

УДК 577.24

РАЗОБЩАЮЩЕЕ И ТОКСИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ АЛКИЛ-ТРИФЕНИЛФОСФОНИЕВЫХ КАТИОНОВ НА МИТОХОНДРИИ И БАКТЕРИИ *Bacillus subtilis* В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ДЛИНЫ АЛКИЛЬНОГО ФРАГМЕНТА

© 2015 Л.С. Хайлова¹, П.А. Назаров¹, Н.В. Сумбатян²,
Г.А. Коршунова¹, Т.И. Рокицкая¹, В.И. Дедухова¹,
Ю.Н. Антоненко^{1*}, В.П. Скулачев^{1,3}

¹ НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского,
Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
119991 Москва; электронная почта: antonen@genebee.msu.ru

² Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
химический факультет, 119991 Москва

³ НИИ Митоинженерии, Московский государственный
университет им. М.В. Ломоносова, 119991 Москва

Поступила в редакцию 17.02.15

После доработки 08.07.15

Серия проникающих катионов на основе алкильных производных трифенилфосфония (C_n -TRP⁺), содержащих в структуре линейные углеводородные фрагменты (бутил, октил, децил и додецил), была исследована в системе выделенных митохондрий, бактерий и липосом. В отличие от ряда производных (сложных эфилов) родамина 19, где наибольшей активностью обладал бутил-родамин, в случае C_n -TRP эффект стимуляции дыхания митохондрий монотонно возрастал с ростом длины алкильного радикала. Тетрафенилфосфоний и бутил-TRP⁺ оказывали разобщающее действие в концентрации сотен микромолей. Наблюдаемый эффект можно связать с взаимодействием C_n -TRP⁺ с эндогенными жирными кислотами и индукцией циклического процесса их переноса, который приводит к транспорту ионов водорода через мембрану митохондрий. Этот механизм был изучен путем измерения вытекания карбоксифлуоресцеина из липосом под действием C_n -TRP⁺. В опытах на бактериях показано, что додецил-TRP⁺, децил-TRP⁺ и октил-TRP⁺, также как и хинон-содержащий аналог (SkQ1), ингибировали рост грам-положительных бактерий *Bacillus subtilis*, причем ингибирующее действие росло с ростом липофильности соединений. Эти катионы не оказывали токсического действия на рост грам-отрицательной бактерии *Escherichia coli*. Предполагается, что различие в токсическом действии на разных бактериях может быть связано с различной проницаемостью бактериальных оболочек для исследованных трифенилфосфониевых катионов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: проникающие катионы, SkQ1, митохондрии, разобщение, бактерии, цитотоксичность.

Митохондриально-направленные антиоксиданты получили широкое распространение не только в исследованиях роли митохондрий в

разных физиологических процессах, но и как терапевтические средства [1, 2]. Эти соединения представляют собой конъюгаты какого-либо известного антиоксиданта (пластохинон, убихинон, витамин Е, ресвератрол) и проникающего катиона (трифенилфосфония, родамина и др.). Помимо антиоксидантного действия, эти соединения разобщают окислительное фосфорилирование митохондрий, что проявляется в стимуляции дыхания и падении мембранного потенциала. Как оказалось, такое разобщающее действие в ряде случаев может быть не только нетоксичным для организма, но при патологиях, связанных с окислительным стрессом, частичное разобщение митохондрий приводит к за-

Принятые сокращения: SkQ1 – 10-(пластохинонил)децилтрифенилфосфоний; C_n -TRP⁺ – катион алкилтрифенилфосфония; Phe₄P⁺ – катион тетрафенилфосфония; DiS-C₃-(5) – потенциалзависимый краситель карбоцианинового ряда; МХ – митохондрии; КФ – карбоксифлуоресцеин; Δψ – мембранный потенциал митохондрий; ΔрН – градиент рН на внутренней мембране митохондрий; ΔμН⁺ – электрохимический потенциал ионов водорода на мембране митохондрий; МЭ – 2-(N-морфолино)этансульфоновая кислота; FCCP – карбонил цианид *n*-(трифторметокси)фенилгидразон.

* Адресат для корреспонденции.

шитному эффекту [3]. Причиной такого феномена может быть зависимость генерации активных форм кислорода от потенциала, как это впервые было показано в работе [4]. Наиболее вероятный механизм разобщающего действия SkQ1 (конъюгата пластохинона и трифенилфосфония, соединенных через декановый линкер, рис. 1) сводится к его способности взаимодействовать с эндогенными жирными кислотами, что облегчает диффузию анионов жирных кислот через мембрану митохондрий [5]. Это взаимодействие носит преимущественно электростатический характер, в котором участвует катион SkQ1 и анион жирной кислоты. Поскольку протонированные формы жирных кислот легко проникают через мембрану, такое взаимодействие позволяет осуществлять перенос протона, как и в случае обычных протонофоров, таких как 2,4-динитрофенол. Показано, что разобщающее действие SkQ1 и его аналога, не содержащего хинон (C_{12} TPP), на митохондриях сходно [5]. Предполагалось также, что SkQ1 и его аналоги в высоких концентрациях способны проявлять детергентное действие, что, в свою очередь, может приводить к стимуляции дыхания и снижению потенциала митохондрий [6].

В серии работ с использованием гидрофобных катионов, полученных на основе родамина 19 и содержащих углеводородные фрагменты различной длины, было показано, что разобщающее действие этих катионов с короткими фрагментами может быть результатом специфического взаимодействия с белками-переносчиками во внутренней мембране митохондрий [7]. Наиболее активен был бутиловый эфир родамина 19 (C_4 R1), тогда как более гидрофобные аналоги родамина 19 (C_8 R1, C_{10} R1 и C_{12} R1) действовали существенно слабее. В лаборатории Зоратти было показано, что конъюгаты ресвератрола с трифенилфосфонием разобщают выделенные митохондрии или митохондрии в клетках путем взаимодействия с АТФазой, что сопровождается индукцией протонной утечки через этот белок [8]. На это указывает чувствительность индуцированного проникающими катионами разобщения к специфическому ингибитору АТФазы олигомицину. Совокупность этих данных побудила нас вернуться к вопросу о механизме разобщающего действия SkQ1, которое, по крайней мере, частично может происходить независимо от жирных кислот посредством специфического взаимодействия SkQ1 с белками-переносчиками внутренней мембраны митохондрий. Для этого были синтезированы алкильные производные трифенилфосфония (C_n -TPP⁺) с различной длиной углеводородной цепи: *n*-бутил-, *n*-октил-, *n*-децил- и *n*-додецилтрифенил-

фосфоний (рис. 1). Кроме того, в настоящей работе мы изучили действие гидрофобных катионов этой серии на бактерии, которое, вследствие сходных биоэнергетических механизмов бактерий и митохондрий, может приводить к разобщению окислительного фосфорилирования у бактерий и угнетению их роста. Можно отметить, что ранее показано, что проникающие катионы растительного происхождения берберин и пальматин проявляют сильное антибактериальное действие [9, 10]. Кроме того, некоторые четверичные соли фосфония проявляли антибактериальную активность [11–13]. Та-

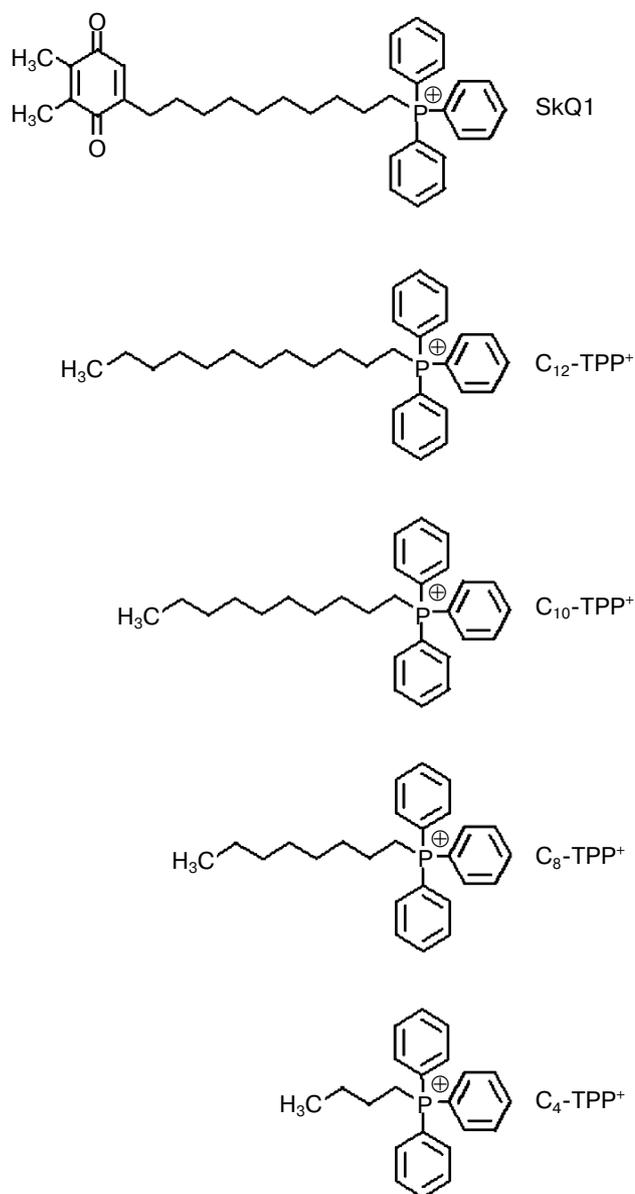


Рис. 1. Структурные формулы катионов SkQ1 и C_n -TPP⁺

ким образом, была поставлена задача изучить действие соединений ряда C_n -TRP⁺ на митохондрии и бактерии. Показано в частности, что C_n -TRP, а также SkQ1, оказывают антибактериальное действие на *Bacillus subtilis*, тогда как бактерии *E. coli* являются устойчивыми по отношению к C_n -TRP⁺ и SkQ1. Как разобщающее, так и токсическое действие в ряду C_n -TRP⁺ росло с увеличением длины алкильной цепи, что указывает на отсутствие специфического связывания этих соединений с белками переносчиками.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Синтез бромидов *n*-бутилтрифенилфосфония (C_4 -TRP⁺), *n*-октилтрифенилфосфония (C_8 TRP), *n*-децилтрифенилфосфония (C_{10} TRP) и *n*-додецилтрифенилфосфония (C_{12} TRP, рис. 1) осуществляли действием соответствующего алкилбромида на трифенилфосфин по методикам, описанным ранее [14].

Все прочие использованные реагенты (если не указано особо) фирмы «Sigma-Aldrich».

Вытекание карбоксифлуоресцеина из липосом. Липосомы, нагруженные 5,6-карбоксифлуоресцеином («Sigma») в концентрации самотушения, были приготовлены из общего липида *E. coli* («Avanti Polar Lipids»), суспендированного в 100 мМ растворе карбоксифлуоресцеина, методом экстракции через поликарбонатный фильтр с диаметром пор 100 нм, согласно [15]. Полученные липосомы отмывали от свободного карбоксифлуоресцеина пропусканием через колонку с сефадексом G-50, используя буфер 100 мМ KCl, 10 мМ Tris, pH 7,4. При измерении выхода карбоксифлуоресцеина липосомы разбавляли до конечной концентрации 5 мкг/мл в том же буфере, и флуоресценцию на длине волны 520 нм (возбуждение 490 нм) измеряли на флуориметре «Paparata». В конце каждого опыта добавляли 0,1%-ный раствор Triton X-100 для регистрации полного выхода карбоксифлуоресцеина. Величину выхода вычисляли как $(F_t - F_0) / (F_{100} - F_0)$, где F_0 и F_t — значения флуоресценции в начальный и произвольный момент времени, F_{100} — значение флуоресценции после полного выхода карбоксифлуоресцеина, вызванного добавлением Triton X-100.

Митохондрии из печени крыс получали как описано ранее [16]. Полученные митохондрии суспендировали в среде, содержащей 250 мМ сахарозы, 5 мМ MOPS-КОН, pH 7,4, 1 мМ EGTA. Концентрацию белка измеряли биуретовым методом, используя БСА в качестве стандарта.

Скорость дыхания митохондрий измеряли полярнографически, используя электрод Кларка на

приборе фирмы «Strathkelvin Instruments» (модель 872) при 25°. Среда инкубации содержала 250 мМ сахарозу, 5 мМ MOPS-КОН, pH 7,4, 1 мМ EGTA. Концентрация митохондрий составляла 0,6–0,7 мг белка/мл. Поглощение кислорода выражали в нмоль O_2 /мин/мг белка.

Мембранный потенциал митохондрий измеряли, используя в качестве индикатора сафранин O [17]. Среда измерения содержала 250 мМ сахарозу, 5 мМ MOPS-КОН pH 7,4, 1 мМ EGTA, 5 мМ сукцинат, 2 мкМ ротенон, олигомицин (1 мкг/мл) и 15 мкМ сафранин O. Концентрация митохондрий составляла 0,6–0,7 мг белка/мл. Поглощение измеряли при длинах волн 555 и 523 нм на спектрофотометре «Aminco DW-2000» в двухволновом режиме.

Бактерии растили на LB среде в течение ночи при 37° на шейкере при 200 об/мин до достижения оптической плотности 1,5 при 600 нм. Измерение оптической плотности при 600 нм проводили на спектрофотометре «Ultrospec 1100 pro» («Amersham Biosciences»). Для измерения кривых роста бактерий клетки ночной культуры пересевали в свежую среду LB, культивировали в течение 5–24 ч при 37° на шейкере при 200 об/мин периодически измеряя оптическую плотность при 600 нм.

Мембранный потенциал бактерий *Bacillus subtilis* измеряли по флуоресценции потенциал-зависимого индикатора *DiS-C₃-(5)* [18]. Клетки ночной культуры *Bacillus subtilis* штамм BR151 пересевали в свежую среду LB и подрачивали в течение 2–4 ч до оптической плотности 0,8 при 600 нм. Клетки разводили в 20 раз в буфере 100 мМ KCl, 10 мМ Tris, pH 7,4. Измерение флуоресценции при 690 нм (возбуждение 622 нм) проводили на флуориметре «Панорама флуорат-02» («Люмекс», Россия).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Разобщающее действие алкил-трифенилфосфониевых катионов на митохондрии. Ранее было показано, что добавление микромолярных концентраций SkQ1 или C_{12} -TRP⁺ к митохондриям печени крыс и дрожжей приводит к стимуляции дыхания и сбросу мембранного потенциала [6, 19]. Рис. 2, а показывает пример кинетической кривой поглощения кислорода митохондриями печени крысы при добавлении возрастающих концентраций C_8 -TRP⁺. Видно, что после стимуляции дыхания под действием примерно сотни микромолей C_8 -TRP⁺, дальнейшее повышение концентрации C_8 -TRP⁺ уже не приводит к стимуляции дыхания. На рис. 2, б показана зависимость скорости дыхания митохондрий печени крысы от концентрации C_{12} -TRP⁺ и других

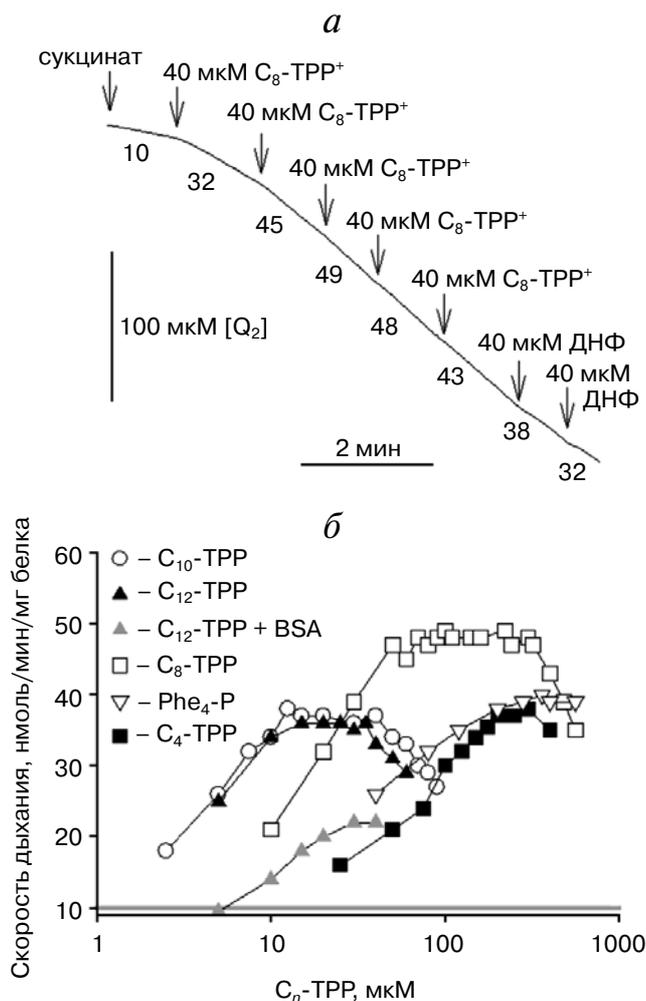


Рис. 2. Зависимость скорости дыхания митохондрий печени крысы от концентрации проникающих катионов ряда C_n -TPP⁺. Субстрат дыхания был сукцинат (5 мМ) в присутствии ротенона (2 мкМ). На панели *а* дан пример полярографической записи стимуляции поглощения митохондриями кислорода при добавлении возрастающих концентраций C_8 -TPP. Среда инкубации: 250 мМ сахарозы, 5 мМ MOPS-КОН, pH 7,4, 1 мМ EGTA

C_n -TPP⁺ с разной длиной алкильного радикала. В отличие от эфиров родамина 19, где наибольшей активностью обладал бутиловый эфир, для C_n -TPP⁺ разобщающий эффект возрастает с ростом длины алкильного радикала. В опытах с тетрафенилфосфонием или C_4 -TPP⁺ разобщающий эффект достигается лишь при высоких концентрациях. Максимальное разобщение достигается при относительно низких концентрациях длинноцепочечных C_n -TPP⁺, тогда как для катиона тетрафенилфосфония и C_4 -TPP⁺ максимальное разобщение митохондрий происходит при более чем на порядок больших концентрациях. В соответствии с этим полумаксималь-

ная действующая концентрация для C_n -TPP⁺ в митохондриях уменьшается с ростом длины алкильного фрагмента. На рис. 2, *б* показано также действие C_{12} -TPP⁺ в среде инкубации, содержащей альбумин (серая кривая). Видно, что альбумин существенно снижает C_{12} -TPP⁺-стимулирующее дыхание митохондрий.

На рис. 3 представлена зависимость скорости дыхания митохондрий от концентрации пальмитата в контроле и в присутствии 5 мкМ C_n -TPP⁺. Видно, что C_n -TPP⁺ стимулируют разобщающее действие пальмитата, причем эффективность стимуляции растет с ростом числа n , достигая насыщения при $n = 10$. Эти данные подтверждают гипотезу о том, что в процесс разобщения могут быть вовлечены эндогенные жирные кислоты.

Поскольку катионы ряда C_n -TPP⁺ должны легко проникать электрофоретически через липидные мембраны, то их добавление к митохондриям должно приводить в начальный момент времени к падению мембранного потенциала и стимуляции дыхания. В отсутствие взаимодействия с жирными кислотами, после завершения процесса накопления катиона внутри митохондрий, величина потенциала и скорость дыхания должны восстанавливаться. На рис. 4 приведено изменение потенциала митохондрий, измеренного с помощью потенциал-чувствительного зонда сафранина, в ответ на добавление катионов тетрафенилфосфония, C_4 -TPP⁺ и C_8 -TPP⁺ в средах без фосфата и в присутствии 1 мМ фосфата. В отсутствие фосфата добавление 120 мкМ

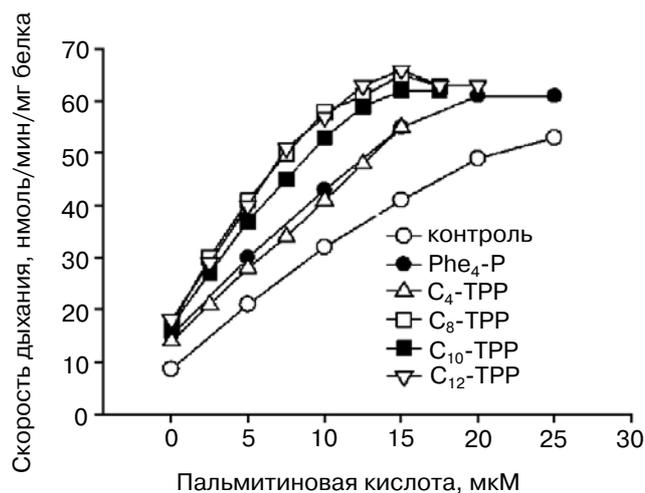


Рис. 3. Влияние C_n -TPP⁺ (5 мкМ) на зависимость скорости дыхания митохондрий от концентрации пальмитиновой кислоты. Условия опыта описаны в подписи к рис. 2

тетрафенилфосфония приводит к падению $\Delta\psi$, величина которого далее восстанавливается в минутной шкале (рис. 4, а, пунктирная кривая).

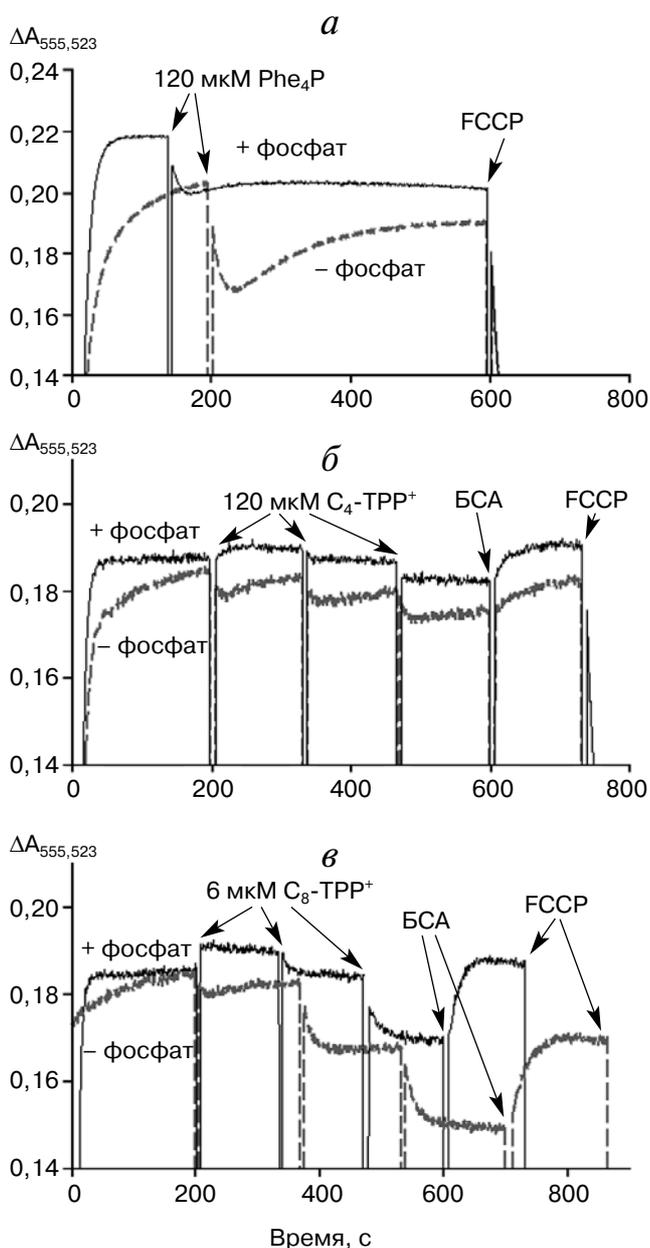


Рис. 4. Влияние тетрафенилфосфония (Ph_4P) (панель а), $\text{C}_4\text{-TRP}^+$ (панель б) и $\text{C}_8\text{-TRP}^+$ (панель в) на потенциал митохондрий, измеренный с помощью сафранина в среде без фосфата (пунктирная кривая) и среде с фосфатом (1 мМ KH_2PO_4 , непрерывная кривая). По оси Y отложена разность поглощения при длинах волн 555 и 523 нм. Для энергизации митохондрий в среду добавляли сукцинат (5 мМ) в присутствии ротенона (2 мМ). Среда инкубации: 250 мМ сахарозы, 5 мМ MOPS, 1 мМ EGTA, 1 мМ олигомицина, pH 7,4, БСА, 0,3 мг/мл альбумина, FCCP, 200 нМ. Концентрация митохондриального белка 0,6 мг/мл

Аналогичный эффект наблюдается при добавлении 20 мкМ $\text{C}_4\text{-TRP}^+$ и 6 мкМ $\text{C}_8\text{-TRP}^+$ (рис. 4, б и в, пунктирные кривая). В присутствии фосфата кривая временного спада и восстановления потенциала не регистрируется, по-видимому, в силу слишком быстрой кинетики этих процессов (непрерывные кривые). Добавление альбумина (БСА) приводит к частичному восстановлению потенциала, особенно в случае среды с фосфатом (рис. 4, б и в). Ускорение восстановления потенциала после добавления проникающего катиона под действием фосфата наблюдалось ранее на примере ионов кальция, которые хорошо проникают через мембрану митохондрий, используя белок-переносчик [20]. Эффект был связан с функционированием неэлектрогенного фосфатного переносчика, который быстро восстанавливает pH в матриксе, что препятствует формированию большого градиента pH на внутренней мембране митохондрий [21]. В соответствии с этим, на рис. 4 уровень потенциала был выше в присутствии фосфата. Дальнейшее наращивание концентраций $\text{C}_4\text{-TRP}^+$ или $\text{C}_8\text{-TRP}^+$ приводит к необратимому падению потенциала даже в присутствии фосфата (рис. 4, б и в), что можно трактовать как включение механизма разобщения с участием жирных кислот.

Используя TRP-селективный электрод для измерения концентрации $\text{C}_4\text{-TRP}^+$ и $\text{C}_8\text{-TRP}^+$ в растворе, мы измерили поглощение их энергизованными и деэнергизованными митохондриями в зависимости от наличия фосфата в среде (рис. 5). Видно, что как в случае $\text{C}_4\text{-TRP}^+$, так и для $\text{C}_8\text{-TRP}^+$, закачка катионов существенно выше в присутствии фосфата. Также можно отметить существенно большее связывание $\text{C}_8\text{-TRP}^+$ как с деэнергизованными, так и с энергизованными митохондриями. Эффект фосфата можно связать с тем, что скорость работы протонных помп во многом определяется градиентом pH на мембране МХ, который существенно быстрее снижается в присутствии фосфата.

Разобщающее действие алкил-трифенилфосфониевых катионов на *Bacillus subtilis*. Для измерения мембранного потенциала на клетках *Bacillus subtilis* был использован потенциалчувствительный краситель DiS-C3-(5). Как известно, этот катионный краситель накапливается в бациллах при наличии мембранного потенциала (минус внутри) и его флуоресценция гаснет вследствие его агрегации [18]. На рис. 6, а показана серия записей флуоресценции красителя при добавлении возрастающих концентраций SkQ1. Видно, что субмикромольные концентрации вызывают сравнительно медленное падение потенциала бацилл, тогда как 5 мкМ SkQ1 вызывают мгновенный сброс потенциала (рис. 6).

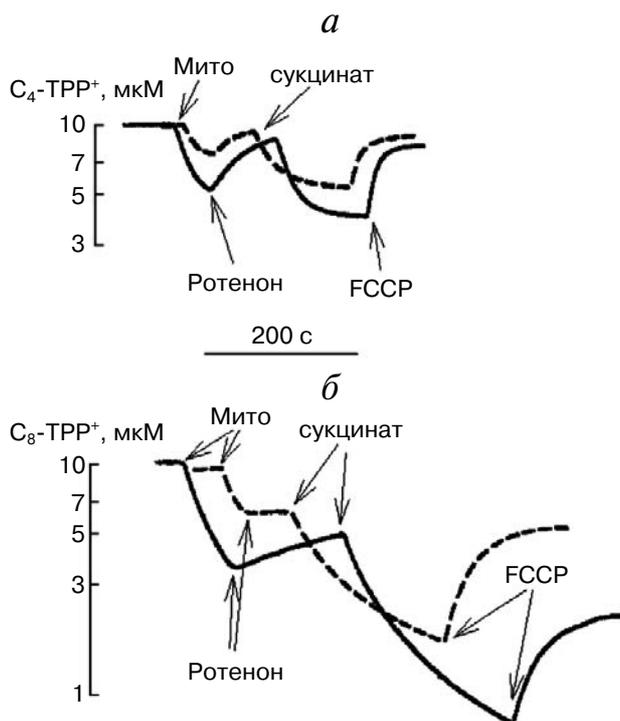


Рис. 5. Перераспределение C_4 -TPP⁺ (панель *a*) и C_8 -TPP⁺ (панель *б*) между средой и митохондриями в ответ на энергизацию митохондрий при добавлении сукцината (3 мМ) в присутствии 2 мкМ ротенона и деэнергизации при добавлении разобщителя FCCP (0,2 мкМ) в зависимости от присутствия фосфата в среде (2 мМ KH_2PO_4). Измерения проводили TPP⁺-селективным электродом. Среда инкубации: 250 мМ сахарозы, 10 мМ MOPS, pH 7,4, 3 мМ $MgCl_2$, 1 мМ EGTA. Концентрация митохондриального белка 0,6 мг/мл

На рис. 6, *б* приведены кривые падения потенциала бацилл при добавлении C_{12} -TPP⁺, C_{10} -TPP⁺ и C_8 -TPP⁺, причем в этих опытах были подобраны концентрации, которые вызывают достаточно медленное падение потенциала. В случае тетрафенилфосфониевого катиона и C_4 -TPP⁺ даже максимально высокая концентрация (100 мкМ) не вызывала падения потенциала. Для остальных C_n -TPP⁺ такими концентрациями оказались 1 мкМ (C_{12} -TPP⁺), 2 мкМ (C_{10} -TPP⁺) и 20 мкМ (C_8 -TPP⁺). Таким образом, по мере роста длины алкильной цепи в C_n -TPP⁺ требуется все большая концентрация катиона для того, чтобы потенциал на бациллах существенно уменьшился.

Мембранный потенциал необходим бактериям для их нормального метаболизма и его подавление должно вызывать токсичность. Это предположение было проверено на примере измерения кривых роста клеток *B. subtilis* и *E. coli* в контроле и при добавлении проникающих катионов (рис. 7). Действительно, в случае бацилл добавление микромолярных концентраций SkQ1 и

C_{12} -TPP⁺ приводит к подавлению их роста (рис. 7, *a*). В то же время эти концентрации не замедляли рост *E. coli* (рис. 7, *б*). Были также проведены опыты по изучению влияния SkQ1 на колониеобразующую активность (КОЕ) этих двух бактерий и также оказалось, что 1 мкМ SkQ1 уменьшал КОЕ у бацилл в десять раз, тогда как такая концентрация SkQ1 практически не

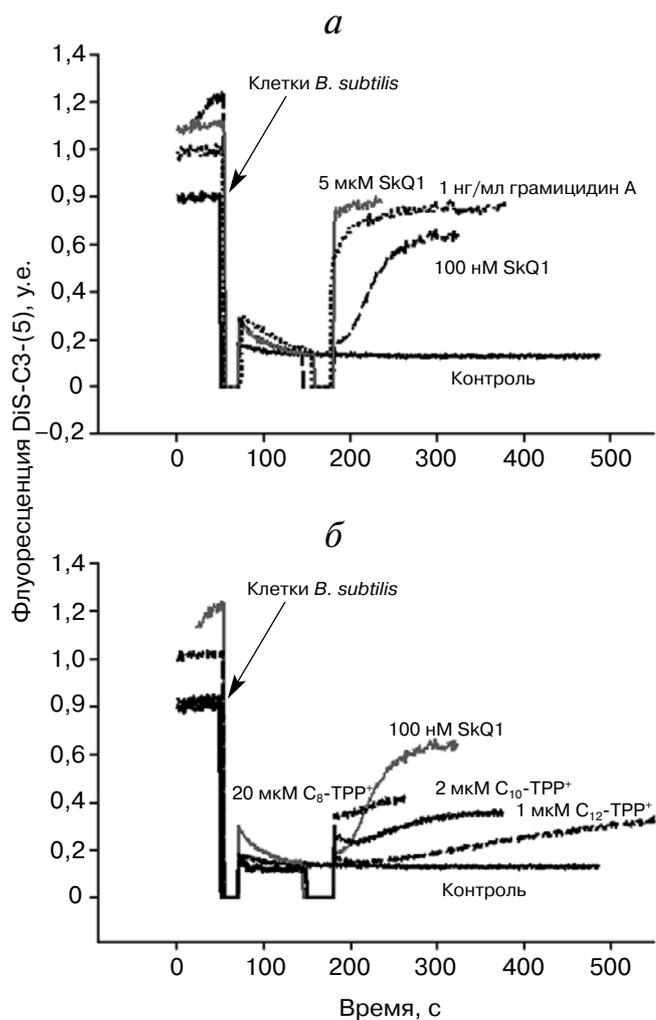


Рис. 6. Действие SkQ1 (панель *a*) и C_n -TPP⁺ (панель *б*) на мембранный потенциал *B. subtilis*, измеренный по флуоресценции DiS-C3-(5). На панели *б* приведены типичные кинетические кривые изменения флуоресценции DiS-C3-(5) при действии таких концентраций C_n -TPP⁺, которые приводили к промежуточному действию на потенциал бактерий, т.е. для каждого соединения меньшие концентрации действовали слабее или не действовали совсем, а большие приводили к быстрому и полному сбросу потенциала. На панели *a* приведено действие грамицидина А, который полностью сбрасывал потенциал. Среда измерения: 100 мМ KCl, 10 мМ Tris, pH 7,4. Концентрация клеток 2×10^7 /мл

действовала на *E. coli* (данные не приведены). На панели *в* рис. 7 приведена зависимость роста бактерий *B. subtilis* от концентрации SkQ1 и соединений ряда C_n -TRP⁺. Наблюдалось постепенное уменьшение ингибирующих концентраций

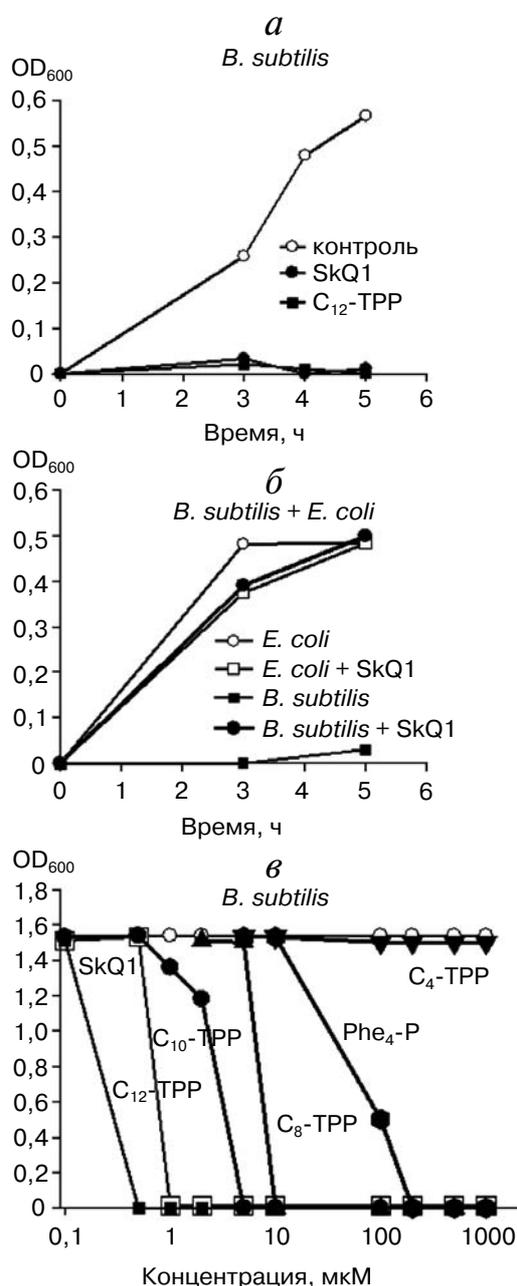


Рис. 7. Действие SkQ1 и C_n -TRP⁺ на рост бактерий *B. subtilis* и *E. coli* на среде LB, измеренный по поглощению при длине волны 600 нм. Ингибиторы добавляли в нулевой момент времени в диапазоне концентраций 0,1–1000 мкМ. На панели *в* приведены зависимость поглощения суспензии *B. subtilis* при 600 нм от концентрации SkQ1 и C_n -TRP⁺, измеренная после 5 ч роста

C_n -TRP⁺ по мере роста длины углеводородного фрагмента соединения. В случае C_4 -TRP⁺ токсичность не появлялась даже при концентрации 1 мМ (рис. 7, *в*, треугольники).

Действие алкил-трифенилфосфониевых катионов на выход карбоксифлуоресцеина из липосом. Итак, на системе МХ и бактерий действие ряда C_n -TRP⁺ росло с увеличением длины углеводородного фрагмента. Это указывает на отсутствие участия специфического взаимодействия с какими-либо ферментами в разобщающем эффекте. На первый план тогда выходит механизм разобщения, связанный с участием эндогенных жирных кислот, который был описан в работе [5]. Для подтверждения этого механизма мы исследовали действие C_n -TRP⁺ на выход из липосом анионного красителя карбоксифлуоресцеина (КФ), который, как и жирные кислоты, является органическим анионом [15]. Липосомы были нагружены КФ в концентрации самотушения и выход КФ регистрировали по росту флуоресценции. Ранее в этой системе уже были изучены эффекты C_{12} -TRP и SkQ1, которые вызывали выход КФ в микромолярных концентрациях [15]. Из рис. 8 видно, что C_{10} -TRP⁺ вызывает выход КФ при концентрациях примерно на порядок больших чем C_{12} -TRP⁺, т.е. это десятки микромолей. SkQ1 действовал также при несколько больших концентрациях по сравнению с C_{12} -TRP⁺. Эффективность остальных катионов ряда C_n -TRP⁺ убывает по мере уменьшения длины углеводородной цепи, однако катион тетрафенилфосфония был несколько более активен чем C_4 -TRP⁺. Ранее было показано, что ряд C_n -TRP⁺ ($n = 1–6$) вызывает выход анионного красителя кальцеина из липосом, причем выход красителя также увеличивался с ростом числа метиленовых звеньев в молекуле C_n -TRP⁺ [22].

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Уже в первых работах по изучению действия проникающих ионов на митохондриях было показано, что проникающие катионы могут сбрасывать потенциал и стимулировать дыхание в силу того, что они проникают через мембрану и их вход по потенциалу приводит к уменьшению его величины, что приводит к стимуляции работы протонных помп [23]. Этот эффект особенно ярко проявляется в случае ионов кальция, когда добавление 100 мкМ этого иона к суспензии энергизованных МХ приводит к начальному сбросу потенциала (и стимуляции дыхания) и далее в секундной шкале (в пределах минуты) к возврату потенциала к уровню, который был до добавления кальция (при условии отсутствия

индукции МХ поры) [20]. Следует отметить, что время возврата потенциала сильно зависит от наличия в среде фосфата и резко возрастает при его отсутствии [20]. Это связано с тем, что во внутренней мембране МХ есть активно работающий электронейтральный фосфатный переносчик, который выравняет рН путем симпорта фосфата с протоном. Активация работы протонных помп при входе внутрь проникающего катиона приводит к образованию градиента рН на мембране (дополнительному защелачиванию матрикса) и соответственно меньшему

уровню запирающего потенциала, поскольку работа протонных помп МХ зависит от протон-движущей силы $\Delta\mu\text{H}^+$, которая равна сумме $\Delta\psi$ и ΔpH . Работа фосфатного переносчика возвращает рН матрикса к первоначальному значению, что способствует возвращению начальной величины $\Delta\psi$ в силу неизменности $\Delta\mu\text{H}^+$.

В отличие от вышеописанного обратимого уменьшения мембранного потенциала МХ, высокие концентрации проникающих катионов вызывают необратимое уменьшение потенциала и стимуляцию дыхания. В настоящей работе показано, что разобщающее действие ряда $\text{C}_n\text{-TRP}^+$ в митохондриях монотонно растет с увеличением длины углеводородного фрагмента. Такая же картина наблюдается на липосомах, где скорость выхода несущего карбоксильную группу карбоксифлуоресцеина росла с ростом длины алкильной цепи $\text{C}_n\text{-TRP}^+$. Кроме того, разобщение дыхания и сброс потенциала под действием $\text{C}_n\text{-TRP}^+$ чувствительны к присутствию жирных кислот и альбумину в среде. Все это позволяет сделать вывод об участии цикла жирных кислот в разобщающем действии $\text{C}_n\text{-TRP}^+$. При этом роль катионов $\text{C}_n\text{-TRP}^+$ сводится к образованию комплексов с анионами эндогенных жирных кислот и стимуляции их транспорта через мембрану МХ. Увеличение эффективности разобщающего действия с ростом длины углеводородного фрагмента в ряду $\text{C}_n\text{-TRP}^+$ может быть связано с увеличением прочности комплекса катиона с анионом жирной кислоты. Однако молекулярно-динамическое изучение этого взаимодействия говорит о слабом средстве между ними, и такое взаимодействие определяется главным образом электростатическими факторами [5]. Показано также, что варьирование длины углеводородного фрагмента в ряду $\text{C}_n\text{-TRP}^+$ не меняет константы трансмембранной диффузии катиона, при этом само сродство к мембране растет с ростом углеводородного фрагмента [19]. Таким образом, наиболее вероятный механизм увеличения эффективности разобщения $\text{C}_n\text{-TRP}^+$ при росте n связан просто с ростом локальной концентрации $\text{C}_n\text{-TRP}^+$ в мембране и увеличением вероятности взаимодействия $\text{C}_n\text{-TRP}^+$ с анионом жирной кислоты, который обладает высокой липофильностью.

Интересно отметить, что максимальная скорость дыхания наблюдалась для $\text{C}_8\text{-TRP}^+$ (рис. 2), и, хотя $\text{C}_{10}\text{-TRP}^+$ действовал при более низких концентрациях, максимальная скорость дыхания в случае этого катиона была ниже. Можно предположить, что $\text{C}_{10}\text{-TRP}^+$ и $\text{C}_{12}\text{-TRP}^+$ могут ингибировать работу сукцинат-дегидрогеназы, что и выражается в суммарной меньшей степени дыхания по сравнению с $\text{C}_8\text{-TRP}^+$.

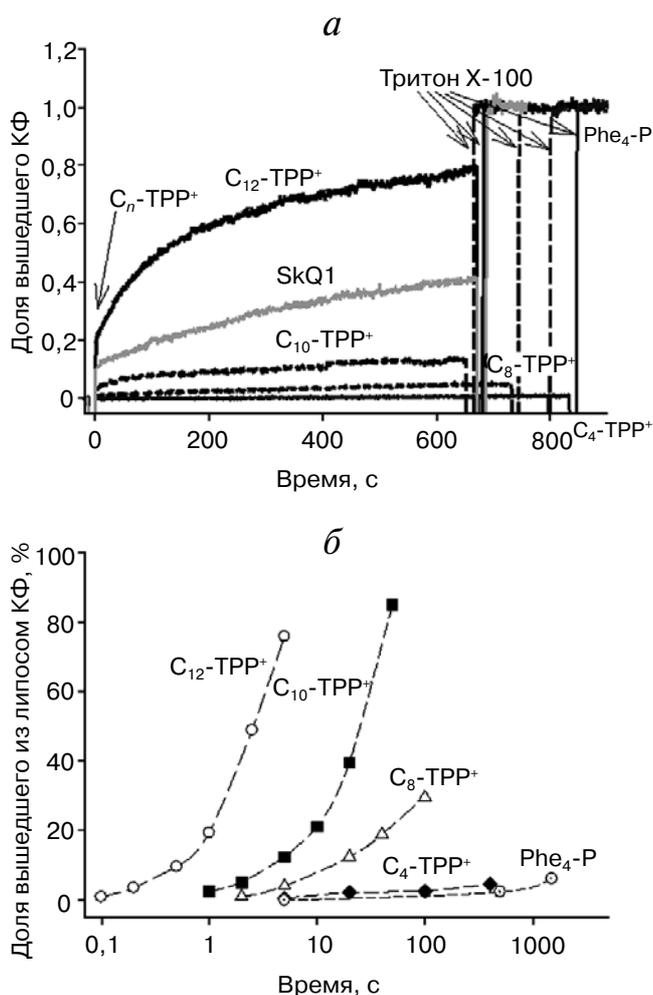


Рис. 8. *a* – Кривые выхода карбоксифлуоресцеина (КФ) из липосом под действием 5 мкМ SkQ1 и $\text{C}_n\text{-TRP}^+$, измеренные по флуоресценции на длине волны 520 нм, отнесенной к флуоресценции КФ после добавления Triton X-100, вызывающего полный выход КФ из липосом. Липосомы, приготовленные из общего липида *E. coli*, содержали внутри 100 мМ КФ, что является концентрацией самотушения; *b* – зависимость доли выхода КФ от концентрации $\text{C}_n\text{-TRP}^+$, измеренного на 600 с после добавления проникающего катиона. Среда измерения: 100 мМ KCl, 10 мМ Tris, pH 7,4. Концентрация липида 3 мкг/мл

В настоящей работе показано также, что SkQ1 и ряд соединений C_n -TRP⁺ подавляют рост бактерий *Bacillus subtilis*, тогда как рост *E. coli* не подавляется. В ряду C_4 -TRP⁺ – C_{12} -TRP⁺ токсическое действие монотонно растет с ростом длины алкильного радикала. Следует отметить, что между соединениями серии C_n -TRP⁺ и катионными поверхностно-активными веществами (ПАВ) просматривается некоторое структурное сходство. Как известно, ПАВ проявляют анти-септическое и антибактериальное действие [24]. Типичным представителем таких ПАВ является бензалконий: смесь четвертичных аминов на основе алкилбензилдиметиламмония, в которых длина алкильного заместителя варьируется от C_8 до C_{18} . Измерение действия C_n -TRP⁺ на потенциал бацилл показало, что эти соединения эффективно снижают потенциал, причем ряд эф-

фективности соответствует ряду цитотоксичности. Можно сделать вывод о том, что цитотоксичность C_n -TRP⁺ обусловлена способностью C_n -TRP⁺ сбрасывать потенциал и тем самым подавлять энергетику бактерий. Причем по аналогии с МХ, это действие по-видимому обусловлено участием эндогенных жирных кислот.

Авторы выражают благодарность Е.А. Омаровой за помощь в работе и С.А. Новгородову за плодотворное обсуждение результатов.

Работа выполнена при финансовой поддержке НИИ Митохондриологии МГУ и Российского научного фонда (гранты 14-24-00107 (Хайлова, Ракицкая, Дедухова, Антоненко, Скулачев) и 14-50-00029 (Назаров, Коршунова, Сумбатян)).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Skulachev, V.P., Antonenko, Y.N., Cherepanov, D.A., Chernyak, B.V., Izyumov, D.S., Khailova, L.S., Klishin, S.S., Korshunova, G.A., Lyamzaev, K.G., Pletjushkina, O.Y., Roginsky, V.A., Rokitskaya, T.I., Severin, F.F., Severina, I.I., Simonyan, R.A., Skulachev, M.V., Sumbatyan, N.V., Sukhanova, E.I., Tashlitsky, V.N., Trendeleva, T.A., Vyssokikh, M.Y., and Zvyagil'skaya, R.A. (2010) Prevention of cardiolipin oxidation and fatty acid cycling as two antioxidant mechanisms of cationic derivatives of plastoquinone (SkQs), *Biochim. Biophys. Acta*, **1797**, 878–889.
- Murphy, M.P., and Smith, R.A. (2007) Targeting antioxidants to mitochondria by conjugation to lipophilic cations, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **47**, 629–656.
- Cunha, F.M., Caldeira da Silva, C.C., Cerqueira, F.M., and Kowaltowski, A.J. (2011) Mild mitochondrial uncoupling as a therapeutic strategy, *Curr. Drug Targets*, **12**, 783–789.
- Korshunov, S.S., Skulachev, V.P., and Starkov, A.A. (1997) High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria, *FEBS Lett.*, **416**, 15–18.
- Severin, F.F., Severina, I.I., Antonenko, Y.N., Rokitskaya, T.I., Cherepanov, D.A., Mokhova, E.N., Vyssokikh, M.Y., Pustovidko, A.V., Markova, O.V., Yaguzhinsky, L.S., Korshunova, G.A., Sumbatyan, N.V., Skulachev, M.V., and Skulachev, V.P. (2010) Penetrating cation/fatty acid anion pair as a mitochondria-targeted protonophore, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 663–668.
- Antonenko, Y.N., Avetisyan, A.V., Bakeeva, L.E., Chernyak, B.V., Chertkov, V.A., Domnina, L.V., Ivanova, O.Y., Izyumov, D.S., Khailova, L.S., Klishin, S.S., Korshunova, G.A., Lyamzaev, K.G., Muntyan, M.S., Nepryakhina, O.K., Pashkovskaya, A.A., Pletjushkina, O.Y., Pustovidko, A.V., Roginsky, V.A., Rokitskaya, T.I., Ruuge, E.K., Saprunova, V.B., Severina, I.I., Simonyan, R.A., Skulachev, I.V., Skulachev, M.V., Sumbatyan, N.V., Sviryayeva, I.V., Tashlitsky, V.N., Vassiliev, J.M., Vyssokikh, M.Y., Yaguzhinsky, L.S., Zamyatnin, A.A., Jr., and Skulachev, V.P. (2008) Mitochondria-targeted plastoquinone derivatives as tools to interrupt execution of the aging program. I. Cationic plastoquinone derivatives: synthesis and *in vitro* studies, *Biochemistry (Moscow)*, **73**, 1273–1287.
- Khailova, L.S., Silachev, D.N., Rokitskaya, T.I., Avetisyan, A.V., Lyamsaev, K.G., Severina, I.I., Il'yasova, T.M., Gulyaev, M.V., Dedukhova, V.I., Trendeleva, T.A., Plotnikov, E.Y., Zvyagil'skaya, R.A., Chernyak, B.V., Zorov, D.B., Antonenko, Y.N., and Skulachev, V.P. (2014) A short-chain alkyl derivative of Rhodamine 19 acts as a mild uncoupler of mitochondria and a neuroprotector, *Biochim. Biophys. Acta*, **1837**, 1739–1747.
- Sassi, N., Mattarei, A., Azzolini, M., Szabo', I., Paradisi, C., Zoratti, M., and Biasutto, L. (2014) Cytotoxicity of mitochondria-targeted resveratrol derivatives: interactions with respiratory chain complexes and ATP synthase, *Biochim. Biophys. Acta*, **1837**, 1781–1789.
- Severina, I.I., Muntyan, M.S., Lewis, K., and Skulachev, V.P. (2001) Transfer of cationic antibacterial agents berberine, palmatine, and benzalkonium through bimolecular planar phospholipid film and *Staphylococcus aureus* membrane, *IUBMB Life*, **52**, 321–324.
- Schmeller, T., Latz-Bruning, B., and Wink, M. (1997) Biochemical activities of berberine, palmatine, and sanguinarine mediating chemical defence against microorganisms and herbivores, *Phytochemistry*, **44**, 257–266.
- Galkina, I.V., and Egorova, S.N. (2009) Biological activity of quaternary salts of phosphonium and perspectives of their medical application, *Farmatsiya*, **9**, 142–145.
- Galkina, I.V., Bakhtiyarova, Y.V., Shulaeva, M.P., Pozdeev, O.K., Egorova, S.N., Cherkasov, R.A., and Galkin, V.I. (2013) Synthesis and antimicrobial activity of carboxylate phosphobetaines derivatives with alkyl chains of various lengths, *J. Chem.*, doi: 10.1155/2013/302937.
- Kanazawa, A., Ikeda, T., and Endo, T. (1994) Synthesis and antimicrobial activity of dimethyl-substituted and trimethyl-substituted phosphonium salts with alkyl chains of various lengths, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **38**, 945–952.
- Ross, M.F., Prime, T.A., Abakumova, I., James, A.M., Porteous, C.M., Smith, R.A., and Murphy, M.P. (2008) Rapid and extensive uptake and activation of hydrophobic triphenylphosphonium cations within cells, *Biochem. J.*, **411**, 633–645.
- Rokitskaya, T.I., Sumbatyan, N.V., Tashlitsky, V.N., Korshunova, G.A., Antonenko, Y.N., and Skulachev, V.P.

- (2010) Mitochondria-targeted penetrating cations as carriers of hydrophobic anions through lipid membranes, *Biochim. Biophys. Acta*, **1798**, 1698–1706.
16. Johnson, D., and Lardy, H. (1967) Isolation of liver or kidney mitochondria, *Methods Enzymol.*, **10**, 94–96.
 17. Akerman, K.E., and Wikstrom, M.K. (1976) Safranin as a probe of the mitochondrial membrane potential, *FEBS Lett.*, **68**, 191–197.
 18. Miller, J.B., and Koshland, D.E., Jr. (1977) Sensory electrophysiology of bacteria: relationship of the membrane potential to motility and chemotaxis in *Bacillus subtilis*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 4752–4756.
 19. Trendeleva, T.A., Rogov, A.G., Cherepanov, D.A., Sukhanova, E.I., P'yasova, T.M., Severina, I.I., and Zvyagil'skaya, R.A. (2012) Interaction of tetraphenylphosphonium and dodecyltriphenylphosphonium with lipid membranes and mitochondria, *Biochemistry (Moscow)*, **77**, 1021–1028.
 20. Lotscher, H.R., Winterhalter, K.H., Carafoli, E., and Richter, C. (1980) The energy-state of mitochondria during the transport of Ca^{2+} , *Eur. J. Biochem.*, **110**, 211–216.
 21. Kramer, R., and Palmieri, F. (1989) Molecular aspects of isolated and reconstituted carrier proteins from animal mitochondria, *Biochim. Biophys. Acta*, **974**, 1–23.
 22. Yang, Q., Liu, X.Y., Umetani, K., Kamo, N., and Miyake, J. (1999) Partitioning of triphenylalkylphosphonium homologues in gel bead-immobilized liposomes: chromatographic measurement of their membrane partition coefficients, *Biochim. Biophys. Acta*, **1417**, 122–130.
 23. Bakeeva, L.E., Grinius, L.L., Jasaitis, A.A., Kuliene, V.V., Levitsky, D.O., Liberman, E.A., Severina, I.I., and Skulachev, V.P. (1970) Conversion of biomembrane-produced energy into electric form. II. Intact mitochondria, *Biochim. Biophys. Acta*, **216**, 13–21.
 24. Thorsteinsson, T., Loftsson, T., and Masson, M. (2003) Soft antibacterial agents, *Curr. Med. Chem.*, **10**, 1129–1136.

**UNCOUPLING AND TOXIC ACTION
OF ALKYLTRIPHENYLPHOSPHONIUM CATIONS
ON MITOCHONDRIA AND BACTERIA
AS A FUNCTION OF THE ALKYL
CHAIN LENGTH**

**L. S. Khailova¹, P. A. Nazarov¹, N. V. Sumbatyan²,
G. A. Korshunova¹, T. I. Rokitskaya¹, V. I. Dedukhova¹,
Y. N. Antonenko^{1*}, V. P. Skulachev^{1,3}**

¹ *A. N. Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology,
M. V. Lomonosov Moscow State University, Moscow 119991,
Russia; E-mail: antonen@belozersky.msu.ru*

² *M. V. Lomonosov Moscow State University, Faculty of Chemistry,
Moscow 119991, Russia*

³ *M. V. Lomonosov Moscow State University, Institute
of Mitoengineering, Moscow 119991, Russia*

Received February 17, 2015
Revision received July 08, 2015

A series of alkyl-triphenylphosphonium cations (C_n -TPP) bearing butyl-, octyl-, decyl-, and dodecyl-groups were synthesized. In contrast to a series of rhodamine 19 alkyl esters exhibiting maximum activity with butyl ester, in the case of C_n -TPP the effect of stimulation of mitochondrial respiration increased with the length of the alkyl chain. Tetraphenylphosphonium and butyl-TPP were practically inactive in this system. The uncoupling effect can be related to interaction with endogenous fatty acids and the induction of their cyclic shuttling leading to proton transport across the membrane. This mechanism was verified in a system of carboxyfluorescein leakage from liposomes induced by C_n -TPP. Dodecyl-TPP, decyl-TPP, and octyl-TPP, as well as quinone-containing SkQ1, inhibited the growth of the Gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*, the effect being enhanced with the increase in lipophilicity of the compounds. The cations did not suppress the growth of the Gram-negative bacterium *Escherichia coli*. The difference in the toxicity towards different bacteria could be attributed to a difference in permeability of the bacterial membranes.

Key words: penetrating cations, SkQ1, mitochondria, uncoupling, bacteria, cytotoxicity