



УДК 577.158.8:543.42

СРАВНЕНИЕ РЕКОНСТРУИРОВАННЫХ ФЕРМЕНТНЫХ СИСТЕМ  
МИКРОСОМ ПЕЧЕНИ КРОЛИКА, СОДЕРЖАЩИХ ЦИТОХРОМЫ  
P-450-LM<sub>2</sub> И P-450-LM<sub>4</sub>

Усанов С. А., Курченко В. П., Метелица Д. И.

Институт биоорганической химии Академии наук БССР, Минск

Констатированы различия спектров поглощения, спектров КД и иммунохимических свойств двух форм цитохрома P-450 из микросом печени кроликов (LM<sub>2</sub> и LM<sub>4</sub>). Изучена кинетика превращения анилина и диметилаанилина в реконструированных системах, включающих в себя обе формы цитохрома P-450, а также NADPH-цитохром-P-450-редуктазу и суммарные микросомные фосфолипиды. Показано, что цитохром P-450-LM<sub>2</sub> эффективно окисляет оба субстрата, в то время как цитохром P-450-LM<sub>4</sub> каталитически инертен по отношению к анилину и диметилаанилину. Цитохром b<sub>5</sub> из микросом печени кроликов в реконструированных системах несколько замедляет окисление диметилаанилина, катализированное цитохромом P-450-LM<sub>2</sub>. Обсуждены причины различной каталитической активности двух форм цитохрома P-450 в окислении анилина и диметилаанилина и показано, что оба субстрата связываются с формой P-450-LM<sub>4</sub> непродуктивно в связи с тем, что эта форма цитохрома P-450 содержит жестко связанные молекулы индуктора — 3-метилхолантрена.

Гидрокселирующая ферментная система микросом печени человека и млекопитающих ответственна за метаболизм ядов, лекарств, канцерогенов и других ксенобиотиков, попадающих в организм [1]. Эта система сложна по своему составу, в нее входят несколько ферментов: цитохром P-450 (КФ 1.14.14.1), NADPH-цитохром-P-450-редуктаза (КФ 1.6.2.4), цитохром b<sub>5</sub> и фосфолипиды [1–5]. Широкая субстратная специфичность микросомной гидрокселирующей системы объясняется существованием множественных форм терминальной оксидазы — цитохрома P-450 [1–14]. В настоящее время многие формы цитохрома P-450 выделены, высоко очищены и охарактеризованы спектральными, иммунохимическими и кинетическими методами [2–14]. Оказалось, что микросомы печени кроликов содержат как минимум семь форм цитохрома P-450, различающихся молекулярными массами, спектральными характеристиками, иммунохимическими и каталитическими свойствами. Некоторые из этих форм характеризуются перекрывающейся субстратной специфичностью [3, 12–14]. Наиболее детально изучаются две формы цитохрома P-450 из микросом печени кроликов: одна (P-450-LM<sub>2</sub>) выделена из микросом печени кроликов, получавших фенобарбитал, и охарактеризована спектрально и кинетически [3–7, 12–14]; другая форма (P-450-LM<sub>4</sub>) выделена из микросом печени кроликов, получавших 3-метилхолантрен [8–10, 13, 14], 5,6-бензофлавоин [6] или 2,3,7,8-тетрахлородибензо-*p*-диоксин [11]. Форма цитохрома P-450-LM<sub>2</sub> из микросом печени кроликов, выделенная в разных лабораториях, имеет близкие характеристики и отличается высокой каталитической активностью в окислении ароматических соединений и в реакциях окислительного дезалкилирования третичных аминов и сложных эфиров [3, 5, 7, 13, 14]. Цитохром P-450-LM<sub>4</sub>, полученный при обработке животных разными индукторами, имеет сходные спектральные характеристики, но сильно различается каталитическими свойствами [6, 8, 10, 12–14]. Ранее мы провели исследования по сравнению спектральных свойств цитохромов P-450-LM<sub>2</sub> и P-450-LM<sub>4</sub> [10], а также их каталитических свойств в окислении анилина и диметилаанилина после встраивания высокоочищенных гемопротендов в микросомы печени кроликов, получавших фенобарбитал, 3-метилхолантрен или не получавших индукторов [15–17]. В результате проведенных нами работ [10, 15–17] оказалось, что оба цитохрома

P-450 сильно различаются по своим спектральным характеристикам и каталитической активности в окислении двух названных субстратов.

Цель настоящей работы — сравнить каталитическую активность цитохромов P-450-ЛМ<sub>2</sub> и P-450-ЛМ<sub>4</sub> в реакциях окисления анилина и диметиланилина в строго идентичных условиях в реконструированных системах, содержащих наряду с цитохромами NADPH-цитохром-P-450-редуктазу и суммарные микросомные фосфолипиды. Проведенная работа показала, что цитохром P-450-ЛМ<sub>2</sub> в реконструированной системе эффективно окисляет оба субстрата, в то время как цитохром P-450-ЛМ<sub>4</sub> в тех же условиях совершенно инертен в отношении обоих субстратов, что хорошо согласуется с полученными нами ранее спектральными данными [10] и кинетическими параметрами окисления анилина и диметиланилина микросомами, обогащенными обоими цитохромами P-450 [15–17]. Другая задача этой работы — сравнить свойства компонентов микросомных реконструированных систем с данными других исследователей, чтобы выяснить возможные причины различий спектральных и кинетических характеристик этих систем.

### Свойства высокоочищенных компонентов реконструированных систем микросом печени

**Цитохром P-450-ЛМ<sub>2</sub>.** Электрофоретически гомогенный белок (рис. 1) имел характеристики (табл. 1), которые хорошо согласуются с данными других лабораторий [3–5, 13, 14]. В обычном состоянии окисленный цитохром P-450-ЛМ<sub>2</sub> находится в низкоспиновом состоянии (максимум полосы Сорс 418 нм, рис. 2). Цитохром P-450-ЛМ<sub>2</sub> эффективно взаимодействует со многими субстратами микросомной системы (диметиламин, нафталин, циклогексан и др.) и переходит при этом в высокоспиновое состояние. Разностные спектры, характеризующие взаимодействие цитохрома P-450-ЛМ<sub>2</sub> с химическими соединениями различной природы, подробно обсуждены нами ранее [10]. Большой интерес представляют спектры КД цитохрома P-450-ЛМ<sub>2</sub>. В окисленном состоянии они характеризуются интенсивной отрицательной полосой в области 330–500 нм (рис. 3). Максимум полосы Сорс приходится на 422 нм. Наблюдается также небольшой максимум в отрицательной области на 350 нм. Цитохром P-450-ЛМ<sub>2</sub> обнаруживает также небольшую полосу в положительной области с максимумом на 580 нм. После восстановления цитохрома

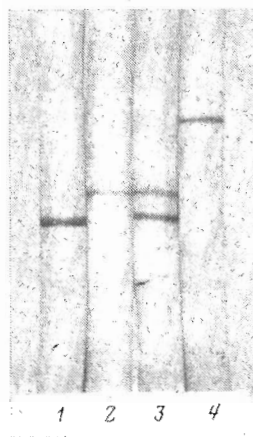


Рис. 1. Электрофореграммы белков, использованных при реконструкции гидрокселирующей системы: 1 — цитохром P-450-ЛМ<sub>2</sub>; 2 — цитохром P-450-ЛМ<sub>4</sub>; 3 — те же цитохромы вместе; 4 — NADPH-цитохром - P-450 — редуктаза

Таблица 1

Свойства компонентов микросомной ферментной системы

Компоненты	Индуклирующий агент	Молекулярная масса, минимальная	Простетическая группа	$\lambda_{\text{макс}}$ , нм для форм		
				восстановленной	окисленной	восстановленной, в присутствии СО
P-450-ЛМ <sub>2</sub>	Фенобарбитал	49 000	1 гем	418, 535, 568	413, 544	450, 522
P-450-ЛМ <sub>4</sub>	3-Метилхолантрет	54 000	»	394, 645	411, 542	448, 550
P-450-ЛМ <sub>4</sub> *	5,6-Бензофлафон	55 000	»	394, 645	411, 542	
Редуктаза	Фенобарбитал	74 000	1 FMN, 1 FAD	382, 456	— **	—

\* Характеристики взяты для сравнения из работ [2, 12].

\*\* Нет данных.

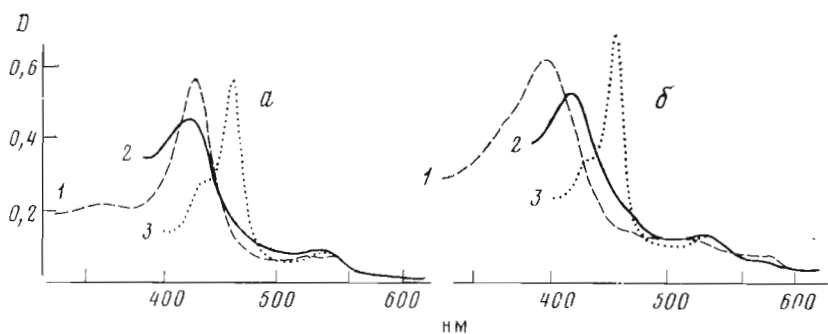


Рис. 2. Спектры поглощения цитохромов P-450-ЛМ<sub>2</sub> (а) и P-450-ЛМ<sub>4</sub> (б): 1 — окисленная форма; 2 — восстановленная форма, 3 — комплекс восстановленного гемопротейда с СО

P-450-ЛМ<sub>2</sub> дитионитом натрия интенсивность полосы КД в отрицательной области уменьшается и максимум поглощения сдвигается на 393 нм, что свидетельствует об изменении спинового состояния восстановленного гемопротейда. Характеристики спектров КД цитохрома P-450-ЛМ<sub>2</sub> из микросом печени кроликов согласуются в данными КД для этой формы гемопротейда, полученной Кун и сотр. [18].

*Цитохром P-450-ЛМ<sub>4</sub>*. Характеристики электрофоретически гомогенного белка (см. рис. 1, табл. 1) хорошо согласуются со спектральными данными для формы цитохрома P-450-ЛМ<sub>4</sub>, полученной при использовании в качестве индуктора 5,6-бензофлавона [2, 6, 12], а также близки к спектральным данным, полученным при использовании 3-метилхолантрена в качестве индуктора [8, 13, 14].

Цитохром P-450-ЛМ<sub>4</sub> в окисленном состоянии находится в высокоспиновой форме и эффективно взаимодействует со многими лигандами, меняя при этом спиновое состояние. Низкоспиновые комплексы цитохрома P-450-ЛМ<sub>4</sub> с диметиланилином и нафталином различаются тем, что лиганды располагаются, по-видимому, параллельно плоскости гема, так как место связывания субстрата в апоферменте у этой формы цитохрома P-450 занято индуктором или его метаболитами [14]. Цитохром P-450-ЛМ<sub>4</sub> не взаимодействует со спиртами и гидроперекисью кумила, а также с такими субстратами микросомной системы, как циклогексан и антипириин [10]. Спектры КД формы P-450-ЛМ<sub>4</sub> сильно отличаются от спектров формы P-450-ЛМ<sub>2</sub> (рис. 3 и 4). Максимум полосы Soret в отрицательной области спектров КД приходится на ~410 нм. В ультрафиолетовой части спектра в положительной области наблюдается небольшой максимум ~300 нм. Спектры восстановленной формы цитохрома P-450-ЛМ<sub>4</sub> сходны со спектрами восстановленного P-450-ЛМ<sub>2</sub>, по максимуму в отрицательной области приходится на 396 нм. Из спектров КД P-450-ЛМ<sub>2</sub> и -ЛМ<sub>4</sub> в восстановленной форме можно заключить, что оба гемопротейда в этом состоянии характеризуются близкой конформацией. Необходимо отметить, что спектры КД формы цитохрома P-450-ЛМ<sub>4</sub> существенно отличаются от спектров цитохрома P-450-ЛМ<sub>4</sub>, полученного из микросом печени кроликов, индуцированных 5,6-бензофлавоном [18]. Это отличие отражает разные конформационные состояния двух белков. Важно, что Кун и сотр. [18] выделяют цитохром P-450-ЛМ<sub>4</sub> в виде смеси низкоспиновой и высокоспиновой форм, в то время как мы имеем дело только с высокоспиновой формой гемопротейда. Характеристика выделенной нами формы цитохрома P-450 ближе к тем, что приводят Сато и сотр. [13, 14] для белка, выделенного из микросом печени кроликов, индуцированных 3-метилхолантеном, чем к тем, что приводятся для белка, выделенного из микросом печени кроликов, индуцированных 5,6-бензофлавоном [2, 6, 18].

Разница двух форм цитохрома P-450 подтверждена нами иммунохимически. Данные по двойной диффузии антител к цитохрому P-450-ЛМ<sub>2</sub> (рис. 5а) и цитохрому P-450-ЛМ<sub>4</sub> (рис. 5б) свидетельствуют, что осаждение анти-P-450-ЛМ<sub>2</sub> наблюдается только с цитохромом P-450-ЛМ<sub>2</sub> и отсут-

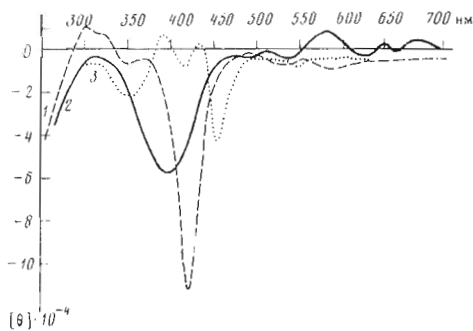


Рис. 3

Рис. 3. Спектры КД цитохрома P-450-ЛМ<sub>2</sub>: 1 — окисленная форма, 2 — восстановленная форма, 3 — комплекс восстановленного гемопротенда с СО

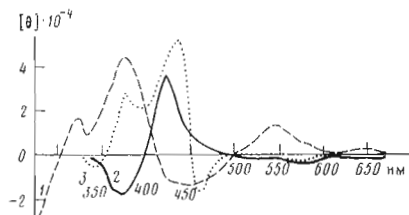


Рис. 4

Рис. 4. Спектры КД цитохрома P-450-ЛМ<sub>4</sub>: 1 — окисленная форма, 2 — восстановленная форма, 3 — комплекс восстановленного гемопротенда с СО

ствует для всех других белков микросомной системы; осаждение анти-P-450-ЛМ<sub>4</sub> наблюдается только для цитохрома P-450-ЛМ<sub>4</sub>. Метод двойной диффузии подтверждает большую разницу двух форм цитохрома P-450 из микросом печени кроликов, образующихся при индукции животных фенобарбитолом и 3-метилхолантеном.

*NADPH-цитохром-P-450-редуктаза* выделена из микросом печени кроликов, индуцированных фенобарбитолом, и имеет характеристики (табл. 1), близкие к литературным данным [19, 20].

*Цитохром b<sub>5</sub>*. Электрофоретически гомогенный белок был получен из микросом печени кроликов, индуцированных фенобарбитолом. Удельное содержание препарата составляло 40–50 нмоль/мг. Цитохром b<sub>5</sub> (молекулярная масса ~12000) в окисленном состоянии характеризуется полосой Сорс с максимумом на 413 нм и в восстановленном состоянии имеет максимумы поглощения при 424, 526, 556 нм, что соответствует литературным данным [21].

### Реконструкция микросомной гидроксилирующей системы

Реконструкцию ферментных гидроксилирующих систем, содержащих цитохромы P-450-ЛМ<sub>2</sub> и P-450-ЛМ<sub>4</sub>, проводили двумя методами — путем встраивания белков-компонентов в фосфолипидные везикулы (метод 1) и холатно-диализным методом, разработанным Рэкером и соотр. [22] (метод 2). Метод реконструкции и условия ее проведения играют важную роль в каталитической активности гидроксилирующего комплекса. Зависимость скорости окисления диметиланилина в реконструированных системах от соотношения количеств цитохрома P-450-ЛМ<sub>2</sub> и редуктазы при различных способах проведения реконструкции (рис. 6) показывает, что скорости реакции окисления диметиланилина минимальны в системе, полученной смешением цитохрома P-450-ЛМ<sub>2</sub> и редуктазы в отсутствие липидов (кривая 1). При последовательном встраивании сначала цитохрома P-450-ЛМ<sub>2</sub>, а затем редуктазы в фосфолипидные везикулы скорости реакции возрастают (кривая 2). Еще большее увеличение скорости процесса достигается при изменении порядка встраивания — сначала редуктаза, а затем цитохром P-450 (кривая 3) или при одновременном встраивании обоих компонентов — редуктазы и цитохрома P-450 (кривая 4). Независимо от порядка встраивания компонентов системы при каждом способе конструирования гидроксилирующего комплекса максимальная скорость процесса достигается при отношении цитохрома P-450-ЛМ<sub>2</sub> к редуктазе, равном 1:1 (см. рис. 6). Полученный результат понятен, так как в фосфолипидных везикулах цитохром P-450-ЛМ<sub>2</sub> и редуктаза образуют комплекс, функционирующий в процессе окисления. Образование такого комплекса доказано спектрально, кинетически и с применением метода гель-хроматографии [23]. При встраивании компо-

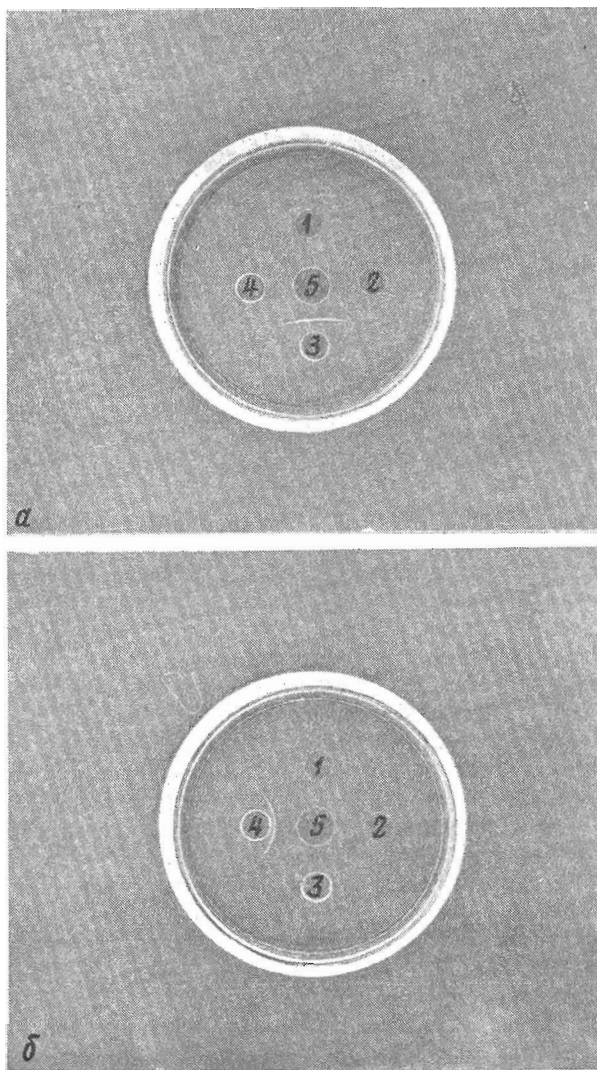
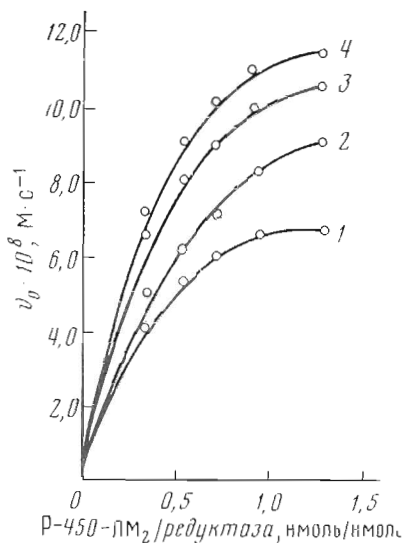


Рис. 5. Гель-диффузионные реакции осаждения антител к цитохрому P-450-ЛМ<sub>2</sub> (а) и антител к цитохрому P-450-ЛМ<sub>4</sub> (б): 1 — цитохром *b*<sub>5</sub>, 2 — NADPH-цитохром-P-450 — редуктаза, 3 — цитохром P-450-ЛМ<sub>2</sub>, 4 — цитохром P-450-ЛМ<sub>4</sub>, 5 — антитела

нентов в фосфолипидные везикулы использовали 1000-кратный избыток фосфолипидов по отношению к цитохрому P-450. Уменьшение концентрации фосфолипидов в реконструированных системах несколько снижает скорости деметилирования диметиланилина (рис. 7). Роль фосфолипидов в реконструированной системе может быть многообразной: они необходимы для облегчения взаимодействия и структурирования компонентов и их комплексов, а также для активации цитохрома P-450 и создания условий концентрирования субстрата и других компонентов системы в мицеллярной фазе, что существенно ускоряет ферментативный процесс [24].

В реконструированной системе процесс окисления диметиланилина существенно замедляется антителами к цитохрому P-450-ЛМ<sub>2</sub> (рис. 8). Ингибирующее действие анти-P-450-ЛМ<sub>2</sub> проявляется при окислении диметиланилина гидроперекисью кумила (кривая 1), при его окислении реконструированной системой без липидов (кривая 2) и в процессе окисления реконструированной системой, собранной холатно-диализным методом (кривая 3). В последнем случае ингибирующее действие анти-P-450-ЛМ<sub>2</sub> наиболее эффективно.

Рис. 6. Зависимость скорости окислительного деметилирования диметиланилина при 30° С от соотношения цитохрома P-450-ЛМ<sub>2</sub> и редуктазы в различных системах: 1 — гемопротеид и редуктаза в растворе в отсутствие фосфолипидов; 2 — в липосомы последовательно встроены сначала цитохром P-450-ЛМ<sub>2</sub> (10 мкг), а затем редуктаза (10 мин); 3 — в липосомы последовательно встроена сначала редуктаза, а затем цитохром P-450-ЛМ<sub>2</sub>; 4 — в липосомы одновременно встроены цитохром P-450 и редуктаза (10 мин при 30° С)



Лучшим способом сравнения реакционной способности двух форм цитохрома P-450-ЛМ<sub>2</sub> и ЛМ<sub>4</sub> является изучение окисления одних и тех же субстратов с участием обеих форм цитохрома P-450. Такая работа проведена нами на примере диметиланилина и анилина, представляющих две большие группы субстратов микросомной системы. Кинетические характеристики окисления анилина и его диметилпроизводного (табл. 2) показывают, что цитохром P-450-ЛМ<sub>2</sub> в самых разнообразных условиях эффективно окисляет диметиланилин и менее эффективно анилин. В отличие от этого во всех указанных системах цитохром P-450-ЛМ<sub>4</sub> не проявляет каталитической активности в отношении обоих субстратов. Это согласуется с нашими данными о каталитической инертности формы ЛМ<sub>4</sub> в окислении диметиланилина и анилина после ее встраивания в микросомы печени кроликов, получавших разные индукторы — фенobarбитал и 3-метилхолантрен [16], а также с данными об отсутствии ингибирующего действия аптител к цитохрому P-450-ЛМ<sub>4</sub> на окисление анилина и диметиланилина интактными и индуцированными ферментными системами микросом печени кроликов [17].

Таким образом, каталитическая инертность цитохрома P-450-ЛМ<sub>4</sub> определяется не условиями проведения реакций и сборки реконструированных систем, а свойствами самого цитохрома P-450-ЛМ<sub>4</sub>, присущими ему как в мембране, так и после выделения из нее. Отсутствие окисления обоих субстратов в реакциях с участием гидроперекиси кумиля вполне понятно, так как, по нашим данным [10], цитохром P-450-ЛМ<sub>4</sub> не взаимодействует со спиртами и гидроперекисями. Нам не удалось зарегистрировать спектральных изменений при взаимодействии с этой формой гемопротеида таких типичных субстратов микросомной системы, как циклогексан и антипирин [10].

Почему гидроперекись кумиля, циклогексан, антипирин не взаимодействуют с цитохромом P-450-ЛМ<sub>4</sub>, но активно реагируют с формой P-450-ЛМ<sub>2</sub>? Во-первых, потому, что высокоспиновый цитохром P-450-ЛМ<sub>4</sub> уже содержит в центре связывания субстратов первого типа индуктор или его метаболиты; это препятствует взаимодействию гемопротеида с гидроперекисью кумиля, антипирином и циклогексаном. Такая точка зрения подтверждается данными, свидетельствующими о наличии от 0,2 до 0,8 моль 3-метилхолантрена на 1 моль цитохрома P-450 [13, 14]. Вторая причина может быть связана с различиями в конформации активных центров P-450-ЛМ<sub>2</sub> и P-450-ЛМ<sub>4</sub>. Из спектров КД обеих форм цитохрома P-450 следует, что гидрофобный участок формы P-450-ЛМ<sub>4</sub> менее доступен для лигандов, чем в форме P-450-ЛМ<sub>2</sub> [18]. Вторая причина менее вероятна, так как форма цитохрома P-450-ЛМ<sub>4</sub> легко взаимодействует с диметиланилином и анилином, образуя комплексы с константами диссо-

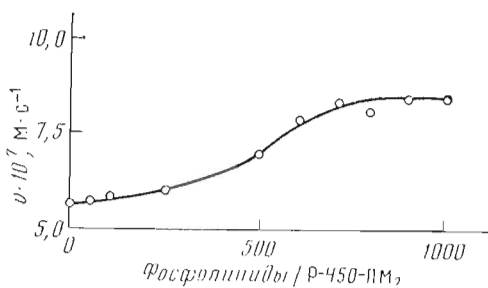


Рис. 7

Рис. 7. Влияние содержания фосфолипидов в реконструированной системе на скорость деметилирования диметиланилина при 30° С: цитохром P-450-ЛМ<sub>2</sub> — 0,7 мкМ, NADPH-цитохром-P-450 — редуктаза — 0,7 мкМ, NADPH — 1,0 мМ

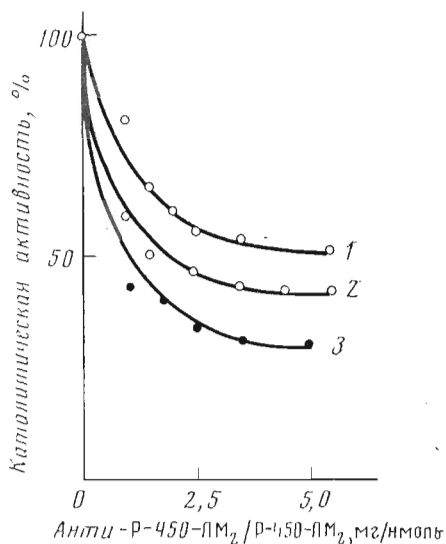


Рис. 8

Рис. 8. Ингибирование окисления диметиланилина антителами к цитохрому P-450-ЛМ<sub>2</sub> (анти-P-450-ЛМ<sub>2</sub>) в разных условиях: 1 — в растворе с участием гидроперекиси кумида (1,0 мМ); 2 — в реконструированной системе, содержащей 0,7 мкМ цитохром P-450-ЛМ<sub>2</sub> и 0,7 мкМ редуктазу; 3 — в реконструированной системе, содержащей те же концентрации ферментов и 0,7 мМ фосфолипидов (холатно-диализный метод)

циации, равными 2,22 и 1,43 мМ соответственно [10]. Цитохром P-450-ЛМ<sub>4</sub> эффективно взаимодействует также с нафталином [10]. Инертность цитохрома P-450-ЛМ<sub>4</sub> скорее всего объясняется образованием непродуктивных комплексов с обоими субстратами. Это предположение подтверждается спектральными данными [10]: диметиланилин образует с цитохромом P-450-ЛМ<sub>4</sub> низкоспиновые комплексы, максимум поглощения в разностных спектрах которых отличается от этого параметра для типичных низкоспиновых комплексов (420 нм вместо 427 нм для комплекса анилина с цитохромом P-450-ЛМ<sub>2</sub>). Непродуктивно связанным с цитохромом P-450-ЛМ<sub>4</sub> может стать диметиланилин, расположенный параллельно плоскости порфиринового кольца гема [10].

В ряде работ показано, что форма цитохрома P-450-ЛМ<sub>4</sub>, выделенная из микросом печени кроликов, обработанных полициклическими индукторами, может быть каталитически активной в реконструированных системах в превращении таких субстратов, как бензфетамин, *n*-нитроанизол, *n*-нитрофенетол, 7-этоксикумарин, ацетанилид [2, 14], бензо[*a*]пирен [2, 25] и *N*-метилкарбазол [26]. Одна часть этих соединений вступает в реакции окислительного дезалкилирования (бензфетамин, *n*-нитроанизол, *n*-нитрофенетол, 7-этоксикумарин), а другая (ацетанилид, бензо[*a*]пирен, *N*-метилкарбазол) гидроксилируется в разные положения. Наличие каталитической активности цитохрома P-450-ЛМ<sub>4</sub>, обнаруженное некоторыми авторами [2, 14, 25, 26], и ее полное отсутствие в реакциях гидроксилирования анилина и окислительного деметилирования диметиланилина, по нашим данным, может быть связана с разницей в методах выделения цитохрома P-450-ЛМ<sub>4</sub> (2, 3 и 10, 14), с использованием разных индуцирующих агентов (5,6-бензофлавона [2, 6, 12] и 3-метилхолантраена [10, 13]) и с разным исходным состоянием высокоочищенного гемопротеида. В работах Куна и сотр. используется форма цитохрома P-450-ЛМ<sub>4</sub>, существующая в виде смеси высокоспинового (содержащего индуктор или его метаболит) и низкоспинового (не имеющего индуктора) гемопротеида, в работах Сато и сотр. [13, 14] — форма цитохрома P-450-ЛМ<sub>4</sub>, выделенная из микросом печени кроликов, обра-

Кинетические параметры окисления анилина и окислительного деметилирования диметиланилина (ДМА) с участием цитохромов P-450-ЛМ<sub>2</sub> и P-450-ЛМ<sub>4</sub> в различных системах

Система	$v \cdot 10^7, \text{M} \cdot \text{с}^{-1}$		$K_m \cdot 10^3, \text{M}$	
	ДМА	анилин	ДМА	анилин
P-450-ЛМ <sub>2</sub> в растворе *	28,6	2,0	1,6	4,0
P-450-ЛМ <sub>4</sub> в растворе *		Реакции не идут		
P-450-ЛМ <sub>2</sub> в липосомах *	68,9	11,1	0,9	6,8
P-450-ЛМ <sub>4</sub> в липосомах *		Реакции не идут		
P-450-ЛМ <sub>2</sub> + редуктаза (1 : 1)	9,1	— **	1,3	—
P-450-ЛМ <sub>4</sub> + редуктаза (1 : 1)		Реакции не идут		
P-450-ЛМ <sub>2</sub> + редуктаза в липосомах (1 : 1)	14,3	0,1	4,6	—

\* Системы получены в присутствии гидроперокси кумила; для липосом — холодно-диализным методом (30° С).

\*\* Нет данных.

ботаниных 3-метилхолантеном, содержащая, в зависимости от выделения, разные количества жестко связанного индуктора. Мы применяем высокоспиновою форму цитохрома P-450-ЛМ<sub>4</sub>, которая, по-видимому, насыщена индуктором или, возможно, его метаболитами [10]. По существу используется не сам цитохром P-450-ЛМ<sub>4</sub>, а его фермент-субстратный комплекс.

Разница в каталитических активностях применяемых препаратов может определяться полнотой освобождения цитохрома P-450-ЛМ<sub>4</sub> от эндогенно-связанных индукторов, что существенно зависит от природы детергентов, используемых в процессе очистки гемопротеида: ренекс-680 [2, 6, 18], эмульген-913 [13, 14], тритон X-100 и тритон N-101 [7, 10].

### Роль цитохрома $b_5$ в реконструированных системах

Важная роль цитохрома  $b_5$  в процессах электронного транспорта и микросомного окисления была постулирована Эстабруком и сотр. [27] и экспериментально подтверждена во многих работах [25—38]. Наблюдаемый при окислении многих субстратов синергизм в действии NADH и NADPH [27—29], а также активирующая роль цитохрома  $b_5$  в реконструированных системах и микросомах при окислении *n*-нитроанизола [31, 34, 36], *N*-метилкарбазола [26], 7-этоксикумарина [32, 33, 36, 38] и бензо[*a*]пирена [25, 37] свидетельствовали о прямом участии цитохрома  $b_5$  в переносе второго электрона на тройной комплекс, содержащий кислород, субстрат и восстановленный первый электроном цитохром P-450 [27, 28, 33, 35, 36, 38]. В то же время в ряде работ утверждается, что цитохром  $b_5$  не является обязательным компонентом в реконструированных системах для восстановления полной каталитической активности при окислении некоторых субстратов [6, 12, 32, 39]. Так, иммунохимическое исследование возможной роли цитохрома  $b_5$  в окислении 7-этоксикумарина, бензо[*a*]пирена и анилина микросомами печени мышей показало, что цитохром  $b_5$  участвует в окислении первых двух субстратов и совершенно не участвует в окислении анилина, так как антитела к этому гемопротеиду не ингибируют окисление анилина микросомами печени мышей [32]. Участие цитохрома  $b_5$  в процессах микросомного окисления, как можно утверждать в результате анализа работ [25—39], существенно зависит от природы цитохрома P-450 и окисляемого субстрата: цитохром  $b_5$  сильно ускоряет окисление в реконструированных системах, содержащих цитохром P-450-ЛМ<sub>2</sub>, таких субстратов, как бензо[*a*]пирен [25], *N*-метилкарбазол [26], и гораздо слабее влияет на окисление тех же субстратов с участием формы цитохрома P-450-ЛМ<sub>4</sub> [25, 26]. Возможно существование особых форм цитохрома P-450 с ярко выраженным повышенным сродством к цитохрому  $b_5$  [34, 35]: в этом случае цитохром  $b_5$  с большой эффективностью ускоряет окисление *n*-нитроанизола [34].



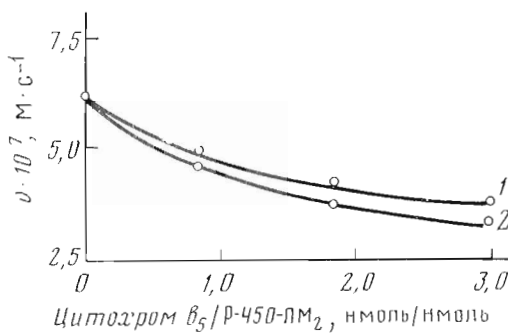


Рис. 9. Зависимость скорости деметилирования диметиланилина при  $30^\circ \text{C}$  от концентрации цитохрома  $b_5$  в реконструированной системе: цитохром P-450-ЛМ<sub>2</sub> — 0,7 мкМ; редуктаза — 0,7 мкМ, фосфолипиды — 0,7 М; 1 — NADPH — 1,0 мМ, 2 — NADPH и NADH — 1,0 мМ каждый (совместно)

Мы провели исследование влияния цитохрома  $b_5$  из микросом печени кроликов, индуцированных фенобарбиталом, на окисление диметиланилина в реконструированной системе, содержащей цитохром P-450-ЛМ<sub>2</sub>, NADPH-цитохром-P-450-редуктазу, микросомные фосфолипиды и возрастающие концентрации цитохрома  $b_5$  (рис. 9). С ростом соотношения одновременно встраиваемых в липосомы белков до пропорций цитохрома  $b_5$  и цитохрома P-450-ЛМ<sub>2</sub>, равных  $\sim 3$ , скорость деметилирования диметиланилина при  $30^\circ \text{C}$  снижается от  $6,0 \cdot 10^{-7}$  до  $3,0 \cdot 10^{-7} \text{ М} \cdot \text{с}^{-1}$ . Таким образом, цитохром  $b_5$  не только не увеличивает скорости окисления субстрата в реконструированной системе, содержащей цитохром P-450-ЛМ<sub>2</sub>, но даже несколько уменьшает ее. Полученный результат можно объяснить, предположив, что встроенная в липосомы редуктаза участвует в восстановлении цитохрома  $b_5$ , который не может передавать электроны на тройной комплекс кислорода, диметиланилина и цитохрома P-450-ЛМ<sub>2</sub>, т. е. не участвует в процессе превращения субстрата. В таком случае цитохром  $b_5$  конкурирует с цитохромом P-450-ЛМ<sub>2</sub> за NADPH-цитохром-P-450-редуктазу, расходуя ее непродуктивно для процесса окисления диметиланилина.

Этот вопрос можно решить, изучив восстановление цитохрома  $b_5$  в липосомах, содержащих редуктазу, цитохром  $b_5$  и NADPH. Восстановление цитохрома  $b_5$  с участием NADPH- и NADPH-цитохром-P-450-редуктазы в микросомах было предположено нами ранее [28]. Ингибирующее влияние цитохрома  $b_5$  на окисление диметиланилина в реконструированной системе может быть также связано с неблагоприятным воздействием цитохрома  $b_5$  на взаимодействие цитохрома P-450-ЛМ<sub>2</sub> и редуктазы в липосомах, что приводит к снижению скорости превращения субстрата. На основании наших данных (см. рис. 9) можно определенно утверждать, что цитохром  $b_5$  не участвует в процессе окисления диметиланилина цитохромом P-450-ЛМ<sub>2</sub> в реконструированной системе, содержащей необходимые компоненты и суммарные фосфолипиды. Это означает, что окислительно-восстановительные потенциалы цитохрома  $b_5$  и тройного комплекса диметиланилин-цитохром-P-450-ЛМ<sub>2</sub>-кислород в реконструированной системе таковы, что перенос электрона с цитохрома  $b_5$  на тройной комплекс невозможен. Такая ситуация, по-видимому, реализуется в микросомах печени мышей при окислении анилина [32], в то время как для ряда других субстратов (7-этоксикумарин [33, 36, 38], бензо[*a*]пирен [25, 37], *n*-нитроанизол [31, 34, 36], *N*-метилкарбазол [26]) в микросомах или реконструированной системе окислительно-восстановительные потенциалы цитохрома  $b_5$  и тройного комплекса соотносятся так, что перенос электрона с цитохрома  $b_5$  на тройной комплекс не только возможен, но и эффективно осуществляется, затея транспорт второго электрона на тройной комплекс с NADPH-цитохром-P-450-редуктазы. Таким образом, роль цитохрома  $b_5$  в микросомных системах может быть различной и определяется соотношением окислительно-восстановительных потенциалов гемопротенда и тройного комплекса «субстрат-цитохром P-450-кислород», т. е. прямым образом зависит от природы субстрата, влияющего на окислительно-восстановительные характеристики тройного комплекса, и формы цитохрома P-450, входящего в комплекс.

Поскольку окислительно-восстановительные свойства белков в микросомах и реконструированных системах могут существенно различаться, не следует однозначно переносить результаты воздействий цитохрома  $b_5$  в реконструированных системах на нативные мембраны.

### Экспериментальная часть

В работе использовали кроликов-самцов весом до 2,5 кг. Индукцию различных форм цитохрома P-450 проводили введением животным внутривенно в течение 5 сут фенobarбитала натрия в дозе 50 мг/кг веса или 3-метилхолантрена из расчета 10 мг/кг веса в течение 3 сут. Микросомную фракцию выделяли методом дифференциального центрифугирования, как описано ранее [40].

Выделение и очистку цитохрома P-450-LM<sub>2</sub> из микросом печени кроликов, получавших фенobarбитал, проводили по методикам [7, 10].

В работе использовали сефарозу 4Б, активированную бромцианом, сефарозу 4Б, СМ-сефадекс С-50, DEAE-сефадекс А-50, 2',5'-ADP-сефарозу 4В (Pharmacia, Швеция); фенobarбитал натрия, дитионит натрия, трис (Merck, ФРГ); холат натрия, тригон N-101, кумасси G-250, бычий сывороточный альбумин (Sigma, США); дезоксихолат натрия, дитиотреит (Calbiochem, США); реактивы для электрофореза (Bio-Rad, США). Все остальные реактивы отечественного производства марки х.ч. Анилин, диметиланилин, гидроперекись кумила очищали перегонкой, а *n*-аминофенол — возгонкой в вакууме.

*Выделение и очистка NADPH-цитохром-P-450-редуктазы* из микросом печени кроликов, индуцированных фенobarбиталом, были проведены по методу [19] с применением аффинного сорбента 2',5'-ADP-сефарозы 4В. Микросомы (4–5 г белка) суспендировали в 400–500 мл 0,1 М трис-НСl-буфером (рН 7,7), содержащим 20% глицерина, 1 мМ EDTA, 1 мМ дитиотреит и 0,5% тритона N-101. Суспензию перемешивали 30 мин и центрифугировали 60 мин при 105 000g. Супернатант наносили на колонку (4,5×30 см) с DEAE-сефадексом А-50, уравновешенную 0,1 М трис-НСl-буфером (рН 7,7), содержащим 20% глицерина, 1 мМ EDTA, 1 мМ дитиотреит и 0,5% тритона N-101. Колонку тщательно промывали 500 мл уравновешивающего буфера и таким же буфером, содержащим 0,15 М KCl (500 мл), NADPH-цитохром-P-450-редуктазу элюировали 500 мл такого же буфера, содержащего 0,3 М KCl. Фракции, содержащие редуктазу, наносили на колонку (1,6×12 см) с 2,5-ADP-сефарозой 4В, уравновешенную 0,1 М трис-НСl-буфером (рН 7,7), содержащим 20% глицерина, 0,1 мМ EDTA, 0,1 мМ дитиотреит и 0,5% холата натрия. Колонку промывали 1 л уравновешивающего буфера и редуктазу элюировали тем же буфером, содержащим 1 мМ NADP<sup>+</sup>. Фракции с высокой редуктазной активностью собирали и диализовали в течение 48 ч против 0,01 М трис-НСl-буфера, рН 7,6, содержащего 20% глицерина для удаления детергента и NADP<sup>+</sup>. Диализованные препараты фермента концентрировали и хранили при –25° С. Препараты имели удельную активность 20–25 единиц. Выход редуктазы составлял 40–50%, NADPH-цитохром-P-450-редуктаза была электрофоретически гомогенной (см. рис. 1) и имела характеристики, приведенные в табл. 1.

*Выделение цитохрома  $b_5$  из микросом печени кроликов*, индуцированных фенobarбиталом, проводили в процессе очистки цитохрома P-450-LM<sub>2</sub>. После элюирования с  $\omega$ -аминооктил-сефарозы 4В цитохрома P-450 и редуктазы колонку промывали 0,05 М калий-фосфатным буфером (рН 7,25), содержащим 20% глицерина и 1% тритона X-100. Цитохром  $b_5$  мигрировал в колонке узкой ярко-красной полосой. Элюаты 5–6 выделений объединяли и наносили на колонку (2,2×12 см) с DEAE-сефадексом А-50, уравновешенную 0,05 М фосфатным буфером, рН 7,25, содержащим 0,1% тритона X-100. Колонку промывали 500 мл 0,1 М трис-ацетатного буфера (рН 8,1), содержащего 0,4% холата натрия. Затем колонку промывали 200 мл такого же буфера, содержащего 0,1 М роданид натрия, и элюировали цитохром  $b_5$  повышением концентрации

роданида натрия до 0,3 М. Цитохром  $b_5$  концентрировали и очищали методом гель-хроматографии на сефадексе G-75, уравновешенном 0,1 М трис-ацетатным буфером (рН 8,4), содержащим 0,4% холата натрия. Дeterгент удаляли интенсивным диализом или гель-хроматографией на сефадексе G-25. Цитохром  $b_5$  мигрировал одной полосой при электрофорезе в присутствии додецилсульфата натрия и характеризовался содержанием 40–50 пмоль/мг белка.

*Получение и очистку моносpezifических антител к цитохромам P-450-ЛМ<sub>2</sub> и P-450-ЛМ<sub>4</sub>* проводили иммунизацией крыс гомогенными антигенами с последующим выделением анти-P-450-ЛМ<sub>2</sub> и анти-P-450-ЛМ<sub>4</sub> из асцитической жидкости крыс по методу [17]. Титр полученных антител определяли методом двойной диффузии в теле по [41]. Титр для обоих антител составлял 1 : 8.

*Суммарную фракцию микросомных фосфолипидов (СМЛ) выделяли* из микросом, индуцированных фенобарбиталом, по известной методике [42]. При расчетах молярной концентрации фосфолипидов использовали усредненную молекулярную массу, равную 750.

*Получение протеолипосом. Метод 1.* Раствор СМЛ в 0,05 М трис-НСI-буфере (рН 7,5) общим объемом 3 мл озвучивали с помощью генератора УЗДН-1 в течение 2 мин и получали монослойные везикулы, к которым добавляли раствор цитохрома P-450 и редуктазы в соотношении 1 : 1. Молярная концентрация СМЛ в 1000 раз превышала концентрацию ферментов. После инкубации при 30° С протеолипосомы осаждали 120 мин при 170 000g в буфере, содержащем 0,3 М NaCl. Осадок протеолипосомы суспендировали в 0,05 М трис-НСI-буфере, рН 7,5.

*Метод 2.* Получение протеолипосом холатно-диализным способом проводили по методике [22]. СМЛ суспендировали в 0,1 М трис-НСI-буфере, рН 7,5, содержащем 1 мМ EDTA, 1 мМ дитиотреит и 10% холата натрия. Раствор разводили буфером до концентрации холата натрия, равной 4%, а затем раствором, содержащим цитохром P-450 и редуктазу, доводили разведение до концентрации холата натрия 1%. Соотношение количеств СМЛ, NADPH-цитохром-P-450 — редуктазы, цитохрома P-450, как правило, составляло 1000 : 1 : 1. Проводили диализ смеси в течение 40 ч против 1000 объемов буфера, не содержащего холата натрия. Протеолипосомы осаждали ультрацентрифугированием при 170 000g в течение 120 мин в растворе, содержащем 0,3 М NaCl. Осадок суспендировали в 0,05 М трис-НСI-буфере, рН 7,5.

*Спектральные методы.* Концентрацию цитохрома P-450 определяли спектрофотометрически по методу Омуре и Саго [43], используя коэффициент молярного поглощения 91 000 М<sup>-1</sup>см<sup>-1</sup>. Концентрацию NADPH-цитохром-P-450—редуктазы определяли посредством измерения поглощения на 456 нм, используя для расчетов коэффициент молярного поглощения, равный 21 400 М<sup>-1</sup>см<sup>-1</sup> [20, 23]. Содержание цитохрома  $b_5$  определяли по дифференциальной схеме, используя при расчетах коэффициент молярного поглощения 164 000 М<sup>-1</sup>см<sup>-1</sup> [44]. Все спектральные определения проводили на приборе «Specord UV VIS» (ГДР).

Спектры КД цитохромов P-450-ЛМ<sub>2</sub> и P-450-ЛМ<sub>4</sub> в разных окислительно-восстановительных состояниях регистрировали при 20° С на спектрофотополариметре «Jasco-20» (Япония), используя кюветы толщиной 1 см.

*Ферментативные реакции.* Активность NADPH-цитохром-P-450—редуктазы определяли при 30° С по скорости восстановления цитохрома  $c$ , за концентрацией последнего следили спектрофотометрически по изменению поглощения на 550 нм. Инкубационная среда объемом 3 мл содержала 0,3 М трис-НСI-буфер (рН 7,7), 50 мкМ цитохром  $c$  и редуктазу. Реакцию начинали добавлением в кювету 100 мкмоль NADPH. При расчетах использовали коэффициент молярного поглощения цитохрома  $c$ , равный 18 500 М<sup>-1</sup>см<sup>-1</sup> [20, 23].

Скорости окислительного деметилирования диметиланилина и гидроксирования анилина измеряли в полной системе, включающей в себя все компоненты, NADPH и O<sub>2</sub>, и в шунтированной системе, содержащей

только цитохром Р-450 и гидроперекись кумила. Инкубационная смесь объемом 1 мл содержала 0,05 М трис-НСI-буфер (рН 7,5), 0,7 мкМ цитохром Р-450 и субстраты диметиланилин или анилин в концентрации 3,0 мМ. Реакцию начинали добавлением гидроперекиси кумила, время реакции 1,5 мин, температура 30° С.

Окисление диметиланилина в реконструированной системе при 30° С проводили в 1 мл инкубационной смеси, содержащей цитохром Р-450-ЛМ<sub>2</sub> и редуктазу в равных концентрациях (0,7 мкМ), 0,7 мкМ СМЛ в 0,05 М трис-НСI-буфере, рН 7,5. Реакцию начинали добавлением 1,0 мМ NADPH, время реакции 6 мин.

Окисление анилина в реконструированной системе проводили в 0,05 М трис-НСI-буфере, содержащем 4,5 мкМ цитохром Р-450-ЛМ<sub>2</sub>, 5,0 мкМ NADPH-цитохром-Р-450—редуктазу, 1000-кратный избыток СМЛ. Реакцию начинали добавлением 1 мМ NADPH, время реакции 30 мин.

В реконструированных системах с участием цитохрома Р-450-ЛМ<sub>1</sub> концентрации гемопротеида достигали 5,0 мкМ, редуктазы — 6,0 мкМ, NADPH — 1,0 мМ, СМЛ — 6,0 мМ. Время реакции 45 мин, температура 30° С. Скорость деметилирования диметиланилина измеряли после остановки реакции смесью Ва(ОН)<sub>2</sub> и ZnSO<sub>4</sub> по накоплению формальдегида, концентрацию которого определяли спектрофотометрически по методу [45]. Скорость окисления анилина измеряли по накоплению *n*-аминофенола, концентрацию которого определяли спектрофотометрически по методу [46].

Авторы выражают благодарность Г. С. Янговской за помощь при регистрации спектров кругового дихроизма цитохромов Р-450.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Метелица Д. И. Активация кислорода ферментными системами. М.: Наука, 1981.
2. Coon M. J., Vatsis K. P. In: Polycyclic hydrocarbons and cancer. N. Y.: Acad. Press, 1978, p. 335–360.
3. van der Hoeven T. A., Haugen D. A., Coon M. J. Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1974, v. 60, № 3, p. 569–575.
4. van der Hoeven T. A., Coon M. J. J. Biol. Chem., 1974, v. 249, № 12, p. 6302–6310.
5. Imai Y., Sato R. Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1974, v. 60, № 1, p. 8–14.
6. Haugen D. A., van der Hoeven T. A., Coon M. J. J. Biol. Chem., 1975, v. 250, № 10, p. 3567–3570.
7. Ахрем А. А., Усаиов С. А., Еремин А. И., Метелица Д. И. Докл. АН БССР, 1978, т. 22, № 9, с. 839–842.
8. Hashimoto C., Imai Y. Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1976, v. 68, № 2, p. 821–827.
9. Kawalek J. O., Levin W., Ryan D., Thomas P. E., Lu A. Y. H. Mol. Pharmacol., 1975, v. 11, № 5, p. 874–878.
10. Еремин А. И., Усаиов С. А., Метелица Д. И., Ахрем А. А. Биоорганич. химия, 1980, т. 6, № 5, с. 757–764.
11. Johnson E. F., Muller-Eberhardt U. J. Biol. Chem., 1977, v. 252, № 9, p. 2839–2845.
12. Coon M. J., Persson A. V., French J. S. In: Alcohol and aldehyde metabolizing systems/Ed. Thurman R. G. N. Y.: Plenum Publ. Corpor., 1980, p. 11–22.
13. Imai Y., Hashimoto-Yutsudo C., Satake H., Girardin A., Sato R. J. Biochem., 1980, v. 88, № 2, p. 489–503.
14. Hashimoto-Yutsudo C., Imai Y., Sato R. J. Biochem., 1980, v. 88, № 2, p. 505–516.
15. Курченко В. П., Усаиов С. А., Метелица Д. И. Изв. АН БССР. Сер. хим., 1980, № 3, с. 100–104.
16. Курченко В. П., Усаиов С. А., Метелица Д. И. Биохимия, 1981, т. 46, № 6, с. 1035–1041.
17. Курченко В. П., Усаиов С. А., Метелица Д. И. Биохимия, 1981, т. 46, № 12, с. 2202–2207.
18. Young-Ling Chiang, Coon M. J. Arch. Biochem. and Biophys., 1979, v. 195, № 1, p. 178–187.
19. Yasukochi Y., Masters B. S. S. J. Biol. Chem., 1976, v. 251, № 12, p. 5337–5344.
20. French J. S., Coon M. J. Arch. Biochem. and Biophys., 1979, v. 195, № 2, p. 565–577.
21. Арчаков А. И. Микросомальное окисление. М.: Наука, 1975, с. 187–194.
22. Рэкер Э. Биоэнергетические механизмы. Новые взгляды. М.: Мир, 1979, с. 132–137.
23. French J. S., Guengerich F. P., Coon M. J. J. Biol. Chem., 1980, v. 255, № 11, p. 4112–4119.
24. Ляхович В. В., Цырлов И. Б. Структурные аспекты биохимии монооксигеназ. Новосибирск: Наука, 1978, с. 236.
25. Brunström A., Ingelman-Sunberg M. Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1980, v. 95, № 2, p. 431–439.

26. Vatsis K. P., Gurka D. P., Hollenberg P. F. In: Biochemistry, biophysics and regulation of cytochrome P-450/Ed. Gustafsson J. Å. et al. Amsterdam: Elsevier/North-Holland Biomed. Press, 1980, p. 347-350.
27. Hildebrandt A., Esterbrook R. W. Arch. Biochem. and Biophys., 1971, v. 143, № 1, p. 66-79.
28. Ахрем А. А., Усанов С. А., Мережуца Д. И. Докл. АН БССР, 1978, т. 22, № 3, с. 275-278.
29. Noshiro M., Omura T. J. Biochem., 1978, v. 83, № 1, p. 61-77.
30. Sasame H. A., Gillette J. R., Boyd M. R. Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1978, v. 84, № 2, p. 389-395.
31. Sugiyama T., Miki N., Yamano T. Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1979, v. 90, № 3, p. 715-720.
32. Noshiro M., Harada N., Omura T. Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1979, v. 91, № 1, p. 207-213.
33. Imai Y. J. Biochem., 1979, v. 86, № 12, p. 1697-1707.
34. Sugiyama T., Miki N., Yamano T. J. Biochem., 1980, v. 87, № 2, p. 1457-1467.
35. Miki N., Sugiyama T., Yamano T. J. Biochem., 1980, v. 88, № 2, p. 307-316.
36. Ingelman-Sundberg M., Johansson J. Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1980, v. 97, № 3, p. 582-589.
37. Ingelman-Sundberg M., Johansson J., Brunström A., Ekström G., Haaparanta T., Rydström J. In: Biochemistry, biophysics and regulation of cytochrome P-450/Ed. Gustafsson J. Å. et al. Amsterdam: Elsevier / North-Holland Biomed. Press, 1980, p. 299-306.
38. Noshiro M., Ruf H.-H., Ullrich V. In: Biochemistry, biophysics and regulation of cytochrome P-450/Ed. Gustafsson J. Å. et al. Amsterdam: Elsevier/North-Holland Biomed. Press, 1980, p. 351-354.
39. Lu A. Y. H., West S. B. Pharm. Ther. A., 1978, v. 2, p. 337-358.
40. Ахрем А. А., Усанов С. А., Мережуца Д. И. Докл. АН СССР, 1974, т. 218, № 6, с. 1457-1460.
41. Ouchterlony O. Acta path. microbiol. scand., 1953, v. 32, № 2, p. 231-240.
42. Кеўс М. Техніка ліпидологиі. М.: Мир, 1975, с. 72-305.
43. Omura T., Sato R. J. Biol. Chem., 1964, v. 239, № 10, p. 2370-2377.
44. Omura T., Sato R. J. Biol. Chem., 1964, v. 239, № 10, p. 2379-2385.
45. Nash T. Biochem. J., 1953, v. 55, p. 416-423.
46. Fujita T., Mannering G. J. Biol. Chem., 1973, v. 248, № 20, p. 8150-8162.

Поступила в редакцию  
3.XI.1981

## COMPARISON OF RECONSTITUTED ENZYME SYSTEMS FOR RABBIT LIVER MICROSOMES CONTAINING CYTOCHROMES P-450-LM<sub>2</sub> AND P-450-LM<sub>4</sub>

USANOV S. A., KURCHENKO V. P., METELITZA D. I.

*Institute of Bioorganic Chemistry, Academy of Sciences  
of the Byelorussian SSR, Minsk*

Differences in absorption spectra, CD, and immunochemical properties were found between the two forms (LM<sub>2</sub> and LM<sub>4</sub>) of cytochrome P-450 from rabbit liver microsomes. The kinetics of aniline or N,N-dimethylaniline (DMA) oxidation were studied in reconstituted systems including cytochrome P-450 forms, NADP-cytochrome P-450 reductase, and total microsomal phospholipids. Cytochrome P-450-LM<sub>2</sub> oxidizes both substrates, whereas cytochrome P-450-LM<sub>4</sub> is catalytically inactive to aniline and DMA. Cytochrome b<sub>5</sub> from rabbit liver microsomes inhibits weakly the DMA oxidation in the reconstituted systems, catalyzed by cytochrome P-450-LM<sub>2</sub>. The different catalytic properties of cytochrome P-450 forms manifested in aniline and DMA oxidation are discussed. It is shown that two substrates are bound with cytochrome P-450-LM<sub>4</sub> nonproductively since this form contains the inducer, 3-methylcholanthrene.