

## CERCETĂRI ASUPRA CORELAȚIEI DINTRE MODIFICĂRILE EXTINCȚIEI SOLURILOR DE LECITINA SUB ACȚIUNEA UNOR SUBSTANȚE ÎN DISPERSIUNE MOLECULARĂ ȘI PERMEABILITATEA LOR

Dr. Balogh Ladislau

Overton observând în anul 1901, că substanțele narcotice sînt ușor solubile în lipide, presupune existența unei membrane alcătuite din colesterină și lecitina pe suprafața celulelor vii. Bazat pe această observație elaborează celebra sa teorie asupra permeabilității celulare, conform căreia substanțele liposolubile, respectiv cele care dizolvă lipidele, pătrund ușor prin membrana celulară, iar cele insolubile, respectiv cele care nu le dizolvă, pătrund greu. Cercetările lui Overton au mai arătat, că în privința permeabilității celulare, diversele celule vegetale și animale au în general o comportare similară. Pe baza permeabilității, Overton a clasificat o seamă de substanțe anorganice și organice. Conform regulilor stabilite de el, dintre substanțele anorganice pătrund ușor: apa,  $H_2O_2$ ,  $O_2$ ,  $CO_2$ ,  $H_2S$ ,  $NH_3$ ,  $H_3BO_3$ , pe cînd electroliții, cum sînt sărurile neutre, acizii și bazele tari, pătrund greu. Dintre substanțele organice pătrund ușor hidrocarburile, alcoolii monovalenți, aldehidele, cetonele, nitrili, esterii; ceva mai greu alcoolii bivalenți, monoacizii, și amidele lor; și mai greu glicerina și carbamida. Alcoolii tetra-, penta- și hexavalenți, hexozele, dizaharidele, aminoacizii și sărurile acizilor organici cu catenă scurtă pătrund greu.

Teoria lui Overton nu clarifică însă numeroase probleme de permeabilitate. Ea nu poate explica bunăoară comportarea ureei care deși nu are nici o legătură cu solubilitatea în lecitină, totuși pătrunde mediocru. O situație similară are și oxigenul. Acetona, care nu dizolvă lecitina, pătrunde totuși ușor. Permeabilitatea bună a apei și impermeabilitatea electroliților cu moleculă mică se explică de asemenea greu cu ajutorul teoriei lui Overton.

Jendrassik studiind între anii 1932 și 1933 anumite comportări ale solurilor de lecitină, demonstrează rolul hotărîtor al lecitinei în cadrul substanțelor membranei celulare și confirmă veracitatea teoriei lipidice a permeabilității, întregind-o cu o explicație coloidală. Jendrassik determinînd cu ajutorul nefelometrului efectul unor substanțe asupra opalescenței solurilor de lecitină, găsește un paralelism între acest efect și valoarea medie a permeabilității după Overton. Substanțele greu permeabile măresc intensitatea luminei lui Tyndall, în urma precipitării lecitinei datorită fie scăderii hidratației fie micșorării gradului de dispersiune a particulelor coloidale. Substanțele ușor permeabile diminuează sau nu modifică intensitatea luminei lui Tyndall. Se știe, că permeabilitatea membranelor și a gelurilor scade sub acțiuni deshidratante și aglutinante. În cazuri contrare permeabilitatea se mărește. Jendrassik presupune deci, că substanțele greu permeabile precipitînd principala substanță a membranei celulare, lecitina, își închid singure calea.

În concordanță cu cercetările lui Jendrassik, Magistris a stabilit că lecitina inhibă difuziunea bazelor și acizilor prin gelurile de agar-agar sau gelatină. Tot astfel se pot interpreta și cercetările lui Abramson și Grey, conform cărora membranele de colodiu, care permit trecerea în timp de 20 de minute a 30% din o soluție tetranormală de NaCl devin aproape impermeabile atunci cînd membranele rapid uscate ( $1\frac{1}{2}$  minut) conțin 50% lecitină.

## Partea experimentală

Pornind de la constatările lui Jendrassik, am examinat acțiunea exercitată de un mare număr de substanțe asupra solurilor de lecitină. Spre deosebire de cea publicată de Jendrassik, în metoda aplicată de mine măsura efectului produs se considera nu schimbarea intensității luminei lui Tyndall, ci variația extincției solului. Am întrebuințat substanțe active în concentrații molare sau normale, iar în cazul substanțelor greu solubile, am recurs la concentrații de  $m/2$  sau  $m/5$ .

În cursul cercetărilor am folosit soluri în concentrație de 0,05% de lecitina, pe cât posibil proaspăt preparată.

M-am convins odată și pentru totdeauna de nealterarea preparatului, controlând consumul ei de NaOH. În cazul substanței folosite de mine o picătură de NaOH decinormal (cca.  $0,04 \text{ cm}^3$ ) înroșește definitiv  $100 \text{ cm}^3$  sol de lecitină 0,05% în prezența fenolftaleinei și a clorurei de bariu. Consumul de NaOH al solurilor din preparate vechi și alterate poate fi considerabil în condițiuni similare.

Preparatul folosit de mine s-a dovedit a fi practic nealterat. lucru pe care îl dovedește și culoarea lui deschisă. Pentru a evita alterarea ulterioară a lecitinei, în cursul cercetărilor, am păstrat-o tot timpul în răcitor la întuneric și la o temperatură joasă, într-un exicator umplut cu azot și conținând  $\text{CaCl}_2$ .

Pentru prepararea solurilor nu am recurs la metoda descrisă de Porges și Neubauer, fiindcă particulele coloidale, chiar după o barbotare mai îndelungată cu aer, ar putea reține ceva din alcoolul sau eterul în care în prealabil a fost dizolvată lecitina, fapt care din cauza naturii cercetărilor mele nu era de dorit. Pe lângă acestea m-am convins și de faptul, că trecerea unui curent de aer prin sol și încălzirea lui modifică rapid proprietățile sale coloidale. Pentru aceasta am preparat solurile după Jendrassik, prin simpla triturare treptată a lecitinei cu apa.

În scopul obținerii solului am cântărit cu balanța analitică pe o sticlă de ceasornic 50 mg de lecitină. Trecind substanța cu o spatulă de sticlă (și nicidecum de metal) într-un mojar de porțelan și adăugând treptat  $5 \text{ cm}^3$  apă în porțiuni de câteva zecimi de  $\text{cm}^3$ , după ce am spălat cu grija sticla de ceasornic și spatula cu aceste porțiuni, am amestecat substanța pînă la formarea unei suspensii fine și omogene. Continuînd diluarea suspensiei cu cantități crescînde de apă, am avut grija să fac să ajungă prin spălare în mojar și ultimele urme de substanță aderată de spatulă și de sticla de ceasornic. După aceasta am trecut cantitativ conținutul mojarului într-un balon cotat de 1 litru și agitîndu-l de mai multe ori, l-am completat succesiv cu apa pînă la semn. Oxigenul și bioxidul de carbon conținut în apa de dizolvare, au fost îndepărtați în prealabil prin fierbere.

Extincțiile solurilor au fost determinate într-un strat de 3 cm cu fotometrul Pulfrich, cu o iluminție laterală întrebunînd filtrul S53 (verde) în așa fel, încît într-una din chiuvete am adăugat la  $9 \text{ cm}^3$  de sol 0,05%  $1 \text{ cm}^3$  din substanța de dispersiune moleculară, în general de concentrație moleculară, iar în cealaltă chiuvetă am adăugat la aceeași cantitate de sol  $1 \text{ cm}^3$  de apă distilată.

Solurile de lecitină astfel obținute sînt foarte opalescente, cu o extincție în jurul valorii de  $E_s = 1,15$ , care poate fi reprodusă cu o eroare de  $\pm 12\%$ . Dacă în cursul preparării solului nu se respectă cu minuțiozitate condițiunile arătate, valorile extincțiilor pot avea devieri și mai mari. În cele ce urmează voi denumi extincție „absolută” extincția proprie a solului, față de valorile relative, care exprimă modificările de extincție produse de diferitele substanțe. Devierile de extincție constatate la solurile de aceeași concentrație și proveniență se datoresc faptului, că nu se pot obține dispersizări identice nici prin respectarea cea mai severă a circumstanțelor de preparare. Pe lângă acestea, modificările extincției provocate de aceeași substanță activă, pot arăta deosebiri destul de accentuate în diferite soluri de aceeași concentrație și proveniență. Devierile referitoare la diferite substanțe active fiind însă în general de același sens, nu influențează prea mult raportul lor reciproc. (În cursul cercetărilor mele nu am putut stabili vreo legătură simplă între devierile extincțiilor „absolute” și devierile efectelor substanțelor active). De aceea, pentru a putea compara efectul

reciproc al substanțelor active, am executat determinările menționate în tabelul Nr. I și Nr. II în același sol de lecitina.

Tabelul Nr. I și II reprezintă mărirea efectului diferitelor substanțe anorganice și organice de dispersitate moleculară în sol din lecitina nealterată de 0,05%. Valorile reprezentate indică diferența dintre extincția probei și a controlului, în strat de 3 cm ( $E_3$ ). Concentrația menționată înaintea denumirii substanțelor în general decinormală sau decimolară, după cum am mai amintit, reprezintă o concentrație din chiuvetă, iar  $E_3$  modificarea extincției.

Tabelul Nr. I.

Modificările extincției unui sol de lecitină 0,05% sub acțiunea unor substanțe anorganice în dispersiune moleculară.

Substanță activă și concentrația ei	$E_3$	Substanță activă și concentrația ei	$E_3$
n/10 Acetat de Na	1,125	m/10 $PO_4Na_3$	0,609
.. FNA	1,012	n/10 LiCl	1,270
.. ClNa	0,907	.. $NH_4Cl$	1,076
.. $SO_4Na_2$	0,898	.. ClNa	0,907
.. $NO_2Na$	0,752	.. ClK	0,782
.. $NO_3Na$	0,685	.. ClRb	0,703
.. BrNa	0,628	.. ClCs	0,699
.. INa	0,592	.. $Cl_2Ba$	1,099
.. SCNNa	0,570	.. $Cl_2Sr$	0,999
.. $B_4O_7Na_2$	0,538	.. $Cl_2Ca$	0,814
.. NaOH	0,478	.. $Cl_2Mg$	0,740
.. $CO_3Na_2$	0,436	.. $Cl_2Zn$	0,788
.. $CO_3NaH$	0,422	.. $Cl_3Al$	0,710
.. $NO_3H$	0,187	n/20 $BO_3H_3$	0,136
.. ClH	0,694	$H_2S$ saturat	0,017
.. $SO_4H_2$	0,683	$CO_2$ saturat	0,008
m/10 $PO_4H_2$	0,755	$H_2O_2$ 3%	0,008
.. $PO_4NaH_2$	0,918	n/10 $NH_4OH$	— 0,226
.. $PO_4Na_2H$	0,586		

Tabelul Nr. II.

Modificările extincției unui sol de lecitină de 0,05% sub acțiunea unor substanțe organice în dispersiune moleculară.

Substanță activă și concentrația ei	$E_3$	Substanță activă și concentrația ei	$E_3$
m/10 alcool metilic	-0,002	m/10 aldehydă acetică	0,016
.. alcool etilic	-0,004	.. acetona	0,005
.. alcool izopropilic	0,016	.. acid formic	0,094
.. alcool butilic normal	-0,035	.. acid acetic	0,223
m/50 alcool izoamilic	-0,017	.. acetat de sodiu	1,125
m/10 glicol	0,000	.. acid propionic	0,325
.. glicerina	0,206	.. acid lactic	0,023
m/50 manită	0,572	m 20 acid oxalic	0,414
m/20 fenol	0,102	.. acid succinic	0,217
m/10 pirocatehină	0,168	m/10 acid tartaric	0,624
.. resorcină	0,114	.. glucoza	0,562
m/20 hidrochinonă	0,101	.. zaharoza	0,570
m/10 eter etilic	0,002	.. urce	0,239
.. acetat de etil	0,024	.. glicocol	0,499
.. etiluretă	-0,036	.. colina	0,114
.. aldehydă formică	0,005	.. clorură de colină	0,933

Intrucît extincția de determinat nu se stabilește în momentul amestecării solului cu substanța activă, ci prezintă o creștere la început rapidă, mai lentă pe urmă, cetirile au fost executate în mod uniform cu cinci minute după amestecarea soluțiilor. Excepție constituie ureea, glicerina, în măsură mai mică acidul oxalic și succinic, intrucît creșterea extincției provocată de acestea, începînd din momentul amestecării lor cu solul de lecitină, prezintă o scădere permanentă. Această comportare specială a ureei și a glicerinei se aseamănă cu acțiunile trecătoare, cunoscute din farmacologie. Descrierea acestui efect și a altor efecte trecătoare, constatate la unele soluțiuni de proteine a fost relatată la timpul său de Jendrassik și Balogh.

Coloana întâi a tabelului Nr. I. reprezintă în ordine descrescîndă efectul diverselor săruri de sodiu. Efectul cel mai energetic îl manifestă anionii de acetat și fluorură, iar cel mai slab anionii de carbonat și bicarbonat

Începînd cu rîndul al 2-lea al coloanei a doua sînt trecute efectele produse de cationii legați de clor. În timp ce în grupa metalelor alcaline, intensitatea efectelor începînd de la litiu scade treptat pînă la cesiu, în grupa metalelor alcalino-terose din contră, acțiunea cea mai puternică o exercită bariul, iar cea mai slabă calciul. Cuprînzînd în serii pe baza intensității efectelor anionii și cationii studiați, observăm, că în general corespund ordinii stabilite de Porges și Neubauer în funcție de intensitatea cu care acești ioni precipită lecitina:

1. Anioni:  $\text{SO}_4^- > \text{CH}_3\text{COO}^- > \text{F}^- > \text{Cl}^- > \text{NO}_3^- > \text{Br}^- > \text{I}^- > \text{SCN}^-$  (Porges și Neubauer)  
 $\text{CH}_3\text{COO}^- > \text{F}^- > \text{Cl}^- > \text{SO}_4^- > \text{NO}_3^- > \text{Br}^- > \text{I}^- > \text{SCN}^-$  (Balogh L.)

2. Ionii metalelor alcaline:

$\text{Li}^+ > \text{Na}^+ > \text{NH}_4^+ > \text{K}^+$  (Porges și Neubauer)  
 $\text{Li}^+ > \text{NH}_4^+ > \text{Na}^+ > \text{K}^+ > \text{Rb}^+ > \text{Cs}^+$  (Balogh L.)

3. Ionii metalelor alcalino-terose:

$\text{Ba}^{++} > \text{Sr}^{++} > \text{Ca}^{++} > \text{Mg}^{++}$  (Porges și Neubauer)  
 $\text{Ba}^{++} > \text{Sr}^{++} > \text{Ca}^{++} > \text{Mg}^{++}$  (Balogh L.)

Modificările de extincție cauzate de substanțele trecute în tabelele Nr. I. și Nr. II. prezintă un uimitor paralelism între valorile de permeabilitate stabilite de Overton, corespunzînd în totul afirmațiilor lui Jendrassik

S-ar putea spune, că în cazul solului de lecitină folosit de mine în determinarea datelor de mai sus se pot considera:

ușor permeabile acele substanțe, care determină o creștere de extincție  $< 0,050$   
 mediocr permeabile acele substanțe, care determină o creștere de extincție  $0,05-0,35$   
 greu permeabile acele substanțe, care determină o creștere de extincție  $> 0,35$

Deci substanțele care nu precipită lecitina sînt în același timp și ușor permeabile. Pe baza teoriei lui Jendrassik pot fi explicate și comportările unor substanțe, care pe baza teoriei lui Overton nu puteau fi interpretate de loc. sau numai pe baza unor ipoteze auxiliare. Astfel apa are o capacitate mare de permeabilitate, pentru că nu modifică starea coloidală a lecitinei. Dacă se diluează suspensia apoasă a lecitinei cu apă, este de la sine înțeles, că opalescența ei exprimată în extincție scade. În acest fel de asemenea găsesc o explicație satisfăcătoare și diferențele existente între capacitățile de permeabilitate ale unor substanțe cu moleculă mică și care nu se dizolvă, respectiv nu dizolvă lipidele. Substanțele anorganice, ca acizii, bazele, sărurile, precum și unele combinații organice, ca de ex. glucoza sau glicocolul, sînt greu permeabile, pentru că

după cum rezultă din efectul lor intensificator de extincție, precipită lecitina. Ureea în multe privințe asemănătoare glicocolului, din contra este mai permeabilă, întrucît pe lângă faptul că efectul său precipitant este redus, acest efect mai este și trecător. La fel se poate explica și ușoara permeabilitate a unor gaze ( $O_2$ ,  $CO_2$ ,  $H_2S$ ) dizolvate în apă, precum și a altor substanțe. Deosebit de expresiv este cazul acelonei ușor permeabile, în care în mod practic lecitina este insolubilă, dar a cărei soluție apoasă nu intensifică extincția.

Este de remarcat, că paralelismul dintre modificarea extincției solurilor de lecitină și capacitatea de permeabilitate a unor substanțe reprezintă o legătură valabilă doar în linii mari, în primă aproximație. Desigur, că membrana celulară pe lângă lecitină mai conține și alte substanțe celulare. Probabil, că examinînd comportarea lecitinei în prezența acestora, rezultatele obținute ar exprima mai fidel realitatea, deși rolul decisiv al lecitinei este incontestabil.

Stabilirea legăturii precise dintre modificarea extincției și capacitatea de permeabilitate este îngreunată și de faptul, că nu exista o legătură lineară între concentrația substanțelor active și modificarea extincției provocată de aceasta. Pe lângă aceasta efectul maxim apare la diferite concentrații, în funcție de substanța folosită: cu alte cuvinte raportul dintre efectul a două substanțe diferite variază în funcție de concentrația lor. Concentrația substanțelor active folosite în cursul cercetărilor am stabilit-o arbitrar la  $m/10$  respectiv  $n/10$  cu referință la conținutul chiuvetei fotometrului. Ordinul de mărime al acestei concentrații corespunde în general concentrației fiziologice. Astfel datele arătate în tabelele Nr. I. și Nr. II. exprimă doar comportamentul aproximativ al membranei celulare față de soluțiile de concentrație  $m/10$ .

Pentru ilustrarea celor expuse, pe baza datelor tabelului Nr. III. se poate compara efectul de intensificare al extincției provocată de soluțiile de uree și  $ClNa$  în diferite concentrații, pe sol de lecitină de 0,05%. Concentrațiile arătate în tabel se referă și în acest caz, la amestecul substanțelor active cu solul de lecitină.

Tabelul Nr. III.

Efectul soluțiilor de uree și clorură de sodiu de diferite concentrații asupra extincției solului de lecitină de 0,05%.

Concentrația substanței active	Intensific. extincției ( $E_3$ )	
	uree	clorură de sodiu
0,001 molară	—	0,037
0,01 ..	0,040	0,345
0,05 ..	0,157	0,655
0,10 ..	0,262	0,962
0,20 ..	—	1,189
0,40 ..	—	1,230
0,50 ..	0,575	—
1,00 ..	0,686	—

#### Rezumat.

Determinarea extincției solurilor de lecitină cu fotometrul Pulfrich constituie o metodă foarte adecuată pentru studierea stării coloidale a lecitinei, admițînd că extincția solurilor ei este determinată de hidratația, respectiv de gradul de dispersitate a particulelor de lecitina.

Există un paralelism între modificările de extincție suferite de solurile de lecitină sub acțiunea substanțelor în dispersiune moleculară și capacitatea acestora de

permeabilitate. Cele ușor permeabile în concentrație de m/10 modifică în mică măsură extincția solului de lecitină, pe cînd cele greu permeabile provoacă o intensificare pronunțată a extincției. Reiese clar că o anumită substanță pătrunde cu atît mai greu prin membrana celulară, cu cît scade mai mult hidratația, respectiv gradul de dispersiune a lecitinei.

Cercetările de mai sus demonstrează rolul decisiv al lecitinei în membrana celulară. Confirmă teoria lipoido-coloidală de permeabilitate a lui Jendrassik, care în-lătură cu succes contradicțiile teoriei lui Overton.

---