

Индукцированный ионный транспорт



§ 1. Бислойные липидные мембраны

Основные закономерности транспорта ионов через мембраны изучены в опытах с различными моделями, из которых самой близкой к биомембранам оказалась бислойная липидная мембрана (БЛМ) (см. § 2 гл. XV).

Затраты энергии, необходимые для проникновения иона в неполярную фазу, можно оценить по формуле Борна [см. (XVIII.2.3)], согласно которой энергия, затрачиваемая на перемещение иона из воды в мембрану, зависит от его радиуса r и диэлектрических проницаемостей воды ϵ_v и мембраны ϵ_m .

В системе СГС эта формула имеет наиболее простую и наглядную запись:

$$W = \frac{z^2 e^2}{2r} (1/\epsilon_m - 1/\epsilon_v), \quad (\text{XX.1.1})$$

где z — валентность иона, e — элементарный заряд. Рассчитанные по данному уравнению значения свободной энергии для перехода K^+ и K^+ из воды в неполярный растворитель с $\epsilon_m = 2$ составляют большую величину (250–350 кДж/моль). Именно это создает барьер, препятствующий прохождению ионов щелочных металлов через гидрофобную часть липидного бислоя в негидратированной форме.

Как видно из (XX.1.1), энергия перехода иона в мембрану снижается с увеличением радиуса иона. Поэтому крупные органические ионы проникают через БЛМ легче, чем катионы щелочных металлов. Для таких крупных липофильных ионов, как дипикириламин и тетрафенилбор, возможно прямое прохождение через мембрану. При изменении градиента концентрации в случае одного проникающего иона разность электрических потенциалов на БЛМ изменяется в соответствии с уравнением Нернста. Этим методом было продемонстрировано пассивное движение проникающих ионов через мембраны митохондрий, субмитохондриальных частиц, бактериальных хроматофоров при энергозависимой генерации мембранного потенциала (см. гл. XXIV).

Как видно из (XX.1.1), величина энергетического барьера в мембране уменьшается, а следовательно, проницаемость мембраны для иона возрастает не только при увеличении его радиуса, но и при приближении значений ϵ_m к ϵ_v . На этих физических принципах и основан перенос ионов ионофорами. Ионофоры могут образовывать с ионом комплекс большого размера — переносчики — либо формировать пору в мембране, заполненную водой, — каналы. Это механизмы переноса — с участием переносчиков и через ионные каналы — изучены наиболее подробно в опытах с БЛМ. □

§ 2. Подвижные переносчики

Перенос иона через мембрану с участием переносчика включает стадии образования комплекса иона с ионофором на одной стороне мембраны, перемещения комплекса через мембрану, освобождения иона на другой стороне и возвращения ионофора. Возможны две схемы работы переносчика: малая «карусель», когда ионофор не выходит из мембраны, и большая «карусель», когда ионофор проходит мембрану насквозь, а образование и распад комплексов протекает в перемешиваемых слоях около мембраны. По механизму малой карусели осуществляется, например, перенос K^+ в присутствии валиномицина.

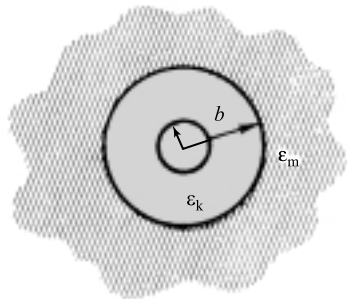


Рис. XX.1.

К расчету электростатической энергии комплекса ион–переносчик:

ϵ_m — диэлектрическая постоянная мембраны, ϵ_k — эффективная диэлектрическая постоянная внутренней полости комплекса, r — радиус иона, b — радиус комплекса ион–переносчик

Энергию комплекса иона радиусом r с переносчиком радиусом b в мембране с диэлектрической проницаемостью ϵ_m можно записать на основании формулы Борна (рис. XX.1):

$$W = \frac{e^2}{2\epsilon_m b} + \frac{e^2}{2\epsilon_k} (1/r - 1/b), \quad (\text{XX.2.1})$$

где ϵ_k — эффективная диэлектрическая проницаемость внутренней сферы комплекса. Энергия комплекса ион–переносчик оказывается значительно меньше энергии дегидратированного иона. Так, для заряженного комплекса радиусом 1 нм свободная энергия перехода из воды в мембрану составляет около 15 кДж/моль в отличие от значений 250–350 кДж/моль, соответствующих энергии дегидратации свободных ионов с радиусом 0,1–0,15 нм.

Среди соединений, относящихся к ионным переносчикам, центральное место занимают макроциклические антибиотики, выделенные из микроорганизмов, и ряд синтетических макроциклических комплексонатов (Ю. А. Овчинников, А. М. Шкроб, В. Т. Иванов). Некоторые соединения из этой группы — нейтральные ионофоры — не содержат ионизируемых групп. Это циклические полипептиды, циклические молекулы, состоящие из чередующихся аминокислот и α -оксикислот (так называемые депсипептиды, примером которых являются валиномицин и его аналоги), макроциклические структуры, включающие четыре лактоновых кольца, — макротетролиды (нонактин) — и некоторые синтетические циклические полиэфиры. Комплексы, образуемые нейтральными макроциклическими соединениями с ионами щелочных металлов, несут положительный заряд. Перенос иона через мембрану происходит в виде заряженного комплекса.

Рентгеноструктурный анализ таких комплексов показывает, что катион входит во внутреннюю полость молекулы ионофора, причем образовавшаяся структура стабилизируется за счет взаимодействия иона с 6–8 полярными группировками (эфирные, амидные или сложноэфирные). В таких комплексах ион металла экрани-

рован от взаимодействия с растворителем. Химическое строение молекулы валиномицина показано на рис. XX.2. Высокая избирательность валиномицина к образованию комплексов с K^+ достигается хорошим стерическим соответствием K^+ и внутренней полости валиномицина, которую образуют СО-группы. Валиномицин, комплексуясь с K^+ , полностью его дегидратирует, а карбонильные (СО-) диполи заменяют гидратную оболочку. Ион Na может поместиться в полости валиномицина, однако вследствие меньшего (по сравнению с K^+) радиуса он оказывается не в состоянии взаимодействовать с кислородом карбонильных групп. Поэтому

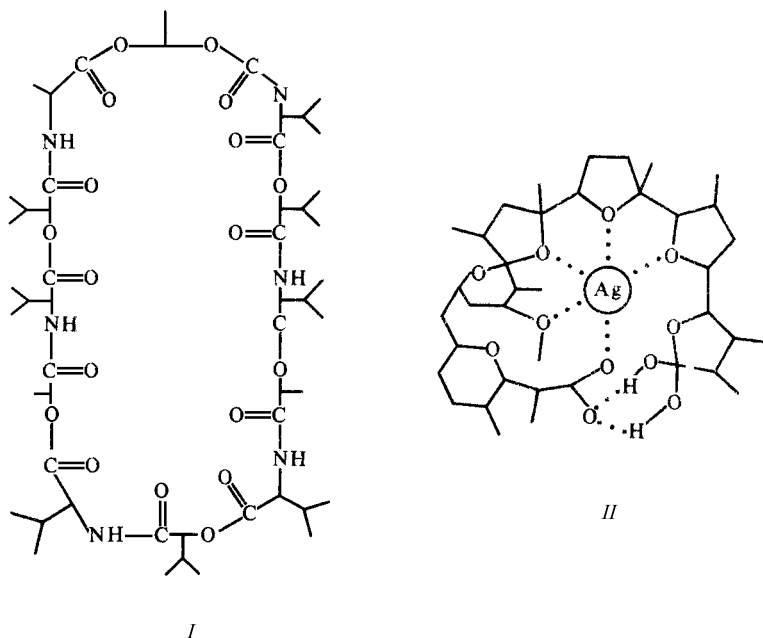


Рис. XX.2.

Химическое строение некоторых ионофоров. *I* — молекула валиномицина, *II* — система металл-кислородных и водородных связей в серебряной соли нигерицина

энергия связывания иона Na с водой гидратной оболочки оказывается больше энергии его связывания с молекулой валиномицина. Если бы молекула валиномицина была достаточно гибкой и размер полости можно было бы «подстроить» под Na^+ , то валиномицин не обладал бы хорошей селективностью. Молекула валиномицина переносит через БЛМ не более 10^4 ионов/с. □

Некоторые ионофору, такие, как нигерицин и гризорицин, формально имеют нециклическое строение, но они также способны связывать ионы металлов, образуя комплексы, в которых молекула находится в свернутой, псевдоциклической конформации. В нигерицине и его аналогах присутствует СООН-группа, ионизированная при нейтральных значениях рН. Предполагаемое строение комплекса катиона с нигерицином также показано на рис. XX.2.

Будучи слабыми кислотами и одновременно обладая способностью образовывать комплексы с ионами металлов, нигерицин и его аналоги переносят через мембрану сразу два типа ионов, а при наличии градиента ионов индуцируют обменный транспорт (см. § 3 гл. XXIV). Так, нигерицин индуцирует в БЛМ и биологических мембранах обмен H^+ на K^+ . В растворе с высоким содержанием протонов нигерицин протонируется и в форме нейтральной недиссоциированной молекулы пересекает мембрану. На другой стороне мембраны происходит депротонирование

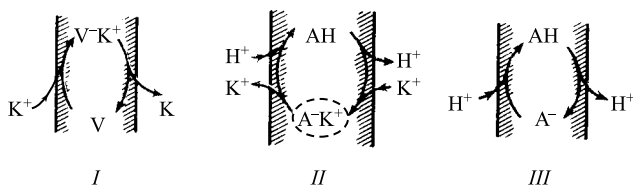


Рис. XX.3.

Индуцированный транспорт ионов при участии различных переносчиков, *I* — нейтральные ионофоры (валиномицин), *II* — нигерицин (обменный транспорт H^+ и K^+); *III* — липофильные разобщители фосфорилирования (перенос протонов):

A^- — диссоциированная форма переносчика, AH — протонированная форма переносчика, V — валиномицин

$COOH$ -группы нигерицина; при этом молекула свертывается в кольцо вокруг K^+ . Стабильная конфигурация образуемого комплекса поддерживается взаимодействием катиона с дипольными частями ионофора и водородными связями между его противоположными концами (рис. XX.2). Переносчики двухвалентных катионов $X537$ и $A23187$ индуцируют электронейтральный обмен Ca^{2+} и Mg^{2+} на протоны.

Рассмотренные варианты работы переносчиков показаны на рис. XX.3, здесь же изображен механизм переноса H^+ липофильными проводниками протонов. Перенос протонов через мембрану осуществляется в основном слабыми кислотами, диссоциированная форма которых присоединяет H^+ с образованием нейтральной молекулы. Недиссоциированная форма протонифора пересекает мембрану, двигаясь по градиенту концентрации; перенос отрицательно заряженной анионной формы в обратном направлении происходит под действием электрического поля. По такому механизму работают разобщители окислительного и фотосинтетического фосфорилирования, повышающие проницаемость БЛМ и энергосопрягающих мембран для H^+ , такие, как 2,4-динитрофенол, карбонилцианидхлорфенилгидразон, тетра-хлортрифторметилбензимидазол и др. (рис. XX.4).

§ 3. Каналообразующие агенты

Движение иона значительно облегчается, если молекулы ионофора образуют комплекс, имеющий водную пору — канал. Наиболее известными каналообразующими соединениями являются грамицидин А, аламетицин, амфотерицин, моназомицин и полиеновые антибиотики. □

Все эти молекулы обладают свойством к водной и органической фазам, что, с одной стороны, позволяет им образовывать водную пору, а с другой — приводит к сильной сорбции антибиотика на мембрану. Внешняя часть молекул в поре гидрофобна, а внутрь канала обращены хорошо поляризуемые группы.

Заряженные или сильно полярные группы могут находиться на одном конце молекулы. Такие группы служат «якорем», удерживая полярный конец на одной из сторон мембраны, позволяя молекуле пронизать гидрофобную часть мембраны.

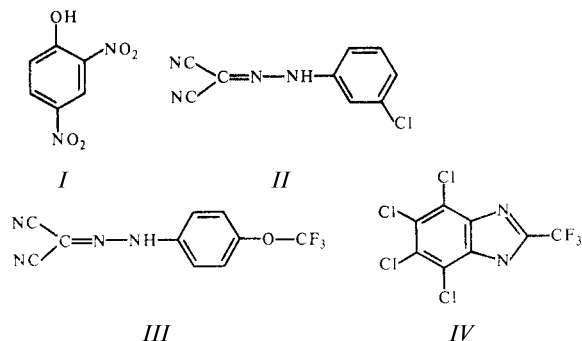


Рис. XX.4.

Химическое строение некоторых липофильных переносчиков протонов

I — 2,4-динитрофенол; *II* — карбонилцианидхлорфенилгидразон; *III* — карбонилцианидтрифторметоксифенилгидразон; *IV* — тетрачлортрифторметилбензимидазол (*TTFB*)

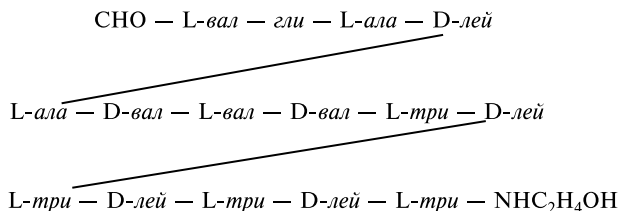


Рис. XX.5.

Структура грамицидина А. Каждый горизонтальный ряд аминокислот соответствует примерно одному повороту $\pi_{L,D}^6$ -спирали, диагональные линии — пептидным связям, соединяющим отдельные витки спирали

Ионные каналы в БЛМ экспериментально можно обнаружить по характерному шуму проводимости, возникающему вследствие их открывания и закрывания (см. § 5 гл. XX). Эта черта функционирования каналов позволяет отличить данный механизм проводимости от транспорта с участием переносчиков.

Каналы, образованные грамицидином А. Пептидная цепь молекулы грамицидина А сформирована пятнадцатью гидрофобными аминокислотами (рис. XX.5), причем характерной чертой является чередование L- и D-конфигураций аминокислот, а также наличие формильной группы на N-конце молекулы (голова) и этаноламина на C-конце (хвост). Молекула полностью гидрофобна, за исключением карбонильных и иминогрупп пептидной цепи и концевых полярных групп.

Находясь в мембране, молекула грамицидина А сворачивается в спиралевидную структуру — полупору, стабилизированную гидрофобными связями, и формирует полый цилиндр длиной около 3 нм и диаметром поры около 0,5–0,8 нм. Такая

структура называется $\pi_{L,D}^6$ -спиралью. Название определяется тем, что каждый виток спирали образован шестью аминокислотными остатками, причем СО-группы L-аминокислотных остатков ориентированы вдоль оси спирали по направлению к С-концу, а соответствующие группы D-остатков и глицина — к N-концу.

При добавлении небольших количеств грамицидина А к БЛМ наблюдаются скачкообразные изменения тока через мембрану. При фиксированном значении напряжения на БЛМ происходят дискретные изменения проводимости мембран при

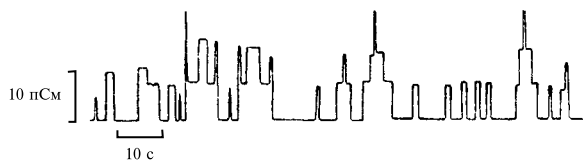


Рис. XX.6.
Записи тока через одиночные каналы, образованные в БЛМ грамицидином А

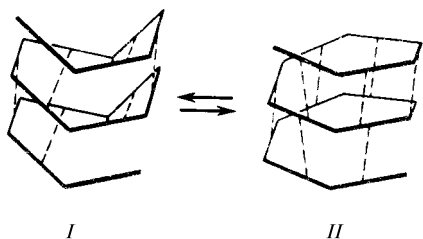


Рис. XX.7.
Равновесие анти- β_2^6 - (I) и $\pi_{L,D}^6$ -спиралей (II) грамицидина А; штриховыми линиями обозначены водородные связи (по D. W. Urry, 1972)

Предполагают, что $\pi_{L,D}^6$ -спираль может находиться в равновесии с другой структурой — так называемой анти- β_2^6 -спиралью. В анти- β_2^6 -спирали нет внутренней полости, и поэтому она не может вмещать ионы металлов. Так как анти- β_2^6 -спираль имеет меньший дипольный момент, чем $\pi_{L,D}^6$ -спираль, то равновесие между этими формами может смещаться в ту или другую сторону под влиянием внешнего электрического поля

мерно равной величины (рис. XX.6). Они могут быть вызваны, например, образованием и распадом одиночных каналов при ассоциации двух мономеров и диссоциации димера грамицидина. Димерная структура образует сквозной трансмембранный канал с проводимостью около 40 пСм в 0,1 М растворе КСl. По такому каналу может переноситься около 10^7 – 10^8 ионов/с.

Причины переходов между проводящим и непроводящим состояниями канала могут быть различны. Альтернативный механизм открывания грамицидиновых каналов показан на рис. XX.7.

Относительно низкая селективность грамицидинового канала может быть следствием эластичности спиральной структуры. При входе иона в канал вода гидратной оболочки частично замещается на карбонильные группы, обращенные внутрь поры. При этом происходит некоторое смещение карбонильных групп по направлению к оси спирали, в результате чего диаметр поры сужается примерно до размера иона. Таким образом обеспечивается наиболее сильное взаимодействие катиона с лигандной системой канала.

Грамицидин — крайне эффективный модификатор БЛМ. В субмикромольных концентрациях он повышает проводимость в 10^6 – 10^8 раз по отношению к уровню проводимости немодифицированных мембран.

Аламетицин. Это пептидный антибиотик, состоящий из 20 преимущественно гидрофобных аминокислот, объединенных в линейную цепь. Проводимость БЛМ, находящихся в водном растворе, в присутствии аламетицина резко зависит от концентраций антибиотика и электролита и от значения мембранного потенциала (рис. XXI.8).

Установлено, что каждый канал, образуемый аламетицином, может иметь несколько (до семи) состояний проводимости. Предполагают, что канал представляет

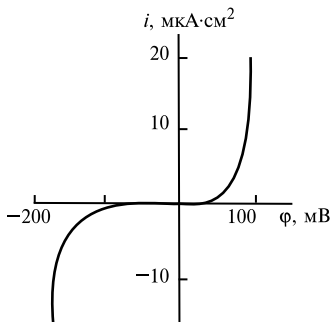


Рис. XX.8.
Зависимость проводимости БЛМ (в присутствии аламетицина) от значения мембранного потенциала (φ):
 i — ток через мембрану

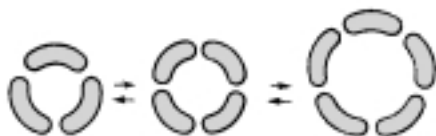


Рис. XX.9.
Сборка аламетицинового канала. Показаны различные состояния канала, соответствующие тримеру, тетрамеру и пентамеру из молекул аламетицина

собой водную пору переменного диаметра. Добавление одной молекулы аламетицина в кольцо молекул, образующих водную пору, приводит к увеличению эффективного сечения поры, а каждому состоянию канала соответствует определенное количество мономеров в кольце. Первое проводящее состояние обусловлено тримером из молекул аламетицина, второе — тетрамером и т. д. (рис. XX.9).

Состояние канала характеризуется не только величиной проводимости, но и средним временем жизни. Если переходы между открытым и закрытым состояниями канала являются случайными, т. е. представляют собой марковский процесс, то зависимость числа каналов, время жизни которых превышает заданное время t , $N(t)$, от значения параметра t в полулогарифмических координатах спрямляется (рис. XX.10). □

Среднее время жизни канала τ_0 определяется уравнением

$$N(t) = N_0 \exp(-t/\tau_0). \quad (\text{XX.3.1})$$

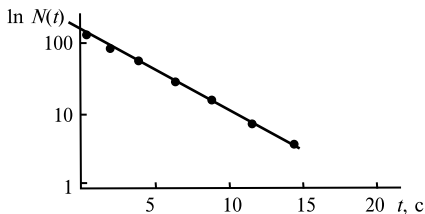


Рис. XX.10.
Распределение времен жизни амфотерициновых каналов:

$N(t)$ — число каналов, находящихся в открытом состоянии в течение большего времени, чем заданное значение t

∇ Величина τ_0 связана с константой скорости перехода канала из открытого в закрытое состояние α соотношением $\alpha = 1/\tau_0$. □

Дискретные изменения проводимости регистрируются лишь в том случае, когда проводимость мембраны сопоставима с проводимостью одиночного канала, т. е. при крайне малых концентрациях антибиотика. При высокой степени модификации мембраны антибиотиками ее проводимость на несколько порядков превышает проводимость одиночного канала и дискретные изменения проводимости неизмеримы. Тем не менее существует возможность отличить механизмы переноса с участием подвижных переносчиков и по ионным каналам по измерениям интегральной проводимости.

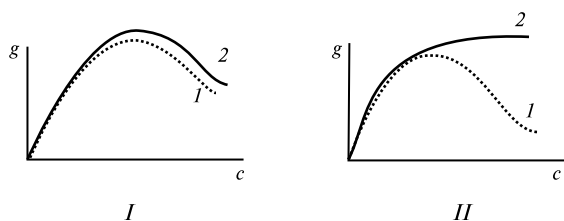


Рис. XX.11.

Концентрационные зависимости проводимости БЛМ на постоянном (I) и переменном (II) токе в случае транспорта по каналному механизму (1) и с участием подвижных переносчиков (2).

Два механизма ионного транспорта (каналы и переносчики) можно различать по концентрационным зависимостям проводимости на переменном токе, более информативным, чем измерения на постоянном токе. Например, зависимость проводимости на постоянном токе от концентрации переносимого иона как для транспорта с переносчиком, так и по каналному механизму носит немонотонный куполообразный характер. Это объясняется блокировкой каналов при высоких концентрациях транспортируемого иона. В случае подвижных переносчиков снижение скорости переноса при высоких концентрациях обусловлено отсутствием свободной формы ионофора, так как весь ионофор находится в виде комплекса с катионом. На переменном токе зависимости проводимости БЛМ для двух разных механизмов переноса отличаются. При высоких концентрациях электролита входные участки каналов заполнены, перескоки через центральный барьер невозможны и проводимость канала на переменном токе остается низкой. В то же время заряженные комплексы переносчика с катионом и на высокой частоте могут переносить ток через мембрану, благодаря чему проводимость БЛМ с переносчиком остается высокой

Один из подходов состоит в том, что мембрану охлаждают до температуры ниже точки фазового перехода липида (см. § 1 гл. XVI). При этом проводимость БЛМ, индуцированная подвижными переносчиками — валиномицином или нонактином, — значительно уменьшается, а проводимость, индуцированная грамицидином, почти не изменяется. Увеличение вязкости мембраны при понижении температуры препятствует движению подвижных переносчиков, но оказывает относительно слабое влияние на транспорт ионов через канал, пронизывающий мембрану насквозь. Другой подход состоит в сравнении проводимости мембран на переменном токе (рис. XX.11).

§ 4. Влияние поверхностного и дипольного потенциалов на скорость ионного транспорта

Проводимость мембран, индуцированная нейтральными ионофорами-переносчиками, существенно изменяется при введении в водные растворы заряженных поверхностно-активных веществ и дипольных модификаторов. Это объясняется тем, что

движение заряженных комплексов ион–переносчик через БЛМ и клеточные мембраны существенным образом зависит от скачков потенциала на границе мембраны с электролитом, называемых граничными потенциалами.

Граничный потенциал φ_b (рис. XX.12) складывается из двух компонентов — поверхностного потенциала φ_s и дипольного потенциала φ_d :

$$\varphi_b = \varphi_s + \varphi_d. \quad (\text{XX.4.1})$$

□

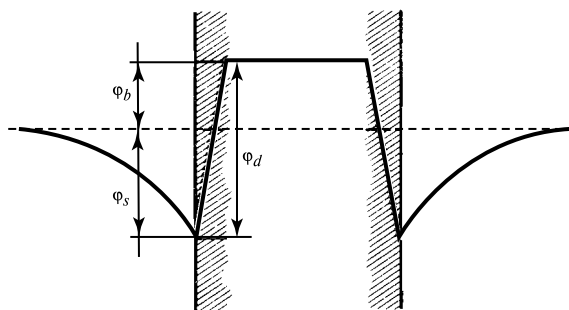


Рис. XX.12.

Граничный потенциал (φ_b) как сумма поверхностного (φ_s) и дипольного (φ_d) потенциалов

Мембрана находится в симметричном ионном окружении при отсутствии внешне приложенной разности потенциалов

Поверхностный потенциал обусловлен фиксированными зарядами мембраны, образованными диссоциируемыми группами в полярных головках липидов, а также ионизируемыми группами аминокислот, входящих в состав структурных белков мембраны. Фиксированные на поверхности мембраны заряды и притягивающиеся к ним противоположные ионы образуют двойной электрический слой (см. § 5 гл. XVIII).

Плотность фиксированных зарядов мембраны σ обычно находится в пределах от 0 до 5 мкКл/см² и зависит от состава липидов и pH среды (см. § 1, 2 гл. XV). Отрицательный заряд мембран возрастает с увеличением pH среды.

Плотность зарядов мембраны изменяется также в результате адсорбции на мембране катионных и анионных детергентов, например цетилтриметиламмония или додецилсульфата, а также многовалентных ионов (Ca, La, Al, многовалентные анионы).

Дипольный скачок потенциала образован ориентированными диполями воды и полярных групп липидных молекул. На основании измерений граничного потенциала монослоев различных липидов был сделан вывод, что гидрофобная область БЛМ заряжена положительно на несколько сот милливольт по отношению к потенциалу водных растворов у границы с мембраной. Принято считать, что в отличие от поверхностного потенциала дипольный потенциал не зависит от pH и ионной силы водного раствора.

Дипольный потенциал можно менять, вводя в БЛМ различные вещества — дипольные модификаторы, электронейтральные молекулы которых обладают значительным дипольным моментом. К таким веществам относятся, например, холестерин, салициламид и флоретин. Поверхностный и дипольный потенциалы относятся

к одним из основных факторов, определяющих проницаемость липидных бислоев для проникающих ионов и заряженных комплексов ион–переносчик. Значение поверхностного потенциала определяет равновесную концентрацию ионов в мембране на границе с раствором:

$$c_M = \gamma c \exp\left(-\frac{zF\varphi_s}{RT}\right), \quad (\text{XX.4.2})$$

где γ — коэффициент распределения иона или заряженного комплекса между мембраной и водой. Если поверхностный потенциал отрицателен, что характерно для большинства клеточных мембран и многих БЛМ, то примембранная концентрация катионов повышена, а соответственно повышена и концентрация катионов в мембране на границе с раствором. \square

Значение дипольного потенциала определяет в качестве одной из составляющих высоту потенциального барьера для перехода заряженных частиц в мембрану. Так как проводимость мембраны g пропорциональна произведению равновесной концентрации заряженных частиц в мембране у границы с раствором на константу скорости их перемещения через мембрану v , то с учетом (XX.4.2) получаем простую формулу, описывающую зависимость проводимости от граничного потенциала:

$$g = \gamma c \exp\left(-\frac{zF\varphi_s}{RT}\right) v_0 \exp\left(-\frac{zF\varphi_d}{RT}\right) = g_0 \exp\left(-\frac{zF\varphi_b}{RT}\right). \quad (\text{XX.4.3})$$

Валентность z в (XX.4.3) относится к заряду транспортируемого иона в случае прямого прохождения иона и к заряду комплекса ион–переносчик в случае индуцированного ионного транспорта.

Из уравнения (XX.4.3) видно, что увеличение отрицательного поверхностного потенциала (при неизменном значении дипольного потенциала) должно сопровождаться увеличением проводимости БЛМ, индуцируемой положительно заряженными комплексами ион–переносчик. Экспериментальное исследование зависимости проводимости БЛМ, индуцированной положительно заряженным ионофорным комплексом нонактин–калий, полностью подтверждает это предположение. Так как заряд БЛМ образуется в результате диссоциации кислотных и основных групп головок фосфолипидов, то он меняется в зависимости от рН, что приводит к росту проводимости с увеличением рН в присутствии нонактина. В соответствии с формулой (XX.4.3) проводимость заряженных БЛМ, индуцируемая нонактином, при нейтральных и щелочных значениях рН снижается с увеличением ионной силы, что вызвано экранированием поверхностного заряда, уменьшением значения φ_s и соответствующим снижением равновесной концентрации положительно заряженных носителей тока в мембране (рис. XX.13).

Дипольный модификатор салициламид в концентрации 10 мМ повышает в 20 раз проводимость БЛМ для катионов и во столько же раз снижает проводимость для анионов, но не оказывает влияния на электрокинетический (дзета) потенциал везикул. Указанные изменения обусловлены сдвигом дипольного потенциала на величину около 75 мВ. Флоретин в концентрации 10^{-4} М повышает проводимость БЛМ для катионов в 1000 раз, что соответствует сдвигу дипольного потенциала на 180 мВ.

Если известна плотность n расположения дипольных групп, ориентированных перпендикулярно плоскости мембраны, и известна величина дипольного момента μ ,

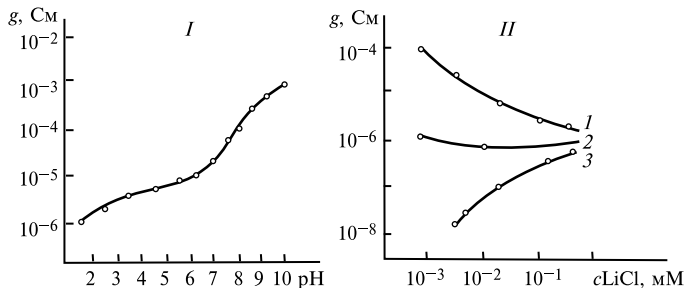


Рис. XX.13.

Влияние поверхностного заряда на индуцированную неонактивом проводимость БЛМ (g):

I — влияние рН на проводимость БЛМ из амфотерного фосфатидилэтаноламина, II — влияние ионной силы на проводимость БЛМ из фосфатидилэтаноламина при различных рН (1 — 10,9; 2 — 5,5; 3 — 2,4)

можно оценить дипольный потенциал:

$$\varphi_d = \frac{n\mu}{\epsilon_0}. \quad (\text{XX.4.4})$$

Значения дипольных моментов некоторых химических связей и молекулярных групп приведены в таблице XX.1.

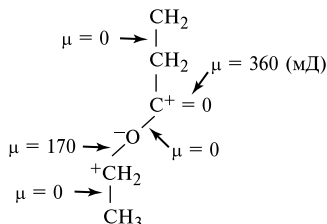
При расчетах по (XX.4.4) необходимо учитывать, что дипольный момент величиной один дебай соответствует $(1/3) \cdot 10^{-29}$ Кл · м в системе СИ.

Изменение проводимости БЛМ при адсорбции на ней заряженных детергентов и ионов многовалентных металлов также объясняется изменением поехвностного потенциала БЛМ.

Таблица XX.1.

Дипольные моменты молекулярных групп и химических связей (по S. Ohki, 1985)

Дипольные моменты связей в миллидебаях



Дипольные моменты групп в дебаях

Группа	Дипольные моменты групп в дебаях	
	Алифатические соединения	Ароматические соединения
CH ₃ -C	0	0,4
C-Cl	2,1	1,6
C-Br	2,0	1,5
NH ₃ -C	0,8	1,5
C-CN	3,8	3,9
C-NO ₂	3,5	3,9
C-OH	1,7	1,6
C-OCH ₃	1,3	1,3
C-COOH	1,7	1,6