

Д. Ш. УГРЕХЕЛИДЗЕ, академик АН ГрузССР С. В. ДУРМИШИДЗЕ,
Ш. М. РУХАДЗЕ

ИНГИБИРОВАНИЕ ФЕРМЕНТАТИВНОГО ОКИСЛЕНИЯ ИНДОЛИЛУКСУСНОЙ КИСЛОТЫ *n*-БЕНЗОХИНОНАМИ

Фенольные соединения, как показывает ряд экспериментальных данных, проявляют физиологическую активность в форме соответствующих хинонов и участвуют в регуляции роста растений через ауксиновый обмен (¹⁻³). Однако об участии в регуляции ауксинового обмена многочисленных растительных хинонов, в том числе и убихинонов, почти ничего не известно (^{4, 5}). В настоящей статье рассматривается вопрос о влиянии *n*-бензохинонов на активность ферментной системы, окисляющей индолилуксусную кислоту (ИУК) в корнях гороха.

Для опытов брали корни 10-дневных проростков гороха сорта Победитель, выращенных на свету на водопроводной воде. Сырые ферментные экстракты готовили на 0,02 М фосфатном буфере со значением рН 6,1; для гель-фильтрации применяли сефадекс Г-25 средней зернистости; в гель-фильтрате белок определяли по Лоури. Активность ауксиноксидазы определяли по убыли в реакционной среде ИУК колориметрически по известной методике (⁶) и по скорости декарбоксилирования меченого ¹⁴C-ИУК; измерение радиоактивности производили на торсионном счетчике БЛФ-25 эффективностью 10,1%. Хиноны синтезировали: толухинон из толуидина (⁷), тимохинон и дуροхинон — из соответствующих углеводов (^{8, 9}); восстановлением указанных хинонов получали гидрохиноны. Перед употреблением препараты сублимировали; их чистоту контролировали методом г.ж.х. (хроматограф Хром-3, пламенно-ионизационный детектор, длина колонки 50 см, неподвижная фаза — полиэтиленгликольадипат). Хиноны и гидрохиноны применяли в виде растворов в 0,02 М фосфатном буфере с рН 6,1.

Влияние бензохинонов и соответствующих гидрохинонов на активность оксидазы ИУК изучали в следующих вариантах опытов:

1. Раствор хинона (гидрохинона) инфильтровывался в вакууме через корни, биомасса выдерживалась 30 мин., после чего из нее готовили сырой ферментный экстракт (⁶); полученный ферментный экстракт фильтровался через гель с целью удаления не связанного с белками хинона (гидрохинона), продуктов его метаболизма и других низкомолекулярных соединений (включая и природный ингибитор оксидазы ИУК); в заключение происходило определение активности ауксиноксидазы.

2. Из корней готовился сырой ферментный экстракт (⁶), гельфильтрацией которого получали суммарную белковую фракцию; к полученной белковой фракции добавлялся раствор хинона (гидрохинона), реакционная масса выдерживалась 15 мин., после чего подвергалась гель-фильтрации; в фильтрате определялась активность ауксиноксидазы.

Результаты опытов первого (*in vivo*) и второго (*in vitro*) вариантов качественно полностью совпали. Количественные данные, приведенные ниже, получены при втором варианте опытов.

Полученные экспериментальные данные показывают, что способность *n*-бензохинона ингибировать процесс окисления ИУК в корнях гороха зависит от структуры молекулы хинона: хиноны, имеющие свободные энди-

онные группы (бензохинон, толухинон), сильно ингибируют этот процесс, в то время как замещенные пространственно затрудненные хиноны (тимохинон, дуροхинон) практически не влияют на процесс окисления ИУК (рис. 1).

При сопоставлении ингибирующей способности хинонов и гидрохинонов наблюдается определенная закономерность: толугидрохинон в такой же степени ингибирует процесс окисления ИУК, как и толухинон, а гид-

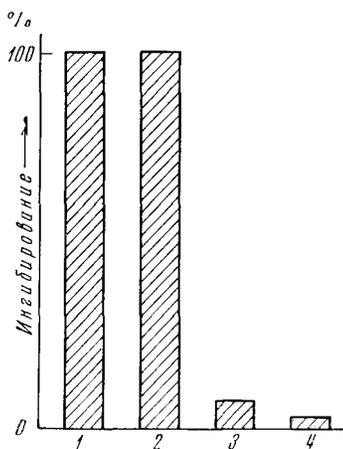


Рис. 1

Рис. 1. Ингибирование окисления ИУК *n*-бензохинонами (концентрация хинонов в мг-молях на 1 мг белка ферментного экстракта). 1 — *n*-бензохинон ($5,3 \cdot 10^{-4}$); 2 — толухинон ($37 \cdot 10^{-4}$); 3 — тимохинон ($11 \cdot 10^{-3}$); 4 — дуροхинон ($8 \cdot 10^{-2}$)

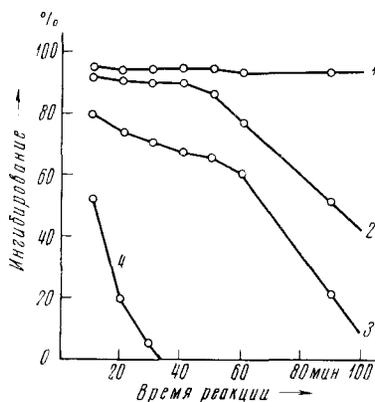


Рис. 2

Рис. 2. Влияние глутатиона на ингибирование окисления ИУК *n*-бензохиноном (концентрация в мг-молях на 1 мг белка ферментного экстракта). 1 — ферментный экстракт + $5 \cdot 10^{-4}$ мг-мол. *n*-бензохинона; 2, 3, 4 — добавлен глутатион соответственно: $1 \cdot 10^{-4}$, $5 \cdot 10^{-4}$, $6 \cdot 10^{-4}$ мг-мол.

рохинон по ингибирующей способности даже превосходит соответствующий хинон (табл. 1).

Предварительное или одновременное добавление в реакцию среду восстановителей (глутатион, тиосульфат натрия) частично или полностью (в зависимости от молярных соотношений ингибитора и восстановителя) снимает эффект ингибирования, обусловленный хинонами и гидрохинонами (рис. 2).

Известно, что фенолы и хиноны могут взаимодействовать с ИУК с образованием комплексов или продуктов конденсации (¹⁰, ¹¹). Сопоставление результатов, полученных с применением реактива Сальковского и ме-

Таблица 1

Эффективные концентрации *n*-бензохинонов и гидрохинонов при ингибировании окисления ИУК (мг-мол. на 1 мг белка ферментного экстракта)

Эффект ингибирования	<i>n</i> -Бензохинон	Толухинон	Гидрохинон	Толугидрохинон
Полное ингибирование окисления ИУК	$5,3 \cdot 10^{-4}$	$37 \cdot 10^{-4}$	$2,5 \cdot 10^{-4}$	$36 \cdot 10^{-4}$
Уменьшение скорости разрушения ИУК на 20% за первые 10 мин. реакции	$2,8 \cdot 10^{-5}$	$19 \cdot 10^{-5}$	$1,3 \cdot 10^{-5}$	$17,5 \cdot 10^{-5}$

ченного 1С¹⁴-ИУК показало, что в описанных нами условиях эксперимента возможность взаимодействия свободного хинона или гидрохинона с индолуксусной кислотой исключается.

Хиноны могут взаимодействовать с функциональными группами белков, причем скорость реакции с некоторыми из них ($-SH$, $-NH_2$) исключительно высокая. С этими функциональными группами хиноны могут реагировать двумя путями: с одной стороны, к свободным эндонным

Таблица 2

Нормальные окислительно-восстановительные потенциалы систем хинон — гидрохинон (в спирите, $t = 25^\circ$)

Хинон	E° по Коэнанту и Физеру (14), в	Хинон	E° по Мортону (8), в
<i>n</i> -Бензохинон	+0,712	Убихинон (Q-10)	+0,542
Толухинон	+0,656	2-Метил-1,4-нафтохинон	+0,422
Тимохинон	+0,594	Витамин К ₁	+0,363
Дурохинон	+0,466	2-Гидрокси-1,4-нафтохинон	+0,358
		Антрахинон	+0,154

группам хинонов могут присоединяться по реакции Михаэля указанные функциональные группы белков; с другой стороны, хиноны могут окислять белковые функциональные группы (в основном сульфгидрильные), а сами при этом восстанавливаться в гидрохиноны. Для реакции первого типа необходимо наличие в молекуле хинона свободной эндонной группировки, а для реакции второго типа молекула хинона должна обладать достаточно высоким окислительным потенциалом. Полученные нами результаты по ингибирующей способности замещенных хинонов (тимохинон, дурухинон) показывают, что их окислительный потенциал недостаточно высок для окисления сульфгидрильных групп белков, окисляющих ИУК в корнях гороха (как известно, в корнях гороха эту функцию могут выполнить, помимо оксидазы ИУК, пероксидаза и полифенолоксидаза (12, 13)).

На основе полученных нами экспериментальных данных можно сделать следующее заключение: *n*-бензохиноны и гидрохиноны способны ингибировать процесс окисления ИУК. Ингибирующая активность хинона предопределяется структурой его молекул — ингибирующее действие оказывают только хиноны, имеющие хотя бы одну свободную эндонную группировку. Можно предположить, что ингибирующая способность гидрохинонов обусловлена их окислением в соответствующие хиноны; при этом семихинонный радикал, образующийся в момент окисления гидрохинона, сильнее ингибирует процесс окисления ИУК, чем стабилизированная хиноидная структура.

Среди растительных хинонов соединения со свободными эндонными группами встречаются крайне редко (4, 5); кроме того, природные хиноны обладают сравнительно низким окислительным потенциалом. Например, все перечисленные в табл. 2 растительные хиноны имеют более низкий окислительный потенциал (8), чем исследуемый нами тимохинон (14).

Принимая во внимание тот факт, что приведенные в табл. 2 растительные хиноны, как и тимохинон, являются пространственно-затрудненными (иногда и в гораздо большей степени), можно предположить, что растительные хиноны, не обладая свободными эндонными группами и имея низкий окислительный потенциал, не могут ингибировать ферментные системы, окисляющие ИУК, и следовательно, не могут участвовать в регуляции роста растений через ауксиновый обмен.

Предполагаем, что приведенные в настоящей работе соображения об ингибирующей способности *n*-бензохинонов можно распространить и на другие ферменты, обладающие активными сульфгидрильными и аминок- группами.

Институт биохимии растений
Академии наук ГрузССР
Тбилиси

Поступило
26 IV 1972

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ P. E. Pilet, M. G. Mato, *Ann. Physiol. Veget.*, **9**, № 4, 369 (1967). ² Д. И. Стом, *Физиол. раст.*, **186**, № 3, 714 (1969). ³ Д. Ш. Угрехелидзе, Дж. Ш. Цевелидзе, *Сообщ. АН ГрузССР*, **60**, № 3, 705 (1970). ⁴ W. Karrer, *Konstitution und Vorkommen der organischen Pflanzenstoffe*, Basel-Stuttgart, 1958. ⁵ R. A. Morton, *Biochemistry of Quinones*, London — N. Y., 1965. ⁶ К. З. Гамбург, *Сборн. Методы определения регуляторов роста и гербицидов*, «Наука», 1967, стр. 57. ⁷ Ю. К. Юрьев, Р. Я. Левина, Ю. С. Шабаров, *Практические работы по органической химии*, в. 4, М., 1969. ⁸ *Синтезы органических препаратов*, сборн. 1 (ред. Г. Гильман), М., 1949, стр. 378. ⁹ *Синтезы органических препаратов*, сборн. 2 (ред. А. Блэтт), М., 1949, стр. 262. ¹⁰ A. C. Leopold, T. H. Plummer, *Plant Physiol.*, **36**, № 5, 589 (1961). ¹¹ Th. Gaspar, M. Bastin, C. Leyh, *Bull. cl. sci. Acad. Roy. Belg.*, **50**, № 7, 799 (1964). ¹² C. A. Van der Mast, *Acta bot. neer.*, **19**, № 2, 141 (1970). ¹³ M. G. H. Jansen, *Acta bot. neer.*, **19**, № 1, 73 (1970). ¹⁴ J. B. Conant, G. E. Fieser, *J. Am. Chem. Soc.*, **45**, 2194 (1923); **46**, 1858 (1924).