

УДК 577.152.1

©Рогожина, Рогожин

ФЕНОТИАЗИНЫ – МЕДЛЕННО ОКИСЛЯЕМЫЕ СУБСТРАТЫ ПЕРОКСИДАЗЫ ХРЕНА

*Т.В. Рогожина, В.В. Рогожин**

Якутская государственная сельскохозяйственная академия, 677002 Якутск,
ул. Красильникова, 15; эл. почта: vtogozhin@mail.ru

Методами стационарной кинетики изучены реакции пероксидазного окисления трифтазина и тиопроперазина в присутствии пероксидазы хрена. Показано, что фенотиазины являются медленно окисляемыми субстратами пероксидазы. В интервале pH 4,5-7,5 определены величины k_{cat} и K_m . Изучено совместное окисление фенотиразинов и *o*-дианизидина. Показано, что при совместном присутствии в реакционной среде аминазин и *o*-дианизидин окисляются последовательно. Окисление *o*-дианизидина не наблюдалось до полного превращения аминазина. Тиопроперазин при pH 4,5-5,5, связываясь с фермент-субстратным комплексом ингибировал пероксидазу по антиконкурентному типу. При pH>5,5 происходило последовательное окисление субстратов с преимущественным превращением тиопроперазина. Трифтазин в исследованном диапазоне pH 4,5-7,5 не оказывал влияния на окисление *o*-дианизидина.

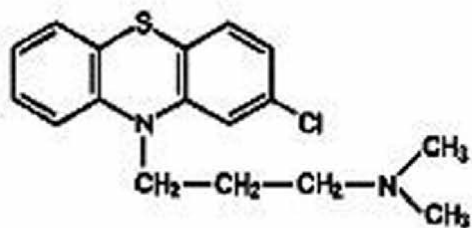
Ключевые слова: пероксидаза хрена, трифтазин, тиопроперазин, аминазин, *o*-дианизидин, фенотиазины.

ВВЕДЕНИЕ. Трифтазин (ТФ) и тиопроперазин (ТП) относятся к нейролептическим препаратам. Основной особенностью препаратов этой группы является их седативное, успокаивающее действие при аффективных расстройствах и состояниях возбуждения. Они оказывают также антипсихотическое действие, снимая или уменьшая бред, галлюцинации, психические автоматизмы [1].

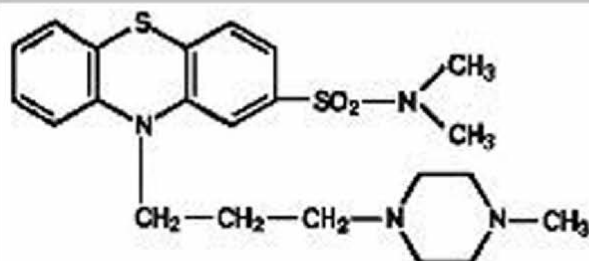
По седативному эффекту ТФ более активен, чем аминазин (АМ), и является одним из наиболее активных нейролептических средств. Он оказывает сильное противорвотное действие, сравнительно с АМ вызывает слабый адренолитический эффект, меньше потенцирует действие снотворных средств, не обладает противогистаминной, спазмолитической и противосудорожной активностью. По химическому строению отличается от АМ тем, что вместо атома хлора в положении 2 фенотиразинового ядра содержит группу CF_3 , а в боковой цепи - ядро пиперазина, замещённое при атоме азота в положении 4 группой CH_3 [1, 2] (рис. 1).

* - адресат для переписки

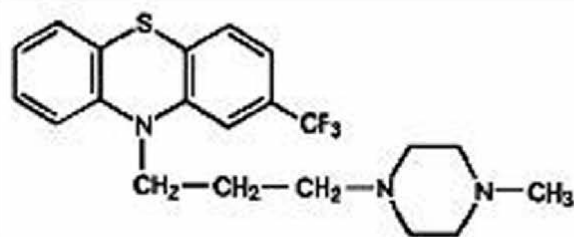
Формулы фенотиазинов



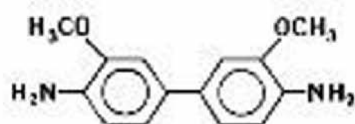
Аминазин



Тиопроперазин



Трифтазин



o-Дианизидин

Рисунок 1.
Структурные формулы фенотиазинов.

У ТП в положении 2 фенотиазинового ядра (в отличие от трифторметильной группы ТФ) располагается диметилсульфамидная группа. ТП оказывает сильное противорвотное действие, обладает относительно слабым седативным эффектом, мало влияет на вегетативную нервную систему. Препарат преимущественно назначается при различных формах шизофрении [1]. Действие АМ обусловлено его влиянием на биохимические системы мозга: он понижает чувствительность адренореактивных систем гипоталамуса и ретикулярной формации мозга к действию норадреналина, углубляет и пролонгирует действие гексенала, тиопентала, морфина, промедола, фенадона [3].

Ультрафиолетовые спектры 10-алкилпроизводных фенотиазина в этаноле имеют по два максимума поглощения в области 290-330 нм; у 10-ацилпроизводных наблюдается гипсохромное смещение обоих максимумов [4].

Производные фенотиазина легко окисляются кислородом воздуха. Реакции эти в большинстве своем мало специфичны и почти не изучены. Предполагается, что при окислении продукты реакции имеют нестабильную розовую окраску за счёт окисления атома серы, а также за счёт окисления ядра фенотиазина в положении 3 и 6. В зависимости от характера окислителя и условий выполнения реакции образуется смесь продуктов окисления, например 9-S-оксид и 9,9-диоксид [2].

Пероксидазное окисление ТФ и ТП не изучено. Возможно, что исследование этого процесса позволит разобраться в динамике их превращений в живых организмах и раскрыть особенности специфического действия препаратов фенотиазинового ряда.

Целью данной работы являлось исследование кинетических характеристик ТФ и ТП, как медленно окисляемых субстратов пероксидазы хрена, в стационарных условиях в широком диапазоне pH, а также изучение их влияния на окисление быстро окисляемого субстрата пероксидазы *o*-дианизидина (ОДН).

МЕТОДИКА.

Реактивы. В работе использовали пероксидазу хрена производства "Reanal" (Венгрия) со спектральным показателем чистоты $RZ=1,0$. Концентрацию фермента определяли спектрофотометрически при 403 нм ($\epsilon=100 \text{ мМ}^{-1}\cdot\text{см}^{-1}$ [5]) и по пиридингемокхромогену [6]. В работе также использовали АМ, ТФ и ТП ("Specia", Франция); их концентрацию определяли пользуясь молярным коэффициентом поглощения при 254 нм $29 \text{ мМ}^{-1}\cdot\text{см}^{-1}$, при 257 нм $28 \text{ мМ}^{-1}\cdot\text{см}^{-1}$ и при 265 нм $39 \text{ мМ}^{-1}\cdot\text{см}^{-1}$ соответственно. ОДН марки ч очищали возгонкой в вакууме. Концентрацию пероксида водорода ("Реахим", Россия) определяли спектрофотометрически, используя молярный коэффициент поглощения при 230 нм $72,7 \text{ мМ}^{-1}\cdot\text{см}^{-1}$ [7].

Методы. Реакцию окисления АМ (14-112 мкМ), ТФ (8,3-33,4 мкМ) или ТП (9,0-21,5 мкМ) пероксидом водорода (0,64 мМ) проводили при 25°C в среде 0,1 М натрий-ацетатного, pH 4,5-6,0, или 0,1 М Tris-HCl, pH 6,5-8,0, буферов объёмом 2,5 мл в диапазоне концентрации пероксидазы хрена 20-280 нМ. Окисление АМ, ТФ и ТП регистрировали по уменьшению поглощения на 254, 257 и 265 нм соответственно. Окисление ОДН регистрировали по возрастанию поглощения при 460 нм ($\epsilon=30 \text{ мМ}^{-1}\cdot\text{см}^{-1}$ [8]). Спектры и кинетические кривые снимали на двухлучевом спектрофотометре DMS 100 S фирмы "Varian" (США). Точность установки длины волны в диапазоне 200-900 нм $\pm 0,5$ нм, погрешность при поглощении 0-2 усл. ед. 1%, разрешение 0,1 нм. За единицу активности фермента принимали его количество, окисляющее 1 мкмоль субстрата (АМ, ТФ, ТП или ОДН) за 1 мин. Скорость сканирования длин волн 100 нм/мин.

Кажущиеся константы скорости окисления субстратов пероксидазы определяли из данных по стационарной кинетике [9].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. На рисунке 2 показаны спектры ТФ и ТП в 0,1 М натрий-ацетатном буфере при pH 4,5. Видно, что в спектрах производных фенотиазина проявляются три выраженных максимума поглощения

ФЕНОТИАЗИНЫ – СУБСТРАТЫ ПЕРОКСИДАЗЫ ХРЕНА

в УФ-области (ТФ - 215, 257, 310 нм; ТП - 235, 265, 310 нм). В процессе пероксидазного окисления в спектре поглощения ТФ появляются три максимума поглощения при 232, 303, 350 нм, а ТП - 243, 305, 355 нм. В течение первых минут проведения реакции спектры ТФ и ТП изменялись - максимумы поглощения при 257 и 265 нм полностью исчезали. Поэтому определение скорости пероксидазного окисления ТФ и ТП в присутствии пероксидазы хрена проводили, регистрируя уменьшение поглощения светопоглощения для ТФ при 257 нм, а ТП - при 265 нм. В отсутствие фермента реакции не наблюдались.

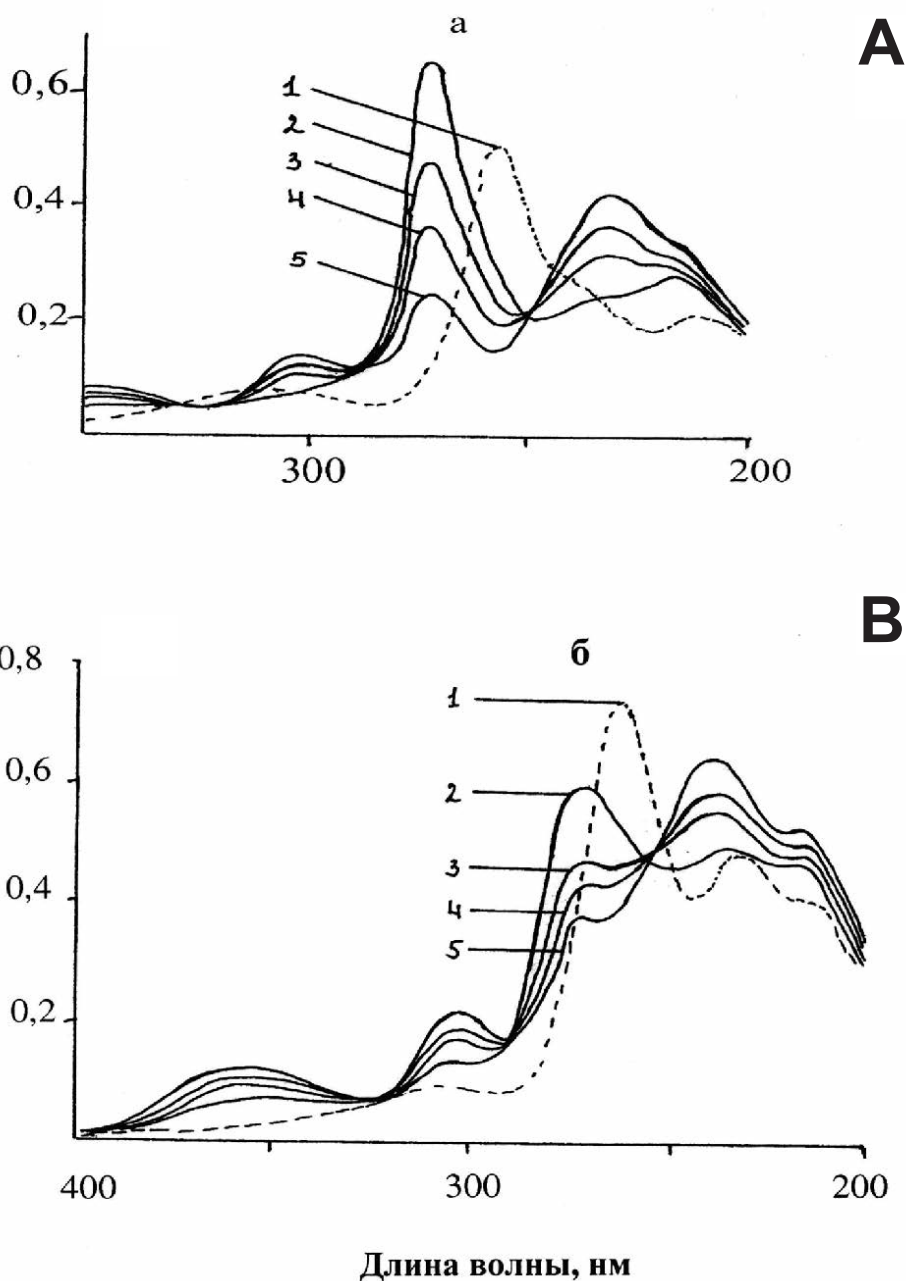


Рисунок 2.

Спектры поглощения ТФ (а), ТП (б) (А) и продуктов их пероксидазного окисления (В)
в 0,1 М натрий-ацетатном буфере, рН 4,5.

Время реакции, мин: 1-0, 2-1,5, 3-3,5, 4-6,5, 5-19,5 (ТФ); 1-0, 2-2,0, 3-5,5, 4-10,5, 5-37,0 (ТП).
Концентрации: ТФ - 17,4 мкМ; ТП - 19,0 мкМ; пероксидаза - 30,0 нМ; пероксид водорода - 0,64 мМ.

В стационарных условиях начальная скорость пероксидазного окисления ТФ и ТП подчиняется уравнению Михаэлиса-Ментен.

На рисунке 3 показаны зависимости начальных скоростей пероксидазного окисления ОДН в присутствии различных концентраций ТП. Графики в двойных обратных координатах при pH 4,0-5,5 имели вид параллельных прямых, что указывает на бесконкурентный или антиконкурентный характер ингибирования, различить которые можно построением в координатах Диксона [9]. Линеаризация в координатах Диксона свидетельствовала об антиконкурентном типе ингибирования. Величины константы ингибирования в зависимости от pH изменялись от 0,98 до 2,08 мМ. При pH 6 и выше наблюдалось последовательное окисление субстратов, причем в начале окислялся ТП, а затем происходило окисление ОДН.

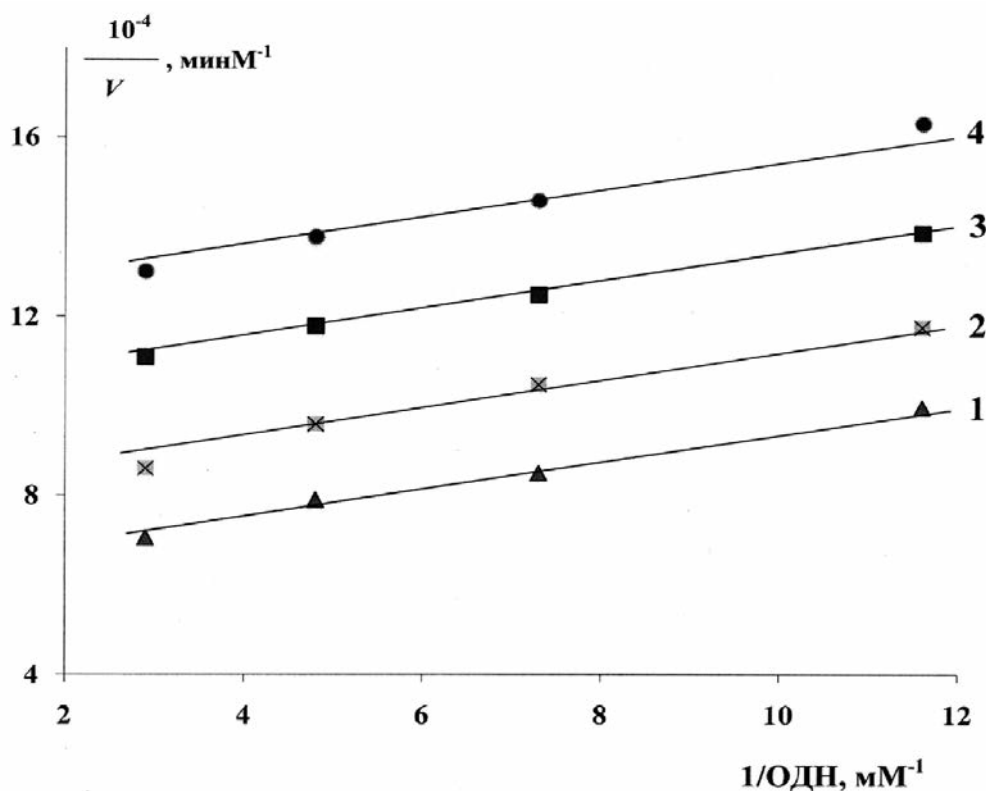


Рисунок 3.

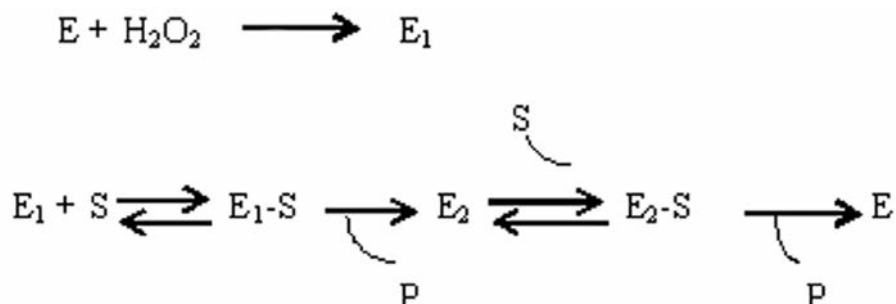
Зависимости начальной скорости пероксидазного окисления ОДН от его концентрации в двойных обратных координатах при различных концентрациях ТП, мМ: 1-0, 2-0,45, 3-0,90, 4-1,35; пероксидаза - 0,14 нМ; пероксид водорода - 0,64 мМ; 0,1 М натрий-ацетатный буфер, pH 5,5.

В исследуемом диапазоне pH ТФ не оказывал влияния на пероксидазное окисление ОДН. При pH 4,5-7,5 окисление ОДН и АМ протекает последовательно. Причём вначале преимущественно окисляется АМ, а затем начинает окисляться ОДН. Последовательность реакций, по-видимому, задается доступностью функциональных групп АМ к каналам электронного транспорта активных центров окисленных форм пероксидазы (E_1 и E_2).

Реакции пероксидазного окисления ТФ и ТП характеризуются низкими значениями каталитических констант 0,3-124 и 0,12-9,8 с⁻¹ соответственно, что позволяет отнести их к группе медленно окисляемых субстратов пероксидазы, таких как NADH [10] и ферроцианид калия [11].

ФЕНОТИАЗИНЫ – СУБСТРАТЫ ПЕРОКСИДАЗЫ ХРЕНА

На основании полученных данных индивидуальное окисление ТФ и ТП можно описать следующей схемой (1):



где E , E_1 , E_2 - пероксидаза и её окисленные формы; S - ТФ или ТП; E_1-S , E_2-S - комплексы окисленных соединений пероксидазы с медленно окисляемыми субстратами.

Величины K_m для ТФ и ТП мало различаются и составляют соответственно 10-330 и 22-196 мкМ в зависимости от pH. Значения K_m ТФ и ТП при pH>6,0 примерно такие же, как у ОДН [8].

Из pH-зависимостей lgk_{cat} и lgk_{cat}/K_m реакций пероксидазного окисления ТФ (рис. 4) и ТП (рис. 5) определяются ионогенные группы с pK 4,89, 5,64 и 5,43, 4,71 соответственно, депротонирование которых ухудшает каталитический процесс пероксидазного окисления соответственно ТФ в 413 раз, а ТП в 82 раза. Аналогичные ионогенные группы были выявлены в реакциях пероксидазного окисления аскорбиновой кислоты [12] и *n*-аминобензойной кислоты [13].

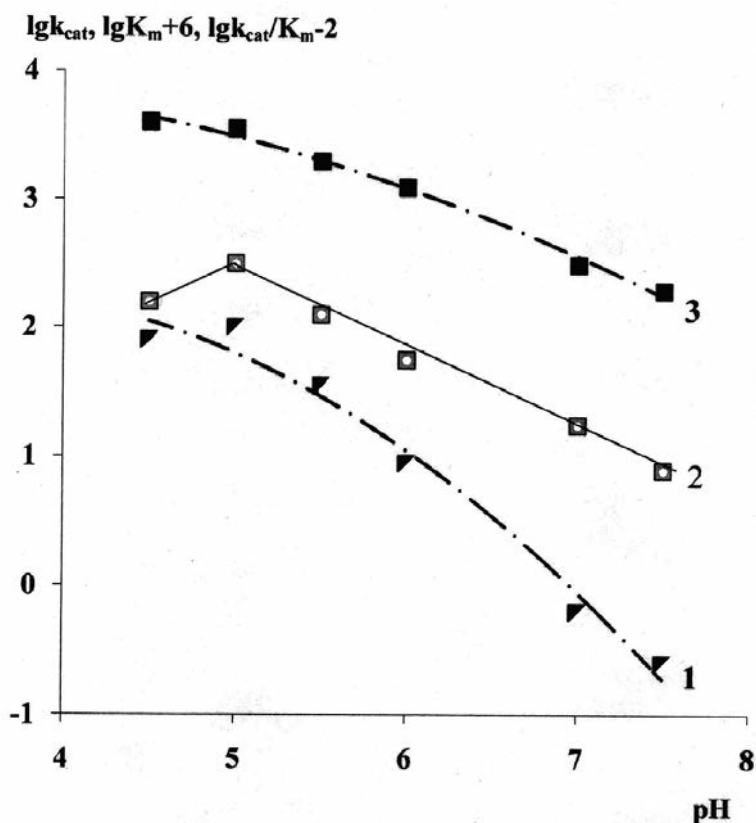


Рисунок 4.

pH-Зависимости lgk_{cat} (1), lgK_m (2) и lgk_{cat}/K_m (3) для реакций пероксидазного окисления ТФ.

Пунктирные кривые рассчитаны с использованием значений $pK_a=4,89$, $k_{cat(lim)}=129 \text{ c}^{-1}$; $pK_a=5,64$, $(k_{cat}/K_m)_{lim}=51,8 \times 10^4 \text{ c}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$.

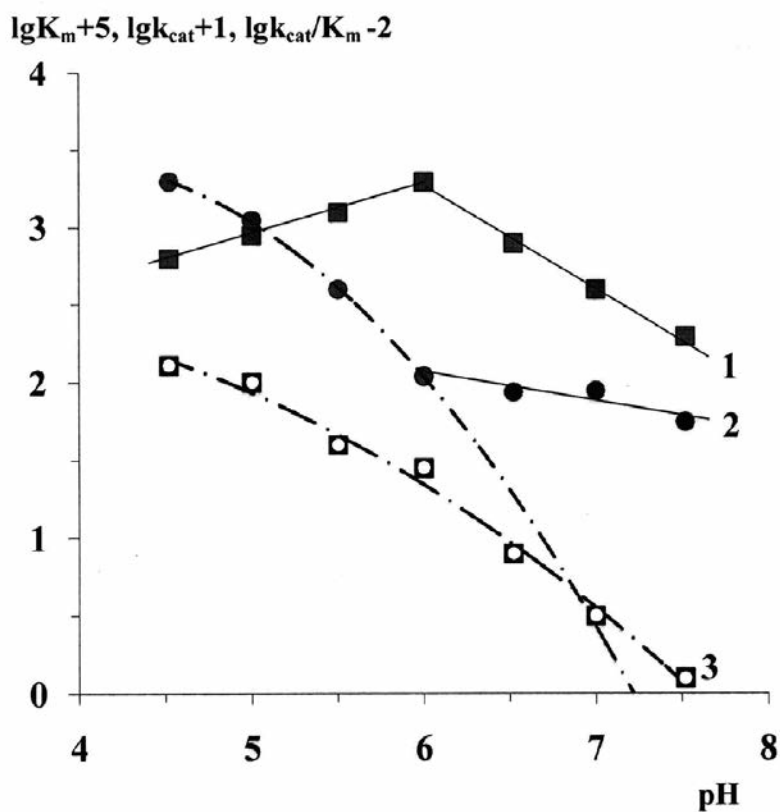


Рисунок 5.

рН-Зависимости $\lg K_m$ (1), $\lg k_{cat}/K_m$ (2) и $\lg k_{cat}$ (3) для реакций пероксидазного окисления ТП. Пунктирные кривые являются теоретическими для $pK_a=5,43$, $k_{cat(lim)}=12,9 \text{ c}^{-1}$; $pK_a=4,71$, $(k_{cat}/K_m)_{lim}=30,5 \times 10^4 \text{ c}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$.

При значениях $pH > 6,0$ имеет место отклонение опытных кривых рН-зависимостей для $\lg k_{cat}/K_m$ от теоретической для реакций пероксидазного окисления ТФ и ТП, что, возможно, вызвано проявлением действия ещё одной ионогенной группы свободного фермента, принимающей участие в связывании субстрата. Влияние аналогичной группы было выявлено в реакциях пероксидазного окисления ОДН в работе [8].

В отличие от АМ [14], у ТФ и ТП, с увеличением рН K_m понижается. При кислых значениях рН (4,5-5,5) ТФ окисляется быстрее АМ в 1,5-3 раза и в 9-12 раз эффективнее ТП. Константа Михаэлиса ТФ в 2-2,5 раза больше, чем у АМ, и в 1,5-3,5 раза - ТП. Однако при $pH > 6,0$ K_m ТФ и ТП понижаются и становятся соизмеримы с K_m для быстро окисляемого субстрата пероксидазы - ОДН [15].

Пероксидазное окисление ОДН достаточно хорошо изучено Лебедевой и Угаровой [8]. Показано, что индивидуальное окисление ОДН протекает через образование фермент-субстратного комплекса, в котором предполагается комплексообразование E_2 с радикалом полуокисленного субстрата ОДН. Из рН зависимости каталитических констант ($\lg k_{cat}$, $\lg K_m$) определяется ионогенная группа в активном центре фермента с pK 6,5, депротонирование которой уменьшает k_{cat} в 60 раз. Предполагают, что такой группой может быть имидазольная группа гистидина [16] или карбоксильная группа [17]. По-видимому, аналогичная группа проявляется в катализе медленно окисляемых субстратов пероксидазы ТФ и ТП.

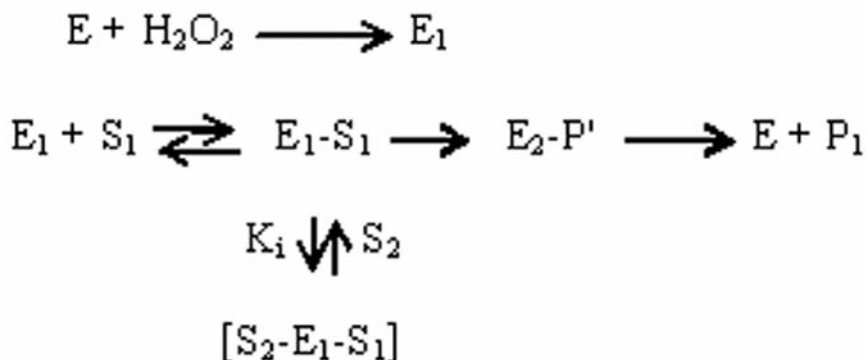
В биологических системах вероятнее всего протекают реакции совместного окисления субстратов пероксидазы. Экспериментами *in vitro* показано [18], что при совместном окислении различных субстратов пероксидазы наблюдаются эффекты взаимной активации и ингибирования. При этом ингибирование либо имеет конкурентный характер, либо связано с дифференцированным окислением субстратов в присутствии пероксидазы. Тогда как субстрат-субстратная активация сопровождается ускорением окисления медленно окисляемого субстрата быстро окисляемым. Изучение этих механизмов позволяет разобраться в сложном и до сих пор мало изученном механизме действия пероксидазы хрена.

Известно, что при совместном окислении ОДН и ферроцианида калия, окисление последнего осуществляется не свободным радикалом ОДН, а комплексом пероксидазы с полуокисленным субстратом. Несколько иной механизм наблюдали при совместном окислении ОДН и гидрохинона [19]. Гидрохинон и ОДН могут конкурировать за место связывания в активном центре фермента. Предварительное связывание ОДН улучшает последующее связывание гидрохинона, ускоряя процесс его пероксидазного окисления. При этом окисление ОДН не происходит до полного окисления гидрохинона.

Широкая субстратная специфичность пероксидазы, по-видимому, обусловлена возможностью реализации ферментом нескольких различных каналов транспорта электронов с субстратов, контактирующих с поверхностью белковой глобулы, на железо гема [18]. Причём субстраты пероксидазы можно разделить на две группы: доноры электронов и доноры атома водорода. В первую группу входят ферроцианид-, сульфит-, нитрит-, тиоцианат-ионы и органические молекулы - NADH [10], аскорбиновая кислота [12], АМ [14]. Во вторую - фенолы, амины и другие органические соединения [18]. Поэтому при совместном окислении быстро окисляемого субстрата пероксидазы (ОДН) с медленно окисляемыми субстратами (АМ, ТФ и ТП) могут реализоваться различные пути переноса электронов [19, 20].

Низкие константы скорости окисления фенотиразинов, возможно, как в случае с NADH и аскорбиновой кислотой, в первую очередь, обусловлены тем, что их окисление пероксидом водорода, протекает по одноэлектронному механизму, аналогично окислению неорганических субстратов пероксидазы [21, 22]. Поэтому при совместном окислении ОДН и различных фенотиразинов, фермент реализует различные пути переноса электрона с окисляемого субстрата, выбор которых определяется доступностью функциональных групп субстрата каналам переноса электронов на поверхности белковой глобулы. Среди изученных фенотиразинов расположение функциональных групп АМ обеспечивает его преимущественное пероксидазное окисление по сравнению с ОДН. При этом вначале полностью окисляется АМ, а уж затем протекает реакция пероксидазного окисления ОДН. При кислых значениях рН ТП и ОДН могут одновременно связываться в активном центре пероксидазы. Причём связывание ТП улучшает последующее связывание ОДН, но замедляет скорость его пероксидазного окисления, что проявляется в антиконкурентном типе ингибирования. При этом ТП связывается только с фермент-субстратным комплексом, и не связывается со свободным ферментом [9]. С возрастанием рН происходит депротонирование одной из функциональных групп активного центра фермента и это способствует переключению механизма переноса электронов с донора водорода ОДН, на преимущественное окисление донора электронов - ТП.

Для объяснения кинетики ингибирования пероксидазы ТП в реакции окисления ОДН может быть предложена схема (2):



где S_1 и S_2 - ОДН и ТП соответственно; E_1-S_1 , E_2-P' - комплексы окисленных соединений пероксидазы с ОДН; $S_2-E_1-S_1$ - комплекс пероксидазы с субстратами.

Противоположный эффект возникает при совместном окислении ОДН и ТФ. Последний возможно и связывается в активном центре фермента, однако его окисление не происходит, поскольку реализуется механизм окисления донора водорода - ОДН.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. Значение выявленных особенностей пероксидазного окисления фенотиразинов позволяет высказать предположения о возможных сроках нахождения фенотиразинов в организме человека, а также дать предположительную оценку эффективности их действия. Среди изученных фенотиразинов выраженное седативное действие ТФ можно объяснить за счёт того, что поскольку он в присутствии быстро окисляемого субстрата не окисляется пероксидазой, то он должен дольше сохранять свое функциональное действие. Быстрее всех в организме может окисляться АМ и его действие должно быть в связи с этим не продолжительным.

Кроме того, результаты спектральных исследований могут быть использованы в биохимических исследованиях при определении содержания фенотиразинов в биологическом материале.

ЛИТЕРАТУРА

1. Машковский М.Д. (1972) Лекарственные средства, Медицина, М.
2. Беликов В.Г. (1985) Фармацевтическая химия, Высш. школа, М.
3. Черняков Д.К., Евдокимов П.Д., Вишкер А.С. (1977) Лекарственные средства в ветеринарии, Колос, М.
4. Арзамасцев А.П., Яскина Д.С. (1975) Ультрафиолетовые и инфракрасные спектры лекарственных веществ, Наука, М.
5. Ogawa S., Shira Y., Morishima I. (1979) Biochem. Biophys. Res. Commun., **90**, 674-678.
6. Falk J.E. (1964) Porphyrins and Metalloporphyrins, Elsevier, London.
7. George P. (1953) Biochem. J., **54**, 267-276.
8. Лебедева О.В., Угарова Н.Н., Березин И.В. (1977) Биохимия, **42**, 1372-1379.
9. Березин И.В., Клесов А.А. (1976) Практический курс химической и ферментативной кинетики, МГУ, М.
10. Лебедева О.В., Угарова Н.Н. (1997) Биохимия, **62**, 249-253.
11. Угарова Н.Н., Лебедева О.В., Курилина Т.А., Березин И.В. (1977) Биохимия, **42**, 1577-1584.
12. Рогожин В.В. (2004) Пероксидаза как компонент антиоксидантной системы живых организмов, ГИОРД, СПб.

ФЕНОТИАЗИНЫ – СУБСТРАТЫ ПЕРОКСИДАЗЫ ХРЕНА

13. *Dunford H.B., Stillman J.S.* (1976) *Coord. Chem. Rev.*, **19**, 187-251.
14. *Рогожин В.В., Верхотуров В.В.* (1998) *Биохимия*, **63**, 661-666.
15. *Угарова Н.Н., Лебедева О.В., Савицкий А.П.* (1981) Пероксидазный катализ и его применение, МГУ, М.
16. *Jamada H., Makino R., Jamasaki J.* (1975) *Arch. Biochem. Biophys.*, **169**, 344-353.
17. *Кутузова Г.Д., Рогожин В.В., Угарова Н.Н., Березин И.В.* (1983) Докл. АН СССР, **270**, 994-998.
18. *Лебедева О.В., Угарова Н.Н.* (1996) Известия РАН. Сер. химическая, №1, 25-32.
19. *Газарян И.Г., Хушпультян Д.М., Тишков В.И.* (2006) Усп. биол. химии, **46**, 303-322.
20. *Veselova I.A., Kireiko A.V., Shekhovtsova T.N.* (2009) *Appl. Biochem. Microbiol.*, **45**(2) 125-129.
21. *Agha A.E., Abbeddou S., Makris D.P., Kefalas P.* (2009) *Biodegradation*, **20**, 143-153.
22. *Walt D.R., Gorris H.H.* (2009) *J. Amer. Chem. Soc.*, **131**(17), 6277-6282.

Поступила: 20. 10. 2009.

PHENOTHIAZINES ARE SLOWLY OXIDIZABLE SUBSTRATES OF HORSERADISH PEROXIDASE

T.V. Rogozhina, V.V. Rogozhin

Yakutsk State Agricultural Academy, ul. Krasil'nikova 15, Yakutsk, 677002 Russia;
e-mail: vrogozhin@mail.ru

Reactions of peroxidase oxidation of triftazine and thioproperazine have been investigated in the presence of horseradish peroxidase using steady state kinetic methods. It has been shown that phenothiazines are slowly oxidizable substrates for horseradish peroxidase. k_{cat} and K_m values have been determined in the range of pH from 4.5 to 7.5. The study of co-oxidation of phenothiazines and *o*-dianisidine (ODN) revealed that in the presence of aminazine and ODN in the reaction medium both substances follow sequential oxidation. ODN oxidation was not observed until full conversion of aminazine. At pH 4.5-5.5 thioproperazine bound to the enzyme-substrate complex and caused a nticompetitive inhibition of peroxidase. At pH>5.5 sequential substrate oxidation with preferential thioproperazine conversion occurred. In the range of pH from 4.5 to 7.5 triftazine did not influence ODN oxidation.

Key words: horseradish peroxidase, triftazine, thioproperazine, aminazine, *o*-dianisidine, phenothiazines.