

Академик АН БССР А. А. АХРЕМ, С. А. УСАНОВ, С. С. ДВОРНИКОВ,
Д. И. МЕТЕЛИЦА

КИНЕТИЧЕСКИЕ И СПЕКТРАЛЬНЫЕ ПАРАМЕТРЫ ГИДРОКСИЛИРОВАНИЯ НАФТАЛИНА ИНТАКТНЫМИ И ИНДУЦИРОВАННЫМИ ФЕРМЕНТНЫМИ СИСТЕМАМИ МИКРОСОМ ПЕЧЕНИ

Для выяснения механизма взаимодействия неполярных субстратов с цитохромом Р-450 микросом печени и механизма активации молекулярного кислорода этим ферментом очень важно провести количественное сопоставление кинетических и термодинамических параметров гидроксилирования одного и того же субстрата интактными и индуцированными ферментными системами, а также сопоставить спектральные характеристики, связанные с фермент-субстратным взаимодействием. Такое сравнение кинетических и спектральных параметров для интактной и индуцированных ферментных систем впервые проведено нами на примере гидроксилирования нафталина.

Микросомную фракцию печени крыс выделяли методом дифференциального центрифугирования по методике, описанной нами ранее ⁽¹⁾. В качестве индукторов ферментных систем использовали 20-метилхолантрен (20-МХ) и фенobarбитал в виде натриевой соли (ФБ). 20-МХ вводили в оливковом масле в дозе 20 мг/кг в течение 3 дней. ФБ вводили интраперитонеально в дозе 100 мг/кг в течение 3 дней. Крыс забивали через 48 час. после последней инъекции. Ферментации проводили при температурах 20—30°, в трис-НСl-буфере с рН 7,54, используя инкубационную смесь объемом 10 мл, содержащую $5,0 \cdot 10^{-4}$ мол/л НАДФ-Н, $5,0 \cdot 10^{-2}$ мол/л $MgCl_2$ и никотинамида и различные концентрации нафталина (АгН) в 0,5 мл ацетона. Концентрация микросомального белка в инкубационной смеси составляла 0,6—0,8 мг/мл и определялась по методу Лоури ⁽²⁾. Реакцию начинали введением НАДФ-Н и останавливали через 10 мин. добавлением 0,5 мл 20%-ной трихлоруксусной кислоты. После отделения белка нафталин и продукты его превращения α -нафтол и 1,2-дигидро-1,2-диоксинафталин (диол) анализировали следующим образом: одну пробу объемом 5 мл в течение 10 мин. нагревали при 100°, что обеспечивало полное превращение диола в α -нафтол. После экстракции α -нафтола этилацетатом его анализировали фотоэлектроколориметрически (ФЭК-56М) в виде азосоединения с парасульфенилдиазонием по методике, описанной нами в ⁽¹⁾; анализ второй пробы того же объема тем же методом без предварительного нагревания давал возможность определить отдельно концентрацию α -нафтола.

Дифференциальные спектры поглощения регистрировали на приборах «Unicam-SP-800» и «Unicam-SP-700» в кюветах толщиной 1 см при 20°, используя растворы, содержавшие от 2 до 3 мг/мл микросомального белка и различные концентрации нафталина и α -нафтола в фосфатном буфере с рН 7,5. Содержание цитохрома Р-450 определяли спектрофотометрически на тех же приборах, регистрируя поглощение комплекса цитохрома с СО и используя коэффициент экстинкции $91 \text{ ммоль} \cdot \text{л}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ ⁽³⁾.

Как нафталин, так и α -нафтол при взаимодействии с цитохромом Р-450 вызывают спектральные изменения I типа. Зависимость величины ΔD , представляющей собой разность оптических плотностей для λ_{max} и λ_{min} , от концентрации АгН или АгОН хорошо описывается уравнением Михаэлиса — Ментен и может быть спрямлена в координатах $1/\Delta D$ и

$1/[ArH]$ (см. рис. 1). Из такого спрямления были вычислены значения констант диссоциации фермент-субстратного комплекса K_s для интактной и индуцированных ферментных систем и обоих субстратов: нафталина и α -нафтола. Спектральные параметры, характеризующие фермент-субстратное взаимодействие, и величины K_s приведены в табл. 1.

В табл. 2 проведено сравнение состава продуктов, образующихся из нафталина при катализе интактными и индуцированными ферментными системами.

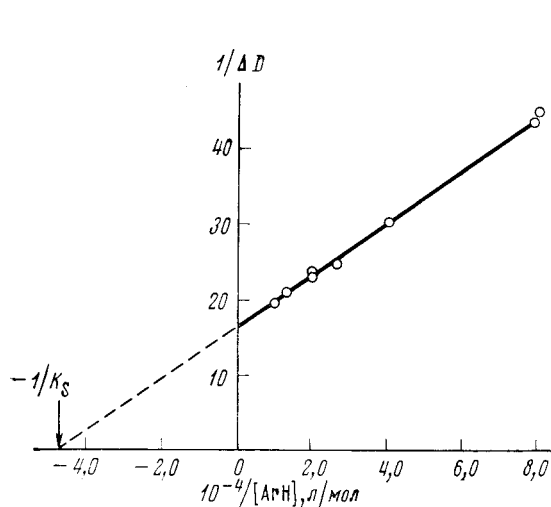


Рис. 1. Зависимость обратной величины ΔD ($D_{394} - D_{423}$) от обратной концентрации нафталина при 20° , концентрации белка 2 мг/мл в фосфатном буфере (рН 7,5)

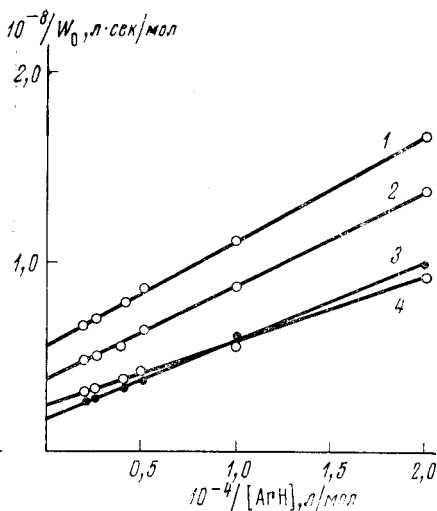


Рис. 2. Зависимость обратной скорости окисления нафталина интактными микросомами от его обратной концентрации (0,65 мг/мл белка): 1 — 20° , 2 — 25° , 3 — 37° и 4 — 30°

Изучение кинетики окисления нафталина при температурах $20-37^\circ$ с различными ферментными системами показало, что во всех случаях зависимость скорости окисления от концентрации субстрата описывается уравнением Михаэлиса — Ментен и хорошо спрямляется по методу Лайтхувера — Берка (см. рис. 2). Из зависимостей обратной скорости реакции от обратной концентрации субстрата вычислены константы Михаэлиса K_m и константы скорости распада фермент-субстратного комплекса k_2 . В интервале температур $20-30^\circ$ зависимость констант скорости k_2 описывается уравнением Аррениуса (см. рис. 3). При температурах выше 30° наблюдается отклонение констант k_2 от зависимости Аррениуса в сторону снижения энергии активации. В табл. 3 приведены значения предэкспоненциальных множителей констант скорости распада фермент-субстратного

Таблица 1

Спектральные параметры фермент-субстратного взаимодействия и величины констант диссоциации фермент-субстратного комплекса при 20°

Микросомы	Субстрат	Белок, мг/мл	Цитохром Р-450, нмол/мг	$\lambda_{\max}$, нм	$\lambda_{\min}$, нм	$K_s \cdot 10^4$, мол/л
Интактные	ArH	3,0	0,6	393	424	0,67
	ArOH	3,8	0,66	392	420	0,19
20-MX	ArH	3,0	0,76	390	420	1,25
	ArOH	3,0	0,76	390	421	0,42
ФБ	ArH	2,0	0,96	391	423	0,22
	ArOH	2,0	0,96	392	420	1,40

комплекса k_{02} , энергии активации и термодинамические параметры распада комплекса, а также значения констант Михаэлиса.

Опыты, проведенные при 20, 25 и 30° по окислению α -нафтола с участием интактных микросом при наблюдении за расходом α -нафтола, показали, что зависимость скорости расхождения AgOH от $[\text{AgOH}]_0$ хоро-

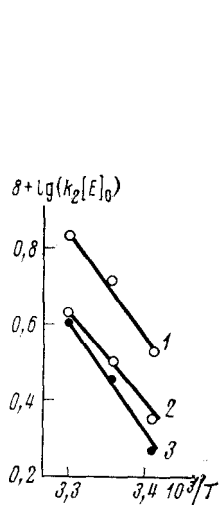


Рис. 3

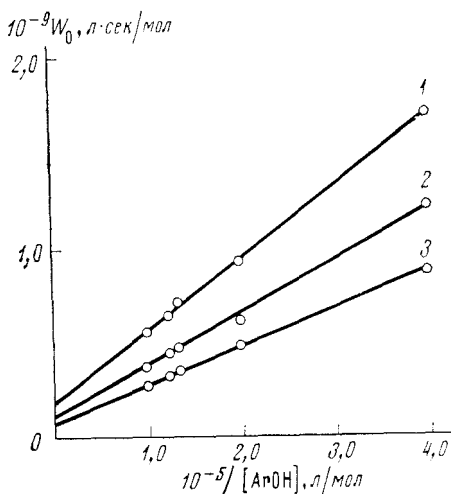


Рис. 4

Рис. 3. Влияние температуры на величину $K_2[E]_0$ для интактных (3) и индуцированных фенобарбиталом (1) и 20-метилхолантреном (2) ферментных систем ($[E]_0$ — концентрация цитохрома Р-450 в мол/л)

Рис. 4. Зависимость обратной скорости окисления α -нафтола от его обратной концентрации. 1 — 20°, 2 — 25° и 3 — 30°

шо спрямляется методом Лайнуивера — Берка (см. рис. 4). Из этого спрямления вычислены константы K_M и константы k_2 . Из температурного хода k_2 получено выражение этой константы скорости в общем виде:

$$k_2^{\text{AgOH}} = 3,1 \cdot 10^7 \exp(-12500/RT) \text{ сек}^{-1}.$$

Важно отметить, что окисление α -нафтола не происходит в отсутствие НАДФ-Н и сильно тормозится окисью углерода, т. е. цитохром Р-450 участвует в превращении α -нафтола.

Критический анализ полученных результатов показывает, что интактные и индуцированные ферментные системы существенно отличаются по некоторым характеристикам. Оба индуктора вызывают увеличение содержания цитохрома Р-450 в микросомной фракции печени крысы (табл. 1). Константы K_s для трех ферментных систем заметно отличаются, хотя характер спектральных изменений практически одинаков (табл. 1). Оба ин-

Таблица 2

Состав продуктов превращения нафталина при 30° с различными ферментными системами (10^{-6} мол/л)

Микросомы	[AgH] · 10 ⁴ , мол/л									
	0,5		1,0		2,0		2,5		4,0	
	AgOH	диол	AgOH	диол	AgOH	диол	AgOH	диол	AgOH	диол
Интактные 20-MX ФБ	5,35	1,10	8,60	1,05	11,40	2,90	13,9	1,50	15,7	1,8
	3,94	3,91	6,10	4,90	8,20	6,10	10,0	6,80	11,4	7,9
	7,15	2,50	12,7	3,70	18,20	3,60	19,6	6,10	23,0	5,5

Таблица 3

Кинетические и термодинамические параметры распада фермент-субстратных комплексов для интактных и индуцированных ферментных систем

Микросомы	k_{02} , сек ⁻¹	E , ккал/моль	ΔH^* , ккал/моль	$-\Delta S^*$, э.е.	t , °C	$K_M \cdot 10^6$, мол/л
Интактные	$2,36 \cdot 10^9$	14,50	13,90	17,7	20,0	1,00
					25,0	1,45
					30,0	1,34
					37,0	2,24
20-МХ	$4,28 \cdot 10^6$	11,0	10,15	30,0	20,0	1,35
					25,0	1,25
					30,0	1,00
					37,0	1,50
ФБ	$3,34 \cdot 10^9$	14,50	13,90	17,0	20,0	1,58
					25,0	1,25
					30,0	1,66
					37,0	2,00

дуктора существенно изменяют состав продуктов превращения нафталина: содержание диола увеличивается от ~20% для интактных систем до ~30—40% для индуцированных фенobarбиталом и почти до ~50% при индукции 20-МХ (табл. 2). Этот факт можно объяснить тем, что индукторы повышают уровень эпоксидгидразы, превращающей промежуточно образующийся 1,2-нафталин-эпоксид в диол (⁴, ⁵). Таким образом, интактные микросомы содержат меньше эпоксидгидразы, чем индуцированные.

Различие кинетических характеристик для интактных и ФБ-микросом не существенно (табл. 3), в то время как 20-МХ-микросомы окисляют нафталин с более низкой энергией активации. Очень важно отметить, что 20-МХ-микросомы не обнаруживают никаких спектральных изменений при взаимодействии с пиперидином, в то время как интактные микросомы при добавлении пиперидина вызывают спектральные изменения второго типа ($\lambda_{\max}=427$ нм, $\lambda_{\min}=389$ нм, $K_s(20^\circ)=0,34 \cdot 10^{-4}$ мол/л). Так как второй тип спектральных изменений связан с взаимодействием субстрата и гемового железа цитохрома (⁶), можно сделать вывод о том, что окружение гемового железа в 20-МХ-цитохроме Р-450 существенно отличается от состояния гемового железа цитохрома в интактных микросомах. Именно этим обстоятельством, возможно, объясняется снижение энергии активации реакции для 20-МХ-микросом.

Константы Михаэлиса для всех трех ферментных систем меняются в довольно узком интервале $(1,0 \div 2,30) \cdot 10^{-4}$ мол/л при температурах 20—37°. При 20° константы K_s и константы K_M мало отличаются друг от друга для всех трех ферментных систем. Это означает, что величины констант скорости распада фермент-субстратного комплекса k_2 малы в сравнении с константами скорости обратной диссоциации этого комплекса k_{-1} и тогда $K_s = (k_{-1})/(k_1) \approx K_M = (k_{-1} + k_2)/k_1$, где k_1 — константа скорости образования фермент-субстратного комплекса.

Снижение энергии активации при окислении α -нафтола в сравнении с окислением нафталина говорит о том, что НО-группа облегчает перенос атома кислорода в молекулу ароматического соединения. Это может быть связано или с увеличением сродства фермента к $AgOH$ в сравнении с AgH (табл. 1), или с облегчением электрофильной атаки $AgOH$ в сравнении с AgH .

Институт биоорганической химии
Академии наук БССР
Минск

Поступило
21 IV 1975

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

¹ А. А. Ахрем, С. А. Усанов, Д. И. Мерелица, ДАН, т. 218, 1457 (1974). ² О. Н. Lowry, N. I. Rosebrough et al., J. Biol. Chem., v. 193, 265 (1951). ³ T. Omura, R. Sato, J. Biol. Chem., v. 239, 2379 (1964). ⁴ D. R. Boyd, J. W. Daly, D. Jerina, Biochem., v. 11, 1961 (1972). ⁵ D. Jerina, J. W. Daly, J. Am. Chem. Soc., v. 90, 6525 (1968). ⁶ Biological Hydroxylation Mechanisms, N. Y.—London, 1972, p. 4.