

Б. СЕРГЕЕВ, М. ГУБЕРГРИЦ, В. КОБЛЯКОВ

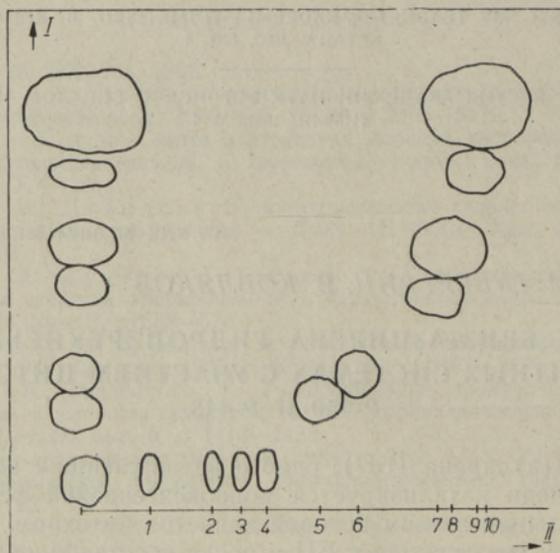
ОКИСЛЕНИЕ БЕНЗ(А)ПИРЕНА ГИДРОПЕРЕКИСЬЮ КУМИЛА В ФЕРМЕНТНЫХ СИСТЕМАХ С УЧАСТИЕМ ЦИТОХРОМОВ P-450 И P-448

Окисление бенз(а)пирена (БП), одного из важнейших канцерогенов, в микросомах печени катализируется монооксигеназной ферментной системой, терминальным звеном которой является цитохром P-450. В окисленной форме он связывается с БП и после восстановления (в качестве донора электронов ферментная система использует NADPH) фермент-субстратный комплекс взаимодействует с молекулярным кислородом, образуя тройной комплекс: восстановленный цитохром P-450 — субстрат — кислород. Второй электрон от NADPH активирует кислород в тройном комплексе, который распадается на эпоксид БП, воду и окисленный цитохром P-450 [1]. Предполагается, что эпоксиды БП гидролизуются до дигидродиолов (ДДО) БП в присутствии эпоксидазы [2] или подвергаются нуклеофильной атаке белки и нуклеотиды. Другой путь в метаболизме БП — возможная перегруппировка эпоксидов до фенолов или образование фенолов гидрокселированием исходной молекулы без промежуточного эпоксидирования БП. Ответ на этот и другие вопросы, связанные с пониманием химического канцерогенеза, даст детальное изучение природы активного кислорода в тройном комплексе. Наиболее вероятной механической моделью образования эпоксидов является т. н. оксеноидный механизм [2], согласно которому оксен (кислород с шестью электронами, названный так по аналогии с карбенами CR_2 и нитренами NR) и есть активный кислород, а оксеноидным реагентом выступает перекисный комплекс ($Fe^{3+}O_2^{2-}$) [3], существование которого, казалось бы, подтверждается проявлением каталитических свойств цитохрома в присутствии перекиси водорода и органических гидроперекисей без участия NADPH/ O_2 . Однако в работах последних лет [4, 5] отмечено несоответствие между продуктами, полученными при окислении одного субстрата обеими системами, что ставит под сомнение адекватность замены NADPH/ O_2 гидроперекисями.

Цель настоящей работы — оценка возможности использования гидроперекиси в ферментной системе для моделирования процессов микросомального окисления ксенобиотиков.

Методика и объекты исследования

Микросомальную фракцию выделяли из печени крыс (самцов) линии Вистар, весом 250—300 г. Печень гомогенизировали в трехкратном 1,15%-ном растворе KCl. Центрифугировали гомогенат при 12 000 g в течение 15 мин, затем — надосадочную жидкость при 105 000 g в течение 1 ч. Осажденные микросомы суспендировали в 1,15%-ном KCl. В работе использовали как интактных, так и индуцированных 3-метилхолантеном крыс, которым за сутки до начала опыта вводили раствор



Хроматограмма разделения в тонком слое реакционной смеси продуктов ферментативного окисления бенз(а)пирена в микросомальной системе. I — разделяющая смесь гексан — этилацетат 3 : 1; II — разделяющая смесь бензол — этанол 10 : 3.

Вещество	R_f	Окраска при	
		254 нм	в NH_3DH
1. 4-ОН-БП?	0,16	голубая	желтая
2. 9,10-ДДО БП	0,29	фиолетовая	—
3. 7,8-ДДО БП	0,36	фиолетовая	—
4. 4,5-ДДО БП	0,38	голубая	бледно-розовая
5. 3,6-хинон БП	0,46	красная	—
6. 1,6-хинон БП	0,63	желтая	—
7. 9-ОН БП	0,79	фиолетовая	зеленая
8. 3-ОН БП	0,83	голубая	зеленая
9. 6-ОСН ₃ БП	0,90	фиолетовая	—
10. БП	0,92	фиолетовая	—

3-метилхолантрена (ЗМХ) концентрацией 25 мг/кг в минеральном масле. Концентрацию белка определяли биуретовым методом [6]. Общий объем инкубационной смеси 2 мл, продолжительность опытов 2 мин. Инкубационная среда содержала: микросомальный белок (2 мг/мл); MgCl_2 (8 мМ); раствор меченого БП в этаноле (7,10- C^{14} , 60,7 $\mu\text{л/нМ}$; RCI Amersham, Англия) концентрацией 10^{-6} М и фосфатный буфер (5 мМ); рН 7,4. Опыты термостатировали при температуре $37 \pm 0,1^\circ\text{C}$, в тех же случаях, когда определяли кажущуюся энергию активации, температуру варьировали от 4 до 37° . Реакция начиналась добавлением в инкубационную смесь 4 мМ NADPH или 0,4 мМ гидроперекиси кумила (ГПК), в зависимости от условий опыта. Останавливали реакцию добавлением в среду этилацетата в равном объеме.

БП и продукты его окисления извлекались из реакционной смеси трехкратным (по 2 мл) экстрагированием этилацетатом, экстракт упаривали до 0,3 мл на роторном испарителе и наносили на пластинки «Silufol UV-254» по 0,1 мл для тонкослойного хроматографического разделения (ТСХ). Чтобы определить местоположения ДДО меченого БП, на ту же пластинку в качестве индикатора наносили смесь ДДО немеченого БП, полученную путем окисления немеченого БП в инкубационной среде, как было указано выше. Метаболиты БП разделяли методом ТСХ в двух направлениях: сначала в смеси

растворителей этилацетат—гексан (1:3), а затем бензол—этанол (10:3) (рисунок).

Продукты окисления БП идентифицировали по флуоресцентным спектрам, снятым на приборе «Перкин-Эльмер», и/или по абсорбционным спектрам, снятым на спектрофотометре «Specord UV-VIS». ДДО меченого БП разделяли методом ТСХ, используя систему растворителей бензол—этанол (10:3). Количественное определение ДДО БП производилось на приборе «Dünnschicht Skenner II Bertold» (ФРГ) по содержанию ^{14}C . В работе использованы х.ч. реактивы.

Все эксперименты проводили в лаборатории канцерогенных веществ Всесоюзного онкологического научного центра АМН СССР в соответствии с программой сотрудничества обоих учреждений в области изучения химического канцерогенеза.

Результаты исследования и их обсуждение

Индукция микросом ЗМХ вызывает смещение максимума поглощения цитохрома Р-450 в СО-дифференциальном спектре (448 нм), что связано с появлением цитохрома Р-448, отличающегося высокой каталитической активностью по отношению к БП. Скорость окисления БП почти в 20 раз больше, чем в интактной микросомальной системе [7]. Для интактных микросом, содержащих NADPH, характерно незначительное увеличение выхода 4,5-ДДО БП (табл. 1), а для индуцированных микросом, содержащих NADPH, помимо значительного увеличения выхода ДДО БП, меняется и их распределение — выход 9,10-ДДО БП составляет примерно 50% общего выхода ДДО БП. Картина выхода ДДО БП в ферментной системе, содержащей ГПК вместо NADPH, резко меняется. Как для интактных (табл. 1, 1), так и для индуцированных микросом (табл. 1, 2) характерно появление только одного 4,5-ДДО БП. Другие ДДО БП не были обнаружены.

Полагая, что действие эпоксидазы не зависит от температуры и положения атома кислорода в молекуле БП, можно сделать вывод, что рассчитанная энергия активации определяет энергию связывания цитохрома с субстратом. С увеличением энергии активации уменьшается энергия связывания. Как видно из табл. 2, энергия активации меняется практически при переходе от интактных к индуцированным микросомам, содержащим NADPH, только для 4,5-ДДО. Для ферментных систем, содержащих ГПК, процесс образования ДДО БП — эпоксидов БП — не зависит от температуры.

Таким образом, данные таблиц проясняют два существенных обстоятельства. Во-первых, с повышением сродства БП к ферментной системе, содержащей цитохром Р-448 (в отличие от интактной ферментной системы), изменяется и распределение ДДО БП. Это, вероятно, связано с возможным существованием в микросомах, индуцированных

Таблица 1

Выход дигидродиолов БП, образующихся при его метаболизме в микросомах печени крыс интактных (1) и индуцированных ЗМХ (2), нМ

Микросомы	Ферментная система	4,5-ДДО	7,8-ДДО	9,10-ДДО
1	NADPH/O ₂	9,16±1,57	5,90±0,81	5,30±0,81
	ГПК	8,43±1,34	на уровне фона	на уровне фона
2	NADPH/O ₂	21,68±1,92	27,62±2,10	49,30±3,71
	ГПК	12,46±1,76	на уровне фона	на уровне фона

Энергия активации дигидродиолов БП при его метаболизме в микросомах печени крыс интактных (1) и индуцированных ЗМХ (2), ккал/моль

Микро-сома	Ферментная система	4,5-ДДО	7,8-ДДО	9,10-ДДО
1	NADPH/O ₂ ГПК	1,433±0,353 около 0	1,195±0,268	1,218±0,302
2	NADPH/O ₂ ГПК	2,383±0,373 около 0	1,520±0,363	1,524±0,474

ЗМХ, изоэнзимов, проявляющих разную областную селективность при связывании с субстратом. В нашем случае константа сродства к молекуле БП изоформы цитохрома P-450 в индуцированных микросомах для положений 9,10 значительно выше, чем для 4,5 и 7,8. Это подтверждается и данными табл. 2. Увеличение энергии активации процесса образования 4,5-ДДО БП в индуцированных микросомах свидетельствует о том, что комплементарность фермента к переходному состоянию молекулы БП при образовании эпоксида в положении 4,5 понижается.

Во-вторых, гидроперекисный механизм отличается от т.н. оксеноидного прежде всего разным распределением ДДО БП: при замене NADPH/O₂ на ГПК в ферментной системе образуется только 4,5-ДДО БП, т. е. в положении молекулы, отличающемся наибольшей реакционной способностью в реакциях присоединения кислорода [8]. Поэтому можно предположить, что на первой стадии окисления БП в системе, содержащей ГПК, образуется комплекс цитохром P-450 — ГПК, который и взаимодействует с субстратом. В образованном тройном комплексе донором электрона служит тиольная группа фермента, связывающая протогем с белком, что приводит к гомолитическому разрыву связи O—O в ГПК (в отличие от оксеноидного механизма, в котором предусматривается гетеролитический разрыв связи O—O) [5]. Терминальный атом кислорода гидроперекиси проявляет электрофильные свойства и независимо от структуры фермента присоединяется к атому углерода в молекуле БП с максимальной электронной плотностью. Другим объяснением различия в выходе ДДО для NADPH/O₂ и ГПК-содержащих ферментных систем служит предположение о существовании изоформ цитохрома P-450, обладающих различной каталитической активностью в присутствии разных гидроперекисей. Это подтверждают данные [5] о различии продуктов окисления одного и того же субстрата при использовании различных гидроперекисей. Поэтому необходимы дальнейшие исследования особенностей окисления субстратов в ГПК-содержащих системах, чтобы окончательно решить вопрос о правомерности замены NADPH гидроперекисями.

ЛИТЕРАТУРА

1. Estabrook, R. W., Patrizi, V. W., Prough, R. The activation of polycyclic hydrocarbons: cytochromes P-450, oxygen and electrons. — *Canc. Enzym.*, 1976, v. 12, p. 103—117.
2. Jerina, D. M., Daly, J. W., Witkop, B., Zalzman-Mirenberg, P., Udenfriend, S. 1,2-naphthalene oxide as an intermediate in the microsomal hydroxylation of naphthalene. — *Biochem.*, 1970, v. 9, p. 147—155.
3. Carpevila, I., Estabrook, R. W., Prough, R. A. Differences in the mechanisms of NADPH- and cumene hydroperoxide supported reactions of cytochrome P-450. — *Arch. Biochem. Biophys.*, 1980, v. 200, p. 186—196.
4. Ullrich, V., Staudinger, H. Aktivierung von Sauerstoff in Modellsystemen in Biochemie des Sauerstoffs. New York, 1969, S. 229.

5. White, R. E., Coon, M. J. Oxygen activation by cytochrome P-450. — *Ann. Rev. Biochem.*, 1980, v. 49, p. 315—336.
6. Gornall, A. D., Bordavill, Ch. J., David, M. N. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. — *J. Biol. Chem.*, 1949, v. 177, p. 151—166.
7. Kuntsman, W., Levin, W., Schilling, G., Alvares, A. The effects of 3-methylcholanthrene and phenobarbital on liver microsomal hemoproteins and on the hydroxylation of benzpyrene. — In: *Microsomes and Drug Oxidation*. New York—London, v. 2, p. 349—370.
8. Pullman, A., Pullman, B. Electronic structure and carcinogenic activity of aromatic molecules. — *Adv. Canc. Res.*, 1955, v. 3, p. 117—122.

*Институт химии
Академии наук Эстонской ССР*

Поступила в редакцию
10/II 1982

B. SERGEJEV, M. GUBERGRITS, V. KOBLIAKOV

**BENZO(A)PÜREENI OKSÜDEERIMINE ENSÜUMISÜSTEEMIDES
KUMEENI HÜDROPEROKSIIDIGA TSÜTOKROOMIDE P-450 JA P-448
MANULUSEL**

Benzo(a)püreeni (BP) oksüdeerimisel NADPH-sõltuvates ensüümisüsteemides, mida sisaldavad indutseerimata (1) või 3-metüülkolantreeniga indutseeritud (2) mikroosomid, on BP dihidrodioolide (DHD) saagised erinevad. Nii on süsteemis 2 BP-9,10-DHD saagis tunduvalt suurem kui BP-4,5-DHD ja BP-7,8-DHD saagised. BP-DHD tekke aktiivsioonienergia süsteemis 2, võrreldes süsteemiga 1, on suurem ainult BP-4,5-DHD osas. On oletatud, et BP seostub tsütokroom P-450 eri vormidega stereoselektiivselt. Kui asendada NADPH mõlemas süsteemis kumeeni hüdroperoksiidiga, siis moodustub ainult BP-4,5-DHD, mille saagis ei olene temperatuurist. See viitab võimalusele, et BP oksüdeerimise mehhanism NADPH ja kumeeni hüdroperoksiidi korral on erinevad.

B. SERGEYEV, M. GUBERGRITS, V. KOBLYAKOV

**OXIDATION OF BENZO(A)PYRENE BY CUMENE HYDROPEROXIDE
IN ENZYMATIC SYSTEMS CONTAINING CYTOCHROMES P-450 AND P-448**

Under the oxidation of benzo(a)pyrene (BP) in NADPH-depending enzymic systems (ES) containing intact (I) and by 3-methyl-cholanthrene-induced (II) microsomes, a certain difference in the yield of dihydrodiols (DDO) of BP was stated. Thus, in the case of (II) the yield of 9,10-DDO-PB is markedly increased as compared with the 4,5- and 7,8-isomers. The apparent energy of activation of the DDO formation in II is somewhat elevated as compared with the I only for the 4,5-DDO of BP. Therefore, a stereoselectivity in binding BP with different forms of cytochrome is assumed. The substitution of NADPH in I and II by cumene hydroperoxide (CHP) is a cause of the formation of 4,5-DDO only, the yield being independent from the temperature. This phenomenon indicates the difference in the mechanisms of the oxidation of BP in enzymatic systems containing NADPH or CHP.