

УДК 541.138

**ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ
ПЛАЦЕНТАРНЫХ И МЫШЕЧНЫХ МЕМБРАН**

© 2010 г.

А.И. Варакин, Ю.В. Серянов

Саратовский государственный технический университет

inta@renet.ru

Поступила в редакцию 13.07.2009

Исследованы вольт-амперные характеристики плацентарных и мышечных мембран. Показана адекватность теоретических моделей – уравнений Гольдмана для расчетов потенциалов асимметрии для мембран – экспериментально найденным значениям потенциалов, полученным из кинетических кривых.

Ключевые слова: вольт-амперные характеристики, биологические мембраны, потенциалы асимметрии, уравнения Гольдмана.

Введение

Электрическое поле ускоряет перенос анионов антибиотиков при наложении как положительных, так и отрицательных напряжений, что ранее было обнаружено при экспериментах *in vivo* В.С. Улащиком [1]. При этом для всех исследованных препаратов *in vivo* у катода их определялось на 20–30% больше, чем у анода. На это различие некоторое влияние оказывал знак заряда исследуемого лекарственного вещества: если оно имело положительный заряд, то различия в его накоплении у анода и катода возрастали, а для отрицательно заряженных веществ они, наоборот, сглаживались. Авторы не нашли объяснения и обоснования обнаруженным явлениям.

Основной характеристикой, демонстрирующей влияние внешнего электрического поля на биологическую мембрану, является вольт-амперная характеристика (ВАХ).

Для описания вольт-амперной характеристики биологической мембраны в классическом представлении мембранной теории можно воспользоваться приближением Планка [2], которое для потенциалопределяющих ионов Na^+ и Cl^- имеет вид линейной зависимости

$$I = \frac{RT}{\lambda} \times \frac{[C_{\text{NaCl}}(\lambda) - C_{\text{NaCl}}(0)]}{\ln[C_{\text{NaCl}}(\lambda)/C_{\text{NaCl}}(0)]} \times \left[(U_{\text{Na}^+} + U_{\text{Cl}^-}) \times \frac{FV}{RT} + U_{\text{Na}^+} - U_{\text{Cl}^-} \right] \times \left[\times \ln \frac{C_{\text{NaCl}}(\lambda)}{C_{\text{NaCl}}(0)} \right], \quad (1)$$

где $C_{\text{NaCl}}(0)$ и $C_{\text{NaCl}}(\lambda)$ – концентрации NaCl при $x = 0$ и $x = \lambda$; $C_{\text{Na}^+}(0)$ и $C_{\text{Na}^+}(\lambda)$ – концентрации Na^+ при $x = 0$ и $x = \lambda$; $C_{\text{Cl}^-}(0)$ и $C_{\text{Cl}^-}(\lambda)$ – концен-

трации Cl^- при $x = 0$ и $x = \lambda$, U_{Na^+} и U_{Cl^-} ($\text{м}^2/\text{В}\cdot\text{с}$) – абсолютные подвижности.

В приближении Гольдмана [3] ВАХ биологической мембраны не линейна и может быть описана соотношением:

$$I_{\text{Na}^+} = \frac{U_{\text{Na}^+} V}{\lambda RT} \cdot \frac{C_{\text{Na}^+}(0) - C_{\text{Na}^+}(\lambda) \cdot e^{-\frac{FV}{RT}}}{1 - e^{-\frac{FV}{RT}}} \quad (2)$$

$$I_{\text{Cl}^-} = \frac{U_{\text{Cl}^-} V}{\lambda RT} \cdot \frac{C_{\text{Cl}^-}(0) - C_{\text{Cl}^-}(\lambda) \cdot e^{-\frac{FV}{RT}}}{1 - e^{-\frac{FV}{RT}}}.$$

Целью работы являлось определение электрохимических характеристик плацентарных и мышечных мембран под воздействием электрического поля и оценка их адекватности существующим теоретическим моделям.

Материалы и методы

В качестве моделей барьеров *in vitro* были использованы плацентарные мембраны и продольные срезы мышечных тканей. Методика подготовки мембран и мышечных тканей к эксперименту и двухкамерная ячейка детально описаны в нашей работе [4].

В качестве рабочего был выбран 0.15 М раствор хлорида натрия с добавкой 0.2% антибиотика. Постоянное напряжение задавалось источником тока Б5-47. Измерение протекающих токов проводилось с помощью высокоточного цифрового мультиметра ЦЦ-300. Диапазон рабочих напряжений, создаваемых источником, определялся на основании расчета средней напряженности поля по усредненной толщине биологического барьера. Поэто-

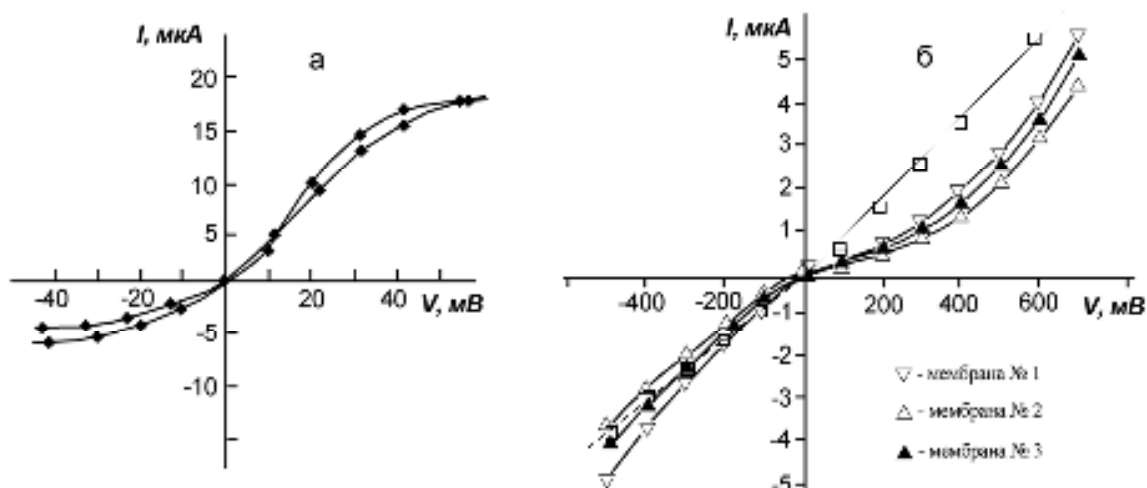


Рис. 1. Сопоставление вольт-амперных характеристик плацентарных (а) и мышечных мембран (б). □ – ВАХ по Планку

му для исследования плацентарных барьеров со средней толщиной 0.1 мм диапазон напряжений составлял $-50 \div +50$ мВ, а для мышечных барьеров толщиной 2 мм варьировался от -700 до $+700$ мВ.

При получении ВАХ мышечного барьера диапазон напряжений ограничивался интервалом $-700 \div +700$ мВ вследствие высокого роста тока при значениях, превышающих эти границы (с мкА до нескольких мА), связанного с началом активных окислительно-восстановительных реакций на электродах. Так как средняя толщина мышечных мембран составляет 2 мм, то этот диапазон приблизительно соответствует напряжению электрического поля порядка 4.6 В/см. Для лекарственного электрофореза, целью которого не является генерация активного вещества (H^+ или OH^- , ClO^- и т.д.), при длительном воздействии постоянного тока ввиду возможности возникновения побочных окислительно-восстановительных реакций следует избегать напряженности внешнего электрического поля между электродами, превышающей этот диапазон.

Результаты и обсуждение

Полученные ВАХ плацентарной мембраны в 0.9%-ном физиологическом растворе с добавкой 0.2% левомецетина (рис. 1а) позволяют заключить, что плацентарные биологические мембраны даже при $|V| < 50$ мВ не подчиняются уравнениям Планка или Гольдмана и обладают отчетливо выраженными «выпрямляющими» свойствами, поскольку их дифференциальное сопротивление переносу катионов Na^+ превышает сопротивление анионному переносу.

При $|V| > 30$ мВ наблюдается переход к области насыщения ВАХ, что может быть связано с конечными константами скоростей вхождения ионов в мембрану и выхода из неё, выражаемыми величинами k_1 и k_2 соответственно. Такое предположение приводит к модифицированным уравнениям Гольдмана:

$$I_{Na^+} = k_1' F \frac{C_{Na^+}(\lambda) \cdot e^{\frac{FV}{RT}} - C_{Na^+}(0)}{e^{\frac{FV}{RT}} + 1 + \frac{\lambda k_2' RT}{FV} (e^{\frac{FV}{RT}} - 1)}$$

$$I_{Cl^-} = -k_1'' F \frac{C_{Cl^-}(\lambda) \cdot e^{\frac{FV}{RT}} - C_{Cl^-}(0)}{e^{\frac{FV}{RT}} + 1 + \frac{\lambda k_2'' RT}{FV} (e^{\frac{FV}{RT}} - 1)},$$

где k_1' и k_2' относятся к переносу катионов Na^+ , а k_1'' и k_2'' – к переносу анионов Cl^- , причем эти уравнения предполагают наличие предельных токов насыщения:

$$I_{Na^+} = k_1' F C_{Na^+}(\lambda),$$

$$I_{Cl^-} = -k_2'' F C_{Cl^-}(\lambda),$$

которые при $C_{Na^+}(\lambda) < C_{Cl^-}(\lambda)$ отвечают экспериментальной ВАХ (см. рис. 1а).

По ВАХ можно оценить удельное сопротивление плацентарного барьера, которое составляет 0.25×10^7 Ом·см, что почти на порядок меньше сопротивления искусственных фосфолипидных мембран, что хорошо согласуется с литературными данными [2].

Экспериментальные вольт-амперные характеристики мышечных мембран (рис. 1б), в от-

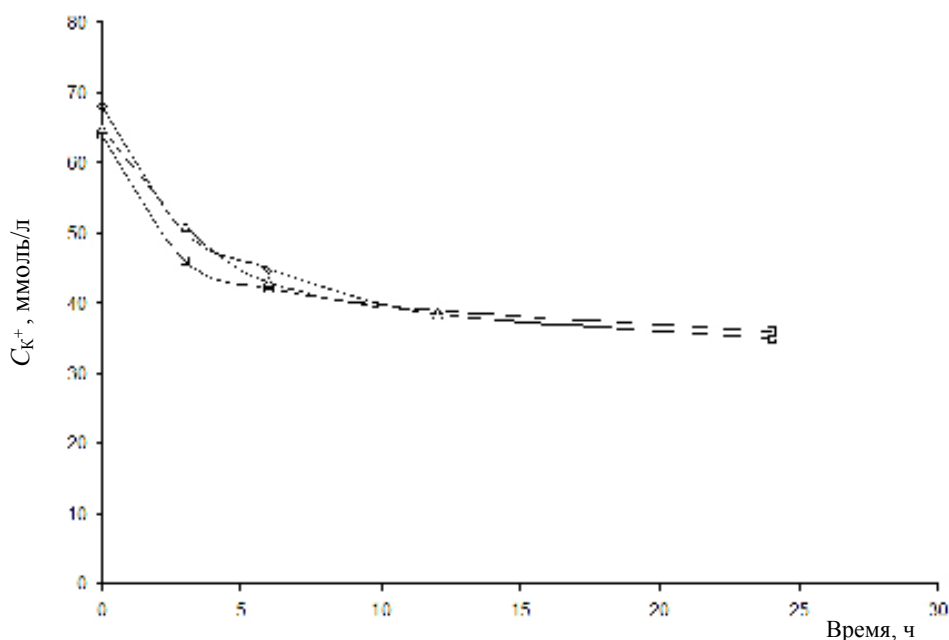


Рис. 2. Изменение содержания K^+ в срезах мышечной ткани от времени вымачивания в изотоническом растворе NaCl

личие от плацентарных, хорошо описываются приближением Гольдмана (2), которое действительно дает неограниченный рост тока как для больших положительных, так и для больших отрицательных напряжений V , при этом катионный и анионный токи равны:

$$I = I_{Na^+} + I_{Cl^-}. \quad (5)$$

Если предположить, что в рассматриваемой системе потенциалопределяющими являются катионы Na^+ и анионы Cl^- с абсолютными подвижностями $U_{Na^+} = 4.6 \cdot 10^{-8}$ и $U_{Cl^-} = 6.8 \cdot 10^{-8} \text{ м}^2/(\text{В} \cdot \text{с})$ [5], то можно рассчитать потенциал асимметрии φ_a (при условиях постоянства напряженности электрического поля и равенства потенциала асимметрии трансмембранному потенциалу $\varphi_a = \varphi_m$) по уравнению Гольдмана:

$$\varphi_a = \frac{RT}{F} \ln \frac{U_{Na^+} C_{Na^+}(0) + U_{Cl^-} C_{Cl^-}(\lambda)}{U_{Na^+} C_{Na^+}(\lambda) + U_{Cl^-} C_{Cl^-}(0)}, \quad (6)$$

где $C_{Na^+}(0)$ и $C_{Na^+}(\lambda)$ — концентрации Na^+ при $x = 0$ и $x = \lambda$; $C_{Cl^-}(0)$ и $C_{Cl^-}(\lambda)$ — концентрации Cl^- при $x = 0$ и $x = \lambda$.

Полагая, что, $C_{Na^+}(0) = C_{Cl^-}(0) = 0.15 \text{ М}$ и $C_{Na^+}(\lambda) = 0.06 \text{ М}$, $C_{Cl^-}(\lambda) = 0.05 \text{ М}$ (соответствуют реальным концентрациям в эксперименте), получаем по уравнению (6) $\varphi_a = 7 \text{ мВ}$, что хорошо согласуется с потенциалами асимметрии, полученными из кинетических кривых для плацентарных мембран, но по порядку величины не отвечает потенциалам асимметрии мышечных биологических мембран ($\varphi_a = 89\text{--}130 \text{ мВ}$), полу-

ченным из кинетических кривых в нашей работе [4].

Для объяснения этого факта можно воспользоваться предположением о накоплении ионов K^+ в А-дисках миофибрилл, т.е. влиянием K^+ как потенциалопределяющего иона.

Для подтверждения сохранения ионов K^+ в мышечной мембране и их определяющей роли в величине потенциала асимметрии мембраны мышечной ткани нами проведено определение ионов калия в срезах мышечной ткани, выдерживаемых в 0.9%-ном растворе хлористого натрия. Результаты эксперимента демонстрирует рис. 2.

Как видно из рис. 2, за первые 3.5 часа мышечная ткань теряет в среднем до 25% K^+ , в течение последующих 21 ч теряется только 27%. Таким образом, за 24 ч теряется не более 54% K^+ , что соответствует выводам о накоплении и сохранении ионов калия в миозине миофибрилл, сделанным в работах Трошина [6], а значения концентраций K^+ очень близки к результатам, полученным в работах [7–8].

Согласно этим данным, мы можем применить приближение Гольдмана–Ходжкина–Катца [9–10] с дополнительными допущениями о полном вытеснении катионов Na^+ из мышечной ткани и влиянии потенциалов Доннана [11]. При этом выражение для потенциала асимметрии принимает вид:

$$\varphi_a^M = \frac{RT}{F} \ln \frac{C_{K^+}(0) \cdot C_{K^+}(\lambda)}{C_{Cl^-}^2(\lambda)} + 2 \frac{\Delta H_{Cl^-}^M}{F}. \quad (7)$$

При характерных для мышечных тканей концентрациях $C_{K^+}(0) = 0.002$ М и $C_{K^+}(\lambda) = 0.06$ [7–8] М и $T = 310$ К на основании соотношения (7) имеем величину $\varphi_a^M = 94.4$ мВ, весьма близкую к экспериментальным значениям, полученным для мышечных биологических мембран. $\Delta H_{Cl^-}^M = 0.72$ кДж/моль отвечает при этом молярной энергии выталкивания анионов Cl^- при поглощении катионов K^+ связывающими центрами миофибриллярных толстых нитей саркомеров миофибрилл.

Таким образом, по результатам исследования ВАХ можно ожидать существенного различия между механизмами переноса в плацентарных и мышечных биологических мембранах.

Потенциал асимметрии, вычисленный с применением приближения Гольдмана и при учете доннановского концентрационного потенциала, соответствует величинам, полученным нами из кинетических кривых.

Список литературы

1. Улащик В.С. Физические факторы как модуляторы действия лекарственных средств // Наука и инновации. 2008. № 1. С. 59–62.
2. Маркин В.С., Чизманджев Ю.А. Индуцированный ионный транспорт. М: Химия, 1974. 251 с.
3. Райгородский Ю.М., Серянов Ю.В., Лепилин А.В. Форетические свойства физических полей и приборы для оптимальной физиотерапии в урологии, стоматологии и офтальмологии. Саратов: Изд-во Саратовского ун-та, 2000. С. 11–103.
4. Варакин А.И., Лясников В.Н. Исследование проницаемости мышечных тканей по отношению к анионам оксациллина, бензилпенициллина и левомицетина при различной температуре // Изв. вузов. Сер. Химия и химическая технология. 2003. Т. 46. Вып. 8. С. 130–134.
5. Добош Д. Электрохимические константы. Пер. с англ. / Под ред. Я.М. Колотыркина. М.: Наука, 1980. 365 с.
6. Трошин А.С. Распределение веществ между клеткой и средой. Л.: Наука, 1985. 194 с.
7. Bozler E. Electrolytes and osmotic balance of muscle in solutions of nonelectrolytes // Amer. J. Physiol. 1961. V. 200. P. 656–657.
8. Greese R. Measurement of cation fluxes in rat diaphragm // Proc. Roy. Soc. London. 1954. V. 142B. P. 497–513.
9. Ходжкин А. Нервный импульс. Пер. с англ. Л.М. Цофиной / Под ред. и с предисл. д-ра биол. наук. Е.А. Либермана. М.: Наука, 1965. 125 с.
10. Катц Б. Нерв, мышца и синапс. Пер. с англ. / Под ред. и с предисл. д-ра биол. наук В.С. Гурфинкеля. М.: Наука, 1968. 220 с.
11. Edelman L. // Physiol. Chem. Phys. and Med. 1983. V. 15. P. 337–341.

ELECTROCHEMICAL CHARACTERISTICS OF PLACENTAL AND MUSCLE MEMBRANES

A.I. Varakin, Yu.V. Seryanov

Voltage-current characteristics of placental and muscle membranes have been studied. The adequacy of theoretical models (the Goldman equations to calculate asymmetry potentials of membranes) to experimental potential values obtained from kinetic curves has been shown.

Keywords: voltage-current characteristics, biological membranes, asymmetry potentials, the Goldman equation.