Доклады Академии наук СССР
1972. Том 204, № 4

УДК 577.15.013 *ФИЗИЧЕСКАЯ ХИМИЯ*

В. С. БЕЛОВА, Л. А. НИКОНОВА Л. М. РАЙХМАН, М. Р. БОРУКАЕВА

ХИМИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ ФЕРМЕНТНОЙ СИСТЕМЫ, ОКИСЛЯЮЩЕЙ УГЛЕВОДОРОДЫ

(Представлено академиком Н. М. Эмануэлем 23 IX 1971)

В живых организмах содержатся ферментные системы, способные в мягких условиях гидроксилировать насыщенные углеводороды с образованием спиртов в качестве первичного продукта. Основным компонентом гидроксилирующих ферментных систем (ГФС) в большинстве случаев является цитохром Р-450 ([1]). Ранее нами было показано, что фермент-субстратный комплекс между парафинами и ГФС микросом печени образуется за счет гидрофобного взаимодействия, которое само по себе не может в значительной мере активировать субстрат ([2]). Поэтому в ГФС необходима эффективная активация кислорода, осуществляемая на гемовой группе цитохрома Р-450. При этом один атом молекулы кислорода за счет окисления цитохрома восстанавливается до воды, а другой внедряется в субстрат (углеводород), присоединяющийся к гидрофобному участку фермента недалеко от гемовой группы ([1]). Поддержание цитохрома Р-450 в восстановленном состоянии осуществляется благодаря функционированию микросомальной дыхательной цепи, переносящей электроны от НАДФН на Р-450.

Для выяснения механизма сложных ферментативных реакций большое значение имет подбор и исследование простых химических систем, моделирующих в той или иной мере работу фермента. Хорошо известно, что углеводороды, в том числе алифатические, могут окисляться молекулярным кислородом по радикально-цепному механизму ([3]). Однако такие процессы, в отличие от ферментативных, характеризуются низкой селективностью и ведут, как правило, к образованию многочисленных продуктов окисления в глубокой деструкции исходных соединений, тогда как ГФС селективно окисляет углеводороды до спиртов (и, возможно, альдегидов) в качестве единственных продуктов. В последние годы появились сообщения о возможности окисления углеводородов в мягких условиях в химических системах, содержащих восстановленные ионы металлов, способных активировать кислород ([4], [5]).

В настоящей работе нам удалось показать, что железопротопорфирин (гемин), являющийся активным центром цитохрома Р-450, может эффективно катализировать окисление углеводородов в мягких условиях при наличии в среде подходящего донора электронов, который поддерживал бы гемин в восстановленном состоянии. Поскольку в цитохроме Р-450 гемин, по-видимому, связан с тиоловой группой ([6]), в качестве донора электронов была использована тиосалициловая кислота, содержащая группу SH, взаимодействие которой с гемином имитирует в некоторой мере структуру активного центра цитохрома Р-450. Реагенты были растворены в водно-ацетоновой среде (вода : ацетон 1 : 9). Концентрации реагентов: гемин 0,001 мол/л, тиосалициловая кислота 0,1 мол/л, циклогексан 0,25 мол/л. Объем среды 2 мл. Смесь встряхивалась на воздухе 15 мин при 25° С. Продукты реакции определялись методом газовой хроматографии. Нули в табл. 1 обозначают полное отсутствие продуктов или обнаружение их в пределах ошибок измерений.

Таблица 1

Гидроксилирование циклогексана в модельной системе гемин — тиосалициловая кислота — кислород

Система	Продукты окисления, μмол		
	циклогексанол	циклогексанон	Σ
Полная система	4,0±0,4	2,2±0,2	6,2±0,6
Без тиосалициловой кислоты	0	0	0
Без гемина	0	0	0
Без кислорода (инкубация в атмосфере аргона)	0	0	0
Без кислорода, но в присутствии перекиси водорода	0	0	0
Полная система +0,025 *M* цианистого калия	1,0±0,1	0,7±0,1	1,7±0,2

Таблица 2

Влияние ингибиторов радикальных процессов на окисление циклогексана в модельной системе

Ингибитор	Количество продуктов окисления, μмол			$K_7 \cdot 10^4$
	циклогексанол	циклогексанон	Σ	
Без ингибиторов	4,0±0,4	2,2±0,2	6,2±0,6	—
n-Пропиловый эфир галловой кислоты	4,0±0,5	2,2±0,2	6,2±0,7	14,3
4-Метил-2,6-дитрет.-бутилфенол (ионол)	4,4±0,5	2,2±0,2	6,6±0,7	2,3
4-Окси-3-трет.-бутилфенилпропиламин	3,6±0,3	1,5±0,2	5,1±0,5	10,3
4-Окси-3,5-дитрет.-бутилфенилпропиламин	2,9±0,3	1,5±0,2	4,4±0,5	2,5
2,4,6-Триметил-3-оксипиридин	2,9±0,3	2,0±0,2	4,9±0,5	8,6

Как показано в табл. 1, система, состоящая из гемина, тиосациловой кислоты и кислорода воздуха, способна окислять циклогексан при комнатной температуре, причем в качестве продуктов реакции обнаруживаются спирт (циклогексанол) и, в меньшем количестве, соответствующий кетон (циклогексанон). Из табл. 1 видно также, что окисление циклогексана происходит только в присутствии всех трех компонентов. При использованных нами концентрациях реагентов реакция может продолжаться около часа и затем прекращается вследствие израсходования тиосалициловой кислоты. При добавлении новой порции восстановителя реакция продолжается.

Доказательством того, что каталитическим центром системы является именно гемин, служат результаты опытов с цианидом (табл. 1). Последний ингибирует окисление циклогексана, причем, как показали параллельные спектрофотометрические измерения, степень ингибирования примерно соответствует степени комплексообразования цианида с гемином. Продукты окисления циклогексана не обнаруживаются при замене молекулярного кислорода перекисью водорода (табл. 1). Это делает маловероятным участие радикальных форм кислорода, как, например, OH, в окислении субстрата, так как известно, что гидроксильные радикалы могут образовываться при взаимодействии гема (и свободных ионов железа) как с молекулярным кислородом, так и с перекисью ([7]).

Результаты опытов с ингибиторами радикальных процессов, приведенные в табл. 2 (концентрация ингибиторов 0,005 мол/л; значения K_7 заимствованы из работы ([8])), свидетельствуют против того, что окисление циклогексана кислородом в описываемой модельной системе осуществляется

Таблица 3

Сопоставление свойств микросомальной ГФС и модельной системы на основе гемина

Свойство	ГФС по ([1], [2])	Модельная система
Число молекул окисленного субстрата на 1 гем в 1 мин.	5,0	0,1
Продукты оксиления парафинов	Спирт и, возможно, альдегид (кетон)	Спирт и, в меньшем количестве, кетон
Возможность протекания реакции при замене кислорода перекисью	Реакция не идет	Реакция не идет
Влияние цианида	Ингибирует	Ингибирует

по радикальному механизму. Из исследованных ингибиторов только азотсодержащие соединения в небольшой степени уменьшают выход продуктов окисления циклогексана, причем отсутствует корреляция между степенью влияния этих реагентов на данную модельную систему и величиной их антиокислительной активности, характеризуемой так называемой константой K_7 ([8]). Небольшое влияние азотсодержащих ингибиторов, по-видимому, обусловлено их способностью образовывать комплексы с гемином.

Интересно сопоставить характеристики данной модельной системы с ГФС (табл. 3). Модельная система на основе гемина по многим свойствам близка к ГФС, хотя и характеризуется меньшей активностью. По-видимому, в обоих случаях кислород активируется аналогично. Образуются не свободные кислородсодержащие радикалы, а комплексы «оксеноидного» типа ([4], [5]), в которых один из атомов связанной с гемом молекулы кислорода близок по электронной структуре к атомарному кислороду и способен при взаимодействии с углеводородом внедряться по связи СН с образованием спирта. Бóльшая активность ГФС по сравнению с модельной системой может быть связана с тем, что белковая часть фермента обеспечивает оптимальную пространственную ориентацию субстрата по отношению к кислородному комплексу гема.

Эффективность изученной модели, по-видимому, связана с благоприятным лигандным окружением иона железа (порфириновая система).

Авторы благодарны Г. И. Лихтенштейну и Е. Б. Бурлаковой за интерес к работе и обсуждение полученных результатов.

Институт химической физики
Академии наук СССР
Черноголовка Моск. обл.

Поступило
14 IX 1971

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

[1] Г. М. Маслова, Л. М. Райхман, В. П. Скулачев, Усп. совр. биол., 67, № 3, 400 (1969). [2] Л. М. Райхман, В. С. Белова и др., Биохимия, 36, № 4, 674 (1971). [3] Н. М. Эмануэль, Е. Т. Денисов, З. К. Майзус, Цепные реакции окисления углеводородов в жидкой фазе, «Наука», 1965. [4] G. A. Hamilton, J. Am. Chem. Soc., 86, 16, 3390 (1964). [5] V. Ullrich, Zs. Naturforsch., 24b, 6, 699 (1969). [6] R. Tsai, C. A. Yu et al., Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 66, 4, 1157 (1970). [7] P. George, In: Oxidases and Related Redox Systems., N. Y.— London, 1965, p. 3. [8] Н. Г. Хранова, В сборн. Физико-химические механизмы злокачественного роста, Тр. МОИП, 32, «Наука», 1970, стр. 227.