

УДК 577.158.8

## ЦИТОХРОМ Р-450 — ЭФФЕКТИВНЫЙ КАТАЛИЗАТОР ОКИСЛЕНИЯ ОРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ ПЕРЕКИСЯМИ

*Метелица Д. И.*

Систематизированы и критически рассмотрены экспериментальные данные по окислению органических соединений перекисями и другими окислителями при участии цитохрома Р-450 из разных природных источников. Обсуждена роль цитохрома Р-450 в реакциях окислительного деалкилирования N-алкиламинов и эфиров гидроперекисями, а также его участие в реакциях перекисного окисления ароматических соединений, насыщенных жирных кислот, стероидов и других субстратов. Особое внимание уделено сравнению механизма окисления органических соединений в полной ферментной системе печени, включающей цитохром Р-450, цитохром Р-450-редуктазу и фосфолипиды, а также НАДФН и  $O_2$ , и окисления органических соединений гидроперекисями при участии одного цитохрома Р-450.

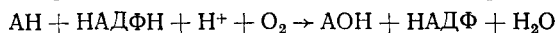
Библиография — 147 ссылок.

### ОГЛАВЛЕНИЕ

|  |      |
|--|------|
| I. Введение  | 2019 |
| II. Окислительное N-деалкилирование N-алкиламинов  | 2022 |
| III. Гидроперекисное O-деалкилирование эфиров  | 2024 |
| IV. Гидроксילирование ароматических соединений и эпоксидирование циклогексена                | 2025 |
| V. Окисление насыщенных соединений и стероидов   | 2027 |
| VI. Пероксидазные реакции цитохрома Р-450  | 2030 |
| VII. Катализ перекисного окисления другими гемопротейнами (гемоглобин, каталаза, цитохром С) | 2033 |
| VIII. Механизм действия цитохрома Р-450 в перекисном окислении органических соединений       | 2036 |
| IX. Перспективы практического использования  | 2043 |

### I. ВВЕДЕНИЕ

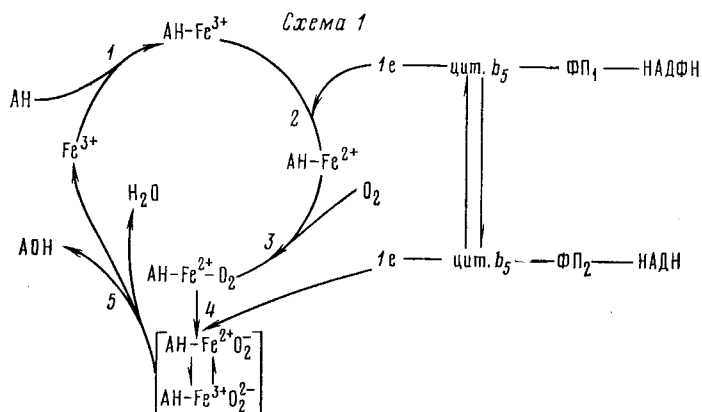
В 1978 г. исполнилось 20 лет со времени открытия Гарфинкелем [1] и Клингенбергом [2] уникального гемопротейна — цитохрома Р-450. Этот гемопротейн широко распространен в природе и входит в состав ферментных систем, относящихся к классу оксидоредуктаз и получивших название монооксигеназ или оксидаз со смешанной функцией. За три года до открытия цитохрома Р-450 Мейсон [3] и Гайяиши [4] независимо обнаружили новый тип оксидоредуктаз, которые требуют обязательного присутствия восстановленных пиридиннуклеотидов — НАДФН или НАДН — и окисляют различные субстраты, внедряя в них один атом кислорода и восстанавливая до воды другой:



где АН — субстрат, АОН — продукт окисления субстрата. В 1964 г. Омура и Сато [5, 6] установили, что цитохром Р-450 является гемопротейном *b*-типа и характеризуется атипичной полосой поглощения карбоксильного комплекса в восстановленном состоянии при 450 нм, что определило название белка.

За два десятилетия достигнуты большие успехи в изучении монооксигеназ, их состава, свойств, функций и строения. Эти достижения нашли отражение в монографиях, сборниках статей, обзорах, и мате-

риалах конференций [7—16]. Теперь хорошо известно, что содержащие цитохром Р-450 ферментные системы входят в состав микросомальной фракции клеток печени человека и млекопитающих и ответственны за метаболизм стероидов, простагландинов и громадного числа ксенобиотиков — попадающих в организм из окружающей среды инородных веществ, среди которых имеются канцерогены, лекарства и другие вещества. Близкая по свойствам к микросомальной гидроксилирующей системе печени стероид-гидроксилирующая система локализована в



митохондриях коры надпочечников и ответственна за ключевые стадии биосинтеза стероидных гормонов в организме человека и млекопитающих. Бактерии многих штаммов содержат гидроксилирующие ферментные системы с цитохромом Р-450 в качестве терминальной оксидазы и способны окислять углеводороды, гетероциклы и соединения других классов.

Особое внимание исследователей привлекает микросомальная гидроксилирующая система печени в связи с существенной ролью ее функций с точки зрения фармакологов, токсикологов, специалистов по химическому канцерогенезу, биохимиков и биофизиков. Микросомальная гидроксилирующая система печени состоит из трех компонентов, каждый из которых в настоящее время выделен и довольно полно охарактеризован [12]: НАДФН-цитохром-Р-450-редуктазы (КФ 1.6.2.4), цитохрома Р-450 (КФ 1.14.14.1) и фосфолипидов. Стероид-гидроксилирующая система из митохондрий коры надпочечников также состоит из трех главных компонентов: адrenoдоксин-редуктазы (КФ 1.6.7.1), ферредоксина (адrenoдоксина) и цитохрома Р-450. Бактериальная система, гидроксилирующая камфору, тоже включает три фермента [8]: путидаредоксин-редуктазу, путидаредоксин и цитохром Р-450<sub>кам</sub><sup>1</sup>.

Механизм действия всех трех систем сложен и включает много стадий. На схеме 1 представлена последовательность стадий ферментативного окисления в микросомальной системе печени, предложенная Эстабруком [17]. Большинство этих стадий изучено методами стационарной и быстрой кинетики [18]. Первая стадия состоит во взаимодействии субстрата с окисленной формой цитохрома Р-450. Константы

<sup>1</sup> Принятые сокращения: цитохром Р-450<sub>кам</sub> — цитохром Р-450 бактерий, гидроксилирующих камфору; цитохром Р-450-LM<sub>2</sub> — форма цитохрома Р-450 из печени кроликов, получавших фенобарбитал натрия; ФБ — фенобарбитал натрия; 3-Мех — 3-метилхолантрен, ГПК — гидроперекись кумила, ГПТБ — гидроперекись *трет*-бутила; НАДН — никотинамидадениндинуклеотид фосфат восстановленный; НАДФН — никотинамидадениндинуклеотид восстановленный; АН — субстрат в восстановленной форме.

скорости этой реакции велики и лежат в пределах  $10^2 \div 10^5$  л/моль·с [18]. Образование фермент-субстратного комплекса сопровождается для субстратов I типа — углеводов, полностью алкилированных аминов, ненасыщенных соединений, — переходом гемового железа из низкоспинового в высокоспиновое состояние [19]. Вторая стадия — восстановление фермент-субстратного комплекса первым электроном, который поступает из НАДФН-специфичной цепи переноса от НАДФН через посредство флавопротеина  $\text{ФП}_1$  при возможном участии цитохрома  $b_5$ , который содержится в мембранах эндоплазматического ретикулаума печени. Вторая стадия складывается из двух фаз: первая фаза характеризуется константами скорости  $0,2 \div 1$  с $^{-1}$  для разных субстратов, вторая (медленная) фаза характеризуется константами скорости  $0,09\text{--}0,31$  с $^{-1}$  [18].

Третья стадия — образование тройного комплекса  $\text{НА} - \text{Fe}^{2+} - \text{O}_2$ . Кислород присоединяется к восстановленному фермент-субстратному комплексу с большими скоростями  $\sim 10^6$  моль/л·с [20]. Четвертая стадия — восстановление тройного комплекса  $\text{НА} - \text{Fe}^{2+} - \text{O}_2$  вторым электроном, который, как предполагается, может быть поставлен НАДН-специфичной цепью переноса, включающей флавопротеин  $\text{ФП}_2$  и цитохром  $b_5$ . В настоящее время эта стадия восстановления для микросомальных систем пока не разрешена на отдельные ступени и ее скорости не измерены. Пятая стадия, которая также может быть сложным процессом и состоять из нескольких ступеней, характеризуется внутримолекулярными превращениями восстановленного тройного комплекса и его распадом с освобождением молекулы воды и гидроксильного производного. Цитохром Р-450 в пятой стадии превращается в исходную форму. Таким образом, активация молекулярного кислорода в тройном комплексе происходит в результате его восстановления двумя электронами. До сих пор не установлена и является предметом дискуссий природа активной формы кислорода, осуществляющей гидроксильное окисление различных по своей структуре химических соединений.

Схема гидроксильного окисления в стероид-окисляющей системе и в бактериальной системе, гидроксильного окисления камфору, имеет, с одной стороны, общие черты с окислением в микросомах, а с другой стороны, характеризуется значительными отличиями от микросомальной (см. [10, 11]).

Для изучения механизма активации молекулярного кислорода цитохромом Р-450 имеет большое значение впервые обнаруженная авторами работы [21] возможность использования органических гидроперекисей для окисления N-алкилзамещенных аминов с участием одного цитохрома Р-450 в окисленной форме. Использование для гидроксильного окисления органических соединений окислителей, которые содержат уже восстановленный двумя электронами кислород — гидроперекисей,  $\text{NaIO}_4$ ,  $\text{NaClO}_2$  и перекиси водорода, делает ненужной сложную электронтранспортную систему, состоящую из макромолекулярных биоконпонентов —  $\text{ФП}_1$ ,  $\text{ФП}_2$  и цитохрома  $b_5$ .

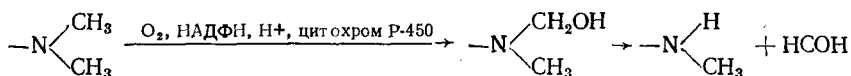
Таким образом, открывается возможность упрощения гидроксильного окисления ферментной системы микросом путем замены трудно выделяемых и сложных компонентов доступными окислителями. Это может иметь большое значение для практического применения уникального биокатализатора при гидроперекисном окислении важных для фармакологии и медицины соединений. Хорошо известна высокая каталитическая способность комплексов металлов с переменной валентностью в гидроперекисном окислении ненасыщенных соединений [22, 23]: гид-

роперекисное окисление олефинов, катализированное комплексами молибдена, положено в основу известного способа получения окиси пропилена, разработанного фирмой «HALCON» [24].

Задача данного обзора — систематизация и критическое рассмотрение реакций окисления органических соединений перекисями при участии цитохрома Р-450 и некоторых других гемопротеинов — гемоглобина, каталазы и цитохрома С. Мы не считаем необходимым рассматривать здесь окисление органических соединений перекисью водорода при участии пероксидаз, так как пероксидазное окисление подробно рассмотрено в обстоятельных обзорах [25, 26].

## II. ОКИСЛИТЕЛЬНОЕ N-ДЕАЛКИЛИРОВАНИЕ N-АЛКИЛАМИНОВ

Реакция окислительного N-деалкилирования алкилзамещенных аминов — одна из самых распространенных из числа катализируемых микросомальной ферментной системой. Считается, что эта реакция происходит в две стадии, первая из которых состоит во внедрении атома кислорода по C—H-связи алкильного заместителя с образованием промежуточного гидроксилированного соединения, которое распадается с освобождением вторичного амина и формальдегида:



Окисление аминопирина, бензфетамина, диметиланилина, этилморфина и других алкилзамещенных аминов различными перекисями при участии микросом печени различных животных и высокоочищенного цитохрома Р-450 изучено в работах [21, 27—31]. В табл. 1 приведены данные по окислению различных аминов гидроперекисью кумила (ГПК) при участии микросом печени свиньи или бычьей каталазы в сравнении с микросомальным окислением тех же субстратов в полной ферментной системе, содержащей все компоненты, НАДФН и  $\text{O}_2$  [21]. Замена кофакторов — НАДФН и  $\text{O}_2$  — на ГПК обеспечивает окисление всех изученных аминов со скоростями, в ряде случаев превышающими скорости окисления в полной системе (диметиланилин, аминопирин). Каталаза эффективна только в окислении первых трех субстратов под действием ГПК.

Представляет интерес сравнение эффективности различных перекисей при окислении одного и того же субстрата (табл. 2). Наиболее эф-

ТАБЛИЦА 1

Скорости окисления аминов микросомами печени свиньи с участием кофакторов, ГПК и каталазы быка (скорости приведены в нмоль формальдегида в минуту на 1 мг микросомального белка) [21]

| Амины         | Микросомы,<br>НАДФН,<br>$\text{O}_2$ | Гидроперекись,<br>ГПК |               |
|---------------|--------------------------------------|-----------------------|---------------|
|               |                                      | микросомы             | ката-<br>лаза |
| Диметиланилин | 3,4                                  | 35,1                  | 451           |
| Аминопирин    | 3,5                                  | 5,8                   | 312           |
| Бензфетамин   | 3,3                                  | 4,2                   | 10            |
| Пропоксифен   | 4,7                                  | 3,3                   | 0             |
| Этилморфин    | 6,3                                  | 2,2                   | 0             |
| Метамфетамин  | 2,0                                  | 0,4                   | 0             |

ТАБЛИЦА 2

Окисление аминопирина различными перекисями при участии микросом печени свиньи или бычьей каталазы [21]

| Перекиси                                     | Микросомы | Ката-<br>лаза |
|--|-----------|---------------|
| Гидроперекись кумила                         | 10,8      | 312           |
| Гидроперекись <i>трет</i> -бутила            | 3,8       | 165           |
| Гидроперекись гераниола                      | 2,0       | 89            |
| Гидроперекись линолевой кислоты              | 0,7       | 11            |
| 17 $\alpha$ -Гидроперекись прегненолона      | 0,4       | 8             |
| Ди- <i>трет</i> -бутилпероксид               | 0,2       | 14            |
| $\text{H}_2\text{O}_2$ -Генерирующая система | 0,1       | 0             |

ТАБЛИЦА 3

Параметры активации распада фермент-субстратных комплексов при гидроперекисном окислении аминов с участием микросомального цитохрома Р-450 [29, 30]

| Система                                | Предэкспоненциальный множитель, с <sup>-1</sup> | E, ккал/моль | E *, ккал/моль | ΔE <sup>a</sup> , ккал/моль |
|--|---|--------------|----------------|-----------------------------|
| 1,2,7-Триметилдекагидрохинолон-4 + ГПК | 6,45·10 <sup>9</sup>                            | 13,7         | 14,2           | +0,5                        |
| Диметиланилин + ГПТБ                   | 7,76·10 <sup>10</sup>                           | 15,8         | —              | —                           |
| Аминопирин + ГПК                       | 1,12·10 <sup>9</sup>                            | 12,7         | 13,4           | +0,7                        |
| Аминопирин + ГПК <sup>б</sup>          | 3,30·10 <sup>8</sup>                            | 12,0         | —              | —                           |
| Монометиланилин + ГПК                  | 1,95·10 <sup>11</sup>                           | 16,1         | 16,6           | +0,5                        |
| Диметиланилин + ГПК                    | 5,12·10 <sup>8</sup>                            | 12,2         | 13,4           | +1,2                        |

Примечание. <sup>a</sup> ΔE = E\* — E; <sup>б</sup> опыты проведены с микросомами крыс, получавших фенобарбитал.

фективным окислителем является ГПК. Генерирование H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в системе, содержащей глюкозу и глюкозооксидазу, не обеспечивает высоких скоростей окисления аминопирина. Однако при электролитическом генерировании H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (или HO<sub>2</sub><sup>-</sup>) наблюдаются сравнительно высокие скорости окисления аминопирина, а также бензфетамина и паранитроанизола микросомами [28]. Участие цитохрома Р-450 в перекисном окислении всех аминов и многих соединений других классов не вызывает никаких сомнений. Это участие подтверждается ингибирующим действием детергентов, которые превращают цитохром Р-450 в неактивную форму Р-420 (SKF-525А, деоксихолат калия и др.) [21] и увеличением скорости окисления аминопирина при использовании микросом животных, получавших фенобарбитал, так как в этом случае содержание цитохрома Р-450 в микросомах существенно возрастает. Скорость окисления аминопирина под действием ГПК растет пропорционально концентрации цитохрома Р-450. Самым убедительным доказательством прямого участия цитохрома Р-450 в окислительном деалкилировании аминов перекисями являются опыты по окислению бензфетамина с участием ГПК и цитохрома Р-450 высокой степени очистки в одной из его форм LM<sub>2</sub>, образующихся в печени крыс при индукции фенобарбиталом [31]. Высокоочищенный цитохром Р-450 свободен от редуктазы, цитохрома b<sub>5</sub> и других компонентов микросомальных цепей переноса электронов и обнаруживает высокую каталитическую активность, которая равна или превышает активность цитохрома Р-450 в микросомах [31].

Детальное кинетическое исследование деметилирования ряда аминов гидроперекисями в интервале 20—37° С проведено в нашей лаборатории [27, 29, 30]. Предполагая, что лимитирующей скоростью стадий гидроперекисного окисления аминов является акт внедрения активированного кислорода в тройном комплексе субстрат-цитохром Р-450-ROOH, а последующие стадии с освобождением продуктов реакции проходят гораздо быстрее, можно считать каталитическую кон-

ТАБЛИЦА 4

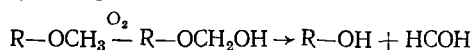
Сравнение скоростей НАДФН-зависимого и ГПК-зависимого О-деалкилирования при катализе ФБ-микросомами кролика 22—25° С (скорости выражены в нмоль альдегидов в минуту на 1 мг микросомального белка) [35]

| Субстрат                 | С участием НАДФН и O <sub>2</sub> | С участием ГПК |
|--------------------------|-----------------------------------|----------------|
| 7-Этоксикумарин          | 1,5                               | 3,6            |
| <i>para</i> -Нитроанизол | 2,3                               | 12,0           |
| Норкодеин                | 6,2                               | 6,2            |
| Фенацетин                | 2,3                               | 2,7            |

станту скорости количественной характеристикой процесса распада тройного комплекса (см. табл. 3). Из табл. 3 следует, что энергии активации окисления аминов в гидроперекисных системах ( $E$ ) близки к значениям, полученным в том же температурном интервале и в тех же условиях для полной микросомальной системы с кофакторами ( $E^*$ ). Разница между ними лежит в пределах ошибки определения энергии активации в узком интервале температур. Окисление аминов гидроперекисями с участием цитохрома Р-450 характеризуется компенсационным эффектом, который описывается уравнением, связывающим активационные характеристики для распада субстрат-фермент-гидроперекисного тройного комплекса:  $\Delta H^*$ , ккал/моль =  $18,7 + 333 \Delta S^*$ . Компенсационный эффект характеризуется величиной  $\alpha = 333/T_{cp} = 1,11$ , где  $T_{cp}$  — средняя температура опытов.

### III. ГИДРОПЕРЕКИСНОЕ О-ДЕАЛКИЛИРОВАНИЕ ЭФИРОВ

Полная микросомальная гидроксилирующая система в присутствии кофакторов НАДФН и  $O_2$  катализирует реакции окислительного О-деалкилирования эфиров, проходящие по схеме:



Эти реакции осуществляются в перекисных системах микросомами в отсутствие НАДФН и  $O_2$  [32—35].

Гидроперекись кумила эффективна в О-деалкилировании многих субстратов (см. табл. 4), а при окислении *n*-нитроанизола скорость реакции в шесть раз превышает скорость окисления в полной системе. О-Деалкилирование сильно тормозится додецилсульфатом натрия и 1-(2-изопропилфенил)имидазолом [32]. Супероксид — дисмутаза практически не влияет на скорость О-деалкилирования, т. е. в реакции нет активных анионов  $O_2^{\cdot -}$ . Весьма важно, что гемин, каталаза, пероксидаза хрена и миоглобин совершенно не активны в реакциях О-деалкилирования гидроперекисями [32].

Детальное кинетическое исследование О-деалкилирования 7-этоксикумарина в интервале 0—45° С, анизола и *n*-хлоранизола в интервале 20—37° с участием ГПК и микросом проведено в работах [34, 35] (см. табл. 5).

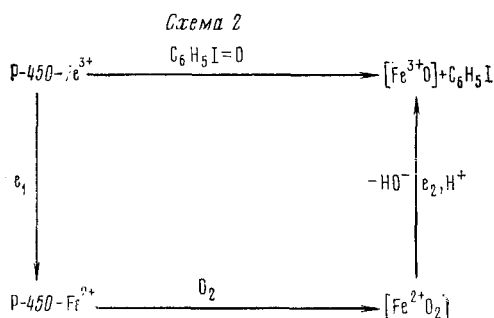
Гидроперекисное окисление одного и того же субстрата может осуществляться по двум направлениям [34]: ГПТБ и микросомы деметилируют анизол (20 %) и одновременно гидроксилируют его в *n*-положении (80%) с образованием *n*-метоксифенола.

Для понимания механизма окисления с участием перекисей и цитохрома Р-450 интересен тот факт, что возможно О-деалкилирование 7-этоксикумарина иодозобензолом с участием микросом [33], так как иодозобензол содержит только один атом кислорода. Можно предположить, что в активной частице, осуществляющей атаку субстратов, со-

ТАБЛИЦА 5

Характеристики О-деалкилирования эфиров гидроперекисью кумила [34, 35]

| Субстрат             | Система                   | $k_0$ , с <sup>-1</sup> | $E$ , ккал/моль | Ссылки |
|----------------------|---------------------------|-------------------------|-----------------|--------|
| Анизол               | ГПК + интактные микросомы | $2,0 \cdot 10^7$        | 11,4            | [34]   |
| <i>n</i> -Хлоранизол | ГПК + интактные микросомы | $5,5 \cdot 10^7$        | 11,8            | [34]   |
| 7-Этоксикумарин      | ГПК + ФБ-микросомы        | —                       | 17,0            | [35]   |



держится лишь один атом кислорода. Такой частицей может быть оксеноидный комплекс  $[\text{FeO}]^{3+}$  (см. схему 2). На схеме 2 приведены пути образования частицы  $[\text{FeO}]^{3+}$  с нодозобензолом, а также в полной микросомальной системе.

#### IV. ГИДРОКСИЛИРОВАНИЕ АРОМАТИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ И ЭПОКСИДИРОВАНИЕ ЦИКЛОГЕКСЕНА

Исследованию гидроксилирования ароматических соединений гидроперекисями с участием микросом печени и высокоочищенного цитохрома Р-450 посвящены работы [36—46] (см. табл. 6).

Гидроксилирование ароматических соединений сопровождается распадом ГПК с образованием кумилового спирта. Показано [36], что на каждую распадающуюся молекулу ГПК при окислении анилина образуется молекула *n*-аминофенола. В гидроксилировании анилина гидроперекисью кумила неэффективны гемин, каталаза, пероксидаза из хрена, миоглобин, цитохром *b*<sub>5</sub> и цитохром Р-420 [36].

В работе [38] проведено количественное сопоставление кинетических характеристик процесса гидроксилирования нафталина гидроперекисью кумила с участием разных ферментных систем. Скорость реакции при индуцировании ферментной системы фенобарбиталом натрия растет пропорционально увеличению концентрации цитохрома Р-450. Каталитическая константа скорости при индукции 3-метилхолантrenom снижается вдвое по сравнению с интактными системами, что связано с образованием в 3-МеХ-индуцированных системах новой формы гемопротейна — цитохрома Р-448.

Детальное кинетическое исследование гидроксилирования нафталина и анилина гидроперекисями в широком интервале температур и эпоксидирования циклогексена гидроперекисью кумила проведено в работах [29, 37—46]. Все опыты проведены в условиях насыщения по гид-

ТАБЛИЦА 6

Сравнение скоростей окисления ароматических субстратов в присутствии кофакторов НАДФН и  $\text{O}_2$ , и ГПК (скорости приведены в нмоль продуктов реакции, образующихся в 1 мин, на 1 мг микросомального белка) [36]

| Система                        | Субстрат  | Кофакторы, НАДФН и $\text{O}_2$ | ГПК   |
|--------------------------------|-----------|---------------------------------|-------|
| Микросомы печени крысы         | дифенил   | 0,60                            | 1,70  |
| Микросомы печени крысы         | бензпирен | 0,78                            | 0,89  |
| ФБ-Микросомы печени кролика    | кумарин   | 0,062                           | 0,055 |
| 3-МеХ-Микросомы печени кролика | анилин    | 0,51                            | 50,0  |

ТАБЛИЦА 7

**Энергетические характеристики окисления нафталина, анилина и циклогексена гидроперекисями**

| Система  | $t$ , °C | $E$ , ккал/моль | Ссылки |
|--|----------|-----------------|--------|
| <b>Нафталин</b>  |          |                 |        |
| ФБ-микросомы крыс-самцов + ГПК   | 5—40     | 18,8            | 42     |
| Высокоочищенный цитохром Р-450 из печени кролика (13 нмоль/мг белка) + ГПК | 5—38     | 17,2            | 42     |
| <b>Анилин</b>  |          |                 |        |
| Интактные микросомы крыс-самцов + ГПК                                      | 10—40    | 18,1            | 42     |
| ФБ-микросомы крыс-самцов + ГПК   | 5—36     | 21,3            | 42     |
| Интактные микросомы крыс-самок + ГПК                                       | 15—37    | 15,3            | 40, 41 |
| Интактные микросомы крыс-самок + ГПТБ                                      | 15—37    | 14,5            | 40, 41 |
| Цитохром Р-450 из печени крысы (4,4 нмоль/мг белка) + ГПК                  | 14—37    | 15,8            | 39     |
| <b>Циклогексен</b>   |          |                 |        |
| Интактные микросомы из печени крыс-самцов + ГПТБ                           | 20—37    | 8,15            | 29     |

роперекиси. Температурный ход максимальных скоростей окисления анилина, нафталина и циклогексена подчиняется уравнению Аррениуса, по которому были вычислены энергии активации процессов (см. табл. 7). Энергии активации окисления нафталина микросомами и высокоочищенным цитохромом в реакции с одной и той же гидроперекисью близки между собой. Энергии активации окисления анилина в *n*-аминофенол при катализе микросомами крыс-самок и очищенным цитохромом Р-450 также мало отличаются — 15,3 и 15,8 ккал/моль [39, 40, 41]. Индукция фенобарбиталом практически не сказывается на энергетических характеристиках окисления нафталина и анилина гидроперекисью кумила [42].

Таким образом, цитохром Р-450 в микросомах и высокоочищенный цитохром Р-450 в растворе не обнаруживают энергетических различий в реакции окисления гидроперекисями одного и того же субстрата (нафталин или анилин). В связи с этим интересно исследование влияния индивидуальных фосфолипидов на реакционную способность высокоочищенного цитохрома Р-450 в гидроперекисном окислении ароматических соединений [43—46], так как фосфолипиды являются компонентом микросомальных мембран и необходимы при реконструкции микросомальной системы для восстановления ее полной активности.

Гидроксирование нафталина и анилина гидроперекисью кумила с участием высокоочищенной формы цитохрома Р-450- $LM_2$  из ФБ-микросом печени кролика (16,8 нмоль/мг белка) изучено в присутствии и в отсутствие различных фосфолипидов [44—46]. Показано, что суммарные микросомальные фосфолипиды (СФЛ), фосфатидилинозит (ФИ) и лизофосфатидилхолин (ЛФХ) увеличивают скорость окисления нафталина в реакции с ГПК в 3—4 раза, если мольное соотношение липиды: цитохром Р-450 равно 30 и более. Фосфатидилхолин (ФХ) и сфингомиелин (СМ) практически не влияют на окисление нафталина вплоть до соотношений липид:цитохром Р-450, равных 200—300. Добавление жирных кислот в инкубационную смесь замедляет окисление нафталина гидроперекисью кумила.

Добавки СФЛ, ФИ, ФС и ЛФХ увеличивают также скорость окисления анилина в реакции с ГПК в два раза, ФХ и СМ не влияют на



окисление анилина, а жирные кислоты замедляют этот процесс. Таким образом, кислые фосфолипиды — ФС, ФИ и СФЛ, содержащие в своем составе кислые липидные компоненты, активируют цитохром Р-450 в процессах гидроперекисного окисления нафталина и анилина, в то время как липиды, существующие в виде цвиттер-ионов, не влияют на скорости окисления субстрата I типа — нафталина и субстрата II типа — анилина [44—46]. Таким образом, взаимодействие цитохрома Р-450 с кислыми липидами сказывается на скоростях гидроперекисного окисления анилина. На этот процесс практически не влияет фосфатидилхолин — главный компонент микросомальной мембраны. Возможно, именно этим обстоятельством объясняется отсутствие разницы в энергиях активации реакций гидроперекисного окисления нафталина и анилина с участием высокоочищенного цитохрома Р-450 и мембранно-связанного цитохрома Р-450 [39—42].

Активация цитохрома Р-450 кислыми фосфолипидами в реакции гидроперекисного окисления может быть объяснена стабилизацией активной конформации гемопротенна в растворе при иммобилизации молекул липида на поверхности белка. Кун и сотр. [47] показали, что взаимодействие формы  $LM_2$  цитохрома Р-450 с фосфолипидами сопровождается увеличением содержания  $\alpha$ -спирали. Из спектральных изменений, которые регистрируются методом дифференциального спектрофотометрирования при взаимодействии цитохрома Р-450 —  $LM_2$  с фосфолипидами при разных температурах, можно заключить, что фосфолипиды способны влиять на равновесие спиновых форм цитохрома Р-450, различающихся по своей способности взаимодействовать с субстратами этого фермента [48]. Таким образом, общие соображения о стабилизации конформации цитохрома Р-450 при взаимодействии с фосфолипидами могут быть конкретизированы: цитохром Р-450 приобретает конформацию  $\alpha$ -спирали и может менять спиновое состояние в результате конформационных перестроек.

#### V. ОКИСЛЕНИЕ НАСЫЩЕННЫХ СОЕДИНЕНИЙ И СТЕРОИДОВ

Известно, что микросомальные гидроксилирующие системы печени и почек, включающие цитохром Р-450, катализируют  $\omega$ -окисление жирных кислот [49, 50]; продуктами окисления являются  $\omega 1$ - и  $\omega 2$ -оксикислоты [50, 51]. Предполагается, что микросомы печени содержат высокоспецифичный цитохром Р-450, ответственный только за окисление до  $\omega 1$ -оксипроизводных, а также другой неспецифичный цитохром Р-450, который катализирует  $\omega 2$ -окисление жирных кислот и гидроксилирование многих лекарств и других ксенобиотиков [51—54]. Микросомы почек, вероятно, содержат только одну форму цитохрома Р-450, ответственного как за  $\omega 1$ -, так и за  $\omega 2$ -окисление жирных кислот [55, 56]. Соотношение  $\omega 1$ - и  $\omega 2$ -продуктов окисления определяется длиной алкильного заместителя в жирных кислотах.

Гидроперекись кумила и микросомы печени обеспечивают окисление лауриновой кислоты в  $\omega 2$ -оксикислоту, причем  $\omega 1$ -оксипроизводное в детектируемых количествах не образуется [57], в то время как в полной системе, содержащей кофакторы НАДФН и  $O_2$ , наблюдается образование  $\omega 1$ - и  $\omega 2$ -оксипроизводных в соотношении 1 : 5. Микросомы почек и ГПК обеспечивают  $\omega 2$ -окисление лауриновой кислоты с небольшими скоростями, а  $\omega 1$ -оксилауриновой кислоты в этом случае не обнаружено [57]. Таким образом, окисление лауриновой кислоты действием ГПК с участием микросом печени и почек дает в обоих случаях один и тот же продукт —  $\omega 2$ -оксилауриновую кислоту. Этот факт подтверждает существование в микросомальной фракции печени двух

ТАБЛИЦА 8

**Гидроксирование стероидов с участием микросом печени  
крысы и различных окислителей [60]**

| Главные продукты реакции           | Скорости реакций *     |                   |      |
|------------------------------------|------------------------|-------------------|------|
|                                    | НАДФН и O <sub>2</sub> | NaIO <sub>4</sub> | ГПК  |
| <b>Андростендион</b>               |                        |                   |      |
| 6α-ОН                              | 0,58                   | 3,97              | 0,85 |
| 7α-ОН                              | 0,13                   | 7,13              | 0,65 |
| 15-ОН                              | 0,13                   | 0,90              | 0,12 |
| 16α-ОН                             | 0,27                   | 0,58              | 0,43 |
| 17β-окси-4-андростен-<br>3,16-дион | 0,12                   | 0,70              | 0,10 |
| Суммарно                           | 1,23                   | 13,28             | 2,15 |
| <b>Тестостерон</b>                 |                        |                   |      |
| 6β-ОН                              | 0,74                   | 2,20              | 1,22 |
| 7α-ОН                              | 0,34                   | 3,98              | 0,25 |
| 16α-ОН                             | 0,16                   | 0,71              | 0,17 |
| Суммарно                           | 1,24                   | 6,99              | 1,64 |
| <b>Прогестерон</b>                 |                        |                   |      |
| 2α-ОН                              | 0,23                   | 0,62              | 0,12 |
| 6β-ОН                              | 0,47                   | 1,20              | 0,48 |
| 7α-ОН                              | 0                      | 0,44              | 0    |
| 15α-ОН                             | 0                      | 0,22              | 0    |
| 15β-ОН                             | 0                      | 0,26              | 0,14 |
| 16α-ОН                             | 0,41                   | 0,44              | 0,26 |
| Суммарно                           | 1,11                   | 3,18              | 1,00 |
| <b>17-β-Эстрадиол</b>              |                        |                   |      |
| Суммарно **                        | 0,38                   | 4,77              | 1,02 |

\* Скорости приведены в нмоль продукта, образующегося за 1 мин, на 1 мг белка.

\*\* Указаны суммарные данные для 6α-ОН, 6β-ОН, 16α-ОН.

или более форм цитохрома Р-450, ответственных за ω-окисление жирных кислот. Можно предполагать, что цитохром Р-450, обеспечивающий ω-2-окисление жирных кислот гидроперекисью кумила, идентичен в микросомах печени и почек [57].

Микросомы печени крысы катализируют реакцию окисления жирных кислот такими окислителями, как хлорит натрия, периодат натрия, иодозобензол и диацетат иодозобензола [58]. Используемые окислители гидроксилируют жирные кислоты только в ω-2-положение и намного эффективнее, чем НАДФН и O<sub>2</sub> в полной микросомальной системе; наиболее эффективен иодозобензолдиацетат. Ингибирующее действие на ω-2-окисление лаурата при участии микросом печени оказывает субстрат микросомальной системы — анилин, полностью останавливающий процесс [58].

Переокисному окислению стероидов с участием цитохром Р-450-содержащих систем посвящены работы [59—65]. Переокисное окисление стероидов могут катализировать микросомы печени [60], цитохром Р-450 из митохондрий коры надпочечников [62], цитохром Р-450 из микросом печени [59, 63]. В табл. 8 представлены данные по окислению стероидов в полной микросомальной системе, а также в присутствии NaIO<sub>4</sub> и ГПК [60]. Как видно, использование NaIO<sub>4</sub> и ГПК в сочетании с микросомами печени не обеспечивает селективного окисления

стероидов; это можно связать с наличием многих форм цитохрома Р-450 в микросомах печени или с возможной ролью радикалов в окислении, что часто приводит к отсутствию селективности. Наиболее эффективным окислителем стероидов является  $\text{NaIO}_4$  [60];  $\text{NaClO}_2$ , ГПК, 17  $\alpha$ -гидроперекись прегненолона, трет-бутилгидроперекись и гидроперекись линолевой кислоты обеспечивают меньшие скорости окисления, чем в полной системе с участием НАДФН и  $\text{O}_2$ . В окислении стероидов с участием микросом печени не проявляют никакой активности такие окислители, как  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ,  $\text{CrO}_3$ ,  $\text{KClO}_4$ ,  $\text{KBrO}_3$ ,  $\text{K}_2\text{IrCl}_6$  и  $\text{NaIO}_3$  [60].

Частично очищенный цитохром Р-450 из микросом печени крысы окисляет андростендион при использовании  $\text{NaIO}_4$ ,  $\text{NaClO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  и органических гидроперекисей [59]. Наиболее эффективным окислителем является периодат натрия. Следует отметить, что в окислении стероидов различными перекисями не проявляют каталитических свойств пероксидаза хрена, каталаза и метмиоглобин [59].

Исследование окисления андростендиона различными производными иодобензола при участии цитохрома Р-450 микросом печени показало, [64], что эффективность окислителей уменьшается в ряду: 2-нитроинодобензолдиацетат > 2-хлоринодобензолдиацетат > 2-метоксинодобензолдиацетат > 4-метилинодобензол > иодобензол. Эффективность окислителя определяется несколькими факторами: тенденцией к олигомеризации окислителя, уменьшающейся при координации его с гемовым железом, присутствием заместителей в положении 2 и электронодонорной способностью этих заместителей. Скорости 7  $\alpha$ -, 6  $\beta$ - и 16  $\alpha$ -гидроксилирования андростендиона 2-нитроинодобензолдиацетатом в 108, 130 и 167 раз выше соответствующих величин при окислении этого субстрата в те же положения в полной микросомальной системе. Авторы работы [64] считают, что этот факт свидетельствует в пользу утверждения о разных лимитирующих стадиях при протекании процесса окисления андростендиона в полной микросомальной системе и при участии перекисей.

Большинство использованных при окислении стероидов доноров кислорода не обеспечивают селективности процесса в противоположность тому, что наблюдается при  $\omega$ -гидроксилировании насыщенных жирных кислот [57, 58]. Однако при окислении холестерина действием периодата натрия и ГПК в присутствии микросом печени наблюдается исключительная селективность: оба окислителя обеспечивают только 25-гидроксилирование холестерина. [65]. Интересно отметить, что при окислении холестерина в полной микросомальной системе с участием НАДФН и  $\text{O}_2$  гидроксилирование происходит в положениях 6 $\beta$ -, 7 $\alpha$ -, 12 $\alpha$ -, 25- и 26- [65]. В этом случае переход к перекисному окислению характеризуется большой селективностью реакции. Этот факт трудно объяснить однозначно, хотя можно предположить, что конкуренция окислителей и холестерина за связывание с цитохромом Р-450 делает недоступными для атаки гидроксилирующим агентом всех положений молекулы субстрата, кроме 25-го. Эффективность высокоочищенного цитохрома Р-450 в окислении андростендиона периодатом натрия увеличивается при добавлении фосфатидилхолина: скорость 6  $\beta$ -гидроксилирования этого субстрата возрастает в 2,5 раза при соотношении цитохром Р-450: липид, равном  $\sim 10$  [63]. Активирующее действие на цитохром Р-450 в окислении андростендиона периодатом натрия оказывают также такие детергенты, как Тритон-Х-100 [63].

Авторы работ [59—62] считают, что при гидроксилировании стероидов различными перекисями активным окисляющим агентом явля-



ТАБЛИЦА 9

Пероксидазная активность микросом по отношению к стероидным гидроперекисям \* [67]

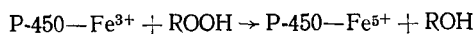
| Гидроперекись                               | Микросомы печени крысы | Микросомы коры надпочечников быка |
|---|------------------------|-----------------------------------|
| 17 $\alpha$ -Гидроперекись прогестерона     | 92                     | 31                                |
| 17 $\alpha$ -Гидроперекись прегненолона     | 80                     | 30                                |
| 17 $\alpha$ -Гидроперекись аллопрегненолона | 76                     | 27                                |
| Гидроперекись линолевой кислоты             | 75                     | 25                                |
| Гидроперекись кумила                        | 34                     | 12                                |
| 7 $\beta$ -Гидроперекись холестерина        | 30                     | 17                                |
| 6 $\beta$ -Гидроперекись холест-4ен-3-она   | 30                     | 10                                |
| 7 $\alpha$ -Гидроперекись холестерина       | 22                     | 9                                 |
| 25-Гидроперекись холестерина                | 17                     | 9                                 |
| 26-Гидроперекись холестерина                | 15                     | 9                                 |
| 20 $\alpha$ -Гидроперекись холестерина      | 12                     | 5                                 |

\* Пероксидазная активность измерена при 23° С в 3 мл раствора фосфатного буфера (рН 7,5), содержащего 0,2 ммоль/л ТМПФД, 2 мг микросомального белка и 0,05 ммоль/л гидроперекисей, а также 1,5 ммоль/л ЭДТА.

тов в присутствии такого донора водорода, как N,N,N',N'-тетраметил-пара-фенилендиамин (ТМПФД). В табл. 9 суммировано пероксидазное действие микросом из печени крысы и из коры надпочечников быка по отношению к гидроперекисям стероидов [67]. Во всех случаях микросомы печени крысы более активны, чем микросомы из коры надпочечников быка.

На пероксидазную активность не оказывают влияния СО, азот, ЭДТА, 2-фенил-2-пропанол. Небольшое ингибирующее действие обнаруживает азид натрия (20%). Пероксидазная активность уменьшается на 95% при нагревании микросом до 80°. Эффективное тормозящее действие на пероксидазные реакции микросом печени оказывают субстраты микросомальной ферментативной системы [67]: субстраты I типа — андростендион, тестостерон, 17  $\beta$ -эстрадиол, аминопирин, гексабарбитал, линолевая кислота — ингибируют пероксидазные реакции на 65—34%, в то время как субстраты второго типа — анилин, имидазол, пиридин, цианид, кортикостерон и *n*-октиламин — ингибируют пероксидазную активность на 83—50%. Этим подтверждается участие в пероксидазных реакциях цитохрома Р-450 в окисленной форме. Пероксидазная активность цитохрома Р-450 из микросом коры надпочечников также ингибируется в большой степени субстратами микросомальной системы обоих типов [67].

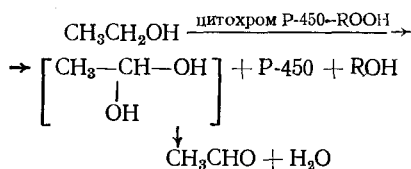
В пероксидазных реакциях цитохрома Р-450 в качестве донора водорода могут выступать НАДН и НАДФН [68]. Совокупность экспериментальных данных [67, 68] свидетельствует о том, что пероксидазная активность присуща окисленной форме цитохрома Р-450: СО не ингибирует пероксидазных реакций цитохрома Р-450, потому что образует комплекс только с восстановленной формой этого гемопротенина. Предполагается, что при взаимодействии цитохрома Р-450 с гидроперекисями образуется комплекс [25, 26], в котором гемовое железо может находиться в состоянии высокой степени окисления:



Известно, что первичные алифатические спирты не являются субстратами пероксидаз [69]. Однако микросомы печени крысы, а также высокоочищенный цитохром Р-450 катализируют окисление первичных алифатических спиртов в альдегиды [70]. Способность спиртов к окис-

лению гидроперекисью кумила с участием цитохрома или каталазы уменьшается с увеличением размеров алифатического радикала [70].

Цитохром Р-450 является наиболее эффективным катализатором в окислении этанола гидроперекисью кумила, в то время как цитохром С, гемоглобин и пероксидаза практически не катализируют окисление спирта. Индукция микросом фенобарбиталом натрия почти в пять раз повышает их каталитическую активность в окислении этанола ГПК [70]. Механизм окисления алифатических спиртов с участием цитохрома Р-450 и гидроперекисей является дискуссионным: спирты могут быть донорами водорода и окисляться по пероксидазному пути, который уже обсуждался в этом разделе; вторая возможность окисления спиртов связана с монооксигеназным действием цитохрома Р-450 — внедрение активированного атома кислорода из комплекса Р-450 — ROOH в молекулу спирта с последующим распадом неустойчивого промежуточного соединения на ацетальдегид и воду:



Исследования механизма окисления спиртов гидроперекисями при участии цитохрома Р-450 пока нигде не проводились. Восстановление гидроперекисей стероидов цитохромом Р-450 представляет большой интерес при выяснении механизма окисления стероидов микросомами печени и при их биосинтезе с участием митохондриального цитохрома Р-450 коры надпочечников, так как гидроперекиси стероидов могут быть промежуточными соединениями, которые затем превращаются в оксипроизводные с участием цитохрома Р-450.

Нежелательным побочным процессом, который сопровождает гидроперекисное окисление большинства субстратов, является деструкция цитохрома Р-450 под действием гидроперекисей [43—45, 71, 72]. Показано [72], что ГПК и ГПТБ разрушают не только цитохром Р-450, но и цитохром  $b_5$ , играющий важную роль в транспорте электронов в микросомальных цепях. Гидроперекись линолевой кислоты разрушает цитохром Р-450 в микросомальной форме в том случае, если этот гемопrotein не индуцирован или индуцирован фенобарбиталом либо 3-метилхолантереном [71]. По данным работы [71], в реакции деструкции микросомального цитохрома Р-450 наблюдается две фазы — быстрая и медленная. Детальное кинетическое исследование деструкции цитохрома Р-450 гидроперекисью кумила в микросомах и после очистки разной степени в растворе показало, что этот процесс является сложным и имеет три фазы [43—45]. В условиях избытка ГПК процесс деструкции цитохрома Р-450 можно охарактеризовать бимолекулярными константами скорости для каждой фазы деструкции. Глубина первой фазы деструкции цитохрома Р-450 независимо от степени его интеграции (микросомы или солюбилизированный цитохром Р-450) зависит от начальной концентрации гидроперекиси и от продолжительности деструкции [43—45].

В табл. 10 представлены кинетические параметры, характеризующие деструкцию цитохрома Р-450 в его реакции с ГПК на разных стадиях этого процесса. Константа скорости  $k_0$  ( $\text{с}^{-1}$ ) характеризует деструкцию цитохрома Р-450 в отсутствие гидроперекиси. Такое превращение наблюдается при 25° С лишь в одном случае — для цито-

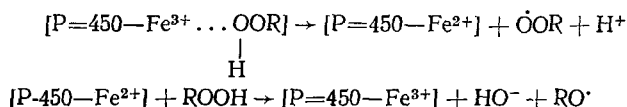
ТАБЛИЦА 10

Кинетические параметры трех фаз деструкции цитохрома Р-450 в реакции с гидроперекисью кумила при 25° С [43—45]

| Система                           | Удельное содержание цитохрома Р-450, нмоль/мг | $k_0$ , с <sup>-1</sup> | $K_I$      | $K_{II}$ , л/моль, с | $K_{III}$ |
|-----------------------------------|---|-------------------------|------------|----------------------|-----------|
| Интактные микросомы крысы         | 0,61  | 0                       | 18,50      | 1,80                 | 0,23      |
| ФБ-микросомы крысы                | 1,70  | 0                       | 41,00      | 1,24                 | 0,22      |
| ФБ-микросомы кролика              | 2,10  | 0                       | 8,77       | 0,47                 | —         |
| 20-МеХ-микросомы крысы            | 1,00  | 0                       | 12,67      | 1,53                 | 0,33      |
| Цитохром Р-450-LM <sub>2</sub> ** | 12,00   | 3,0·10 <sup>-4</sup>    | 0,78       | 0,43                 | 0,15      |
| То же                             | 13,00   | 0                       | 0,60—0,97* | 0,12—0,39*           | 0,07      |
| »                                 | 16,84   | 0                       | 0,69       | 0,10—0,59*           | 0,16      |
| Цитохром Р-450-LM <sub>4</sub> ** | 9,40  | 0,17·10 <sup>-4</sup>   | 0,18—0,42* | 0,10—0,22*           | 0,11      |

\* Величины констант скорости для концентраций гидроперекиси больше 3,0·10<sup>-4</sup> М.  
 \*\* Из ФБ-микросом кролика.

хрома Р-450 в форме LM<sub>2</sub> при его удельном содержании 12,0 нмоль/мг белка. Субстраты микросомальной системы — анилин и др. — сильно тормозят процесс деструкции цитохрома Р-450 гидроперекисями. Введение в инкубационную смесь ингибитора радикальных процессов — 1-нафтола — сопровождается его расходом и сильным торможением процесса деструкции. Тормозящее действие этого антиоксиданта подтверждает радикальный механизм деструкции цитохрома Р-450. Комплекс гидроперекиси и цитохрома Р-450, строение которого будет обсуждено в последнем разделе обзора, распадается с образованием активных радикалов:



Образовавшиеся радикалы RO<sup>•</sup> и RO<sub>2</sub><sup>•-</sup> атакуют порфириновое кольцо гема цитохрома Р-450 и апофермент, разрушая его.

# VII. КАТАЛИЗ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ДРУГИМИ ГЕМОПРОТЕИНАМИ (ГЕМОГЛОБИН, КАТАЛАЗА, ЦИТОХРОМ С)

Большой интерес представляет выяснение каталитической способности других гемопротеинов в перекисном окислении. Не во всех случаях цитохром Р-450 может быть заменен другими, более доступными гемопротеинами: окислительное деалкилирование N-алкиламинов катализируют пероксидаза хрена в сочетании с Н<sub>2</sub>О<sub>2</sub> [73], гемоглобин и каталаза в сочетании с ГПК или Н<sub>2</sub>О<sub>2</sub> [74]; окисление анилина гидроперекисью кумила катализируют гемоглобин [75] и цитохром С [76]; пероксидазную активность в присутствии Н<sub>2</sub>О<sub>2</sub> по отношению к фенилгидразину проявляет гемоглобин [77].

В табл. 11 суммированы данные по каталитическому действию гемопротеинов в различных реакциях. Только цитохром Р-450 проявляет каталитическую активность во всех реакциях, в то время как другие гемопротеины могут катализировать лишь одну или несколько реакций перекисного окисления. Ни один из гемопротеинов, кроме цитохрома Р-450, не способен катализировать реакции перекисного О-деалкилирования эфиров [32] и окисления стероидов [59]. Каталаза участ-

ТАБЛИЦА 11

Каталитические свойства гемопротеинов в окислении органических соединений перекисями и некоторыми другими окислителями неперекисной природы

| Реакции                                    | Гемопротеины, проявляющие каталитическую активность *  | Ссылки                              | Гемопротеины, не проявляющие каталитических свойств                               | Ссылки |
|--|--|-------------------------------------|---|--------|
| N-Деалкилирование аминов                   | цитохром P-450 (ROOH, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )<br>каталаза (ROOH, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )<br>пероксидаза (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )<br>гемоглобин (ГПК, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) | [21, 27—31]<br>[21]<br>[73]<br>[74] | цитохром P-420  | [21]   |
| O-Деалкилирование эфиров                   | цитохром P-450 (ГПК, ГПТБ, C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> IO)   | [32—35]                             | гемин, каталаза, пероксидаза, миоглобин, цитохром P-420                           | [32]   |
| Гидроксилирование ароматических соединений | цитохром P-450 (ROOH, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )<br>гемоглобин (ГПК),<br>цитохром C (ГПК)   | [28, 36—46]<br>[75]<br>[76]         | гемин, каталаза, пероксидаза, миоглобин, цитохром b <sub>5</sub> , цитохром P-420 | [36]   |
| Окисление стероидов                        | цитохром P-450 (ROOH, NaIO <sub>4</sub> , C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> IO, NaClO <sub>2</sub> )   | [59—65]                             | пероксидаза, каталаза, метмиоглобин   | [59]   |
| Окисление спиртов                          | цитохром P-450 (ROOH, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )<br>каталаза (ROOH, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )   | [70]                                | пероксидаза, цитохром C, гемоглобин   | [70]   |

\* В скобках указаны примененные окислители.

вует в окислении спиртов [70] и в N-деалкилировании аминов [21]. Цитохром P-420 не проявляет активности ни в одной из реакций [32]. Важно отметить, что механизмы реакций с участием цитохрома P-450 и с участием других гемопротеинов, как правило, отличаются. Пока что ни в одной из реакций перекисного окисления с участием цитохрома P-450 прямым путем не обнаружено радикалов. В то же время реакции окислительного N-деалкилирования аминов в системе H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> — пероксидаза [73], в системах ГПК — каталаза и ГПК — гемоглобин [74] сопровождаются образованием радикалов. Ингибиторы радикальных процессов — 1-нафтол и др. — замедляют окисление анилина в системах гемоглобин — ГПК и цитохром C — ГПК [75, 76], что свидетельствует о наличии радикальных стадий в этих случаях.

При окислительном деметилировании аминопирина в системе H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> — пероксидаза радикалы обнаружены методом ЭПР и представляют собой, вероятно, катион-радикалы аминопирина [73]. Окисление аминопирина пероксидазой в сочетании с H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> является самым эффективным способом превращения этого соединения в сравнении с действием других систем.

Эффективность различных гемопротеинов в перекисном окислении диметиланилина сопоставлена в табл. 12 [74]. Наиболее эффективна в перекисном окислении диметиланилина каталаза. Ингибирующего действия 1-нафтола не обнаружено только в реакциях с участием цитохрома P-450 [74].

При 37° в фосфатном буфере (рН 7,4) анилин гидроксилируется в пара-аминофенол в системе гемоглобин — ГПК. Кинетические [75] и спектральные данные [78, 79] свидетельствуют о том, что в процессе гидроксилирования анилина наблюдается образование комплекса гемоглобина с анилином и гидроперекисью: разностные спектры системы



ТАБЛИЦА 12

Эффективность различных систем в деметилировании  
диметиланилина ( $0,003\text{ M}$ ) при  $37^\circ$  в расчете на концентрации  
гемопротеинов  $10^{-6}\text{ M}$  [74]

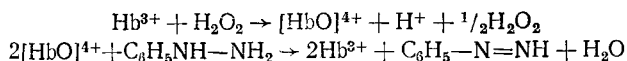
| Система   | $10^7 w_0^*$ , моль/л·с |
|---|-------------------------|
| Каталаза ( $5,0 \cdot 10^{-7}\text{ M}$ ) + ГПК ( $0,001\text{ M}$ )                          | 26,60                   |
| Гемоглобин ( $2,0 \cdot 10^{-6}\text{ M}$ ) + ГПК ( $0,003\text{ M}$ )                        | 2,60                    |
| Гемоглобин ( $2,0 \cdot 10^{-6}\text{ M}$ ) + $\text{H}_2\text{O}_2$ ( $0,006\text{ M}$ )     | 4,10                    |
| Цитохром Р-450 в микросомах ( $1,25 \cdot 10^{-6}\text{ M}$ ) +<br>+ ГПК ( $0,001\text{ M}$ ) | 8,20                    |

\* Начальная скорость реакции.

анилин — гемоглобин характеризуются максимумом поглощения при 425 нм и минимумом при 405 нм [78]. Идентичные дифференциальные спектры наблюдаются при взаимодействии гемоглобина с ГПК. Реакция внедрения активированного кислорода происходит в тройном комплексе анилин — гемоглобин — ГПК. В ходе процесса наблюдается побочная реакция деструкции гемоглобина гидроперекисью кумила [75].

Цитохром С при  $0^\circ\text{C}$  катализирует окисление анилина в *пара*-аминофенол в сочетании с ГПК. Анилин образует комплекс с цитохромом С, характеризующийся максимумом поглощения 420 нм и минимумом 401 нм при рН 5,8 в фосфатном буфере. Происходит образование комплексов ГПК с цитохромом С, что отражается в разностных спектрах поглощения, имеющих максимум при 433 нм и минимум при 413 нм [76]. 1-Нафтол тормозит реакцию окисления анилина гидроперекисью кумила с участием цитохрома С [76], но не останавливает ее полностью.

Способность гемоглобина в сочетании с  $\text{H}_2\text{O}_2$  проявлять пероксидазную активность показана в [77] на примере окисления в этой системе фенилгидразина. Предполагается, что гемоглобин в окисленном состоянии ( $\text{Hb}^{3+}$ ) образует комплекс с  $\text{H}_2\text{O}_2$ ; комплекс распадается и генерирует феррилгемоглобин, окисляющий фенилгидразин:



Недавно из семян гороха выделен гемопротейн, отличающийся от цитохрома Р-450 и окисляющий в присутствии гидроперекисей и  $\text{H}_2\text{O}_2$  по пероксидазному механизму ряд субстратов: индол в индоксил, фенол в гидрохинон,  $\alpha$ -нафтол в  $\alpha$ -нафтогидрохинон и анилин в фенилгидроксиламин [80]. Окисление индола в присутствии этого гемопротейна незначительно тормозится KCN и  $\text{NaN}_3$ , но очень сильно замедляется  $\alpha, \alpha'$ -дипиридиллом, анилином и N,N-диметил-*пара*-фенилендиамином. Новый катализатор назван « $\text{H}_2\text{O}_2$ -восстанавливающим гемопротейном» [80]. Продукты, образующиеся при окислении перечисленных выше субстратов с участием этого гемопротейна, сильно отличаются от продуктов микросомального окисления тех же субстратов, что подтверждает различие нового гемопротейна и цитохрома Р-450.

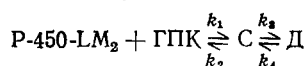
В заключении этого раздела следует еще раз подчеркнуть, что не все реакции, катализируемые цитохромом Р-450, ускоряются другими гемопротейнами. В каталитическом действии цитохрома Р-450 и других гемопротейнов самым существенным различием является отсутствие радикальных стадий в случае цитохрома Р-450 и их наличие в реакциях с участием других гемопротейнов. Перекиси образуют комплексы

не только с цитохромом Р-450, но и с другими гемопротейнами; однако образующиеся комплексы цитохрома Р-450 и других гемопротейнов превращаются по различным путям.

#### VIII. МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ ЦИТОХРОМА Р-450 В ПЕРЕКИСНОМ ОКИСЛЕНИИ ОРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ

Цитохром Р-450, гемоглобин и цитохром С при взаимодействии с гидроперекисями образуют комплексы [81—84]. Впервые комплексообразование цитохрома Р-450 в микросомальной суспензии с гидроперекисью кумила было доказано спектрофотометрически в [81]. При смешении ГПК с микросомами из печени кроликов, получавших фенобарбитал, при 5° С зарегистрированы разностные спектры поглощения с максимумами при 441 и 535 нм и минимумами на 422 и 579 нм. Аналогичные спектральные изменения наблюдаются при взаимодействии микросом с гидроперекисями *трет*-бутила и тетралина [82], а также при взаимодействии очищенного цитохрома Р-450 с ГПК [39].

Взаимодействие гидроперекисей и надкислот с высокоочищенной формой цитохрома Р-450-LM<sub>2</sub> из микросом печени кролика исследовано спектрофотометрически в сочетании с методом остановленного потока [83, 84]. Получены разностные спектры поглощения с максимумами при 370, 436 и 540 нм и минимумом при 421 нм. Взаимодействие ГПК с Р-450-LM<sub>2</sub> описывается следующей схемой:



где С — комплекс Михаэлиса между ГПК и Р-450, Д — спектрально регистрируемая частица, которая может быть оксиферрилпроизводным цитохрома Р-450. Взаимодействие ГПК и Р-450 происходит очень быстро:  $k_1 = 5000$  л/моль·с. Константы скорости обратной реакции равны  $k_2 = 50$  с<sup>-1</sup>,  $k_3 = 1,3$  с<sup>-1</sup> и  $k_4 = 0,009$  с<sup>-1</sup> [83]. Определенные для этой реакции кинетические параметры мало зависят от рН и от добавления фосфолипидов.

Сходные спектральные характеристики получены при изучении продуктов взаимодействия Р-450-LM<sub>2</sub> с надуксусной, метаклорнадбензойной, *пара*-нитронадбензойной кислотами и другими перекисями. Тот факт, что различные перекисные соединения дают с Р-450 комплексы с аналогичными спектральными характеристиками, предполагает сходную для разных окислителей природу активной частицы, возникающей

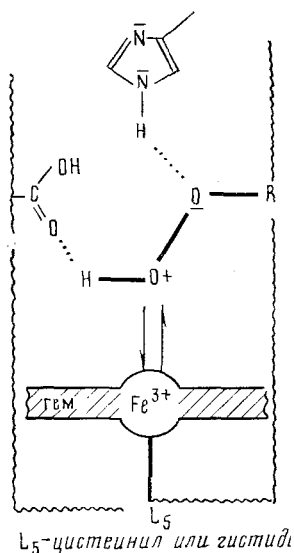
ТАБЛИЦА 13

Спектральные характеристики комплексов гемопротейнов с гидроперекисями

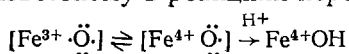
| Система, условия   | $\lambda_{\text{макс}}, \text{ нм}$ | $\lambda_{\text{мин}}, \text{ нм}$ | Ссылки   |
|--|-------------------------------------|------------------------------------|----------|
| ФБ-Микросомы кролика — ГПК; рН 7,4;                                | 441, 535                            | 422, 579                           | [81]     |
| Микросомы печени крысы — ГПТБ; рН 7,5; 20°                         | 380—440                             | 418                                | [82]     |
| Микросомы печени крысы — гидроперекись тетралина; рН 7,5; 20°      | 380—440                             | 420                                | [82]     |
| Цитохром Р-450 из микросом печени крысы — ГПК; рН 7,4; 20°         | 380, 440                            | 418                                | [39]     |
| Цитохром Р-450-LM <sub>2</sub> из ФБ-микросом печени кролика — ГПК | 370, 436, 540                       | 421                                | [83, 84] |
| Гемоглобин — ГПК; рН 8,0; 20°                                      | 423                                 | 405                                | *        |
| Цитохром С — ГПК; рН 5,8; 20°                                      | 433                                 | 413                                | [76]     |

\* Данные получены Е. И. Тищенко в нашей лаборатории.

при комплексообразовании. Спектральные параметры комплексов гемопротеинов с гидроперекисями представлены в табл. 13. Комплексообразование гидроперекисей, по мнению автора, происходит так, как изображено на схеме 4. Комплекс образует недиссоциированная форма гидроперекиси, один атом кислорода которой (из НО-группы) связывается с гемовым железом, а другой атом образует водородную связь с гистидином; алкильный остаток перекиси взаимодействует с апоферментом за счет гидрофобного связывания. При комплексообразовании гемоглобина в стабилизации комплекса участвует, вероятно, дистальный гистидин. Известно, что комплексы гемоглобина с молекулярным кислородом стабилизированы дистальным гистидином [85, 86]. Спектральные характеристики (табл. 13) относятся, вероятно, к продукту превращения изображенного на схеме 4 комплекса в оксиферрилпроиз-

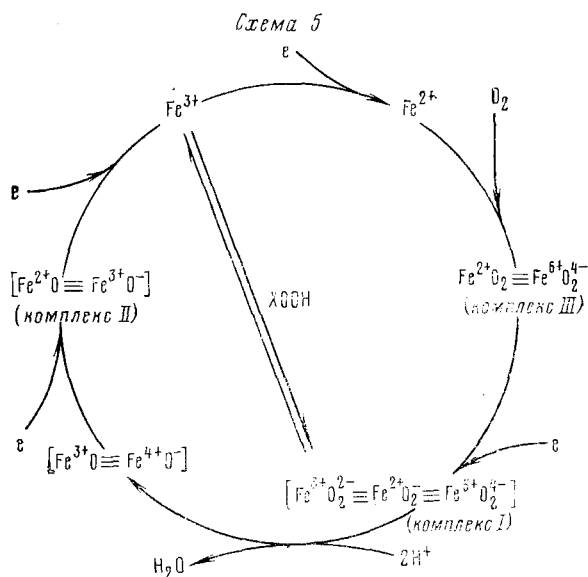


водное, образующееся в результате разрыва связи —O—O— и аналогичное комплексу I, известному в реакциях пероксидаз:



При взаимодействии ГПК с цитохромом Р-450 методом ЭПР зарегистрирован сигнал с  $g$ -фактором  $\sim 2,0$  [81], аналогичный сигналу ЭПР, возникающему при взаимодействии  $\text{H}_2\text{O}_2$  с метмиоглобином или с цитохром-С-пероксидазой [87, 88]. Предполагается, что этот сигнал ЭПР связан с высшими валентными состояниями гемового железа, например, феррил-4<sup>+</sup>-состоянием. При добавлении ГПК или  $\text{H}_2\text{O}_2$  к метмиоглобину наблюдается спектр ЭПР, который сходен с регистрируемым в системе микросомы — ГПК [81]. Ямазак [89] предложил общую схему, которая описывает окислительно-восстановительные превращения гемопротеинов и отличается пятью валентными состояниями гемового железа. Эта схема описывает результаты, полученные при изучении пероксидазы и каталазы и согласуется с результатами изучения взаимодействия перекисей с метмиоглобином [90, 92].

На схеме 5 показано последовательное образование различных кислородсодержащих частиц при функционировании цитохрома Р-450 и проведена аналогия с частицами, образующимися при функционирова-

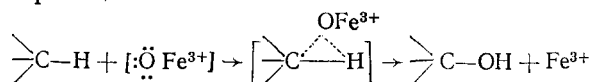


нии пероксидаз. Тройной комплекс восстановленного цитохрома Р-450 с субстратом и кислородом эквивалентен комплексу III пероксидаз, как предположил Уллрих [93]. Валентное состояние железа в этом комплексе зависит от распределения электронов между кислородом и ионом железа. Одноэлектронное восстановление этого комплекса приводит к образованию комплекса I или перферрил-иона [89]. Образовавшийся комплекс I может быть восстановлен одним электроном до комплекса II или одновременно двумя электронами до исходного состояния ( $\text{Fe}^{3+}$  — Р-450).

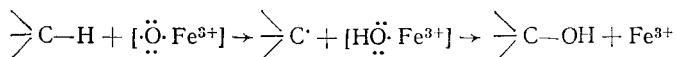
Таким образом, активной частицей, образующейся при взаимодействии окисленного цитохрома Р-450 с перекисями или при последовательном восстановлении двумя электронами тройного комплекса субстрат — цитохром Р-450 —  $\text{O}_2$ , может быть один и тот же комплекс I, который характеризуется высокой степенью окисления иона железа. Комплекс I может реагировать, получая последовательно по одному электрону от субстрата и превращаясь в исходную форму  $\text{Fe}^{3+}$  — Р-450. Этот пероксидазный путь реакции характеризуется промежуточным образованием комплекса II. В других случаях комплекс I может сразу получить два электрона от субстрата и превратиться в исходную форму  $\text{Fe}^{3+}$  — Р-450. Такой путь реализуется в реакциях гидроксилирования, механизм которых считается оксеноидным [93]. Соотношение между пероксидазным и оксеноидным превращением комплекса I определяется в первую очередь природой гемопroteина. Гемоглобин и цитохром С в реакциях с участием гидроперекисей реагируют по пероксидазному пути с промежуточным образованием радикалов, что подтверждается замедляющим действием на эти реакции ингибиторов радикальных процессов. Оксеноидный или гидроксилазный механизм характеризуется отсутствием радикальных стадий, что подтверждается действием тех же ингибиторов в гидроксилазных реакциях [74].

Комплекс I, существующий в различных формах ( $\text{Fe}^{2+}\text{O}_2^-$ ,  $\text{Fe}^{3+}\text{O}_2^{2-}$ ,  $\text{Fe}^{3+}\text{O}$ ,  $\text{Fe}^{4+}\text{O}^-$ ), содержит кислород в триплетном или синглетном состояниях. Синглетный оксеноид внедряет атом кислорода в субстрат по трехцентровому синхронному механизму с образованием синглет-

ного продукта реакции:

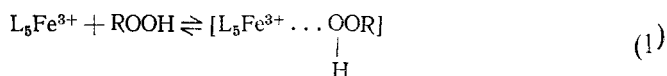


Если оксенонд является триплетным, то прямое внедрение кислорода в субстрат невозможно, так как такая реакция была бы спин-запрещенной. В этом случае окисление происходит по механизму «отрыв атома водорода — рекомбинация» или по скрыто-радикальному механизму, который может быть не чувствительным к действию ингибиторов радикальных процессов:



Различные состояния кислорода в комплексе I могут определяться природой пятого лиганда гемового железа в гемопротейнах. Наличие гистидина в пятом положении у гемоглобина и цитохрома С, вероятно, в существенной степени определяет пероксидазный путь реакции с участием этих гемопротейнов и гидроперекисей. Цистенил в пятом положении у цитохрома Р-450 обуславливает отличия спектров комплекса этого гемопротейна с гидроперекисями от спектров комплексов других гемопротейнов (см. табл. 13) и гидроксилазный путь реакции.

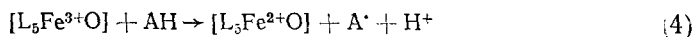
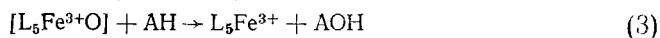
Рассмотрим теперь возможные пути превращения комплексов гемопротейнов с гидроперекисями. В результате взаимодействия гемопротейнов с гидроперекисями образуется комплекс Михаэлиса С, в котором координация гидроперекиси центральным ионом железа происходит за счет атома кислорода гидроксильной группы (см. схему 4). Доказательства участия в координации групп НО гидроперекиси кумила с хелатами кобальта и никеля получены методом ЯМР по химическим сдвигам протонов НО-группы в гидроперекиси [94]. Комплекс Михаэлиса С распадается по реакции (2) с образованием оксенондного комплекса или оксиферрилпроизводного, аналогичного комплексу I. Комплекс I может реагировать по гидроксилазному механизму (реакция (3)). Комплекс I может последовательно получить от подходящего субстрата два электрона: восстановление первым электроном приводит к образованию комплекса II по реакции (4). Комплекс Михаэлиса С может распадаться в отсутствие субстрата с образованием перекисного радикала  $\text{RO}_2\cdot$  (реакция (5)). В этой реакции гидроперекись выступает как восстановитель<sup>2</sup>.



(комплекс С)

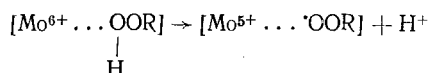


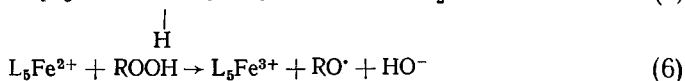
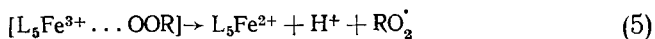
(комплекс I)



(комплекс II)

<sup>2</sup> Следует отметить, что пероксид-радикал  $\text{RO}_2\cdot$  может быть комплексно-связанным, как это показано в [23] для случая распада комплексов гидроперекисей с  $\text{Mo(VI)}$ :





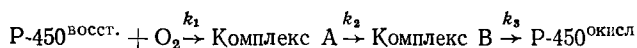
где АН — субстрат,  $L_5$  — аксиальный лиганд в пятом положении.

Восстановленная форма гемопротейна окисляется другой молекулой гидроперекиси с образованием радикала  $RO^{\cdot}$  (реакция (6)). Реакции (5) и (6) хорошо известны при взаимодействии ГПК с ионами металлов и комплексами металлов, как реакции Габера — Вайса [95]. Соотношение скоростей реакций (3) — (6) определяется природой гемопротейна, и, в частности, характером аксиального лиганда, в пятом положении, наличием или отсутствием субстратов, природой окисляемого субстрата и другими факторами. Комплекс I, образующийся при взаимодействии цитохрома С или гемоглобина с гидроперекисью кумила, реагирует в основном по пероксидазному пути (реакция (4)), в то время как комплекс I цитохрома Р-450 реагирует в основном по гидроксилазному пути (реакция (3)). Следует отметить, что гидроксилирующим агентом может быть комплекс Михаэлиса С, который способен при взаимодействии с субстратом окислить его в одну стадию. Изучение модельных систем показывает, что возможны два механизма гидроксилирования — последовательное двухстадийное гидроксилирование (реакции (2) и (3)) или одностадийный перенос активного кислорода в субстрат [96, 97] с помощью комплексов, аналогичных комплексу Михаэлиса С.

В присутствии субстратов или ингибиторов радикальных процессов реакции (5) и (6), инициирующие деструкцию гемопротейнов, проходят с меньшими скоростями. В отсутствие субстратов или ингибиторов радикалы  $RO^{\cdot}$  и  $RO_2^{\cdot}$  атакуют гем и апофермент и необратимо разрушают их.

Впервые оксигенированную форму восстановленного цитохрома Р-450 из микросом печени спектрофотометрически наблюдал в 1971 г. Эстабрук с сотр. [17]. Гансалус [98] и Ишимура [99] спектрально доказали образование комплекса молекулярного кислорода с восстановленным цитохромом Р-450<sub>кам</sub>, гидроксилирующим камфору. В работах [100, 101] комплексы камфора — цитохром Р-450<sub>кам</sub>— $O_2$  и восстановленный цитохром Р-450<sub>кам</sub>— $O_2$  выделены хроматографически при температурах ниже 0° в смешанных водно-органических растворителях и охарактеризованы спектрально и кинетически. Тройной комплекс камфора — цитохром Р-450<sub>кам</sub>— $O_2$  автоокисляется; энергия активации этого процесса составляет 18 ккал/моль в воде и 19 ккал/моль в водно-органической среде [100].

Спектрофотометрически с использованием метода остановленного потока изучено комплексообразование высокоочищенного цитохрома Р-450 из микросом печени с молекулярным кислородом [102]. Эта реакция в присутствии бензфетамин характеризуется двумя фазами: сначала образуется комплекс А — оксигенированный комплекс цитохрома Р-450, имеющий в разностном спектре максимумы при 430 и 450 нм. Короткоживущий комплекс А превращается затем в комплекс В с максимумом при 440 нм. Комплексообразование  $O_2$  с восстановленным цитохромом Р-450 описывается следующей схемой:



Комплекс В имеет спектральные характеристики, близкие к таковым для комплекса I и, вероятно, аналогичен ему. Компоненты реакции характеризуются следующими полосами Соре: Р-450<sup>восст</sup> — 424 нм,

Р-450<sub>окисл</sub> — 418 нм, комплекс А — 423 нм и комплекс В — 421 нм [102]. Лимитирующей стадией процесса является окисление цитохрома Р-450 в тройном комплексе, сопровождающееся гидроксилированием субстрата. Добавление в систему цитохрома  $b_5$  увеличивает константы скорости  $k_3$ , т. е. цитохром  $b_5$  играет роль эффектора в реакции.

Таким образом, в полной микросомальной системе в результате ряда стадий образуется оксигенированный комплекс цитохрома Р-450, близкий по своим свойствам к комплексу I (см. схемы 2, 3 и 5). Этот комплекс может переносить атом кислорода в субстрат с одновременным освобождением молекулы воды или сначала отщеплять молекулу воды и превращаться в феррилпроизводное  $[\text{Fe}^{3+}\text{O} \leftrightarrow \text{Fe}^{4+}\text{O}^-]$ , которое переносит атом кислорода в субстрат.

Представляет большой интерес выяснение природы лимитирующей стадии при окислении субстратов в полной микросомальной системе. Этот сложный процесс состоит по крайней мере из пяти стадий (см. схемы 1 и 5). Кинетический анализ каждой из пяти стадий сделан в обзоре [18], где обобщен материал, полученный в нескольких лабораториях. Прямое измерение констант скоростей взаимодействия субстратов с цитохромом Р-450, скорости восстановления фермент-субстратного комплекса первым электроном и скоростей образования тройного комплекса восстановленного цитохрома Р-450 с субстратом и кислородом показывает, что все три стадии характеризуются высокими константами скорости и не могут быть лимитирующими в процессе окисления в полной системе [18].

Лимитировать скорость всего процесса может или восстановление тройного комплекса вторым электроном, или акт внедрения активизированного кислорода в субстрат, который сопровождается разрывом атакуемой связи и последующим быстрым освобождением продукта реакции. До сих пор процесс превращения тройного комплекса, включающий его восстановление вторым электроном и последующий распад с образованием продукта реакции, не разрешен на отдельные стадии. Однако имеются экспериментальные факты, свидетельствующие о том, что в лимитирующей стадии реакции происходит разрыв атакуемой С—Н-связи субстратов. В ряде работ измерены первичные изотопные эффекты при окислении субстратов в полной микросомальной системе [103—117]; полученные данные суммированы в табл. 14. Как правило, наблюдаются высокие значения первичных изотопных эффектов, за исключением окисления дейтерированного циклогексана, для которого изотопного эффекта не обнаружено [105]. Особый интерес представляют те работы, в которых проведено внутримолекулярное определение изотопных эффектов с такими субстратами, которые являются симметричными и содержат одновременно недейтерированные и дейтерированные С—Н-связи, атакуемые при окислении, как например, 1,3-дифенилпропан-1,1- $\text{D}_2$  [114]. В этом случае величина изотопного эффекта равна 11. Такая же величина получена при гидроксилировании норборнана в реконструированной ферментной системе микросом печени кролика [117]. Полученные значения изотопных эффектов не оставляют сомнения в том, что в лимитирующей стадии окисления происходит разрыв атакуемой С—Н-связи; это свидетельствует в пользу механизма «отрыв — рекомбинация».

Другим доказательством определяющей роли прочности разрываемой при окислении связи является существование так называемых соединений-разобщителей — полностью фторированных углеводов, которые взаимодействуют с цитохромом Р-450, но не окисляются, так как прочная С—F-связь не может быть разорвана окисляющей частицей [118—121].

ТАБЛИЦА 14

Величины первичных изотопных эффектов при микросомальном окислении различных субстратов

| Субстрат   | Изотопный эффект | Ссылки |
|--|------------------|--------|
| CD <sub>3</sub> -Морфин                                  | 1,4              | [103]  |
| $\alpha$ -D <sub>2</sub> -Этилбензол                     | 1,8              | [104]  |
| D <sub>12</sub> -Циклогексан                             | 1,0              | [105]  |
| 11-D <sub>2</sub> -Лауриновая кислота                    | 3,0              | [106]  |
| 9-D <sub>2</sub> -Капроновая кислота                     | 3,0              | [106]  |
| Насыщенные соединения                                    | 1,4              | [107]  |
| 16 $\alpha$ -D-Прегненолон                               | 3,0              | [108]  |
| 7 $\alpha$ - <sup>3</sup> H-Тауродезоксихолеваая кислота | 3,8              | [109]  |
| $\alpha$ -D <sub>2</sub> -Изопропиламфетамин             | 1,6              | [110]  |
| CD <sub>3</sub> - <i>орто</i> -Нитроанизол               | 2,0              | [111]  |
| CD <sub>3</sub> -Метоксанизол                            | 10,0             | [112]  |
| Ароматические соединения бензольного ряда                | 1,3—1,75         | [113]  |
| 1,3-Дифенилпропан-1,1-D <sub>2</sub>                     | 11,0             | [114]  |
| Дифенил  | 1,4              | [115]  |
| N, N'-Диметил фентермин                                  | 1,4              | [116]  |
| Норборнан  | 11,5             | [117]  |

Сопоставление энергетических характеристик окисления одних и тех же субстратов в полной микросомальной системе и в системах, содержащих только цитохром Р-450 и гидроперекиси, показывает, что в обоих случаях энергии активации окисления для одного и того же субстрата близки или совпадают по величине (см. табл. 3 и работы [29, 30]). Это сопоставление, проведенное в строго идентичных условиях с обеими системами, — полной и шунтированной — свидетельствует в пользу существования одинаковой лимитирующей стадии процесса в обоих случаях. В гидроперекисной системе нет необходимости в транспорте второго электрона к фермент-субстрат-гидроперекисному комплексу, так как кислород в нем уже активирован двумя электронами, т. е. процесс восстановления тройного комплекса в этом случае отсутствует и лимитировать скорость реакции может лишь внедрение атома кислорода с разрывом связи окисляемого субстрата. Следовательно, можно предполагать в гидроперекисной системе и в полной микросомальной системе одинаковую лимитирующую стадию процесса — внедрение активного кислорода в субстрат с последующим быстрым распадом комплекса и освобождением продукта реакции.

В работах [58—62] получены данные о том, что использование окислителей — NaIO<sub>4</sub>, NaClO<sub>2</sub> и иодозобензолов — в сочетании с цитохромом Р-450 позволяет увеличить скорости превращения субстратов по сравнению с достигаемыми в полной системе. Это привело авторов к утверждению о различии лимитирующих стадий в обеих системах [58—62]. Здесь следует отметить, что разница в скоростях окисления может объясняться не отличием лимитирующей стадии в обоих случаях, а разной концентрацией активных окисляющих частиц, что связано с различным сродством молекулярного кислорода и примененных окислителей к цитохрому Р-450.

Естественно, что наиболее убедительным доказательством природы лимитирующей стадии окисления в полной микросомальной системе может быть прямое измерение скоростей всех стадий процесса с использованием методов быстрой кинетики. Такая работа проведена для про-



цесса деметилирования бензфетамина в реконструированной микросомальной системе [122]. Лимитирующая стадия окисления бензфетамина может быть связана с процессом восстановления тройного комплекса вторым электроном или с любым процессом превращения тройного комплекса после его восстановления, так как все предыдущие стадии происходят много быстрее, чем накопление продукта реакции [122, 123].

Следует отметить, что в микросомальной мембране в определенных условиях процесс восстановления цитохрома Р-450 первым электроном может стать лимитирующей стадией окисления. Ниже 18—20°С в микросомах затрудняется взаимодействие цитохрома Р-450 с его редуказой — флавопротеином I. Это связано с изменением фазового состояния фосфолипидов микросомальных мембран от жидко-кристаллического выше 18—20° до кристаллического ниже этих температур. Фазовый переход фосфолипидов мембран отражается на энергии активации окисления субстратов в полной системе: в точках 18—20° на зависимости Аррениуса для максимальных скоростей окисления или для каталитических констант наблюдается излом [35, 42, 124]. Энергия активации окисления субстратов первого типа при температурах выше 18—20°С составляет 8—12 ккал/моль и относится, вероятно, к превращению тройного комплекса; энергия активации при температурах ниже 18—20°С составляет 18—24 ккал/моль и относится к другой лимитирующей стадии, которой может быть восстановление цитохрома Р-450 его редуказой в условиях их затрудненного контакта. Такой контакт облегчается при изменении состояния мембраны выше 18—20° за счет возможности латеральной подвижности ее компонентов.

#### IX. ПЕРСПЕКТИВЫ ПРАКТИЧЕСКОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

Важные функции гидроксилирующих ферментных систем заставляют искать пути их практического использования. В настоящее время сделаны лишь первые попытки практического применения монооксигеназ, содержащих цитохром Р-450. Область возможного использования цитохрома Р-450 и его аналогов весьма обширна. Цитохром Р-450-содержащие ферментные системы микроорганизмов и дрожжей могут окислять практически все углеводороды в спирты: американская фирма «Мобил Ойл» в 1967 г. взяла патент на окисление углеводородов нефти всех классов монооксигеназами, содержащимися в бактериях разных штаммов [125].

На основе иммобилизованного цитохрома Р-450 могут быть созданы «метаболические реакторы» для исследования оптимизации применяемых лекарств, а также для экстракорпоральной детоксикации крови путем окисления содержащихся в ней примесей [126—128]. Возможно применение цитохрома и его аналогов в иммобилизованном состоянии для селективного окисления физиологически активных соединений, в первую очередь стероидов и некоторых аминов [129]. Уже сейчас можно привести пример успешного применения монооксигеназ в традиционной сфере использования активности микробных клеток — стероидной химии; так Мосбах [130, 131] осуществил превращение вещества «S» Рейхштейна в преднизолон с помощью двухстадийной системы. На первой стадии вещество «S» гидроксилируется в положении 11β с образованием кортизола мицеллем грибной культуры *Curvulatia lunata*, иммобилизованным в полиакриламидном геле, а кортизол превращается в преднизолон на втором этапе в колонне, заполненной иммобилизованной стероидной  $\Delta^{1-2}$ -дегидрогеназой из *Corynebacterium simplex*.

Ученые ГДР создали ферментный электрод на основе цитохрома Р-450 [126, 132]. С его помощью можно обнаруживать малые концентрации многих субстратов цитохрома Р-450, контролируя потребление перекиси водорода в реакции с помощью сенсорного электрода.

Практическое использование гидроксилирующих ферментных систем связано с решением нескольких сложных задач, так как эти системы представляют собой мультиферментные комплексы и требуют применения кофакторов. Цитохром Р-450 и другие компоненты системы нестабильны и дорогостоящи. Поэтому на пути практического использования цитохром Р-450-содержащих монооксигеназ необходимо решить следующие задачи:

1) упрощение сложного мультиферментного комплекса путем уменьшения числа его компонентов и замены трудновывделяемых биомолекул более простыми и доступными аналогами;

2) стабилизация цитохрома Р-450 путем иммобилизации микросом или изолированных компонентов гидроксилирующего комплекса [133—139];

3) практическое использование более простых аналогов цитохрома Р-450, сохраняющих его функцию;

4) иммобилизация клеток микроорганизмов, содержащих гидроксилирующие комплексы [130, 140, 141].

Один из путей решения первой задачи предложен нами [29]: замена сложной электронтранспортной цепи микросом органическими гидроперекисями, которые в сочетании с одним компонентом системы — окисленным цитохромом Р-450 — осуществляют все реакции, характерные для полной системы. Такое упрощение гидроксилирующего комплекса сильно удешевляет каталитическую систему и позволяет свести сложную задачу иммобилизации всего мультиферментного комплекса к иммобилизации одного его компонента — цитохрома Р-450.

Для достижения дальнейших успехов в использовании гидроперекисных систем необходима удачная иммобилизация цитохрома Р-450 и его стабилизация по отношению ко второму компоненту — органическим гидроперекисям. В ряде лабораторий предпринимались попытки иммобилизовать цитохром Р-450 из микросом печени и из других природных источников [127, 129, 133—139]. Во всех случаях цитохром Р-450 частично сохранял свою активность, однако через несколько часов или дней активность иммобилизованного гемопротейна существенно снижалась. Поэтому задача повышения стабильности иммобилизованного цитохрома Р-450 и упрощения процесса его иммобилизации остается весьма актуальной. Известно, что стабильность некоторых ферментов может быть существенно повышена при их иммобилизации не непосредственно на какой-то матрице, а путем связывания с инертным белком, который в свою очередь иммобилизуется на носителе. Таким инертным белком может быть, в частности, сывороточный альбумин. Березин и сотр. [142, 143] показали, что иммобилизация пероксидазы на ВгСN-сефарозе, предварительно модифицированной альбумином, или иммобилизация олигомеров, полученных взаимодействием пероксидазы с альбумином в присутствии глутарового альдегида, приводят к существенной стабилизации пероксидазы. Нами [136] иммобилизован высокоочищенный цитохром Р-450 из микросом печени кролика на модифицированном альбумином биогеле Р-300 и исследована активность иммобилизованного таким образом цитохрома Р-450 в реакции гидроксилирования анилина гидроперекисью кумила. Такой способ иммобилизации существенно повышает термостабильность цитохрома Р-450 и обеспечивает окисление анилина в *пара*-аминофенол с кинетическими характери-

ками, близкими к характеристикам той же реакции с участием неиммобилизованного цитохрома Р-450. После иммобилизации цитохрома Р-450 сорбцией на полиамиде или нейлоне-6 получены образцы «сухого» катализатора, сохраняющие высокую активность в течение 19 дней [138].

Детальное изучение деструкции цитохрома Р-450 гидрперекисями позволяет предложить в качестве пути ее предотвращения [45, 144] введение в систему ингибиторов радикальных реакций. Сложной проблемой является необходимость повышения термической стойкости цитохрома Р-450. Систематическое исследование термоинактивации цитохрома Р-450 из печени кроликов показало, что стойкость гемопротеина существенно повышается при добавлении в раствор 20% глицерина, а также при некоторых способах иммобилизации цитохрома Р-450 [145]. По мнению автора данного обзора, дальнейшие успехи в применении цитохрома Р-450 будут достигнуты при использовании некоторых новых приемов стабилизации ферментов, разрабатываемых Березиным и Мартинексом [146, 147]: проведение реакций в двухфазных системах «вода — несмешивающийся с водой органический растворитель», включение фермента в обращенные мицеллы поверхностно-активных веществ в органических растворителях и т. д.

Исследования по практическому использованию уникальных свойств цитохрома Р-450 только начинаются. Однако уже сейчас на этом пути достигнуты некоторые, пока немногочисленные успехи. Можно не сомневаться, что на основе цитохрома Р-450 и его аналогов будут созданы ферментные реакторы и процессы селективного окисления.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Garfinkel D. Arch. Biochem. Biophys., 1958, v. 71, p. 493.
2. Klingenberg M. Ibid., 1958, v. 75, p. 376.
3. Mason H. S., Fowlks W. L., Peterson E. J. Am. Chem. Soc., 1955, v. 77, p. 2914.
4. Hayashi O., Katagiri M., Rothberg S. Ibid., 1955, v. 77, p. 5450.
5. Omura T., Sato R. J. Biol. Chem., 1964, v. 239, p. 2370.
6. Omura T., Sato R. Ibid., 1964, v. 239, p. 2379.
7. Biological Hydroxylation Mechanisms. Ed. Boyd G. S., Smellie R. M. S. New York — London: Acad. Press, 1972, 240 p.
8. Molecular Mechanism of Oxygen Activation. Ed. Hayaishi O. New York — London: Acad. Press, 1974, 613 p.
9. Advances in Experimental Medical Biology, v. 58, Cytochromes P-450 and  $b_5$ . Structure, Function and Interaction. Ed. D. Y. Cooper, O. Rosenthal, R. Snyder, C. Witter. New York — London: Plenum Press, 1975, p. 537.
10. Ахрем А. А., Метелица Д. И., Скурко М. Е. Успехи химии, 1975, т. 44, с. 868.
11. Арчаков А. И. Микросомальное окисление. М.: Наука, 1975, 327 с.
12. The Structural Basis of Membrane Function. Eds. Hatefi Y., Djavadi-Ohanience L. New York — San-Francisco — London: Acad. Press, 1976, p. 409.
13. Iron and Copper Proteins. Ed. Yasunobu K. T., Mower H. F. Hayashi O. New York — London: Plenum Press, 1976, p. 588.
14. Cytochrome P-450 — Structural Aspects. Ed. Coon M. J., Gunsalus I. C., Maricic S.: Croat. Chem. Acta, 1977, v. 49, p. 163—388.
15. Ляхович В. В., Цырлов И. Б. Структурные аспекты биохимии монооксигеназ. Новосибирск: Наука, 1978, 236 с.
16. Ruckpaul K., Janig G.-R., Pfeil D., Honeck H., Smettan G., Rein H., Ristau O., Chr. Jung. Pharmazie, 1978, B. 33, H. 6, S. 308.
17. Estabrook R. W., Hildebrandt A., Boron J., Netter K., Leibman K. Biochem. Biophys. Res. Commun., 1971, v. 42, p. 132.
18. Blank J., Smettan G. Pharmazie, 1978, B. 33, H. 6, S. 321.
19. Rein H., Ristau O. Ibid., 1978, B. 33, H. 6, S. 325.
20. Guengerich F. P., Ballou D. P., Coon M. J. Biochem. Biophys. Res. Commun., 1976, v. 70, p. 951.
21. Kadlubar F. F., Morton K. C., Ziegler D. M. Ibid., 1973, v. 54, p. 1255.
22. Метелица Д. И. Успехи химии, 1972, т. 41, с. 1737.
23. Скибида И. П. Там же, 1975, т. 44, с. 1729.
24. Landau R. Hydrocarbon Proc., 1967, v. 46, p. 141.

25. Yamazaki Y., Yokota K. *Mol. Cell Biochem.*, 1973, v. 2, p. 39.
26. Саундерс Б. К. Неорганическая биохимия, т. 2. М.: Мир, 1978, с. 397.
27. Ахрем А. А., Бельский С. М., Метелица Д. И. Изв. АН БССР, сер. хим., 1976, № 6, с. 73.
28. Scheller F., Renneberg R., Mohr P., Janig G.-R., Ruckpaul K. *FEBS Letters*, 1976, v. 71, p. 309.
29. Akhrem A. A., Metelitz D. I., Belski S. M., Kiselev P. A., Skurko M. E., Usanov S. A. *Croat. Chem. Acta*, 1977, v. 49, p. 223.
30. Ахрем А. А., Бельский С. М., Метелица Д. И. Биохимия, 1978, т. 43, с. 216.
31. Nordbloom G. D., White R. E., Coon M. J. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1976, v. 175, p. 524.
32. Rahimtula A. D., O'Brien P. J. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1975, v. 62, p. 268.
33. Lichtenberger F., Nastanczyk W., Ullrich V. *Ibid.*, 1976, v. 70, p. 939.
34. Ахрем А. А., Абелиович М. Л., Метелица Д. И. Биохимия, 1977, т. 42, с. 1978.
35. Duppel W., Ullrich V. *Biochim. Biophys. Acta*, 1976, v. 426, p. 399.
36. Rahimtula A. D., O'Brien P. J. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1974, v. 60, p. 440.
37. Ахрем А. А., Абелиович М. Л., Дворников С. С., Усанов С. А., Метелица Д. И. Биоорганич. химия, 1976, т. 2, с. 549.
38. Akhrem A. A., Usanov S. A., Dvornikov S. S., Metelitz D. I. *React. Kinet. Catal. Letters*, 1977, v. 6, p. 187.
39. Akhrem A. A., Bokut S. B., Metelitz D. I. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1977, v. 77, p. 20.
40. Akhrem A. A., Bokut S. B., Metelitz D. I. *Chem.-Biol. Interactions*, 1977, v. 18, p. 195.
41. Ахрем А. А., Бокуть С. Б., Метелица Д. И. Биохимия, 1977, т. 42, с. 2110.
42. Ахрем А. А., Еремин А. Н., Усанов С. А., Метелица Д. И. Там же, 1978, т. 43, с. 1578.
43. Metelitz D. I., Akhrem A. A., Bokut S. B., Erjomin A. N., Usanov S. A. *Abstracts XIII FEBS Meeting, Dresden*, 1978, p. 3044.
44. Metelitz D. I., Akhrem A. A., Erjomin A. N., Kisel M. A., Usanov S. A. *Abstracts, Sci. Conf. «Cytochrome P-450. Structural and Functional Aspects», Eberswalde (GDR)*, 1978, p. 34.
45. Metelitz D. I., Akhrem A. A., Erjomin A. N., Kisel M. A., Usanov S. A. *Acta biol. med. Germ.*, 1979, B. 38, S. 511.
46. Ахрем А. А., Кисель М. А., Усанов С. А., Метелица Д. И. Докл. АН БССР, 1979, т. 23, с. 282.
47. Coon M. J., Chiang Y. L., Vatsis K. P., White R. E. *Abstracts XII FEBS Meeting, Dresden*, 1978, p. 2552.
48. Ахрем А. А., Киселев П. А., Кисель М. А., Усанов С. А., Метелица Д. И. Докл. АН СССР, 1979, т. 245, с. 234.
49. Wade F. *Biochim. Biophys. Acta*, 1968, v. 162, p. 518.
50. Ellin A., Jacobson S. V., Schenkman J. B., Orrenius S. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1972, v. 150, p. 64.
51. Bjorkhem J., Daniellson H. *Europ. J. Biochem.*, 1970, v. 17, p. 450.
52. Hamberg M., Bjorkhem J. *J. Biol. Chem.*, 1971, v. 246, p. 7411.
53. Bjorkhem J., Hamberg M. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1972, v. 47, p. 333.
54. Moldeus P., Ellin A., Thor H., Orrenius S. In: *Regulation of Hepatic Metabolism*. Ed. Lundquist F., Tygstrup N. Copenhagen: Munksgaard, 1974, p. 659.
55. Ellin A., Orrenius S., Pilotti A., Swahn C.-G. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1973, v. 158, p. 597.
56. Orrenius S., Ellin A., Jacobson S. V., Thor H., Cinti D., Schenkman J. B., Estabrook R. W. *Drug Metab. Disp.*, 1973, v. 1, p. 350.
57. Ellin A., Orrenius S. *FEBS Letters*, 1975, v. 50, p. 378.
58. Gustafsson J.-A., Bergman J. *Ibid.*, 1976, v. 70, p. 276.
59. Hrycay E. G., Gustafsson J.-A., Ingelman-Sundberg M., Ernster L. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1975, v. 66, p. 209.
60. Hrycay E. G., Gustafsson J.-A., Ingelman-Sundberg M., Ernster L. *FEBS Letters*, 1975, v. 56, p. 161.
61. Hrycay E. G., Gustafsson J.-A., Ingelman-Sundberg M., Ernster L. *Europ. J. Biochem.*, 1976, v. 61, p. 43.
62. Gustafsson J.-A., Hrycay E. G., Ernster L. *Arch. Biochem. Biophys.* 1976, v. 174, p. 440.
63. Ingelman-Sundberg M. *Biochim. Biophys. Acta*, 1977, v. 488, p. 225.
64. Gustafsson J.-A., Rondahl L., Bergman J. *Abstracts XII FEBS Meeting, Dresden*, 1978, p. 3045.
65. Daniellson H., Wikvall K. *FEBS Letters*, 1976, v. 66, p. 299.
66. Akhrem A. A., Skurko M. E., Metelitz D. I. *React. Kinet. Catal. Letters*, 1976, v. 4, p. 25.

67. Hrysay E. G., O'Brine P. O. Arch. Biochem. Biophys., 1972, v. 153, p. 480.
68. Bidlack W. R., Hochstein P. Life Science, 1974, v. 14, p. 2003.
69. Диксон М., Уэбб Э. Ферменты. М.: ИЛ, 1961, с. 350.
70. Rahimtula A. D., O'Brien P. J. Europ. J. Biochem., 1977, v. 77, p. 201.
71. Jeffery E., Kotake A., el Azhary R., Mannering G. J. Mol. Pharmacol., 1977, v. 13, p. 415.
72. Sies H., Grosskopf M. Europ. J. Biochem., 1975, v. 57, p. 513.
73. Griffin B. W. FEBS Letters, 1977, v. 74, p. 139.
74. Ахрем А. А., Бельский С. М., Метелица Д. И. Изв. АН БССР, сер. хим., 1978, № 1, с. 87.
75. Akhrem A. A., German S. Yu., Metelitz D. I. React. Kinet. Catal. Letters, 1978, v. 8, p. 217.
76. Метелица Д. И., Киселев П. А., Киселева С. Н. Кинетика и катализ, 1980, т. 21, с. 1436.
77. Goldberg B., Stern A., Peisach J. J. Biol. Chem., 1976, v. 251, p. 3045.
78. Mieyal J., Freeman L. S. Biochem. Biophys. Res. Commun., 1976, v. 69, p. 143.
79. Mieyal J., Blumer J. L. J. Biol. Chem., 1976, v. 251, p. 3442.
80. Ishimaru A., Yamazaki I. Ibid., 1977, v. 252, p. 6118.
81. Rahimtula A. D., O'Brien P. J., Hrysay E. G., Peterson J. A., Estabrook R. W. Biochem. Biophys. Res. Commun., 1974, v. 60, p. 695.
82. Ахрем А. А., Дворников С. С., Усанов С. А., Метелица Д. И. Изв. АН БССР, сер. хим., 1976, № 5, с. 93.
83. Coon M. J., Blake R. C., Oprian D. D., Ballou D. P. Abstracts Sci. Conf. «Cytochrome P-450. Structural and Functional Aspects», Eberswalde, 1978, p. 9.
84. Blake R. C., Oprian D. D., Ballou D. P. Federat. Proc., 1978, v. 37, p. 1759.
85. Pauling L. Nature, 1964, v. 203, p. 182.
86. Perutz M. F. Umschau, 1966, B. 66, S. 597.
87. King N. K., Winfield M. P. J. Biol. Chem., 1963, v. 238, p. 1520.
88. Yonetani T., Schleyer H. Ibid., 1967, v. 242, p. 1974.
89. Yamazaki I., Nakayama R., Mioshi K., Makino R., Tamura M. In: Oxidases and Related Redox Systems. Baltimore: Univ. Park Press, 1973, v. 1, p. 407.
90. George P., Irvine D. H. Biochem J., 1952, v. 52, p. 511.
91. George P., Irvine D. H. Ibid., 1953, v. 55, p. 230.
92. George P., Irvine D. H. Ibid., 1955, v. 60, p. 596.
93. Ullrich V., Staudinger H. In: Biological and Chemical Aspects of Oxygenases. Tokyo: Maruzen Company, 1966, p. 235.
94. Булакова Г. М., Шупик А. Н., Замараев К. И., Скибида Н. П. Докл. АН СССР, 1972, т. 203, с. 863.
95. Haber F., Weiss J. Naturwissenschaften, 1932, B. 20, S. 948.
96. Hamilton G. A. Adv. Enzymology, 1969, v. 32, p. 55.
97. Метелица Д. И. Успехи химии, 1971, т. 40, с. 1192.
98. Gunsalus I. C., Tyson C. A., Tsai R., Lipscomb J. D. Chem.-Biol. Interactions, 1971, v. 4, p. 75.
99. Ishimura Y., Ullrich V., Peterson J. A. Biochem. Biophys. Res. Commun., 1971, v. 42, p. 140.
100. Debey P., Balny C., Douzou P. FEBS Letters, 1976, v. 69, p. 231.
101. Balny C., Debey P., Douzou P. Ibid., 1976, v. 69, p. 236.
102. Guengerich F. P., Ballou D. P., Coon M. J. Biochem. Biophys. Res. Commun., 1976, v. 70, p. 951.
103. Elison C., Elliot H. W., Look M., Rapoport H. J. Med. Chem., 1962, v. 6, p. 237.
104. McMahon R. E., Sullivan H. R., Craig J. C., Pereira W. E. Arch. Biochem. Biophys., 1969, v. 132, p. 575.
105. Ullrich V. Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem., 1969, B. 350, S. 357.
106. Hamberg M., Bjorkhem J. J. Biol. Chem., 1971, v. 246, p. 7411.
107. Daly J. W. Handbook of Experimental Pharmacology, v. 28/2. Berlin: Springer Verlag, 1971, p. 284.
108. Bjorkhem J., Hamberg M. Biochem. Biophys. Res. Commun., 1972, v. 47, p. 333.
109. Bjorkhem J. Europ. J. Biochem., 1971, v. 18, p. 299.
110. Henderson P. Th., Vree T. B., Ginneken C. A. M., van Rossum J. M. Xenobiotica, 1974, v. 4, p. 121.
111. Miloma C., Yasuda D., Tagg J., Tanabe M. Biochim. Biophys. Acta, 1967, v. 136, p. 566.
112. Foster A. B., Jarman M., Stevens J. D., Thomas P., Westwood J. H. Chem.-Biol. Interactions, 1974, v. 9, p. 327.
113. Tomaszewski J., Ferina D. M., Daly J. W. Biochemistry, 1975, v. 14, p. 2024.
114. Hjelmeland L., Aronow L., Trudell J. R. Biochem. Biophys. Res. Commun., 1977, v. 76, p. 546.
115. Billings R. E., McMahon R. E. Mol. Pharmacol., 1978, v. 14, p. 145.

116. Miwa G. T., Garland W. A., Hodgson B. J., Lu A. Y. H. *Feder. Proc.*, 1978, v. 37, p. 1758.
117. Groves J. T., McClusky G. A., White R. E., Conn M. J. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1978, v. 81, p. 154.
118. Narasimhulu S. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1971, v. 147, p. 384.
119. Ribbons D. W., Onta J. *FEBS Letters*, 1970, v. 12, p. 105.
120. Ullrich V., Diehl H. *Chem.-Biol. Interactions*, 1971, v. 3, p. 310.
121. Ullrich V., Diehl H. *Europ. J. Biochem.*, 1971, v. 20, p. 509.
122. Imai Y., Sato R., Iyanagi T. *J. Biochem.*, 1977, v. 82, v. 51, p. 601.
123. Rosen P., Stier A. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1973, v. 51, p. 601.
124. Yang C. S., Strickhardt F. S., Kicha L. P. *Biochim. Biophys. Acta*, 1977, v. 465, p. 362.
125. Коновалов С. А., Максимов В. И. *ЖВХО им. Д. И. Менделеева*, 1972, т. 17, с. 538.
126. Mohr P., Scheller F., Renneberg R., Kuhn M., Scheler W. *Pharmazie*, 1978, B. 33, H. 7, S. 415.
127. Brunner G., Loesgen H. In: *Artificial Organs*. Ed. Kennedi R., Couterney J., Gaylor J. London: MacMillan Press, 1977, p. 388.
128. Kastl P. R., Baricos W. H., Chambers R. P., Cohen W. *Abstracts IV Enzyme Engineering Conference*. GFR, Bad Neunahr, 1977, p. 14.
129. Sofer S. S., Ziegler D. M., Popovich R. P. *Biotechnol. Bioengng.*, 1975, v. 17, p. 107.
130. Mosbach K., Larsson P. *Ibid.*, 1970, v. 12, p. 19.
131. Mosbach K. *Scientific Amer.*, 1971, v. 3, p. 26.
132. Scheller F., Renneberg R., Schwarze W., Strand G., Pommering K., Prumke H.-J., Mohr P. *Acta biol. med. Germ.*, 1979, B. 38, S. 503.
133. Baess D., Janig G.-R., Ruckpaul K. *Acta biol. med. Germ.*, 1975, B. 34, S. 1745.
134. Gustafson J.-A., Hrycaj E. G., Ernster L. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1976, v. 174, p. 440.
135. Janig G.-R., Pfeil D., Honeck H., Ruckpaul K. *Acta biol. med. Germ.*, 1977, B. 36, S. 55.
136. Еремин А. Н., Усанов С. А., Метелица Д. И. *Прикл. биохимия и микробиол.*, 1979, т. 15, с. 861.
137. Еремин А. Н., Метелица Д. И., Усанов С. А., Ахрем А. А. Там же, 1980, т. 16, с. 206.
138. Еремин А. Н., Усанов С. А., Метелица Д. И., Ахрем А. А. *Изв. АН БССР, сер. хим.*, 1979, № 3, с. 86.
139. Janig G.-R., Pfeil D., Ruckpaul K. *Acta biol. med. Germ.*, 1979, B. 38, S. 409.
140. Скрябин Г. К., Кощеенко К. А., Суrowцев В. И. *Докл. АН СССР*, 1974, т. 215, с. 737.
141. Скрябин Г. К., Головлева Л. А. *Использование микроорганизмов в органическом синтезе*. М.: Наука, 1976, с. 141.
142. Кершенгольц Б. М., Угарова Н. Н., Березин И. В. *Биоорганич. химия*, 1976, т. 2, с. 264.
143. Березин И. В., Кершенгольц Б. М., Угарова Н. Н. *Докл. АН СССР*, 1975, т. 223, с. 1256.
144. Ахрем А. А., Еремин А. Н., Усанов С. А., Метелица Д. И. *Биофизика*, 1980, т. 25, с. 75.
145. Еремин А. Н., Метелица Д. И., Усанов С. А., Ахрем А. А. Там же, 1980, т. 25, с. 71.
146. Мартинек К. В кн.: *Успехи биоорганического катализа*. Ред. И. В. Березин, К. Мартинек. М.: Изд. МГУ, 1979, с. 135—157.
147. Мартинек К., Березин И. В. *Успехи химии*, 1980, т. 49, с. 737.

Институт биоорганической химии АН БССР, Минск