

УДК 577.15.02.-541.6.69

©Коллектив авторов

КВАНТОВОХИМИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ ДЛЯ ПРОГНОЗА ПОЛОЖЕНИЯ ГИДРОКСИЛИРОВАНИЯ АРОМАТИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ ПОД ДЕЙСТВИЕМ ЦИТОХРОМА P450

*Н. В. Харчевникова¹, А. В. Дмитриев², Ю. В. Бородин²,
П. Н. Дьячков³*

¹ НИИ экологии человека и гигиены окружающей среды им. А. Н. Сысина,
РАМН, 119981 Москва, Погодинская ул., 10;

факс: (095)245 03 41, эл. почта: kharchevnikova_n@mail.ru

² НИИ биомедицинской химии им. А. И. Ореховича, РАМН, Москва, тел.: 246 71 73

³ НИИ общей и неорганической химии им. Н.С. Курнакова, РАН

Подход, основанный на оксеноидной модели действия монооксигеназ и полуэмпирических квантовохимических расчетах, применен для прогноза положения гидроксילирования ароматических соединений - субстратов цитохрома P450. Результаты сопоставлены с экспериментальными данными по метаболизму у человека и млекопитающих.

Ключевые слова: метаболизм, квантовохимическая модель, гидроксילирование, ароматические соединения, цитохром P450.

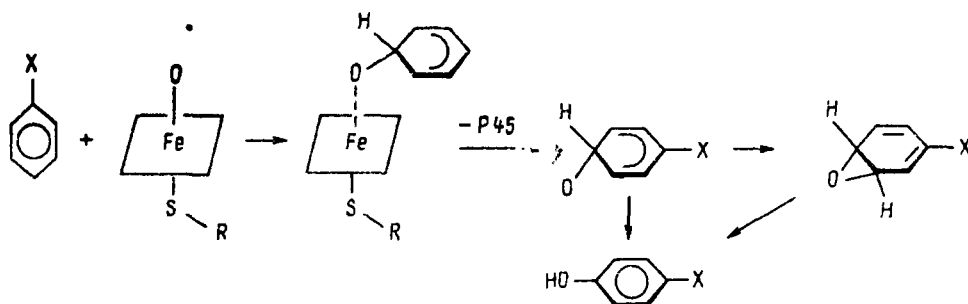
ВВЕДЕНИЕ. Метаболизм большого числа эндогенных и чужеродных для организма химических соединений осуществляется с участием группы ферментов монооксигеназ, наиболее известными представителями которых являются цитохромы P450. Под действием этих ферментов вещества становятся более гидрофильными, что обеспечивает более легкое выведение чужеродных соединений из организма [1]. С другой стороны, в процессе метаболизма образуются интермедиаты или конечные метаболиты более токсичные, чем исходные вещества [1-3]. Например, из веществ проканцерогенов образуются конечные канцерогены [4]. Многие лекарства также являются субстратами монооксигеназной ферментной системы цитохрома P450, локализованной преимущественно в клетках печени и желудка, причем метаболизм лекарств может приводить к потере терапевтической активности и образованию соединений, которые определяют вредные побочные эффекты [5].

Многие изоформы цитохрома P450 не накладывают жестких требований на структуру субстратов, субстраты могут свободно вращаться в полости активного центра фермента [6-7]. Предпочтительное положение метаболитического превращения при этом определяется реакционной способностью, и, в конечном счете электронной структурой субстрата.

Ароматические соединения являются типичными субстратами цитохрома P450. Многие ароматические соединения, в частности, лекарственные препараты, могут рассматриваться как замещенные производные бензола с простыми или сложными заместителями. Вредные эффекты, проявляющиеся при действии на

ПРОГНОЗ ГИДРОКСИЛИРОВАНИЯ АРОМАТИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ

организм производных бензола, представляют собой следствие биоактивации бензольного кольца [1-6, 8]. Короткоживущими, но исключительно активными продуктами биоактивации бензола и его производных являются ареноксины. Разнообразные токсические эффекты многих замещенных бензолов C_6H_5X — результат взаимодействия ареноксида с клеточными макромолекулами [8]. Схема гидроксилирования бензольного кольца с образованием фенолов через стадию ареноксида может быть представлена следующим образом [9]:



Экспериментальные данные свидетельствуют о том, что скорость окисления, количество различных образовавшихся продуктов и токсичность производных бензола зависят от природы заместителей. В предыдущих работах [10, 11] эти зависимости были изучены с использованием квантовохимических расчетов в рамках оксеноидной модели. Согласно этой модели, роль фермента состоит в разрыве молекулы O_2 с образованием “активного кислорода” в атомарном или близком к атомарному состоянии, который и связывается с субстратом. Оксеноидный механизм реакции окисления различных субстратов изучали экспериментально и с помощью квантовохимических расчетов [12-14]. В случае производных бензола ключевой стадией, запускающей процесс метаболизма, является образование интермедиата с тетраэдрически координированным атомом углерода [11]. Предполагается [10, 11], что скорость гидроксилирования определяется устойчивостью “тетраэдрического” интермедиата относительно исходного соединения. Модель позволила удовлетворительно предсказать (за несколькими исключениями) преимущественное положение гидроксилирования, относительную легкость гидроксилирования и токсичность в ряду однократно замещенных бензолов.

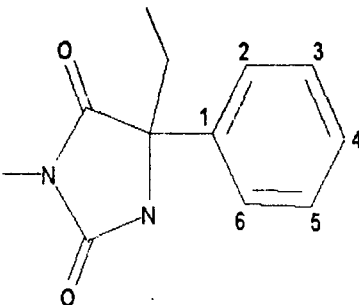
Целью данной работы является применение этой модели для предсказания положения гидроксилирования существенно более широкого круга соединений, отнесенных к субстратам ароматического гидроксилирования в базе данных Metabolite [15].

МЕТОДИКА. База данных Metabolite содержит результаты изучения метаболизма различных субстратов *in vivo* у человека, млекопитающих и водных организмов, а также в различных тест-системах *in vitro*. Около 98% субстратов являются лекарственными препаратами и около 2% — пищевые добавки, пестициды и промышленные химические вещества. Тестовая выборка из этой базы содержала 24 субстрата и включала только те соединения, которые могут быть рассмотрены как замещенные бензолы. Энергии образования исходных соединений и интермедиатов с тетраэдрически координированным атомом углерода рассчитывали по программе MOPAC 6.0 [16] в рамках метода MNDO. При расчете интермедиатов геометрия метаболизируемого кольца принималась такой же, как в интермедиате бензола, структура которого взята из работы Korzekwa и соавторов [10], а геометрия заместителей считалась такой же, как в исходной молекуле субстрата. Геометрию субстрата находили оптимизацией из условия минимума полной энергии. Рассматривали все возможные положения ароматического

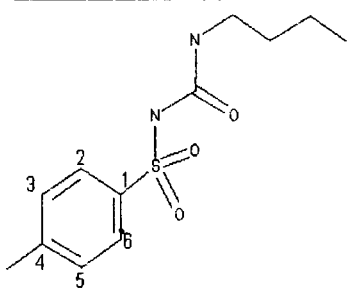
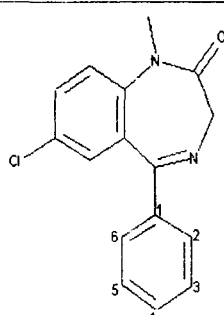
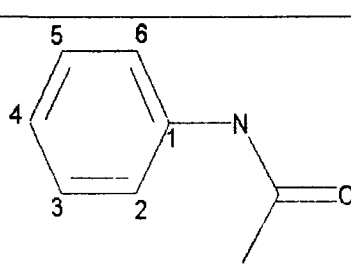
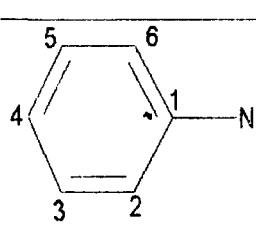
гидроксилирования в молекуле; если в молекуле имеется два или больше бензольных кольца, рассчитывали энергии интермедиатов, образованных при последовательном присоединении кислорода ко всем незамещенным положениям всех бензольных колец. Согласно развиваемой модели, чем меньше разность энергий образования интермедиата и исходного субстрата ΔE , тем легче должно идти гидроксилирование по данному положению. За нуль энергии принимали разность энергий интермедиата и исходной молекулы незамещенного бензола. Известно, что бензол является субстратом цитохрома P450, и его метаболизм проходит через стадию образования ареноксида и затем фенола [8,9]. Отрицательные значения ΔE в таблице отвечают положениям, активированным по сравнению с бензолом, поэтому эти положения обязательно должны гидроксилироваться [17]. Положительные значения ΔE соответствуют меньшей легкости гидроксилирования по сравнению с незамещенным бензолом. Реакция не пойдет, если значение ΔE положительно и велико.

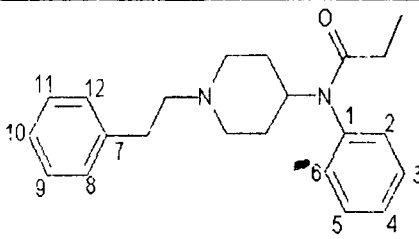
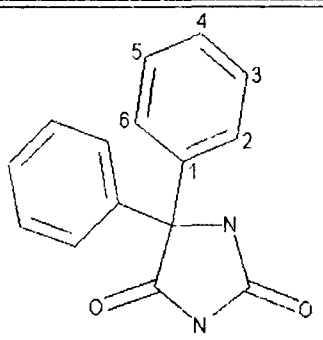
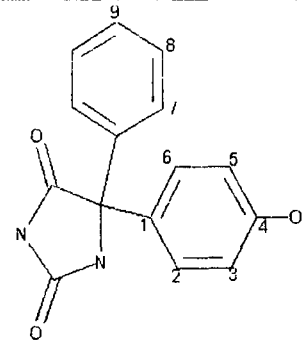
Результаты расчетов и экспериментальные данные приведены в таблице. Для каждого экспериментально обнаруженного метаболита приведены условия эксперимента, т.е. указано *in vivo* или *in vitro* проводился эксперимент, вид экспериментального объекта и, если эта информация приведена в базе данных, изоформа цитохрома P450.

Таблица. Структура субстратов ароматического гидроксилирования под действием цитохрома P450 (атомы Н не указаны), возможные положения гидроксилирования, разности энергий ΔE интермедиата с тетраэдрически координированным атомом С и исходного субстрата (за начало отсчета энергии принято значение ΔE для бензола) и экспериментальные данные по метаболизму (знаком "+" обозначен наблюдаемый метаболит с ОН-группой в соответствующем положении, знаком минус – не обнаруженный)

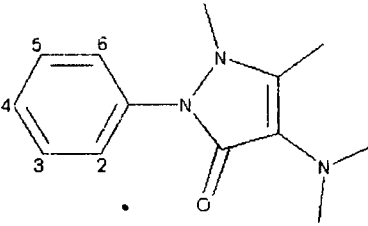
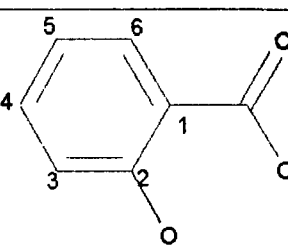
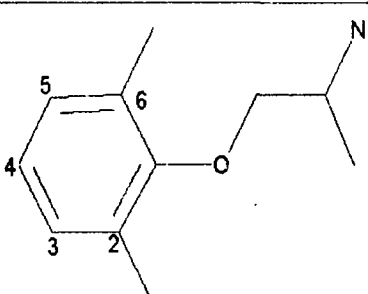
№	Соединение	Возможное положение гидроксилирования	ΔE (ккал/моль)	Эксперимент	Экспериментальный объект, способ введения и изоформа цитохрома P450
1	2	3	4	5	6
1		4	3,49	+	1) человек, <i>in vivo</i> , per os, CYP2C19; 2) <i>in vitro</i> микросомы печени человека, CYP2C19; 3) микросомы клеток тонкой кишки человека, CYP2C19
		2	12,83	-	
		3	3,71	-	

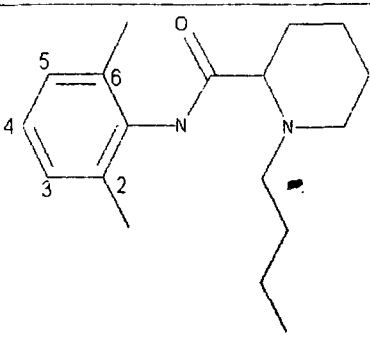
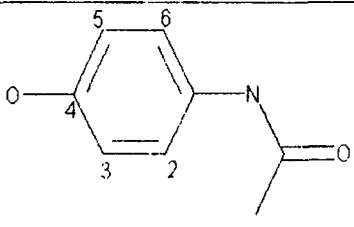
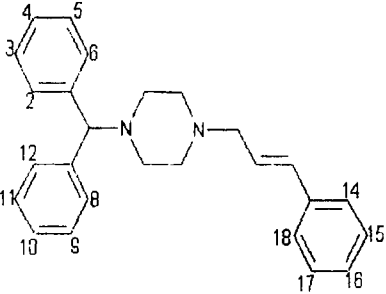
ПРОГНОЗ ГИДРОКСИЛИРОВАНИЯ АРОМАТИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ

1	2	3	4	5	6
2		5	5,33	+	<i>in vitro</i> микросомы печени человека, CYP2C8, CYP2C9
		6	11,83	-	
3		4	2,15	+	1) крысы, в/в, per os; <i>in vitro</i> микросомы печени крыс, CYP2D1; 2) микросомы печени человека; 3) CYP3A
		5	7,65	-	
		6	2,65	-	
4		4	-4,84	+	<i>in vitro</i> микросомы печени мышей и крыс, CYP1A2
		3	5,71	-	
		2	-4,38	+	крысы per os
5		4	-15,67	+	1) крысы в/б; 2) <i>in vitro</i> микросомы печени крыс, кролики, человек per os, CYP2E1; 3) <i>in vitro</i> микросомы печени и почек крыс, CYP1A2, CYP2E1
		2	-19,83	+	Человек, кролики,
		3	-1,33	+	микросомы печени человека,

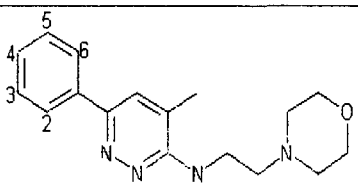
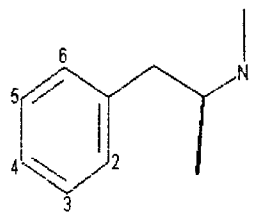
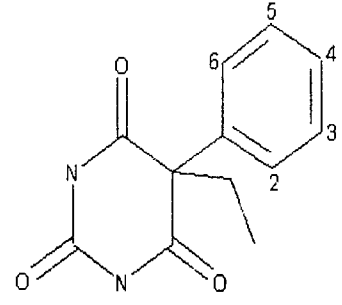
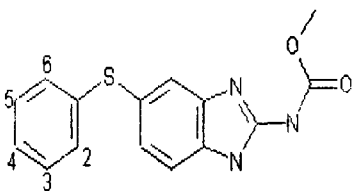
1	2	3	4	5	6
6		10	0,57	+	1) человек, в/в; 2) <i>in vitro</i> микросомы печени крыс, микросомы печени человека, CYP1A, гепатоциты печени морской свинки
		12	7,7	-	
		11	2,3	-	
		4	-0,5	+	крысы в/в
		5	8,97	-	
		6	5,97	-	
7		2	0,55	+	<i>in vitro</i> микросомы печени крыс, печени собак и печени человека
		3	1,81	+	1) лошади в/в, <i>in vitro</i> микросомы печени собак, CYP2C9; 2) микросомы печени мышей
		4	2,59	+	1) человек per os, 2) <i>in vitro</i> микросомы печени человека, CYP2C9, CYP2C19, 3) лошади per os, 4) лошади в/в
8		5	-0,44	+	1) <i>in vitro</i> микросомы печени человека, CYP2C9, CYP2C19, CYP3A4, CYP3A5, CYP3A7; 2) микросомы печени крыс, 3) <i>in vivo</i> собаки, обезьяны, человек
		2	8,31	-	

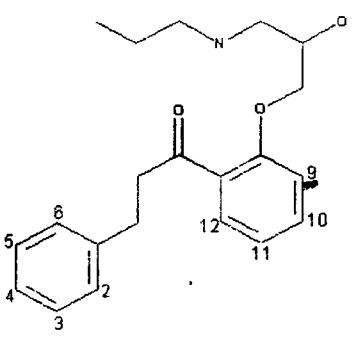
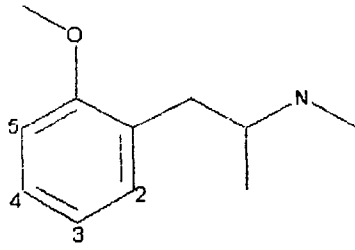
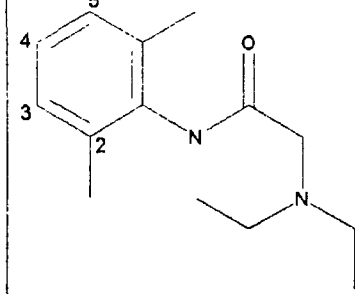
ПРОГНОЗ ГИДРОКСИЛИРОВАНИЯ АРОМАТИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ

1	2	3	4	5	6
9		4	0,32	+	<i>in vitro</i> микросомы печени крыс, CYP2B1
		5	4,53	-	
		6	1,32	-	
10		5	-2,68	+	1) человек, кошки, кролики, собаки <i>per os</i> ; 2) <i>in vitro</i> микросомы печени человека, фермент экспрессирован в β-лимфобласто-идных клетках человека, CYP3A4; 3) фермент экспрессирован в β-лимфобласто-идных клетках человека, CYP2E1
		6	18,77	-	
		4	5,81	+	человек <i>per os</i>
		3	-9,95	+	1) крысы, мыши <i>в/в</i> ; 2) <i>in vitro</i> гомогенат тромбоцитов человека; 3) микросомы печени человека
11		4	-3,27	+	1) человек <i>per os</i> CYP2D6; 2) человек <i>в/в</i> ; 3) <i>in vitro</i> микросомы печени человека, фермент экспрессирован в β-лимфобласто-идных клетках человека CYP2D6, CYP1A2
		5	0,51	+	1) человек <i>per os</i> CYP2D6; 2) <i>in vitro</i> микросомы печени крыс, мышей, кроликов, хомяков, морских свинок

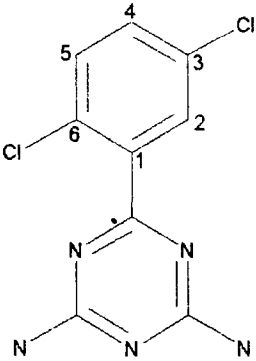
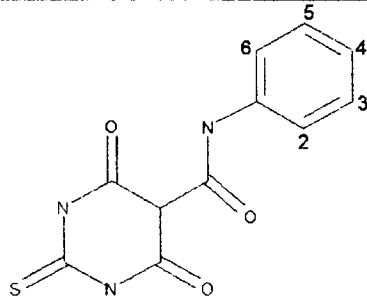
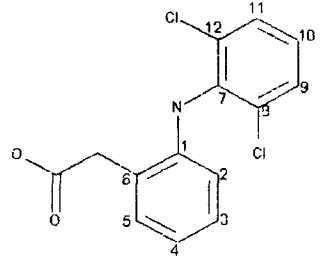
1	2	3	4	5	6
12		3	0,34	+	1) <i>in vitro</i> микросомы печени человека, CYP1A2; 2) <i>in vivo</i> человек в/в; 3) кролики подкожно
		4	0,84	+	1) <i>in vitro</i> микросомы печени человека, CYP1A2; 2) <i>in vivo</i> человек в/в, инфузия; 3) кролики, обезьяны подкожно
13		3	-11,02	+	1) человек рег ос, CYP1A2; 2) мыши, хомяки в/п; 3) <i>in vitro</i> микросомы печени крыс и мышей; 4) микросомы клеток слизистой носа мышей CYP2A5, CYP2G1
		2	-4,47	-	
14		16	-0,83	+	1) крысы-самки, рег ос; 2) <i>in vitro</i> микросомы печени крыс, CYP2D6
		4	0,27	+	<i>in vitro</i> микросомы печени крыс, CYP2D6
		18	0,57	-	
		17	0,37	-	
		8	7,17	-	
		9	1,17	-	

ПРОГНОЗ ГИДРОКСИЛИРОВАНИЯ АРОМАТИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ

1	2	3	4	5	6
15		4	1,94	+	1) человек, обезьяны, крысы, собаки per os; 2) <i>in vitro</i> микросомы печени мышей, CYP2D6; 3) <i>in vitro</i> микросомы печени крыс, собак, обезьян
		6	3,63	+	человек, обезьяны, крысы, собаки per os
		5	-0,16	+	крысы, per os
16		4	-0,42	+	1) крысы, человек per os; 2) мыши, крысы в/б
		2	0,83	-	
		3	1,82	-	
17		4	4,64	+	1) крысы, человек per os; 2) человек, крысы в/в; 3) <i>in vitro</i> микросомы печени человека, CYP2C9, CYP2C19, CYP2E1
		6	6,3	-	
		5	4,14	+	крысы в/в
18		4	0,82	+	1) <i>in vitro</i> микросомы печени крыс; 2) CYP2C11, CYP2C6, CYP2B1, козы per os
		6	7,38	-	
		5	2,55	-	

1	2	3	4	5	6
19		11	-2,69	+	1) человек, собаки per os, CYP2D6; 2) <i>in vitro</i> микросомы печени человека, CYP2D6
		12	14,91	-	
		10	7,91	+	человек per os
		9	2,51	-	
		2	4,13	-	
		3	8,83	-	
		4	3,81	+	1) собаки per os, 2) <i>in vitro</i> клетки печени крыс
20		4	0,9	+	<i>in vitro</i> , цитохром P450 человека, CYP2D6
		5	-2,43	+	<i>in vitro</i> фермент экспрессирован в β- лимфо-бласти-идных клетках человека, CYP2D6
		3	-2,45	+	<i>in vitro</i> фермент экспрессирован в β- лимфо-бласти-идных клетках человека, CYP2D6
		2	7,14	-	
21		3	1,07	+	1) человек, крысы per os, крысы, собаки в/в; 2) <i>in vitro</i> микросомы печени человека, CYP1A2, CYP4A4; 3) <i>in vitro</i> фермент экспрессирован в β- лимфо-бласти-идных клетках человека, CYP2D6; 4) микросомы печени и почек крыс, CYP2D; 5) микросомы печени, почек легких и мозга крыс, CYP3A
		4	-0,33	+	человек, крысы

ПРОГНОЗ ГИДРОКСИЛИРОВАНИЯ АРОМАТИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ

1	2	3	4	5	6
22		4	3,7	+	<i>in vitro</i> микросомы печени крыс, собак; обезьян, <i>in vitro</i> фермент экспрессирован в β -лимфоцитароидных клетках человека CYP3A4, CYP1A1, CYP2B6, CYP1A2, CYP2C9, CYP2E1, CYP2D6
		2	12,9	-	
		5	3,055	+	крысы, собаки, обезьяны per os, в/в
23		4	3,65	+	<i>in vitro</i> микросомы печени крыс
		6	4,93	-	
		5	1,25	-	
24		4	-0,56	+	1) человек per os, <i>in vitro</i> микросомы печени человека, CYP3A4; 2) гепатоциты человека
		5	5,14	-	
		3	1,15	+	<i>in vitro</i> микросомы печени человека, CYP2C9
		2	-0,45	-	
		10	-1,81	+	1) человек per os; 2) <i>in vitro</i> гепатоциты человека, крысы; 3) <i>in vitro</i> фермент экспрессирован в клетках HYP G2 гепатобластомы человека, CYP2C9-Cys144 человека
		11	2,51	+	1) человек per os, в/м в/в; 2) <i>in vitro</i> гепатоциты человека, CYP2C9

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Для оценки результатов всем возможным положениям ароматического гидроксирования данного субстрата были приписаны ранги в возрастающей последовательности в соответствии со значением энергии интермедиата. В идеале “правильные” положения гидроксирования (метаболиты с ОН- группой в этих положениях обнаружены экспериментально) должны иметь меньшие ранги, чем “неправильные” положения. Точность распознавания положения гидроксирования оценивали по значению индекса точности прогноза [18] (index of accurancy of prediction, IAP):

$$IAP = 100 \times N\{r_i < r_f\} / (N_i \times N_f) \%,$$

где $N\{r_i < r_f\}$ число случаев, для которых положение, по которому идет гидроксирование в эксперименте (“правильное”), имеет меньший ранг, чем положение, по которому реакция не идет (“неправильное”), причем сопоставлялись все пары “правильное”/“неправильное” положение гидроксирования. N_i и N_f – количество “правильных” и “неправильных” положений гидроксирования, соответственно. Эта статистика была рассчитана для каждого субстрата и усреднена по всей выборке; усредненное значение составляла 91,2 %.

Таким образом, статистический анализ свидетельствует, что в подавляющем большинстве случаев предсказанное по результатам расчета положение гидроксирования совпадает с наблюдаемым в эксперименте. Однако в некоторых случаях отсутствуют экспериментальные данные о гидроксировании в положения, в которых, согласно модели, гидроксирование возможно.

Обсудим теперь результаты более подробно. В случае соединения 1, по данным расчетов, наиболее легко должно осуществляться гидроксирование в пара-положение по отношению к заместителю в бензольном кольце. Именно такой процесс наблюдается как в экспериментах на людях, так и в тест-системах *in vitro*.

По результатам расчета, в соединении 2 из двух возможных более выгодным является гидроксирование по *мета*-положению, что и наблюдается в эксперименте.

Для соединения 3 наиболее выгодно гидроксирование в *пара*-положение. Такой продукт метаболизма действительно обнаружен у крыс при введении соединения внутривенно, а также в экспериментах *in vitro*. Образование продукта с ОН-группой в *мета*-положении требует на 5,5 ккал/моль больше энергии, и такой продукт не был обнаружен.

Согласно прогнозу, гидроксирование субстрата 4 должно идти по *пара*- и *орто*-положениям, что и наблюдается в эксперименте. Эти положения активированы по сравнению с бензолом, поэтому реакция должна идти более интенсивно, чем в случае бензола. В работе Кузнецова [11] приведены количественные оценки интенсивности метаболизма ряда замещенных бензолов с образованием различных изомеров фенолов у млекопитающих и человека, а также в экспериментах *in vitro*. При введении соединения 4 кроликам обнаружено большое количество замещенного фенола с ОН-группой в *пара*-положении (70% от введенной дозы), при введении собакам – значительное количество *орто*-изомера, тогда как *мета*-изомер не был обнаружен ни в одном эксперименте.

Соединение 5 (анилин) содержит NH_2 -группу, которая является сильным активирующим заместителем [17]. В согласии с этими соображениями и результатами расчетов, обнаружены все три изомерных продукта реакции ароматического гидроксирования анилина. Значения ΔE , характеризующие величину энергии активации, для *пара*- и *орто*-положений самые малые во всем ряду рассчитанных соединений, и, следовательно, интенсивность реакции метаболизма должна быть бо́льшей, что согласуется с экспериментальными данными [11].

Для соединения 6 наиболее устойчивы интермедиаты с атомом кислорода в *пара*-положении к заместителям в одном и другом бензольном кольце. В экспериментах *in vivo* и *in vitro* обнаружены метаболиты с ОН-группой именно в

ПРОГНОЗ ГИДРОКСИЛИРОВАНИЯ АРОМАТИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ

этих положениях.

В соединении 7 также наиболее устойчив интермедиат, соответствующий гидроксильному в *пара*-положение. Такой метаболит был обнаружен в экспериментах как *in vivo*, так и *in vitro* на микросомах печени человека. Однако и остальные – *орто*- и *пара*-гидроксильные продукты также были обнаружены в экспериментах *in vitro* (таблица). Это связано с тем, что значения ΔE для всех положений гидроксильного близки и мало отличаются от нуля (величины ΔE для бензола).

Только метаболит с ОН-группой в *орто*-положении к ОН-группе в молекуле субстрата обнаружен в экспериментах *in vivo* и *in vitro* для субстрата 8. Согласно результатам расчета, это положение активировано по сравнению с бензолом. Интермедиат реакции образования *мета*-метаболита на 8,75 ккал/моль менее устойчив. Согласно принципу Белла-Эванса-Поляни [19], энергия активации для образования этого метаболита значительно больше, чем у *орто*-изомера, и неудивительно, что в эксперименте *мета*-метаболит не обнаружен.

Энергии *пара*- и *орто*-интермедиатов субстрата 9 очень близки (разница всего 1 ккал/моль), однако в экспериментах *in vitro* обнаружен только *пара*-изомер. Отсутствие *орто*-изомера может объясняться стерическими препятствиями, связанными с наличием объемного заместителя вблизи реакционного *орто*-положения. Образование *мета*-изомера на 4 ккал/моль менее выгодно, и в эксперименте он не обнаружен.

Согласно расчету, из четырех возможных положений ароматического гидроксильного в молекуле субстрата 10 ферментативная реакция должна идти по *орто*- и *пара*-положениям к ОН-группе, которая является сильным активирующим ориентантом в реакциях электрофильного замещения [17], причем наиболее сильно активированы *орто*- и *пара*-положения. Значение ΔE для *орто*-положения – одно из самых низких по всей выборке. Согласно принципу Белла-Эванса-Поляни [19], энергия активации ароматического гидроксильного для этих положений также должна быть низкой. Соответствующие метаболиты обнаружены в многочисленных экспериментах *in vivo* и *in vitro* на различных тест-объектах. Наименее устойчивый интермедиат образуется по *мета*-положению к гидроксильной группе и *орто*- к карбоксильной группе, которая является дезактивирующим ориентантом, т.е. затрудняет прохождение реакции электрофильного замещения, причем наиболее сильно в *орто*- и *пара*-положениях. Действительно, значение ΔE для гидроксильного в это положение наибольшее по всей выборке. Продукт гидроксильного по этому положению не обнаружен ни в одном из проводившихся экспериментов. В одном эксперименте обнаружен метаболит с ОН-группой в *мета*-положении к ОН-группе субстрата и в *пара*-положении к карбоксильной группе. Согласно теории электрофильного ароматического замещения [17] и результатам расчетов, образование этого метаболита должно быть затруднено по сравнению с бензолом (ΔE 5,81 ккал/моль). К сожалению, количественные оценки легкости прохождения реакции (например, количество метаболита в процентах от введенного вещества) в литературе не приведены. Возможно, метаболит образуется в следовых количествах.

Для соединений 11 и 12 значения ΔE для всех положений гидроксильного близки между собой и мало отличаются от значения для бензола. Экспериментально обнаружены все возможные метаболиты, образующиеся по реакции ароматического гидроксильного.

Соединение 13 содержит два активирующих заместителя. Гидроксильное идет в *орто*-положении по отношению к ОН-группе, как более сильному ориентанту. Гидроксильное по *мета*-положению хотя и облегчено по отношению к бензолу, но требует на 6,5 ккал/моль больше энергии. Возможно, метаболит не образуется из-за стерических препятствий, связанных с наличием объемного заместителя вблизи реакционного центра.

Для соединения 14 наиболее выгодно гидроксильное в *пара*-положения

бензольных колец, что и наблюдается в эксперименте.

Согласно расчету, в соединении 15 гидроксильное наиболее выгодно по *мета*-положению, и соответствующий метаболит обнаружен в эксперименте. Однако энергии интермедиатов, соответствующих гидроксильному в *орто*- и *пара*-положения, ненамного больше, чем для *мета*-изомера, и такие метаболиты также обнаружены в эксперименте.

Для соединения 16 наиболее выгодно гидроксильное в *пара*-положение по отношению к заместителю. Именно такой метаболит действительно наблюдали в эксперименте. Согласно расчету, должны наблюдаться также и два других изомера, поскольку разность энергий менее 2 ккал/моль. Значения ΔE также низки, так что значительных энергетических препятствий для гидроксильного в *орто*- и *мета*-положения нет. Возможно, реакция не идет из-за стерических препятствий, связанных с ориентацией соединения в активном центре фермента.

В соединении 17, согласно расчету, все положения возможного гидроксильного дезактивированы по сравнению с бензолом. Сильнее дезактивировано *орто*-положение, и такой метаболит не обнаружен.

В соединении 18 наименьшее значение ΔE соответствует гидроксильному в *пара*-положение, что и наблюдается в эксперименте.

Группа OR является сильным активирующим заместителем, причем наиболее сильно активированы *пара*- и *орто*-положения. Карбонильная же группа является дезактивирующим заместителем. В согласии с теорией, наименьшее значение ΔE , для соединения 19, в котором имеется бензольное кольцо, замещенное этими двумя группами, соответствует *пара*-положению по отношению к группе OR. Соответствующий метаболит обнаружен в экспериментах на человеке и собаках, а также *in vitro* на микросомах печени человека. *Орто*-положение к карбонильной группе и *мета*-положение к группе OR сильно дезактивировано, значение ΔE одно из самых высоких по выборке, и реакция по этому положению не идет. Образование метаболита с OH-группой в *пара*-положении к карбонильной группе и *мета*-положении к группе OR энергетически невыгодно, однако такой метаболит был обнаружен в одном эксперименте. Среди возможных положений гидроксильного другого бензольного кольца наименьшее значение ΔE соответствует *пара*-положению к заместителю, и такой метаболит был обнаружен в эксперименте.

Мета-положение к метокси группе в соединении 20 сильно дезактивировано (ΔE 7,14 ккал/моль), и метаболит с OH-группой в этом положении не обнаружен. Другие положения активированы, и соответствующие метаболиты обнаружены в экспериментах *in vitro*.

Значения ΔE для двух возможных положений гидроксильного соединения 21 близки между собой и мало отличаются от значения ΔE для бензола. Соответствующие метаболиты обнаружены в эксперименте.

Хлор является дезактивирующим заместителем, и значения ΔE для всех возможных положений гидроксильного соединения 22 больше, чем в бензоле. Экспериментально не обнаружен метаболит, соответствующий наиболее сильно дезактивированному положению.

В эксперименте *in vitro* обнаружен единственный продукт реакции ароматического гидроксильного соединения 23. Это метаболит с OH-группой в *пара*-положении к заместителю. Согласно результатам расчета наименьшее значение ΔE соответствует *мета*-положению. Разница энергий интермедиатов составляет всего 2,4 ккал/моль, и величина ΔE ненамного больше, чем в бензоле. Можно предположить, что в других экспериментах могут быть обнаружены другие метаболиты. Возможно, региоселективность в данном случае определяется ориентацией субстрата в активном центре фермента.

Для соединения 24 наиболее энергетически выгодно гидроксильное в *пара*-положение к мостиковой группе NH. Такие метаболиты наблюдаются в эксперименте. *Орто*-положение к NH группе также активировано, однако

ПРОГНОЗ ГИДРОКСИЛИРОВАНИЯ АРОМАТИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ

соответствующий метаболит не обнаружен, вероятно из-за стерических препятствий.

В заключение ещё раз подчеркнём связь результатов квантовохимического прогноза положений гидроксилирования рассмотренных субстратов с принятым в органической химии методом прогноза направления реакций электрофильного замещения в ароматическом ряду, основанным на ориентационных свойствах заместителей. Заместители разделяются на активирующие *орто*- и *пара*-положения и дезактивирующие все положения, причём *мета*-положение дезактивировано меньше, чем *орто*- и *пара*-положения (*мета*-ориентанты). Все ароматические соединения, содержащие в качестве заместителей *орто*- и *пара*-ориентанты (группы OH, OR, NH₂, CH₃ и др.) гидроксилируются легче чем бензол, а содержащие *мета*-ориентанты (группы NO₂, CF₃, CO₂H, CHO и др.) труднее, чем бензол.

ВЫВОДЫ. Предложенная модель прогноза положения ароматического гидроксилирования соединений ряда замещенных бензолов хорошо описывает экспериментальные данные по метаболизму и может быть использована для предсказания пути метаболизма неизученных соединений.

ЛИТЕРАТУРА

1. Тиунов Л.А. (1986) в кн.: Общие механизмы токсического действия (С.Н. Голиков ред.), Медицина, Л., 114.
2. Метелица Д.И. (1982) Активация кислорода ферментными системами, Наука, М.
3. Archakov A.I., Bachmanova G.I. (1990) Cytochrome P450 and Active Oxygen, Taylor and Francis, London.
4. Bresnick E. (1988) in Mechanisms and toxicity of chemical carcinogens and mutagens, New York, pp. 79-86.
5. Rendic S., DiCarlo F.J. (2002) Drug Metab. Rev., **34**, 83-89.
6. Singh S.B., Shen L.Q., Walker M.J., and Sheridan R.P. (2003) J. Med. Chem., **46**, 1330-1338.
7. Jones J.P., Mysinger M., and Korzekwa K.R. (2002) Drug Metab. Dispos., **30**, 7-16.
8. Goldstein J.A., Faletto M.B. (1993) Environ. Health Persp., **100**, 169-176.
9. Korzekwa K.R., Trager W., Gouterman M., Sprangler, P. and Loew G.H. (1985) J. Amer. Chem. Soc., **107**, 4273-4279.
10. Дьячков П.Н. (1990) Квантовохимические расчеты в изучении механизма действия и токсичности чужеродных веществ. Итоги науки и техники ВИНТИ. Сер. Токсикология, **16**, 280 с.
11. Кузнецов А.В. (1990) Мол. биол., **24**, 1373-1380.
12. Pudzianowski A.T., Loew G.H., and Mico B.A. (1983), J. Amer. Chem. Soc., **105**, 3434-3438.
13. Pudzianowski A.T., Loew G.H. (1982) J. Mol. Catal., **17**, 1-22.
14. Pudzianowski A.T., Loew G.H. (1983) Int. J. Quantum Chem., **23**, 1257-1268.
15. MDL Metabolite Database 2001.1. MDL Information Systems, Inc., 14600 Catalina Street, San Leandro, CA, USA (<http://www.mdli.com>).
16. Frank J. Seiler Res. Lab., U.S. Air Force Academy, Colo. SPGS., CO. 80840.
17. Робертс Дж., Касерио М. (1968) Теоретическая органическая химия, т. 2, Мир, М., с. 142.
18. Borodina Yu., Sadyr A., Filimonov D., Blinova V., Dmitriev A., Poroikov V. (2003) J. Chem. Inf. Comput. Sci., **43**, 1636-1639.
19. Дьюар М. (1972) Теория молекулярных орбиталей в органической химии (пер. с англ.), Мир, М.

Поступила: 18. 03. 2004 г.

**QUANTUM CHEMICAL MODEL FOR THE PREDICTION OF THE SITE OF
CYTOCHROME P450 MEDIATED HYDROXYLATION OF AROMATIC SUBSTANCES**

N. V. Kharchevnikova¹, A. V. Dmitriev², Yu. V. Borodina², P. N. Dyachkov³

¹Institute of Human Ecology and Environmental Health, Russian Academy of Medical Sciences,
10 Pogodinskaya str., Moscow, 119121 Russia; tel.: 7(095)246-71-73, fax: 7(095)245-03-41,
e-mail: kharchevnikova_n@mail.ru

²Institute of Biomedical Chemistry, Russian Academy of Medical Sciences, Pogodinskaya str.,
10, Moscow, 119121 Russia;

³Institute of General and Inorganic Chemistry, Russia Academy of Sciences,
31 Leninsky Pr., Moscow, 119921 Russia.

An approach based on the oxenoid model of monooxygenase action and semiempirical quantum chemical calculations was applied to the prediction of aromatic hydroxylation sites of cytochrome P450 substrates. The results were compared with experimental data on the metabolism in mammals and human from Metabolite database.

Key words: metabolism, quantum chemical model, hydroxylation, aromatic substances, cytochrome P450.