

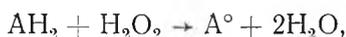


УДК 577.158.52

И. ИСМАХИЛ, Н. В. ГАВРИЛЕНКО,
А. Т. ПИКУЛЕВ, В. П. КУРЧЕНКО

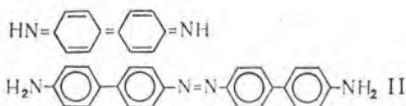
КИНЕТИКА ОКИСЛЕНИЯ БЕНЗИДИНА И ЕГО ПРОИЗВОДНЫХ С УЧАСТИЕМ РАЗЛИЧНЫХ ГЕМОПРОТЕИДОВ

Бензидин и его производные являются исходными веществами и полупродуктами, используемыми в химической промышленности, применяются в медико-биологических исследованиях [1]. Среди них много проканцерогенов, требующих метаболической активации для проявления канцерогенных свойств. Одним из возможных путей их метаболической активации является пероксидазное окисление. Гемоглобин, миоглобин, каталаза, цитохромы v_5 и P-450, другие гемопротеиды обладают свойствами пероксидаз [2]. Они способны катализировать реакции окисления соединений по уравнению:



где AH_2 — донор водорода.

Анализ литературных данных показывает, что пероксидазное окисление бензидина и его производных сопровождается образованием нескольких продуктов реакции [3, 4]. Принято считать, что первичным продуктом пероксидазного окисления бензидина является хинондиимин I



При значении pH 3,7 образуется бис-азодифенил со структурой II. Наряду с этими двумя продуктами реакции возможно образование катионрадикала и его комплекса с переносом заряда между бензидином и его хинондиимином I. Эти продукты окисления могут являться прямыми канцерогенами. Их накопление и высокая стационарная концентрация зависят от эффективности ферментов, катализирующих окисление аминобифенилов.

В связи с этим в настоящей работе проведено сравнительное кинетическое исследование пероксидазного окисления ряда аминобифенилов с убывающей канцерогенностью: бензидина (БД) — сильного канцерогена, слабых канцерогенов — 3,3'-диметилбензидина (ДМБД), 3,3'-димероксибензидина (ДМОБД), а также неканцерогенного 3,3', 5,5'-тетраметилбензидина (ТМБД), рядом гемопротеидов: пероксидазой, гемоглобином, мономерами каталазы, цитохромом P-450 ЛМ₂, микросомами из печени.

Материал и методика

Микросомальную фракцию из печени кроликов выделяли методом дифференциального центрифугирования. Высокоочищенный цитохром

P-450 ЛМ₂ из печени получали по описанной методике [5]. Использовали пероксидазу хрена, гемоглобин, каталазу фирмы «Реанал» (ВНР). Концентрацию белка определяли методом Лоури [6]. Концентрацию цитохромов P-450 — методом Омуро и Сато [7], пероксидазы, гемоглобина, каталазы [8]. Бензидин и его производные очищали возгонкой в вакууме. Концентрацию пергидроля определяли иодометрическим титрованием. Пероксидазное окисление аминов вели в 0,1 М цитратно-ацетатном буфере. В пробирку вносили 0,5 мл субстрата, 0,4 мл буферного раствора и 2,0 мл раствора фермента. Смесь термостатировали 3 мин при 30 °С. Реакцию начинали добавлением 0,1 мл Н₂О₂ и вели при 30 °С. За ее ходом следили по накоплению продуктов реакции. Спектральные параметры ароматических аминов и продуктов их пероксидазного окисления представлены в табл. 1 [9].

Таблица 1

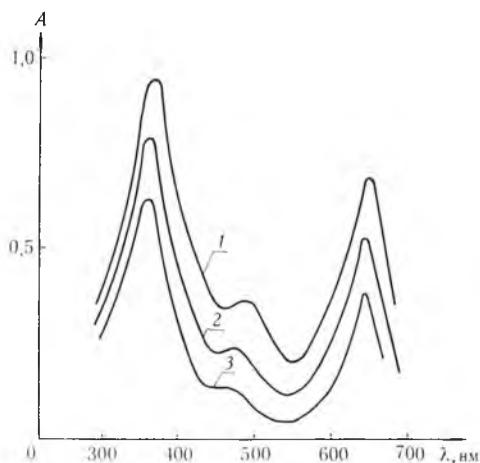
Спектральные характеристики аминобифенилов и продуктов их пероксидазного окисления [9]

Субстрат	Амин		Продукт окисления	
	$\lambda_{\text{макс}}, \text{ нм}$	$(\text{М}^{-1} \text{ см}^{-1}) \times 10^{-4}$	$\lambda_{\text{макс}}, \text{ нм}$	$(\text{М}^{-1} \text{ см}^{-1}) \times 10^{-4}$
БД	283	2,10	590	0,31
3,3'-ДМОБД	304	1,80	460	3,0
3,3'-ДМБД	—	—	580	1,4
3,3', 5,5'-ТМБД	287	2,37	655	3,9

Реакции характеризовали начальными скоростями окисления и каталитическими константами $K_{\text{кат}}$ в с⁻¹.

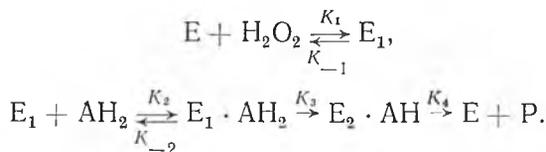
Результаты и их обсуждение

Спектры поглощения оксидантов ТМБД в присутствии пероксидазы, цитохрома P-450 ЛМ₂ и других белков близки, что свидетельствует о схожести состава продуктов окисления этими гемопротеидами (рисунок). Максимальные скорости окисления изучаемых субстратов достигались при рН 5,5 для всех изучаемых белков. В строго идентичных, оптимальных условиях изучены зависимости начальных скоростей окисления БД, ДМБД, ДМОБД и ТМБД от их концентрации. Во всех изученных случаях эти зависимости хорошо описывались уравнением Михаэлиса — Ментен. Из спрямленных зависимостей по методу Лайнуивера — Бэрка определены кинетические характеристики окисления всех субстратов. В табл. 2 приведены каталитические константы, константы Михаэлиса и их отношение $K_{\text{кат}}/K_{\text{м}}$ пероксидазного окисления бензидина и его производных микросомами печени и рядом гемопротеидов в присутствии гидроперекиси водорода. Отношение констант $K_{\text{кат}}/K_{\text{м}}$ характеризует эффективность ферментов. Из табл. 2 видно, что введение метильных (ДМБД) и метокси- (ДМОБД) заместителей в молекулу бензидина по третьему положению и метильных по третьим и пятым положениям (ТМБД) приводит к



Спектры поглощения продуктов пероксидазного окисления ТМБД пероксидазой хрена (1), цитохромом P-450 ЛМ₂ (2) и гемоглобином (3)

значительным изменениям кинетических параметров. Сравнительное рассмотрение литературных данных по пероксидазному окислению этих и других субстратов показывает, что всем кинетическим данным удовлетворяет ранее предложенная схема [10]:



В этой схеме E_1 обозначает I комплекс пероксидазы, $E_1 \cdot AN_2$ — комплекс соединения I пероксидазы с субстратом, $E_2 \cdot AN$ — комплекс полуокисленного субстрата с соединением II пероксидазы. Предполагается, что радикал субстрата AN не выходит в объем, а превращается в продукт реакции на стадии 4.

Применяя условия стационарности к интермедиям E_1 , E_1AN_2 , E_2AN , содержащим разные формы фермента, и пренебрегая диссоциацией E_1 , можно показать, что кинетические параметры являются сложной функцией кинетических констант отдельных стадий и начальной концентрации перекиси водорода [10, 11]:

$$K_{кат} = \frac{K_1 K_3 K_4 [H_2O_2]_0}{K_3 K_4 + K_1 (K_3 + K_4) [H_2O_2]_0},$$

$$K_M = \frac{K_1 K_4 (K_{-2} + K_3) [H_2O_2]_0}{K_3 K_3 K_4 + K_1 (K_3 + K_4) [H_2O_2]_0}.$$

Выражения для $K_{кат}$ и K_M могут быть существенно упрощены с учетом того, что в эксперименте $K [H_2O_2]_0 > K_4$. Действительно, константа скорости $K_1 = 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ [2, 3, 12], а $[H_2O_2] = 1 \text{ mM}$. В таком случае

$$K_{кат} = \frac{K_3 K_4}{K_3 + K_4}, \quad K_M = \frac{K_4 (K_2 + K_3)}{K_2 K_3}.$$

Если учесть, что $K_3 > K_4$ [3, 12], и пренебречь реакцией диссоциации комплекса E_1AN_2 ($K_2 \approx 0$), то $K_{кат} \approx K_4$, а $K_M \approx K_4/K_2$. Таким образом, каталитическая константа близка скорости распада комплекса E_2AN (см. схему). Так как $K_{кат} \approx K_4$, а $K_M \approx K_4/K_2$, то соотношение $K_{кат}/K_M \approx K_2$, т. е. описывает скорость второй стадии процесса. Полученные нами значения констант K_2 хорошо соответствуют литературным данным о скоростях взаимодействия различных субстратов с комплексом I пероксидазы [3, 12]. Сравнивая значения константы скорости K_2 для бензидина и его производных при окислении их пероксидазой хрена, можно наглядно видеть значительный рост константы с введением заместителей в молекулу бензидина. При окислении этих субстратов микросомами печени, цитохромом P-450 ЛМ₂ и гемоглобином K_2 , наоборот,

Таблица 2

Кинетические параметры пероксидазного окисления аминобифенилов микросомами и гемопотеидами

Система	БД			ДМБД			ДМОБД			ТМБД		
	$K_M \cdot M \cdot 10^4$	$K_{кат} \cdot c^{-1}$	$\frac{K_{кат}/K_M}{M^{-1} \cdot c^{-3}} \times 10^{-3}$	$K_M \cdot M$	$K_{кат} \cdot c^{-1}$	$\frac{K_{кат}/K_M}{M^{-1} \cdot c^{-3}} \times 10^{-3}$	$K_M \cdot M \cdot 10^4$	$K_{кат} \cdot c^{-1}$	$\frac{K_{кат}/K_M}{M^{-1} \cdot c^{-3}} \times 10^{-3}$	$K_M \cdot M \cdot 10^4$	$K_{кат} \cdot c^{-1}$	$\frac{K_{кат}/K_M}{M^{-1} \cdot c^{-3}} \times 10^{-3}$
микросомы	3,64	32,8	90,1				1,25	22,7	181,6	0,71	3,1	43,6
цитохром P-450 ЛМ ₂	1,96	6,7	342				1,82	0,4	2,2	9,09	2,4	2,6
гемоглобин	1,43	163,8	1145	117	32	273	1,04	6,9	66,7	1,02	14,1	138
каталаза							0,13	4,1	315,8	1,3	0,9	70
пероксидаза	1,18	1320	11186	0,74	1400	18918	0,68	2800	41176	1,69	8460	50059

уменьшается в 2, 25 и 10 раз соответственно с увеличением количества заместителей в молекуле бензида. Изменение константы K_4 носит аналогичный характер в изученных системах (см. табл. 2).

Сравнение $K_{кат}/K_m$ (K_2) для ряда гемопротеидов при окислении бензида показывает, что каталаза практически не окисляет бензидин. Цитохром P-450 LM_2 в 35 раз менее эффективен при пероксидазном окислении бензида гемоглобином и в 327 раз — пероксидазы хрена. Введение метильных заместителей в 3 и 5 положения молекулы бензида приводит к значительному уменьшению $K_{кат}$ (K_4) для всех систем, за исключением пероксидазы хрена, у которой наблюдается обратная зависимость. Эффективность пероксидазного окисления производных бензида с введением заместителей уменьшается для всех систем.

Таким образом, при пероксидазном окислении бензида и его производных рядом гемопротеидов и микросомами печени образуются спектрально идентичные продукты реакции. Бензидин эффективно окисляется микросомами печени, цитохромом P-450 LM_2 и особенно гемоглобином. Введение метильных и метоксизаместителей в молекулу бензида (ДМБД, ДМОБД, ТМБД) резко снижает эффективность пероксидазного катализа цитохромом P-450 LM_2 , мономерами каталазы, гемоглобином и микросомами, но существенно увеличивает для пероксидазы хрена.

Список литературы

1. Канцерогенные вещества (справочник). М., 1987. С. 332.
2. Саундере Б. К. Пероксидазы и каталазы // Неорганическая биохимия / Под ред. Г. Эйхгорна. М., 1978. Т. 2. С. 434.
3. Yamazaki I. Peroxidase // Molecular mechanisms of oxygen activation / Edit. O. Nayaichi. New York, 1974. P. 535.
4. Савенкова М. И., Курченко В. П., Метелица Д. И. // Биохимия. 1984. Т. 49. № 7. С. 1147.
5. Еремин А. Н., Усанов С. А., Метелица Д. И. // Биоорганическая химия. 1980. № 6. С. 757.
6. Lowry O. H., Posebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. // Journ. Biol. Chem. 1951. V. 193. P. 265.
7. Omura T., Sato R. J. // Ibid. 1964. V. 251. P. 3442.
8. Shanon L., Kay M. E., Lew E. J. // Ibid. 1966. V. 341. № 9. P. 2166.
9. Савенкова М. И., Курченко В. П., Метелица Д. И. // Изв. АН БССР. Сер. хим. 1983. № 5. С. 41.
10. Лебедева О. В., Угарова Н. Н., Березин И. В. // Биохимия. 1977. Т. 42. № 8. С. 1372.
11. Ugarova N. N., Lebedeva O. V., Berezin J. V. // Journ. Mol. Catal. 1981. V. 13. P. 215.
12. Yamazaki I., Yokota K. // Mol. Cell. Biochem. 1973. V. 2. № 1. P. 39.

УДК 577.164.32+612.822.56+616.833

В. Т. ШАЛАТОНИН, Н. Н. ПЕТРАШЕВСКАЯ, Т. О. ЧЕРНОВА

ВЛИЯНИЕ α -ТОКОФЕРОЛА, РУТИНА И КВЕРЦЕТИНА НА РАЗВИТИЕ РАННЕЙ ДЕГЕНЕРАЦИИ ДВИГАТЕЛЬНЫХ НЕРВНЫХ ВОЛОКОН

Свободные кислородные радикалы вызывают структурно-функциональные повреждения клеток и тканей, нарушая их нормальное функционирование, что определяет развитие многих патологий [1], в том числе и ряда нервно-мышечных [2]. Обнаружение участия свободнорадикального механизма в нейрональной дегенерации [3] открывает возможности для изыскания и применения ингибиторов свободнорадикальных реакций (антиоксидантов) для регуляции дегенерационного процесса в нервно-мышечной системе. В связи с этим необходимы исследования, направленные на выявление потенциальной противодегенерационной активности антиоксидантных веществ. В данной работе изучено влияние на развитие ранней дегенерации двигательных нервных во-