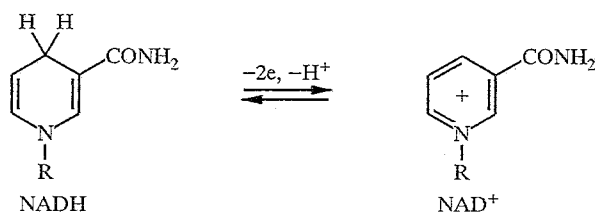


М. В. Медведев, В. Ю. Тюрин, Е. А. Рожкова,
Е. Р. Милаева

ОКИСЛИТЕЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ МЕТАЛЛООРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ ПО ОТНОШЕНИЮ К КОФЕРМЕНТАМ NADH и NADPH

Кинетические исследования взаимодействия металлоорганических соединений Hg и Sn с NADH и NADPH с использованием спектрофотометрического метода показывают, что данные соединения могут выступать в качестве окислителей по отношению к коферментам. Их окислительная активность зависит от природы и числа органических групп в молекуле. Сопоставление кинетических данных для активности соединений Hg и Sn с таковыми для порфиринов Fe, имитирующих активные центры редокс-ферментов, свидетельствует о конкурентности металлоорганических соединений и моделей природных акцепторов электронов.

Коферменты NAD и NADP являются участниками большого числа окислительно-восстановительных ферментативных процессов, протекающих в клетках живых организмов. Их функция заключается в обратимом транспорте электронов и протонов по схеме:



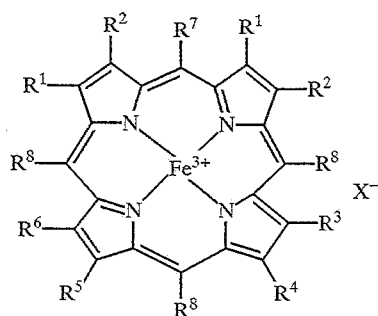
R — остаток адениндинуклеотида (NAD);
адениндинуклеотида фосфата (NADP)

Акцепторами электронов могут служить активные центры редокс-ферментов, например порфирины железа [1]. Кроме того, восстановленные формы коферментов NADH и NADPH могут окисляться экзогенными экотоксикантами — металлоорганическими соединениями тяжелых металлов, имеющими антропогенное происхождение, либо образующимися в результате биохимических реакций алкилирования соответствующих неорганических солей [2, 3]. Ранее было высказано предположение об окислении NADH до NAD⁺ в присутствии хлорида метилртути [4].

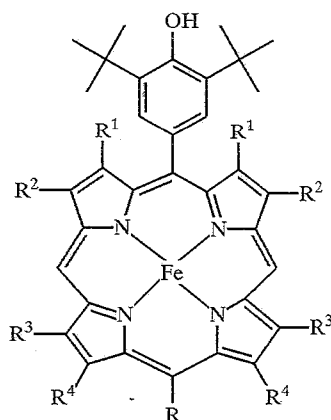
В настоящей работе проведено сравнительное исследование окислительной активности модельных порфиринов железа и металлоорганических соединений Hg и Sn по отношению к NADH и NADPH методом спектроскопии поглощения в условиях, максимально приближенных к *in vivo*.

В качестве металлокомплексов, моделирующих активные центры редокс-ферментов, в работе использованы порфирины железа с различными заместителями на периферии макрокольца, в том числе этиопорфирин Ia, протопорфирин IX (гемин) Ib, тетрафенилпорфирин Iv, а также порфирин железа Ig, содержащий в мезоположении 2,6-ди-*трет*-бутилфенол.

В качестве экотоксикантов рассмотрены металлоорганические соединения общей формулы: R_nMX_m; R = Me, Et, *n*-Pr, *i*-Pr, *n*-Bu, *i*-Bu, *n*-C₇H₁₅, *n*-C₈H₁₇, Ph, *p*-MeC₆H₄; M = Hg, Sn; X = Cl, Br, I; *n* = 0...4; *m* = 0...4. Кроме того, проведено сравнение с неорганическими солями, относящимися к типичным окислителям: HgCl₂, Hg(OAc)₂, SnCl₄, Pb(OAc)₄.



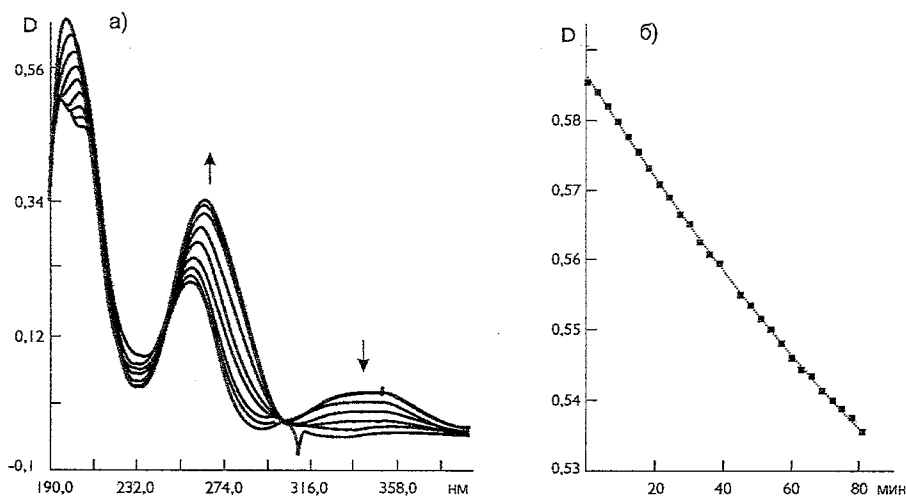
- Ia $R^1, R^3, R^5 = \text{Me}, R^2, R^4, R^6 = \text{Et}, X = \text{Cl};$
 Ib $R^1, R^3, R^6 = \text{Me}, R^2 = \text{CH}=\text{CH}_2, R^4, R^5 = \text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOMe}, X = \text{Cl};$
 Ic $R^1-R^6 = \text{H}, R^7, R^8 = \text{Ph}, X = \text{Cl}$



- Ic $R^1-R^4 = \text{H}, X = \text{Cl}$

Учитывая относительную легкость редокс-перехода в паре $\text{NADH} \rightleftharpoons \text{NAD}^+$ ($\sim 0,4$ В на первой скоростьопределяющей стадии реакции окисления до соответствующего катион-радикала [5]), можно полагать, что не только неорганические соли (например, $\text{Pb}(\text{OAc})_4$), но и их органические производные будут проявлять окислительную активность. Действительно, все перечисленные металлоорганические соединения являются окислителями по отношению к NADH и NADPH . Во всех случаях характер спектра NADH , как и NADPH , при добавлении окислителей изменяется подобно представленному на рисунке (а, типичная кинетическая кривая — б). В избытке окислителя реакция имеет первый порядок по субстрату. В табл. 1 представлены константы скорости окисления NADH в присутствии различных соединений Hg и Sn . Константа скорости окисления $\text{Pb}(\text{OAc})_4$ максимальна и составляет $0,942 \text{ с}^{-1}$.

С целью выявления различия между коферментами NAD и NADP изучено влияние дополнительной фосфатной группы в NADP на ход и скорость его реакции с некоторыми окислителями по сравнению с NAD . В качестве последних использованы HgCl_2 , MeHgI , $n\text{-PrHgBr}$. Кинетические параметры реакций, проведенных в идентичных условиях, приведены в табл. 2. Видно, что в исследуемых реакциях характер поведения обоих коферментов одинаков, что позволяет сделать вывод об их идентичности. Подобное сравнительное исследование было вызвано предположением



Спектральные изменения (падение D , λ_{\max} 340 нм) при окислении NADH MeHgI (а);
 кинетическая кривая окисления NADH ($2 \cdot 10^{-3}$ моль/л)
 в присутствии MeHgI ($6 \cdot 10^3$ моль/л) (б) (рН 7,5; MOPS; H₂O, 20 °С)

о возможном комплексообразовании, в результате которого ион тяжелого металла координирует вокруг себя фрагменты молекулы кофермента; хелатирующими агентами могут выступать гетероциклические кольца либо фосфатные группы. В последнем случае следует ожидать образования нерастворимых фосфатов, что выражается в резком уменьшении концентрации кофермента в растворе. Однако выпадения осадка в ходе реакции не наблюдается, что свидетельствует об отсутствии подобного превращения

Таблица 1

Константы скорости окисления NADH в присутствии соединений Hg и Sn
 (рН 7,4, H₂O, 20 °С, С [R_nMX_m] $4,2...42 \cdot 10^{-4}$ моль/л,
 С [NADH] $3,5...3,9 \cdot 10^{-4}$ моль/л)

RHgX	$k \cdot 10^{-4}, c^{-1}$	R _n SnX _{4-n}	$k \cdot 10^{-4}, c^{-1}$
Без добавок	$0,004 \pm 0,0006$		
HgCl ₂	$2080 \pm 0,9$	SnCl ₄	$510 \pm 0,5$
Hg(OAc) ₂	$2250 \pm 1,9$	MeSnCl ₃	$4 \pm 0,2$
MeHgI	$11 \pm 0,04$	Me ₂ SnCl ₂	$0,2 \pm 0,04$
		Me ₃ SnCl	$0,06 \pm 0,0085$
<i>n</i> -PrHgBr	$1 \pm 0,65$	EtSnCl ₃	$1 \pm 0,45$
<i>i</i> -PrHgBr	$0,8 \pm 0,09$	Et ₂ SnCl ₂	$1 \pm 0,35$
		Et ₃ SnCl	$0,2 \pm 0,04$
<i>i</i> -BuHgCl	$0,7 \pm 0,04$	Bu ₂ SnCl ₂	$0,3 \pm 0,07$
<i>n</i> -C ₇ H ₁₅ HgBr	$0,6 \pm 0,085$	Bu ₃ SnCl	$0,3 \pm 0,05$
<i>n</i> -C ₈ H ₁₇ HgBr			
<i>p</i> -MeC ₆ H ₄ HgBr	$1 \pm 0,7$	PhSnCl ₃	$67 \pm 0,075$
(<i>p</i> -MeC ₆ H ₄) ₂ Hg	$0,07 \pm 0,01$	Ph ₂ SnCl ₂	$0,3 \pm 0,04$
		Ph ₃ SnCl	$0,2 \pm 0,01$

в связи с малыми значениями ПР. Следовательно, и наличие дополнительной фосфатной группы в NADP не влияет на общий механизм окисления, представляющий собой одноэлектронный перенос с молекулы кофермента на молекулу металлоорганического соединения [6].

Т а б л и ц а 2

Сравнительные кинетические параметры окисления NADH и NADPH в присутствии соединений ртути (рН 7,4, H₂O, 20 °С)

Соединение	С _{нач} · 10 ⁻⁴ , моль/л		k, с ⁻¹	
	NADH	NADPH	NADH	NADPH
HgCl ₂	4,7	4,8	0,208 ± 0,0005	0,197 ± 0,0008
MeHgI	3,8	4,0	0,0011 ± 0,0004	0,0015 ± 0,0008
n-PrHgBr	4,28	4,1	0,0001 ± 0,0007	0,0001 ± 0,0006

Полученные экспериментальные данные свидетельствуют о том, что соединения ртути и олова могут выступать в качестве окислителей по отношению к NADH и NADPH, причем для неорганических солей наблюдается более высокая скорость окисления, чем для металлоорганических соединений с различием констант скоростей на 2...3 порядка, и в целом реакции с участием оловоорганических соединений протекают несколько медленнее, чем со ртутоорганическими производными. На примере метильных производных Sn хорошо видно, что скорость окисления NADH уменьшается при увеличении числа органических групп в молекуле окислителя, что может быть связано с аналогичными изменениями их потенциалов восстановления [7, 8].

В табл. 3 представлены значения констант скоростей реакции окисления NADH в присутствии порфиринов железа Ia—г. В данном случае окислительная активность акцепторов электронов связана с изменением степени окисления иона Fe в порфириновом кольце. Данный процесс характеризуется более высокими значениями потенциалов восстановления (-0,11...-0,17 В [9]) в отличие от металлоорганических соединений ртути и олова (-0,4...-1,2 В [7, 8]), что не может не отразиться на скорости окисления коферментов.

Т а б л и ц а 3

Константы скорости окисления NADH в присутствии порфиринов железа Ia—г (рН 7,4, H₂O, 20 °С, С [R_nMX_m] 2,1...17 · 10⁻⁴ моль/л, С [NADH] 1,4...1,9 · 10⁻⁴ моль/л)

Соединение	Ia	Iб	Iв	Iг
k · 10 ⁻⁴ , с ⁻¹	1,1 ± 0,1	1,9 ± 0,3	1,1 ± 0,4	1,4 ± 0,2

Анализ кинетических данных, представленных в табл. 1 и табл. 3, показывает, что в большинстве случаев металлоорганические соединения оказываются более слабыми окислителями. Однако метилртутидид, например, обладающий крайне высокой токсичностью [1], характеризуется и высокой скоростью окисления коферментов.

Таким образом, детальные кинетические исследования, данные которых приводятся в работе, позволяют сделать вывод о возможном конкурентном влиянии токсичных соединений тяжелых металлов при их проникновении в клетку на процессы окисления коферментов NADH и NADPH, что может привести к иному маршруту транспорта электронов и общему нарушению метаболизма.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Электронные спектры поглощения регистрировали на приборе Varian DMS-100s в кварцевых кюветках при комнатной температуре. NADH, NADPH, NAD^+ , NADP^+ , протопорфирин IX (гемин) использовали в виде готовых препаратов (Sigma) без предварительной очистки. Соединения ртути и олова, а также порфирины Ia, в, г получены по известным методикам [10—13].

Растворы металлоорганических соединений и порфиринов Ia—г готовили в буфере непосредственно перед экспериментом и хранили в течение проведения спектрального эксперимента в закрытых кюветках. Приготовление растворов проводили из расчета сочетания количества используемого реагента и приемлемого значения оптической плотности используемого субстрата. В случае недостаточно высокой растворимости исследуемых соединений первоначально готовили раствор данного соединения в EtOH или ДМФА, который затем разбавляли раствором буфера (калий-фосфатный буфер или MOPS). Кинетические исследования проводили по падению интенсивности полосы поглощения при 340 нм (ϵ $6,22 \cdot 10^3$ (моль/л) $^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$), соответствующей восстановленной форме NAD (дигидроникотинамидный участок молекулы). В каждом случае проводили сравнение полученного спектра после окисления NADH со спектром готовой формы NAD^+ соответствующей концентрации.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант 99-03-33052-а). Авторы признательны кандидату химических наук Е. В. Григорьеву за предоставленные серии оловоорганических соединений.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Olson D. L., Williksen E. P., Scheeline A. // J. Amer. Chem. Soc. — 1995. — Vol. 117. — P. 2.
2. Craig P. J. Organometallic Compounds in the Environment. — Longman, UK, 1986. — 651 p.
3. Manahan S. E. Toxicological Chemistry. 2nd ed. Chelsea. — MI: Lewis Publ., 1993. — 814 p.
4. Hamdy M. K., Noyes O. R. // Bull. Environm. Cont. Toxicol. — 1977. — Vol. 17. — P. 112.
5. Берберова Н. Т., Охлобыстин О. Ю. // ХГС. — 1984. — № 8. — С. 1011.
6. Ganther H. E. // Environm. Health Perspect. — 1978. — Vol. 25. — P. 71.
7. Томилов А. П., Каргин Ю. М., Черных И. Н. // Электрохимия элементоорганических соединений. Элементы IV, V, VI групп периодической системы. — М.: Наука, 1986. — С. 849.
8. Бутин К. П., Рахимов Р. Д., Новикова И. В. // Металлоорган. химия. — 1989. — Т. 2. — С. 849.
9. Порфирины: спектроскопия, электрохимия, применение / Под ред. Ениколопяна Н. С. — М.: Наука, 1987. — С. 127.
10. Методы элементоорганической химии. Ртуть / Под ред. Макаровой Л. Г., Несмеянова А. Н. — М.: Наука, 1965. — 675 с.
11. Методы элементоорганической химии. Германий, олово, свинец / Под ред. Коченкова К. А., Землянского Н. Н., Швердина Н. И., Панова Е. М. — М.: Наука, 1968. — 704 с.
12. Порфирины: структура, синтез, свойства / Под ред. Ениколопяна Н. С. — М.: Наука, 1987. — С. 130.
13. Milaeva E. R., Speier G. // Asian. J. Chem. Rev. — 1990. — Vol. 1, N 2. — P. 159.