



УДК 577.158

### КИНЕТИКА ГИДРОКСИЛИРОВАНИЯ НАФТАЛИНА ГИДРОПЕРЕКИСЬЮ ТРЕТИЧНОГО БУТИЛА ПРИ УЧАСТИИ МИКРОСОМ ПЕЧЕНИ И $\text{MoCl}_5$

*Ахрем А. А., Абелиович М. Л., Дворников С. С.,  
Усанов С. А., Метелица Д. И.*

*Институт биоорганической химии Академии наук БССР, Минск*

При 37° в среде, содержащей трис-НСl-буфер (рН 7,4) и микросомы печени крысы, изучена кинетика гидроксилирования нафталина в  $\alpha$ -нафтол гидроперекисью третичного бутила (ГПТБ). Зависимость скорости реакции от концентраций субстрата, ГПТБ и микросомного белка свидетельствует о возможности образования тройного комплекса субстрат — цитохром P-450 — ГПТБ. Определены величины  $K_m$  по субстрату ( $5,0 \cdot 10^{-4}$  М) и ГПТБ ( $2,85 \cdot 10^{-3}$  М). Методом дифференциальной спектрофотометрии измерена константа диссоциации комплекса цитохрома P-450 с нафталином, равная  $0,67 \cdot 10^{-4}$  М при 20°. Показана гидроксилирующая способность системы ГПТБ —  $\text{MoCl}_5$  по отношению к нафталину и обсужден механизм реакции гидроксилирования системой ГПТБ — микросомы. Предполагается возможная роль высших валентных состояний ионов железа в процессах гидроксилирования микросомными системами.

Ферментная система микросом печени млекопитающих, содержащая цитохром P-450, катализирует гидроксилирование молекулярным кислородом разнообразных субстратов, относящихся к алифатическому, ароматическому и другим классам органических соединений [1]. Один атом молекулы кислорода включается в субстрат лишь после того, как молекула  $\text{O}_2$  присоединяется к восстановленному гемовому железу цитохрома P-450. Активация молекулярного кислорода цитохромом P-450 состоит в передаче первому двух электронов: один электрон получает комплекс субстрата с цитохромом из цепи переноса, специфичной к NADPH, а второй электрон получает тройной комплекс цитохрома с субстратом и кислородом из цепи переноса, специфичной к NADH [2].

Одной из форм активированного кислорода являются гидроперекиси и надкислоты, в которых кислород уже восстановлен двумя электронами. Можно предположить, что такая активная форма кислорода в сочетании с окисленным цитохромом P-450 будет обладать гидроксилирующей способностью. Для проверки этого предположения нами была изучена кинетика гидроксилирования нафталина в  $\alpha$ -нафтол ГПТБ при участии цитохрома P-450 микросом печени крысы.

Опыты при начальных концентрациях ГПТБ (0,01 М) и нафталина AgH (0,001 М) и различных концентрациях белка показали, что начальная скорость окисления нафталина в  $\alpha$ -нафтол линейно растет с увеличением содержания микросомного белка от 0,75 до 2,0 мг/мл и не изменяется при дальнейшем увеличении концентрации белка.

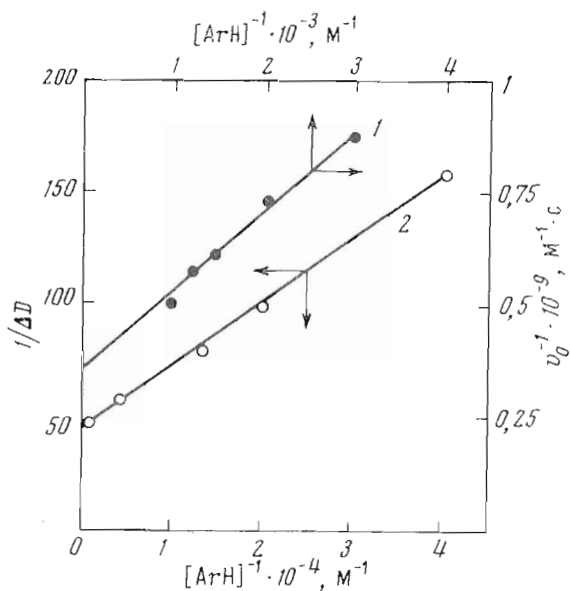


Рис. 1. Зависимость обратной скорости реакции окисления нафталина (1) и обратной величины спектральных изменений (2) от обратной концентрации нафталина. Условия: 1 — 37°,  $[ГПТВ]_0 = 0,01$  М, концентрация микросомного белка 1,83 мг/мл; 2 — 20°, концентрация микросомного белка 3,0 мг/мл, фосфатный буфер, рН 7,5

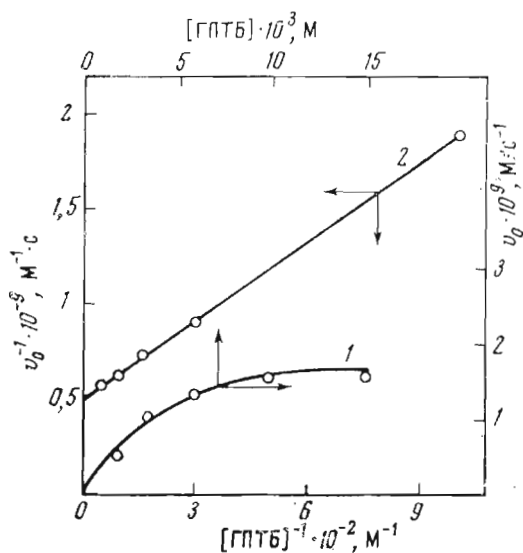


Рис. 2. Зависимость скорости реакции гидроксирования нафталина от концентрации ГПТВ (1) и обратной скорости реакции от обратной концентрации ГПТВ (2). Условия: 37°,  $[ArH]_0 = 5,0 \cdot 10^{-4}$  М, концентрация микросомного белка 1,83 мг/мл

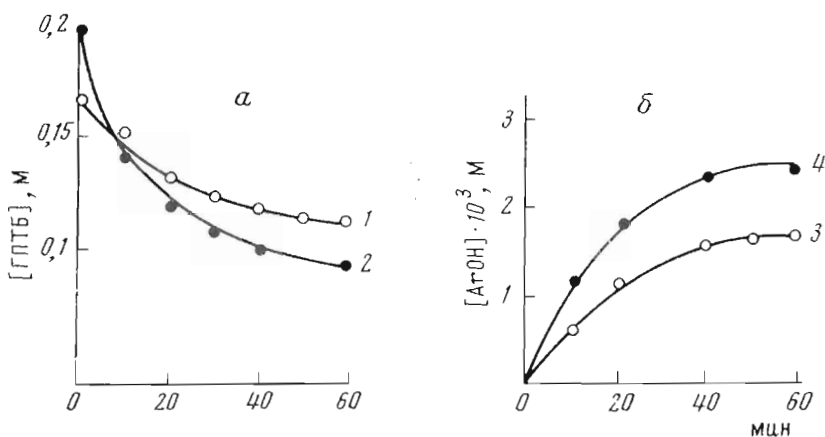


Рис. 3. Кинетические кривые расхода ГПТБ (а) и накопления  $\alpha$ -нафтола (б) при 70 и 79° в ацетонитриле. Условия:  $[\text{ArH}]_0$  0,5 М,  $[\text{MoCl}_5]_0$  0,01 М (70°) и 0,02 М (79°). 1, 3 — 70°; 2, 4 — 79°

Зависимость начальной скорости реакции окисления нафталина  $v_0$  от его начальной концентрации описывается уравнением Михаэлиса — Ментен. Спрямление этой зависимости по методу Лайнуивера — Берка (рис. 1) дало возможность определить величину  $K_m$  ( $5,0 \cdot 10^{-4}$  М) и максимальную скорость реакции  $V$  ( $2,8 \cdot 10^{-9}$  М · с $^{-1}$ ).

На основании зависимости скорости реакции гидроксилирования нафталина от начальной концентрации ГПТБ и спрямления этой зависимости в координатах  $1/v_0 - 1/[\text{ГПТБ}]_0$  (рис. 2) рассчитаны величины  $K_m$  для ГПТБ ( $2,85 \cdot 10^{-3}$  М) и  $V$  ( $2,0 \cdot 10^{-9}$  М · с $^{-1}$ ).

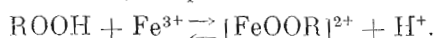
Прямое взаимодействие нафталина с цитохромом Р-450 микросом печени, изученное методом дифференциального спектрофотометрирования, дает характерный дифференциальный спектр с максимумом при 393 нм и минимумом при 424 нм. Зависимость  $\Delta D$ , представляющей собой разность поглощения  $\lambda_{\text{макс}}$  и  $\lambda_{\text{мин}}$ , от концентрации нафталина может быть спрямлена в координатах  $1/\Delta D - 1/[\text{ArH}]_0$  (рис. 1, 2). По данным рис. 1 вычислена константа диссоциации комплекса цитохрома Р-450 с нафталином, равная  $0,67 \cdot 10^{-4}$  М при 20°.

Представляется интересным поиск систем, которые могли бы имитировать характерный для ферментной системы микросом печени перенос кислорода из гидроперекисей в ароматические субстраты. Одной из таких систем является ГПТБ —  $\text{MoCl}_5$  —  $\text{CH}_3\text{CN}$ . При 70 и 79° в ацетонитриле нафталин гидроксилируется в  $\alpha$ -нафтол в присутствии ГПТБ при участии  $\text{MoCl}_5$  (рис. 3). За расходом гидроперекиси в этих опытах следили йодометрически. Хотя выход  $\alpha$ -нафтола (в %) на расходующуюся гидроперекись невелик, факт гидроксилирования нафталина в этих условиях не вызывает сомнений.

Характер кинетических зависимостей скорости окисления нафталина от концентраций субстрата и гидроперекиси (рис. 1 и 2), а также прямое доказательство комплексообразования субстрата с цитохромом Р-450 (рис. 1) свидетельствуют в пользу образования комплекса субстрат — цитохром — гидроперекись, в котором происходит перенос атома кислорода из гидроперекиси в субстрат. Косвенно это подтверждается близостью величин максимальной скорости реакции, полученных в разных сериях опытов:  $2,8 \cdot 10^{-9}$  М · с $^{-1}$  из зависимости скорости реакции от начальной концентрации нафталина и  $2,0 \cdot 10^{-9}$  М · с $^{-1}$  из зависимости скорости реакции от начальной концентрации ГПТБ (рис. 1 и 2). Интересно сопоставить эффективность гидроксилирования нафталина в системах микросомы — ГПТБ и микросомы —  $\text{NADPH} - \text{O}_2$  в идентичных усло-

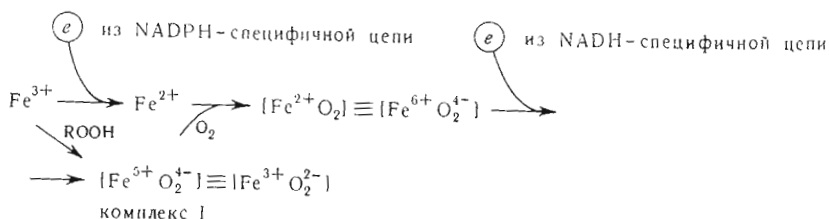
виях. При 37° в среде, содержащей 10% ацетона, при 0,001 М концентрации NADPH максимальная скорость окисления нафталина равна  $8,33 \cdot 10^{-9} \text{ М} \cdot \text{с}^{-1}$  [3], а в аналогичных условиях в системе микросомы — ГПТБ —  $2,8 \cdot 10^{-9} \text{ М} \cdot \text{с}^{-1}$ , т. е. система микросомы — NADPH — O<sub>2</sub> приблизительно в 3 раза эффективнее системы микросомы — ГПТБ в реакции гидроксирования нафталина.

Недавно было показано, что микросомы печени в сочетании с гидроперекисями могут вызывать С-гидроксирование ряда аминов [4], а гидроперекись кумила и микросомы гидроксилируют анилин, бензпирен и кумарин [5, 6]. Таким образом, гидроксилирующая способность систем микросомы — гидроперекиси проявляется по отношению к разным субстратам. Эта гидроксилирующая способность присуща разным гидроперекисям в сочетании с микросомами печени. Представляется важным обсудить природу гидроксилирующего агента, действующего в системах микросомы — гидроперекись. Таким агентом может быть комплекс, образующийся при взаимодействии гидроперекисей ROOH с трехвалентным железом окисленного цитохрома P-450:



Этот комплекс аналогичен хорошо известному в энзимологии комплексу I  $[\text{FeOOH}]^{2+}$ , в котором железо находится в состоянии окисления 5 [7]. Комплекс I образуется в растворах, содержащих ион трехвалентного железа и перекись водорода, и идентифицирован по его спектрам с переносом заряда [7]. Можно предположить, что высшие валентные состояния ионов железа играют важную роль в процессах гидроксирования микросомами в сочетании с гидроперекисями. Это подтверждается сходством спектров ЭПР системы микросомы — гидроперекись кумила и системы перекись водорода — метмиоглобин, в которой высшие состояния окисления иона железа хорошо доказаны [6].

Ниже приведена схема, отражающая активацию кислорода в системах микросомы — NADPH — O<sub>2</sub> и микросомы — гидроперекиси:



Из приведенной схемы следует, что в обеих системах образуется один и тот же активный гидроксилирующий агент — комплекс I, который может быть также активным при действии пероксидаз и каталаз. Интересно отметить, что гидроперекиси обладают гидроксилирующей способностью в сочетании с ионами молибдена, находящегося в одном из высших валентных состояний. Установление природы гидроксилирующих частиц требует дальнейших исследований более широкого круга реакций с участием системы микросомы — гидроперекиси и изучения гидроксилирующих агентов на уровне физикохимии элементарного акта.

### Экспериментальная часть

Микросомную фракцию печени крыс выделяли методом дифференциального центрифугирования [3]. Все опыты проводили при 37°. Инкубационная смесь общим объемом 6 мл содержала трис-HCl-буфер (рН 7,4), 0,6 мл ацетона, различные концентрации ГПТБ и нафталина AgH, а также микросомы в концентрации (по белку) — 1—2 мг/мл. Реакцию

начинали добавлением ГПТБ, проводили в течение 30 мин и останавливали добавлением 0,5 мл 20%-ной трихлоруксусной кислоты. После отделения белка центрифугированием продукт реакции —  $\alpha$ -нафтол — экстрагировали этилацетатом и анализировали фотоэлектроколориметрически (фотоэлектроколориметр ФЭК-56М) в виде азосоединения с серноокислым *n*-сульфофенилдиазонием [3]. Концентрацию микросомного белка определяли по методу Лоури [8].

Дифференциальные спектры поглощения регистрировали в приборах «Uniscam SP-800» и «Uniscam SP-700» в кюветах толщиной 1 см при 20°, используя растворы, содержащие различные концентрации нафталина в фосфатном буфере (рН 7,5) и микросомы (3,0 мг/мл, по белку). Содержание цитохрома P-450 составляло 0,60 нмоль на 1 мг микросомного белка и определялось спектрофотометрически по поглощению комплекса цитохрома с окисью углерода и с использованием коэффициента экстинкции 91  $\text{mM}\cdot\text{cm}^{-1}$  [9].

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Ахрем А. А., Метелица Д. И., Скурко М. Е. (1975) Успехи химии, **44**, 868—896.
2. Biological Hydroxylation Mechanisms (1972) pp. 4—9, Acad. Press., London — New York.
3. Ахрем А. А., Усанов С. А., Метелица Д. И. (1974) Докл. АН СССР, **218**, 1457—1460.
4. Kadlubar F. F., Morton K. C., Ziegler D. M. (1973) Biochem. Biophys. Res. Commun., **54**, 1255—1261.
5. Rahimtula A. D., O'Brien P. (1974) Biochem. Biophys. Res. Commun., **60**, 440—444.
6. Rahimtula A. D., O'Brien P., Hrycaj E. G., Peterson J. A., Estabrook R. W. (1974) Biochem. Biophys. Res. Commun., **60**, 695—702.
7. Ингрэм Л. (1964) Механизмы биохимических реакций, с. 100—103, «Мир», М.
8. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. (1951) J. Biol. Chem., **193**, 265—275.
9. Omura T., Sato R. (1964) J. Biol. Chem., **239**, 2370—2378.

Поступила в редакцию  
16.VI.1975

#### KINETICS OF NAPHTHALENE HYDROXYLATION BY TERTIARY BUTYL HYDROPEROXIDE IN A SYSTEM WITH RAT LIVER MICROSOMES AND $\text{MoCl}_5$

AKHREM A. A., ABELIOVICH M. L., DVORNIKOV S. S.,  
USANOV S. A., METELITZA D. I.

*Institute of Bioorganic Chemistry, Academy of Sciences  
of the BSSR, Minsk*

The kinetics have been measured for naphthalene hydroxylation into  $\alpha$ -naphthol performed by tert-butyl hydroperoxide (TBHP) in a medium containing rat liver microsomes (Tris-HCl, pH 7.4, 37°). The dependence of the reaction rate on the concentrations of the substrate, TBHP and microsomal protein testifies to the formation of the ternary substrate-cytochrome P-450-TBHP complex. The  $K_m$  determined with a substrate is  $5.0\cdot 10^{-4}$  mole/l and that with TBHP constitutes  $2.85\cdot 10^{-3}$  mole/l. The dissociation constant of the cytochrome P-450 complex with naphthalene equals  $0.67\cdot 10^{-4}$  mole/l at 20° C, as measured by difference spectrophotometry method. The hydroxylating activity of the TBHP/ $\text{MoCl}_5$  system with naphthalene is demonstrated. The mechanism of hydroxylation by the TBHP-microsomes system is discussed. A possible involvement of the higher valence states of the iron ions in hydroxylation by microsomal systems is considered.