Доклады Академии наук СССР
1972. Том 205, № 3

УДК 577.15.3

БИОХИМИЯ

Л. С. ЯГУЖИНСКИЙ, Е. Г. СМИРНОВА, Л. А. РАТНИКОВА,
И. П. КРАСИНСКАЯ, Н. А. АЗАРЕНКОВА

ГИДРОФОБНЫЕ ПЛОЩАДКИ ФЕРМЕНТОВ НАЧАЛЬНОГО УЧАСТКА ЭЛЕКТРОНТРАНСПОРТНОЙ СИСТЕМЫ МИТОХОНДРИЙ

(Представлено академиком А. И. Белозерским 2 XI 1971)

Известно, что участок дыхательной цепи между НАД и цитохромом b чувствителен к ингибиторам, резко различающимся по химической структуре ([1–4]). Относительно высокое сродство к липидам указанных ингибиторов наводило исследователей на мысль о том, что связь веществ с ферментом в значительной мере осуществляется за счет гидрофобного взаимодействия ([5]).

В связи с этим интересна работа Ганша и Андерсона, показавших взаимосвязь между ингибирующим эффектом барбитуратов и величиной их коэффициента распределения в системе октанол/вода (P) ([6]):

$$\lg \frac{1}{c} = 1{,}1 \lg P + 1{,}24. \qquad (1)$$

Следует подчеркнуть, что эти данные ничего не говорят о роли, которую играют функциональные группы барбитуратов при взаимодействии с ферментом.

В настоящей работе доказано существование функционально важной гидрофобной площадки в начальном участке дыхательной цепи митохондрий между НАД и цитохромом b. Вторая гидрофобная площадка обнаружена в области дегидрогеназ субстратов, связанных с НАД.

Исследования проведены на митохондриях печени крысы ([7]) и на субмикрохондриальных частицах (СМЧ), выделенных из сердца быка ([8]).

Дыхание регистрировали полярографическим методом со стационарным платиновым электродом, в качестве электрода сравнения использовали хлорсеребряный электрод. Среда инкубации в работе с митохондриями содержала: 0,2 моля сахарозы; 0,03 моля трис-HCl-буфера; 0,01 моля KH_2PO_4; 0,005 моля $MgSO_4$; 0,02 моля KCl и 250 μмол. ЭДТА, pH 7,5; субстраты дыхания — глутамат — малат (по 5 ммол. в пробе). Содержание белка в пробе 3—4 мг.

Коэффициент распределения определяли на дифференциальном спектрофотометре фирмы Хитачи в системе октанол — вода.

Мы обнаружили, что эфиры и амиды ароматических кислот (табл. 1, 17—22) подавляют электронный транспорт так же, как барбитураты. Эффект ингибирования окисления яблочной кислоты, вызванный этими соединениями, снимается витамином K_3 (рис. 1). Таким же эффектом обладают фенолы с $pK_{дисс} > 7{,}7$ (табл. 1, 1—4) и производные анилина (табл. 1, 9—13).

Эффективность различных классов ароматических веществ определяется степенью их средства к липидам. На рис. 3*А* можно видеть, что эффективность изученных веществ тем выше, чем больше коэффициент распределения (P) в системе октанол/вода.

Существование корреляции эффективности ароматических соединений с величиной P, единой для различных классов химических веществ, однозначно показывает, что функциональные группировки не принимают непосредственного участия в связывании ингибитора с ферментом. При этом

Таблица 1

Биологическая эффективность и физико-химические параметры ингибиторов начального участка дыхательной цепи

№№ п.п.	Соединение	$\lg P$ *	$pK_{дисс}$	$\lg \frac{1}{c}$ **
1	Фенол	1,46	9,90	2,00
2	4-Хлорфенол	2,39	9,44	2,85
3	2-Метил-4-хлорфенол	2,78	9,60	3,50
4	2,4-Дихлорфенол	3,08	7,75	3,65
5	2,4,6,-Трихлорфенол	4,05	7,00	3,40
6	2,4-Дибромфенол	3,48	7,60	2,80
7	2,4,6-Трибромфенол	4,23	6,80	3,45
8	Пентахлорфенол	5,86	4,80	4,40
9	Анилин	0,90	—	1,72
10	4-Метоксианилин	0,78	—	1,7
11	4-Метиланилин	1,39	—	2,2
12	4-Броманилин	2,05	—	3,00
13	N,N-Диметиланилин	2,29	—	2,82
14	Метанол	—0,68	—	—0,3
15	Этанол	—0,15	—	0,3
16	Бутанол	0,32	—	0,65
17	Этилбензоат	2,20	—	2,8
18	Этиловый эфир коричной кислоты	2,91	—	3,52
19	N-Этил-N-ацетоксиэтиланилин	2,04	—	2,92
20	Диацетокситолуол	1,62	—	3,00
21	1-Ацетоксинафталин	2,78	—	3,50
22	1-Фенил-2-ацетамидоциклопропан	1,43	—	2,66
23	Фенилуксусная кислота	1,51	—	2,14
24	Коричная кислота	2,08	—	2,35
25	*n*-(N-2-Хлорэтил-N-ацетил)-аминофенил-уксусная кислота	1,20	—	2,05

* Некоторые значения взяты из работ Ганша (⁹, ¹⁰).

** *c* — концентрация ингибиторов, вызывающая 50% торможение дыхания митохондрий в состоянии 3 по Чансу. Концентрации в табл. 1 соответствуют концентрациям ингибиторов на рис. 2 и 3.

можно думать, что фермент-ингибиторный комплекс образуется либо за счет гидрофобного взаимодействия, либо в результате образования π-комплекса между ароматическими ядрами ингибитора и фермента.

Последняя возможность была исключена при исследовании действия на дыхание митохондрий алифатических спиртов. Спирты (табл. 1, 14—16) оказались ингибиторами начального участка дыхательной цепи, эффективность которых также определяется величиной коэффициента распределения (рис. 3*А*).

Совокупность приведенных данных показывает, что ингибирование электронного транспорта происходит в результате гидрофобного взаимодействия полярных органических веществ с ферментом дыхательной цепи. Эффективность веществ описывается уравнением

$$\lg \frac{1}{c} = 1{,}1 \lg P + 0{,}6. \qquad (2)$$

Это, в свою очередь, говорит о том, что в системе окислительного фосфорилирования присутствует гидрофобная площадка, которая играет существенную роль в механизме переноса электронов; неспецифическая гидрофобная адсорбция органических молекул, нарушающая свойства этой площадки, прерывает транспорт электронов по дыхательной цепи.

Более подробное исследование адсорбционных свойств гидрофобной площадки показало, с одной стороны, что неполярные ароматические молекулы (метиловые эфиры 2-метил-4-хлорфенола и α-нафтола) не подчиняются уравнению (2); их эффективность оказывается в 10—100 раз более низкой, чем это предписывается уравнением (2). В то же время они нарушают электронный транспорт, по-видимому, в той же области, что и полярные соединения, так как их эффект частично снимает K_3.

С другой стороны, сильно диссоциирующие ароматические кислоты не способны адсорбироваться на гидрофобной площадке, локализованной между НАД и цитохромом b, что особенно наглядно видно при сопоставлении действия фенолов с низкой и с высокой константой диссоциации на дыхание СМЧ (рис. 2). Слабокислые фенолы (табл. 1, 1—3) адсорбируются на гидрофобной площадке между НАД и цитохромом b. Их эффективность

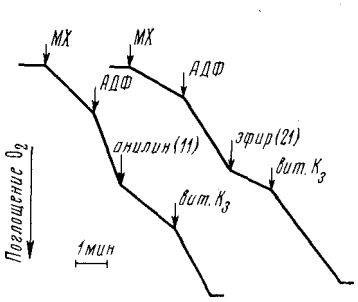


Рис. 1

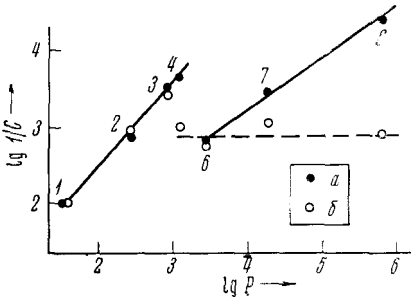


Рис. 2

Рис. 1. Снятие эффекта торможения дыхания митохондрий ингибиторами с помощью витамина K_3

Рис. 2. Зависимость эффективности фенолов с низкой и высокой константой диссоциации, ингибирующих дыхание митохондрий (*а*) и СМЧ (*б*), от коэффициента распределения в системе октанол/вода (P). Цифры на графике соответствуют номерам веществ в табл. 1

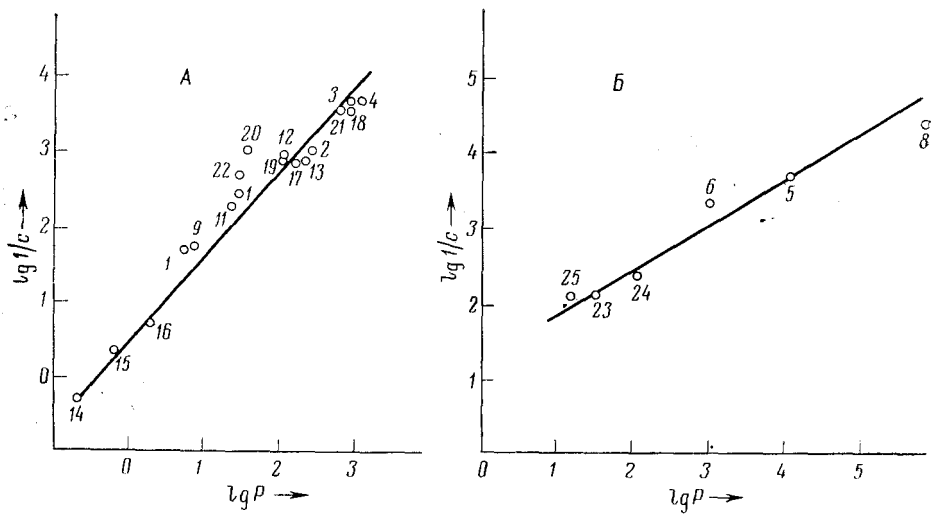


Рис. 3. Зависимость эффективности ингибиторов при действии на дыхание митохондрий от коэффициента распределения в системе октанол/вода. *А* — нейтральные соединения, *Б* — анионы кислот с $pK < 7{,}7$

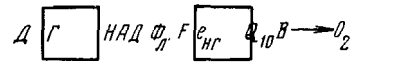
растет пропорционально величине P; фенолы, имеющие $pK < 7{,}7$ (табл. 1, 4—8), не адсорбируются на гидрофобной площадке, их эффективность резко занижена по сравнению с теоретической (см. уравнение (2)) и не зависит от величины коэффициента распределения. В случае митохондрий печени приблизительно в этой же области значений pK наблюдается скачок ингибирующих свойств фенолов (рис. 2). На митохондриях сердца этот перелом выражен менее четко.

Из сопоставления кривых на рис. 2 видно, что фенолы с высокой константой диссоциации в митохондриях ингибируют гидрофобный участок, связанный с работой дегидрогеназы. Действительно, в случае СМЧ, где дегидрогеназа субстратов не функционирует (субстрат окисления НАД-Н), ингибирующая эффективность этих фенолов резко снижена по сравнению

с митохондриями, в которых работает дегидрогеназа. Витамин K_3 не снимает ингибирующего эффекта сильнокислых фенолов (табл. 1, 4—8). Эти данные были подтверждены при исследовании ингибирующего действия ароматических карбоновых кислот (табл. 1, 23—25, $pK < 5$). Из рис. 3*Б* можно видеть, что ингибирующая эффективность анионов кислот также коррелирует с величиной P согласно уравнению

$$\lg \frac{1}{c} = 0{,}57 \lg P + 1{,}3. \qquad (3)$$

Таким образом, наши наблюдения показали, что в начальном участке электронтранспортной системы митохондрий есть две функционально важные гидрофобные площадки, резко различающиеся по своей способности адсорбировать органические молекулы. Первая площадка локализована в области дегидрогеназ субстратов, связанных с НАД. Она эффективно адсорбирует сильные кислоты ароматического ряда, которые в условиях опыта полностью диссоциированы.



Вторая площадка локализована между НАД и цитохромом b. Она адсорбирует только незаряженные полярные молекулы. Излом на рис 2 показывает, что заряд препятствует посадке сильной кислоты на эту площадку.

Функция указаных гидрофобных площадок пока не выяснена, однако можно с большой степенью достоверности считать, что в естественных условиях они служат для связывания коферментов дыхательной цепи, НАД и KoQ соответственно.

Существование гидрофобной площадки в цепи переноса электронов по дыхательной цепи, которая неспецифически взаимодействует с полярными органическими молекулами, говорит о том, что очень широкий класс органических веществ (в том числе лекарственные препараты) должен нарушать дыхание митохондрий.

Это, с одной стороны, позволило объяснить физиологическое значение K_3- и b_5-шунтов ([12]) в митохондриях печени и почек. Показательно, что шунты есть именно в тех органах, которые подвержены массированному воздействию чужеродных веществ, попадающих в кровь, и продуктов катаболизма. С другой стороны, сопоставление наших данных (рис. 3*А*, уравнение (2)) с данными Ганша и Андерсона по действию барбитуратов (уравнение (1)) ([6]) на дыхание митохондрий показало, что барбитураты *, так же как и изученные нами вещества, являются неспецифическими гидрофобными ингибиторами электронного транспорта.

По-видимому, аналогичный механизм лежит в основе действия многих известных в настоящее время ингибиторов начального участка дыхательной цепи.

Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова

Поступило
30 VIII 1971

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

[1] G. Palmer, D. Horgan et al., J. Biol. Chem., **243**, 844 (1968). [2] R. Beyer, D. Crankshaw, J. Kuner, Biochim. Biophys. Res. Commun., **28**, 758 (1967). [3] E. Kean, Arch. Biochem. and biophys., **127**, 528 (1968). [4] M. Cowger, R. Lable, B. Mackler, Arch. Biochem. and Biophys., **96**, 583 (1962). [5] E. Redfearm, T. King, Nature, **202**, 1313 (1964). [6] C. Hansch, S. Anderson, J. Med. Chem., **10**, 745 (1967). [7] В. П. Скулачев, В кн. Соотношение окисления и фосфорилирования, «Наука». [8] C. Hansen, D. Smith, Biochem. et biophys. acta, **81**, 214 (1964). [9] T. Fujita, J. Iwasa, C. Hansch, J. Am. Chem. Soc., **86**, 5175 (1964). [10] C. Hansch, J. Quinlan, G. Lawrence, J. Org. Chem., **33**, 347 (1968). [11] Л. А. Ратникова, Л. С. Ягужинский, В. П. Скулачев, Биохимия, **36**, 347 (1964). [12] В. П. Скулачев, В кн. Аккумуляция энергии в клетке, «Наука», 1969.

* Небольшое различие величины β в уравнениях (1) и (2), вероятно, обусловлено тем, что в ([6]) действие барбитуратов испытывалось на митохондриях сердца.