



УДК 577.158.8:543.42

СПЕКТРАЛЬНЫЕ ПАРАМЕТРЫ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ
ВЫСОКООЧИЩЕННЫХ ФОРМ ЦИТОХРОМА P-450 LM₂
И LM₄ С РАЗЛИЧНЫМИ ЛИГАНДАМИ

Ерелин А. Н., Усанов С. А., Метелица Д. Н., Ахрем А. А.

Институт биоорганической химии Академии наук БССР, Минск

Методом дифференциальной спектроскопии изучено взаимодействие высокоочищенных форм цитохрома P-450 LM₂ и LM₄ из микросом печени кроликов с различными лигандами. Из спектральных данных определены константы диссоциации фермент-субстратных комплексов для лигандов первого типа (бензол, нафталин, циклогексан, диметиланилин), второго (анилин, пиридин, имидазол) и второго модифицированного типа (этанол, изопропанол). Полученные данные обсуждены с точки зрения влияния лигандов на спиновое состояние форм цитохрома P-450. Предложены модели высокоспиновой и низкоспиновой форм цитохрома P-450 LM₂ в свободном состоянии и в комплексе с лигандами различной природы.

Гидроксилирующая ферментная система микросом печени млекопитающих ответственна за метаболизм ядов, лекарств и канцерогенов в организме и содержит в качестве терминальной оксидазы цитохром P-450 [1]. Этот уникальный гемопrotein в окисленном состоянии взаимодействует с соединениями различной химической природы, многие из которых являются субстратами микросомальной гидроксилирующей системы. Все соединения, взаимодействующие с цитохромом P-450, вызывают спектральные изменения трех типов [2—6]: первый характеризуется наличием в дифференциальных спектрах максимума поглощения в области около 390 нм и минимума в области 420 нм; для второго типа характерны максимум около 430 нм и минимум около 390 нм; второй модифицированный тип дифференциальных спектров, который иногда называют обратным первым типом, характеризуется максимумом поглощения около 415 нм и минимумом около 380 нм [6]. К числу лигандов первого типа относятся многие алифатические и ароматические углеводороды, третичные амины, алициклические соединения, большинство которых является субстратами микросомальной гидроксилирующей системы. Лиганды второго типа, как правило, представляют собой амины. Предполагается, что они взаимодействуют непосредственно с гемовым железом цитохрома P-450 и вызывают спектральные изменения, подобные тем, что наблюдаются при реакции аминов с другими ферригемопroteинами [7]. Лиганды второго типа часто не являются субстратами микросомальной гидроксилирующей системы. Второй модифицированный тип спектральных изменений вызывают спирты и карбонилсодержащие соединения [6].

В настоящее время убедительно доказана множественность форм цитохрома P-450 [8]: при индукции ферментной системы фенобарбиталом натрия в печени животных предпочтительно образуется форма цитохрома LM₂, в то время как при индукции β-нафтофлавоном в печени образуется другая форма цитохрома P-450—LM₄, отличающаяся от первой молекулярным весом, аминокислотным составом, субстратной специфичностью и ка-

Спектральные параметры взаимодействия лигандов с LM₂- и LM₄-формами цитохрома P-450

Лиганд	Тип лиганда *	P-450 LM ₂				P-450 LM ₄			
		Макс. кон-центрация лиганда, мМ	$\lambda_{\text{макс}}$, нм	$\lambda_{\text{мин}}$, нм	K_S , мМ	Макс. кон-центрация лиганда, мМ	$\lambda_{\text{макс}}$, нм	$\lambda_{\text{М}^{\text{II}}}$, нм	K_S , мМ
Нафталин	I	1,05	389	423	1,39	1,11	421	389	1,89
Бензол	I	11,40	389	422	—	12,40	420	388	—
Циклогексан	I	29,90	386–387	419–420	—	19,0	Нет	Нет	—
Антипирин	I	2,67	Нет	Нет	—	4,26	»	»	—
Диметиланилин	I	2,29	387	420–421	3,85	2,44	420	393	2,22
Фенацетин	II ^M	1,96	427–429	411–412	—	2,70	424	408	—
Ацетанилид	II ^M	8,31	425	390	4,35	8,67	421	392	—
Этапол	II ^M	1650,0	422	386	540,0	1250,0	421	388	—
Изопропанол	II ^M	1000,0	431	412	540,0	1000,0	423	387–388	—
Нирпидип	II	29,6	433	412	5,35	27,4	427	392–393	58,8
Анилин	II	3,15	433	412	3,23	2,38	427	391	1,43
Имидазол	II	0,89	437	414	0,19	1,64	433	397–399	0,50
Никотинамид	II	2,06	Нет	Нет	—	1,91	Нет	Нет	—
Дитиотреит	—	2,48	468	418–419	5,00	2,17	»	»	—
Гидроперекись кумпла	—	0,42	440	413–415	0,12	0,35	»	»	—

* II^M обозначает второй модифицированный тип спектральных изменений.

Таблица 2

Сравнение величин K_S для формы LM₂ и микросомального цитохрома P-450 из печени крыс, получавших фенобарбитал натрия

Лиганд	K_S , М		Ссылки
	P-450 LM ₂	Микросомы крыс	
Нафталин	$1,39 \cdot 10^{-3}$	$2,50 \cdot 10^{-5}$	[10]
Диметиланилин	$3,85 \cdot 10^{-3}$	$4,65 \cdot 10^{-4}$	[12]
Анилин	$3,23 \cdot 10^{-3}$	$6,00 \cdot 10^{-4}$	[10]
Ацетанилид	$4,35 \cdot 10^{-3}$	$1,00 \cdot 10^{-4}$	[10]
Этапол	0,54	0,03	[6]
Изопропанол	0,54	$7,00 \cdot 10^{-3}$; 0,50	[6]

талитическими свойствами. Существуют также другие формы цитохрома P-450, которые в настоящее время интенсивно изучаются [9]. В нашей лаборатории разделены и очищены формы цитохрома P-450 LM₂ и LM₄ из микросом печени кроликов, получавших фенобарбитал натрия и 20-метилхолантрен.

Для выяснения причин различной субстратной специфичности и различных каталитических свойств цитохромов P-450 необходимо систематическое изучение взаимодействия разных форм гемопротенина с широким кругом лигандов и количественная характеристика образующихся при этом взаимодействии комплексов. Целью настоящей работы было исследование дифференциальных спектров, сопровождающих взаимодействие чистых форм цитохрома P-450 LM₂ и LM₄ из микросом печени кролика с рядом химических соединений разной природы, часть из которых является субстратами микросомальной гидроксидирующей системы.

При взаимодействии форм цитохрома P-450 LM₂ и LM₄ с разными лигандами зарегистрированы дифференциальные спектры, положения максимумов и минимумов поглощения в которых приведены в табл. 1. Интенсивность спектральных изменений связана с концентрацией добавленного

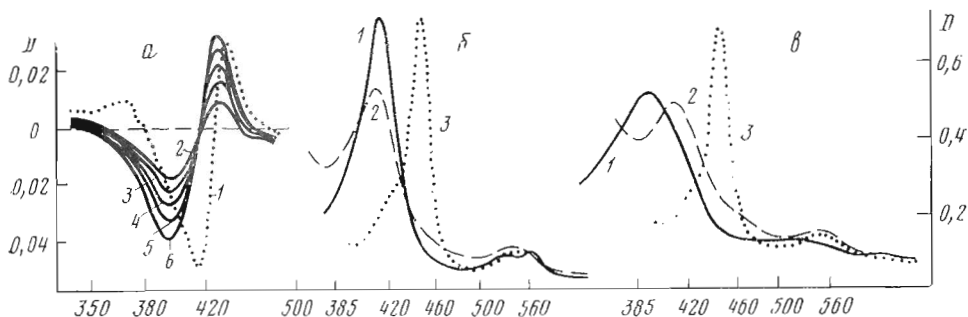


Рис. 1

Рис. 1. Дифференциальные спектры системы P-450 LM₂+анилин и P-450 LM₁+анилин (а) и абсолютные спектры форм цитохрома P-450 LM₂ (б) и LM₁ (в): а — [LM₂]₀=4,39 мкМ; [анилин]₀=3,15 мМ (1); [LM₂]₀=3,80 мкМ; [анилин]₀=0,44 (2), 0,75 (3), 1,18 (4), 1,78 (5), 2,38 мМ (6); б — [LM₂]₀=6,26 мкМ; в — [LM₁]₀=5,49 мкМ; для б и в: 1 — окисленная форма, 2 — восстановленная форма, 3 — карбонильный комплекс восстановленной формы

Рис. 2. Зависимость обратной величины интенсивности спектральных изменений цитохрома P-450 LM₁ от обратной концентрации анилина, 20° С

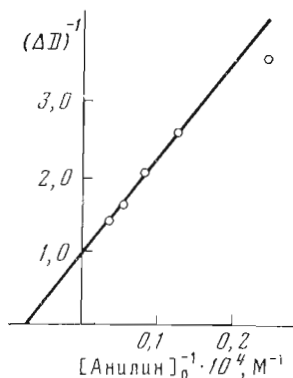


Рис. 2

анилина и увеличивается с ее ростом (рис. 1). Как правило, обратная величина ΔD , представляющая собой разность поглощения для λ_{max} и λ_{min} , линейно связана с обратной концентрацией анилина, индуцирующего спектральные изменения (рис. 2). На рис. 2 представлен график, из которого можно вычислить так называемую спектральную константу диссоциации фермент-субстратного комплекса (K_s). Подобным образом получены K_s для всех исследованных соединений. В настоящее время считается, что полученные таким путем значения констант K_s для субстратов первого типа отражают природу комплекса цитохрома P-450 с субстратом, а сами изменения первого типа связаны с метаболизмом субстратов [10, 11]. Значения K_s для лигандов второго типа характеризуют образование комплекса с цитохромом P-450, не участвующего в процессе превращения субстрата.

Проанализируем полученные нами спектральные характеристики при взаимодействии форм цитохрома P-450 LM₂ и LM₁ с различными лигандами (табл. 1).

Цитохром P-450 в форме LM₂. Субстраты первого типа (бензол, нафталин, диметилаанилин) при взаимодействии с формой LM₂ вызывают указанные выше спектральные изменения. Полученные значения K_s для этих соединений существенно выше соответствующих величин для комплексов цитохром P-450 в микросомах с теми же лигандами (табл. 2). Проведенное сравнение подтверждает предположение с том, что субстраты первого типа связываются с цитохромом P-450 за счет гидрофобных взаимодействий с участками апофермента, находящимися вблизи гемового железа [2--6, 11], а также подтверждает возможную роль липидов микросомальных мембран в связывании гидрофобных молекул с цитохромом P-450. Действительно, комплексы лигандов первого типа с чистой формой цитохрома P-450 LM₂ менее прочны, чем комплексы тех же лигандов с микросомальным цитохромом P-450.

Константы диссоциации комплексов P-450 LM₂ с лигандами второго типа (пиридин, анилин, имидазол) также существенно выше соответствующих величин для комплексов этих лигандов с микросомальным цитохромом P-450 (табл. 2). Это сравнение наводит на мысль, что лиганды второго типа связываются с микросомальной формой цитохрома несколькими способами: непосредственно с гемовым железом, а также другими центрами, прилегающими к гемовому железу цитохрома P-450. В ферментативном процессе, вероятно, участвуют комплексы анилина с гидрофобными участками, соседствующими с порфириновым кольцом.

Весьма важно, что форма LM₂ образует прочный комплекс с гидроперекисью кумила ($K_s 1,17 \cdot 10^{-4}$ M), так как это соответствует высокой каталитической активности цитохрома P-450 в реакциях окисления различных соединений гидроперекисями [12, 13].

Не было зарегистрировано спектральных изменений при взаимодействии P-450 LM₂ с антипирином — известным субстратом микросомальной системы. Это означает, что антипирин может превращаться какой-то другой формой цитохрома P-450 или эффективно взаимодействует с ним только в присутствии фосфолипидов микросомальной мембраны.

Спирты (этанол, изопропанол) образуют с формой LM₂ весьма непрочные комплексы. Сравнение полученных величин K_s с соответствующими значениями для комплексов спиртов с микросомальным цитохромом P-450 в отсутствие детергентов подтверждает существенную роль липидов в связывании спиртов, так как взаимодействие спиртов с микросомами характеризуется образованием комплексов с двумя константами диссоциации [6]: спирты в микросомах связываются непосредственно с гемовым железом, а также с гидрофобными участками цитохрома P-450.

Характер спектральных изменений, зарегистрированных при взаимодействии LM₂-формы цитохрома P-450 с различными лигандами, может быть объяснен с учетом хорошо известных литературных данных [2—7, 11]. Как и другие гемопротенины, форма цитохрома P-450 LM₂ существует в виде смеси низкоспинового ($S=1/2$) и высокоспинового ($S=5/2$) белков [2—5, 10, 11]. Между спиновыми состояниями существует равновесие, которое можно сдвинуть присоединением лиганда, воздействием температуры, добавлением детергентов и водородных ионов [11]. Низкоспиновой форме в дифференциальных спектрах соответствует полоса ~420 нм, высокоспиновой — полоса ~390 нм. Добавление лигандов первого типа сдвигает равновесие спиновых форм LM₂ в сторону высокоспинового состояния. Трудно указать точно место взаимодействия гидрофобных лигандов первого типа с формой LM₂. Можно предположить, что таким местом служит порфириновое кольцо гемопротенина или гидрофобный участок апофермента вблизи плоскости порфиринового кольца. На рис. 3 представлен цитохром P-450 в высокоспиновом состоянии: лигандом в пятом положении, как часто предполагается, является атом серы цистеина, лигандом в шестом положении может быть молекула воды, связанная водородной связью с имидазолом апофермента [11]. Ион железа в высокоспиновом комплексе выдвинут из плоскости порфиринового кольца, и связь его с водой ослаблена. Выказывались предположения [2—5], что лигандом в шестом положении низкоспиновой формы может быть азот гистидина, который покидает свое место в высокоспиновом гемопротенине. Однако трудно себе представить, чтобы сильный азотсодержащий лиганд покидал координационную сферу с большой легкостью, так как теплоты спиновых переходов невелики и составляют всего лишь 6—9 ккал/моль [11].

Лиганды первого типа превращают цитохром P-450 LM₂, существующий при обычных условиях главным образом в низкоспиновом состоянии, в высокоспиновую форму. Лиганды второго типа образуют комплексы с P-450 LM₂ в низкоспиновой форме, заменяя молекулу воды в координационной сфере. Не исключено взаимодействие лигандов второго типа по другим центрам связывания. Спирты, как слабые лиганды, с трудом вы-

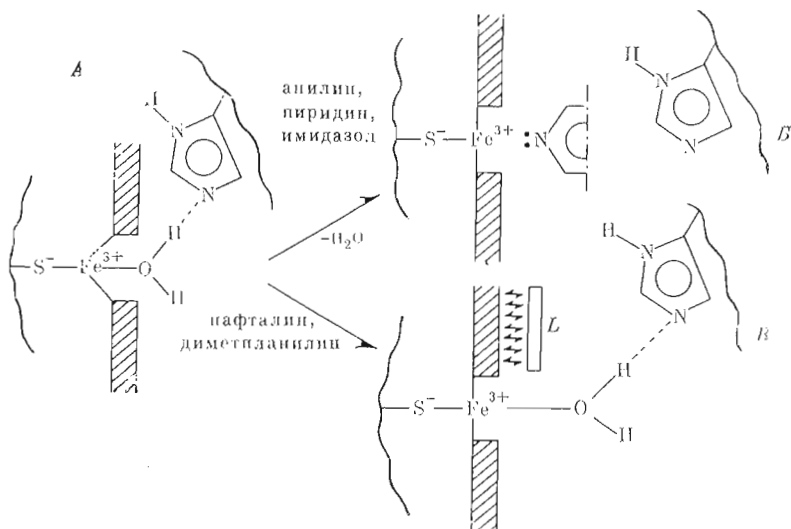


Рис. 3. Высокоспиновая (А) и низкоспиновые формы (Б, В) цитохрома Р-450 LM_4 . L — лиганд

тесняют воду из координационной сферы и образуют пепрочные комплексы второго модифицированного типа, в которых кислород гидроксила координирован с гемовым железом в шестом положении. Аналогичные комплексы образует с формой LM_2 гидроперекись кумила. Хорошо известно, что спирты и гидроперекиси могут быть конкурирующими лигандами комплексов металлов с переменной валентностью [14].

Цитохром Р-450 в форме LM_4 . Эта форма цитохрома Р-450 в обычных условиях существует в основном в высокоспиновом состоянии (рис. 3). Лиганды второго типа тесняют молекулу воды из координационной сферы и превращают цитохром Р-450 LM_4 в низкоспиновое состояние. Эти лиганды являются ферригемохромогенами и увеличивают электронную плотность на центральном атоме.

Субстраты первого типа не могут вытеснить молекулу воды из координационной сферы комплекса и взаимодействуют с плоскостью порфиринового кольца, располагаясь параллельно ей и образуя структуру, изображенную на рис. 3. Этим обстоятельством мы объясняем образование низкоспинового комплекса нафталина и диметиланилина с формой LM_4 , в отличие от высокоспинового комплекса этих соединений с формой LM_2 , в которой гидрофобные лиганды взаимодействуют с участком апофермента, близким к гему. Такой участок в форме LM_4 может быть занят эндогенным субстратом, что обуславливает существование Р-450 LM_4 в высокоспиновом состоянии. Чрезвычайно важно, что гидроперекись кумила не образует комплекса с формой LM_4 . Это обстоятельство объясняет полную инертность цитохрома Р-450 в форме LM_4 в реакциях окисления анилина, нафталина и диметиланилина гидроперекисью кумила. В отличие от формы LM_2 в форме LM_4 гидроперекись кумила не может попасть в координационную сферу LM_4 . Этанол и изопропанол практически не взаимодействуют с формой LM_4 .

Таким образом, форма цитохрома Р-450 LM_2 , существующая в обычных условиях в низкоспиновом состоянии, присоединяет субстрат первого типа и превращается в высокоспиновую форму А. Замещение воды в высокоспиновой форме LM_2 лигандами второго типа переводит Р-450 LM_2 в низкоспиновую форму. Вода в высокоспиновой форме может быть заменена молекулами спиртов или гидроперекисей с образованием модифицированной формы второго типа, отличающейся от формы Б (рис. 3) положением максимума и минимума в спектрах поглощения (табл. 1).

Форма цитохрома P-450 LM₄ существует в обычных условиях в высокоспиновом состоянии А (рис. 3), так как апофермент связал эндогенный субстрат (место связывания не показано). Лиганды второго типа вытесняют молекулу воды из координационной сферы, образуя низкоспиновую форму В. Лиганды первого типа не могут взаимодействовать с апоферментом (место связывания занято эндогенным субстратом) и координируются параллельно плоскости порфиринового кольца, образуя низкоспиновую форму В, отличающуюся от формы В положением максимумов и минимумов в спектрах поглощения (табл. 1).

Другое отличие формы LM₂ от формы LM₄ состоит в том, что в высокоспиновой форме последней молекула воды не может быть вытеснена из координационной сферы гидроперекисями или спиртами. Это объясняет отсутствие каталитических свойств формы LM₄ в реакциях окисления субстратов гидроперекисями.

Экспериментальная часть

Дифференциальные спектры поглощения регистрировали на приборе Spereord UV-VIS (ГДР) при 20°С. В работе использовали растворы цитохрома P-450 LM₂ (4,39 мкМ) в 0,1 М калий-фосфатном буфере (рН 7,25) и растворы цитохрома P-450 LM₄ (3,80 мкМ) в 0,16 М калий-фосфатном буфере (рН 7,25). В кювету сравнения добавляли различные концентрации лигандов. Максимальные значения концентраций приведены в табл. 1.

В работе использовали фенобарбитал натрия (Merck, ФРГ), 20-метилхолантрен (Fluka, Швейцария), сефарозу 4В и СМ-сефадекс С-50 (Pharmacia, Швеция), тритон X-100 (Fergak, Зап. Берлин), додецилсульфат натрия (Serva, ФРГ), холат натрия (Sigma, США), дитиотреит (Calbiochem, США), все другие реактивы — отечественного производства.

1. *Выделение и очистка цитохрома P-450 LM₂ из микросом печени кроликов, индуцированных фенобарбиталом натрия.* В работе использовали кроликов весом 2—2,5 кг, которым в течение 5 сут интраперитонеально вводили фенобарбитал натрия в дозе 50 мг/кг/сут. Микросомальную фракцию печени получали по методике [15]. Выделение цитохрома P-450 проводили по модифицированному нами методу [16, 17]. Все операции проводили при температуре 0—4°С, применяя на всех этапах выделения калий-фосфатный буфер (рН 7,25), содержащий 20% глицерина.

Микросомы (2—3 г белка) суспендировали в 1000 мл 0,1 М фосфатного буфера, содержащего 1 мМ дитиотреит, 1 мМ EDTA и 0,6% холата натрия. Суспензию периодически встряхивали в течение 30 мин и центрифугировали 1 ч при 105 000g. Осадок отбрасывали, а супернатант наносили на колонку с ω-аминогексил-сефарозой 4В (4×35 см), полученной по методике [18]. После промывки колонки тремя объемами уравновешивающего буфера, содержащего 0,5% холата натрия, цитохром P-450 элюировали 1500 мл 0,1 М фосфатного буфера, содержащего 1 мМ дитиотреит, 1 мМ EDTA, 0,4% холата натрия и 0,08% тритон X-100. Фракции с удельным содержанием цитохрома P-450, равным 10—12 нмоль/мг белка, разбавляли в 3 раза 20% глицерином и наносили на колонку, уравновешенную 33 мМ фосфатным буфером, с гранулированным гидроксилатитом (3×15 см), полученным по методике [19]. После промывки колонки 300 мл 40 мМ фосфатного буфера, содержащего 0,2% тритон X-100, цитохром P-450 элюировали последовательно 250 мл 80 мМ буфера, содержащего 0,2% тритон X-100; 200 мл 150 мМ буфера, содержащего 0,2% тритон X-100; и 250 мл 150 мМ буфера, содержащего 0,2% тритон X-100 и 0,1% холата натрия.

Фракции цитохрома P-450, элюируемые 80 мМ фосфатным буфером и разбавленные в 4 раза 20% глицерином, содержащим 0,2% тритон X-100,

наносили на колонку с СМ-сефадексом С-50 ($2,5 \times 15$ см), уравновешенную 20 мМ фосфатным буфером, содержащим 0,2% тритон Х-100. Колонку промывали 150 мл уравновешивающего буфера и элюировали цитохром Р-450 200 мл 0,1 М фосфатного буфера, содержащего 0,2% тритон Х-100. Фракции с удельным содержанием цитохрома Р-450 16—17 нмоль/мг белка диализовали против 20 мМ фосфатного буфера в течение 48 ч и наносили на колонку с СМ-сефадексом С-50 ($2,5 \times 10$ см), уравновешенную тем же буфером. Колонку промывали уравновешивающим буфером до исчезновения поглощения при 277 нм, обусловленного присутствием тритона Х-100, после чего цитохром Р-450 элюировали 70 мл 0,2 М фосфатного буфера и использовали как очищенный препарат. Выход высокоочищенного цитохрома Р-450 LM_2 составлял 8—10%.

Полученный препарат цитохрома Р-450 мигрировал одной полосой при электрофорезе в присутствии додецилсульфата натрия. Сопоставленные электрофоретической подвижности Р-450 и белков с известным молекулярным весом (бычий альбумин, каталаза, овальбумин и цитохром с) позволило установить молекулярный вес цитохрома: 47 000. На основании спектральных характеристик, молекулярного веса и электрофоретической подвижности цитохром Р-450 идентифицирован как LM_2 -форма [20].

2. *Выделение и очистка цитохрома Р-450 из микросом печени кроликов, индуцируемых 20-метилхолантреном.* Цитохром Р-450 LM_4 выделяли по модифицированному методу [21]. Микросомы (2—3 г белка), полученные из печени кроликов, индуцированных в течение 5 сут 20-метилхолантреном в дозе 20 мг/кг/сут, суспендировали в 1000 мл 0,2 М фосфатного буфера, содержащего 20% глицерина, 1 мМ дитиотреит, 1 мМ EDTA и 0,6% холата натрия, и встряхивали 30 мин. Суспензию центрифугировали в течение 1 ч при 105 000g, осадок отбрасывали, а супернатант наносили на колонку с ω -аминогексил-сефарозой 4В (4×35 см), уравновешенную тем же буфером. После промывки колонки тремя объемами 0,1 М фосфатного буфера, содержащего 1 мМ дитиотреит, 1 мМ EDTA и 0,5% холата натрия, цитохром Р-450 элюировали 1500 мл 0,1 М фосфатного буфера, содержащего 1 мМ дитиотреит, 1 мМ EDTA, 0,4% холата натрия и 0,08% тритона Х-100. Фракции с удельным содержанием цитохрома Р-450 10—13 нмоль/мг белка разбавляли 20% глицерином и наносили на колонку с гранулированным гидроксилпатитом (3×10 см), уравновешенную 33 мМ фосфатным буфером, содержащим 20% глицерина. Колонку промывали последовательно 40, 80, 150 мМ фосфатным буфером по 200 мл каждого, содержащим 20% глицерина и 0,2% тритона Х-100; цитохром Р-450 элюировали 150 мл 150 мМ буфера, содержащего 20% глицерина, 0,2% тритона Х-100 и 0,1% холата натрия.

Фракции цитохрома Р-450, элюируемые в присутствии холата натрия, разводили в 2 раза 20% глицерином, содержащим 0,2% тритона Х-100, и наносили на колонку с СМ-сефадексом С-50 ($2,2 \times 10$ см), уравновешенную 75 мМ фосфатным буфером, содержащим 0,2% тритона Х-100. Колонку промывали последовательно по 250 мл 100, 150 мМ буфера, содержащего 0,2% тритона Х-100; цитохром Р-450 элюировали 100 мл 0,2 М буфера, содержащего 0,2% тритона Х-100. Для удаления тритона Х-100 цитохром Р-450 наносили на колонку с гидроксилпатитом ($2,2 \times 6$ см), промывали буфером, не содержащим тритона Х-100, до исчезновения поглощения, обусловленного детергентом, при 277 нм; цитохром Р-450 элюировали 100 мл 0,5 М буфера и использовали как очищенный препарат. Выход высокоочищенного цитохрома Р-450 LM_4 составлял 13—15%.

Полученный препарат, охарактеризованный электрофорезом в присутствии додецилсульфата натрия, имел единственную полосу, которая соответствовала молекулярному весу ~ 54 000. Спектральные характери-

стики, молекулярный вес и электрофоретическая подвижность позволили идентифицировать гемопротейн как LM_4 -форму [20].

Содержание цитохрома P-450 определяли по методу [22], а концентрацию белка — по методу [23]. Электрофорез в полиакриламидном геле проводили по методу [24]. Препараты цитохрома P-450 LM_2 -формы имели удельное содержание 16–18 нмоль/мг белка, а LM_4 — 17–18 нмоль/мг белка.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ахрем А. А., Метелица Д. И., Скурко М. Е. (1975) Успехи химии, **44**, 868–890.
2. Schenkman J. B. (1970) Biochemistry, **9**, 2081–2087.
3. Schenkman J. B., Cinti D., Orrenius S., Moldeus P., Kraschnitz R. (1972) Biochemistry, **11**, 4243–4251.
4. Jefcoate C. R. E., Gaylor I. L., Calabrese R. L. (1969) Biochemistry, **8**, 3455–3463.
5. Jefcoate C. R. E., Gaylor I. L. (1969) Biochemistry, **8**, 3464–3472.
6. Ахрем А. А., Попова Е. М., Метелица Д. И. (1978) Биохимия, **43**, 1485–1491.
7. Schenkman J. B., Remmer H., Estabrook R. W. (1967) Mol. Pharmacol., **3**, 113–123.
8. Coon M. J., Haugen D. A. (1967) in: The structural basis of membrane function, pp. 409–427, Acad. Press, N. Y.—San-Francisco—London.
9. Guengerich F. P. (1978) J. Biol. Chem., **253**, 7931–7939.
10. Ахрем А. А., Дворников С. С., Усанов С. А., Метелица Д. И. (1976) Изв. АН БССР. Сер. хим. н., **5**, 93–97.
11. Rein H., Ristau O. (1978) Pharmazie, **33**, 325–328.
12. Akhrem A. A., Metelitsa D. I., Belski S. M., Kiselev P. A., Skurko M. E., Usanov S. A. (1977) Croat. chem. acta, **49**, 223–235.
13. Metelitsa D. I., Akhrem A. A., Erjomin A. N., Kissel M. A., Usanov S. A. (1979) Acta biol. et med. Germ., **38**, 511–519.
14. Свитыч Р. Б., Ржевская Н. Н., Яблонский О. П., Буначенко А. Л., Петухов А. А., Беляев В. А. (1977) Кинетика и катализ, **18**, 76–82.
15. Ахрем А. А., Усанов С. А., Дворников С. С., Метелица Д. И. (1975) Докл. АН СССР, **223**, 1014–1017.
16. Imai Y., Sato R. (1974) Biochem. and Biophys. Res. Commun., **60**, 8–14.
17. Ахрем А. А., Усанов С. А., Еремин А. Н., Метелица Д. И. (1978) Докл. АН БССР, **23**, 839–842.
18. Porath J., Fornsted N. J. (1970) Chromatogr., **51**, 479–484.
19. Mazin A. L., Sulimova G. E., Vanyushin B. F. (1974) Anal. Biochem., **61**, 62–71.
20. Haugen D. A., Coon M. J., (1976) J. Biol. Chem., **251**, 7929–7939.
21. Hashimoto C., Imai Y. (1976) Biochem. and Biophys. Res. Commun., **68**, 821–827.
22. Omura T., Sato R. (1964) J. Biol. Chem., **239**, 2370–2378.
23. Popov N., Schmitt M., Sculzeck S., Marthies M. (1975) Acta biol. et med. Germ., **34**, 1441–1447.
24. Laemmli U. K. (1970) Nature, **227**, 680–685.

Поступила в редакцию
25.VII.1979

После доработки
17.IX.1979

SPECTRAL PARAMETERS OF THE INTERACTION OF VARIOUS LIGANDS WITH LM_2 AND LM_4 FORMS OF HIGHLY PURIFIED CYTOCHROME P-450

ERYOMIN A. N., USANOV S. A., METELITSA D. I., AKHREM A. A.

*Institute of Bioorganic Chemistry, Academy of Sciences
of the Byelorussian SSR, Minsk*

The interaction of various ligands with highly purified LM_2 and LM_4 forms of cytochrome P-450 has been studied by difference spectrophotometry. The dissociation constants were determined for type I ligands (benzene, naphthalene, cyclohexane, dimethylaniline), as well as for type II (aniline, pyridine, imidazole) and modified type II ligands (ethanol, isopropanol). The results obtained were discussed from the viewpoint of ligand action on the spin equilibrium of the cytochrome P-450 forms. The models of high and low spin forms of cytochrome P-450 LM_4 in free state and in ligand-bound complexes were proposed.