

Miara pH w strukturach subkomórkowych

Granice kwasowości



EWA KUROWSKA

Institut Biochemii i Biofizyki
Polska Akademia Nauk, Warszawa
kurowska.ewa@gmail.com

Dr Ewa Kurowska jest zainteresowana toksykologią molekularną metali. Zajmuje się również problemami wynikającymi ze zmniejszenia objętości, w których zachodzą reakcje chemiczne, a w szczególności zagadnieniem pH w małych objętościach.

Każdy zna i intuicyjnie rozumie pojęcie kwasowości. Wszyscy słyszeliśmy o pikantnym jedzeniu, aromatycznych napojach czy „kwaśnych deszczach”. Jednak znaczenie chemiczne tego pojęcia nie jest tak oczywiste

Kwasowość definiuje się jako ujemny logarytm dziesiętny stężenia jonów wodorowych w roztworze. Cóż to naprawdę znaczy? Czy są jakieś ograniczenia tej skali? Jeśli tak, jakie? Czy możemy to złożone pojęcie w jakiś sposób uchwycić?

Gdzie kończy się pH

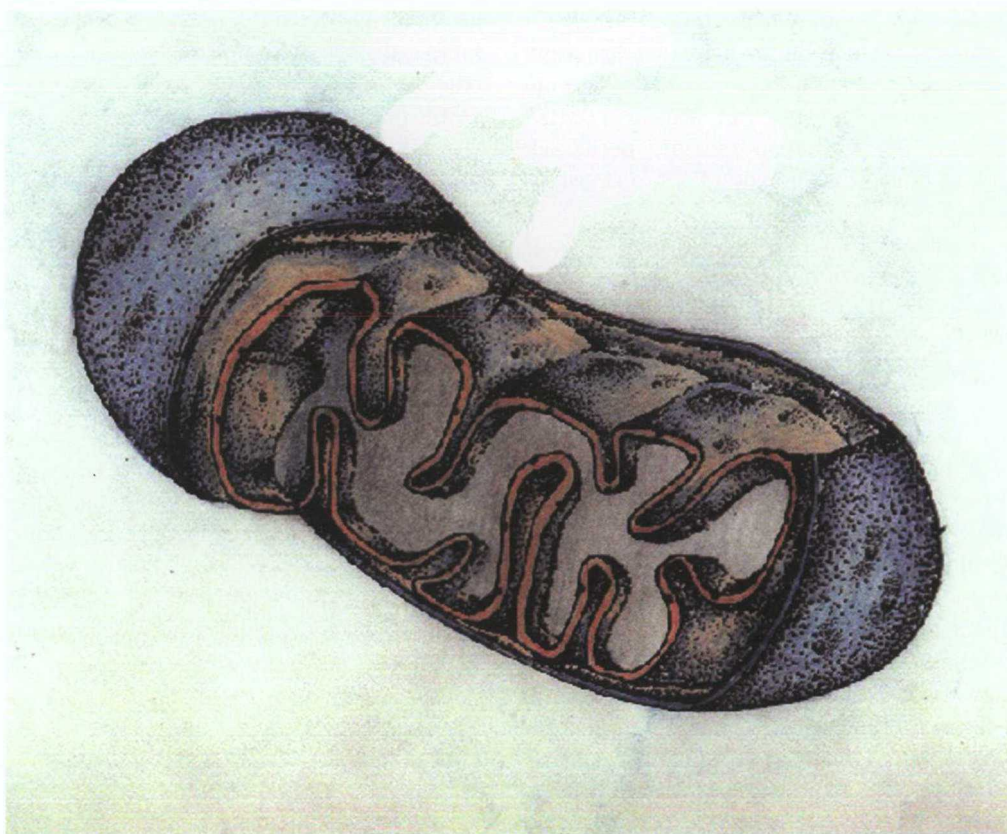
Na początek zacznijmy od wyjaśnienia, czym jest stężenie. Najbardziej podstawowe znaczenie stężenia to ilość jednej substancji wymieszanej lub zawartej w innej substancji. Istnieje wiele sposobów na wyrażenie stężenia, przy czym dwa najbardziej popularne w chemii to stężenie procentowe i stężenie molowe. Stężeniem procentowym jest procentowy udział masy substancji A w masie roztworu, na którą składają się masy zarówno substancji A, jak i rozpuszczalnika. Na przykład butelka 12-procentowego czerwonego wina o pojemności 750 ml zawiera 90 ml czystego alkoholu plus 660 ml roztworu (wody oraz wszystkich substancji chemicznych, które powstały w procesie produkcji wina).

Stężenie molowe wprawdzie wydaje się mniej przydatne w codziennym życiu, ale każdy może wyciągnąć z niego bardzo ciekawe wnioski dotyczące podstaw naszego

naukowego widzenia świata. Zacznijmy od moli. Jeden mol jest pewną dokładną liczbą cząsteczek – o oszałamiającej wartości $6,022 \times 10^{23}$. Mol to jednostka używana zwykle do obliczania liczby cząsteczek, chociaż tak naprawdę wszystko, łącznie z ludźmi, może być policzone w molach. Na przykład, jeśli założymy, że jest 7 miliardów (7×10^9) osób żyjących na naszej planecie, możemy powiedzieć, że populacja ludzka składa się z 0,112 femtomola ludzi ($0,112 \times 10^{-15}$ mola). Stężenie molowe (1M) to liczba moli substancji rozpuszczonej w roztworze o łącznej objętości 1 litra – warto zapamiętać tę informację, gdyż będzie pomocna w rozumieniu dalszej części tekstu.

H^+ i OH^- nieodłącznie razem

Gdy już mniej więcej wiemy, czym jest stężenie, możemy przejść do pH. Skala pH jest to ilościowa skala kwasowości danego roztworu wodnego, mieszcząca się w granicach od 0 do 14. Krótko mówiąc, skala wskazuje, czy roztwór wodny zawiera więcej jonów H^+ (protonów, jonów wodorowych, roztwory kwasowe o niskim pH np. 3), czy jonów OH^- (hydroksylowych, roztwory zasadowe o wysokim pH np. 10) lub czy występują one w jednakowych ilościach (roztwory obojętne o pH 7). Opierając się na teorii stężenia molowego, możemy powiedzieć, że pH zależy od stężenia jonów H^+ i OH^- w roztworze. A zatem, jeżeli stężenie protonów jest większe od stężenia jonów hydroksylowych, roztwór jest kwasowy. Im większa jest liczba protonów, tym bardziej kwasowy odczyn i niższe pH ma roztwór. Na tym etapie bardzo ważne jest określenie pochodzenia jonów H^+ i OH^- . Są one produktami procesu zwanego dysocjacją, w którym cząsteczki wody (H_2O) ulegają rozpadowi na jony H^+ i OH^- . Jako że w procesie tym nie uczestniczą żadne inne cząsteczki (w rozcieńczonych roztworach oraz w normalnych warunkach temperatury i ciśnienia), w przypadku wody proces nazywamy autodysocjacją. Reakcja jest bardzo rzadka i relatywnie niewiele



Mitochondria
- komórki
elektrownie - mają
objętość około 1fL.
Czy w ich przypadku
pH ma sens?

cząsteczek wody podlega temu procesowi. W ten oto sposób otrzymywany jest iloczyn jonowy wody leżący u podłoża definicji pH.

$$[H^+] \times [OH^-] = 1 \times 10^{-14} [M^2]$$

Iloczyn jonowy wody łączy stężenie protonów i jonów hydroksylowych za pomocą jednego równania, a jego wartość jest stała w danych warunkach (1×10^{-14} w temperaturze 25°C oraz stałym ciśnieniu atmosferycznym). Oznacza to, że spadek wartości jednego czynnika wymusza wzrost drugiego, by równanie mogło być spełnione. Dlatego też skala pH mieści się w granicach od 0 do 14 ($-\log 10^0 = 0$ and $-\log 10^{-14} = 14$). Zmiany w pH spowodowane dodaniem kwasu lub zasady są wynikiem wzajemnego oddziaływania protonów oraz jonów hydroksylowych pochodzących z procesu autodysocjacji wody z protonami lub jonami hydroksylowymi dodanymi do roztworu. Wartości pH nie można określić wyłącznie na podstawie jednego typu jonów, H^+ lub OH^- . Jony te muszą zawsze być rozpatrywane wspólnie, ponieważ to ich wzajemne interakcje stanowią podstawę pH.

Poza skalą makro

Tak długo, jak pozostajemy w skali makro (litrów, mililitrów etc.), można by zadać pytanie: „I cóż z tego?”. Jednak, jak wykazaliśmy w naszej pracy „The Final Frontier of pH and the Undiscovered Country Beyond” („Ostateczna granica pH oraz nieodkryty obszar poza nią”) opublikowanej w tym roku przez PLOS One, całość okazuje się znacznie bardziej złożona, gdy weźmiemy pod uwagę, jak małe są komórki i ich organelle. Typowa komórka ssaków ma objętość 1,2 pL (pikolitra, $1,2 \times 10^{-12}$ L), a jej organelle są od 1000 do 1000000 razy mniejsze [np. mitochondria - komórki elektrownie - mają objętość około 1 fL (femtolitra 1×10^{-15} L)], podczas gdy pęcherzyki opłaszczane mają zaledwie od 30 do 800 zL (zeptolitrow, 1×10^{-21} L). Gdy przypomnimy sobie, że stężenie jest funkcją objętości, zagadnienia te stają się jeszcze ciekawsze. Jakie jest najmniejsze możliwe stężenie w danej objętości biologicznej? Najmniejszym możliwym stężeniem substancji jest jedna cząsteczka zamknięta w danej objętości. Im większa objętość, tym mniejsze stężenie. Np. jedna cząsteczka znajdująca się w $4,2 \times 10^{-16}$ L (420 aL) ma stężenie $4,0 \times 10^{-9}$ moli/litr (4 nanomole, nM). I jest to ob-

Miara pH w strukturach subkomórkowych

jętość, jaką zajmuje woda w typowej wielkości bakterii *E. coli*. Mniejsze objętości dają większe stężenia: najmniejsze możliwe stężenie w lizosomie ($3,0 \times 10^{-17}$ L) wynosi $8,0 \times 10^{-8}$ mol/litr (80 nM), podczas gdy pęcherzyk opłaszczony zawierający 3×10^{-20} L wody, ma $8,0 \times 10^{-5}$ M (80 μ M).

Co ma to wspólnego z pH i kwasowością? Jak już wspomniano, pH dotyczy stężenia jonów H^+ i OH^- , które są nierozdzielne z sobą połączone poprzez równanie 1, w związku z tym ich iloczyn zawsze musi być stały. Najmniejsza objętość zajmowana przez roztwór o pH równym 7 (z jednym jonem H^+ oraz jednym jonem OH^-) to $1,66 \times 10^{-17}$ L (16,6 aL). Jest to biologicznie istotna objętość, podobna objętością do struktur wewnątrzkomórkowych! Co więcej, wszelkie odchylenia w pH, wzrost bądź spadek, będą wymagały większej objętości minimalnej. Konsekwencje są zaskakujące. Oznaczają one bowiem, że w fizjologicznie istotnych objętościach idea pH nie jest już prawdziwa – chociaż pojęcie to jest nadal używane do opisywania warunków i reakcji mających miejsce w komórkach i ich organellach! Inną, oprócz nieprawidłowego opisu warunków komórkowych i wewnątrzkomórkowych, konsekwencją jest fakt, że w tak małych przedziałach woda nie jest wystarczająco zdysocjowana, by być źródłem protonów dla zachodzącej w nich chemii kwasowo-zasadowej.

Nowy paradygmat?

Wydaje się to stać w opozycji do powszechnie obowiązującej wiedzy z zakresu chemii międzykomórkowej/subkomórkowej. Rodzą się pytania: Co tak naprawdę dzieje się w komórce? Jak właściwie żywe organizmy funkcjonują, jeśli wszystko, co dotychczas o nich wiemy, okazuje się nieprawdą? Kryzys wiedzy o pH przypomina częściowo problemy fizyki. Na pewnym poziomie (dokładniej na poziomie atomów) fizyka klasyczna zawodzi, a zaobserwowane zjawiska wymagają nowych teorii, by je opisać. Z pomocą przychodzi nam fizyka kwantowa, która na pierwszy rzut oka również wydaje się w opozycji do fizyki klasycznej (makroskopowej). Podobna sytuacja może mieć miejsce w przypadku wewnątrzkomórkowego pH. Teoria dotycząca skali o dużej objętości – teoria klasyczna – jak się

okazuje, nie opisuje zjawisk chemicznych, które odbywają się poniżej pewnych granic objętości.

Te proste obserwacje, oparte na prostych, ręcznych obliczeniach, prowadzą do zaskakujących wniosków, które wymagają weryfikacji. Kolejnym krokiem będzie oczywiście opracowanie i przeprowadzenie odpowiednich eksperymentów mających na celu wyjaśnienie, co dzieje się, gdy objętości biologiczne stają się zbyt małe, by właściwie funkcjonować zgodnie z obowiązującymi prawami. To niebywale delikatna sprawa, ponieważ odpowiedzi na te niezwykle ważne pytania nie są oczywiste, a potencjalne wyniki mogą zaprzeczyć obecnemu paradygmatowi. Paradygmatowi, który utrzymuje, że to, co widzimy w makroskali w próbówce, jest tym samym, co dzieje się w mikroskali komórek i ich organelli. I jak pokazaliśmy w tej pracy, nie do końca tak jest. ■

Chcesz wiedzieć więcej?

Bal W., Kurowska E., Maret W. (2012). The Final Frontier of pH and the Undiscovered Country Beyond (Ostateczna granica pH oraz nieodkryty obszar poza), *PLOS One*, e45832.

Skala pH to ilościowa skala kwasowości danego roztworu wodnego, mieszcząca się w granicach od 0 do 14. pH mierzy się np. za pomocą papierków lakmusowych

