

УДК 577.322: 537.632.5

В. С. Мартынюк, Д. А. Панов

ПОВЕРХНОСТНО АКТИВНЫЕ СВОЙСТВА ПРИРОДНЫХ ФОСФОЛИПИДОВ В РАЗЛИЧНЫХ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ СРЕДАХ

Липосомы являются одной из часто используемых моделей для изучения процессов происходящих на биологических мембранах.

Как известно свойства билипидного слоя зависят от состава фосфолипидов мембран. Наиболее часто для построения модельных мембран используют сумму фосфолипидов полученных из яичного желтка, в которых содержится более 70% лецитинов. Известно, что поверхностно активные свойства, а, следовательно, и свойства биологических мембран также зависят от параметров среды (ионной силы, рН, температуры, присутствия органических веществ). В связи с этим целью настоящей работы было изучение поверхностно активных свойств природных фосфолипидов в различных физиологических средах, которые наиболее часто используются в биологических исследованиях.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве показателя, характеризующего процесс мицеллообразования, использовали критическую концентрацию мицеллообразования (ККМ) природных фосфолипидов [1]. Фосфолипиды получали из яичного желтка модифицированным методом [2, 4].

Для изучения поверхностно активных свойств природных фосфолипидов были приготовлены девять растворов различной концентрации: $1 \cdot 10^{-6}$, $5 \cdot 10^{-6}$, $1 \cdot 10^{-5}$, $5 \cdot 10^{-5}$, $1 \cdot 10^{-4}$, $5 \cdot 10^{-4}$, $1 \cdot 10^{-3}$, $5 \cdot 10^{-3}$, $1 \cdot 10^{-2}$ моль/л.

Эксперимент был проведён в трёх различных средах: 0,89% растворе NaCl (физиологический раствор), дистиллированной воде (H₂O) и 0,067 М фосфатном буфере (Na₂HPO₄ – KH₂PO₄, рН = 7,4).

Навеска фосфолипидов взвешивалась на аналитических весах, а затем растворялась в 1 мл этилового спирта. Далее 0,3 мл раствора липидов в этаноле быстро смешивают с помощью шприца с 29,7 мл воды, при этом получают липосомы правильной сферической формы с диаметром около 500Å [5].

ККМ определяли кондуктометрическим, вискозиметрическим и оптическим методами [3, 6]. В оптическом методе измерения проводились на приборе КФК-2 при длине волны 315 нм [6]. Использовались кюветы с длиной оптического пути 3 см [3]. В вискозиметрическом методе измерение вязкости проводили методом истечения жидкости через капилляр [6]. Для этого был использован вискозиметр с диаметром капилляра 0,57 мм. В кондуктометрическом методе для измерения электропроводности был использован Кондуктометр КЭЛ-1М. Эксперименты проводили при комнатной температуре 20-22 С .

Измерения проводили через 20 минут после инициации процесса мицеллообразования. Данный интервал времени был выбран в связи с тем, что за указанное время после инициации формирования липосом экспериментальная система приходит в состояние, близкое к равновесному (Рис.1 и 2.)

Для оценки достоверности использовали t-критерий Стьюдента.

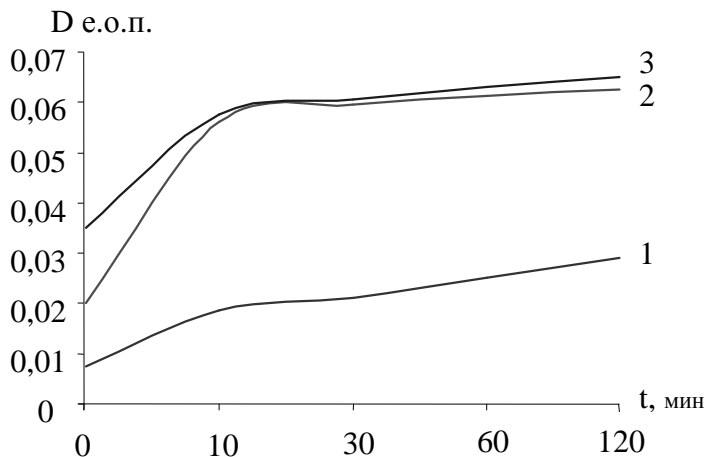


Рис. 1. Временная зависимость оптической плотности липосомальных суспензий.

1. $1 \cdot 10^{-4}$ моль/л;
2. $5 \cdot 10^{-4}$ моль/л;
3. $1 \cdot 10^{-3}$ моль/л.

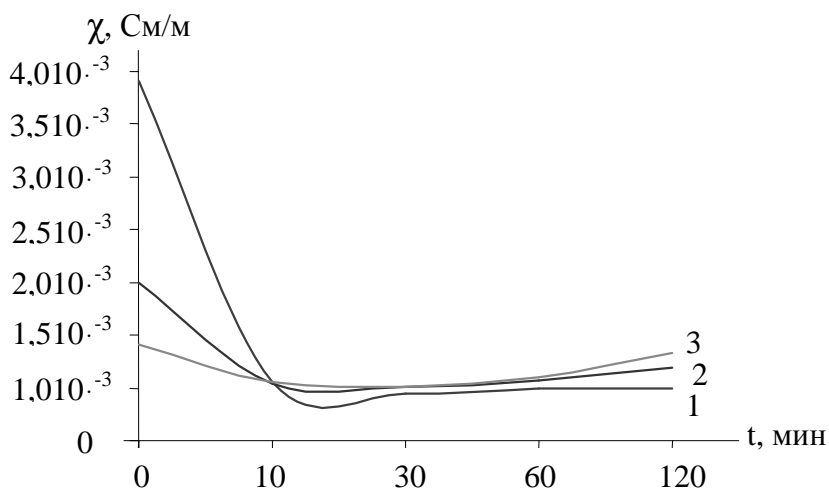


Рис.2 Временная зависимость электропроводности липосомальных суспензий.

1. $1 \cdot 10^{-4}$ моль/л;
2. $5 \cdot 10^{-4}$ моль/л;
3. $1 \cdot 10^{-3}$ моль/л.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На рисунке 3 представлены результаты изучения процесса формирования липосом оптическим методом. Используя регрессионный анализ были найдены соответствующие значения ККМ.

Анализируя поведение ККМ в трёх разных средах можно сказать, что ККМ составляет для дистиллированной воды - $5,43 \cdot 10^{-4} \pm 0,732 \cdot 10^{-4}$ М/л; для физиологического раствора - $4,76 \cdot 10^{-4} \pm 0,342 \cdot 10^{-4}$ М/л и для 0,067 М фосфатного буфера (рН=7,4) - $9,37 \cdot 10^{-4} \pm 0,803 \cdot 10^{-4}$ М/л (табл.). Первые две среды дают близкие показатели ККМ, а фосфатный буфер резко отличается от них. Более высокие значения ККМ указывают на большую растворимость фосфолипидов в фосфатном буфере. Во-первых, это может быть связано с разной концентрацией свободных протонов водорода в указанных средах – рН $\sim 6.5 \div 7.0$ в воде и физиологическом растворе, и 7,4 в фосфатном буфере. Во-вторых, это может быть связано с тем, что полярные группы фосфолипидов и в первую очередь фосфатные, выступают в роли дополнительного элемента буферной системы.

Результаты сравнительного анализа данных, полученных разными методами, свидетельствуют о том, что наиболее точным и хорошо воспроизводимым методом является оптический метод, основанный на регистрации рассеивания света (табл.).

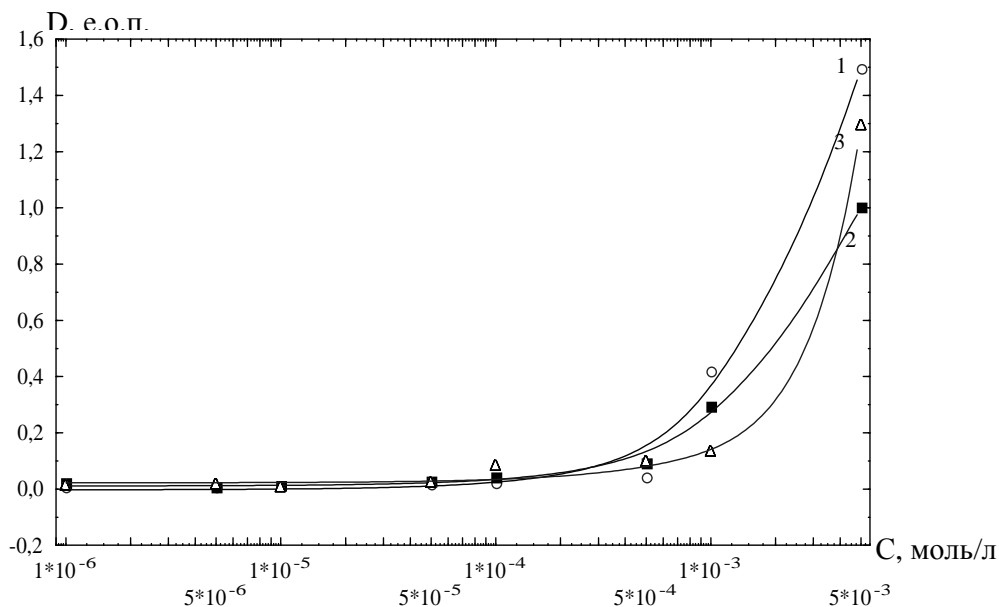


Рис.3. Зависимость оптической плотности суспензии от концентрации фосфолипидов в различных физиологических средах.

- 1 – дистиллированная вода;
- 2 – физиологический раствор (0,89% р-р NaCl);
- 3 – фосфатный буфер (рН = 7,4).

Таблица.
Значение критической концентрации мицеллообразования
природных фосфолипидов яичного желтка

Среда	Метод измерения	Значение ККМ
Дистиллированная вода	Оптический	$5,06 \cdot 10^{-4} \pm 0,702 \cdot 10^{-4}$
	Кондуктометрический	$6,23 \cdot 10^{-4} \pm 0,732 \cdot 10^{-4}$
	Вискозиметрический	$4,99 \cdot 10^{-4} \pm 0,753 \cdot 10^{-4}$
Физ. раствор	Оптический	$4,76 \cdot 10^{-4} \pm 0,342 \cdot 10^{-4}$
	Кондуктометрический	—*
	Вискозиметрический	—*
Фосфатный буфер	Оптический	$9,51 \cdot 10^{-4} \pm 0,790 \cdot 10^{-4}$
	Кондуктометрический	—*
	Вискозиметрический	$9,23 \cdot 10^{-4} \pm 0,814 \cdot 10^{-4}$

* – плоховоспроизводимые данные.

ВЫВОДЫ

1. Критическая концентрация мицеллообразования фосфолипидов яичного желтка в широко используемых в экспериментальной биологии и медицине физиологических средах находится в пределах от $4,7 \cdot 10^{-4}$ – $9,5 \cdot 10^{-4}$ моль/л.

2. Критическая концентрация мицеллообразования природных фосфолипидов сильно зависит от состава физиологической среды и составила $5,43 \cdot 10^{-4} \pm 0,732 \cdot 10^{-4}$; $4,76 \cdot 10^{-4} \pm 0,342 \cdot 10^{-4}$; $9,37 \cdot 10^{-4} \pm 0,803 \cdot 10^{-4}$ моль/л для дистиллированной воды; физиологического раствора и фосфатного буфера соответственно.

3. Для исследования поверхностно активных свойств природных фосфолипидов яичного желтка наиболее простым и статистически надежным методом определения ККМ является оптический метод, основанный на рассеивании света липосомальными суспензиями.

Список литературы

1. Воюцкий С.С. -Курс коллоидной химии. – М.: Химия, 1964. – 574 с.
2. Кучеренко Н.Е., Васильев А.Н. Липиды. – Киев: «Вища Школа», 1985. – 248 с.
3. Практикум по биохимии. Под ред. Северина С.Е., Соловьёвой Г.А. – М.: Изд-во МГУ, 1989. – 509 с.
4. Препаративная биохимия липидов: биологические и технические мембраны. – Изд-во «Наука», 1981. – 260 с.
5. Страйер Л. Биохимия: Пер с англ. – М.: «Мир», 1984. – Т.1. –232 с.
6. Фридрихсберг Д.А. Курс коллоидной химии. – Л.: «Химия», 1984. – 368с.

Поступила в редакцию 10.10.2002 г.