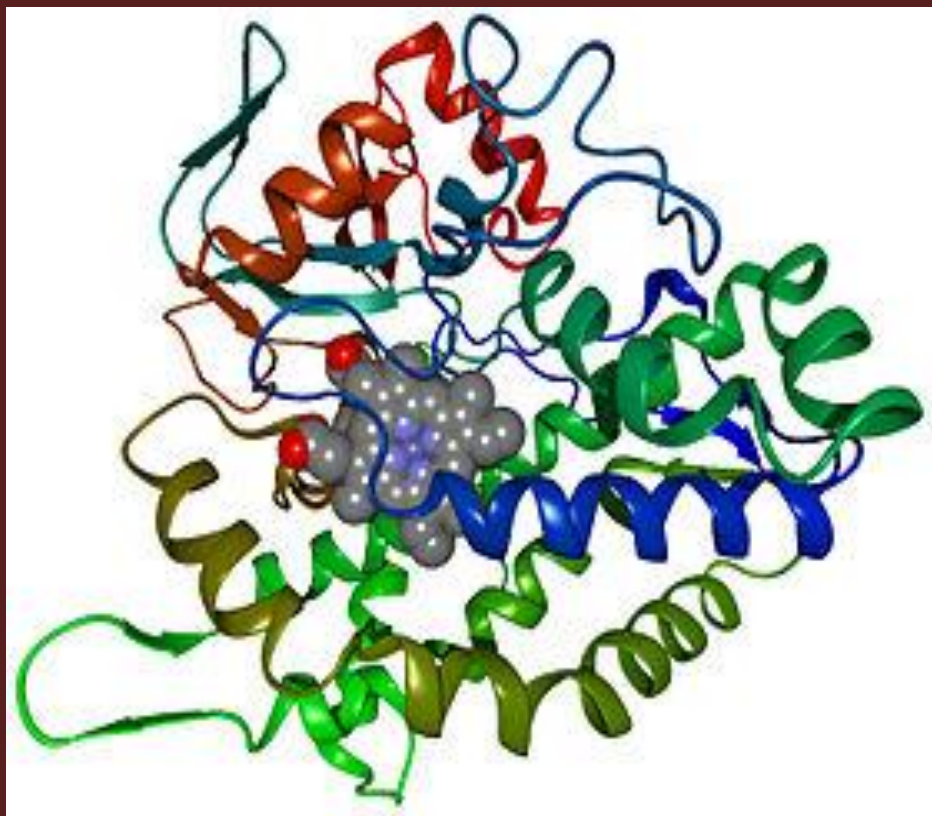
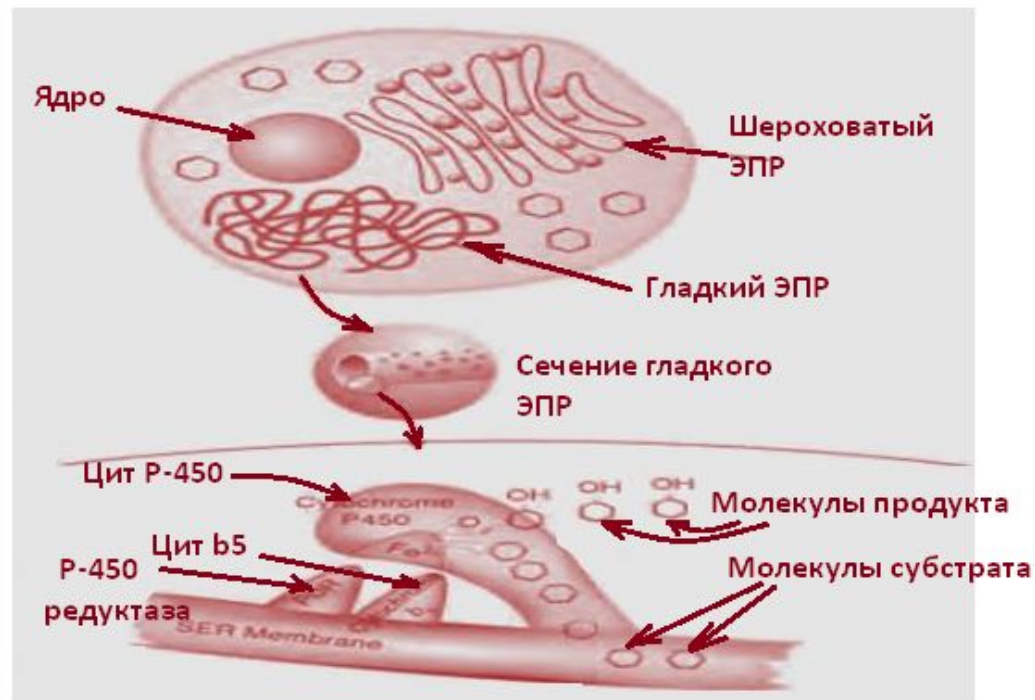


# Цитохромы P-450, b-5



Молекула P<sub>450</sub>eryF

**Цитохромы P450 (КФ 1.14.14.1) – семейство гем-содержащих монооксигеназ, осуществляющих метаболизм ксенобиотиков, в том числе лекарственных препаратов. Локализованы в гладком эндоплазматическом ретикулуме клетки, открыты – Д.Гарфинкель, М. Клингенберг, 1958.**



Цитохром P450 (англ. *Cytochrome P450*, CYP)

**Название указывает на то, что он окрашен (P – от английского Pigment).**

Цитохром P450, связанный с монооксидом углерода, имеет максимум поглощения света при длине волны **450 нм**, что определило его название (Т.Омура и Р.Сато в 1964 г.).

**СО не имеет никакого отношения к функции P450. Он добавляется для того, чтобы облегчить определение содержания P450 по интенсивности спектра поглощения.**

Использование термина «цитохром» применительно к гемопротеинам класса P450 нельзя считать удачным, так как функцией цитохромов является перенос электронов, а не катализ монооксигеназных реакций.

Цитохром P-450 относится к цитохромам типа b. Предшественник гема – протопорфирин IX.

Молекулярная масса различных цит. Р450 колеблется 44 - 60 кДа.

Мономеры гемопротейна состоят из одной полипептидной цепи, содержащей от 45 до 55% неполярных аминокислотных остатков.

Полная аминокислотная последовательность установлена для более чем 150 цит. Р450.

С помощью рентгеновской кристаллографии детально изучена трехмерная структура цит. Р450 из *P. putida*. Белок содержит 414 аминокислотных остатков, М.м. - 47 кДа, представляет собой асимметричную призму с основанием 3,0 нм и сторонами по 5,5 и 6,0 нм.

Цит. P450 из *P. putida* содержит 4 антипараллельных спиральных участка, смесь спиралей и неупорядоченных структур, перемежающихся параллельными бета-структурами. Гем расположен между двумя параллельными спиральями.

С пропионовыми группами гема взаимодействуют остатки Arg-112, Arg-229 и His-335. Другие аминокислоты, окружающие гем, неполярны. Гем не выходит на поверхность молекулы. Наименьшее расстояние от поверхности до гема составляет около 0,8 нм.

Все мембранные цитохромы P450 на N-концевом фрагменте пептидной цепи имеют короткий гидрофобный участок, содержащий от 12 до 21 аминокислотных остатков. Он выполняет роль якорного пептида и содержит **сигнальную последовательность**, ответственную за встраивание белка в мембрану. За ним расположена **стоп-сигнальная последовательность**, останавливающая встраивание пептида в фосфолипидный бислой.

Цитохромы  $P_{450}$  отсутствуют только у облигатно анаэробных организмов.

Описано не менее 11 500 ? белков системы Цит.

$P_{450}$

Цит.  $P_{450}$  бактерий и архей растворены в цитоплазме.

Переход к эукариотическим системам сопровождался встраиванием  $P_{450}$  в мембрану. Все цит.  $P_{450}$  высших организмов - мембранные ферменты.

В эволюционном плане наиболее древней является бактериальная монооксигеназа.



Система цит.  $P_{450}$  участвует в окислении многочисленных соединений, как эндогенных, так и экзогенных.

Цит.  $P_{450}$ -зависимые монооксигеназы катализируют расщепление различных веществ с участием донора электронов и молекулярного кислорода. В этой реакции один атом кислорода присоединяется к субстрату, а второй восстанавливается до воды.

Центр связывания кислорода – высокоспецифичен, центр связывания преобразуемого субстрата – относительно.

Ферменты семейства цитохрома P<sub>450</sub> разнообразны и различаются:

- по функциям,
- типами ферментативной активности,
- регуляторами активности (ингибиторами, индукторами).

Отдельные изоформы (изоферменты) цит. P-450 отличаются определенной специфичностью и каждая из них участвует в метаболизме относительно небольшого количества веществ.

Цитохром P450, наряду с **монооксигеназной** активностью, может проявлять **оксидазную** (А.И. Арчаков с сотр.), т.е. катализировать удаление водорода из субстрата, используя при этом в качестве акцептора водорода кислород и восстанавливать его до воды, или генерировать активные формы кислорода в виде супероксидного и гидроксильного радикалов, пероксида водорода.

P450 обнаруживает **пероксидазную активность**, используя в реакциях окисления в качестве ко-субстратов вместо NADPH органические пероксиды или пероксид водорода.

Имеются данные, что P450 может катализировать **диоксигеназные** реакции, вводить в окисляемое вещество два атома кислорода.

**Таким образом, характерной особенностью P450 является множественность функций, но основной является монооксигеназная.**

**Цит. Р-450 кодируются суперсемейством генов.**

**У человека в системе цит. Р-450 выявлено 57 генов и более 59 псевдогенов** (нефункциональные аналоги структурных генов, утратившие способность кодировать белок и не экспрессирующиеся в клетке. Термин «псевдоген» был впервые предложен в 1977 году.).

Nebert (1987) была разработана классификация цит.Р-450, основанная на **дивергентной эволюции и гомологии последовательностей нуклеотид/ аминокислотной.**

Суперсемейство подразделяется на 18 семейств и 43 подсемейства. Номенклатура генов цит. Р-450 человека описана подробно.

В настоящее время известны тысячи изоформ (изоферментов) цит. Р-450.

**Изоформы**, имеющие более 40 % общего аминокислотного состава, объединены в семейства и **обозначаются арабскими цифрами** (CYP1, CYP2, CYP3 и т. д.).

**Подсемеяства** обозначаются **латинскими буквами** и объединяют изоформы с идентичностью аминокислотного состава более 55 % (CYP2D, CYP3A и т.д.)

**В подсемеястве** отдельные изоформы обозначаются **арабскими цифрами**, следующими за латинскими буквами (CYP1A2, CYP2D6, CYP3A4).

Ксенобиотик может быть субстратом двух и более изоформы. Разные изоформы способны метаболизировать одно вещество в различных участках его молекулы

Цит. P<sub>450</sub> катализируют  $\omega$ -окисление насыщенных жирных кислот (ж.к.), перекисное окисление ненасыщенных ж.к., гидроксилирование стероидных гормонов, желчных кислот и холестерина, биосинтез простагландинов (локализованы в митохондриях, на ядерной мембране).

Цитохромы P<sub>450</sub> микросом участвуют в метаболической биотрансформации ксенобиотиков (лекарств, ядов, наркотических веществ).

В метаболизме ЛС принимают участие изоформы семейств I, II и III, из них основные — 1A1, 1A2, 2A6, 2B6, 2D6, 2C9, 2C19, 2E1, 3A4.

## Общие индукторы

Ферменты	Индуктор	Индуктор	Индуктор	Индуктор
	Фенобарбитал	Тяжелые металлы	Противо-опухолевые лекарства	Метил-холантрен
Система цитохрома P <sub>450</sub>	↑			
Система цитохрома P <sub>448</sub>				↑
Эпоксид-гидролазы	↑			
Глутатион и УДФ-глюкуронил-трансферазы	↑			
Синтез GSH		↑	↑	
Металло-тионеины		↑		
P-гликопротеин			↑	

**Фенобарбитал активирует синтез цит. P<sub>450</sub>, УДФ-глюкуронилтрансферазы и эпоксид гидролазы.**

Например, у животных, которым вводили индуктор фенобарбитал, увеличивается площадь мембран ЭР, которая достигает 90 % всех мембранных структур клетки, и, как следствие, - увеличение количества ферментов, участвующих в обезвреживании ксенобиотиков или токсических веществ эндогенного происхождения.

**Одновременный прием фенобарбитала и некоторых лекарственных препаратов, метаболизирующих при участии цит. P<sub>450</sub>, приводит к снижению эффективности последних за счет трансформации молекулы в процессе биотрансформации или быстрого их удаления из организма.**



В настоящее время описано **более 250 химических соединений**, вызывающих индукцию микросомальных ферментов.

Индукторы монооксигеназных систем разделяются на **два класса**.

Представители первого класса (инсектициды, этанол и др.) **вызывают выраженную пролиферацию гладкого эндоплазматического ретикула** в гепатоцитах и увеличение активности цитохрома P450.

Стимуляция метаболизма, вызываемая индукторами второго класса (ПАУ - полициклические ароматические углеводороды: тетрахлордибензодиоксин, 3-метилхолантрен, бенз(а)пирен и др.), **не сопровождается пролиферацией гладкого эндоплазматического ретикула**, но при этом существенно возрастает активность многих ферментов биотрансформации.

Усиление метаболизма большинства ксенобиотиков приводит к снижению токсичности. Вместе с тем токсичность некоторых ксенобиотиков под воздействием индукторов существенно возрастает. Например

**Имеются химические вещества, способные ингибировать как ферменты 1-й фазы биотрансформации (изоферменты цитохрома P-450) и 2-й фазы биотрансформации (N- ацетилтрансфераза и др.), так и транспортеры 3-й фазы (P-АТФазы).**

**При снижении активности ферментов метаболизма возможно развитие побочных эффектов, связанных с длительной циркуляцией этих соединений в организме.**

**Ингибирование транспортеров, как и их индукция, может приводить к различным изменениям (преимущественно к повышению) концентрации ксенобиотиков в плазме крови в зависимости от функций данного транспортера.**

# Электронтранспортные цепи ЭПР

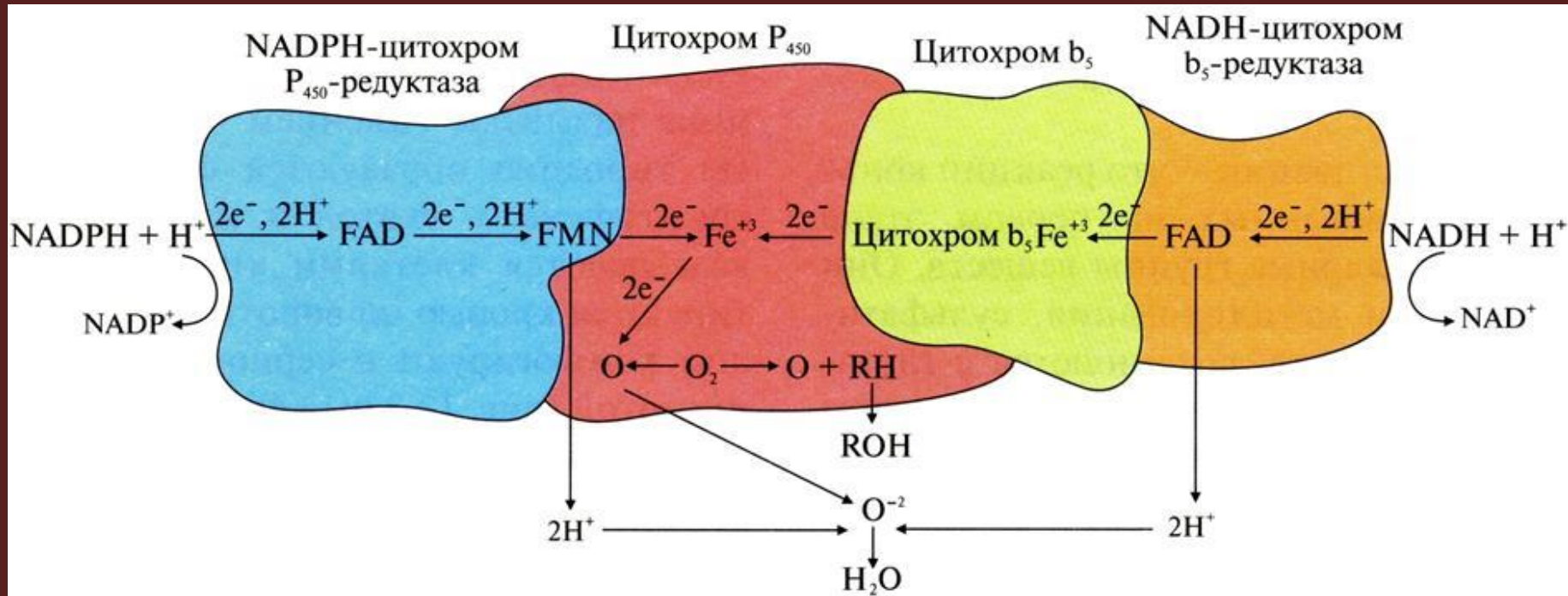
## 1 цепь включает:

1) цитохром  $P_{450}$ , имеет центры связывания для  $O_2$  и гидрофобного субстрата; 2) NADPH-цитохром  $P_{450}$ -редуктазу, содержащую коферменты FAD и FMN; 3) NADPH+H<sup>+</sup> – донор e<sup>-</sup> и H<sup>+</sup> в этой электрон-транспортной цепи; 4)  $O_2$ .

## 2 цепь включает:

1) цитохром  $P_{450}$ ; 2) фермент NADH-цитохром  $b_5$ -редуктазу, коферментом которой является FAD; 3) цитохром  $b_5$  – гемопротейн, переносящий e<sup>-</sup> от NADH-цитохром  $b_5$ -редуктазы на цитохром  $P_{450}$ ; 4) NADH + H<sup>+</sup> – донор e<sup>-</sup> и H<sup>+</sup>; 5)  $O_2$ .

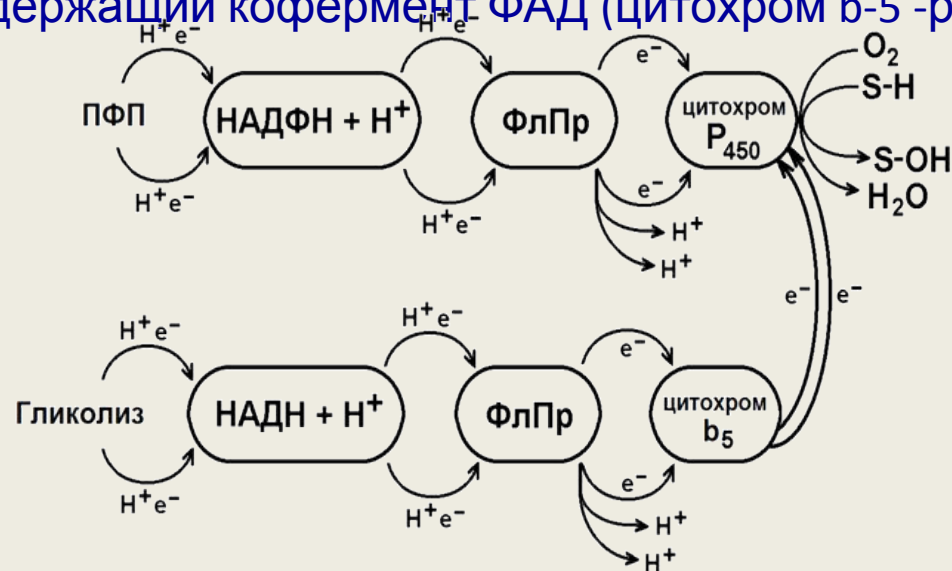
Цитохром  $P_{450}$  один атом  $O_2$  включает в молекулу субстрата, а 2-й восстанавливает с образованием  $H_2O$  за счет переноса e<sup>-</sup> и H<sup>+</sup> от NADPH+H<sup>+</sup> при участии цитохром  $P_{450}$ -редуктазы (или от NADH+H<sup>+</sup> с помощью цитохром  $b_5$ -редуктазы и цитохрома  $b_5$ ).



# Еще одна схема организации электронтранспортной цепи ЭПР

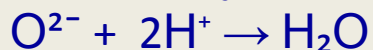
Источником электронов и протонов в цепи является НАДФН+Н<sup>+</sup>, который образуется в реакциях пентозофосфатного пути окисления глюкозы. Промежуточным акцептором Н<sup>+</sup> и е<sup>-</sup> служит флавопротеин, содержащий кофермент ФАД (цитохром Р-450-редуктаза). Конечное звено в цепи микросомального окисления - **цитохром Р-450**, восстанавливающий кислород до воды.

Работа системы цит. Р-450 сопряжена с работой системы цит. b-5, источником электронов и протонов в которой является НАДН+Н<sup>+</sup>, образующийся в гликолизе. Промежуточным акцептором Н<sup>+</sup> и е<sup>-</sup> служит флавопротеин, содержащий кофермент ФАД (цитохром b-5 -редуктаза).

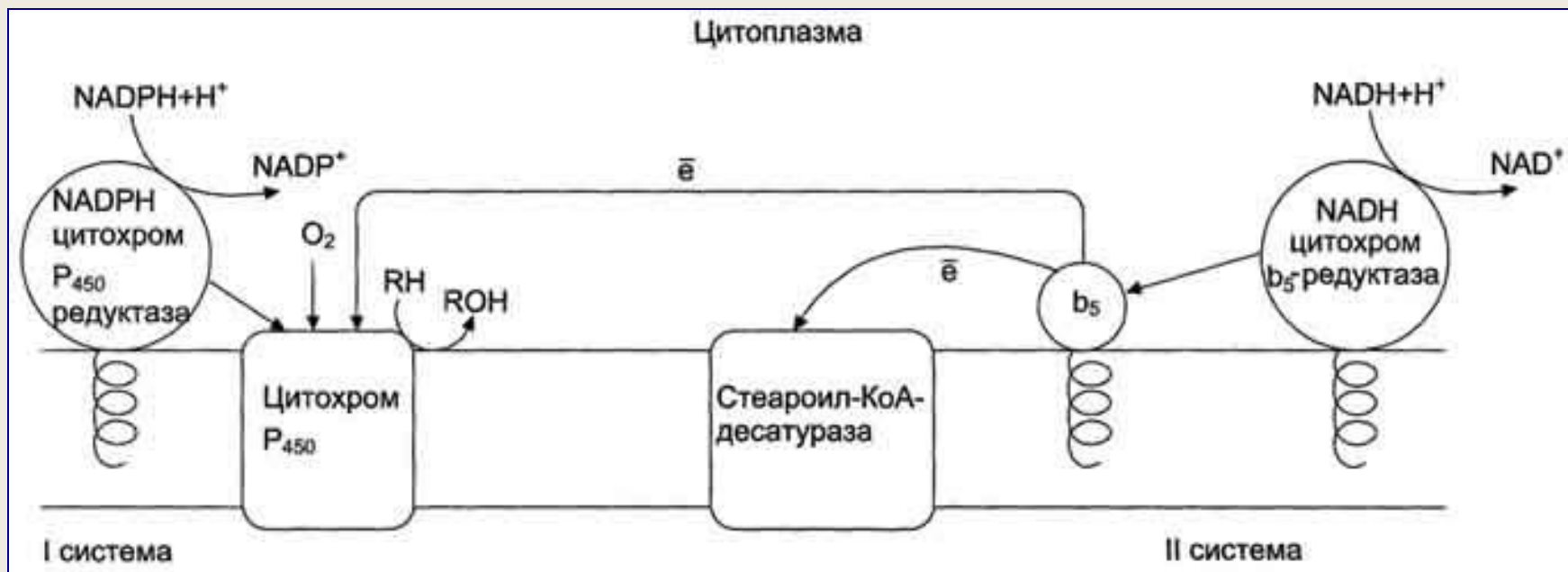


## Пример

RH – субстрат цит. P-450; стрелками показаны реакции переноса электронов. Восстановленную форму цит.-b5 окисляет стеариол-КоА-монооксигеназа, которая переносит электроны на O<sub>2</sub>. Один атом O<sub>2</sub> принимает 2 e<sup>-</sup> и переходит в форму O<sup>2-</sup>. Донором электронов служит НАДФН, который окисляется НАДФН-цит.Р-450-редуктазой. O<sup>2-</sup> взаимодействует с протонами с образованием воы:



Второй актом кислорода включается в субстрат RH, образуя гидроксильную группу вещества R-OH.

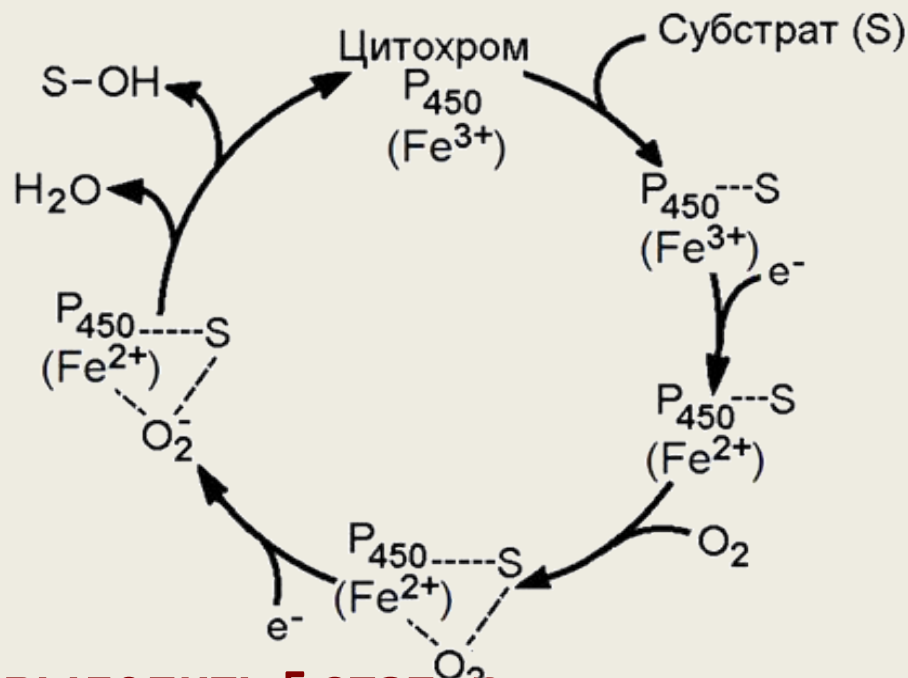


## **НАДФ-Н-цитохром Р-450-редуктаза – флавопротеин.**

Один моль фермента содержит по одному молю флавинмононуклеотида (ФМН) и флавинадениндинуклеотида (ФАД).

Поскольку цитохром С может служить акцептором электрона (используется в модельных системах), указанный фермент часто называют НАДФ-цитохром С-редуктазой.

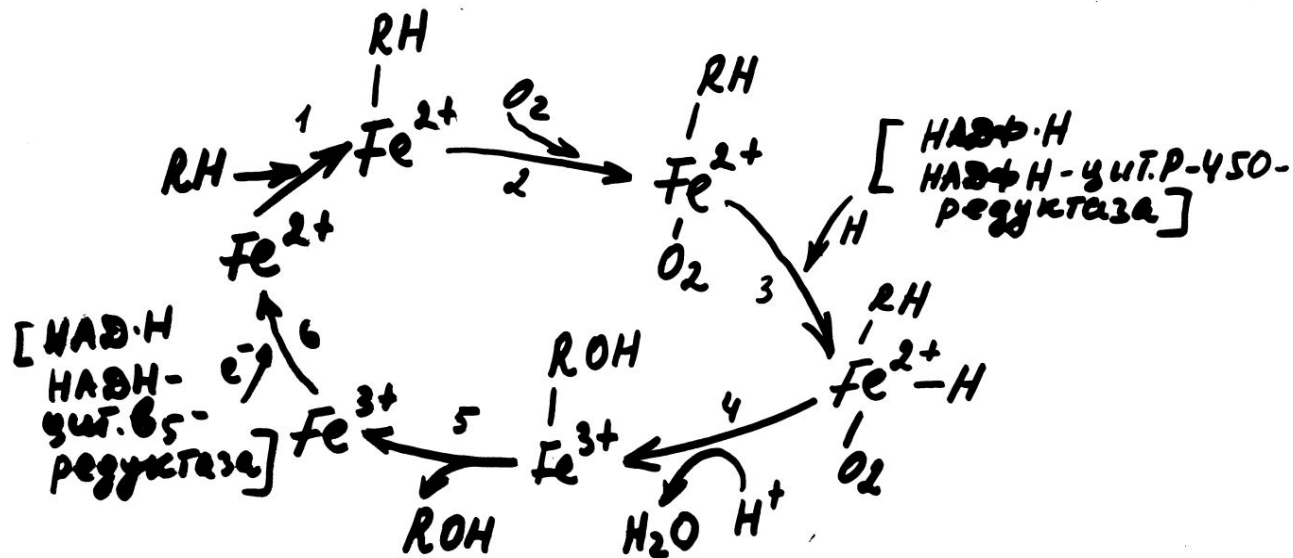
# Механизм гидроксилирования субстрата при участии цитохрома P-450



## Условно можно выделить 5 этапов:

1. окисляемое вещество (S) образует комплекс с окисленной формой цитохрома P-450;
2. происходит восстановление этого комплекса электроном от НАДФН;
3. восстановленный комплекс соединяется с молекулой O<sub>2</sub>;
4. O<sub>2</sub> в составе комплекса присоединяет ещё один электрон с НАДФН;
5. комплекс распадается с образованием молекулы H<sub>2</sub>O, окисленной формы цитохрома P-450 и гидроксилированного субстрата (S-OH).





$Fe^{2+}$  – восстановл. форма цит. P-450

$Fe^{3+}$  – окислен. форма цит. P-450

$RH$  – в-во, подвергающееся биотрансформации

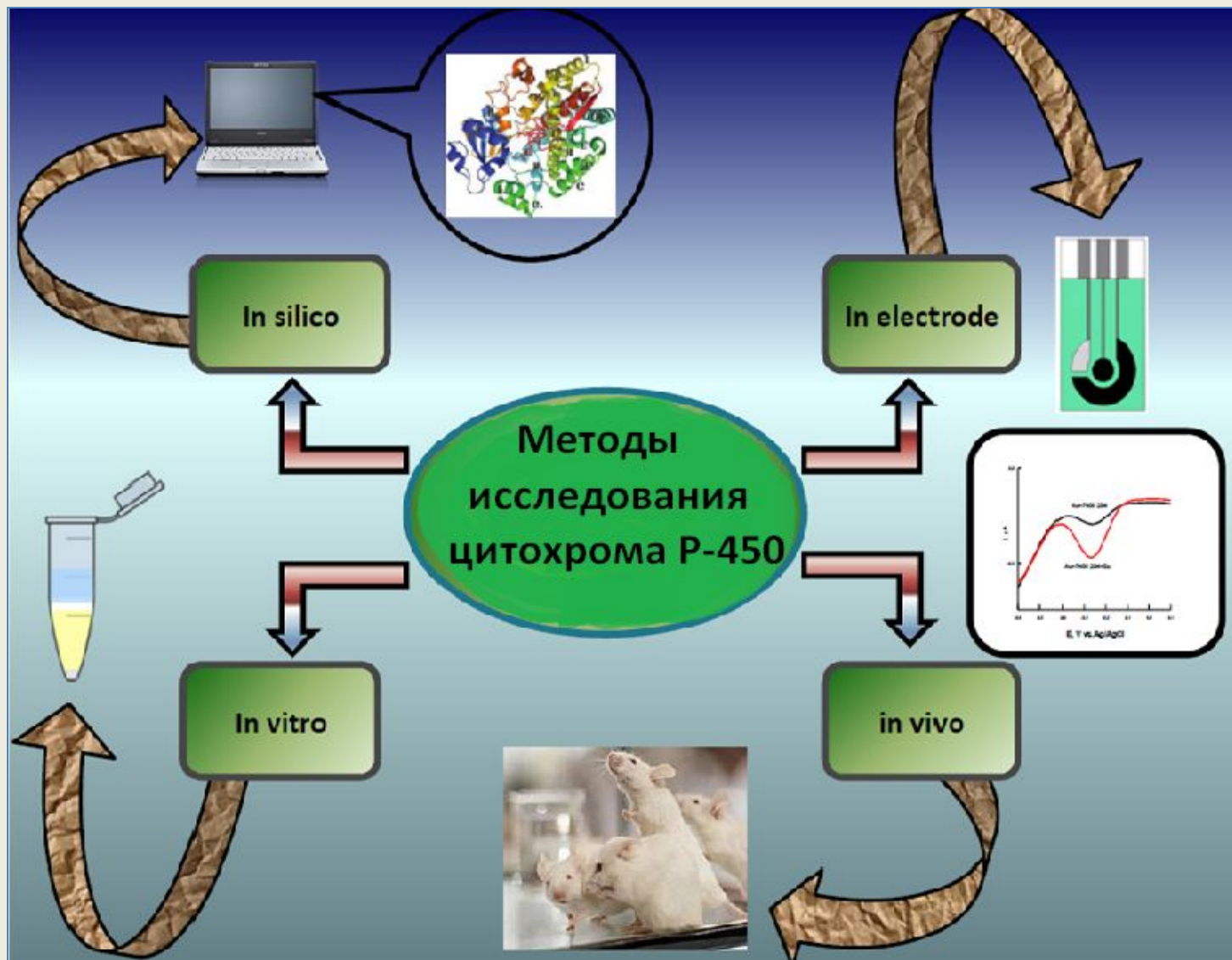
$ROH$  – гидроксилир. в-во

**МОДЕЛЬ 2. Упрощенная схема гидроксилирования ксенобиотиков микросомальными монооксигеназами (цитохром P-450)**

В отличие от митохондриальной дыхательной цепи, в монооксигеназной цепи при переносе электронов **не происходит** аккумуляирования энергии в виде АТФ.

Микросомальное окисление является **свободным окислением**.

В большинстве случаев гидроксилирование чужеродных веществ снижает их токсичность. Однако могут образоваться продукты с цитотоксическими, мутагенными и канцерогенными свойствами.



Цитохромы Р-450 являются мембранными белками и при исследовании их каталитической активности требуется сложное реконструирование монооксигеназной системы с использованием редокс-партнеров и фосфолипидов. Кроме того, изоферменты цит. Р-450 быстро инактивируются.

**Электрохимический метода анализа существенно упростил определение активности цит. Р-450.**

Первые работы, посвященные использованию электрода в качестве донора электронов для катализа цит. Р-450 (СУР ЗА4):

Кузнецов Б.А., Местечкина Н.М., Изотов М.В., Карузина И.И., Карякин А.В., Арчаков А.И. (1979) *Биохимия*, 44, 1569-1574.

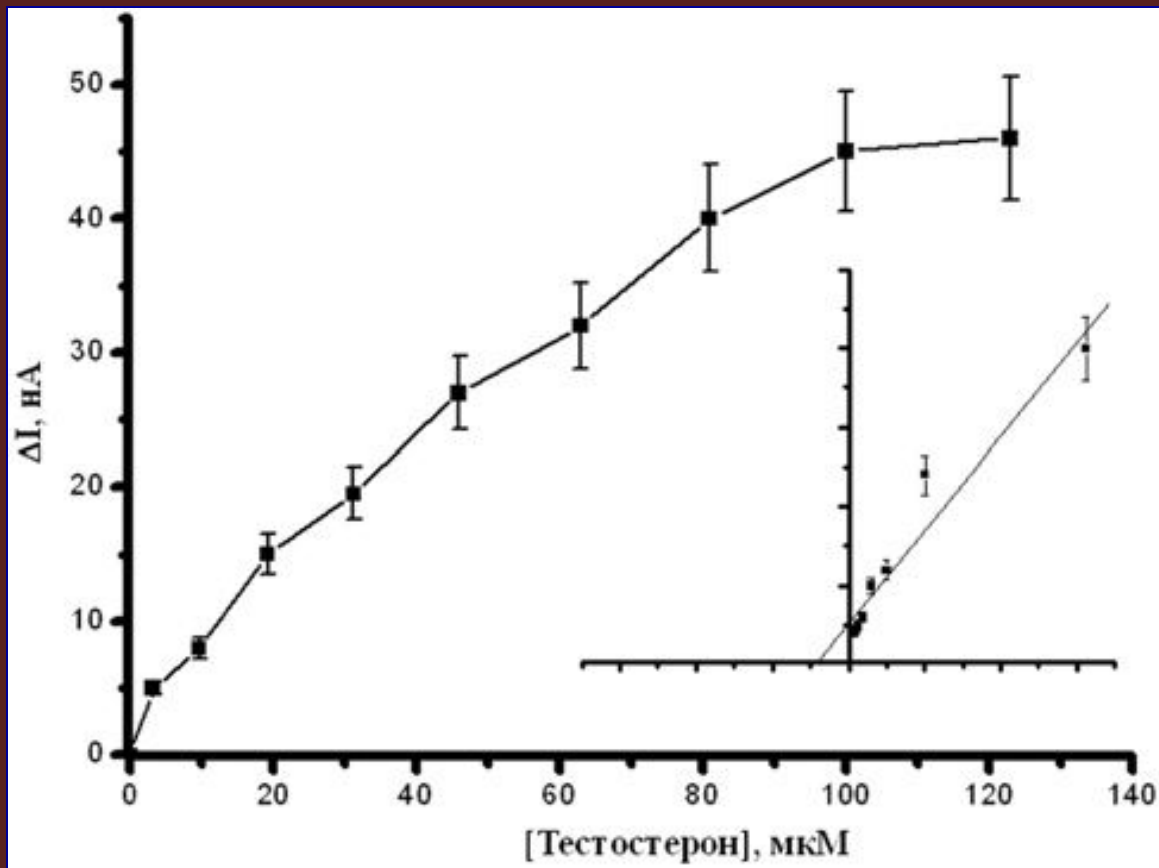
Арчаков А.И., Кузнецов Б.А., Изотов М.В., Карузина И.И. (1981) *Биофизика*, 26, 352-354.

В настоящее время разработаны **электрохимические биосенсорные системы на основе иммобилизованных на электроде цитохромов P-450.**

Электрокаталитическая реакция инициируется электронами с электрода. Это **исключает необходимость использования редокс-партнеров монооксигеназной системы и восстановительных эквивалентов НАДФН.**

Определение каталитической активности иммобилизованного цит. P-450 **осуществляется с помощью регистрации каталитического тока,** возникающего при внесении в электрохимическую систему субстрата.

Регистрация каталитического тока осуществляется **методами вольтамперометрии или амперометрии** и позволяет рассчитать многие характеристики ферментативного процесса: константу Михаэлиса-Ментен, электрохимическую каталитическую константу.



Зависимость изменения каталитического тока при амперметрическом титровании цит. Р-450 3А4 (СУР 3А4) тестостероном при контролируемом напряжении  $E = -0,5 \text{ В}$  (vs.  $\text{Ag}/\text{AgCl}$ ).

На вставке – расчет электрохимической  $K_m$  [тестостерон].

(В.В. Шумянцева и соав., 2015)

Разработка **биосенсоров** на основе электрохимических цитохром Р450-содержащих систем **позволяет выявлять субстраты (ксенобиотики), исследовать эффекты лекарственных препаратов на каталитическую активность конкретных изоформ цитохрома Р450.**

Цель – **создание сенсорных устройств**, пригодных для использования в персонифицированной медицине, проведения экспериментов по изучению влияния лекарственных препаратов на активность СYP в системах электрод/цитохром Р450.

# **Преимущества электрохимического метода исследования цитохром P450-монооксигеназной системы**

1) электрохимическая система **не требует использования дорогостоящих и неустойчивых восстановительных эквивалентов NADPH и NADH**, т.к. применяется альтернативный источник электронов – электрод;

2) **не требует полного реконструирования монооксигеназной системы** (использования всех компонентов микросомальной системы и белков редокс-партнеров каталитического цикла цитохрома P450);

3) **метод обладает высокой чувствительностью** и позволяет использовать минимальное количество дорогостоящего фермента (до 10-12 мкмоль белка/электрод);

4) **электрокатализ и контролируемость ферментативного процесса с помощью электрического тока обладает высокой эффективностью;**

5) **можно предотвращать инактивацию интактных изоформ P450** путем использования различных синтетических модификаторов поверхности электрода.



# Методы оценки состояния системы биотранс-формации ксенобиотиков:

## 1) Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ).

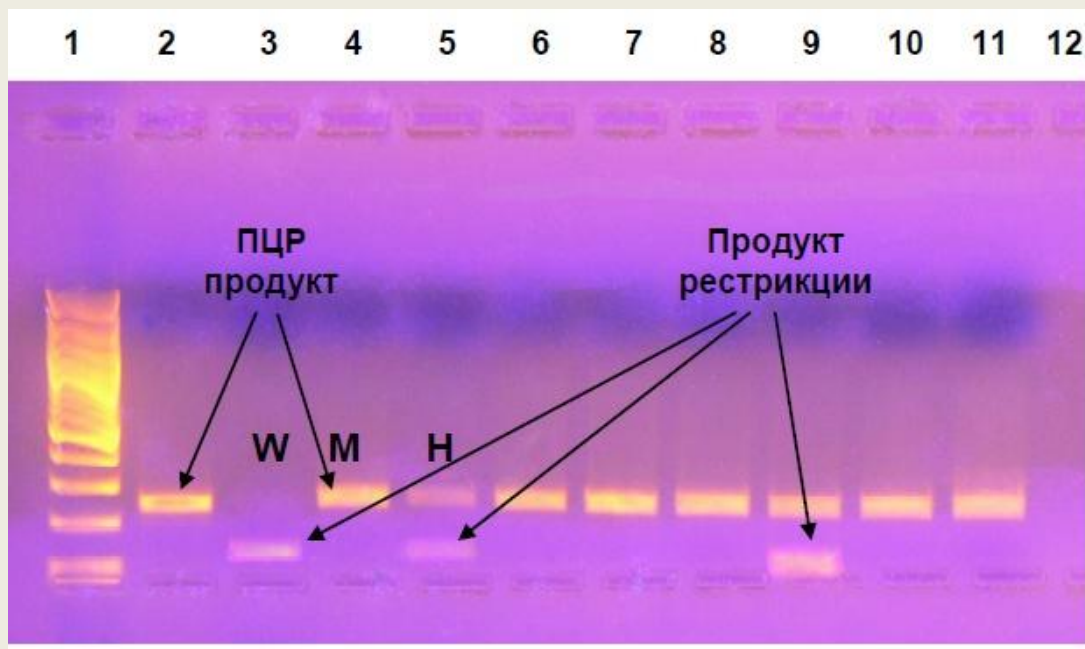
Дает возможность исследовать аналиты в моче, крови, слюне, другом биологическом материале после введения ксенобиотика (лекарственного вещества). Можно проводить кинетический анализ, позволяющий определить период полувыведения тестового препарата, объем кажущегося распределения, клиренс элиминации, исследовать другие параметры.

Аналит – это компонент или характеристика образца, подлежащий (ая) измерению.

Это понятие включает в себя любой элемент: ион, соединение, вещество, фактор, инфекционный агент, клетку, органеллу, активность (ферментативную, гормональную, иммунологическую) или признак: наличие или отсутствие, концентрацию, активность, интенсивность или другие характеристики, которые необходимо определить. Понятие сформулировано Национальным комитетом по клиническим лабораторным стандартам США (NCCLS, document NRSL8-A).

Близко к употребляемому у нас термину «лабораторный показатель», «параметр», «тест» и др.

## 2) ПЦР-ПДРФ анализ полиморфизма и мутантных форм генов цит.Р-450.



### Результаты анализа полиморфизма длины рестрикционных фрагментов (ПДРФ-анализ) гена **CYP1A2**:

- 1 – маркер молекулярных масс; 2, 4, 6, 7, 8, 10 и 11 – мутантный генотип – М (мутация в сайте рестрикции – рестрикция не происходит); 3 – мутация отсутствует – генотип дикого типа – W;
- 5 и 9 – гетерозиготный генотип – имеются все фрагменты – H;
- 12 – отрицательный контроль.

### **3) ДНК-чипы**

**Позволяют одновременно определять очень большое количество полиморфизмов в одной пробе.**

На твердом чипе очень небольшого размера в виде отдельных пятен размещается большое количество олигонуклеотидных зондов, каждый из которых обеспечивает специфическую гибридизацию с нормальными и мутантными аллелями множества различных генов.

Перед проведением гибридизации проводят неспецифическое флуоресцентное мечение исследуемой ДНК. В случае связывания ДНК образца с зондом на чипе выявляется флуоресцентный сигнал соответствующего участка чипа [Иванов, Терешин, Щербак, 2010].

**Зная, какая аллель отвечает за синтез того или иного изофермента цит.Р-450, можно определить какие ксенобиотики и каким путем будут биотрансформированы.**

## 4) Компьютерные программы для моделирования взаимодействия лигандов с цитохромами P450

Для изучения взаимодействия субстрата и фермента используются **методы молекулярного докинга и молекулярной динамики.**

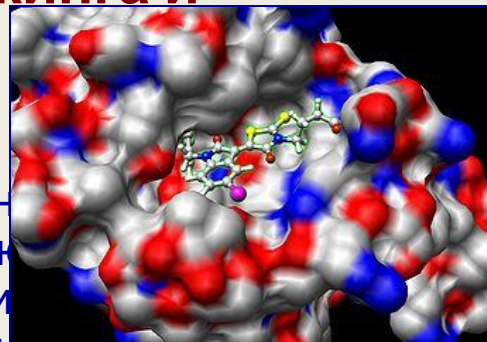
**Молекулярный докинг** (или молекулярная стыковка) — это метод молекулярного моделирования, который позволяет предсказать наиболее выгодную ориентацию и положение одной молекулы по отношению к другой.

При помощи **скоринговых функций** (англ. score - счет), определяют наиболее энергетически выгодные конформации лиганда в активном центре.

**Молекулярная динамика** — метод, в котором временная эволюция системы взаимодействующих атомов или частиц отслеживается интегрированием их уравнений движения. Играет важную роль (наряду с кристаллографией и ЯМР) в определении структуры белка и уточнении его свойств.

**Наиболее популярными пакетами программного обеспечения для моделирования динамики биологических молекул являются: AMBER, CHARMM (и коммерческая версия**

**CHARMMm), GROMACS, GROMOS, LAMMPS, HOOMD-blue, NAMD,**



При описании взаимодействия цит. P-450 и лигандов оценивается роль пространственных и энергетических факторов, т.к. вклад этих факторов для различных цит. P450 отличается.

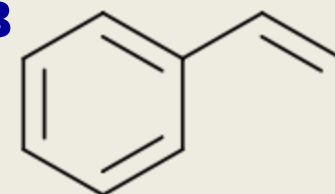
**Для исчерпывающего описания взаимодействия низкомолекулярного лиганда и цит. P-450 in silico и предсказания возможных биотрансформаций необходимо учитывать:**

- реакцию способность фермента,
- структуру активного центра фермента,
- расположение и конформацию лиганда в активном центре фермента,
- возможность множественных способов связывания субстрата в активном центре фермента (связывание может происходить опосредованно через молекулы воды),
- региоспецифичную реакцию способность, присущую самому субстрату (она может меняться в зависимости от конформации, принимаемой субстратом),
- аффинность продукта, который должен высвободиться из активного центра фермента.

**Р-ция наз. региоспецифичной**, если в качестве единств. продукта (в пределах ошибки) образуется один из двух или нескольких возможных региоизомеров.

Региоизомеры – это изомеры, образующиеся в результате преобразования одного из нескольких возможных реакционных центров, имеющих в молекуле субстрата.

Если один изомер лишь преобладает в продуктах р-ции, такая р-ция наз. **региоселективной**.



Напр., присоединение несимметричного электрофильного НВг к несимметричному стиролу  $C_6H_5CH=CH_2$  происходит региоспецифично: образуется только один из двух возможных продуктов присоединения –  $C_6H_5CHBrCH_3$ , но не  $C_6H_5CH_2CH_2Br$ .

**QSAR модели.** Количественные взаимоотношения структура-активность (QSAR - англ. сокр. от Quantitative Structure-Activity Relationships) позволяют по описанию структуры химических соединений предсказывать их свойства, в том числе устанавливать взаимодействие с цитохромами низкомолекулярных соединений и их биотрансформацию. **Например:**

**1) для классификации субстратов различных цитохромов применяются:**

метод построения опорных векторов,  
метод К-ближайших соседей,  
метод дерева принятия решений и др.

**2) для оценки взаимодействия лигандов, (субстратов и ингибиторов) с активным центром цитохрома используются трехмерные QSAR (3-D QSAR) методы.**

Суперсемейство цит. P-450 катализирует большое количество реакций, проходящих по разным механизмам, поэтому классические **QSAR методы не могут быть применены корректно для веществ, принадлежащих к различным классам.**

Для каждого отдельного цитохрома, метаболизирующего ксенобиотик, нужно строить специальную QSAR модель с использованием различных дескрипторов и разных математических методов.



## **Основные цитохромы P450, ответственные за метаболизм лекарств в организме человека исследуемые *in silico* – это подсемейство цит. P-450 3A.**

Цитохром P450 3A4 является мембраносвязанным белком, расположен в эндоплазматическом ретикулуме. Молекулярная масса 57299 D, в первичной структуре содержится 502 аминокислотных остатка. Ген CYP3A4 расположен в длинном плече седьмой хромосомы (7q22.1).

Подсемейство 3A – наиболее экспрессируемое в печени и кишечнике. Примерно 2/3 цитохромов печени принадлежат к этому подсемейству.

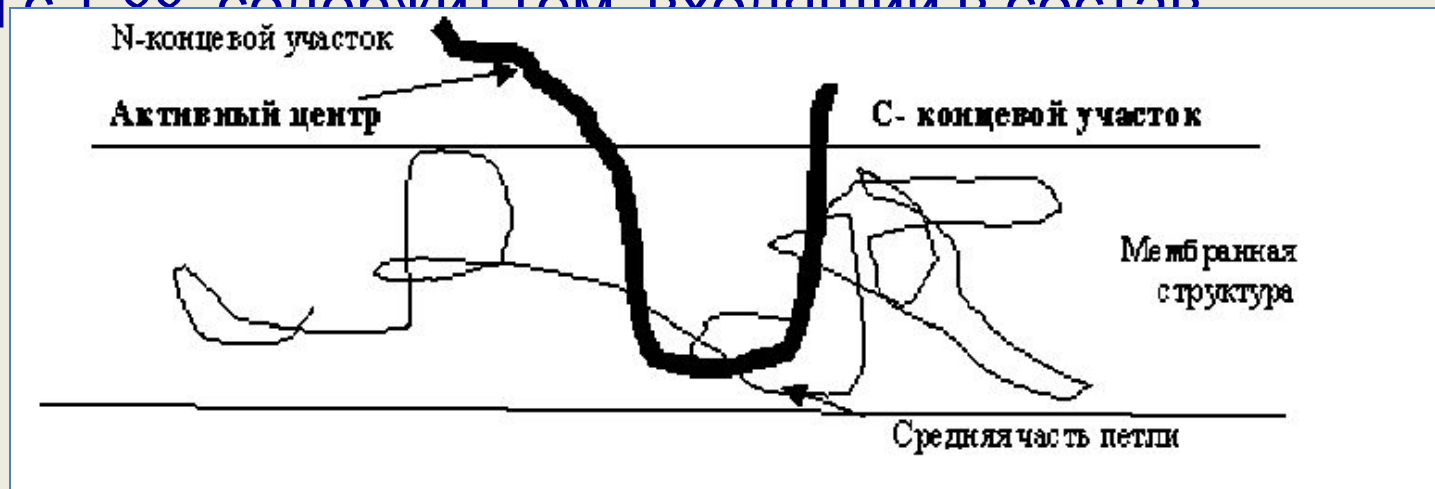
Два цит. P450 3A4 и 3A5 подробно описаны в литературе.

Цит. P450 3A5 чаще встречается у подростков, полиморфно экспрессируемый и не индуцируемый глюкокортикоидами, в отличие от 3A4. Существует еще одна эмбрионально экспрессируемая изоформа - 3A7 (составляет 50 % фетальных цитохромов P450).

**Цитохром  $b_5$**  – гемопротейн, участвует в разнообразных биохимических окислительно-восстановительных реакциях в качестве переносчика электронов.

**Молекула митохондриального цитохрома  $b_5$**  состоит из двух доменов - гидрофильного и гидрофобного .

**Гидрофильный N-концевой участок** расположен на поверхности мембраны ЭР, образован аминокислотными остатками с 1-88, содержит гем, входящий в состав активного



Схематичное изображение расположения молекулы цитохрома  $b_5$  в мембране.

**Гидрофобный домен цитохрома  $b_5$**  закорен в липидном бислое (ЭПР или митохондриальной), спирализован, образован остатками аминокислот С-конца белковой молекулы (остатки аминокислот 89-133).

С помощью компьютерного моделирования показано, что С-концевой участок молекулы цитохрома  $b_5$  образует петлю и пронизывает липидную мембрану насквозь.

Наибольшая гидрофобность наблюдается в средней части петли, которая погружена в мембрану.

С-концевая часть молекулы фермента играет важную роль при встраивании в мембрану, ориентации энзима в липидном бислое, обеспечении функциональной активности.

**Цитохром  $b_5$  наружной мембраны митохондрий**, по сравнению с микросомальным обладает более низким редокс-потенциалом, молекула более устойчива к химической и термической денатурации, связь между апопротеином и гемом значительно прочнее.

В молекуле цитохрома  $b_5$  митохондрий выявлено **два гидрофобных участка**. Первый формируют остатки аланина-18, изолейцина-32, лейцина-36 и лейцина-47. Второй – изолейцин-25, фенилаланин-58, лейцин-71 и гем.

С использованием мутантных форм молекулы показано, что оба гидрофобных участка имеют большое значение в поддержании стабильности молекулы. При отсутствии или замены в них аминокислотных остатков взаимодействие апопротеина с гемом снижается.

## **Роль цитохрома $b_5$ в реакциях, катализируемых изоформами системы цитохрома P-450.**

### **Возможные механизмы стимулирующего влияния цит. $b_5$ на изоформы цит. P-450:**

- прямая передача электрона в монооксигеназной реакции, без посредства НАДФ цитохром P-450 редуктазы;
- в случае использования второго электрона от цитохрома  $b_5$  в монооксигеназном цикле происходит образование более активных радикалов кислорода, что, в свою очередь, сопровождается более быстрым образованием метаболита;

- цит.  $b_5$  взаимодействует с цит. P-450 с образованием комплекса двух гемопротейнов и последующей передачей двух электронов от НАДФН цитохром P-450 редуктазы. Это повышает скорость образования активного кислорода и устраняет необходимость повторного взаимодействия цит. P-450 и НАДФН цитохром P-450 редуктазы;
- цит.  $b_5$  может осуществлять аллостерическую стимуляцию цит. P-450 без переноса электронов, например на втором этапе каталитического цикла;
- цитохром  $b_5$  может оказывать защитное действие на молекулы терминальной оксигеназы, которое не связано с реакциями окислительно-восстановительного цикла, что предотвращает ее разрушение.

## **Влияние цит. $b_5$ на изменение скорости реакции, спектра метаболитов и образование активных форм кислорода в реакциях системы цит. P-450.**

- в присутствии цит.  $b_5$  скорость метаболизма большинства эндогенных соединений и ксенобиотиков чаще всего повышается;
- влияние цит.  $b_5$  на биотрансформацию одного и того же соединения, например андростендиона, у разных видов животных неодинаково. У кроликов в присутствии цит  $b_5$  скорость метаболизма стероида цит. P-450 2B5 повышается, а у собак – цит. P-450 2B11 снижается;

- цит.  $b_5$  у разных видов (человек и хомячок) может не изменять скорости окисления соединения (нитрозамин) или оказывать стимулирующее действие;
- наличие цит.  $b_5$  изменяет спектр метаболитов, образующихся при биотрансформации соединения одной и той же изоформой цит. P-450, например тетрахлорбифенила цит. P-450 2B1;
- в присутствии цит.  $b_5$  уменьшается образование активных форм кислорода, гиперпродукция которых оказывает негативное действие на жизнедеятельность клеток организма;
- метаболизм биологически активных соединений (арахидоновая кислота, лейкотриены) происходит только в присутствии цит.  $b_5$  .



## Влияние цитохрома $b_5$ на изменение скорости реакции, спектра метаболитов и образование активных форм кислорода в реакциях при участии различных изоформ цит.Р-450 (фрагмент)

Изоформа цитохрома Р-450	Субстрат	Изменение скорости реакции	Изменение спектра метаболитов	Образование активных форм кислорода
Р-450 1А1	тетрахлорбифенил	↓		
Р-450 1А2	метанол, 7-этоксикумарин	↑П		↓
Р-450 2А1	9-антралдегид	↑П		
Р-450 2В1	Андростендион	↑П		
- II -	2-хлор-1,1-дифлуорэтина	↑П		
- II -	тетрахлорбифенил (2,2',5,5'- и 2,3',4',5-)	↑П	изменяется	
- II -	тетрахлорбифенил (2,3,4,4-)	↓	изменяется	
Р-450 2В2	9-антралдегид	↑П		
Р-450 2В4	Тетранитрометан	↑Н		
- II -	Аминопирин	↑П		
Р-450 2В5	Андростендион	↑П		
- II -	Тестостерон	не изменяет	изменяется	

## **НАДН-цитохром b5-редуктаза – флавопротеин.**

Это двухдоменный белок, глобулярный цитозольный домен связывает ФАД, гидрофобный домен (единственный «хвост») закрепляет белок в мембране.