

Академик АН БССР А. А. АХРЕМ, М. Е. СКУРКО,  
С. С. ДВОРНИКОВ, Д. И. МЕТЕЛИЦА

## КИНЕТИКА ФЕРМЕНТАТИВНОГО ГИДРОКСИЛИРОВАНИЯ ЦИКЛОГЕКСАНА

Для установления механизма взаимодействия алициклических соединений с цитохромом Р-450 микросом печени и механизма активации кислорода этим ферментом необходимо получение количественных характеристик ферментативного процесса и сопоставление их с количественными данными для субстратов других классов. Целью данной работы было получение кинетических и термодинамических параметров гидроксилирования циклогексана микросомами печени крысы. Такие характеристики в литературе отсутствуют, хотя известно, что циклогексан является субстратом ферментной системы микросом печени (<sup>1, 2</sup>).

Микросомную фракцию печени крыс выделяли дифференциальным центрифугированием по методике (<sup>3</sup>). В качестве индукторов ферментных систем использовали 20-метилхолантрен (20-МХ) и фенобарбитал натрия (ФБ) фирмы «Merck». 20-МХ вводили в оливковом масле в дозе 20 мг/кг в течение 3-х дней. ФБ вводили интраперитонеально в дозе 100 мг/кг в течение 3-х дней. Крыс забивали декапитацией через 48 час. после последней инъекции. Ферментации проводили в фосфатном буфере (рН 7,7) при температурах 20—37° С. Инкубационная смесь общим объемом 5 мл содержала 0,001 мол/л никотинамида, 0,002 мол/л НАДФ.Н, от 0,50 до 1,0 мг/мл микросомального белка и различные концентрации циклогексана в 0,1 мл ацетона. Реакцию начинали добавлением НАДФ.Н и прерывали через 10 мин. введением 0,5 мл 30% трихлоруксусной кислоты. Реакцию характеризовали скоростями расходования циклогексана  $W_0$  в мол/л·сек, поэтому реакционную смесь центрифугировали 10 мин. при 5000 g и супернатант встряхивали с 2 мл бутилацетата. Бутилацетатный слой, содержащий циклогексан и единственный продукт его превращения — циклогексанол, анализировали методом г.ж.х. на приборе «Хром-31». Колонка длиной 3,6 м и диаметром 6 мм содержала полиэтиленгликоль-6000 (15%) на хроматоне N-AW. Температура испарителя и термостата 80°, детектор — пламенно-ионизационный, газ-носитель — гелий. Циклогексанол определяли в тех же условиях при 110°. Для количественного определения циклогексана в качестве внутреннего стандарта использовали ацетон. Содержание микросомального белка определяли по методу Лоури (<sup>4</sup>).

Дифференциальные спектры поглощения регистрировали на приборах Unicam-SP-800 и Unicam-SP-700 в кюветах толщиной 1 см при 20°, используя растворы, содержавшие 2 мг/мл микросомального белка и разные концентрации циклогексана в фосфатном буфере с рН 7,5. Содержание цитохрома Р-450 определяли по поглощению его комплекса с СО спектрофотометрически на тех же приборах, используя величину коэффициента экстинкции 91 ммоль·л<sup>-1</sup>·см<sup>-1</sup> (<sup>5</sup>).

Циклогексан (RH) при взаимодействии с цитохромом Р-450 микросом печени вызывает спектральные изменения первого типа (см. рис. 1). Из зависимости обратной величины  $\Delta D$ , равной разнице оптических плотностей при 391 и 417 нм, от обратной концентрации циклогексана вычислена константа равновесия  $K_s$ , характеризующая фермент-субстратное взаимодействие при 20° и равная  $0,49 \cdot 10^{-4}$  мол/л.

При 37° изучено влияние количества ацетона в инкубационной смеси на скорость гидроксилирования и показано, что содержание ацетона, большее чем 0,5 мл на 5 мл среды, вызывает снижение скорости процесса инактивации фермента. Поэтому все опыты проведены при объемном содержании ацетона не больше 10%. Зависимость окисления РН от времени инкубации при 30° показала, что ферментация в течение 10 мин. позволяет корректно вычислить начальную скорость гидроксилирования РН.

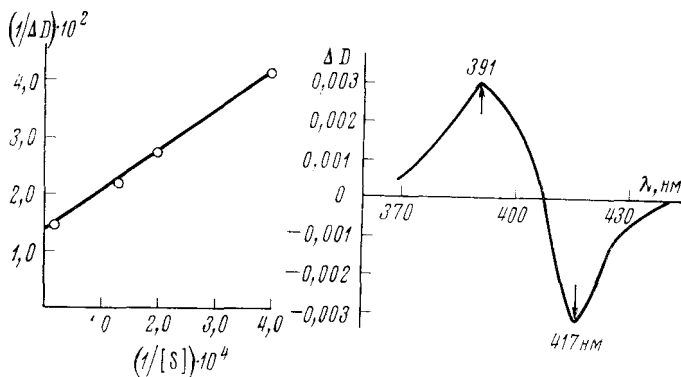


Рис. 1. Спектральные изменения при взаимодействии микросом с циклогексаном и зависимость их интенсивности от концентрации  $C_6H_{12}$ : 20°, 2 мг/мл микросомального белка в фосфатном буфере с рН 7,50

При 37° скорость реакции прямо пропорциональна содержанию микросомального белка до 1,0 мг/мл (см. рис. 2, 1). При той же температуре с ростом начальной концентрации НАДФ.Н скорость реакции увеличивается, достигая предела при  $[НАДФ.Н]_0 = 3,0 \cdot 10^{-3}$  мол/л (см. рис. 2, 2).

При 20—37° изучена зависимость скорости реакции от концентрации циклогексана. Эта зависимость описывается уравнением Михаэлиса — Ментен (см. рис. 3), из которого вычислены значения констант Михаэлиса  $K_m$  и констант скорости распада фермент-субстратного комплекса  $k_2$  при разных температурах (см. табл. 1). Мольное содержание цитохрома Р-450 в этой серии опытов составляло  $4,0 \cdot 10^{-7}$  мол/л.

Зависимость констант скорости распада фермент-субстратного комплекса  $k_2$  от температуры описывается уравнением Аррениуса (см. рис. 4), по которому была вычислена энергия активации распада комплекса, равная 10,50 ккал/моль. Константа  $k_2$  в общем виде равна:  $9,40 \cdot 10^6 \exp(-10500/RT)$  сек<sup>-1</sup>, а активационные параметры распада фермент-субстратного комплекса составляют при 30°:

$$\Delta H^* = 9,90 \text{ ккал/моль и } \Delta S^* = -28,5 \text{ кал/мол} \cdot \text{град.}$$

Гидроксилирование циклогексана ферментными системами, индуцированными 20-МХ и ФБ характеризуется при 37° величинами  $K_m$ , равными  $2,2 \cdot 10^{-4}$  мол/л для 20-МХ-микросом и  $2,27 \cdot 10^{-4}$  мол/л для ФБ-микросом. ФБ почти в 2 раза увеличивает содержание цитохрома в микросомальном белке, что приводит к увеличению скорости реакции гидроксилирования циклогексана. Для обоих индукторов характерно увеличение значений  $K_m$  по сравнению с интактными ферментными системами (см. табл. 1), что соответствует уменьшению сродства циклогексана к индуцированным системам в сравнении с интактными.

Таблица 1

Кинетические параметры гидроксилирования циклогексана микросомами печени

| Т-ра, °С | $10^6 \cdot k_2 \cdot [E]_0$ , мол/л · сек | $k_2$ , сек <sup>-1</sup> | $10^4 \cdot K_m$ , мол/л |
|----------|--------------------------------------------|---------------------------|--------------------------|
| 20       | 5,00                                       | 0,12                      | 0,65                     |
| 25       | 7,50                                       | 0,18                      | 1,10                     |
| 30       | 9,10                                       | 0,23                      | 1,40                     |
| 37       | 13,10                                      | 0,33                      | 1,75                     |

Так как при  $20^\circ K_s = \frac{k_{-1}}{k_1} = 0,49 \cdot 10^{-4}$  мол/л, а  $K_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} = 0,65 \cdot 10^{-4}$  мол/л, где  $k_{-1}$  и  $k_1$  — константы скорости обратной диссоциации и образования фермент-субстратного комплекса, то из двух полученных уравнений можно вычислить значения констант  $k_{-1}$  и  $k_1$ , зная величину  $k_2 = 0,12 \text{ сек}^{-1}$  при  $20^\circ$  (см. табл. 1). Решение системы двух уравнений дает величины  $k_1 = 0,75 \cdot 10^4 \text{ л/моль сек}$  и  $k_{-1} = 0,367 \text{ сек}^{-1}$ . Полученные количественные характеристики свидетельствуют о том, что константа скорости

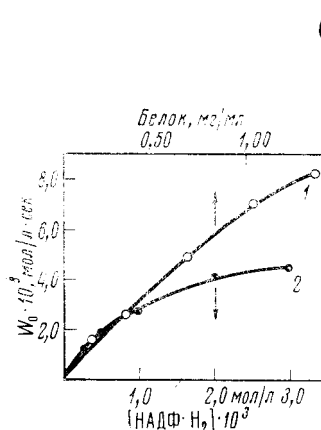


Рис. 2

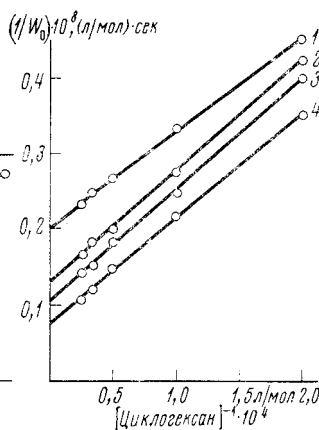


Рис. 3

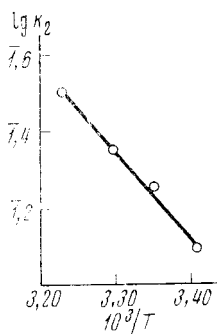


Рис. 4

Рис. 2. Влияние концентрации микросомального белка (1) и концентрации НАДФ. Н (2) на скорость гидроксирования циклогексана при  $37^\circ$ : 1 —  $[\text{НАДФ} \cdot \text{Н}]_0 = 0,002 \text{ мол/л}$ ,  $[\text{C}_6\text{H}_{12}]_0 = 10^{-4} \text{ мол/л}$ ; 2 — белок —  $0,68 \text{ мг/мл}$ ,  $[\text{C}_6\text{H}_{12}]_0 = 10^{-4} \text{ мол/л}$ .

Рис. 3. Зависимость обратной скорости реакции от обратной концентрации циклогексана при  $[\text{НАДФ} \cdot \text{Н}]_0 = 0,002 \text{ мол/л}$  и концентрации белка  $0,80 \text{ мг/мл}$ : 1 —  $20^\circ$ , 2 —  $25^\circ$ , 3 —  $30^\circ$  и 4 —  $37^\circ$ .

Рис. 4. Зависимость константы скорости распада фермент-субстратного комплекса  $k_2$  от температуры.

образования фермент-субстратного комплекса довольно велика, а константа скорости обратной диссоциации этого комплекса в 3 раза превосходит константу скорости распада комплекса с образованием продукта реакции — циклогексанола.

Очень важно сравнить полученные нами энергетические характеристики ферментативного окисления циклогексана и нафталина, принадлежащих к разным классам химических соединений и характеризующихся различными прочностями связей С—Н в молекуле. Энергия активации распада комплекса фермента с нафталином в сопоставимых условиях равна  $14,5 \text{ ккал/моль}$ , что существенно выше энергии активации распада комплекса того же фермента с циклогексаном ( $10,5 \text{ ккал/моль}$ ). Такое снижение энергии активации при переходе от нафталина к циклогексану представляется разумным, так как прочность связи С—Н в нафталине ( $\alpha$ -положение) выше прочности С—Н-связи циклогексана, что может сказаться в лимитирующей стадии распада фермент-субстратного комплекса, включающей разрыв атакуемой С—Н-связи субстрата.

Институт биоорганической химии  
Академии наук БССР  
Минск

Поступило  
24 IV 1975

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> M. R. Waterman, V. Ulrich, R. W. Estabrook, Arch. Biochem. and Biophys., v. 155, 355 (1973).
- <sup>2</sup> A. Krämer, H. Staudinger, V. Ulrich, Chem.-Biol. Interactions, v. 8, 11 (1974).
- <sup>3</sup> A. A. Азрем, С. А. Усанов, Д. И. Метелица, ДАН, т. 218, 1457 (1974).
- <sup>4</sup> O. H. Lowry, N. I. Rosebrough, et al., J. Biol. Chem., v. 193, 265 (1951).
- <sup>5</sup> T. Omura, R. Sato, J. Biol. Chem., v. 239, 2379 (1964).