

УДК 577.158.8

## АКТИВАЦИЯ КИСЛОРОДА ЦИТОХРОМОМ P-450 И ДРУГИМИ ГЕМОПРОТЕИДАМИ

Метелица Д. И.

Рассмотрены данные по активации молекулярного кислорода полной микросомальной гидроксилирующей системой, содержащей в качестве терминальной оксигеназы цитохром P-450\*. Дан анализ природы гидроксилирующего агента, которым является оксеноид  $\text{Fe}^{3+}\text{O}$ . Проведено сравнение автоокисления цитохромов P-450 из разных источников, гемоглобина, миоглобина, пероксидаз и показана роль аксиальных лигандов гемового железа и строения активного центра гемопротендов в этом процессе. Критически рассмотрены возможные механизмы окисления органических соединений перекисями при участии цитохрома P-450, цитохрома *c*, гемоглобина и каталазы. Гемопротенды разделены на три группы по типу реакций перекисного окисления. Дан анализ соотношения радикальных и двухэлектронных реакций при окислении соединений перекисями с участием разных гемопротендов.

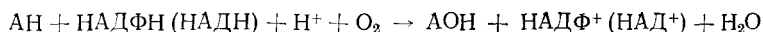
Библиография — 184 ссылки.

### ОГЛАВЛЕНИЕ

I. Введение	1818
II. Активация молекулярного кислорода полной микросомальной гидроксилирующей системой	1820
III. Автоокисление гемопротендов	1831
IV. Механизмы катализа перекисного окисления гемопротенидами	1833

### I. ВВЕДЕНИЕ

В живом мире широко распространены гидроксилирующие ферментные системы, которые используют в качестве окислителя молекулярный кислород и требуют для своего функционирования пиридиннуклеотиды — НАДН или НАДФН. Многочисленные реакции, катализируемые такими системами, характеризуются следующей стехиометрией:



Ферменты, внедряющие один атом кислорода в субстрат и восстанавливающие другой до воды, называются монооксигеназами или оксидазами со смешанной функцией [1—18]. Наиболее многочисленная группа монооксигеназ представляет собой сложные мультиферментные комплексы, содержащие в качестве терминальной оксидазы уникальные гемопротениды — цитохромы P-450. Гидроксилирующие системы такого типа содержатся в микросомах печени человека и животных, в митохондриях коры надпочечников, входят в состав клеток многих бактерий, дрожжей, грибов, а также в состав клеток печени холоднокровных и содержатся в некоторых высших растениях.

Особое внимание привлекает микросомальная гидроксилирующая система печени в связи с большой важностью ее функций. Эта система окисляет эндогенные субстраты (стероиды и холестерин) и многочисленные ксенобиотики, попадающие в организм, среди которых ле-

\* В обзоре использованы следующие сокращения: P-450-LM<sub>2</sub> — цитохром микросом печени кроликов, получавших фенобарбитал натрия; P-450-LM<sub>4</sub> — цитохром микросом печени кроликов, получавших 3-метилхолантрен или β-нафтофлавоп; P-450<sub>кам</sub> — цитохром P-450 из бактерий, гидроксилирующих камфору; P-450<sub>мт</sub> — цитохром митохондрий коры надпочечников, катализирующий отщепление боковой цепи холестерина; ГПК — гидроперекись кумила; ГПТБ — гидроперекись трет-бутила; ДМА — N,N-диметиланилин; ROOH — органические гидроперекиси и надкислоты; АН — субстрат; АОН — продукт реакции.

ТАБЛИЦА 1

## Некоторые характеристики гемопротеидов

Гемопротеид	Мол. масса	Аксиальные лиганды		Полосы поглощения, нм			Природный источник	Ссылки
		L <sub>5</sub>	L <sub>6</sub>	окисл.	восстан.	комплекс с CO		
Цитохромы P-450:								
LM <sub>2</sub>	48 700	S (Cys)	H <sub>2</sub> O или N(His)	418, 535, 568	413, 544	450, 552	печень кролика	[11, 13]
LM <sub>4</sub>	55 300	S (Cys)		396, 645	411, 545	448, 550	печень кролика	[11, 13]
P-450 <sub>кам</sub>	45 000	S (Cys)	N(His)	417, 535, 571	411, 540	447, 550		[19]
P-450 <sub>sec</sub>	48 000	S (Cys)	N(His)	394, 540, 565	416, 548	448, 550	митохондрии	[25]
P-450 <sub>11β</sub>	45 000	S (Cys)	N(His)	394, 510, 645	416, 548	448, 550	кора надпочечников быка	[25]
Цитохром b <sub>5</sub>	11 000	N(His)	N(His)	413	424, 526, 556	нет	печень телят	[5]
Цитохром c	13 000	N(His-18)	S(Met-80)	407	415, 521, 550	нет	сердце лошади	[26]
Пероксидаза (1.11.1.7)	40 000	N(His)	H <sub>2</sub> O	420, 541	432, 535, 565	—	хрен	[27, 28]
Миоглобин	17 000	N(His)	H <sub>2</sub> O или HO <sup>-</sup>		435, 555	423, 541, 578	сердце кашалота	[29]
Гемоглобин	68 000	N(His-82α, 92β)	H <sub>2</sub> O или HO <sup>-</sup>	407, 504, 538, 630	~ 430, ~ 555, ~ 590	419, 539, 569	кровь человека и лошади	[29, 30]
Каталаза КФ 1.11.1.6	232 400	N(His)	HO <sup>-</sup> или H <sub>2</sub> O	—	—	—	печень быка, печень лошади	[28, 31]

карства, яды, канцерогены, химические вещества окружающей человека производственной среды и т. д. Микросомальная гидроксилирующая система печени состоит из трех компонентов, каждый из которых полно охарактеризован [7, 11, 17, 18]: НАДФН — цитохром Р-450 — редуктазы (КФ 1.6.2.4), цитохромов Р-450 (КФ 1.14.14.1), существование многих форм которых убедительно доказано [11], и фосфолипидов [9]. Стероид-гидроксилирующая система из митохондрий коры надпочечников также состоит из трех компонентов: адренодоксин-редуктазы (КФ 1.6.7.1), ферредоксина (адренодоксина) и двух форм цитохрома Р-450, одна из которых ответственна за реакции отщепления боковой цепи холестерина — Р-450<sub>scs</sub>, а другая за реакцию 11-β-гидроксилирования стероидов — Р-450<sub>11β</sub> [18]. Бактериальная система, гидроксилирующая камфору, также включает три компонента: путидаредоксин-редуктазу, ферредоксин (путидаредоксин) и цитохром Р-450<sub>кам</sub> [18, 19]. Усилиями исследователей из многих стран наиболее существенные стороны строения, функций и механизма действия ферментных гидроксилирующих комплексов глубоко изучены и обобщены в ряде монографий, обзоров и сборников [1—19]. Однако не решены окончательно два наиболее важных вопроса — механизм активации молекулярного кислорода цитохромами Р-450 и организация мультиферментных комплексов в мембранах эндоплазматического ретикулума, митохондрий коры надпочечников и в клетках бактерий.

Задачей настоящего обзора является критическое рассмотрение и обобщение экспериментальных данных по активации молекулярного кислорода цитохромом Р-450, полученных в самое последнее время для микросомальной гидроксилирующей системы печени. Весьма существенна для понимания механизма активации кислорода цитохромом Р-450 его способность окислять множество субстратов разной химической природы в сочетании с органическими перекисями и другими окислителями. В связи с этим большое внимание уделено реакциям окисления субстратов гидроперекисями и другими окислителями с участием цитохрома Р-450. По механизму действия цитохром Р-450 отличается от других гемопротеидов, способных катализировать многие окислительные процессы. Одной из задач данного обзора является рассмотрение и анализ причин этого отличия цитохрома Р-450 от других гемопротеидов в окислительно-восстановительных процессах. Для решения последней задачи автор ограничился кругом гемопротеидов, перечисленных в табл. 1. Это связано с наличием данных для сравнения реакций с участием этих гемопротеидов, а также с возможностью анализа роли аксиальных лигандов и структуры апобелков в активации кислорода. Большое внимание уделено природе гидроксилирующих агентов и соотношению гомолитических и гетеролитических стадий в процессах окисления с участием перечисленных гемопротеидов.

## **II. АКТИВАЦИЯ МОЛЕКУЛЯРНОГО КИСЛОРОДА ПОЛНОЙ МИКРОСОМАЛЬНОЙ ГИДРОКСИЛИРУЮЩЕЙ СИСТЕМОЙ**

Понятие полная микросомальная гидроксилирующая система мы будем применять для обозначения реконструированных систем, содержащих НАДФН-цитохром Р-450-редуктазу, цитохром Р-450, НАДФН, кислород и субстрат, а также при описании окисления микросомами печени с участием НАДФН и кислорода в отличие от окисления субстратов гидроперекисями с участием микросом или индивидуальных форм цитохрома Р-450.

Процесс окисления микросомами и реконструированными системами сложен и состоит, по крайней мере, из восьми стадий (см. рис. 1). В первой стадии субстрат образует комплекс с окисленной формой цитохрома Р-450, что сопровождается изменением окислительно-восстановительного потенциала и спинового состояния гемопротеида: большинство субстратов переводят низкоспиновую форму цитохрома Р-450 в высокоспиновую форму, некоторые амины вызывают обратный пере-

ход. Предполагается, что высокоспиновая форма цитохрома Р-450 теряет аксиальный лиганд в шестом положении, но сохраняет в качестве пятого лиганда цистеинил [20]. Скорости образования фермент-субстратных комплексов высоки и характеризуются значениями констант  $10^2 \div 10^6$  л/моль·с в зависимости от природы субстрата [21]. Связывание субстратов с цитохромом Р-450 облегчает восстановление фермент-субстратного комплекса первым электроном, поступающим из НАДФН-специфичной цепи электронного транспорта [18, 22]. В состав этой цепи входят НАДФН-цитохром Р-450-редуктаза (ФП<sub>1</sub>) и, возможно, цитохром b<sub>5</sub>. НАДФН-цитохром Р-450-редуктаза является флавопротеном (ФП<sub>1</sub>) с мол. массой около 79000, содержащим в одной молекуле 1 ФАД и 1 ФМН [23, 24]. ФМН редуктазы получает два элект-

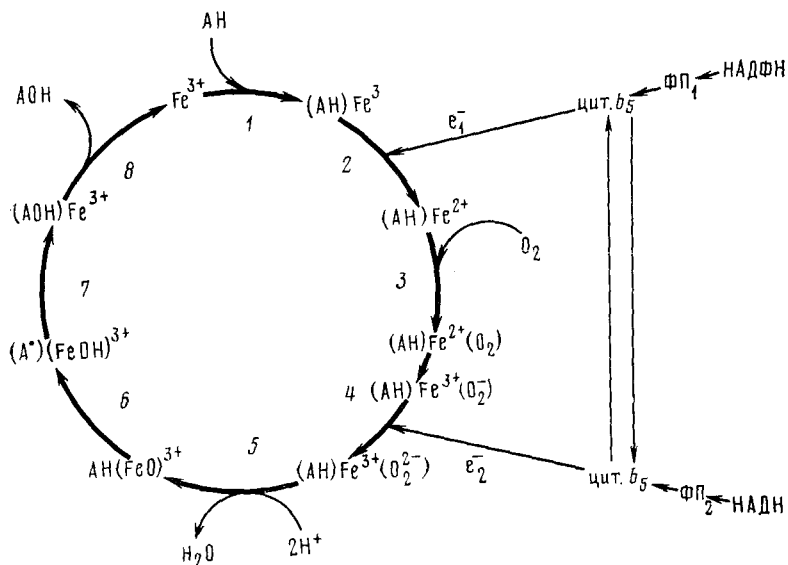


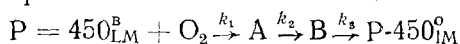
Рис. 1

рона от НАДФН, а ФАД участвует в передаче этих электронов на цитохром Р-450 [24]. Механизм действия редуктазы окончательно не выяснен, так как неизвестно взаимное расположение двух флавиновых фрагментов в молекуле фермента. Вторая стадия процесса в микросомах и в реконструированных системах складывается из двух фаз [12]. Возможной причиной двух фаз при восстановлении фермент-субстратного комплекса первым электроном в микросомах может быть гетерогенность цитохрома Р-450 [12, 17] и, что более вероятно, различие скоростей восстановления разных спиновых форм цитохрома Р-450 [32], так как высокоспиновые гемопротенды восстанавливаются быстрее низкоспиновых [20].

В третьей стадии восстановленный первым электроном фермент-субстратный комплекс с высокой скоростью присоединяет молекулярный кислород: для разных комплексов константы скорости присоединения  $O_2$  меняются в диапазоне  $10^4 \div 10^6$  л/моль·с [21]. Впервые оксигенированную форму восстановленного цитохрома Р-450 из микросом печени зарегистрировали спектрофотометрически в 1971 г. Эстабрук и сотр. [22]. Одновременно Гансалус [33] и Ишимура [34] спектрально доказали образование комплекса кислорода с восстановленным цитохромом Р-450<sub>кам</sub>, гидроксилирующим камфору. В 1976 г. [35, 36] впервые выделены комплексы — камфора — Р-450<sub>кам</sub> —  $O_2$  и Р-450<sub>кам</sub> —  $O_2$  — методом хроматографии при температурах ниже 0°С в смешанных водно-органических растворителях. Эти комплексы охарактеризовали спектрально и кинетически. Тройной комплекс камфора — 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 [35].

В 1979 г. впервые выделен оксигенированный комплекс цитохрома Р-450 из микросом печени кролика при  $-30^\circ$  в водно-глицериновом растворе [37]. Комплекс характеризуется максимумами поглощения при 420 и 557 нм, энергия активации автоокисления равна  $\sim 10$  ккал/моль [37]. Совсем недавно в той же среде очищен тройной комплекс цитохрома Р-450<sub>sec</sub> из митохондрий коры надпочечников быка с холестерином и кислородом: комплекс имеет максимум поглощения при 414 нм и характеризуется коэффициентом экстинкции  $84 \pm 2$  л/ммоль·см [38].

Комплексообразование высокоочищенного цитохрома Р-450 из микросом печени кролика (Р-450-LM) изучено спектрофотометрически с использованием метода остановленного потока [39]. Реакцию проводили в присутствии субстрата — бензфетамин и характеризовали двумя фазами: сначала образуется оксигенированный комплекс А, имеющий максимумы поглощения в разностном спектре при 430 и 450 нм, затем короткоживущий комплекс А превращается в комплекс В с максимумом поглощения при 440 нм. Комплексообразование кислорода с восстановленным цитохромом описывается схемой:



Константа скорости  $k_1 > 6,0 \cdot 10^4$  мин<sup>-1</sup>,  $k_2 = 270$  мин<sup>-1</sup> и  $k_3 = 3,0$  мин<sup>-1</sup> [39]. Комплекс В имеет спектральные характеристики, близкие к таковым для комплекса I в реакциях пероксидаз с H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [28], и, вероятно, аналогичен ему. Компоненты реакции имели следующие полосы Сор: Р-450<sup>а</sup> — 424 нм, Р-450<sup>в</sup> — 418 нм, А — 432 нм, В — 421 нм. Окисление цитохрома Р-450 в тройном комплексе является лимитирующей стадией процесса превращения и приводит к гидроксигированию субстрата.

Для механизма активации кислорода цитохромом Р-450 первостепенное значение имеет строение оксигенированного гемопротеида. Состояние кислорода в комплексе субстрат — Р-450—О<sub>2</sub> и его конфигурация до сих пор неизвестны. По аналогии с оксигемоглобином предполагается, что кислород получает электрон от гемового железа и его состояние лучше всего передается структурой, предложенной для оксигемоглобина Вайссом [40]: Fe<sup>3+</sup>О<sub>2</sub><sup>-</sup> (рис. 1). По аналогии с оксигемоглобином можно предположить, что кислород в оксигенированном цитохроме Р-450 имеет конфигурацию Fe—О=О, в которой угол Fe—О=О близок к 120°. Предприняты попытки рассчитать наиболее выгодную конфигурацию оксигенированного цитохрома Р-450 квантово-механическими методами [41, 42]. Проведенные вычисления показали, что необычные спектральные свойства кислородного и карбонильного комплексов цитохрома Р-450 полностью связаны с тиоловым лигандом в пятом аксиальном положении и очень сильно зависят от расстояния гемовое железо — сера тиолового лиганда. Увеличения этого расстояния на 0,2 Å и более вполне достаточно для превращения цитохрома Р-450 в неактивную форму Р-420, отличающуюся от первой максимумом полосы Сор карбонильного комплекса цитохрома в восстановленном состоянии [42]. Делать определенные выводы о конфигурации кислорода в оксигенированном цитохроме Р-450 на основании квантово-механических расчетов преждевременно и опасно, так как теоретические расчеты связи Fe—О<sub>2</sub> для оксигемоглобина оказались неубедительными. Такие расчеты, проведенные методом молекулярных орбиталей [43], отдают предпочтение структуре Полинга [44], в то время как из расчетов по методу ЛКАО МО, выполненных другими авторами [45], следует, что только закрытая структура Гриффита [46] обеспечивает существование стабильного низкоспинового комплекса оксигемоглобина. Рентгеноструктурное исследование оксигенированного миоглобина подтвердило модель Полинга, т. е. ось молекулы О<sub>2</sub> с плоскостью порфиринового кольца образует угол, близкий к 120° [47].

Тройной комплекс субстрат — Р-450 — О<sub>2</sub> в микросомальной гидроксигирующей системе не устойчив и автоокисляется. Для гидроксиги-

лирования субстрата необходимо восстановление этого комплекса еще одним электроном, что происходит в четвертой стадии процесса (см. рис. 1). Предполагается, что второй электрон поступает из НАДН-специфичной микросомальной цепи, содержащей НАДН-цитохром  $b_5$ -редуктазу и цитохром  $b_5$ . До настоящего времени эта стадия процесса не разрешена на отдельные ступени и ее скорости не измерены для микросомальных систем. Важная роль цитохрома  $b_5$  в транспорте второго электрона подтверждена при изучении окисления микросомами [48—53] и при окислении ряда субстратов в реконструированных системах [54—65]. Считают, что цитохром  $b_5$ , восстановленный в НАДН-специфичной цепи транспорта электронов, может передавать второй электрон непосредственно цитохрому Р-450 [48]. В пользу участия цитохрома  $b_5$  в транспорте второго электрона к тройному комплексу свидетельствует целый ряд экспериментальных данных, обсужденных в [66].

Во-первых, при микросомальном окислении субстратов первого типа (углеводороды, третичные амины, алициклы) при участии двух пиридиннуклеотидов — НАДН и НАДФН наблюдается синергистический эффект, отражающий важную роль двух электрон-транспортных цепей в процессе окисления [48, 50]. Синергистический эффект не наблюдается для субстратов второго типа (анилин и другие амины) [17]. Важно отметить, что к синергизму причастен только эндогенный цитохром  $b_5$ , в то время как экзогенный цитохром  $b_5$  (встраиваемый в микросомальные мембраны) не всегда стимулирует микросомальное окисление, а процессы превращения аминопирена и диметиланилина даже замедляет [49, 66]. Очевидно, встраиваемый в мембрану цитохром  $b_5$  отличается от нативного тем, что не может попасть в кластер, содержащий цитохром Р-450 и редуктазу, и принять участие в восстановлении цитохрома Р-450. Ингибирующее действие встроенного в микросомы цитохрома  $b_5$  можно объяснить его способностью получать электроны от НАДФН-цитохром Р-450-редуктазы и расходовать ее непродуктивно с точки зрения процесса гидроксирования. Восстановление цитохрома  $b_5$  НАДФН-цитохром Р-450-редуктазой вначале только предполагалось [48, 50], а теперь получило экспериментальное подтверждение [17, 56, 59]. Разное влияние эндогенного и экзогенного цитохрома  $b_5$  на микросомальное окисление может быть объяснено различием окислительно-восстановительных потенциалов нативного и внесенного в мембрану гемопротеида.

Во-вторых, часто при окислении микросомами или реконструированными системами цитохром  $b_5$  ускоряет окисление одних субстратов, но индифферентен в процессах превращения других; окисление бензо[*a*]пирена [53, 57], ацетанилида [57], 4-ипомеанола [52], бензфетамина [54], 7-этоксикумарина [53, 55, 61], *пара*-нитроанизола [59—61] ускоряется цитохромом  $b_5$ , в то время как окисление аминопирена [49] и анилина [66] ингибируется этим гемопротеидом. Возможно, что субстраты первой группы образуют такие комплексы с цитохромом Р-450, окислительно-восстановительные потенциалы которых благоприятны для восстановления комплексов субстрат — Р-450— $O_2$  цитохромом  $b_5$ ; в то же время анилин и аминопирин образуют комплексы с окислительно-восстановительными характеристиками, препятствующими их восстановлению цитохромом  $b_5$  [49, 66].

В-третьих, влияние цитохрома  $b_5$  на окисление в реконструированных системах в большой степени определяется природой самого цитохрома Р-450. Недавно выделен цитохром Р-450 с повышенным сродством к цитохрому  $b_5$  [60] и показано, что реакция окислительного деметилирования *пара*-нитроанизолов в этом случае эффективно ускоряется цитохромом  $b_5$  [56, 59]. Цитохром  $b_5$  с разной эффективностью ускоряет окисление одного и того же субстрата — бензо[*a*]пирена в идентичных условиях при участии в процессе двух разных форм цитохрома из печени кроликов — Р-450- $LM_2$  и Р-450- $LM_4$ , т. е. природа цитохрома Р-450 в существенной степени определяет стимулирующие возможности цитохрома  $b_5$  [62]. Недавно получены прямые доказательства восста-

новления цитохромом  $b_5$  окисгенированного цитохрома Р-450 из микросом печени [65]: показано, что автоокисление окисгенированного цитохрома Р-450 ускоряется в присутствии восстановленного цитохрома  $b_5$ .

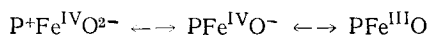
Таким образом, влияние цитохрома  $b_5$  на процессы окисления разных субстратов в микросомах и в реконструированных системах определяется несколькими факторами: природой цитохрома  $b_5$  (экзогенный или эндогенный) и его окислительно-восстановительным потенциалом; природой окисляемого субстрата и его влиянием на окислительно-восстановительные характеристики тройного комплекса субстрат — Р-450 —  $O_2$ ; наконец, природой самого цитохрома Р-450 и его сродством к цитохрому  $b_5$ . Отметим также влияние способов реконструкции ферментных систем, содержания примесных количеств неудаленных детергентов и условия проведения реакций. При благоприятном соотношении окислительно-восстановительных параметров цитохрома  $b_5$  и тройного комплекса гемопротейд стимулирует окисление субстратов, при неблагоприятном соотношении этих параметров цитохром  $b_5$  может получать электроны от НАДФН-цитохром Р-450-редуктазы, но не способен передать их цитохрому Р-450, что замедляет процесс окисления.

Четвертая стадия микросомального окисления является сложным процессом, в котором могут участвовать несколько макромолекулярных биоконпонентов микросомальной системы. Скорости этой стадии до сих пор не измерены. Отметим, что стадия восстановления вторым электроном тройного комплекса камфора — Р-450<sub>кам</sub> —  $O_2$  в системе, гидроксилирующей камфору, детально изучена и охарактеризована константами скорости. Этот процесс происходит с участием эффектора — путидаредоксина и является лимитирующей ступенью окисления камфоры в бактериальной системе [19, 67].

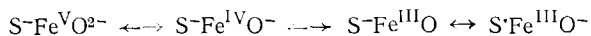
После восстановления тройного комплекса вторым электроном в четвертой стадии процесса происходит гидроксилирование субстрата, освобождение молекул воды и продукта реакции и регенерирование исходного катализатора в окисленной форме (см. рис. 1). Необходимо подчеркнуть, что в настоящее время ни один из этих процессов не изучен как дискретный, более того, не известно, в какой последовательности происходят перечисленные процессы. Не исключено, что число стадий после четвертой может быть больше или меньше четырех, обозначенных на рис. 1. Возможно, что после четвертой стадии вслед за актом гидроксилирования из тройного комплекса одновременно освобождаются молекулы продукта реакции и воды, т. е. сложный акт гидроксилирования является кооперативным процессом, что часто встречается в ферментативных реакциях. Другая возможность рассмотрена Куном и Уайтом [12]: после четвертой стадии происходит расщепление связи  $O—O$  в тройном комплексе с образованием воды, гидроксилирующий агент разрывает связь  $C—H$  в субстрате, вслед за чем образуется продукт реакции, который выходит в объем на последней стадии процесса. Окисляющий агент ни в одной из гидроксилирующих ферментных систем не идентифицирован прямыми способами. О его природе и свойствах приходится судить по косвенным данным, касающимся стереоселективности и специфичности при микросомальном окислении, наличия или отсутствия изотопных эффектов при окислении меченых субстратов, и, что очень важно, сходства и отличий при окислении одних и тех же субстратов в полной системе и при участии гидроперекисей в сочетании с цитохромом Р-450. Важная роль при обсуждении соотношения гомолитических и гетеролитических стадий в процессе микросомального окисления принадлежит ингибированию реакций антиоксидантами, замедляющими процессы радикального окисления [68, 69]. Обсуждение стадий процесса 5—8 (рис. 1) будет в дальнейшем строиться с учетом всех данных, касающихся разных сторон микросомального окисления субстратов.

Авторы работы [12] считают, что вслед за четвертой стадией процесса происходит расщепление связи  $O—O$  в тройном комплексе с об-

разованием гидроксiliрующей частицы, содержащей только один атом кислорода. В пользу этого утверждения свидетельствует высокая окисляющая способность иодозобензола  $C_6H_5I=O$  и его производных в сочетании с окисленным цитохромом Р-450, впервые обнаруженная Улрихом и сотр. [70]. Действительно, иодозобензол может передать окисляющему агенту только один атом кислорода, так как другого атома у этого соединения нет. Двум группам исследователей удалось получить с помощью иодозобензола относительно устойчивые соединения, моделирующие гидроксiliрующий агент цитохрома Р-450, содержащий только один атом кислорода [71, 72]: окисление углеводов иодозобензолом катализирует хлордиметилферрипротопорфирин IX [71], а 2-иодозо-*мета*-ксилол в присутствии хлорида октаэтилпорфиринатожезла-III в  $CHCl_3$  или в  $CH_2Cl_2$  образует частицу, магнитная восприимчивость которой соответствует высокоспиновому состоянию Fe (IV) [72]. Авторы [72] считают, что структура полученного соединения аналогична комплексу I пероксидаз, каталаз и хлорпероксидазы и характеризуется следующими формулами:

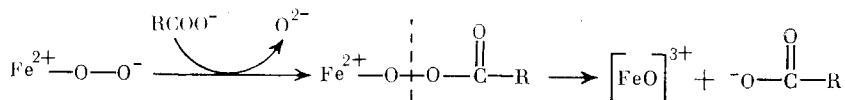


где Р — порфирин. Высокая степень окисления железа в этих модельных комплексах стабилизируется, по мнению авторов, порфириновым кольцом, которое отдает один электрон атому железа или кислорода. В ряде случаев получены доказательства существования порфирин-катионов [73, 74]. Частица, структура которой изображена выше, называется оксеном [18, 75], так как атом кислорода в ней содержит шесть электронов на внешней оболочке и отличается высокой реакционной способностью по аналогии с карбенами и нитренами [76, 77]. В схеме, предложенной Куном и сотр. [12], в результате расщепления связи O—O в тройном комплексе образуется именно такая частица. Процесс расщепления связи O—O происходит с участием карбоксильной группы одной из аминокислот активного центра цитохрома Р-450 (рис. 2). Авторы считают, что структура надкислоты, образующейся при взаимодействии карбоксильной группы с кислородным комплексом цитохрома Р-450, благоприятна для последующего расщепления связи O—O и образования гидроксiliрующей частицы. Это соображение подтверждается высокой гидроксiliрующей способностью надкислот по отношению к ароматическим и алифатическим углеводородам, которая возрастает при координации надкислот с комплексами металлов. Неслучайно надкислоты являются удобными моделями монооксигеназ, имитирующими акт внедрения кислорода в субстраты микросомальной системы [4, 75, 78]. Авторы работы [12] считают, что образующийся в стадии 5 (рис. 1) оксеноид стабилизируется тиоловым лигандом цитохрома Р-450, который представляет собой своеобразный резервуар электронов в процессе образования гидроксiliрующей частицы и ее реакций:

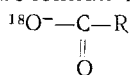


Возможность участия карбоксильной группы одной из аминокислот активного центра цитохрома Р-450 в образовании гидроксiliрующего агента подтверждена экспериментально [79] на примере цитохрома Р-450<sub>кам</sub>.

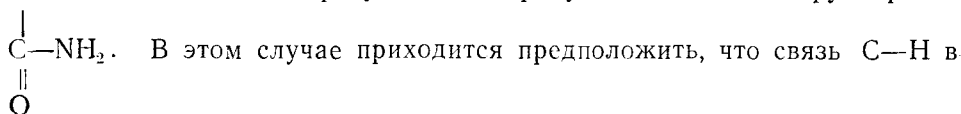
С применением меченого кислорода  $^{18}O_2$  авторы работы [79] показали, что дигидролиповая кислота ацилирует дистальный кислород в оксигенированном комплексе Р-450<sub>кам</sub>  $^{18}O_2$ , образуя перекисное промежуточное соединение, разрыв связи O—O в котором сильно облегчается, в результате чего один атом  $^{18}O$  внедряется в камфору, а другой атом  $^{18}O$  в карбоксилатную группу дигидролиповой кислоты:



При гетеролитическом распаде ацилперекиси образуется оксеноид  $[\text{Fe}^{18}\text{O}]^{3+}$  и липсовая кислота, меченная по карбоксильной группе



В качестве альтернативы гетеролитическому распаду ацилперекиси, образующейся при ковалентном связывании карбоксильной группы аминокислоты с оксигенированным цитохромом Р-450, рассматривается [12] возможность гомолитического распада промежуточного перекисного соединения, образующегося при участии амидной группировки



субстратах атакуется амидильным радикалом  $\text{NH}-\text{C}=\text{C}\cdot$ . Мы считаем, что такой путь реакции маловероятен, потому что амидильный радикал

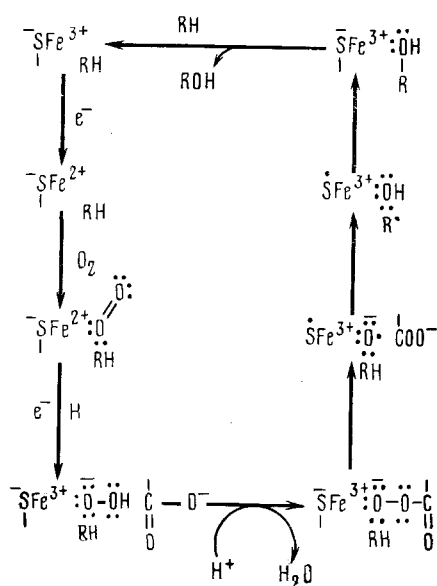
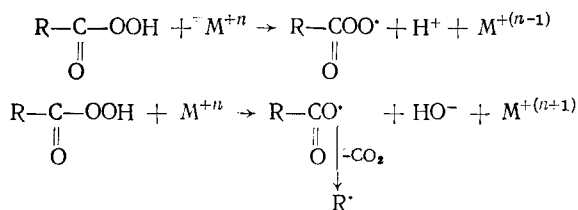


Рис. 2

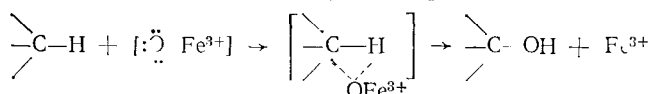
относительно устойчив, и при температурах, близких к физиологическим, не сможет разорвать прочные  $\text{C}-\text{H}$ -связи у большинства субстратов цитохрома Р-450. Гомолитический путь разрыва  $\text{O}-\text{O}$ -связи в промежуточно образующейся ацилперекиси также следует исключить, потому что гомолиз этой связи при участии комплексов и ионов металлов сопровождается декарбоксилированием образующегося ацилпероксирадикала [80]:



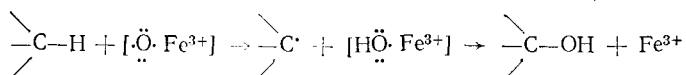
В результате последней реакции кислота апофермента, участвующая в ковалентной фиксации кислорода в оксигенированном цитохроме Р-450, будет необратимо расходоваться, и катализатор быстро разрушится.

Таким образом, наиболее вероятным путем образования оксеноида в полной микросомальной системе представляется гетеролитический распад ацилперекиси, образующейся при взаимодействии карбоксильной группы одной из аминокислот активного центра с активированным кислородом тройного комплекса субстрат—Р-450—O<sub>2</sub>, восстановленного вторым электроном. Важно отметить, что координированный цитохром Р-450 кислород не только фиксируется матрицей фермента, как это предполагается для оксигемоглобина [44, 81], а ковалентно связывается с одной из кислот апофермента с образованием промежуточного соединения перекисной природы.

В шестой стадии процесса (рис. 1) происходит разрыв связи С—Н в молекуле субстрата. Авторы работы [12] считают, что эта стадия протекает по радикальному пути. В пользу такого утверждения имеются экспериментальные данные, на которых мы подробно остановимся ниже. Электронная структура и реакционная способность оксеноида  $[\text{Fe}^{3+}\text{O} \leftrightarrow \text{Fe}^{4+}\text{O}^-]$  совершенно неизвестны. Можно предположить, что реализуются один из двух механизмов атаки субстрата [16, 18]: первый механизм (оксеноидный) или двухэлектронный:



второй механизм (скрыторадикальный) или одноэлектронный:



Было бы неправильно утверждать, что один из этих путей реакции является универсальным. Если состояние кислорода в оксеноиде является синглетным, то реализуется первый механизм, по которому атом кислорода внедряется в связь С—Н без ее разрыва, как это происходит при реакции карбенов, нитренов и атомарного кислорода с ароматическими и алифатическими углеводородами [76, 77, 78]. Такой путь реакции наиболее вероятен в процессах окисления ароматических соединений и является единственно возможным при микросомальном окислении циклогексена и других ненасыщенных соединений, так как трудно представить себе образование окиси циклогексена и окисей олефинов по радикальному механизму. Если оксеноид находится в триплетном состоянии, то прямое внедрение атома кислорода в субстрат невозможно — такая реакция является спин-запрещенной. В этом случае реализуется одноэлектронный, скрыторадикальный механизм, что отражено на схеме (см. рис. 1 и 2). В пользу радикального механизма окисления в полной микросомальной системе получен ряд весо- мых доказательств.

Во-первых, при гидроксилировании метилциклогексена с участием цитохрома Р-450-LM<sub>2</sub> получена смесь метилциклогексанолов с соотношением изомеров 1°:2°:3°, равным 0,072:1:1,25 [82]. Такое распределение продуктов реакции согласуется с радикальным механизмом процесса.

Во-вторых, в пользу разрыва связи С—Н в процессе микросомального окисления свидетельствуют величины первичных изотопных эффектов, которые удалось наблюдать в ряде случаев (табл. 2). Примечательно, что при окислении ароматических соединений бензольного ряда и дифенила величины изотопных эффектов малы:  $k_{\text{H}}/k_{\text{D}} = 1,3 \div 1,8$ . Малые величины изотопных эффектов получены также для реакций окислительного деалкилирования CD<sub>3</sub>-морфина [83], N, N'-диметилфентермина [96], CD<sub>3</sub>-орто-анизола и α-D<sub>2</sub>-изо-пропиламфетамина [90, 91]. Это означает, что при окислении ароматических соединений и окислительном деалкилировании некоторых веществ или не происходит разрыва С—Н-связей, или этот процесс не является лимитирующим. В ряде случаев измерен внутримолекулярный изотопный эффект,

ТАБЛИЦА 2

**Величины первичных изотопных эффектов ( $k_H/k_D$ )  
при микросомальном окислении различных субстратов**

Субстрат	$k_H/k_D$	Ссылки
CD <sub>3</sub> -морфин	1,4	[83]
$\alpha$ -D <sub>2</sub> -этилбензол	1,8	[84]
D <sub>12</sub> -циклогексан	1,0	[85]
11-D <sub>2</sub> -лауриновая кислота	3,0	[86]
9-D <sub>2</sub> -капроновая кислота	3,0	[86]
Насыщенные соединения	1,4	[87]
16 $\alpha$ -D-прегненолон	3,0	[88]
7 $\alpha$ - <sup>3</sup> H-тауродезоксихолевая кислота	3,8	[89]
$\alpha$ -D <sub>2</sub> -изо-пропиламфетамин	1,6	[90]
CD <sub>3</sub> -орто-нитроанизол	2,0	[91]
CD <sub>3</sub> -метоксианизол	10,0	[92]
Ароматические соединения бензольного ряда	1,3÷1,75	[93]
1,3-Дифенилпропан-1,1-D <sub>2</sub>	11,0	[94]
Дифенил	1,4	[95]
N,N'-диметилфентермин	1,4	[96]
Норборнан	11,5	[97]
7-Этоксикумарин	13,5	[98]

когда молекула содержала в одном и том же положении водород и дейтерий. При микросомальном окислении *экзо*, *экзо*, *экзо*, *экзо*-тетрадейтеронорборнана получена смесь *эндо*- и *экзо*-2-норборнелов [97]. Отношение *экзо*-спирта к *эндо*-спирту равнялось 3,4:1 для норборнана и уменьшалось до 0,76:1 для дейтерированного субстрата. Изотопный эффект составил в этом случае 11,5 [97]. В этой же работе показано, что реакция окисления норборнана не сопровождается полным сохранением конфигурации при образовании спирта, что подтверждает промежуточное образование углеродсодержащего радикала. Недавно измерены изотопные эффекты в реакции О-деэтилирования 7-этоксикумарина [98] при окислении его двумя цитохромами из микросом печени крыс — Р-450 и Р-448. Величины  $k_H/k_D$  составили 11,8 и 13,5 для Р-450 и Р-448 соответственно. Большие величины изотопных эффектов в ряде случаев подтверждают, что в лимитирующей стадии процесса микросомального окисления происходит разрыв С—Н-связи субстратов.

В-третьих, при систематическом кинетическом изучении влияния 1-нафтола и маннитолла на окисление анилина и диметиланилина микросомами с участием НАДФН и O<sub>2</sub> и реконструированными системами с участием тех же кофакторов показано эффективное замедляющее действие 1-нафтола [69]. Концентрации 1-нафтола были существенно ниже концентраций обоих субстратов, поэтому смешанный тип ингибирования при окислении обоих субстратов нельзя объяснить только их конкуренцией с ингибитором за связывание с цитохромом Р-450. 1-Нафтол в условиях опытов является эффективной ловушкой активных радикалов, участвующих в окислении, в то время как маннитол не замедляет процесса окисления. На основе полученных данных сделан вывод, что в полной микросомальной системе в окислении анилина и ДМА могут участвовать радикалы [69].

Таким образом, распределение продуктов реакции при окислении углеводов, наличие больших первичных изотопных эффектов при окислении ряда субстратов, ингибирующее действие антиоксидантов на окисление анилина и диметиланилина, частичное сохранение конфигурации при окислении норборнана подтверждают возможность радикальных стадий в процессе окисления полной микросомальной системой.

Последняя стадия микросомального окисления (см. рис. 1) связана с освобождением продукта реакции из тройного комплекса и регенери-

Кинетические параметры  $k$  и  $v$ . N-деметилования бензфетамина в реконструированной системе микросом печени [99]

Стадия процесса	Кинетические характеристики
Связывание бензфетамина с цитохромом Р-450	$k_1 = 50 \text{ с}^{-1}$
Восстановление фермент-субстратного комплекса первым электроном	$k_2 = 4 \div 12 \text{ с}^{-1}$
Связывание кислорода с фермент-субстратным комплексом	$k_3 = (1,0 - 1,3) \cdot 10^3 \text{ с}^{-1}$
Разложение тройного комплекса с образованием продуктов реакции	$v \geq 2,3$
Окисление НАДФН	$v = 0,8 - 1,2$
Накопление формальдегида	$v = 0,5 - 0,7$

Примечание. Скорости процессов приведены в нмоль/с на 1 нмоль цитохрома Р-450.

рованием цитохрома Р-450 в исходном состоянии. Эта стадия происходит быстро, так как более полярные продукты реакции хуже связываются с цитохромом Р-450 в сравнении с менее полярными субстратами и легко вытесняются молекулами субстратов из активного центра фермента.

Проблема установления лимитирующей стадии микросомального окисления является довольно сложной. Отметим сразу, что лимитирующие стадии окисления одного и того же субстрата в микросомах и реконструированных системах могут отличаться. Рассмотрение обширного кинетического материала об окислении разных веществ микросомами и скоростях отдельных стадий процесса проведено ранее [16, 18]. Здесь следует лишь напомнить читателю, что некоторые из стадий микросомального окисления заведомо не могут быть лимитирующими. Взаимодействие многих субстратов с окисленным цитохромом Р-450 происходит с высокими скоростями [18, 21], восстановление фермент-субстратного комплекса НАДФН-цитохром Р-450-редуктазой также происходит быстро и, как показано в работах [21, 99], не может лимитировать скорости всего процесса окисления. Третья стадия реакции — связывание молекулярного кислорода с восстановленным фермент-субстратным комплексом отличается высокими константами скорости  $10^3 - 10^6 \text{ л/моль} \cdot \text{с}$  [21]. Оценить скорость восстановления тройного комплекса вторым электроном в четвертой стадии процесса микросомального окисления до сих пор не удалось. Иногда предполагается, что именно эта стадия может лимитировать скорость процесса в целом [12, 17]. Часто проводится аналогия микросомальной системы с бактериальной гидроксимирующей системой, окисляющей камфору, в которой стадия восстановления тройного комплекса камфора — Р-450<sub>кам</sub> — О<sub>2</sub> вторым электроном является лимитирующей ступенью всего процесса [19, 67]. Однако такая аналогия может быть ошибочной, потому что в восстановлении тройного комплекса вторым электроном в бактериальной системе участвует еще один белок — путидаредоксин. С другой стороны, число оборотов в микросомальной системе составляет меньше одной десятой от числа оборотов при гидроксимировании камфоры с участием Р-450<sub>кам</sub> [12].

Самым правильным решением вопроса о природе лимитирующей стадии микросомального окисления является измерение скорости всех ступеней сложного процесса и сопоставление их между собой. Такая работа проделана в лаборатории Сато при окислении бензфетамина в реконструированной системе [99]. В табл. 3 представлены кинетические характеристики отдельных стадий процесса.

Анализ скоростей отдельных стадий окисления бензфетамина привел авторов работы [99] к выводу, что лимитирующей стадией может быть или восстановление тройного комплекса вторым электроном или любой процесс после этого акта, так как накопление продукта реакции происходит со скоростями, меньшими чем скорость разложения тройного комплекса.

Несколько лет назад мы высказали предположение, что лимитирующей стадией процесса микросомального окисления является атака субстрата в тройном комплексе гидроксиллирующим агентом, сопровождающаяся разрывом атакуемой С—Н-связи [100, 101]. В пользу такого предположения свидетельствуют несколько экспериментальных фактов. Во-первых, как уже отмечалось, при микросомальном окислении в большинстве случаев наблюдаются большие первичные изотопные эффекты (см. табл. 2), что означает разрыв связей С—Н в молекуле субстрата в лимитирующей стадии реакции. Если бы такой разрыв происходил до или после лимитирующей стадии, то нельзя было бы получить значения изотопных эффектов, равные 11÷13.

Во-вторых, существуют так называемые соединения-разобщители, которые эффективно связываются с цитохромом Р-450, но не окисляются микросомами. К числу таких соединений относятся полностью фторированные углеводороды [102—105]; в этом случае связи С—F, отличающиеся большой прочностью, не могут быть разорваны окисляющим агентом в лимитирующей стадии реакции.

В-третьих, нами было показано, что в полной микросомальной системе и при участии гидроперекисей кинетические и энергетические характеристики окисления одного и того же субстрата в обоих случаях часто очень близки или не отличаются совсем. Это может отражать атаку субстрата одним и тем же окисляющим агентом в обеих системах. Однако в гидроперекисном окислении отсутствует необходимость в транспорте двух электронов к окисляющему агенту, так как кислород гидроперекиси уже активирован двумя электронами. Следовательно, в обеих системах может быть одинаковая лимитирующая стадия, связанная с превращением тройного комплекса, содержащего субстрат, цитохром Р-450 и кислород в первом случае и субстрат, цитохром Р-450 и гидроперекись во втором случае. По-видимому, для большинства субстратов это вполне справедливо, хотя нельзя игнорировать возможные отличия при окислении микросомами в полной системе и при участии гидроперекисей. Эти различия обеих систем будут обсуждены в дальнейшем.

В заключении этого раздела необходимо подчеркнуть, что при микросомальном окислении лимитирующая стадия может меняться в зависимости от условий проведения реакций. С этой точки зрения весьма существенно изменение температуры процесса. Микросомальные фосфолипиды при температурах 17—20° претерпевают фазовые превращения, которые сказываются на энергетических характеристиках окисления одних и тех же субстратов: энергии активации окисления субстратов первого типа выше температур фазового перехода меняются в пределах 9÷14 ккал/моль; при температурах ниже точки фазового перехода энергии активации возрастают до 17÷25 ккал/моль [106]. Излом на зависимостях констант скорости окисления от температуры в точках, соответствующих фазовым переходам микросомальных фосфолипидов, может означать смену лимитирующей стадии процесса: выше точки излома в условиях повышенной подвижности цитохрома Р-450 и редуктазы их взаимодействие облегчается и не лимитирует скорости окисления; ниже точки фазового перехода жидкокристаллическое состояние липидов мембраны затрудняет контакт двух ферментов и стадия восстановления цитохрома Р-450 редуктазой может лимитировать скорость всего процесса. Поэтому энергии активации ниже точки излома могут относиться к стадии восстановления цитохрома Р-450 редуктазой, в то время как энергии активации выше точки излома могут

относиться к другой стадии, например к распаду тройного комплекса с образованием продукта реакции или к разрыву связи C—H гидроксилирующим агентом в тройном комплексе.

### III. АВТООКИСЛЕНИЕ ГЕМОПРОТЕИДОВ

Сравнительный анализ автоокисления гемопротеидов полезен с двух точек зрения: во-первых, автоокисление миоглобина и гемоглобина является единственным путем активации молекулярного кислорода этими белками, во-вторых, сопоставление скоростей автоокисления гемопротеидов дает возможность оценить роль аксальных лигандов и структуры апофермента в активации кислорода гемопротеидами. В табл. 4

ТАБЛИЦА 4

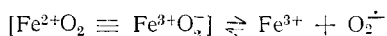
Характеристики оксигенированных комплексов гемопротеидов

Системы	$\lambda_{\text{макс}}, \text{нм}$	$E^*, \text{ккал/моль}$	Ссылки
S—P-450 <sub>нам</sub> —O <sub>2</sub>	418, 552	17,0; 18,0	[19, 35, 36]
P-450 <sub>кам</sub> —O <sub>2</sub>	—	24,0; 14,5	[19, 35, 36]
S—P-450 <sub>сес</sub> —O <sub>2</sub>	414	—	[38]
P-450-LM <sub>2</sub> —O <sub>2</sub>	420, 557	9,6	[37]
Гемоглобин—O <sub>2</sub>	412, 542, 577	17,7	[29, 107]
Миоглобин—O <sub>2</sub>	417, 544, 582	—	[29]

\* E — энергия активации окисления.

приведены некоторые характеристики оксигенированных комплексов гемопротеидов.

Как видно из табл. 4, оксигенированные комплексы пяти гемопротеидов характеризуются сходными спектрами поглощения. Все перечисленные белки автоокисляются. Показано, что при окислении цитохромов P-450<sub>нам</sub> и P-450-LM<sub>2</sub> образуются суперокисные анионы O<sub>2</sub><sup>-</sup> [108—111]. Несколько неожиданно, что при автоокислении цитохрома P-450-LM<sub>4</sub> из микросом печени кроликов, получавших β-нафтофлафон, обнаружить анион O<sub>2</sub><sup>-</sup> прямыми методами не удалось [112]. Некоторые авторы ошибочно приписывали аниону O<sub>2</sub><sup>-</sup> роль гидроксилирующей частицы в микросомальном окислении на том основании, что процессы окисления ингибируются супероксид-дисмутазой и комплексами меди, которые могут моделировать этот фермент [113]. Детальное исследование ингибирования окисления диметиланилина ионами и комплексами Cu<sup>2+</sup> с тирозином и лизином показало, что роль соединений меди сводится к взаимодействию с анионом O<sub>2</sub><sup>-</sup> и к сдвигу равновесия вправо [114]:



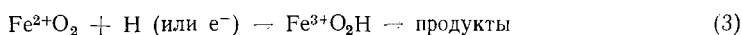
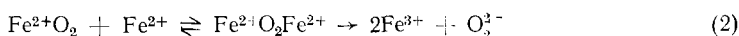
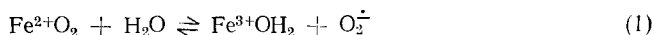
Этот процесс приводит к непродуктивному расходованию оксигенированного цитохрома P-450 и конкурирует с восстановлением последнего вторым электроном, т. е. снижает концентрацию гидроксилирующих частиц в системе и тем самым замедляет окисление. Соединения меди вступают также в другие реакции, которые вместе с обсужденной выше, обуславливают сложный смешанный тип ингибирования при окислении диметиланилина микросомами печени кролика [114].

Миоглобин и гемоглобин автоокисляются очень медленно, что неудивительно, так как их главная функция состоит в переносе молекулярного кислорода, а не в его активации. Тем не менее многократно показано, что при окислении миоглобина и гемоглобина образуются анионы O<sub>2</sub><sup>-</sup> [81]. Автоокисление белков-переносчиков кислорода давно привлекает внимание исследователей [115]. В настоящее время вполне возможно обсуждение основных путей автоокисления миоглобина и гемоглоби-

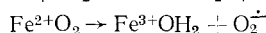
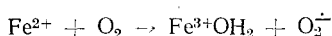
Окислительно-восстановительные потенциалы ( $E_0'$ ) гемопротейдов и качественное сравнение устойчивости их оксигенированных комплексов  $Fe^{2+} + O_2$  ( $K$ )

Гемопротейд	$E_0'$ , В, pH 7	$K$	Ссылки
Гемоглобин	+0,2	очень устойчив	[115]
Миоглобин	+0,1	очень устойчив	[115]
Пероксидаза репы, P <sub>7</sub>	—0,12	устойчив в течение 20 мин	[115]
Пероксидаза хрена	—0,25	быстро окисляется, не обнаружен	[115]
S—P-450 <sub>кам</sub>	—0,17	очень быстро окисляется	[19, 35, 36]
P-450 <sub>кам</sub>	—0,27	устойчив только при —30°	[19, 35, 36]

на. Имеются три механизма окисления этих белков:

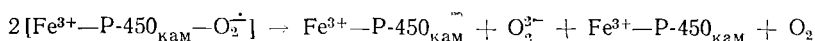


Реакция (1) является важной стадией автоокисления железопорфиринов, но образованию  $O_2^-$  или  $HO_2^-$  препятствует гидрофобное окружение внутри белка. Сопоставление соответствующих окислительно-восстановительных потенциалов показывает, что реакции простых ионов являются эндотермическими и по этой причине едва ли могут быть основным путем автоокисления миоглобина и гемоглобина при pH 7



Реакция (1) может стать главной при автоокислении гемоглобина, если будет существенно снижен окислительно-восстановительный потенциал пары  $Fe^{2+}/Fe^{3+}$ . Такое снижение потенциала возможно при замене гистидила в пятом аксиальном положении на другой лиганд, например тирозил или цистеинил, что наблюдается в некоторых мутантных гемоглобинах. Однако не только аксиальный лиганд может снизить окислительно-восстановительный потенциал гемопротейда; это способен сделать сам белок. Действительно, миоглобин, гемоглобин и пероксидаза имеют одинаковый пятый аксиальный лиганд — гистидин, однако отличаются разными окислительно-восстановительными потенциалами и, как следствие, разной автоокисляемостью оксигенированных комплексов (табл. 5). Из табл. 5 следует, что автоокисляемость оксигенированных гемопротейдов возрастает с понижением окислительно-восстановительного потенциала, который сильно снижается при замене пятого лиганда (гистидина у миоглобина, гемоглобина и пероксидазы) на цистеин (у цитохромов P-450).

Реакция (2) для белковых железопорфиринов маловероятна, так как белок препятствует димеризации оксигенированной формы с другой молекулой порфирина, однако такая димеризация наблюдается для небелковых железопорфиринов. Следует отметить, что дисмутация двух комплексов  $Fe^{2+} - P-450_{\text{кам}} - O_2$  доказана для бактериальной гидроксилирующей системы [19]:

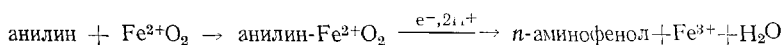


Это возможно только в случае ассоциации двух молекул цитохрома P-450<sub>кам</sub>, которая не исключена.

Чаще всего окисление оксигенированного миоглобина и гемоглобина происходит с участием донора атома водорода или электрона (реакция (3)). В качестве таких доноров могут выступать нитрит [116], фенол [116], 1-нафтол [107], анилин [30], фенилгидразин [117] и другие органические и неорганические восстановители. Показано, что оксигемо-

глобин окисляет эти восстановители по радикальному механизму [107, 118]. Энергия активации окисления 1-нафтола оксигемоглобином составляет 17,7 ккал/моль [107]. В отсутствие доноров электронов оксигемоглобин достаточно устойчив и для генерирования аниона  $O_2^{\cdot-}$  приходится использовать различные воздействия, например импульсный фотолит ( $\lambda = 300$  нм) [119].

Таким образом, оксигемоглобин и оксимиоглобин отличаются в нормальных условиях большой устойчивостью в сравнении с другими оксигенированными гемопротеидами. Предполагается, что эта устойчивость обеспечивается структурой белков-переносчиков кислорода и, в частности, важной ролью дистального гистидина, стабилизирующего кислород путем образования с ним водородной связи [44]. Однако медленное окисление миоглобина и гемоглобина все же происходит, и в оксигенированной крови обычно имеется стационарная концентрация метгемоглобина  $Fe^{3+}OH_2$ , составляющая 1—2%. В присутствии ионов  $H^+$  или доноров электронов окисление гемоглобина ускоряется: так, например, убедительно доказана анилин-гидроксилазная активность эритроцитов. Гемоглобин, который не принято считать ферментом, катализирует окисление анилина в *para*-аминофенол [120]:



Важно отметить, что оксигенированные цитохромы P-450<sub>кам</sub> и P-450-LM<sub>2</sub> не способны окислять свои субстраты [18, 19]. В первом случае для окисления необходим восстановленный путидаредоксин — эффектор окисления камфоры, а во втором случае окисление происходит в присутствии восстановленного цитохрома  $b_5$  [121]. Эта параллель наводит на мысль, что в микросомальной системе цитохром  $b_5$  может играть роль эффектора, аналогичную роли Fe, S-содержащего путидаредоксина в бактериальной системе окисления камфоры. В литературе имеется только одно указание на окисляющую способность оксигенированного цитохрома P-450-LM<sub>2</sub> в отсутствие доноров электронов [122]. Однако, по нашему мнению, эти данные получены при использовании сомнительного анализа продукта реакции и нуждаются в дополнительной проверке.

В заключении этого раздела еще раз подчеркнем, что автоокисление гемопротеидов происходит с образованием аниона  $O_2^{\cdot-}$ , который сам не является гидроксилирующей частицей, но при рекомбинации может образовать перекись водорода — источник активных радикалов-окислителей  $HO^{\cdot}$ . Скорости автоокисления гемопротеидов определяются окислительно-восстановительными потенциалами пары  $Fe^{2+}/Fe^{3+}$  и резко увеличиваются при замене гистидина в пятом аксиальном положении (миоглобин, гемоглобин, пероксидазы) на цистеин (цитохромы P-450). Окислительно-восстановительный потенциал железопорфиринов определяется не только природой пятого аксиального лиганда, но и структурой самого белка. Дистальный гистидин в молекулах миоглобина и гемоглобина, вероятно, в существенной степени стабилизирует оксикомплексы этих кислородпереносящих гемопротеидов, предохраняя их от автоокисления с освобождением токсичного аниона  $O_2^{\cdot-}$ . Активация кислорода в координационной сфере цитохрома P-450 обеспечивается его аномально низким окислительно-восстановительным потенциалом.

#### IV. МЕХАНИЗМЫ КАТАЛИЗА ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ГЕМОПРОТЕИДАМИ

Уже было отмечено, что окисленный цитохром P-450 в сочетании с органическими гидроперекисями катализирует окисление многих субстратов микросомальной системы. После первой работы Кадлубара и сотр. [123], в которой доказана способность микросом печени катализировать реакции окислительного деалкилирования аминов гидроперекисями, выполнено много исследований, обобщенных и обсужденных в обзорах [12, 16, 124]. Известно, что каталитической способностью в пере-

кислом окислении обладают цитохромы P-450-LM<sub>2</sub>, P-450<sub>кар</sub> и некоторые другие [16, 125]. В то же время не удалось обнаружить каталитической активности в перекисном окислении для цитохрома P-450-LM<sub>1</sub> [126, 127]. Круг применяемых окислителей весьма широк и включает кроме органических гидроперекисей (ГПК, ГПТБ), надкислоты, перекись водорода [128], периодат натрия [129], хлорит натрия [130], иодозобензол [70], иодозобензолдиацетат [131] и N-окись пиридина [132]. Число реакций, катализируемых цитохромом P-450 при использовании окислителей перекисной и неперекисной природы также велико: окисление ароматических соединений [106, 133—140], окислительное O- и N-деалкилирование эфиров и третичных аминов [123, 130, 141—148], эпоксицирование циклогексена [100], окисление насыщенных и алициклических соединений [149—151] и окисление алифатических спиртов [152].

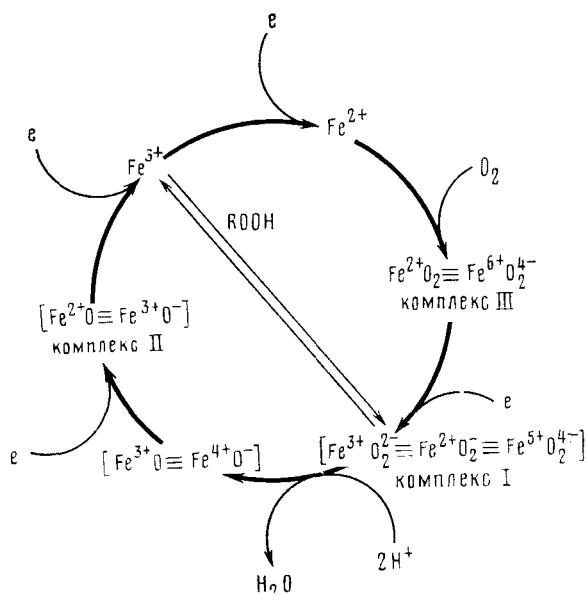


Рис. 3

Таким образом, все реакции, катализируемые микросомальным цитохромом P-450 в полной системе, могут проходить в присутствии перекисей [16, 18]. Важное место принадлежит перекисному окислению липидов микросомальных мембран, в котором могут играть существенную роль реакции инициирования радикалов при взаимодействии перекисей липидов с гемопротейдами мембран. Образование перекисей липидов подробно изучено [5]. В микросомальной фракции существуют две системы перекисного окисления ненасыщенных жирных кислот: неферментативная, в которой восстановление железа происходит под действием аскорбиновой кислоты, и ферментативная, использующая в качестве восстановителя НАДФН. В качестве индуцирующих центров выступает эндогенное железо гемов. Рассмотрение важного класса реакций перекисного окисления липидов выходит за рамки этого обзора, так как представляет самостоятельный интерес. Отметим здесь только, что реакции перекисей липидов с цитохромом P-450 могут стать важным источником генерирования активных радикалов RO<sup>•</sup> и RO<sub>2</sub><sup>•</sup> по механизмам, подробно обсужденным в дальнейшем. На первых этапах работы несколько групп исследователей предполагали, что окисляющим агентом в перекисном окислении является комплекс I (рис. 3), аналогичный хорошо известному промежуточному комплексу при реакциях пероксидаз, каталаз и хлорпероксидазы [100, 133—143]. Образование комплекса I в гидроперекисной системе и его сравнение с образованием этого же агента в полной микросомальной системе показаны на рис. 3. В пользу такой аналогии свидетельствует несколько важных экспериментальных дан-

Спектральные характеристики комплексов гемопротеидов с гидроперекисями

Гемопротеид	Перекись	$\lambda_{\text{макс}}$ , нм	$\lambda_{\text{мин}}$ , нм	$K_S$ , ммоль/л	Ссылки
Микросомы	ГПК	441	422	—	[154]
То же	Гидроперекись тетралина	380, 440	420	—	[160]
»	ГПТВ	380, 440	418	—	[160]
»	ГПК	380, 440	418	—	[136]
»	ГПК	440	418	0,043	[161]
Цитохром Р-450-LM <sub>2</sub>	ГПК	440	413—415	0,120	[162]
Цитохром Р-450-LM <sub>2</sub>	ROOH *	436—440	418	—	[128]
Цитохром с	ГПК	433	413	0,083	[163]
Гемоглобин	ГПК	425	405	0,100	[164]

\* Здесь использованы замещенные надбензойные кислоты, замещенные ГПК и замещенные гидроперекиси бензила;  $K_S$  — константа диссоциации комплексов.

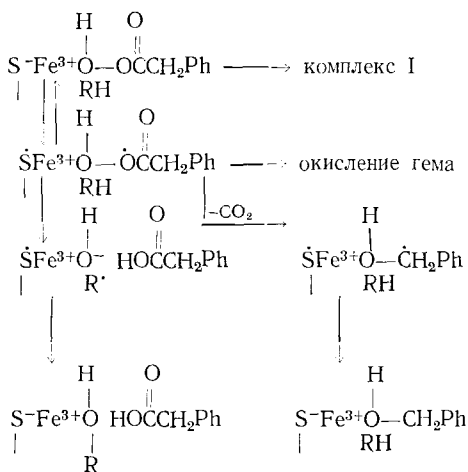
ных. Во-первых, при взаимодействии гидроперекисей с микросомами или с высокоочищенным цитохромом Р-450-LM<sub>2</sub> зарегистрированы разностные спектры, идентичные спектрам комплекса I некоторых пероксидаз (например цитохром с пероксидазы) [153]. В табл. 6 представлены характеристики разностных спектров комплексов гидроперекисей с цитохромом Р-450 и другими гемопротеидами. Во-вторых, при смешении микросом с ГПК зарегистрирован спектр ЭПР образующего соединения с *g*-фактором 2,0, т. е. образуется частица радикального характера, аналогичная комплексу I [154]. В-третьих, при окислении 4-Н<sup>3</sup>-ацетанилида в гидроперекисной системе получены те же величины НН-сдвига, что и в полной микросомальной системе, т. е. механизм внедрения атома кислорода в ацетанилид в обоих случаях идентичен [155]. В-четвертых, как уже отмечалось, при окислении многих субстратов в полной и гидроперекисной системах получены близкие или идентичные кинетические и энергетические параметры для окисления одного и того же субстрата в обеих системах [18, 100, 101]. Все перечисленные факты подтверждают высказанную несколькими авторами гипотезу о сходном механизме окисления в полной и гидроперекисной системе [16, 100, 146] и позволяют предположить существование в обеих системах одного и того же гидроксидирующего агента — оксенонда  $[\text{Fe}^{3+}\text{O} \leftrightarrow \text{Fe}^{4+}\text{O}^-]$ , аналогичного комплексу I пероксидаз и каталаз. Однако в последнее время получен ряд результатов, которые свидетельствуют о более сложном механизме гидроперекисного окисления и о возможных различиях гидроксидирующего агента и комплекса I.

Использование спектрофотометрии и метода остановленного потока позволило детально изучить взаимодействие большого числа замещенных надбензойных кислот, производных ГПК и производных гидроперекиси бензила с цитохромом Р-450-LM<sub>2</sub> и реконструировать абсолютные спектры поглощения образующихся промежуточных соединений [128]. В результате получены спектры, заметно отличающиеся для разных перекисей. Абсолютный спектр поглощения смеси метаклорнадбензойной кислоты с цитохромом Р-450-LM<sub>2</sub> характеризуется, в частности, максимумами при 375, 425 и 540 нм. Этот спектр существенно отличается от известных спектров для комплексов I: комплексы I пероксидазы и каталазы имеют максимум поглощения при 400 нм, а комплекс I хлорпероксидазы — при 395 нм [74, 156, 157]. Зарегистрированный для цитохрома Р-450 комплекс аналогичен комплексу I цитохром с-пероксидазы ( $\lambda_{\text{мин}} = 419$  нм) [153] и комплексу II для пероксидазы хрена ( $\lambda_{\text{макс}} = 420$  нм) [156]. Второе существенное отличие комплексов цитохрома Р-450 с гидроперекисями от комплексов I пероксидаз и каталаз состоит в ки-

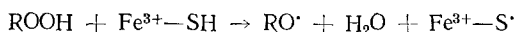
нетике и стехиометрии образования [128]. Пероксидазы и каталазы реагируют с  $\text{H}_2\text{O}_2$  или гидроперекисями ( $\text{ROOH}$ ) в стехиометрии 1:1 и их реакция считается необратимой. Правда, в самое последнее время показано, что образование комплекса I и комплекса II пероксидазами может быть обратимым процессом: комплекс I может быть восстановлен до ферри-пероксидазы в две стадии с промежуточным образованием комплекса II при использовании в качестве восстановителя  $\text{K}_2\text{IrCl}_6$  [158]. Кун и сотр. [128] показали, что процесс взаимодействия гидроперекисей с цитохромом P-450 сложен и состоит, по крайней мере, из двух обратимых стадий



Здесь С — фермент-субстратный комплекс, а Д — неустойчивое соединение, регистрируемое, как предполагают авторы, спектрально. Отношение констант скорости  $k_1/k_2$  сильно зависит от типа гидроперекисей и коррелирует с их гидрофобностью [128]. Показано также, что значения констант скорости  $k_3$  и  $k_4$  определяются структурой перекисей, а спектры соединения Д отличаются для разных перекисей, т. е. природа перекиси сильно сказывается на взаимодействии с цитохромом P-450 и на характеристиках промежуточно образующихся соединений. Это привело авторов работы [12] к выводу, что промежуточный комплекс цитохрома P-450 с  $\text{ROOH}$  отличается от комплекса I пероксидаз и каталаз. В связи с этим авторы [12] предложили новую схему перекисного окисления, отличающуюся тем, что в тройном комплексе субстрат — P-450 —  $\text{ROOH}$  происходит гомолитический разрыв связи  $\text{O}—\text{OR}$ , и окисляющим агентом является алкоксильный радикал из гидроперекиси  $\text{RO}^\bullet$  (рис. 4). Гомолитический путь разрыва связи  $\text{O}—\text{OR}$  подтвержден при исследовании взаимодействия цитохрома P-450- $\text{LM}_2$  и P-450<sub>нам</sub> с фенилнадуксеной кислотой [125]. В пользу гомолиза связи  $\text{O}—\text{OR}$  свидетельствует катализированное цитохромом P-450 декарбоксилирование фенилнадуксеной кислоты:

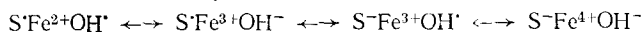


В схеме перекисного окисления [128] (рис. 4) важная роль отводится тиоловому лиганду цитохрома P-450. Возможное участие этого лиганда в гомолитическом распаде гидроперекисей было предположено нами ранее [139]:



Термохимический расчет показывает, что такая реакция при благоприятных условиях сольватации вполне возможна при температурах, близких к физиологическим [159]. Тиоловый лиганд фактически является донором электрона, облегчающим гомолитический разрыв связи  $\text{O}—\text{OR}$ . Образующийся после гомолиза связи  $\text{O}—\text{OR}$  комплекс может

быть эквивалентен комплексу II пероксидаз и каталаз:



Возможно, что регистрируемое спектрально промежуточное соединение при смешении ROOH и цитохрома P-450 представляет собой именно комплекс II: не случайно максимумы поглощения у комплекса II пероксидаз и смеси цитохрома P-450 с ROOH совпадают (420 нм) [156].

Не отрицая возможность гомолитических реакций распада органических гидроперекисей в присутствии цитохрома P-450, доказанную в ряде работ [125, 139, 159], сделаем все же ряд существенных замечаний, касающихся интерпретации данных, полученных Куном и сотр. [12, 128]. Во-первых, спектры поглощения комплексов I для пероксидаз и цитохрома P-450 не обязательно должны совпадать между собой, более того, они должны отличаться так как гидроперекиси становятся лиган-

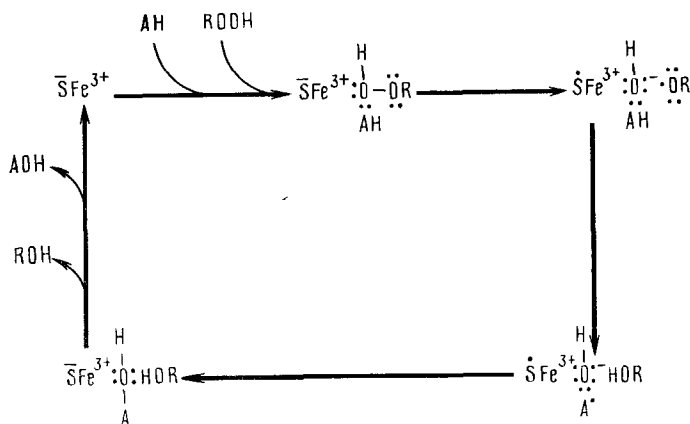


Рис. 4

дом гемопротеида, занимая шестое координационное положение, в то время как в пятом аксиальном положении у пероксидаз находится гистидин, а у цитохрома P-450 — цистеин. Различия лигандов вполне достаточны, чтобы объяснить различие спектров комплексов I для разных гемопротеидов. Из табл. 6 следует, что природа пятого лиганда ответственна за разницу дифференциальных спектров поглощения комплексов ROOH с цитохромом с и гемоглобином, с одной стороны, и цитохромами P-450, с другой стороны. Во-вторых, образование комплексов I пероксидаз может быть обратимым, так же как и взаимодействия ROOH с цитохромом P-450 [158]. В-третьих, окисление циклогексена в системе микросомы — ГПТБ приводит к образованию окиси циклогексена, что не согласуется с радикальной схемой процесса [100]. В-четвертых, при окислении меченого ацетанилида получены одинаковые величины NН-сдвига в полной и гидроперекисной системе, что подтверждает сходство механизмов в обоих случаях. Учитывая все имеющееся в настоящее время данные, можно утверждать, что в гидроперекисных системах кроме реакций по оксеноидному пути, сходных с реакциями в полной системе, происходят также радикальные процессы, которые ответственны в ряде случаев за окисление некоторых субстратов и за деструкцию цитохрома P-450. К числу процессов, где радикальные стадии могут превалировать, относится N-деалкилирование третичных аминов, эффективно замедляемое ингибиторами радикальных процессов — 1-нафтолом и др. [69], окисление спиртов [14, 155]. В то же время окисление ароматических соединений и эпоксилирование олефинов происходит по оксеноидному пути, рассмотренному во втором разделе обзора. Следует отметить, что некоторые наиболее реакционноспособные ароматические соединения могут окисляться одновременно по двум направлениям — оксеноидному и радикальному. Вероятно, именно так окисляется бензо[а]пирен в гидроперекисных системах [165]; оксеноидный путь

ТАБЛИЦА

Каталитические свойства гемопротеидов в окислении органических соединений перекисями и некоторыми другими окислителями неперекисной природы [16]

Реакции	Гемопротеиды, проявляющие каталитическое действие *	Ссылки	Гемопротеиды, не проявляющие каталитических свойств	Ссылки
N-деалкилирование аминов	цитохром P-450 (ROOH, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	[123, 141—145]	цитохром P-420	[123]
То же » »	каталаза (ROOH, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) пероксидаза (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) гемоглобин (ГПК, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	[123] [167] [168]	То же » »	[123] [123] [123]
O-деалкилирование эфиров	цитохром P-450 (ГПК, ГИТБ, C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> IO)	[146—148]	гемин, каталаза	[146]
То же	То же	[146—148]	пероксидаза, миоглобин, цитохром P-420	[146]
Гидроксилирование ароматических соединений	цитохром P-450 (ROOH, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	[100, 133—140]	гемин, каталаза	[133]
	гемоглобин (ГПК)	[169]	пероксидаза, миоглобин, цитохром, b <sub>5</sub> , цитохром P-420	[133]
	цитохром c (ГПК)	[163]	То же	[133]
Окисление стероидов	цитохром P-450 (ROOH, NaClO <sub>4</sub> , C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> IO, NaClO <sub>2</sub> )	[129, 170—173]	пероксидаза, каталаза, метмиоглобин	[129]
Окисление спиртов	цитохром P-450 (ROOH, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	[152]	пероксидаза	[152]
То же	каталаза (ROOH, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	[152]	цитохром c	[152]

\* Здесь в скобках указаны примененные окислители.

реакции ведет к образованию эпоксидов, а радикальные процессы приводят к накоплению фенолов и хинонов. Утверждения авторов [165] о принципиальной разнице механизмов окисления бензо[а]пирена в полной системе и при участии ГПК, построенные на различии продуктов реакции в обеих системах, слишком категоричны: просто в гидроперекисной системе в дополнение к оксеноидному пути реализуется еще один путь реакции — радикальный.

Другие гемопротеиды также могут катализировать реакции перекисного окисления некоторых субстратов (табл. 7), хотя не все реакции, свойственные цитохрому P-450, ускоряются другими железопорфиринами: пероксидаза не может окислять насыщенные соединения и спирты, а цитохром P-420 не способен участвовать ни в одной из приведенных в табл. 7 реакций. Как объяснить различную реакционную способность и отличия в механизмах реакций перекисного окисления с участием разных гемопротеидов? Первая стадия процесса одинакова для всех гемопротеидов — образование комплексов с перекисями (см. табл. 6). В табл. 6 отсутствуют данные для известных реакций пероксидаз и каталаз с гидроперекисями. Комплексы ROOH с разными гемопротеидами различаются параметрами разностных спектров поглощения — сказыва-

вается различие аксиальных лигандов в пятом положении. Кроме аксиальных лигандов важную роль в комплексообразовании между ROOH и гемопротеидами могут играть аминокислотные остатки в активных центрах. Предполагается, что в комплексе ROOH с гемопротеидами весьма существенна роль водородных связей, образуемых карбоксильными группами аминокислот и дистальным гистидином [16] (рис. 5). Важная роль в гетеролитическом расщеплении связи O—OR цитохром

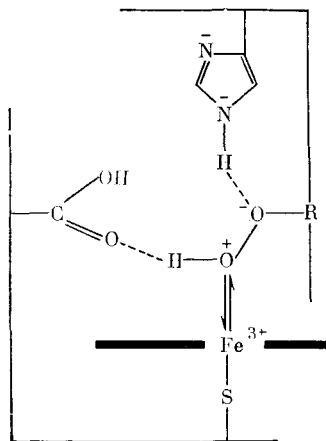


Рис. 5

*c*-пероксидазой отводится дистальному гистидину-52, аргинину-48 и триптофану-51 [166] (рис. 6). Как видно из рис. 6, дистальный гистидин-52 является своеобразным кислотно-основным катализатором, остаток аргинина-48 стабилизирует заряд, а стабилизацию гемового железа в высокой степени окисления осуществляет проксимальный гистидин-174, т. е. активный центр пероксидазы непосредственно участвует в образовании комплекса I. Известно также, что аспартат-43 пероксидазы хрена включается своей карбоксильной группой в образование комплекса с

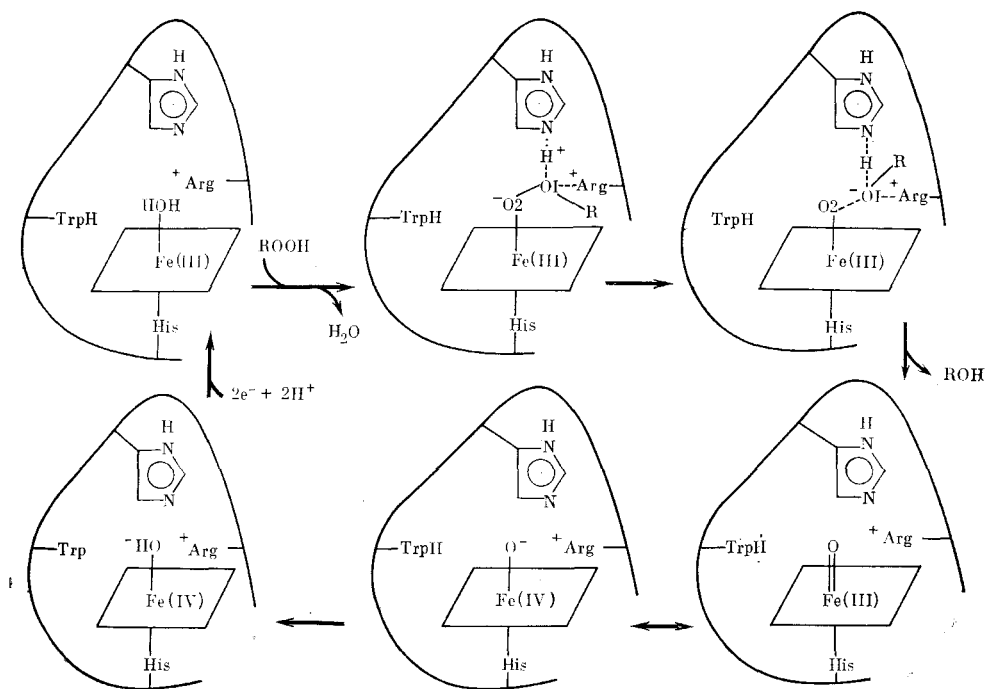


Рис. 6

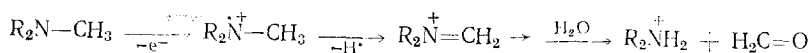
Системы окислительного деалкилирования N-алкиламинов, обнаружившие признаки радикальных реакций

Гемопротеид	Окислитель	Субстрат	Ссылки
Пероксидаза хрена	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	аминопирин	[167, 179]
То же	То же	ДМА	[180]
»	»	ДПТ	[180, 181]
Метмиоглобин	H <sub>2</sub> O	аминопирин	[179]
Метмиоглобин	ГПК	аминопирин	[182]
Метгемоглобин	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	ДМА	[168, 180]
Метгемоглобин	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	ДПТ	[180]
Метгемоглобин	ГПК	ДМА	[168]
Каталаза	ГПК	ДМА	[168]
Протогемин	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	аминопирин	[179]
Цитохром Р-450 из ФБ-микро- сом печени кролика	ГПК	аминопирин	[178]
Микросомы печени крысы	ГПК	ДМА	[168]
ФБ-микросомы печени кролика	ГПК	ДМА	[69]
Цитохром Р-450-LM <sub>2</sub> из ФБ-мик- росом печени кролика	ГПК	ДМА	[69]

Примечание. ДМА — N,N-диметиланилин; ДПТ — N,N-диметил-*p*-толуидин; ФБ — индуцированные фенобарбиталом натрия микросомы.

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [174]. В молекуле миоглобина глицерин Е8 занимает то же место, что аспартат-43 в молекуле пероксидазы хрена, поэтому миоглобин не образует комплекса I в отличие от пероксидазы [174]. Таким образом, несмотря на то, что все гемопротеиды образуют комплексы с ROOH, не все из них способны генерировать комплекс I из-за различий в структуре активного центра.

Координация гидроперекисей по шестому положению гемопротеидов хорошо известна [16, 175, 176]. Судьба комплексов гидроперекисей с гемопротеидами может быть различной: пероксидазы и каталазы образуют комплекс I, миоглобин не дает такого комплекса. Для некоторых гемопротеидов доказано образование радикалов при их взаимодействии с гидроперекисями. Регистрация хемилюминесценции низкой интенсивности в результате рекомбинации перекисных радикалов ROO<sup>•</sup> показала, что такие радикалы образуются при взаимодействии гидроперекисей с цитохромом с, миоглобином, метгемоглобином и пероксидазой хрена [177], т. е. в перечисленных случаях возможны радикальные стадии при окислении внесенных в систему субстратов. В настоящее время есть возможность сравнить эффективности разных гемопротеидов в реакциях окислительного деалкилирования N-алкиламинов и обсудить различия в механизме их действия (табл. 8). Наиболее эффективна в окислении аминов перекисью водорода пероксидаза хрена [167], а каталаза наиболее активна в окислении диметиланилина гидроперекисью кумила [168]. В системе H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> — пероксидаза при окислении аминопиринна методом ЭПР обнаружены катион-радикалы субстрата [167]. Окисление аминопиринна в системах ГПК — цитохром Р-450 и ГПК — миоглобин происходит с одинаковой эффективностью и сопровождается образованием радикалов субстрата [178]. Гриффин и сотр. [179] считают, что все реакции окислительного деалкилирования аминов, перечисленные в табл. 8, проходят по радикальному механизму. Гриффин предложила следующую схему окислительного деалкилирования N-алкиламинов [179]:



Отличительной чертой этой схемы является радикальное протекание процесса и включение в формальдегид атома кислорода из воды, а не из

Спектральные параметры комплексов анилина с гемопротеидами

Гемопротеид	$\lambda_{\text{макс}}$ , нм	$\lambda_{\text{мин}}$ , нм	$K_S$ , ммоль/л	Ссылки
Цитохром Р-450:				
в ФБ-микросомах	431	398	0,60	[160]
в МХ-микросомах	431	399	0,027	[160]
в микросомах	429, 440	385, 397	0,160	[160]
Р-450-LM <sub>2</sub> из микросом кролика	433	412	3,230	[162]
Р-450-LM <sub>4</sub> из микросом кролика	427	391	1,430	[162]
Цитохром с	421—417	401—399	24÷13	[183]
То же	420	405	24*	[163]
Гемоглобин человека	425	405	$K_R$ 75 $K_T$ 260 $K_S$ 105	[30]
Гемоглобин лошади	425	405	$K_R$ 33 $K_T$ 125 $K_S$ 53	[164]

\* Значение получено при pH 5,8, остальные значения  $K_S$  для комплекса анилин — цитохром с получены при разных pH.

молекулы  $O_2$ . Нами получено подтверждение радикальных стадий реакций при окислении диметиланилина гидроперекисью кумила с участием микросом, цитохрома Р-450-LM<sub>2</sub> [69] и гемоглобина [168] с применением ингибитора радикальных процессов — 1-нафтола. Сложный характер ингибирования окисления ДМА 1-нафтолом согласуется с возможной ролью радикальных реакций при перекисном окислении с участием ГПК и гемоглобина, каталазы или цитохрома Р-450.

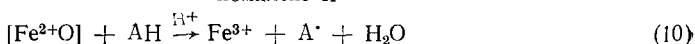
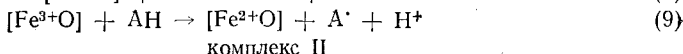
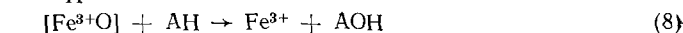
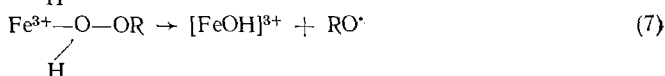
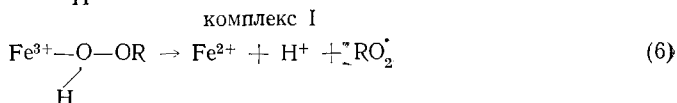
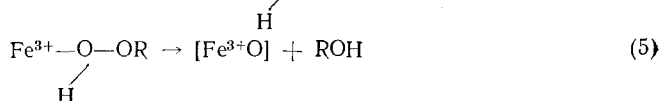
Таким образом, в реакциях окислительного деалкилирования N-алкиламинов гидроперекисями с участием пероксидазы хрена, миоглобина, гемоглобина, каталазы, протогемина и цитохрома Р-450 наблюдаются радикальные стадии. При окислении аминопирина радикалы зарегистрированы методом ЭПР [182], а при окислении диметиланилина констатируется эффективное ингибирование процесса антиоксидантом — 1-нафтолом [69, 168].

Нами проведено систематическое сравнительное кинетическое исследование окисления анилина гидроперекисью кумила с участием цитохрома Р-450 [69, 106, 136], гемоглобина [169] и цитохрома с [163]. Анилин образует комплексы с тремя гемопротеидами (табл. 9). Наиболее прочные комплексы образуются между цитохромом Р-450 и анилином. Отличие разностных спектров комплексов цитохрома Р-450 и цитохрома с связано с разной природой аксиальных лигандов в пятом положении (см. табл. 1). При взаимодействии анилина с гемоглобином наблюдается аллостерический эффект и комплексы в этом случае охарактеризованы тремя константами диссоциации —  $K_R$ ,  $K_T$  и  $K_S$ . Все три гемопротеида эффективно катализируют окисление анилина в парааминофенол. 1-Нафтол ингибирует все три реакции, но не останавливает их до конца. Реакции с участием цитохрома с и гемоглобина идут по радикальному механизму, в то время как в реакции, катализированной цитохромом Р-450, на наш взгляд, возможны не только радикальные стадии, но и оксеноидный путь [69].

На реакции гидроперекисного окисления ДМА ингибирующее действие оказывает  $CuCl_2$  и комплексы меди с лизином и тирозином [144]. Ингибирование окисления ДМА солью  $CuCl_2$  в процессе с участием ГПК и цитохрома Р-450-LM<sup>2</sup> носит неконкурентный характер, в то вре-

мя как комплексы меди с лизином и тирозином ингибируют этот процесс по смешанному типу. Ингибирующее действие соединений меди на окисление ДМА гидроперекисью кумила объясняется разрушением гидроперекиси по реакции Габера — Вайсса с образованием радикалов  $RO\cdot$  и  $RO_2\cdot$ , разрушающих цитохром Р-450. Хлорид меди в концентрации  $\sim 0,001$  л/моль и выше денатурирует цитохром Р-450 в отсутствие ГПК [144].

На основании приведенных в этом разделе данных можно обсудить сходство и различия при гидроперекисном окислении с участием цитохрома Р-450 и других гемопротенидов [16, 18]. Эти процессы характеризуются такой последовательностью реакций:



Как уже отмечалось, все гемопротениды (исключение цитохром Р-450- $LM_4$ ) образуют комплексы с  $ROOH$  (4). Далее пероксидазы, каталазы и цитохром Р-450 образуют комплекс I (5). Миоглобин, гемоглобин и цитохром с, по-видимому, комплекса I не образуют из-за отличий структуры активного центра от структуры пероксидаз, каталаз и цитохрома Р-450. Параллельно с образованием комплекса I (там, где это происходит) протекают реакции распада комплексов гемопротенидов с  $ROOH$  на радикалы (6) и (7). Все гемопротениды без исключения могут генерировать радикалы  $RO\cdot$  и  $RO_2\cdot$ , способные окислять большинство субстратов монооксигеназ и разрушать порфириновое кольцо гемопротенидов [16, 159]. Реакции (5), с одной стороны, и (6), (7), с другой стороны, зависят от типа гемопротенида. Для миоглобина, гемоглобина и цитохрома с превалирующими являются реакции (6), (7), а для цитохрома Р-450, пероксидаз и каталаз главной является реакция (5), т. е. одна группа гемопротенидов (миоглобин, гемоглобин и цитохром с) разрушает гидроперекиси по гомолитическому механизму, в то время как другая (цитохром Р-450, пероксидазы и каталазы) расщепляют связь  $O-OR$  в основном по гетеролитическому механизму с образованием комплекса I. Присутствие субстратов цитохрома Р-450 (анилин, ДМА, нафталин) и ингибиторов радикальных реакций (1-нафтол, замещенные фенолы) подавляет реакции (6) и (7) и способствует удельному росту процесса (5) [16, 139].

Механизм окисления комплексов I определяется, в первую очередь, природой гемопротенида и, во вторую очередь, природой субстрата. Комплекс I пероксидаз и каталаз характеризуется наличием иона железа в высокой степени окисления ( $Fe^{4+}$ ) и отличается способностью к одноэлектронным процессам окисления, так как является радикалом (реакция (9)). В результате реакции (9) образуется комплекс II, который в свою очередь окисляет еще одну молекулу субстрата  $AH$ . Активность комплексов I пероксидаз и каталаз достаточно велика и эти комплексы легко окисляют множество субстратов — фенолы, амины и т. д. [27, 28], но не способны разорвать прочные  $C-H$ -связи насыщенных углеводов, которые не являются субстратами пероксидаз и каталаз.

Комплекс I цитохромов Р-450 способен одновременно к двухэлектронным реакциям окисления (оксеноидный или гидроксилазный механизм) и к одноэлектронным реакциям окисления (радикальный или пероксидазный механизм). Можно предположить, что реакционная способность комплекса I цитохромов Р-450 выше, чем реакционная способность этого же комплекса у пероксидаз и каталаз, т. е. ион железа комплексов I цитохрома Р-450 может находиться в более высокой степени окисления, чем ион железа в комплексах I пероксидаз и каталаз. Состояние железа в повышенной степени окисления в комплексе I цитохрома Р-450 стабилизируется не только порфириновым кольцом, как в пероксидазах [73, 74], но и тиоловым лигандом в пятом координационном положении. Главное отличие цитохрома Р-450 от других гемопротеидов, обуславливающее его уникальные свойства, состоит в возможности стабилизировать комплекс I двумя путями — с участием порфиринового кольца и тиолового лиганда. Соотношение радикальных и гетеролитических стадий при окислении комплексом I цитохрома Р-450 определяется природой субстрата: N-алкиламины, насыщенные углеводороды, эфиры, спирты окисляются по радикальному механизму, в то время как ароматические соединения, олефины окисляются в основном по оксеноидному гетеролитическому пути, т. е. с переходом двух электронов от субстрата на комплекс I одновременно. Разумеется, в ряде случаев возможно параллельное протекание реакций одноэлектронного и двухэлектронного окисления. Вероятно, это имеет место при окислении бензо[a]пирена и циклогексена гидроперекисями: аренокси бензо[a]пирена и окись циклогексена образуются по оксеноидному механизму, а фенолы бензо[a]пирена и 2-циклогексенол образуются по радикальному механизму. Третичные амины легко отдают один электрон многим окислителям и поэтому окисляются в основном по радикальному механизму, который предложен и обоснован Гриффин [179], с промежуточным образованием относительно устойчивого иминиум-катиона  $R_2N^+=CH_2$ , который в водной среде превращается во вторичный амин и формальдегид.

В табл. 10 суммированы сведения о характере окисления разных субстратов перекисями с участием различных гемопротеидов. Гемопротеиды разделены нами на три группы: реакции миоглобина, метгемоглобина и цитохрома с проходят *только по радикальному пути* с участием радикалов  $RO^\bullet$  и  $RO_2^\bullet$ ; вторая группа гемопротеидов — пероксидазы и каталазы катализируют реакции по радикальному механизму с участием комплексов I этих белков, и, наконец, третью группу составляют цитохромы Р-450, которые в зависимости от природы субстратов могут превращать их по гетеролитическому пути с участием комплексов I (циклогексен, нафталин, анилин, бензо[a]пирен) или по радикальному пути с участием того же комплекса I и радикалов  $RO^\bullet$  и  $RO_2^\bullet$  (ДМА, аминопирин, циклогексан, кумол, этилбензол, спирты, камфора).

Как видно из табл. 10, имеются субстраты с «амфотерными» свойствами, способные окисляться одновременно по двум путям — гомолитическому и гетеролитическому (бензо[a]пирен и, возможно, другие ароматические углеводороды). Из приведенных нами данных следует, что универсального механизма катализа перекисного окисления гемопротеидами не существует. Механизм перекисных реакций гемопротеидов определяется несколькими факторами:

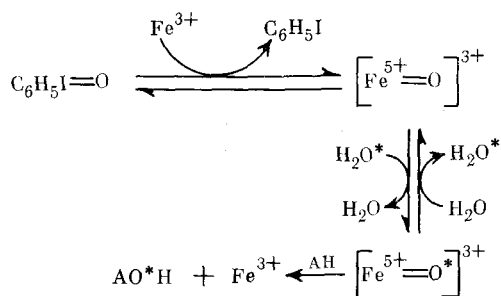
1. Природой гемопротеида, строением его активного центра и пятым аксиальным лигандом.
2. Природой окисляемого субстрата, его способностью к одноэлектронным или двухэлектронным редокс-превращениям, прочностями разрываемых связей C—H для углеводородов или окислительно-восстановительным потенциалом для N-алкиламинов.
3. Природой применяемого окислителя.

Последнее положение подтверждается различным поведением в реакциях окисления с участием цитохрома Р-450 таких окислителей,

Реакции в системах ROOH-гемопротеиды

Системы	Возможные окисляющие агенты	Субстраты	
		одноэлектронные реакции	двухэлектронные (оксеноидные) реакции
Миоглобин+ГПК	RO <sup>•</sup> , RO <sub>2</sub> <sup>•</sup>	аминопирин [182]	нет
Гемоглобин+ГПК	То же	аминопирин [182]	нет
То же	»	анилин [169]	нет
»	»	ДМА [168]	нет
Цитохром с+ГПК	»	анилин [163]	нет
Пероксидаза+H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	[Fe <sup>3+</sup> +O]	аминопирин [167]	нет
То же	То же	ДМА [180]	нет
Каталаза+ГПК	»	ДМА [168]	нет
Цитохром Р-450 из микросом печени+ROOH	[Fe <sup>3+</sup> +O], RO <sup>•</sup> , RO <sub>2</sub> <sup>•</sup>	ДМА [69]	циклогексен [100]
То же	То же	аминопирин [178]	нафталин [100]
»	»	циклогексан [125]	анилин [69]
»	»	кумол [125]	—
»	»	этилбензол [125]	—
»	»	бензо[а]пирен [165]	бензо[а]пирен [165]
»	»	спирты [152]	—
Цитохром Р-450 <sub>кам</sub> + фенилнадуксусная кислота	[Fe <sup>3+</sup> +O], RO <sup>•</sup> , RO <sub>2</sub> <sup>•</sup>	камфора [125]	—

как перекись водорода, органические гидроперекиси [12, 128] и иодозобензол [184]. Недавно показано, что при окислении камфоры иодозобензолом с участием цитохрома Р-450<sub>кам</sub> при использовании H<sub>2</sub><sup>18</sup>O кислород поступает в продукт окисления не из окислителя, а из воды [184]. Авторы [184] предполагают, что в присутствии Р-450<sub>кам</sub> иодозобензол образует уникальный оксеноид, способный к быстрому обмену своего кислорода с водой:



Изотопный обмен иодозобензола с водой в отсутствие цитохрома Р-450<sub>кам</sub> не происходит. По нашему мнению, возможен другой механизм, объясняющий результаты работы: цитохром Р-450 катализирует распад иодозобензола с образованием атома кислорода, высокая реакционная способность которого объясняет его быстрый изотопный обмен с H<sub>2</sub><sup>18</sup>O. Гидроксилирующим агентом может быть атом кислорода <sup>18</sup>O, обладающий высокой гидроксилирующей способностью [18].

\* \* \*

В заключении следует отметить, что для окончательного установления механизмов каталитического действия гемопротеидов в реакциях окисления необходима дальнейшая работа в нескольких направлениях: проведение сравнительного изучения окисления широкого круга субст-

ратов с участием разных гемопротендов в сопоставимых условиях, отыскание новых подходов к изучению промежуточных стадий процессов с участием цитохрома Р-450 с целью выяснения природы и строения гидроксигирующего агента. Установление природы активных частиц в микросомальном окислении откроет возможность направленного поиска простых каталитических химических систем, способных заменить уникальный гемопротеид, цитохром Р-450, и создать процессы окисления, не уступающие по своей эффективности и селективности ферментативным.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Biological-Hydroxylation Mechanisms. Eds Boyd G. S., Smellie R. M. S. New York — London: Acad. Press, 1972. 240 p.
2. Molecular Mechanisms of Oxygen Activation. Ed. Hayaishi. New York — London: Acad. Press, 1974. 613 p.
3. Cytochromes P-450 and B<sub>5</sub>. Structure, Function and Interaction, v. 58. Eds. Cooper D. Y., Rosenthal O., Snyder R., Witmer C. New York — London: Plenum Press, 1975. 537 p.
4. Ахрем А. А., Метелица Д. И., Скурко М. Е. Успехи химии, 1975, т. 44, с. 868.
5. Арчаков А. И. Микросомальное окисление. М.: Наука, 1975. 327 с.
6. The Structural Basis of Membrane Function. Eds. Hateli Y., Djavadi-Ohanience L. New York — San Francisco — London: Acad. Press, 1976, p. 409.
7. Iron and Copper Proteins. Eds. Yasunobu K. T., Mower H. F., Hayaishi O. New York — London: Plenum Press, 1976. 588 p.
8. In: Cytochrome P-450 — Structural Aspects. Eds. Coon M. J., Gunsalus I. C. Maricic S. Croatica Chem. Acta, 1977, v. 49, p. 163—388.
9. Ляхович В. В., Цырлов И. Б. Структурные аспекты биохимии монооксигеназ. Новосибирск: Наука, 1978. 236 с.
10. Ruckpaul K., Janig G.-R., Pfeil D., Honeck H., Rein H., Ristau O. Jung Chr. Pharmazie, 1978, B. 33, S. 308—311.
11. Guengerich F. P. Pharmacol. Ther., 1979, v. 6, p. 99.
12. White R. E., Coon M. J. Ann. Rev. Biochem., 1980, v. 49, p. 315.
13. Biochemistry, Biophysics and Regulation of Cytochrome P-450. Eds. Gustafsson J.-A., Carlstedt-Duke J., Mode A., Raftar J. Amsterdam: Elsevier, 1980. 626 p.
14. Метелица Д. И., Попова Е. М. Биохимия 1979, т. 44, с. 1923.
15. Головенко Н. Я. Механизмы реакций метаболизма ксенобиотиков в биологических мембранах. Киев: Наукова Думка, 1981. 219 с.
16. Метелица Д. И. Успехи химии, 1981, т. 50, с. 2019.
17. Mannering G. J. In: Concepts in Drug Metabolism, B. Eds. Jenner P., Testa B. New York: Marcel Dekker, 1981, p. 53.
18. Метелица Д. И. Активация кислорода ферментными системами. М.: Наука, 1982. 254 с.
19. Gunsalus I. C., Meeks J. R., Lipscomb J. D., Debrunner P., Munck E. In: Molecular Mechanisms of Oxygen Activation. Ed. Hayaishi O. New York: Acad. Press, 1974, p. 559.
20. Rein H., Ristau O. Pharmazie, 1978, B. 33, S. 325.
21. Blank J., Smeltan G. Ibid., 1978, B. 33, S. 321.
22. Estabrook R. W., Hildebrandt A., Baron J., Netter K., Leibman K. Biochem. Biophys. Res. Commun., 1971, v. 42, p. 312.
23. French J. S., Coon M. J. Arch. Biochem. Biophys., 1979, v. 195, p. 565.
24. Vermillion J. L., Ballou D. P., Massey V., Coon M. J. J. Biol. Chem., 1981, v. 256, p. 266.
25. Katagiri M., Takemori S., Itagaki E., Suhara K., Gomi T., Sato H. In: Iron and Copper Proteins. Eds. Yasunobu K. T., Mower H. F., Hayaishi O. New York — London: Plenum Press, 1976, p. 281—289.
26. Номенклатура ферментов. Ред. Браунштейн А. Е. М.: ВИНТИ, 1979, с. 34.
27. Yamazaki Y., Yokota K. Mol. Cell Biochem., 1973, v. 2, p. 39.
28. Саундерс Б. К. В кн.: Неорганическая биохимия. Т. 2. М.: Мир, 1978, с. 397.
29. Волькенштейн М. В. В кн.: Молекулярная биофизика. М.: Наука, 1975, с. 421.
30. Miesal J. J., Blumer J. L. J. Biol. Chem., 1976, v. 251, p. 3442.
31. Полторак О. М., Чухрай Е. С. В кн.: Физико-химические основы ферментативного катализа. М.: Высшая школа, 1971, с. 210.
32. Bakes W. L., Sligar S. G., Schenkman J. B. Biochem. Biophys. Res. Commun., 1980, v. 97, p. 860.
33. Gunsalus I. C., Tyson C. A., Tsai R., Lipscomb J. D. Chem.-Biol. Interactions, 1971, v. 4, p. 75.
34. Ishimura Y., Ullrich V., Peterson J. A. Biochem. Biophys. Res. Commun., 1971, v. 42, p. 140.
35. Debey P., Balny C., Douzou P. FEBS Letters, 1976, v. 69, p. 231.
36. Balny C., Debey P., Douzou P. Ibid., 1976, v. 69, p. 236.
37. Bonfils C., Debey P., Maurel P. Biochem. Biophys. Res. Commun., 1979, v. 88, p. 1301.
38. Larroque Ch., Van Lier J. E. FEBS Letters, 1980, v. 115, p. 175.

39. Guengerich F. P., Ballou D. P., Coon M. J. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1976, v. 70, p. 951.
40. Weiss J. J. *Nature*, 1964, v. 203, p. 83, 183.
41. Ei-Ichiro-Ochiai, J. *Inorg. Nucl. Chem.*, 1974, v. 36, p. 2129.
42. Jung Chr., Friedrich J., Ristau O. *Acta biol. med. Germ.*, 1979, B. 38, S. 363.
43. Maggiora G. M., Viale R. O., Ingraham L. L. In: *Oxidases and Related Redox Systems*, v. 1. Eds King T. E., Mason H. S., Morrison M. New York: John Wiley, 1965, p. 88.
44. Pauling L. *Nature*, 1964, v. 203, p. 182.
45. Zerner M., Gouterman M. *Theoret. Chim. Acta*, 1966, v. 4, p. 44.
46. Griffith J. S. *Proc. Roy. Soc.*, 1956, v. A235, p. 23.
47. Watson H. C., Nobbs C. L. *Coll. Gesellschaft Biol. Chem.*, XIX Mosbach. Berlin: Springer Verlag, 1968.
48. Hillebrandt A., Estabrook R. W. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1971, v. 143, p. 66.
49. Jansson I., Schenkman J. B. *Mol. Pharmacol.*, 1973, v. 9, p. 840.
50. Ахрем А. А., Усанов С. А., Метелица Д. И. Докл. АН БССР, 1978, т. 22, с. 275.
51. Noshiro M., Omura T. *J. Biochem.*, 1978, v. 83, p. 61.
52. Sasame H. A., Gillette J. R., Boyd M. R. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1978, v. 84, p. 389.
53. Noshiro M., Harada N., Omura T. *Ibid.*, 1979, v. 91, p. 207.
54. Imai Y., Salo R. *Ibid.*, 1977, v. 75, p. 420.
55. Imai Y. *J. Biochem.*, 1979, v. 86, p. 1697.
56. Sugiyama T., Miki N., Yamano T. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1979, v. 90, p. 715.
57. Morgan E. T., Koop D. P., Coon M. J. *Federat. Proc.*, 1981, v. 40, p. 697.
58. Brunström A., Ingelman-Sundberg M. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1980, v. 95, p. 431.
59. Sugiyama T., Miki N., Yamano T. *J. Biochem.*, 1980, v. 87, p. 1457.
60. Miki N., Sugiyama T., Yamano T. *Ibid.*, 1980, v. 88, p. 307.
61. Ingelman-Sundberg M., Johansson J. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1980, v. 97, p. 582.
62. Ingelman-Sundberg M., Johansson J., Bruström A., Ekström G., Haaparanta T., Rydström J. In: *Biochemistry, Biophysics and Regulation of Cytochrome P-450*. Ed. Gustafsson J.-A. Amsterdam: Elsevier, 1980, p. 299.
63. Vatsis K. P., Gurka D. P., Hollenberg P. F. *Ibid.*, 1980, p. 347.
64. Noshiro M., Ruf H.-H., Ullrich V. *Ibid.*, 1980, p. 351.
65. Bonjils C., Balny C., Maurel P. *J. Biol. Chem.*, 1981, v. 256, p. 9457.
66. Курченко В. П., Усанов С. А., Метелица Д. И. Изв. АН БССР. Сер. хим., 1982, № 2, с. 71.
67. Hui Bon Hoa, Begard E., Debey P., Gunsalus I. C. *Biochemistry*, 1978, v. 17, p. 2835.
68. Метелица Д. И. III Всесоюз. конф. по механизмам каталитических реакций. Тезисы докладов. Новосибирск: Наука, 1982, с. 214.
69. Курченко В. П., Усанов С. А., Метелица Д. И. Изв. АН БССР, Сер. хим., 1981, № 6, с. 78.
70. Lichtenberger F., Nastanczyk W., Ullrich V. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1976, v. 70, p. 939.
71. Groves J. T., Nemo T. E., Meyers R. J. *Amer. Chem. Soc.*, 1979, v. 101, p. 1032.
72. Chang C. K., Kuo M.-S. *Ibid.*, 1979, v. 101, p. 3413.
73. Kaneko Yo., Tamura M., Yamazaki I. *Biochemistry*, 1980, v. 19, p. 5795.
74. Dolphin D., Forman A., Borg D. C., Fajer J., Felton R. H. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1971, v. 68, p. 614.
75. Hamilton G. A. In: *Molecular Mechanisms of Oxygen Activation*. Ed. Hayaishi O. New York — London: Acad. Press, 1974, p. 405.
76. Нефедов О. М., Иоффе А. И. ЖВХО им. Д. И. Менделеева, 1974, т. 19, с. 305.
77. Иоффе Б. В., Семенов В. П., Оглоблин К. А. Там же, 1974, т. 19, с. 314.
78. Метелица Д. И. Дис. на соискание уч. ст. докт. хим. наук. Черногловка: Институт химической физики АН СССР, 1975. 259 с.
79. Sligar S. G., Kennedy K. A., Pearson D. C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1980, v. 77, p. 1240.
80. Денисов Е. Т., Мицкевич И. И., Агабеков В. Е. В кн.: *Механизм жидкофазного окисления кислородсодержащих соединений*. Минск: Наука и техника, 1975, с. 139.
81. Sugawara Y., Shikama K. *Europ. J. Biochem.*, 1980, v. 110, p. 241.
82. White R. E., Groves J. T., McClusky G. A. *Acta biol. med. Germ.*, 1979, B. 38, S. 475.
83. Elison C., Elliot H. W., Look M., Rapoport H. *J. Med. Chem.*, 1962, v. 6, p. 237.
84. McMahon R. E., Sullivan H. R., Craig J. C., Pereira W. E. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1969, v. 132, p. 575.
85. Ullrich V. *Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem.*, 1969, B. 350, S. 357.
86. Hamberg M., Bjorkhem J. *J. Biol. Chem.*, 1971, v. 246, p. 7411.
87. Daly J. W. In: *Handbook of Experimental Pharmacology*, v. 28/2. Berlin: Springer Verlag, 1971, p. 284.
88. Bjorkhem J., Hamberg M. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1972, v. 47, p. 333.
89. Bjorkhem J. *Europ. J. Biochem.*, 1971, v. 18, p. 299.
90. Hendersoon P. Th., Vree T. B., Ginneken C. A. M., van Rossum J. M. *Xenobiotica*, 1974, v. 4, p. 121.
91. Mitoma C., Yasuda D., Tagg J., Tanabe M. *Biochim. Biophys. Acta*, 1967, v. 136, p. 566.

92. Foster A. B., Jarman M., Stevens J. D., Thomas P., Westwood J. H. Chem.-Biol. Interactions, 1974, v. 9, p. 327.
93. Tomaszewski J., Jerina D. M., Daly J. W. Biochemistry, 1975, v. 14, p. 2024.
94. Hjelmeland L., Aronow L., Trydell J. R. Biochem. Biophys. Res. Commun., 1977, v. 76, p. 546.
95. Billings R. E., McMahon R. E. Mol. Pharmacol., 1978, v. 14, p. 145.
96. Miwa G. T., Garland W. A., Hodgson B. J., Lu A. Y. H. Federat. Proc., 1978, v. 37, p. 1758.
97. Groves J. T., McClusky G. A., White R. E., Coon M. J. Biochem. Biophys. Res. Commun., 1978, v. 81, p. 154.
98. Lu A. Y. H., Walsh J., Miwa G. T. Abstracts V Internat. Symposium on Microsomes and Drug Oxidations. Tokyo, 1981, p. 9.
99. Imai Y., Sato R., Lyanagi T. J. Biochem., 1977, v. 82, p. 1237.
100. Akhrem A. A., Metelitz D. I., Bielski S. M., Kiselev P. A., Skurko M. E., Usanov S. A. Croatica Chem. Acta, 1977, v. 49, p. 223.
101. Metelitz D. I., Akhrem A. A., Belski S. M., Bokut S. B., Usanov S. A. In: Industrial and Environmental Xenobiotics. Eds. Fouts J. R., Gut I. Amsterdam: Excerpta Medica, 1978, p. 40.
102. Narasimhulu S. Arch. Biochem. Biophys., 1971, v. 147, p. 384.
103. Ribbons D. W., Onta J. FEBS Letters, 1970, v. 12, p. 105.
104. Ullrich V., Diehl H. Chem.-Biol. Interactions, 1971, v. 3, p. 310.
105. Ullrich V., Diehl H. Europ. J. Biochem., 1971, v. 20, p. 509.
106. Ахрем А. А., Еремин А. Н., Усанов С. А., Метелица Д. И. Биохимия, 1978, т. 43, с. 1578.
107. Метелица Д. И., Попова Е. М. Там же, 1980, т. 45, с. 1379.
108. Sligar S. G., Lipscomb J. D., Debrunner P. G., Gunsalus I. C. Biochem. Biophys. Res. Commun., 1974, v. 61, p. 290.
109. Lipscomb J., Sligar S., Namtvedt M., Gunsalus I. C. J. Biol. Chem., 1976, v. 251, p. 1116.
110. Sasame H. A., Mitchell J. R., Gillette J. R. Federat. Proc., 1975, v. 34, p. 729.
111. Kulhan H., Tsai H., Graf H., Ullrich V., Werringloer J., Estahrook R. W. FEBS Letters, 1978, v. 91, p. 343.
112. Oprian D. D., Coon N. J. In: Biochemistry, Biophysics and Regulation of Cytochrome P-450. Eds. Gustafsson J.-A. Amsterdam: Elsevier, 1980, p. 323.
113. Richter C., Azzi A., Wendel A. FEBS Letters, 1976, v. 64, p. 332.
114. Kurchenko V. P., Usanov S. A., Metelitz D. I. React. Kinet. Catal. Letters, 1979, v. 12, p. 31.
115. В кн.: Методы и достижения бионеорганической химии. Ред. МакОлифф К. М.: Мир, 1978, с. 183.
116. Wallace W. J., Caughey W. Biochem. Biophys. Res. Commun., 1975, v. 62, p. 681.
117. Misra H. P., Fridovich I. Biochemistry, 1976, v. 15, p. 681.
118. Castro C. E., Wade R. E., Belser N. O. Ibid., 1978, v. 17, p. 225.
119. Demma L. S., Sathany J. M. J. Biol. Chem., 1977, v. 252, p. 1226.
120. Blisard K. S., Mieyal J. J. Ibid., 1979, v. 254, p. 5104.
121. Oprian D. D. Abstracts V Internat. Symposium on Microsomes and Drug Oxidations. Tokyo, 1981, p. 7.
122. Bonfils C., Anderson K. K., Maurel P., Debey P. J. Mol. Catal., 1980, v. 7, p. 209.
123. Kadlubar F. F., Morton K. C., Ziegler D. M. Biochem. Biophys. Res. Commun., 1973, v. 54, p. 1255.
124. O'Brien P. J. Pharmacol. Ther. A, 1978, v. 2, p. 517.
125. White R. E., Sligar S. G., Coon M. J. J. Biol. Chem., 1980, v. 255, p. 11108.
126. Курченко В. П., Усанов С. А., Метелица Д. И. Биохимия, 1981, т. 46, с. 1035.
127. Курченко В. П., Усанов С. А., Метелица Д. И. Там же, 1981, т. 46, с. 2202.
128. Blake R. C., Coon M. J. J. Biol. Chem., 1980, v. 255, p. 4100.
129. Hryciay E. G., Gustafsson J.-A., Ingelman-Sundberg M., Ernster L. Biochem. Biophys. Res. Commun., 1975, v. 66, p. 209.
130. Nordbloom G. D., White R. E., Coon N. J. Arch. Biochem. Biophys., 1976, v. 175, p. 524.
131. Gustafsson J.-A., Rondahl L., Bergman J. Biochemistry, 1979, v. 18, p. 865.
132. Sligar S. G., Kennedy K. A., Pearson D. C. In: Oxidases and Related Redox Systems. Eds. King T. E., Mason H. S., Morrison M. Baltimore: Univ. Park Press, 1980.
133. Rahimtula A. D., O'Brien P. J. Biochem. Biophys. Res. Commun., 1974, v. 60, p. 440.
134. Ахрем А. А., Абедиович М. Л., Дворников С. С., Усанов С. А., Метелица Д. И. Бионеорганич. химия, 1976, т. 2, с. 549.
135. Akhrem A. A., Usanov S. A., Dvornikov S. S., Metelitz D. I. React. Kinet. Catal. Letters, 1977, v. 6, p. 187.
136. Akhrem A. A., Bokut S. B., Metelitz D. I. Biochem. Biophys. Res. Commun., 1977, v. 77, p. 20.
137. Akhrem A. A., Bokut S. B., Metelitz D. I. Chem.-Biol. Interactions, 1977, v. 18, p. 195.
138. Ахрем А. А., Бокуть С. Б., Метелица Д. И. Биохимия, 1977, т. 42, с. 2110.
139. Metelitz D. I., Akhrem A. A., Erjomin A. N., Kisel M. A., Usanov S. A. Acta biol. med. Germ., 1979, B. 38, S. 511.
140. Ахрем А. А., Кисель М. А., Усанов С. А., Метелица Д. И. Докл. АН БССР, 1979, т. 23, с. 282.
141. Ахрем А. А., Бельский С. М., Метелица Д. И. Изв. АН БССР. Сер. хим., 1976, № 6, с. 73.

142. Scheller F., Renneberg R., Mohr P., Janig G.-R., Ruckpoul K. FEBS Letters, 1976, v. 71, p. 309.
143. Ахрем А. А., Бельский С. М., Метелица Д. И. Биохимия, 1978, т. 43, с. 216.
144. Курченко В. П., Усанов С. А., Метелица Д. И. Там же, 1980, т. 45, с. 1312.
145. Metelitz D. I., Erjomin A. N., Kurchenko V. P., Usanov S. A. In: Biochemistry, Biophysics and Regulation of Cytochrome P-450. Ed. Gustafsson J.-A. Amsterdam: Elsevier, 1980, p. 291.
146. Rahimtula A. D., O'Brien P. J. Biochem. Biophys. Res. Commun., 1975, v. 62, p. 268.
147. Ахрем А. А., Абелиович М. Л., Метелица Д. И. Биохимия, 1977, т. 42, с. 1978.
148. Duppel W., Ullrich V. Biochim. Biophys. Acta, 1976, v. 426, p. 399.
149. Ellin A., Orrenius S. FEBS Letters, 1975, v. 50, p. 378.
150. Gustafsson J.-A., Bergman J. Ibid., 1976, v. 70, p. 276.
151. Akhrem A. A., Skurko M. E., Metelitz D. I. React. Kinet. Catal. Letters, 1976, v. 4, p. 25.
152. Rahimtula A. D., O'Brien P. J. Europ. J. Biochem., 1977, v. 77, p. 201.
153. Yonetani T., Ray G. S. J. Biol. Chem., 1965, v. 240, p. 4509.
154. Rahimtula A. D., O'Brien P. J., Hrycaj E. G., Peterson J. A., Estabrook R. W. Biochem. Biophys. Res. Commun., 1974, v. 60, p. 695.
155. Rahimtula A. D., O'Brien P. J., Seifried H. E., Jerina D. M. Europ. J. Biochem., 1978, v. 89, p. 133.
156. Hewson W. D., Hager L. P. J. Biol. Chem., 1979, v. 254, p. 3182.
157. Hollenberg P. F., Rand-Meir T., Hager L. P. Ibid., 1974, v. 249, p. 5816.
158. Hayashi Yu., Yamazaki I. Ibid., 1979, v. 254, p. 9101.
159. Ахрем А. А., Еремин А. Н., Усанов С. А., Метелица Д. И. Биофизика, 1980, т. 25, с. 75.
160. Ахрем А. А., Дворников С. С., Усанов С. А., Метелица Д. И. Изв. АН БССР. Сер. хим., 1976, № 5, с. 93.
161. O'Brien P. J., Rahimtula A. D. In: Biochemistry, Biophysics and Regulation of Cytochrome P-450. Ed. Gustafsson J.-A. Amsterdam: Elsevier, 1980, p. 273.
162. Еремин А. Н., Усанов С. А., Метелица Д. И., Ахрем А. А. Биоорганич. химия, 1980, т. 6, с. 757.
163. Метелица Д. И., Киселев П. А., Киселева С. Н. Кинетика и катализ, 1980, т. 21, с. 1436.
164. Герман С. Ю. Диссер. на соискание уч. ст. канд. хим. наук, Минск: ИВХ АН БССР, 1977, с. 76.
165. Capdevila J., Estabrook R. W., Prough R. A. Arch. Biochem. Biophys., 1980, v. 200, p. 186.
166. Poulos T. L., Kraut J. J. Biol. Chem., 1980, v. 255, p. 8199.
167. Griffin B. W. FEBS Letters, 1977, v. 74, p. 139.
168. Ахрем А. А., Бельский С. М., Метелица Д. И. Изв. АН БССР. Сер. хим., 1978, № 1, с. 87.
169. Akhrem A. A., German S. Ya., Metelitz D. I. React. Kinet. Catal. Letters, 1978, v. 8, p. 217.
170. Hrycaj E. G., Gustafsson J.-A., Ingelman-Sundberg M., Ernster L. FEBS Letters, 1975, v. 56, p. 161.
171. Hrycaj E. G., Gustafsson J.-A., Ingelman-Sundberg M., Ernster L. Europ. J. Biochem., 1976, v. 61, p. 43.
172. Gustafsson J.-A., Hrycaj E. G., Ernster L. Arch. Biochem. Biophys., 1976, v. 174, p. 440.
173. Ingelman-Sundberg M. Biochim. biophys. acta, 1977, v. 488, p. 225.
174. Dunford H. B., Arais T. Biochem. Biophys. Res. Commun., 1979, v. 89, p. 764.
175. George P., Tsou C. L. Biochem. J., 1952, v. 50, p. 440.
176. Tsou C. L. Ibid., 1952, v. 50, p. 493.
177. Cadenas E., Boveris A., Chance B. Ibid., 1980, v. 187, p. 131.
178. Griffin B. W., Marth Ch., Yasukochi Yu., Masters B. S. S. Arch. Biochem. Biophys., 1980, v. 205, p. 543.
179. Griffin B. W., Ting P. L. Biochemistry, 1978, v. 17, p. 2206.
180. Griffin B. W. Arch. Biochem. Biophys., 1978, v. 190, p. 850.
181. Ashley P. L., Davis D. K., Griffin B. W. Biochem. Biophys. Res. Commun., 1980, v. 97, p. 660.
182. Griffin B. W., Ting P. L. FEBS Letters, 1978, v. 89, p. 196.
183. Ахрем А. А., Тищенко Е. И., Киселев П. А., Метелица Д. И. Биохимия, 1978, т. 43, с. 2033.
184. Heinbrook D. C., Sligar S. G. Biochem. Biophys. Res. Commun., 1981, v. 99, p. 530.

Институт биоорганической химии  
АН БССР, Минск