

УДК 577.150.2 : 577.158.8

## ФЕРМЕНТЫ-МОНООКСИГЕНАЗЫ И ПУТИ ИХ МОДЕЛИРОВАНИЯ

А. А. Ахрем, Д. И. Метелица и М. Е. Скурко

Обобщен и классифицирован материал по реакциям, катализируемым ферментами-монооксигеназами. Рассмотрены состав и свойства монооксигеназ, кинетика и механизм их действия в реакциях гидроксирования алифатических и ароматических соединений и эпексидирования олефинов. Обсуждены и систематизированы пути моделирования действия ферментов-монооксигеназ и критически рассмотрены механизмы реакций модельных систем.

Библиография — 193 наименования.

## ОГЛАВЛЕНИЕ

I. Введение . . . . .	868
II. Распространенность, место и роль монооксигеназ в биологическом окислении . . . . .	869
III. Типы реакций, катализируемых монооксигеназами . . . . .	873
IV. Состав и свойства монооксигеназных ферментных систем . . . . .	874
V. Кинетика и механизм действия монооксигеназ . . . . .	878
VI. Пути моделирования ферментов-монооксигеназ . . . . .	882

## I. ВВЕДЕНИЕ

Хорошо известно, что молекулярный кислород относительно инертен и в живых организмах не может непосредственно окислить аминокислоты, стероиды, углеводороды и другие соединения. Действительно, взаимодействие молекулы кислорода с углеводородами  $(RH) RH + O_2 \rightarrow R' + HO_2^{\cdot}$  сильно эндотермично ( $Q_{H-O_2} - Q_{R-H} = 47 - 93 = -46$  ккал/моль<sup>1</sup>) и может идти с измеримыми скоростями лишь при очень высоких температурах. В условиях, близких к биологическим, превратить молекулу кислорода в два активных атома невозможно, так как прочность связи  $O=O$  составляет 117,2 ккал/моль<sup>1</sup>. Известно, что кислород становится активным окислителем в ходе его ступенчатого восстановления до радикалов  $HO_2^{\cdot}$  и  $HO^{\cdot}$  и перекиси водорода. Ступенчатое восстановление молекулярного кислорода может происходить термически, радиолитически или в условиях сопряженного окисления органических веществ<sup>2</sup>. Активные окислители —  $H_2O_2$ ,  $HO^{\cdot}$  и  $HO_2^{\cdot}$  действуют на субстраты очень неселективно, что приводит к большому числу продуктов реакции. В то же время известно, что микроорганизмы могут усваивать различные углеводороды и другие соединения и окислять их в мягких условиях с необычайно высокой селективностью<sup>3-7</sup>. Такие сложные органические молекулы, как стероиды, можно селективно трансформировать в оксипроизводные, (гидроксировать с помощью микроорганизмов<sup>8,9</sup>). Реакция гидроксирования различных субстратов — аминокислот, стероидов, углеводов, гетероциклических соединений и т. д. является одной из наиболее важных в ряде физиологических процессов. В настоящее время можно считать доказанным, что реакция гидроксирования осуществляется с помощью ферментных систем, относящихся к классу оксидоредуктаз и называемых монооксигеназами. Этот тип ферментов, открытый в 1954 г. Мейсоном<sup>10-13</sup>, отличается тем, что в ходе катализируемой ими реакции

один атом молекулярного кислорода расходуется на окисление субстрата ( $S$ ), а другой атом восстанавливается до воды, так что суммарная реакция гидроксилирования характеризуется следующим уравнением:  $S + O_2 + DH_2 \rightarrow SO + H_2O + D$ , где  $DH_2$  — косубстрат, дегидрирующийся в ходе превращения. Если роль косубстрата выполняет сам субстрат  $SH_2 + O_2 \rightarrow SO + H_2O$ , то монооксигеназа называется «внутренней»<sup>14</sup>.

Сам Мейсон называл открытый им тип ферментов «оксидазами со смешанной функцией», подчеркивая тем самым принадлежность ферментов к классу оксидаз и отмечая необычность внедрения кислорода в субстрат. Гаяиши<sup>12-14</sup> предложил термин «монооксигеназы», который в настоящее время наиболее употребителен, так как позволяет отличить монооксигеназы от диоксигеназ, внедряющих в субстрат сразу два атома кислорода.

В последнее время ферменты-монооксигеназы интенсивно изучаются, и результаты исследований отражены в ряде обзоров, посвященных, в основном, биологическим аспектам действия монооксигеназ<sup>4, 11, 15</sup>. Цель нашего обзора — описать известные в настоящее время монооксигеназы, классифицировать их по типам реакций и строению, оценить роль монооксигеназ в биологическом окислении, обсудить состав монооксигеназ и их свойства. Мы хотели бы особо подчеркнуть роль моделирования в изучении механизма катализируемых монооксигеназами реакций. Нами рассмотрены в основном работы, выполненные в последнее время, так как они несут самую новую информацию и аккумулируют сведения, полученные ранее. В обзоре использованы общепринятые биохимические сокращения.

## II. РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ, МЕСТО И РОЛЬ МОНООКСИГЕНАЗ В БИОЛОГИЧЕСКОМ ОКИСЛЕНИИ

Все процессы внутриклеточного дыхания можно разделить на два класса: 1) окисление, сопряженное с аккумуляцией энергии, и 2) свободное окисление, не связанное с образованием высокоэнергетических (макроэргических) соединений. Сопряженное фосфорилирующее окисление выполняет функцию энергообеспечения клетки и осуществляется с участием полиэнзиматического комплекса, структура которого полностью не выяснена. Этот комплекс состоит из ряда переносчиков электронов, потенциалы восстановления которых при pH 7,0 заключены между потенциалами восстановления НАД, исходного донора ( $НАД - НАДН = 0,320$  в), и кислорода, конечного акцептора ( $O_2 - H_2O = 0,815$  в). Таким образом, возникает большой скачок потенциала и в процесс вовлекается начальная энергия окисления субстрата. Эта энергия частично (~40%) расходуется на образование АТФ. Энергия гидролиза АТФ используется клеткой в реакциях биосинтеза, которые иначе были бы термодинамически невыгодными. Роль кислорода в сопряженном окислении состоит в том, что он служит акцептором электронов, высвобождающихся в реакциях дегидрирования. Эта функция кислорода и деструктивный метаболизм в клетке в настоящее время довольно хорошо известны и детально описаны в руководствах по биологической химии<sup>16</sup>.

Свободное окисление, не связанное с образованием высокоэнергетических соединений, осуществляется с помощью ферментов, которые можно разделить на два класса: оксидазы и оксигеназы. Из рассмотрения исключаются протеины — переносчики кислорода: гемоглобин, миоглобин, гемоцианин. Оксидазы представляют собой дегидрогеназы, использующие кислород как акцептор электронов, и восстанавливающие его до перекиси водорода<sup>17</sup>.

Оксидазы в зависимости от природы простетических групп являются флавопротеинами, металлофлавопротеинами или купропротеинами.

В отличие от оксидаз оксигеназы катализируют реакции, в ходе которых кислород связывается с субстратом. Если связывается один атом кислорода, то фермент называется монооксигеназой, если в субстрат включаются два атома кислорода, то фермент называется диоксигеназой. Как уже отмечалось, в ходе реакций, катализируемых монооксигеназами, один атом кислорода расходуется на окисление субстрата, а другой восстанавливается до воды. Именно этот атом кислорода служит акцептором электронов, как в случае оксидаз. Этим объясняется термин «оксидаза со смешанной функцией». Эта функция оксидаз требует присутствия косубстрата, дегидрирующегося в ходе реакции. В том случае, если роль косубстрата выполняет сам субстрат, фермент называется «внутренней монооксигеназой». Таким образом, ферменты-монооксигеназы катализируют реакции, в которых роль кислорода не ограничивается его функцией акцептора электронов, а состоит во внедрении в субстрат, а значит, и в окислении последнего. Приведем в качестве примера, некоторые «внутренние» монооксигеназы: лизиноксигеназа<sup>14, 18</sup>, лактат-декарбоксилаза<sup>19</sup>, триптофанооксигеназа<sup>20</sup>, аргининоксигеназа<sup>21</sup>.

Реакции, катализируемые монооксигеназами, широко представлены в биологических системах. Особая дыхательная цепь, составленная из ферментов свободного окисления, локализована в микросомах печени, где большинство чужеродных соединений и ряд природных метаболитов претерпевают превращения, приводящие к образованию полярных нетоксичных продуктов, которые затем выделяют почками. Катализированное монооксигеназами гидрокселирование лекарственных, канцерогенных и токсических веществ представляет большой интерес для фармакологии, онкологии и токсикологии<sup>4, 22</sup>. Близкая по составу к микросомной цепь гидрокселирования функционирует в митохондриях надпочечников, принимая участие в синтезе стероидных гормонов. Нарушение процессов такого рода лежит в основе ряда патологий.

Ряд микроорганизмов гидрокселирует углеводороды, используя их как питательные вещества<sup>3, 5-7, 23, 24</sup>. Эта способность микроорганизмов рассматривается в последние годы в аспекте получения пищевых продуктов и кормов из углеводородов нефти и природного газа<sup>23, 24</sup>. Американская фирма «Мобил Ойл» в 1967 г. взяла патент на ферментативное окисление углеводородов всех классов<sup>6</sup>. Универсальный характер реакции окисления объясняется тем, что используются разнообразные штаммы четырех видов микроорганизмов — *Pseudomonas*, *Nocardia*, *Bacillus*, *Mycobacterium*.

Гидрокселирование чужеродных соединений может осуществляться не только в эндоплазматическом ретикулуме (ЭР) клеток печени, но также в легких, желудочно-кишечном тракте, коже и почках<sup>25-27</sup>. ЭР является системой мембран толщиной ~80 Å, расположенной в цитоплазме. При дифференциальном центрифугировании фрагменты этих мембран образуют так называемую микросомную фракцию, остающуюся в надосадочной жидкости после отделения тяжелых частиц; ядер и митохондрий.

Где бы ни находились сложные гидрокселирующие системы — в микросомах печени млекопитающих, в митохондриях надпочечников или в бактериях — во всех случаях они многокомпонентны. В табл. 1 представлены важнейшие из изученных в последние годы монооксигеназ.

Вопросы физиологической роли монооксигеназ микросом печени, индукции синтеза микросомальной гидрокселирующей системы и ее гормональной регуляции подробно обсуждены в обзоре Масловой, Райхма-

ТАБЛИЦА 1

## Наиболее изученные монооксигеназы

Фермент	Донор электронов	Местонахождение	Ссылки на литературу
<i>Стероид-монооксигеназы:</i>			
Сквален-2,3-монооксигеназа КФ 1.14.1.3	НАДФ-Н	Печень	28, 29
11-β-Монооксигеназа КФ 1.14.1.6	НАДФ-Н	Митохондрии надпочечников	30—32
C-21-Монооксигеназа КФ 1.14.1.8	НАДФ-Н	ЭР надпочечников	33, 34
Холестерин-20-монооксигеназа КФ 1.14.1.9	НАДФ-Н	Митохондрии надпочечников	35, 36
2β-, 6α-, 6β-, 7α-, 7β-, 1α-, 1-β-, 15α-, 16α-, 18α-Монооксигеназа	НАДФ-Н	ЭР печени	37—40

*Монооксигеназы аминокислот и их производных*

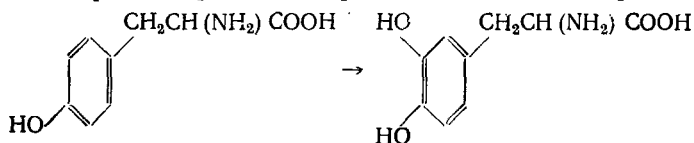
L-кинуренин-3-монооксигеназа КФ 1.14.1.2	НАДФ-Н НАД-Н	Митохондрии печени	41, 42
Допамин-β-монооксигеназа КФ 1.14.2.1	Аскорбат	Надпочечники	43, 44
4-Оксифенилпироват-1-монооксигеназа КФ 1.14.2.2.	Образующийся альдегид	Цитоплазма печени	45, 46
Фенилаланин-4-монооксигеназа КФ 1.14.3.1.	Тетрагидробиоптерин	Цитоплазма печени	47, 48
Пролин-4-монооксигеназа	Аскорбат		49, 50

*Прочие монооксигеназы*

Гем-α-монооксигеназа	НАДФ-Н	ЭР печени	51
ω-Оксигеназа жирных кислот	НАДФ-Н	ЭР печени	52—54
Арил-4-монооксигеназа	НАДФ-Н	ЭР печени	55, 56
Алкан-монооксигеназа	НАД-Н	ЭР печени	53, 57—59
Пара-окси-бензоат-гидроксилаза КФ 1.14.1.12.	НАДФ-Н	<i>Pseudomonas desmolytica</i>	60
Камфора-5-монооксигеназа	НАДФ-Н	<i>Pseudomonas putida</i>	61, 62

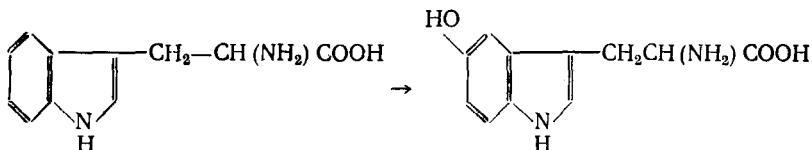
на и Скулачева<sup>4</sup>. Нам хотелось бы остановиться лишь на роли монооксигеназ в физиологическом состоянии мозга. За последние годы достигнуты большие успехи в исследовании ферментов центральной нервной системы, в особенности ферментов обмена биогенных аминов, участ-

вующих в осуществлении специфических функций нервных клеток. К биогенным аминам относятся тирамин, допамин, адреналин, норадреналин, серотонин и др. Их биосинтез и катаболизм регулируется деятельностью ферментных систем, в частности монооксигеназ, и определяет нормальное физиологическое состояние мозга<sup>63</sup>. В окончаниях нервов и в некоторых отделах головного мозга обнаружена тирозингидроксилаза, катализирующая гидроксилирование тирозина до 3,4-диоксифенилаланина<sup>64</sup>:



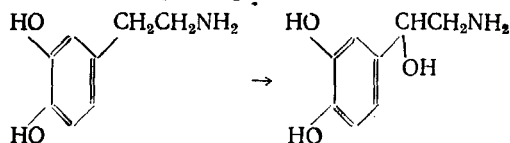
Очищенный фермент получен из мозгового слоя надпочечников быка<sup>64</sup>. Поиски множественных форм тирозингидроксилазы продолжаются. Тирозингидроксилаза активна в аэробных условиях в присутствии тетрагидрофолевой кислоты или 2-амино-4-окси-6,7-диметилтетрагидроптеридина, ионов  $\text{Fe}^{2+}$  и  $\text{K}^+$ <sup>65</sup>. Фермент ингибируется *in vitro* аминокислотами и их производными, в частности норадреналином, катехолами и индолами. Тирозингидроксилаза в норме гидроксилирует только тирозин. При паркинсонизме, как предполагается, возможно гидроксилирование диоксифенилэтиламина, введение которого животным вызывает «химическую симпатэктомию», т. е. исключение функций нервных клеток, имеющих в качестве медиатора импульсов норадреналин, а также полное торможение активности тирозингидроксилазы<sup>66</sup>.

Триптофангидроксилаза, катализирующая гидроксилирование триптофана до 5-окситриптофана, обнаружена в мозгу<sup>67-70</sup>, особенно в стволовой его части<sup>71</sup>:



Очищенный фермент получен из мозга быка<sup>71</sup>. Для действия триптофангидроксилазы необходим 2-амино-4-окси-6,7-диметил-5, 6, 7, 8-тетрагидроптеридин. В отличие от фермента печени, триптофангидроксилаза мозга гидроксилирует только *L*-триптофан в положение 5. Гидроксилирование триптофана ограничивает скорость биосинтеза серотонина в мозгу<sup>72</sup>.

Допамин-β-гидроксилаза, катализирующая гидроксилирование допамина до норадреналина охарактеризована еще до 1964 г.:



Фермент катализирует заключительный этап биосинтеза норадреналина — медиатора нервных импульсов в синапсах симпатической нервной системы. С недостаточностью адреналина связывают развитие некоторых видов психических депрессий. Многие психотропные средства изменяют содержание норадреналина в мозгу. Накопление в клетке избытка норадреналина тормозит дальнейшее гидроксилирование допамина.

## III. ТИПЫ РЕАКЦИЙ, КАТАЛИЗИРУЕМЫХ МОНООКСИГЕНАЗАМИ

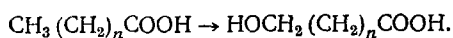
Реакции, катализируемые монооксигеназами, весьма разнообразны. Микросомы печени способны метаболизировать различные по структуре вещества, а значит — осуществлять разные реакции. В табл. 2 представлены реакции, катализируемые монооксигеназами. Самой распространен-

ТАБЛИЦА 2

Реакции, катализируемые ферментами-монооксигеназами

Тип реакции	Реакция	Ссылки на литературу
1. Гидроксилирование алифатических соединений	$\begin{array}{c} R_1 \\ \diagdown \\ R_2-CH \\ \diagup \\ R_3 \end{array} \rightarrow \begin{array}{c} R_1 \\ \diagdown \\ R_2-COH \\ \diagup \\ R_3 \end{array}$	12, 14, 30—40 73, 74
2. Гидроксилирование ароматических соединений	$ArH \rightarrow ArOH$	47, 48, 55, 56. 60, 64, 67—70
3. Эпоксилирование	$\begin{array}{c} \diagup \\ C=C \\ \diagdown \end{array} \rightarrow \begin{array}{c} \diagup \\ C-C \\ \diagdown \\ O \end{array}$	8, 9, 75
4. Образование лактонов	$\begin{array}{c}   \\ R-C-CH_2 \\    \\ O \end{array} \rightarrow \begin{array}{c}   \\ R_1-C-O- \\    \\ O \end{array} + H_2CO$	76
5. Дезаминирование	$\begin{array}{c} R-CH-CH_3 \\   \\ NH_2 \end{array} \rightarrow \left[ \begin{array}{c} R-C(OH)-CH_3 \\   \\ NH_2 \end{array} \right] \rightarrow$ $\rightarrow R-CO-CH_3 + NH_3$	4
6. Окислительное N-, O- и S-деалкилирование	$C_6H_5OCH_3 \rightarrow C_6H_5OH + CH_2O$ $R_1-NH-CH_2-R_2 \rightarrow R_1NH_2 + R_2C \begin{array}{c} O \\    \\ H \end{array}$	14
7. Гидроксилирование и окисление по N	$R_1-NH-R_2 \rightarrow R_1-N(OH)-R_2$ $\begin{array}{c} R_1 \\ \diagdown \\ R_2-N \\ \diagup \\ R_3 \end{array} \rightarrow \begin{array}{c} R_1 \\ \diagdown \\ R_2-N \\ \diagup \\ R_3 \end{array} \rightarrow O$	77
8. Образование сульфокисей	$\begin{array}{c} R_1 \\ \diagdown \\ R_2-S \\ \diagup \\ R_2 \end{array} \rightarrow \begin{array}{c} R_1 \\ \diagdown \\ R_2-S \\ \diagup \\ R_2 \end{array} \rightarrow O$	12

ной реакцией монооксигеназ является гидроксилирование алифатических соединений. Это практически наиболее важная реакция микробиологической трансформации стероидных соединений<sup>8, 9</sup>. Почти для всех положений стероидной системы — ядра, боковой цепи, ангулярных метильных групп — известны стероид-гидроксилазы микроорганизмов. Все изученные реакции гидроксилирования в стероидном ряду имели место у насыщенного атома углерода. Стероид-гидроксилазы встречаются не только в микроорганизмах, но, как уже отмечалось, и в тканях животных<sup>78—80</sup>. При ферментации микроорганизмами в молекулу стероида обычно вводится один, реже — два атома кислорода. Микросомы печени окисляют концевые группы алифатических углеводов до первичных спиртов<sup>53</sup> и осуществляют ω-гидроксилирование жирных кислот в ω-оксикислоты<sup>53, 81—83, 84</sup>.



Второе место по распространенности среди реакций, катализируемых монооксигеназами, занимает гидроксилирование ароматических сис-

тем<sup>47, 48, 55, 56, 60, 85</sup>. По этой реакции в ароматическое ядро вводится оксигруппа с образованием фенолов. Нельзя не отметить большую роль этой реакции в метаболизме ароматических аминокислот. Положение вводимой оксигруппы часто определяется наличием функциональных заместителей в ароматическом кольце.

Реакция эпоксицирования встречается при микробиологических трансформациях ненасыщенных стероидных субстратов<sup>8, 9</sup>. В настоящее время описано ферментативное образование  $\alpha$ -окисей из  $\Delta^5$ -,  $\Delta^9$ (<sup>11</sup>)-,  $\Delta^{11}$ - и  $\Delta^{14}$ -стероидов. Очень часто эпоксицирование и гидроксильрование стероидов осуществляет одна и та же ферментная система<sup>8</sup>.

С участием монооксигеназ происходит дезаминирование жирорастворимых аминов, которые превращаются в кетоны и аммиак. Амфетамин и его аналоги вступают в эту реакцию в печени животных. Монооксигеназы катализируют также реакции N-, O-, S-деалкилирования, гидроксильруют по атому азота и окисляют субстраты по атому азота и серы.

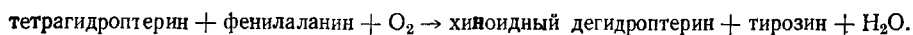
При всем своем разнообразии реакции монооксигеназ имеют одну важную общую черту — в субстрат в результате реакции переносится только один атом кислорода.

#### IV. СОСТАВ И СВОЙСТВА МОНООКСИГЕНАЗНЫХ ФЕРМЕНТНЫХ СИСТЕМ

Гидроксильрующие ферментные системы — это сложные многокомпонентные белковые образования. Все монооксигеназы можно разделить на две большие группы: первая группа включает *ферменты, не содержащие иона или комплекса металла*, вторая группа включает *ферменты, имеющие в своем составе один или несколько атомов металлов*, и поэтому представители второй группы относятся к металлопротеинам.

В числе ферментов первой группы — имидазолацетатмонооксигеназа<sup>14</sup>, донором электронов для которой является НАД-Н, а простетическая группа содержит ФАД и является флавопротеином; кинуренин-3-монооксигеназа<sup>41, 42, 86, 87</sup>; салицилатгидроксилаза<sup>73</sup>; пара-оксибензоатгидроксилаза<sup>74</sup>; L-лизинмонооксигеназа<sup>88</sup>. Простетические группы этих ферментов представляют собой, как правило, ФАД-содержащий белок<sup>89-93</sup>. Кинетика и механизм действия ферментов этой группы будут рассмотрены подробно в пятом разделе нашей статьи.

Более многочисленны и глубже изучены ферменты второй группы, содержащие в своем составе ион металла. К их числу относится тирозиназа, являющаяся купропротеином, косубстратом этого фермента служит дифенол — продукт реакции<sup>94</sup>. Допамин- $\beta$ -монооксигеназа содержит на один моль фермента два атома меди<sup>95</sup>. Хорошо изучена к настоящему времени фенилаланингидроксилаза, содержащая на один моль энзима 1—2 моля Fe<sup>96-100</sup>. Фенилаланингидроксилаза, выделенная из печени крысы, существует в двух формах, которые можно разделить электрофорезом: каждая из форм может быть мономером (*М. в.* 51 000—55 000), димером (*М. в.* 110 000) и тетрамером (*М. в.* 210 000). Димеры диссоциируют в мономерную форму при разбавлении энзима и возрастании температуры от 0 до 30°<sup>96</sup>. Реакция фенилаланингидроксильности характеризуется следующей стехиометрией:



Дегидрирующимся косубстратом является тетрагидроптерин. Атом Fe, содержащийся в ферменте, находится в высокоспиновой форме Fe<sup>3+</sup>. Потеря атома железа или добавление соединений, хелатирующих металл, ингибирует гидроксильность. Спектр ЭПР очищенной фенилаланингидрок-

силазы характеризуется сигналом с  $g=4,23$ , что связано с высокоспиновой формой иона железа. Присоединение субстрата к ферменту вызывает исчезновение сигнала с  $g = 4,23$ , что свидетельствует о восстановлении железа до  $Fe^{2+}$ <sup>98</sup>. Лишенный активности удалением из него железа фермент снова восстанавливает свою активность при добавлении  $FeCl_2$ . В самое последнее время началось изучение фенилаланингидроксилазы, выделяемой из печени человека аутопсией<sup>99, 100</sup>. Энзим получен в двух формах: растворенной при 6000 g и осажденной при том же ускорении<sup>100</sup>. Сравнение фермента из печени человека и фермента из печени крысы показывает большую общность свойств обоих энзимов. Константа Михаэлиса  $K_m$  изменяется в зависимости от pH и концентрации 2-амино-4-окси-6, 7-диметил-5, 6, 7, 8-тетрагидроптеридина и равна при оптимальном значении pH  $5 \cdot 10^{-4}$  моль/л<sup>100</sup>.

Самой большой группой, интенсивно изучаемой в последние годы, являются энзимы, содержащие в качестве простетической группы так называемый цитохром Р-450. В свою очередь ферменты этой группы можно разделить на три подгруппы в зависимости от их нахождения в природе: к первой подгруппе относятся монооксигеназы микросом печени млекопитающих<sup>102-112</sup>, ко второй подгруппе относятся монооксигеназы митохондрий надпочечников, к третьей — монооксигеназы бактериального происхождения<sup>60-62, 89-93, 118, 119</sup>. Между ферментными системами этих трех подгрупп есть существенные различия, однако все они, как правило, содержат цитохром Р-450. Ниже показаны для сравнения цепи переноса электронов, реализующиеся в этих трех подгруппах ферментов<sup>4</sup>:

Схема 1

*Микросомы печени:*

НАДФ-Н → флавопротеин II → негеминный Fe-белок → цитохром Р-450 →  $O_2$

↓  
цитохром С

*Митохондрии надпочечников:*

НАДФ-Н → флавопротеин III → негеминный Fe-белок → цитохром Р-450 →  $O_2$   
(адренодоксин)

*Бактериальные монооксигеназы*

Метилгидроксилаза:

НАД-Н → флавопротеин → путидаредоксин → цитохром Р-450 →  $O_2$

*ω-Гидроксилаза:*

НАД-Н → флавопротеин → рубредоксин → неидентифицированный цитохром →  $O_2$

Как следует из схемы 1, донором электронов (водорода) является НАДФ-Н или НАД-Н в случае бактериальных монооксигеназ. От донора на флавиновую группировку белка-редуктазы водород передается вместе с электронной парой по механизму гидридного переноса. Белок-редуктаза одинаково способен как к двум-, так и к одноэлектронным переносам. Следующим звеном в цепи переноса электронов служит белок, содержащий чаще всего атомы железа и серы и называемый негеминным железобелком (адренодоксином в случае митохондриальных систем, путидаредоксином — в случае метилгидроксилазы и рубредоксином в парафиноокисляющих системах). В разных случаях роль железобелка различна. Если его присутствие в парафиноокисляющей системе не обязательно, то в случае метилгидроксилазы он является в высшей степени специфичным и не может быть заменен никаким другим белком. Путидаредоксин и адренодоксин принимают самое непосредственное участие в переносе электронов в цепи и мы остановимся в дальнейшем на их роли более подробно. Пока нет прямых указаний на участие негеминного железа в переносе электронов в микросомах, хотя предполагается, что оно играет роль компонента, включенного между флавином и цитохромом Р-450.



Терминальным электронным переносчиком микросомальной цепи, также как митохондриальной и бактериальной, является цитохром Р-450. В настоящее время этот цитохром выделен из микросом печени<sup>101-105</sup>, из митохондрий надпочечников<sup>113-116</sup> и из бактерий<sup>118, 119</sup>. Остановимся подробно на свойствах цитохрома Р-450.

Цитохром Р-450 представляет собой гемовый белок, который в восстановленном состоянии образует прочный комплекс с молекулой СО, имеющий максимум поглощения при 450 нм. Цитохром довольно легко окисляется молекулярным кислородом и может быть снова восстановлен с помощью НАДФ-Н или дитионита. Цитохром наряду с железом содержит также медь. При обработке цитохрома протеазами, амидами, кетонами, фенолами, анилинами он превращается в форму, не обладающую ферментативной активностью, с полосой *Sore* карбонильного комплекса 420 нм, характерной для других цитохромов. Абсолютный спектр окисленной формы цитохрома Р-450 характеризуется максимумами поглощения 360, 416, 535, 570 и 650 нм. Цитохром Р-450 из микросом печени содержит смесь низкоспиновой и высокоспиновой форм железа. Абсолютный спектр восстановленной формы отличается низким коэффициентом поглощения и сдвигом полосы *Sore* в сторону коротких волн с максимумами 412 и 557 нм. В окисленном состоянии цитохром Р-450 из микросом печени дает сигнал ЭПР со значениями компонент *g*-фактора:  $g_x=1,91$ ,  $g_y=2,25$  и  $g_z=2,41$ . Этот сигнал характеризует низкоспиновое состояние трехвалентного железа в асимметричном окружении. Низкоспиновая форма цитохрома при низком рН или обработке его тиоловыми ингибиторами переходит в высокоспиновую форму с анизотропным сигналом ЭПР. Цитохром из микросом печени имеет в своем составе липидный компонент, благодаря которому он может связываться с гидрофобными соединениями. Недавно показано<sup>120</sup>, что цитохром Р-450 из микросом в восстановленной форме образует комплекс с молекулярным кислородом, имеющий максимум поглощения при 440 нм. Этот комплекс образуется в 20 раз быстрее, нежели карбонильное производное цитохрома Р-450: при 25° константа скорости взаимодействия цитохрома Р-450 с  $O_2$  составляет  $4,4 \cdot 10^6$  л/моль·сек, а с СО —  $2,4 \cdot 10^{-5}$  л/моль·сек.

Цитохром Р-450, выделенный из митохондрий надпочечников, мало отличается от печеночного. Оптические и ЭПР-спектры цитохрома Р-450 из митохондрий и микросом аналогичны<sup>114</sup>.

Наиболее изучен в настоящее время цитохром, выделенный из микроорганизмов, окисляющих камфору<sup>118, 119, 121</sup>. Хорошо исследованы оптические и ЭПР-спектры этого цитохрома, а также спектры Мёссбауэра. Для того, чтобы снять последние, природный цитохром обогащался изотопом <sup>57</sup>Fe. Окисленный цитохром в присутствии субстрата — камфоры — состоит из смеси высокоспинового ( $S=5/2$ ) и низкоспинового ( $S=1/2$ ) гемового железа  $Fe^{3+}$ . Удаление камфоры превращает высокоспиновое железо  $Fe^{3+}$  в низкоспиновое. Анаэробное восстановление цитохрома Р-450 дает высокоспиновую форму  $Fe^{2+}$  ( $S=2$ ), причем не наблюдается никаких парамагнитных эффектов даже в сильном поле. Спектры Мёссбауэра (цитохром Р-450)<sub>камф.</sub> аналогичны спектрам оксигенированного гемоглобина. Цитохром Р-450<sub>камф.</sub> представляет собой белок с *М. в.* 45 000, состоящий из одной полипептидной цепи и железо-протопорфирина IX группы. Вопрос об аксиальной координации гема Р-450 пока остается открытым; предполагается лишь, что аксиальными лигандами являются сера цистеина и азот гистидина. Восстановленный (цитохром Р-450)<sub>камф.</sub> дает комплекс с  $O_2$ , который наблюдали оптическими методами<sup>118, 121</sup>; появляется новая спектральная полоса с максимумами 555, 418 и 355 нм<sup>118</sup>. Сигнал ЭПР с  $g=2,26$ , характерный для низ-

коспиновой  $\text{Fe}^{3+}$ -формы, при этом исчезает. Комплекс [цитохром Р-450<sub>камф.</sub>  $\rightarrow \text{O}_2$ ] довольно устойчив при низких температурах ( $4-8^\circ$ ), но при хранении медленно превращается в высокоспиновую форму  $\text{Fe}^{3+}$ . Таким образом, гемовая природа цитохромов Р-450 в настоящее время твердо установлена, так же как и прямое участие цитохромов Р-450 в гидроксилировании разных субстратов. Твердо доказано образование оксигенированного производного цитохромов при энзиматическом гидроксилировании.

В цепи переноса электронов цитохрому Р-450 предшествуют так называемые Fe, S-содержащие белки. Белки этого класса отличаются от других Fe-содержащих белков тем, что металл не связан с комплексуемыми органическими лигандами<sup>122</sup>. В рубредоксине единственный атом железа координирован с 4 атомами S цистеина. Биологическая роль рубредоксина не всегда ясна: чаще всего она состоит в переносе электронов. Этот белок в стероид-гидроксилирующих системах называется адренодоксин. Он выделен в свободном виде<sup>117</sup> и хорошо охарактеризован. Адренодоксин содержит 2 *г-атома* железа и 2 *моля* лабильной серы на 1 *моль* белка и имеет *М. в.* 12 500 и простую полипептидную цепь, содержащую 114 аминокислот. Структура активного центра би-ядерно-тетраэдрическая. Окислительно-восстановительный потенциал адренодоксина составляет по последним данным<sup>114</sup> — 0,27 *в* при pH 7,0. Адренодоксин может быть полностью восстановлен дитионитом, НАДФ-Н или адренодоксин-редуктазой.

Особенно важную роль в гидроксилировании камфоры имеет Fe, S-содержащий белок, называемый путидаредоксином. Он обеспечивает передачу второго электрона на тройной комплекс цитохрома с субстратом и кислородом<sup>119</sup>. Путидаредоксин очень специфичен и не может быть заменен другим серусодержащим белком, например адренодоксином, компонентом 11  $\beta$ -гидроксилазы стероидов. В то же время НАД-дегидрогеназа в цепи переноса электронов системы гидроксилирующей камфору, может быть заменена другой дегидрогеназой без потери ферментативной активности. Физико-химическое исследование путидаредоксина (магнитная восприимчивость, ЭПР, электронно-ядерный двойной резонанс, спектры Мёссбауэра и спектры кругового дихроизма) указывают на присутствие двух атомов железа в окисленной форме в высокоспиновом состоянии ( $\dot{S} = 5/2$ ). Таким образом, в ряде случаев установлено, что негеминовый белок участвует в переносе электронов при гидроксилировании субстрата, в то же время его присутствие в парафиноокисляющей системе не обязательно.

Негеминовым белкам в цепи переноса электронов предшествуют белки-редуктазы, являющиеся, как правило, флавопротеидами, способными к переносу двух электронов. Редуктаза, выделенная из системы, осуществляющей энзиматическое  $\omega$ -окисление жирных кислот, содержит ФАД в качестве простетической группы (1 *моль* на 1 *моль* белка) и имеет *М. в.* 55 000<sup>84</sup>. Редуктаза очень специфична и взаимодействует с рубредоксином, давая комплекс с константой диссоциации  $2,1 \cdot 10^{-7}$  *моль/л*. Энергия активации энзим-катализированного восстановления рубредоксина с помощью НАД-Н равна 5,4 *ккал/моль*.

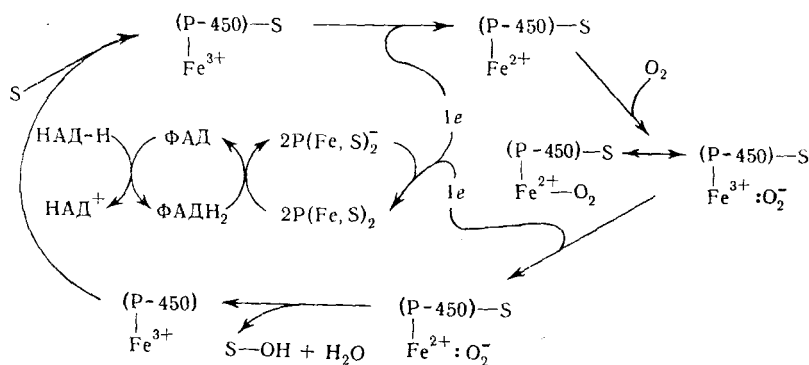
Таким образом, гидроксилирующие ферментные системы являются сложными многокомпонентными белковыми структурами. Каждый компонент этих систем выполняет функцию переноса электронов. В структуре и свойствах отдельных частей ферментных систем еще много неясностей и загадок.

## V. КИНЕТИКА И МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ МОНООКСИГЕНАЗ

Ценную информацию о механизме действия монооксигеназ дает изучение кинетики реакций монооксигеназ и измерение скоростей отдельных стадий сложного ферментатического процесса. Следует помнить, однако, что изучение механизма действия на экстрактах и даже на очищенных препаратах почти всегда приводит лишь к ориентировочным выводам о механизме окислительной стадии.

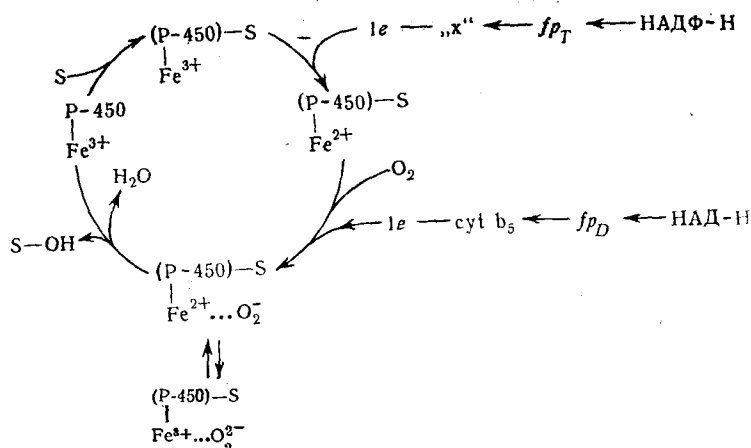
В настоящее время получены количественные характеристики для различных стадий реакции окисления камфоры с участием метилен-гидроксилазы<sup>118, 121, 123, 124</sup>. Показано, что с очень высокими скоростями цитохром Р-450 реагирует с молекулярным кислородом, давая комплекс. Измерена константа скорости образования комплекса камфоры с цитохромом Р-450, равная при 8°  $3,7 \cdot 10^6$  л/моль·сек<sup>123</sup>, и определена константа равновесия для этого комплекса  $0,47 \cdot 10^6$  л/моль. Сам фермент-субстратный комплекс выделен в кристаллическом состоянии<sup>124</sup>. Твердо установлено, что окисленный цитохром присоединяет камфору, а затем получает один электрон. Фермент-субстратный комплекс присоединяет затем кислород с образованием тройного комплекса фермент — субстрат —  $O_2$ . Этот последний комплекс получает второй электрон и образует окисленную камфору и окисленный цитохром. Скорость присоединения камфоры и кислорода к ферменту в 100 раз больше скорости образования продукта. На основании кинетических измерений и анализа функций составных частей предложена следующая схема действия метилен — гидроксилирующей системы (S — субстрат, S—ОН — окисленный субстрат); см. схему 2. Отличительной чертой схемы 2<sup>121</sup> является то, что оба электрона для восстановления кислорода поставляются путидаредоксином.

Схема 2



Изучение окислительно-восстановительного цикла цитохрома Р-450 из микросом печени показало, что этот цикл включает образование оксигенированного интермедиата восстановленного цитохрома. Этот интермедиат обнаружен методом дифференциального спектрофотометрирования и изучена кинетика его появления. Недавно, с использованием техники флеш-фотолиза и быстрого смешения измерены константы скорости взаимодействия цитохрома с кислородом —  $4,4 \cdot 10^6$  л/моль·сек при 25°<sup>120</sup>.

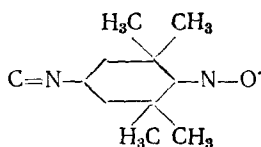
Схема 3



На схеме 3 приведено течение реакций переноса электронов в микросомах печени при гидроксировании субстрата <sup>103</sup>.

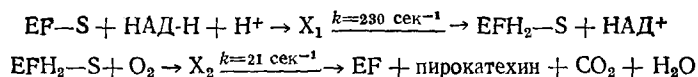
На схеме 3 донором электронов для окисгенированной формы восстановленного цитохрома Р-450 служит цитохром b<sub>5</sub>.

В последнее время методом спиновой метки <sup>110, -112</sup> изучалась молекулярная структура и механизм действия цитохрома Р-450. Цитохром Р-450 из микросом печени взаимодействовал с изоцианидной спиновой меткой (ИСМ):



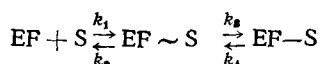
в результате чего наблюдалось появление полос поглощения с  $\lambda$  около 435 и 455 нм, характерных для изоцианидных производных цитохрома. Спектры ЭПР микросом печени, обработанных ИСМ, говорят о значительной заторможенности молекулярного движения метки, что связано с ее гидрофобным окружением. Частота молекулярного вращения ИСМ возрастает при добавлении гидроксигируемого субстрата (гексабарбитурата). Форма спектров ЭПР ИСМ указывает на то, что молекулы гема, к которым присоединена метка, расположены далеко друг от друга и не образуют димерных структур. Предполагается, что активный центр цитохрома Р-450 представлен одной гемовой группой, окруженной неполярными аминокислотными остатками, пространственное расположение которых относительно гема меняется определенным образом при взаимодействии цитохрома с субстратами.

Остановимся теперь на механизме действия монооксигеназ, не содержащих металла. Используя технику изучения быстрых реакций в потоке, удалось выяснить некоторые аспекты механизма реакции салицилат-гидроксилазы из *Pseudomonas putida* <sup>92</sup>. При 25° и pH 7,0 константа скорости связывания энзима с субстратом составляет  $1,8 \cdot 10^7$  л/моль·сек, а константа скорости обратной реакции равна 62 сек<sup>-1</sup>. Обозначив E — энзим, F — флавин, S — субстрат, можно так представить схему реакции:



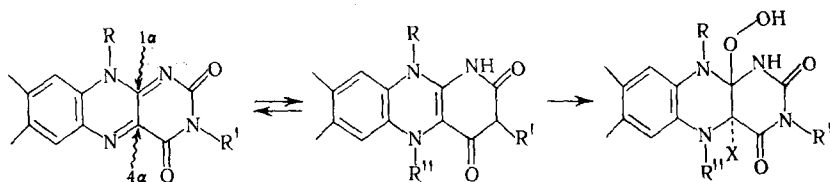
В этой схеме  $EF-\dot{S}$  и  $EFH_2-S$  — окисленный и восстановленный комплекс соответственно, а  $X_1$  и  $X_2$  — кинетически проявляющиеся частицы. Скорость восстановления флавина более чем в 2000 раз больше в присутствии салицилата, чем без него. Лимитирующей стадией всего процесса является окисление восстановленного комплекса молекулой  $O_2$ .

Изучение кинетики образования фермент-субстратного комплекса пара-окси-бензоат-гидроксилазой с использованием метода остановленного потока показало, что скорость реакции комплексообразования очень велика, а сама реакция проходит две стадии <sup>89</sup>:



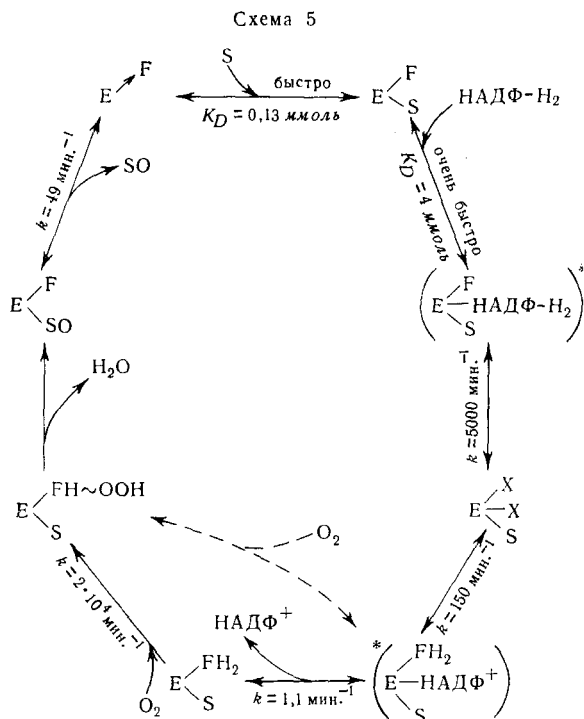
Первая стадия протекает гораздо быстрее второй ( $k_3=480 \text{ сек}^{-1}$ ,  $k_4=140 \text{ сек}^{-1}$ ). Обнаруженная мультиступенчатость связана, возможно, с изомеризацией фермент-субстратного комплекса или с конформационными изменениями энзима. Хорошо известны другие примеры мультиступенчатого образования фермент-субстратных комплексов для энзимов других классов <sup>125-128</sup>. Многоступенчатое взаимодействие энзима с субстратом обнаружено, например, в системах рибонуклеаза-цитидин-3-фосфат, химотрипсин-профлавин, лизоцим-олигосахариды и др. В настоящее время постадийно изучена реакция пара-оксибензоат-гидроксилазы из микроорганизмов *Pseudomonas — fluorescens* с 2,4-диоксибензоатом в присутствии НАД-Н и  $O_2$ . Спектрофотометрически с использованием техники остановленного потока исследовано анаэробное восстановление комплекса пара-оксибензоат-гидроксилазы с 2,4-диоксибензоатом с помощью НАД-Н и показано образование в ходе процесса, по крайней мере, трех промежуточных соединений. Все три интермедиата поглощают в длинноволновой области и не обнаруживают сигналов ЭПР. Изучено также окисление восстановленного фермент-субстратного комплекса кислородом и отчетливо зарегистрирован интермедиат — оксигенированная форма связанной с энзимом флавиновой простетической группировки. Второй интермедиат идентифицирован как окисленный комплекс «энзим-продукт». Это промежуточное соединение претерпевает превращение со скоростью, близкой к максимальной скорости ферментативного процесса. Предложенный в работе <sup>90</sup> оксигенированный интермедиат флавина совсем недавно удалось обнаружить при взаимодействии полностью восстановленного флавина и флавопротеина с молекулярным синглетным кислородом <sup>129</sup>. Структура оксигенированного флавина установлена по спектрам поглощения и с помощью снабженного компьютером масс-спектрометра высокого разрешения. Оксигенированная форма характеризуется поглощением при 500—680 нм и пиком при 375 нм. Ниже представлена схема 4 образования оксигенированного флавина с кислородом в его первом возбужденном состоянии ( $^1\Delta g$ ):

Схема 4



где  $X = -OCH_3$ ;  $-SCH_2CH(NH_2)COOCH_3$

Как видно из схемы 4, кислород атакует положение  $1\alpha$ , в результате чего образуется гидроперекисное производное флавина. На основании кинетических исследований предложен механизм взаимодействия параксibenзоат-гидроксилазы с субстратом — 2,4-оксibenзоатом, представленный на схеме 5<sup>90, 91</sup>, где F — связанный с ферментом (E) флавин, X — неидентифицированные частицы, SO — 2,3,4-триоксibenзоат, а звездочка обозначает комплексы с переносом заряда.



Из схемы 5 следует, что самой медленной стадией реакции является перенос заряда в комплексе фермент — субстрат — НАДФ ( $k = 1,1 \text{ мин}^{-1}$ ). Остальные стадии реакции протекают много быстрее. Образование оксигенированного флавинового производного в комплексе фермента с субстратом предшествует переносу атома кислорода в субстрат.

Исследование предстационарной и стационарной кинетики реакций ферментов-монооксигеназ позволяет сделать заключения о лимитирующей стадии всего ферментативного процесса и выделить активные промежуточные комплексы, ответственные за активацию молекулярного кислорода. Опыт показывает, что одного гидрофобного взаимодействия субстрата с гидрофобными, например, липидными участками молекул фермента недостаточно для протекания ферментативной реакции<sup>109-111</sup>. В ходе реакции необходимо активировать инертную молекулу кислорода. Эту главную функцию монооксигеназ выполняют цитохром P-450, образующий оксигенированное промежуточное соединение с  $O_2$ , и флавиновые группы монооксигеназ, не содержащих ионов металла и образующих, как четко доказано в самое последнее время, гидроперекисное соединение флавина с  $O_2$  по положению  $1\alpha$ . Таким образом, молекула кислорода активируется путем двухэлектронного восстановления или через посредство иона железа, или через посредство восстановленного

в цепи переноса электронов флавина. В схеме 3 двухэлектронного восстановления кислорода с участием цитохрома Р-450 много неясностей, связанных с источником, поставляющим второй электрон для восстановления, так как пока не ясно взаимодействие НАДФ-Н и НАД-Н-специфических цепей переноса электронов<sup>130</sup>. В последнее время высказываются соображения об обмене восстанавливающимися эквивалентами между НАДФ-Н и НАД-Н-специфическими цепями переноса электронов<sup>131</sup>. В соответствии со схемой 6 этот обмен осуществляется с участием цитохрома  $b_5$ :

Схема 6



Пути обмена 1 и 2 не реализуются.

Несмотря на большие достижения в изучении кинетики ферментативных реакций монооксигеназ и их отдельных стадий до сих пор нельзя считать решенной центральную проблему — механизм активации кислорода, так как структура активного кислорода в цитохроме Р-450 полностью не известна. Ясно лишь, что перенос атома кислорода в субстрат не всегда является лимитирующей стадией. Так как прямое исследование переходного состояния у большинства ферментативных реакций невозможно, становится необходимым изучение модельных систем и модельных реакций, отражающих отдельные стороны сложного ферментативного процесса. Только модельные реакции и модельные системы помогут выяснить детали активации  $O_2$ .

Известно, что проблему установления механизма ферментативного действия можно решать тремя путями: теоретическими построениями, исследованием свойств ферментов и изучением механизмов химических реакций и их катализа<sup>132</sup>. Согласно Дженксу, — «... для того, чтобы понять механизм катализа в ферментативной реакции, необходимо сперва понять механизм неферментативной реакции и установить те пути, по которым реакцию можно ускорить». В следующей части нашего обзора мы подробно остановимся на вопросах моделирования действия ферментов-монооксигеназ.

## VI. ПУТИ МОДЕЛИРОВАНИЯ ФЕРМЕНТОВ-МОНООКСИГЕНАЗ

При всей своей сложности, ферменты подчиняются тем же термодинамическим и кинетическим законам, что и обычные катализаторы, поэтому даже простые катализаторы в какой-то мере моделируют определенные стороны действия ферментов. Говоря о моделировании ферментов, по мнению А. Е. Шилова, — «наиболее целесообразно применять это понятие, руководствуясь скорее целью исследования, чем степенью сходства изучаемого катализатора и фермента, который этот катализатор моделирует». Опубликовано большое число обзоров<sup>132–138</sup>, посвященных моделированию ферментов. Комплексный подход к моделированию ферментной системы может привести к существенным результатам. Так произошло при моделировании ферментативной фиксации молекулярного азота<sup>137</sup>. Обучаясь у природы и используя химические представления, удается открыть новые, иногда поразительные реакции.

В результате действия монооксигеназ один атом молекулярного кислорода переносится в молекулу субстрата. Поэтому наиболее целесообразно изучать в первую очередь пути и механизмы переноса кислоро-

да в субстрат различными системами. Исследование монооксигеназ показало, что атом кислорода способен внедриться в субстрат только после того, как молекула кислорода получит два электрона. Все системы, переносящие кислород в субстрат можно разделить на две большие группы: первая группа включает ионы и комплексы металлов, при окислении которых кислород получает два электрона, вторая группа включает соединения перекисного характера, в которых кислород уже активирован, так как имеет эти два электрона. В первом случае субстрат окисляется сопряженно с окислением иона или комплекса металла. Во втором случае происходит непосредственный перенос атома кислорода в субстрат от перекисного или гидроперекисного соединения. Имитация ферментативного переноса кислорода будет тем полнее, чем шире круг реакций, которые может осуществлять предполагаемая модель монооксигеназы (см. табл. 3). Переносчиками кислорода в субстрат могут быть также N-окиси, озон и оксо-анионы солей металлов.

В дальнейшем мы подробно остановимся на реакциях каждой группы предполагаемых модельных систем и на особенностях механизма действия этих систем. Наибольший интерес представляет первая группа систем, включающих ион или комплекс металла и молекулярный кислород. В табл. 3 представлен ряд таких систем. (Для ароматических субстратов приводится распределение изомерных фенолов в последовательности: орто : мета : пара).

В табл. 4 представлены реакции надкислот и некоторых перекисных соединений<sup>158-173</sup> с рядом субстратов, на которые кислород переносится по типу действия монооксигеназ, содержащих в своем составе флавопротеиды и не имеющих иона или комплекса металла. В этой таблице отсутствуют реакции надкислот с олефинами, механизм и кинетика которых хорошо изучены<sup>174</sup>. (Для ароматических субстратов приводится соотношение изомеров в порядке: орто : мета : пара).

Модельные системы первого типа (табл. 3) можно разделить, в свою очередь, на две подгруппы: первая подгруппа включает ион металла, способный к переносу не одного, а двух или более электронов —  $\text{SnHPO}_4$ ,  $\text{SnCl}_2$ ,  $\text{MoCl}_3$ ,  $\text{Mo}(\text{CO})_6$ . Вторая подгруппа включает ион металла, способный к одноэлектронному переносу и редокс-активный лиганд — аскорбиновую кислоту, тиосалициловую кислоту, третрагидроптерин, пириидины. Как следует из табл. 3, модельные системы первого типа осуществляют реакции гидроксирования алифатических<sup>139-141, 151, 154</sup> и ароматических<sup>142-147, 155, 156</sup> соединений, а также окисляют трифенилфосфин до окиси<sup>157</sup>. Кроме того, системы, содержащие ион  $\text{Fe}^{2+}$  и редокс-активный лиганд, могут превращать олефины в эпоксиды<sup>138</sup>. Таким образом, модельные системы первого типа осуществляют многие из реакций, катализируемых монооксигеназами (см. табл. 2). Самое важное — распознать природу частицы, содержащей активный кислород и осуществляющей все реакции, перечисленные в табл. 3. Возможными формами активной частицы являются радикалы  $\text{OH}^\bullet$  и  $\text{HO}_2^\bullet$ , однако, эти свободные радикалы не могут быть активированными формами кислорода в случае ферментных систем, так как будут разрушать клетку. Радикалы  $\text{HO}_2^\bullet$  и  $\text{HO}^\bullet$  могут быть стабилизированы ионами металлов:  $\text{HO}_2^\bullet$ , взаимодействуя с  $\text{Fe}^{3+}$  превращается в  $\text{FeO}_2^{2+}$  (комплекс III), а  $\text{HO}^\bullet$ , взаимодействуя с ионом  $\text{Fe}^{3+}$ , превращается в комплекс II —  $\text{FeO}^{2+}$ . В таком стабилизированном состоянии радикалы  $\text{HO}^\bullet$  и  $\text{HO}_2^\bullet$  могут быть переносчиками кислорода при биологическом окислении. Важной характеристикой природы частицы, атакующей ароматический субстрат, является распределение изомеров и ориентирующее влияние заместителя в бензольном ядре. Для всех случаев, приведенных в табл. 3, распре-



ТАБЛИЦА 3

Системы, включающие ион или комплекс металла и молекулярный кислород

Система	Субстрат	Продукты	Ссылки на литературу
$\text{Fe}^{2+} + \text{аскорбат}$	Андростенолон	7-андростенолон	139
$\text{Fe}^{2+} + \text{аскорбат}$	Кортексолон	Кортизол + кортизон	140, 141
$\text{Fe}^{2+} + \text{аскорбат} + \text{ЭДТА}$	Анизол	Метоксифенолы 43:18:39	142
$\text{Fe}^{2+} + 2,4,5\text{-триамино-6-оксипиримидин}$	Анизол	Метоксифенолы 49:13:38	143
$\text{Fe}^{2+} + \text{тиосалициловая к-та}$	Ацетанилид	Фенолы 57:3:40	144
То же	Толуол	Крезолы 61:13:16	144
То же	Нафталин	$\alpha$ -нафтол 11% $\beta$ -нафтол 9%	144
$\text{Fe}^{2+} + \text{N-бензил-1,4-дигидро-никотинамид}$	AgH	AgOH	145
$\text{Fe}^{2+} + \text{тетрагидроптерин}$	Фенилаланин	Тирозин 2:1:1	146
То же	Триптофан	5-окситриптофан + меланин + + кинуренин	146, 147
Гемин + тиосалициловая к-та	Циклогексан	Циклогексанол	148
$\text{Fe}^{2+} + \text{ЭДТА}$	Толуол	Крезолы 38:24:38	145
То же	Анизол	Метоксифенолы 56:8:36	145
То же	Фторбензол	Фторфенолы 2:45:53	145
$\text{FeCl}_2$ (ацетон или метанол)	Циклогексан	Циклогексанол	149
$\text{TiCl}_3$	Ацетанилид	Фенолы 35:32:33	150
$\text{TiCl}_3$	Толуол	Крезолы 61:16:23	145
$\text{TiCl}_3$	Анизол	Метоксифенолы 54:0:46	145
$\text{TiCl}_3$	Фторбензол	Фторфенолы 2:33:65	145
$\text{TiCl}_3$	Нитробензол	Нитрофенолы 4:36:60	145
$\text{TiCl}_3$	Циклогексан	Циклогексанол + циклогексанон	151
CuCl	Толуол	Крезолы 29:29:49	145
CuCl	Анизол	Метоксифенолы 75:8:17	145
CuCl	Фторбензол	Фторфенолы 30:68:2	145
$\text{SnHPO}_4$	Толуол	Крезолы 46:38:16	145
$\text{SnHPO}_4$	Анизол	Метоксифенолы 53:20:17	145
$\text{SnHPO}_4$ — орган. растворитель	Ацетанилид	Фенолы 34:44:22	152
$\text{SnCl}_2$ — ацетонитрил	Алканы	Изомерные спирты	153
$\text{SnCl}_2$ — ацетон	Циклогексан	Циклогексанол	154
$\text{MoCl}_3$	Циклогексан	Циклогексанол	151
$\text{Mo}(\text{CO})_6$ — ацетонитрил	Нафталин	$\alpha$ -нафтол	155
То же	Бензол	Фенол	156
$\text{MoO}(\text{S}_2\text{CNR}_2)_2$	$\text{PPh}_3$	$\text{Ph}_3\text{P-O}$	157

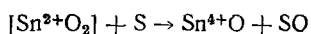
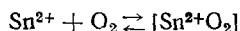
Реакции надкислот и перекисных соединений

ТАБЛИЦА 4

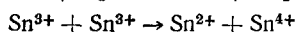
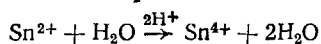
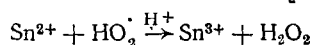
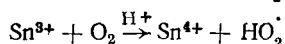
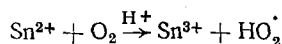
Реагент	Субстрат	Продукты и константы	Ссылки на литературу
$\text{CF}_3\text{CO}_3\text{H}$	Бензол	Фенол	158
$\text{CF}_3\text{CO}_3\text{H}$	Эфиры фенолов	Феноксифенолы	159
$\text{CF}_3\text{CO}_3\text{H}$	Анизол	Метоксифенолы, хиноны	160
$\text{CF}_3\text{CO}_3\text{H}$	Анизол	Метоксифенолы 73:0:27	161
$\text{CF}_3\text{CO}_3\text{H}$	Толуол	Крезолы 78:2:20	161
$\text{CF}_3\text{CO}_3\text{H}$	Фторбензол	Фторфенолы 17:0:83	161
$\text{CF}_3\text{CO}_3\text{H}$	Ацетанилид	Фенолы 43:1:56	56
$\text{CF}_3\text{CO}_3\text{H}$	4-D-толуол	4-метилфенол	
$\text{CF}_3\text{CO}_3\text{H}$		2-D-4-метилфенол	162
$\text{CF}_3\text{CO}_3\text{H}$	Нафталин	$K = 1,6 \cdot 10^8 \exp(-14400/RT)$	163
$\text{CF}_3\text{CO}_3\text{H}$	2-метилбутан	Смесь изомеров бутанола	15
$\text{CF}_3\text{CO}_3\text{H}$	Метилциклогексан	Смесь метилциклогексанола	15
$\text{CH}_3\text{CO}_3\text{H}$	4-Метилфенолы	Муконовые к-ты и их лактоны	164
$\text{CH}_3\text{CO}_3\text{H}$	Гексаметилбензол		165
$\text{CH}_3\text{CO}_3\text{H}$ , $\text{HCO}_3\text{H}$	Фенол	Пирокатехин — гидрохинон	166
$\text{CH}_3\text{CO}_3\text{H}$	Нафталин	$K = 6,2 \cdot 10^9 \exp(-21000/RT)$	167
$\text{CH}_3\text{CO}_3\text{H}$	Анизол	$K = 6,3 \cdot 10^8 \exp(-17000/RT)$	167
$\text{CH}_3\text{CO}_3\text{H}$	Фенол	Хиноны + муконовая к-та	168
$\text{CH}_3\text{CO}_3\text{H}$	$\alpha$ -Метоксинафталин	Муконовые кислоты	169
$\text{CH}_3\text{CO}_3\text{H}$	4-Метилфенол	<i>цис</i> , <i>транс</i> - $\beta$ -метилмуконовая кислота	170
Мета-хлор-надбензойная кислота	4-Метил-2,6-ди- <i>трет</i> -бутил-фенол		108
Автоокисляющиеся дигидроаллоксазины			171
$\text{MoO}(\text{O}_2)_2\text{L}_1\text{L}_2$	Аллиловый спирт	Глицидол	172
$\text{MoO}(\text{O}_2)_2\text{L}_1$ , где $\text{L}_1$ — гексаметапол	Аллиловый спирт	Глицидол	172
$\text{L}_2$ — вода			
$\text{MoO}(\text{O}_2)_2\text{L}_1$	Нафталин	$\alpha$ -Нафтол + хиноны	173

деление изомерных фенолов существенно отличается от распределения, характерного для радикалов  $\text{HO}^\bullet$ , генерированных разными способами: реактивом Фентона, радиолитически и т. д. (см.<sup>2</sup>). Это означает, что радикал  $\text{HO}^\bullet$  не является активной промежуточной частицей для всех исследованных систем. В ряде работ предполагалось, что в качестве атакующей частицы для систем  $\text{TiCl}_3 + \text{O}_2$  и  $\text{Sn}^{2+} + \text{O}_2$ <sup>152</sup> может выступать радикал  $\text{HO}_2^\bullet$ . Распределение изомерных фенолов для этих систем свидетельствует о том, что субстрат атакуется менее электрофильной частицей, нежели  $\text{HO}^\bullet$ , и в то же время хорошо известно, что радикал  $\text{HO}_2^\bullet$  более электрофилен, чем  $\text{HO}^\bullet$  в соответствии со значениями сродства к электрону, равными 3,04 эв для  $\text{HO}_2^\bullet$  и 2,65 эв для  $\text{HO}^\bullet$  (см.<sup>1</sup>, стр. 207). Таким образом, радикал  $\text{HO}_2^\bullet$  или не может выступать в качестве активной частицы, или выступает в состоянии менее электрофильном, чем  $\text{HO}^\bullet$ , за счет взаимодействия с растворителем (водородные связи). Следует заметить также, что активность  $\text{HO}_2^\bullet$  в отношении алифатических и ароматических субстратов много ниже, чем активность  $\text{HO}^\bullet$ <sup>2, 175</sup>. Гидроксилирующая способность радикала  $\text{HO}_2^\bullet$  по отношению к ароматическим соединениям убедительно доказана в работах одного из нас<sup>2</sup>; в то же время известно, что активность радикала  $\text{HO}^\bullet$  по отношению к индигодисульфонату на 6 порядков выше активности радикала  $\text{HO}_2^\bullet$ <sup>175</sup>.

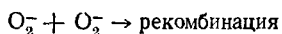
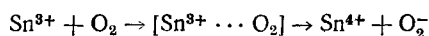
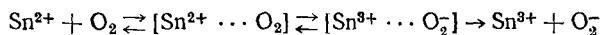
Большое значение в выборе между радикалом  $\text{HO}_2^\cdot$  и другими формами атакующей частицы имеет изучение системы  $\text{Sn}^{2+} + \text{O}_2$ . Хорошо известно, что ион  $\text{Sn}^{2+}$  может окисляться последовательно через  $\text{Sn}^{3+}$  до  $\text{Sn}^{4+}$ , а также сразу до  $\text{Sn}^{4+}$  с потерей двух электронов одновременно<sup>176</sup>. При двухэлектронном окислении  $\text{Sn}^{2+}$  кислород передается в субстрат по схеме:



Такой простой путь предложил Ульрих<sup>152</sup>. Однако доказано, что в водных растворах ион  $\text{Sn}^{2+}$  окисляется молекулярным кислородом по радикально-цепному механизму<sup>176, 177</sup>:



Радикально-цепной механизм окисления олова (II) в водных растворах подтверждается замедляющим действием ингибиторов — 5-амино-2-метил-пара-хинон-бис-пара-толилимидом, триоксалатокобальтиатом калия и др.<sup>176</sup>. Таким образом, при работе в водных растворах или водно-спиртовых и водно-ацетоновых смесях гидроксiliрующая частица может быть либо радикалом  $\text{HO}_2^\cdot$ , либо комплексом кислорода с ионом  $\text{Sn}^{2+}$  или  $\text{Sn}^{3+}$ . Для того, чтобы сделать выбор между радикалом  $\text{HO}_2^\cdot$  и комплексами кислорода с ионами олова, была исследована кинетика окисления  $\text{Sn}^{2+}$  кислородом в апротонном растворителе — ацетоне и гидроксiliрование циклогексана в этих условиях<sup>154</sup>. Радикал  $\text{HO}_2^\cdot$  при окислении  $\text{Sn}^{2+}$  в ацетоне не может образоваться, значит циклогексан гидроксiliруется комплексами олова с кислородом, так как ион-радикал  $\text{O}_2^-$ , образующийся при переносе одного электрона с иона олова на кислород, гидроксiliрующей способностью не обладает. Стехиометрия реакции  $\text{Sn}^{2+}$  с кислородом в ацетоне равна 1 : 2, т. е. один ион  $\text{Sn}^{2+}$  окисляет две молекулы кислорода, а значит одновременный перенос двух электронов с иона олова (II) на кислород, как это предполагается Ульрихом, невозможен. Ион  $\text{Sn}^{2+}$  окисляется кислородом в две ступени:

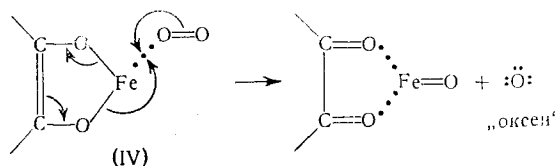


Такая схема окисления  $\text{Sn}^{2+}$  в ацетоне подтверждается экспериментально полученной стехиометрией реакции, а также высоким значением константы скорости рекомбинации ион-радикалов  $\text{O}_2^-$ , равной 100 л/моль·сек при 25°<sup>178</sup>. В апротонных средах, как правило, ион  $\text{O}_2^{2-}$  не образуется, так как он устойчив лишь в водных растворах и в кристаллах<sup>179</sup>. Гидроксiliрующей способностью в апротонной среде могут обладать комплексы олова с кислородом:  $[\text{Sn}^{2+} \dots \text{O}_2]$ ,  $[\text{Sn}^{3+} \dots \text{O}_2^-]$  или  $[\text{Sn}^{3+} \dots \text{O}_2]$ . Сделать выбор между этими тремя формами активированного кислорода трудно; ясно лишь, что активированный кислород в

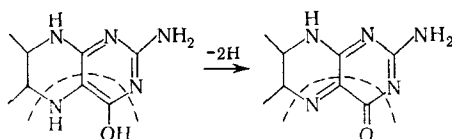
комплексе носит радикальный характер, так как гидроксилирование циклогексана в ацетоне тормозится добавлением ингибиторов радикальных реакций.

Важно отметить, что в случае других систем, например  $\text{Fe}^{2+}$  — ЭДТА —  $\text{O}_2$ <sup>145</sup>, надежно установлено непосредственное участие иона металла в гидроксилировании и его влияние на распределение изомеров при гидроксилировании ароматических соединений, что позволило авторам работы<sup>145</sup> говорить о гидроксилирующей способности комплекса  $[\text{Fe}^{2+} \dots \text{O}_2]$ . Сравнение распределения изомеров для одного и того же субстрата, например толуола, полученное в системах  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Sn}^{2+}$ ,  $\text{Ti}^{3+}$ ,  $\text{Cu}^+$  с кислородом, показывает, что изомерный состав крезолов сильно зависит от иона металла<sup>145</sup>. Если бы в качестве гидроксилирующей частицы выступал радикал  $\text{HO}^\bullet$ , образующийся при окислении всех перечисленных ионов в водных растворах, то природа катиона не влияла бы на распределение изомеров; следовательно, гидроксилирующая частица является комплексом катиона металла с кислородом, который характеризуется изменением электрофильности при переходе от одного металла к другому. Различная электрофильность частиц, атакующих субстрат, обуславливает разницу в распределении изомеров. При больших концентрациях ионов распределение изомеров становится статистическим — орто : мета : пара = 40 : 40 : 20, что связано, по-видимому, с изменением механизма гидроксилирования<sup>145</sup>.

Очень важно, каким образом атом кислорода из комплекса с ионом металла переносится на субстрат. Гамильтон обратил внимание на тот факт, что большинство реакций, катализируемых монооксигеназами и некоторыми их моделями, аналогичны реакциям карбенов  $\text{CR}_2$  и нитренов  $\text{NR}$ , имеющих по 6 электронов вокруг углерода или азота и являющихся очень реакционноспособными соединениями. Карбены внедряются по  $\text{C}-\text{H}$ -связям алифатических и ароматических соединений, присоединяются к олефинам, давая циклопарафины<sup>138, 143, 180</sup>. Такого же типа реакции осуществляются монооксигеназами и их моделями. Аналогом карбена или нитрена может быть атом кислорода, имеющий шесть электронов на внешней оболочке. Однако в ферментативных процессах атом кислорода не может быть генерирован. Поэтому Гамильтон предположил, что атом кислорода передается в субстрат из оксеноидного комплекса, названного так по аналогии с карбеноидами, содержащими связанный карбен, передаваемый субстрату в переходном состоянии. Молекула кислорода образует оксеноид при взаимодействии с комплексом иона  $\text{Fe}^{2+}$  и редокс-активных лигандов, таких как аскорбиновая кислота, тетрагидроптеридин и др.:

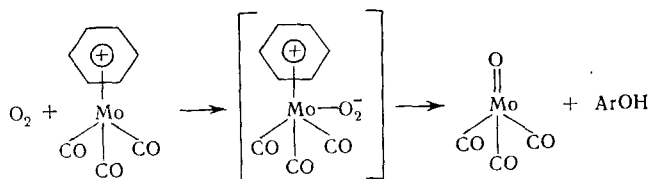


Комплекс, подобный IV, может образоваться из тетрагидроптеридина при участии атомов, отмеченных пунктиром<sup>138</sup>:



Функция иона  $\text{Fe}^{2+}$  в комплексе (IV) состоит в том, чтобы, соединившись в переходном состоянии с восстанавливающим агентом и кислородом, передать последнему электроны. В этом комплексе (IV), вероятно, становится возможной передача синглетного атома кислорода из связанной молекулы  $\text{O}_2$  в субстрат таким образом, что радикальных промежуточных соединений не образуется. Передача триплетного атома кислорода в субстрат энергетически менее выгодна, так как в этом случае образовался бы триплетный продукт  $\text{SO}$ , менее устойчивый, чем синглетный. Предложенный Гамильтоном оксеноидный механизм передачи кислорода в субстрат хорошо объясняет способность монооксигеназ катализировать реакции гидроксирования и эпексидирования. Оксеноидный комплекс в зависимости от природы металла и лиганда может характеризоваться разной степенью электрофильности. Более того, этот комплекс, атакующий субстрат, может носить радикальный характер или даже быть нуклеофильным. Такое свойство оксеноидного комплекса делает понятным разное распределение изомеров и разное ориентирующее влияние заместителей в бензольном ядре при гидроксировании ароматических субстратов. В отдельных случаях на основании модельных опытов можно судить об электрофильности активного центра ферментных систем, передающих кислород на ароматический субстрат. Так, при микросомальном гидроксировании толуола образуются изомеры крезол в соотношении 59 : 13 : 28, что практически совпадает с распределением изомеров, полученным при гидроксировании толуола системой:  $\text{Fe}^{2+}$  + тиосалициловая кислота +  $\text{O}_2$  <sup>144</sup>. Это дает возможность полагать, что активный центр микросомальной гидроксильющей системы — цитохром P-450 образует с молекулярным кислородом комплекс, действующий на субстрат как электрофильный агент средней силы. Гидроксирование толуола таким сильным электрофильным агентом, как трифторнадуксусная кислота, дает распределение крезолов 78 : 2 : 20 <sup>161</sup>. Следовательно, комплекс, атакующий субстрат в микросомальной гидроксильющей системе, обладает меньшей электрофильностью, чем трифторнадуксусная кислота, осуществляющая ту же реакцию.

Недавно исследована реакция, в ходе которой на одном активном центре — атоме молибдена — происходит одновременная активация и окисляемого субстрата (бензол, нафталин или 2-метилнафталин), и молекулярного кислорода <sup>155, 156</sup>. Перечисленные ароматические соединения не окисляются молекулярным кислородом не только в физиологических условиях, но и при довольно высоких температурах. Однако в присутствии комплекса молибдена с окисью углерода —  $\text{Mo}(\text{CO})_6$  — в ацетонитриле при 70—80° происходит окисление ароматических соединений с образованием фенолов и нафтолов. Как известно, арены образуют с  $\text{Mo}(\text{CO})_6$  арентрикарбонильные комплексы  $\text{ArHMo}(\text{CO})_3$ , в которых, так же как и в самом гексакарбониле молибдена, металл находится в нульвалентном состоянии. Атом молибдена способен присоединить молекулу кислорода и передать ей один или несколько электронов, т. е. активировать молекулярный кислород. В то же время ароматический лиганд в арентрикарбонильном комплексе несет эффективный положительный заряд, в отличие от несвязанного в комплексе арена, т. е. становится способным к реакциям нуклеофильного замещения. Таким образом, ставший более электрофильным арен атакуется кислородом; при этом связанный в комплекс кислород обладает большей нуклеофильностью, чем свободный молекулярный кислород:



Можно предположить, что акт передачи атома кислорода в ароматическую молекулу происходит по «оксеноидному» механизму Гамильтона с промежуточным образованием энергетически неустойчивого аренэпоксида, изомеризирующегося в фенол. Изучение кинетики гидроксирования ароматических соединений в системе  $\text{Mo}(\text{CO})_6-\text{O}_2$  показало прямое участие кислорода в реакции: скорость накопления фенолов оказалась прямо пропорциональной парциальному давлению кислорода в системе. Образованию фенолов из всех субстратов предшествует образование арентрикарбонильного комплекса  $\text{ArHMo}(\text{CO})_3$ , которое в случае нафталина лимитирует скорость всего процесса. Система  $\text{ArH}-\text{Mo}(\text{CO})_6-\text{O}_2$  по типу действия напоминает «внутренние» монооксигеназы, так как атом кислорода, не внедряемый в субстрат, стабилизируется металлом, который в результате реакции окисляется. К сожалению, различие в реакционной способности исследованных ароматических молекул в этой системе нельзя использовать для выводов о характере атакующей частицы, поскольку для разных субстратов в сложной последовательности реакций лимитирующими являются различные стадии процесса.

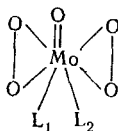
Недавно было показано, что надкислоты способны к реакциям переноса кислорода, характерным для монооксигеназ<sup>13, 108</sup>. В ряде случаев<sup>108, 167</sup> совершенно одинаков характер продуктов образующихся из одних и тех же субстратов, как при реакциях надкислоты, так и при микросомальном или микробиологическом окислении. Так, при микросомальном окислении 4-метил-2,6-ди-*трет*-бутил-фенола и при его реакции с метаклор-надбензойной кислотой образуются совершенно идентичные продукты. При окислении нафталина надуксусной кислотой<sup>167</sup> последовательность превращений первого совершенно аналогична микробиологической трансформации нафталина пятью различными видами микроорганизмов<sup>181</sup>. Как уже отмечалось, часть монооксигеназ не содержит ионов металлов и активирует кислород, образуя промежуточные соединения с флавиновыми компонентами гидроксилирующей системы. Эти промежуточные соединения являются, по существу, гидроперекисями<sup>89-91, 129</sup>. Поэтому надкислоты и некоторые перекисные соединения могут имитировать перенос кислорода в субстрат, характерный для монооксигеназ<sup>108, 158-170, 171, 173</sup> (см. табл. 4). Очень важно сопоставить скорости переноса кислорода надкислотами и перекисными производными флавопротеидов. Для этого необходимо знать константы скорости взаимодействия надкислот с различными субстратами. Реакции надкислот с олефинами охарактеризованы количественно<sup>174</sup>, но в случае реакций надкислот с ароматическими и алифатическими соединениями до недавнего времени не было измерено ни одной константы скорости. Лишь недавно определены величины констант скорости надуксусной кислоты с нафталином и анизолом<sup>163, 167</sup>. Эти константы скорости определены в присутствии смеси уксусной кислоты с дихлорэтаном или хлористым метилом. Энергии активации надуксусной кислоты с ароматическими соединениями выше, чем в реакции Прилежаева, что хорошо согласуется с увеличением нуклеофильности при переходе от арена к олефинам. Реакция надкислот с ароматическими соединениями, так же как и с олефинами, протекает как бимолекулярное взаимодействие

электрофильной молекулы надкислоты с нуклеофильной молекулой ароматического соединения. Промежуточный комплекс надкислоты с ароматическими молекулами обнаружить не удастся<sup>163, 167</sup>. Такого рода комплекс был кинетически доказан при реакции надуксусной кислоты с пропиленом<sup>182</sup>.

Константы скорости бимолекулярной реакции надкислот с ароматическими соединениями показывают, что перенос атома кислорода от надкислоты в субстрат происходит довольно быстро: так, при комнатной температуре (20°) константа скорости взаимодействия трифторнадуксусной кислоты с нафталином составляет  $10^{-3}$  л/моль·сек<sup>163</sup>, а молекула  $\alpha$ -нафтола при той же температуре реагирует с надуксусной кислотой с константой скорости  $\sim 0,33$  л/моль·сек<sup>163</sup>. Примерно такие же скорости наблюдаются при взаимодействии гидроперекисных производных флавиновой части пара-окси-бензоат-гидроксилазы с 2,4-диоксибензоатом<sup>90, 91</sup>.

Сходство с монооксигеназами, не имеющими иона металла, в действии на гидроксилируемые субстраты обнаруживают автоокисляющиеся дигидроаллоксазины<sup>171</sup>, при взаимодействии которых с кислородом образуются гидроперекисные производные.

Недавно для моделирования переноса кислорода монооксигеназами были использованы пероксокомплексы шестивалентного молибдена, открытые в лаборатории Сажо<sup>183</sup>:



где  $L_1$  и  $L_2$  — лиганды<sup>172, 173</sup>.

Изучение кинетики взаимодействия с аллиловым спиртом в среде дихлорэтана пероксокомплексов с двумя лигандами ( $L_1$  — гексаметапол,  $L_2$  —  $H_2O$ ) и с одним лигандом  $L_1$  показало, что оба комплекса образуют промежуточное соединение с субстратом, которое распадается с образованием глицидола. Одна молекула пероксокомплекса эпоксирует две молекулы аллилового спирта. При 50° определены константы скорости  $k_2^*$  распада промежуточного комплекса аллилового спирта с пероксокомплексами и значения констант Михаэлиса — Ментен.

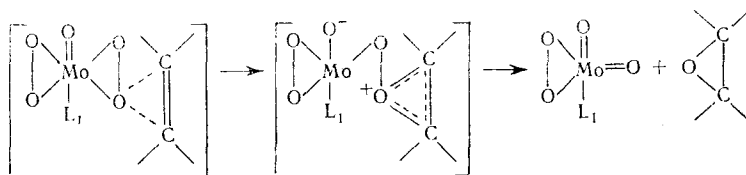
$$K_m = \frac{k_{-1} + k_2^*}{k_1}$$

где  $k_1$  и  $k_{-1}$  — константы скорости образования и диссоциации промежуточного соединения пероксокомплексов с аллиловым спиртом. Ниже приведены значения полученных нами при 50° констант для обоих комплексов:

	$K_m$ , моль/л	$k_2^*$ , сек <sup>-1</sup>
$MoO(O_2)_2 L_1$	0,81	$9,71 \cdot 10^{-4}$
$Mo(O_2)_2 L_1 L_2$	0,78	$4,17 \cdot 10^{-4}$

Для комплекса с одним лигандом  $L_1$  получены активационные параметры из значения констант  $k_2 = 2,4 \cdot 10^9 \exp(-18300/RT)$ : энтальпия активации  $\Delta H^\ddagger = 17,7$  ккал/моль, энтропия активации  $\Delta S^\ddagger = -18,0$  кал/моль·град<sup>172</sup>. На основании полученных для обоих комплексов количественных характеристик, мало отличающихся между собой, а также учитывая пространственные препятствия для непосредственного уча-

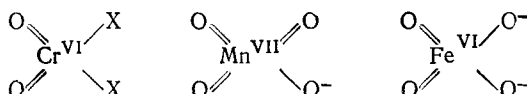
ствия атома молибдена во взаимодействии с субстратом, предложен механизм реакции эпексидирования аллилового спирта пероксокомплексами молибдена:



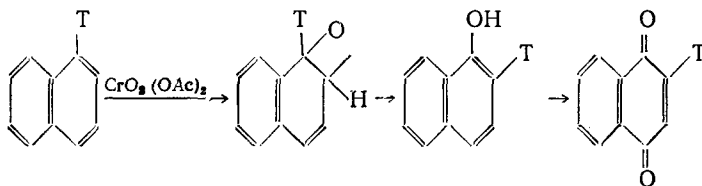
Существенная черта этого механизма — участие перекисного атома кислорода в комплексообразовании с аллиловым спиртом и отсутствие прямого участия атома молибдена в процессе комплексообразования, которое предположили французские авторы в работе <sup>184</sup>. В пользу первого механизма свидетельствуют близкие величины констант скорости и  $K_m$  для комплекса с одним и с двумя лигандами, а также хорошее согласие активационных параметров лимитирующей стадии реакции с энергетическими характеристиками эпексидирования аллилового спирта другими перекисными агентами, образующими комплекс по перекисному кислороду (см. <sup>174</sup>, стр. 1761).

Можно предположить, как это сделано в приведенной выше схеме реакции, что перенос атома кислорода в молекулу аллилового спирта происходит по «оксеноидному» механизму. В пользу электрофильности эпексидирующей частицы свидетельствует способность пероксокомплекса  $\text{MoO}(\text{O}_2)_2\text{L}_1$  гидроксильровать нафталин с образованием  $\alpha$ -нафтола <sup>173</sup>. Реакция гидроксильрования нафталина пероксокомплексом проведена при 70° в дихлорэтано.  $\alpha$ -Нафтол является промежуточным продуктом и вступает в дальнейшие превращения с пероксокомплексом.

Группа американских исследователей подчеркивает сходство в переносе кислорода монооксигеназами и рядом оксо-соединений металлов переменной валентности <sup>185</sup>:

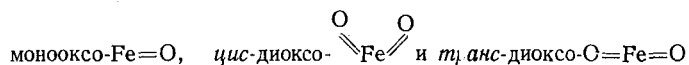


где  $\text{X} = \text{OH}$ ,  $\text{Cl}$ ,  $\text{OAc}$ . Действительно, хромилацетат ( $\text{X} = \text{OAc}$ ) эпексидирует олефины,  $\text{KMnO}_4$  гидроксильрует углеводороды <sup>186</sup>, а  $\text{O}_2\text{Cr}(\text{OAc})\text{Cl}$  вступает и в ту, и в другую реакцию; оксо-соединения свинца  $\text{Pb}(\text{OAc})_{4-n}(\text{N}_3)_n$  используются как средство оксигенирования стероида андроста-4,9(II)-диен-3,17-диона, который эпексидируется и гидроксильруется одновременно <sup>187</sup>. Хорошо известно также, что при гетерогенном катализе активность контакта в реакции окисления связывается с наличием связи  $\text{M}=\text{O}$  <sup>188</sup>. Замечательна особенность переноса кислорода таким оксо-соединением, как  $\text{O}_2\text{Cr}(\text{OAc})_2$ , которое способно при гидроксильровании ароматических замещенных субстратов вызывать миграцию группы из гидроксильруемого положения в соседнее <sup>185</sup>:





Такого рода миграция заместителя в ароматическом кольце, очень характерна для действия монооксигеназ<sup>189</sup>, и происходит при гидроксировании ароматических соединений трифторнадуксусной кислотой<sup>162</sup>. При микросомальном окислении ароматических соединений показано промежуточное образование окисей аренов, без чего нельзя объяснить миграцию заместителей в ароматических соединениях<sup>162, 189–191</sup>. Таким образом, оксосоединения переходных металлов имитируют важную особенность действия монооксигеназ. Это обстоятельство навело на мысль, что и во многих других случаях частица, переносящая кислород в субстрат, имеет оксо-группу<sup>185</sup> и, например, для иона железа предполагаются следующие кислородпереносящие структуры:



Однако такое предположение не всегда подтверждается практикой. Кислородпереносящий пероксокомплекс молибдена  $\text{MoO}(\text{O}_2)_2\text{L}_1$ , где  $\text{L}_1$  — гексаметапол, имеет две пероксогруппы и одну оксо-группу. Использование в реакции эпексидирования комплекса, меченного изотопом  $^{18}\text{O}$  по оксо-группе, показало, что образующийся эпексид не содержит изотопов  $^{18}\text{O}$ , т. е. оксо-группа комплекса  $\text{Mo}^{\text{VI}}$  в переносе кислорода не участвует<sup>192</sup>. Таким образом, оксо-форма связи металла с кислородом не является универсальной для всех кислородпереносящих частиц.

Все реакции, обсуждавшиеся в этом разделе, в определенной степени имитируют перенос монооксигеназами атома кислорода в субстрат. Однако системы, генерирующие свободные радикалы, никак не могут считаться модельными, так как активные свободные радикалы несовместимы с живой клеткой. В окислительных биохимических процессах возможно участие не свободных радикалов, а их комплексов с ионами металлов переменной валентности, например, комплексов радикалов  $\text{HO}^\bullet$  и  $\text{HO}_2^\bullet$  с ионами трехвалентного железа. Изучение моделей, включающих ион или комплекс металла и кислород, показывает, что наиболее вероятной атакующей частицей в этом случае является комплекс металла с кислородом. Это обстоятельство весьма примечательно, так как в настоящее время убедительно доказано комплексообразование кислорода и активного центра монооксигеназ — цитохрома Р-450. Физическими методами показано, что цитохром связывает молекулу кислорода путем комплексообразования последней с ионом железа в восстановленном состоянии.

При изучении модельных систем ( $\text{Fe}^{2+} + \text{O}_2$ ,  $\text{Sn}^{2+} + \text{O}_2$ ) получено много данных, свидетельствующих в пользу гидроксирования субстратов комплексами этих ионов с кислородом: участие иона металла в гидроксировании, влияние иона металла на распределение изомеров при гидроксировании ароматических субстратов, отсутствие влияния на реакцию добавляемой перекиси водорода, осуществление одной и той же системой реакций гидроксирования аренов и эпексидирования олефинов, исключаяющее радикал  $\text{OH}^\bullet$  как атакующий агент, гидроксирование субстратов в апротонных средах, где образование  $\text{HO}_2^\bullet$  исключено, и другие факты.

Наиболее вероятным и универсальным механизмом переноса атома кислорода в субстрат представляется предложенный Гамильтоном «оксеноидный» механизм, позволяющий удовлетворительно объяснить все экспериментальные данные, полученные для модельных реакций и систем. Оксеноидный способ передачи атома кислорода, по всей вероятности, характерен и для перекисных соединений, таких как надкислоты и пероксокомплексы металлов. Эти соединения хорошо имитируют пе-

ренос кислорода монооксигеназами, имеющими флавиновую группировку в активном центре. Надкислоты, так же как и монооксигеназы, при реакции с ароматическими субстратами вызывают миграцию заместителя в ядре из положения, в которое внедряется кислород, в соседнее.

Интенсивное изучение реакций монооксигеназ, выделение и очистка этой группы ферментов, исследование структуры и функций составных частей сложной ферментной системы, широкое использование физических методов в изучении состояния ионов металла в активном центре — все это позволило во многих случаях с большой определенностью говорить о механизме действия этих ферментных систем. Очень важную роль в обосновании обсуждаемых в данной статье механизмов сыграли исследования предстационарной и стационарной кинетики реакций различных монооксигеназ. Однако даже такое фронтальное наступление исследователей, работающих в этой области, не дало возможности раскрыть до конца механизм активации молекулярного кислорода. В выяснении отдельных черт этого механизма большую роль играет не только изучение действия самих монооксигеназ, но и детальное изучение модельных систем. Исследование моделей позволит выяснить структуру частиц, переносящих кислород на субстрат, и возможно, укажет пути химической активации кислорода при физиологических условиях. Сегодня выходы продуктов реакции, получаемые с помощью модельных систем, еще довольно низки, однако найдены системы, позволяющие следить за кинетикой накопления продуктов реакции и за валентными превращениями ионов металлов, играющих ведущую роль в этих системах.

Практическая ценность ферментов-монооксигеназ очень велика для самых разных областей токсикологии, фармакологии, онкологии. В последнее время получены результаты, грозящие переворотом в синтезе некоторых физиологически активных веществ. Так, недавно осуществлена двухступенчатая трансформация доступного вещества «S» Рейхштейна в преднизолон с помощью  $11\beta$ -гидроксилазы и  $\Delta^1-2$ -дегидрогеназы<sup>193</sup>. Это превращение осуществлено с помощью ферментов, фиксированных на гелевых матрицах, и помещенных в две колонны, соединенные последовательно. В первой из колонн происходит гидроксилирование вещества «S» в кортизол, а во второй кортизол дегидрируется до преднизолона. Можно надеяться, что число примеров подобной трансформации с помощью ферментов-монооксигеназ будет увеличиваться.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. В. И. Веденеев, Л. В. Гурвич, В. Н. Кондратьев, В. А. Медведев, Е. Л. Франкевич, Энергии разрыва химических связей, изд. АН СССР, М., 1962.
2. Д. И. Метелица, Усп. химии, 40, 1175 (1971).
3. В. И. Карбан, Р. В. Кучер, Н. И. Мироненко, Там же, 38, 539 (1969).
4. Т. М. Маслова, Л. М. Райхман, В. П. Скулачев, Усп. соврем. биологии, 67, 400 (1969).
5. Г. К. Скрябин, Е. Л. Головлев, ЖВХО им. Д. И. Менделеева, 17, 488 (1972).
6. С. А. Конавалов, В. И. Максимов, Там же, 17, 538 (1972).
7. V. Treccani, Progr. Ind. Microbiol., 42, 2 (1964).
8. А. А. Ахрем, Ю. А. Титов, Микробиологические трансформации стероидов, «Наука», М., 1965.
9. А. А. Ахрем, Ю. А. Титов, Стероиды и микроорганизмы, «Наука», М., 1970.
10. H. S. Mason, Adv. in Enzymology., 19, 128 (1957).
11. H. S. Mason, Ann. Rev. Biochem., 34, 595 (1965).
12. O. Hayaishi, Ann. Rev. Biochem., 38, 21 (1969).
13. O. Hayaishi, Ann. N. Y. Acad. Sci., 158, 318 (1969).
14. O. Hayaishi, Y. Ishimura, T. Nakazawa, M. Nozaki, Biochemie des Sauerstoffe, Springer-Verlag, Berlin, 1968, стр. 196.
15. V. Ulrich, Angew. Chemie, 84, 689 (1972).

16. Г. Малер, Ю. Кордес, Основы биологической химии, «Мир», М., 1970, стр. 368—399.
17. Ж.-П. Вандекастель, Кинетика и катализ, 14, 123 (1973).
18. H. Takeda, S. Yamamoto, Y. Koyima, O. Hayaishi, J. Biol. Chem., 244, 2935 (1969).
19. W. B. Sutton, J. Biol. Chem., 226, 395 (1957).
20. T. Kosuge, Methods in Enzymology, Academic Press, N.—Y., London, 1970, стр. 446.
21. A. Olomucki, D. B. Pho, R. Lebar, L. Delcambre, N. V. Thoai, Biochim. biophys. acta, 151, 353 (1968).
22. J. Gillette, Adv. Pharmacol., 4, 220 (1966).
23. M. Johnson, Science, 155, 1515 (1967).
24. A. Humphrey, Biotechnol. and Bioengineering, 9, 3 (1967).
25. L. Wattenberg, I. Leong, P. Strand, Cancer Res., 22, 1120 (1962).
26. G. Dutton, J. Stevenson, Biochim. biophys. acta, 158, 633 (1962).
27. H. Gelburn, N. Blackburn, Cancer Res., 24, 356 (1964).
28. J. Willet, K. Sharpless, K. Lord, E. van Tamelen, R. Clayton, J. Biol. Chem., 242, 4181 (1967).
29. T. Scallen, W. Dean, M. Schyster, Там же, 243, 5202 (1968).
30. M. L. Sweat, M. D. Lipscomb, J. Am. Chem. Soc., 77, 5185 (1955).
31. T. Omura, E. Sanders, R. W. Estabrook, D. Y. Cooper, O. Rosenthal, Arch. Biochem. Biophys., 117, 660 (1966).
32. W. Cammer, D. Y. Cooper, R. W. Estabrook, в книге K. W. McKerns, Function of the Adrenal Cortex. N.—Y., 1968.
33. K. J. Ryan, L. L. Engel, J. Biol. Chem., 225, 103 (1957).
34. D. Y. Cooper, S. Narashimulu, O. Rosenthal, см.<sup>32</sup>.
35. E. R. Simpson, G. S. Boyd, Biochem. Biophys. Res. Commun., 24, 10 (1966).
36. E. R. Simpson, G. S. Boyd, Там же, 28, 945 (1967).
37. A. H. Conney, A. Klutch, J. Biol. Chem., 238, 1611 (1963).
38. B. P. Lisboa, J.-A. Gustafsson, Eur. J. Biochem., 6, 419 (1968).
39. K. Leybold, H. Staudinger, Biochem. Ztschr., 331, 399 (1959).
40. R. Abraham, H. Staudinger, Hoppe-Seyler's Ztschr. physiol. Chem., 346, 198 (1966).
41. H. Okamoto, O. Hayashi, Biochem. Biophys. Res. Commun., 29, 394 (1967).
42. U. Horn, V. Ulrich, H. Staudinger, цит. по<sup>15</sup>.
43. S. Friedman, S. Kaufman, J. Biol. Chem., 240, 763 (1965).
44. M. Goldstein, T. H. Joh, T. Q. Garvey, Biochemistry, 7, 2724 (1968).
45. B. N. La Du, V. G. Zannoni, Nature, 177, 574 (1956).
46. B. N. La Du, V. G. Zannoni, J. Biol. Chem., 217, 777 (1955).
47. S. Kaufman, Там же, 234, 2677 (1959).
48. S. Kaufman, O. Hayaishi, Oxygenases, Academic Press, N.—Y., 1962, стр. 129.
49. S. Udenfriend, Science, 152, 1335 (1966).
50. B. Peterkowsky, S. Udenfriend, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 53, 335 (1963).
51. R. Tenhunen, H. S. Marver, R. Schmidt, J. Biol. Chem., 244, 6388 (1969).
52. B. Preiss, K. Bloch, Там же, 239, 85 (1964).
53. M. L. Das, S. Orrenius, L. Eruster, Eur. J. Biochem., 4, 519 (1968).
54. A. Y. H. Lu, M. J. Coon, J. Biol. Chem., 239, 1331 (1968).
55. C. Mitoma, H. S. Posner, H. S. Reitz, S. Udenfriend, Arch. Biochem. Biophys., 61, 431 (1956).
56. V. Ulrich, J. Wof, E. Amadori, H. Staudinger, Hoppe-Seyler's Ztschr. physiol. Chem., 349, 85 (1968).
57. H. Diehl, S. Capalna, V. Ulrich, FEBS — Letters, 4, 99 (1969).
58. U. Frommer, V. Ulrich, H. Staudinger, Hoppe-Seyler's Ztschr. physiol. Chem., 351, 903 (1970).
59. K. Ichichara, E. Kusunose, M. Kusunose, Biochem. biophys. acta, 176, 713 (1969).
60. N. Higashi, H. Shoun, K. Yano, K. Arima, K. Hiromi, Naturforsch., 27b, 1172 (1972).
61. N. Katagiri, B. Gauguli, J. Gunsalus, J. Biol. Chem., 243, 3543 (1968).
62. C. A. Yu, J. Gunsalus, Biochem. Biophys. Res. Commun., 40, 1431 (1970).
63. В. З. Горкин, ЖВХО им. Д. И. Менделеева, 16, 454 (1971).
64. T. Nagatsu, M. Levitt, S. Udenfriend, J. Biol. Chem., 239, 2910 (1964).
65. R. H. Roth, M. Boadle, J. Hyghes, Experientia, 26, 494 (1970).
66. R. A. Muller, H. Thoenen, J. Axelrood, Science, 163, 468 (1969).
67. D. G. Grahame-Smith, Biochem. Biophys. Res. Commun., 16, 568 (1964).
68. A. Nakamura, A. Ichiyama, O. Hayaishi, Feder. Proc., 24, 604 (1965).
69. S. Concolo, S. Carattini, R. Chietmetti, P. Morselli, L. Valzelli, Life Sci., 4, 625 (1965).
70. E. M. Gal, J. C. Armstrong, B. Ginsberg, J. Neurochem., 13, 643 (1966).
71. A. Ichiyama, S. Nakamura, Y. Nishizuka, O. Hayaishi, J. Biol. Chem., 245, 1699 (1970).
72. D. Eccleston, J. M. Ritchie, M. H. T. Roberts, Nature, 226, 84 (1970).
73. H. Yasada, K. Suzuki, S. Takemori, M. Katagiri, Biochem. Biophys. Res. Commun., 28, 135 (1967).
74. B. Hesp, M. Calvin, K. Hosokawa, J. Biol. Chem., 244, 5644 (1969).
75. S. Yamamoto, K. Bloch, Там же, 245, 1670 (1970).
76. C. A. Yu, J. C. Gunsalus, Там же, 244, 6149 (1969).

77. L. Nover, *Die Pharmazie*, 24, 361 (1969).
78. C. Tamm, *Angew. Chem.*, 74, 225 (1962).
79. D. H. Peterson, *Proc. IV Intern. Congr. Biochem.*, vol. IV, Vienna, 1958, стр. 83.
80. P. И. Дорфман, Труды V Междунар. биохим. конгресса, VII, М., 1961, стр. 38.
81. K. Robbins, *Arch. Biochem. Biophys.*, 123, 531 (1968).
82. M. Coon, *J. Biol. Chem.*, 243, 1331 (1968).
83. K. Ichichara, E. Kusunose, M. Kusunose, *Biochem. biophys. acta*, 176, 704 (1969).
84. T. Yeda, M. J. Coon, *J. Biol. Chem.*, 247, 5010 (1972).
85. H. V. Gellboin, *Biochem. J.*, 125, 4P (1972).
86. S. Yamamoto, H. Takeda, Y. Maki, O. Hayaishi, *Biological and Chemical Aspects of Oxygenases*, Tokio, 1966, стр. 303.
87. H. Okamoto, *Methods in Enzymology*, Academic Press, N.—Y., London, 1970, стр. 460.
88. S. Yamamoto, F. Hirata, T. Yamauchi, M. Nozaki, K. Hiromi, O. Hayaishi, *J. Biol. Chem.*, 246, 5540 (1971).
89. N. Higashi, H. Shoun, K. Yano, K. Arima, K. Hiromi, *Naturforsch.*, 27b, 1172 (1972).
90. T. Spector, V. Massey, *J. Biol. Chem.*, 247, 5632 (1972).
91. T. Spector, V. Massey, Там же, 247, 7123 (1972).
92. S. Takemori, M. Nakamura, K. Suzuki, M. Katagiri, T. Nakamura, *Biochem. biophys. acta*, 284, 382 (1972).
93. V. Ulrich, F.-H. Bernhardt, H. Diehl, N. Erdin, H. H. Ruf, *Naturforsch.*, 27b, 1067 (1972).
94. D. Kertesz, R. Zito, *Oxygenases*, Academic Press, N.—Y., 1962, стр. 307.
95. H. Hörtnagl, H. Winkler, H. Lochs, *Biochem. J.*, 129, 187 (1972).
96. S. Kaufman, D. Fisher, *J. Biol. Chem.*, 245, 4745 (1970).
97. S. Kaufman, *Adv. Enzymol.*, 35, 245 (1971).
98. D. Fisher, R. Kirkwood, S. Kaufman, *J. Biol. Chem.*, 247, 5161 (1972).
99. P. A. Friedman, *Biochim. biophys. acta*, 293, 56 (1973).
100. J. M. Connellan, D. M. Danks, Там же, 293, 48 (1973).
101. T. Omura, R. Sato, *J. Biol. Chem.*, 239, 2370 (1964).
102. R. W. Estabrook, J. Baron, J. Peterson, Y. Ishimura, *Biochem. J.*, 125, 3P (1972).
103. R. W. Estabrook, A. Heidelbrandt, J. Baron, K. Netter, K. Leibman, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 42, 132 (1971).
104. F. De Matteis, R. G. Soarks, *FEBS Letters*, 29, 141 (1973).
105. R. H. Menard, J. L. Purvis, *Arch. Biochem. Biophys.*, 154, 8 (1973).
106. A. Y. H. Lu, M. Jacobson, W. Levin, S. West, R. Kuntzman, Там же, 153, 294 (1972).
107. S. West, A. Y. H. Lu, Там же, 153, 298 (1972).
108. Y.-S. Shaw, C. Chen, *Biochem. J.*, 128, 1285 (1972).
109. Л. М. Райхман, В. С. Белова, М. Р. Борукаева, Г. И. Лихтенштейн, *Биохимия*, 36, 674 (1971).
110. Л. М. Райхман, Б. Аннаев, А. Б. Шапиро, Э. Г. Розанцев, Там же, 37, 548 (1972).
111. Л. М. Райхман, Б. Аннаев, О. Н. Мамедниязов, Э. Г. Розанцев, *Биофизика*, 18, 228 (1973).
112. Л. М. Райхман, Б. Аннаев, В. С. Белова, М. Р. Борукаева, *Молек. биол.*, 7, 399 (1973).
113. D. Y. Cooper, H. Schleyer, O. Rosenthal, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 174, 205 (1970).
114. H. Schleyer, D. Y. Cooper, O. Rosenthal, *J. Biol. Chem.*, 247, 6103 (1972).
115. H. Schleyer, D. Y. Cooper, S. S. Lewin, O. Rosenthal, *Biochem. J.*, 125, 8P (1972).
116. G. S. Boyd, A. C. Browne, C. R. Jefcoate, E. R. Simpson, Там же, 125, 1P (1972).
117. J. J. Huang, T. Kimura, *Biochemistry*, 12, 406 (1973).
118. Y. Ishimura, V. Ulrich, J. A. Peterson, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 42, 140 (1971).
119. J. C. Gunsalus, J. D. Lipscomb, V. Marshall, H. Frauenfelder, E. Münck, E. Greenbaum, *Biochem. J.*, 125, 5P (1972).
120. P. Rösen, A. Stier, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 51, 603 (1973).
121. M. Sharrock, E. Münck, P. G. Debrunner, V. Marshall, J. D. Lipscomb, G. C. Gunsalus, *Biochemistry*, 12, 258 (1973).
122. R. Mason, J. A. Zubietta, *Angew. Chem.*, 85, 390 (1973).
123. J. A. Peterson, B. Griffin, *Fed. Proc.*, 30, 1143 (1971).
124. C. A. Yu, J. C. Gunsalus, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 40, 143 (1970).
125. G. G. Hammes, R. E. Cathon, *J. Am. Chem. Soc.*, 86, 3240 (1964).
126. B. H. Harsteen, *J. Biol. Chem.*, 242, 769 (1967).
127. J. Eckfeldt, G. G. Hammes, S. C. Mahr, *Biochemistry*, 9, 3353 (1970).
128. E. Holler, J. A. Ruply, G. P. Heiss, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 37, 423 (1969).
129. M. Yamasaki, T. Yamano, Там же, 51, 612 (1973).
130. А. И. Арчаков, *Усп. соврем. биологии*, 71, 163 (1971).
131. А. И. Арчаков, В. М. Девиченский, И. И. Карузина, *ДАН*, 209, 973 (1973).
132. В. Дженкс, Катализ в химии и энзимологии, «Мир», М., 1972, стр. 13—14.
133. В. Лангенбек, Органические катализаторы, М., 1961.
134. Л. А. Николаев, Биокатализаторы и их модели, «Высшая школа», М., 1968.
135. F. H. Westheimer, *The Enzymes*, 1, 259 (1959).

136. N. O. Kaplan, Science, 131, 392 (1960).
137. А. Е. Шилов, ЖВХО им. Д. И. Менделеева, 16, 450 (1971).
138. G. A. Hamilton, Adv. Enzymolog., 32, 55—96 (1969).
139. L. Starka, J. Kutova, Biochim. biophys. acta, 56, 76 (1962).
140. A. Revol, C. Nofre, A. Cier, C. r., 247, 2486 (1958).
141. A. Cier, C. Nofre, A. Revol, Там же, 247, 542 (1958).
142. S. Udenfriend, C. T. Clark, J. Axelrood, B. B. Brodie, J. Biol. Chem., 208, 731 (1954).
143. G. A. Hamilton, R. J. Workman, L. Woo, J. Am. Chem. Soc., 86, 3390 (1964).
144. V. Ulrich, Naturforsch., 24b, 699 (1969).
145. M. B. Dearden, C. R. E. Jefcoate, J. R. L. Smith, Int. Oxydation Symposium, San-Francisco, 2, 487 (1967).
146. M. Viscontini, G. Mattern, Helv. chim. acta, 53, 372 (1970).
147. M. Viscontini, G. Mattern, Там же, 53, 832 (1970).
148. В. С. Белова, Л. А. Никонова, Л. М. Райхман, М. Р. Борукаева, ДАН, 204, 897 (1972).
149. А. А. Ахрем, М. Е. Скурко, Д. И. Метелица, Bioorganic Chem., (в печати).
150. H. Staudinger, V. Ulrich, Naturforsch., 19b, 877 (1964).
151. А. Е. Шилов, А. А. Штейман, Кинетика и катализ, 14, 154 (1973).
152. V. Ulrich, H. Staudinger, Naturforsch., 24b, 583 (1969).
153. Н. З. Мурадов, А. Е. Шилов, А. А. Штейман, Кинетика и катализ, 13, 1357 (1972).
154. А. А. Ахрем, М. Е. Скурко, Д. И. Метелица, С. М. Бельский, Там же, 16 (1975).
155. А. А. Ахрем, М. Л. Абелиович, Д. И. Метелица, ДАН, 213, 1079 (1973).
156. А. А. Ахрем, М. Л. Абелиович, С. Н. Коваленко, Д. И. Метелица, Нефтехимия, 14, 746 (1974).
157. R. Barral, C. Bocard, J. Seree de Roch, L. Sajus, Tetrahedron Letters, 1972, 1693.
158. R. D. Chambers, P. Goggins, W. K. R. Musgrave, J. Chem. Soc., 1959, 1804.
159. H. Davidge, A. G. Davies, J. Kenyon, R. F. Mason, Там же, 1958, 4569.
160. J. D. Meclure, P. H. Williams, J. Org. Chem., 27, 627 (1962).
161. A. J. Davidson, R. O. C. Norman, J. Chem. Soc., 1964, 5404.
162. D. M. Jerina, J. W. Daly, B. Witkop, Biochemistry, 10, 366 (1971).
163. А. А. Ахрем, П. А. Киселев, Д. И. Метелица, Кинетика и катализ, 16 (1975).
164. J. C. Farrand, D. C. Johnson, J. Org. Chem., 36, 3606 (1971).
165. A. Oku, T. Fuse, F. Mashio, J. Chem. Soc. Japan, Chem. Ind. Sci., 1972, № 6, 1199.
166. Y. Ogata, M. Mineno, J. Chem. Soc. Japan, 73, 1849 (1970).
167. А. А. Ахрем, П. А. Киселев, Д. И. Метелица, Сообщения по кинетике и катализу, 2, № 1 (1975).
168. J. Boeseken, C. F. Metz, J. Pluim, Rec. trav. chim., 54, 345 (1935).
169. H. Fernholz, Chem. Ber., 84, 110 (1951).
170. J. A. Elvidge, R. P. Linstead, P. Sims, J. Chem. Soc., 1961, 3386.
171. H. J. X. Mager, W. Berends, Rec. trav. chim., 91, 611 (1972).
172. А. А. Ахрем, Т. А. Тимосchtschuk, Д. И. Метелица, Tetrahedron, 30, 3165 (1974).
173. А. А. Ахрем, С. Н. Коваленко, Д. И. Метелица, ДАН, 216, 830 (1974).
174. Д. И. Метелица, Усп. химии, 41, 1737 (1972).
175. Н. А. Высоцкая, Там же, 42, 1843 (1973).
176. Э. А. Кутнер, Автореф. кандид. диссерт., Рижский политехн. ин-т, Рига, 1968 г.
177. Э. А. Кутнер, Б. П. Мацевский, Кинетика и катализ, 10, 997 (1969).
178. D. Behar, J. Rabani, H. A. Schwarz, G. Czapski, L. M. Dorfman, J. Phys. Chem., 74, 3209 (1970).
179. И. И. Вольнов, Усп. химии, 41, 600 (1972).
180. G. Hamilton, J. Am. Chem. Soc., 86, 3391 (1964).
181. M. Malessat-Bras, E. Azonlay, Ann. Inst. Pasteur, 109, 894 (1965).
182. П. И. Валов, Э. А. Блумберг, Т. В. Филиппова, Кинетика и катализ, 8, 760 (1967).
183. H. Mimoun, J. Seree de Roch, L. Sajus, Bull. soc. chim. France, 1969, 1481.
184. H. Mimoun, J. Seree de Roch, L. Sajus, Tetrahedron, 26, 37 (1970).
185. K. B. Sharpless, T. C. Flood, J. Am. Chem. Soc., 93, 2316 (1971).
186. K. B. Wiberg, Oxidation in Organic Chemistry, Academic Press, N.-Y., 1965.
187. E. Zbiral, H. Hugl, Tetrahedron, 29, 769 (1973).
188. Г. К. Боресков, В. В. Поповский, В. А. Сазонов, Тр. IV Конгресса по катализу, М., 1968, «Наука», 1970, 1, стр. 343.
189. D. M. Jerina, T. W. Daly, B. Witkop, P. Zaltzman-Nirenberg, S. Udenfriend, Biochemistry, 9, 147 (1970).
190. D. M. Jerina, J. W. Daly, B. Witkop, P. Zaltzman-Nirenberg, S. Udenfriend, J. Am. Chem. Soc., 90, 6525 (1968).
191. D. M. Jerina, J. W. Daly, A. M. Jeffrey, D. T. Gibson, Arch. biochem. biophys., 142, 394 (1971).
192. K. B. Sharpless, J. M. Townsend, D. R. Williams, J. Am. Chem. Soc., 94, 295 (1972).
193. K. Mosbach, Scientific American, 224, 26 (1971).