

УДК 576.3.08

© А. Г. Варехов

ПОТЕНЦИОМЕТРИЧЕСКИЕ ИЗМЕРЕНИЯ ТРАНСМЕМБРАННОГО ПОТЕНЦИАЛА КЛЕТОК С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПРОНИКАЮЩИХ ИОНОВ

В статье обсуждаются методические ограничения, возникающие при потенциометрических измерениях трансмембранного потенциала клеток с использованием проникающих (липофильных) ионов. Произведен анализ экспериментальных результатов измерений трансмембранного потенциала бактериальных клеток *B. subtilis* при действии грамицидина А, полученных с использованием ТФФ⁺-селективного мембранного электрода. Анализ основан на предположении о почти обратимой адсорбции индикаторных катионов на клеточной поверхности. Показано, что результатом таких измерений является не трансмембранный, а значительно больший по величине дипольный потенциал мембраны. Предлагается способ оценки изменений мембранного потенциала с использованием для расчета необратимо связанной части проникающих ионов, иммобилизованных в мембранных каналах при действии грамицидина. Вычислены поверхностная плотность адсорбированного заряда, концентрация мест связывания индикаторных катионов и параметры двойного электрического слоя.

Кл. сл.: потенциометрические измерения, грамицидин, ТФФ⁺-селективный электрод, дипольный потенциал, трансмембранный потенциал

ВВЕДЕНИЕ

Косвенные методы измерения трансмембранного потенциала с использованием проникающих (липофильных) ионов стали активно использоваться при исследовании энергетического сопряжения на митохондриальных мембранах [1]. При использовании таких ионов, в частности катионов тетрафенилфосфония ТФФ⁺ (TRP⁺), несущих делокализованный положительный заряд, были получены многочисленные важные научные результаты. В самое последнее время исследована [2] специфическая функция ТФФ⁺ как ингибитора выхода ионов Ca²⁺ из митохондрий клеток сердечной мышцы, что способствует энергоснабжению.

Эти измерения стали актуальными и для бактериальных клеток как с точки зрения исследования мембранной энергетики, так и для оценки жизнеспособности клеточных популяций. Исследования с использованием проникающих ионов способствовали также развитию детальных представлений о строении периферической области клеток и органелл. Эта область представляет собой, как правило, морфологически сложную слоистую концентрическую структуру с непрерывным электрическим потенциальным профилем, включая локальные скачки потенциала на границах отдельных слоев. Электрический потенциальный

профиль в целом отражает как пассивные (абиогенные) свойства клеточной периферии, так и процессы, связанные с энергетическим метаболизмом.

Косвенные методы измерения основаны на использовании химических агентов, действие которых сводится к энергизации или деэнергизации клеток и органелл. Это прежде всего активация или ингибирование сопряженных процессов дыхания (переноса электронов) и фосфорилирования или разобщение обоих этих процессов. Такими агентами являются некоторые липофильные фенолы (например, 2,4-динитрофенол, разобщающее действие которого известно очень давно), а также некоторые антибиотики, стимулирующие или подавляющие дыхание и фосфорилирование.

В этой работе использовался шунтирующий мембрану для катионов H⁺, K⁺, Na⁺ и (селективно) ТФФ⁺ ионофорный антибиотик (порообразующий токсин) грамицидин, угнетающий энергизацию клеток (фосфорилирование), не подавляя или умеренно подавляя (при накоплении в клетке K⁺) при этом дыхание. Спиральный пептид грамицидин А, продуцируемый бактерией *Bacillus brevis*, состоит из 15 аминокислот и встраивается в мембранный бислой таким образом, что две его спирали, соприкасающиеся своими концами, образуют сквозной трансмембранный ионный канал. При этом диаметр (просвет) канала равен 4 Å, а длина,

равная $2 \times 30 = 60 \text{ \AA}$, должна (для максимальной проницаемости) близко соответствовать толщине мембраны. Селективность (проницаемость) такого канала, определяемая радиусом витков спирали, для однозарядных ионов представлена рядом $\text{H}^+ > \text{NH}_4^+ > \text{Cs}^+ > \text{Rb}^+ > \text{K}^+ > \text{Na}^+ > \text{Li}^+$, т. е. наиболее выражена для протонов [3]. При этом ионный радиус протона H^+ ($0.38 \text{ \AA}$) примерно в 4 раза меньше ионного радиуса ближайшего к протону по проницаемости катиона аммония NH_4^+ ($1.46 \text{ \AA}$) и примерно в 10 раз меньше ионного радиуса катиона TFF^+ (около $4 \text{ \AA}$). Таким образом, можно предполагать однорядовый механизм диффузионного продвижения катионов TFF^+ вдоль мембранного канала, образованного грамицидином.

ПОСТАНОВКА ЗАДАЧИ

Проблема измерения мембранного потенциала косвенными методами (главным образом потенциометрическим и флуоресцентным) связана с тем, что распределение связанных с клеткой зондирующих (индикаторных) ионов в направлении от поверхности клетки внутрь, как правило, неизвестно. Первоначально при использовании TFF^+ предполагалось [4–7], что весь измеренный потенциометрически, т. е. с использованием TFF^+ -селективного электрода, связанный клетками пул катионов благодаря липофильности оказывается в цитоплазматическом матриксе. Однако предположение о том, что липофильность сама по себе может обеспечить пассивную диффузию зондирующих ионов в клетку, физически не обоснована. Оставались непонятными все физические процессы, происходящие на поверхности и в периферическом слое, граничащем с мембраной. Использование формулы Нернста позволяло сразу вычислить разность потенциалов, однако было недостаточным для того, чтобы считать ее трансмембранной. Усложнения формулы Нернста [4, 5] позволяли уточнить результат, однако это требовало многих дополнительных данных, например точного знания объема внутриклеточной воды [4].

В вычислениях мембранного потенциала светочувствительных клеток *Rhodospseudomonas spheroides* пул поглощенного TFF^+ разделялся на свободную и связанную части с разными концентрациями [8]. В расчетное соотношение для мембранного потенциала, полученное с использованием закона действующих масс, входили такие параметры, как доля инкубационного объема, занятого клетками, а также и обе концентрации. В другой статье той же группы исследователей [9] на том же биологическом материале утверждалось, что 47 % мест связывания TFF^+ находится на внутренней стороне цитоплазматической мембраны,

а 53 % — на внешней стороне. Таким образом, предполагалось, что весь связанный материал находился на мембране, но не в цитоплазме. Отметим, что с принципиальной точки зрения уравнение Нернста отражает только постоянство электрохимического потенциала при наличии в электролите концентрационного градиента ионов определенного вида или разности потенциалов между двумя водными отсеками, разделенными проницаемой для этих ионов перегородкой, но ничего не говорит о характере связывания. Кроме того, если одна из концентраций неограниченно убывает, равновесная разность электрических потенциалов неограниченно возрастает.

Несколько позже более частым способом измерения мембранного потенциала стало применение флуоресцентных техник, например, с использованием положительно заряженных карбоцианинов (дипропилтиодикарбоцианин $\text{DiSC}_3(5)$ и другие) [10]. Однако и в этом случае увеличение или уменьшение уровня флуоресценции отражает только свойства микроокружения (полярность и вязкость) хромофора красителя в области связывания и соответственно квантовый выход флуоресценции, но не связаны с локализацией мест связывания красителя и механизмами связывания.

МЕТОДИКА И РЕЗУЛЬТАТЫ

В этой работе использовался достаточно стабильный потенциометрический мембранный электрод, селективный по отношению к катионам TFF^+ , разработанный на кафедре биохимии и биофизики Вильнюсского университета [11].

Электрод представляет собой структурную матрицу на основе материала стекловолоконистых фильтров марки Whatman GF/F, пропитанную раствором ионообменного комплекса тетрафенилфосфоний—тетрафенилборат ($\text{TFF}^+ - \text{TFB}^-$) в тетрагидрофуране. Эта плоская структура с обеих сторон покрывалась слоем поливинилхлорида, для чего последний также растворялся в тетрагидрофуране с небольшой добавкой диоктилфталата. Электрод выполнялся в виде стеклянной трубочки, запаянной с одного конца упомянутой выше стекловолоконистой матрицей, и заполнялся изнутри 10^{-2} М раствором TFF в воде. Для электрического контакта служил стандартный хлорсеребряный электрод сравнения, сочленяемый после его предварительной разборки с трубочкой измерительного электрода. Другим электрическим контактом служил еще один хлорсеребряный электрод сравнения, помещаемый в инкубационную среду. Измерительная цепь замыкалась через электролитический ключ. Селективность электрода по отношению к ближайшему аналогу TFF^+ трифенилметилфосфоний (TФМФ^+) составляла $3 \cdot 10^{-2}$.

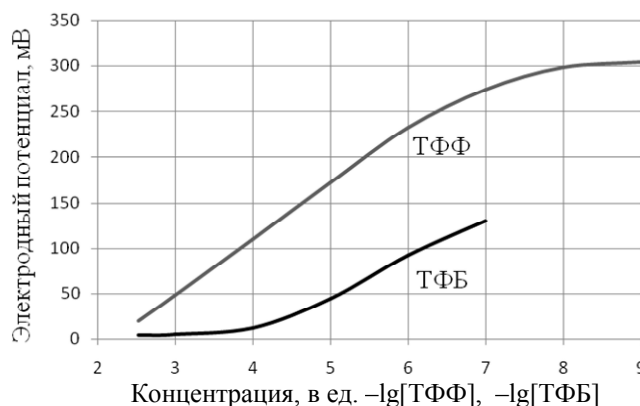


Рис. 1. Зависимость электродного потенциала от концентрации ТФФ и ТФБ в инкубационной среде.

Концентрация во внутреннем объеме электрода 10^{-2} М

По отношению ко всем остальным компонентам включая NaCl, Трис-HCl, $MgSO_4$, глюкозу, АТФ и многие другие — не более $3 \cdot 10^{-5}$ [4].

На рис. 1 представлены концентрационные характеристики электрода по отношению к TFF^+ и TFB^- , откуда следует, что метрологические свойства катион-селективного электрода с точки зрения диапазона измерений и линейности существенно лучше, чем анион-селективного. Из рис. 1 также следует, что в диапазоне концентраций от 10^{-6} М до значения 10^{-3} М или несколько большего значения TFF^+ -селективный электрод является нернстовским с угловым коэффициентом прямой, равным 59.1 мВ на декаду. Изменения электродного потенциала в диапазоне значений $pH 7.0 \pm 0.5$ составляли не более 2 мВ.

Рис. 2 показывает характер потенциометрического эксперимента, необходимого для расчетов трансмембранного потенциала. Добавление в инкубационную среду (физиологический раствор) интактных клеток *B.subtilis* приводит к связыванию (сорбции) индикаторных катионов. Изменение потенциала измерительного электрода после добавления клеток составляло $\Delta\varphi_s = 1$ мВ. Последующее добавление грамицидина в концентрации 4–6 мкМ соответствует десорбции связанных катионов. Оба процесса сорбции и десорбции почти обратимы с точностью до небольшого по величине потенциала $\Delta\varphi_d$, обозначаемого [4] как доннановский и связанного с невозможностью выхода во внешнюю среду части сорбированных катионов, иммобилизованных в углеводородном ядре мем-

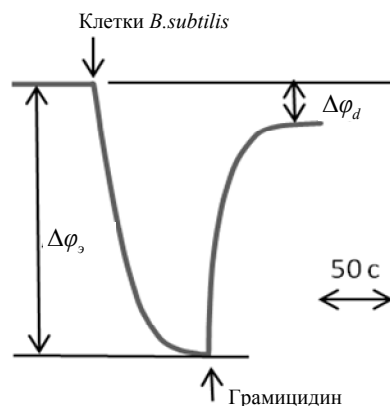


Рис. 2. Изменение электродного потенциала при связывании (сорбции) индикаторных катионов TFF^+ клетками *B.subtilis* и потере (десорбции) при действии грамицидина.

Концентрация TFF^+ в инкубационной среде (физиологический раствор) — 10^{-5} М; концентрация клеток (по сухому весу) — 0.56 мг·мл $^{-1}$; концентрация грамицидина — 5.85 мкМ

браны и на ее внутренней стороне. Добавление грамицидина инициирует процесс образования мембранных каналов (пор), который ведет к деэнергизации мембраны и к инаktivации клеток. Порообразование порождает, во-первых, конкурентное (по отношению к катионам TFF^+) связывание протонов в поверхностном слое и соответственно выход во внешнюю среду индикаторных катионов, а, во-вторых, относительно медленное частичное поглощение их мембраной.

Процедура расчета трансмембранного потенциала сводилась [4] к следующим действиям. Добавление интактных клеток *Bacillus subtilis* позволяло измерить электродный потенциал $\Delta\varphi_s$ и далее определить концентрацию C_2^{out} индикаторных катионов после окончания (около 100 с) процесса связывания их с клетками в среде с исходной концентрацией C_2^{in} на основании формулы Нернста:

$$\Delta\varphi_s = \frac{RT}{nF} \ln \frac{C_2^{in}}{C_2^{out}},$$

где $RT/nF = kT/e = 25.7$ мВ ($T = 298$ К).

Для расчета использовалась та часть изменения концентрации TFF^+ в суспензии клеток *Bacillus subtilis*, которая связана с действием на клетки грамицидина. Эта часть, соответствующая изменению электродного потенциала, равного $\Delta\varphi_s - \Delta\varphi_d$, в конкретном случае составляла 2.49 нМ в расчете на 1 мл суспензии. Первона-

чально предполагалось, как уже было отмечено ранее, что действие грамицидина приводит к проникновению катионов TFF^+ в цитоплазму клеток. Далее вычислялся общий объем цитоплазматического матрикса в расчете на 1 мл суспензии при известной концентрации клеток. Таким образом определялись величина сухого веса клеток (0.56 мг в расчете на 1 мл суспензии) и соответствующий объем внутриклеточной воды (2 мкл на 1 мл суспензии). Это давало значение эквивалентной концентрации TFF^+ в клетке, равное в данном случае $C_{\text{кл}}^{\text{in}} = 2.49 / (0.56 \cdot 2) = 2.22 \text{ мМ}$. Трансмембранный потенциал определялся из соотношения

$$\Delta\varphi_{\text{м}}^{\text{кл}} = -k_{\varphi} \ln \frac{C_{\text{кл}}^{\text{in}}}{C_{\text{кл}}^{\text{out}}}, \quad (1)$$

в котором $k_{\varphi} = kT / e = 25.7 \text{ мВ}$; $C_{\text{кл}}^{\text{out}} = 5.85 \text{ мкМ}$ — концентрация TFF^+ в инкубационной среде. Вычисления дают значение $\Delta\varphi_{\text{м}}^{\text{кл}} \cong -152.6 \text{ мВ}$. Знак (минус) соответствует цитоплазматическому матриксу. Это значение находится в согласии с большой совокупностью экспериментальных данных измерений трансмембранного потенциала для соприкасающихся мембран различной природы.

Существуют некоторые противоречия относительно корректности такой процедуры расчета. Поскольку детали распределения связанных катионов неизвестны, достоверным, по-видимому, можно считать только утверждение, что особенности связывания и количество связанных клетками катионов каким-то образом зависят от трансмембранной разности потенциалов и, следовательно, от уровня энергетического метаболизма. Таким образом, вычисленное значение $\Delta\varphi_{\text{м}}^{\text{кл}}$ определяет не трансмембранный потенциал, а суммарную разность потенциалов между цитоплазмой и водным окружением клетки, т. е. алгебраическую сумму всех компонентов трансмембранного потенциального профиля.

Рассмотрим далее потенциометрический ответ электрода, исходя из предположения об адсорбции TFF^+ на клеточной поверхности. Косвенно об этом свидетельствует почти обратимый (с точностью до доннановского потенциала цитоплазмы) характер ответов при последовательном добавлении клеток и грамицидина, показанный на рис. 2. Обсуждаемый ниже подход основан на следующих положениях.

1. Физиологически активная часть бактериальной клетки с дыхательным типом энергетики, т. е. плазматическая мембрана, несущая трансмембранную разность потенциалов, поляризует периферическую область клетки, граничащую с ее водным окружением. Эта поляризация определяет

совместно с пассивными (абиогенными) свойствами периферии величину отрицательных поверхностного и электрокинетического потенциалов.

2. Индикаторные катионы TFF^+ , несущие де-локализованный электрический заряд, благодаря чему ослабляется кулоновское взаимодействие катиона с полимерной решеткой периферии, образуют на поверхности плотный двойной электрический слой вместе с анионными группами клеточной периферии, но не проникают в цитоплазматический матрикс.

3. Грамицидин образует в плазматической мембране каналы; присутствие сорбированных катионов TFF^+ делает внешнюю поверхность плазматической мембраны липофильной, что, как известно [3], необходимо для образования трансмембранных каналов.

4. Образование мембранных каналов, проницаемых для протонов, приводит к шунтированию трансмембранной разности потенциалов и частичной или полной деполяризации поверхности клетки.

5. Деполяризация поверхности приводит, во-первых, к деструкции двойного электрического слоя и выходу сорбированных катионов во внешний водный объем, а, во-вторых, к однорядовому диффузионному продвижению части этих катионов в каналах (порах) к внутренней поверхности мембраны.

6. Накопление в порах положительного пространственного заряда устанавливает равновесное распределение катионов по длине поры, т. е. равенство химического и электрического потенциалов этих катионов.

Пусть концентрация проникающих ионов $C(r)$ убывает при удалении от наружной границы сферической клетки радиуса $r = a$ внутрь. При этом удовлетворяется условие сохранения числа частиц (ионов), записываемое в форме

$$\int_a^{a-\delta} C(r) 4\pi r^2 dr = C_{\text{кл}}^{\text{in}} \frac{4}{3} \pi (a - \delta)^3, \quad (2)$$

где δ — толщина клеточной периферии; $C_{\text{кл}}^{\text{in}}$ — значение концентрации из (1). Выполнение условия сохранения в данном контексте сводится к тому, что все поглощенные ионы размещаются в объеме клеточной периферии (клеточная стенка плюс мембрана для бактериальных клеток). Пусть теперь для простоты концентрация выражается экспоненциальной формой

$$C(r) = C_m \exp[-\alpha(a - r)],$$

где α — параметр, показывающий скорость убывания концентрации, C_m — граничная концентрация при $r = a$. Таким образом, вся периферическая

ская область клетки предполагается однородной средой, не имеющей внутренних границ раздела. Это предположение оказывается тем более верным, чем меньше толщина адсорбированного слоя. После интегрирования в левой части (2) при условиях $a - \delta \cong a$ и $\exp(-\alpha\delta) \ll 1$ получаем уравнение

$$C_m \left(\frac{a^2}{\alpha} + \frac{2a}{\alpha^2} + \frac{2}{\alpha^3} \right) \cong C_m \frac{a^2}{\alpha} = \frac{1}{3} C_{\text{кл}}^{\text{in}} a^3,$$

или

$$\frac{C_m}{C_{\text{кл}}^{\text{in}}} = \frac{1}{3} \alpha a. \quad (3)$$

Определим далее ход электрического потенциала в поверхностном слое клетки, соответствующий принятой экспоненциальной концентрационной зависимости. Рассмотрим элементарный участок dr , расположенный внутри периферического слоя толщины δ . Из уравнения (1) при условии $r < a$ элементарное приращение потенциала выражается следующим образом:

$$\begin{aligned} d\varphi &= k_\varphi \ln \frac{C(r) - dC}{C(r)} \cong -k_\varphi \frac{dC}{C(r)} = \\ &= -k_\varphi \frac{\partial C(r) / \partial r}{C(r)} dr \end{aligned} \quad (4)$$

(здесь $dC > 0$).

Это же соотношение следует непосредственно из определения химического потенциала:

$$d\varphi = \frac{RT}{nF} d[\ln C(r)] = k_\varphi \frac{\partial C(r) / \partial r}{C(r)} dr$$

(здесь $dC < 0$).

При экспоненциальном законе убывания концентрации интегрирование выражения (4)

$$\int_{\varphi_s}^{\varphi(r)} d\varphi = -k_\varphi \int_a^r \frac{\alpha C_m \exp[-\alpha(a-r)]}{C_m \exp[-\alpha(a-r)]} dr$$

приводит к линейной зависимости вида

$$\varphi(r) = \varphi_s + k_\varphi \alpha (a - r). \quad (5)$$

Концентрационная зависимость $C(r)$ и ход потенциала $\varphi(r)$ в периферическом слое клетки, а также и линейная зависимость (5) иллюстрируют рис. 3.

Из этой зависимости, в частности, следует, что в общем случае потенциал может неограниченно

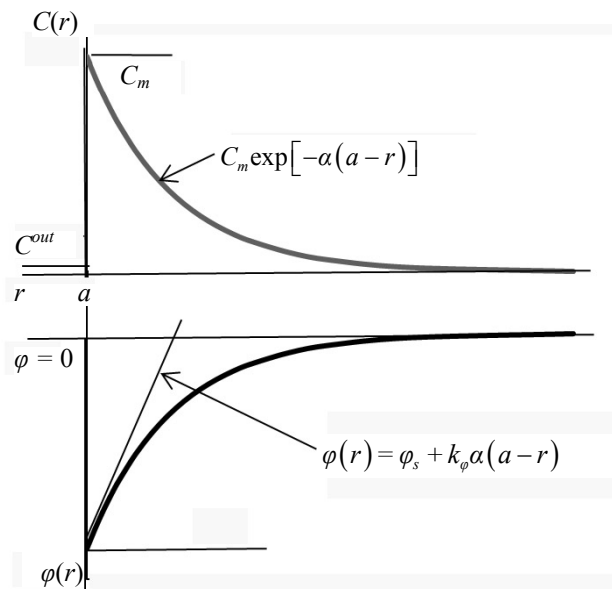


Рис. 3. Зависимость концентрации индикаторных катионов ТФФ^+ и генерируемого ими потенциала при удалении внутрь от внешней границы клетки

возрастать, что не соответствует физическому смыслу. Такое неограниченное возрастание потенциала имеет место в силу ограничения, содержащегося в исходном уравнении (1), т. е. неограниченного возрастания потенциала в случае, если одна из концентраций ($C_{\text{кл}}^{\text{in}}$) неограниченно убывает. Это обстоятельство уже отмечалось выше. Поскольку одновременно удовлетворяется уравнение Пуассона

$$\nabla^2 \varphi = \frac{-\varepsilon}{\varepsilon_0} \rho(r) = \frac{-\varepsilon e}{\varepsilon_0} C(r) \quad (e = 1.6 \cdot 10^{-19} \text{ Кл}), \quad (6)$$

которое дает при экспоненциально убывающей концентрации экспоненциально убывающий потенциал, мы будем считать, что асимптотическое поведение потенциала определяется именно уравнением (6). Интегрирование (6) в сферических координатах при условиях

$$\nabla^2 \varphi = \frac{\partial^2 \varphi}{\partial r^2} \quad \text{и} \quad C(r) = C_m \exp[-\alpha(a-r)]$$

приводит к соотношению

$$\varphi(r) = \frac{-\varepsilon e}{\varepsilon_0 \alpha^2} C_m \exp[-\alpha(a-r)] + C_1 r + C_2.$$

При выполнении условия $a - r \gg l$, т. е. в пределах клеточной периферии $C_1 = C_2 = 0$; другое

граничное условие, т. е. равенство $\varphi = \varphi_s$ при $r = a$ дает в результате уравнение

$$\varphi_s = \frac{-\varepsilon e}{\varepsilon_0 \alpha^2} C_m. \quad (7)$$

Таким образом, если известна величина поверхностного потенциала φ_s , то система уравнений

$$\begin{aligned} \frac{C_m}{C_{\text{кл}}^{\text{in}}} &= \frac{1}{3} \alpha a, \\ \varphi_s &= \frac{-\varepsilon e}{\varepsilon_0 \alpha^2} C_m \end{aligned} \quad (8)$$

определяет оба параметра концентрационной зависимости α и C_m . Отметим, что именно поверхностный потенциал и поверхностный заряд определяют проводимость мембранных каналов, в том числе каналов, образованных грамицидином А [12].

Необходимые параметры концентрационной зависимости α и C_m получаются при совместном решении уравнений (7) и (3). Для этого необходимо задаться значением φ_s . Для оценочных расчетов можно воспользоваться значением электрокинетического потенциала (ζ -потенциала) для границы раздела "жирная кислота—вода", равного $\zeta = -120$ мВ [13]. Имеются основания считать [14], что граница раздела "вода—неполярный растворитель" может рассматриваться как модель границы раздела "вода—липидная мембрана" с диэлектрической проницаемостью в граничном слое, равной 2–3.

С другой стороны, можно использовать вычисленное выше значение трансмембранного потенциала $\Delta\varphi_M^{\text{кл}} = -152.6$ мВ и считать его равным поверхностному потенциалу клетки φ_s . Значение относительной диэлектрической проницаемости ε оценим, исходя из величины удельной емкости бислоя $0.7 \div 1.0$ мкФ·см⁻² [12]. Используя значения $\varepsilon = 5$, $\varepsilon_0 = 8.85 \cdot 10^{-12}$ Ф·м⁻¹, совместное решение (3) и (7) дает значения $l = 1/\alpha \approx 0.038$ Å и $C_m = 1.95 \cdot 10^2$ М (в молях на литр). Нетрудно подчитать, что один адсорбированный катион занимает площадь, равную примерно 17×17 Å. Если принять среднюю площадь в расчете на одну молекулу липида равной 52 Å², как это принято в модельных расчетах [15], то, следовательно, в поверхностной решетке один сорбирующийся катион располагается в окружении 5–6 полярных (карбокисильных) фрагментов липидов.

Вычисленная малая величина l представляет собой на самом деле результат усреднения по поверхности двойного электрического слоя, если считать, как это принято в адсорбционной модели Штерна, что максимальная реальная толщина слоя в месте контакта определяется размерами катионов ТФФ⁺ (4 Å). При этом эквивалентная толщина слоя, вычисленная как длина ребра кубического объема $17 \times 17 \times 0.038$ Å, составляет 2.2 Å. Очевидно, что при столь малых значениях l весь процесс представляет собой однослойную (лэнгмюровскую) адсорбцию с дополнениями модели Штерна. Таким образом, можно предположить, что связывание индикаторных катионов происходит в тонком (2–3 Å) поверхностном слое (слой Штерна), связанном с мембраной малоподвижной воды. Для такой воды характерен крайне низкий коэффициент самодиффузии (10^{-7} см²·с⁻¹ по сравнению со значением 10^{-5} см²·с⁻¹ для свободной воды [15]), что и способствует стабилизации двойного слоя.

Отмеченную выше специфическую функцию ТФФ⁺ как блокатора кальциевого обмена



препятствующего выходу кальция из митохондрий, по-видимому, можно рассматривать как дополнительное свидетельство в пользу сорбционного механизма связывания.

Величина концентрации C_m , соответствующая тому же количеству поглощенного материала, что и вычисленное исходя из значения внутриклеточной концентрации $C_{\text{кл}}^{\text{in}}$, стала несоизмеримо больше. Соответственно отношение обеих концентраций определяется теперь отношением объема цитоплазмы и объема плотного тонкого адсорбированного слоя индикаторных катионов.

Если теперь вернуться к (1) и подставить вместо $C_{\text{кл}}^{\text{in}} = 2.22$ мМ значение $C_m = 1.95 \cdot 10^2$ М, получим $\Delta\varphi_M^{\text{кл}} = \varphi_s = -445.2$ мВ. Затем из (7) совместно с (3) снова находим $l = 0.1104$ Å, $C_m = 67$ М, $\varphi_s = -417.8$ мВ и так далее. Конец итераций (пять шагов) соответствует с высокой точностью значениям $C_m = 71.6$ М, $l = 0.104$ Å, $\varphi_s = -419.2$ мВ. При этом эквивалентная толщина адсорбированного слоя, вычисленная тем же способом, как и выше, составит 3.1 Å. Это значение достаточно близко к размеру сорбирующихся ионов. Если считать, возвращаясь к действию грамицидина (рис. 2), что часть сорбированных катионов, определяемая изменением электродного потенциала $\Delta\varphi_d$, поглощается мембраной и располагается в порах и на ее внутренней поверхности,

то можно определить изменение трансмембранного потенциала, определяющего деполяризующее мембрану воздействие грамицидина.

Для наглядности представим изменение электродного потенциала в виде суммы $\Delta\varphi_s = (\Delta\varphi_s - \Delta\varphi_d) + \Delta\varphi_d$, где первое слагаемое, измеряемое непосредственно, и второе принципиально неизмеримое слагаемое определяют доли исходной концентрации C_s^{out} катионов, возвращающихся благодаря десорбции в инкубационную среду и поглощенных мембраной. Обозначим эти доли соответственно, как $1-x$ и x , так что $C_s^{out} = (1-x)C_s^{out} + xC_s^{out}$, где первое и второе слагаемые в правой части равенства представляют собой концентрации, установившиеся после окончания переходного процесса. Для рассматриваемого конкретного случая (рис. 2) $\Delta\varphi_s - \Delta\varphi_d = 0.88 \text{ мВ} = k_\phi \ln [C_s^{out} / C_s^{out} (1-x)] = k_\phi \ln [1 / (1-x)]$, откуда следует значение $x = 0.0337$. Деполяризующая мембрану разность потенциалов определяется соответственно выражением $\Delta\varphi_{dep} = k_\phi \ln [xC_s^{out} / (1-x)C_s^{out}] = k_\phi \ln [x / (1-x)] = -86.24 \text{ мВ}$. Знак (минус) соответствует внутренней поверхности мембраны. При этом предполагается, что вдоль мембранного канала сохраняется постоянство электрохимического потенциала поглощенных катионов.

Вычислим теперь поверхностную плотность адсорбированного заряда. Для конечного значения концентрации $C_m = 71.6 \text{ М}$ в адсорбированном слое индикаторных катионов ТФФ^+ получим значение площади в расчете на один катион, равное примерно $15 \times 15 \text{ \AA}$. Следовательно, поверхностная плотность адсорбированного электрического заряда равна $\sigma \cong 0.07 \text{ Кл} \cdot \text{м}^{-2}$. Максимальная плотность отрицательного поверхностного заряда для бислоя на основе фосфатидилсерина (PS), определяющая число центров связывания для одновалентных ионов, оценивается [16] величиной $\sigma_{max} = 0.23 \text{ Кл} \cdot \text{м}^{-2}$. Таким образом, в рассматриваемом расчетном примере только около одной трети центров связывания на поверхности бислоя заняты адсорбированными ионами.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ

Полученное расчетным путем значение поверхностного потенциала соответствует, по всей вероятности, дипольному потенциалу. Происхождение дипольного потенциала связано с ориентацией дипольных моментов полярных групп липидов и гидроксильных ассоциированных с ними моле-

кул воды. Дипольный потенциал возрастает от внешней границы клетки в направлении неполярного углеводородного ядра мембраны. Экспериментально измерены [17] значения дипольного потенциала для границы "мономолекулярная пленка фосфатидилхолин—вода", равного 400 мВ, и потенциала для границы липидного бислоя в воде, равного 280 мВ. Таким образом, именно дипольный потенциал определяет высоту 400 мВ потенциального барьера, препятствующего проникновению катионов ТФФ^+ в мембрану. Это значение достаточно близко соответствует оценке примерно 360 мВ, найденной Френкелем для поверхностного потенциала микронных водных капель. Для расчета этого потенциала использовалось соотношение $\varphi_s = n_d \delta p_r / \epsilon_0$ (n_d, δ, p_r — соответственно объемная концентрация диполей, толщина двойного слоя и проекция дипольного момента на радиальное направление сферической частицы) [18]. Общая оценка дипольного потенциала лежит еще выше, т. е. в пределах от 400 до 700 мВ [17].

Дипольный потенциал не может быть измерен непосредственно, но его изменения при адсорбции индикаторных катионов определяются измеримыми электрокинетическим и поверхностным потенциалами, зависящими, в свою очередь, от величины трансмембранного потенциала.

Таким образом, основные выводы статьи сводятся к следующим положениям:

- 1) измеряемый с помощью ТФФ^+ -селективного электрода потенциал соответствует, по всей вероятности, значению периферического дипольного потенциала;
- 2) предположение об адсорбционном характере связывания индикаторных катионов с мембраной позволяет вычислить сначала долю поглощенных катионов, определяющую изменение мембранного потенциала клеток, а затем и само изменение мембранного потенциала при действии деэнергизирующих агентов, в частности, порообразующего токсона грамицидина А.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Liberman E.A., Topali V.P., Tsofin L.M. et al. Mechanism of coupling of oxidative phosphorylation and the membrane potential of mitochondria // Nature. 1969. Vol. 222. P. 1076–1078.
2. Тренделева Т.А., Рогов А.Г., Черепанов Д.А. и др. Взаимодействие тетрафенилфосфония и додецилтрифенилфосфония с липидными мембранами и митохондриями // Биохимия. 2012. Т. 77, № 9. С. 1230–1239.
3. Корыта И. Ионы. Электроды. Мембраны. М.: Изд. Мир, 1983. 227 с.
4. Гринюс Л.Л., Даугелавичюс Р.Ю., Алькимави-

- чюс Г.А. Исследование мембранного потенциала клеток *Bacillus subtilis* и *Escherichia Coli* методом проникающих ионов // Биохимия. 1980. Т. 45, № 9. С. 1609–1618.
5. Rottenberg H. Membrane potential and surface potential in mitochondria: Uptake and binding of lipophilic cations. // J. of Membrane Biol. 1984. Vol. 81, No. 2. P. 127–138.
 6. Muratsugu M., Kamo N., Kobatake Y., Kimura K. Determination of membrane potential of *Escherichia coli* with use of an electrode sensitive to tetraphenyl phosphonium // J. of Electroanal. Chem. and Interfacial Electrochem. 1979. Vol. 104. P. 477–491.
 7. Kamo N., Muratsugu M., Hongoh R., Kobatake Y. Membrane potential of mitochondria measured with electrode sensitive to tetraphenyl phosphonium and relationship between proton electrochemical potential and phosphorylation potential in steady state // J. of Membrane Biol. 1979. Vol. 49. P. 105–121.
 8. Lolkema J.S., Hellingwerf K.J., Konings W.H. The effect of «probe binding» on the quantitative determination of the proton-motive force in bacteria // Biochimica et Biophysica Acta. 1982. Vol. 681. P. 85–94.
 9. Lolkema J.S., Abbing A., Hellingwerf K.J., Konings W.H. The transmembrane electrical potential in *Rhodopseudomonas sphaeroides* determined from the distribution of tetraphenylphosphonium after correction for its binding to cell components // FEBS J. 1983. Vol. 130, No. 2. P. 287–292.
 10. Breeuwer P., Abee T. Assessment of the membrane potential, intracellular pH and respiration of bacteria employing fluorescence techniques // Molecular Microbial Ecology Manual, Second Edition. 2004. P. 1563–1580.
 11. Гринюс Л.Л., Даугелавичюс Р.Ю., Пташекас М.Р. Ионселективный мембранный электрод. АС СССР, № 1136611, 1984.
 12. Остроумова О.С., Ефимова С.С., Малев В.В., Щагина Л.В. Ионные каналы в модельных липидных мембранах. СПб.: Институт цитологии РАН, 2012. 32 с.
 13. Weiss L. The cell periphery // Intern. Rev. Cytology. 1970. Vol. 26. P. 63.
 14. Рубин А.Б. Биофизика (в 2 томах). Т. 1. Теоретическая биофизика. М., 1999. 81 с.
 15. Зленко Д.В., Красильников П.М. Молекулярное моделирование липидных бислоевых мембран // Компьютерные исследования и моделирование. 2009. Т. 1, № 4. С. 423–436.
 16. Ермаков Ю.А. Биоэлектрохимия бислоевых липидных мембран // Российский химический журнал. 2005. Т. 49, № 5. С. 114–120.
 17. Brockman H. Dipole potential of lipid membranes // Chemistry and Physics of Lipids. 1994. Vol. 73, No. 1–2. P. 57–79.
 18. Френкель Я.И. Теория явлений атмосферного электричества. М.—Л.: ГИТТЛ, 1949. 155 с.

**Санкт-Петербургский государственный университет аэрокосмического приборостроения,
г. Санкт-Петербург**

Контакты: Варехов Алексей Григорьевич,
varekhov@mail.ru

Материал поступил в редакцию: 25.12.2014

POTENTIOMETRIC MEASUREMENTS OF TRANSMEMBRANE POTENTIAL OF CELLS WITH USE OF THE PENETRATING IONS

A. G. Varekhov

Saint-Petersburg State University of Aerospace Instrumentation, RF

There are methodical restrictions arising at potentiometric measurements of the transmembrane potential of cells with use of the penetrating (lipophilic) ions are discussed in the article. The analysis of the experimental results of measurements of transmembrane potential of *B. subtilis* cells on exposure to a gramicidin A is made that was received with using TPP⁺ selective membrane electrode. The analysis is based on the assumption of almost reversible adsorption of indicator cations on a cellular surface. It is shown that result of such measurements is more considerable value dipolar potential of a membrane rather the transmembrane potential. There is offered the estimation method of changes of the membrane potential, using the irreversible connected part of the penetrating ions immobilized in membrane channels on exposure to the gramicidin for calculation. Area density of the adsorbed charge, concentration of places of binding of indicator cations and parameters of a double electric layer are calculated.

Keywords: potentiometric measurements, gramicidin, TPP⁺ selective electrode, dipolar potential, transmembrane potential

REFERENCES

1. Liberman E.A., Topali V.P., Tsofina L.M. et al. Mechanism of coupling of oxidative phosphorylation and the membrane potential of mitochondria. *Nature*, 1969, vol. 222, pp. 1076–1078.
2. Trendeleva T.A., Rogov A.G., Cherepanov D.A. et al. [Interaction a tetrafenilfosfoniya and a dodetsil-trifenilfosfoniya with lipidic membranes and mitochondrions]. *Biochimiya* [Biochemistry], 2012, vol. 77, no. 9, pp. 1230–1239. (In Russ.).
3. Koryta I. [Ions. Electrodes. Membranes]. M., Mir Publ., 1983. 227 p. (In Russ.).
4. Grinyus L.L., Daugelavichyus R.Yu., Al'kimavichyus G.A. [Research of membrane potential of cages of *Bacillus subtilis* and *Escherichia Coli* by method of the getting ions]. *Biochimiya* [Biochemistry], 1980, vol. 45, no. 9, pp. 1609–1618. (In Russ.).
5. Rottenberg H. Membrane potential and surface potential in mitochondria: Uptake and binding of lipophilic cations. *J. of Membrane Biol.*, 1984, vol. 81, no. 2, pp. 127–138.
6. Muratsugu M., Kamo N., Kobatake Y., Kimura K. Determination of membrane potential of *Escherichia coli* with use of an electrode sensitive to tetraphenyl phosphonium. *J. of Electroanal. Chem. and Interfacial Electrochem.*, 1979, vol. 104, pp. 477–491.
7. Kamo N., Muratsugu M., Hongoh R., Kobatake Y. Membrane potential of mitochondria measured with electrode sensitive to tetraphenyl phosphonium and relationship between proton electrochemical potential and phosphorylation potential in steady state. *J. of Membrane Biol.*, 1979, vol. 49, pp. 105–121.
8. Lolkema J.S., Hellingwerf K.J., Konings W.H. The effect of «probe binding» on the quantitative determination of the proton-motive force in bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1982, vol. 681, pp. 85–94.
9. Lolkema J.S., Abbing A., Hellingwerf K.J., Konings W.H. The transmembrane electrical potential in *Rhodospseudomonas sphaeroides* determined from the distribution of tetraphenylphosphonium after correction for its binding to cell components. *FEBS J.*, 1983, vol. 130, no. 2, pp. 287–292.
10. Breeuwer P., Abee T. Assessment of the membrane potential, intracellular pH and respiration of bacteria employing fluorescence techniques. *Molecular Microbial Ecology Manual*, Second Edition, 2004, pp. 1563–1580.
11. Grinyus L.L., Daugelavichyus R.Yu., Al'kimavichyus G.A. [Ionselektivny membrane electrode]. Patent USSR, no. 1136611, 1984. (In Russ.).
12. Ostroumova O.S., Efimova S.S., Malev V.V., Schagina L.V. [Ionic channels in model lipidic membranes]. St. Petersburg, Institute of cytology RAS Publ., 2012. 32 p. (In Russ.).
13. Weiss L. The cell periphery. *Intern. Rev. Cytology*, 1970, vol. 26, pp. 63.
14. Rubin A.B. [Biophysics, vol. 1: Theoretical biophysics]. M., 1999. 81 p. (In Russ.).
15. Zlenko D.V., Krasil'nikov P.M. [Molecular modeling lipidic bisloynnykh of membranes]. *Komp'yuternye issledovaniya i modelirovanie* [Computer researches and modeling], 2009, vol. 1, no. 4, pp. 423–436. (In Russ.).
16. Ermakov Yu.A. [Bioelectrochemistry bisloynnykh of lipidic membranes]. *Rossiyskiy khimicheskiy zhurnal* [Russian chemical magazine], 2005, vol. 49, no. 5, pp. 114–120. (In Russ.).
17. Brockman H. Dipole potential of lipid membranes. *Chemistry and Physics of Lipids*, 1994, vol. 73, no. 1–2, pp. 57–79.
18. Frenkel' Ya.I. [Theory of the phenomena of atmospheric electricity]. M.—L., GITTL Publ., 1949. 155 p. (In Russ.).

Contacts: Varekhov Aleksey Grigor'evich,
varekhov@mail.ru

Article received in edition: 25.12.2014