

გ. ხატისაშვილი, მ. გორდეზიანი, თ. ვარაზი,  
მ. ყურაშვილი, მ. ფრუიძე

# **ბიოქიმიკანების ოქსიგენაზები**

(ფიზიოლოგია და ბიოქიმია)

თბილისი  
2009

G. Khatisashvili, M. Gordeziani, T. Varazi, M. Kurashvili, M. Pruidze

**Oxygenases of Biomembranes  
(Physiology and bBiochemistry)**

**Tbilisi, 2009**

**დურმიშიძის ბიოქიმიისა და ბიოტექნოლოგიის ინსტიტუტი  
Durmishidze Institute of Biochemistry and Biotechnology**

**გ. ხატისაშვილი, მ. გორდეზიანი, თ. ვარაზი, მ. ყურაშვილი, მ. ფრუიძე  
ბიომემბრანების ოქსიგენაზები (ფიზიოლოგია და ბიოქიმია)**

მონოგრაფიაში განხილულია მონოოქსიგენაზური ფერმენტული სისტემა, რომელიც ქსენობიოტიკების მეტაბოლურ გარდაქმნებზეა ორიენტირებული. ეს რთული მულტიფერმენტული კომპლექსია და ფართოდაა გავრცელებული ცოცხალ სამყაროში. წარმოდგენილი მასალა “ეკოლუციური ქრონოლოგიით” ასახავს, როგორ იტვირთეს P450-შემცველმა მონოოქსიგენაზებმა დეტოქსიკაციის ფუნქცია.

ნაშრომში დეტალურადაა გააანალიზებული ლიტერატურული და საკუთარი მონაცემები მონოოქსიგენაზების ფიზიოლოგიური და ბიოქიმიური როლის შესახებ. ცალკე თავი აქვს დათმობილი ციტოქრომ P450-ის ფერმენტული აქტივობის რეგულაციის ფუნქციურ და სტრუქტურულ ასპექტებს.

წიგნი განკუთვნილია განსხვავებული დარგების სპეციალისტებისათვის: ქიმიკოსებისათვის, ბიოქიმიკოსებისათვის, ბიოფიზიკოსებისათვის ფარმაკოლოგიებისათვის, ტოქსიკოლოგებისათვის, ეკოლოგებისათვის, ფიზიოლოგებისათვის, აგრეთვე ბიოფაკულტეტების პედაგოგებისა და ზედა კურსების სტუდენტებისათვის. იგი შეიძლება სასარგებლო აღმოჩნდეს მემბრანულ ბიოლოგიაში და ტოქსიკოლოგიაში მომუშავე მედიკოსებისათვის.

**რედაქტორი:** საქართველოს მეცნიერებათა ეროვნული აკადემიის  
წევრ-კორესპონდენტი **ნ. ალექსიძე**

**რეცენზენტი:** ბიოლოგიის მეცნიერებათა კანდიდატი **ე. იმედიე**

ISBN 978-9941-0-1699-8

ოქსიგენაზები. ფიზიოლოგია და ბიოქიმია (შესავალი).....	6
<b>თავი 1.</b> მონოოქსიგენაზები.....	9
მოქმედების ფუნქცია, სტრუქტურული ორგანიზაცია, და კატალიზური ციკლი.....	9
მონოოქსიგენაზების კვლევის მოკლე ისტორიული მიმოხილვა.....	9
1.1 მიკროსომული ჰიდროქსილირების ბიოლოგიური აზრი და მისი მექანიზმი.....	14
1.2 ოქსიგენაზები.....	19
1.3 მიკროსომული მონოოქსიგენაზების ფერმენტული შემადგენლობა.....	22
1.3.1 NADPH-ციტოქრომ P450-რედუქტაზა (NADPH-სპეციფიკური ფლავოპროტეინი EC 1.6.2.4).....	23
1.3.2 NADH-ციტოქრომ b <sub>5</sub> -რედუქტაზა (EC 1.6.2.1).....	28
1.3.3 ციტოქრომი b <sub>5</sub> .....	32
1.3.4 ციტოქრომ P450 – მიკროსომების ელექტრონთა სატრანსპორტო სისტემის ტერმინალური კომპონენტი.....	41
1.3.4.1 მიკროსომული ჰიდროქსილირების ცალკეული სტადიები (მონოოქსიგენაზური ციკლი).....	55
1.4 ციტოქრომ P450-ის მრავლობითი ფორმები და მათი თანამედროვე ნომენკლატურა.....	77
1.4.1 ციტოქრომ P450-ის მრავლობითი ფორმების ინდუქცია.....	88
1.5 მიკროსომული ფოსფოლიპიდი – მაჰიდროქსილირებელი კომპლექსის აუცილებელი კომპონენტი.....	92
ლიტერატურა.....	102
<b>თავი 2.</b> ოქსიგენაზები შიდაუჯრედულ მეტაბოლურ ცვლაში.....	124
2.1 ციტოქრომ P450 მცენარის აზოტფიქსაციაში.....	124
2.2 ოქსიგენაზები ცხიმოვან მჟავათა ზეჟანგურ ჟანგვაში.....	125
2.2.1 ჯაჭვის გაგრძელების სტადია.....	131
2.2.2 ციტოქრომ P450-ის მონაწილეობა ცხიმოვანი მჟავების ჰიდროქსილირებასა და ეპოქსიდირებაში.....	142
2.3 ციტოქრომ P450 ფენოლურ ნაერთთა ბიოგენეზში.....	148
2.4 ციტოქრომ P450 ალკალოიდების ბიოსინთეზში.....	152
2.5 ციტოქრომ P450-ის მონაწილეობა ჰიბერელინების ბიოსინთეზში.....	155
2.6 სტეროიდთა მაჰიდროქსილირებელი ოქსიგენაზები.....	158
2.6.1 თირკმელზედა ჯირკვლის ქერქის მიტოქონდრიების ციტოქრომ P450.....	160
2.6.2 NADPH-ადრენოლოქსინრედუქტაზა (EC 1.6.7.1).....	164
2.6.3 ადრენოლოქსინი.....	165
2.6.4 სტეროიდმაჰიდროქსილირებელი სისტემის მოქმედების მექანიზმი.....	168
2.6.4.1 ქოლესტერინის გვერდითი ალიფატური ჯაჭვის მოხლეჩვის მექანიზმის შესახებ.....	176

2.6.5 ქოლესტერინი მცენარეში და მისი მეტაბოლური გარდაქმნები .....	181
2.6.5.1 ქოლესტერინის ეთერიფიკაცია მცენარეში .....	181
2.6.5.2 ქოლესტერინის ჟანგვა მიკროორგანიზმებსა და მცენარეში (შედარებითი ანალიზი) .....	184
2.7 ურთიერთკავშირი ოქსიგენაზურ და იმუნურ სისტემებს შორის .....	191
2.7.1 მოლეკულური რეცეპტოროლოგიის ზოგადი პრინციპები.....	198
2.7.2 ოქსიდაზები და ოქსიგენაზები მცენარის მდგრადობასა და ფიტოიმიუნიტეტში.....	201
ლიტერატურა .....	207
<b>თავი 3.</b> ოქსიგენაზები ქსენობიოტიკების დეტოქსიკაციაში .....	219
3.1 ციტოქრომ P450-ის როლი ქსენობიოტიკების მეტაბოლიზმში.....	219
3.2 ციტოქრომ P450-ის მიერ კატალიზებული რეაქციები .....	222
3.2.1 ჰიდროქსილირება.....	223
3.2.2 დემეთილირება .....	237
3.2.3 N- და S-ჟანგვა .....	240
ლიტერატურა .....	245
<b>თავი 4.</b> მონოქსიგენაზური სისტემის რეგულაცია .....	249
4.1 რეგულაცია აღმდგენელი ექვივალენტების დონეზე.....	249
4.1.1 ურთიერთქმედება ელექტრონ-სატრანსპორტო გზებს შორის .....	249
4.1.2 ელექტრონთა ტრანსმემბრანული ცვლა მიკროსომასა და მიტოქონდრიას შორის .....	254
4.1.2.1 მიტოქონდრიული კონტროლი.....	255
4.1.2.2 NADPH-ის თავისუფალი მიკროსომული ჟანგვა .....	259
4.2 მონოქსიგენაზური სისტემის აქტივობის სუბსტრატული რეგულაცია .....	263
4.3 ციტოქრომ P450-ის რეგულაცია ინდუქციის დონეზე.....	267
4.4 მონოქსიგენაზური სისტემის აქტივობის რეგულაცია მემბრანულ დონეზე .....	271
4.4.1 მემბრანული ფოსფოლიპიდების გავლენა ციტოქრომ P450-ის მეორეულ სტრუქტურაზე და აქტივობაზე.....	271
4.4.2 მემბრანული ფოსფოლიპიდების როლი NADPH-ციტოქრომ P450-რედუქტაზისა და ციტოქრომ P450-ის ურთიერთქმედებაში .....	273
4.4.3 NADH-ციტოქრომ $b_5$ -რედუქტაზისა და ციტოქრომ $b_5$ -ის დამოკიდებულება მემბრანულ ფოსფოლიპიდებზე.....	279
4.4.4 მონოქსიგენაზების და ლიპიდების ერთიანი სისტემა.....	283
4.4.5 ლიპიდების ფერმენტული პეროქსიდაცია და ქსენობიოტიკების ჟანგვა ენდოპლაზმურ მემბრანებში ერთი და იგივე ელექტრონის სატრანსპორტო სისტემით კატალიზდება .....	288
4.5 რეგულაცია ციტოქრომ P450-ის ქიმიური მოდიფიკაციის დონეზე .....	294

4.5.1 NADPH-ციტოქრომ P450-რედუქტაზას შესაძლო ფუნქციები	
ციტოქრომ P450-ის პეროქსიდაზად ტრანსფორმაციის პირობებში .....	319
ლიტერატურა .....	326
მეცნიერები, რომლებმაც მნიშვნელოვანი წვლილი შეიტანეს ბიოლოგიური ჟანგვის ოქსიგენაზური მექანიზმების გამოკვლევაში.....	336

წიგნის გამოცემა დაფინანსებულია საქართველოს ეროვნული სამეცნიერო  
ფონდის (GNSF) და უკრაინის მეცნიერებისა და ტექნოლოგიების ცენტრის  
(STCU) ერთობლივი გრანტით #4674

## ოქსიგენაზები ფიზიოლოგია და ბიოქიმია

### შესავალი

ციტოქრომ P450-შემცველი მონოოქსიგენაზები ენდოგენური და ეგზოგენური წარმოშობის ლიპოფილური ნაერთების მეტაბოლიზმში მონაწილეობენ. ამ ნივთიერებათა ჩამონათვალი საკმაოდ გრძელია. ესენია სინთეზური და ბუნებრივი სამკურნალო საშუალებები, სამრეწველო ნარჩენები, პესტიციდები, საღებავები, ნავთობპროდუქტები, პლასტმასები, საყოფაცხოვრებო მოხმარების პროდუქტები, კოსმეტიკური საშუალებები და სხვ. საკვებ პროდუქტებშიც კი, რომელთაც ყოველდღიურად ვიყენებთ, საყუათო ნივთიერებები “სუფთა” სახით იშვიათად გვხვდება და ყოველთვისაა ორგანიზმისთვის უსარგებლო ბალასტური მინარევები. აღარაფერს ვამბობთ საკვებ დანამატებზე და კონსერვანტებზე. ეს ნივთიერებები საწყისი ფორმით ორგანიზმში არც ენერჯის და არც პლასტიკური ცვლის მიზნებისათვის არ გამოიყენება და “უცხო” (ძველი განსაზღვრით) წარმოადგენენ. ამჟამად ისინი “ქსენობიოტიკების” (ბერძნ: “ქსენოს” – უცხო, “ბიოს” – სიცოცხლე) საერთო სახელწოდებით არიან ცნობილი, თუმცა ბიოქიმიაში, ფარმაკოლოგიაში და ტოქსიკოლოგიაში ორივე ტერმინი დღესაც თანასწორუფლებიანობით სარგებლობს.

გარემოდან ორგანიზმში ქსენობიოტიკები შემთხვევით ან სხვადასხვა მიზეზით, ორგანიზმის ნებისაგან დამოუკიდებლად ხვდებიან. აქ ისინი სპონტანურად ან კატალიზურად განიცდიან გარდაქმნებს. მეტაბოლური აქტივაციის შედეგად ელექტროფილური რეაქციისუნარიანი შუალედი პროდუქტები წარმოიქმნებიან, რომლებიც რთული ჟანგვითი გარდაქმნების გზით ან საბოლოოდ დეტოქსიცირდებიან (უვნებელდებიან), ან ურთიერთქმედებენ შიდაუჯრედულ სასიცოცხლოდ აუცილებელ ნაერთებთან (განსაკუთრებით მაკრომოლეკულებთან) და ეს პროცესი მუტაგენურ, ტოქსიკურ, ტერატოგენულ და კანცეროგენულ ეფექტებს უკავშირდება.

სადღეისოდ ქსენობიოქიმია ბიოლოგიური მეცნიერების დამოუკიდებელ დარგადაა ჩამოყალიბებული. მას თავისი თეორიული საფუძვლები და ტექნიკურ-მეთოდური მიდგომები გააჩნია. პრინციპში ქსენობიოქიმია დარგთაშორისი დისციპლინაა, რამდენადაც ბიოქიმიის, ორგანული ქიმიის, ანალიზური ქიმიის, ფარმაკოლოგიისა და ტოქსიკოლოგიის გარკვეულ სფეროებს მოიცავს. მისი

ინტერესები ქსენობიოტიკების კატალიზისა და ორგანიზმზე მათი მოქმედების მექანიზმების დადგენაში მდგომარეობს.

ფერმენტული სისტემა, რომელიც ქსენობიოტიკების “მეტაბოლურ აქტივაციაზე” და გარდაქმნებზეა ორიენტირებული, მონოოქსიგენაზებს მიეკუთვნება. ეს რთული მულტიფერმენტული კომპლექსია და ფართოდაა გავრცელებული ცოცხალ სამყაროში. მისი ფიზიოლოგიური და ბიოქიმიური როლის დეტალური შესწავლა თანამედროვე ქსენობიოქიმიის ერთ-ერთი ყველაზე “ცხელი” მიმართულებაა. გამოდინარე იქიდან, რომ მონოოქსიგენაზა მემბრანადაკავშირებულ (ინტეგრალურ) ცილას წარმოადგენს, ფერმენტული აქტივობის რეგულაციის თვალსაზრისით დიდ ყურადღებას იმსახურებს მისი არამარტო კვლევის ფუნქციური, არამედ სტრუქტურული ასპექტებიც.

ჰიდროლიზისა და დეჰიდროგენირების სხვადასხვა რეაქციების ზოგადი მექანიზმი დიდი ხანია ცნობილია. მიუხედავად ამისა, ენდოპლაზმური რეტიკულუმის (მიკროსომების) ფერმენტებით უცხო ნაერთთა ჟანგვა-აღდგენის რეაქციების მექანიზმების კვლევა ამჟამად ინტენსიურად გრძელდება. დადგენილია, რომ აღნიშნული პროცესების მაკატალიზებელ ფერმენტულ სისტემაში ცენტრალური პოზიცია ციტოქრომ P450-ს უკავია. ქსენობიოტიკის მეტაბოლური გარდაქმნის სიჩქარე ამ ჰემოპროტეინის მაქსიმალური აქტივობით და სუბსტრატისადმი მისი სწრაფვით ლიმიტირდება.

ყოველი ცოცხალი ქსოვილი მაღალი სპეციფიკურობის მქონე “ოქსიგენაზების ანაკრებს” შეიცავს. მრავალი მათგანი წყალში ხსნადი ფერმენტია და ამდენად ჰიდროფილური თვისებების მქონე ენდოგენური სუბსტრატების ჟანგვას ემსახურება. ეს, უპირველეს ყოვლისა, ამინომჟავების (ფენილალანინის, ტრიფტოფანის, ლიზინის, პროლინის) ოქსიგენაზებია. ფართოდაა გავრცელებული პოლიუჯერი ცხიმოვანი მჟავების ოქსიგენაზა (ლიპოქსიგენაზა), ლაქტატოქსიგენაზა, ინდოლამინოქსიგენაზა და ა.შ. მათი კვლევის “მშვიდი” მსვლელობა მას შემდეგ დაირღვა, რაც აღმოჩენილ იქნა უნივერსალური ოქსიგენაზები ციტოქრომ P450-ის შემცველობით. ისინი მონაწილეობენ როგორც ენდოგენური წარმოშობის სუბსტრატების (სტეროლური ჰორმონების, ცხიმოვანი მჟავების, პროსტაგლანდინების, ალკალოიდების, ჰიბერელინების და მრავალი სხვ.) ბიოსინთეზებში და ჟანგვაში, ასევე მრავალი უცხო ნაერთის ბიოდეგრადაციაში.

ცხადია, შორეულ წარსულში, როდესაც გარემოში ქსენობიოტიკების დონე ნულოვან ნიშნულს უტოლდებოდა, ციტოქრომ P450-შემცველი ოქსიგენაზები

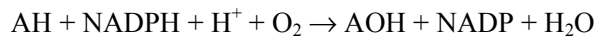
აქტიურ მონაწილეობას ენდოგენურ პლასტიკურ ცვლაში იღებდნენ. მხოლოდ სინთეზური სამკურნალო საშუალებების გამოყენების და გარემოს ქიმიური დაბინძურების შემდეგ იტვირთეს მათ დეტოქსიკაციის ფუნქცია და ტიპიურ “გარეგან” მონოქსიგენაზებად იქცნენ. ასე რომ, დამცველობითი ფუნქცია ამ ფერმენტული კომპლექსის გაცილებით გვიან შეძენილი თვისებაა. ამიტომ წინამდებარე მონოგრაფიაში წარმოდგენილი მასალაც ასეთი “ეკოლუციური ქრონოლოგიითაა” დალაგებული.



**თავი 1**  
**მონოოქსიგენაზები.**  
**მოქმედების ფუნქცია, სტრუქტურული ორგანიზაცია,**  
**და კატალიზური ციკლი**

**მონოოქსიგენაზების კვლევის მოკლე ისტორიული მიმოხილვა**

მონოოქსიგენაზების კვლევა თავის სათავეს გასული საუკუნის 50-იანი წლებიდან იღებს. ჯერ კიდევ ბროდისა და თანაავტორების [1], აგრეთვე აქსელროდის [2] სამუშაოებით დადგენილ იქნა ღვიძლის ენდოპლაზმურ რეტიკულუმში ფერმენტული სისტემის არსებობა, რომელსაც განსხვავებული ტიპის წამლებისა და არომატული ნაერთების უფრო პოლარულ პროდუქტებად გარდაქმნის უნარი გააჩნდა. გაირკვა, რომ ამ პროცესში ჩართული არიან  $Mg^{2+}$ -ის იონები და NADPH-გენერირებადი სისტემა (NADP + გლუკოზო-6-ფოსფატდეჰიდროგენაზა – პენტოზური ციკლის საწყისი ფერმენტი). აგრეთვე გამოვლინდა, რომ აღნიშნული გარდაქმნები მხოლოდ მოლეკულური ჟანგბადის უშუალო თანამყოფობით ხორციელდება. ამასთან დაკავშირებით მასონმა და თანაავტორებმა [3] წარმოადგინეს მონაცემები სუბსტრატზე ჟანგბადის გადამტანი ფერმენტული სისტემის ფუნქციონირების შესახებ და იგი მიაკუთვნეს რეაქციის ფენოლზურ ტიპს, რომელიც მოქმედების შემდეგი მექანიზმით ხასიათდება:



შემდგომში ეს გარდაქმნა მონოოქსიგენაზური რეაქციის ზოგად განტოლებად იქნა აღიარებული.

მომდევნო წლებში გარფინკელმა [4] და კლინგენბერგმა [5] ღვიძლის მიკროსომებში დაადასტურეს CO-დამკავშირებელი პიგმენტის არსებობა, რომელიც NADPH-ითა და დითიონიტით განიცდიდა აღდგენას. მათ პირველებმა აჩვენეს, რომ ეს პიგმენტი და მისი CO-კომპლექსი შთანთქმის მაქსიმუმს 450 ნმ-ზე ამჟღავნებენ. 1964 წელს იაპონელმა მკვლევარებმა ომურამ და სატომ [6, 7] ამ პიგმენტის ჰემოპროტეინული ბუნება გამოავლინეს და მას პირობითად ციტოქრომ P450 უწოდეს (P – პიგმენტის აღმნიშვნელი ასოა).

შემდგომი გამოკვლევებით ექსპერიმენტულად დადასტურდა, რომ მიკროსომული მონოოქსიგენაზური კომპლექსი შეიცავს ელექტრონის თავისუფალ

(ენერჯის გენერირებასთან არაშეუღლებული) სატრანსპორტო ჯაჭვს, რომლის საწყის ელექტრონულ დონორს NADPH-დამოკიდებულ რედუქტაზა წარმოადგენს, ხოლო ციტოქრომ P450 აქ ნამდვილად ელექტრონთა ტერმინალური აქცეპტორის როლს ასრულებს [8, 9].

განხილული მონაცემები ძირითადად მიკროსომებზე და ციტოქრომ P450-ის ნაწილობრივ გასუფთავებულ პრეპარატებზე ტარდებოდა. 1968 წელს კი კატაპირის [10] ჯგუფმა *Pseudomonas putidas* ბაქტერიული მუტანტიდან წარმატებით გამოყო ამ ფერმენტის ხსნადი ფორმა, რომელიც ქაფურის 5-ეპოქსიჰიდროქსიქაფურად ჰიდროქსილირებას ახორციელებდა.

მეტად საგულისხმოა ის ფაქტი, რომ მონოოქსიგენაზების კვლევის დაწყების თანადროულად სათანადო ყურადღება მიექცა უცხო ნაერთთა ბიოდეგრადაციაში თვით ენდოპლაზმური რეტიკულუმის მემბრანული სისტემის მნიშვნელობის გარკვევას. პალადისა და სიკევიცის [11] მიერ ნანახი იქნა, რომ დიფერენციალური ცენტრიფუგირებით მიღებული მიკროსომული ფრაქცია სფერულად შეკრულ ამ მემბრანულ სტრუქტურებს წარმოადგენს და მრავალი ცილის ბიოსინთეზში არამხოლოდ მატრიქსის (“შტატივის” ან “სამაგრი ბლოკის”), არამედ ფერმენტული აქტივობის გამომჟღავნებისათვის კოფაქტორულ ფუნქციასაც ასრულებს.

მცენარეში მიკროსომული ციტოქრომების კვლევა უკავშირდება ციანიდრეზისტენტული სუნთქვის (“ნარჩენი სუნთქვის”) ფენომენის გამოვლენას [12, 13] და იმის დადგენას, თუ კონკრეტულად რომელი ოქსიდაზები განაპირობებენ ამ მოვლენას. ამთავითვე შევნიშნავთ, რომ ეს საკითხი პრინციპულად დღესაც არაა გადაწყვეტილი. საფიქრებელი იყო, რომ ნარჩენ სუნთქვაში ჩართული უნდა ყოფილიყვნენ ციტოქრომებისაგან განსხვავებული ციანიდისა და აზიდისადმი რეზისტენტული ოქსიდაზები და ამის რეალურ კანდიდატებად ფლავინურ ფერმენტებს მიიჩნევდნენ. ამ ჯგუფის პირველი წარმომადგენელი როგორც ცნობილია 1932 წელს ვარბურგმა და კრისტიანმა [14] აღმოაჩინეს. ქიმიურმა გამოკვლევებმა აჩვენეს, რომ იგი იზოალექსაზინურ მონონუკლეოტიდს (ფლავინმონონუკლეოტიდს – FMN-ს) წარმოადგენს. აღდგენილ მდგომარეობაში მას ინტენსიური ყვითელი შეფერილობა აქვს და ჟანგვისას უფერულდება. თვით აღმოჩენებმა მას ყვითელი ფერმენტი (ლიტერატურაში “ძველი ყვითელი ფერმენტი” სახელწოდებითაა ცნობილი) უწოდეს. სადღეისოდ მას რიბოფლავინად ვიცნობთ. დადგენილ იქნა, რომ NADPH-ის თანამყოფობისას ეს ფერმენტი ჟანგავს გლუკოზოფოსფატს და ამ სუბსტრატს წყალბადი უშუალოდ ჟანგ-

ბადზე გადააქვს. ამდენად იგი ოქსიდაზას წარმოადგენს. ამავე მკვლევარებმა 1938 წელს “ახალი ყვითელი ფერმენტი” აღმოაჩინეს, რომელიც ფლავინადენინდინუკლეოტიდს (FAD-ს) წარმოადგენს.

ყვითელი ფერმენტის აღმოჩენამ სათავე დაუდო ფლავინური ოქსიდაზების ფიზიოლოგიური როლის კვლევას. აღმოჩნდა, რომ ზოგიერთი ადრე ცნობილი ოქსიდაზა პროსტეტულ ჯგუფად FAD-ს ან უფრო იშვიათად FMN-ს (მაგ., ქსანთინოქსიდაზა, D- და L-ამინომჟავათა ოქსიდაზები, ალდეჰიდოქსიდაზა და სხვ.) შეიცავს. მათ სუბსტრატებთან უშუალო რეაგირების უნარი აქვთ და მათგან მოცილებული წყალბადის ჟანგბადზე გადატანას ახორციელებენ. ამის შედეგად რეაქციის პროდუქტად ზეჟანგი წარმოიქმნება, რომელსაც შემდგომში კატალაზა ან პეროქსიდაზა გარდაქმნის. FMN და FAD შედარებით გვიან აღმოჩენილ ფერმენტ-დეჰიდროგენაზების აქტიურ ჯგუფებს წარმოადგენენ და NAD(P)H-ის ელექტრონებს სხვადასხვა აქცეპტორებს გადასცემენ.

ნარჩენ სუნთქვაში ფლავინური ფერმენტების მონაწილეობის სასარგებლოდ არსებული ფაქტები მიუთითებენ გარკვეულ პარალელიზმზე ამ ფერმენტთა რაოდენობრივ შემცველობასა და ნარჩენი სუნთქვის სიდიდეს შორის და, რაც მთავარია, მათ რეზისტენტობაზე ციანიდისა და აზიდის მაინჰიბირებელი მოქმედების მიმართ.

საერთოდ, გასული საუკუნის 50-იანი წლები, როგორც ფლავინური ფერმენტების, ასევე ციტოქრომული სისტემის ინტენსიური კვლევით აღინიშნება. შესაძლებელი შეიქმნა ციტოქრომოქსიდაზა ისეთ მცენარეულ ობიექტებშიც გამოვლენილიყო, რომლებშიც ადრე მისი იდენტიფიკაცია არ ხერხდებოდა. ამის შედეგად ჰიპოთეზაც კი ჩამოყალიბდა, რომლის თანახმადაც ციტოქრომული სისტემა სუნთქვას მცენარის ზრდის ადრეულ ეტაპებზე ახორციელებს, ხოლო შემდეგ მას ფლავინური ფერმენტები ცვლიან, ანუ ადგილი აქვს სუნთქვის სისტემათა ცვლას. შემდგომში ეს ჰიპოთეზა პრაქტიკულად უარყოფილ იქნა. ამის საპირისპიროდ ჩამოყალიბდა ე.წ. “ოქსიდაზების სიჭარბის თეორია”, რომლის თანახმადაც ოქსიდაზების ნაწილი სუნთქვის სიჩქარეს არ განსაზღვრავენ და ისინი უჯრედში სიჭარბით იმყოფებიან. ამიტომ შხამის დამკავშირებელი უბნების შემდეგაც კი რჩება სუნთქვისათვის საკმარისი ოქსიდაზების ნაწილი. სპექტროფოტომეტრული გამოკვლევების საფუძველზე ამ შეხედულებამ გარკვეული დასაბუთება მოიპოვა. აღნიშნული მეთოდის გამოყენებით შესაძლებელი გახდა ციანიდის თანამყოფობისას ციტოქრომოქსიდაზას როგორც აღდგენილი, ასევე დაჟანგული ფორმების ერთდროულად არსებობის დემონ-

სტრირება. ჯერ კიდევ 1945 წელს ლუნდეგარდმა [15] სუნთქვის მხოლოდ 12%-ით დათრგუნვა მიიღო, მაშინ როდესაც ციტოქრომოქსიდაზას 82% ციანიდთან იყო დაკავშირებული. ჩანსის და ჰაკეტის [16] ცდებში ეგზოგენური NADH-ის ჟანგვისას, რომელიც ძლიერ ინტენსიურად მიმდინარეობს, ციანიდისა და აზიდის თანამყოფობისას C და  $a_3$  ციტოქრომების ძირითადი (99%) ნაწილის აღდგენილი ფორმით არსებობა არ ვლინდებოდა. ამგვარად, ადრე თუ მიღებული იყო, რომ ნარჩენი სუნთქვა არამეტალშემცველი ფლავენური ოქსიდაზებით ხორციელდება, ამჟამად ამ ფერმენტთა როლი მაინც უკანა პლანზეა გადაწეული და თვლიან, რომ სუნთქვაში წამყვანი როლი უპირატესად ციტოქრომულ სისტემას ეკუთვნის.

მცენარეში მონოოქსიგენაზების კვლევას კერძოდ რაც შეეხება, 1955 წელს მარტინისა და მორტონის [17] მიერ შაქრის ჭარხლის ფოთლის მიკროსომებში პირველად იქნა აღმოჩენილი ჰემშემცველი პროტეინი, რომელიც ციანიდის მიმართ ინერტულობას ამჟღავნებდა. ცოტა მოგვიანებით ამავე ავტორებმა [18] შეძლეს დაედგინათ, რომ ეს მიკროსომული პიგმენტი “ხ“ ჯგუფის ციტოქრომებს მიეკუთვნება და მას რკინა-ჟანგბადიანი კომპლექსის წარმოქმნის უნარი აქვს. მცენარე იუკას (*Arum maculatum*) მიკროსომებში კაროტინოიდებთან ერთად ორი ციტოქრომული კომპონენტის არსებობა დაადგინეს ბენდალმა და ჰილმა [19], ხოლო კასინსკისა და თანაავტორების [20] მიერ ნაჩვენები იქნა ლობიოს ეთიოლირებული აღმონაცენების გველის შხამით დამუშავებული მიკროსომებიდან CO-დამკავშირებელი პიგმენტის მიღების შესაძლებლობა და ამ ფრაქციაში ხ-ტიპის ორი ციტოქრომის არსებობა. ანალოგიური შედეგები მიღებულ იქნა ამბიკესა და ბაქსტერის [21] მიერ. მათ გამოავლინეს *Claviceps purpurea*-ს მიცელიუმში CO-დამკავშირებელი ციტოქრომი, რომელიც გველის შხამით ან ნატრიუმის ქოლატიტ სოლუბილიზდებოდა. ჰემოპროტეინის ინაქტივაციას თან ახლდა სპექტრულ თვისებათა ცვლილებები.

შერეული ფუნქციის ოქსიდაზა, რომელიც ბამბის აღმონაცენების ჰიპოკოტილებიდან მიღებულ მიკროსომებში შარდოვანას წარმოებულების დემეთილირებას ახორციელებდა, გამოყვეს და დაახასიათეს ფრეარმა და თანაავტორებმა [22]. ფერმენტული პრეპარატის აქტივირებისათვის აუცილებელი აღმოჩნდა მოლეკულური ჟანგბადი და კოფაქტორად NAD(P)H-ის თანამყოფობა. იონური დეტერგენტებითა და იონური აქცეპტორებით, აგრეთვე ნახშირბადის მონოოქსიდით პროცესის ინჰიბირებამ ამ ავტორებს საშუალება მისცა გაეკეთებინათ დასკვნა მცენარეული და ცხოველური მიკროსომული ელექტრონის სატრანს-

პორტო სისტემების სტრუქტურული ორგანიზაციის მსგავსების შესახებ.

250 ნმ-ზე შთანთქმის მაქსიმუმით CO-დამკავშირებელი პიგმენტის სპექტრულმა კვლევამ მისი არსებობა დაადასტურა ბარდის (*Pisum sativum*) აღმონაცენებში და სიმინდის (*Zea mays*) ლეზნებში [23]. სპეციფიკური ინჰიბიტორების (SKF-525A-ისა და მეთირაპონის) და ჰიდროქსილირების სუბსტრატების (ამინოპირინისა და დიმეთილანილინის) დახმარებით გორდონმა და თანაავტორებმა [24] ხორბლის აღმონაცენების ფესვებში გამოავლინეს მიკროსომული რედოქს-სისტემისა და ციტოქრომ P450-ის ფუნქციონირება. საყურადღებოა, რომ ექსპერიმენტებში ისინი იყენებდნენ არა მიკროსომულ ფრაქციას, არამედ მთლიან მცენარულ ქსოვილს.

2,4-დიქლოროფენოქსიმარმჟავას (2,4-D) არილჰიდროქსილირება კიტრისა და ბარდის ფოთლებში შეისწავლებოდა ჩკანიკოვისა და თანაავტორების [25, 26] მიერ. ნაჩვენები იქნა, რომ ეს პროცესი 2,4-D-ს მეტაბოლიზმში ერთ-ერთი უმნიშვნელოვანესი სტადიაა და შერეული ფუნქციების მქონე მიკროსომული ოქსიდაზით კატალიზდება. თვისებებით იგი ძლიერ წააგავს მეორე მიკროსომულ ოქსიდაზას – დარიჩინმჟავა-4-ჰიდროქსილაზას, რამდენადაც ორივე ფერმენტი აქტივობისათვის საჭიროებენ O<sub>2</sub>-ს, NADPH-ს და მთლიანად ითრგუნებიან ნახშირბადის მონოოქსიდით. ჰიდროქსილირების პროდუქტის მაქსიმალური გამოსავალი მიიღებოდა NADPH-თან ერთად 2-მერკაპტოეთანოლის თანამყოფობისას, რაც ამ ავტორთა მიერ ახსნილი იქნა მემბრანაზე მისი მასტიმულირებელი მოქმედებით, რადგან NADPH-ის გარეშე ეს ნივთიერება ფერმენტის აქტივობაზე არაავითარ ზემოქმედებას არ ახდენდა. აგრეთვე დადგინდა იქნა, რომ არილჰიდროქსილირების რეაქციის კინეტიკა ექვემდებარება მიხაელის-მენტენის განტოლებას და უჩვენებს, რომ დასაყანგი სუბსტრატების ფერმენტთან დაკავშირება კონკურენტული ბუნებისაა.

გორდენიანისა და მის თანაავტორთა [27] მიერ ნაჩვენებია, რომ აერობულ პირობებში სოიასა და სიმინდის გაჯირჯეული ლეზნები ახორციელებენ ამინოპირინის, დიმეთილანილინისა და მონურონის (შარდოვანას წარმოებული N-მეთილის ჯგუფების შემცველი ჰერბიციდის) N-დემეთილირებას (რეაქციის მსვლელობა ფასდებოდა გამოყოფილი ფორმალდეჰიდით) და ანილინის *p*-ჰიდროქსილირებას. ორივე რეაქცია დამოკიდებული აღმოჩნდა NADPH-ზე, რამდენადაც სტიმულაციის ხარისხს ამ კოსუბსტრატის კონცენტრაცია განსაზღვრავდა. გარდა ამისა, დადგინდა იქნა, რომ ბენზიდინისა და ნაფტალინის შემთხვევაშიც არომატული ბირთვის ჟანგვის საწყის სტადიას NADPH- და

O<sub>2</sub>-დამოკიდებული ჰიდროქსილირება წარმოადგენს. პროცესი ინჰიბირდებოდა ნახშირბადის მონოოქსიდით და შემდგომში ფოტორეაქტივაციას განიცდიდა [28]. ეს მონაცემები პირდაპირ მიუთითებენ, რომ მცენარეში მიმდინარე აღნიშნულ პროცესებში უშუალოდ ციტოქრომ P450 მონაწილეობს.

მცენარის მიკროსომები ციტოქრომული კომპონენტების მრავალფეროვნებით ხასიათდებიან. მათი შემცველობა ფართო საზღვრებში მერყეობს. აქედან გამომდინარე თვლიან, რომ აქ ელექტრონის რამდენიმე სატრანსპორტო სისტემა უნდა ფუნქციონირებდეს, რომელთა აქტივობებიც ცალკეული ქსოვილის ინდივიდუალურ მეტაბოლურ მოთხოვნებზეა დამოკიდებული [29, 30].

ციტოქრომ P450 იდენტიფიცირებულია ეუკარიოტულ ორგანიზმებშიც. განსაკუთრებით მნიშვნელოვანია ამ ჰემოპროტეინის როლი ზოგიერთ საფუარ სოკოში, რომლებიც ზრდისათვის აერობულ პირობებს ითხოვენ და ნახშირბადის ერთადერთ წყაროდ ალკანებს მოიხმარენ [31]. საფუერის (*Candida tropicalis*) ტეტრადეკანზე გამოზრდისას ინდუცირდება ფერმენტი, რომელიც ცხიმოვანი მჟავების, ალკანებისა და წამლების ჰიდროქსილირებას ახორციელებს [32]. ფერმენტი აფინური ქრომატოგრაფიის მეთოდით იქნა გაწმენდილი და მისი ცხოველურ ციტოქრომ P450-თან იდენტურობა დადასტურდა.

### **1.1 მიკროსომული ჰიდროქსილირების ბიოლოგიური აზრი და მისი მექანიზმი**

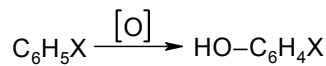
ქსენობიოტიკთა უმრავლესობა (~98%) წყალში უხსნად (ან მცირედ ხსნად) არაპოლარულ ჰიდროფობულ ნივთიერებებს მიეკუთვნება. უჯრედში შეღწევის შემდეგ ისინი, როგორც ცხიმში ხსნადი ნივთიერებები, სწრაფად იღვენებიან ციტოპლაზმის წყლოვანი ფაზიდან და ბიომემბრანების ფოსფოლიპიდების ან მემბრანის ჰიდროფობული ცილების ფაზაში კონცენტრირდებიან. ეს გარემოება მნიშვნელოვნად უნდა ზღუდავდეს ოქსიდაზური სისტემით მათ დეგრადაციას, რადგან ეს ფერმენტები თავის ფუნქციას წარმატებით მხოლოდ წყლოვან ფაზაში ახორციელებენ. აქედან გამომდინარე, ცხადი ხდება, რომ უცხო ნაერთთა დეტოქსიკაციის რთული საფეხურებრივი გარდაქმნებისათვის აუცილებელ წინაპირობას წარმოადგენს მათთვის წყალში ხსნადობის უნარის (ჰიდროფობულიდან ჰიდროფილურად გარდაქმნის) მინიჭება. სწორედ ამ მიზანს ემსახურება მემბრანაში მიმდინარე ჟანგვითი რეაქციები. მათი საშუალებით ქსე-

ნობიოტიკის მოლეკულაში ახალი ფუნქციური ჯგუფის (ჰიდროქსილის, კარბოქსილის, ეპოქსიდის ან სხვ.) შეყვანა ხდება. ამიტომ ამ სტადიას ფუნქციონალიზაციას უწოდებენ. ამ დროს მცირდება ნივთიერების ქიმიური ინერტულობა და მიღებული პროდუქტების პოლარული ჯგუფები ფერმენტული გარდაქმნებისათვის გაცილებით ხელმისაწვდომი ხდება. გარდასაქმნელი ნივთიერების მოლეკულაში რამდენიმე ფუნქციური ჯგუფის შეყვანა კიდევ უფრო ეფექტურს ხდის მასზე ფერმენტთა ერთობლივ მოქმედებას და მოლეკულის განსხვავებულ უბნებზე ფერმენტთა სწრაფ “შეტევას”. სხვაგვარად რომ ითქვას, ფუნქციონალიზაციის შედეგად უცხო ნაერთი ისეთ პირველად გარდაქმნებს განიცდის, რომ ოქსიდაზებისადმი იგი ადვილად “შეცნობადი” ხდება. ამ პროცესში ოქსიდაზების გარდა შეიძლება ჩაერთვნენ რედუქტაზები, ესთერაზები, დეჰალოგენაზები და სხვ. არცთუ იშვიათად ფუნქციონალიზაცია შეიძლება ამ ფერმენტთა ურთიერთშენაცვლებით რეალიზდეს.

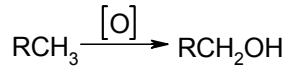
ფუნქციონალიზაციის ყველაზე გავრცელებულ ფორმას ჰიდროქსილირება წარმოადგენს. ცხოველში ეს პროცესი ღვიძლში არსებულ ციტოქრომ P450 შემცველი მონოოქსიგენაზებით ხორციელდება. ამ მხრივ მცენარე უფრო ფართო არჩევანი გააკეთა და ჰიდროქსილირებისათვის ამ ჰემოპროტეინის გარდა პეროქსიდაზები და ფენოლოქსიდაზებიც გამოიყენა. რეაქცია აქტივაციის მაღალ ენერჯიას საჭიროებს და ამის გამო შენელებულად მიმდინარეობს. მეორე მხრივ, უჯრედისათვის სასიცოცხლოდ აუცილებელია ის, რომ რაც უფრო სწრაფად განხორციელდება უცხო ნაერთის პოლარობის გაზრდა, მით უფრო სწრაფად წარიმართება მისი შემდგომი ჟანგვითი გარდაქმნები. აქედან გამომდინარეობს დასკვნა, რომ უცხო ნაერთის მრავალსაფეხურებრივი ჟანგვითი დეგრადაციისათვის ფუნქციონალიზაცია პროცესის სინქარემალიმიტირებელ სტადიას წარმოადგენს და სრული დეტოქსიკაციის რეგულაცია სწორედ ამ სტადიაზე უნდა ხორციელდებოდეს.

მიკროსომული მონოოქსიგენაზებით კატალიზებული ბიოქიმიური ჟანგვის რეაქციები მეტად ფართო წრეს მოიცავს, მაგრამ ძნელი არაა იმის შემჩნევა, რომ ქვემოთმოყვანილ რეაქციებს:

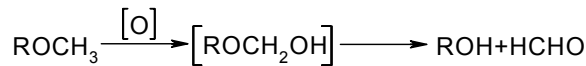
- არომატულ ჰიდროქსილირებას



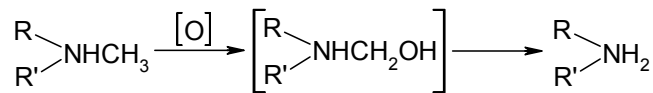
- აციკლურ ჟანგვას



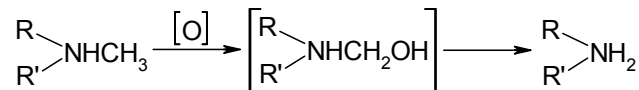
– O-დეალკილირებას



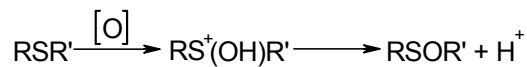
– N-დეალკილირებას



– დეზამინირებას



– სულფოჟანგვას



ერთი და იგივე, კერძოდ, ჰიდროქსილირების საერთო მექანიზმი უღევს საფუძვლად. ყველა ამ რეაქციას აღდგენილი NADPH და ატმოსფერული ჟანგბადი ესაჭიროება, რადგან  $^{18}\text{O}_2$ -ისა და  $\text{H}_2^{18}\text{O}$ -ის გამოყენებით ჩატარებულმა ცდებმა აჩვენეს, რომ უცხო ნაერთის მოლეკულაში ჩანერგილი ჰიდროქსილის ჟანგბადი ატმოსფერულ ჟანგბადს, და არა წყლის მოლეკულას ეკუთვნის. ამიტომ უცხო ნაერთების ჟანგვა NADPH-ის ოქსიდაციასთან პირდაპირ დამოკიდებულებაშია და იგი შეიძლება კონკურენტულად დაითრგუნოს მიკროსომული ჟანგვის სხვა სუბსტრატით [33]. ამ შედეგიდან გამომდინარეობს, რომ მიკროსომული ჰიდროქსილირება შეუღლებული ჟანგვა-აღდგენით ხორციელდება: გარკვეული კოფერმენტი NADPH-ით განიცდის აღდგენას და შემდგომ ჟანგბადთან მიერთებით ე.წ. “აქტიურ ჟანგბადს” გენერირებს. ეს უკანასკნელი კი სხვადასხვა ჰიდროქსილაზების მონაწილეობით უცხო ნაერთთან ურთიერთქმედებს და ჰიდროქსილირებული პროდუქტი, ან მისი წინამორბედი აქტიური ინტერმედიატი წარმოიქმნება.



გარკვეული დროის განმავლობაში ითვლებოდა, რომ მთელი რიგი ქსენო-ბიოტიკების ჰიდროქსილირებაში არასპეციფიკური ფერმენტის ერთადერთი ფორმა მონაწილეობს, მაგრამ სახეობრივმა და ფერმენტული ინჰიბიტორებისა და ინდუქტორებისადმი განსხვავებულმა მგრძობიარობამ მკაფიოდ გამოავლინა სხვადასხვა ფერმენტის არსებობა [34, 35]. როგორც გამოირკვა, ჰიდროქსილირების ყველა რეაქციისათვის საერთოა მხოლოდ შუალედი პროდუქტის წარმოქმნა NADPH-ით და  $O_2$ -ით გენერირებული “აქტიური ჟანგბადით”. ზუსტად ასევე, “აქტიური ჟანგბადი” საერთოს წარმოადგენს სტეროლების მა-ჰიდროქსილირებელი ფერმენტებისა [36] და ცხიმების ზეჟანგური ჟანგვის მა-კატალიზებელი ფერმენტებისათვის [37].

აუცილებელია აღინიშნოს, რომ N-დეალკილირება, რომლის დროსაც ნახ-შირბად-აზოტის კავშირი წყდება და კარბონილური ნაერთი და დეალკილირებული ამინი წარმოიქმება, ბიოქიმიაში საკმაოდ ცნობილი რეაქციაა. მისი განხორციელების მიზანია აზოტზე დამატებითი აქტიური წყალბადის გაჩენა, რომლის საშუალებითაც N-კონიუგატების წარმოქმნა და ორგანიზმიდან მათი სწრაფად გამოძევება ხდება. მაშასადამე, დეალკილირების შედეგად საწყისი ნივთიერების პოლარობა იზრდება, რასაც თან სდევს განაწილების მოცულობის შემცირება [38]. N-დეალკილირება და დეზამინირება იდენტური პროცესებია და უცხო ნაერთთა მეტაბოლიზმში მათ ერთ-ერთი ცენტრალური პოზიცია უკავია.

ღვიძლის მიკროსომებში N-დეალკილირების რეაქცია შეიძლება N-ჟანგვით დაიწყო. ამიტომ C-N-კავშირის გაწყვეტა შესაძლოა ამინოოქსიგენაზამ განახორციელოს. ეს იმას ნიშნავს, რომ ციტოქრომ P450-ის გარდა N-ოქსიდაზების ფუნქციას განსაზღვრული ფლავინური ფერმენტები ინაწილებენ [39]. ამის სასარგებლოდ მეტყველებენ არჩაკოვისა და თანაავტორების [40, 41] მონაცემებიც. ოქსიდაზური რეაქციების გააქტივების მიზნით მათ გამოიყენეს  $Mg^{2+}$ -ის სხვადასხვა კონცენტრაციები და შეისწავლეს დიმეთილანილინის N-დემეთილირებაზე და p-ჰიდროქსილირებაზე ამ მეტალის იონების გავლენა. აღმოჩნდა, რომ ორივე რეაქციისათვის აქტივაციის კოეფიციენტი შესაბამისად 1.5-ს და 2.2-ს შეადგენდა, მაშინ როდესაც N-ჟანგვაზე  $Mg^{2+}$  არავითარ ზემოქმედებას არ ავლენდა. ამ შედეგების საფუძველზე ავტორები იმ დასკვნამდე მივიდნენ, რომ დემეთილირებისა და ჰიდროქსილირების რეაქციებზე  $Mg^{2+}$ -ის მასტიმულირებელი მოქმედება ან NADPH-სპეციფიკური ფლავოპროტეინით არ უნდა იყოს განპირობებული, ან N-ჟანგვაში სხვა,  $Mg^{2+}$ -ისადმი არამგრძობიარე ფლავოპროტეინი უნდა იყოს ჩართული. აქვე შევნიშნავთ, რომ

ჯერ კიდევ გასული საუკუნის 60-იან წლებში ციგლერმა და პეტიტმა [42] აჩვენეს, რომ N,N-დიმეთილანლინის ოქსიდი ინტერმედიატს წარმოადგენს N,N-დიმეთილანლინის N-დემეთილირების გზაზე. სუბსტრატი იჟანგებოდა ერთ-ერთი ფლავენ-დამოკიდებული ოქსიდაზით, ხოლო შემდგომ ციტოქრომ P450-ით დემეთილირდებოდა, თუმცა მოგვიანებით ვილიმ და ბიკელმა [43] დაასკვნეს, რომ N-ოქსიდური დეალკილირება, როგორც  $\alpha$ -ნახშირბადის ჟანგვის დამატებითი გზა, ზოგად წესად არ უნდა მიიჩნეოდეს.

არომატულ ნაერთებში ჰიდროქსილირების კვლევისა და მიღებული პროდუქტების ანალიზის საფუძველზე სხვადასხვა მოსაზრებებია წარმოდგენილი, რომლებიც მიკროსომული ჟანგვის ამ ძირითადი მექანიზმის გარკვევას ეხებიან. ამასთან დაკავშირებით ინტენსიურად მიმდინარეობდა ბიოლოგიური ჰიდროქსილირებისა და მოდელური სისტემის მიერ განხორციელებული ნაცნობი მექანიზმის მქონე ჰიდროქსილირების შედარებითი შესწავლა.

მოდელური სისტემებიდან ყველაზე პოპულარულია ფენტონის რეაქტივი ( $H_2O_2 + Fe^{2+}$ ) და იუდენფრენდის [44] სისტემა (ასკორბატი- $Fe^{2+}$ -EDTA- $O_2$  ან  $H_2O_2$ ), რომლებიც შესაბამისად ჰიდროქსილისა ( $HO^{\bullet}$ ) და პერჰიდროქსილის ( $HO_2^{\bullet}$ ) რადიკალებს წარმოქმნიან. იუდენფრენდის სისტემა, რომელშიც EDTA (ეთილენდიამინტეტრაამარმჟავა) შეტანილია, როგორც მეტალებთან კომპლექს-წარმომქმნელი მახელატირებელი აგენტი, ჟანგვის რამოდენიმე რეაქციას აკატალიზებს. ისინი პრინციპში მიკროსომულ ფერმენტულ ჟანგვას, მათ შორის არომატულ ჰიდროქსილირებას, აციკლურ ჟანგვას, O-დეალკილირებას, N-დეალკილირებას და ამინოჟანგვას შეესაბამებიან. მიკროსომულ და მოდელურ სისტემებზე ჩატარებულმა გამოკვლევებმა შესაძლებელი გახადა დაშვებულიყო, რომ ჟანგვის ბიოლოგიური მექანიზმის საფუძველს თავისუფალ (შესაძლოა პერჰიდროქსილის) რადიკალებს შორის ურთიერთქმედების რეაქცია წარმოადგენს.

არომატული ნაერთების ჰიდროქსილირებისა და წარმოქმნილ პროდუქტთა გამოსავალში მიკროსომულ და მოდელურ სისტემათა შორის მსგავსება იმ პირობით ხდება უფრო თვალსაჩინო, თუ დავუშვებთ, რომ უცხო ნაერთი ჟანგბადის გააქტივებულ ფორმასთან, როგორც მაჰიდროქსილირებელ აგენტთან, შეშფოთებულ მოლეკულურ (აღზნებულ მდგომარეობაში მყოფი უარყოფითი იონი ან მოლეკულა) მდგომარეობაში ურთიერთქმედებს [45]. ამან შეიძლება ეპოქსიდის ან N-ოქსიდის, ხოლო შემდგომ მათი გადაჯგუფებით, შესაბამისად, ფენოლის ან N-ჰიდროქსილური ნაერთის წარმოქმნა გამოიწვიოს. ისიც უნდა

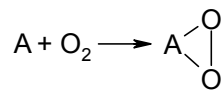
ითქვას, რომ ფერმენტულად და მოდელური სისტემებით განხორციელებულ ჰიდროქსილირებას შორის მსგავსება ხშირ შემთხვევაში არასრულია და მთელი რიგი უცხო ნაერთების მიმართ შესამჩნევი განსხვავებები არსებობს. მიუხედავად ამისა, ორივე მიმართულებით ჩატარებული გამოკვლევების საფუძველზე შესაძლებელი შეიქმნა გაკეთებულიყო მნიშვნელოვანი ზოგადი დასკვნა, რომ მიკროსომული მაჰიდროქსილირებელი სისტემა ფოსფოლიპიდ-პროტოპეიდ-სულფიდპროტეინულ კომპლექსს უნდა წარმოადგენდეს, რომელშიც ციტოქრომ P450 ჟანგბადის გამააქტივებელი კომპონენტის ფუნქციას ასრულებს [46-48].

## 1.2 ოქსიგენაზები

ბიოლოგიური ჟანგვის რეაქციათა მექანიზმების კვლევა მდიდარია წინააღმდეგობრივი და ხშირად ერთმანეთის გამომრიცხავი თეორიებით. ორი დამეტრალურად განსხვავებული თვალსაზრისი, რომელიც აღიარებდა ან უარყოფდა მოლეკულური ჟანგბადის გააქტიურებისა და ორგანულ ნაერთებში მისი შემდგომი ჩართვის შესაძლებლობას, "შშეიდობიანი თანაარსებობით" დასრულდა. ბახის და ენგლერ-ვილდის [49] მიერ 1897 წელს შექმნილმა შენელებული ჟანგვის ზეჟანგურმა თეორიამ წარმატებით დაასაბუთა ბიოლოგიურ ჟანგვაზე მეცნიერული შეხედულება, რომელიც მოლეკულური ჟანგბადის დასაჟანგ სუბსტრატში (R) უშუალო ჩართვას ითვალისწინებს:

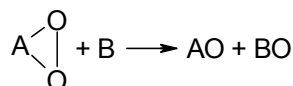


გამომდინარე იმ ფაქტიდან, რომ O=O ბმის სრული დაშლისათვის უფრო მეტი ენერგიაა საჭირო, ვიდრე -O-O-ად გარდასაქმნელად, ამ მკვლევარებმა მიიჩნიეს, რომ შენელებული ჟანგვისას ჟანგბადის მოლეკულა სწორედ ასეთ ცვლილებას უნდა განიცდიდეს. იგი ხორციელდება არამდგრად წონასწორობაში მყოფი აუტოოქსიდაბელური (თვითჟანგვადი) ნივთიერების ხარჯზე, რომელიც ჟანგბადთან ურთიერთქმედებისას ზეჟანგს წარმოქმნის:



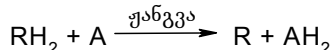
ზეჟანგი ადვილად იშლება ატომური ჟანგბადის გამოთავისუფლებით, რო-

მელიც ძლიერი დამჟანგველია:



ბახი-ენგლერის თეორიას მიკროსოპული ჟანგვის დღეს არსებულ ცნობილ ფაქტებთან თუ შევაჯერებთ, შემდეგი დასკვნის გაკეთება შეიძლება: აუტოქსიდაბელური ცილა-ფერმენტი, რომელსაც ზეჟანგური დაჯგუფების მიერთება შეუძლია და შემდგომ აქტიური ჟანგბადი ძნელად დასაჟანგ ნივთიერებაზე გადააქვს, სხვა არაფერია, თუ არა მიკროსოპული მონოოქსიგენაზას ძირითადი კომპონენტი ციტოქრომ P450.

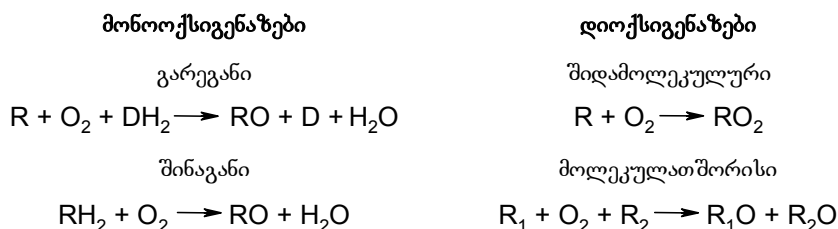
საერთოდ, მეოცე საუკუნის დასაწყისი ბიოლოგიურ ჟანგვაზე წარმოდგენების მკვეთრი ცვლილებებით აღინიშნა. ამ პერიოდში მოლეკულური ჟანგბადი კერძო შემთხვევად იქნა ჩათვლილი, სადაც იგი ელექტრონული აქცეპტორის ერთ-ერთ შესაძლო პრეტენდენტადაა აღიარებული. წინა პლანზე წამოიწია ფერმენტული დეჰიდრირების რეაქციამ, რომლის თანახმადაც ბიოლოგიური ჟანგვა დასაჟანგი სუბსტრატადან (პროტონთა R-დონორიდან) წყალბადის ატომების (ან ელექტრონების) A-აქცეპტორზე გადატანას გულისხმობს.



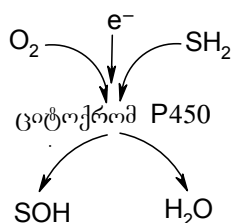
ჰიპოთეზის ერთ-ერთ ავტორად ვიელანდი [50] ითვლება. რეაქციის მაკატალიზებელი ფერმენტები – დეჰიდროგენაზები განსაკუთრებულ კლასს წარმოადგენენ. ისინი წყალბადის აქცეპტორად  $\text{O}_2$ -ს იყენებენ. “დეჰიდროგენაზულმა თეორიამ” გასული საუკუნის 60-იან წლებამდე “იბატონა” და პირველი “ბზარი” მას შემდეგ გაუჩნდა, რაც დადგენილ იქნა, რომ ჟანგვის პროდუქტებში ჩართული  $^{18}\text{O}$  როგორც ზევით იყო აღნიშნული, ეკუთვნის მოლეკულურ ჟანგბადს (ბახ-ენგლერის თანახმად) და არა წყალს (ვიელანდის თანახმად).

1960-1965 წლებიდან დაწყებული ოქსიგენაზური თეორია კვლავ იძენს თავის აღიარებას. ვლინდებიან ფერმენტთა სხვადასხვა მონო- და დიოქსიგენაზური ტიპები. პირველები ისეთი მოქმედებით ხასიათდებიან, რომლითაც ჟანგბადის მხოლოდ ერთი ატომის ჩართვა ხდება დასაჟანგ სუბსტრატში, ხოლო მეორე წყლის წარმოქმნაზე იხარჯება. დიოქსიგენაზებს რაც შეეხება, ისინი ჟანგბადის ორივე ატომს ახმარენ სუბსტრატის ჟანგვას [51].

ოქსიგენაზების თანამედროვე კლასიფიკაცია ასე გამოიყურება:



მაშასადამე, მონოოქსიგენაზების ორი კლასიდან ერთნი ფუნქციონირებისათვის მოლეკულურ ჟანგბადზე გადასატანად ელექტრონთა გარე წყაროებს (დონორებს) საჭიროებენ, ხოლო მეორენი გარე რედოქს-ექვივალენტებს არ ითხოვენ და ელექტრონებს თვით დასაყვანი მოლეკულებიდან იღებენ. ასეთი კლასიფიკაციის გარდა, მონოოქსიგენაზები იმის მიხედვითაც შეიძლება დაყოფილიყო, შეიცავენ თუ არა მათი მოლეკულები მეტალის იონებს, ან მათ კომპლექსებს. ყველაზე ხშირად ეს ფერმენტები სპილენძის ან რკინის იონებს შეიცავენ. სწორედ მათ მიეკუთვნება ჰემოპროტეინი ციტოქრომ P450 [52]. კატალიზურ რეაქციებში, რომლებიც მონოოქსიგენაზური კომპლექსით ხორციელდებიან, ციტოქრომ P450 თავისებური “აქტიური ცენტრის” როლს ასრულებს [53]. იგი ურთიერთქმედებს სუბსტრატთან, მოლეკულურ ჟანგბადთან და შესაბამისი დონორებიდან იღებს ელექტრონებს:



სპეციალურ ლიტერატურაში მონოოქსიგენაზები ხშირად “ჰიდროქსილაზებად” მოიხსენიება. ეს განსაზღვრა არაზუსტია, რამდენადაც არსებობენ ფერმენტები, რომლებიც ჰიდროქსილირებას აკატალიზებენ, მაგრამ ეს პროცესი მონოოქსიგენაზური მექანიზმით არ მიმდინარეობს.

დიოქსიგენაზების ორი კლასი ერთმანეთისაგან იმით განსხვავდება, რომ ერთ შემთხვევაში ჟანგბადის ორი ატომი ერთ მოლეკულას უერთდება (შიდამოლეკულური), ხოლო მეორეში – ისინი დასაყვანი სუბსტრატის ორ მოლეკულას შორის ნაწილდება (მოლეკულათშორისი). ცნობილია ოქსიგენაზები

(მაგ., ინდოლამინდიოქსიგენაზა), რომლებიც სუბსტრატად არა მოლეკულურ ჟანგბადს, არამედ მისი ერთი ელექტრონით აღდგენილ პროდუქტს – სუპეროქსიდ-რადიკალს მოიხმარენ.

სადღეისოდ ოქსიგენაზურ სისტემათა პოლიფუნქციურობა ეჭვს აღარ იწვევს. ბაქტერიულ და საფუვრის უჯრედებში ისინი ძირითადად პლასტიკურ მიზნებს ემსახურებიან. ნახშირბადშემცველ ნივთიერებათა ჟანგვის შედეგად ისინი ნახშირბადის სარეზერვო ფონდს ქმნიან. მცენარეებში მონოოქსიგენაზური რეაქციებით სინთეზდება: ბიორეგულატორები, ალკალოიდები, სტეროიდები და სხვ. ცხოველისა და ადამიანის უჯრედებში შემონახულ პლასტიკურ ფუნქციებთან ერთად ამ ფერმენტულ სისტემას კიდევ ერთი, დამცველობითი ფუნქციაც გაუჩნდა. მონოოქსიგენაზების ძირითადი ფიზიოლოგიური როლის – მოლეკულის პოლარობის გაზრდის ზოგადი სქემა ერთნაირად ოპტიმალურად ესადაგება როგორც ქსენობიოტიკებს, ასევე მრავალ ენდოგენურ ჰიდროფობულ ნივთიერებებს. ევოლუციური კიბის ყველაზე მაღალ საფეხურზე დგას ღვიძლის ციტოქრომ P450-შემცველი მონოოქსიგენაზა. აქედან გამომდინარე, გასაკვირი არაა, რომ ამ ორგანოს მიკროსომული ჟანგვის სისტემა საწყისი და უნივერსალური მოდელია ყველა ეუკარიოტული ორგანიზმის მემბრანასთან დაკავშირებული ოქსიგენაზების დასახასიათებლად.

### **1.3 მიკროსომული მონოოქსიგენაზების ფერმენტული შემადგენლობა**

მემბრანული მონოოქსიგენაზა ფერმენტული კომპლექსია, რომელიც ფოსფოლიპიდურ მატრიქსშია ჩაშენებული. რეაქციისათვის საჭირო ელექტრონების წყაროს აქ ძირითადად NADPH წარმოადგენს, საიდანაც აღმდგენელი ექვივალენტები ფლავოპროტეინის საშუალებით ციტოქრომ P450-ზე გადაიტანებიან. ამ ფერმენტის სახელწოდებაა NADPH-ციტოქრომ P450-რედუქტაზა. მიკროსომულ მემბრანაში კიდევ ორი კომპონენტი იმყოფება, რომლებიც ასევე მონაწილეობენ უცხო ნაერთთა მეტაბოლიზმში და ელექტრონთა სატრანსპორტო ჯაჭვს ქმნიან. ესენია NADPH-ციტოქრომ ხ<sub>5</sub>-რედუქტაზა და ციტოქრომ ხ<sub>5</sub>. ზანგრძლივი პერიოდის მანძილზე ითვლებოდა, რომ აღნიშნული ფერმენტული სისტემა ერთადერთია, რომელიც ღვიძლის ენდოპლაზმურ მემბრანაში NADPH-ს ჟანგავს. შემდგომში მიკროსომებიდან გამოყოფილ იქნა კიდევ ერთი

NADPH-სპეციფიკური ფლავოპროტეინი, რომელიც თავისი მოლეკულური თვისებებით განსხვავდება ციტოქრომ P450-შემცველი მონოოქსიგენაზას ფლავოპროტეინისაგან. იგი უმთავრესად მესამეული მეთილჩანაცვლებული ამინების N-ჟანგვაში მონაწილეობს. ამიტომ ამჟამად შეიძლება ითქვას, რომ მიკროსომაში NADPH-ის ჟანგვის ორი სისტემა ფუნქციონირებს [54-57]. როგორც გაირკვა, მონოოქსიგენაზურ კომპლექსში ფლავოპროტეინის ერთ მოლეკულაზე ციტოქრომ P450-ის რამდენიმე მოლეკულა მოდის [58].

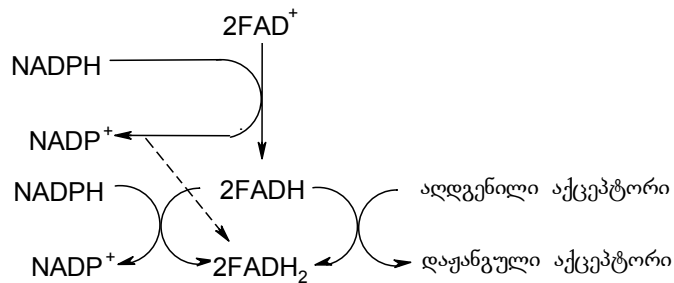
### 1.3.1 NADPH-ციტოქრომ P450-რედუქტაზა (NADPH-სპეციფიკური ფლავოპროტეინი EC 1.6.2.4)

ფერმენტი ენდოპლაზმური მემბრანის ძირითადი რედოქს-ჯაჭვის საწყისი კომპონენტია. ხშირად მას აღნიშნავენ როგორც FP<sub>1</sub>-ს (ფლავოპროტეინ I-ს). მისი საშუალებით ციტოქრომ P450 ელექტრონებს ჯერ ფერმენტ-სუბსტრატის კომპლექსის, ხოლო შემდგომ სამმაგი კომპლექსის (ფერმენტი-სუბსტრატი-O<sub>2</sub>) თანმიმდევრული აღდგენისათვის იყენებს.

ფერმენტი პირველად მიკროსომებიდან გამოყოფილ იქნა 1962 წელს, მკვლევართა ორი დამოუკიდებელი ჯგუფის მიერ [59, 60]. ციტოქრომ c-სადმი მალალი სწრაფვის გამო მას თავდაპირველად NADPH-ციტოქრომ c-რედუქტაზა ეწოდა. აქვე შევნიშნავთ, რომ ციტოქრომი c მიკროსომებში ძალიან მცირე რაოდენობითაა. ელექტრონთა ჭეშმარიტი ბუნებრივი აქცეპტორი სადღეისოდ ჯერაც უცნობია. საყურადღებოა ის ფაქტიც, რომ ფლავოპროტეინის სწრაფვა ციტოქრომ b<sub>5</sub>-ის მიმართ იზრდება და ციტოქრომ c-ს მიმართ სწრაფვას უტოლდება გარემოს იონური ძალის გაორმაგებისას [61]. ფერმენტი მემბრანასთან მტკიცედ დაკავშირებული ცილაა. ნატიური სახით იგი 81 kD მოლეკულური მასის მქონე დიმერს წარმოადგენს და ორი 40.5 kD მოლეკულური მასის მქონე სუბერთეულისაგან შედგება. გამოყოფის მეთოდის მიუხედავად, რედუქტაზა ერთ პოლიპეპტიდურ ჯაჭვზე თითო მოლეკულა FMN-ს და FAD-ს შეიცავს [62]. როგორც ირკვევა, ისინი ცილასთან კოვალენტურად არ არიან დაკავშირებულები, ამიტომ ფერმენტისაგან მათი მოცილება pH-ის დაქვეითებით, ან ხსნარის მალალი იონური ძალისა და დაბალი ტემპერატურის პირობებში ხერხდება. რედუქტაზას მოლეკულის სტოქსის რადიუსი 4 ნმ-ს აღწევს, ხოლო სტანდარტული რედოქს-პოტენციალი -310 mV-ს უტოლდება.

ამინომჟავური შემადგენლობის ანალიზმა აჩვენა, რომ იგი ~31%-მდე ჰიდროფობულ ამინომჟავურ ნაშთებს, აგრეთვე ცისტეინის 6 და ტრიფტოფანის 1 ნაშთს შეიცავს. თიოლურ ჯგუფებს, როგორც ჩანს, გარკვეული როლი უნდა გააჩნდეთ რედუქტაზისა და NADPH-ის ურთიერთქმედებაში. დაჟანგულ მდგომარეობაში ფლავოპროტეინის შთანთქმის სპექტრი სამი მაქსიმუმით (277, 380 და 455 ნმ-ებზე) და ერთი მხარით (485 ნმ-ზე) ხასიათდება. განსაზღვრულია მაღალი სისუფთავის ფერმენტის ექსტინქციის კოეფიციენტი, რომელიც 455 ნმ-ზე  $10.7 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{სმ}^{-1}$ -ს შეადგენს.

რედუქტაზა მკაცრად სპეციფიურია NADPH-ის მიმართ და თითქმის თანაბარი სიჩქარით შეუძლია აღადგინოს ერთ- და ორელექტრონიანი აქცეპტორები: ციტოქრომი c,  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ , დიქლორფენოლინდოლფენოლი, მაგრამ არა ციტოქრომი  $\text{b}_5$ , კოენზიმი  $\text{Q}_{10}$ , ნეოტეტრაზოლიუმი და ციტოქრომები P420 ან P450 [63-66]. იზოლირებულ ფერმენტს ნეოტეტრაზოლიუმის აღდგენის უნარი მხოლოდ ფოსფატიდილქოლინის თანამყოფობისას უჩნდება. ლეციტინის ისეთი უახლოესი ანალოგი, როგორც ფოსფატიდილეთანოლამინია, ამ შემთხვევაში არაეფექტურია. იზოლირებული ფლავოპროტეინი მოლეკულური ჟანგბადით ძლიერ დაბალი სიჩქარით იჟანგება. რედუქტაზული რეაქციის შესაძლო მექანიზმი მოცემულია ნახ. 1.1-ზე.

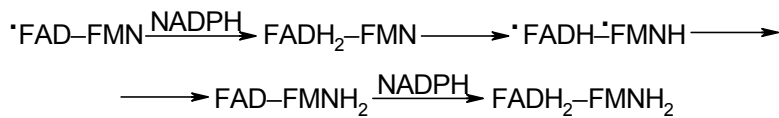


ნახ. 1.1. FAD-ის აღდგენის რეაქციის მექანიზმი [64].

მოცემული მექანიზმის თავისებურება იმაში მდგომარეობს, რომ ამ დროს ფერმენტის ნახევრადაღდგენილი სტაბილური ფორმა წარმოიქმნება [65, 66]. ამის სასარგებლოდ არსებული ექსპერიმენტული მონაცემების თანახმად, აერობულ პირობებში NADPH-სპეციფიკურ რედოქს-ჯაჭვში კოფერმენტის თანამყოფობისას ერთდროულად შეიძლება აღდგენილი ფლავინის ორი ფორმა



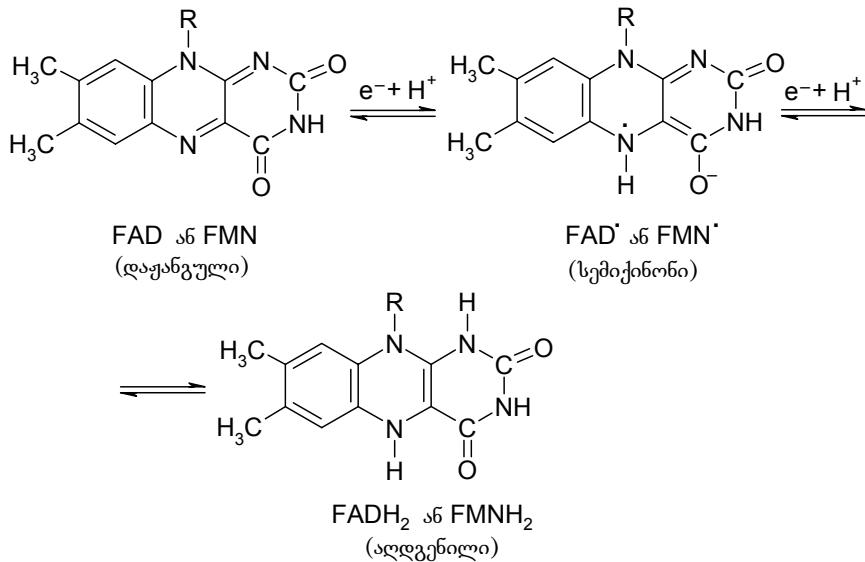
(FADH და FADH<sub>2</sub>) არსებობდეს, რომელთა შორისაც დინამიკური წონასწორობა მყარდება [61]. ფლავინის ნახევრადალდგენილ ფორმას ციტოქრომ c-სა და ელექტრონთა სხვა აქცეპტორების აღდგენის უნარი არ გააჩნია. ამ რეაქციებში აქტიურ აღმდგენელს მხოლოდ FADH<sub>2</sub> წარმოადგენს. რეაქციათა სტექიომეტრიის შესწავლამ აჩვენა, რომ 1 მოლი NADPH 2 მოლ ციტოქრომ c-ს აღადგენს და NADP<sup>+</sup>-ის გარდა, ამ დროს პროდუქტად FADH-იც მიიღება. აღნიშნულიდან გამომდინარე, დაასკვნეს, რომ სუბსტრატის ჟანგვისა და აქცეპტორის აღდგენის პროცესში ფლავინი ნახევრადალდგენილიდან სრულად აღდგენილ ფორმად ციკლურ გარდაქმნებს განიცდის. ამ თვალთახედვის მიხედვით რედუქტაზას სრული აღდგენის რეაქციის თანმიმდევრობა შეიძლება ასე წარმოვიდგინოთ:



პრინციპულად განსხვავებული შედეგებია მიღებული, და შესაბამისად, სხვა თვალსაზრისია ჩამოყალიბებული ინაგისა და თანაავტ. [67, 68] მიერ, რომლებმაც დაადგინეს, რომ რედუქტაზას მოლეკულა ყოველ 69 kD მოლეკულური მასის მქონე პოლიპეპტიდზე 2 მოლ ფლავინს შეიცავს. მათგან ერთი FAD, ხოლო მეორე FMN-ია. აქ ცენტრალური პრობლემა NADPH-დან ციტოქრომ P450-ზე ელექტრონების გადატანაში მდგომარეობს. პირიქით უკლებლივ ორი ელექტრონის დონორები არიან, მაგრამ ერთი ჰემის შემცველ ჰემოპროტეინს ერთი ელექტრონის მიღება შეუძლია. ამდენად ცილა, რომელიც NADPH-დან ციტოქრომ P450-ზე ელექტრონთა გადატანას ემსახურება, ერთდროულად ორი ელექტრონის აქცეპტორისა და ერთი ელექტრონის დონორის თვისებებს უნდა ფლობდეს. ეს მექანიზმი თვით NADPH-ფლავოპროტეინული რედუქტაზის მოქმედებით შეიძლება აიხსნას. იგი ერთადერთი სადღეისოდ ცნობილი ფერმენტია, რომელიც კოფაქტორებად FAD-ს და FMN-ს შეიცავს. რედუქტაზა NADPH-დან მყისიერად ღებულობს ორ ელექტრონს, მაგრამ მათ ცალ-ცალკე გადასცემს ან რკინა-გოგირდოვან ცილას (მიტოქონდრიაში), ან პირდაპირ ციტოქრომ P450-ს (მიკროსომაში). მეორე შემთხვევაში ელექტრონთა ტრანსპორტისათვის რკინა-გოგირდოვანი ცილების მონაწილეობა საჭირო აღარაა. აერობულ პირობებში რედოქს-ჯაჭვის ფუნქციონირებისას ფლავინის ერთი მოლეკულა სტაბილურ სემიქინონის ფორმაში გადადის. მეორე ფლავინი კი

სრულად დაჟანგულ მდგომარეობაში რჩება. წარმოქმნილი სემიქინონი მკრ-სპექტრის დამახასიათებელ სიგნალს  $\lambda=2$ -ის ოლქში იძლევა, რომელიც მიკროსომული პრეპარატებისთვისაც დარეგისტრირდა. ავტორებმა ვერ გამოავლინეს ამ ფერმენტისათვის დამახასიათებელი ზევითაღნიშნული ნახევრადაღდგენილი და სრულად აღდგენილი ფორმების შექცევადი გადასვლები. ამიტომ, მათი აზრით, ფლავოპროტეინის აღდგენა ოთხ-ელექტრონიან სტადიას უნდა მოიცავდეს და სრულად აღდგენილ ფერმენტს ციტოქრომ P450-თან უშუალო ურთიერთქმედება უნდა შეეძლოს; ანუ, როგორც ითქვა, ცილა, რომელიც NADPH-დან ჰემოპროტეინზე ელექტრონთა გადამტანის როლს ასრულებს, მართლაც უნდა ავლენდეს ორი ელექტრონის აქცეპტორისა და ერთელექტრონიანი დონორის თვისებებს.

FAD და FMN, ვიტამინ რიბოფლავინის წარმოებულებია და იზოალოქსაზინის ბირთვის შეიცავენ. მათი ქიმიური ბუნება სავსებით შეესატყვისება ნახ. 1.1-ზე აღწერილი პროცესების სპეციფიკას: როდესაც სრულად დაჟანგული ფლავონუკლეოტიდი მხოლოდ ერთ ელექტრონს (წყალბადის ერთ ატომს) იერთებს, იზოალოქსაზინის ბირთვის ნახევრად აღდგენილი (სემიქინონური) ფორმა წარმოიქმნება. გარდა ამისა, იგი შეიძლება იმყოფებოდეს ან სრულად დაჟანგულ, ან ერთი და ორი ელექტრონით აღდგენილ მდგომარეობებში:



აღნიშნული გარემოება იმას განაპირობებს, რომ ამ კლასის ფლავოპროტეინები უფრო მრავალრიცხოვან რეაქციებს აკატალიზებენ, ვიდრე პირიდინუკლეოტიდური დეჰიდროგენაზები.

დეჰიდროგენაზულ რეაქციათა ძირითადი შუალედური პროდუქტების შემადგენლობაში, როგორც წესი, არ იდენტიფიცირდება ფლავინის რადიკალები, ამდენად, სუბსტრატის ფლავინდამოკიდებული დეჰიდროგენიზაცია ორელექტრონიან გადატანასთან არის დაკავშირებული [69]. O–H-კავშირის ორელექტრონიანი აქტივაციის მექანიზმი შეესაბამება დაბალი პოტენციალის უბანს ანუ “შესასვლელს” ბიოლოგიური ჟანგვისას და მაღალი პოტენციალის უბანს ანუ “გამოსასვლელს” ფოტოსინთეზისას. თუმცა უნდა აღინიშნოს, რომ მეტალთა კომპლექსებთან ფლავინი ერთელექტრონიანი მექანიზმით რეაგირებს, რომელიც სუნთქვითი ჯაჭვის ფლავინური უბნიდან “გამოსასვლელს” და ფოტოსინთეზურ ჯაჭვში “შესასვლელს” შეესაბამება. ეს იმასთანაა დაკავშირებული, რომ ცილები ზრდიან ფლავინური რადიკალის მდგრადობას [70]. ამგვარად, რედუქტაზას შეუძლია მიიღოს ელექტრონები NADPH-დან და ისინი გაანაწილოს ფლავინის ორ კოფაქტორს შორის, ვიდრე მათ ჰემოპროტეინს გადასცემს.

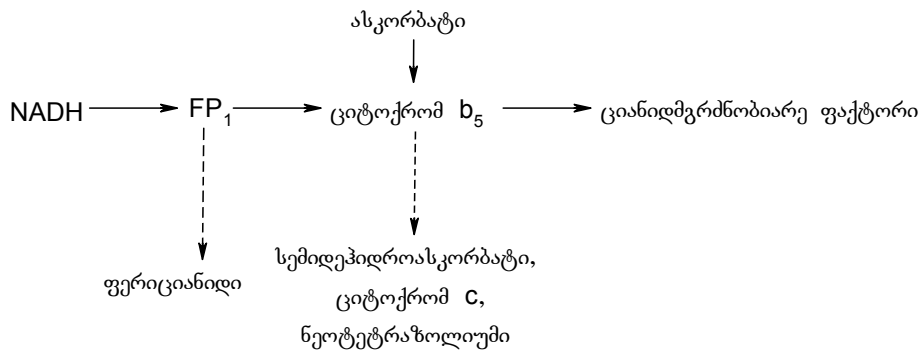
მიუხედავად იმისა, რომ გასუფთავებული, ჰომოგენური ფლავოპროტეინი ჟანგბადთან ძალიან ნელა რეაგირებს, მემბრანაში იგი მნიშვნელოვან აუტოოქსიდაბელობას ამჟღავნებს. ამიტომ საგნებით შესაძლებელია, რედოქს-ჯაჭვის მუშაობისას  $H_2O_2$ -ის წარმოქმნა ამ უბანზე იყოს ლოკალიზებული. NADPH-ოქსიდაზური აქტივობა ადვილად რეკონსტრუირდება მაღალი იონური ძალის მქონე არეში NADPH-სპეციფიკური ფლავოპროტეინის, ციტოქრომ  $b_5$ -ისა და Fe–EDTA-ს კომპლექსის გამოყენებისას [63, 71]. ნაჩვენებია მოცემული ფერმენტის მონაწილეობა აზორედუქტაზულ რეაქციაში. გასუფთავებული სახით მას უნარი აქვს აღადგინოს აზოსაღებავები, კერძოდ დიმეთილამინოაზობენზოლი. ამ რეაქციის კინეტიკა და ინჰიბიტორებისადმი მგრძობიარობა სრულ შესაბამისობაშია NADPH-ციტოქრომ- $c$  რედუქტაზულ რეაქციასთან [72, 73].

ტრიფსინით სოლუბილიზებულ რედუქტაზას ციტოქრომ  $b_5$ -ის აღდგენის უნარი გარემოს მაღალი იონური ძალის პირობებში გააჩნია; დეტერგენტით გამოყოფილს კი მარილთა დაბალი კონცენტრაციის ხსნარებშიც შეუძლია ჰემოპროტეინის აღდგენა. ფლავინზე წარმოქმნილი სუპეროქსიდული ანიონი ციტოქრომის აღდგენაში არ მონაწილეობს [74].

### 1.3.2 NADH-ციტოქრომ b<sub>5</sub>-რედუქტაზა (EC 1.6.2.1)

ენდოპლაზმური მემბრანის ელექტრონთა სატრანსპორტო მეორე სისტემა NADH-დამოკიდებული ციტოქრომ b<sub>5</sub>-რედუქტაზითა და ციტოქრომ b<sub>5</sub>-ითაა წარმოდგენილი. ორივე ცილა ამფიფილური ბუნებისაა, ანუ როგორც ჰიდროფობულ, ისე ჰიდროფილურ უბნებს შეიცავს. ამთავითვე შევნიშნავთ, რომ ელექტრონთა გადატანის ეს გზა უჯრედის ყველაზე ნაკლებად შესწავლილ ფერმენტულ სისტემას წარმოადგენს და მისი ჭეშმარიტი ფუნქციური როლი კვლავაც დაუდგენელი რჩება.

NADH-დამოკიდებული რედოქს ჯაჭვის წყობა შეიძლება ასე წარმოვიდგინოთ (ნახ. 1.2).



ნახ. 1.2. NADH-დამოკიდებული რედოქს ჯაჭვი. უწყვეტი ხაზებით გამოსახულია ციტოქრომ b<sub>5</sub>-ის აღდგენის, ხოლო პუნქტირით მისი ჟანგვის გზები [75, 76].

გამოყოფილი და გასუფთავებული NADH-ციტოქრომ b<sub>5</sub>-რედუქტაზას (ჩვეულებრივ, მას აღნიშნავენ, როგორც FP<sub>2</sub>-ს), მოლეკულური მასა 38-41 kD-ია. იგი არ შეიცავს რკინას და ან სხვა რომელიმე ცვალებადი ვალენტობის მეტალის იონს. ერთ მოლ აპოფერმენტზე რედუქტაზა ერთ მოლ FAD-ს შეიცავს. კოფერმენტ-ცილის ურთიერთქმედებას, როგორც ირკვევა, თიროზინის ნაშთი განაპირობებს, რამდენადაც ერთი ფენოლური ჯგუფის იოდირება ამ ურთიერთქმედებას აბსოლუტურად აბლოკირებს [77-79]. საფიქრებელია, რომ აპოფერმენტთან FAD-ის დაკავშირებაში სულფჰიდრილური ჯგუფები არ მონაწილეობენ, რადგან მათი ინჰიბიტორები – *p*-ქლორმერკურბენზოატი და მერ-

სალილი ფლავინის მიერთებაზე არ მოქმედებენ, თუმცა ერთ-ერთი თავისუფალი SH-ჯგუფი მაინც პასუხისმგებელი უნდა იყოს ცილასთან NADH-ის დაკავშირებაზე. NADH-ფლავოპროტეინის კომპლექსი აპოფერმენტის SH-ჯგუფს იცავს *p*-ქლორმერკურბენზოატისა და N-ეთილმალეინიდის მოქმედებისაგან. კომპლექსის წარმოქმნაში NADH-ის ფოსფორიბოზული ნაშთი მონაწილეობს. სტეი-ომეტრიულად ფერმენტის ერთი მოლის აღდგენაზე NADH-ის 1 მოლი იხარჯება [77-80]. FAD-ის აღდგენა სტერეოსპეციფიკურად, პირიდინული ბირთვის 4A-მდგომარეობიდან ფლავინზე წყალბადის პირდაპირი გადატანით ხორციელდება. ელექტრონულ აქცეპტორად ფერიციანიდის გამოყენებისას სწორედ C-H-ბმის გახლეჩვა წარმოადგენს რეაქციის სიჩქარის მალიმიტირებელ სტადიას.

შეტუტიალებისას ფერმენტის ინაქტივაციას თან ახლავს პოლიპეპტიდური ჯაჭვის გაფაშარება, აგრეთვე ტრიფტოფანის ნაშთისა და ფლავინის გადასვლა მემბრანის პოლარულ ფაზაში. ცვლილებებს ექვემდებარება ცისტეინისა და თიროზინის ნაშთებიც, მაგრამ დაშლას მხოლოდ NADH-ის დაკავშირებული ცენტრი განიცდის [81, 82].

ჟანგბადისა და ციტოქრომ c-ს (როგორც ელექტრონების აქცეპტორების) მიმართ და NADPH-ის (როგორც ელექტრონების დონორის) მიმართ, ფერმენტის მოლეკულური აქტივობა უაღრესად დაბალია. ამის საპირისპიროდ, ძალიან მაღალია რედუქტაზის ციტოქრომ  $b_5$ -ისადმი და  $K_3[Fe(CN)_6]$ -ისადმი სწრაფვა [79]. გასუფთავებულ ფერმენტს ნეოტეტრაზოლიუმის აღდგენის უნარი არ გააჩნია, მაგრამ ციტოქრომ  $b_5$ -ის დამატების შემდეგ ვლინდება NADH-ნეოტეტრაზოლიუმ-რედუქტაზული აქტივობა. ციტოქრომ  $b_5$ -ის გავლენით დიქლოროფენოლინდოფენოლის აღდგენის სიჩქარე თითქმის ორმაგდება და მიკროსომებში NADH-დიქლოროფენოლინდოფენოლ-რედუქტაზული აქტივობის 50%-მდე ფლავოპროტეინის წილად მოდის [83].

ელექტრონების აქცეპტორად  $O_2$ -ის გამოყენებისას ფლავოპროტეინით NADH-ის ჟანგვის სიჩქარე ძალზე დაბალია და ფერიციანიდული ჟანგვის სიჩქარის 0.01%-ს უტოლდება. ძალიან დაბალია აგრეთვე (0.3%-მდე) ფერმენტით NADPH-ის დაჟანგვის სიჩქარე ფერიციანიდისა და ჟანგბადის თანამყოფობისას. მაშასადამე, ფერმენტს თვითდაჟანგვის უნარი არ გააჩნია. ელექტრონების დონორების – NADPH-ისა და NADH-ის მიმართ ფლავოპროტეინის სწრაფვა იმდენად განსხვავებულია (მოლეკულურ აქტივობათა შორის სხვაობა NADH-ისათვის 3-რიგით მაღალია), რომ ფერმენტი NADH-ისადმი აბსოლუტურად სპეციფიკურად შეიძლება ჩაითვალოს [81].

NADH-ციტოქრომ  $b_5$ -რედუქტაზული რეაქციის მექანიზმი საფუძვლიანად ჯერაც არაა შესწავლილი. საფიქრებელია, რომ ციტოქრომის ალდგენა ერთეულექტრონიანი გადატანის შედეგს წარმოადგენს [84, 85]. თავდაპირველად ხდება ფერმენტისა და NADH-ის კომპლექსის ფორმირება. რედუქტაზას პირიდინული ბირთვი აპოფერმენტის SH-ჯგუფთან ურთიერთქმედებს, ხოლო ადენოზინდიფოსფორიბოზის ფოსფატი გარკვეულ ელექტროფილურ ჯგუფს უკავშირდება. პროცესი იმდენად სწრაფად ხორციელდება, რომ მთლიანი რეაქციის სიჩქარის ლიმიტირება აქ არ უნდა ხდებოდეს. მომდევნო სტადიაზე ხდება C-H ბმის დაშლა და პირიდინული ბირთვიდან ფლავინზე წყალბადის გადატანა. ეს რეაქცია გაცილებით შენელებულად ხორციელდება და ამდენად, შეიძლება მთლიანი პროცესის სიჩქარის ლიმიტირებას ახდენდეს. ამ მოსაზრებას ისიც ადასტურებს, რომ სუბსტრატად NADH-ის გამოყენებისას რეაქციის სიჩქარის კონსტანტა ( $68 \text{ mM}\cdot\text{წმ}^{-1}$ ) კორელაციაშია ამ პირიდინუკლეოტიდის დაჟანგვის ჯამური რეაქციის სიჩქარესთან [86]. ყველაზე ნაკლებადაა შესწავლილი ფლავოპროტეინიდან ციტოქრომ  $b_5$ -ზე ელექტრონის გადატანის სტადია, მაშინ როდესაც სწორედ მას თვლიან რედუქტაზული რეაქციის სიჩქარის მალიმიტირებელ ეტაპად [87, 88].

მემბრანის ფოსფოლიპიდი აადვილებს NADPH-რედუქტაზულ რეაქციას და მის სწრაფ მსვლელობას უზრუნველყოფს, ხოლო NADH-ფერიციანიდ-რედუქტაზულ აქტივობაზე ფოსფოლიპიდი გავლენას არ ახდენს.

ტრიტონ X-100-ით დამუშავებული ღვიძლის მიკროსომებიდან გამოყოფილი რედუქტაზა ტიპური ამფიფილური ცილაა (მოლეკულური მასით 43 kD) და 381 ამინომჟაურ ნაშთს (დეტერგენტულ ფრაგმენტს) შეიცავს [89, 90]. პროტეინაზული (კატეფსინაზური) დამუშავების შემდეგ ფერმენტს 33 kD მოლეკულური მასა გააჩნია და 292 ამინომჟაური ნაშთისაგან შედგება. დეტერგენტულ ფერმენტში არაპოლარული ამინომჟაეების შემცველობა გაცილებით მეტია, ვიდრე პროტეაზულში. დეტერგენტული ფერმენტის ქიმოტრიფსინით დამუშავება 10 kD მოლეკულური მასის მქონე პოლიპეპტიდის მოცილებას იწვევს, რომელიც უპირატესად ჰიდროფობული ამინომჟაეებითაა წარმოდგენილი. დეტერგენტული ფერმენტი წყალხსნარში 600 kD მოლეკულური მასის აგრეგატებს წარმოქმნის. NADH-ისა და ციტოქრომ  $b_5$ -ისადმი ორივე ფერმენტის სწრაფვა ერთნაირია: NADH-ის შემთხვევაში  $K_M$  შესაბამისად  $6.0 \mu\text{M}$  და  $2.5 \mu\text{M}$ -ია, ხოლო ციტოქრომ  $b_5$ -ისათვის  $K_M$  შესაბამისად  $45 \mu\text{M}$ -ისა და  $10 \mu\text{M}$ -ს შეადგენს. ამ მონაცემების საფუძველზე გაკეთებულია დასკვნა, რომ კა-

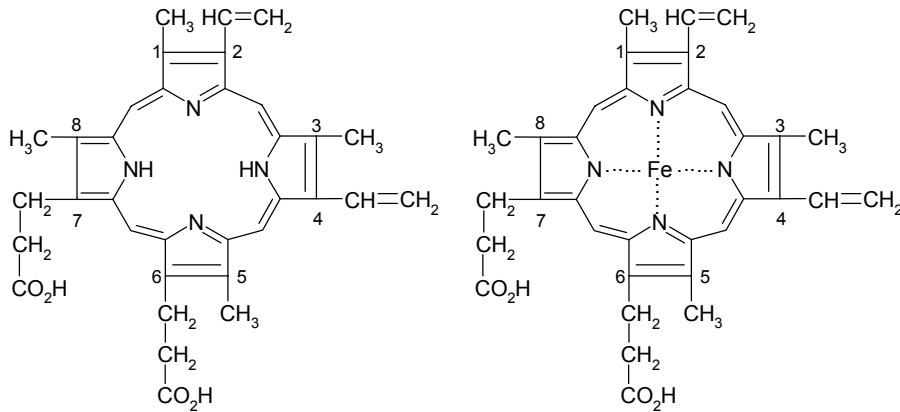
ტალიზურად აქტიური ცენტრი მოლეკულის ჰიდროფობულ ნაწილში იმყოფება, რომელიც ფერმენტის მთლიანი მოლეკულის 25%-ს არ აღემატება. ფლავოპროტეინი მემბრანაში ჩაშენების გასაოცარ უნარს ამჟღავნებს; კერძოდ, იგი 100-ჯერ აღემატება მისი საწყისი შემცველობის რაოდენობას. მემბრანაში ჩაშენებული რედუქტაზა ფუნქციურად უაღრესად აქტიურია და მემბრანულ სტრუქტურას ჰიდროფობული ურთიერთქმედების ძალებით მტკიცედ უკავშირდება. გარდა ამისა, ფერმენტს მემბრანის სიბრტყეში ადვილად დიფუნდირებისა და ციტოქრომ  $b_5$ -ის რამდენიმე მოლეკულის დაკავშირების უნარი აქვს. ხსნარში და მემბრანაში რედუქტაზასა და ციტოქრომ  $b_5$ -ს მოქმედების ერთნაირი კინეტიკა აქვთ, რაც საშუალებას გვაძლევს მისაღებად ჩავთვალოთ მოსაზრება იმის შესახებ, რომ მემბრანაში არ არსებობს ფლავოპროტეინისა და ციტოქრომ  $b_5$ -ის სპეციალიზირებული კომპლექსი და მიკროსომების თხევად ფაზაში რედოქს-ჯაჭვის ფუნქციონირება გადამტანთა შემთხვევით შეჯახებებს უნდა ემყარებოდეს [89, 90].

არსებობს მონაცემები, რომლებიც მიკროსომებში NADH-ციტოქრომ  $b_5$ -რედუქტაზას გარდა, NADH-ის ჟანგვის სხვა გზის არსებობაზე მიუთითებენ [58, 75, 91, 92]. ვარაუდობენ კიდევ ერთი ფლავოპროტეინის ფუნქციონირებას, რომელიც პროსტეტულ ჯგუფად FMN-ს შეიცავს და მაღალი სწრაფვა გააჩნია ციტოქრომ  $c$ -ს მიმართ [93]. ამ რეაქციით ციტოქრომ  $c$ -ს აღდგენა სულფჰიდრილიური შხამებისა და დეტერგენტების მიმართ მდგრადობას ამჟღავნებს [75, 91] და ამით განსხვავდება NADH-ციტოქრომ  $b_5$ -რედუქტაზული აქტივობისაგან.

აღნიშნავთ აგრეთვე, რომ გამოყოფილია NADH-რედუქტაზას პოლიმერული ფორმა მოლეკულური მასით 200-400 kD. დოდეცილსულფატის მოქმედებით ეს პოლიმერი 35-39 kD მოლეკულური მასის მქონე სუბერთეულებად იშლება. ფლავოპროტეინის მონომერული ფორმისაგან განსხვავებით, პოლიმერი ციტოქრომ  $c$ -ს მიმართ უფრო მოჭარბებულ სწრაფვას ამჟღავნებს, ვიდრე ფერიციანიდის მიმართ, ანუ მონომერთან შედარებით რედუქტაზას პოლიმერული ფორმა უფრო “ფიზიოლოგიურია” [94, 95].

### 1.3.3 ციტოქრომი b<sub>5</sub>

ცილა-ფერმენტების მნიშვნელოვან კლასს წარმოადგენენ ჰემი- ან ჰემო-პროტეინები, რომლებიც პროსტეტულ ჯგუფად რკინა-პორფირინებს შეიცავენ. მრავალ სხვა ფუნქციებთან (ჰემოგლობინით ჟანგბადის ტრანსპორტი, მიოგლობინით ჟანგბადის შენახვა, ციტოქრომ c-ოქსიდაზით ჟანგბადის წყლამდე აღდგენა, ციტოქრომ P450-ით სხვადასხვა ფუნქციური ჯგუფების დაჟანგვა ჟანგბადის საშუალებით და სხვ.) ერთად, ისინი მონაწილეობენ ელექტრონთა გადატანაში (ციტოქრომები b და c). წინსართები ჰემი- და ჰემო- წარმოადგება რკინაპორფირინის დაჯგუფების სახელწოდებიდან: რკინა (II) პორფირინის კომპლექსს უწოდებენ ჰემს, ხოლო რკინა (III) პორფირინს – ჰემინს. სამი ყველაზე გავრცელებული ჰემი (a, b და c) დაკავშირებულია a, b და c ციტოქრომებთან. b-ჰემის პორფირინულ ლიგანდს წარმოადგენს პროტოპორფირინი IX. ამიტომ ხშირად b-ჰემს უწოდებენ: რკინა (II) პროტოპორფირინ IX-ს, ან პროტოჰემს, ან უბრალოდ ჰემს [96]:



პროტოფორფირინ IX  
(2,4-დიფენილდეიტროპორფირინი)

ჰემი b – ანუ პროტოჰემი

რომაული ციფრი IX პორფირინულ ციკლში ჩანაცვლებულების სპეციფიკურ მდებარეობას აღნიშნავს. პორფირინის ბირთვის 8 ნახშირბადატომთან შეიძლება სხვადასხვა სიგრძის და ფუნქციური ჯგუფების მქონე ჩანაცვლებელი იყოს დაკავშირებული. ერთ-ერთი მათგანის სპეციფიკური განლაგება (რიგით IX) b-ჰემის წარმომქმნელ ლიგანდს – პროტოპორფირინ IX-ს ახასიათებს (დეტალურად იხ. 1.6).



მიკროსომულ მემბრანებში არსებული ხ-ტიპის ციტოქრომული ცილები სადღეისოდ საფუძვლიანადაა შესწავლილი. ისინი ფართოდ არიან გავრცელებული სრულიად განსხვავებულ ობიექტებში. ამ ჯგუფის წარმომადგენელი ციტოქრომი  $b_5$  იდენტიფიცირებულია ღვიძლისა და ტვინის ქსოვილებში, ცხიმოვან ქსოვილში, უმაღლეს და უმდაბლეს მცენარეთა ორგანოებში, მიკროორგანიზმებში, ანაერობულად მზარდ საფუერებში და სხვ. იგი მტკიცედ უკავშირდება უჯრედის ორგანოებს და ამიტომ ხსნადი ფორმით მისი მიღება მხოლოდ ფერმენტული ჰიდროლიზის შედეგადაა შესაძლებელი [97-100]. ციტოქრომი  $b_5$  გამოყოფილია მონომერის სახით, რომელსაც 11-13 kD მოლეკულური მასა გააჩნია. 1 მოლ აპოფერმენტზე მისი მოლეკულა 1 მოლ რკინა-პროტოპორფირინ IX-ს შეიცავს. იგი ამფიფატური ცილაა, რომელშიც ჰიდროფობული უბნის სიდიდე უფრო მეტია (მთელი მოლეკულის 25%), ვიდრე ფლავოპროტეინში. ჰიდროფობული ნაწილი მემბრანაშია ჩაძირული და გარეთ მყოფი ცილის დიდი ნაწილისათვის დამჭერი “ღუზის” როლს ასრულებს. დაჟანგული ფორმით ეს ჰემოპროტეინი კარგად გამოსახულ შთანთქმის მაქსიმუმს 413 ნმ-ზე ავლენს, ხოლო აღდგენილი ფორმა ასევე კარგად გამოსახულ შთანთქმის მაქსიმუმებს 424, 525 და 556 ნმ-ებზე ამჟღავნებს [101, 102].

გასუფთავებული ჰემოპროტეინი აღდგება დითიონიტით, ცისტეინით, ასკორბატით და ფერმენტულად – NADH-ციტოქრომ  $b_5$ -რედუქტაზით. იგი იჟანგება ციტოქრომ c-ს,  $FeCl_2$ -ის და სათანადო რედოქს-პოტენციალის მქონე საღებავების მოქმედებით. ჟანგბადთან იგი ძალიან ნელა ურთიერთქმედებს [103-105]. ნახშირბადის მონოოქსიდთან, აზიდთან და ციანიდთან ეს ჰემოპროტეინი არ რეაგირებს, ხოლო მჟავებისა და ტუტეების ზემოქმედებისადმი საკმაოდ მდგრადია [106, 108]. ნახშირბადის მონოოქსიდი და ციანიდი, როგორც ლიგანდები, ცილა-ჰემატოპეის კომპლექსში რკინას კოორდინაციულად უკავშირდებიან. ეს პროცესი რკინასთან ცილის ჯგუფების ჩანაცვლებით მიმდინარეობს.

სადღეისოდ სრულადაა გაშიფრული ციტოქრომ  $b_5$ -ის ამინომჟავური თანმიმდევრობა [103, 104, 109-111]. სხვადასხვა წყაროებიდან პროტეოლიზური დამუშავების შედეგად გამოყოფილი ჰემოპროტეინი თითოეულ პოლიპეპტიდურ ჯაჭვში თიროზინის სამ და ტრიფტოფანის ერთ ნაშთს შეიცავს. მოლეკულაში გამოვლენილი არაა გოგირდშემცველი ამინომჟავების არსებობა. ისინი განსხვავდებიან თავისი N-კიდურა ამინომჟავებით. სავსებით შესაძლებელია, რომ ერთი ობიექტიდან მიღებული ჰეტეროგენურობითაც ხასიათდებოდეს. ამის მა-

გალითია ხბოს ღვიძლიდან მიღებული ცილის პრეპარატი, რომელიც შეიცავს ელექტროფორეზული ძვრადობისა და DEAE-ცელულოზაზე ქრომატოგრაფირების უნარით ერთმანეთისაგან განსხვავებულ ციტოქრომი ხ<sub>5</sub>-ის ქვეფრაქციებს [112]. პირველად სტრუქტურაში განსხვავება იმაში მდგომარეობს, რომ ერთი მათგანი – ციტოქრომი ხ<sub>5</sub>(1) C-კიდურა დიპეპტიდად გლუტამინ-სერინს შეიცავს, მაშინ როდესაც მეორე ციტოქრომი ხ<sub>5</sub>(2)-ს ეს დიპეპტიდი საერთოდ არ გააჩნია. ციტოქრომი ხ<sub>5</sub>-ის ორი ქვეფრაქციის არსებობა ერთმნიშვნელოვნად არ წყვეტს საკითხს იმის შესახებ, ნამდვილად არსებობს თუ არა ეს ორი ციტოქრომი, ან განსხვავება მათ სტრუქტურაში ხომ არაა არტეფაქტი, ანუ სოლუბილიზაციის პროცედურისას პროტეოლიზური დაზიანების შედეგი.

ღვიძლიდან გამოყოფილ ჰემოპროტეინის პრეპარატებში ორი ციტოქრომი ხ<sub>5</sub>-ის არსებობა სხვა ავტორების მიერაც არის ნაჩვენები. აღმოჩნდა, რომ ტრიფსინით დამუშავებისას DEAE-ცელულოზაზე სწრაფად და შენელებულად ძვრადი ციტოქრომი ხ<sub>5</sub>-ების ფარდობა შესაბამისად 7:1-ს, ხოლო ბაქტერიული პროტეაზით დამუშავებულ პრეპარატებში 1:4-ს შეადგენს [101]. ციტოქრომი ხ<sub>5</sub>-ის მესამე ტიპი, რომელიც წინა ორისაგან არსებითად განსხვავდება, გამოყოფილია მიტოქონდრიის გარე მემბრანიდან [113], ხოლო თვით მიტოქონდრიაში იდენტიფიცირებულია სამი ციტოქრომი ხ<sub>5</sub>, რომლებიც მემბრანულ სტრუქტურებთან კავშირის სიმტკიცითა და იმუნოლოგიური თვისებებით განსხვავდებიან [114, 115].

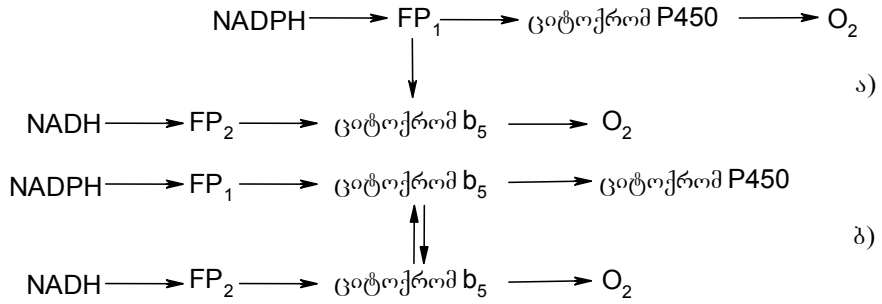
ჯერჯერობით არაა გაცემული პასუხი კითხვაზე – წარმოდგენენ თუ არა ციტოქრომი ხ<sub>5</sub>-ის პრეპარატები ჰეტეროგენულ ფორმებს? ამ პრობლემის კვლევაში მნიშვნელოვანი როლი შეასრულეს იაპონელმა მკვლევარებმა იტომ და სატომ [116, 117]. სწორედ მათ მიერ იქნა ნაჩვენები, რომ ციტოქრომი ხ<sub>5</sub>-ს თუ მივიღებთ არა პროტეაზული დამუშავებით, არამედ დეტერგენტებით სოლუბილიზაციის შედეგად, შესაძლებელი გახდება გამოიყოს ციტოქრომის მონომერი, რომელსაც ჩვეულებრივზე ორჯერ მეტი მოლეკულური მასა (24-26 kD) გააჩნია. ამ გზით იზოლირებული ციტოქრომი ხ<sub>5</sub>-ის მონომერი უაღრესად ჰიდროფობულია და სწრაფვა აქვს წარმოქმნას პოლიმერი მოლეკულური მასით 120 kD. ამ მკვლევართა აზრით, პროტეაზული დამუშავებისას სოლუბილიზაციას განიცდის ციტოქრომი ხ<sub>5</sub>-ის მხოლოდ ფერმენტულად აქტიური ნაწილი. მოლეკულის მეორე ნაწილი, რომელიც მემბრანაში რჩება და მის ცილალიზიდურ კომპლექსთან დაკავშირებაზეა პასუხისმგებელი, პროტეაზული ზემოქმედებისას ხსნარში არ გადადის. ამის საპირისპიროდ დეტერგენტი ჰემო-

პროტეინის მთლიანი მოლეკულის სოლუბილიზაციას იწვევს.

მიუხედავად იმისა, რომ არსებული მონაცემები გადაჭრით ვერ ასაბუთებენ ლეიძლის მიკროსომებში ორი განსხვავებული ციტოქრომ  $b_5$ -ის ფუნქციონირებას, ასევე მათი არსებობის იგნორირება მაინც არ შეიძლება. ამის სათქმელად საფუძველს გვაძლევს არჩაკოვისა და მისი თანამშ. [118-123] მიერ მიღებული ფაქტები, რომლებიც მოცემული ჰემოპროტეინის ფუნქციურ ჰეტეროგენულობაზე მიუთითებენ. მათ მიერ საკმაოდ სარწმუნოდ იქნა ნაჩვენები, რომ ციტოქრომ  $b_5$ -ს შეუძლია აღდგეს როგორც NADH-ით, ასევე NADPH-ით. NADH-ის გამოყენებისას მიხაელის-მენტენის ტიპური მრუდი ისახება, ხოლო ანაერობულ პირობებში მიკროსომული სუსპენზიის NADPH-ით აღდგენისას ადგილი აქვს ციტოქრომ  $b_5$ -ის აღდგენის ხარისხის შენელებულ ზრდას და ეს პროცესი პირიქით უკლებლივ კონცენტრაციაზე დამოკიდებული. NADPH-ის ელექტრონებით ციტოქრომ  $b_5$ -ის აღდგენა NADPH-სპეციფიკური ჯაჭვიდან NADH-ის ჟანგვის ჯაჭვზე რედუცირებული ექვივალენტების გადასვლას ანუ მიკროსომების მაპიდროქსილირებელ კომპლექსში ციტოქრომ  $b_5$ -ის მონაწილეობას მოწმობს [124, 125].

NADPH-ის კონცენტრაციის გაზრდით (10-დან 100  $\mu$ M-მდე) ციტოქრომ  $b_5$ -ის აღდგენილობის ხარისხი იზრდება და ეს შეიძლება აიხსნას მისი ჩართვით მძლავრი აუტოქსიდაბელური ტერმინალური აქცეპტორის მქონე ელექტრონთა სატრანსპორტო ჯაჭვში. NADPH-სპეციფიკურ ჯაჭვში ასეთ აქცეპტორად ციტოქრომ P450 ფუნქციონირებს. გარდა ამისა, საინკუბაციო ნარევიში ჰიდროქსილირების სუბსტრატის-დიმეთილანილინის შეყვანისას ციტოქრომ  $b_5$ -ის აღდგენილობის ხარისხი კლებულობს, რაც ჰიდროქსილირების რეაქციაში ელექტრონულ გადამტანად ციტოქრომ  $b_5$ -ის უშუალო მონაწილეობის პირდაპირი მაჩვენებელია.

NADPH-ის ჟანგვის ჯაჭვში ციტოქრომ  $b_5$ -ის ერთ-ერთი ქვეფრაქციის ფუნქციონირების მნიშვნელოვან დადასტურებად შეიძლება ჩაითვალოს იმ ექსპერიმენტების შედეგები, რომლებშიც NADH-ისა და NADPH-ის თანამყოფობის პირობებში იზომებოდა ციტოქრომ  $b_5$ -ის ჟანგვა-აღდგენის სინქარეები და იგი ედრებოდა ამ სუბსტრატთა თანამყოფობისას ციტოქრომ  $b_5$ -ის სტაციონარული მდგომარეობის დონეებს. ამის საფუძველზე დიფერენცირებულ იქნა პრინციპულად ორი განსხვავებული სქემა [126]:



სქემა 1.1. (განმარტება ტექსტში).

პირველი სქემა (ა), რომელსაც მკვლევართა უმეტესობა იზიარებს, ციტოქრომ  $b_5$ -ის მხოლოდ ერთი ფრაქციის არსებობას ითვალისწინებს. იგი ჩართულია NADH-ის ჟანგვის ჯაჭვში, მაგრამ NADPH-სპეციფიკური ფლავოპროტეინითაც შეუძლია აღდგენა. სხვა შესაძლებლობაა ნაჩვენები (ბ) სქემაზე, რომელიც საკმაოდ ორიგინალურია და ციტოქრომ  $b_5$ -ის ორი ქვეფრაქციის არსებობას ითვალისწინებს. თუ გაიზომება ციტოქრომ  $b_5$ -ის ჟანგვა-აღდგენითი რეაქციის საწყისი სიჩქარეები, შეიძლება გამოითვალოს აერობულ პირობებში მისი აღმდგენელობის დონე და ექსპერიმენტურად დადგენილს შედარდეს. ამ სიდიდეთა დამთხვევა ელექტრონთა გადატანის განხილული სქემის სისწორეზე, ხოლო საწინააღმდეგო შემთხვევაში მის არაადექვატურობაზე მიუთითებს [121]. მიკროსომულ მემბრანებში NADH-ისა და NADPH-ის თანმყოფობისას ციტოქრომ  $b_5$ -ის აღმდგენელობითი დონეების ექსპერიმენტულად მიღებული და თეორიულად გამოთვლილი სიდიდეების მონაცემები ასე გამოიყურება:

ექსპერიმენტული სიდიდეები	70	57
თეორიულად გამოთვლილი სიდიდეები		
სქემა ა	100	99
სქემა ბ	74	60

კარგად ჩანს, რომ ასეთ დამთხვევას მხოლოდ (ბ) სქემის შემთხვევაში აქვს ადგილი.

NADPH-ის ჟანგვის რეაქციებში ციტოქრომ  $b_5$ -ის მონაწილეობა შესაძლებელი გახდა გამოვლენილიყო ცდებით, რომლებშიც შეისწავლებოდა NaCl-ის

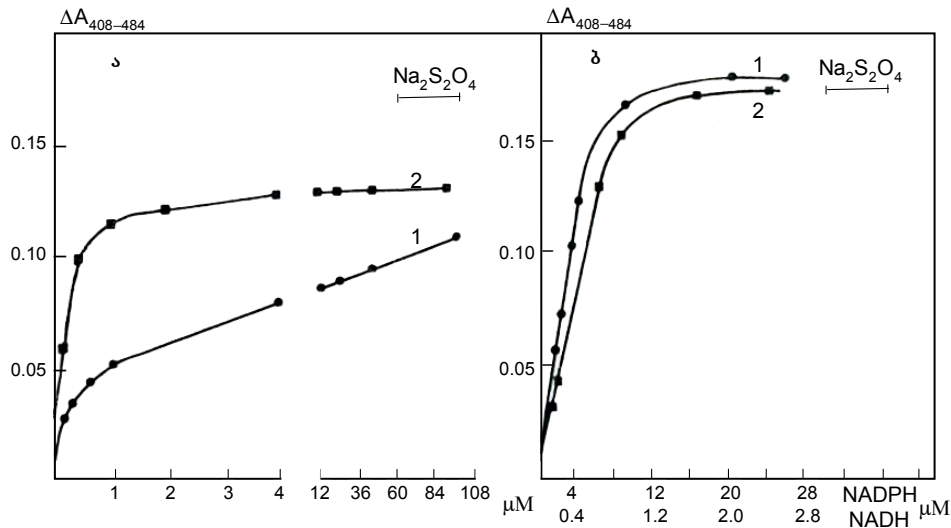
თანამყოფობისას NADPH-ციტოქრომ  $b_5$ - და NADPH-ციტოქრომ P450-რედუქტაზულ აქტივობათა სტიმულირება. აღმოჩნდა, რომ საინკუბაციო არეში NaCl-ის შეტანით იზრდება NADPH-ით და არა NADH-ით ციტოქრომების –  $b_5$ -ისა და P450-ის აღდგენის რეაქციათა სიჩქარეები [119, 112].

აღნიშნულიდან გამომდინარე, გამოითქვა მოსაზრება ენდოპლაზმურ რეტკულუმში ციტოქრომ  $b_5$ -ის ორი ქვეფრაქციის არსებობის შესახებ, რომელთა ჟანგვა-აღდგენა განსხვავებული გზებით ხორციელდება. ამასთან, ერთი ქვეფრაქცია აღდგება NADPH-ით და იჟანგება ციტოქრომ P450-ით, ხოლო მეორე NADH-ით განიცდის აღდგენას და შემდგომში შეიძლება სხვა გზით დაიჟანგოს.

ენდოპლაზმურ მემბრანებში ორი ელექტრონგადამტანი კომპლექსური სისტემის არსებობა, რომელთაგან თითოეული თავის ციტოქრომ  $b_5$ -ს შეიცავს, გამოკვლეულ იქნა ტრიტონ X-100-ით დამუშავებულ მიკროსომული მემბრანების პრეპარატებში. ვარაუდობდნენ, რომ დეტერგენტი დაარღვევდა რა ფერმენტულ კომპლექსთა მკაცრ სივრცობრივ ორიენტაციას, მოსპობდა ციტოქრომების კომპარტმენტალიზაციას და იმავდროულად გააქრობდა განსხვავებას ჰემოპროტეინების ჟანგვის გზებს შორის. ნაჩვენები იქნა, რომ დეტერგენტის დახმარებით შესაძლებელია ციტოქრომ  $b_5$ -ის ორ ფრაქციას შორის განსხვავების ნიველირება და მიიღება ციტოქრომების ერთიანი ფონდი, რომელიც თანაბარი დონით აღდგება როგორც NADH-ით, ასევე NADPH-ით. ამისათვის აუცილებელი აღმოჩნდა, რომ პირიდინ-უკლეოტიდების კონცენტრაციები თითქმის ერთი რიგით განსხვავდებოდნენ ერთმანეთისაგან. აერობულ პირობებში NADPH-ის სხვადასხვა კონცენტრაციებით ციტოქრომ  $b_5$ -ის აღდგენის მრუდი პროცესის ორსტადიურობაზე მიუთითებს (ნახ. 1.3): პირველისათვის დამახასიათებელია აერობულ (ა) და ანაერობულ (ბ) პირობებში ციტოქრომ  $b_5$ -ის აღდგენის დონის დამოკიდებულება NADPH-ისა (1) და NADH-ის (2) კონცენტრაციებზე [126].

NADPH-ის მიმართ აღმდგენელი სისტემის მაღალი სწრაფვა ( $K_M=0.3 \mu M$  NADPH), და გაჯერება, NADPH-ის მაღალი კონცენტრაციების (100 მკმ) გამოყენებისასაც კი არ მიიღწევა.

ანაერობულ პირობებში ციტოქრომ  $b_5$ -ის შენელებული აღდგენის მეორე ფაზა ქრება და მხოლოდ ამ ჰემოპროტეინის სწრაფი გაჯერების ფაზა ( $K_M \sim 2.5 \mu M$ ) რჩება. ეს გარემოება შეიძლება NADPH-სპეციფიკურ ჯაჭვში ციტოქრომ P450-ის – მძლავრი ელექტრონული აქცეპტორის არსებობით



ნახ. 1.3. აერობულ (ა) და ანაერობულ (ბ) პირობებში ციტოქრომ  $\text{b}_5$ -ის აღდგენილობის დონის დამოკიდებულება NADPH-ისა (1) და NADH-ის (2) კონცენტრაციებზე [126].

აიხსნას. სწორედ ციტოქრომ  $\text{b}_5$ -ის სწრაფი დაჟანგვის რეაქცია იწვევს იმას, რომ სტაციონარული მდგომარეობის მიღწევის შემდეგ მისი აღდგენილობის დონე NADPH-ის კონცენტრაციის გაზრდისას უმნიშვნელოდ მატულობს.

NADH-ის თანამყოფობისას ციტოქრომ  $\text{b}_5$ -ის მაქსიმალური აღდგენილობის დონე ერთნაირად ადვილად მიიღწევა როგორც აერობულ, ასევე ანაერობულ პირობებში ( $K_M=0.4 \mu\text{M}$ ). სუბსტრატად NADH-ის გამოყენებისას მისი აღდგენის შენელებული ფაზის არარსებობა საშუალებას იძლევა მისაღებად ჩაითვალოს, რომ ღვიძლის ენდოპლაზმური რეტიკულუმის მემბრანებში ფუნქციონირებენ ციტოქრომ  $\text{b}_5$ -ის განსხვავებული ქვეფრაქციები, რომელთაგანაც ერთი – სწრაფად ჟანგვადი – უშუალოდაა ჩართული NADPH-სპეციფიკურ რედოქს-ჯაჭვში და აქ ტერმინალურ ელექტრონულ აქცეპტორს ციტოქრომი  $\text{b}_5$  წარმოადგენს, ხოლო მეორე – შენელებულად ჟანგვადი – ჩართულია NADH-სპეციფიკურ ელექტრონის სატრანსპორტო სისტემაში. ამ ორ რედოქს-სისტემას შორის ელექტრონების ცვლა უნდა ხორციელდებოდეს [126]. ანაე-

რობულ პირობებში წყალბადის ზეჟანგის დამატებისას NADH-ით აღდგენილი ციტოქრომ  $b_5$ -ის არაუმეტეს 20%-ის დაჟანგვა ხდება, მაშინ როცა NADPH-ით აღდგენილი ციტოქრომი სრულად იჟანგება. ეს შედეგი იმაზე მეტყველებს, რომ NADH-ის ჟანგვის ჯაჭვში ჩართულ ციტოქრომ  $b_5$ -ს საკუთარი ტერმინალური აუტოოქსიდაბელური ელექტრონის აქცეპტორი არ გააჩნია.

ანაერობულ პირობებში NADPH-ით აღდგენილი ციტოქრომ  $b_5$ -ის ნაწილობრივი დაჟანგვა შეიძლება აიხსნას ციტოქრომ  $b_5$ -ის იმ ქვეფრაქციის დაჟანგვით, რომელიც NADPH-ის ჟანგვის ჯაჭვშია ჩართული და რომელიც ანაერობიოზისას NADH-ით აღდგენას განიცდის. აერობულ პირობებში ციტოქრომ  $b_5$ -ის ეს ქვეფრაქცია NADH-ით არ აღდგება, რადგან NADH-ის ჟანგვის ჯაჭვიდან NADPH-ის ჟანგვის ჯაჭვზე ელექტრონების გადატანა ძლიერ უმნიშვნელოა.

კიდევ ერთი ძნელად ასახსნელი ფაქტის შესახებ: აბსოლუტურად გაუგებარია თუ +20 mV რედოქს-პოტენციალის მქონე ციტოქრომ  $b_5$ -იდან თუ როგორ ტრანსპორტირდებიან აღმდგენელი ექვივალენტები ციტოქრომ P450-ზე, რომლის რედოქს-პოტენციალი -200-იდან -300 mV-მდე შეადგენს და თან NADPH-რედოქს-ჯაჭვში ეს ორივე გადამტანი თითქმის სრულად დაჟანგულ მდგომარეობაში იმყოფება. ამასთან დაკავშირებით არსებობს მეტად საყურადღებო თვალსაზრისი იმის შესახებ, რომ სუნთქვითი ჯაჭვის ამ უბანზე ელექტრონთა გადატანა ელექტრულ ველში ხორციელდება, რომელიც ციტოქრომ P450-სა (“პლიუსი” ჰემის რკინაზე) და ჟანგბადს (“მინუსი”) შორის წარმოიქმნა. ეს უკანასკნელი რკინისაგან მნიშვნელოვან მანძილზე იმყოფება. მემბრანის განივად ასე განწყობილ ელექტრულ ველში ელექტრონები შეიძლება ეფექტურად გადაადგილდნენ ციტოქრომ  $b_5$ -იდან ციტოქრომ P450-ზე [126].

ციტოქრომ  $b_5$ -ის მეორადი და მესამეული სტრუქტურა სადღეისოდ დეტალურადაა შესწავლილი. ცნობილია, რომ მოლეკულაში ჰემის რკინა დაკავშირებულია აპოფერმენტის ჰისტიდინის ორ იმიდაზოლთან. აპოფერმენტის ნუკლეოფილური დაჯგუფებები და ლიზინის  $\epsilon$ -ამინოჯგუფები აპოფერმენტთან ჰემის მიერთებაში არ მონაწილეობენ [104, 105, 112, 127]. აპოფერმენტთან ჰემის რკინის ლიგანდური ურთიერთქმედებით ციტოქრომი  $b_5$  ძლიერ წააგავს ჰემოგლობინის მოლეკულას, მაგრამ ამ ცილათა ფუნქციები მნიშვნელოვნად განსხვავდებიან ერთმანეთისაგან [127]. ციტოქრომის მოლეკულა ელიფსოიდური ფორმისაა 25×25×32 ნმ ზომებით. მთელი ჰემი მოლეკულის ჰიდროფობული უბნის შიგნითაა განლაგებული და მხოლოდ პროპიონის მჟავას ნაშთი გამოდის

აპოფერმენტის ზედაპირზე [128, 129].

ციტოქრომ  $b_5$ -ის სხვა მახასიათებლებიდან საჭიროა აღინიშნოს მისი მაგნიტური თვისებები. მიკროსომულ პრეპარატში ჰემოპროტეინის  $b_5$ -სიგნალი ძალიან სუსტია და ამიტომ მისი მაგნიტური თვისებების კვლევა მხოლოდ იზოლირებულ ფერმენტზე შესაძლებელია. ამ დროს შემდეგი სიგნალები ვლინდებიან: დაბალსპინური (g-ფაქტორით 3.03, 2.23 და 1.43) და მაღალსპინური კომპონენტი (g-ფაქტორი 6.2). ტუტე არეში ფერმენტის დენატურაციისას მაღალსპინური სიგნალის ამპლიტუდა მკვეთრად იზრდება [130, 131].

ციტოქრომ  $b_5$ -ის ჭეშმარიტი ფუნქცია ჯერაც იდუმალებით მოცული რჩება. ამ მიმართულებით კვლევას ის აფერხებს, რომ გამოვლენილი არაა მოცემული ჰემოპროტეინის შემცველი NADH-ის მჟანგველი სისტემის საბოლოო ელექტრონული აქცეპტორი. ამასთან დაკავშირებით რამდენიმე თვალსაზრისი არსებობს. მათგან უპირველეს ყოვლისა უნდა აღინიშნოს ვარაუდი მემბრანაში ჩაშენების შემდეგ ამ ჰემოპროტეინის მიერ თვითდაჟანგვის შექმნის უნარის შესახებ. ეს თვალსაზრისი ექსპერიმენტულად არ დასაბუთებულა. ამასთან დადგენილ იქნა, რომ იზოლირებულ და მემბრანაში ჩაშენებულ ციტოქრომს ერთნაირი რედოქს-პოტენციალი გააჩნია და ამდენად ნაკლებ მოსალოდნელია მემბრანაში ჩაშენებისას ჰემოპროტეინის ფიზიკური თვისებების ასეთი მკვეთრი ცვლილებები, რამაც მისი თვითდაჟანგვა უნდა დააჩქაროს.

სადავო რჩება მეორე ალტერნატივაც იმის შესახებ, რომ მიკროსომებში არსებობს განსაკუთრებული ციანიდმგრძობიარე ფაქტორი, რომელიც NADH-ის ჟანგვის ჯაჭვის ტერმინალურ აქცეპტორს შეიძლება წარმოადგენდეს და ნაჯერ ცხიმოვან მჟავათა დენატურაციის რეაქციებში მონაწილეობს [132-134]. აღმოჩნდა, რომ ფლავოპროტეინისა და ციტოქრომ  $b_5$ -ის გარდა, ამ რეაქციებში მონაწილეობს კომპონენტი, რომელიც NaCN-ისადმი თავისი სწრაფით ძლიერ წააგავს ციტოქრომოქსიდაზისადმი  $\text{NaN}_3$ -ის სწრაფვას. ციტოქრომოქსიდაზისაგან განსხვავებით, ციანიდმგრძობიარე ფაქტორი არ ინჰიბირდება  $\text{Na}_2\text{S}$ -ით. სწორედ ამ ფაქტორის ხორკლიან მემბრანებში სწრაფი სინთეზი და შემდგომ მისი გადასვლა გლუვ მემბრანებში პასუხისმგებელი აღმოჩნდა ნახშირწყლებით მდიდარ დიეტაზე მყოფი ვირთხების ღვიძლის ენდოპლაზმურ მემბრანებში დენატურაზული აქტივობის ინდუქციაზე [134].

ციანიდმგრძობიარე ფაქტორი იზოლირებულია მაღალი სისუფთავის მდგომარეობაში. ეს პრეპარატი არ შეიცავს არც ფლავო- და ჰემოპროტეინს. ცილა:ფოსფორიპიდის თანაფარდობა მასში 1:1-ზეა. ამ მონაცემების საფუძ-



ველზე აღნიშნული ფაქტორი უნდა განიხილებოდეს არა როგორც ელექტრონების გადამტანი, არამედ ლიპოპროტეინი, რომელიც აუცილებელია დესატურაციის რეაქციისათვის.

NADH-ის ჟანგვის ჯაჭვის ინჰიბიტორულმა ანალიზმა აჩვენა, რომ NADH-ის ოქსიდაზურ რეაქციაში მონაწილეობს ორვალენტური მეტალთა იონები. ეს რეაქცია ინჰიბირდება EDTA-ით და აქტიურდება  $Ca^{2+}$ -ით. საფიქრებელია, რომ  $Ca^{2+}$ -ის გამააქტივებელი მოქმედება გამოწვეული იყოს NADH-ისათვის ენდოპლაზმური მემბრანის განვლადობის გაზრდით. NADH-ის ჟანგვა არამგრძობიარეა მიტოქონდრიული შხამების – როტენონისა და ანტიმიცინ A-ს მიმართ. იგი მდგრადია ციანიდის, აზიდის და სულფჰიდრილური შხამების მიმართაც. მიკროსომებში NADH-ის ჟანგვის სიჩქარეზე დამორგუნველად მოქმედებენ ციტოქრომ P450 ჰიდროქსილასას სუბსტრატები და ინჰიბიტორები [126].

არსებული მონაცემები საშუალებას იძლევა NADH-ის ჟანგვა ჩავთვალოთ მიკროსომული ჟანგვის განსაკუთრებულ სახედ, რომელიც არამგრძობიარეა ტიპური მიტოქონდრიული ინჰიბიტორების მიმართ. ამავე დროს, უეჭველია ამ რეაქციებში ციანიდმგრძობიარე ელექტრონთა ტერმინალური აქცეპტორის მონაწილეობა. სავსებით შესაძლებელია, რომ ციტოქრომ P450 გარკვეულ როლს ასრულებდეს NADH-ოქსიდაზურ რეაქციებში. ყველა ნივთიერება, რომელიც ამ ჰემოპროტეინთან ურთიერთქმედებს, NADH-ის ჟანგვის ინჰიბირებას იწვევს. დათრგუნვის მექანიზმი კვლავაც უცნობია.

### **1.3.4 ციტოქრომ P450 — მიკროსომების ელექტრონთა სატრანსპორტო სისტემის ტერმინალური კომპონენტი**

მიკროსომების სუსპენზიაში აღმდგენი აგენტის დამატების და ნახშირბადის მონოოქსიდის გატარების შედეგად წარმოქმნილ პროდუქტს სპექტრის 450 ნმ-ზე შთანთქმის მაქსიმუმი ახასიათებს. ჰემშემცველი პროტეინების წარმომადგენლებს, რომელთაც ზოლები შთანთქმის სპექტრის ამ ოლქში (სორეს ოლქში) გააჩნიათ, ციტოქრომ P450-ებს აკუთვნებენ [6].

ელექტრონთა სატრანსპორტო სისტემებში ციტოქრომ P450-ის სხვადასხვა ფორმები ტერმინალური აქცეპტორის როლს ასრულებენ. ეს სისტემები ძირითადად ენდოპლაზმურ და მიტოქონდრიულ მემბრანებში ლოკალიზდებიან. ისევე

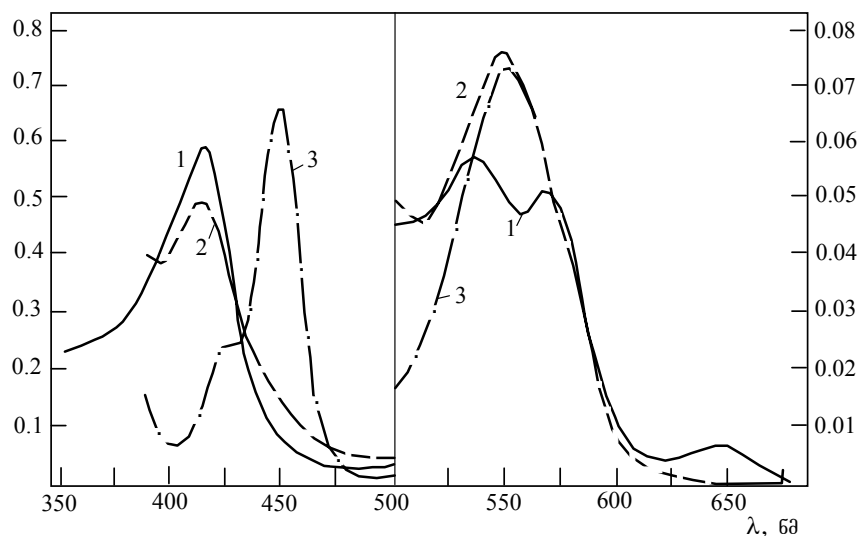
როგორც ყველა სხვა ციტოქრომი, P450-იც რკინა-პორფირინის პროსტეტულ ჯგუფს შეიცავს. იგი ტეტრაპიროლური ნაერთის – პორფირინის საწყისი წარმოებულია. მისი მოლეკულები ოთხი მეთილის, ორი ვინილის ჯგუფებისა და პროპიონმჟავას ნაშთისაგან შედგება. რამდენადაც პროტოპორფირინები სამი განსხვავებული ტიპის ჩამნაცვლელებს შეიცავენ, მათ გვერდითი ჯაჭვის რვა შესაძლო მდგომარეობაში ჩანაცვლებულების განლაგების რიგის მიხედვით თხუთმეტი იზომერული ფორმით არსებობა შეუძლიათ. ამ იზომერებიდან მნიშვნელოვანია პროტოპორფირინი IX (იხ. 1.5), რომელსაც როგორც ციტოქრომ b<sub>5</sub>, ციტოქრომ P450-იც შეიცავს. იგი რკინის, მაგნიუმის, თუთიის, კობალტისა და სპილენძის იონებთან “ოთხბირთვიან” კომპლექსებს წარმოქმნის. ჰემში პორფირინის ოთხი ლიგანდური ჯგუფი რკინასთან კომპლექსს იძლევა, რომელსაც ბრტყელი აღნაგობა აქვს, ხოლო რკინის მეხუთე და მეექვსე კოორდინაციული კავშირები პორფირინის ბირთვის სიბრტყის პერპენდიკულარულია. ყველა ცნობილი ციტოქრომის ჰემის რკინა დაკავშირებულია პორფირინის ბირთვის პიროლის აზოტის ოთხ ატომთან. მეხუთე აქსიალური (პერპენდიკულარულ მდგომარეობაში არსებული) ლიგანდი მასთან ცისტეინის ნაშთის მერკაპტილური ჯგუფითაა დაკავშირებული, ხოლო მეექვსე შეიძლება სხვა ლიგანდით (მაგ., ჟანგბადით, ნახშირბადის მონოოქსიდით, ციანიდით და ა.შ.) იყოს ჩანაცვლებული. ბუნებრივია, რომ ჰემოპროტეინის კოორდინაციული კომპლექსის ძირითადი ფიზიკური მახასიათებლები დამოკიდებული უნდა იყოს მეხუთე და მეექვსე ლიგანდებზე, რომლებიც ჰემის პროსტეტულ ჯგუფს უკავშირდებიან [96].

მოდელური სისტემები, რომლებშიც მეხუთე ლიგანდს გოგირდის ატომი, ხოლო მეექვსეს იმიდაზოლის აზოტი წარმოადგენენ, ყველაზე ოპტიმალურად იმეორებენ ჰემოპროტეინის სპექტრულ თვისებებს. სწორედ ეს ლიგანდები ინაცვლებიან სულფჰიდრილური შხამებითა და ციტოქრომ P450-ის სპეციფიკური ინჰიბიტორით – მეთირაპონით. დითიონიტით აღდგენისას ციტოქრომ P450-ს ელექტრონის მიღება შეუძლია, რაც იმაზე მიუთითებს, რომ ჰემოპროტეინი, ჰემური რკინის გარდა, ელექტრონის კიდევ ერთ აქცეპტორს უნდა შეიცავდეს [96, 126].

ხანგრძლივი პერიოდის განმავლობაში არ ხერხდებოდა მემბრანიდან ციტოქრომ P450-ის ნატიური ფორმით სოლუბილიზაცია. ამის მიზეზს მისი უაღრესად მაღალი ლაბილურობა წარმოადგენს, რის გამოც იგი ადვილად გარდაიქმნება (კონვერსირდება) არააქტიურ ციტოქრომ P420-ად. ამ უკანასკნელს b-

ტიპის ციტოქრომებისათვის დამახასიათებელი სპექტრი გააჩნია. უნდა აღინიშნოს, რომ P450-ის კონვერსია მარტო სოლუბილიზაციისას არ შეინიშნება. მას ადგილი აქვს მემბრანაზე ნეიტრალურ მარილთა მაღალი კონცენტრაციებით, ტრიფსინით, ლიზოლექტინით, *p*-ქლორმერკურიბენზოატით, ორგანული გამხსნელებითა და სხვა ნაერთებით ზემოქმედებისას. არც ერთ ჩამოთვლილ შემთხვევაში მემბრანიდან ფერმენტის სოლუბილიზაცია არ ხდება. ამის გამო კვლევათა უმრავლესობა ძირითადად სუსპენზიურ პრეპარატებზე ტარდებოდა [135-137]. 1974 წელს იაპონელი მკვლევარების იმაისა და სატოს მიერ ფენობარბიტალით ინდუცირებული კურდღლის ღვიძლის მიკროსომებიდან გამოყოფილ იქნა ციტოქრომ P450 ჰომოგენურ მდგომარეობაში (ჰემოპროტეინის შემცველობა 17 ნმოლი/მგ ცილაზე). ამ მიზნით მათ გამოიყენეს აფინური ქრომატოგრაფია *α*-ამინოპტილსეფაროზაზე, რადგან ამ დროისათვის უკვე ცნობილი იყო, რომ *n*-ოქტილამინი თვითონ წარმოადგენს განსაკუთრებით ძლიერ ლიგანდს დაჟანგული ფორმის ციტოქრომ P450-ისათვის [140]. ამჟამად საყოველთაოდაა მიღებული, რომ სეფაროზას როგორც ალკილური, ასევე იონური ჯგუფები ერთნაირად მნიშვნელოვანია მიკროსომულ ფერმენტთა გამოყოფის პროცესში [141]. თითქმის იმავედროულად, 1974 წელს კუნმა და მისმა თანამშ. [142] წარმოადგინეს ჰომოგენური ციტოქრომ P450-ის მიღების მეთოდი, რომელშიც ფრაქციონირებისათვის პოლიეთილენგლიკოლი იქნა გამოყენებული. აქაც ჩატარდა ფენობარბიტალით წინასწარი ინდუქცია, ოღონდ კურდღლის ღვიძლის მიკროსომები დამუშავდა პიროფოსფატით, სოლუბილიზაცია მოხდა ნატრიუმის ქოლატით, ხოლო ფრაქციონირება – პოლიეთილენგლიკოლ 6000-ით. ფერმენტის შემდგომი გასუფთავება განხორციელდა ქრომატოგრაფიით რამდენიმე საფეხურად: DEAE-ცელულოზაზე, ჰიდროქსიაპატიტზე და კალციუმის ფოსფატთან გელზე. დამამთავრებელ სტადიაზე გამოყენებულ იქნა არაიონური დეტერგენტი რენექს-690. ამ გზით აღნიშნულმა მკვლევარებმა მიიღეს ციტოქრომ P450-ის ფორმები, რომლებიც ერთმანეთისგან განსხვავდებოდნენ ელექტროფორეზული ძვრადობით და აღდგენილი კარბონილური (CO-დაკავშირებული) კომპლექსების სპექტრებით. ელექტროფორეზული ძვრადობის შემცირების რიგისა და თითოეული სუბერთეულის მოლეკულური მასის ზრდის მიხედვით ეს ფორმები პირობითად ჩაიწერა, როგორც LM<sub>1</sub>, LM<sub>2</sub> და ა.შ. ფენობარბიტალით ინდუცირებული ციტოქრომ P450 აღინიშნა, როგორც P450LM<sub>2</sub> [143]. ფერმენტი 90%-იანი სისუფთავისა და ელექტროფორეზულად ჰომოგენურია. იგი 49 kD მოლეკულური მასის მქონე პოლიპეპტიდს შეიცავს და

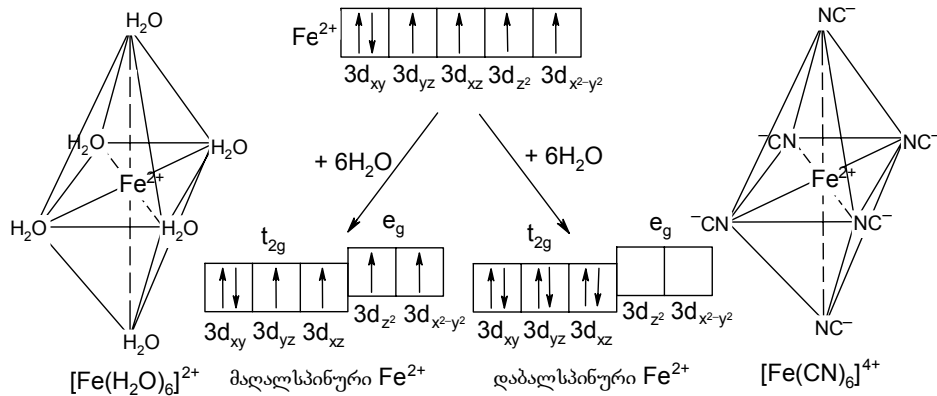
409 ამინომჟავური ნაშთისაგან შედგება. ჰემოპროტეინის პოლიმერულ ფორმას გააჩნია 280 kD მოლეკულური მასა და, როგორც ჩანს, 6 სუბერთეულისაგან შედგება. ყოველ პოლიპეპტიდზე 6 ცისტეინი და ~50%-მდე არაპოლარული ამინომჟავა მოდის. ამ ცილის ტიპური აბსოლუტური შთანთქმის სპექტრები მოცემულია სურათზე (ნახ. 1.4) [144].



ნახ. 1.4. ღვიძლის მიკროსომების ციტოქრომ P450-ის შთანთქმის სპექტრები.

1. დაჟანგული ფორმა;
2. აღდგენილი ფორმა;
3. აღდგენილი და CO-სთან კომპლექსირებული ფორმა.

ციტოქრომ P450-ის მიერ კატალიზური აქტის განსახორციელებლად NAD(P)H-ის აღდგენელი ექვივალენტებით მისი აღდგენის სიჩქარეს ძირითადად აქტიურ ცენტრში მყოფი რკინის იონის სპინური მდგომარეობა განსაზღვრავს. ამ იონს 5 სხვადასხვა სივრცული ორიენტაციის მქონე 3d ორბიტალზე 6 ელექტრონი აქვს (ნახ. 1.5). 3d<sub>xy</sub> ორბიტალი ურთიერთსაპირისპირო სპინის მქონე ორ ელექტრონს შეიცავს, ხოლო დანარჩენი ორბიტალები ერთნაირი სპინის მქონე თითო ელექტრონითაა დაკავებული. როდესაც ოქტაედრულ სტრუქტურაში Fe<sup>2+</sup> ექვსი ლიგანდითაა გარემოცული, მაშინ ლიგანდების



ნახ. 1.5. რკინის (II) იონის სპინური მდგომარეობები (განმარტება იხ. ტექსტში).

ოქტაედრული ველის გავლენით 3d ორბიტალი განსხვავებული ენერჯის მქონე  $e_g$  და  $t_{2g}$  ქვედონებად იხლიჩება; ამასთან, ელექტრონების აღნიშნულ ქვედონებზე გადანაწილება დამოკიდებულია ოქტაედრული ველის სიძლიერეზე.

შესაძლებელია ორი ზღვრული შემთხვევა:

1. სუსტი ოქტაედრული ველის შემთხვევაში, რომელსაც, მაგ.,  $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ -კომპლექსში  $\text{Fe}^{2+}$ -ის გარშემო განლაგებული წყლის მოლეკულები ქმნიან, მაღალი ენერჯის  $e_g$ -ქვედონეზე განლაგდებიან  $3d_{z^2}$  და  $3d_{x^2-y^2}$  ორბიტალების ელექტრონები, რომლებიც ლიგანდებთან  $\sigma$ -ბმებს წარმოქმნიან;  $3d_{xy}$ ,  $3d_{yz}$  და  $3d_{xz}$  ორბიტალებიდან დაბალი ენერჯის  $t_{2g}$  ქვედონეზე გადასული ელექტრონები კი  $\pi$  ბმების წარმოქმნაში იღებენ მონაწილეობას; ამასთან ორივე ქვედონეზე ელექტრონები ისე არიან ორიენტირებული, რომ მათი სპინური ქვანტური რიცხვების ჯამი მაქსიმალურია და +2-ს აღწევს. ასეთი გარემოცვისას  $\text{Fe}^{2+}$  მაღალსპინურ მდგომარეობაში იმყოფება.
2. ძლიერი ოქტაედრული ველის შემთხვევაში მაგ.,  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ -კომპლექსში ექვსივე ელექტრონი დაბალი ენერჯის  $t_{2g}$ -ქვედონეზეა გადასული. ისინი ურთიერთსაპირისპირო მიმართულებით თავსდებიან. შესაბამისად ამ ელექტრონების სპინური ქვანტური რიცხვების ჯამი ნულის ტოლი იქნება. ამიტომ ამ კომპლექსში  $\text{Fe}^{2+}$  დაბალსპინურ მდგომარეობაშია. ზოგიერთი ჰემოპროტეინისათვის დადგენილია მაღალ- ( $S=5/2$ ) და დაბალ-

( $S=1/2$ ) სპინურ ფორმებს შორის წონასწორობის არსებობა, ანუ სხვადასხვა ობიექტებიდან მიღებულ მიკროსომებში ციტოქრომ P450 ფაქტიურად ორივე სპინური ფორმის ნარევის სახით არის წარმოდგენილი [145, 146]. ეს მდგომარეობები ერთმანეთისაგან ენერგეტიკულად დიდად არ განსხვავდება და გარე ფაქტორთა გავლენით შესაძლებელია მათი ურთიერთგადასვლა. ლიგანდების ველის თეორიის თანახმად განსაზღვრული ლიგანდების ზემოქმედებას ე.წ. სპინების შეწყველების ენერგია შეესაბამება.

რკინის იონთა დაჟანგულობის ხარისხის შექცევადი ცვლილება  $[Fe^{+2} \rightleftharpoons Fe^{+3}]$  ციტოქრომ P450-ს საშუალებას აძლევს თავისი ჭეშმარიტი, ელექტრონთა გადატანის ფუნქცია შეასრულოს. სუბსტრატის მიერთება ჰემის რკინის ელექტრონული ღრუბლის შემოთებას იწვევს. ამის გამო მისი რედოქს-პოტენციალი უფრო დადებითი ხდება, ვიდრე სუბსტრატის გარეშეა. ეს გარემოება შესაძლებელს ხდის, რომ ეს ჰემოპროტეინი აღდგეს ელექტრონებით, რომელიც მას NADPH-დან ფლავოპროტეინის გავლით, NADPH-ციტოქრომ P450-რედუქტაზას საშუალებით გადაეცემა. ჰიდროქსილირების აქტის განსახორციელებლად ორი ელექტრონია საჭირო და მათ ციტოქრომი ერთმანეთისაგან დამოუკიდებლად ღებულობს. ჰემის რკინა დაჟანგულობის  $+2$ -ხარისხში უნდა იმყოფებოდეს, რათა მან ჟანგბადის მიერთება შეძლოს. ამიტომ პირველი ელექტრონი ჰემთან ჟანგბადის მიერთებას, ხოლო მეორე – ჟანგბადის გააქტივებას ხმარდება [135].

სხვადასხვა წარმოშობის ციტოქრომ P450-ები სპექტრული თვისებებით იდენტურებია. ოთახის ტემპერატურაზე და pH 7.0-ზე ამ ჰემოპროტეინის დაჟანგულ და აღდგენილ ფორმებს სორეს ზოლები შესაბამისად 415 და 412 ნმ-ებზე გააჩნიათ. სპექტრში 424 ნმ-ზე მხარაც რეგისტრირდება. სხვა ციტოქრომებისაგან განსხვავებით, დაჟანგული ციტოქრომ P450 რამდენადმე ატიპური აბსოლუტურ შთანთქმის სპექტრს იძლევა, რაც იმაში მდგომარეობს, რომ შთანთქმის ჩვეულებრივი ზოლების გარდა, რაც რკინის დაბალსპინური მდგომარეობისთვისაა დამახასიათებელი, 650 ნმ-ის ოლქში ჩნდება ახალი ფართო ზოლი, ეს კი იმის მაჩვენებელია, რომ CO-ს გარეშე აღდგენისას იგი მაღალსპინურ მდგომარეობაში იმყოფება. გარდა ამისა, თვალში საცემია აღდგენილი ციტოქრომ P450-ის შთანთქმის სპექტრში სორეს ოლქის ანომალური განლაგება 448 ნმ-ზე CO-სთან კომპლექსირებისას და 450 ნმ-ზე ჰემოპროტეინის ფორმაზე დამოკიდებულებით. ამის საპირისპიროდ სხვა ჰემოპროტეინები CO-კომპლექსთან შთანთქმის მაქსიმუმს 420 ნმ-ზე ამჟღავნებენ. აღდგენილი

ციტოქრომ P450-ის კარბონილური კომპლექსის ექსტინქციის კოეფიციენტი  $91\ 000\ \text{მოლი}^{-1}\text{სმ}^{-1}$ -ის ტოლია და ამ სიდიდეს ფერმენტის კონცენტრაციის განსასაზღვრად იყენებენ [7].

ციტოქრომ P450 ნახშირბადის მონოოქსიდს მხოლოდ აღდგენილი ფორმით იკავშირებს. ამასთან ჩნდება შთანთქმის ერთი მაქსიმუმი 450 ნმ-ზე. CO-სადმი ფერმენტის სწრაფვა ძლიერ მაღალია:  $K_{CO}=1.3\ \mu\text{M}$ -ს და მეორე რიგის რეაქციის სიჩქარის კონსტანტა  $25^{\circ}\text{C}$ -ზე და  $2.4 \cdot 10^5\ \text{მოლიწმ}^{-1}$ -ის ტოლია. ალკილიზოციანიდები ერთნაირად უკავშირდებიან როგორც აღდგენილ, ასევე დაჟანგულ ციტოქრომ P450-ს. ამასთან, დაჟანგული ჰემოპროტეინი შთანთქმის მხოლოდ ერთ მაქსიმუმს წარმოქმნის 434 ნმ-ზე, დაჟანგული კი ორ მაქსიმუმს ამჟღავნებს 430 და 455 ნმ-ებზე. ზოლების ინტენსივობის თანაფარდობა ბუფერის იონურ ძალასა და გარემოს pH-ზეა დამოკიდებული [126].

სოლუბილიზებული ციტოქრომ P420 ხ-ტიპის ჰემოპროტეინებისათვის დამახასიათებელ თვისებებს ავლენს. მისი დაჟანგული ფორმა სორეს ზოლს 414 ნმ-ზე ფლობს, ხოლო აღდგენილი – მაქსიმუმებს 427-ის, 530-ისა და 560 ნმ-ის ოლქში იძლევა. ფერმენტის რედოქს-პოტენციალი ( $E_0'$ ) pH 7.0-ზე -20 mV-ის ტოლია. pH 9.5-ზე მისი მონომერის მოლეკულური მასა 150 kD-ის რიგისაა [126].

აპოფერმენტთან პროსთეტული ჯგუფის სპეციფიკური ურთიერთქმედება განსაზღვრავს ციტოქრომ P450-ის სპექტრულ, მაგნიტურ, ქიმიურ და ფუნქციურ მახასიათებლებს. დიდ მაგნიტურ ველებში მიკროსომების მპრ-სპექტრები პირველად მეისონისა და მისი თანამშ. [147] მიერაა დარეგისტრირებული და დადგენილია გ-ფაქტორების მნიშვნელობები. აღმოჩნდა, რომ ამ ჰემოპროტეინს დაბალსპინური ფორმის დამახასიათებელ მპრ-სპექტრს შედარებით ვიწრო სამი ზოლი აქვს და გ-ფაქტორი 1.91-ის, 2.24-ისა და 2.42-ის ტოლია. მაღალსპინურ ფორმას გ-ფაქტორთა 1.7-ის, 3.7-ისა და 8-ის ტოლი მნიშვნელობები შეესაბამება. ციტოქრომ P450-ისათვის დასახელებულ სიდიდეთა დადგენა საფუძველს ქმნის ჰემოპროტეინის ჟანგბადთან, აღმდგენელ აგენტებთან, სუბსტრატთან და ინჰიბიტორებთან ურთიერთქმედების მექანიზმის ასახსნელად. განსხვავებული სპინური მდგომარეობის ნარევეზე ზოგიერთი სუბსტრატის დამატებისას შეინიშნება ჰემოპროტეინის მაღალსპინურ მდგომარეობაში სრულად გადასვლა. ციტოქრომ P450-ის სოლუბილიზაციას და არააქტიურ P420-ად კონვერსიას თან ახლავს მაღალსპინური სიგნალის აღძვრა 6.0-ის ტოლი გ-ფაქტორით. ამასთან, ციტოქრომ P420-ისათვის დამახასიათებ-

ბელი 2.25 გ-ფაქტორის სიგნალი შენარჩუნებულია. დადგინდა, რომ ციტოქრომ P420 შეიძლება არსებობდეს სამ (β, γ და σ) მდგომარეობაში ერთნაირი სპექტრებით და განსხვავებული სპინური მდგომარეობებით. ციტოქრომ P450-ის ინაქტივაციას თან ახლავს მისი ნატიური α-მდგომარეობიდან β-ფორმების გავლით მადალსპინურ γ-ფორმაში გადასვლა. გამოირკვა აგრეთვე, რომ არსებობს ნივთიერებები (მაგ., ეთილენგლიკოლი, პროპილენგლიკოლი, რიბიტოლი, გლუკოზა, საქაროზა, სორბიტალი, დიმეთილსულფოქსიდი და ა.შ.), რომლებსაც ციტოქრომ P420-ის ციტოქრომ P450-ად რეკონვერსია შეუძლიათ.

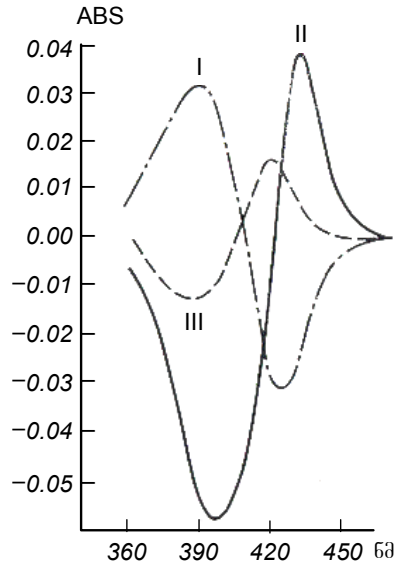
ციტოქრომ P450-ის მპრ-სპექტრის თავისებურებას წარმოადგენს ჰემური რკინის სიმეტრიის ძლიერი დარღვევა (ანიზოტროპია), რომელიც ლიგანდების ველის თეორიის ჩარჩოებში შეიძლება იმ პარამეტრებით დახასიათდეს, რომლებიც რომბისებურ და აქსიალურ გადახრებს ასახავენ [148]. მსგავსი სიმეტრიის დარღვევა სხვა ჰემოპროტეინების მიმართ არ ვლინდება. ადრეულ გამოკვლევებში ანიზოტროპული დაბალსპინური მპრ-სიგნალის გაჩენას მიკროსომებში  $Fe_x$  კომპონენტის არსებობას უკავშირებენ [149]. შემდგომში აღმოჩნდა, რომ ეს სიგნალი ციტოქრომ P450-ს განეკუთვნება. ამიტომ  $Fe_x$ -კომპონენტის შემცველობის განსაზღვრა ორივე ჰემოპროტეინის ჯამურ რაოდენობას უფრო ასახავს [150-153].

არ შეიძლება არ აღინიშნოს მპრ-მეთოდის გარკვეული შეზღუდულობა, რაც შემდეგში მდგომარეობს: სპინური წონასწორობა შეისწავლება სხვადასხვა ტემპერატურაზე სისტემის მაგნიტური თვისებების დადგენით. ოთახის ტემპერატურაზე ამ პარამეტრის განსასაზღვრავად აღნიშნული მეთოდი გამოუსადეგარია. ჰემური კომპლექსების ელექტრონული რელაქსაციის ძალიან მცირე დროის გამო ოთახის ტემპერატურაზე მპრ-ის სიგნალი საერთოდ არ ჩნდება. ამ კომპლექსების სპინური მდგომარეობების კვლევა შესაძლებელია უპირატესად ოპტიკური მეთოდების გამოყენებით, რომლებიც შესანიშნავად ასახავენ სპინურ მდგომარეობას. მეტჰემოგლობინის წარმოებულთათვის ნაჩვენებია, რომ მაგნიტური ამთვისებლობა ხაზოვნადაა დაკავშირებული სორეს ზოლების მდებარეობასთან. მაგნიტური ამთვისებლობის ზრდისას სორეს ზოლი შედარებით მოკლე ტალღიანი ოლქის მხარეს ინაცვლებს და პირიქით, ამ თვისების შემცირებისას სორეს ზოლი გრძელტალღოვანი უბნისკენაა წანაცვლებული [154]. გამორიცხული არაა, რომ ასეთი კორელაცია სამართლიანი იყოს სხვა ჰემოპროტეინების, და კერძოდ, ციტოქრომ P450-ისთვისაც [146]. სორეს ზოლების წანაცვლებები იმის გამო ხდება, რომ დაჟანგულ ფორმაში მოცემული ჰემო-



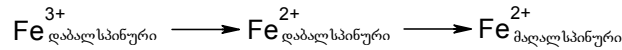
პროტეინი ერთდროულად ორი სპინური მდგომარეობით არსებობს და თითოეული მათგანი სორეს ზოლის განსხვავებული მდებარეობით ხასიათდება: მაღალსპინურ მდგომარეობას მოკლე ტალღების მხარეს, ხოლო დაბალსპინურს მაქსიმუმი უფრო გრძელი ტალღების მხარეს გააჩნია [155]. განსაზღვრულ სპინურ ფორმასთან დაკავშირებული სორეს ზოლის ზუსტი მდებარეობა თვით ჰემოპროტეინზეცაა დამოკიდებული, კერძოდ, სპინური მდგომარეობა მნიშვნელოვანწილად ჰემური რკინის აქსიალური ლიგანდებითაა განპირობებული. სპინური წონასწორობის არსებობისას სორეს ზოლის მდებარეობა ორი სპინური ფორმის შედარებითი წილით განისაზღვრება. სხვადასხვა ტემპერატურაზე დიფერენციული სპექტრების რეგისტრირებისას დაბალ- და მაღალსპინური ფორმების სორეს ზოლები შეიძლება ერთმანეთისაგან იქნეს დაყოფილი [156]. სხვადასხვა ტემპერატურაზე შთანთქმის ზოლების ინტენსივობით ადგენენ სპინური წონასწორობის კონსტანტებს და ჰემოპროტეინის განსაზღვრული სპინური ფორმის შემცველობას, თუ, რა თქმა უნდა, ამ ფორმის ექსტინქციის კოეფიციენტი ცნობილია.

ციტოქრომ P450-ის უნიკალურ თვისებას წარმოადგენს ის, რომ იგი თავის სუბსტრატებთან და ინჰიბიტორებთან სპექტროფოტომეტრულად ადვილად რეგისტრირებად კომპლექსებს წარმოქმნის. მიკროსომულ მემბრანებში ასეთ კომპლექსთა შესაძლო წარმოქმნის გამოსავლენად განსაზღვრავენ შთანთქმის დიფერენციულ სპექტრებს და ერთმანეთს უდარებენ კომპლექსისა და თავისუფალი ჰემოპროტეინის შთანთქმის სპექტრებს. ციტოქრომ P450-ის ამ კუთხით კვლევის დაწყება დაკავშირებულია ნარასიმჰულუსა და მისი თანამშ. [157] მიერ მიღებულ შედეგებთან, რომლებმაც აჩვენეს, რომ თირკმელზედა ჯირკვლის ქერქის მიკროსომულ სუსპენზიაზე 17-ოქსიპროგესტერონის დამატებისას ადგილი აქვს სპექტრულ ცვლილებებს. შემდგომში დადგენილ იქნა, რომ სრულიად განსხვავებული ბუნების მქონე ნაერთები ღვიძლის მიკროსომებზე დამატებისას შთანთქმის დიფერენციალურ სპექტრებში დამახასიათებელ ცვლილებებს იწვევენ და ეს ცვლილებები დაკავშირებულია ციტოქრომ P450-თან სხვადასხვა ნივთიერებების უშუალო ურთიერთქმედებასთან [158-160]. ამის მიხედვით ყველა სპექტრული ცვლილება, რომლებიც ციტოქრომ P450-თან სხვადასხვა ნივთიერების დაკავშირებისას რეგისტრირდება, სამი ტიპისაა: I, II და მოდიფიცირებული-II (ნახ. 1.6). შესაბამისად ზდება ამ ცვლილებების გამოწვევი სუბსტრატების კლასიფიკაციაც [158, 161].



ნახ. 1.6. სპექტრულ ცვლილებათა ტიპები მიკროსომების (1 მგ/მლ-ზე ცილის შემცველობის მიხედვით) ურთიერთქმედებისას სხვადასხვა სუბსტრატებთან. I ტიპის სპექტრული ცვლილებები ხასიათდება შთანთქმის მაქსიმუმით 390 ნმ-ზე და მინიმუმით 420 ნმ-ზე (მრუდი I, სუბსტრატი – 8.4 ნმოლი ჰექსაბარბიტალი; II ტიპის სპექტრული ცვლილებები ხასიათდებიან მაქსიმუმით 420-430 ნმ-ებზე და მინიმუმით 390 ნმ-ზე (მრუდი II, სუბსტრატი – 2.5 ნმოლი ანილინი); მოდიფიცირებული II ტიპი წარმოადგენს “შებრუნებულ I ტიპს”, ანუ I ტიპის სპექტრული ცვლილებების სარკისებურ ასახვას (მრუდი III, სუბსტრატი – 1.6 ნმოლი აგროკლავინი).

I ტიპის სუბსტრატებს, ისევე როგორც აღდგენას, ციტოქრომ P450-ის რკინა დაბალსპინურიდან მაღალსპინურ მდგომარეობაში გადაწყავთ, ხოლო II ტიპის სუბსტრატები პირიქით, უკუგადასვლას იწვევენ [162, 163]. ეს უჩვეულო თვისება სხვა ჰემოპროტეინებისთვის დამახასიათებელი არაა [130, 163]. ასეთი გადასვლის მექანიზმის დეტალურმა შესწავლამ აჩვენა, რომ იგი უნდა ხორციელდებოდეს დაბალსპინური ციტოქრომ P450-ის აღდგენის სტადიის გავლით, რომელიც შუალედი ფორმაა შემდეგ რეაქციაში:



I ტიპის სპექტრული ცვლილებები მჭიდროდაა დაკავშირებული იმ ნივთიერებათა მეტაბოლიზმთან, რომლებიც ციტოქრომ P450-ის ინდუქციას იწვევენ და პრაქტიკულად მიკროსომების მაჰიდროქსილირებელი სისტემის სუბსტრატებს წარმოადგენენ. მათ მიეკუთვნება: ნაჯერი და არომატული ნახშირწყალბადები, მესამეული ამინები, ეთერები, ალიციკლური და ჰეტეროციკლური ნაერთები და სხვ. ყველა ეს ნივთიერება I ტიპის ლიგანდთა კლასს შეადგენს.

ჰილისა და მისი თანამშ. [164] მიერ პოსტულირებულია, რომ I ტიპის ნივთიერებათა დამატებისას დაჟანგული ციტოქრომ P450-ის მაღალსპინური მდგომარეობის მატებას თან ახლავს რკინის იონსა და ლიგანდს შორის კომფორმაციულ-ინდუცირებული მანძილის გაზრდა, რომელიც მერკაპტილურ ჯგუფთან ტრანს-მდგომარეობაში იმყოფება. ამ დროს რკინა გამოდის პორფირინის ბირთვის სიბრტყიდან გოგირდის ატომის მიმართულებით. ჯეფკოტი და მისი თანამშ. [165] ციტოქრომ P450-ის დაჟანგული ფორმის სპექტრებზე I ტიპის ნივთიერებათა გავლენას განსხვავებული ინტერპრეტაციით წარმოადგენენ. მათი მოსაზრებით, ამ ნივთიერებათა დამატება იწვევს კონფორმაციულ ცვლილებებს, რასაც საბოლოო ჯამში კოორდინაციული კომპლექსის ცვლილებასთან მივყავართ. მრავალრიცხოვანი მონაცემების ანალიზის საფუძველზე აღნიშნულმა მკვლევარებმა გამოთქვეს ვარაუდი, რომ მეტალსა და გოგირდის ატომს შორის მანძილი უნდა იზრდებოდეს და არა მცირდებოდეს. როგორც ჩანს, ამ ორი განხილული ჰიპოთეზიდან უპირატესობა მეორეს უნდა მიენიჭოს: აღდგენილ ციტოქრომ P450-თან ნახშირბადის მონოქსიდის მიერთებისას CO-ს მოლეკულა კოორდინაციული სფეროდან გამოდევნის მერკაპტილურ ჯგუფს, რომელიც მას დაჟანგული ფორმის ჰემოპროტეინში ეკავა. ამის შედეგად მიიღება კომპლექსი, რომელშიც მეტალი გამოსულია პორფირინის ბირთვის სიბრტყიდან CO-ს მიმართულებით, ხოლო ტრანს-მდგომარეობა ან თავისუფალია, ან დაკავებულია მეტალთან სუსტად ბმული ლიგანდით. ფერმენტული სისტემის ფუნქციონირებისათვის, როგორც ჩანს, აუცილებელია, რომ ჟანგბადის მოლეკულა ჰემთან ამგვარადვე იყოს დაკავშირებული.

I ტიპის სუბსტრატების მიერთებისას ციტოქრომ P450-ის რედოქს-პოტენციალი -300 mV-დან -230 mV-მდე იზრდება. ამის შედეგად ელექტრონის სატრანსპორტო ჟაჭვში მისი აღდგენა ადვილდება. ჟანგბადისადმი მაღალი სწრაფვა ( $K_M=0.1-0.2 \mu\text{M}$ ) და დიდი აუტოქსიდაბელობა (მეორე რიგის რეაქციის სიჩქარის კონსტანტა -  $2-4 \cdot 10^6$  მოლი $\cdot$ წმ $^{-1}$ , ნახევრადდაჟანგვის პე-

რიოდი – 300 მოლიწმ<sup>-1</sup>) ციტოქრომ P450-ის აერობულად აღდგენისას სტაციონარული მდგომარეობის დაბალ დონეს განაპირობებს [166, 167]. მოცემული პარამეტრებით იგი ციტოქრომოქსიდაზას წააგავს [167], მაგრამ მისგან განსხვავებით უფრო მაღალი სწრაფვა აქვს CO-ს მიმართ. იმისათვის, რომ ციტოქრომოქსიდაზას აქტივობა 50%-ით დაითრგუნოს, საჭიროა ფარდობა CO<sub>2</sub>:O<sub>2</sub>=10, მაშინ როდესაც ციტოქრომ P450-ისათვის ეს კოეფიციენტი 1-ის ტოლია. ორივე ფერმენტი Cu<sup>2+</sup>-ს შეიცავს [47, 168].

ნივთიერებები, რომლებიც II ტიპის სპექტრულ ცვლილებებს იწვევენ, როგორც წესი, ამინებს წარმოადგენენ და მცირე გამონაკლისის გარდა (ანილინი, იმიდაზოლი და სხვ.), არ მიეკუთვნებიან მიკროსომული სისტემის სუბსტრატებს. ეს ციტოქრომ P450-თან მათი ურთიერთობის ხასიათითაა განპირობებული. ითვლება, რომ II ტიპის ლიგანდები (სუბსტრატის ამინოჯგუფები) უშუალოდ უკავშირდებიან ციტოქრომის ჰემურ რკინას, როგორც ტიპური ჰემოქრომოგენები და ფერმენტის მეექვსე აქსიალური ლიგანდები (ფერიჰემოქრომები) ხდებიან [158, 169]. დიფერენციულ სპექტრებში ეს ~420 ნმ-ზე შთანთქმის მაქსიმუმის და ~390 ნმ-ზე შთანთქმის მინიმუმის გაჩენას იწვევს [170]. ციტოქრომ P450-თან II ტიპის ლიგანდების ურთიერთქმედებისას დაბალსპინური კომპლექსები წარმოიქმნებიან, რამდენადაც ჰემური რკინა კოორდინაციულ სფეროში ექვს ლიგანდს შეიცავს. II ტიპის ამინები კონკურენციას უწევენ CO-ს, და შესაძლოა, O<sub>2</sub>-საც რკინის ერთსა და იმავე ცენტრთან დაკავშირებისათვის. მთელ რიგ შემთხვევაში (ანილინი, ნიკოტინამიდი) მიკროსომულ სუსპენზიასთან ურთიერთქმედებისას შეინიშნება დიფერენციული სპექტრები ორი მაქსიმუმით და ორი მინიმუმით, რაც შეიძლება ამ ნივთიერებათა გარდაქმნაში ციტოქრომ P450-ის სხვადასხვა ფორმის მონაწილეობას ასახავდეს [159, 170]. ამასთან დაკავშირებით შევნიშნავთ, რომ სადღეისოდ ყველაზე დეტალურადაა დახასიათებული ღვიძლის მიკროსომების ციტოქრომ P450-ის ორი ფორმა: ერთი მათგანი (P450LM<sub>2</sub>), როგორც ზევით აღინიშნა, ფენობარბიტალით, ხოლო მეორე – 3-მეთილქოლანტრენით ან β-ნაფტოლფლავონით ინდუცირდება და აღინიშნება, როგორც P450LM<sub>4</sub> [171, 172]. მათი ჰომოგენური ფორმების ზოგიერთი მახასიათებელი მოყვანილია 1.1 ცხრილში [173, 174]. ცნობილია P450LM<sub>2</sub>-ფორმის 30 რგოლის N-კიდურა ამინომჟავური თანმიმდევრობა, რომლებიც 20-დან 17 ჰიდროფობულ ამინომჟავურ ნაშთს და ორ კლასტერში გაერთიანებულ ხუთ თანმიმდევრულად დაკავშირებულ ლეიცინს შეიცავს. ვარაუდობენ, რომ P450LM<sub>2</sub>-ის ეს ფრაგმენტი პასუხისმგებელია

მიკროსომულ მემბრანასთან დაკავშირებაზე, ან სისტემის ფუნქციონირებისას ციტოქრომ P450-ის კომპლექსის თავისი რედუქტაზისადმი და ფოსფოლიპიდებისადმი ორიენტაციაზე [171].

ცხრილი 1.1

ბოცვრის ღვიძლის მიკროსომების ციტოქრომ P450-ის ჰომოგენურ ფორმათა ზოგიერთი მახასიათებელი [173, 174]

თვისებები	LM <sub>2</sub>	LM <sub>4</sub>
ფერმენტის მოლეკულური მასა (kD)	48.7	55.3
პოლიპეპტიდის მოლეკულური მასა (kD)	47.6	54.2
<b>შემცველობა:</b>		
P450 ნმოლი/მგ ცილაზე	20	17
ჰემი ნმოლი/ნმოლ ცილაზე	1	1
ლიპიდები ნმოლი/ნმოლ ცილაზე	0.3	0.5-1.6
დეტერგენტი მგ/მგ ცილაზე	0.05	0.05
C- კიდურა ამინომჟავა	არგინინი	ლიზინი
N- კიდურა ამინომჟავა	მეთიონინი	–
<b>ნახშირწყლები ნმოლი/ნმოლ ცილაზე:</b>		
გლუკოზამინი	0.7	0.8
მანოზები	1.7	2.0
გლუკოზა	0.2	0.9

თავისი სპექტრული და სხვა მახასიათებლებით ციტოქრომ P450LM<sub>4</sub> ძლიერ განსხვავდება P450LM<sub>2</sub> ფორმისაგან [175, 176]. პირველი არ იკავშირებს ორგანულ ჰიდროზეფანებს და მიკროსომული სისტემის ისეთ ტიპურ სუბსტრატებს, როგორებიც ბენზოლი, ციკლოპქსანი და ანტიპირინია. ეს იმით აიხსნება, რომ ციტოქრომ P450LM<sub>4</sub> ინდუქტორთან (3-მეთილქოლანტრენთან) ან მის მეტაბოლიტებთან კომპლექსის სახით არსებობს. ასეთი კომპლექსები მაღალსპინურ მდგომარეობაში იმყოფებიან და ზღუდავენ ჰემოპროტეინთან ჩამოთვლილ ნივთიერებათა დაკავშირებას [175, 176]. ზოგიერთი ნივთიერება (ანილინი, ნაფტალინი, დიმეთილანილინი) ეფექტურად უკავშირდება ციტოქრომ P450LM<sub>4</sub>-ს, მაგრამ პრაქტიკულად ამ ჰემოპროტეინით არ იჟანგება. ეს ფაქტი

იმაზე მიუთითებს, რომ უნდა არსებობდეს ამ ციტოქრომის დაბალსპინური კომპლექსის ორი ტიპი, რომლებშიც ლიგანდების ინტენსიური დაკავშირება ხდება, მაგრამ ისინი ჟანგვის პროდუქტიულობის თვალსაზრისით არ გამოირჩევიან [175]. ანილინი, პირიდინი, იმიდაზოლი და, შესაძლოა, სხვა აზოტშემცველი ორგანული ფუძეებიც დაბალსპინური ფორმის კომპლექსს წარმოქმნიან, რომელშიც უკვე შეუძლებელია მოლეკულური ჟანგბადის ან ორგანული ჰიდროჟენების მიერთება. P450LM<sub>2</sub>-სა და P450LM<sub>4</sub>-ს შორის არსებითი განსხვავება წრიული დიქროიზმის მეთოდითაც დასტურდება [177]. ამ მეთოდით მიღებული შედეგების საფუძველზე გაკეთებულია დასკვა, რომ P450LM<sub>4</sub>-ის ფორმის ჰემი უფრო მჭიდრო ჰიდროფობული “ჯიბით” არის გარემოცული, ვიდრე P450LM<sub>2</sub>-ის ფორმის ჰემი.

ისევე როგორც სხვა ციტოქრომ P450-ები P450LM<sub>2</sub> და P450LM<sub>4</sub> ადვილად განიცდიან აღდგენას დითიონიტით და წარმოქმნიან CO-სთან აღდგენილი ჰემოპროტეინების კომპლექსებს შთანთქმის მაქსიმუმებით შესაბამისად 450 და 448 ნმ-ებზე. ზოგჯერ P450LM<sub>4</sub>-ის იდენტურ ციტოქრომ P450-ის ფორმას ციტოქრომ P448-ს უწოდებენ [170].

არსებობს სპექტრული ცვლილებების ტიპი შთანთქმის მაქსიმუმებით 390 და 420 ნმ-ზე. როგორც აღინიშნა, ფაქტიურად იგი I ტიპის სპექტრულ ცვლილებათა სარკისებულ გამოსახულებას წარმოადგენს და ამიტომ მას “მოდიფიცირებული II” ტიპს აკუთვნებენ (ლიტერატურაში იგი ინვერსიული ან რევერსიული სპექტრის სახელწოდებითაცაა ცნობილი).

ასეთი ცვლილება სუბსტრატის ჰიდროქსილის ჯგუფისა და მაღალსპინური რკინის ურთიერთქმედების შედეგია. ამ დროს შთანთქმის მაქსიმუმის 394 ნმ-იდან 416 ნმ-მდე გადანაცვლება ხდება.

მოდიფიცირებული II ტიპის სპექტრული ცვლილებების გამომწვევი ნივთიერებების ჯგუფი თავისი შემადგენლობით საკმაოდ არაერთგვაროვანია. მასში შედიან სპირტები, კეტონები, ალკალოიდები, სტეროლები და სხვ. [158, 176, 178, 179]. მცირე გამონაკლისის გარდა, ისინი მიკროსომული ჟანგვის სისტემის სუბსტრატებს წარმოადგენენ. ციტოქრომ P450-ის სპირტებთან ურთიერთქმედება რთული ბუნებისაა და, უპირველეს ყოვლისა, ამ ნივთიერებათა ალიფატური ჯაჭვის სიგრძეზეა დამოკიდებული. მცირე ზომის მოლეკულების მქონე სპირტების (მეთანოლის, ეთანოლის, პროპანოლის) ჰემურ რკინასთან კოორდინირება მეექვსე აქსიალურ მდგომარეობაში ხორციელდება, ხოლო თუ სპირტის მოლეკულას გრძელი, ან განტოტვილი ჯგუფი გააჩნია, მაშინ მას I

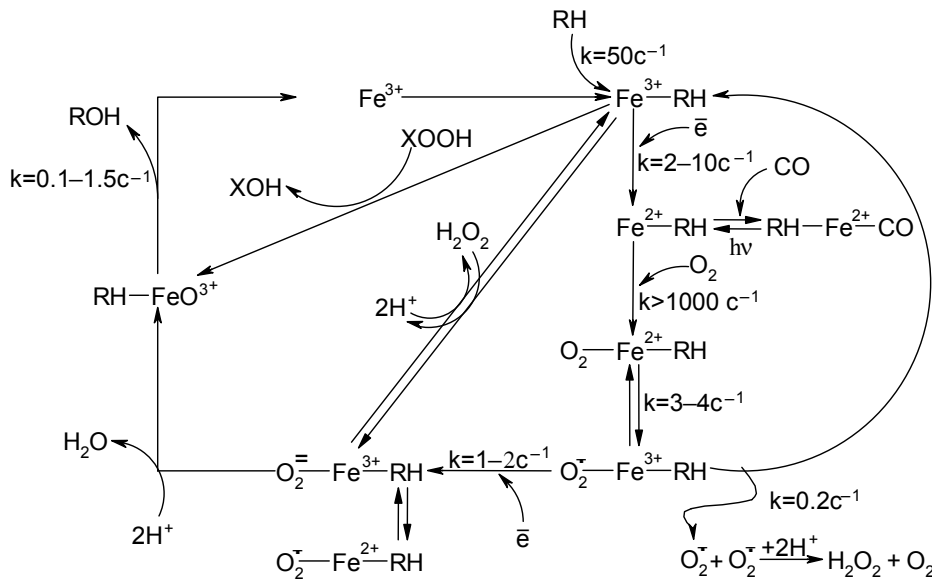
ტიპის სუბსტრატების მსგავსად ციტოქრომ P450LM<sub>2</sub>-თან ჰიდროფობული ურთიერთქმედებით დაკავშირება შეუძლია. იმის გამო, რომ სპირტები უკვე შეიცავენ პოლარულ OH-ჯგუფებს, პრინციპში ისინი ციტოქრომ P450-ის სუბსტრატებს არ უნდა წარმოადგენდნენ. მიუხედავად ამისა, როგორც ირკვევა, ამ კლასის ნაერთების ჟანგვით მეტაბოლიზმში ციტოქრომ P450 მაინც მონაწილეობს [179].

ციტოქრომ P450-ის ჯგუფის ფერმენტებზე არსებულ მონაცემებს თუ გავანალიზებთ, შეიძლება გარკვეული დასკვნების გამოტანა: 1) ამ ცილებში ჰემი ჰიდროფობულ გარემოცვაში იმყოფება; 2) ნეიტრალურ გამხსნელში სუბსტრატის არყოფნისას ციტოქრომ P450-ის დაჟანგული ფორმები უპირატესად დაბალსპინურ მდგომარეობაშია; 3) ასეთ დაბალსპინურ კომპლექსში ცისტეინის მერკაპტილური ჯგუფი რკინასთანაა დაკავშირებული; 4) დაჟანგულ ფორმაში დარჩენილ კოორდინაციულ მდგომარეობას ცილის სხვა პოლარული ჯგუფი, შესაძლოა ჰისტიდინის ნაშთის იმიდაზოლური ჯგუფი იკავებდეს; 5) I ტიპის ნაერთთა თანამყოფობისას შეინიშნება კონფორმაციულად ინდუცირებული გადასვლები, რასაც დაჟანგული ფორმის მაღალსპინურ მდგომარეობაში გარდაქმნასთან მივყავართ; 6) აღდგენილი ციტოქრომ P450 მაღალსპინურ მდგომარეობაში არსებობს, მაშინ როდესაც მისი როგორც დაჟანგული, ასევე აღდგენილი ფორმები დაბალსპინურ კომპლექსებს წარმოქმნიან [96].

#### **1.3.4.1 მიკროსომული ჰიდროქსილირების ცალკეული სტადიები (მონოოქსიგენაზური ციკლი)**

უცხო ნაერთთა მიკროსომული ჟანგვის შესწავლაში ცენტრალურ პოზიციას დღესაც ჰიდროქსილირების რთული პროცესის მექანიზმის კვლევა წარმოადგენს. სადღეისოდ არავითარ ეჭვს არ იწვევს ის ფაქტი, რომ მიკროსომებში და რეკონსტრუირებულ სისტემებში მიმდინარე ყველა ჰიდროქსილაზურ რეაქციას მონოოქსიგენირება უდევს საფუძვლად. ეს იმას ნიშნავს, რომ ამ გარდაქმნისას გააქტიურებული მოლეკულური ჟანგბადის ერთი ატომი წყლის წარმოქმნაზე იხარჯება, ხოლო მეორე დასაჟანგი სუბსტრატის მოლეკულაში ინერგება [181, 182]. მონოოქსიგენაზური გარდაქმნის ციკლური ბუნება და მისი ცალკეული სტადიების თანმიმდევრობა პირველად 1968 წელს ესტაბრუკის, ჰილდებრანტისა და ულრიხის [183] მიერაა შემოთავაზებული.

ზოგიერთი დამატებებით იგი სქემა 1.2-ზეა მოცემული. შემდგომში გამოკვლევებმა ნათლად აჩვენეს ამ სქემის სამართლიანობა და ცოცხალ სამყაროში მისი უნივერსალობა საყოველთაოდ იქნა აღიარებული [184-188]. სქემიდან ვხედავთ, რომ ჰიდროქსილირება კოოპერატიული, მრავალსტადიური პროცესია.



სქემა 1.2. მონოოქსიგენაზური ციკლი [52].

I სტადიაზე ციტოქრომ P450-თან (ფეროციტოქრომთან) სუბსტრატის მიერთება და ფერმენტ-სუბსტრატის კომპლექსის წარმოქმნა ხდება. ამას თან სდევს ჰემოპროტეინის ჟანგვა-აღდგენითი პოტენციალისა და სპინური მდგომარეობის ცვლილებები. რედოქს-პოტენციალი -300 mV-დან +170 mV-მდე იზრდება. ამის გამო თერმოდინამიკურად მომგებიანი ხდება NADPH-ის აღმდგენელი ექვივალენტების ფეროციტოქრომზე გადატანა.

სუბსტრატთა უმეტესობას ციტოქრომი დაბალსპინურიდან (ჯამური სპინი +1/2) მაღალსპინურ ფორმაში (ჯამური სპინი +5/2) გადაჰყავს, ხოლო ზოგიერთი ამინი უკუგადასვლას იწვევს. ვარაუდობენ, რომ მაღალსპინური ფორმა ძველესე მდგომარეობაში კარგავს აქსიალურ ლიგანდს, მაგრამ მეხუთე ლიგანდად ცისტეინის ნაშთს ინარჩუნებს [156]. ფერმენტ-სუბსტრატის კომპლექსთა



წარმოქმნის სიჩქარეები მაღალია და ხასიათდებიან  $10^2 \pm 10^6$  კონსტანტთა მნიშვნელობებით, რაც თვით სუბსტრატთა ბუნებაზეა დამოკიდებული [189]. ფერმენტ-სუბსტრატის კომპლექსის წარმოქმნა დეტალურადაა შესწავლილი ქაფურის დამჟანგველ ციტოქრომ P450-ისათვის ( $P450_{cam}$ ) [153, 190-192]. ნაჩვენებია, რომ ჰემოპროტეინის დაჟანგული ფორმის ამ სუბსტრატთან ურთიერთქმედების შედეგად შთანთქმის სპექტრში 417, 539 და 569 ნმ-ებზე მაქსიმუმების მქონე ზოლების ნაცვლად ჩნდება ახალი – 391, 500 და 640 ნმ-ებზე მაქსიმუმების მქონე, ანუ დაბალსპინური 2.46, 2.26 და 1.91 გ-ფაქტორიანი ფორმა გადადის მაღალსპინურ ფორმაში და ჩნდება 3.4 და 1.8 გ-ფაქტორიანი სივანალები.

კომპლექსის წარმოქმნა მეორე რიგის სიჩქარის ( $4.1 \cdot 10^6$  მოლიწმ<sup>-1</sup>), ხოლო მისი დაშლა პირველი რიგის სიჩქარის კონსტანტით ( $6.0$  მოლიწმ<sup>-1</sup>) ხასიათდება. გარდა ამისა, კომპლექსს უფრო მაღალი რედოქს-პოტენციალი ( $E'_0 = -140$  mV) გააჩნია, ვიდრე თავისუფალ ჰემოპროტეინს. კომპლექსირებისას ციტოქრომის ციკლურ ნაწილში კონფორმაციული ცვლილებები მიმდინარეობს [193]. დაკავშირებისათვის აბსოლუტურად აუცილებელია მისი კარბონილური ნაშთის არსებობა. ნახშირბადის მონოოქსიდს უნარი აქვს დათრგუნოს, ან სულაც კომპლექსიდან გამოაძევოს დაკავშირებული სუბსტრატი [149, 194-196].

ცნობილია ნაერთთა კლასი, რომელსაც ჰიდროქსილირების გათიშვა შეუძლია. ამ კლასის ნაერთები ციტოქრომთან კომპლექსებს წარმოქმნიან, მაგრამ შემდგომ აღარ ჰიდროქსილირდებიან [197-200]. ამ დროს ჰემოპროტეინთან სუბსტრატის ურთიერთქმედების ყველა დამახასიათებელ შედეგს (დიფერენციული სპექტრების წარმოქმნას, NADPH-ისა და O<sub>2</sub>-ის მოხმარების გაზრდას) აქვს ადგილი, მაგრამ თვით გამთიშველის ჟანგვითი გარდაქმნები არ რეგისტრირდება. ნივთიერებათა ამ ჯგუფს მრავალი ფტორშემცველი ნახშირწყალბადი მიეკუთვნება [199, 201]. მათი მოქმედების ასახსნელად საჭიროა გათვალისწინებულ იქნას ცნობილი ფაქტი ორტინოლ- და სალიცილატ-ჰიდროქსილაზურ რეაქციებში სუბსტრატული ანალოგებით – რეზორცინითა და ბენზოატით ჰიდროქსილირების გათიშვა, რომლებიც ელექტრონების ნაკადს ჟანგბადის აქტივაციისაკენ მიმართავენ, წყალბადის ზეჟანგის შემდგომი წარმოქმნით [198, 200]. მიკროსომულ მაჰიდროქსილირებელ სისტემაში გათიშვას შეიძლება წყლის დაჩქარებული წარმოქმნა ახლდეს [197]. დაჟანგულ ციტოქრომთან არაჰიდროქსილირებადი გამთიშველის კომპლექსირება იმის

თვალსაჩინო ილუსტრაციაა, თუ რამდენად სწორია წარმოდგენა იმის შესახებ, რომ ფერმენტ-სუბსტრატის დაკავშირება მონოოქსიგენირების პირველი ეტაპია. მეორე მხრივ, ვერაც დაუდგენელია, შეიძლება თუ არ ეს სტადია სრული ციკლის სიჩქარის მალიმიტირებელ უბნად ჩაითვალოს და განისაზღვროს მისი სიჩქარე.

ლიტერატურაში არსებობს მითითებები კომპლექსირების სახეობრივ სპეციფიკურობაზე. მაგ., კორტიზოლი ზღვის გოჭების ღვიძლის მიკროსომების ციტოქრომ P450-თან I ტიპის, ხოლო ვირთხის მიკროსომების ჰემოპროტეინთან II ტიპის კომპლექსებს წარმოქმნის [202]. სუბსტრატებთან ურთიერთქმედება გავლენას ახდენს ციტოქრომ P450-ის, როგორც ელექტრონთა აქცეპტორის თვისებებზე და ეს, თავის მხრივ, ასახვას პოულობს NADPH-რედუქტაზულ რეაქციაში მისი აღდგენის სიჩქარეზე; კერძოდ, ციტოქრომთან სუბსტრატთა დაკავშირება აადვილებს ფერმენტ-სუბსტრატის კომპლექსის პირველი ელექტრონით აღდგენას [170, 184].

II სტადიაზე ციტოქრომ P450-სუბსტრატის კომპლექსის აღდგენა ხდება თავის ადრეულ საშუალებებში ჯილეტმა და მისმა თანამშ. [203-205] შეძლეს გაეზომათ ელექტრონთა გადატანის ჯაჭვში NADPH-ციტოქრომ P450-რედუქტაზული რეაქციის სიჩქარე. სწრაფი რეაქციების ჩამწერი, რთული ორსხივიანი სპექტროფოტომეტრული ტექნიკის გამოყენებით ამ მკვლევარებმა აჩვენეს, რომ ანაერობულ პირობებში მიკროსომულ სუსპენზიაზე NADPH-ის დამატება ციტოქრომ P450-ის თითქმის სრულად აღდგენას იწვევს, და ეს პროცესი ორფაზიანი ხასიათისაა. პირველი, საწყისი ფაზა, რომელიც უაღრესად სწრაფად ხორციელდება, არაა დამოკიდებული ანაერობიოზის სიღრმეზე; მეორე, შენელებული ფაზა კი საინკუბაციო ხსნარში ჟანგბადის კვალის სახით თანამყოფობას მოითხოვს. I ტიპის სუბსტრატები აჩქარებენ, ხოლო II ტიპის სუბსტრატები ანელებენ საწყისი ფაზის სიჩქარეს და იგი ჰიდროქსილირების საერთო რეაქციის სიჩქარესთან სრულ შესაბამისობაშია. მეორე, შენელებული ფაზა, როგორც ჩანს, სხვა არაფერია, თუ არა ციტოქრომ P450-ის ძალზე დაბალი სიჩქარით აღდგენა, რომლის დროსაც სუბსტრატის დაკავშირება და მისი ჰიდროქსილირება უშუალოდარ ხორციელდება. იგი ასევე არ წარმოადგენს ჰემოპროტეინის ორი ქვეფრაქციის ჟანგბადისადმი განსხვავებული სწრაფვის შედეგს [206]. რეაქციის სწრაფ ფაზაში აღდგენილი ციტოქრომ P450-ის რაოდენობა ოპტიმალურად კორელირებს ციტოქრომ P450-სუბსტრატის (ციკლოპექსანი) კომპლექსის შემცველობასთან [178]. რეაქციის სრაფი ფაზა პირველი

რიგის, შენელებული კი მეორე რიგის რეაქციის კინეტიკით ხასიათდება. ამავე ავტორებმა [203] აჩვენეს, რომ მიკროსომულ ფრაქციაში ციტოქრომ P450-ის გარკვეული ნაწილი (10-20%-მდე) შეიძლება რომელიმე I ტიპის ენდოგენურ სუბსტრატთან იყოს კომპლექსირებული. მიღებული შედეგების საფუძველზე გაკეთებულ იქნა დასკვნა, რომ ციტოქრომ P450-ის აქტიურ ცენტრში პირველი ელექტრონის აქცეპტირება ჰიდროქსილირების მალიმიტირებელი სტადიაა. მოგვიანებით ეს დასკვნა არასწორი აღმოჩნდა. მაცუბარამ და თანაავტ. [207] გამოიყენეს რა უფრო სრულყოფილი შეყონებული ნაკადის მეთოდი, ნახეს, რომ მიკროსომებში ჰემოპროტეინის აღდგენა მართლაც ორფაზიანი რეაქციაა. სამაგიეროდ, ორივე ფაზა პირველი რიგის რეაქციის ტიპს მიეკუთვნება, სიჩქარის კონსტანტებით შესაბამისად ჩქარი ფაზისათვის  $2 \text{ წმ}^{-1}$  და შენელებული-სათვის  $0.3 \text{ წმ}^{-1}$ . სწრაფ ფაზაში აღდგენას განიცდის მთელი ჰემოპროტეინის შემცველობის 50% და ამასთან რედუქტაზული რეაქციის სიჩქარე ( $150 \text{ nM წმ}^{-1}/\text{მგ ცილაზე}$ ) გაცილებით მეტია, ვიდრე ჰიდროქსილირების სიჩქარე (მაგ., ეთილმორფინისათვის  $8.6 \text{ nM წმ}^{-1}/\text{მგ ცილაზე}$ ) [207]. აქედან გამომდინარე, პირველი ელექტრონით ჰემოპროტეინის აღდგენა არ შეიძლება ოქსიგენაზური ციკლის მალიმიტირებელ რგოლად ჩაითვალოს. საყურადღებოა აღინიშნოს ისიც, რომ ციტოქრომ P450-ის აღდგენის ორფაზიანობა მიკროსომული სისტემის მემბრანასთან ინტეგრაციის ყველა დონეზეა (ინტაქტურ მემბრანაში, დეტერგენტით სოლუბილიზებულ მიკროსომული მემბრანის კომპონენტთა ნარევიში და გასუფთავებული ფლაგოპროტეინითა და ციტოქრომ P450-ით რეკონსტრუირებულ სისტემაში) შენარჩუნებული [189, 208]. რეაქციის ორფაზიანობა ვლინდება დითიონიტის აღმდგენელად გამოყენებისას; მხოლოდ ამ შემთხვევაში აუცილებელია ფოსფოლიპიდის თანამყოფობა. ხსნად რეკონსტრუირებულ სისტემაში ფოსფოლიპიდი შეიძლება დეტერგენტებით შეიცვალოს [209-211]. რეკონსტრუირებულ მემბრანულ სისტემაში უარყოფითად დამუხტული ფოსფოლიპიდის დამატება NADPH-ციტოქრომ P450-რედუქტაზული რეაქციის სტიმულირებას იწვევს. ასეთ სისტემებში ციტოქრომ  $\text{h}_5$ -ს უნარი აქვს ციტოქრომ P450-ს პირველი ელექტრონი მიაწოდოს, მაგრამ არა 10-20%-ით იმაზე მეტი სიჩქარით, რასაც NADPH-სპეციფიკური ფლაგოპროტეინი აღწევს. სამაგიეროდ, მეორე ელექტრონი  $\text{h}_5$ -დან გაცილებით სწრაფად გადაიტანება [211]. სარეაქციო არეში ერთ- და ორვალენტთან მეტალთა იონების დამატება NADPH-ციტოქრომ P450-რედუქტაზას გააქტიურებას იწვევს [212, 213]. აღმოჩნდა, რომ ჰიდროქსილირების რეაქციაზე  $\text{Mg}^{2+}$ -ის მასტიმულირებელი მოქმედება ამ

ფლავოპროტეინის გააქტიურებით რეალიზდება. ეს დასტურდება ორივე რეაქციის ტემპერატურაზე ერთნაირი დამოკიდებულებით და მათზე  $D_2O$ -ის ერთნაირი მაინჰიბირებელი მოქმედებით [214].

საერთოდ, უმრავლეს შემთხვევებში რედუქტაზული და ჰიდროქსილაზური რეაქციების სიჩქარეები ერთმანეთთან დადებით კორელაციაშია. მათ შორის განსხვავებები (მაგ., ეთილმორფინის დემეთილირებისას) სხვადასხვა სახის ცხოველებში ადვილად შეიძლება აიხსნას NADPH-ციტოქრომ P450-რედუქტაზას განსხვავებული აქტივობებით. გაცილებით ხშირად ჰიდროქსილირების სიჩქარე ფერმენტ-სუბსტრატის აღდგენის სიჩქარესთან უფროა შესაბამისობაში, ვიდრე თავისუფალი ციტოქრომ P450-ის აღდგენის სიჩქარესთან [215, 216].

NADPH-ციტოქრომ P450-რედუქტაზული რეაქციის მექანიზმის კვლევამ აჩვენა, რომ ჰემოპროტეინის მოლეკულას პირველი ტიპის სუბსტრატებისათვის (ეთილმორფინისათვის) დაკავშირების არაერთი უბანი გააჩნია. სწორედ ეს უბნები არიან პასუხისმგებელი მოცემული რეაქციის გააქტივებაზე [217]. ერთი მათგანი სუბსტრატისადმი მაღალი, ხოლო მეორე დაბალი სწრაფვით (შესაბამისად  $K_s = 0.016$  მმოლი და  $K_s = 0.60$  მმოლი) ხასიათდება. მიუხედავად ამისა, არც ეს კონსტანტები და არც მათგან გამოთვლილი საშუალო სიდიდეები (0.13 მმოლი) არ ემთხვევა ამ სუბსტრატისათვის დამახასიათებელ ჰიდროქსილირების  $K_M$ -ს და დისოციაციის სპექტრულ კონსტანტებს (0.23 და 0.062 mM შესაბამისად). ეს კი იმაზე მიუთითებს, რომ NADPH-ის ჟანგვის ჯაჭვში ეთილმორფინისათვის დაკავშირების სულ მცირე, სამი უბანი მაინც უნდა არსებობდეს [217]. პირველს, როგორც ჩანს, ფიზიოლოგიური ფუნქცია აკისრია, რამდენადაც სუბსტრატისადმი მაღალი სწრაფვა აქვს და მისი დაბალი კონცენტრაციებისას რედუქტაზული რეაქციის აქტივაციას აკონტროლებს. ძალიან დაბალი სწრაფვის მქონე უბანს მნიშვნელობა შეიძლება სუბსტრატის ტოქსიკური კონცენტრაციებისას ენიჭებოდეს. მათგან განსხვავებით, მესამე უბანი სპექტრული ცვლილებების აღძვრას განაპირობებს. უაღრესად მნიშვნელოვანია ავტორთა მიერ გაკეთებული დასკვნა იმის თაობაზე, რომ ჰიდროქსილირების რეაქციის სიჩქარე უნდა განისაზღვროს არა თავისუფალი ან სუბსტრატთან დაკავშირებული ციტოქრომ P450-ის აღდგენის სიჩქარით, არამედ სიდიდით, რომელიც სუბსტრატის მოქმედებით რედუქტაზული რეაქციის დაჩქარებას ახასიათებს.

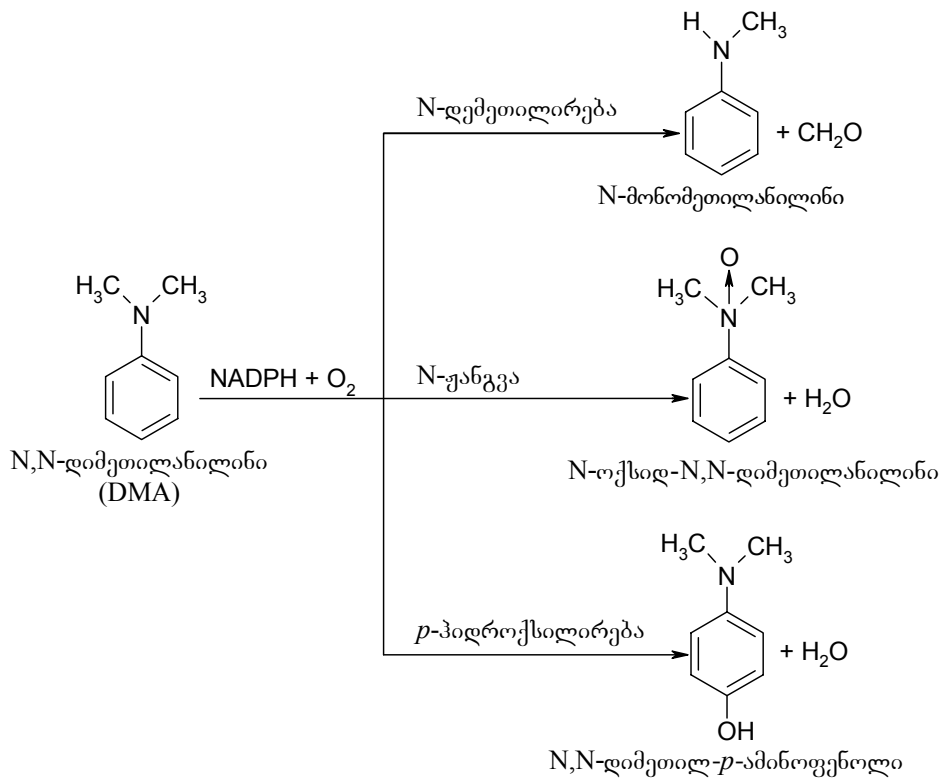
ციტოქრომ P450-ის მოლეკულაში დაკავშირების განსხვავებული ცენტრების არსებობაზე მიუთითებენ შრომებიც, რომლებშიც ნაჩვენებია რეკონსტრუირ-

რებულ სისტემებში ჰემოპროტეინის ფოსფატიდილქოლინის აბსოლუტური აუცილებლობა მაშინ, როდესაც ფერმენტის სუბსტრატთან დაკავშირება და დამახასიათებელი სპექტრული ცვლილებების აღძვრა ასეთ სისტემაში ფოსფოლიპიდს არ საჭიროებს [218, 219].

არჩაკოვისა და მისი თანამშ. მიერ [40, 41] ჩატარებულ იქნა გამოკვლევა, რომელიც მიზნად ისახავდა N,N-დიმეთილანლინთან (DMA) კომპლექსში ციტოქრომ P450-ის სტიმულირებული აღდგენის გავლენის დადგენას ამ სუბსტრატის N-დემეთილირების, *p*-ჰიდროქსილირებისა და N-ჟანგვის რეაქციათა სიჩქარეებზე. NADPH-ციტოქრომ P450-რედუქტაზული რეაქციის მასტიმულირებელ ფაქტორად გამოიყენებოდა  $Mg^{2+}$ -ის იონები [212, 213]. ასეთი მიდგომა საკმაოდ ორიგინალური იყო ჰიდროქსილირების მექანიზმში კომპლექსის აღდგენის რეაქციის როლის სრულად გამოსავლენად: ჰიდროქსილირების ჯაჭვში რედუქტაზული რეაქცია თუ მართლაც მალიმიტირებელია, მაშინ  $Mg^{2+}$ -ის დახმარებით მისი სიჩქარის გაზრდამ ერთი სუბსტრატის ჟანგვის სამივე ტიპის რეაქციის სტიმულირება უნდა მოახდინოს. ამ შემთხვევაში სუბსტრატად DMA-ს გამოყენება ამის სრულ საშუალებას იძლევა. მისი გარდაქმნის შესაძლო გზები მოცემულია ნახაზზე. 1.7.

$Mg^{2+}$ -ის სხვადასხვა კონცენტრაციების მოქმედების შესწავლამ DMA-ს დემეთილირებისა და *p*-ჰიდროქსილირებაზე განსხვავებული მასტიმულირებელი ეფექტები გამოავლინა. აქტივაციის კოეფიციენტები შესაბამისად 1.5 და 2.2-ს შეადგენდა. N-დემეთილირების მაქსიმალური სტიმულაცია მიიღწეოდა 15 მმოლი  $MgCl$ -ის თანამყოფობისას. *p*-ჰიდროქსილირებისათვის  $Mg^{2+}$ -ის უფრო მაღალი კონცენტრაციები აღმოჩნდა აუცილებელი. რაც შეეხება DMA-ს N-ჟანგვას, მასზე ამ მეტალის გამააქტიურებელი მოქმედება არ გამოვლინდა და ამ შედეგს ავტორებმა ორგვარი ახსნა მისცეს: დემეთილირება და ჰიდროქსილირება ან NADPH-სპეციფიკური ფლავოპროტეინის მეშვეობით არ ხორციელდება, ან N-ჟანგვაში მონაწილეობს სხვა,  $Mg^{2+}$ -სადმი არამგრძნობიარე ფლავოპროტეინი [40].

ელექტრონთა გადატანის რეაქციებზე მაგნიუმის გავლენის შესწავლისას დადგინდა, რომ ამ მეტალის იონები 2–2.5-ჯერ ზრდიან NADPH-ის ჟანგვის სიჩქარეს საინკუბაციო ნარევი როგორც DMA-ს თანამყოფობისას, ასევე მის გარეშე [40]. გარდა ამისა, DMA-ც იწვევს NADPH-ის ჟანგვის სიჩქარის



ნახ. 1.7. DMA-ს ჟანგვის გზები ღვიძლის მიკროსომებში.

მატებას, თუმცა ამ შემთხვევაში სტიმულაციის კოეფიციენტი გაცილებით დაბალია. მიუხედავად ამისა, როგორც გამოირკვა, Mg<sup>2+</sup>-ისა და DMA-ის თანამყოფობისას NADPH-ის ჟანგვის სიჩქარის გაზრდის ეფექტი აღტიურია.

ჰიდროქსილირების მექანიზმის პირველი ორი სტადიის როლის განხილვის შედეგად შეიძლება მეტ-ნაკლებად სიცხადით ითქვას, რომ არც ციტოქრომ P450-სუბსტრატის კომპლექსის წარმოქმნის და არც NADPH-ის ჟანგვის ჯაჭვში ამ კომპლექსის აღდგენის რეაქცია უმრავლესი სუბსტრატების ჰიდროქსილირების სიჩქარის ლიმიტირებას არ ახდენენ. მხოლოდ ზოგიერთი მათგანის (მაგ., ამინოპირინისა და DMA-სათვის) დემეთილირების სიჩქარე უტოლდება ციტოქრომ P450-სუბსტრატის აღდგენის სიჩქარეს, და ამდენად, ამ

სუბსტრატების მიერ კომპლექსის წარმოქმნას შეუძლია ჟანგვის სიჩქარის ლიმიტირება. საერთო პროცესში “ვიწრო ადგილს” რომელიღაც სხვა სტადია უნდა წარმოადგენდეს. გამოთქმულია მოსაზრება, რომ ეს რგოლი – სამმაგი კომპლექსის (აღდგენილი ციტოქრომი P450–სუბსტრატი–O<sub>2</sub>) მეორადი აღდგენა [185]. ციტოქრომი P450-ის სუბსტრატთან ურთიერთქმედების კინეტიკა იმდენად რთულია, რომ შეუძლებელი ხდება K<sub>s</sub>-ის იმ ჭეშმარიტი სიდიდის დადგენა, რომელიც ლაინუივერ-ბერკის მეთოდით ჰემოპროტეინის სუბსტრატთან სწრაფვას ახასიათებს.

III სტადიაზე ერთი ელექტრონით აღდგენილი კომპლექსი მაღალი სიჩქარით ურთიერთქმედებს მოლეკულურ ჟანგბადთან და სამმაგ კომპლექსს (აღდგენილი ციტოქრომი P450–O<sub>2</sub>–სუბსტრატი) წარმოქმნის. სხვადასხვა კომპლექსებისათვის O<sub>2</sub>-ის მიერთების სიჩქარის კონსტანტები 10<sup>4</sup>-10<sup>6</sup> მოლი<sup>-1</sup>წმ<sup>-1</sup>-ის დიაპაზონში იცვლება [189]. ჰიდროქსილირების მექანიზმის სქემა ამ კომპლექსის პროდუცირების აუცილებლობას ითვალისწინებს, რადგან მეორე ელექტრონით შემდგომმა აღდგენამ ჟანგბადის უშუალო გააქტივება უნდა გამოიწვიოს. სამმაგი კომპლექსის წარმოქმნის შესაძლებლობა როგორც აღნიშნული იყო პირველად *Pseudomonas putida*-ს ჰიდროქსილაზურ სისტემაში იქნა გამოვლენილი [153]. ესტაბრუკი და თანაავტორები [220] NADPH-ით აღდგენილ ლვიძლის მიკროსომულ სუსპენზიაში ჰექსობარბიტალის დამატებისას აკვირდებოდნენ სპექტრულ ცვლილებებს. მათ მიერ მიღებულ დიფერენციალურ სპექტრში შთანთქმის ორი ზოლი ჩნდება 440 და 590 ნმ-ზე. ეს ცვლილებები შეაფასეს როგორც შუალედი კომპლექსის (O<sub>2</sub><sup>-</sup>–Fe<sup>3+</sup>– I ტიპის სუბსტრატი) წარმოქმნის შედეგი. მეორე ტიპის სუბსტრატები ამ შემთხვევაში არაეფექტურნი აღმოჩნდნენ. მოგვიანებით შესაძლებელი გახდა *Pseudomonas putida*-ს კულტურიდან ციტოქრომი P450-ის ოქსიგენირებული სტაბილური ფორმის გამოყოფა, რომლის შემადგენლობაშიც შედიოდა თვით ციტოქრომი P450<sub>cam</sub>, ქაფური და O<sub>2</sub>. აბსოლუტურ სპექტრში კომპლექსის შთანთქმის ზოლები 355, 418 და 555 ნმ-ების ოლქში მჟღავნდებოდა [187].

ოქსიციტოქრომის სამმაგი კომპლექსის შესწავლამ ცხადყო, რომ ოქსი-ჰემოგლობინის ანალოგიურად ელექტრონული სიმკვრივე ჟანგბადის ატომზეა გადაწვავილი და ამის გამო რკინა კვლავ დაჟანგულ მდგომარეობაში რჩება. კომპლექსმა შეიძლება დისპროპორციონირება განიცადოს სუპეროქსიდური ანიონ-რადიკალის წარმოქმნით. არც ისაა გამორიცხული, რომ ფერმენტ-სუბსტრატის კომპლექსმა, ჟანგბადის მოლეკულის ნაცვლად, წყალბადის

ზეჟანგიდან ან არაორგანული ჰიდროზეჟანგიდან უკვე ორი ელექტრონით აღდგენილი ჟანგბადატომები მიიერთოს [184]. სამმაგ კომპლექსში ჟანგბადის მდგომარეობა და მისი კონფიგურაცია შედარებით დეტალურად ჯერაც არაა გამოკვლეული. გამოთქმული ვარაუდით, რომ მისი მდგომარეობა უკეთ შეესაბამება ვაისის [221] მიერ შემოთავაზებულ სტრუქტურას:  $Fe^{3+}O_2^-$  და

მასში  $Fe \begin{array}{c} \diagup O \\ \diagdown O \end{array}$  კუთხე  $120^\circ$ -ს უახლოვდება.

ზოგიერთი მკვლევარი ცდილობდა ქვანტურ-მექანიკური მეთოდების გამოყენებას ოქსიგენირებული ციტოქრომ P450-ის ყველაზე მომგებიანი კონფიგურაციის განსაზღვრად [222, 223]. ჩატარებულმა გამოკვლევებმა აჩვენეს, რომ ჰემოპროტეინის ჟანგბადური და კარბონილური კომპლექსების უჩვეულო სპექტრული თვისებები მთლიანადაა დაკავშირებული მეხუთე აქსიალურ მდგომარეობაში მყოფ თიოლურ ლიგანდთან და ძლიერაა დამოკიდებული ჰემურ რკინასა და ამ ლიგანდს შორის მანძილზე. 2 ნმ-ით ამ მანძილის გაზრდა სავსებით საკმარისია ციტოქრომ P450-ის არააქტიურ ციტოქრომ P420-ად გარდასაქმნელად, რომელიც პირველისაგან აღდგენილ მდგომარეობაში კარბონილური კომპლექსის სორეს ზოლის მაქსიმუმით განსხვავდება [223]. ამის საფუძველზე გარკვეული დასკვნის გაკეთება ზოგიერთი ავტორის მიერ ნაადრევად და სახიფათოდ იქნა მიჩნეული, რამდენადაც ოქსიჰემოგლობინისათვის ჩატარებული Fe-O<sub>2</sub>-ის კავშირის თეორიული გათვლები არაადამაჯერებელი აღმოჩნდა. მხოლოდ ამ ჰემოპროტეინის რენტგენოსტრუქტურულმა გამოკვლევებმა აჩვენეს, რომ O<sub>2</sub>-ის მოლეკულური ღერძი პორფირინის ბირთვის სიბრტყესთან მართლაც ქმნის კუთხეს, რომელიც  $120^\circ$ -ს უტოლდება [224].

მიკროსომულ მაჰიდროქსილირებელ სისტემაში სამმაგი კომპლექსი არამგრაღია და თვითჟანგვას განიცდის. სუბსტრატის მონოოქსიგენირებისათვის აუცილებელია ამ კომპლექსის კიდევ ერთი ელექტრონით აღდგენა, რაც პროცესის მომდევნო სტადიაზე ხორციელდება.

არსებული მონაცემების საფუძველზე დამახასიათებელი სპექტრული თვისებების მქონე სამმაგი კომპლექსის წარმოქმნა არავითარ ეჭვს არ იწვევს. მიუხედავად ამისა, წარმოდგენილი მექანიზმის სრულად მისაღებად საჭიროა გაირკვეს, თუ: 1) ჰემოპროტეინის ოქსიგენირებული ფორმა რატომ წარმოიქმნება მაინცდამაინც მხოლოდ I და არა II ტიპის სუბსტრატების შემთხვევაში? 2) კომპლექსის გასააქტიურებლად საიდან მიიღება მეორე ელექტრონი? მრავალი ავტორის [212, 217, 225] თანახმად კომპლექსში მყოფი ციტოქრომ



P450-ის აღდგენის რეაქციის სინჯარე ჰიდროქსილირების რეაქციის საერთო სინჯარეს უტოლდება, მაშინ როდესაც იგი არაუმცირეს ორჯერ მეტი უნდა იყოს, რადგან ერთი მოლეკულა ჰემოპროტეინის აღდგენას ორი ელექტრონი ესაჭიროება. მხოლოდ ამ კითხვებზე პასუხის გაცემის შემდეგ შეიძლება საბოლოოდ სარწმუნოდ იქნას მიღებული ზევით განხილული წარმოდგენების სისწორე ჰიდროქსილირებისას შუალედი სამმაგი კომპლექსის წარმოქმნის შესახებ, რომლის შემდგომ აღდგენასაც ჟანგბადის აქტიური ფორმის გენერირებასთან მიეყვართ.

IV სტადია “ჟანგბადის აქტიური ფორმის” წარმოქმნას და დასაჟანგ სუბსტრატთან მის დაკავშირებას მოიცავს. ამ ფორმის ჟანგბადის შემცველი სამმაგი კომპლექსის წარმოქმნა და მისი შემდგომი დაშლა იმდენად რთულია, რომ ზშირად ამ ეტაპებს არადისკრეტულად იხილავენ.

სუბსტრატის ჰიდროქსილირებისათვის სამმაგი კომპლექსის აღდგენა საჭირო და ამისათვის მეორე ელექტრონის წყაროდ NADPH-ციტოქრომ  $b_5$ -რედუქტაზას, ხოლო გადამტანად ციტოქრომ  $b_5$ -ს მიიჩნევენ. NADPH-ციტოქრომ P450-რედუქტაზით ციტოქრომ  $b_5$ -ის აღდგენის შესაძლებლობა ექსპერიმენტულად დადასტურებულია, და ამაზე ჩვენ ადრე გვქონდა საუბარი (იხ. 1.3.2 და 1.3.3). ელექტრონის ტრანსპორტში ციტოქრომ  $b_5$ -ის მნიშვნელოვანი როლი ნაჩვენებია როგორც მიკროსომულ [225-228], ასევე რეკონსტრუირებულ სისტემებში მთელი რიგი სუბსტრატების ჟანგვის შესწავლით [229-235]. ითვლება, რომ ელექტრონთა ტრანსპორტის NADH-სპეციფიკურ ჯაჭვში აღდგენილი ციტოქრომი  $b_5$  მეორე ელექტრონს უშუალოდ გადასცემს სამმაგ კომპლექსში ოქსიციტოქრომ P450-ს, რის შედეგადაც პეროქსიციტოქრომ P450 წარმოიქმნება. ამას ადასტურებენ უამრავი ექსპერიმენტული მონაცემები, რომელთა ანალიზი დეტალურადაა განხილული ორ შესანიშნავ მონოგრაფიაში [126, 175]. პირველი ფაქტორი, რომელიც უთუოდ ყურადღებას იმსახურებს, ისაა, რომ I ტიპის სუბსტრატების (ნახშირწყალბადების, მესამეული ამინების, ალიციკლების) ჟანგვისას ორი პირიდინუკლეოტიდის (NADH-ისა და NADPH-ის) ერთდროულად თანამყოფობისას ადგილი აქვს სინერგიზმის ეფექტს, რაც არ შეინიშნება II ტიპის სუბსტრატთა მიმართ. ეს შედეგი მიკროსომულ ჟანგვაში ორივე ელექტრონულ-სატრანსპორტო სისტემის შესაძლო თანამონაწილეობაზე მიუთითებს [225, 226]. მეორე ფაქტორი, რომელიც არანაკლებ საყურადღებოა: სინერგიზმის ფენომენის აღძვრაში მხოლოდ ენდოგენური და არა მიკროსომულ მემბრანაში ჩამენებული

ეგზოგენური ციტოქრომი  $b_5$  ერთვება, რომელიც არათუ არ ასტიმულირებს ჰიდროქსილირებას, არამედ ამინოპირინისა და დიმეთილანილინის ჟანგვითი გარდაქმნების დამუხრუჭებასაც კი იწვევს [226]. ეს შედეგები შეიძლება იმით აიხსნას, რომ მეგბრანაში ჩაშენებული ჰემოპროტეინი იმ კლასტერში არ “ჯდება”, რომელშიც ციტოქრომი P450 და მისი რედუქტაზა მდებარეობს. ინჰიბიტორულ მოქმედებას რაც შეეხება, ეს შესაძლოა იმით იყოს გამოწვეული, რომ ციტოქრომი  $b_5$  NADPH-ციტოქრომი  $b_5$ -რედუქტაზადან ელექტრონების აქცეპტირების მიუხედავად, ჰიდროქსილირების თვალსაზრისით შემდგომში მათ არაპროდუქტიულად ხარჯავს.

არსებობს მეორე ალტერნატივაც მიკროსომულ ჟანგვაზე ენდოგენური და ეგზოგენური ციტოქრომი  $b_5$ -ის განსხვავებული ზემოქმედების ახსნის შესახებ, რაც ნატიური და დამატებული ჰემოპროტეინის განსხვავებულ რედოქს-პოტენციალს უკავშირდება. შესაძლოა, პირველი ჯგუფის სუბსტრატები ციტოქრომი P450-თან ისეთ კომპლექსებს ქმნიან, რომელთა ჟანგვა-აღდგენითი პოტენციალები დადებითად მოქმედებენ ციტოქრომი  $b_5$ -ით სამმაგი კომპლექსის აღდგენაზე, მაშინ როდესაც ამინოპირინი და დიმეთილანილინი წარმოქმნიან კომპლექსებს, რომელთა ჟანგვა-აღდგენითი პოტენციალები ამ პროცესს ზღუდავენ [226].

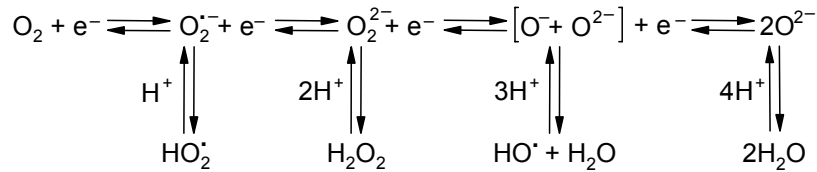
რეკონსტრუირებულ სისტემაში მიმდინარე ჟანგვის პროცესებზე ციტოქრომი  $b_5$ -ის გავლენა მნიშვნელოვნადაა განპირობებული თვით ციტოქრომი P450-ის ბუნებით. მაგ., იდენტიფიცირებულია ამ ჰემოპროტეინის ფორმა, რომელსაც ციტოქრომი  $b_5$ -ისადმი მომეტებული სწრაფვა გააჩნია [236], და  $p$ -ნიტროანიზოლის ჟანგვითი დემეთილირების რეაქცია ეფექტურად ჩქარდება ამ ციტოქრომი P450-ით [231, 234]. ციტოქრომი  $b_5$  განსხვავებული დონით აჩქარებს ერთი და იგივე სუბსტრატის (3,4-ბენზპირენის) ჟანგვას იდენტურ პირობებში, პროცესში მონაწილე ორი განსხვავებული ფორმის ციტოქრომი P450-ით (P450LM<sub>2</sub>-ით და P450LM<sub>4</sub>-ით), ანუ მისი ბუნება არსებითად ცვლის ციტოქრომი  $b_5$ -ის მასტიმულირებელ შესაძლებლობას.

ამრიგად, შეიძლება მისაღებად ჩაითვალოს, რომ მიკროსომებში და რეკონსტრუირებულ სისტემებში სხვადასხვა სუბსტრატის ჟანგვაში ციტოქრომი  $b_5$ -ის გავლენა რამოდენიმე ფაქტორითაა განპირობებული: ციტოქრომი  $b_5$ -ის წარმოშობით (უჯრედში არსებულია თუ დამატებული) და მისი ჟანგვა-აღდგენითი პოტენციალით; დასაჟანგი სუბსტრატის ბუნებით და სამმაგი კომპლექსის ჟანგვა-აღდგენით მახასიათებლებზე მისი გავლენით; თვით ციტოქრომი P450-ის

ბუნებით და ციტოქრომ  $b_5$ -სადმი მისი განსხვავებული სწრაფვით. აღნიშნის ღირსია აგრეთვე ფერმენტულ სისტემათა რეკონსტრუქციის მეთოდების, მათში დეტერგენტების ნარჩენების შემცველობისა და რეაქციის მსვლელობის პირობების ფაქტორები. ციტოქრომ  $b_5$ -ისა და სამმაგი კომპლექსის ჟანგვა-აღდგენითი პარამეტრების ოპტიმალური თანაფარდობისას ჰემოპროტეინი ასტიმულირებს სუბსტრატის ჟანგვას; არაკეთილსასურველი თანაფარდობისას კი ციტოქრომ  $b_5$ -ს NADPH-ციტოქრომ P450-რედუქტაზიდან შეუძლია ელექტრონების მიღება, მაგრამ ციტოქრომ P450-ზე მათ გადატანას ვეღარ ახორციელებს, რის გამოც ჟანგვის პროცესი ითრგუნება.

განსჯა იმის შესახებ, თუ რომელი სისტემაა მიკროსომებში მიმდინარე ჰიდროქსილირების პროცესის ყველაზე უკეთესი მოდელი, ეკუთვნით შტაუდინგერსა და მის თანამშ. [237, 238], აგრეთვე იუდენფრენდსა და მის თანამშ. [239, 240]. ამის საფუძველზე მათ მიერ შემოთავაზებულია რამოდენიმე კრიტერიუმი, რომელთაგანაც ყველაზე პოპულარობით სხვადასხვა მდგომარეობაში ჩანაცვლებული ბირთვის მქონე ციკლური ნაერთების ჰიდროქსილირების სიჩქარის შედარებითი შესწავლა სარგებლობს. მაგ., მოდელურ სისტემებში აცეტანილიდისა და ანიზოლის *o*-, *m*- და *p*-მდგომარეობებში ჰიდროქსილირების სიჩქარეთა თანაფარდობის გაზომვა აღნიშნულ ავტორებს მიაჩნიათ მიკროსომული ჰიდროქსილირების მექანიზმთან შედარების საუკეთესო მიდგომად. აღმოჩნდა, რომ გამოყენებული სუბსტრატის მიუხედავად, მიკროსომებში ჰიდროქსილირების პროდუქტთა თანაფარდობა ისეთია, რომ საერთო რაოდენობის არაუმცირეს 90%-ს *p*-წარმოებულები, ~10%-ს *o*-წარმოებულები და არაუმეტეს 1%-ს *m*-წარმოებულები შეადგენენ. რაც შეეხება  $\text{HO}^\bullet$ -რადიკალების გენერირებად მოდელურ სისტემებს (ფენტონის –  $\text{Fe}^{2+}$ , EDTA, ასკორბატი,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{N}_2$ ; და იუდენფრენდის –  $\text{Fe}^{2+}$ , EDTA,  $\text{O}_2$ ), მათში *p*-ჰიდროქსილირებულ პროდუქტთა გამოსავალი ~55 %-ს არ აღემატება ხოლო *o*- და *m*-წარმოებულები შესაბამისად ~45 და ~10%-ს შეადგენენ. მაშასადამე, ჰიდროქსილირებულ პროდუქტთა გამოსავლით ეს მოდელური სისტემები მეტნაკლებად შეესატყვისებიან მიკროსომულს, თუმცა შესაბამისობა მაინც არასრულია.

ჟანგბადის რადიკალების გენერირებად სისტემებში რეაქციების თანმიმდევრობა, სავარაუდოდ, ასე გამოიყურება:



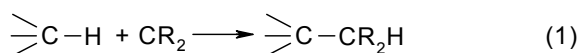
ჟანგბადის ოთხელექტრონიანი აღდგენის თანმიმდევრობა [126].

აქედან ჩანს, რომ  $\text{HO}^{\cdot}$  რადიკალების გენერაციისათვის აუცილებელია ჟანგბადის სამ-ელექტრონიანი აღდგენა. შუალედ პროდუქტებად  $\text{O}_2^{\cdot-}$  და  $\text{H}_2\text{O}_2$  წარმოიქმნებიან. კატალაზას ან Ti-ის საშუალებით  $\text{H}_2\text{O}_2$ -ის მუდმივი მოცილება თუ მოხდება, ასეთ სისტემაში  $\text{HO}^{\cdot}$ -რადიკალების კონცენტრაცია მკვეთრად მოიკლებს, ხოლო ძალზე არასტაბილური  $\text{HO}_2^{\cdot}$  რადიკალების წილი საგრძნობლად მოიმატებს [241]. სისტემაში, რომელშიც  $\text{HO}^{\cdot}$ - და  $\text{HO}_2^{\cdot}$ -მაჰიდროქსილირებელ აგენტებს შორის თანაფარდობა  $\text{HO}_2^{\cdot}$  წარმოქმნისკენაა გადაწეული, სხვადასხვა მდგომარეობების ჰიდროქსილირებულ პროდუქტთა გამოსავალში თანაფარდობრივი ცვლილება მოხდება და ამ დროს სამივე სახის პროდუქტის დაახლოებით თანაბარ წარმოქმნას ექნება ადგილი, ანუ  $\text{HO}_2^{\cdot}$  რადიკალით ჰიდროქსილირების შედეგად მიღებულ პროდუქტთა გამოსავალი მიკროსომებისაგან განსხვავებული იქნება.

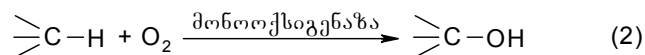
მაჰიდროქსილირებელი ნაწილაკის ჭეშმარიტი ბუნების დადგენაში აუცილებელი აღნიშვნის ღირსია ჰამილტონის [242] მიერ წამოყენებული ჰიპოთეზა. მონოოქსიგენაზური რეაქციების გაანალიზებისას მან შენიშნა მათი გასაოცარი მსგავსება კარბენების ( $\text{CR}_2$ ) და ნიტრენების (NR) დამახასიათებელ რეაქციებთან. ეს ნაერთები მრავალ ქიმიურ გარდაქმნებში წარმოიქმნებიან როგორც მაღალრეაქტიურობის მქონე შუალედური ფორმები. ჰამილტონმა პარალელი გაავლო და ამასთან დაკავშირებით გამოითქვა მოსაზრება, რომ ფერმენტ-მონოოქსიგენაზებს ჟანგბადი სუბსტრატზე გადააქვთ კარბენოიდების მსგავსად, ე.წ. ოქსენოიდური მექანიზმით [243, 244]. ზოგიერთ დიოქსიგენაზასაც ახასიათებს სუბსტრატზე ჟანგბადის გადატანის ოქსენოიდური გზა. მიუხედავად იმისა, რომ ძნელია დამტკიცდეს ყველა მონოოქსიგენაზას ოქსენოიდური მექანიზმით ფუნქციონირება, მაინც შეიძლება ითქვას, რომ ამ კლასის ფერმენტთა უმრავლესობა პროცესის სხვადასხვა სტადიაზე მსგავსების არსებით ნიშნებს ამჟღავნებს. ჰამილტონის აზრით, ოქსიგენაზებით კატალიზებულ რეაქციებში აქტიურ დამ-

ჟანგველ ნაწილაკს წარმოადგენს ჟანგბადის ატომი, რომელსაც გარე ენერგეტიკულ დონეზე 6 ელექტრონი (ჟანგბადის სინგლეტური მდგომარეობა) გააჩნია, ანუ ესაა არა თავისუფალი ჟანგბადის ატომი, არამედ ნაწილაკი (ოქსენოიდი), რომელსაც სუბსტრატზე ასეთი ჟანგბადი გადააქვს. საილუსტრაციოდ მოვიყვანო რამოდენიმე მაგალითს [182, 245]:

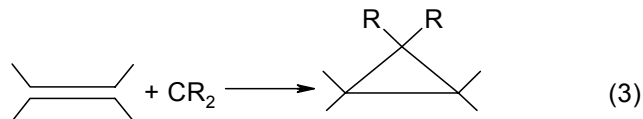
1. კარბენებს შეუძლიათ მრავალ ალკანში ჩანერგვა და ალკილური წარმოებულების წარმოქმნა მათი კონფიგურაციის შეუცვლელად:



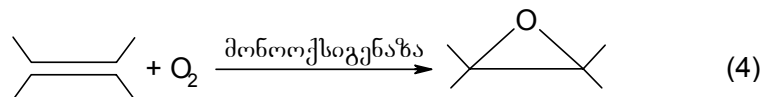
არცთუ იშვიათად არის შემთხვევები, როცა მონოქსიგენაზები ალკანთა მოლეკულებში ჟანგბადის ატომს ნერგავენ და მათი პირველადი კონფიგურაციის შენარჩუნებით სპირტებს წარმოქმნიან:



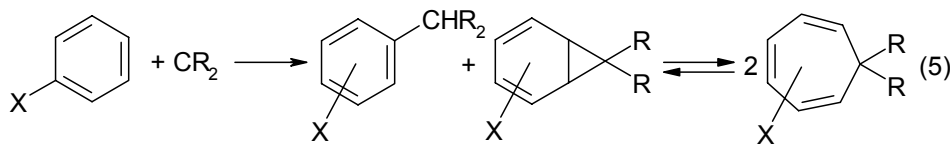
2. კარბენები უერთდებიან ალკენებს ციკლოპროპანების წარმოქმნით:



ამ რეაქციის ანალოგიურად მიმდინარეობს მონოქსიგენაზებით კატალიზებული ალკენების ეპოქსიდირებაც:

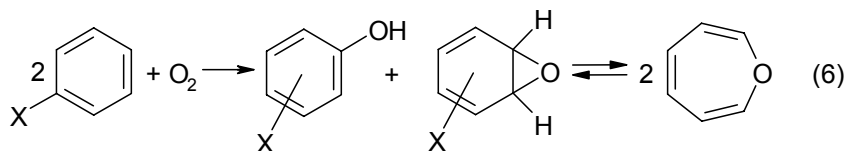


3. კარბენები ადვილად რეაგირებენ არომატულ ნაერთებთან ალკილბენზოლისა და ნორკარადიენის წარმოქმნით, რომლებიც წონასწორობაშია ციკლოჰექსატრიენებთან:



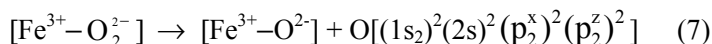
მრავალი ოქსიგენაზა აკატალიზებს არომატული ნაერთების ფენოლებად და

არენოქსიდად გარდაქმნას, რომლებიც წონასწორობაშია ოქსიპინთან:



აღნიშნულ რეაქციათა ანალოგიამ ჩამოაყალიბა შეხედულება იმის შესახებ, რომ კარბენები ოქსიგენაზების შორეულ მოდელს წარმოადგენენ. ამან, თავის მხრივ, გამოიწვია გაცხოველებული კვლევების დაწყება ოქსიგენაზების მოქმედების იმიტაციის უნარის მქონე მოდელური სისტემების მოძიებისა და შესწავლისათვის.

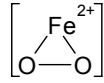
ოქსენოიდური მექანიზმის რეალობაზე არსებული მთელი რიგი სარწმუნო მტკიცებულებების მიუხედავად, ძნელია გარკვეულად მსჯელობა მის ბუნებასა და სტრუქტურაზე. ერთი რამ მაინც ნათელია: სხვადასხვა შემთხვევაში ოქსენოიდს განსხვავებული სტრუქტურა უნდა გააჩნდეს. მართლაც, ბუნებრივია, რომ ისეთი რთული ფერმენტული სისტემისათვის, რომელიც ციტოქრომ P450-სა და ფლავოპროტეინს შეიცავს, არსებობდეს სუბსტრატზე ჟანგბადის გადამტანი ერთი აქტიური უნივერსალური ნაწილაკი. ერთ შემთხვევაში ოქსენოიდი ერთი ელექტრონით აღდგენილ ჟანგბადთან ჰემური რკინის კომპლექსს, ან მისი გარდაქმნის პროდუქტს წარმოადგენს, რომელიც O—O ბმის დაშლის შედეგად მიიღება. მეორე შემთხვევაში ოქსენოიდი შეიძლება იყოს ფლავინის ჰიდროზეჟანგი ან მისი გარდაქმნის პროდუქტი, რომელიც სუბსტრატში ჩასანერგ ნაწილაკში ელექტრონის დეფიციტით ხასიათდება. ციტოქრომ P450-ის ჰემით ან სხვა ჰემშემცველი ცილებით ჟანგბადის აქტივაციის თეორიული განხილვა  $[\text{Fe}^{3+}-\text{O}_2^{2-}]$  სტრუქტურის სასარგებლოდ მეტყველებს. აქ ჟანგბადის ატომები  $120^\circ$ -იან კუთხეს ქმნიან. გარდამავალ მდგომარეობაში ეს ნაწილაკი სუბსტრატს რკინისაგან კიდურა ჟანგბადის ატომზე გადასცემს [222].



არსებობს მონაცემები, რომელთა მიხედვითაც ოქსენოიდი შეიძლება იყოს ნაწილაკი  $[\text{Fe}^{3+}-\ddot{\text{O}}:]$ , რომელიც O—O ბმის დაშლისა და წყლის მოლეკულის გამოთავისუფლების შედეგად წარმოიქმნება. ასეთი მტკიცება ეფუძნება დაჟანგულ მდგომარეობაში მყოფ ციტოქრომ P450-ის კატალიზურ აქტივობას იოლოზობენზოლთან შეთანაწყობაში. ამ შემთხვევაში ოქსენოიდი არ შეიძლება

ჟანგბადის ორ ატომს შეიცავდეს, რადგან იოდოზობენზოლი მხოლოდ ჟანგბადის ერთი ატომის დონორია [246].

ისეთ მოდეულურ სისტემებზე ჩატარებული ცდებით, რომლებშიც მაჰიდროქსილირებელ ნაწილაკად წარმოიქმნებოდა ან ჟანგბადის ექსელექტრონიანი ატომი –  $[N_2O \rightarrow O + N_2]$  (ოქსენოიდური მექანიზმი) ან  $OH^+$ -იონები –  $(CF_3COOH + H_2O_2)$ . ნაჩვენებია, რომ მათგან არც ერთი პროდუქტი არ მიიღება ისეთი თანაფარდობით, როგორც მიკროსომების მაჰიდროქსილირებელ სისტემაში. ჩამოთვლილი მოდელები პრინციპში ჰიდროქსილირების ყველა შესაძლო მექანიზმს (რადიკალურს, ოქსენოიდურს და ელექტროფილურს) მოიცავენ. ამდენად მიღებული შედეგები ორი დასკვნის გაკეთების საშუალებას იძლევიან: 1). ყველა შესწავლილი მოდელი არ ასახავს მიკროსომული ჰიდროქსილირების მექანიზმს; 2). მიკროსომებში სუბსტრატთა *p*-მდგომარეობაში ჰიდროქსილირება უზრუნველყოფილია აპოფერმენტით, ან მემბრანულ ლიპიდურ ფაზაში რეაქციის მსვლელობის თავისებურებებით. მეორე ვარაუდის სისწორის შემთხვევაში ზევით მოყვანილი მექანიზმებიდან ერთ-ერთმა მაინც სრულად უნდა ასახოს მიკროსომული ჰიდროქსილირების მექანიზმი [126]. ამ არჩევანის გასაკეთებლად სხვადასხვა მკვლევარები რამდენიმე მეთოდურ ხერხს იყენებენ და მათგან ყველაზე ეფექტური იუდენფრენდის [247-249] ლაბორატორიაში დადგენილი მოვლენა აღმოჩნდა, რომელიც “NIH-Shift”-ის სახელწოდებითაა ცნობილი. მისი აზრი იმაში მდგომარეობს, რომ სუბსტრატი დასაყანვ ატომთან თუ რაიმე ჩამნაცვლებელს (დეიტერიუმს, ტრიტიუმს ან ჰალოგენს) შეიცავს, მაშინ ჩამნაცვლებლის ნაწილი მიკროსომებში ჰიდროქსილირებისას სუბსტრატს კი არ მოსცილდება, არამედ მეზობელი მდგომარეობისაკენ გადაინაცვლებს. ასეთი რეტენცია კი (მოლეკულაში ჩამნაცვლებლის შეკავება) მხოლოდ ოქსენოიდური და  $OH^+$ -ჰიდროქსილირებისთვისაა დამახასიათებელი [250], და აბსოლუტურად არ ხდება რადიკალების შემცველ სისტემაში. ამ უკანასკნელს კიდევ იმიტომ არ შეიძლება ჰქონდეს ადგილი, რომ ფენტონის სისტემაში არ რეგისტრირდება ციკლოპექსანის ჰიდროქსილირება, მაშინ როდესაც ეს სუბსტრატი მიკროსომებში საკმარის მაღალი სიჩქარით იჟანგება [238, 251]. რადიკალური მექანიზმი გამოყენებულია  $O$ -დეალკილირებისთვისაც [238]. მოყვანილი მონაცემები იმის დადასტურებაა, რომ თავისუფალი რადიკალებისა და  $OH^+$ -იონების გენერირებადი სისტემები სრულად ვერ ხსნიან მიკროსომული ჰიდროქსილირების მექანიზმს. საფიქრებელია, რომ ჟანგბადის აქტივაცია მიდის მისი ორელექტრონი-



ნი აღდგენით. წარმოქმნილი კომპლექსი შეიცავს ლაბილურ (O—O) კავშირს, რომლის გახლეჩისას ან უშუალოდ პირდაპირ შეიძლება განხორციელდეს ერთ-ერთი ჟანგბადის ჩანერგვა დასაჟანგ სუბსტრატში (პოლარულ-მაჰიდროქსილირებელი მექანიზმი), ან წინასწარ წარმოიქმნას რკინით სტაბილიზებული ჟანგბადოვანი რადიკალი და მხოლოდ ამის შემდეგ განხორციელდეს ეს რეაქცია (რადიკალურ მაჰიდროქსილირებელი მექანიზმი). მოდელურ სისტემებში ამ ტიპის რეაქციათა შორის სხვაობები ჯერაც არაა გამოვლენილი.

სუპეროქსიდული რადიკალის ( $\text{O}_2^-$ ) წარმოქმნის შესაძლებლობა ექსპერიმენტულად შემოწმდა ხსნად რეკონსტრუირებულ მიკროსომული ჰიდროქსილირების სისტემაზე [252, 253]. აღმოჩნდა, რომ ასეთ სისტემაში ჰიდროქსილაზური აქტივობა მკვეთრად ქვეითდება ერთროკუპრინის თანამყოფობისას, რომელიც სუპეროქსიდული რადიკალების დისმუტაციას იწვევს. ამავე დროს სუპეროქსიდების გენერირებად ფერმენტს — ქსანთინოქსიდაზას NADPH-რედუქტაზის შეცვლის უნარი აღმოაჩნდა. ავტორების მიერ ჩატარებული ამ გამოკვლევით ფაქტიურად დაიხვეწა შეხედულება ჟანგბადის აქტიური ფორმის ბუნების შესახებ და იგი სუპეროქსიდ-ანიონს წარმოადგენს. სამწუხაროდ რეკონსტრუირებულ სისტემებში მიმდინარე ჰიდროქსილირების რეაქციები, ამ რადიკალის როლზე მიღებული მონაცემები მემბრანული სისტემებისათვის არ იქნა დადასტურებული.

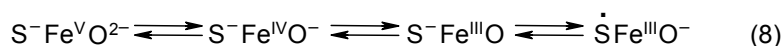
ამგვარად, არსებული ფაქტების საფუძველზე შეიძლება დავასკვნათ, რომ ბიოლოგიურ ჟანგვაში  $\text{HO}^\bullet$ -ს და  $\text{O}^{\cdot-}$ -ს აქტიური ფორმების მონაწილეობა ერთობ საეჭვოა მათი არასელექტიურობის გამო.  $\text{HO}_2^\bullet$  რადიკალიც არ უნდა იღებდეს მონოქსიგენირებაში მონაწილეობას დაბალი რეაქციისუნარიანობის გამო. ჟანგბადის ატომი  $\text{O}(^3\text{p})$  მაღალაქტიურია, მაგრამ მოლეკულური ჟანგბადიდან მისი პირდაპირი გენერირება შეუძლებელია. სავარაუდოდ რჩება ის, რომ სუბსტრატებს ჟანგბადის ატომები გადაეცემა გარდამავალი მდგომარეობის ნაწილაკებით და ასეთებს წარმოადგენენ ოქსენოიდები, რომლებიც ჟანგბადის აქტიური ფორმის სტაბილიზებას ახდენენ. ოქსენოიდური აგენტების ბუნებისა და თვისებების კვლევა, აგრეთვე ოქსენოიდური მექანიზმებით მოქმედი მოდელური სისტემის შექმნა არის ის ერთ-ერთი მთავარი მიზანი, რომელიც თავის აუცილებელ გადაწყვეტას ელოდება, რათა საბოლოოდ გაიხსნას



ფერმენტული სისტემებით მოლეკულური ჟანგბადის აქტივაციის მექანიზმი.

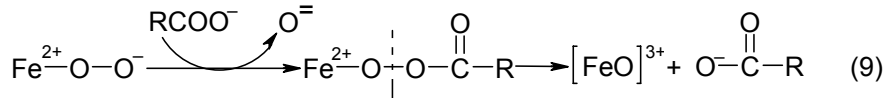
მიკროსომული ჟანგვის IV სტადიაში სავარაუდოდ მონაწილეობა შეუძლია მიიღოს ამ სისტემის რამდენიმე მაკრომოლეკულურმა ბიოკომპონენტმა. მხოლოდ ქაფური-P450<sub>cam</sub>-O<sub>2</sub> სამმაგი კომპლექსის მეორე ელექტრონით აღდგენის სტადიაა სინჯარის კონსტანტებით დახასიათებული [254, 255]. ეს პროცესი ეფექტურად პუტიდარედოქსინს იყენებს და ბაქტერიულ სისტემაში ქაფურის ჟანგვის მალიმიტირებელ საფეხურად ითვლება.

IV სტადიის შემდეგ სამმაგ კომპლექსში O-O კავშირის დაშლა და ჟანგბადის ერთი ატომის შემცველი მაჰიდროქსილირებელი აგენტის (ოქსენის) წარმოქმნა ხდება. რეაქციას თან ახლავს წყლის გამოყოფა. ამის კვალდაკვალ დამჟანგავი ნაწილაკი სუბსტრატში ხლენს C-H ბმას, რის შედეგადაც რეაქციის პროდუქტი (ROH) და რეგენერირებული საწყისი კატალიზატორი (Fe<sup>3+</sup>) მიიღება [256]. O-O კავშირის დაშლა ციტოქრომ P450-ის აქტიური ცენტრის ერთ-ერთი ამინომჟავის კარბოქსილური ჯგუფის მონაწილეობით მიმდინარეობს. კუენის [256] აზრით, სამმაგი კომპლექსის კარბოქსილის ჯგუფთან ურთიერთქმედებით წარმოქმნილი ზეჟანგური მჟავას სტრუქტურა კეთილსასურველად მოქმედებს O-O კავშირის დაშლაზე და მაჰიდროქსილირებელი ნაწილაკის ჩამოყალიბებაზე. ეს მოსაზრება დასტურდება არომატულ და ალიფატურ ნახშირწყალბადებთან შედარებით ზეჟანგურ მჟავათა მაღალი მაჰიდროქსილირებელი უნარით, რომელიც მეტაღლა კომპლექსებთან მათი კოორდინირებისას იზრდება. შემთხვევითი არაა, რომ ზეჟანგური მჟავები მონოქსიგენაზების მოხერხებულ მოდელს წარმოადგენენ და მიკროსომულ სისტემაში სუბსტრატში ჟანგბადის ჩანერგვის აქტის იმიტაციას ახდენენ [175, 243]. ოქსენოიდი სტაბილიზდება ციტოქრომ P450-ის თიოლური ლიგანდით, რომელიც თავისებურ ელექტრონების რეზერვუარს წარმოადგენს მაჰიდროქსილირებელი ნაწილაკის ჩამოყალიბებაში და მის რეაქციაში:

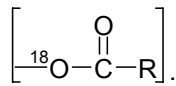


მაჰიდროქსილირებელი აგენტის წარმოქმნაში ჰემოპროტეინის აქტიური ცენტრის ამინომჟავის კარბოქსილური ჯგუფის შესაძლო მონაწილეობის ფაქტი ექსპერიმენტულად ნაჩვენებია სლიგარისა და მისი თანამშ. [257] მიერ ციტოქრომ P450<sub>cam</sub>-ის მაგალითზე. მძიმე ჟანგბადის (<sup>18</sup>O<sub>2</sub>) გამოყენებით მათ დაადგინეს, რომ P450<sub>cam</sub>-<sup>18</sup>O<sub>2</sub>-ის ოქსიგენირებულ კომპლექსში დიჰიდროლიპოის მჟავა აცილებს დისტალურ (კიდურა) ჟანგბადს და წარმოქმნის შუალედ ზე-

ჟანგურ ნაერთს, რომელშიც O—O ბმის გახლეჩა ძალზე გაადვილებულია. ამის გამო  $^{18}\text{O}$ -ის ერთი ატომი ქაფურში, ხოლო მეორე დიჰიდროლიპოს მჟავას კარბოქსილურ ჯგუფში ინერგება:



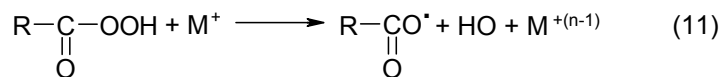
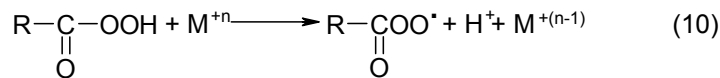
მაშასადამე, აცილზეჟანგის ჰეტეროლიტური დაშლისას ოქსენოიდი  $\text{Fe}^{18}\text{O}$  და ლიპოს მჟავა წარმოიქმნება მონიშნული კარბოქსილის ჯგუფით



აღნიშნული გარდაქმნის ალტერნატივად კუუნმა და უაიტმა [256] განიხილეს შუალედი ზეჟანგური ნაერთის ჰომოლიტური დაშლის შესაძლებლობა,

რომელიც ამიდური ჯგუფის  $\left( \overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{NH}_2 \right)$  მონაწილეობით ხორციელდება. ამ შემთხვევაში საჭიროა დაშვებულ იქნას, რომ სუბსტრატში C—H ბმა ამიდური რადიკალის  $\left( \text{NH}-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C} \right)$  მხრიდან შეტევას განიცდის.

ზოგიერთი ავტორი [258] რეაქციის ასეთ გზას ნაკლებ ალბათურად მიიჩნევს, რადგან ამიდური რადიკალი შედარებით მდგრადია და ფიზიოლოგიურთან ახლო მყოფ ტემპერატურაზე ციტოქრომ P450-ის სუბსტრატთა უმეტესობაში მტკიცე C—H კავშირის დარღვევა არ შეუძლია. ეს ავტორები გამორიცხავენ შუალედურად წარმოქმნილ აცილზე ჟანგბადშიც არსებული O—O კავშირის დაშლის ჰომოლიტურ გზასაც, რადგან მეტალის კომპლექსებისა და იონების მონაწილეობით ამ ბმის ჰომოლიზს თან ახლავს წარმოქმნილი აცილპეროქსი-რადიკალის დეკარბოქსილირება [259]:

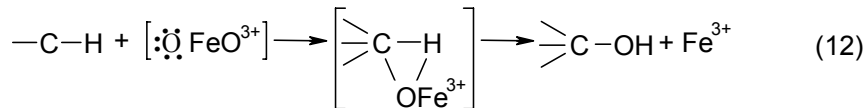


მე-11 რეაქციის შედეგად აპოფერმენტის მჟავა, რომელიც ოქსიგენირებულ

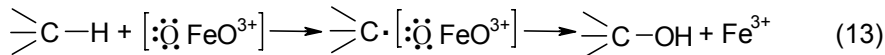
ციტოქრომ P450-ში ჟანგბადის კოვალენტურ ფიქსაციაში მონაწილეობს, შეუქცევადად დაიწყებს ხარჯვას და კატალიზატორი სწრაფად დაიშლება.

ამგვარად, სრულ მიკროსომულ სისტემაში ოქსენოიდის წარმოქმნის გზას ყველაზე მეტი ალბათობით წარმოადგენს აცეტილზეჟანგების ჰომოლიტური დაშლა. ეს ნაერთები სამმაგი კომპლექსის გააქტივებულ ჟანგბადთან ფერმენტის აქტიური ცენტრის ერთ-ერთი ამინომჟავის კარბოქსილის ჯგუფის ურთიერთქმედებით ფორმირდება. მნიშვნელოვანია აღინიშნოს, რომ ციტოქრომ P450-ით კოორდინირებული ჟანგბადი არამარტო ფიქსირდება ფერმენტის მატრიცით, არამედ კოვალენტურადაც უკავშირდება აპოფერმენტის ერთ-ერთ მჟავას, ზეჟანგური ბუნების შუალედი ნაერთის წარმოქმნით [260, 261].

პროცესის დამამთავრებელ სტადიაზე სუბსტრატის მოლეკულაში C-H-ბმის გახლეჩა ხდება. კუნი და მისი თანაშემ. [256] თვლიან, რომ ეს სტადია რადიკალური მექანიზმით მიმდინარეობს. გამომდინარე იქიდან, რომ ოქსენოიდის სტრუქტურა და რეაქციისუნარიანობა ( $Fe^{3+}O \rightleftharpoons Fe^{4+}O^-$ ) კვლავაც უცნობია, მეტელიცამ [170] დაუშვა, რომ სუბსტრატზე შეტევის ორიდან ერთი მექანიზმი უნდა რეალიზდებოდეს: პირველი – ოქსენოიდური, ანუ ორელექტრონიანი:



ხოლო მეორე – ფარულ-რადიკალური, ანუ ერთელექტრონიანი:



არასწორი იქნებოდა იმის მტკიცება, რომ რეაქციის რომელიმე ერთი გზა უნივერსალურს წარმოადგენს. როდესაც ოქსენოიდში ჟანგბადის მდგომარეობა სინგლეტურია, მაშინ პირველი მექანიზმი რეალიზდება, რომლის მიხედვითაც, კავშირის გაწყვეტის გარეშე, ჟანგბადი C-H ბმაში ინერგება. რეაქციის ასეთი გზა ყველაზე მეტად ალბათურია არომატული და უჯერი ნაერთების ჟანგვის პროცესში, რადგან ძნელი წარმოსადგენია რადიკალური მექანიზმით ციკლოპქსანისა და ოლეფინების ოქსიდების წარმოქმნა. თუ ოქსენოიდი ტრიპლეტურ მდგომარეობაში იმყოფება, მაშინ სუბსტრატში ჟანგბადის პირდაპირი ჩანერგვა შეუძლებელი იქნებოდა, რადგან ასეთი რეაქცია სპინ-აკრძალულია. ამ შემთხვევაში ელექტრონიანი ფარულ-რადიკალური მექანიზმი ამოქმედდება.

მიკროსომული ჟანგვის მაღლიმიტირებელ სტადიას რაც შეეხება, ამთავითვე

უნდა აღინიშნოს, რომ ერთი და იგივე სუბსტრატისათვის იგი მიკროსომებში და რეკონსტრუირებულ სისტემებში სხვადასხვაა. გარდა ამისა, წინასწარვე შეიძლება ითქვას, თუ რომელი სტადია არ შეიძლება იყოს მალიმიტირებელი. დაჟანგული ციტოქრომ P450-ის ურთიერთქმედება მრავალ სუბსტრატთან მაღალი სიჩქარით მიმდინარეობს. ფერმენტ-სუბსტრატის კომპლექსის აღდგენა NADPH-ციტოქრომ P450-რედუქტაზით ასევე სწრაფად ხორციელდება, და ამდენად, ამ სტადიას მთლიანი ჟანგვის პროცესის ლიმიტირება არ შეუძლია [183, 259]. მესამე სტადია – აღდგენილი ფერმენტ-სუბსტრატის კომპლექსის მიერ მოლეკულური ჟანგბადის მიერთება, სიჩქარის მაღალი კონსტანტებით ( $10^3-10^6 \text{ M}^{-1}\cdot\text{წმ}^{-1}$ ) გამოირჩევა. ვარაუდობენ, რომ სწორედ ეს სტადია უნდა ალიმიტირებდეს მთლიანი პროცესის სიჩქარეს. ამასთან დაკავშირებით პარალელს ავლებენ მიკროსომული და ქაფურის მჟანგავ ბაქტერიულ მაჰიდროქსილირებელ სისტემებს შორის, რომელშიც სამმაგი კომპლექსის აღდგენა მართლაც მთელი პროცესის მალიმიტირებელი სტადიაა. მიუხედავად ამისა, ასეთი ანალოგია შეიძლება მცდარი იყოს, რადგან ბაქტერიულ სისტემაში კიდევ ერთი დამატებითი ცილა – პუტიდარედოქსინი მონაწილეობს.

ცხრილი 1.2

ღვიძლის მიკროსომების რეკონსტრუირებულ სისტემაში ბენზფეტამინის N-დემეთილირების კინეტიკური მახასიათებლები

პროცესის სტადია	კინეტიკური მახასიათებლები
ბენზფეტამინის მიერთება ციტოქრომ P450-თან	$K=50 \text{ წმ}^{-1}$
ფერმენტ-სუბსტრატის კომპლექსის აღდგენა პირველი ელექტრონით	$K_2=4\cdot 12$
ფერმენტ-სუბსტრატის კომპლექსთან ჟანგბადის მიერთება	$K_3=(1.0-1.3)\cdot 10^3 \text{ წმ}^{-1}$
სამმაგი კომპლექსის დაშლა რეაქციის პროდუქტის წარმოქმნით	$V \geq 2.3^*$
NADPH-ის ჟანგვა	$V=0.8-1.2^*$
ფორმალდეჰიდის დაგროვება	$V=0.5-0.7^*$

\* – პროცესების სიჩქარის განზომილებაა  $\text{ნმოლი}\cdot\text{წმ}^{-1}\cdot\text{ნმოლი}^{-1}$  ციტოქრომ P450-ზე.

მიკროსომულ ჟანგვაში მალიმიტირებელი სტადიის დაზუსტებაში ყველაზე მართებულია ამ რთული პროცესის ცალკეული საფეხურების სიჩქარის

გაზომვა და მათი შეპირისპირება. ასეთი საშუალო ჩატარებული სატოსა და მისი თანამშ. [259] მიერ რეკონსტრუირებულ სისტემებში ბენზფეტამინის ჟანგვისას. ცხრილში 1.2 მოცემულია პროცესის ცალკეული სტადიების კინეტიკური მახასიათებლები.

ბენზფეტამინის ჟანგვის ცალკეული სტადიების სიჩქარეთა შედარებამ ავტორები იმ დასკვნამდე მიიყვანა, რომ მაღლიმიტირებელი სტადია შეიძლება იყოს ან სამმაგი კომპლექსის აღდგენა მეორე ელექტრონით, ან ამ აქტის შემდეგ ნებისმიერი, რამდენადაც რეაქციის პროდუქტის დაგროვება უფრო ნაკლები სიჩქარით ხდება, ვიდრე სამმაგი კომპლექსის დაშლა.

#### **1.4 ციტოქრომ P450-ის მრავლობითი ფორმები და მათი თანამედროვე ნომენკლატურა**

ბიოქიმიის ზოგადი პრინციპებიდან გამომდინარე, ფერმენტების სუბსტრატული სპეციფიკურობა შეიძლება იყოს აბსოლუტური (ერთი ფერმენტი – ერთი სუბსტრატი) ან ფართო (ერთი ფერმენტი – მრავალი სუბსტრატი, რომლებსაც განსაზღვრული საერთო თვისება გააჩნიათ). ფერმენტთა უმრავლესობისათვის დამახასიათებელია მაღალი სპეციფიკურობა. ისინი ჩვეულებრივ ურთიერთქმედებენ მხოლოდ ერთ სუბსტრატთან და ერთ რეაქციას აკატალიზებენ. არსებობს ფერმენტები, რომლებიც მკაცრად განსაზღვრული ქიმიური ჯგუფების შემცველ ნივთიერებებთან ურთიერთქმედებენ. ამ თვალსაზრისით ციტოქრომ P450-ის მრავლობითი ფორმები, როგორც ფერმენტები, ბიოქიმიაში უპრეცედენტო მოვლენას წარმოადგენენ. ციტოქრომ P450-ის სუბსტრატების სპექტრი იმდენად მრავალფეროვანია (მათ ჩვენ II და III თავებში მიმოვიხილავთ), რომ ძნელი წარმოსადგენია, ამდენი სხვადასხვაგვარი ქიმიური სტრუქტურების ნაერთების ჟანგვა მხოლოდ ერთი იზოფორმის მიერ კატალიზდებოდეს. ამიტომ ციტოქრომ P450-ის კვლევის საწყისი ეტაპებიდანვე წარმოიშვა მოსაზრება, რომ ეს ჰემოპროტეინი რამდენიმე იზოფორმის სახით არსებობს. ჰიპოთეზა პირველ რიგში ციტოქრომ P450-ის ინდუქტორების მრავალგვარობას ეყრდნობოდა – იმ ნივთიერებების საერთო რაოდენობა, რომლებიც ციტოქრომ P450-შემცველი მონოოქსიგენაზას ინდუქციას იწვევენ, რამდენიმე ასეულს აღწევდა [262]. ეს ნივთიერებები განსხვავდება როგორც ქიმიური ბუნების, ისე ბიოლოგიური მოქმედების მიხედვით. ინდუქტორების ერთადერთი საერთო თვისებაა ლიპოფილური ბუნება, რაც თავის მხრივ,

ციტომემბრანებში მათ შერჩევითად შეღწევას და უჯრედის ენდოპლაზმურ ბადეში დაგროვების უნარს განაპირობებს. ეს, თავის მხრივ, ხელს უწყობს ინდუქციას: რაც უფრო დიდხანს იმყოფება სუბსტრატი ორგანიზმში, მით უფრო ხანგრძლივია მისი ფერმენტთან კონტაქტი და, შესაბამისად, უფრო მაღალია ინდუქციის ხარისხი. სავარაუდოა, რომ ინდუქციის მოვლენა გარემო პირობებთან ორგანიზმის შეგუების ერთ-ერთ მექანიზმს წარმოადგენს, რამდენადაც ამ დროს იზრდება ქსენობიოტიკების მეტაბოლიზმის სინქარე და უფრო ეფექტური ხდება მათი გაუვნებელოფის (დეტოქსიკაციის) პროცესი [263].

მონოოქსიგენაზური სისტემის მოლეკულური ორგანიზაციის ზოგადი პრინციპების განხილვისას უსათუოდ წინა პლანზე გამოდის საკითხი იმის შესახებ, თუ რა სიმრავლით არსებობენ და რით განსხვავდებიან ან ემსგავსებიან ერთმანეთს ციტოქრომ P450-ის იზოფორმები. კვლევის საწყის სტადიაზე დომინირებდა შეხედულება, რომ ქსენობიოტიკთა ჟანგვის ყველა რეაქციაში მონაწილეობს ძლიერ ფართო სუბსტრატული სპეციფიკურობის მქონე ერთი ჰემოპროტეინი. შემდგომში ეს შეხედულება იმის სასარგებლოდ შეიცვალა, რომ არსებობს გამოკვეთილი სპეციფიკურობის მქონე ციტოქრომ P450-ის მრავლობითი ფორმები. მაგ., თირკმელზედა ჯირკვლის მიტოქონდრიებისა და მიკროსომების ფრაქციები შეიცავენ ჰემოპროტეინებს, რომლებიც სტეროლებს სხვადასხვა მდგომარეობაში ჟანგავენ. მიკროსომული ციტოქრომ P450 სტეროლის გვერდითი ჯაჭვის C-21 მდგომარეობას ჟანგავს; მიტოქონდრიები 2 ჰემოპროტეინს შეიცავენ, რომელთაგან ერთი ქოლესტეროლს გვერდით ჯაჭვს აცილებს C-20 და C-22 მდგომარეობებში, ხოლო მეორე – დეზოქსიკორტიკოსტეროლს ჟანგავს 11β- და 18-ე მდგომარეობებში [264].

მრავალწლიანი კვლევების საფუძველზე ჩამოყალიბდა ზოგადი ხასიათის მქონე დებულებები:

1. ციტოქრომ P450 წარმოადგენს ხ-ტიპის CO-დამკავშირებელ ჰემოპროტეინს, რომელიც ბუნებაში მრავლობითი ფორმით არსებობს;
2. ციტოქრომ P450-ის მრავლობითი ფორმები პოლიპეპტიდურ ჯაჭვში ამინომჟავათა განსაზღვრული თანმიმდევრობით ხასიათდებიან, რაც იმაზე მიუთითებს, რომ მათი ბიოსინთეზი სხვადასხვა გენებით კონტროლდება;
3. არსებობს ისეთი სუბსტრატები, რომელთა სპეციფიკური მეტაბოლიზმი ციტოქრომ P450-ის განსაზღვრული ფორმებით კატალიზდება. ამის პარალელურად, სუბსტრატთა უმრავლესობისათვის ფერმენტთა მკაცრად დადგენილი სპეციფიკურობა არ არსებობს, თუმცა ჰემოპროტეინის სხვადასხვა

ფორმებით მათი გარდაქმნის სიჩქარეები ხშირად განსხვავებულია;

4. ციტოქრომ P450-ის იზოფორმებს შეიძლება ერთნაირი მოლეკულური მასები და აღდგენილ მდგომარეობაში CO-კომპლექსის შთანთქმის ერთნაირი მაქსიმუმები გააჩნდეთ, მაგრამ ისინი გენეტიკურად სხვადასხვა ცილებს წარმოადგენდნენ.

ყოველივე ამან ციტოქრომ P450-ის კვლევაში ახალი ნომენკლატურის შემოტანის აუცილებლობის საკითხი დააყენა. გენეტიკისა და მოლეკულური ბიოლოგიის განვითარებამ პირობები შექმნა ნათელი გამხდარიყო ციტოქრომ P450-ის კლასიფიკაციაში არსებული ბუნდოვანება. პრობლემის გადაწყვეტაში საწყის კრიტერიუმებს საყოველთაოდ ცნობილი ბიოლოგიური კანონზომიერებები წარმოადგენენ. როგორც ცნობილია, გენები განსაზღვრავენ უჯრედის რეგულატორული მექანიზმების არსებობას, ხოლო ეს მექანიზმები გენში კოდირებული ფერმენტით რეალიზდება. უჯრედში განუწყვეტლად მიმდინარეობს რამდენიმე გენის ტრანსკრიპცია, თუმცა გენომის ნაწილი შეიძლება არც გამოვლინდეს. ფაქტორებს, რომლებიც განაპირობებენ რიბოსომებზე ფერმენტის სინთეზის სიჩქარეს ტრანსკრიპციის დონეზე რნმ-ის მოლეკულების დეგრადაციის სიჩქარეები ალიმიტირებენ. ამგვარად, არეგულირებენ რა ფერმენტების ბიოსინთეზს, გენები აკონტროლებენ განსაზღვრულ მეტაბოლურ რეაქციებს. ეს გამოიხატა მტკიცებულებაში: “ერთი გენი – ერთი ფერმენტი”. აქედან გამომდინარე, ციტოქრომ P450-ის სხვადასხვა იზოფორმების ბიოსინთეზი უნდა იმყოფებოდეს გენეტიკური კონტროლის ქვეშ და ეს იზოფორმები ერთმანეთისაგან მხოლოდ ამინომჟავური თანმიმდევრობით უნდა განსხვავდებოდნენ. მათი ნაწილი უნდა იყოს კონსტიტუციური, ე.ი. წარმოიქმნებოდეს იმის მიუხედავად, თუ რა პირობებში იმყოფება უჯრედი; ნაწილი კი ინდუქციური, ე.ი. წარმოდგენილი უნდა იყოს კვალის სახით და განსაზღვრულ დონეს აღწევდეს ენდოგენური ან ეგზოგენური სუბსტრატების თანამყოფობისას. ციტოქრომ P450-ის ზოგიერთი იზოფორმისათვის შეიმჩნევა ე.წ. იმპრინტინგის მოვლენა, რომლის არსი იმაში მდგომარეობს, რომ ნეონატალურ პერიოდში ინდუქტორის (ფენობარბიტალის) შეყვანისას ცხოველის ღვიძლში ჰემოპროტეინის შესაბამისი მნიშვნელობები შენარჩუნებულია სქესობრივი სიმწიფის მიღწევამდე. ამ შემთხვევაში ადგილი აქვს ფერმენტის შეუქცევად ინდუქციას [265]. უნდა აღინიშნოს, რომ კონსტიტუციური ფერმენტების იზოფორმების ნაწილს ახასიათებს ინდუქციური ბუნებაც, ნაწილს კი არა. ამიტომ ციტოქრომ P450-ის იზოფორმებისათვის დამახასიათებელი თავისებურებაა გენთა ექსპრესია. ცალკეული გენების ტრანსკრიპციული აქტივობა იწყება ორგანიზმის განვითარების სხვადასხვა სტა-

დიებზე და დამოკიდებულია ცხოველის სქესზე, სახეობასა და ქსოვილის ტიპზე [266]. ზოგიერთი გენის ტრანსკრიპციისათვის აღმოჩენილია ფენობარბიტალ-მგრძობიარე პრომოტორი, რომელიც შეიცავს დადებით და უარყოფით მარეგულირებელ ელემენტებს [267]. მათ შეიძლება წარმოადგენდეს სპეციფიკური ცილა, რომელიც ფოსფორილებური ფორმით მოქმედებს, როგორც პრომოტორის დადებითი, ხოლო დეფოსფორილებური ფორმით – როგორც უარყოფითი ელემენტი. დადგენილია, რომ გლუკოკორტიკოიდებს, ზრდის, სქესობრივ და თირეოიდულ ჰორმონებს გენების ექსპრესიის მნიშვნელოვანი მოდულირების უნარი გააჩნიათ [268].

სადღეისოდ გენების რაოდენობა, რომლებშიც ციტოქრომ P450-ის იზოფორმებია კოდირებული, 500-მდეა. ისინი ეუკარიოტების 85 სახეობაში (ხერხემლიანები, უხერხემლოები, მცენარეები, სოკოები) და 20 სახეობის პროკარიოტებშია აღმოჩენილი (იხ. ცხრილი 1.3) [263]. ციტოქრომ P450-ის იზოფერმენტების კლასიფიკაციისათვის გაითვალისწინეს ფერმენტის ამინომჟავური შედგენილობის მსგავსების პრინციპი და გენების საერთო წარმომავლობის კანონზომიერებები.

ცხრილი 1.3

სხვადასხვა ტაქსონომიური ჯგუფების ორგანიზმების ციტოქრომ P450-ის ოჯახების საერთო დახასიათება [263]

CYP 1	<b>ხერხემლიანებში:</b> ინდუცირდება დიოქსინით; მონაწილეობს პოლიციკლური ნახშირწყალბადების, პეტეროციკლური ნაერთების, არომატული ამინების მეტაბოლიზმში
CYP 2	<b>ხერხემლიანებში</b> და <b>უხერხემლოებში:</b> მონაწილეობს წამლების და გარემოს დამბინძურებლების მეტაბოლიზმში
CYP 3	<b>ხერხემლიანებში:</b> მონაწილეობს წამლების და გარემოს დამბინძურებლების მეტაბოლიზმში
CYP 4	<b>ხერხემლიანებში:</b> მონაწილეობს ცხიმოვანი მჟავების ჰიდროქსილირებაში; <b>უხერხემლოებში:</b> ფუნქცია ჯერჯერობით უცნობია
CYP 5	<b>ხერხემლიანებში:</b> ტრომბოქსანსინთაზა; <b>მწერებში:</b> მონაწილეობს მცენარეული წარმოშობის ნაერთების და პესტიციდების მეტაბოლიზმში
CYP 6	<b>მწერებში:</b> მონაწილეობს მცენარეული წარმოშობის



	ნაერთების და პესტიციდების მეტაბოლიზმში
CYP 7A	ხერხემლიანებში: ქოლესტერინ 7a-ჰიდროქსილაზა
CYP 7B	ხერხემლიანებში: ფუნქცია ჯერჯერობით უცნობია
CYP 8	ხერხემლიანებში: პროსტაციკლინსინთაზა
CYP 9	მწერებში: ფუნქცია ჯერჯერობით უცნობია
CYP 10	მოლუსკები: მიტოქონდრიული ფერმენტები
CYP 11	ხერხემლიანებში: ქოლესტერინის გვერდითი ჯაჭვის ჟანგვა, სტეროიდ 11-ხ-ჰიდროქსილაზა და ალდოსტერონ სინთაზა (მიტოქონდრიებში)
CYP 12	მწერებში: მიტოქონდრიული ფერმენტები
CYP 13	ნემატოდებში
CYP 14	ნემატოდებში
CYP 15	ნემატოდებში
CYP 16	ნემატოდებში
CYP 17	ხერხემლიანებში: სტეროიდ 7a-ჰიდროქსილაზა
CYP 18	მწერებში
CYP 19	ხერხემლიანებში: ანდროგენების არომატიზაცია
CYP 21	ხერხემლიანებში: სტეროიდ 21-ჰიდროქსილაზა
CYP 24	ხერხემლიანებში: სტეროიდ 24-ჰიდროქსილაზა (მიტოქონდრიებში)
CYP 27	ხერხემლიანებში: სტეროიდ 27-ჰიდროქსილაზა (მიტოქონდრიებში)
CYP 51	ცხოველები, მცენარეები, საფუვრები, სოკოები: სტეროლის ბიოსინთეზი
CYP 52	საფუვრები: ალკანების ჰიდროქსილირება
CYP 53 – CYP 62	სოკოები
CYP 71 – CYP 92	მცენარეები
CYP 73	მცენარეები: დარიჩინმჟავა 4-ჰიდროქსილაზა
CYP 101 – CYP 118	ბაქტერიები

ამჟამად არსებობს ციტოქრომ P450-ების გენების 120 ოჯახი, რომელთაგან 11-ს ყველა ბუძემწოვრის ღნმ-ში ვხვდებით (იხ. ცხრილი 1.3). (ამ მონაცემთა ბაზის განახლება მუდმივად ხდება და მათი გაცნობა ინტერნეტის საშუალებით შეიძლება [272-274]) მაგ., „ოჯახი 1“ – პოლიციკლური არომატული ნაერთებით, მათ შორის 3-მეთილქოლანტრენით ინდუცირებად ციტოქრომ P450-ებს მოიცავს, ხოლო „ოჯახი 3“-ის წარმომადგენლები სტეროლებით ინდუცირდება. „ოჯახი 2“ აერთიანებს რამდენიმე ქვეოჯახს, მაგ., „ქვეოჯახ 2B“-ში ფენობარბიტალით ინდუცირებული ჰემოპროტეინებია, ხოლო „ქვეოჯახ 2E“-ს იზოფორმებისათვის ინდუქტორი ეთანოლია. ზოგჯერ, მოხერხებულობისათვის, ოჯახისთვის ისეთი ნომერია შერჩეული, რომ იგი ფერმენტის სპეციფიკურ აქტივობას უკავშირდება. მაგ., „ოჯახი 11“ შეიცავს ციტოქრომ P450-ებს, რომლებსაც სტეროიდ-11-β-ჰიდროქსილაზური აქტივობა გააჩნიათ. ასევეა დანომრილი „ოჯახი 17“ (სტეროიდ-17-α-ჰიდროქსილაზა), „ოჯახი 21“ (სტეროიდ 21-ჰიდროქსილაზა) და სხვ. თუმცა, როგორც აღვნიშნეთ, ოჯახებსა და ქვეოჯახებში იზოფორმები ერთიანდება არა სუბსტრატული სპეციფიკურობის, არამედ გენეტიკური ჰომოლოგიურობის ხარისხის მიხედვით.

უნდა აღინიშნოს, რომ ციტოქრომ P450-ის ყველა მკვლევარი სინარულით არ შეხვედრია ახალ კლასიფიკაციას და აღნიშნავენ, რომ იგი მოსახმარად არც ისე მარტივია, როგორც ერთი შეხედვით ჩანს. პირველ რიგში, მოუხერხებელია, რომ ზოგიერთ გენს უკვე მინიჭებული ჰქონდა ტრივიალური სახელწოდება და მხოლოდ შემდეგ დადგინდა მათი როლი ციტოქრომ P450-ის კოდირებაში. მაგ., გენი *Eig17-1*, რომლებიც გვხვდება მწერებში (*Drosophila melanogaster*) და მცენარეებში (*Arabidopsis thaliana*) წარმოადგენს გენს *Cyp18*, ე.ი. გამოდის, რომ *Eig17-1* და *Cyp18* ოფიციალური სინონიმებია, რაც კლასიფიკაციისათვის მიუღებელია. ასევე ხშირია გაუგებრობა პუბლიკაციებში, რადგან ბევრი მკვლევარი კვლავ ჰემოპროტეინების ძველ ნომენკლატურას იყენებს, რომელიც ციტოქრომ P450-ის იზოფორმების სახეობრივ თავისებურებებზეა დაფუძნებული: მაგალითად იხმარება ბოცერის ციტოქრომ P450*o1f1*-ის ნაცვლად გამოყენებულ უნდა იქნას *CYP2C16*, ვირთაგვის ციტოქრომ P450II *C16*-ის ნაცვლად – *CYP2C16*. სტეროიდჰიდროქსილაზებში ციტოქრომები P450*c11b1*, P450*cb1*, P450*arom* უნდა დასახელდნენ, როგორც *CYP11B1*, *CYP11B2* და *CYP17*.

მოლეკულური ბიოლოგიის თანამედროვე მეთოდები გენეტიკური ელემენტებით მანიპულაციის საშუალებას იძლევა. ერთ-ერთი ასეთი მეთოდია *in vitro*

პირობებში კონსტრუირებული **ღწმ**-ის რეკომბინირებული მოლეკულების კლონირებით გენების ჩანერგვა. ამ დროს მიღებული **ღწმ**-ის ჰიბრიდული მოლეკულა შემდგომში შეიძლება კლონირებულ იქნას *in vivo* პირობებში. ახალი მეთოდოლოგია (PCR – Polymerase chain reaction – პოლიმერაზული ჯაჭვური რეაქცია) საშუალებას იძლევა დიდი რაოდენობით გამოიყოს **ღწმ**-ის ინდივიდუალური ფრაგმენტები (გენები) ნებისმიერი წყაროდან. სწორედ ასეთი მეთოდებით იქნა მიღებული ციტოქრომ P450-ის ისეთი იზოფორმები, რომლებიც ბუნებრივი იზოფორმებისაგან ამინომჟავური თანმიმდევრობით განსხვავდებიან. ასეთ შემთხვევაში რეკომენდირებულია შემდეგი ნომენკლატურის გამოყენება: ჯერ უნდა მიეთითოს ციტოქრომ P450-ის ბუნებრივი იზოფორმა, შემდეგ აბრევიატურა X###Y, რომელიც გვიჩვენებს, რომ ცილის ### უბანში X ამინომჟავა შეცვლილია Y-ით. მაგალითად, აღნიშვნა CYP1A1I426V გვიჩვენებს, რომ CYP1A1 იზოფორმაში იზოლეიცინი (აღინიშნება I-თ) 426-ე მდგომარეობაში შეცვლილია ვალინით (აღინიშნება V-თი).

ციტოქრომ P450-ის იზოფორმებზე მრავალმხრივი ინფორმაციის დაგროვებამ ხელი შეუწყო შექმნილიყო ფილოგენეტიკური ხე, რომელიც აღწერდა ამ ცილების ევოლუციას. ცნობილია, რომ ფილოგენეტიკურად დაცილებული სახეობების ერთი და იგივე ტიპის ფერმენტებს საერთო სტრუქტურული ფრაგმენტები გააჩნიათ, თუმცა მნიშვნელოვნად განსხვავდებიან ამინომჟავური თანმიმდევრობით. ასეთ ცილებს, როგორც წესი, აქტიური ცენტრის უბანში ერთნაირი ამინომჟავური თანმიმდევრობა აქვთ. როგორც ჩანს, ამ უბანში ნებისმიერი ცვლილება არღვევს სტერიულ შესაბამისობას სუბსტრატთან, ან იწვევს იმ პროსთეტული ჯგუფის დაკარგვას, რომელიც კატალიზურ პროცესში მონაწილეობს. აქედან გამომდინარე, ამინომჟავური თანმიმდევრობის დივერგენციის მიხედვით შესაძლებელია კოდონებში მომხდარი მუტაციების რაოდენობის გამოთვლა და ამით ადვილად ფასდება მოდიფიცირებული ნიშანთვისებების მემკვიდრულად გადაცემა. როგორც ჩანს, მუტაციის ტემპი, რომელიც ამინომჟავურ თანმიმდევრობაში მჟღავნდება, დროში ცვალებადია და განსხვავებულია სხვადასხვა ოჯახებისათვის [263].

არსებობს რამდენიმე სქემა, რომლებიც აჩვენებენ ნათესაურ კავშირებს ციტოქრომ P450-ის ცალკეულ ოჯახებს შორის. [275-278]. მათგან ყველაზე ფართოდ აღიარებულ სქემაში [277] ძირითადი ოჯახები და ცალკეული იზოფორმები გაყოფილია რვა (I–VIII) ჯგუფად, რომლებიც თანმიმდევრობითაა ერთმანეთთან დაკავშირებული. ამ კავშირის საფუძველია პოლიპეპტიდური

ჯაჭვების ჰომოლოგიურობა. I ჯგუფს (5 გენი) მიეკუთვნება 4 ჰემოპროტეინი, რომლებიც გვხვდება ხერხემლიანი ცხოველების ორგანიზმებში და 1 – მწერებში (CYP18). II ჯგუფი წარმოდგენილია 13 გენისგან შემდგარი კლასტერის სახით და მხოლოდ მცენარეებშია გავრცელებული. III ჯგუფის (6 გენი) ჰემოპროტეინები დამახასიათებელია უხერხემლოებისათვის. IV ჯგუფს (5 გენი) მიეკუთვნება ციტოქრომ P450-ები, რომლებიც პროკარიოტებსა და ეუკარიოტებში ცხიმოვანი მჟავების ჟანგვას აკატალიზებენ. V ჯგუფის 7 გენში კოდირებულია მიტოქონდრიული ციტოქრომ P450-ები, რომელთა ძირითად ფუნქციასაც სტეროიდების ჟანგვა წარმოადგენს. VI ჯგუფი აერთიანებს მცენარეული ჰემოპროტეინის 4 გენს. VII ჯგუფის 6 გენი მიეკუთვნება სოკებს, ხოლო VIII ჯგუფში (7 გენი) თავმოყრილია სხვადასხვა ტაქსონომიური ჯგუფების წარმომადგენელი ორგანიზმების ციტოქრომ P450-ები. საინტერესოა, რომ ამ ოჯახის წარმომადგენლის CYP19 გენი, რომელიც ძუძუმწოვრებში გვხვდება და აკოდირებს არომატაზას (არომატული ბირთვის მჟანგავ ციტოქრომ P450-ს), მცენარე *Arabidopsis thaliana*-ს (წიწმატურას) CYP86A1-ის გენის ჰომოლოგიურია. ტაქსონომიურად განსხვავებული ორგანიზმების ციტოქრომ P450-ების ჰომოლოგიურობის კარგი მაგალითია სოკო *Neurospora*-ს CYP54, რომელიც აკოდირებს სტეროიდ 14-დემეთილაზას და გავრცელებულია ცხოველებშიც, მცენარეებშიც, სოკოებსა და საფუვრებშიც. ცხადია, რომ ბაქტერიიდან ადამიანამდე ციტოქრომ P450-ის გენებს ერთი საერთო წინაპარი ჰყავთ.

უნდა აღინიშნოს, რომ ციტოქრომ P450-ის გენების ასეთი ფილოგენეტიკური

უნდა აღინიშნოს, რომ ციტოქრომ P450-ის გენების ასეთი ფილოგენეტიკური განლაგებისას ადგილი არ მოიძებნა ბაქტერია *Pseudomonas putida*-ს CYP101 ჰემოპროტეინისათვის, არადა სწორედ ეს ციტოქრომ P450 იქნა პირველად გამოყოფილი კრისტალური სახით და ციტოქრომ P450-ის კატალიზური თვისებები სწორედ ამ ფერმენტზეა პირველად შესწავლილი. გარდა ამისა ამ ფილოგენეტიკურ სქემაში ვერაფრით მოიძებნა ადგილი NO-სინთაზისთვის, რომელიც თავისი კატალიზური აქტივობით ციტოქრომ P450-ის ანალოგიურია. NO-სინთაზას ამინომჟავური თანმიმდევრობის კომპიუტერულმა ანალიზმა აჩვენა, რომ ეს ფერმენტი არ არის ციტოქრომ P450-ის სუპეროჯახის წევრი. აღმოჩნდა, რომ იგი C-ბოლოს დომენის შედგენილობის მიხედვით – ციტოქრომ c რედუქტაზას ოჯახს “ენათესავება”. შესაძლოა, რომ ფუნქციისა და შედგენილობის ასეთი შეუსაბამობა ევოლუციის პროცესში მომხდარი დივერგენციის შედეგია.

მოყვანილი ფაქტები იმაზე მიგვანიშნებენ, რომ ბაქტერიების, მცენარეებისა და ცხოველების დივერგენციისას 2 მილიარდი წლის წინ მომხდარმა ევოლუციურმა ცვლილებებმა ციტოქრომ P450-ის ძირითად სტრუქტურულ-ფუნქციურ თავისებურებებს მნიშვნელოვანი კვალი არ დაამჩნია. ეს ის ეტაპია, როდესაც ევოლუციის ერთ-ერთი ყვალზე უფრო კრიტიკული – ეფექტური აერობული მეტაბოლიზმის ჩამოყალიბების სტადია მიმდინარეობდა, რასაც მიტოქონდრიების წარმოქმნა მოჰყვა [263].

ქრომოსომებში ციტოქრომ P450-ის გენების განლაგების შესწავლამ აჩვენა, რომ ზოგჯერ იზოფორმების მაკოდირებელი გენები ერთსა და იმავე ქრომოსომაშია ლოკალიზებული. მაგალითად, CYP1A1 და CYP1A2 ადამიანის მე-15 ქრომოსომაში ერთმანეთის ახლოს, ერთ კლასტერშია “ჩაწერილი”. ასეთ შემთხვევაში სახელწოდების მინიჭებისას რეკომენდებულია მითითებულ იქნას, რომელ ოჯახს ეკუთნის ეს კლასტერი, ე.ი. ამ შემთხვევაში კლასტერის სახელწოდება იქნება “CYP1A კლასტერი”, ხოლო გენის ადგილმდებარეობის მინიშნებისათვის გამოყენებული უნდა იყოს მოლეკულურ ბიოლოგიაში მიღებული აღნიშვნები, მაგალითად, CYP1A 15q22-qter (MPI) [279].

კლასტერების წარმოქმნას მკვლევარები ღნმ-ს დუპლიკაციის შედეგად დიპლოიდური უჯრედების წარმოქმნას უკავშირებენ, რაც 400 მილიონი წლის განმავლობაში ხდებოდა [277]. ასეთი დუპლიკაციის შედეგად დიპლოიდურ უჯრედებში თითოეული ფერმენტისათვის ორის ნაცვლად ოთხი გენია. შემდეგ გენერაციებში გენთა თითოეული წყვილი ერთმანეთისგან დამოუკიდებლად შეიძლება იცვლებოდეს: ერთი წყვილი დარჩეს უცვლელი, მეორემ კი მუტაცია განიცადოს. ამის შედეგად მეორე წყვილი იგივე ფუნქციის ფერმენტს დაასინთეზებს, რასაც პირველი, მაგრამ განსხვავება სპეციფიკურ აქტივობაში გამოვლინდება.

კლასიკური გენეტიკური კვლევებით დადგინდა, რომ შესაძლებელია ადგილი ჰქონდეს გენთა ტრანსლოკაციას – ქრომოსომის ერთი ნაწილის სხვა ქრომოსომაში გადატანას. ცხადია, ევოლუციურ პროცესში ციტოქრომ P450-ის გენთა დუპლიკაციის დროს ასეთ ტრანსლოკაციასაც ექნებოდა ადგილი. ასეთი ტრანსლოკაციის მაგალითად ასახელებენ ადამიანის გენებს, რომლებიც ციტოქრომ P450-ის ერთ ოჯახს ქმნიან: CYP2B (19q13.1-13.2), CYP2C (19q12-q13.2) და CYP2D (10q24.1-24.3). ასეთივეა ციტოქრომ P450-ის ყველაზე “ძველი” გენი CYP51, რომელიც წარმოდგენილია შესაბამისი კლასტერით ადამიანის მე-7 ქრომოსომაში და ასევე ორი ფსევდოგენით მე-3 და მე-13 ქრომოსომებში.

ციტოქრომ P450-ის იზოფორმებს სახეობრივი სპეციფიკურობაც ახასია-

თებთ. მაგალითად, P4501B1 ადამიანში პასუხისმგებელია იზოფორმაზე, რომელიც ეთოქსირეზორცინის O-დემეთილირებას აკატალიზებს, მაგრამ თავებსა და ვირთავებში ეს იზოფორმა აღნიშნული რეაქციის მიმართ აბსოლუტურად არააქტიურია [280].

ციტოქრომ P450-ის იზოფორმების მრავლობითობა ინჰიბიტორების მრავალფეროვნებასაც განაპირობებს. ამჟამად ციტოქრომ P450-ის ინჰიბიტორები, მოქმედების მექანიზმის მიხედვით, 4 ჯგუფად იყოფა [281]:

**a ჯგუფის** ინჰიბიტორები მოქმედებენ ჰემთან კომპლექსწარმოქმნის დონეზე, კერძოდ, ასეთია CO, რომელიც სპეციფიკურად უკავშირდება ჰემს, ამიტომ იგი ყველა იზოფორმისათვის უნივერსალურია;

**b ჯგუფის** ინჰიბიტორები SKF-525A (β-დიეთილამინოეთილდიფენილპროპილაცეტატი), პიპერონილ ბუთოქსიდი, მეთირაპონი და სხვები მოქმედებენ რეაქციის მექანიზმის დონეზე და სუბსტრატის მსგავსად უკავშირდებიან აქტიურ ცენტრს, მაგრამ არ გარდაიქმებიან. ამ ჯგუფის ინჰიბიტორების მოქმედების ეფექტი ხანმოკლეა;

**c ჯგუფის** ინჰიბიტორები მოქმედებენ ჰემის ბიოსინთეზის დონეზე. მაგ., პორფობილინოგენი თრეუნავს ფეროხელატაზას (ჰემის სინთეტაზას); გლიცინი და სუქცინილ CoA ერთად აბლოკირებენ ფერმენტ δ-ამინოლევულინმჟავა-სინთეტაზას და ა.შ. მეტად მრავალმხრივი ეფექტი აქვს ამ ჯგუფის წარმომადგენელ კიდევ ერთ ინჰიბიტორს – კობალტის (II) იონს.  $Co^{2+}$  აინჰიბირებს δ-ამინოლევულინმჟავა-სინთეტაზას და ფეროხელატაზას. იგი ხელს უშლის ჰემის ნორმალურ ასოცირებას აპოციტოქრომ P450-თან და ამასთანავე ასტიმულირებს ჰემის დეგრადაციაში მონაწილე ფერმენტს – ჰემოქსიგენაზას;

**d ჯგუფის** ინჰიბიტორები წარმოადგენენ აგენტებს, რომლებიც ჰემის დესტრუქციის დონეზე მოქმედებენ. მაგ., ალილიზიპროპილაცეტამიდი რეაგირებს ციტოქრომ P450-თან და წარმოქმნის ეპოქსიდს, რომელიც ჰემის დესტრუქციას იწვევს, ასეთივე ეფექტი გააჩნია ოთხქლორიან ნახშირბადსაც, რომელიც ციტოქრომ P450-ისათვის „გამანადგურებელი“ სუბსტრატია, რადგან ჰემისათვის „საშიშ“ ტრიქლორმეთილის თავისუფალ რადიკალს გენერირებს. ჰემის დესტრუქტორია აგრეთვე ზოგიერთი მძიმე მეტალის იონიც, კერძოდ,  $Cd^{2+}$ .

ქსენობიოქიმიისათვის საინტერესოა ის იზოფორმები, რომლებიც უცხო ნაერთთა ჟანგვაში მონაწილეობენ. პირველ რიგში, ასეთი იზოფორმაა P4501A1, რომელიც პოლიციკლური არომატული ნახშირწყალბადების კონფორმაციულად დახურული უბნების ჰიდროქსილირებას ახორციელებს. ამ

რეაქციის შედეგად არენების ისეთი ეპოქსიდები წარმოიქმნება, რომლებიც ეპოქსიჰიდროლაზების საშუალებით აღარ გარდაიქმნებიან შესაბამის დიოლქებად. ამის გამო რეაქციისუნარიანი მეტაბოლიტები შემდგომ გარდაქმნებს აღარ განიცდიან და იქმნება იმის ალბათობა, რომ ისინი კოვალენტურად დაუკავშირდნენ ცილებსა და ნუკლეინის მჟავებს. ყოველივე ეს განაპირობებს ასეთი მეტაბოლიტების ციტოტოქსიკურ, მუტაგენურ და კანცეროგენულ მოქმედებას [282]. ანალოგიური მოქმედების მეტაბოლიტები წარმოიქმნება P4501A2-ის მიერ პოლიციკლური არომატული ამინების ჟანგვის შედეგადაც. რაც შეეხება იზოფორმას P4501B1, სუბსტრატული სპეციფიკურობით ის ახლოა P4501A1-თან [280]. ციტოტოქსიკური ნაერთების ფორმირება ხდება ციტოქრომ P4502E1-ის მიერ ბენზოლის, სტიროლის, ოთხქლორიანი ნახშირბადის, ქლოროფორმის, დიქლორმეთანის, ქლორვინილის, ეთილკარბამატის და აკრილონიტრილის ჟანგვის შედეგადაც [283]. საინტერესოა, რომ ინჰალაციური ანესთეტიკი (მაგალითად, ნარკოზისათვის გამოყენებული ქლოროფორმი) სწორედ ამ იზოფორმის საშუალებით ჩასუნთქვიდან 3 წამში ჰეპატოტოქსიკური მეტაბოლიტები წარმოიქმნება [284]. ციტოქრომ P4502E1-ს უკავშირებენ ეთანოლის ჟანგვის კატალიზებასაც, რამდენადაც ეს იზოფორმა ალკოჰოლდეჰიდროგენაზას მსგავსად ეთანოლიდან აცეტალდეჰიდს წარმოქმნის.

მცენარეებში ყველაზე უკეთ შესწავლილია CYP76B1, რომელიც კლასიკური ფერმენტთა კლასიფიკაციის მიხედვით დარიჩინმჟავა-4-ჰიდროქსილაზას (EC 1.14.14.1) წარმოადგენს. ეს ციტოქრომ P450 აქტიურად აკატალიზებს მრავალი ტოქსიკური ნაერთის, მათ შორის სხვადასხვა ქიმიური ბუნების ჰერბიციდების მეტაბოლურ გარდაქმნებს. საერთოდ, მცენარეებში აღმოჩენილია 120-მდე ღ6მ-ის თანმიმდევრობა, რომლებშიც კოდირებულია ციტოქრომ P450 [271, 285-287]. ეს მცენარეებია: ხორბალი (*Triticum vulgare*), ავოკადო (*Persea americana*), ბადრიჯანი (*Solanium melongela*), კატაპიტნა (*Nepeta racemosa*), გველის სურო (*Catharanthus roseus*), პიტნა (*Mentha piperita*), ქუთქუთა (*Thlaspi arvense*), წიწმატი (*Arabidopsis thaliana*), სიმინდი (*Zea mays*), მიწაგაშლა (*Helianthus tuberosus*), მაშა-ლობიო (*Vigna radiata*), იონჯა (*Medicago sativa*), მზესუმზირა (*Helianthus annuus*), ბარდა (*Pisum sativum*), სელი (*Linum usitatissimum*), გვაიულა (*Parthenium argentatum*), პეტუნია (*Petunia hybrida*), ჯადვარი (*Phalaenopsis* sp. ჰიბრიდი SM9108), სორგო (*Sorghum bicolor*), კოწახური (*Berberis stolonifera*), მინდვრის მღოვი (*Brassica campestris*), ცერცვი (*Vicia faba*), თამბაქო (*Nicotiana tabacum*), სოია (*Glycine Max*) და სხვ.

#### 1.4.1 ციტოქრომ P450-ის მრავლობითი ფორმების ინდუქცია

სადღეისოდ მიღებულია, რომ ციტოქრომ P450-ის მრავლობითი ფორმების ინდუქცია სამი მოდელის მიხედვით ხდება [288]:

**I – ბენზპირენის მოდელი** – ასეთ ინდუქციას იწვევენ 3-მეთილქოლანტრენის ტიპის ინდუქტორები: რომლებშიც შედის თვით 3-მეთილქოლანტრენი, ბენზპირენი, ბენზანტრაცენი, 2,3,7,8-ტეტრაქლორდიბენზო-*p*-დიოქსინი, ტეტრაქლორბენზოლი, β-ნაფტოფლავონი და სხვ.;

**II – ფენობარბიტალის მოდელი** – ამ ჯგუფს მიეკუთვნება: თვითონ ფენობარბიტალი, ბარბიტალი, თიოპენტალი, ალდრინი, დიელდრინი, პოლიქლორირებული ბიფენილები, რეპტაქლორი და სხვ.;

**III – ქლოფებრატის მოდელი** – ამ ტიპის ინდუქტორებია: საფროლი, იზოსაფროლი, პრეგნენოლონი, 16α-კარბონიტრილი, აროქლორი, ჰექსაქლორბენზოლი და სხვ.

მიკროსომულ ფერმენტთა ინდუქტორებად ყველაზე ხშირად ფენობარბიტალი და სხვა ბარბიტურატები გამოიყენება. მათი ეფექტი ხასიათდება ენდოპლაზმური მემბრანების რაოდენობისა და ცილებში ამინომჟავების ჩართვის სიჩქარის ზრდით. ეს ეფექტი განსაკუთრებით მკვეთრად გლუვ მემბრანებშია გამოსახული [289-291]. ფენობარბიტალით ცხოველის წინასწარი დაუშავების შემდეგ მიღებულ მიკროსომულ ფრაქციაში ცილის შემცველობა თითქმის გასამაგებელია. ასეთი მიკროსომებისათვის დამახასიათებელია აგრეთვე მრავალი ქსენობიოტიკის, კერძოდ, ბენზფეტამინისა და ამინოპირინის N-დემეთილირების რეაქციათა გაძლიერება. გარდა ამისა, ადგილი აქვს ციტოქრომ P450-ის რაოდენობის მნიშვნელოვან მატებას და იგი ცხოველში ფენობარბიტალის შეყვანის სინშირეზე, ცხოველის სახეობაზე, სქესზე და სხვა დამატებით ფაქტორებზეა დამოკიდებული. დადგენილია ისიც, რომ სუბსტრატთა მეტაბოლიზმის სპეციფიკურობას მხოლოდ ციტოქრომ P450, და არა მონოოქსიგენაზური სისტემის სხვა რომელიმე კომპონენტი განსაზღვრავს [289].

მიკროსომული მონოოქსიგენაზური სისტემის მძლავრი სტიმულატორია 3-მეთილქოლანტრენი [290]. *in vivo* პირობებში გამოყენებისას ციტოლოგიური მახასიათებლების ცვლილებებით და ზოგიერთი ქსენობიოტიკის მეტაბოლიზმის სპეციფიკით ეს ინდუქტორი ფენობარბიტალისაგან არსებითად განსხვავდება. 3-



მეთილქოლანტრენით ინდუცირდება ჰემოპროტეინი, რომელსაც CO-აღდგენილ მდგომარეობაში შთანთქმის მაქსიმუმი სპექტრის მოკლეთალღიანი ოლქისაკენ (448 ნმ-ზე) ოდნავ წინ აქვს გადაწეული. თავდაპირველად ვარაუდობდნენ, რომ სპექტრის ასეთი ცვლილება ციტოქრომ P450-ისა და 3-მეთილქოლანტრენის ურთიერთქმედებას უნდა გამოეწვია. შემდგომში ეს ვარაუდი არ დასტურდა და ამ ინდივიდუალურმა ჰემოპროტეინმა ციტოქრომ P448-ის სახელწოდება მიიღო. 3-მეთილქოლანტრენით ინდუცირებული ციტოქრომ P448-ის მეტაბოლური აქტივობის ყველაზე დამახასიათებელ თვისებას ბენზპირენის ჰიდროქსილირების სიჩქარის მკვეთრი ზრდა წარმოადგენს. რაც შეეხება  $\beta$ -ნაფტოფლავონს [291], შეიძლება დაბეჯითებით ითქვას, რომ მოცემული ქსენობიოტიკი ინდუქციის ისეთივე ეფექტს იძლევა, როგორსაც 3-მეთილქოლანტრენი, ხოლო პოლიქლორირებული ბიფენილების წარმომადგენელი აროკლორ 1254-ის ინდუქციური ეფექტი ფენობარბიტალისა და 3-მეთილქოლანტრენის ერთდროული მოქმედებით აღძრული ეფექტის იდენტურია [292]. მეთილქოლანტრენული ტიპის ინდუქტორებია სხვა პოლიციკლური არომატული ნახშირწყალბადებიც. ანალოგიური უნარი აღმოაჩნდათ პოლიქლორირებულ ბიფენილებს და ზოგიერთ ქლორირებულ დიბენზოდიოქსინს [293]. გამოკვლევებმა აჩვენეს, რომ ამ ნივთიერებათა ინდუქციის ეფექტს მოლეკულაში ქლორის ატომის მდგომარეობა განსაზღვრავს. მეთილქოლანტრენული ტიპის ძლიერი ინდუქტორია 2,3,7,8-ტეტრაქლორდიბენზო-*p*-დიოქსინი. მეთილქოლანტრენული ეფექტის მისაღებად საკმარისია ამ ქსენობიოტიკის 4 რიგით (10 000-ჯერ) უფრო ნაკლები კონცენტრაცია.

იზოსაფროლით ინდუცირდება ინდივიდუალური ჰემოპროტეინი, რომელსაც ელექტროფორეზული ძვრადობით შუალედური მდგომარეობა უკავია ფენობარბიტალითა და მეთილქოლანტრენით ინდუცირებულ ჰემოპროტეინებს შორის. მას ციტოქრომ P450d ეწოდა [291]. ამ ჰემოპროტეინის განმასხვავებელ თვისებად ის ითვლება, რომ გამოიყოფა იზოსაფროლის მეტაბოლიზმის პროდუქტებთან კომპლექსში. იგი აკატალიზებს ციკლოპექსანის, ეთილბენზოლისა და *p*-ნიტროანიზოლის ჟანგვით გარდაქმნებს.

ზოგიერთი სინთეზური სტეროლი *in vivo* ზემოქმედებისას ასტიმულირებს მიკროსომულ რეაქციებს და ზრდის ციტოქრომ P450-ის რაოდენობას. პრევენოლონ-16 $\alpha$ -კარბონიტრილით ინდუქცია არ მიეკუთვნება არც ფენობარბიტალურ და არც მეთილქოლანტრენულ ტიპს. სპექტრულად განსაზღვრული ჰემოპროტეინი ფენობარბიტალით ინდუცირებულის იდენტური აღმოჩნდა, მაგრამ

მისგან განსხვავებულად ააქტიურებდა ბენზპირენის ჰიდროქსილირებისა და ეთილმორფინის N-დემეთილირების რეაქციებს [291].

მაშასადამე, სარწმუნოდ შეიძლება ითქვას, რომ მიკროსომებში ფერმენტულ აქტივობათა ინდუქციის საერთო სურათი, რომელიც მრავალი ქსენობიოტიკის ზემოქმედების შედეგია, უპირველეს ყოვლისა, ციტოქრომ P450-ის განსხვავებული ფორმების ბიოსინთეზზე დაიყვანება.

რეკონსტრუირებულ სისტემებში ამა თუ იმ ქსენობიოტიკის მეტაბოლიზმის შესწავლისას საკითხი არ დგას იმის შესახებ, თუ კონკრეტულად ციტოქრომ P450-ის რომელი ფორმა ახორციელებს მას, რადგან ეს პირობა წინასწარ თვით ექსპერიმენტატორის მიერაა დაზუსტებული. ორგანოს ან ორგანიზმის დონეზე მთლიანი მიკროსომების კვლევისას კი საკითხი გაცილებით რთულადაა, რადგან მეტაბოლურ რეაქციებში ციტოქრომ P450-ის რამდენიმე იზოფორმას შეუძლია ერთდროულად ჩართვა და მოცემული ქსენობიოტიკის ჟანგვით დეგრადაციაში თითოეული ამ ფორმის თანამონაწილეობის დონის დადგენას უალრესად დიდი მნიშვნელობა ენიჭება.

მოლეკულური მასების ზრდისა და შესაბამისად, SDS-ელექტროფორეზული ძვრადობის შემცირების მიხედვით ჰემოპროტეინის ყველა ცნობილ იზოფორმას (მათ აღნიშნავენ, როგორც LM) ასეთი სახით ალაგებენ [291]:

1. კონსტიტუციური ქვეფრაქცია – ციტოქრომ P450LM<sub>1</sub>;
2. ფენობარბიტალით ინდუცირებული ქვეფრაქცია – ციტოქრომ P450LM<sub>2</sub>;
3. კონსტიტუციური ქვეფრაქცია – ციტოქრომ P450LM<sub>3</sub>;
4. 3-მეთილქოლანტრენით ან β-ნაფტოფლავონით ინდუცირებული ქვეფრაქცია – ციტოქრომ P450LM<sub>4</sub>;
5. 2,3,7,8-ტეტრაქლორდიბენზო-p-დიოქსინით ინდუცირებული ქვეფრაქცია – ციტოქრომ P450LM<sub>6</sub>.

ჰემოპროტეინის ჩამოთვლილი იზოფორმები სპექტრული და სხვა მახასიათებლებით ძლიერ განსხვავდებიან ერთმანეთისაგან. მაგ., ციტოქრომ P450LM<sub>2</sub>-ისაგან P450LM<sub>4</sub> იმით განსხვავდება, რომ იგი არ იკავშირებს მიკროსომული ჟანგვის ისეთ ტიპიურ სუბსტრატებს, როგორებიც ბენზოლი, ციკლოჰექსანი ან ანტიპირინია [294]. ზოგიერთი ქსენობიოტიკი (ანილინი, ნაფტალინი, დიმეთილანილინი) ციტოქრომ P450LM<sub>4</sub>-ს ადვილად უკავშირდება, მაგრამ ამ იზოფორმით პრაქტიკულად არ იჟანგება. ამ ფაქტს ხსნიან ციტოქრომ P450LM<sub>4</sub>-ის კომპლექსთა ორი დაბალსპინური ფორმის არსებობით, რომლებითაც ლიგანდების (ქსენობიოტიკების) ინტენსიური დაკავშირება მიმდინარეობს, მაგრამ ჟანგ-

ვის პროცესის თვალსაზრისით ეს ლიგანდები სუბსტრატებს არ წარმოადგენენ. ანილინი, პირიდინი, იმიდაზოლი და, შესაძლოა, სხვა ორგანული აზოტშემცველი ფუძეები წარმოქმნიან დაბალსპინურ კომპლექსებს, რომლებთანაც უკვე შესაძლებელია მოლეკულური ჟანგბადის, ან ორგანული ჰიდროზეჟანგის დაკავშირება, რათა ჩამოთვლილი სუბსტრატების (ლიგანდების) ჟანგვა განხორციელდეს. ნაფტალინს და დიმეთილანილინს შეუძლიათ ციტოქრომ P450LM<sub>4</sub>-თან ურთიერთქმედება და მაღალსპინური კომპლექსის წარმოქმნა, რომელშიც ლიგანდები პორფირინული ბირთვის სიბრტყის გასწვრივაა განლაგებული. მიუხედავად ამისა, მათი ჟანგვა არ ხდება, რადგან I-ტიპის სუბსტრატთა დამაკავშირებელი უბნები ინდუქტორით ან მისი მეტაბოლიტებითაა დაკავებული. ციტოქრომების – P450LM<sub>2</sub>-ისა და P450LM<sub>4</sub>-ის კონფორმაციული განსხვავებები წრიული დიქროიზმის მეთოდითაა დადგენილი. აღმოჩნდა, რომ P450LM<sub>4</sub>-ის ფორმის ჰემი უფრო მჭიდრო ჰიდროფობული „ჯიბითაა“ გარემოცული. ჰემოპროტეინით აღნიშნულ ფორმათა სტრუქტურული განსხვავებები შესაბამისად დიდ სხვაობებს იწვევენ მათ სუბსტრატულ სპეციფიკურობაში, კატალიზურ აქტივობასა და იმუნოქიმიურ თვისებებში.

ინდუქციის დროს ციტოქრომ P450-ის ფორმირება წარიმართება ცილის სინთეზისა და მისი “მომწიფების”, ჰემის წარმოქმნისა და აპოფერმენტთან მისი დაკავშირების გზით [295]. დადგენილია, რომ ქსენობიოტიკ-ინდუქტორის მოქმედებით რეპრესორული ცილა გენის რეპრესორულ უბანში გადაინაცვლებს, რაც ცილის სინთეზს ინიცირებს. ციტოქრომ P450-ის აპოფერმენტის სინთეზის ეს მომენტი ყველა ორგანიზმისათვის საერთოა, თუმცა მექანიზმის ცალკეულ დეტალებს შორის მნიშვნელოვანი განსხვავებებია [296]. რაც შეეხება ჰემის სინთეზს, ცხოველების, საფუერებისა და ბაქტერიებისაგან განსხვავებით, უმაღლეს მცენარეებში ეს პროცესი მხოლოდ გლუტამატ-დამოკიდებული გზით მიმდინარეობს და არა 5-ალანინ-სინთაზას საშუალებით [297].

## 1.5 მიკროსომული ფოსფოლიპიდი — მაჰიდროქსილირებული კომპლექსის აუცილებელი კომპონენტი

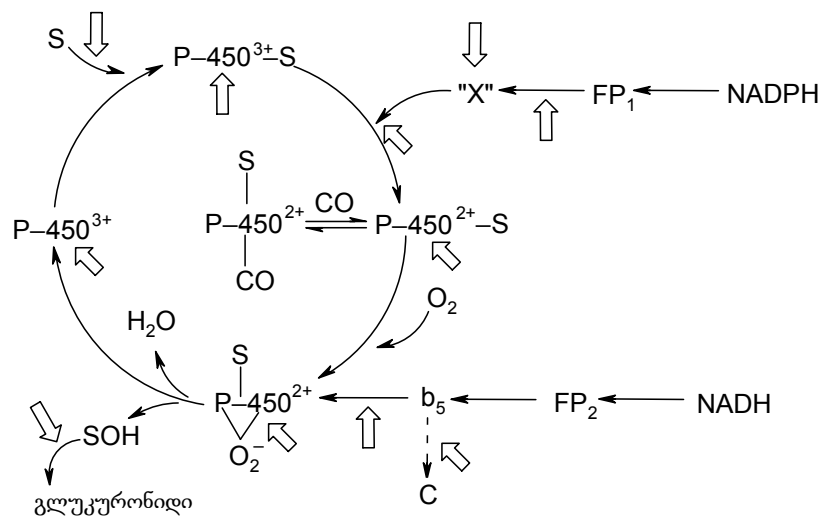
რთულ მემბრანადაკავშირებულ ფერმენტულ სისტემათა სპეციფიკური მოქმედების რეგულაციაში უაღრესად დიდი როლი ენიჭება ბიოლოგიური მემბრანების ფოსფოლიპიდურ კომპონენტებს. კარგა ხანია, რაც ჩვენი წარმოდგენები გასცდა იმ არსებულ სქემებს, რომელთა მიხედვითაც ბიომემბრანათა საერთო კონსტრუქციაში ამ კლასის ნაერთებს მხოლოდ სტრუქტურულ (“შტატივის” ან “მისამაგრებელი ბლოკის”) ადგილს უთმობდნენ [298]. ამჟამად ჩვენთვის ცნობილია, რომ მათ სხვა, გაცილებით მრავალმხრივი დატვირთვა გააჩნიათ; კერძოდ, დადგენილია, რომ ფოსფოლიპიდის საერთო ფონდის გარკვეულ ფრაქციას კოფაქტორული ფუნქციაც შეიძლება გააჩნდეს. ამ ნივთიერებათა ამფიფატური ბუნება ამის მტკიცების გარკვეულ საფუძველს გვაძლევს. მოგვყავს ის არასრული ჩამონათვალი (თუ არ ჩავთვლით კიდევ ისეთ ფუნქციებს, რომლებიც მკვლევართა ყურადღების მიღმა დარჩა), რომელთა ერთიანობა ფოსფოლიპიდთა მონაწილეობით აღძრული მრავალი ეფექტის ახსნის საშუალებას იძლევა:

- ცილების აქტიური კონფორმაციის შექმნა და სტაბილიზაცია;
- ფერმენტულ კომპლექსებში ცალკეულ კომპონენტთა აგრეგაცია;
- მემბრანათა ყველა დამახასიათებელი თვისებების (სელექტიური განვლადობის, კოოპერატიული ეფექტებისა და ა.შ.) მქონე ჩაკეტილი უწყვეტი სტრუქტურის წარმოქმნის უნარი;
- მემბრანაში მიმდინარე რეაქციებისათვის ოპტიმალური ჰიდროფობული გარემოს შექმნა;
- ცხიმში ხსნადი ნივთიერებების ტრანსპორტი [299] და სხვ.

ენდოპლაზმური რეტიკულუმის “არაშემავლლებელ” (ენერჯის არაგენერირებად) მემბრანებს რაც შეეხებათ, ცნობილია, რომ ისინი ფოსფოლიპიდური მასალის სიმდიდრით, მათი მაღალი დენადობით, მემბრანის სიგრძივი დაგეგმარების მხრივ ჰეტეროგენული განაწილებით, ხოლო განივი დაგეგმარებით ასიმეტრიულობით ხასიათდებიან. ამასთან ერთად, თვალსაჩინოდაა გამოკვეთილი მიკროსომულ ფოსფოლიპიდებსა და მონოოქსიგენაზებს შორის ცილა-ლიპიდური ურთიერთქმედების განმსაზღვრელი როლი. განსაკუთრებით ხაზგასასმელია ის გარემოება, რომ არსებობს სარწმუნო მტკიცებულებები მონოოქსიგენაზური რეაქციების კინეტიკის თავისებურებათა შესაბამისობაზე, რომელიც

დამახასიათებელია მხოლოდ ბიფაზური სისტემისათვის – ლიპიდი-წყალი [300].

ჰიდროქსილირების რთული პროცესის პრაქტიკულად ყველა სტადიაზე ფოსფოლიპიდების მოქმედების პუნქტები საფუძვლიანადაა გაანალიზებული ლიახოვიჩისა და ცირლოვის მონოგრაფიასა [301] და მიმოხილვით სტატიაში [302]. ზოგადი სურათი ასე გამოიყურება (ნახ. 1.8) [301]:



ნახ. 1.8. მემბრანული ფოსფოლიპიდების მონაწილეობა მონოქსიგენაზური სისტემის ფუნქციონირებაში. ისრებით ნაჩვენებია ფოსფოლიპიდ-დამოკიდებული მონოქსიგენაზის კომპონენტები და რეაქციები [301].

- ფოსფოლიპიდები მემბრანასთან დაკავშირებული მონოქსიგენაზებისა და მათი ფრაგმენტებისათვის ჰიდროფობულ გარემოცვას ქმნიან;
- ფოსფოლიპიდები ხელს უწყობენ ჰიდროფობული სუბსტრატების ციტოქრომ P450-თან დაკავშირებას;
- ფოსფოლიპიდები ოპტიმალურ პირობებს ქმნიან ციტოქრომ P450-ისა და NADPH-ციტოქრომ P450-რედუქტაზას ურთიერთქმედებისათვის;
- ფოსფოლიპიდები გავლენას ახდენენ მიკროსომულ რედოქს-ჯაჭვში ელექტრონთა ტრანსპორტზე.

სადღეისოდ არ გაგვაჩნია სარწმუნო მონაცემები ფოსფოლიპიდების მონაწილეობის შესახებ ჰიდროქსილირების პროცესის ისეთ ყველაზე იდუმალებით მოცულ სტადიაში, როგორც სუბსტრატში გააქტივებული ფანგბადის ჩანერგვა.

არსებული მონაცემების საფუძველზე დაბეჯითებით შეიძლება ითქვას, რომ ფოსფოლიპიდების ერთ-ერთი უძირითადესი ფუნქცია ციტოქრომ P450-ის სტაბილიზაციაა. ევოლუციური განვითარების განსაზღვრულ საფეხურზე მემბრანაში ჩაშენების პროცესმა ფერმენტს სუბსტრატის გარეშე აქტიური კონფორმაციის შენარჩუნების უნარი შესძინა. ამასთან დაკავშირებით მაშინვე იბადება ბუნებრივი კითხვა მოლეკულური ორგანიზაციის იმ თავისებურებათა შესახებ, რომლებიც მემბრანულ და წყალში ხსნად ციტოქრომ P450-შემცველ მონოქსიგენაზურ სისტემებს ახასიათებთ: მოლეკულურ-ორგანიზაციული თვალსაზრისით ჰემოპროტეინის მემბრანაში ჩაშენებამ გამოიწვია თუ არა მონოქსიგენაზას რაიმე ახალი ფორმის ჩამოყალიბება? პრინციპში, შესაძლებელია ფერმენტულ სისტემათა ორი ტიპის ორგანიზაცია. პირველის თანახმად, მემბრანაში არსებობს განსაზღვრული სტეკიომეტრიის მქონე მტკიცე მრავალკომპონენტური კომპლექსები და ელექტრონთა გადატანა მხოლოდ ასეთი “კლასტერების” შიგნით შეიძლება ხდებოდეს. მეორე ტიპი ითვალისწინებს მემბრანაში ყველა გადამტანის უწყვეტ განაწილებას, რომლებიც თავისი ძვრადობის გამო მის სიბრტყეში ადვილად დიფუნდირებენ. შემთხვევითი დაჯახებებისას შეინიშნება ელექტრონთა გადატანა. ამ დროს ბუნებრივია მუხტის გადამტანი შესაბამისი ბინარული კომპლექსების წარმოქმნა. მათი სიცოცხლის ხანგრძლივობა თუ უფრო მცირეა მორეაგირე მოლეკულების ბირთვებს შორის ელექტრული მუხტის გადატანის დროსთან შედარებით, მაშინ ასეთი რეაქციები დიფუზიურ-მალიმიტირებადი იქნებიან. წინააღმდეგ შემთხვევაში რეაქცია დიფუზიაზე დამოკიდებული აღარ იქნება [52].

ურთიერთმოქმედ მოლეკულათა საერთო რაოდენობასთან შედარებით, კომპლექსების რიცხვი მათი წარმოქმნის კონსტანტის სიდიდეზეა დამოკიდებული. იმის გამო, რომ ენდოპლაზმური რეტისკულუმის მემბრანა თხევადკრისტალურ სტრუქტურას წარმოადგენს და მასში ცილის მოლეკულებს ლატერალური ძვრადობის უნარი აქვთ [303], კონსტანტა, რომელიც გადამტანთა ერთმანეთის მიმართ სწრაფვას ახასიათებს, მემბრანაში ფერმენტული სისტემის მოლეკულურ-ორგანიზაციას უნდა ახასიათებდეს. სამწუხაროდ, მიკროსოპულ მემბრანაში ელექტრონთა გადამტანებისათვის ამ სიდიდის რაოდენობრივი შეფასება

ჯერაც არ განხორციელებულა და ამიტომ ოქსიგენაზური სისტემის მოლეკულური ორგანიზაციის პრობლემა კვლავ გადაუწყვეტელი რჩება.

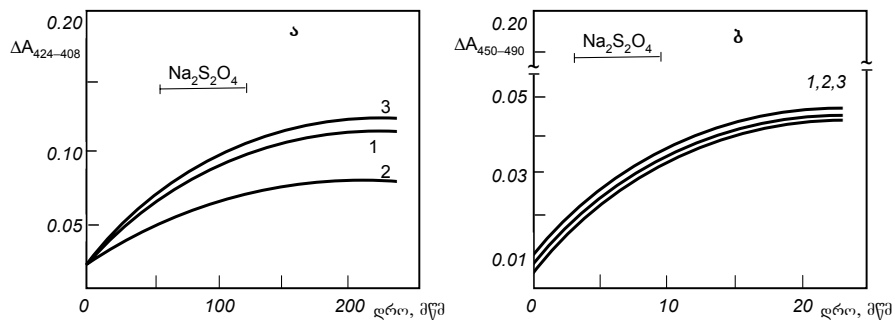
მიკროსომების მემბრანაში მონოოქსიგენაზური სისტემის წყობის შესახებ სხვადასხვაგვარი ვარაუდები არსებობენ; ასე მაგ., ორი გადამტანისათვის, კერძოდ NADPH-სპეციფიკური ფლავოპროტეინისა და ციტოქრომ P450-ისათვის მიღებულია, რომ ისინი მემბრანაში თავისუფლად დიფუნდირებენ და მტკიცე ხანგრძლივ სიცოცხლისუნარიან კომპლექსებს არ წარმოქმნიან [88, 90, 304, 305]. ოქსიგენაზური სისტემის ორი სხვა კომპონენტისათვის მონაცემები იმდენად წინააღმდეგობრივია, რომ საბოლოო დასკვნების გაკეთების საშუალებას არ იძლევიან. გამოკვლევათა უმეტესობა არის იმის შესახებ, რომ უნდა არსებობდეს NADPH-სპეციფიკური ფლავოპროტეინისა და ციტოქრომ P450-ის რამოდენიმე მოლეკულისგან წარმოქმნილი მტკიცე ფერმენტული კლასტერი [301, 306-308]. რეკონსტრუირებულ პროტეოლიპოსომებზე ჩატარებული ცდები კი გადამტანთა თავისუფლად დიფუნდირების სასარგებლოდ მეტყველებენ [309-312]. ნაჩვენებია, რომ ასეთ სისტემაში ელექტრონთა გადატანის სიჩქარე NADPH-სპეციფიკური ფლავოპროტეინისა და ციტოქრომ P450-ის ბინარული კომპლექსის კონცენტრაციითაა განპირობებული [313].

განხილულ წარმოდგენათა სისწორის შესამოწმებლად შესწავლილ იქნა მიკროსომულ ოქსიგენაზურ სისტემაში ელექტრონთა გადატანის სიჩქარის დამოკიდებულება ლიპიდური ბიშრის მიკროსიბლანტეზე [314]. გამომდინარე იმ მოსაზრებიდან, რომ მემბრანაში ქოლესტეროლის ჩაშენება-მოცილებით ფოსფოლიპიდური მემბრანის მიკროსიბლანტე შეიცვლებოდა, შესაძლებელი გახდებოდა გამოვლენილიყო ელექტრონთა გადატანის დიფუზიაზე დამოკიდებული რეაქციები და აგრეთვე ის გადამტანები, რომლებიც მემბრანაში ფუნქციონირებენ, როგორც თავისუფლად დიფუნდირებადი ცილები.

შეჩერებული ნაკადის მეთოდით გამოკვლეულ იქნა ციტოქრომების –  $\text{b}_5$ -ისა და P450-ის NAD(P)H-დამოკიდებული აღდგენა. ნახაზზე 1.9 მოყვანილი მონაცემები გვიჩვენებენ მემბრანის მიკროსიბლანტის ცვლილებების გავლენას ციტოქრომ  $\text{b}_5$ -ის NADH-დამოკიდებული აღდგენის სიჩქარეზე.

გამოვლენილია უკუდამოკიდებულება ლიპიდური ბიშრის მიკროსიბლანტესა და NADH-ციტოქრომ  $\text{b}_5$ -რედუქტაზული რეაქციის სიჩქარის კონსტანტას შორის. ქოლესტეროლის ჩაშენების დიფუზიის კოეფიციენტის შემცირებას  $2.4 \cdot 10^{-8}$ -დან  $1.5 \cdot 10^{-8}$   $\text{cm}^2 \cdot \text{წმ}^{-1}$ -მდე (ანუ 1.6-ჯერ) თან სდევს ამ რეაქციის სიჩქარის კონსტანტას შემცირება  $3 \cdot 10^3$ -დან  $5 \cdot 10^3$   $\text{მოლი}^{-1} \cdot \text{წმ}^{-1}$ -მდე (მრუდი 2). ქოლესტე-

როლის მოცილებისას მემბრანის მიკროსიბლანტის დაქვეითებას თან ახლავს დიფუზიის  $3.3 \cdot 10^{-3} \text{ სმ}^2 \cdot \text{წმ}^{-1}$ -მდე (ანუ 1.4-ჯერ) და, შესაბამისად, რეაქციის სიჩქარის კონსტანტას გაზრდა  $15 \cdot 10^3 \text{ მოლი}^{-1} \cdot \text{წმ}^{-1}$ -მდე (მრუდი 3). ამ რეაქციისაგან განსხვავებით, NADH-ციტოქრომ P450-რედუქტაზას აქტივობა მემბრანის მიკროსიბლანტზე დამოკიდებული არ აღმოჩნდა. ამგვარად, NADPH-ციტოქრომ P450-რედუქტაზული რეაქცია დამოკიდებულია დიფუზიაზე, ხოლო NADH-ციტოქრომ P450-რედუქტაზული კი – არა. ეს შედეგი შეიძლება განხილულ იქნას, როგორც პირდაპირი ექსპერიმენტული დადასტურება ჟანგვის ჯაჭვის ორი საწყისი კომპონენტის – NADH : ფლავოპროტეინისა და ციტოქრომ  $b_5$ -ის ლატერალური ძვრადობის შესახებ. ეს მონაცემები სარწმუნოდ გვიჩვენებენ მემბრანაში ამ გადამტანთა უწყვეტი განაწილებს. NADH-ციტოქრომ P450-რედუქტაზული რეაქციის სიჩქარეზე ბიშრის მიკროსიბლანტის არაეფექტურობა იმაზე მეტყველებს, რომ ეს რეაქცია არაა დიფუზიაზე დამოკიდებული. ამ რეაქციის შედარებით დაბალი სიჩქარე (სიჩქარეთა კონსტანტებს შორის სხვაობა 3 რიგით უფრო მაღალია), გვაფიქრებინებს, რომ ამ შემთხვევაში ლიპიდურ ბიბრებად სტადიას ციტოქრომ  $b_5$ -ის ჰემური რკინიდან ციტოქრომ P450-ის ჰემურ რკინაზე ელექტრონების გადატანა უნდა წარმოადგენდეს.

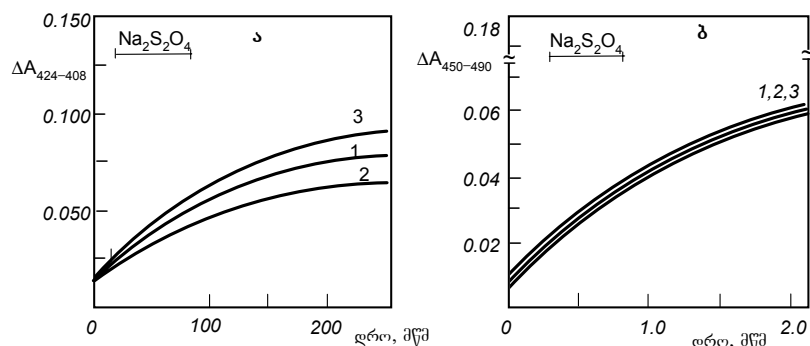


ნახ. 1.9. ციტოქრომების –  $b_5$ -ისა (ა) და P450-ის (ბ) NADH-დამოკიდებული აღდგენა ვირთხის ღვიძლის მიკროსომებში ლიპიდური ბიშრის განსხვავებული მიკროსიბლანტისას.

1. საკონტროლო მიკროსომები;
2. მიკროსომები ჩაშენებული ქოლესტეროლით;
3. მიკროსომები მოცილებული ქოლესტეროლით [315].



სუბსტრატად NADPH-ის გამოყენებისას ლიპიდის მიკროსიბლანტეზე აღნიშნულ ჰემოპროტეინთა აღდგენის სიჩქარის დამოკიდებულების შესწავლამ ზუსტად ისეთივე კანონზომიერება გამოავლინა, როგორსაც NADH-ის შემთხვევაში ჰქონდა ადგილი (ნახ. 1.10) [315]. NADPH-ციტოქრომ  $b_5$ -რედუქტაზული რეაქციის სიჩქარე დამოკიდებული აღმოჩნდა მიკროსიბლანტეზე, ხოლო NADPH-ციტოქრომ P450-რედუქტაზული – არა. ამ რეაქციების სიჩქარეთა კონსტანტები არაუმეტეს ერთი რიგით განსხვავდებიან ერთმანეთისაგან.



ნახ. 1.10. ციტოქრომების –  $b_5$ -ისა (ა) და P450-ის (ბ) NADPH-დამოკიდებული აღდგენა ვირთხის ღვიძლის მიკროსომებში ლიპიდური ბიშრის განსხვავებული მიკროსიბლანტისას.

1. საკონტროლო მიკროსომები;
2. მიკროსომები ჩაშენებული ქოლესტეროლით;
3. მიკროსომები მოცილებული ქოლესტეროლით [315].

ამგვარად, NADPH-სპეციფიკური ფლავოპროტეინისაგან, ციტოქრომების  $b_5$ -ისა და P450-ისაგან უფრო მოსალოდნელია მტკიცე ხანგრძლივსიცოცხლიანი კომპლექსების წარმოქმნა, ვიდრე ამ ფლავოპროტეინისა და ციტოქრომ  $b_5$ -ისაგან.

ფოსფოლიპიდების ფიზიკურმა მდგომარეობამ შეიძლება ძლიერ იმოქმედოს არამხოლოდ ჟანგვის სიჩქარეზე, არამედ მთლიანი პროცესის მალიმიტირებელი სტადიის შეცვლაც კი გამოიწვიოს. ამ შემთხვევაში მნიშვნელოვანია ტემპერატურული ფაქტორი.

სრულ მიკროსომულ სისტემაში, რომელიც ყველა კომპონენტს, აგრეთვე

NADPH-ს და  $O_2$ -ს შეიცავს, მრავალი სუბსტრატის ჟანგვის სიჩქარის კონსტანტას ტემპერატურაზე დამოკიდებულებამ აჩვენა, რომ ჟანგვის აქტივაციის ენერგია მკვეთრად იცვლება  $18-25^{\circ}C$  ტემპერატურისას [316-319]. ამ ტემპერატურის ზევით მთელი რიგი სუბსტრატების ჟანგვა ხასიათდება აქტივაციის ენერგიით, რომელიც  $33-50$  კჯ/მოლი<sup>-1</sup>-ის საზღვრებში იმყოფება, მაშინ როდესაც მრავალი სუბსტრატის აქტივაციის ენერგია  $18-25^{\circ}C$ -ის ქვევით  $80-104$  კჯ/მოლი<sup>-1</sup>-მდე იზრდება. ამ ტემპერატურაზე არენიუსის გრაფიკებზე ჩნდება მოხრილობა, და იგი დაკავშირებული არაა ციტოქრომ P450-ის ან რედუქტაზის მდგომარეობის ცვლილებებზე; ხსნარში ან ლიპოსომებში ინდივიდუალური ციტოქრომ P450-ის მონაწილეობით ჰიდროზეფანგური ჟანგვის რეაქციის ტემპერატურული სხვაობა აქტივაციის ენერგიის მხოლოდ ერთი სიდიდით ხასიათდება [317, 319]. რედუქტაზას ჟანგვის აქტივაციის ენერგია  $50-59$  კჯ/მოლი<sup>-1</sup>-ის ტოლია და ფართო ტემპერატურულ ინტერვალში რაიმე მნიშვნელოვან ცვლილებებს არ განიცდის. არენიუსის დამოკიდებულებებზე არსებული მოხრილობა მთლიანადაა დაკავშირებული მიკროსომული ფოსფოლიპიდების ფაზურ გადასვლებთან, რაც ზეგავლენას ახდენს რედუქტაზისა და ციტოქრომ P450-ის ურთიერთქმედებაზე. ფოსფოლიპიდების ფაზური გადასვლის წერტილზე დაბალი ტემპერატურისას ( $18-25^{\circ}C$ -ზე), რედუქტაზისა და ციტოქრომ P450-ის ხისტად ორგანიზებულ კომპლექსში ჰემოპროტეინის აღდგენა შეიძლება ჟანგვის მთლიანი პროცესის სიჩქარის მალიმიტირებელი სტადიაც კი აღმოჩნდეს; ფაზური გადასვლის წერტილის ზევით ციტოქრომ P450-ის აღდგენის პროცესი ადვილდება მისი და რედუქტაზის გაზრდილი ძვრადობის გამო. ასეთი სურათი შეინიშნება არა მხოლოდ ღვიძლის მიკროსომული ჟანგვისას, არამედ კურდღლის ფილტვების მიკროსომებში ნაფტალინის ჟანგვის შემთხვევაშიც [320]. მაშასადამე, მიკროსომულ პროცესებზე მემბრანული ფოსფოლიპიდების ზემოქმედება “ფიზიკურ” ხასიათს ატარებს. იგი დაკავშირებულია მათ თხევადკრისტალურიდან თხევად მდგომარეობაში გადასვლასთან, როდესაც იზრდება მაჰიდროქსილირებელი კომპლექსის კომპონენტთა ლატერალური დიფუზია.

მიკროსომულ ჟანგვაზე ფოსფოლიპიდების გავლენის მოლეკულური მექანიზმების შესწავლა გაცილებით მოსახერხებელია რეკონსტრუირებულ სისტემაზე, სადაც შეიძლება იცვლებოდნენ ვეზიკულების, მიცელების და ლიპოსომების წარმომქმნელი ფოსფოლიპიდების კონცენტრაციები და ქიმიური ბუნება [321-326]. როგორც წესი ლიპოსომებში ან რეკონსტრუქციისას ფოსფოლიპი-

დების შემცველ სისტემაში ციტოქრომ P450-ის ჩართვა, ამ უკანასკნელის კატალიზური აქტივობის გაზრდას იწვევს, რაც არსებითად ფოსფოლიპიდური ვეზიკულის ბუნებაზეა დამოკიდებული. ნაჩვენებია მაგ., რომ ციტოქრომი P450LM<sub>2</sub> განსაკუთრებით აქტიურია ჯამური მიკროსომული ფოსფოლიპიდების, ან არამემბრანული დილაუროილფოსფატიდილქოლინის თანამყოფობისას [327]. რეკონსტრუირებულ სისტემებში დიდ როლს ასრულებს ფოსფოლიპიდის მუხტი. უარყოფითად დამუხტული ფოსფოლიპიდების აქტივობა თანაბარ პირობებში ნეიტრალურ ფოსფოლიპიდებთან შედარებით გაცილებით მეტია. *p*-ნიტროანიზოლის O-დემეთილირების რეაქციაში ციტოქრომ P450LM<sub>2</sub>-ის აქტივობა უარყოფითად დამუხტული ფოსფოლიპიდური ვეზიკულების ელექტროფორული ძვრადობის პირდაპირპროპორციულია [327].

გელ-ფილტრაციის მეთოდისა და <sup>14</sup>C-დილაუროილგლიცერო-3-ფოსფორილქოლინის გამოყენებით ნაჩვენებია, რომ ციტოქრომ P450LM<sub>2</sub>-ის სუბერთეული ფოსფოლიპიდის 22 მოლეკულას იკავშირებს, და ასეთი კომპლექსის დისოციაციის კონსტანტა  $7 \cdot 10^{-6}$  მოლის ტოლია. ამ პირობებში მიცელების წარმოქმნის კრიტიკული კონსტანტა  $4.5 \cdot 10^{-5}$  მოლს უდრის [328]. რეკონსტრუირებულ სისტემებში ფოსფოლიპიდები დიდი სიჭარბითაა და ამდენად ყოველთვის დაცულია მიცელების წარმოქმნის პირობები. ამ შემთხვევაში ფოსფოლიპიდების ზეგავლენა ორ – მოლეკულურ და ზემოლეკულურ დონეზე ხორციელდება: მოლეკულურ დონეს განსაზღვრავს ჰემოპროტეინის ერთი მოლეკულის მიერ 22 მოლეკულა ფოსფოლიპიდის მიერთება; ზემოლეკულური დონე მიცელარული კატალიზის ეფექტებით მულავენდება – ფოსფოლიპიდური ვეზიკულები აადვილებენ ციტოქრომ P450-ის რედუქტაზასთან და აგრეთვე ჰემოპროტეინის სუბსტრატთან დაკავშირებას. ეს ვითარება ნაწილობრივ მიგვითითებს რეკონსტრუირებულ სისტემებში ფოსფოლიპიდების არსებობის აუცილებლობას მასში ჩაშენებული ციტოქრომ P450-ის მაღალი კატალიზური აქტივობის გამოსამჟღავნებლად. ხსნარებთან შედარებით მიცელარულ სისტემებს სხვა უპირატესობებიც გააჩნიათ: ფოსფოლიპიდური მიცელები აჩქარებენ რედუქტაზით ციტოქრომ P450-ის აღდგენას; მიცელაში კატალაზის ფაქტორი ხშირად გადამწყვეტია, მაგრამ არც ამ ფაქტორებით ამოიწურება ფოსფოლიპიდების როლი, რადგან ისინი ძლიერ და მრავალმხრივ ზეგავლენას ახდენენ თვით ჰემოპროტეინზე, როდესაც სისტემაში შესაბამისი რედუქტაზა არ იმყოფება.

ინგელმან-სანდბერგის [329] მიერ შესწავლილია ფოსფოლიპიდების გავლენა ინდივიდუალურ ციტოქრომ P450-ის რეაქციებზე. ნატრიუმის

პერიოდატის თანამყოფობისას ანდროსტედიონის 6β-ჰიდროქსილირების სიჩქარე 2.5-ჯერ იზრდებოდა ფოსფოლიპიდ-ციტოქრომის თანაფარდობისას 10 :1. ამ მკვლევარმა გამოთქვა ვარაუდი იმის შესახებ, რომ გამოყენებული ფოსფატიდილიქოლინი, ფოსფატიდილეთანოლამინი და ფოსფატიდილსერინი მნიშვნელოვნად უნდა განსაზღვრავდნენ ციტოქრომ P450-ის აქტიურ კონფორმაციას.

აღნიშნული მონაცემების საფუძველზე შემდგომში მეტელიცასა და მისი თანაავტ. [329-330] მიერ გამოკვლეულ იქნა სხვადასხვა ფოსფოლიპიდის გავლენა ციტოქრომ P450LM<sub>2</sub>-ის მონაწილეობით კუმოლის ჰიდროზეჟანგით სუბსტრატთა ჟანგვაზე. ფოსფოლიპიდის ციტოქრომ P450LM<sub>2</sub>-თან 30 და მეტი მოლური თანაფარდობისას ფოსფატიდილსერინი, ფოსფატიდილინოზიტი და ლიზოფოსფატიდილიქოლინი ნაფტალინისა და ანილინის ჟანგვის სიჩქარეს 3-4-ჯერ ზრდიდნენ მაშინ, როდესაც ფოსფატიდილიქოლინი და სფინგომიელინი იმავე კონცენტრაციებით აღნიშნული სუბსტრატების ჟანგვის სიჩქარეზე არ მოქმედებდნენ. რაც შეეხება მიკროსომებიდან მიღებულ ცხიმოვან მჟავებს, ისინი ამ რეაქციების ინჰიბირებასაც კი ახდენდნენ. მაშასადამე, ანილინის, ნაფტალინისა და დიმეთილანილინის ჰიდროზეჟანგურ ჟანგვაში ციტოქრომ P450LM<sub>2</sub>-ის ინდივიდუალურ რეაქციაზე გამაქტიურებელ მოქმედებას ავლენენ მჟავა, და არა ნეიტრალური ფოსფოლიპიდები. აღნიშნულიდან გამომდინარეობს საგულისხმო დასკვნა: ციტოქრომ P450-ის აქტივაციაში მნიშვნელოვან როლს ასრულებს ფოსფოლიპიდის მუხტი. ამასთან დაკავშირებით ჩატარებულია საინტერესო გამოკვლევები, რომლებიც ციტოქრომ P450-ის სპინურ ფორმათა წონასწორობაზე ფოსფოლიპიდების პირდაპირ გავლენას ეხება [331-334]. ნაჩვენებია, რომ ნეიტრალური ფოსფოლიპიდები ზრდიან ციტოქრომ P450-ის მაღალსპინური ფორმის შემცველობას, რაც სპექტრებში შთანთქმის მაქსიმუმით 382-390 ნმ-ებზე და მინიმუმით 417-418 ნმ-ებზე დასტურდება. რაც შეეხება მჟავა ფოსფოლიპიდებს, ისინი იწვევენ სპექტრულ ცვლილებებს მაქსიმუმით 435-440 და მინიმუმით 416-419 ნმ-ებზე [35]; ე.ი. ლიპიდი გავლენას ახდენს მხოლოდ ჰემოპროტეინის სპინურ მდგომარეობაზე.

ჩვენს ლაბორატორიაში [335] მცენარეულ (სოიასა და სიმინდის ლეზნების) თხელ ანათლებზე ნაჩვენებია ტრიტონ X-100-ის დამორგუნველი (65-85%-ით) მოქმედება ამინობირინის, დიმეთილანილინის N-დემეთილირებაზე და ანილინის p-ჰიდროქსილირებაზე; N-დემეთილაზური აქტივობის სრული და p-ჰიდროქსილაზური აქტივობის 60%-ით აღდგენა ფოსფატიდილიქოლინის (“ნედლი” ლეციტინის სახით) დამატებით მოხერხდა. საყურადღებოა ერთი ფაქტი:

ფოსფოლიპიდის მასტიმულირებელი ეფექტი აბსოლუტურად ერთნაირია საინკუბაციო ხსნარში დეტერგენტთან ერთად მისი შეტანისას (ინჰიბირება აღარ შეინიშნება) და დეტერგენტული ინჰიბირების მიღების შემდეგაც. აქედან გამომდინარე, ფოსფატიდილქოლინის მოქმედებას ორნაირი ახსნა მივეციტ: 1). დეტერგენტთან ერთად თანამყოფობისას ეს ფოსფოლიპიდი მჟანგველი ფერმენტული სისტემის ირგვლივ ლიპიდ-დამოკიდებულ ჰიდროფობულ გარემოცვას ქმნის და ჰემოპროტეინის აქტიურ ცენტრს დეტერგენტისადმი შეუვალს ხდის; 2). ინჰიბირების შემდეგ ფოსფოლიპიდი, როგორც ჩანს, ფერმენტის აქტიური ჰიდროფობული უბნიდან აძევებს დეტერგენტს და მის ირგვლივ კვლავ ჰიდროფობულ გარემოცვას ალადგენს.

ამგვარად, მიკროსომების ლიპიდური კომპონენტის ფუნქციას, უპირველეს ყოვლისა, ციტოქრომ P450-ის კონფორმაციულ რელაქსაციაზე ზეგავლენა წარმოადგენს. გარდა ამისა, ლიპიდები ზრდიან ფერმენტ-სუბსტრატის კომპლექსის მდგრადობას; ხელს უწყობენ ამ ჰემოპროტეინისა და მისი რედუქტაზის კომპლექსირებას და ასტაბილიზებენ მას; კეთილსასურველ გარემოს ქმნიან ჟანგვის პროცესებისათვის და ჰიდროფობულ ზონაში სუბსტრატთა კონცენტრირებას ახორციელებენ; უზრუნველყოფენ მონოოქსიგენაზური სისტემის კომპონენტთა ოპტიმალურ ლატერალურ ძვრადობას და ა.შ. ზოგადად რომ ითქვას, ციტოქრომ P450-ზე და მთლიან მონოოქსიგენაზურ სისტემაზე ფოსფოლიპიდების გავლენა უადრესად მრავალწახნაგაა და როგორც მოლეკულურ, ასევე ზემოლექულურ დონეზე ხორციელდება [336].

## ლიტერატურა

1. Brodie, B.B., Axelrod, J., Cooper, J.R., Gaudette, L., La Du, B.N., Mitoma, C., Undenfriend, S. Detoxication of drugs – and other foreign compounds by liver microsomes. *Science*, 1955, 121, 603-604
2. Axelrod, J. The enzymatic N-demethylation of narcotic drugs. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1956, 117, 322-330
3. Mason, H.S., Fowlks, W.L., Peterson, E. Oxygen transfer and electron transport by the phenolase complex. *J. Am. Chem. Soc.*, 1955, 77, 2914-2915
4. Garfinkel, D. Studies on pig liver microsomes. 1. Enzymic and pigment composition of different microsomes frations. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1958, 77, 493-509
5. Klingenberg, M. Pigments of rat liver microsomes. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1958, 75, 376-386
6. Omura, T., Sato, R. The carbon monoxid-binding pigment of liver microsomes. I. Evidence for its hemoprotein nature. *J. Biol. Chem.*, 1964, 239, 2370-2378
7. Omura, T., Sato, R. The carbon monoxid-binding pigment of liver microsomes. II. Solubilization, purification and properties. *J. Biol. Chem.*, 1964, 239, 2379-2385
8. Estabrook, R.W., Cooper, D.Y., Rosenthal, O. The light reversible carbon monoxide inhibition of the steroid C-21 hydroxylase system of the adrenal cortex. *Biochem. J.*, 1963, 338, 741-755
9. Cooper, D.Y., Levin, S., Navasimhulu S., Rosenthal, O., Estabrook, R.W. Photochemical action spectrum of the terminal oxidase of mixed function oxidase systems. *Science*, 1965, 147, 400-402
10. Katagivi, M., Ganduli, B.N., Gunsalus, I.C. A soluble cytochrome P450 functional in methylene hydroxylation. *J. Biol. Chem.*, 1968, 243, 3543-3546
11. Palade, G.E., Siekevitz, P. Pancreatic microsomes; an integrated morphological and biochemical study. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 1956, 25, 671-690
12. James, W.O., Beevers, H. The respiration of *Arum spadix*. A rapid respiration, resistant to cyanide. *New Phytologist*, 1950, 49, 283-429
13. James, W.O., Elliott, D.C. Cyanide-resistant mitochondria from the spadix of an *arum*. *Nature*, 1955, 175, 4445, 89
14. Gordeziani, M., Varazi, T., Kurashvili, M., Pruidze, M. Biological Oxidation and Chemiosmosis. Tbilisi, 2007 (In Georgian)
15. Lundegårdh, H. Absorption, transport, and exudation of inorganic ions by the roots. *Arkiv. Bot.*, 1945, 32, 1-7
16. Chance, B., Hackett, D.P. The electron transfer system of skunk cabbage mitochondria. *Plant Physiology*, 1959, 34, 33-49
17. Martin, E.M., Morton, R.K. Cytochromes of microsomal particles: cytochrome  $b_3$  of microsomes from plant tissues. *Nature*, 1955, 176, 4472, 113-114
18. Martin, E.M., Morton, R.K. Haem pigments of cytoplasmic particles from non-

- photosynthetic plant tissues. *Biochem. J.*, 1957, 65, 404-413
19. Bendall, D.S., Hill, R. . Cytochrome components in the spadix of *Arum maculatum*. *New Phytologist*, 1956, 55, 206-212
  20. Kasinsky, H.E., Shichi, H., Hackett, D.P. Particulate cytochromes of mung bean seedlings plant. *Physiol.*, 1966, 41, 739-748
  21. Ambike, S.H., Baxter, R.M. Cytochrome P-450 and  $b_5$  in *Claviceps purpurea*: Interconversion of P-450 and P-420. *Phytochem.*, 1970, 9, 1952-1962
  22. Fvear, D.S., Swanson, H.R., Tanava, F.S. N-demethylation of substituted 3-(phenyl)-1-methyluveas: isolation and characterization of a microsomal mixed function oxidase from cotton. *Phytochem.*, 1969, 8, 2157-2169
  23. Markham, A., Hartman, G.C., Parke, D.V. Spectral evidence from the presence of cytochrome P-450 in microsomal fractions obtained from some higher plants. *Biochem. J.*, 1972, 130, 90-100
  24. Гордон, Л.Х., Бичурина, А.А., Алексеева, В.Я. Возможность исследования внемитохондриальных окислительных систем на целых растительных тканях. *ДАН СССР*, 1974, 215, 983-985
  25. Макеев, А.М., Маковейчук, Ф.Ю., Чкаников, Д.И. Микросомальное гидрокселирование 2,4- в растениях. *ДАН СССР*, 1977, 233, 1222-12259
  26. Чкаников, Д.И., Метаболизм 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты в растениях. *Усп. совр. биол.*, 1985, 99, 212-225
  27. Gordeziani, M., Durmishidze, S., Kurashvili, L. N-demethylated and p-hydroxylated activities of soybean and maize cotyledons. *Bulletin of the Georgian Academy of Sciences*. 1979, 96, 3, 717-720
  28. Durmishidze, S., Gordeziani, M., Jikia, A., Lomidze, E., Miminoshvili, T., Bobokhidze, E. Participation of plant microsomal redox system in naphthalene and benzidine oxidation. XIV Annual Meeting of the European Environmental Mutagen Society (EEMS). Abstracts, 11-14 September, Moscow, 1984, 140
  29. Рубин, Б.А., Логинова, Л.Н. Энзимология резистентного дыхания. *Усп. соврем. биол.*, 1970, 69, 3
  30. Rich, P.R., Bendall, D.S. Cytochrome components of plant microsomes. *Eur. J. Biochem.*, 1975, 55, 33-341
  31. Shunck, W.H., Reige, P., Kuhe, R. Cytochrome P-450 of eukaryotic microorganisms. *Pharmazie*, 1978, 5, 412-214
  32. Wiseman, A. Microsomal cytochromes P-450: drug appreciations. *Biotechnology*, 1977, 1, 172-184
  33. Rubin, A., Tephly, T.R., Mannering, G.J. Kinetics of drug metabolism by hepatic microsomes. *Biochem. Pharmac.*, 1964, 13, 1007-1016
  34. Boyland, E., Sims, P. Metabolism of polycyclic compounds. *Biochem. J.*, 1964, 90, 391-398
  35. Boyland, E., Nery, R. The metabolism of urethane and related compounds. *Biochem.*

- J., 1965, 94, 198-208
36. Hecker, E., Marks, F. On metabolism and action mechanism of estrogens. VII. O-hydroxylation of estrone in rat liver and its relation to protein binding as well as to p-hydroxylation and to hydroxylations in aliphatic positions. *Biochem. Z.*, 1965, 343, 211-226
  37. Orrenius, S., Dallner, G., Ernster, L. Inhibition of the TPNH-linked lipid peroxidation of liver microsomes by drugs undergoing oxidative demethylation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1964, 14, 329-334
  38. Metzlev, D.E. Instructor manual for biochemistry: the chemical reactions of living cells. Academic Press, New-York, 1977
  39. Zeigler, D.M. Microsomal flavin-containing monooxygenase. In: enzymatic basis of detoxication (W.B. Jakoby, ed.). Academic press, New-York, 1980, 1, 201-230
  40. Archakov, A.I., Karuzina, I.I., Kokareva, I.S., Bachmanova, G.I. The effect of magnesium ions on the diemthylaniline oxidation rate and electron transfer in liver microsomal fraction. *Biochem. J.*, 1973, 136, 371-379
  41. Archakov, A.I., Karuzina, I.I., Tveritinov, V.N., Kokareva, I.S. Hydroxylation of aniline and aminoantipyrine (1-phenyl-2,3-dimethyl-aminopyrasolon-5) derivatives in liver endoplasmatic reticulum. *Biochem. Pharmac.*, 1974, 23, 1053-1063
  42. Zeigler, D.M., Pettit, F.H. Formation of an intermediate N-oxide in the oxidative demethylation of N,N-dimethylaniline catalized by microsomes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1964, 15, 188-193
  43. Willi, P., Bickel, M.H. Liver reactions: Tertiary amine N-dealkylation, tertiary amine N-oxidation, N-oxide reduction and N-oxide N-dealkylation. II. N,N-dimethylamine. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1973, 156, 772-779
  44. Udenfriend, S., Clark, C.T., Axelrod, J., Brodie, B.B. Ascorbic acid in aromatic hydroxylation. I. A model system for aromatic hydroxylation. *J. Biol. Chem.*, 1954, 208, 731-740
  45. Kato, R., Chiesara, E., Vassanelli, R. Stimulating effect of some inhibitors of the drug metabolisms (SKF 525 A, Lilly 18947, Lilly 32391 and MG 3062) on excretion of ascorbic acid and drug metabolisms. *Med. Exp. Int. J. Exp. Med.*, 1962, 6, 254-260
  46. Omura, T., Sato, R., Cooper, D.Y., Rosenthal, O., Estabrook, R.W. Function of cytochrome P-450 of microsomes. *Fed. Proc.*, 1965, 24, 1181-1189
  47. Masson, H.S, North, J.C., Vanneste, M. Microsomal mixed-function oxidations: the metabolism of xenobiotics. *Fed. Proc.*, 1965, 24, 1172-1180
  48. Ernster, L. Control of cell metabolism at the mitochondrial level. *Fed. Proc.*, 1965, 24, 1222-1236
  49. Бах, А.Н. Собрание трудов по химии и биохимии. Изд. АН СССР, 1990
  50. Wieland, H. On the mechanism of oxidation. Gale Univ. press, New-Haven, 1932, 23



51. Hayaishi, O., Takikawa, O., Sono, M., Yoshida, R. In: *Microsomes, Drug Oxidation and Chemical Carcinogenesis* (Coon, M. J., Conney, A. H., Estabrook, R. W., Gelboin, H. V., Gillette, J. R. and O'Brien, P. J., eds). 1980, Vol. 1. pp. 1-13, Academic Press., New York
52. Арчаков, А.И. Оксигеназы биологических мембран. XXXVII Баховские чтения. М., Наука, 1983, 4-6
53. Головенко, Н.Я. Механизмы реакции метаболизма ксенобиотиков в биологических мембранах. Киев, «Наукова думка», 1984, 11
54. Masters, B.S.S, Baron, J., Taylor, W.E., Isaacson, E.L., LoSpalluto, J. Immunochemical studies on electron transport chains involving cytochrome P-450. I. Effects of antibodies to pig liver microsomal reduced triphosphopyridine nucleotide-cytochrome c reductase and the non-heme iron protein from bovine adrenocortical mitochondria. *J. Biol. Chem.*, 1971, 246, 4143-4150
55. Masters, B.S.S, Ziegler, D.M. The distinct nature and function of NADPH-cytochrome c reductase and the NADPH-dependent mixed-function amine oxidase of porcine liver microsomes. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1971, 145, 358-364
56. Ziegler, D.M., Jollow, D., Cook, D.E. Properties of a purified liver microsomal mixed function amine oxidase. In: *3rd International Symposium: Flavins and Flavoproteins*. H. Kamin (Ed.), 1971, 507-522
57. Ziegler, D. M., Mitchell, C. H., Jollow, D. In: *Microsomes and Drug Oxidations*. J. R. Gillett, A. H. Conney, G. J. Cosmides, R. W. Estabrook, J. R. Fouts and G. J. Mannering (eds.), Academic Press, New York, 1969, 173-188
58. Schulze, H.U., Staudinger, H. Studies on the distribution of enzyme proteins in liver-cell endoplasmic membranes. I. Separation of rat liver microsomes by differential and zonal centrifugation. II. Structure of the endoplasmic reticulum of the rat liver cell: correlation of morphometric and biometric data. *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 1971, 352, 1659-1674, 1675-1680
59. Phillips, A.H., Langdon, R.G. Hepatic triphosphopyridine nucleotide-cytochrome c reductase: isolation, characterization, and kinetic studies. *J. Biol. Chem.*, 1962, 237, 2652-2660
60. Charles, H. Williams, C.H.Jr., Kamin, H. Microsomal triphosphopyridine nucleotide-cytochrome c reductase of liver. *J. Biol. Chem.*, 1962, 237, 587-595
61. Baggott, J.P., Langdon, R.G. The relation of reduced triphosphopyridine nucleotide cytochrome c reductase structure to its interaction with cofactors. *J. Biol. Chem.*, 1970, 245, 5888-5896
62. Ichihara, K., Kusunose, E., Kusunose, M. Effect of triton X-100 and trypsin on NADPH-cytochrome C reductase reconstitutively active in fatty acid  $\omega$ -hydroxylation. *FEBS Letters*, 1972, 20, 105-107
63. Kamin, H., Masters, B.S. Electron transport in microsomes. In: *Enzymatic oxidation of toxicants*. (E. Hodgson, ed.), University of North Carolina, Raleigh. 1968, 5-25

64. Kamin, H., Gibson, Q.H., Williams, C.H.Jr. Microsomal TPNH-cytochrome c reductase. *Fed. Proc.*, 1965, 24, 1164-1171
65. Masters, B.S., Kamin, H., Gibson, Q.H., Williams, C.H. Studies on the mechanism of microsomal triphosphopyridine nucleotide-cytochrome c reductase. *J. Biol. Chem.*, 1965, 240, 921-931
66. Masters, B.S., Williams, C.H., Kamin, H. The preparation and properties of microsomal TPNH-cytochrome c reductase from pig liver. *Methods in Enzymology*, 1967, 10, 565-573
67. Iyanagi, T., Mason, H.S. Properties of hepatic reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-cytochrome c reductase. *Biochemistry*, 1973, 12, 2297-2308
68. Iyanagi, T., Makino, N., Mason, H.S. Redox properties of the reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-cytochrome P-450 and reduced nicotinamide adenine dinucleotide-cytochrome b<sub>5</sub> reductases. *Biochemistry*, 1974, 13, 1701-1710
69. Hemmerich, P., Nagelschneider, G., Veeger, C. Chemistry and molecular biology of flavins and flavoproteins. *FEBS Letters*, 1970, 8, 69-83
70. Müller, F., Hemmerich, P., Ehrenberg, A., Palmer, G., Massey, V. The chemical and electronic structure of the neutral flavin radical as revealed by electron spin resonance spectroscopy of chemically and isotopically substituted derivatives. *Eur. J. Biochem.*, 1970, 14, 185-196
71. Bilimoria, M.H., Kamin, H. The effect of high salt concentrations upon cytochrome C, cytochrome B<sub>5</sub>, and iron-EDTA reductase activities of liver microsomal NADPH-cytochrome C reductase. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1973, 212, 428-448
72. Hernandez, P.H., Gillette, J.R., Mazel, P. Studies on the mechanism of action of mammalian hepatic azoreductase—I: Azoreductase activity of reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-cytochrome c reductase. *Biochem. Pharmacol.*, 1967, 16, 1859-1866
73. Hernandez, P.H., Mazel, P., Gillette, J.R. Studies on the mechanism of action of mammalian hepatic azoreductase—II: The effects of phenobarbital and 3-methylcholanthrene on carbon monoxide sensitive and insensitive azoreductase activities. *Biochem. Pharmacol.*, 1967, 16, 1877-1888
74. Prough, R.A., Masters, B.S.S. The mechanism of cytochrome b<sub>5</sub> reduction by NADPH-cytochrome c reductase. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1974, 165, 263-267
75. Hara, T., Minakami, S. On functional role of cytochrome b<sub>5</sub>: I. NADH-linked cytochrome c reductase in microsomes. *J. Biochem.*, 1971, 69, 317-324
76. Hara, T., Minakami, S. On functional role of cytochrome b<sub>5</sub>: II. NADH-linked ascorbate radical reductase activity in microsomes. *J. Biochem.*, 1971, 69, 325-330
77. Strittmatter, C.F. Flavin-linked oxidative enzymes of *Lactobacillus casei*. *J. Biol. Chem.*, 1959, 234, 2794-2800
78. Strittmatter, P. Protein and coenzyme interactions in the NADH-cytochrome b<sub>5</sub> reductase system. *Fed. Proc.*, 1965, 24, 1156-1163

79. Strittmatter, P. The nature of the flavin binding in microsomal cytochrome b<sub>5</sub> reductase. *J. Biol. Chem.*, 1961, 236, 2329-2335
80. Strittmatter, P. Direct hydrogen transfer from reduced pyridine nucleotides to microsomal cytochrome b<sub>5</sub> reductase. *J. Biol. Chem.*, 1962, 237, 3250-3254
81. Strittmatter, P. The detection and characterization of several conformational states of cytochrome b<sub>5</sub> aporeductase during reversible denaturation. *J. Biol. Chem.*, 1967, 242, 4630-4636
82. Strittmatter, P. The characterization and interconversions of two conformational states of cytochrome b<sub>5</sub> reductase. *J. Biol. Chem.*, 1971, 246, 1017-1024
83. Takesue, S., Omura, T. Purification and properties of NADH-cytochrome b<sub>5</sub> reductase solubilized by lysosomes from rat liver microsomes. *J. Biochem.*, 1970, 67, 267-276
84. Iyanagi, T., Yamazaki, I. One-electron-transfer reactions in biochemical systems III. One-electron reduction of quinones by microsomal flavin enzymes. *Biochim. Biophys. Acta*, 1969, 172, 370-381
85. Tenhunen, R., Marver, H.S., Schmid, R. The enzymatic conversion of heme to bilirubin by microsomal heme oxygenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1968, 61, 748-755
86. Strittmatter, P. The reaction sequence in electron transfer in the reduced nicotinamide adenine dinucleotide-cytochrome b<sub>5</sub> reductase system. *J. Biol. Chem.*, 1965, 240, 4481-4487
87. Rogers, M.J., Strittmatter, P. Lipid-protein interactions in the reconstitution of the microsomal reduced nicotinamide adenine dinucleotide-cytochrome b<sub>5</sub> reductase system. *J. Biol. Chem.*, 1973, 248, 800-806
88. Rogers, M.J., Strittmatter, P. Evidence for random distribution and translational movement of cytochrome b<sub>5</sub> in endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.*, 1974, 249, 895-900
89. Spatz, L., Strittmatter, P. A form of reduced nicotinamide adenine dinucleotide-cytochrome b<sub>5</sub> reductase containing both the catalytic site and an additional hydrophobic membrane-binding segment. *J. Biol. Chem.*, 1973, 248, 793-799
90. Rogers, M.J., Strittmatter, P. The binding of reduced nicotinamide adenine dinucleotide-cytochrome b<sub>5</sub> reductase to hepatic microsomes. *J. Biol. Chem.*, 1974, 249, 5565-5569
91. Schulze, H.U., Staudinger, H. Studies on the lipid dependability of NADH: semidehydroascorbic-acid-oxidoreductase (EC 1.6.5.4). *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 1971, 352, 309-317
92. Staroń, K., Kaniuga, Z. Distinction between two microsomal activities of NADH cytochrome c reductase by means of Triton X-100. *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 1972, 353, 14-18
93. Mackler, B. Microsomal DPNH-cytochrome c reductase. *Methods in Enzymology*

- gy, 1967, 10, 551-553
94. Okuda, T., Mihara, K., Sato, R. Interactions between NADH-cytochrome  $b_5$  reductase and cytochrome  $b_5$  preparations purified from liver microsomes. *J. Biochem.*, 1972, 72, 987-992
  95. Panfili, E., Sottocasa, G.L., De Bernard, B. A high molecular weight form of NADH-cytochrome  $b_5$  reductase from ox liver microsomes. *Biochim. Biophys. Acta*, 1971, 253, 323-331
  96. Кон, В. Железопорфирины – геммы и гемины. В кн.: Неорганическая биохимия (под ред. Г. Эйхгорна). М., Мир, 1978, 218-255
  97. Berezney, R., Crane, F.L. Cytochromes in bovine liver nuclear membranes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1971, 43, 1017-1023
  98. Donaldson, R.P., Tolbert, N.E., Schnarrenberger C. A comparison of microbody membranes with microsomes and mitochondria from plant and animal tissue. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1972, 152, 199-215
  99. Ichikawa, Y. Yamano, T. Cytochrome  $b_5$  and CO-binding cytochromes in the Golgi membranes of mammalian livers. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1970, 40, 297-305
  100. Kasper, C.B. Biochemical distinctions between the nuclear and microsomal membranes from rat hepatocytes. The effect of phenobarbital administration. *J. Biol. Chem.*, 1971, 246, 577-581
  101. Kajihara, T., Hagihara B. Crystalline cytochrome  $b_5$ : I. Preparation of crystalline cytochrome  $b_5$  from rabbit liver. *J. Biochem.*, 1968, 63, 453-461
  102. Omura, T., Takesue, S. A new method for simultaneous purification of cytochrome  $b_5$  and nadph-cytochrome  $c$  reductase from rat liver microsomes. *J. Biochem.*, 1970, 67, 249-257
  103. Ozols, J. Amino acid sequence of rabbit liver microsomal cytochrome  $b_5$ . *J. Biol. Chem.*, 1970, 245, 4863-4874
  104. Tsugita, A., Kobayashi, M., Kajihara, T., Hagihara, B. Primary structure of rabbit liver cytochrome  $b_5$ . *J. Biochem.*, 1968, 64, 727-730
  105. Strittmatter, P. The nature of the heme binding in microsomal cytochrome  $b_5$ . *J. Biol. Chem.*, 1960, 235, 2492-2497
  106. Strittmatter, P., Velick, S.F. The purification and properties of microsomal cytochrome reductase. *J. Biol. Chem.*, 1957, 228, 785-799
  107. Velick, S.F., Strittmatter, P. The oxidation-reduction stoichiometry and potential of microsomal cytochrome. *J. Biol. Chem.*, 1956, 221, 265-276
  108. Lumberg, R., Barret, J. Cytochromes. Academic Press, London-New-York, 1973
  109. Nóbrega, F.G., Araujo, P.S., Pasetto, M., Raw, I. Some properties of cytochrome  $b_5$  from liver microsomes of man, monkey, pig and chicken *Biochem. J.*, 1969, 115, 849-856
  110. Ozols, J., Strittmatter, P. Correction of the amino acid sequence of calf liver micro-

- somal cytochrome  $b_5$ . J. Biol. Chem., 1969, 244, 6617-6618
111. Ozols, J. Cytochrome  $b_5$  from microsomal membranes of equine, bovine, and porcine livers. Isolation and properties of preparations containing the membranous segment. Biochemistry, 1974, 13, 426-434
  112. Strittmatter, P., Ozols, J. The restricted tryptic cleavage of cytochrome  $b_5$ . In: Hemes and Hemoproteins (B. Chance, R.W. Estabrook, T. Yonetani, Eds.)/ Academic Press. New York, 1966, 447-461
  113. Davis, K.A., Kreil, G. Some characteristics of cytochrome  $b_5$  from outer membranes of rat liver mitochondria. Biochim. Biophys. Acta, 1968, 162, 627-630
  114. Fukushima, K., Ito, A., Omura, Y., Sato, R. Occurrence of different types of cytochrome  $b_5$ -like hemoprotein in liver mitochondria and their intramitochondrial localization. J. Biochem., 1972, 71, 447-461
  115. Fukushima, K., Sato, R. Purification and characterization of cytochrome  $b_5$ -like hemoprotein associated with outer mitochondrial membrane of rat liver. J. Biochem., 1974, 74, 161-173
  116. Ito, A., Sato, R. Purification by means of detergents and properties of cytochrome  $b_5$  from liver microsomes. J. Biol. Chem., 1968, 243, 4922-4923
  117. Ito, A., Sato, R. Proteolytic microdissection of smooth-surfaced vesicles of liver microsomes. J. Cell. Biol., 1969, 40, 179-189
  118. Арчаков, А.И. Девиченский, В.М. Влияние ионов  $\text{Na}^+$  и  $\text{K}^+$  на скорость переноса электронов в микросомах. Биофизика, 1973, 18б 1041-1045
  119. Арчаков, А.И. Девиченский, В.М. Перенос электронов в мембранах эндоплазматического ретикулума: Участие цитохрома  $b_5$  в реакциях окисления NADPH. Биохимия, 1974, 39, 691-699
  120. Арчаков, А.И. Девиченский, В.М. Перенос электронов в мембранах эндоплазматического ретикулума. Количественная оценка содержания цитохрома  $b_5$  в цепях окисления NADPH и NADH. Биохимия, 1974, 39, 691-699. Биохимия, 1974, 39, 1132-1137
  121. Арчаков, А.И. Девиченский, В.М., Карузина, И.И. Перенос электронов в мембранах эндоплазматического ретикулума. Взаимодействие NADPH- и NADH-специфических цепей переноса электронов в микросомах. Биохимия, 1974, 39, 903-909
  122. Archakov, A.I., Devichensky, V.M., Karyakin, A.V. The electron transfer in the membranes of endoplasmic reticulum. Participation of cytochrome  $b_5$  in the NADPH-oxidation reaction. The evidence for two cytochrome  $b_5$  in liver microsomes. Arch. Biochem. Biophys., 1975, 166, 295-307
  123. Archakov, A.I., Devichensky, V.M., Karuzina, I.I., Karyakin, A.V. The electron transfer in the membranes of endoplasmic reticulum. The interaction of NADPH and NADH-electron transfer chains in microsomes. Arch. Biochem. Biophys., 1975, 166, 308-312

124. Cohen, B.S., Estabrook, R.W. Microsomal electron transport reactions: I. Interaction of reduced triphosphopyridine nucleotide during the oxidative demethylation of aminopyrine and cytochrome  $b_5$  reduction. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1971, 37-45
125. Estabrook, R.W., Baron, J., Hildebrandt, A.G. A new spectral species associated with cytochrome P-450 in liver microsomes. *Chem. Biol. Interactions*, 1971, 3, 260-261
126. Арчаков, А.И. Микросомальное окисление. М., Наука, 119
127. Ozols, J., Strittmatter, P. The homology between cytochrome B-5, hemoglobin, and myoglobin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1967, 58, 264-267
128. Mathews, F.S., Levine, M., Argos, P. The structure of calf liver cytochrome b 5 at 2.8 Å resolution. *Nat. New Biol.*, 1971, 233, 15-16
129. Mathews, F.S., Levine, M., Argos, P. Three-dimensional Fourier synthesis of calf liver cytochrome b 5 at 2-8 Å resolution. *J. Mol. Biol.*, 1972, 64, 449-464
130. Bios-Poltoratsky, R., Ehrenderg, A. Magnetic and spectrophotometric investigations of cytochrome  $b_5$ . *Eur. J. Biochem.* 1967, 2, 361-365
131. Ikeda, M., Iizuka, T., Takao, Y., Hachihara, P. Studies on the heme environment of oxidized cytochrome  $b_5$ . *Biochim. Biophys. Acta*, 1974, 336, 15-24
132. Oshino, N., Imai, Y., Sato, R. Electron-transfer mechanism associated with fatty acid desaturation catalyzed by liver microsomes. *Biochim. Biophys. Acta*, 1966, 17, 13-28
133. Oshino, N., Imai, Y., Sato, R. A function of cytochrome  $b_5$  in fatty acid desaturation by rat liver microsomes. *J. Biochem.*, 1971, 69, 155-167
134. Oshino, N., Sato, R. The dietary control of the microsomal stearyl CoA desaturation enzyme system in rat liver. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1972, 149, 369-377
135. Ichikawa, Y., Yamano, T. The role of the hydrophobic bonding in P-450 and the effect of organic compounds on the conversion of P-450 to P-420. *Biochim. Biophys. Acta*, 1967, 147, 518-525
136. Ichikawa, Y., Yamano, T., Fujishima, H. Relationship between the interconversion of cytochrome P-450 and P-420 and its activities in hydroxylations and demethylations by P-450 oxidase systems. *Biochim. Biophys. Acta*, 1967, 171, 32-46
137. Imai, Y., Sato, R. Conversion of P-450 to P-420 by neutral salts and some other reagents. *Eur. J. Biochem.*, 1967, 1, 419-426
138. Imai, Y., Sato, R. A gel-electrophoretically homogeneous preparation of cytochrome P-450 from liver microsomes of phenobarbital-pretreated rabbits. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1974, 60, 8-14
139. Imai, Y., Sato, R. An affinity column method for partial purification of cytochrome P-450 from phenobarbital-induced rabbit liver microsomes. *J. Biochem.*, 1974, 75, 689-697
140. Jefcoate, C.R.E., Gaylor, J.L., Calabrese, R.L. Ligand interactions with cytochrome P-450. I. Binding of primary amines. *Biochemistry*, 1969, 8, 3455-3463

141. Imai, Y. The use of 8-aminooctyl sepharose for the separation of some components of the hepatic microsomal electron transfer system. *J. Biochem.*, 1976, 80, 267-276
142. van der Hoeven, T.A., Haugen, D.A., Coon, L. Cytochrome P-450 purified to apparent homogeneity from phenobarbital-induced rabbit liver microsomes: Catalytic activity and other properties. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1974, 60, 569-575
143. Haugen, D.A., van der Hoeven, T.A., Coon, L. Purified liver microsomal cytochrome P-450. Separation and characterization of multiple forms. *J. Biol. Chem.*, 1975, 250, 3567-3570
144. Nishibayashi, H., Sato, R. Preparation of hepatic microsomal particles containing P-450 as sole heme constituent and absolute spectra of P-450. *J. Biochem.*, 1968, 63, 766-779
145. Kadish, K.M., Davis, D.G. Electrochemical studies of metalloporphyrins. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1973, 206, 495-503
146. Rein, H., Ristau, O., Friedrich, J., Jänig, G.R., Ruckpaul, K. Evidence for the existence of a high spin-low spin equilibrium in liver microsomal cytochrome P-450. *FEBS Lett.*, 1977, 15, 19-22
147. Hashimoto, Y., Yamano, T., Mason, H.S. An electron spin resonance study of microsomal electron transport. *J. Biol. Chem.*, 1962, 237, 3843-3849
148. Harris Loew, G.M. An analysis of the electron spin resonance of low spin ferric heme compounds, *Biophys. J.*, 1970, 10, 196-212
149. Rein, H., Ristau, O. Evidence of high-spin and low-spin form of hemoproteins using electron spin resonance. *Biochim. Biophys. Acta*, 1965, 94, 516-524
150. Ichikawa, Y., Hagihara, B., Yamano, T. Magnetic and spectrophotometric properties of the microsomal carbon monoxide binding pigment. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1967, 120, 204-213
151. Ichikawa, Y., Yamano, T. Electron spin resonance of microsomal cytochromes: Correlation of the amount of CO-binding species with so-called microsomal Fe<sub>x</sub> in microsomes of normal tissues and liver microsomes of Sudan III-treated animals. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1967, 121, 742-749
152. Mason, H.S., North, J.C., Vanneste, M. Microsomal mixed-function oxidations: the metabolism of xenobiotics. *Fed. Proc.*, 1965, 24, 1172-1180
153. Peterson, J.A. Camphor binding by *Pseudomonas putida* cytochrome P-450. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1971, 144, 678-693
154. Scheler, W., Schoffa, G., Jung, F. Light absorption and paramagnetic susceptibility of the derivatives of horse and *Chironomus* methemoglobins and of horse metmyoglobin. *Biochem. Z.*, 1957, 329, 232-246
155. Smith, D.W., Williams R.J.P., Analysis of the visible spectra of some sperm-whale ferrimyoglobin derivatives. *Biochem. J.*, 1968, 110, 297-301
156. Rein, H., Ristau, O. The importance of the high spin/low spin equilibrium existing in cytochrome P-450 for the enzymatic mechanism. *Pharmazie*, 1978, 33, 325-328

157. Narasimhulu, S., Cooper, D.Y., Rosenthal, O. Spectrophotometric properties of a triton-clarified steroid 21-Hydroxylase system of adrenocortical microsomes. *Life Sci.*, 1965, 4, 2101-2107
158. Schenkman, J.B., Remmer, H., Estabrook, R.W. Spectral studies of drug interaction with hepatic microsomal cytochrome. *Mol. Pharmacol.*, 1967, 3, 113-123
159. Ахрем, А.А., Бельский, С.М., Метелица, Д.И. Влияние температуры на взаимодействие цитохрома P-450 с некоторыми аминами. *Биохимия*, 1977, 42, 2116-2120
160. Imai, Y., Sato, R. Substrate interaction with hydroxylase system in liver microsomes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1966, 22, 620-626
161. Orrenius, S., Thor, H. Fatty acid interaction with the hydroxylating enzyme system of rat liver microsomes. *Eur. J. Biochem.*, 1969, 9, 415-418
162. Miyake, Y., Gaylor, J.L., Mason, H.S. Properties of a submicrosomal particle containing P-450 and flavoprotein. *J. Biol. Chem.*, 1968, 243, 5788-5797
163. Miyake, Y., Mori, K., Yamano, T. Oxidation-reduction mechanisms of cytochrome P-450. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1971, 44, 564-570
164. Hill, H.A.O., Röder, A., Williams, R.J.P. Cytochrome P-450 suggestions as to the structure and mechanism of action. *Naturwissenschaften*, 1970, 57, 69-72
165. Tsai, R., Yu, C.A., Gunsalus, I.C., Peisach, J., Blumberg, W., Orme-Johnson, W.H., Beinert, H. Spin-state changes in cytochrome P-450cam on binding of specific substrates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1970, 66, 1157-1163
166. Rösen, P., Stier, A. Kinetics of CO and O<sub>2</sub> complexes of rabbit liver microsomal cytochrome P<sub>450</sub>. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1973, 51, 603-611
167. Ishimura, Y., Ullrich, V., Peterson, J.A. Oxygenated cytochrome P-450 and its possible role in enzymic hydroxylation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1971, 42, 140-146
168. Lemberg, M.R. Cytochrome oxidase. *Physiol. Rev.*, 1969, 49, 48-121
169. Remmer, H. The role of the liver in drug metabolism. *Am. J. Med.*, 1970, 49, 617-629
170. Метелица, Д.И. Активация кислорода ферментными системами. М., Наука, 1982, 249
171. Guengerich, F.P. Isolation and purification of cytochrome P-450, and the existence of multiple forms. *Pharmacol. Ther.*, 1979, 6, 99-121
172. Imai, Y., Hashimoto-Yutsudo, C., Satake, H., Girardin, A., Sato, R. Multiple forms of cytochrome p-450 purified from liver microsomes of phenobarbital- and 3- ethylcholanthrene-pretreated rabbits: i. resolution, purification, and molecular properties. *J. Biochem.*, 1980, 88, 489-503
173. Jänig, G.R., Pfeil, D. Liver microsomal monooxygenase system: functional components and their properties. *Pharmazie*, 1978, 33, 313-317
174. Haugen, D.A., Armes, L.G., Yasunobu, K.T., Coon, M.J. Amino-terminal sequence



- of phenobarbital-inducible cytochrome P-450 from rabbit liver microsomes: Similarity to hydrophobic amino-terminal segments of preproteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1977, 77, 967-973
175. Метелица, Д.И. Моделирование окислительно-восстановительных ферментов. Минск, Наука и техника, 1984, 292
  176. Ахрем, А.А., Попова, А.А., Метелица, Д.И. Взаимодействие алифатических спиртов с цитохромом P-450 микросим печени крысы. *Биохимия*, 1978, 43, 1485-1491
  177. Chiang, Y.-L., Coon, M.J. Comparative study of two highly purified forms of liver microsomal cytochrome P-450: Circular dichroism and other properties. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1979, 195, 178-187
  178. Diehl, H., Schädelin, J., Ullrich, V. Studies on the kinetics of cytochrome P-450 reduction in rat liver microsomes. *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 1970, 351, 1359-1371
  179. Метелица, Д.И., Попова, А.А. Механизмы окисления алифатических спиртов ферментными системами печени. *Биохимия*, 1979, 44, 1923-1935
  180. Wilson, B.J., Orrenius, S. A study of the modified type II spectral change produced by the interaction of agroclavine with cytochrome P-450. *Biochim. Biophys. Acta*, 1972, 261, 94-101
  181. Hayaishi, O. Electronic aspects of catalysis of the oxygenases. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1969, 158, 318-335
  182. Hayaishi, O. Enzymatic hydroxylation. *Annu. Rev. Biochem.*, 1969, 38, 21-44
  183. Estabrook, R.W., Hildebrandt, A.G., Ullrich, V. Oxygen interaction with reduced cytochrome P-450. *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 1968, 349, 1605-1608
  184. Estabrook, R.W., Hildebrandt, A.G., Baron, J., Netter, K.J., Leibman, K. A new spectral intermediate associated with cytochrome P-450 function in liver microsomes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1971, 42, 132-139
  185. Gunsalus, I.C., Tyson, C.A., Tsai, R., Lipscomb, J.D. P-450 cam hydroxylase: substrate-effector and electron-transport reactions. *Chem. Biol. Interact.*, 1971, 4, 75-78
  186. Huang, J.J., Kimura, T. A specific role of reduced adrenodoxin in adrenal mitochondrial steroid hydroxylases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1971, 44, 1065-1070
  187. Peterson, J.A., Ishimura, Y., Griffin, B.W. *Pseudomonas putida* cytochrome P-450: characterization of an oxygenated form of the hemoprotein. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1972, 149, 197-208
  188. Schenkman, J.B. The effects of temperature and substrates on component reactions of the hepatic microsomal mixed-function oxidase. *Mol. Pharmacol.*, 1972, 8, 178-188
  189. Blanck, J., Smettan, G. The cytochrome P-450 reaction mechanism-kinetic aspects. *Pharmazie*, 1978, 33, 321-324
  190. Katagiri, M., Ganguli, B.N., Gunsalus, I.C. A soluble cytochrome P-450 functional

- in methylene hydroxylation. *J. Biol. Chem.*, 1968, 25, 243, 3543-3546
191. Tsai, R., Yu, C.A., Gunsalus, I.C., Peisach, J., Blumberg, W., Orme-Johnson W.H., Beinert H. Spin-state changes in cytochrome P-450cam on binding of specific substrates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1970, 66, 1157-1163
  192. Griffin, B.W., Peterson, J.A. Camphor binding of *Pseudomonas putida* cytochrome P-450. Kinetics and thermodynamics of the reaction. *Biochemistry*, 1972, 11, 4740-4746
  193. Dolinger, P.M., Kielczewski, M., Trudell, J.R., Barth, G., Linder, R.E., Bunnenberg, E., Djerassi, C. Magnetic circular dichroism studies. XXV. A preliminary investigation of microsomal cytochromes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1974, 71, 399-403
  194. Alvares, A.P., Schilling, G., Kuntzman, R. Alteration in the microsomal hemoprotein and the kinetics of 3,4-benzpyrene hydroxylase induced by 3-methylcholanthrene: time course study and effects of puromycin. *Life Sci.*, 1971, 10, 129-136
  195. Beije, B., Hultin, T. Oxidation and protein binding of aromatic amines by rat liver microsomes. *Chem. Biol. Interact.*, 1971, 3, 321-336
  196. Orrenius, S., Ernster, L. Interaction between liver microsomes and compounds capable of undergoing enzymic hydroxylation. *Life Sci.*, 1967, 6, 1473-1482
  197. Narasimhulu, S. Uncoupling of oxygen activation from hydroxylation in the steroid C-21 hydroxylase of bovine adrenocortical microsomes. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1971, 147, 384-390
  198. Ribbons, D.W., Ohta, Y. Uncoupling of electron transport from oxygenation in the mono-oxygenase, orcinol hydroxylase. *FEBS Lett.*, 1970, 12, 105-108
  199. Ullrich, V., Diehl, H. Uncoupling of monooxygenation and electron transport by fluorocarbons in liver microsomes. *Chem. Biol. Interact.*, 1971, 3, 310
  200. White-Stevens, R.H., Kamin, H. Uncoupling of oxygen activation from hydroxylation in a bacterial salicylate hydroxylase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1970, 38, 882-889
  201. Ullrich, V., Diehl, H. Uncoupling of monooxygenation and electron transport by fluorocarbons in liver microsomes. *Eur. J. Biochem.*, 1971, 20, 509-512
  202. Orrenius, S., Kupfer, D., Ernster L. Substrate binding to cytochrome P-450 of liver and adrenal microsomes. *FEBS Lett.*, 1970, 16, 249-252
  203. Gigon, P.L., Gram, T.E., Gillette, J.R. Studies on the rate of reduction of hepatic microsomal cytochrome P-450 by reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate: effect of drug substrates. *Mol. Pharmacol.*, 1969, 5, 109-122
  204. Sasame, H.A., Gillette, J.R. Studies on the relationship between the effects of various substances on absorption spectrum of cytochrome P-450 and the reduction of p-nitrobenzoate by mouse liver microsomes. *Mol. Pharmacol.*, 1969, 5, 123-130
  205. Gigon, P.L., Gram, T.E., Gillette, J.R. Effect of drug substrates on the reduction of hepatic microsomal cytochrome P-450 by NADPH. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1968, 31, 558-562

206. Gillette, J.R. Factors affecting drug metabolism. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1971, 179, 43-66
207. Matsubara, T., Baron, J., Peterson, L.L., Peterson, J.A. NADPH-cytochrome P450 reductase. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1976, 172, 463-469
208. Blanck, J., Rohde, K., Behlke, J., Jänig, G.R., Pfeil, D., Ruckpaul, K. NADPH reduction of cytochrome P-450 at different integrational levels of the enzyme system. *Acta Biol. Med. Ger.*, 1979, 38, 399-408
209. Levin, W., Ryan, D., West, S., Lu, A.Y. Preparation of partially purified, lipid-depleted cytochrome P-450 and reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-cytochrome c reductase from rat liver microsomes. *J. Biol. Chem.*, 1974, 25, 249, 1747-1754
210. Strobel, H.W., Lu, A.Y., Heidema, J., Coon, M.J. Phosphatidylcholine requirement in the enzymatic reduction of hemoprotein P-450 and in fatty acid, hydrocarbon, and drug hydroxylation. *J. Biol. Chem.*, 1970, 245, 4851-4854
211. Ichihara, K., Kusunose, E., Kusunose, M. A fatty acid gamma-hydroxylation system solubilized from porcine kidney cortex microsomes. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1971, 239, 178-189
212. Fouts, J.R., Pohl, R.J. Further studies on the effects of metal ions on rat liver microsomal reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-cytochrome P-450 reductase. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1971, 179, 91-100
213. Peters, M.A., Fouts, J.R. A study of some possible mechanisms by which magnesium activates hepatic microsomal drug metabolism in vitro. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1970, 173, 233-241
214. Holtzman, J.L., Carr, M.L. Inhibition of hepatic microsomal mixed function oxidases by D<sub>2</sub>O. *Life Sci.*, 1970, 9, 1033-1038
215. Castro, J.A., Gillette, J.R. Species and sex differences in the kinetic constants for the N-demethylation of ethyl-morphine by liver microsomes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1967, 28, 426-430
216. Davies, D.S., Gigon, P.L., Gillette, J.R. Species and sex differences in electron transport systems in liver microsomes and their relationship to ethylmorphine demethylation. *Life Sci.*, 1969, 8, 85-91
217. Holtzman, J.L., Rumack, B.H. The kinetics of cytochrome P-450 reductase stimulation by ethylmorphine. *Life Sci.*, 1971, 10, 669-677
218. Coon MJ, Autor AP, Strobel HW. Role of phospholipid in electron transfer in a reconstituted liver microsomal enzyme system containing cytochrome P-450. *Chem. Biol. Interact.*, 1971, 3, 248-250
219. Peters, M.A., Fouts, J.R. A study of some possible mechanisms by which magnesium activates hepatic microsomal drug metabolism in vitro. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1970, 173, 233-241
220. Hildebrandt, A., Estabrook, R.W. Evidence for the participation of cytochrome b<sub>5</sub> in

- hepatic microsomal mixed-function oxidation reactions. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1971, 143, 66-79
221. Weiss, J.J. Nature of the iron-oxygen bond in oxyhaemoglobin. *Nature*, 1964, 203, 182-183
222. Ochiai Ei-Ichiro. Oxygen activation by hemes—A theoretical and comparative study. *J. Inorg. Nucl. Chem.*, 1974, 36, 2129-2132
223. Jung, C., Friedrich, J., Ristau, O. Quantum chemical interpretation of the spectral properties of the CO and O<sub>2</sub> complexes of hemoglobin and cytochrome P-450. *Acta Biol. Med. Ger.*, 1979, 38, 363-377
224. Watson, H. C., Nobbs, C. L., Nineteenth Coll. Ges. Biol. Chemie., Mosbach, Springer, Berlin, 1968
225. Jansson, I., Schenkman, J.B. Evidence against participation of cytochrome b<sub>5</sub> in the hepatic microsomal mixed-function oxidase reaction. *Mol. Pharmacol.*, 1973, 9, 840-845
226. Noshiro, M., Omura, T. Immunochemical study on the electron pathway from NADH to cytochrome P-450 of liver microsomes. *J. Biochem.*, 1978, 83, 61-77
227. Sasame, H.A., Gillette, J.R., Boyd, M.R. Effects of anti-NADPH-cytochrome c reductase and anti-cytochrome b<sub>5</sub> antibodies on the hepatic and pulmonary microsomal metabolism and covalent binding of the pulmonary toxin 4-ipomeanol. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1978, 84, 389-395
228. Noshiro, M., Harada, N., Omura, T. Immunochemical study on the participation of cytochrome b<sub>5</sub> in drug oxidation reactions of mouse liver microsomes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1979, 91, 207-213
229. Imai, Y., Sato, R. The roles of cytochrome b<sub>5</sub> in a reconstituted N-demethylase system containing cytochrome P-450. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1977, 75, 420-426
230. Imai, Y. Reconstituted O-dealkylase systems containing various forms of liver microsomal cytochrome P-450. *J. Biochem.*, 1979, 86, 1697-1707
231. Sugiyama, T., Miki, N., Yamano, T. The obligatory requirement of cytochrome b<sub>5</sub> in the p-nitroanisole O-demethylation reaction catalyzed by cytochrome P-450 with a high affinity for cytochrome b<sub>5</sub>. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1979, 90, 715-720
232. Morgan, E.T., Koop, D.R., Coon, M.J. Catalytic activity of cytochrome P-450 isozyme 3a isolated from liver microsomes of ethanol-treated rabbits. Oxidation of alcohols. *J. Biol. Chem.*, 1982, 257, 13951-13957
233. Brunström, A., Ingelman-Sundberg, M. Benzo(a)pyrene metabolism by purified forms of rabbit liver microsomal cytochrome P-450, cytochrome b<sub>5</sub> and epoxide hydrolase in reconstituted phospholipid vesicles. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1980, 95, 431-439
234. Sugiyama, T., Miki, N., Yamano, T. NADH- and NADPH-dependent reconstituted

- p-nitroanisole O-demethylation system containing cytochrome P-450 with high affinity for cytochrome b<sub>5</sub>. *J. Biochem.*, 1980, 87, 1457-1467
235. Ingelman-Sundberg, M., Johansson, I. Cytochrome b<sub>5</sub> as electron donor to rabbit liver cytochrome P-450LM2 in reconstituted phospholipid vesicles. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1980, 97, 582-589
  236. Miki, N., Sugiyama, T., Yamano, T. Purification and characterization of cytochrome P-450 with high affinity for cytochrome b<sub>5</sub>. *J. Biochem.*, 1980, 88, 307-310
  237. Staudinger, H. Korekjarto, B., Ullrich, V., Zubrzycki, Z. In: *Oxidases and related redox systems*. (King, T.E., Mason, H.S., and Morrison, M., eds). 1965, Vol. 2, pp. 815-831, Wiley, New York
  238. Ullrich, V., Staudinger, H. In: *Microsomes, Drug Oxidation and Chemical Carcinogenesis* (Gillette J.R., ed). 1969, Vol. 2. pp. 199-224, Academic Press., New York
  239. Posner, H.S., Mitoma, C., Udenfriend, S. Enzymic hydroxylation of aromatic compounds. II. Further studies of the properties of the microsomal hydroxylating system. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1961, 94, 269-279
  240. Posner, H.S., Mitoma, C., Rothberg S.Udenfriend, S. Enzymic hydroxylation of aromatic compounds. III. Studies on the mechanism of microsomal hydroxylation. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1961, 94, 280-290
  241. Sehested, K., Rasmussen, O.L., Fricke H. Rate constants of OH with HO<sub>2</sub>, O<sub>2</sub><sup>-</sup>, and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>+</sup> from hydrogen peroxide formation in pulse-irradiated oxygenated water. *J. Phys. Chem.*, 1968, 72, 626-631
  242. Hamilton, G.A. Oxidation by molecular oxygen. II. The oxygen atom transfer mechanism for mixed-function oxidases and the model for mixed-function oxidases. *J. Am. Chem. Soc.*, 1964, 86, 3391-3392
  243. Hamilton, G.A. Mechanisms of two- and four-electron oxidations catalyzed by some metalloenzymes. *Adv. Enzymol.*, 1969, 32, 55-96
  244. Hamilton, G.A. In: *Progress in bioorganic chemistry* (Kaiser, E.T., Kézdy, F.J. eds). 1973, V. 1, p. 83. Willey, New York
  245. Mason, H.S. Oxidases. *Annu. Rev. Biochem.* 1965, 34, 595-634
  246. Lichtenberger, F., Nastainczyk, W., Ullrich, V. Cytochrome P450 as an oxene transferase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1976, 70, 939-946
  247. Daly, J., Jerina, D., Farnsworth, J., Guroff, G. The migration of deuterium during aryl hydroxylation. II. Effect of induction of microsomal hydroxylases with phenobarbital or polycyclic aromatic hydrocarbons. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1969, 131, 238-244
  248. Daly, J., Jerina, D., Witkop, B. Migration of deuterium during hydroxylation of aromatic substrates by liver microsomes. I. Influence of ring substituents. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1968, 128, 517-527
  249. Guroff, G., Levitt, M., Daly, J., Udenfriend, S. The production of meta-tritiotyrosine from p-tritiophenylalanine by phenylalanine hydroxylase. *Biochem. Biophys. Res.*

- Commun., 1966, 20, 25, 253-259
250. Jerina, D., Daly, J. In: Oxidases and related redox systems. (King, T.E., Mason, H.S., and Morrison, M., eds). 1965, Vol. 1, pp. 143-161, Univ. Park Press, Baltimore-London-Tokyo
  251. Ullrich, V., Estabrook, R.W., Schädelin, J., Staudinger, H. Hydroxylation of cyclohexane by rat liver microsomes. Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem., 1968, 349, 1631-1633
  252. Strobel, H.W., Coon, M.J. Effect of superoxide generation and dismutation on hydroxylation reactions catalyzed by liver microsomal cytochrome P-450. J. Biol. Chem., 1971, 246, 7826-7829
  253. Coon, M.J., Autor, A.P., Biyer, R.F., Lode, E.T., Strobel, H.W. In: Oxidases and related redox systems. (King, T.E., Mason, H.S., and Morrison, M., eds). 1965, Vol. 2, pp. 527-553, Univ. Park Press, Baltimore-London-Tokyo
  254. Gunsalus, I.C., Meeks, J.R., Lipscomb, J.D., Debrunner, P.G., Münck, E. In: Molecular mechanisms of oxygen activation (Hayaishi, O., ed). 1974, pp. 559-613, Academic Press, New York
  255. Hui Bon Hoa, G., Begard, E., Debey, P., Gunsalus I.C. Two univalent electron transfers from putidaredoxin to bacterial cytochrome P<sub>450</sub> at subzero temperature. Biochemistry, 1978, 17, 2835-2839
  256. White, R.E., Coon, M.J. Oxygen activation by cytochrome P-450. Annu. Rev. Biochem., 1980, 49, 315-356
  257. Sligar, S.G., Kennedy, K.A., Pearson, D.C. Chemical mechanisms for cytochrome P-450 hydroxylation: evidence for acylation of heme-bound dioxygen. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1980, 77, 1240-1244
  258. Денисов, Е.Т., Мицкевич, Н.И., Агабеков, В.Е. Механизм жидкофазного окисления кислородсодержащих соединений. 1975, с. 139-153, Наука и техника, Москва
  259. Imai, Y., Sato, R., Iyanagi, T. Rate-limiting step in the reconstituted microsomal drug hydroxylase system. J. Biochem., 1977, 82, 1237-1246
  260. Pauling, L. Nature of the iron? Oxygen bond in oxyhaemoglobin. Nature, 1964, 203, 182-183
  261. Sugawara, Y., Shikama, K. Autoxidation of native oxymyoglobin. Thermodynamic analysis of the pH profile. Eur. J. Biochem., 1980, 110, 241-246
  262. Головенко, Н.Я. Механизмы реакций метаболизма ксенобиотиков в биологических мембранах. Киев, Наукова думка, 1981, 220
  263. Головенко, Н.Я. Некоторые аспекты биохимии, химии, молекулярной биологии и генетики цитохрома р-450 (обзор литературы) . [http://www.medved.kiev.ua/arhiv\\_mg/st\\_2001/01\\_3\\_3.htm](http://www.medved.kiev.ua/arhiv_mg/st_2001/01_3_3.htm)
  264. Мишин, М.М., Ляхович, В.В. Множественные формы цитохрома Р-450. Новосибирск, Наука, 1985, 181

265. Ahrqwal, A., Shapiro B. Phenobarbital induction of hepatic CYP2B1 and CYP2B2 pretranscriptional and posttranscriptional effects of gender, adult age and phenobarbital dose // *Mol. Pharmacol.*, 1996, 49, 523-531
266. Ioannides, C., Parke, D.V. The cytochrome P 450. Gene family of microsomal hemoproteins and their role in the metabolic activation on chemicals // *Drug Metab. Rev.*, 1990, 27, 1-85
267. Honkakoski, P., Negishi, M. Characterisation of a phenobarbital —responsive enhancer module in mouse P450 CYP2b10 gene // *J.Biol.Chem.*, 1997, 272, 23,14943-14949
268. Mugford, C.A., Kedderis, G.Z. Sex-dependent metabolism of xenobiotics // *Drug. Metab. Rev.*, 1998, 30, 3, 441-498
269. Nebert, D.W., Adesnik M., Coon, M.J., Estabrook, R.W., Gonzalez, F.J., Guengerich, F.P., Gunsalus, I.C., Johnson, E.F., Kemper, B., Levin, W., Phillips, I.R., Sato, R., Waterman, M.R. The P450 gene superfamily: recommended nomenclature. *DNA*, 1987, 6, 1-11
270. Salaün, J.P. Metabolization de xenobiotiques par des monooxygenases a cytochrome P-450 chez les plantes. *Oceanis* 17, 1991, 459-474
271. Chapple, C. Molecular-genetic analysis of plant cytochrome P450-dependent monooxygenases. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 49, 1998, 311-343
272. <http://drnelson.utmen.edu/homepage.html>
273. <http://www.icgeb.trieste.it/p450>
274. <http://gdbdoc.gdb.org/~avoltz/450-html>
275. Nebert, D.W., Gonzales, F.J. P450 genes: Structure, evolution and regulation // *Annu.Rev.Biochem.*, 1987, 56, 3, 572-593
276. Nelson, D.R., Strobel, H.W. Evolution of cytochrome P-450 proteins // *Mol.Biol.Evol.*, 1987, 4, 2, 572-593
277. Nelson, D., Koymans, Z., Kamataki, T. et al. P 450 superfamily: update on new sequence, gene mapping, accession numbers and nomenclature // *Pharmacogenetics*. 1996, 6, 1-42
278. Archakov, A., Zisitsa, A., Zgoda, V. et al. Censterization of P 450 superfamily using the objective pair alignment method and UPGMA program // *J. Mol. Model.*, 1998, 4, 153-158
279. Nelson, D.R., Kamataki, T., Waxman, D.I. et al. The P450 superfamily: update on new sequence, gene mapping, accession numbers, early trivial names, and nomenclature // *DNA Cell Biol.*, 1993, 12, 1, 1-15
280. Juchau, M., Boutelet-Bochan, H., Huang, Y. Cytochrome P-450-dependent biotransformation of xenobiotics in human and rodent embryonic tissues // *Drug Metabolism Reviews*. 1998, 30, 3, 541-568
281. მ. გორდეზიანი, გ. სატისაშვილი. მემბრანული ქსენობიოქიმია. თბილისი, 2005, 281

282. Sandermann, H. Mutagenic activation of xenobiotics by plant enzymes. *Mutation Res.*, 1988, 197, 183-194
283. Guengerich, F., Kim, D., Iwasaki, M. Role of human cytochrome P-450 2E1 in the oxidation of many low molecular weight cancer suspects // *Chem. Res. Toxicol.*, 1991, 4, 2, 168-179
284. Spracklin, D., Hankins, D., Fisher, K. et al. Cytochrome P 4502E1 in the principal catalyst of human oxidative haloethane metabolism in vitro. 1997, 281, 1, 400-411
285. David, R., Nelson, D.R., Strobel, H.W. On the Membrane Topology of Vertebrate Cytochrome P-450 Proteins. *J. Biol. Chem.*, 1988, 263, 6038-6050
286. Schuler, M.A. Plant cytochrome P450 monooxygenases. *Crit Rev Plant Sci* 15, 1996, 235-284
287. Didierjean, L., Gondet, L., Perkins, R., Lau S-MC, Schaller, H., O'Keefe, D.P., Werck-Reichhart, D. Engineering herbicide metabolism in tobacco and Arabidopsis with CYP76B1, a cytochrome P450 enzyme from Jerusalem artichoke. *Plant Physiol*, 130, 2002, 179-189
288. Durst, F., Benveniste, I., Lesot, A.A., Salaün, J.-P., Werck-Reichhart, D. Induction of plant cytochrome P-450. In *Redulation of Enzymatic Systems Detoxifying Xenobiotics in Plants*, Dordrecht/Boston/London, Kluwer Academic Publishers, 1997, 19-34
289. Bidleman, K., Mannering, G. J. Induction of drug metabolism. V. Independent formation of cytochromes P-450 and P1-450 in rats treated with phenobarbital and 3-methylcholanthrene simultaneously. *Mol. Pharmacol.*, 1970, 6, 679-701
290. Augenlicht, L.H., Argyris, T.S. Stimulation of immature mali rat liver growth by phenobarbital and 3-methylcholanthrene. *Expt. Mol. Path.*, 1975, 22, 1-10
291. Ляхович, В.В., Цырлов, И.И. Индукция ферментов метаболизма ксенобиотиков, Говосибирск, Наука, 1981, 242
292. Nebert, D.W., Felton, J.S. Importance of genetic factors influencing the metabolism of foreign compounds. *Fed. Proc.*, 1976, 35, 1133-1141
293. Poland, A., Glover, E. Chlorinated biphenyl induction of aryl hydrocarbon hydroxylase activity: a study of the structure-activity relationship. *Mol. Pharmacol.*, 1977, 13, 924-938
294. Еремин, А.Н., Усанов, С.А., Метелица, Д.И., Ахрем, А.А. Спектральные параметры взаимодействия высокоочищенных форм цитохрома P-450<sub>1m2</sub> и 1m4 с различными лигандами. *Биоорганическая химия*, 1980, 6, 757-764
295. Адрианов, Н.В., Уваров, В.Ю. Регуляция активности ферментных систем окисления чужеродных соединений. *Вести АМН СССР*, 1988, 1, 24-33
296. Pulco, A.J., He, J.S., Liang, Q. Induction by baibitirates of P-450 cytochromes and other drug metabolizing enzymes in bacteria and eukaryotes. *Abstr. 10-th Int. Symp. Microsomes and Drug Oxidat.* Toronto, July 18-21, 1994. Toronto, Univ., 1994, 62-64



297. Werck-Reichhart, D., Jones, O.T.G., Durst, F. *Biochem.J.*, 1988, 249, 473-480
298. Robertson, I.D. Unit membranes: A review with recent new studies of experimental alterations and new subunit structure in synaptic membranes. In: *Cellular Membranes in Development* (Locke, M., ed.). 1964, pp. 1-81. New York, Acad. Press
299. Микельсаар, Х., Северина, И.И., Скулачев В.П. Фосфолипиды и окислительное фосфорилирование Усп. совр. биол., 1974, 78, 348-370
300. Parry, G., Palmer, D.N., Williams, D.J. Ligand partitioning into membranes: its significance in determining  $K_m$  and  $K_s$  values for cytochrome P-450 and other membrane bound receptors and enzymes. *FEBS Lett.*, 1976, 67, 123-129
301. Ляхович, В.В., Цырлов, И.Б. Структурные аспекты биохимии монооксигеназ. Новосибирск, Наука, 1978, 236
302. Цырлов, И.Б., Ляхович, В.В. роль микросомальных фосфолипидов в организации и регуляции активности монооксигеназной системы. Усп. совр. биол., 1977, 84, 3-21
303. Sato, R., Omura, T. *Cytochrome P450*. Kodansha, Tokyo, 1978, 23-36
304. Strittmatter, P., Rogers, M.J. Apparent dependence of interactions between cytochrome  $b_5$  and cytochrome  $b_5$  reductase upon translational diffusion in dimyristoyl lecithin liposomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1975, 72, 2658-2661
305. Archakov, A.I., Karyakin, A.V., Skulachev, V.P. Intermembrane electron transfer in mitochondrial and microsomal systems. *FEBS Lett.*, 1974, 39, 239-242
306. Ruckpaul, K. The molecular organization of the liver microsomal monooxygenatic system. *Pharmazie*, 1978, 33, 310-312
307. Franklin, M.R., Estabrook, R.W. On the inhibitory action of mersalyl on microsomal drug oxidation: a rigid organization of the electron transport chain. *rch. Biochem. Biophys.*, 1971, 143, 318-329
308. Stier, A., Sackmann, E. Spin labels as enzyme substrates. Heterogeneous lipid distribution in liver microsomal membranes. *Biochim. Biophys. Acta*, 1973, 311, 400-408
309. Taniguchi, H., Imai, Y., Iyanagi, T., Sato, R. Interaction between NADPH-cytochrome P-450 reductase and cytochrome P-450 in the membrane of phosphatidylcholine vesicles. *Biochim. Biophys. Acta*, 1979, 550, 341-356
310. Taniguchi, H., Imai, Y., Sato, R. In: *Microsomes, Drug Oxidation and Chemical Carcinogenesis* (Coon, M.J., Conney, A.H., Estabrook, R.W., Gelboin, H.V., Gillette, J.R., O'Brien, P.J., eds.), 1980, V.1, pp. 985-988. Academic Press, New York
311. Lu, A.Y.H., Miwa, G.T. In: *Biochemistry, Biophysics, and Regulation of Cytochrome P-450: Proceedings of the Third European Meeting on Cytochrome P-450*, Held in Saltsjobaden, Sweden, June 16-19, 1980, 14
312. Miwa, G.T., West, S.B., Huang, M.T., Lu, A.Y. Studies on the association of cytochrome P-450 and NADPH-cytochrome c reductase during catalysis in a reconstituted hydroxylating system. *J. Biol. Chem.*, 1979, 254, 5695-5700
313. French, J.S., Guengerich, F.P., Coon, M.J. Interactions of cytochrome P-450,

- NADPH-cytochrome P-450 reductase, phospholipid, and substrate in the reconstituted liver microsomal enzyme system. *J. Biol. Chem.*, 1980, 255, 4112-4119
314. Бачманова, И.А., Карузина, И.И., Менгазетдинов, Д.Е. Тверитинов, В.Н., Погодина, О.К., Хайтина, С.З., Арчаков, А.И., Мясоедова, К.Н. Тепловая и протектитическая инактивация цитохрома Р-450. *Биохимия*, 1981, 46, 280-286
  315. Бородин, Е.А., Добрецов, Г.Е., Карасевич, Е.И., Карузина, И.И., Карякин, А.В., Кузнецова, Г.П., Спиринов, М.М., Арчаков, А.И. Влияния встраивания и выведения холестерина на вязкость липидного бислоя и скорость окислительных процессов в мембранах микросом печени крысы. *Биохимия*, 1981, 46, 1109-1118
  316. Аннаев, Б., Кольтовер, В.К., Мамедниязов, О.Н., Райхман, Л.М., Розенцев, Э.Г. Исследование молекулярной организации эндоплазматических мембран методом спинового зонда. *Биофизика*, 1980, 17, 224-230
  317. Duppel, W., Ullrich, V. Membrane effects on drug monooxygenation activity in hepatic microsomes. *Biochim. Biophys. Acta*, 1976, 426, 399-407
  318. Yang, C.S., Strickhart, F.S., Kicha, L.P. The effect of temperature on monooxygenase reactions in the microsomal membrane. *Biochim. Biophys. Acta*, 1977, 465, 362-370
  319. Ахрем, А.А. Еремин А.Н., Усанов, С.А., Метелица, Д.И. Влияние фазовых переходов в микросомальных мембранах на энергетические характеристики окисления. *Биохимия*, 1978, 43, 1578-1585
  320. Тищенко, И.В., Усанов, С.А., Метелица, Д.И. Влияние температуры на энергетические характеристики окисления нафталина микросомами кролика. *Биофизика*, 1980, 25, 762-763
  321. Курченко, В.П., Усанов, С.А., Метелица, Д.И. Реакционная способность LM<sub>4</sub>-формы цитохрома Р-450 из печени кроликов. *Биохимия*, 1981, 46, 1035-1041
  322. Lu, A.Y., Kuntzman, R., West, S., Jacobson, M., Conney, A.H. Reconstituted liver microsomal enzyme system that hydroxylates drugs, other foreign compounds, and endogenous substrates. II. Role of the cytochrome P-450 and P-448 fractions in drug and steroid hydroxylations. *J. Biol. Chem.*, 1972, 247, 1727-1734
  323. Oprian, D.D., Vatsis, K.P., Coon, M.J. Kinetics of reduction of cytochrome P-450LM<sub>4</sub> in a reconstituted liver microsomal enzyme system. *J. Biol. Chem.*, 1979, 254, 8895-8902
  324. French, J.S., Guengerich, F.P., Coon, M.J. Interactions of cytochrome P-450, NADPH-cytochrome P-450 reductase, phospholipid, and substrate in the reconstituted liver microsomal enzyme system. *J. Biol. Chem.*, 1980, 255, 4112-4119
  325. Bösterling, B., Trudell, J.R., Galla, H.J. Phospholipid interactions with cytochrome P-450 in reconstituted vesicles. Preference for negatively-charged phosphatidic acid. *Biochim. Biophys. Acta*, 1981, 643, 547-556
  326. Ingelman-Sundberg, M. Phospholipids and detergents as effectors in the liver microsomal hydroxylase system. *Biochim. Biophys. Acta*, 1977, 448, 225-234
  327. Ekström, G., Haaparanta, T., Rydström, J. In: *Biochemistry Biophysics and Regula-*

- tion of Cytochrome P-450, (Gustafsson, J.A., Carlstedt-Duke, Mode, A, Rafter, J., eds.) Elsevier- North Holland Biomedical Press, New York, 1980, 299-306
328. The structural Basis of Membrane Function. (Y. Hafeti, L. Djavadi-Ohanience, eds.) New York – San-Francisco – London. Academic Press. 1976, 409-427
329. Metelitz, D.I., Akhrem, A.A., Erjomin, A.N., Kissel, M.A., Usanov, S.A. The mechanism of hydroperoxide-dependent reactions with participation of cytochrome P-450. *Acta Biol. Med. Ger.*, 1979, 38 511-518
330. Ахрем, А.А., Кисель, М.А., Усанов, С.А., Метелица, Д.И. Влияние фосфолипидов на активность высокоочищенного цитохрома P-450 микросом печени в реакции гидроксирования анилина и нафталина гидроперекисями. *Прикл. биох. и микробиол.*, 1980, 16, 100-105
331. Ruckpaul, K., Rein, H., Blank, J., Ristau, O. Coon, M.J. In: *Biochemistry Biophysics and Regulation of Cytochrome P-450*, (Gustafsson, J.A., Carlstedt-Duke, Mode, A, Rafter, J., eds.) Elsevier- North Holland Biomedical Press, New York, 1980, pp. 539-549
332. Gibson, G.G., Cinti, D.L., Sligar, S.G., Schenkman, J.B. The effect of microsomal lipids on the spin state of purified de-lipidated cytochrome P-450. *Biochem. Soc. Trans.*, 1979, 7, 1289-1290
333. Ахрем, А.А., Киселев, П.А., Кисель, М.А., Усанов, С.А., Метелица, Д.И. Влияние фосфолипидов на спектральные характеристики высокоочищенного цитохрома P-450 микросом печени кролика. *ДАН СССР*, 1980, 245, 234-237
334. Gibson, G.G., Cinti, D.L., Sligar, S.G., Schenkman, J.B. The effect of microsomal fatty acids and other lipids on the spin state of partially purified cytochrome P-450. *J. Biol. Chem.*, 1980, 255, 1867-1873
335. Гордзениани, М.Ш., Дурмишидзе, С.В., Курашвили, Л.К. Восстановление фосфатидилхолином ингибированных детергентом реакции гидроксирования в целой растительной ткани. *Сообщ. АН ГССР*, 1981, 104, 465-468
336. Уваров, В.Ю., Бачманова, И.А., Арчаков, А.И., Сухомудренко, А.Г., Мясоедова, К.Н. Конформация и тепловая стабильность растворимого и встроенного в мембрану липосом цитохрома P-450. *Биохимия*. 1981, 46, 280-286

## თავი 2

### ოქსიგენაზები შიდაუჯრედულ მეტაბოლურ ცვლაში

#### 2.1 ციტოქრომ P450 მცენარის აზოტფიქსაციაში

პარკოსან მცენარეთა ფესვებში კოჟრის ბაქტერიები ბაქტერიოიდებად ტრანსფორმირდებიან. ისინი ბაქტერიების სიმბიოზურ ფორმებს წარმოადგენენ. ამ დროს ნივთიერებათა ცვლის ისეთი ღრმა ცვლილებები ხორციელდება, რომლებიც სიმბიოზური პირობებისათვის აბსოლუტურად ახალია და, როგორც ჩანს, სრულად ემსახურებიან აზოტის ფიქსაციის პროცესს. გარდა ამისა, მიმდინარე ცვლილებები ელექტრონებით უზრუნველყოფასა და ATP-ის ენერჯიას საჭიროებს [1]. N<sub>2</sub>-ის ბიოლოგიური აღდგენა ანაერობული პროცესია, მაგრამ ინტაქტურ ბაქტერიოიდებს ჟანგბადის გარეშე ფუნქციონირება მაინც არ შეუძლიათ. ამასთან დაკავშირებით ყველაზე მნიშვნელოვანი ისაა, რომ ბაქტერიოიდებში ციტოქრომული კომპონენტების შემცველობა თვისობრივადაა შეცვლილი: α-ჯგუფის ციტოქრომების გაქრობის ფონზე მათში თითქმის გაორმაგებულია C-ჯგუფის ციტოქრომების რაოდენობა და, რაც მთავარია, ჩნდებიან ციტოქრომული სისტემის ისეთი ახალი კომპონენტები, როგორებიცაა აუტოოქსიდაბელური CO-რეაქტიული ციტოქრომები P450 და C<sub>552</sub>. მათი თანამყოფობა მხოლოდ კოჟრის ბაქტერიების ბაქტერიოიდული ფორმებისთვის („ეფექტური“ ბაქტერიოიდებისთვის) არის დამახასიათებელი და ამიტომ საფიქრებელია, რომ მათი ინდუქცია ახლად შექმნილ ფუნქციებთან იყოს დაკავშირებული. მინდვრის მცენარის ბაქტერიოიდების ცენტრიფუგატების და ქვიშაზე გაზრდილი ხანჭოლას კოჟრების ბაქტერიოიდების სუსპენზიაში ყოველთვის შეიძლება გამოვავლინოთ ინტენსიური შთანთქმის ზოლი 425 ნმ-ზე მაქსიმუმით, რაც ციტოქრომ P450–CO კომპლექსისთვისაა დამახასიათებელი. აღმოჩნდა აგრეთვე, რომ ციტოქრომ P450 აქ ხსნადი სახითაა და თავისი სპექტრული თვისებებით ღვიძლის ენდოპლაზმური მემბრანების ჰემოპროტეინთან უფრო ახლოს დგას, ვიდრე ქაფურის მაჰიდროქსილირებელ ხსნად ბაქტერიულ ციტოქრომ P450-თან [2, 3]. ამ ციტოქრომის მაქსიმალური შემცველობა მცენარის ყვავილობის, ანუ აქტიური სუნთქვისა და აქტიური აზოტფიქსაციის ფაზას ემთხვევა.

ციტოქრომ P450-ის მეტაბოლურ ფუნქციებსა და ბაქტერიოიდების აზოტმაფიქსირებელ უნარს შორის უშუალო კავშირზე პირველი მოსაზრება ეპლბის [4] ეკუთვნის, რომელმაც აზოტის აღდგენის პროცესში ამ ჰემო-

პროტეინის შესაძლო როლზე გაამახვილა ყურადღება.

სოიის ფესვებიდან გამოყოფილი მსუნთქავი ბაქტერიები (*Rhizobium japonicum*) სუსპენზიაზე ოქსილეგჰემოგლობინის დამატებისას ეპლბიმ და თანაავტორებმა [5] გამოავლინეს ATP-ის დონისა და ATP/ADP-ის სიდიდის ზრდა. პარალელურად ადგილი ჰქონდა ნიტროგენაზას აქტივობის მატებას. მათ მიერ გამოყენებული ციტოქრომ P450-ის სპეციფიკური ინჰიბიტორის N-ფენილიმიდაზოლის კონცენტრაციების შემცირებისას ფარდობა ATP/ADP და ნიტროგენაზას აქტივობა ერთმანეთს შორის ხაზოვან დამოკიდებულებას ავლენდა. ამ მონაცემებზე დაყრდნობით ავტორებმა გამოთქვეს მოსაზრება იმის შესახებ, რომ ციტოქრომ P450 წარმოადგენს ჟანგვითი ფოსფორილების კომპონენტს, სადაც იგი ფუნქციონირებს როგორც მოლეკულური ჟანგბადის გადამტანი და არა როგორც ტერმინალური ოქსიდაზა.

## 2.2 ოქსიგენაზები ცხიმოვან მჟავათა ზეჟანგურ ჟანგვაში

ცნობილია, რომ უჯრედული მემბრანები უჯერი ცხიმოვანი მჟავებით მდიდარ ფოსფოლიპიდებს შეიცავს. ისინი მემბრანათა მაღალ ძვრადობას უზრუნველყოფენ. სტრესული ზემოქმედებისას (მაგ., ქსოვილთა ჰიპოქსიისას ან იშემიისას) ადგილი აქვს ცხიმოვან მჟავათა ზეჟანგური ჟანგვის რეაქციების გააქტიურებას. გარდა ამისა, მემბრანებში თავისუფალი რადიკალების ინიციაციას თან ახლავს ცხიმოვან მჟავებთან მათი ურთიერთქმედება, რომელიც წარმოქმნილი უჯერი ბმების რიცხვის ზრდის თანაზომიერად ძლიერდება. უჯერ ცხიმოვან მჟავათა ზეჟანგური ჟანგვის შედეგად სახეზე გვაქვს ერთი მხრივ, მემბრანის გაზრდილი სიბლანტე, მეორე მხრივ კი მისი უაღრესად დაქვეითებული ბარიერული ფუნქცია.

სადღეისოდ არ შეგვიძლია საბოლოო პასუხი გავცეთ კითხვას: რაში სჭირდება ლიპიდთა ზეჟანგური ჟანგვის პროცესი უჯრედს? მისი ჭეშმარიტი ფუნქციური როლის შეუცნობლობის მიუხედავად, ფიზიოლოგიური და განსაკუთრებით პათოლოგიური ცვლილებებისას ამ ტიპის რეაქციების აუცილებლობა არავითარ ეჭვს არ იწვევს. მოგვეპოვება სავსებით სარწმუნო ფაქტობრივი მასალა იმის შესახებ, რომ ლიპიდთა ზეჟანგური ჟანგვა დამახასიათებელია ყველა ნორმალური მეტაბოლიზმის მქონე ქსოვილისათვის. რაც უფრო აქტიურად ხორციელდება ნივთიერებათა ცვლა, მით მაღალია ლიპოპეროქსიდაციის დონე. არსებობს მოსაზრება (თუმცა ჯერ კიდევ სადისკუსიო) იმის შესახებ, რომ ეს პროცესი მემბრანათა მუდმივ თვითგან-

ახლებას ემსახურება და განსაკუთრებით ინტენსიურად იმ მემბრანებში მიმდინარეობს, რომლებიც ელექტრონის სატრანსპორტო სისტემებს შეიცავს.

ჯერ კიდევ გასული საუკუნის სამოციან წლებში ჰონშტეინის, ერნსტერისა და თანაავტორების მიერ [6-8] ნაჩვენები იქნა ცხოველის მიკროსომებში უნიკალური ფერმენტული სისტემის არსებობა, რომელიც მემბრანათა ლიპიდების ზეჟანგურ ჟანგვას აკატალიზებს. მათ მიერვეა ჩამოყალიბებული დებულება, რომლებიც დღემდე ძალაში რჩება: არსებობს პეროქსიდაციის ორი – ფერმენტული და არაფერმენტული სისტემა. პირველი სისტემა რედუცირებადი ექვივალენტების წყაროდ აღდგენილ NADPH-ს იყენებს და ინაქტივდება გაცხელებით ან *p*-ქლორმერკურიბენზოატით. არაფერმენტული ლიპოპეროქსიდაციის სისტემა აღმდგენელად ასკორბატს იყენებს და არამგრძობიარეა ტემპერატურისა და სულფჰიდრილური შხამების მიმართ.

ფოსფოლიპიდთა შემადგენლობაში მყოფი უჯერი რიგის ცხიმოვან მჟავათა ნაშთების ფერმენტული ზეჟანგური ჟანგვა იმ ერთ განსაკუთრებულ რეაქციათა კლასს მიეკუთვნება, რომელიც ენდოპლაზმურ მემბრანებში ლოკალიზებული ფერმენტული კომპლექსით ხორციელდება. ამ შემთხვევაში განსაკუთრებულ ინტერესს იძენს ამ პროცესში მიკროსომული NADPH-სპეციფიკური ფლავოპროტეინისა და ციტოქრომ P450-ის მონაწილეობის საკითხი.

პირველი მონაცემები, რომ ლიპიდთა ზეჟანგური და ქსენობიოტიკთა ჟანგვა ერთი და იგივე ფერმენტებით კატალიზდება, ერნსტერსა და მის თანამშრომლებს [9-10] ეკუთვნით. ამ დასკვნამდე ისინი შემდეგ ფაქტებზე დაყრდნობით მივიდნენ:

1. ქსენობიოტიკთა ჟანგვის პროდუქტები აინჰიბირებენ NADPH-დამოკიდებულ ლიპიდთა პეროქსიდაციას;
2. მიკროსომული პრეპარატების “დაბერებისას”, როდესაც ქსენობიოტიკთა ჟანგვის ინტენსივობის მკვეთრი დაქვეითება ხდება, მათი მხრიდან NADPH-დამოკიდებული ზეჟანგური ჟანგვის ინჰიბირება იხსნება.

აღნიშნული ფაქტების ასახსნელად ამ მკვლევართა მიერ გამოითქვა მოსაზრება, რომლის თანახმადაც ორივე პროცესში NADPH-ის მჟანგველი ელექტრონ-სატრანსპორტო ფერმენტული კომპლექსი მონაწილეობს. ახლად გამოყოფილ მიკროსომებში ქსენობიოტიკები ამ კომპლექსზე დომინირებენ, რის გამოც NADPH-ის ძირითადი ფონდი მათ დეგრადაციაშია ჩართული, ხოლო ლიპიდური პეროქსიდაცია დათრგუნულია. “ასაკოვან” მიკროსომებში “მონოპოლირების” ეფექტი ქრება და NADPH-ის მჟანგველი სისტემა აქ-

ტიურად ერთვება ლიპიდურ პეროქსიდაციაში. ამ შემთხვევაში NADPH-სპეციფიკური ფლავოპროტეინი განსაკუთრებით ეფექტური ხდება ორვალენტური რკინის კომპლექსთან ( $ADP-Fe^{2+}$ -ის, ან  $EDTA-Fe^{2+}$ -ის თანამყოფობისას).

ლიპიდთა ზეჟანგურ ჟანგვასა და ქსენობიოტიკთა ჰიდროქსილირებაში NADPH-სპეციფიკური ფლავოპროტეინის მონაწილეობის მტკიცებულებები შეიძლება შემდეგი დებულებების სახით ჩამოყალიბდეს [11]:

1. ორივე პროცესი სპეციფიკურია NADPH-ის მიმართ და მისი NADH-ით შეცვლისას არ მიმდინარეობს;
2. არსებობს კორელაცია NADPH-ციტოქრომ P450-რედუქტაზულ აქტივობასა და ცხიმოვან მჟავათა NADPH-სპეციფიკური ზეჟანგური ჟანგვის რეაქციის სიჩქარეთა შორის;
3. NADPH-ციტოქრომ P450-რედუქტაზას კონკურენტული ინჰიბიტორი – დაჟანგული  $NADP^+$  ასევე წარმატებით თრგუნავს NADPH-დამოკიდებულ ზეჟანგურ ჟანგვას;
4. ფერმენტული რეაქციების სამივე ტიპი – NADPH-ციტოქრომ P450-ის ოქსიდორედუქცია, NADPH-სპეციფიკური ჰიდროქსილირება და NADPH-დამოკიდებული ზეჟანგური ჟანგვა ერთნაირად სტერეოსპეციფიკურია;
5. მენადიონი (ვიტამინი  $K_3$ ) – ხელოვნური აქცეპტორი, რომლის მიმართაც NADPH-სპეციფიკური ფლავოპროტეინის სწრაფვა უაღრესად მაღალია, ერთნაირად თრგუნავს დიმეთილანლინის დემეთილირებას და ლიპიდთა ზეჟანგურ ჟანგვას;
6. NADPH-სპეციფიკური ფლავოპროტეინი, ქსენობიოტიკთა ჰიდროქსილირება და ლიპიდთა ზეჟანგური ჟანგვა ერთნაირად ექსტრემალურად მგრძობიარეა პროტეაზების მოქმედების მიმართ. ტრიპსინი და პრონაზა დაბალ ტემპერატურაზეც კი შერჩევითად ახდენენ ფლავოპროტეინის სოლუბილიზაციას და მკვეთრად ამუხრუჭებენ ჰიდროქსილირებისა და ლიპიდთა პეროქსიდაციის პროცესებს;
7. ცხიმოვან მჟავათა ზეჟანგური ჟანგვის სისტემა შეიძლება რეკონსტრუირდეს ლიპოსომებისა და NADPH-სპეციფიკური ფლავოპროტეინისაგან;
8. NADPH-ციტოქრომ P450-რედუქტაზის ანტისხეული აინჰიბირებს ზეჟანგურ ჟანგვას.

ჩამოთვლილი მტკიცებულებები ცალსახად მიუთითებენ იმაზე, რომ NADP-ციტოქრომ P450-რედუქტაზა საწყის რგოლს წარმოადგენს ჰიდროქსილირებისა და ზეჟანგური ჟანგვის რეაქციებში.

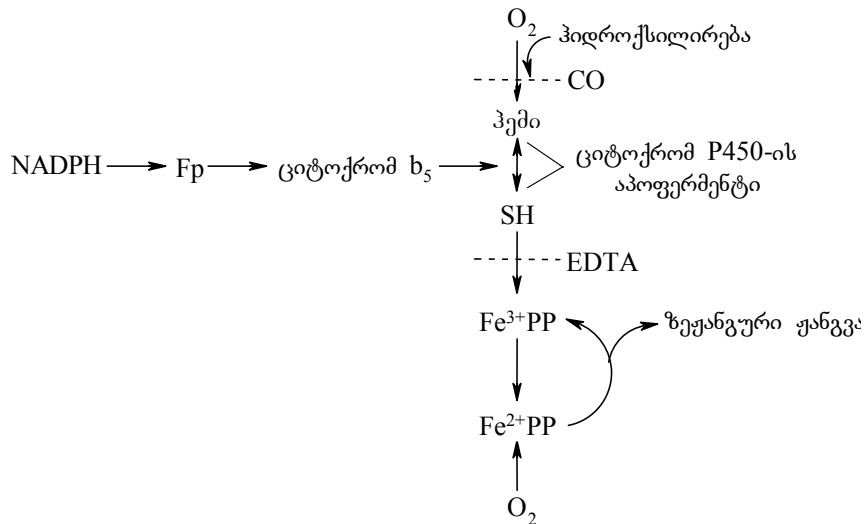
საჭიროა აღინიშნოს, რომ არსებობს მონაცემები, რომელთა თანახმადაც ამ ფერმენტის ნაცვლად ორივე პროცესში ელექტრონთა გადატანის ჯაჭვის სხვა კომპონენტი მონაწილეობს. ამის სასარგებლო მნიშვნელოვანი ფაქტი იმაში მდგომარეობს, რომ მიკროსომებში ლიპიდთა პეროქსიდაცია და ქსენობიოტიკთა ჰიდროქსილირება *p*-ქლორმერკურობენზოატით ითრგუნება, მაშინ როდესაც ამ შხამის მიმართ NADPH-ფლავოპროტეინი არამგრძობიარეა [6-8]. მეორე ფაქტის თანახმად პროტეაზებით სოლუბილიზებული ფერმენტი სუპერნატანტში აქტივობის დაუკარგავად გადადის, მაგრამ ამ დროს ჰიდროქსილირებისა და პეროქსიდაციის პროცესები დამუხრუჭებულია. როგორც ჩანს, პროტეაზების მიერ ელექტრონის სატრანსპორტო ჯაჭვიდან ამ საწყისი კომპონენტის “ამოგლეჯა” ჯაჭვის მომდევნო უბნებს აღდგენის უნარს აკარგვინებს. ცნობილია, რომ ეს ფერმენტი მემბრანის ზედაპირზეა ლოკალიზებული და მასთან დასაკავშირებლად გამოიყენება არა ლიპიდები, არამედ მემბრანული ცილების ამინომჟავური ნაშთები. სწორედ ამის მიზეზი უნდა იყოს პროტეაზების მაღალი მასოლუბილიზებული ეფექტი. მემბრანულ ცილებთან სუსტი კონტაქტი საფიქრებელს ხდის, რომ ზეჟანგური ჟანგვის ინიციაციაში ფლავოპროტეინი უშუალოდ არ მონაწილეობს. ამისათვის საჭიროა სივრცობრივი სიახლოვე რადიკალების წარმოქმნელ ცენტრებსა და ფერმენტულ ზეჟანგურ ჟანგვის უბნებს შორის. ამ მოსაზრებიდან გამომდინარეობს, რომ ლიპიდთა ფერმენტული პეროქსიდაციის წარმატებით განხორციელებისათვის NADPH-სპეციფიკური ფლავოპროტეინი აუცილებელია, მაგრამ პროცესის ინიციაცია არა ამ პირველ კომპონენტთან, არამედ უფრო მოშორებით, სადღაც შუალედ, ან ჯაჭვის ტერმინალურ უბანზე ხდება.

მიკროსომული მემბრანების NADPH-სპეციფიკური რედოქს-სისტემის ცალკეული კომპონენტის თვისებათა განხილვა არ იძლევა რომელიმე მათგანზე ლიპიდთა პეროქსიდაციის ზუსტი ლოკალიზაციის დადგენის საშუალებას, რადგან თავისუფალი რადიკალები, რომლებიც ზეჟანგურ ჟანგვას ინიცირებენ, შეიძლება წარმოიქმნას როგორც საწყის (თვითჟანგვადი ფლავინის), ასევე ტერმინალურ (ციტოქრომ P450-ის) უბნებზე. ძნელია ამ პროცესში ელექტრონის სატრანსპორტო ჯაჭვის შუალედური უბნის როლზე მსჯელობა, მით უმეტეს თუ ჩავთვლით, რომ აქ ციტოქრომი ხ<sub>5</sub> იმყოფება.

ცხიმოვან მჟავათა პეროქსიდაციაში მნიშვნელოვანია საკითხი ციტოქრომ P450-ის მონაწილეობის შესახებ. პირველი მონაცემები ამის სასარგებლოდ არჩაკოსა და მის თანამშრომლებს [11] ეკუთვნით. აღნიშნულ



მკვლევართა თანახმად ჰემოპროტეინის აქტიურ ცენტრში მყოფი აპოფერმენტის SH-ჯგუფთან რკინის პიროფოსფატის (FePP) დაკავშირებას თავისუფალი რადიკალების გენერირებადი ახალი ცენტრების ჩამოყალიბება მოსდევს (ნახ. 2.1). ამ შემთხვევაში არ ხდება ნახშირბადის მონოოქსიდით აქტივობის დათრგუნვა, ხოლო ციტოქრომ P450 ფუნქციონირებს არა როგორც ჰემოპროტეინი, არამედ როგორც არაჰემური გოგირდშემცველი რკინაპროტეინი. მიკროსომულ ელექტრონთა სატრანსპორტო სისტემაში ციტოქრომ P450 ერთადერთი გადამტანია, რომელსაც აქტიურ ცენტრში SH-ჯგუფები გააჩნია და ელექტრონების ტრანსპორტში მონაწილეობის მიღება შეუძლია. ზეჟანგური ჟანგვის ფერმენტული სისტემა კი მგრძობიარეა SH-ჯგუფების ისეთი შხამების მიმართ, როგორებიც *p*-ქლორმერკურიბენზოატი, HgCl<sub>2</sub> და მერსალილია.



ნახ. 2.1. ციტოქრომ P450-ის ფუნქციონირება ჰიდროქსილირებისა და ზეჟანგური ჟანგვის რეაქციებში [11].

როგორც ჩანს, SH-ჯგუფი ლიპიდურ პეროქსიდაციაში მხოლოდ ენდოგენურ რკინასთან კომპლექსირებისას ერთვება. ასკორბატდამოკიდებულ არაფერმენტულ ზეჟანგურ ჟანგვაში SH-ჯგუფების როლი გამორიცხულია, რადგან ეს პროცესი სულფჰიდრილური ჯგუფების შხამების მიმართ არამგრძობიარეა.

სოიოს ნაზარდებიდან მიღებულ მიკროსომულ ფრაქციაზე ჩვენს ლაბო-

რატორიაში ჩატარებული გამოკვლევებით [12] დადგენილ იქნა, რომ ლიპოპეროქსიდაციის (მალონის დილდეჰიდის წარმოქმნის მიხედვით) როგორც ფერმენტული, ასევე არაფერმენტული პროცესი დიმეთილანილინის N-დემეთილირების გაძლიერებას იწვევს.  $Fe^{2+}$ -ისა და NADPH-ის თანამყოფობისას ლიპიდური პეროქსიდაციის ორივე ტიპის რეაქციები თითქმის სინერგიულად ჯამდება. პარალელურად ადგილი აქვს ფრაქციის N-დემეთილაზური აქტივობის ზრდას. ფოსფატიდილქოლინი, რომელსაც ანტიოქსიდანტური თვისებები გააჩნია, ლიპიდთა ზეჟანგურ ჟანგვას აინჰიბირებს, ხოლო N-დემეთილირების რეაქციას ასტიმულირებს. ფოსფატიდილეთანოლამინს ასეთი გამოკვეთილი მოქმედება არ გააჩნია. საფიქრებელია, რომ მისი ნახშირწყალბადოვანი ნაშთის უჯერი ბმები თვითონ ხდებიან თავისუფალი რადიკალებისათვის მოხერხებულ სამიზნედ. მიღებული მონაცემების საფუძველზე დასაშვებად მივიჩნით მოსაზრება, რომ მცენარეში მოცემული ქსენობიოტიკის ჟანგვის პროცესი რადიკალურ სტადიას შეიცავს, თუმცა იგი ლიპიდური პეროქსიდაციისაგან გარკვეული დამოუკიდებლობით ხასიათდება. თავისთავად ეს ბუნებრივიცაა: მცენარის ინტაქტურ უჯრედში ამ ორ პროცესს შორის NADPH-ისათვის აშკარა კონკურენცია არ უნდა ვლინდებოდეს, რადგან ამ კოფერმენტის ისეთი მძლავრი გენერირებადი სისტემა ფუნქციონირებს, როგორც ფოტოსინთეზია.

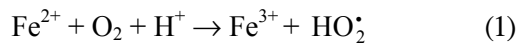
გამოთქმულია მოსაზრება იმის შესახებ, რომ ფერმენტული და არაფერმენტული ლიპოპეროქსიდაციის ინიციაცია ანალოგიური მექანიზმებით უნდა ხდებოდეს [11]. რეაქციაში მოქმედი  $ADP-Fe^{3+}$  ან პირდაპირ აღდგენას განიცდის რედუქტაზით, ან ქსანთინოქსიდაზას შემთხვევაში არაპირდაპირ აღდგება სუპეროქსიდ-რადიკალით. წარმოქმნილი პერფენილიონი შემდგომში პოლიუჯერ ცხიმოვან მჟავებთან რეაგირებს და ზეჟანგურ ჟანგვას ინიცირებს. პეროქსიდაციის ყველა სისტემა ემორჩილება სუპეროქსიდდისმუტაზას მაინჰიბირებელ გავლენას, თუმცა თავისთავად სუპეროქსიდ-რადიკალს მისი ინიცირება არ შეუძლია. ჰიდროქსილის რადიკალები ფიზიოლოგიურ პირობებში ლიპიდთა ზეჟანგურ ჟანგვაში მნიშვნელოვან როლს არ უნდა ასრულებდნენ. სუპეროქსიდდისმუტაზას მაინჰიბირებელი მოქმედება ქოლათით სოლუბილიზებულ ფოსფატიდილქოლინისა და ფოსფატიდილეთანოლამინის თავისუფალ ჟანგვაზე, აგრეთვე ლიპოსომებში ფოსფატიდილქოლინის ჟანგვაზე გამოვლენილია ერთროციტებში [13]. ეს ფაქტი არაპირდაპირ მიუთითებს, რომ ლიპიდთა პეროქსიდაციაში სუპეროქსიდური რადიკალები მონაწილეობენ.

ლიპიდთა ზეჟანგური ჟანგვის NADPH-დამოკიდებულ ფერმენტულ

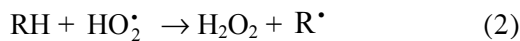
სისტემაში შეისწავლებოდა ჟანგბადის აქტიური ფორმების წარმოქმნის მექანიზმი [14]. სპინური დამჭერების მეთოდით, აგრეთვე სუპეროქსიდის-მუტაზისა და კატალაზას გამოყენებით დადგინდა, რომ NADPH-დამოკიდებული ლიპოპეროქსიდაციის ინიცირება ღვიძლის მიკროსომებში ხორციელდება ჟანგბადის აქტიური ფორმების საშუალებით, რომლებიც მიკროსომულ რედოქს-ჯაჭვში ჟანგბადის თანმიმდევრული ერთელექტრონიანი აღდგენის გზით წარმოიქმნებიან. ჟანგბადის რადიკალების გენერირებაზე პასუხისმგებელ უბანს NADPH-ციტოქრომ P450-რედუქტაზა წარმოადგენს. მის გარეშე NADPH-დამოკიდებული ზეჟანგური ჟანგვა პრაქტიკულად არ მიმდინარეობს. ევზოგენური რკინის თანამყოფობისას ზეჟანგური ჟანგვა ელექტრონის გადატანის სწორედ ამ უბანზე დაფიქსირდა.

### 2.2.1 ჯაჭვის გაგრძელების სტადია

ლიპიდთა პეროქსიდაცია იმ თავისუფალ-რადიკალური ჯაჭვური მექანიზმით ხორციელდება, რომელიც მოლეკულური ჟანგბადით ნებისმიერი ორგანული ნაერთის უშუალო ჟანგვის რეაქციებისთვისაა დამახასიათებელი. პროცესი მხოლოდ იმ შემთხვევაში დაიწყება, თუ სისტემაში თავისუფალი რადიკალები გაჩნდება [15, 16]. მაგალითად, მოლეკულური ჟანგბადით ორვალენტიანი რკინის დაჟანგვისას წარმოიქმნება  $\text{HO}_2^{\cdot}$ -ტიპის რადიკალი:



მაღალი რეაქციისუნარიანობის გამო წარმოქმნილი რადიკალი რეაგირებს გარემომცველ მოლეკულებთან, კერძოდ, ცხიმოვან მჟავებთან და ნახშირწყალბადოვანი ( $\text{R}^{\cdot}$ ) რადიკალი მიიღება:



ამ ორი რეაქციით იწყება ჟანგვის ჯაჭვური პროცესი. ამიტომ მათ ჯაჭვის ინიცირების სტადიას უწოდებენ.

ლიპიდთა ჟანგვაში  $\text{Fe}^{2+}$  ორმაგ როლს თამაშობს: ერთი მხრივ, ისინი შლიან ჰიდროზეჟანგებს და ამით აჩქარებენ ჟანგვის პროცესს; მეორე მხრივ კი აჩერებენ ჯაჭვური პროცესის დაწყებას ჰიდროზეჟანგების პირველადი წარმოქმნის დამუხრუჭების გზით და ამდენად ანტიოქსიდანტის თვისებას ავლენენ [17, 18]. როდესაც  $[\text{ROOH}] \gg [\text{Fe}^{2+}]$ , რკინის იონები, როგორც კატალიზატორები, ლიპიდური ზეჟანგების წარმოქმნაში მონაწი-

ლებენ, ხოლო თუ  $[Fe^{2+}] \gg [ROOH]$ , რკინის იონები მოქმედებენ, როგორც ანტიოქსიდანტები. უჯრედში რკინის შესაძლო აღმდგენ ნაერთებს მიეკუთვნება ცისტეინი და ასკორბინის მჟავა. გამორიცხული არაა ისიც, რომ ალდგენაში ცილის სულფჰიდრილური ჯგუფებიც მონაწილეობდნენ [19].

ანტიოქსიდანტური აქტივობა გააჩნია ტოკოფეროლისა და დიფენილურ წარმოებულებს, რომლებიც ტიპიურ რადიკალურ “დამჭერებს” წარმოადგენენ. მათი გავლენით ზეჟანგური ჟანგვის დამუხრუჭება უმნიშვნელოვანესი არგუმენტია ამ პროცესში თავისუფალი რადიკალების წარმოქმნის მტკიცების სასარგებლოდ [6].

თავისუფალ რადიკალთა მნიშვნელოვანი თვისება ისაა, რომ რამდენჯერაც არ უნდა მოხდეს მოლეკულებთან ურთიერთქმედება, მათი რიცხვი მაინც უცვლელი რჩება (თავისუფალი ვალენტობის მოუსპობლობის პრინციპი). ჟანგბადის თანამყოფობის პირობებში  $R^{\bullet}$  რადიკალები მასთან ურთიერთქმედებენ, რის შედეგადაც ახალი  $RO_2^{\bullet}$  რადიკალი მიიღება, რომელსაც ზეჟანგურ რადიკალს უწოდებენ:

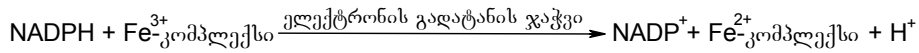
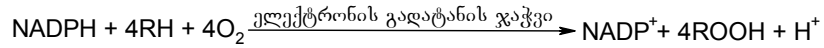
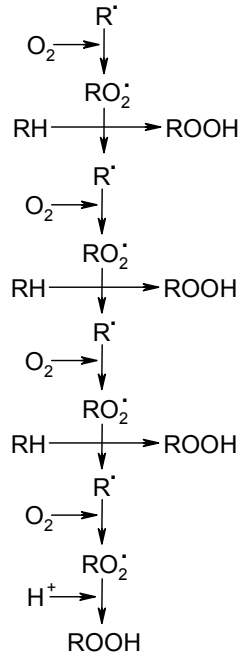
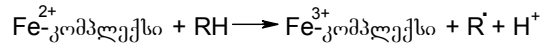


ზეჟანგურ რადიკალს უჯერ ცხიმოვან მჟავას ახალ მოლეკულებთან რეაგირება შეუძლია. ამ დროს წარმოიქმნება ჰიდროზეჟანგი ( $ROOH$ ) და ისევ  $R^{\bullet}$  რადიკალი მიიღება:



ამ ორი რეაქციის მონაცვლეობას იქამდე მივყავართ, რომ პროცესში ლიპიდისა ( $RH$ ) და ჟანგბადის ახალი მოლეკულები ერთვება. ამის შედეგად წარმოიქმნება ჰიდროზეჟანგები, ხოლო  $R^{\bullet}$  და  $RO_2^{\bullet}$  რადიკალების ჯამური რაოდენობა პრაქტიკულად უცვლელი რჩება (ნახ. 2.2). პროცესის ამ სტადიას “პროლონგაციის” (განხანგრძლივების) სტადიას უწოდებენ. მთლიანი პროცესის სიჩქარეს ზეჟანგური რადიკალებისა და ლიპიდის მოლეკულების შედარებით ნელი ურთიერთქმედების რეაქცია განსაზღვრავს.

თავისუფალი რადიკალები უჯერი ცხიმოვანი მჟავის მხოლოდ ახალ-ახალ მოლეკულებთან რომ რეაგირებდნენ, მაშინ ჟანგბადით საკმარისად უზრუნველყოფისას ერთადერთი რადიკალიც კი მოცემულ ნიმუშში არსებულ ყველა ცხიმოვან მჟავას ზეჟანგად გარდაქმნიდა. სინამდვილეში ეს ასე არ ხდება, რადგან ადგილი აქვს რადიკალების „ჩაქრობას“ [8].



ნახ. 2.2. მიკროსომებში ზეჟანგური ჟანგვის რეაქციის მექანიზმი.

$\text{Fe}^{2+}$ -კომპლექსი – რადიკალინიცირებადი ცენტრი;

RH – ერთი ორმაგი კავშირის მქონე უჯერი ცხიმოვანი მჟავა [20].

ეს იმ შემთხვევაშია შესაძლებელი, თუ რადიკალები მოქმედებენ:

– ერთმანეთთან, მაგ.:



– ცვალებადი ვალენტობის მქონე მეტალებთან (მჟავე არეში), მაგ.:

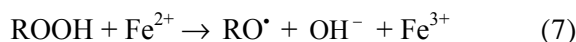


– ანტიოქსიდანტების მოლეკულებთან, მაგ.:  $\alpha$ -ტოკოფეროლთან (AnH-თან)

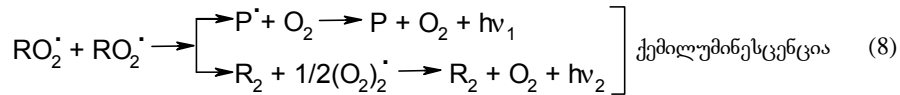


პირველ ორ შემთხვევაში მოლეკულური პროდუქტები წარმოიქმნება, ხოლო მესამეში მცირედ აქტიური რადიკალები მიიღება, რომელთაც ახალ ცხიმოვან მჟავებთან რეაქციაში შესვლის უნარი დაკარგული აქვთ. ნებისმიერ შემთხვევაში ხდება ჯაჭვური რეაქციების შეჩერება, ანუ გაწყვეტა. თავისუფალი რადიკალის წარმოქმნის მომენტიდან მის გაქრობამდე  $\text{R}^\bullet$ -ისა და  $\text{RO}_2^\bullet$ -ის მონაწილეობით რამდენიმე თანმიმდევრული ციკლური რეაქცია მიმდინარეობს. ამის შედეგად სისტემაში ყოველ წარმოქმნილ რადიკალზე ჰიდროზეფანგის რამდენიმე მოლეკულა ჩნდება. ეს რიცხვი ჯაჭვური რეაქციების რაოდენობას, ანუ ჯაჭვის სიგრძეს ახასიათებს. როგორც ჩანს, ჯაჭვის სიგრძე მისი გაწყვეტით ისაზღვრება და იგი ანტიოქსიდანტების თანამყოფობისას მოკლდება. ამით ხსნიან თავისუფალ-რადიკალურ პროცესებზე ანტიოქსიდანტების ინჰიბიტორულ მოქმედებას.

განხილული სურათი ჟანგვის განუტოტველი ჯაჭვებისთვისაა დამახასიათებელი. ცვალებადი ვალენტობის მქონე მეტალთა იონების, კერძოდ, ორვალენტური რკინის თანამყოფობისას ჯაჭვურ რეაქციაში წარმოქმნილი ჰიდროზეფანგის დაშლა ხდება:

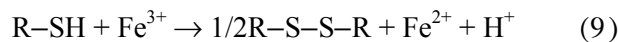


ამ დროს ახალი თავისუფალი რადიკალები ჩნდება და ჟანგვის ახალი ჯაჭვის ინიციატორი ხდება. ამ შემთხვევაში ზეჟანგური ჟანგვის პროცესის განტოტვა ხდება ჯაჭვური რეაქციების მექანიზმით. ზეჟანგური ჟანგვის სიჩქარეს ამჯერად განტოტვის ზემოთ მოყვანილი რეაქცია (7) განსაზღვრავს. მოდელურ ცდებში  $\text{Fe}^{2+}$ -ის სიჭარბისას რეაქციის სიჩქარე უპირატესად რეაგენტის ( $\text{ROOH}$ ) კონცენტრაციაზეა დამოკიდებული. მისი სწრაფი დაგროვება იმას იწვევს, რომ მთლიან პროცესს თვითაჩქარებული (ფეთქებადი) ხასიათი ეძლევა. აფეთქებასთან ზეჟანგური ჟანგვის ამ სტადიის განვითარების ანალოგიას ის განაპირობებს, რომ პროცესს თან ახლავს ნათება (ქემილუმინესცენცია), რომლის რეგისტრირებითაც რეაქციის კინეტიკა და მექანიზმი შეისწავლება [19].



აქ P – რეაქციის პროდუქტია (შესაძლოა – კეტონი), ხოლო  $h\nu_1$  და  $h\nu_2$  – სინათლის ენერჯის (ფოტონის) თითო ქვანტია. ოლეინმჟავას ჟანგვისას ქემილუმინესცენციის სპექტრში 390, 460, 550 და 600 ნმ-ებზე შთანთქმის მაქსიმუმები ჩნდება, რომელთაგან ნაწილი, როგორც ჩანს, კარბონილის ჯგუფებს, ნაწილი კი – ჟანგბადის დიმერებს ეკუთვნის.

უჯრედში ჯაჭვების განტოტვის რეაქციის სიჩქარე უპირატესად იონების კონცენტრაციით და ლოკალიზაციით განისაზღვრება; დაუკავშირებელი ან დაჟანგული რკინა არააქტიურია, ამიტომ ზეჟანგური ჟანგვის სიჩქარე საბოლოო ჯამში დამოკიდებული იქნება სისტემაში რკინის მდგომარეობაზე და იმ აგენტებზე, რომლებიც მის შეკავშირებასა და აღდგენას უზრუნველყოფენ (მაგ., მემბრანული ცილების სულფჰიდრილური ჯგუფები):



ბენზპირენის მეტაბოლიზმის რეაქციაში რკინის იონები ასტიმულირებენ ინტერმედიატის წარმოქმნას, რომელიც მჭიდროდ უნდა იყოს დაკავშირებული ლიპიდთა ზეჟანგურ ჟანგვასთან [21]. პროოქსიდანტები  $\text{Fe}^{2+}$  და  $\text{CCl}_4$  ერთნაირ მასტიმულირებელ მოქმედებას ავლენენ არამარტო ლიპიდურ პეროქსიდაციაზე, არამედ მონოოქსიგენაზურ სისტემაზე და ააქტიურებენ NADPH-დამოკიდებულ ბენზპირენის ჰიდროქსილირებას; ე.ი. ლიპიდური რადიკალები საერთო ინტერმედიატს წარმოადგენენ ორივე ტიპის რეაქციაში. მთლიანობაში ზეჟანგური ჟანგვა შეიძლება განხილულ იქნას, როგორც იმ ლიპიდური რადიკალების უტილიზაციის ალტერნატიული გზა, რომლებიც პოლიციკლური ნახშირწყალბადების ჰიდროქსილირებაში არ მონაწილეობენ. საყურადღებოა, რომ თირკმლის მიკროსომებში იდენტიფიცირებულია ციტოქრომ P450-ის მსგავსი ჰემოპროტეინი, რომელიც P450<sub>L</sub>-დაა წოდებული [22]. იგი მონაწილეობს ლაურინმჟავას ჟანგვაში და CO-სთან კომპლექსირებისას შთანთქმის პიკს იძლევა 453-454 ნმ-ზე. NADPH-ისა და მოლეკულური ჟანგბადის თანამყოფობისას ამ ჰემოპროტეინის შემცველი თირკმლის ქერქის მიკროსომები აკატალიზებენ ლაურინმჟავას ჰიდროქსილირებას და წარმოიქმნება ω- და (ω-1)-ჰიდროქსიწარმოებულები. შედეგად მიიღება ორი პროდუქტი 2:1 შეფარდებით. ლაურინ-

მჟავას ჰიდროქსილირება ციტოქრომ P450-ის ფუნქციაა. ამ რეაქციის მსვლელობა ნახშირბადის მონოოქსიდით შექცევადად ინჰიბირდება სინათ-  
ლეზე. გარდა ამისა, მიკროსომულ სუსპენზიაზე ლაურინმჟავას დამატება I-  
ტიპის სპექტრულ ცვლილებებს იძლევა, რაც ჰემოპროტეინ-ლაურინმჟავას  
კომპლექსის წარმოქმნის მაჩვენებელია.

ორვალენტური რკინის იონთან კომპლექსირებული ADP-ს თანამყო-  
ფობისას ლიპიდური პეროქსიდაციის სტიმულირება ნაჩვენებია მცენარეშიც,  
კერძოდ, ბარდის ეთილირებული ნაზარდებიდან და მწვანე ფოთლებიდან  
გამოყოფილ მიკროსომულ სუსპენზიაში [23]. აღდგენილი პირიდინულ-  
ლეოტიდები იწვევენ ზეჟანგური ჟანგვის პროცესს და, როგორც ჩანს, იგი  
ფერმენტულად მიმდინარეობს, რადგანაც მგრძობიარეა გაცხელებისა და  
სულფჰიდრილური რეაგენტების მიმართ.

მიკროსომებში NADPH-ის ჟანგვაზე ADP-ს მასტიმულირებელი მოქმე-  
დება პირველად იტალიელი მეცნიერების მიერ [24] იქნა გამოვლენილი.  
ოდნავ მოგვიანებით მათივე [25] და აგრეთვე ერნსტერისა და  
თანაავტორების [6-7] გამოკვლევებით დაბეჯითებით იქნა ნაჩვენები ამ ორ  
პროცესს (NADPH-ის ჟანგვასა და უჯერი რივის ცხიმოვან მჟავათა  
ჟანგვას) შორის უშუალო პირდაპირი კავშირი. ეჭვგარეშე გახდა, რომ  
მასტიმულირებელი ეფექტი დამახასიათებელია ნებისმიერი პიროფოს-  
ფატული და არა ფოსფატური დაჯგუფებებისათვის. ზეჟანგურ ჟანგვაზე  
მათი განსხვავებული მოქმედების ახსნა არ შეიძლება არც ამ იონების  
გავლენით ჯაჭვურ რეაქციებზე (მოდელურ სისტემებში დაბალი კონცენტ-  
რაციებით ისინი აჩქარებენ, ხოლო მაღალი კონცენტრაციებით აინჰიბირებენ  
ლიპიდური ზეჟანგების წარმოქმნას) და არა NADPH-სპეციფიკურ ჯაჭვში  
ელექტრონთა გადატანის სიჩქარეზე მათი გავლენით, სადაც ორივე იონი  
საკვლევი კონცენტრაციების შემთხვევაში მიკროსომული ჰიდროქსილირების  
სიჩქარეზე არავითარ ზემოქმედებას არ ავლენენ [7, 19, 26].

პიროფოსფატის მასტიმულირებელ მოქმედებაზე და ფოსფატის  
არაეფექტურობაზე ყველაზე სავარაუდო ახსნად შეიძლება გამოყენებულ  
იქნას დაშვება იმის შესახებ, რომ ეს იონები განსხვავებულ ზეგავლენას  
ახდენენ მემბრანული ცილების ფუნქციურ ჯგუფებზე, რკინის იონების  
დამატებისას რადიკალწარმოქმნელი ცენტრების ფორმირების პროცესში.  
იმდენად, რამდენადაც პირო- და ორთოფოსფატის ეფექტური კონცენტ-  
რაციები ფიზიოლოგიურის საზღვრებში იმყოფებიან. სავსებით ბუნებრივია,  
რომ ამ ანიონებს NADPH-დამოკიდებულ ზეჟანგურ ჟანგვაში რეაქციის  
სიჩქარის რეგულირებაში მონაწილეობის მიღება შეეძლო.



ფერმენტულ სისტემაში ფოსფატისა და პიროფოსფატის მოქმედება არაფერმენტული სისტემისაგან განსხვავებით შეიძლება კარგად აიხსნას, თუ მოდელურ სისტემებზე მიღებული მონაცემებიდან გამოვალთ, სადაც  $Fe^{2+}$ -ის ჰაერის ჟანგადით ჟანგვის აქტივაციის ხარჯზე ამ ნივთიერებათა დაბალი კონცენტრაციები ქემილუმინესცენციის ინდუქციის განვითარების პერიოდს კვეცავენ. შედარებით მაღალი კონცენტრაციები ქემილუმინესცენციას და ზეჟანგურ ჟანგვას თრგუნავდნენ, რადგან ამ დროს  $Fe^{2+}$ -ის კატალიზატორი არააქტიურ  $Fe^{3+}$ -ფორმაში გადადიოდა [19, 27].

ბილლაკსა და ტაპელს [28] აქვთ გამოთქმული განსხვავებული მოსაზრება, რომლის თანახმადაც დაკავშირებული რკინის იონები NADPH-სპეციფიკურ ჯაჭვში ფუნქციონირებს, როგორც რადიკალწარმოქმნელი ცენტრები, რომლებიც ზეჟანგური ჟანგვის ინიცირებას იწვევენ. აქედან გამომდინარე, ამ მკვლევარებმა ვარაუდი გამოთქვეს, რომ რკინის როლი რადიკალური გზით ჰიდროზეჟანგების დაშლაში მდგომარეობს. წარმოქმნილი ზეჟანგური რადიკალები თავის მხრივ ჰიდროზეჟანგების წარმოქმნის ახალ რეაქციებს ინიცირებენ. მათი წარმოდგენით რკინის იონები რადიკალწარმოქმნისას ჯაჭვის დაგრძელების სტადიაზე მუშაობენ. ამგვარად ჩამოყალიბდა კომპრომისული შეხედულება, რომლის თანახმადაც დაკავშირებულ რკინას შეუძლია იფუნქციონიროს როგორც ზეჟანგური ჟანგვის „ინიციატორმა“, ასევე ჯაჭვის „დამაგრძელებელმა“.

ლიპიდების თავისუფალრადიკალური ჟანგვის ინდუქციებისას მიკროსომულ მემბრანაში სტრუქტურულ-ფუნქციური თანაფარდობები შესწავლილია *in vitro* პირობებში [29]. ნაჩვენებია, რომ მემბრანის ლიპიდურ ფაზაში მიმდინარე ზეჟანგური რეაქციები უპირველეს ყოვლისა არღვევენ ფოსფოლიპიდების პოლიუჯერ ცხიმოვან აცილებს ( $C_{22:6}$ ;  $C_{22:6}$ ). ამის შემდეგ პროცესში ერთვება ორმაგი კავშირების ნაკლები რიცხვის ( $C_{18:2}$ ;  $C_{18:0}$ ) მქონე ცხიმოვანი მჟავური ნაშთები. ლიპიდთა ჟანგვის პროდუქტების დაგროვების პარალელურად შეინიშნება მემბრანადაკავშირებული ფერმენტების აქტივობათა ცვლილებები. მონოტონურად კლებულობს ციტოქრომ P450-ის შემცველობა (ნაწილობრივ მისი ციტოქრომ P420-ად კონვერსიის ხარჯზე). შესაბამისად ქვეითდება ამინოპირინის დემეთილირებისა და 3,4-ბენზპირენის ჰიდროქსილირების სიჩქარე. გლუკოზო-6-ფოსფატაზის ცვლილება 3-ფაზიან ბუნებას ამჟღავნებს: ზეჟანგური ჟანგვის ინდუქციის საწყის სტადიაზე შედარებითი ინჰიბირების შემდეგ აქტივობის თავდაპირველ დონემდე აღდგენა ხდება. მისი აქტივაცია დაკავშირებულია ლიპიდთა ზეჟანგურ ჟანგვასთან და როგორც ჩანს მიკროსომული მემბრანის განვ-

ლაღობის ცვლილებითაა განპირობებული. არსებითი ისაა, რომ მემბრანის მთლიანობაზე დამოკიდებულ ფერმენტთა აქტივობების ცვლილებები გაცილებით უფრო ადრე შეინიშნება, ვიდრე მემბრანის ელექტრონულ-მიკროსკოპული ულტრასტრუქტურული ცვლილებები.

მიკროსომებში უჯერი რივის ცხიმოვან მჟავათა ზეჟანგური ჟანგვის რეაქციის სტექიომეტრიის საკითხი განსაკუთრებით დეტალურად ფერმენტული სისტემებისთვისაა შესწავლილი, რამდენადაც სწორედ მისთვისაა დამახასიათებელი იმ განსაკუთრებული მექანიზმების არსებობა, რითაც იგი არაფერმენტული სისტემებისაგან განსხვავდება. მოცემული საკითხის გამოკვლევების დაწყება ჰონშტეინისა და ერნსტერის [6] კვლევებს უკავშირდება. მათ შეძლეს დაედგინათ, რომ სარეაქციო არეში ზეჟანგური ჟანგვის ინიციატორის ( $ADP-Fe^{2+}$ ) თანამყოფობისას NADPH-ის ერთი მოლის ჟანგვა 10-20 მოლი ჟანგბადის აღდგენას იწვევს.  $ADP-Fe^{2+}$ -კომპლექსის გარეშე მიკროსომულ NADPH-დამოკიდებულ ელექტრონთა გადატანის პროცესში ერთი მოლი NADPH 1 მოლ  $O_2$ -ს ააქტივებს. მოგვიანებით ამავე ლაბორატორიაში მიღებულ იქნა უფრო დაბალი კოეფიციენტი:  $\Delta NADPH : \Delta O_2 = 1 : 4$  [9]. მეისა და მაკკეის [30] გამოკვლევებმა ერთი მეტად საინტერესო ფაქტი გამოავლინა. მათ ცდებში  $\Delta NADPH : \Delta$ ზეჟანგური ჟანგვა :  $\Delta O_2$  ფარდობა 1:1:4-ს შეადგენდა. ამასთან კოეფიციენტი  $\Delta O_2 : \Delta NADPH$  მუდმივი არ იყო და რეაქციის მსვლელობაში 1-დან (რეაქციის დასაწყისში) 4-მდე (რეაქციის დასასრულს) იცვლებოდა. კოეფიციენტის ასეთი ცვლილება არ შეიძლება აიხსნას რეაქციის წარმოქმნილი კარბონილური ნაერთების შემდგომი გარდაქმნით, ანუ ეს არაა წარმოქმნილი არასრული ჟანგვის პროდუქტების შემდგომ დაჟანგვაზე ჟანგბადის ხარჯვის შედეგი. ის, რომ ასეთი პროდუქტები არ წარმოიქმნება, დასტურდება ზეჟანგების გაქრობის ქრომატოგრაფიულად შემოწმებული შედეგებითა და იოდური რიცხვის ცვლილებებით. გამოთვლებმა აჩვენეს, რომ არსებობს გარკვეული შესაბამისობა გამქრალ ორმაგი კავშირების რიცხვსა და რეაქციის მსვლელობაში შთანთქმულ  $O_2$ -ს შორის. მაშასადამე, მიკროსომებში ზეჟანგური ჟანგვის განვითარების თანაზომიერად ყოველ მოლეკულა დაჟანგულ NADPH-ზე სულ უფრო მეტი წარმოქმნილი ლიპიდის ზეჟანგის მოლეკულების რიცხვი მოდის. ეს სიტუაცია ძლიერ წააგავს პროცესებს, რომლებიც ჯაჭვური რეაქციებისას შეინიშნება; ე.ი. სადაც ინიციატორის ყოველ მოლეკულაზე პროდუქტის რამდენიმე მოლეკულა მოდის, რომელთა რაოდენობა ჯაჭვის სიგრძეზეა დამოკიდებული [19]. ჯაჭვური პროცესის შესაბამისად ჯაჭვის სიგრძის

ზრდა, რომელიც საბოლოო ჯამში სისტემაში ანტიოქსიდანტების დაშლასთანაა დაკავშირებული, ასევე ტიპურია ჯაჭვური რეაქციებისათვის, კერძოდ, ორვალენტიანი რკინით კატალიზირებული ფოსფოლიპიდების ზეჟანგური ჟანგვისათვის [19, 31].

ამგვარად, ანტიოქსიდანტების მაინჰიბირებელი მოქმედება და ლიპიდური ზეჟანგების წარმოქმნის სტექიომეტრია სავსებით სარწმუნოდ მიუთითებს NADPH-თან შეუღლებულ ლიპიდთა ზეჟანგური ჟანგვის ზოგიერთი სტადიების ჯაჭვურ, თავისუფალ-რადიკალურ ბუნებაზე. ამ გავებით ფერმენტული და არაფერმენტული ზეჟანგური ჟანგვის სისტემები ერთმანეთისაგან ფაქტობრივად არ განსხვავდება. აღნიშნულ პროცესებს შორის სხვაობა, როგორც ჩანს, ინიცირების ადრეულ სტადიებზე მთავრდება, ხოლო შემდგომ ისინი ერთი და იგივე მექანიზმით ვითარდებიან და ერთნაირ პროდუქტებს წარმოქმნიან. ორივე სისტემას ქემილუმინესცენციის ერთნაირი კინეტიკა გააჩნია, რაც იმაზე მეტყველებს, რომ ლიპიდური ზეჟანგების ფერმენტულ და არაფერმენტულ წარმოქმნებს შორის განსხვავება მთავრდება პროცესის საწყის სტადიებზე, ანუ მანამდე, ვიდრე ზეჟანგური ჟანგვის ჯაჭვური რეაქციები „ჩაირთვება“.

დეტალურადაა შესწავლილი NADPH-სპეციფიკური ზეჟანგური ჟანგვის პროდუქტები [30, 32-34]. აღმოჩნდა, რომ ამ პროცესის შედეგად ესთერული კავშირების რიცხვი არ იცვლება. სამაგიეროდ მკვეთრად მცირდება ორმაგი კავშირების რაოდენობა და ამინური აზოტის შემცველობა. ორმაგი ბმების შემცველი ცხიმოვანი მჟავების ზეჟანგური ჟანგვის ანალიზმა აჩვენა, რომ ჟანგვას უპირველეს ყოვლისა 6, 4 და 2 ორმაგი ბმები განიცდიან. ხშირ შემთხვევაში ასეთი მჟავებია შესაბამისი დოკოზოჰექსენმჟავა, არაქიდონმჟავა და ლინოლენმჟავა. სწორედ ეს უჯერი ცხიმოვანი მჟავები წარმოადგენენ ფერმენტული ზეჟანგური ჟანგვის ძირითად სუბსტრატებს. იმის გამო, რომ ცხიმოვანი მჟავათა ნაშთები გლიცერინის ჩონჩხის მიმართ β-მდგომარეობაშია, ბუნებრივია, ჟანგვა მათზე განხორციელდება. ამას ადასტურებს ფოსფოლიპაზა A-ს შერჩევითი „შეტევა“ β-ესთერულ ბმებზე. მემბრანული ფრაქციის ფოსფოლიპაზით წინასწარი დამუშავება ზეჟანგურ ჟანგვას აინჰიბირებს, ხოლო უკვე დაჟანგული ფრაქციის ამ ფერმენტით დამუშავება წარმოქმნილი პოლარული პროდუქტების სრულ გამოთავისუფლებას იწვევს [35].

NADPH-თან ინკუბირებულ მიკროსომებიდან ლიპიდური ექსტრაქტის შთანთქმის სპექტრებს თუ გავაანალიზებთ, დავინახავთ, რომ მასში წარმოიქმნება შეუღლებული ორმაგი და სამმაგი კავშირების სისტემა შთანთ-

ქმის მაქსიმუმებით 230-232 და 280 ნმ-ებზე. ამასთან, პირველი ზოლი ლიპიდების ჰიდროზეფანგებს ეკუთვნის [35].

ზეფანგური ჟანგვის საბოლოო პროდუქტი ლიპოფუსცინმჟავას მსგავსი პიგმენტი წარმოიქმნება ლიზინის  $\epsilon$ -ამინოჯგუფთან მალონის დიალდეჰიდის ურთიერთქმედებით. იგი კონიუგირებულ შიკის ფუძეს ( $-N=CH-CH_2-HC=N-$ ) შეიცავს. მისთვის დამახასიათებელია ფლუორესცენციის ალგზ-ნების მაქსიმუმი 345-360 ნმ-ზე და გამოსხივების მაქსიმუმი 425-450 ნმ-ზე. პროცესის სტექიომეტრია ასეთია:  $\Delta O_2 : \Delta \text{მალონის დიალდეჰიდი} : \Delta \text{ლიპოფუსცინი} = 436 : 16 : 1$  [36]. წარმოქმნილ ლიპიდთა ჰიდროზეფანგებს, ჟანგვის პირველად პროდუქტსა და მალონის დიალდეჰიდს შორის ურთიერთკავშირის შესწავლამ აჩვენა, რომ ლიპიდთა ზეფანგები მალონის დიალდეჰიდთან შედარებით ერთი რიგით მეტი წარმოიქმნება და სწრაფადვე იშლება: ლიპიდური ზეფანგების მაქსიმალური რაოდენობა რეაქციის საწყის პერიოდში ვლინდება. მათი რაოდენობა მცირდება მალონის დიალდეჰიდის მუდმივად მზარდი კონცენტრაციების ფონზე. ლიპიდური ზეფანგების დიდი ნაწილიდან (თუ მთლიანად არა) ზუსტად ისევე, როგორც პოლიუჯერი ცხიმოვანი მჟავებიდან, მალონის დიალდეჰიდი იქ წარმოიქმნება, სადაც ისინი ფოსფოლიპიდებთან  $\beta$ -მდგომარეობაში იმყოფებიან. ფერმენტული ზეფანგური ჟანგვის პროცესში ინჰიბიტორების მოქმედება არ განსხვავდება მთლიანი ზეფანგური ჟანგვის პროცესზე მათი მოქმედებისაგან [37, 38].

ამრიგად, ზეფანგური ჟანგვის სუბსტრატებად გამოიყენებიან დოკოზო-ჰექსენ-, არაქიდონ- და ლინოლენმჟავები, რომლებიც ფოსფატიდილ, ეთანოლამინისა და ფოსფატიდილქოლინის მოლეკულებში  $\beta$ -მდგომარეობაში იმყოფებიან. რეაქციის დასაწყისში უნდა არსებობდეს განსაზღვრული სხვაობები მემბრანებში ზეფანგური ჟანგვის ინიცირების ცენტრების განსხვავებული განლაგების გამო. ეს ვარაუდი კი თავის მხრივ სარწმუნოდ ამტკიცებს NADPH-ის დამაჩქარებელ მოქმედებას ასკორბატ-დამოკიდებულ ზეფანგურ ჟანგვაზე და ფერმენტულ სისტემაში წარმოქმნილი ზეფანგების ციტოქრომ P450-ზე გაძლიერებულ დამაზიანებელ მოქმედებას (ცხრილი 2.1).

უჯერი ცხიმოვანი მჟავების ზეფანგური ჟანგვის საბოლოო პროდუქტებს შორის თხელფენოვანი ქრომატოგრაფიით 18 ალდეჰიდი და კეტონი იდენტიფიცირდება [19]. ყველა ისინი ერთსაფეხურიანი ჟანგვითრმიილება. კარბონილური ნაერთების კარბოქსილურად შემდგომი დაჟანგვა აღარ ხდება [35].

მიკროსომულ სისტემაში *in vitro* ცხიმოვან მჟავათა ზეფანგური ჟანგვა არ შეიძლება ყველა მაღალუჯერი ცხიმოვანი მჟავების სრული დაჟანგვით

მიმდინარეობდეს. მალიმიტირებელ ფაქტორებად ამ შემთხვევაში, უპირველეს ყოვლისა, რედუცირებადი ექვივალენტების დონორები (NADPH და ასკორბატი) უნდა წარმოადგენდნენ. ეს საკვებით გასაგებიცაა: მემბრანის მკაცრი ორიენტაციის გამო ჟანგვის ჯაჭვის სიგრძე მცირეა და პროცესი არ შეიძლება ავტოკატალიზურად წარიმართოს. მემბრანულ პრეპარატებში ბუნებრივი ანტიოქსიდანტების შემცველობაც მცირეა და ამიტომ მათ არ შეუძლიათ ზეჟანგური ჟანგვის სიჩქარეზე რაიმე არსებითი გავლენის მოხდენა.

ცხრილი 2.1.

NADPH-ისა და ასკორბატის გავლენა ლიპიდური ზეჟანგების წარმოქმნის სიჩქარეზე (წარმოქმნილი მალონის დიალდეჰიდი  $\mu\text{g}^{-1} \cdot \text{წთ}^{-1}$ ) [19]

აღმდგენელი	ინკუბაციის დრო	
	10 წთ	20 წთ
NADPH, 1.0 mM	36	50
ასკორბატი, 0.8 mM	50	67
NADPH, 1.0 mM + ასკორბატი 0.8 mM	62	88

*in vitro* პირობების საწინააღმდეგოდ უჯრედში აღდგენილი NADPH და ასკორბატი ნაკლებ სავარაუდოა შემზღვეველი ფაქტორები იყვნენ, რამდენადაც ციტოპლაზმაში მათი რეალური კონცენტრაციები (შესაბამისად  $2.5 \cdot 10^{-4}$  და  $10^{-3}$  M) საკვებით საკმარისია ზეჟანგური ჟანგვის რეაქციების მაქსიმალურ სიჩქარეთა მისაღწევად. საინკუბაციო არეში ასკორბატ-დამოკიდებულ სისტემაზე რკინის იონების მკვეთრი გამააქტიურებელი მოქმედება იმაზე მეტყველებს, რომ სწორედ ამ იონების დეფიციტს შეუძლია არაფერმენტული ზეჟანგური ჟანგვის სიჩქარის ლიმიტირება. ფერმენტულ სისტემაში მოცემულ ფაქტორს, სავარაუდოა, რომ დიდი მნიშვნელობა არ უნდა გააჩნდეს, რადგან რკინასთან მისი სწრაფვა მაღალია და უჯრედში ამ იონის რეალური კონცენტრაცია, როგორც ჩანს, ფერმენტულად ზეჟანგების მაქსიმალური სიჩქარით წარმოქმნის უზრუნველსაყოფად საკვებით საკმარისია. ამ შემთხვევაში წინა პლანზე სტერიული ფაქტორი, ანუ რადიკალ-წარმოქმნის ცენტრებისა და ჟანგვის სუბსტრატების (უჯერ ცხიმოვან მჟავათა) სივრცული განმხოლოება გამოდის. ზეჟანგური ჟანგვის სისტემის ჟანგბადისადმი დაბალი სწრაფვა ამ სისტემას საშუალებას არ აძლევს ეფექტური კონკურენცია გაუწიოს ორ სხვა – ციტოქრომოქსიდაზურ და ციტოქრომ P450-ოქსიგენაზურ სისტემებს.

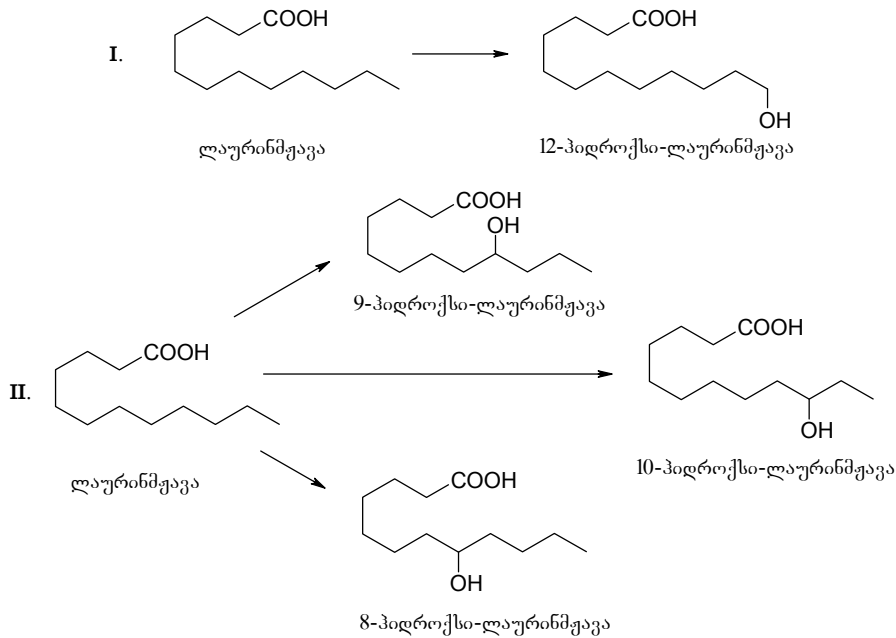
არსებული ექსპერიმენტული მონაცემების საფუძველზე შეიძლება ნათლად გამოიკვეთოს ყველაზე მნიშვნელოვანი დებულებები [20]:

1. მიკროსომულ მემბრანებში დამტკიცებულია ლიპიდთა ზეჟანგური ჟანგვის ორი სისტემის არსებობა, რომლებიც ერთმანეთისაგან პრინციპულად ინიციაციის სტადიით განსხვავდებიან. NADPH-სპეციფიკურ სისტემაში რკინის იონები (რადიკალწარმოქმნელი ცენტრები) ელექტრონთა გადატანის ფერმენტული გზით აღდგება. არაფერმენტულ სისტემაში რკინის აღდგენა ასკორბატით, ან სხვა შესაბამისი რედოქს-პოტენციალის მქონე აღმდგენელით ხდება;
2. ორივე პროცესის კინეტიკა და სტექიომეტრია იმ მოსაზრების სასარგებლოდ მეტყველებს, რომლის თანახმადაც მათ მიმდინარეობას ერთი საერთო – ჯაჭვური, რადიკალური რეაქციები უდევს საფუძველად;
3. ითვლება, რომ ორ- და სამვალენტიანი რკინის იონები უკავშირდებიან ცილების განსაზღვრულ ფუნქციურ ჯგუფებს, ხდებიან რადიკალწარმოქმნელი პუნქტები, ანუ რეაქციის ინიციაციის ცენტრები. ამ მხრივ ყველაზე მოსალოდნელია, რომ ლიპიდთა ფერმენტულ ზეჟანგურ ჟანგვაში წამყვანი როლი ციტოქრომ P450-ის SH-ჯგუფებს ეკუთვნის.

### 2.2.2 ციტოქრომ P450-ის მონაწილეობა ცხიმოვანი მჟავების ჰიდროქსილირებასა და ეპოქსილირებაში

ციტოქრომ P450-ით კატალიზებული ცხიმოვანი მჟავების ჟანგვის რეაქციები შეიძლება ჰიდროქსილირებისა და ეპოქსილირების რეაქციებად დავაჯგუფოთ. ჰიდროქსილირებისას იჟანგება როგორც ტერმინალური მეთილის ჯგუფი [39], ასევე ალიფატური ჯაჭვის შიდა ნახშირბადატომები [40]. ცერცვის (*Vicia faba*) მიკროსომების მიერ პალმიტინმჟავას ω-ჰიდროქსილირების შესწავლისას [39] გაირკვა, რომ რეაქციაში ციტოქრომ P450 მონაწილეობს. შიდაჯაჭვური მონოოქსიგენირებისას ერთი და იგივე მჟავა შეიძლება სხვადასხვა მდგომარეობაში დაიჟანგოს, რაც მკაფიოდ ჩანს მიწავაშლას (*Helianthus tuberosus*) მიკროსომების მიერ ლაურინმჟავას 8-, 9- და 10-ჰიდროქსილირების მაგალითზე (ნახ. 2.3–II) [40].

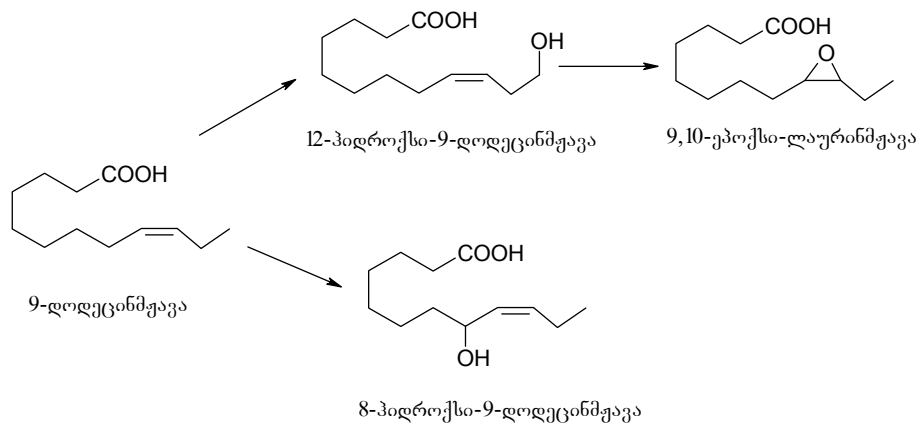
უნდა აღინიშნოს, რომ ლაურინმჟავას მიმართ ციტოქრომ P450 გარკვეულ სტერეოსპეციფიკურობას ამჟღავნებს, რაც მცენარის სახეობაზე დამოკიდებული. ფერმენტის ორივე – ω-ჰიდროქსილაზური და შიდაჯაჭვურ-ჰიდროქსილაზური აქტივობები ერთსა და იმავე მცენარეში არასოდეს მუდგანდება [41].



ნახ. 2.3. ლაურინმჟავას ციტოქრომ P450-დამოკიდებული ω-(I) და შიდაჯაჭვური (II) ჰიდროქსილირება [40].

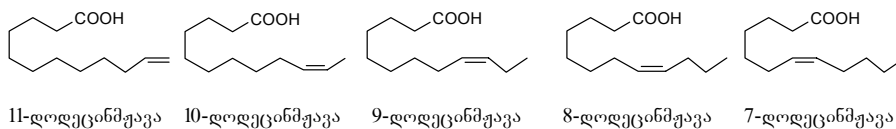
ციტოქრომ P450-დამოკიდებულ ω-ჰიდროქსილირებას განიცდის როგორც ნაჯერი, ისევე უჯერი მჟავები [42, 43]. უჯერი მჟავები შიდაჯაჭვური და ტერმინალური ჰიდროქსილირების გარდა, ეპოქსიდირებასაც განიცდის. ეს უკანასკნელი შეიძლება წარიმართოს, როგორც ω-ჰიდროქსილირების შემდგომი ეტაპი, ან როგორც შიდაჯაჭვური ჰიდროქსილირების თანმდევი რეაქცია. ცერცვის მიკროსომებში 9-დოდეცინმჟავას ჰიდროქსილირებისას ადგილი აქვს უჯერი ბმის ნახშირბადატომების ეპოქსიდირებასაც, რომელიც 8-ჰიდროქსილირების კონკურენტულად მიმდინარეობს (ნახ. 2.4) [44].

ზოგიერთ მკვლევარს [45] მიაჩნია, რომ უჯერი მჟავას ეპოქსიდირების რეაქციას იგივე ჰემოპროტეინი აკატალიზებს, რომელიც მის ω- და შიდაჯაჭვურ ჰიდროქსილირებაში მონაწილეობს. ამ დასკვნამდე ისინი მივიდნენ ციტოქრომ P450-ის სტერეო- და რეგიო-სპეციფიკურობის კვლევის შედეგად, როდესაც ერთმანეთს ადარებდნენ ორმაგი ბმის მდებარეობით განსხვავებულ დოდეცინმჟავას იზომერების ჰიდროქსილირებას და ეპოქსიდირებას.



ნახ. 2.4. 9-ლოდეცინმჟავას ციტოქრომ P450-დამოკიდებული ეპოქსიდირება და შიდაჯაჭვური ჰიდროქსილირება [44].

აღმოჩნდა, რომ შიდაჯაჭვური ჰიდროქსილირებისა და ეპოქსიდირების რეაქციებს შორის კარგად გამოხატული კონკურენციაა; ამასთან, თუ მჟავაში ორმაგი ბმა ჯაჭვის ბოლოში – მე-11-ე და მე-12-ე ნახშირბადატომებს შორისაა, მაშინ შიდაჯაჭვური მონოოქსიგენირების ინტენსივობა ბევრად სუსტია ეპოქსიდირებასთან შედარებით; ორმაგი ბმის გადანაცვლება ჯაჭვის შიგნით კი ეპოქსიდირების საშუალებას ამცირებს და ამ დროს უპირატესობა შიდაჯაჭვურ ჰიდროქსილირებას ენიჭება. ლოდეცინმჟავას იზომერებზე ერთი თვალის შევლებითაც კი ნათელი ხდება, რომ რაც უფრო ჯაჭვის შიგნითაა ორმაგი ბმა, მით უფრო „მიუღობელია“ იგი ფერმენტისათვის და ამ დროს ეპოქსიდირების რეაქცია იზღუდება.



აქვე უნდა აღინიშნოს, რომ ამ კანონზომიერებას ეწინააღმდეგება ერთი ფაქტი: ცის- და ტრანს-იზომერების ეპოქსიდირება ერთნაირი სიჩქარით მიმდინარეობს.

ზევით განხილულ რეაქციებში ციტოქრომ P450-ის მონაწილეობა კლასიკური კატალიზით – მონოოქსიგენაზური ციკლის მიხედვით ხორცი-

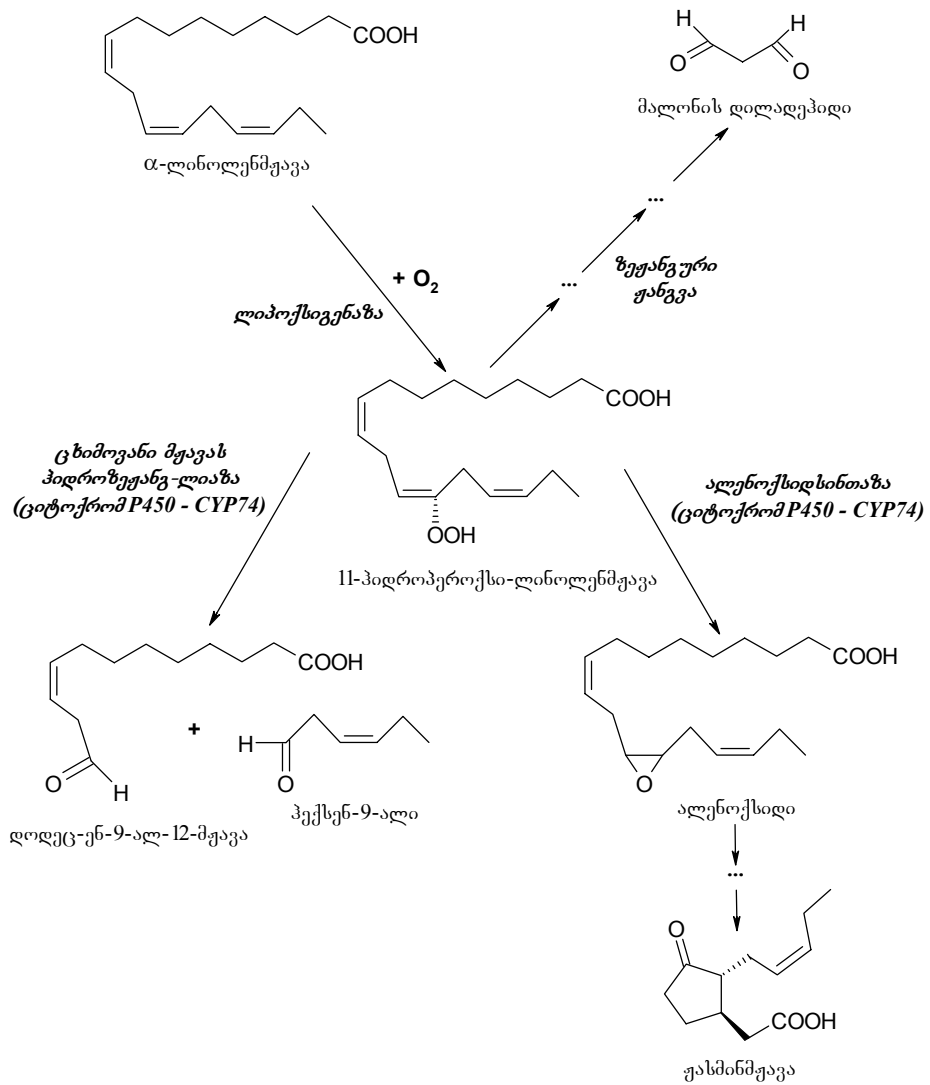


ელდება: ცხიმოვანი მჟავას დასაჟანგად იგი მოლეკულურ ჟანგბადსა და აღდგენილი ნიკოტინამიდური კოფერმენტების აღმდგენელ ექვივალენტებს იყენებს. მიუხედავად ამისა, არსებობს ციტოქრომ P450-ის კატალიზური აქტივობის გამოვლენის სხვა მექანიზმიც, როდესაც ეს ჰემოპროტეინი ჰიდროქსილირებისათვის ორგანულ ჰიდროზეფანგებს მოიხმარს და ამ დროს იგი ცხიმოვან მჟავათა ჰიდროზეფანგების გარდაქმნებს NAD(P)H-ისა და O<sub>2</sub>-ის გარეშე აკატალიზებს [45]. ამ შემთხვევაში ციტოქრომ P450-ის სუპეროქსიდის ზივიერით წარმომადგენელს ცხიმოვანი მჟავების ჰიდროზეფანგების დაჟანგვა ზეფანგური ჟანგვისაგან განსხვავებული უფრო „ნატიფი“ მექანიზმით შეუძლია, რომლის დროსაც ცხიმოვანი მჟავას ნახშირბადოვანი ჩონჩხი მალონის დიალდეჰიდამდე უხეშად კი არ იგლიჯება, არამედ მისი სტრუქტურული ფრაგმენტებიდან მაღალი ფიზიოლოგიური აქტივობის მქონე მოლეკულები წარმოიქმნებიან. ამის მაგალითია ალენოქსიდების წარმოქმნა ლინოლენმჟავას ჰიდროზეფანგიდან (ნახ. 2.5) [45].

ფერმენტ ლიპოქსიგენაზას მოქმედების შედეგად ფორმირებული ლინოლენმჟავას ჰიდროზეფანგი შეიძლება ადვილად დაიშალოს ფერმენტული და/ან არაფერმენტული ზეფანგური ჟანგვის შედეგად, მაგრამ აღმოჩნდა, რომ მცენარეებში ლიპოქსიგენაზასთან შერწყმულია ციტოქრომ P450-ის იზოფორმა (CYP74), რომელიც კლასიფიცირდება, როგორც ალენოქსიდსინთაზა [46]. ეს ჰემოპროტეინი ჰიდროზეფანგიდან ეპოქსიდს (ე.წ. ალენოქსიდს) წარმოქმნის, რის შედეგადაც სათავე ეძლევა მცენარეული ჰორმონის – ჟასმინმჟავას ბიოსინთეზს. ასევე მნიშვნელოვანია ციტოქრომ P450-ის კიდევ ერთი ფერმენტული აქტივობის გამოვლენა – ცხიმოვანი მჟავას ჰიდროზეფანგის ალტერნატიული დაშლა ნ-ნახშირბადატომიან უჯერ აღდეჰიდად, რომელიც მცენარის პათოგენისაგან დაცვის რეაქციებში მონაწილეობს [47]. ალენოქსიდსინთაზა მნიშვნელოვან როლს ასრულებს ჰევეაში (*Hevea brasiliensis*) მიმდინარე კაუჩუკის ფორმირების პროცესშიც [48].

ჟასმინმჟავას ბიოსინთეზი ფოსფოლიპაზა A-ს მიერ ფოსფოლიპიდების ჰიდროლიზით იწყება, რის შედეგადაც ლინოლენმჟავა მიიღება (ნახ. 2.5). იგი სასიგნალო მოლეკულაა, რომელიც ორ – პრინციპულად განსხვავებულ რეგულატორულ პროცესში მონაწილეობს [49]:

1. მცენარის კეგეტაციური ზრდის შეჩერება და მოსვენებულ მდგომარეობაში გადაყვანა – ამ დროს იწყება სპეციფიკური სამარაგო ცილების ბიოსინთეზი, რასაც თან სდევს ნაყოფების, თესლების, ტუბერებისა და ბოლქვების ფორმირება;



ნახ. 2.5. ჟასმინმჟავას წინამორბედი ალენოქსიდის წარმოქმნა უჯერი ცხიმოვანი მჟავას ჰიდროზეფანგიდან ციტოქრომ P450-ის მონაწილეობით [45].

2. აბიოტური და ბიოტური სტრესების მიმართ იმუნური საპასუხო რეაქციების გაძლიერება – ამ დროს სინთეზდება ნაერთები, რომლებიც პათოგენების საწინააღმდეგოდ მოქმედებენ [50]. ესენია:

- ექსტენსინები, რომელთა მოქმედებითაც მსხვილდება უჯრედის კედლები, რაც ხელს უშლის პათოგენების უჯრედში შეღწევას;
- თიონინები (ცისტინით მდიდარი ცილები), რომლებიც იკავშირებენ და ანეიტრალბენ პათოგენების ტოქსინებს;
- ფიტოალექსინები – სესქვიტერპენოიდული ბუნების მცენარეული ანტიბიოტიკები;
- ფენოლური ბუნების ნაერთები, მაგ., სალიცილმჟავა, რომელიც ფუნგიციდური მოქმედებით გამოირჩევა;
- პეპტიდი სისტემინი, რომელიც პათოგენების პროტეაზების ინჰიბირებას იწვევს და ამით მცენარეს ინფიცირებისაგან იცავს.
- ფერმენტები, რომლებიც დაზიანებული უჯრედების დაპროგრამებულ კვლამას – აპოპტოზს იწვევენ [51].

ჟასმინმჟავა ისეთი ცილების ბიოსინთეზსაც იწვევს, რომლებიც ამცირებენ ფლოემური ნაკადის სიჩქარეს, ხურავენ ბაგეებს და ამით ხელს უწყობენ გვალვიან ამინდში მცენარის წყლოვანი ბალანსის შენარჩუნებას. არასაჭიროების შემთხვევაში ჟასმინმჟავა სამარაგო გლიკოზიდის სახით ინახება და საჭიროების შემთხვევაში თავისუფლდება.

ჟასმინმჟავა შეიძლება გამოიყოს მცენარის ფოთლებიდან აქროლადი ეთერის – მეთილჟასმინატის სახით. ეს ნაერთი ადვილად შედის სხვა ფოთლებში, სადაც ისევ ჟასმინმჟავად იშლება და ზემოთაღნიშნული დაცვითი ნაერთების ინდუცირებას იწვევს. ამდენად, მეთილჟასმინატის გამოყოფით მცენარის საგანგაშო სიგნალის გამოცემა და მოსალოდნელი სტრესული სიტუაციისათვის დაუზიანებელი ქსოვილისთვის ან მეზობლად მზარდი მცენარეების წინასწარი მომზადება შეუძლია.

ალენოქსიდსინთაზა და ცხიმოვანი მჟავას ჰიდროპეროქსიდლიაზა სხვა ციტოქრომ P450-ებისაგან პირველადი სტრუქტურითაც განსხვავდებიან. მაგ., მათ აქტიურ ცენტრში ტრეონინი იზოლაციონითაა ჩანაცვლებული [52]. ასეთივე თავისებურება ახასიათებს ცხოველებში პროსტაგლანდინების სინთეზში მონაწილე ციტოქრომ P450-შემცველ თრომბოქსანსინთაზას [53]. უნდა აღინიშნოს, რომ ეს მცირედი განსხვავება პრინციპული ხასიათისაა, რამდენადაც ციტოქრომ P450-ის მიერ ჟანგბადის აქტივაციის პროცესში სწორედ ამ პოზიციაში მდგომი ამინომჟავური ნაშთი მონაწილეობს. არსებობს მოსაზრება, რომ ალენოქსიდსინთაზას შეუძლია გამოამჟღავნოს

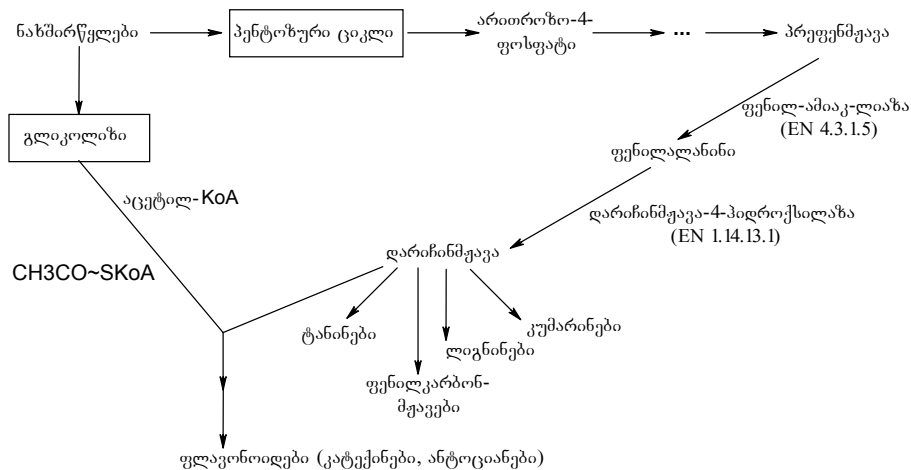
ცხიმოვანი მჟავას ჰიდროპეროქსიდ-ლიაზური აქტივობაც, რაშიც მას ხელს უწყობს აქტიურ ცენტრში ჰისტიდინის ნაშთის სპეციფიკური კონფიგურაცია [46].

ალენოქსიდისინთაზას აპოფერმენტში N-ტერმინალური ბოლოს ამინომჟავური თანმიმდევრობა პლასტიდების და მიტოქონდრიების მემბრანებთან დაკავშირებული სპეციფიკური პეპტიდების ჰომოლოგიურია [53]. ამ ფერმენტის აქტივობის გამომჟღავნებისათვის აუცილებელ პირობას მემბრანულ სტრუქტურებთან კავშირი წარმოადგენს [54]. ფერმენტი არამარტო მიკროსომებზე, არამედ ქლოროპლასტების და ვაკუოლების მემბრანებზეცაა ლოკალიზებული [51].

ალენოქსიდები პროსტაგლანდინების ბიოსინთეზის ინტერმედიატებსაც წარმოადგენენ [55]. ასეთი ნაერთები იდენტიფიცირებულია ბარდის (*Pisum sativum*) მიკროსომების მიერ არაქილონმჟავას ჟანგვის პროდუქტებში [56] და სელის (*Linaria vulgaris*) თესლების ცხიმოვანი მჟავების ჰიდროჟენგების ციტოქრომ P450-დამოკიდებული დეგრადაციით მიღებულ ნაერთებს შორის.

### 2.3 ციტოქრომ P450 ფენოლურ ნაერთთა ბიოგენეზში

დარიჩინმჟავა-4-ჰიდროქსილაზა (EC 1.14.13.11), რომელიც ტრანს-დარიჩინმჟავას p-ჰიდროქსი-დარიჩინმჟავად (p-კუმარმჟავად) გარდაქმნის, ფენილალანინ-ამიაკ-ლიაზას (EC 4.3.1.5) შემდეგ მეორე გასაღებ ფერმენტს წარმოადგენს მრავალრიცხოვანი ფენოლური ბუნების (ლიგნინების, ტანინების, ფლავონოიდების, ფენილკარბოჟავებისა და ა.შ.) ნაერთთა ბიოსინთეზის გზაზე (ნახ. 2.6). ამ ნივთიერებათა უმეტესობას ჰიდროქსილის ჯგუფი მეოთხე ნახშირბადის პოზიციაში გააჩნია. ფერმენტი კლასიფიცირებულია მიკროსომულ შერეული ფუნქციის ოქსიდაზად, ანუ მონოოქსიგენაზად. იგი მულტიფერმენტული კომპლექსია და აქტივობისათვის მოლეკულურ ჟანგბადს და NADPH-ს საჭიროებს, რომელსაც იგი ამ კოფერმენტის გენერირებადი სისტემიდან (NADP + გლუკოზოფოსფატდეჰიდროგენაზიდან) იღებს. აღდგენილი პირიდინუკლეოტიდიდან NADPH-ციტოქრომ P450-რედუქტაზას საშუალებით ელექტრონები ციტოქრომ P450-ზე გადაიტანება. დარიჩინმჟავა, როგორც სუბსტრატი, I-ტიპის სპექტრულ ცვლილებებს იძლევა [57]. ფერმენტი, უპირველეს ყოვლისა, NADPH/NADP-ფარდობით რეგულირდება.



ნახ. 2.6. ფენოლურ ნაერთთა ბიოგენეზის ზოგადი სქემა.

დარიინმეკა-4-ჰიდროქსილაზა თავისი სუბსტრატისადმი აბსოლუტურად სპეციფიკურია; ხოლო შესაძლო სუბსტრატებად ფენილალანინის ან 4-ჰიდროქსიდარიინმეკას გამოყენებისას მათი შესაბამისი ჰიდროქსი-წარმოებულებად — თიროზინად, ან 3,4-ჰიდროქსიდარიინმეკად (ყავის მჟავად) გარდაქმნა არ რეგისტრირდება. სუბსტრატისადმი მაღალი სწრაფვა განაპირობებს პროდუქტის მკაცრ კონტროლს თავისსავე სინთეზზე, ანუ ამ პროდუქტის კონცენტრაცია უჯრედში მკაცრი თვითრეგულირების ქვეშ იმყოფება. ეს იმის მაჩვენებელია, რომ დარიინმეკას წარმოქმნის სტადია ფენოლურ ნაერთთა ბიოსინთეზის პროცესში რეგულირების მნიშვნელოვან საკონტროლო უბანს წარმოადგენს და რომ საკუთარი პროდუქტით ფენილ-ალანინ-ამიაკ-ლიაზური ინჰიბირება რეგულაციის პირველ უბანს ქმნის [57].

დარიინმეკა-4-ჰიდროქსილაზა სრულადაა ლოკალიზებული მიკროსომულ ფრაქციაში; მაგ., ბარდის აპიკალურ კვირტებში ფერმენტის აქტივობა მხოლოდ ენდოპლაზმური რეტიკულუმის მემბრანებშია გამოვლენილი, მაშინ როდესაც პლასტიდებისა და მიტოქონდრიების ფრაქციები ამ ფერმენტულ აქტივობას არ ავლენენ [58]. თვით მიკროსომულ ფრაქციაში ძირითადი აქტივობა უპირატესად ხორკლიან მემბრანებშია კონცენტრირებული. იგი ითრგუნება ნახშირბადის მონოოქსიდით, დითიოტრეიტოლით და განსაკუთრებით 2-მერკაპტოეთანოლით [59]. ხაოიანი რეტიკულუმის ქვეფრაქციაში მაგნიუმის იონები დარიინმეკა-4-ჰიდროქსილაზას აქტივობის ინდუცირებასა და ციტოქრომ P450-ის შემცველობის ზრდას იწვევს. გლუვი მემბ-

რანების ქვეფრაქცია ციტოქრომ P450-ს არ შეიცავს, მაგრამ მნიშვნელოვანი 4-ჰიდროქსილაზური აქტივობა გააჩნია. ეს ფაქტი იმაზე მიუთითებს, რომ დარიჩინმჟავას ჰიდროქსილირება შეიძლება ციტოქრომ P450-ის გარეშეც განხორციელდეს [60]. ამასთან დაკავშირებით საინტერესო შედეგები აქვთ მიღებული რიჩსა და ლამბს [61]. ცდები ტარდებოდა კარტოფილის გარეცხილ ანათლებზე. ამ მკვლევარებმა აჩვენეს, რომ ციტოქრომ P450 იკავშირებს ტრანს-დარიჩინმჟავას და ეს ურთიერთქმედება სპექტრების წარმოქმნის მიხედვით I-ტიპის სუბსტრატების ანალოგიურია. სხვა ქსოვილებში ჰეპატოციტების არსებობის პირობებში ამ სუბსტრატის ჰიდროქსილირება არ ხორციელდება. აქედან გამომდინარე, გამოთქმულ იქნა მოსაზრება იმის შესახებ, რომ უმაღლეს მცენარეებში ციტოქრომ P450-ს სხვა ფუნქციებიც გააჩნია და რომ მისი სუბსტრატული სპეციფიკურობა სხვადასხვა მცენარეებში ფართო ვარიაციას განიცდის.

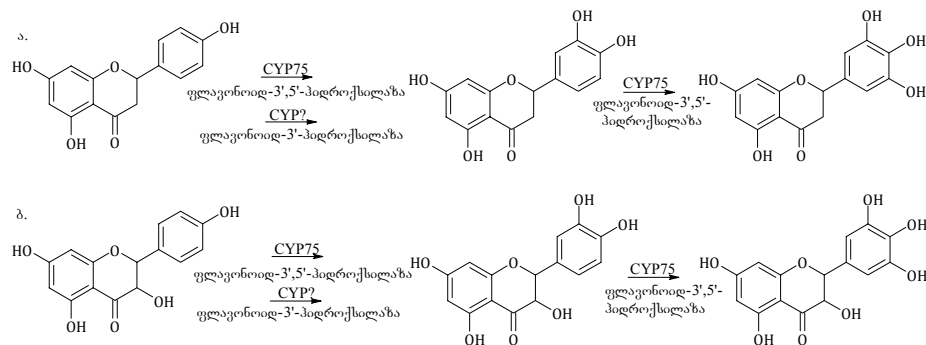
სორგოს ეთიოლირებული ფოთლებიდან მიღებული დარიჩინმჟავა-4-ჰიდროქსილაზას ფერმენტული ექსტრაქტის აქტივობა ფერმენტის მრავლობით ფორმებთან, ან სხვადასხვა დისოციაციის ხარისხის მქონე ფორმების ნარევეთან აღმოჩნდა დაკავშირებული [62]. ეს აქტივობა მეტად არამდგრადია, მაგრამ მისი რეაქტივაცია შესაძლებელია ექსტრაქტის 30°C-მდე შეთბობით. გარდა ამისა, *in vitro* ცდებში ფერმენტის მაქსიმალური აქტივობის მისაღწევად აუცილებელია დისულფიდური ბმები, რომლებიც ამ შემთხვევაში ფერმენტის მსხვილი აგრეგატების წარმოქმნას უზრუნველყოფენ. სტაფორდის მიერ [63] დადგენილ იქნა, რომ სორგოს ახალგაზრდა ფოთლების მიკროსომული ფრაქცია დარიჩინმჟავას-4-ჰიდროქსილაზური აქტივობასთან ერთად ფენილალანინ-ამიაკ-ლიაზური აქტივობებსაც ფლობს. აქედან გამომდინარე, აღნიშნულმა მკვლევარმა მისაღებად ჩათვალა, რომ მონოფენოლის მაჰიდროქსილირებელი ფერმენტი იმ ფერმენტული კომპლექსის ნაწილია, რომელიც ამინომჟავას C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-ტიპის ფენოლურ მჟავებად გარდაქმნის. მემბრანადაკავშირებული ფერმენტული სისტემა მონაწილეობს ციანოგენური გლუკოზიდების ბიოსინთეზში და უნარი აქვს განახორციელოს *p*-ჰიდროქსიფენილაცეტონიტრილის ჰიდროქსილირება [64].

ისევე, როგორც ყველა სხვა მემბრანადაკავშირებული ფერმენტი, დარიჩინმჟავა-4-ჰიდროქსილაზაც აუცილებლად საჭიროებს ფოსფოლიპიდებს, კერძოდ ლეციტინს. მაგ., ოხრაზუმის (*Petroselinum hortense Hoffm.*) სუსპენზიურ კულტურაში ნანახი იქნა, რომ ფოსფოლიპაზით ფოსფოლიპიდის ~60%-ის მოცილების შემდეგ ჰიდროქსილაზური აქტივობა მთლიანად ქრება [65], ხოლო შემდგომ ნედლი მიკროსომული ლიპიდური ექსტრაქტის

დამატებით ჰიდროქსილაზური აქტივობა მტკიცედ აღდგენას განიცდის.

ამჟამად, დარინინმჟავა-4-ჰიდროქსილაზა ენდოპლაზმური მემბრანების სამარკერო ფერმენტადაა მიღებული [61].

ანტოციანინების ბიოსინთეზის გზაზე ინტერმედიატებს 3',5'-ჰიდროქსილაზური (F3',5'H) რეაქციის პროდუქტები წარმოადგენენ. ეს ფერმენტი ფლავონონ ნარინგენინის ერიოდიქტიოლად და პენტაჰიდროქსიფლავონინად გარდაქმნას აკატალიზებს. პარალელურად ჰიდროქსილირების რეაქციით დიჰიდროფლავონოლი და დიჰიდროკემფეროლი დიჰიდროკვერცეტინს და დიჰიდრომირიცეტინს წარმოქმნის (ნახ. 2.7) [66, 67].



ნახ. 2.7. ნარინგენინის (ა) და დიჰიდროკემპეროლის (ბ) გარდაქმნა ერიოდიქტიოლად და ჰიდროკვერცეტინად. რეაქციებს შესაბამისად აკატალიზებენ ფლავონოიდ-3',5'-ჰიდროქსილაზა და ფლავონოიდ-3',5'-ჰიდროქსილაზა. რეაქციების პროდუქტებმა შეიძლება შემდგომ ჰიდროქსილირება განიცადონ ფლავონოიდ-3',5'-ჰიდროქსილაზას მოქმედებით და პენტაჰიდროქსიფლავონინი და დიჰიდრომირიცეტინი წარმოიქმნან [66, 67].

უნდა აღინიშნოს, რომ F3',5'H-ის მაკოდირებელი გენი მცენარეული ციტოქრომ P450-ის პირველი გენი იყო, რომლის კლონირებაც *Petunia hybrida*-ს ყვავილში ბიოქიმიური და გენეტიკური მიდგომების კომბინირებით განხორციელდა [68]. *Petunia*-ს და სხვა სახეობების ყვავილებში დი- და ტრი-ჰიდროქსილირებული წარმოებულები – გლუკოზიდები, ციანიდინი და დელფინიდონი მუქი წითელი ფერის პიგმენტებს წარმოადგენენ. F3',5'H-ის გამოყენებით ყვავილის ფერის მანიპულირების შესაძლებლობა გამოყენებულ იქნა შესაბამისი გენის იზოლირებისათვის [69].

საყურადღებოა, რომ F3',5'H ბიოქიმიურად განსხვავდება ფლავონოიდ-3'-ჰიდროქსილაზასაგან (F3'H), რომელიც ნარინგენინს და დიჰიდროკუმფეროლს ერიოდიქტიოლად და დიჰიდროკვერცეტინად გარდაქმნის (ნახ. 2.7). F3',5'H-ს შეუძლია აქტიურ ცენტრთან მიერთოს დიჰიდროქსილირებული B-ბირთვი, ხოლო F3'H-ს ამის უნარი არ გააჩნია.

## 2.4 ციტოქრომ P450 ალკალოიდების ბიოსინთეზში

ალკალოიდების უმეტესობა ჰეტეროციკლში ფუძე თვისებების მქონე აზოტის ერთი ატომის შეცვლელ ნაერთებს მიეკუთვნება. მცენარეში ისინი ძირითადად ორგანული მჟავების (ვამლმჟავას, ღვინომჟავას, ლიმონმჟავას და სხვ.) მარილების სახითაა. ზოგიერთი ალკალოიდის მოლეკულაში სხვადასხვა აზოტოვანი ჰეტეროციკლის კომბინაციას ვხვდებით. ასე მაგალითად, ნიკოტინის მოლეკულაში ერთმანეთთანაა დაკავშირებული პირიდინი და პიროლიდინი, ხოლო ამიდის სახით ზოგიერთ დეჰიდროგენაზას შემადგენლობაში იმყოფება. ზოგად თვისებებს რაც შეეხება, ეს მათი უაღრესად მაღალი ფიზიოლოგიური აქტივობაა [70].

ალკალოიდების ბიოსინთეზის გზები სხვა ნივთიერებებთან (მაგ., სტეროლებთან ან ტერპენებთან) შედარებით ნაკლებადაა შესწავლილი. ეს განსაკუთრებით შუალედური ცვლის ნებისმიერი კვლევის იმ დამამთავრებელ სტადიას ეხება, რომელიც ინდივიდუალური ფერმენტული სისტემების გამოცალკევებასა და დახასიათებას მოიცავს. მცენარეში ალკალოიდები განსაზღვრული ამინომჟავებიდან იწარმოება და ბიოგენეზის ძირითადი გზა ამინო-, იმინო-, კარბონილის ჯგუფისა და ძვრადი ნახშირბად-ატომის კონდენსაციაა [71]. ჭვავის რქის (სოკო *Claviceps purpurea*-ს მოზამთრე ფორმა, რომელიც ჭვავის მარცვალზე ვითარდება) შედგენილობაში მყოფი ალკალოიდების ერთი მხრივ, წარმოქმნასა და მეორე მხრივ, ამინომჟავურ ცვლას შორის პირდაპირი კავშირი გამოვლინდა [70]. ამის სასარგებლოდ მეტყველებს ცდების მონაცემები, რომლებშიც  $^{14}\text{C}$ -ით მონიშნული ამინომჟავები გამოიყენებოდა. ისინი მცენარეში ფოთლის ყუნწებიდან ან ვაკუუმ-ინფილტრაციით, წყალხსნარების სახით შეყავდათ.  $^{14}\text{C}$ -ორნიტინით მცენარის დამუშავებისას რადიოაქტიური ნახშირბადის მნიშვნელოვანი ნაწილი ნიკოტინის პიროლიდონის ბირთვში ჯდებოდა. ახალგაზრდა მანჭკვალაში  $^{14}\text{C}$ -ლიზინის შეყვანისას რადიოაქტიური ნიშანი განსაკუთრებით ინტენსიურად ალკალოიდ ლუპანინში ერთვებოდა. მონიშნული ლიზინით ჩატარებულმა ცდებმა აჩვენეს აგრეთვე, რომ მისი



ციკლიზაციის შედეგად კონიინი – *Conium maculatum*-ის მთავარი ალკალოიდი წარმოიქმნება. ალკალოიდ ანაბაზინის პიპერიდინური ბირთვიც ლიზინიდან იწარმოება. ერთ-ერთი ძლიერ შხამიანი ალკალოიდი – ჰიოსციამინი, ორნიტინის, ფენილალანინისა და ძმარმჟავას ორი ნაშთის კონდენსაციით სინთეზდება; თვით მორფინის წინამორბედებს თიროზინი და მეთიონინი წარმოადგენენ; ნიკოტინმჟავას პირიდინული ბირთვი ასპარაგინ-მჟავასთან გლიცერალდეჰიდ-3-ფოსფატის კონდენსაციით მიიღება [70].

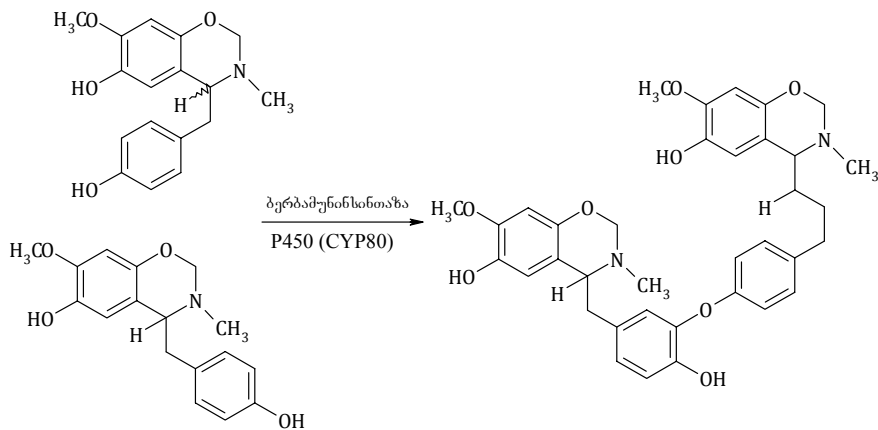
ამჟამად მოგვეპოვება მთელი რიგი მონაცემებისა ციტოქრომ P450-ის მნიშვნელოვანი ფუნქციური როლის შესახებ ალკალოიდების ბიოსინთეზში. ამბიკასა და თანაავტორების მიერ [72, 73] შესწავლილია L-ტრიფტოფანისა და მისი ზოგიერთი ანალოგის უნარი, დაუკავშირდნენ ციტოქრომ P450-ს და ფერმენტის დაჟანგულ ფორმასთან წარმოქმნან კომპლექსი. *C. purpurea*-ს მიცელიუმის პრეპარატებზე ტრიფტოფანთან ფენობარბიტალის ან 3-მეთილქოლანტრენის დამატებას თან ახლდა  $\text{h}_5$ - და P450-ციტოქრომებისა და ერგოალკალოიდების შემცველობის ერთდროული ზრდა.

*Vinca rosea*-ს ეთიოლოგიური ნაზარდებიდან გამოყოფილ იქნა მონოოქსიგენაზა, რომელიც ჰიდროქსილირების რეაქციით მონოტერპენულ სპირტებს – გერანიოლსა და ნეროლს (ცის-გერანიოლს) 10-ჰიდროქსიწარმოებულებად გარდაქმნის [74, 75]. გერანიოლის ჰიდროქსილირება იზრდება დითიოტრეიტოლით (ნაკლებ ეფექტურია მონოთიოლი) და ინჰიბირდება ფოსფოლიბაზით, მეთირაპონით ან ციტოქრომ P450-ის სხვა რომელიმე ინჰიბიტორით. გერანიოლი უფრო სწრაფად ჰიდროქსილირდება, ვიდრე ნეროლი, თუმცა ორივეს თანაბარი  $K_m$  სიდიდეები გააჩნიათ. მემბრანადაკავშირებული ჰიდროქსილაზა ქოლატით ან რუბროლით სოლუბილიზების შემდეგ ეფექტურად იყენებს NADPH-ციტოქრომ P450-რედუქტაზას, ციტოქრომ P450-ს და ლიპიდებს [76].

10-ჰიდროქსიწარმოებულები ინდოლური ალკალოიდების ბიოსინთეზში ერთვებიან. ფერმენტის აქტივობა NADPH- და  $\text{O}_2$ -დამოკიდებულია. იგი მიკროსომებში ლოკალიზდება და აღდგენილი „P450-CO“ კომპლექსისათვის დამახასიათებელ სპექტრს იძლევა. გარდა ამისა, მეთირაპონით დამუშავებისას კომპლექსი შექცევადად ინჰიბირდება [76]. ყოველივე ეს ფერმენტის მონოოქსიგენაზური ბუნების ნათელი დადასტურებაა. დადგინდა ისიც, რომ აღნიშნული ჰიდროქსილაზა ციტოქრომ P450-ის ტიპს განეკუთვნება. აღნიშნულ გამოკვლევაში ცის-და ტრანს-იზომერული აქტივობა არ შეინიშნება, რაც იმაზე მიუთითებს, რომ გერანიოლიცა და ნეროლიც ჰიდროქსილირებას C-10 მეთილის ჯგუფთან განიცდიან [77].

*Catharanthus roseus*-ში გერანიოლის 10-ოქსიწარმოებულად მაჰიდროქსილირებელი ოქსიგენაზა ინჰიბირდება ინდოლის ჯგუფის ისეთი ალაკალოიდებით, როგორებიცაა კატარანტინი, ვინბლანტინი და ვინდოლინი. ინჰიბირების კინეტიკის შესწავლამ გამოავლინა, რომ ეს პროცესი არაკონკურენტული და ხაზოვანია, ანუ ფერმენტი ალოსტერულია. ვინდოლინი, რომელიც მონოოქსიგენაზაზე შედარებით დაბალ ინჰიბიტორულ ზემოქმედებას ახდენს, მნიშვნელოვნად თრგუნავს ლოგანმჟავას მეთილტრანსფერაზას აქტივობას. ეს ნივთიერება ერთ-ერთი წინამორბედია სეკოლოგანიის – მრავალი ინდოლური ალკალოიდის ტერაპეიტიული ნაწილის ბიოსინთეზში [78].

მცენარეული ციტოქრომ P450-ის სუპეროჯახის ერთ-ერთ წარმომადგენელს (CYP80-ბერბამუნინსინთაზას) ბირადიკალური შერწყმის მექანიზმით ორი ალკალოიდური მონომერის დიმერიზაციის კატალიზება შეუძლია (ნახ. 2.8) [79].



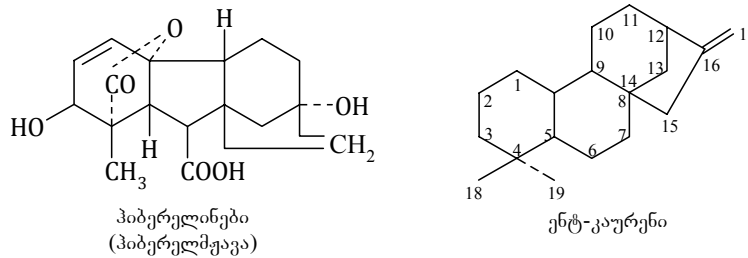
ნახ. 2.8. ბერბამუნინ-სინთაზა აკატალიზებს ორი მოლეკულა N-მეთილ-კოკლაურიინის შერწყმას, რის შედეგადაც ბერბამუნინი ან გუა-ტეგაუმერინი წარმოიქმნება [79].

ამ შემთხვევაში ფერმენტს უნდა გააჩნდეს ისეთი აქტიური ცენტრი, რომელსაც ორი საკმაოდ მოზრდილი ალკალოიდური მონომერის დაკავშირება შეუძლია.

## 2.5 ციტოქრომ P450-ის მონაწილეობა ჰიბერელინების ბიოსინთეზში

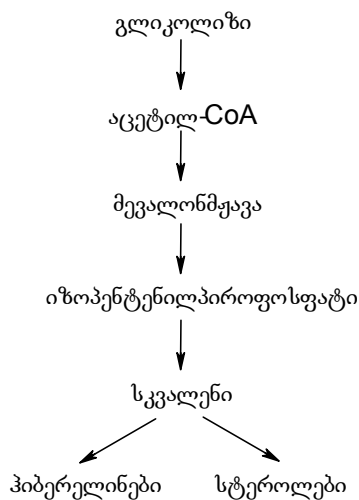
მცენარეული ორგანიზმის ჰორმონულ სისტემაზე წარმოდგენები სადღე-ისოდ ფიტოფიზიოლოგიის დამოუკიდებელ მიმართულებადაა ჩამოყალიბებული. მცენარის ზრდის რეგულატორების მნიშვნელოვან წარმომადგენლებს მიეკუთვნებიან ფიტოჰორმონები, რომელთაგან შედარებით დეტალურადაა შესწავლილი აუქსინები, ჰიბერელინები, ციტოკინინები, აბსციისის მჟავა და ეთილენი. ისინი ძლიერ მცირე დოზებით მოიხმარება და დამახასიათებელ მორფოფიზიოლოგიურ ცვლილებებს იწვევენ. აქვე უნდა შევნიშნოთ, რომ მცენარეულ და ცხოველურ ჰორმონებს შორის ერთ-ერთი მთავარი განსხვავება მცენარეული ჰორმონების პოლიფუნქციურობაა [80].

ჰიბერელინები ქიმიური ბუნებით ტერპენოიდების (ტეტრაციკლური დიტერპენოიდების) კლასს მიეკუთვნება. სახელწოდება მომდინარეობს სოკო-პროდუცენტის (*Gibberella*) ლათინური სახელწოდებიდან. მათ სისტემატიზაციას ახდენენ A-ბირთვის ჟანგვის, ან მოლეკულის ჰიდროქსილირების ხარისხით [80].

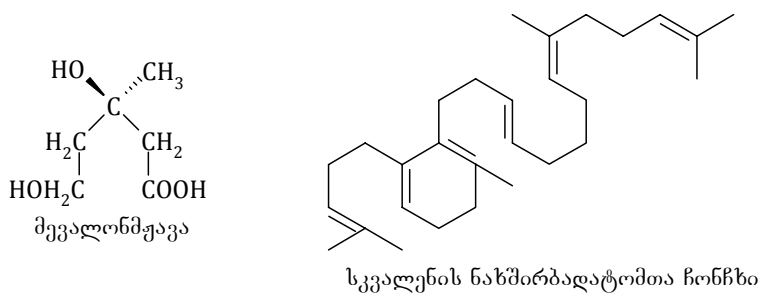


მცენარეში ჰიბერელინების ბიოსინთეზი ასე გამოიყურება (ნახ. 2.9).

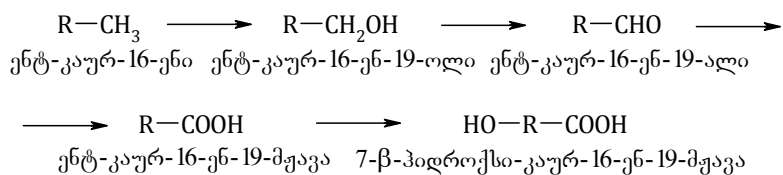
მეგალონმჟავიდან მცენარეში ფერმენტულად ჰიბერელმჟავისა და საერთოდ ყველა ჰიბერელინის წინამორბედი ინტერმედიატი ენტ-კაურენი იწარმოება. თავის მხრივ ეს მეტაბოლიტი გლიკოლიზის გზით აცეტილ-CoA-დან მიიღება და შემდგომში სკვალენსა (დიჰიდროტრიტერპენს) და სხვა იზოპრენოიდულ ნივთიერებას აძლევს დასაბამს. სკვალენიც ხუთ ნახშირბადატომიანი იზოპრენული ერთეულებისაგან შედგება.



ნახ. 2.9. მცენარეში ჰიბერულინების ბიოსინთეზის ზოგადი სქემა.



კაურენი შეუქცევადად იჟანგება კაურენოლად, კაურენალად და კაურენ-მჟავად (ნახ. 2.10) რეაქციათა მსვლელობა ალიფატური ჰიდროქსილირების გზით მიმდინარეობს, ხოლო ციტოქრომ P450-ების აღმოჩენის შემდეგ ნაჩვენებია იქნა, რომ ამ ტიპის ფერმენტები ჰიბერულინების ბიოსინთეზის ცალკეული საფეხურების კატალიზებას ასორციელებენ [79, 81-84].



ნახ. 2.10. კაურენის ალიფატური ჰიდროქსილირება.

ჰიბერელინების ბიოსინთეზში ციტოქრომ P450-დამოკიდებული ოქსიგენაზებით მიმდინარე რეაქციებია [81].

აღნიშნული რეაქციები ლოკალიზებულია მიკროსომებში და აღდგენილი პირიდინ-უკლეოტიდების ან  $105 \cdot 10^3$  გ სუპერნატანტის დამატებას საჭიროებენ. ამ შემთხვევაში NADPH გაცილებით ეფექტურია, ვიდრე NADH. ვერც აერობულ და ვერც ანაერობულ პირობებში NADP და NAD კოფერმენტის ფუნქციას ვერ ასრულებენ. კაურენოლის კაურენალად გარდაქმნა ინჰიბირდება NADP-ით, *p*-ქლორმერკურიბენზოატით და SKF-525A-ით, რაც იმის პირდაპირი დასაბუთებაა, რომ რეაქციას შერეული ფუნქციის ოქსიდაზა ახორციელებს [81].

მეგალონატიდან კაურენის, სკვალენისა და ფიტონენის წარმოსაქმნელად პირიდინ-უკლეოტიდების გარდა საჭიროა ATP-ს,  $Mg^{2+}$ -ისა და  $Mn^{2+}$ -ის თანამყოფობა. NADPH-ის გარეშე არ ხდება სკვალენის სინთეზი, ხოლო  $Mn^{2+}$  აუცილებელია ფიტონენის მისაღებად. სხვა პროდუქტებთან შედარებით კაურენის მიღება შედარებით დაბალ pH-ზე ხდება და მეგალონატის გარდაქმნაში იგი ძირითად პროდუქტს წარმოადგენს [85].

ჰარონისა და ვესტის [86, 87] გამოკვლევებით *Marah macrocarpus*-ის უმწიფარი თესლის ენდოსპერმიდან მიღებულ მიკროსომებში ციტოქრომების P450-ისა და ხ<sub>5</sub>-ის გარდა სპექტრულად იდენტიფიცირდა NADPH- და NADH-ციტოქრომ c-რედუქტაზული აქტივობები. ჰიბერელინების ბიოსინთეზის რეაქციები მაქსიმალური აღმოჩნდა მიკროსომულ პრეპარატებში, ხოლო სუპერნატანტში დადგინდა ფაქტორის არსებობა, რომელიც მიკროსომებით კატალიზებულ ჟანგვის სინჯარეს დადებითად არეგულირებს. NADPH-ის დამატება NADH-ზე მეტად ეფექტურია. NADH-ის, ATP-ისა და NADP-ის შემცველი ხსნარი კი ბევრად უფრო ეფექტურია, ვიდრე ცალკე NADH. 2,4-დინიტროფენოლითა და სხვადასხვა ინჰიბიტორების გამოყენებით ჩატარებული ცდებით მათ მიერ ნაჩვენები იქნა, რომ ATP ასტიმულირებს NADPH-ის სინთეზს. NADPH-ისა და NADP-ს დაბალი კონცენტრაციები ერთად უფრო ეფექტურია, ვიდრე რომელიმე მათგანის ექვივალენტური კონცენტრაციები. FAD-ის დამატება ასტიმულირებს NADPH-დამოკიდებულ ჟანგვის სინჯარეს. აქედან გამომდინარე, აღნიშნულმა მკვლევარებმა ჩათვალეს, რომ მიკროსომებში არსებობს ელექტრონის ორი – NADH და NADPH-დამოკიდებული სატრანსპორტო გზა და ფლავინოუკლეოტიდის როლი ჩვეულებრივ ჟანგვასთან დაკავშირებულ ელექტრონის გადატანაში მდგომარეობს.

უმწიფარი ბარდის ლეზებიდან  $1 \cdot 10^5$  გ-ზე მიღებულ სუპერნატანტში

ნაჩვენებია, რომ  $2\text{-}^{14}\text{C}$ -მევალონატიდან წარმოქმნილი კაურენი პროტეინს უკავშირდება. ეს კომპლექსი CO-მგრძობიარე ჟანგვისათვის ვარგისი სუბსტრატია. არაკატალიზური „გადამტანი“ პროტეინის ფრაქცია შეიძლება ენდოპლაზმური რეტიკულუმიდან სოლუბილიზდეს, დაიკავშიროს კაურენი და მას შერეული ფუნქციის ოქსიდაზებით ჟანგვის უნარი შესძინოს [88]. კომპლექსი შეიცავს სკვალენსაც, რომელიც იგივე პირობებში კაურენის მსგავსად განიცდის ფერმენტულ ოქსიდაციას.

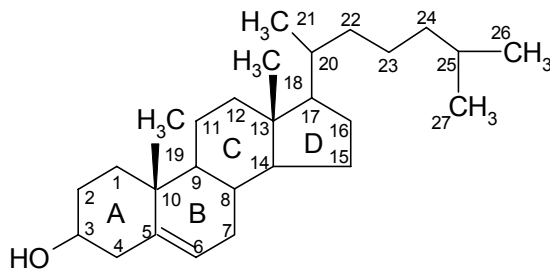
*Eucalyptus macrocarpa*-ს ენდოსპერმის ქსოვილის ჰომოგენატში დეტალურად იქნა შესწავლილი (-)-კაურ-16-ენის ზრდის ჰორმონებად ჟანგვითი გარდაქმნების ორი საწყისი სტადია [89]. ორივე რეაქცია – (-)-კაურ-16-ენის გარდაქმნა (-)-კაურ-16-ენ-19-ოლში და ამ ნაერთის შემდგომი დაჟანგვა (-)-კაურ-16-ენ-19- ამჟამად საჭიროებს მოლეკულურ ჟანგბადს და NADPH-ს.  $^{18}\text{O}_2$ -ის გარემოში პირველი რეაქციის მსვლელობისას ალდეჰიდის მოლეკულაში  $^{18}\text{O}_2$ -ის 78% ერთვება. ორივე რეაქცია CO-ინჰიბირებას ემორჩილება და მისი მოქმედება სორეს უბნის 422 და 453 ნმ-ებთანაა დაკავშირებული. პიკი განპირობებულია ციტოქრომით, რომელიც ძუძუმწოვართა ციტოქრომ P450-ის მსგავსია. ეს მონაცემები იმაზე მიუთითებს, რომ ჰიბერელინ-ჰორმონების ბიოსინთეზი მცენარეებში და სტეროლ-ჰორმონების წარმოქმნა ცხოველებში ზოგადად ანალოგიური პროცესებით ხორციელდება.

## 2.6 სტეროიდთა მაჰიდროქსილირებელი ოქსიგენაზები

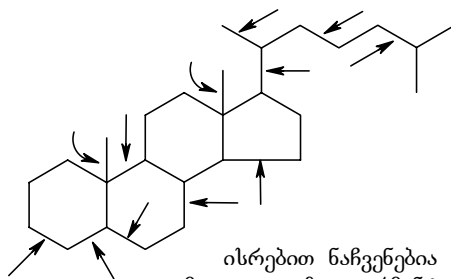
სტეროიდთა ჰიდროქსილირებას თვალსაჩინო ადგილი უკავია იმ რეაქციებს შორის, რომლებიც ციტოქრომ P450-შემცველი ოქსიგენაზებით კატალიზდება. ასეთ რეაქციათა რიცხვს მიეკუთვნება ქოლესტერინიდან გვერდითა ჯაჭვის მოცილება პრეგნენოლონის წარმოქმნით და შემდგომი 11 $\beta$ , 17-, 18- და 21 $\beta$ -ჰიდროქსილირება. ეს რეაქციები ძირითადად თირკმელზედა ჯირკვლის ქერქის მიტოქონდრიებსა და მიკროსომებში მიმდინარეობს.

სტეროლთა ბიოლოგიური ტრანსფორმაცია, გარკვეული აზრით, შეიძლება განხილულ იქნას, როგორც დეტოქსიკაციისა და უჯრედიდან მათი მოცილების თავისებური გამოვლენა, რადგან სტეროიდთა სრულ ფერმენტულ დეგრადაციას თან ახლავს უჯრედის მიერ მათი ნახშირბადატომების პლასტიკური მიზნებისათვის გამოყენებაც. აქაც ადგილი აქვს ნივთიერების

მოლეკულაში ჟანგბადის ატომის ჩანერგვას და აქაც აღდგენილი ციტოქრომ P450 მონაწილეობს. ჰემოპროტეინის კვლავ აღდგენა მემბრანებში არსებული რედოქს-ჯგაჯვით ხორციელდება, რომელიც შეუღლებული არაა პროტონული გრადიენტის ( $\Delta\mu^+$  მემბრანული პოტენციალის) აღძვრასთან და ამდენად თავისუფალი, არადაძმოსფორებული ჟანგვის სისტემას განეკუთვნება. იგი მიტოქონდრიული მემბრანის შიდა მხარესაა ლოკალიზებული და ციტოქრომ P450-ს, NADPH-ადრენოლოქსინრედუქტაზას (EC 1.6.7.1) და ადრენოლოქსინს შეიცავს [90-95]. დაგროვილი უამრავი ექსპერიმენტული მასალა საშუალებას გვაძლევს საკმაოდ გარკვეულად ვიმსჯელოთ მაჰიდროქსილირებელი სისტემების შედგენილობაზე, მათი ცალკეული კომპონენტების თვისებებზე და მოქმედების მექანიზმზე.



ქოლესტეროლი ნახშირბადატომების ნუმერაციით



ისრებით ნაჩვენებია ქოლესტერინის მოლეკულაზე ფერმენტთა შეტევის უბნები

ოქსიგენაზების გარკვეული ჯგუფი ქოლესტერინიდან ნაღვლის მჟავების სინთეზშია ჩართული. ეს პროცესი  $7\alpha$ -მდგომარეობაში ქოლესტერინის ჰიდროქსილირებით ლიმიტირდება და ლვიძლის მიკროსომებში ხორციელდება. რაც შეეხება სტეროიდული ჰორმონების ბიოსინთეზში ქოლესტერინის ჟანგვასა და ჰიდროქსილირებას, მასში მონაწილე ციტოქრომ P450-ის 80%

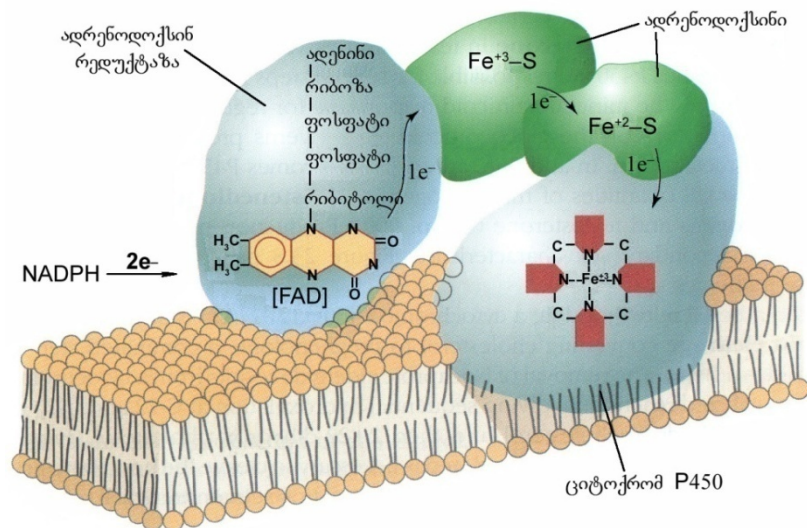
მიტოქონდრიული წარმოშობისაა. ეს სისტემა და მიკროსომების მაჰიდროქსილირებელი სისტემა არსებითად განსხვავდებიან ერთმანეთისაგან. პირველი – არაჰემურ ცილას (ადრენოლოქსინს) შეიცავს და ძლიერ წააგავს ბაქტერიულ (*Pseudomonas putida*) მაჰიდროქსილირებელ სისტემას, მაშინ როდესაც მიკროსომული სისტემა Fe,S-ცილებს არ შეიცავს [90-97]. ამჟამად დადგენილ ფაქტად ითვლება, რომ თირკმელზედა ჯირკვლის ქერქის მიტოქონდრიუმში ორი სხვადასხვა ციტოქრომ P450 ფიგურირებს: ერთი მათგანი 11β-ჰიდროქსილირებას აკატალიზებს (აღინიშნება, როგორც P450<sub>11β</sub>), ხოლო მეორე მოლეკულის გვერდით ჯაჭვს აცილებს (აღინიშნება, როგორც P450<sub>sc</sub>). ორივე ციტოქრომი ელექტრონებს ადრენოლოქსინიდან იღებს, რომელიც თავის მხრივ NADPH-ადრენოლოქსინრედუქტაზით რეგულირდება [90-94]. თირკმელზედა ჯირკვლის ქერქის მიკროსომული სისტემა სტეროიდთა 21-ჰიდროქსილირებას ახორციელებს. სტეროიდთა ჯაჭვში მონაწილე ოქსიგენაზები ძირითადად ინდუქციური ბუნებისაა და სათანადო სუბსტრატთა გამოყენებისას მათი აქტივობები მაქსიმალურად იზრდება. აქტივობის დაახლოებით 1-5% კონსტიტუციურ ფერმენტებს ემძობა და სუბსტრატთა დამატებისას მათი აქტივობები პრაქტიკულად არ იცვლება [90-95].

### 2.6.1 თირკმელზედა ჯირკვლის ქერქის მიტოქონდრიუმის ციტოქრომ P450

ამ ორგანოს ორივე ციტოქრომ P450 სადღეისოდ გამოყოფილი და სრულად დახასიათებულია [91-95, 98]. ორივე ჰემოპროტეინი მჭიდროდ დაკავშირებულია მემბრანასთან და ინტეგრალურ ცილებს წარმოადგენენ (ნახ. 2.11), რაც განაპირობებს ულტრაბერითა და დეტერგენტებით მათ გამოყოფას. P450<sub>11β</sub> და P450<sub>sc</sub> ყოველ პოლიპეპტიდურ ჯაჭვზე ერთ ჰემს შეიცავენ და ისინი h-ტიპის ციტოქრომებს მიეკუთვნება. ბუფერულ ხსნარებში ორივე ციტოქრომი განსხვავდება ხსნადობით და ამონიუმის სულფატით ფრაქციონირებისადმი დამოკიდებულებით, რაც მათი დაყოფის საშუალებას იძლევა. მიტოქონდრიული ციტოქრომების ორივე ფორმის მახასიათებლები წარმოდგენილია ცხრილში 2.2.

სადღეისოდ დადგენილია ორივე ციტოქრომის ამინომჟავური შემადგენლობა [94, 99, 100] და ციტოქრომ P450<sub>sc</sub>-ის ფრაგმენტთა ამინომჟავური თანმიმდევრობა [95]. ცნობილია მათი ჰემშემცველი პეპტიდების





ნახ. 2.11. მიტოქონდრიული მემბრანის ციტოქრომ P450-შემცველი სისტემის კომპონენტები. ციტოქრომ P450 მიტოქონდრიული მემბრანის ინტეგრალური ცილაა. NADPH-ადრენოლოქსინრედუქტაზა და ადრენოლოქსინი პერიფერიული ცილებია; ისინი არაა მემბრანაში „ჩამონტაჟებული“.

ცხრილი 2.2

თირკმელზედა ჯირკვლის ქერქის მიტოქონდრიების ციტოქრომ P450<sub>scc</sub> და P450<sub>11β</sub>-ის თვისებები [93, 95, 98]

თვისებები	ციტოქრომი P450 <sub>scc</sub>	ციტოქრომი P450 <sub>11β</sub>
მოლეკულური მასა	~ 49000	~ 43000
<b>მაქსიმუმი შთანთქმის სპექტრებში:</b>		
დაჟანგული ფორმა	393, 526, 645	394, 510, 645
აღდგენილი ფორმა	417, 548	419, 555
CO-სთან კომპლექსი	448	448
მპრ-სპექტრში გ-ფაქტორი	1.914, 2.241, 2.415	1, 91, 2.24, 2.42

შემაღგენლობაც [101]. მიტოქონდრიული ციტოქრომ P450-ის ორივე ფორმა გამოირჩევა ჰიდროფობული ამინომჟავური ნაშთების მაღალი (36%) შემცველობით და გოგირდშემცველი ამინომჟავების ტოლი რიცხვით; გააჩნიათ მსგავსი ფიზიკურ-ქიმიური მახასიათებლები, თუმცა P450<sub>11β</sub> უფრო ჰიდროფობულია. სპექტრული პარამეტრები დამოკიდებულია ცილის გამოყოფის მეთოდზე. ზოგიერთ მკვლევარს ციტოქრომ P450<sub>SCC</sub> დაბალსპინურ, ხოლო ზოგიერთს – მაღალსპინურ მდგომარეობაში აქვთ მიღებული. ჰემოპროტეინის განსხვავებულ სპინურ ფორმათა თანაფარდობა მნიშვნელოვანწილადაა დამოკიდებული მისი სუბსტრატთან (ქოლესტერინთან) დაკავშირების უნარზე და გასუფთავების ხერხზე. შენიშნულია, რომ P450<sub>SCC</sub> ადვილად ასოცირდება 800–850 kD მოლეკულური მასის აგრეგატებად და ამ შემთხვევაში იგი 16 სუბერთეულისაგან შედგება, რომელთაგან მხოლოდ რვა შეიცავს ჰემურ რკინას [102]. უნდა აღინიშნოს, რომ ციტოქრომ P450<sub>11β</sub> აკატალიზებს სტეროიდთა არამხოლოდ 11β- და 18-ჰიდროქსილირების რეაქციებს, არამედ რეკონსტრუირებულ სისტემებში 4-ანდროსტენ-3,17-დიონის მე-19 მდგომარეობაში ჟანგვასაც. აქედან გამომდინარე, შეიძლება ვივარაუდოთ, რომ P450<sub>11β</sub> სტეროიდებს ორი განსხვავებული უბნით იკავშირებს.

მიტოქონდრიულ ციტოქრომებთან (ისევე როგორც სხვა ჰემოპროტეინებთან) სუბსტრატებისა და ინჰიბიტორების ურთიერთქმედებაზე მნიშვნელოვან ინფორმაციას დიფერენციული სპექტროსკოპიის მეთოდი იძლევა. თირკმელზედა ჯირკვლის ქერქის მიტოქონდრიის ციტოქრომ P450-თან სხვადასხვა ნივთიერებათა ურთიერთქმედების ასეთი სპექტრები პირველად ნარაშიმგულუმ და მისმა თანაავტორებმა [103] შეისწავლეს. დადგინდა იქნა, რომ რეგისტრირებადი სპექტრული ცვლილებები ორ დიდ ჯგუფს – I და II ტიპს განეკუთვნებიან. აღმოჩნდა, რომ სტეროიდთა ბუნებასა და ციტოქრომთან დაკავშირების ტიპს შორის არავითარი კორელაცია არ არსებობს.

დაკავშირების პირველ ტიპს შეესაბამება სუბსტრატის ურთიერთქმედება ციტოქრომ P450-ის ჰიდროფობულ უბანთან, რის შედეგადაც იზრდება მეექვსე მდგომარეობაში ლიგანდის პოლარობა, მაშინ როდესაც დაკავშირების მეორე ტიპი ხასიათდება ლიგანდის უშუალო ურთიერთქმედებით ციტოქრომ P450-ის ჰემურ რკინასთან ფერიჰემოქრომის წარმოქმნით.

ციტოქრომ P450-ის შთანთქმის სპექტრებისა და მპრ-ის მონაცემებზე დაყრდნობით სარწმუნოდ უნდა მივიჩნიოთ, რომ სუბსტრატთა ურთიერთქმედების I და II ტიპი ჰემოპროტეინის მაღალ- და დაბალსპინური ფორმე-

ბითაა განპირობებული. მპრ-მეთოდით ციტოქრომ P450-ის დეტალური შესწავლა ჯეფკოატის და მისი თანამშრომლების [104] მიერაა ჩატარებული. მათ მიერ მოპოვებულია თირკმელზედა ჯირკვლის ქერქის მიტოქონდრიების ციტოქრომ P450-ის სპინურ ფორმათა რაოდენობრივი თანაფარდობის შესახებ ამომწურავი ცნობები. დაახლოებით 80% P450<sub>scc</sub> მაღალ, ხოლო 90% P450<sub>11β</sub> – დაბალსპინურ მდგომარეობაში იმყოფება. I-ტიპის დიფერენციული სპექტრები ხასიათდება ~390 ნმ მაქსიმუმებით და ~420 ნმ მინიმუმებით, მაშინ როდესაც II-ტიპის დიფერენციულ სპექტრს მაქსიმუმი ~420 ნმ-ზე და მინიმუმი ~390 ნმ-ზე აქვს. ციტოქრომ P450-თან სუბსტრატის ურთიერთქმედებისას შთანთქმის დიფერენციული სპექტრები დაკავშირებულია ლიგანდის გავლენით ჰემოპროტეინთა სპინური წონასწორობის წანაცვლებასთან (ცხრილი 2.3).

ცხრილი 2.3

P450<sub>scc</sub> და P450<sub>11β</sub>-ციტოქრომების ჟანგვა-აღდგენითი პოტენციალები [105]

ჰემოპროტეინი	ჟანგვა-აღდგენითი პოტენციალი (mV)
P450 <sub>scc</sub> სუბსტრატის გარეშე	-412 ± 2
P450 <sub>scc</sub> + ქოლესტერინი	-305 ± 1
P450 <sub>scc</sub> + პრეგნენოლონი	-305 ± 30
P450 <sub>11β</sub> სუბსტრატის გარეშე	-335 (pH 8.0-ზე)

როგორც ჩანს, სუბსტრატის ციტოქრომ P450<sub>scc</sub>-თან მიერთებისას ძლიერ იზრდება მისი ჟანგვა-აღდგენითი პოტენციალი, რითაც ადვილდება ფერმენტ-სუბსტრატის აღდგენის პროცესი.

ციტოქრომ P450-ში ჰემის ოქტაედრული კომპლექსის სქემას რაც შეეხება, არსებობს მტკიცებულება, რომ იგი ციტოქრომ P450<sub>cam</sub>-ის ანალოგიურია და რკინის მეხუთე აქსიალურ ლიგანდს ცისტეინილი წარმოადგენს [106]. ციტოქრომ P450-სა და მისი მოლელებისათვის მპრ-ის მონაცემები ადასტურებენ, რომ მეხუთე მდგომარეობაში შეიძლება იმყოფებოდეს ცისტეინის გოგირდი, ხოლო მეექვსეში – ჰისტიდინის აზოტი. მეექვსე ლიგანდს წყლის მოლეკულა ავსებს [107]. P450<sub>11β</sub>-სა და P450<sub>scc</sub>-ის მოლეკულების სტრუქტურის გამოსავლენად გამოყენებულ იქნა შეზღუდული პროტეოლიზის მეთოდი [108]. ნაჩვენებია იქნა, რომ ორივე

გლობალური ფრაგმენტისაგან შედგება, რომლებიც ტრიფსინის მოქმედებისათვის ხელმისაწვდომი მცირე პეპტიდური კავშირით ერთდებიან. ტრიფსინოლიზზე გავლენას არ ახდენს ცილის აგრეგაცია, მისი ადრენოლოქსინთან ურთიერთქმედება და მემბრანული გარემოცვა. ავტორთა აზრით [108], კატალიზური ცენტრი და ადრენოლოქსინთან კომპლექსის წარმოქმნაზე პასუხისმგებელი უბანი ლოკალიზებულია მოლეკულის ერთ ფრაგმენტში, რომლის მოლეკულური მასა ~27 kD-ს შეადგენს. მეორე ~22 kD მოლეკულური მასის მქონე ფრაგმენტი ციტოქრომ P450<sub>sec</sub>-ს მემბრანასთან ურთიერთქმედებას უზრუნველყოფს.

### 2.6.2 NADPH-ადრენოლოქსინრედუქტაზა (EC 1.6.7.1)

მიტოქონდრიულ ელექტრონთა სატრანსპორტო ჯაჭვში ადრენოლოქსინისა და ციტოქრომ P450-ის წინ NADPH-ადრენოლოქსინრედუქტაზა იმყოფება. ეს ფლავოპროტენი, რომელიც ერთ პოლიპეპტიდურ ჯაჭვზე ერთ FAD-ს შეიცავს, რამდენიმე მეთოდითაა გასუფთავებული და კრისტალიზებული. ფერმენტი გამოირჩევა ჰიდროფობული ამინომჟავების მაღალი შემცველობით. ღორის თირკმელზედას ქერქის მიტოქონდრიების რედუქტაზა შაქრებს არ შეიცავს, მაშინ როდესაც შესაბამისი ფერმენტი ხარის იმავე ორგანოდან შეიცავს მანოზას, ფრუქტოზას, გალაქტოზას და გლუკოზას [93]. ადრენოლოქსინრედუქტაზას მომატებული სწრაფვა აქვს ნახშირწყლების მიმართ და ისინი ცილის მოლეკულის ზედაპირზე თავსდებიან. გამოყოფის მეთოდისაგან დამოკიდებულებით ფერმენტის მოლეკულური მასები განსხვავებულია (ცხრილი 2.4).

ფერმენტის მნიშვნელოვან თავისებურებას ის წარმოადგენს, რომ მას უნარი აქვს მხოლოდ ადრენოლოქსინის თანამყოფობისას ალაღვინოს ციტოქრომ P450 და ციტოქრომ c. მის გარეშე რედუქტაზა მხოლოდ 2,6-დიქლოროფენოლინდოფენოლს ან ფერიციანიდს ალაღვინებს. თვლიან, რომ ადრენოლოქსინრედუქტაზასთან NADPH-ის დაკავშირებაში არსებით როლს ჰისტიდინი და ცისტეინი ასრულებენ. ადრენოლოქსინი რედუქტაზასთან წარმოქმნის მტკიცე კომპლექსს 1:1 თანაფარდობით. მას დისოციაციის დაბალი კონსტანტა გააჩნია და რედუქტაზას ჟანგვა-აღდგენით პოტენციალს არ ცვლის. სამაგიეროდ მნიშვნელოვნად მოქმედებს მის სტაბილურობაზე და ფერმენტულ აქტივობაზე. ადრენოლოქსინრედუქტაზას კომპლექსთან NADPH-ის ურთიერთქმედებისას ორი ელექტრონით აღდგენილი სამმაგი

ხარის თირკმელზედა ჯირკვლის ქერქიდან გამოყოფილი მიტოქონდრიული NADPH-ადრენოლოქსინრედუქტაზას თვისებები [93]

პარამეტრები	მნიშვნელობები
პროსთეტული ჯგუფი	1 FAD
ამინომჟავური ნაშთების რიცხვი	470
ნახშირწყლები	2-9%
შთანთქმის მაქსიმუმები	272, 378, 450
$\epsilon_{450}$ სმ <sup>-1</sup> ·M <sup>-1</sup>	10 900
იზოელექტრული წერტილი	5.4
მოლეკულური მასა	50 000–54 0000
ჟანგვა-აღდგენითი პოტენციალი	-274 mV (pH 7.0)
$K_m$ NADPH-ისადმი	$1.82 \cdot 10^{-6}$ მოლი

კომპლექსი (AD-FP-NADP) მიიღება.

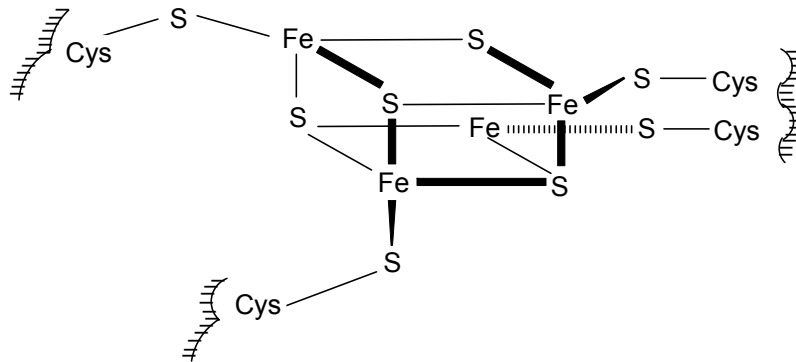
ადრენოლოქსინი და მისი რედუქტაზა ინტაქტური მიტოქონდრიიდან აღვილად ირეცხება. რედუქტაზა ხსნადი ფერმენტია და მის შედგენილობაში აღმოჩენილი არაა მემბრანასთან ასოცირებისათვის აუცილებელი ჰიდროფობული სეგმენტი. ამიტომ თვლიან, რომ იგი ფუნქციონირებს როგორც მემბრანასთან იონური ურთიერთქმედებით დაკავშირებული პერიფერიული ცილა (ნახ. 2.11).

### 2.6.3 ადრენოლოქსინი

უჯრედში არსებობს დაბალმოლეკულური (~6-14 kDA) ცილები, რომლებშიც რკინის ატომები დაკავშირებულია არა პორფირინის ბირთვთან, არამედ გოგირდშემცველ ლიგანდებთან. მათ რკინა-გოგირდპროტეინებს უწოდებენ. ასეთი ცილების შემადგენლობაში შეიძლება შედიოდეს გოგირდშემცველი კომპლექსწარმოქმნელი ორი ტიპის ჯგუფი: პირველს ცისტეინის სულფჰიდრილური ჯგუფები, ხოლო მეორეს – ე.წ. „ლაბილური გო-

გირდი“ მიეკუთვნება. ამ ფორმის გოგირდი იმით ხასიათდება, რომ ცილის ხსნარის შემყავებისას  $H_2S$ -ის,  $HS^-$ -ის ან  $S^{2-}$ -ის სახით გამოიყოფა.

უმარტივესი რკინა-გოგირდშემცველი ცილები რკინის ერთიდან რვაამდე ატომს შეიცავენ, რომლებიც ერთმანეთს პოლიპეპტიდური ჯაჭვების ცისტეინის ნაშთებით უკავშირდებიან. როგორც ირკვევა, ამ ნაშთების სივრცული განლაგება თითოეული ასეთი ტიპის ცილისათვის განსაზღვრულ მნიშვნელობას იძენს. ცილის მოლეკულა რკინის ორ ან მეტ ატომს თუ შეიცავს, ის თავისებურ „გალიისმაგვარ“ კლასტერს წარმოქმნის, რომლის შედგენილობაშიც „ლაბილური გოგირდი“ (შესაძლოა სულფიდის სახით) და ცისტეინის ნაშთი (შეიძლება თიოლატის სახით) შედის (ნახ. 2.12) [109].



ნახ. 2.12. ადრენოლოქსინის სავარაუდო აქტიური ცენტრი. დაჯგუფება, რომელიც „გალიას“ წაგავს (Cys – ცისტეინის ნაშთი).

ასეთ მრავალბირთვიან კლასტერს შეუძლია მიიღოს ან გასცეს ერთი ელექტრონი. გოგირდი, როგორც ლიგანდი,  $Fe(II)$ -ის უმდგრადობას აპირობებს, რითაც შეიძლება აიხსნას მეტაბოლურ პროცესებში ამ ცილების ძლიერი აღმდგენელი უნარი.  $Fe^{2+}$  და  $Fe^{3+}$  იონებს შორის ერთელექტრონიან გადასვლაში „გალიის“ მსგავსი დაჯგუფების ბიოქიმიური ფუნქცია ელექტრონთა გადატანაში უფრო მდგომარეობს, ვიდრე ამათუიმ გარდაქმნის კატალიზებაში.

ადრენოლოქსინი არაჰემური ცილაა და ფერედოქსინების კლასს მიეკუთვნება. იგი პუტიდარედოქსინის ანალოგიურია და მისი ბიოლოგიური როლი NADPH-ადრენოლოქსინრედუქტაზადან ციტოქრომ P450-ზე ელექტრონების ტრანსპორტში მდგომარეობს, რომელთანაც იგი მტკიცე კომპლექსს

წარმოქმნის [109]. ადრენოლოქსინი გამოყოფილია ჰომოგენურ მდგომარეობაში ელექტროფორეზულად და კრისტალიზებულია. სახელწოდება გამოხატავს იმ ფაქტს, რომ იგი პირველად მიღებულია თირკმელზედა ჯირკვლის ქერქიდან (Adrenal cortex) რვა ატომი რკინისა და რვა ატომი „ლაბილური გოგირდის“ შემცველი ცილის აღსანიშნავად. „ადრენოლოქსინის“ სინონიმად გამოიყენება „ფერედოქსინი“ (Fer – რკინა, redoxin – ელექტრონის გადატანი ცილა). ამის გარდა გამოიყენება აღნიშვნაც: n-Fe-S\*-ცილები, სადაც ვარსკვლავი „ლაბილური გოგირდის“ აღმნიშვნელია, ხოლო n – მისი ატომების რაოდენობას გვიჩვენებს, რომელიც ჩვეულებრივ რკინის ატომთა რიცხვის ტოლია. 2Fe-S\*-ადრენოლოქსინი და ტესტოლოქსინი გამოყოფილია შესაბამისად თირკმელზედა ჯირკვლიდან და სათესლეებიდან. მათი ფუნქცია იმ ფერმენტ-ოქსიგენაზების ელექტრონებით უზრუნველყოფაა, რომლებიც სტეროიდული ჰორმონების სინთეზისას ქოლესტერინის ჰიდროქსილირებას, ან ნახშირწყალბადური გვერდითა ჯაჭვის მოცილებას აკატალიზებენ [110]. 2Fe-S\*-ტიპის ფერედოქსინი სუქცინალური წარმოებულის სახით გამოყოფილია გულის მიტოქონდრიების სუნთქვითი ჯაჭვის bc<sub>1</sub>-კომპლექსიდან (სხვა სახელწოდებები: სლეიტერის ფაქტორი, რისკეს ცილა, ბრიტანული ანტილუიზიტის-BAL-ის მიმართ მგრძობიარე ფაქტორი), რომელიც მიტოქონდრიული ელექტრონთა სატრანსპორტო გზის ცენტრალური უბანია [110]. ამ ტიპის ფერედოქსინებს გააჩნიათ დამახასიათებელი ოპტიკური თვისებები, რომლითაც ისინი განსხვავდებიან სხვა რკინა-გოგირდშემცველი ცილებისაგან. მათ შთანთქმის სპექტრში არსებობენ ზოლები 320, 420 და 460 ნმ-ებზე და აგრეთვე მხარი 500 ნმ-ის სიახლოვეს. გარდა ამისა, Fe-S\*-ტიპის ცილას შეიცავს ზოგიერთი აზოტ-მაფიქსირებელი ბაქტერია, თუმცა უცნობია თვით აზოტის ფიქსაციაში მათი უშუალო მონაწილეობა. მცენარეული ტიპის ფერედოქსინები გამოვლენილია ანაერობულ (*Clostridium pasteurianum*) და აერობულ (*Azotobacter vine-landii*) ბაქტერიებში [111, 112].

ღორისა და ხარის თირკმელზედას მიტოქონდრიებიდან გამოყოფილი ადრენოლოქსინებისათვის დადგენილია ამინომჟავური თანმიმდევრობები. რეკონსტრუირებული ადრენოლოქსინი თავისი სპექტრული თვისებებითა და კატალიზური აქტივობებით ნატიურისაგან არ განსხვავდება.

ადრენოლოქსინის მპრ- და მესბაუერის სპექტრებმა, აგრეთვე ორმაგბირთვულმა რეზონანსმა და მაგნიტური ამთვისებლობის გაზომვამ საშუალება შექმნა იმის მტკიცებისათვის, რომ დაჟანგულ დიამაგნიტურ ცილაში რკინის ორი ატომი მაღალსპინურ მდგომარეობაში იმყოფება და ურთიერთქმედ-

დებენ რა როგორც ანტიფერომაგნეტიკები, იძლევიან  $S=0$ -ის ტოლ ჯამურ სპინს. აღდგენილ მდგომარეობაში ორბიტოვანი კომპლექსი შეიცავს ერთ ატომ რკინას სამვალენტთან მდგომარეობაში, ხოლო მეორეს – ორვალენტთან მაღალსპინურ მდგომარეობაში. აღდგენილი ცილის რკინის ატომები არაექვივალენტურები არიან და ურთიერთქმედებისას იძლევიან ჯამურ  $S=1/2$ -ის ტოლ სპინს.

არომატულ ამინომჟავათა ნაშთებს ელექტრონული ტრანსპორტის მექანიზმში არსებითი როლის შესრულება შეუძლიათ. ადრენოლოქსინის მოლეკულა შეიცავს ერთადერთ თიროზინს, 4 ფენილალანინს და საერთოდ არ შეიცავს ტრიპტოფანს. თიროზინ-82-ში ნიტრო-ჯგუფის შეყვანა ასახვას პოულობს ადრენოლოქსინის თვისებებსა და აქტივობაზე. შესაძლოა, რომ მოდიფიცირებული ადრენოლოქსინის კატალიზური აქტივობის დაქვეითების მიზეზი ადრენოლოქსინრედუქტაზასთან მისი კომპლექსის სიმტკიცის შემცირება იყოს.

ადრენოლოქსინის ბიოქიმიური კვლევის შედეგად არსებული მონაცემების საფუძველზე შეიძლება შემდეგი ზოგადი დასკვნების გამოტანა:

- ადრენოლოქსინი თითქმის ყველა სასიცოცხლოდ მნიშვნელოვან ჟანგვა-აღდგენით პროცესში (ფოტოსინთეზში, მიტოქონდრიულ სუნთქვაში, აზოტფიქსაციაში და სხვ.) მონაწილეობს და ელექტრონთა გადატანას ახორციელებს;
- ცალკეულ შემთხვევებში ადრენოლოქსინს ორი ისეთი ელექტრონის გადატანა შეუძლია, რომელთა ენერგია მხოლოდ ელექტრონებისადმი მაღალი სწრაფვის მქონე წყვილებისთვისაა დამახასიათებელი;
- ჰემოპროტეინებისაგან განსხვავებით, რომლებშიც კომპლექსწარმოქმნა პორფირინის უკვე ჩამოყალიბებულ ხისტ დაჯგუფებებთან ხდება, ადრენოლოქსინების ქიმიური შენება საშუალებას იძლევა შეიქმნას ლიგანდების აუცილებელი უფრო პლასტიკური სივრცული წყობა.

#### **2.6.4 სტეროიდმაჰიდროქსილირებელი სისტემის მოქმედების მექანიზმი**

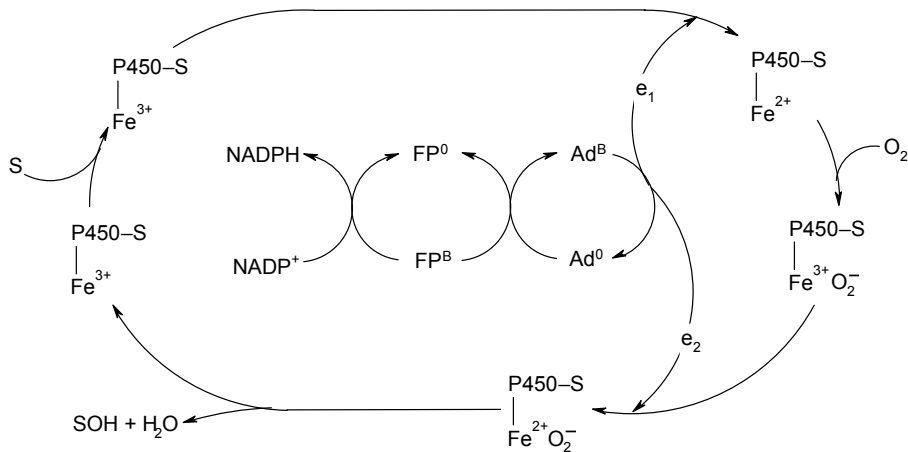
თირკმელზედა ჯირკვლის მიტოქონდრიებში (ისევე, როგორც სხვა მაჰიდროქსილირებელ სისტემებში) ციტოქრომ P450-თან კომპლექსში მყოფი ჟანგბადის გასააქტიურებლად ორი ელექტრონია საჭირო. აქაც ჰემოპროტეინის დაჟანგულ ფორმასთან სუბსტრატის ურთიერთქმედების სტადია ყველა ციტოქრომ P450-შემცველი მაჰიდროქსილირებელი სისტემის ანა-



ლოგიურია. ეს იმას ნიშნავს, რომ ჟანგბადის აღდგენა მიმდინარეობს თანმიმდევრობით ჯერ ერთი, ხოლო შემდგომ მეორე ელექტრონის მიერთების გზით, და ორივე სტადიაში აქ ადრენოლოქსინი მონაწილეობს, რომლის როლიც ქაფურის მაჰიდროქსილირებელ სისტემაში არსებული პუტიდარედოქსინის იდენტურია [90, 113]. უაღრესად არსებითია, რომ პირველი ელექტრონით ფერმენტ-სუბსტრატის კომპლექსის აღდგენა ორივე სისტემაში აღმდგენელის ბუნების მიმართ არასპეციფიკურია და შეიძლება ისეთი მარტივი აღმდგენელით იქნას შეცვლილი, როგორც ნატრიუმის დითიონიტია. ციტოქრომ P450-სუბსტრატი-O<sub>2</sub> სამმაგი კომპლექსის აღდგენა მიტოქონდრიულ სისტემაში ადრენოლოქსინის, ხოლო ქაფურ-მაჰიდროქსილირებელ სისტემაში – პუტიდარედოქსინის მონაწილეობას მოითხოვს. მიუხედავად ამისა, ამ ორი სისტემის მოქმედებაში მნიშვნელოვანი სხვაობებიც არსებობს, რაც ფერმენტ-სუბსტრატისა და სამმაგი კომპლექსის პირველ- და მეორე ელექტრონით უზრუნველყოფის მექანიზმში ვლინდება.

თირკმელზედა ჯირკვლის ქერქის მიტოქონდრიებში NADPH-დან ციტოქრომ P450-ზე ელექტრონული ტრანსპორტის თანმიმდევრობა მოცემულია ნახ. 2.13-ზე. მასში მონაწილეობენ რედუქტაზა (FP), ადრენოლოქსინი (Ad) და მათი კომპლექსები.

პირველ სტადიაზე სუბსტრატის დაკავშირება ხდება დაჟანგულ ციტოქრომ P450-თან. NADPH-დან რედუქტაზას ანაერობულ აღდგენას თან სდევს ჰემოპროტეინის ჟანგვა-აღდგენითი პოტენციალისა და სპინური მდგომარეობის ცვლილებები. ამავე დროს შთანთქმის სპექტრის მაქსიმუმი 750 ნმ-ის (ან უფრო მეტის) ოლქში ჩნდება. ამ პროცესში მპრ-სიგნალი არაა დარეგისტრირებული. შთანთქმის სპექტრი ორ შემთხვევაშია იდენტური: დაჟანგული რედუქტაზას ურთიერთქმედებისას NADPH-თან, ან დითიონიტით აღდგენილ რედუქტაზაზე NADP-ის დამატებისას. FP-ის აღდგენა შეიძლება განხორციელდეს სხვა აღმდგენლების, კერძოდ NADH-ის ან დითიონიტის გამოყენებით და ამ შემთხვევაში გრძელტალღოვან ოლქში შთანთქმის ზოლები არ მჟღავნდება. ეს იმის მარკენებელია, რომ მხოლოდ NADP წარმოქმნის აღდგენილ რედუქტაზასთან კომპლექსს (FP-H<sub>2</sub>-NADP), რომელიც ორ ელექტრონს შეიცავს და გააჩნია 1.0·10<sup>-8</sup> დისოციაციის კონსტანტა. დითიონიტით აღდგენილი რედუქტაზა NADPH-თან წარმოქმნის კომპლექსს, რომელიც ოთხ ელექტრონს შეიცავს. განხილული ცვლილებები აადვილებენ პირველი ელექტრონით ფერმენტ-სუბსტრატის აღდგენას, რომლის ტრანსპორტშიც NADPH-ადრენოლოქსინრედუქტაზა და ადრენოლოქსინია ჩართული [90, 93, 98].

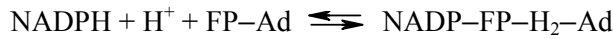


ნახ. 2.13. თირკმელზედა ჯირკვლის ქერქის მიტოქონდრებში ჰიდროქსილირების კატალიზური ციკლი (განმარტება იხ. ტექსტში) [98].

NADPH-ის სიჭარბისას ადრენოლოქსინრედუქტაზას აღდგენა პირველი რიგის კონსტანტით ხასიათდება და  $28 \text{ წმ}^{-1}$ -ის ტოლია. კოფერმენტის დიდი სიჭარბისას ჩნდება აღდგენის რეაქციის კიდევ ერთი ფაზა, რაც დაკავშირებულია კომპლექსში NADPH-ის NADP-ით შეცვლით ( $k=4.25 \text{ წმ}^{-1}$ ). ადრენოლოქსინრედუქტაზა აკატალიზებს 2,ნ-დიქლორფენოლინდოლოფენოლის აღდგენას, მაშინ როდესაც ციტოქრომ c აღდგენას მხოლოდ რედუქტაზისა და ადრენოლოქსინის მონაწილეობით განიცდის [114]. ადრენოლოქსინი რედუქტაზასთან 1:1 თანაფარდობით მტკიცე კომპლექსს წარმოქმნის, რომელიც შეიძლება მაღალი სიჩქარით ( $k=300 \text{ წმ}^{-1}$ ) დაიშალოს და ეს დამოკიდებული არაა ხსნარში მარილთა კონცენტრაციაზე [115].

ადრენოლოქსინის გავლენით რედუქტაზა კონფორმაციულ ცვლილებებს განიცდის, რითაც შეიძლება აიხსნას NADPH-ის, FP-ისა და Ad-ის მონაწილეობით c-ს აღდგენის პროცესში გარკვეული ინდუქციური პერიოდის არსებობა. FP-H<sub>2</sub>-Ad-ის კომპლექსის სწრაფი წარმოქმნა და მისი ასევე სწრაფი დაშლა იმას მოწმობს, რომ ადრენოლოქსინი შეიძლება რედუქტაზიდან აღსადგენ ობიექტზე (ციტოქრომ c-ზე ან ციტოქრომ P450-ზე) ელექტრონების ძვრადი გადამტანი იყოს [114, 118]. ადრენოლოქსინის კომპლექსს ფლავოპროტეინთან დისოციაციის დაბალი კონსტანტა გააჩნია [119]. ამ კომპლექსის NADPH-თან ურთიერთქმედებისას ფლავოპროტეინი აღდგენას განიცდის, ხოლო ადრენოლოქსინი დაჟანგულ მდგომარეობაში

რჩება:



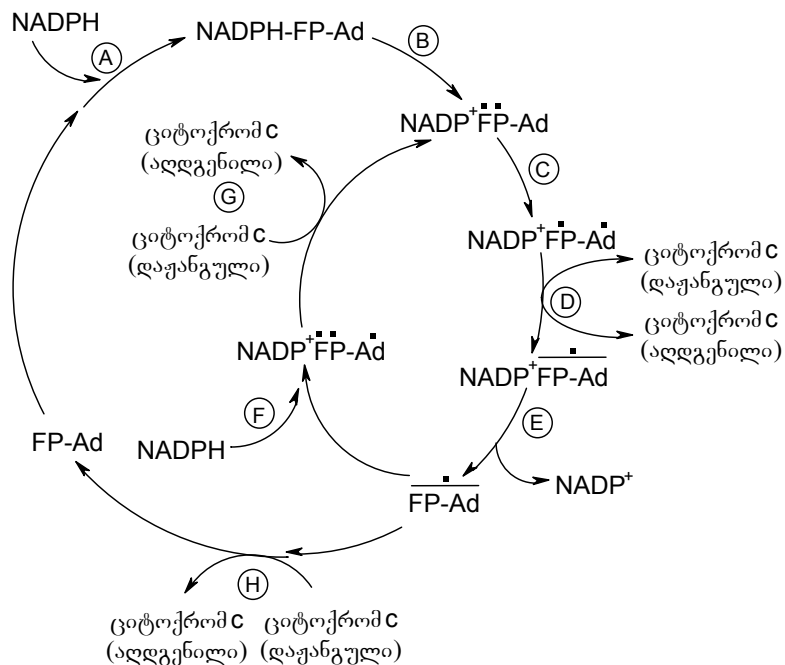
NADPH-ით ციტოქრომ c-ს აღდგენისას FP-Ad-კომპლექსის მოქმედების მექანიზმი დეტალურადაა შესწავლილი [120] და ამ რეაქციის კატალიზური ციკლი მოცემულია ნახ. 2.14-ზე.

პირველ სტადიაზე ორი დაჟანგული ცილის მტკიცე კომპლექსი (FP-Ad) რეაგირებს NADPH-თან. A და B რეაქციათა სიჩქარეები ხასიათდებიან  $18 \text{ წმ}^{-1}$  კონსტანტებით. წარმოქმნილ სამმაგ კომპლექსში მუხტის გადატანისას ორი ელექტრონი რედუქტაზას ფლავინურ დაჯგუფებაზეა ლოკალიზებული. სამმაგი კომპლექსის დისოციაციის კონსტანტა  $10^{-8} \text{ M}$ -ის ტოლია. C-სტადიაზე ხდება ერთი ელექტრონის გადატანა სრულად აღდგენილი რედუქტაზას ფლავინური დაჯგუფებიდან ადრენოლოქსინის Fe,S-კლასტერზე, რომელიც მხოლოდ ერთი ელექტრონის აქცეპტორია. მიუხედავად იმისა, რომ სტაციონალური და სწრაფი კინეტიკის მეთოდით NADP-FP-Ad ნაწილაკის იდენტიფიცირება ვერ მოხერხდა, მისი არსებობა სავსებით დასაშვებია, რადგან მარტო რედუქტაზას არ შეუძლია ციტოქრომ c-ს აღდგენა, ხოლო აღდგენილი ადრენოლოქსინი ციტოქრომ c-სთან სწრაფად რეაგირებს ( $k > 300 \text{ წმ}^{-1}$ ). გარდა ამისა, NADPH და მისი ექვიმოლური FP და Ad ადვილად ახორციელებენ ციტოქრომ c-ს აღდგენას [120].

NADP-FP-Ad ნაწილაკის არსებობა აბსოლუტურად შესაძლებელია თერმოდინამიკური თვალსაზრისითაც. C- და D-სტადიები მიმდინარეობს პროცესის მალიმიტირებელი საფეხურის სიჩქარის კონსტანტით ( $3.2 \text{ წმ}^{-1}$ ). D-სტადიის შედეგად წარმოიქმნება ერთი ელექტრონის შემცვე-

ლი კომპლექსი ( $\text{NADP} \cdot \text{FP} \cdot \text{AD}$ ). ამ ფორმას 2500-ჯერ ნაკლები სწრაფვა აქვს NADPH-ის მიმართ, ვიდრე კომპლექსის ორელექტრონიან ფორმას. ამით შეიძლება აიხსნას სამმაგი კომპლექსის დისოციაციით NADP-ის გამოთავისუფლება (E-სტადია).  $\text{FP} \cdot \text{AD}$  -ფორმას შეუძლია ციტოქრომ c-ს შენელებული აღდგენა ( $K = 0.11 \div 0.33 \text{ წმ}^{-1}$ ). ციტოქრომ c-ს გაცილებით სწრაფი აღდგენის რეაქცია ხორციელდება ნაწილაკით, რომელიც სამ ელექტრონს

( $\text{NADP} \cdot \text{FP} \cdot \text{Ad}$ ) შეიცავს და F-სტადიაზე წარმოიქმნება. ეს ნაწილაკი G-სტადიაზე ორელექტრონიან ფორმად ( $\text{NADP} \cdot \text{FP} \cdot \text{Ad}$ ) გარდაიქმნება.



ნახ. 2.14. ადრენოლოქსინრედუქტაზა – ადრენოლოქსინის კომპლექსით ციტოქრომ-ს-ს NADPH-დამოკიდებული კატალიზური ალდგენის ციკლი. FP – ადრენოლოქსინრედუქტაზა, Ad – ადრენოლოქსინი (განმარტება იხ. ტექსტში) [120].

როგორც ვხედავთ, ციტოქრომ c-ს NADPH-დამოკიდებული ალდგენა ციკლურ პროცესს წარმოადგენს, რომელშიც გაერთიანებულია ერთ- და სამ-ელექტრონიანი კომპლექსები. სრულად დაჟანგული კომპლექსი მხოლოდ კატალიზური ციკლის დასაწყისში წარმოიქმნება. დასაშვებადაა მიჩნეული, რომ მიტოქონდრიებში ციტოქრომ P450 მემბრანაში ციტოქრომ c-ს ანალოგიური მექანიზმით განიცდის ალდგენას [120]. ციტოქრომ P450-ზე ელექტრონების გადატანა ხდება სამმაგ კომპლექსში, რომელშიც რედუქტაზა, ადრენოლოქსინი და თვით ეს ჰემოპროტეინია ჩართული. ამ დაშვების სასარგებლოდ მეტყველებს ციტოქრომ P450<sub>sc</sub>-ისა და ადრენოლოქსინის მიერ კომპლექსწარმოქმნის ფაქტი, რომელიც ნაჩვენებია კატაპირისა და თანაავტორების [108] მიერ. მათ ჩათვალეს, რომ ეს კომპლექსი მხოლოდ ქოლესტერინის თანამყოფობისას წარმოიქმნება. მოგვიანებით ნაჩვენები იქნა

უქოლესტერინოდ ციტოქრომ P450<sub>sc</sub>-ისა და ადრენოლოქსინის შორის კომპლექსწარმოქმნის შესაძლებლობა, რომელსაც დისოციაციის დაბალი კონსტანტა ( $4 \cdot 10^{-7}$  M) გააჩნია და ქოლესტერინთან ერთად კიდევ უფრო ქვეითდება ( $3.0 \cdot 10^{-8}$  M) [121]. ციტოქრომ P450<sub>sc</sub>-ისა და ადრენოლოქსინის კომპლექსი ტემპერატურის ფართო ინტერვალში და ბუფერის სხვადასხვა კონცენტრაციაზე ძალზე უმდგრადია. რამდენადაც ადრენოლოქსინი კომპლექსს წარმოქმნის რელექტაზასთან და ციტოქრომ P450<sub>sc</sub>-თან, სავარაუდოდ ხდება, რომ სამმაგი კომპლექსი სამივე ცილას 1:1:1 თანაფარდობით შეიცავს, რაც მნიშვნელოვან როლს უნდა ასრულებდეს მიტოქონდრიულ ჰიდროქსილირებაში [94, 122, 123]. ამ სამუშაოებში გაზიარებულია ასეთი თვალსაზრისი. აღნიშნული საკითხი დღესაც აქტუალურია, რადგან იგი დაკავშირებულია მიტოქონდრიული ჰიდროქსილაზური სისტემის ორგანიზაციის პრობლემასთან და მონოოქსიგენაზური კომპლექსის რეკონსტრუქციასთან.

არ შეიძლება გვერდი აგუაროთ ზოგიერთი მკვლევარის [114-120] მონაცემებს, რომლებიც უარყოფენ მიტოქონდრიული სისტემის ფუნქციონირებაში სამმაგი კომპლექსის შესაძლო როლს. ეს თვალსაზრისი შემდეგ ფაქტებს ემყარება: 1. მიტოქონდრიულ მემბრანაში ადრენოლოქსინრელექტაზა, ადრენოლოქსინი და P450-ციტოქრომები ჯამში 1:10:10 ფარდობით იმყოფებიან, ანუ ნატიურ პირობებში შეინიშნება ადრენოლოქსინისა და P450-ების სიჭარბე [122]; 2. ადრენოლოქსინისა და ქოლესტერინის კომპლექსირება ციტოქრომ P450<sub>sc</sub>-თან შემთხვევით და არა მოწესრიგებულ ხასიათს ატარებს; ამავე დროს ადრენოლოქსინის ურთიერთქმედება ციტოქრომ P450-თან მცირედაა დამოკიდებული სუბსტრატის თანამყოფობაზე [121]; 3. რეკონსტრუირებულ სისტემაში მაქსიმალური აქტივობა მიიღება ადრენოლოქსინ:P450-ის 1:1 ფარდობასთან შედარებით უფრო დიდი თანაფარდობისას, ანუ სისტემის მაქსიმალურ ბრუნვათა რიცხვის მისაღწევად აუცილებელია ადრენოლოქსინის სიჭარბე [116], რაც ეწინააღმდეგება სამივე კომპონენტის 1:1:1 ფარდობისათვის კომპლექსის ფუნქციურ როლს; 4. არსებობს მონაცემები იმის შესახებ, რომ მტკიცედ დაკავშირებული სამმაგი კომპლექსის (FP-Ad-P450) არსებობა საერთოდ შეუძლებელია. ყოველ შემთხვევაში, იმ პირობებისათვის მაინც, როცა სამივე კომპონენტი დაჟანგულ მდგომარეობაში იმყოფება [105]. მთელ რიგ შემთხვევაში მონაცემები მიუთითებს იმის შესახებ, რომ მტკიცედ დაკავშირებული სამმაგი კომპლექსის FP-Ad-კომპლექსი პრაქტიკულად არ იკავშირებს ციტოქრომ P450<sub>sc</sub>-ს [118].

როგორ შეიძლება აიხსნას მიტოქონდრიული მონოოქსიგენაზას ფუნქ-

ციონირებაში სამმაგი კომპლექსის არსებობასა და როლზე ასეთი წინააღმდეგობრივი მონაცემები?

როგორც ირკვევა სათანადო პირობებში ასეთი კომპლექსი არსებობს. მისი გამოვლენა დამოკიდებულია სისტემის რეკონსტრუქციის ხერხზე, pH-ის მნიშვნელობაზე, ხსნარის იონურ ძალაზე და ქოლესტერინის არსებობა-არარსებობაზე. ასე მაგალითად, დიმირისტილიფოსფატიდილიქოლინით წარმოქმნილ ფოსფოლიპიდურ ვეზიკულებში დაბალი იონური ძალისას ქოლესტერინის თანამყოფობის პირობებში სამმაგი კომპლექსი (FP-Ad-P450<sub>sc</sub>) ნამდვილად არსებობს [122]. ქოლესტერინის გარეშე დაბალი იონური ძალისა და სხვა თანაბარ პირობებში სამმაგი კომპლექსი კარგავს ციტოქრომ P450-ს და ბინარულ კომპლექსად (FP-Ad) გარდაიქმნება. ასევე, ქოლესტერინის გარეშე მაღალი იონური ძალისას სამივე კომპონენტი დისოცირებულ მდგომარეობაში იმყოფება [122].

ფოსფატიდილიქოლინის ვეზიკულის გამოყენებისას და პირობების რამდენადმე შეცვლით ჩატარებულმა გამოკვლევებმა აჩვენეს, რომ სამმაგი კომპლექსი არ ფუნქციონირებს [117]. ციტოქრომ P450<sub>sc</sub> ლიპიდურ ვეზიკულასთან ურთიერთქმედებს თავისი ჰიდროფობული ფრაგმენტით, ხოლო ადრენოლოქსინთან დაკავშირების ცენტრი ვეზიკულის გარეთ იმყოფება და პოლარული ბუნებისაა. ქოლესტერინის დაკავშირების ცენტრი ვეზიკულის შიგნითაა ლოკალიზებული და ჰიდროფობული თვისებები გააჩნია, ანუ განსხვავებულ პირობებში ციტოქრომ P450-თან კომპლექსის კომპონენტთა დაკავშირება სხვადასხვანაირად შეიძლება რეალიზდებოდეს ან საერთოდ არ ხდებოდეს. არსებობს გაფრთხილება იმის შესახებ, რომ ხსნარში მონოოქსიგენაზური კომპლექსის კონსტრუქციისას ან მისი იმობილიზაციის მიღებული მონაცემების პირდაპირმა გადატანამ ნატიურ მიტოქონდრიულ სისტემაზე შეიძლება მცდარ დასკვნამდე მიგვიყვანოს [110-118, 123, 124]. აქამდე არ მოხერხდა ინტაქტურ მიტოქონდრიულ სისტემაში სამი ცილის სტექიომეტრული თანაფარდობის ზუსტი დადგენა. ამიტომ მიტოქონდრიულ მემბრანაში მონოოქსიგენაზური კომპლექსის კომპონენტთა ურთიერთქმედების ორ ტიპს შორის არჩევანის გაკეთება საკმაოდ ძნელია. არსებობს მონაცემები კლასტერის შესაძლო წარმოქმნაზე [122, 124]. ამის საპირისპიროდ კი არსებობს პუბლიკაციები მემბრანაში მაჰიდროქსილირებელი კომპლექსის კომპონენტთა მაღალი ლატერალური დიფუზიის შესახებ [114-118]. ამიტომ მემბრანაში კომპონენტთა ურთიერთქმედების ორი ტიპის – ლატერალური დიფუზიისა და კლასტერების არსებობის შესახებ საბოლოო დასკვნების გამოტანა მაინც ძნელი და ნაადრევი, მითუმეტეს რომ არსებო-

ბენ როგორც ერთი, ასევე მეორე მოდელის დამამტკიცებელი ფაქტები [94, 123, 124].

სტეროიდჰიდროქსილაზური სისტემის მოლეკულური ორგანიზაციის შეცნობაში უდავო ინტერესს წარმოადგენს ამ სისტემის თვითაწყობა [94, 123, 124]. მეთოდოლოგიურად პროცესის არსი შემდეგში მდგომარეობს: ადრენოლოქსინრედუქტაზა დაიტანება ადრენოლოქსინ-სეფაროზას სვეტზე და შემდგომ ემატება ციტოქრომ P450. მეორე ვარიანტი გულისხმობს სტეროიდჰიდროქსილაზას კომპონენტთა დატანის სხვა რიგს და ამ დროს აქტივობის მაქსიმუმი რეგისტრირდება: მაღალი იონური ძალის ბუფერში სვეტზე დაიტანება ციტოქრომ P450, ხდება სორბირებული ჰემოპროტეინის დეზაგრეგაცია და შემდგომ სვეტში შეაქვთ ადრენოლოქსინრედუქტაზა. მიღებული რეკონსტრუირებული სისტემა ჟანგავს შესაბამის სუბსტრატებს. მიღებული შედეგები აჩვენებს სტეროიდჰიდროქსილაზური სისტემის შესაძლო არსებობას, რომელიც მემბრანაში სტაბილურად მოფუნქციონირე მულტიფერმენტული კომპლექსის სახით იმყოფება. სტეროიდჰიდროქსილაზური სისტემის თვითაწყობა ახალ პერსპექტივას სახავს ჰორმონული პრაპარატების ფერმენტულ სინთეზში მათი პრაქტიკული გამოყენებისათვის.

ამგვარად შეიძლება დავაჯამოთ არსებული ფაქტები: ღვიძლის მიკროსომებში NADPH-დან ციტოქრომ P450-ზე ელექტრონების გადატანა მიმდინარეობს FAD- და FMN-შემცველი NADPH-ციტოქრომ P450-რედუქტაზით და Fe,S-შემცველ ცილებს არ საჭიროებს. ღვიძლის ფერმენტული სისტემის მიერ ციტოქრომ c-ს კატალიზური აღდგენა მრავალ საერთოს ამჟღავნებს ამავე ჰემოპროტეინის ადრენოლოქსინ-ადრენოლოქსინრედუქტაზას კომპლექსით აღდგენასთან. ორივე პროცესში ჩართულია ორ-ორი ჟანგვა-აღდგენითი ცენტრი: FAD და Fe<sub>2</sub>S<sub>2</sub>-კლასტერი მიტოქონდრიულ სისტემაში და FAD და FMN მიკროსომულ სისტემაში. კატალიზური აქტის განხორციელებისას ორივე სისტემა ნაწილობრივ აღდგენილ მდგომარეობაში რჩება. მიკროსომული რედუქტაზა თავის მდგომარეობას იცვლის 2-ელექტრონ-4-ელექტრონ-შემცველ, ან 1-ელექტრონ-3-ელექტრონ-შემცველ ფორმამდე, ხოლო მიტოქონდრიული კომპლექსი თავის მდგომარეობას 1-ელექტრონ-3-ელექტრონ-შემცველ ფორმამდე იცვლის.

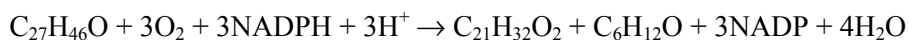
უნდა აღინიშნოს, რომ ფლავოპროტეინების და Fe,S-შემცველი ცილების კომპლექსები 1:1 თანაფარდობით ზოგიერთ სხვა სისტემებშიც გვხვდება; მაგ., NADH-რუბეროლოქსინ – რედუქტაზასა და რუბეროლოქსინში [125], ფერედოქსინ : NADP-ოქსიდორედუქტაზასა და ფერედოქსინში [126], პუტიდარედოქსინსა და პუტიდარედოქსინრედუქტაზაში.

### 2.6.4.1 ქოლესტერინის გვერდითი ალიფატური ჯაჭვის მოხლეჩვის მექანიზმის შესახებ

როგორც აღნიშნული იყო, თირკმელზედა ჯირკვლის ქერქის მიტოქონდრიების ციტოქრომ P450<sub>sec</sub> აკატალიზებს ქოლესტერინის გვერდითი ჯაჭვის არასრულ მოწყვეტას, რის შედეგადაც ქოლესტერინის ბირთვებთან დაკავშირებული მხოლოდ ორი ნახშირბადატომის შემცველი შუალედი პროდუქტი პრეგნენოლონი და იზოკაპრონის ალდეჰიდი მიიღება. ეს რეაქცია იმითაა მნიშვნელოვანი, რომ იგი სტეროიდული ჰორმონების ბიოსინთეზის გზაზე მაღლიმიტირებელ სტადიას წარმოადგენს [127]. რეაქციის მაკატალიზებელ ციტოქრომ P450<sub>sec</sub>-ს ხშირად დესმოლაზას უწოდებენ.

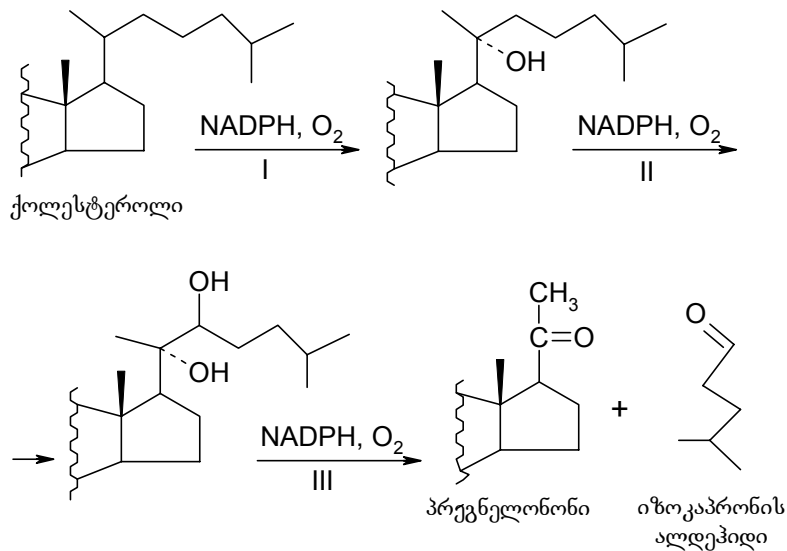
დესმოლაზური რეაქციის განხილვისას ბუნებრივად ჩნდება კითხვები, კერძოდ: რომელი რეაქციები უსწრებენ ქოლესტერინის გვერდითი ჯაჭვის მოხლეჩას? რომელი შუალედური ნაერთები წარმოიქმნება ამ დროს? ერთი თუ რამდენიმე ციტოქრომ P450<sub>sec</sub>-ს ფორმა აკატალიზებს ამ პროცესს? ჩართული არიან თუ არა მასში სხვა ფერმენტებიც? და ა.შ. მთელ რიგ სამუშაოებში [128-131] მოცემულია მცდელობები ზოგიერთ ამ კითხვაზე პასუხის გასაცემად და მათ საფუძველზე შეიძლება წარმოდგენილ იქნას ქოლესტერინის გვერდითი ჯაჭვის მოხლეჩის გამარტივებული სქემა (ნახ. 2.15).

გარდაქმნის ამ მექანიზმში არსებითი ისაა, რომ ქოლესტერინის მოლეკულას გვერდითი ჯაჭვი სამი თანმიმდევრული რეაქციის შედეგად სცილდება. ესენია 20-ჰიდროქსილირება, 22-ჰიდროქსილირება და C-20 და C-22-ნახშირბადატომებს შორის ჯაჭვის მოხლეჩა (იხ. ქოლესტერინის მოლეკულური ფორმულა). ასეთი მექანიზმის არსებობის სასარგებლოდ მეტყველებს დახარჯული NADPH-ისა და O<sub>2</sub>-ის სტექიომეტრია, აგრეთვე წარმოქმნილი პრეგნენოლონი. დადგინდა, რომ ერთი მოლეკულა პრეგნენოლონის წარმოქმნა სამ-სამი მოლეკულა NADPH-ისა და O<sub>2</sub>-ის მოხმარებას ითხოვს [132]:



NADPH-ის, O<sub>2</sub>-ის და H<sup>+</sup>-ის ხარჯვის სტექიომეტრია განსაზღვრულია არა მარტო ქოლესტერინის, როგორც სუბსტრატის, არამედ მისი შუალედური ოქსიწარმოებულებისთვისაც. ცხრილ 2.5-ში მოცემულია გაზომვის შედეგები.





ნახ. 2.15. ქოლესტერინის (სქემაზე მოცემულია მხოლოდ მისი D-ბირთვი და გვერდითი ჯაჭვი) ჰიდროქსილირება ალიფატური ჯაჭვის მოცილებით [132].

ცხრილი 2.5 [132]

ქოლესტერინის გვერდითი ჯაჭვის მოცილების რეაქციის სტექიომეტრია

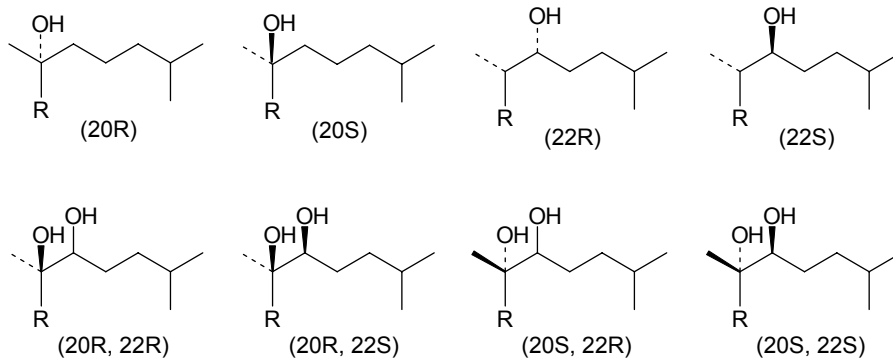
სუბსტრატი	$\frac{\Delta\text{NADPH}}{\text{პრეგნენოლი}}$	$\frac{\Delta\text{O}_2}{\text{პრეგნენოლი}}$	$\frac{\Delta\text{H}^+}{\text{პრეგნენოლი}}$
ქოლესტერინი	$3 \pm 0.2$	$3.1 \pm 0.3$	$3.0 \pm 0.2$
20 $\alpha$ -HO- ქოლესტერინი	$1.9 \pm 0.3$	$2.1 \pm 0.3$	$2.1 \pm 0.1$
20 $\alpha$ , 22-(HO) <sub>2</sub> - ქოლესტერინი	$1.0 \pm 0.3$	$0.9 \pm 0.4$	$1.1 \pm 0.1$

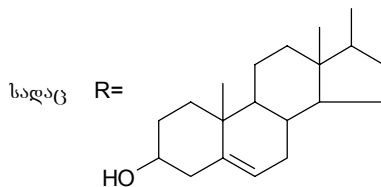
მიღებული სტექიომეტრია ადასტურებს, რომ სამივე რეაქცია მონოქსიგენაზური მექანიზმით კატალიზდება და რომ მესამე სტადიაზე გვერდითი ჯაჭვის მოცილებაში ციტოქრომ P450 მონაწილეობს. დადგინდა აგრეთვე, რომ pH 6.8-ზე მიტოქონდრიების ციტოქრომ P450-ის ერთი და იგივე ფრაქცია (P450<sub>scc</sub>) იმ შემთხვევაში უზრუნველყოფს მაქსიმალურ ფერმენ-

ტულ აქტივობას, როდესაც სუბსტრატებად გამოიყენება: ქოლესტერინი, [20S]-20-ოქსიქოლესტერინი, [22R]-22-ოქსიქოლესტერინი, ან [20R, 22R]-20,22-დიოქსიქოლესტერინი. ქოლესტერინის ყველა ოქსიწარმოებულიდან პრეგნენოლონის წარმოქმნა მნიშვნელოვნად ითრგუნება [20R, 22S]-20,22-ქოლესტერინოქსიდით [130].

ცალკეული სამუშაოების [133, 134] საფუძველზე გამოთქმულია ვარაუდი, რომ 20,22-ქოლესტერინოქსიდი ქოლესტერინიდან გვერდითი ჯაჭვის მოხლეჩის რეაქციაში შუალედ პროდუქტს წარმოადგენს. ამ ჰიპოთეზის თანახმად პირველ სტადიაზე ხდება ქოლესტერინის დეჰიდრირება 22,22-დეჰიდროქოლესტერინის წარმოქმნით, რომელიც შემდეგ ციტოქრომ P450-ის, O<sub>2</sub>-ისა და NADPH-ის მონაწილეობით ეპოქსიდად გარდაიქმნება. ამის საპირისპიროდ მორისაკისა და თანაავტორების მიერ [128] სარწმუნოდ იქნა ნაჩვენები, რომ არც 20,22-დეჰიდროქოლესტერინი და არც 22,22-ქოლესტერინოქსიდი გვერდითი ჯაჭვის მოხლეჩის პროცესში არ წარმოადგენენ შუალედ პროდუქტებს, რამდენადაც ორივე ნივთიერების ინკუბაცია ციტოქრომ P450-შემცველი სისტემის ყველა კომპონენტთან ჟანგბადის თანამყოფობისას პრეგნენოლონს არ იძლევა.

მორისაკიმ და თანაავტორებმა [131] გამოიკვლიეს C-20 და C-22 ატომების სტერეოქიმიური სპეციფიკურობა, რომლებიც ქოლესტერინის გვერდითი ჯაჭვის მოხლეჩის პროცესში ამ მდგომარეობაში აღმოჩნდნენ ჰიდროქსილირებულები. ამ მიზნით მათ დაასინთეზეს 20-ოქსიქოლესტერინის, 22-ოქსიქოლესტერინისა და 22,22-დიოქსიქოლესტერინის ყველა C-20 და C-22-სტერეოიზომერი, რომელთა ფორმულები წარმოდგენილია ქვევით.





პრეგნენოლონის დაგროვების სიჩქარის დასადგენად ყოველი ეს სტერეოიზომერი დაინკუბირდა სრულ მაჰიდროქსილირებელ სისტემაში. აღმოჩნდა, რომ [20R, 22R]- და [20R, 22S]- დიოქსიქოლესტერინები პრეგნენოლონად გარდაიქმნებოდნენ ინკუბაციის ერთი საათის განმავლობაში, მაშინ როდესაც [20S, 22R]- და [20S, 22S]-იზომერები გარდაქმნის გაცილებით ნაკლები სიჩქარით ხასიათდებოდნენ. ეს შედეგები იმის მაჩვენებელია, რომ ციტოქრომ P450<sub>sc</sub> ძლიერ მგრძობიარეა ქოლესტერინის მოლეკულაში C-20- და მცირედ მგრძობიარეა C-22-ატომის სტექიომეტრიის მიმართ. [20R]-ოქსიქოლესტერინი აბსოლუტურად არააქტიურია ციტოქრომ P450-თან რეაქციაში, მაშინ როცა [20S]-20-ოქსიქოლესტერინი დიდი სიჩქარით გარდაიქმნება პრეგნენოლონად. [22R]- და [22S]-22-ოქსიქოლესტერინის იზომერები პრეგნენოლონად უფრო მაღალი სიჩქარით გარდაიქმნებიან, ვიდრე თვით ქოლესტერინი. ეს ფაქტი სუბსტრატის მოლეკულის C-22-ატომის სტერეოსპეციფიკურობის უმნიშვნელო როლის მაჩვენებელია. ქოლესტერინის გვერდითი ჯგუფის მოხლეჩის პროცესში ყველაზე სააღბათო შუალედი ოქსიწარმოებულები შეიძლება იყოს [20S]-20-ოქსიქოლესტერინი, [22R]-22-ოქსიქოლესტერინი და [20R, 22R]-დიოქსიქოლესტერინი. ამ სპირტების პრეგნენოლონად კონვერსიის შედარებითი სიჩქარეები შემდეგი თანმიმდევრობით მცირდება:

20,22-დიოლი > 22-ოლი > 20-ოლი >> ქოლესტერინი.

პროცესის მალიმიტირებელი სტადია შეიძლება იყოს C-20- ან C-22-ჰიდროქსილირება, რადგან 20,22-დიოლის პრეგნენოლონად გარდაქმნის სიჩქარე გაცილებით მაღალია, ვიდრე 20- ან 22-ოლებიდან მისი მიღების სიჩქარე. მოყვანილი მონაცემები კიდევ ერთხელ ადასტურებს ქოლესტერინის პრეგნენოლონად გარდაქმნის სამსაფეხურიანი სქემის სამართლიანობას: თავდაპირველად ხდება ქოლესტერინის ჰიდროქსილირება C-20- და შემდეგ C-22 მდგომარეობაში და შუალედ პროდუქტად 20,22-დიოქსიქოლესტერინი წარმოიქმნება. მიღებულ დიოლს C-22 მდგომარეობაში კიდევ ერთხელ უტევს გააქტიურებული ჟანგბადი, რასაც თან ახლავს C-H-ბმაში

ჟანგბადის ატომის ჩანერგვა და გვერდითი ჯაჭვის მოხლეჩა იზოკაპრონის ალდეჰიდ-ჰიდრატის სახით (ნახ. 2.15).

ციტოქრომ P450<sub>scc</sub>-ის ისეთ ფრაქციებად დასაყოფად, რომლებიც C-20-C22-ჰიდროქსილირებას აკატალიზებენ და C-20- C-22-ნახშირბადოვან კავშირს შლიან, გამოყენებულ იქნა ელექტროფოკუსირების მეთოდი. აღმოჩნდა, რომ სამივე რეაქციას ჰემოპროტეინის ერთი და იგივე ფრაქცია ახორციელებს [130], თუმცა ეს შედეგი ჯერ კიდევ არ ნიშნავს იმას, რომ თვით ციტოქრომ P450<sub>scc</sub>-ებს შორის განსხვავება არ არსებობდეს. დიფერენციალური სპექტროსკოპიით ჩატარებულმა კვლევამ ჯეფკოატი [135] იმ დასკვნამდე მიიყვანა, რომ არსებობს ციტოქრომ P450-ის ფორმები, რომლებიც ერთმანეთისაგან განსხვავდებიან სტერიოდთა მიერთების ცენტრების ბუნებითა და რიცხვით. ამ მკვლევარის აზრით არსებობს P450<sub>scc</sub>-ის ორი ფორმა. პირველს გააჩნია სტერიოდთა დაკავშირების ორი ცენტრი: L<sub>1</sub>-ცენტრი იკავშირებს ქოლესტერინს და 25-ოქსიქოლესტერინს. ამ შემთხვევაში მაღალსპინური კომპლექსი წარმოიქმნება. დაკავშირების L<sub>1</sub>-R ცენტრი მხოლოდ 20S-ოქსიქოლესტერინთან ან 22R-ოქსიქოლესტერინთან, აგრეთვე პრეგნენოლონთან ურთიერთქმედებს, რაც დაბალსპინური კომპლექსის მიღებას შეესაბამება.

ციტოქრომ P450<sub>scc</sub>-ს მეორე ფორმას დაკავშირების ერთადერთი ცენტრი გააჩნია და მხოლოდ 20S, 22R-დიოქსიქოლესტერინთან ურთიერთქმედებს მაღალსპინური კომპლექსის წარმოქმნით. ამ კომპლექსის ფორმა 1 ტემპერატურის დაწვეით და pH-ის გაზრდით დაბალსპინურ მდგომარეობაში გადადის. პროცესს როგორც ჩანს არ ახლავს სუბსტრატის დაკარგვა. ტემპერატურისა და pH-ის შეცვლით ფორმა 2-ის მაღალსპინური კომპლექსი მცირე ცვლილებებს განიცდის. იზოლირებულ მიტოქონდრიებში ფორმა 1-ის L<sub>1</sub>-ცენტრი იკავშირებს ქოლესტერინს. 20S-ოქსიქოლესტერინი იკავებს ფორმა 1-ის L<sub>1</sub>-R ცენტრს, მაშინაც კი, თუ ამ ფორმის L<sub>1</sub> ცენტრი მთლიანადაა ქოლესტერინით დაკავებული. 20S-ოქსიქოლესტერინის სწრაფვა ფორმა 2-ის L<sub>2</sub> ცენტრისადმი უაღრესად დაბალია. 22R-ოქსიქოლესტერინი მაღალ სწრაფვას ავლენს ფორმა 1-ის როგორც L<sub>1</sub>-ასევე L<sub>2</sub>-ცენტრების მიმართ. ჯერჯერობით დასადგენია, წარმოადგენენ თუ არა ეს ორი ფორმა ციტოქრომ P450<sub>scc</sub>- იზოფორმებს ან ერთი და იგივე ფერმენტის სუბერთეულებს, თუ ასახავენ ფერმენტზე მიტოქონდრიული მემბრანის განსხვავებულ ზემოქმედებას. ფაქტი ერთია, რომ ასეთ ფორმათა არსებობა მნიშვნელოვან როლს ასრულებს ქოლესტერინის გვერდითი ჯაჭვის მოხლეჩის თანმიმდევრული საფეხურების განხორციელების რთულ პროცესში.

## 2.6.5 ქოლესტერინი მცენარეში და მისი მეტაბოლური გარდაქმნები

სანგრძლივი პერიოდის განმავლობაში ქოლესტერინი ტიპიურ ცხოველურ სტერინად იყო მიჩნეული, რადგან მისი იდენტიფიკაცია მცენარეში არ განხორციელებულა. ამჟამად ამ სტერინის არსებობა დადგენილია ბაქტერიებში და მათთან ნათესაურად ახლოს მყოფ ლურჯ-მწვანე წყალმცენარეებში. უმაღლესი მცენარეები მას მცირე რაოდენობით შეიცავენ. გამონაკლისს წარმოადგენენ თესლის ზეთები და ყვავილის მტკვერი [136].

ჩვენს ინსტიტუტში ნ. ზამბახიძის [137], აგრეთვე ზამბახიძისა და თანაავტორების მიერ [138] შესწავლილია უმაღლეს მცენარეთა ორგანოებში თავისუფალი, ეთერიფიცირებული და გლიკოზიდირებული სტერინები და მათი დინამიკა. თხელფენოვანი და აირ-თხევადი ქრომატოგრაფიის მეთოდით დადგენილია, რომ მთელი ვეგეტაციური პერიოდის განმავლობაში თავისუფალი სტერინების შედგენილობა რაიმე საგრძნობ ცვლილებებს არ განიცდის და ჯამურ პრეპარატებში ძირითად კომპონენტებს წარმოადგენენ  $\beta$ -სიტოსტერინი, კამპასტერინი, ქოლესტერინი და სტიგმასტერინი. მათთან ერთად ვლინდება ორი არაიდენტიფიცირებული სტერინიც. ქოლესტერინის შემცველობა ჯამურ პრეპარატში საკმაოდ დაბალია (~4-13%), მიუხედავად იმისა, რომ მცენარეში ის წინამორბედ ნივთიერებას წარმოადგენს კაროტინოიდების, სტერინური საპოგენინების, ალკალოიდების და განსაკუთრებით ფიტოჰორმონების ბიოსინთეზში [139, 140]. თავისუფალ სტერინთა ბიოსინთეზს რაც შეეხება, ნაჩვენებია იქნა, რომ ეს პროცესი გაცილებით აქტიურად ვეგეტაციის საწყის ფაზაში მიმდინარეობს [137], რაც ისეთ მნიშვნელოვან ფიზიოლოგიურ პროცესს უკავშირდება, როგორც უჯრედის მემბრანოგენეზი.

### 2.6.5.1 ქოლესტერინის ეთერიფიკაცია მცენარეში

ქოლესტერინის არაჟანგვითი გარდაქმნისას მისი მოლეკულის ციკლური კომპონენტი უცვლელი რჩება, ხოლო გვერდითი ალიფატური ნაწილის ოქსიგენირებისას ცხოველურის მსგავსად ორნანშირბადატომიანი ფრაგმენტით შეიძლება დამოკლდეს და პრეგნენოლონი წარმოიქმნას.

მცენარეულ უჯრედში ქოლესტერინი უპირატესად სტეარინ-, პალმიტინ-, ოლეინ- და ლინოლენმჟავებთან ეთერების სახით იმყოფება. საფიქრებელია, რომ უჯრედში ეგზოგენურად მოხვედრილი ქოლესტერინიც ჟანგვით

გარდაქმნებში ჩართვამდე, უპირველეს ყოვლისა, ეთერიფიკაციას განიცდის. ეს პროცესი, როგორც ჩანს, მისი ჭარბი რაოდენობის შებოჭვის (დეპონირების) უმარტივესი მექანიზმია, რომლის შემდგომაც საჭიროების შემთხვევაში უჯრედი მას აქტიური მეტაბოლიზმისათვის იყენებს. ამ თვალსაზრისით გასათვალისწინებელია რამდენიმე მომენტი:

1. ქოლესტერინის ტრანსფორმაცია უჯრედში შეიძლება იყოს, როგორც “შემთხვევითი“ პროცესი;
2. ქოლესტერინმა შეიძლება მონაწილეობა მიიღოს ენდოგენურ სტერონული ბუნების ნაერთთა ბიოსინთეზში ან თავისუფალი სახით მემბრანათა სტრუქტურირებაში;
3. ქოლესტერინი შეიძლება გამოყენებულ იქნას ნახშირბადატომების წყაროდ;
4. ქოლესტერინი შეიძლება გარდაიქმნას იმგვარად, რომ ეს იყოს მისი დეტოქსიკაციის და უჯრედიდან მოცილების თავისებური რეაქცია.

უჯრედში განსაკუთრებულ მნიშვნელობას უნდა იძენდეს ქოლესტერინის სრული ფერმენტული დეგრადაცია და პლასტიკური მიზნებისათვის მისი გამოყენება (პუნქტი 2 და 3).

მცენარეში ეგზოგენური ქოლესტერინის ეთერიფიცირებასა და მის ჟანგვით გარდაქმნებს შორის რაოდენობრივი თანაფარდობის დასადგენად გამოკვლევა იქნა ჩატარებული ჩვენს ლაბორატორიაში [141].

ვაზისა (*Vitis vinifera*) და იუკა დიდებულის (*Yucca gloriosa*) ფოთლების თხელი ანათლები ინკუბირდა  $4\text{-}^{14}\text{C}$ -ქოლესტერინთან ( $1.5\ \mu\text{Ci} - 2 \cdot 10^{-3}\ \text{M}$ ) და სათანადო კომპონენტებთან (პალმიტინმჟავა, სტეარინმჟავა, ATP, cAMP, გლუტათიონი, ციკლოპექსიმიდი) 4 საათის განმავლობაში ფოსფატის ბუფერში (pH 6.2 ვაზისათვის და 5.0 იუკასათვის). ჰექსანოლითა და ეთანოლით ექსტრაქციის შედეგად მიღებულ იქნა ნეიტრალური ლიპიდებისა და მეტაბოლურად აქტიურ ნივთიერებათა, ანუ 80% ეთანოლში ხსნადი (ორგანული მჟავების, ამინომჟავების და შაქრების) ჯამური ფრაქციები. თავისუფალი და ეთერიფიცირებული სტერინების დაყოფას ვაწარმოებდით თხელფენოვანი ქრომატოგრაფიით (სილიკაგელი 5/40  $\mu$ , გამხსნელი – ბენზოლი:გოგირდის ეთერი 7:3). რადიოაქტიურობის ათვლა ხდებოდა თხევად-სცინტილაციურ მთვლელზე (SL-30). პარალელურად დგებოდა ე.წ. “მკვდარი ცდა“, რომლის მიხედვითაც ექსპერიმენტულ მონაცემებში შეგუქონდა სათანადო შესწორებები.

ჩატარებული ექსპერიმენტების საფუძველზე გამოვლინდა, რომ ვაზის

ფოთლებში პალმიტატთან და სტეარატთან  $4\text{-}^{14}\text{C}$ -ქოლესტერინის ინკუბირებისას მნიშვნელოვნად იზრდება ეთერიფიცირებული სტერინების ჯამური ფრაქციის რადიოაქტიურობა და ამ შემთხვევაში სტეარატი უფრო ეფექტურია. საინტერესო ის არის, რომ ეთერიფიცირების პარალელურად გაზრდილია 80%-იან ეთანოლში ხსნადი ფრაქციის რადიოაქტიურობაც. მაშასადამე, მცენარის ფოთლებში, ეთერიფიკაციას მყისიერად მოსდევს ჰიდროლიზი და ამ დროს გამოთავისუფლებული ქოლესტერინი შემდგომი ტრანსფორმაციისათვის გაცილებით “ლაბილურია“, ვიდრე უჯრედში თავისუფლად მყოფი ენდოგენური ქოლესტერინი.

საინკუბაციო ხსნარში ATP-ს, cAMP-სა და გლუტათიონის ერთდროულად თანამყოფობისას 80%-იან ეთანოლში ხსნადი ფრაქციის მაქსიმალურ ზრდას თან ახლავს ეთერიფიცირებული ფრაქციის რადიოაქტიურობის მკვეთრი ვარდნა. შედეგი კიდევ ერთხელ ადასტურებს იმ ფაქტს, რომ უჯრედში დაბალმოლეკულური აქტიური მეტაბოლიტების წარმოქმნაში უპირატესად ეთერების ჰიდროლიზისას გამოყოფილი “ლაბილური“ ქოლესტერინი მონაწილეობს. ეთერიფიცირებული სტერინებისა და მეტაბოლურად აქტიურ ნაერთთა რაოდენობრივი თანაფარდობების განხილული ცვლილებების ფონზე თავისუფალი სტერინების ფრაქციის რადიოაქტიურობა მეტნაკლებად მუდმივადაა შენარჩუნებული.

ციკლოპქსიმიდი (50 მკგ/მლ) მნიშვნელოვნად თრგუნავს ეთერების სინთეზს. შედარებით ნაკლები ხარისხით აქვეითებს იგი მეტაბოლურად აქტიური ნაერთების წარმოქმნას. ეს არ შეიძლება გამოწვეული იყოს მიტოქონდრიებისაკენ ქოლესტერინის სატრანსპორტო გზის ბლოკირებით, ან მიტოქონდრიულ სტეროლჰიდროქსილაზურ სისტემაზე ამ ინჰიბიტორის მოქმედებით. ჩვენ დავადგინეთ, რომ ციკლოპქსიმიდის მაღალი კონცენტრაციები (~100 მკგ/მლ) საკვლევ მცენარეთა ფოთლებში აერობულ სუნთქვაზე აბსოლუტურად არ მოქმედებს, როგორც ჩანს, მიტოქონდრიულ მემბრანაში მისი განუვლადობის გამო. ამიტომ უფრო საფიქრებელია, რომ ციკლოპქსიმიდით გამოწვეული ინჰიბირება დაკავშირებული იყოს რიბოსომული ცილებით, კერძოდ, სტერინსინთეზების წარმოქმნის დათრგუნვასთან.

ანალოგიური კანონზომიერებები გამოვლინდა იუკა დიდებულის ფოთლებშიც: სტეარატი და პალმიტატი ცალკეულად ზრდიან ქოლესტერინის რადიოაქტიური ნიშნის ჩართვას ეთერიფიცირებული სტერინებისა და მეტაბოლურად აქტიური ნაერთების ფრაქციაში. ATP, cAMP და გლუტათიონი ზრდიან 80%-იან ეთანოლში ხსნადი ფრაქციის რადიოაქტიურობას, რასაც თან სდევს ეთერიფიცირებული სტერინების ფრაქციის რადიოაქტიურობის დაქვეითება.

ყურადღებას იმსახურებს ერთი უაღრესად მნიშვნელოვანი გარემოება: ორივე საკვლევი მცენარის ფოთლებში მეტაბოლურად აქტიურ ნაერთთა ფრაქციის რადიოაქტიურობის მაქსიმალური მატება მთლიანი რადიოაქტიურობის (იგულისხმება მშრალი მცენარეული ნაშთის, ექსტრაგირებული ფრაქციებისა და  $^{14}\text{CO}_2$ -ის რადიოაქტიურობათა ჯამი) ~25%-ს აღწევს, თუ საინკუბაციო ხსნარში ერთდროულად იმყოფება ATP და 3',5'-AMP (ციკლური აღენოზინმონოფოსფატი). მაშასადამე, ათვისებული ქოლესტერინი ბიოდეგრადაციულად გარდაიქმნება. 4-საათიანი ინკუბაციის პირობებში ეს საკმაოდ მაღალი მაჩვენებელია და ქოლესტერინის კატაბოლიზმში მონაწილე მჟანგველი სისტემის მაღალ აქტიურობაზე მიუთითებს.

### 2.6.5.2 ქოლესტერინის ჟანგვა მიკროორგანიზმებსა და მცენარეში (შედარებითი ანალიზი)

მიკრობებსა და მცენარეულ ქსოვილებში ქოლესტერინის ჟანგვითი დეგრადაცია ცხოველებთან შედარებით ჯერ კიდევ არასათანადოდაა გამოკვლეული. ზოგად პრინციპებში მსგავსება კი შემდეგში მდგომარეობს: 1. ჰიდროქსილირებისათვის სამივე შემთხვევაში აუცილებელია ატმოსფერული ჟანგბადი; 2. ანაერობულ პირობებში ჰიდროქსილირება არ ხორციელდება; 3. ჰიდროქსილირება მოითხოვს აღმდგენელი აგენტის თანამყოფობას და ამ მიზნით ჩვეულებრივ NADPH ან ფლავინური ფერმენტი გამოიყენება; 4. ჰიდროქსილირებას მეტალშემცველი ფერმენტები აკატალიზებს.

მიკრობულ უჯრედებში სტერონთა ჟანგვაში მონაწილე ფერმენტებისათვის საჭირო ელექტრონთა სატრანსპორტო სისტემა გარკვეულ მსხვილ სუბუჯრედულ ნაწილაკებშია ლოკალიზებული, რომლებიც 7500 გ-ზე სრულად ილექტიბიან, ხოლო მათში არსებული ქოლესტერინდეჰიდროგენაზა 110000 გ-ზეც კი არ ილექტება. ცხოველურ ქსოვილებში ეს ფერმენტული სისტემები ენდოპლაზმურ მემბრანებში იმყოფებიან და აღნიშნულ აჩქარებებზე სრულად „ჯდებიან“ [142]. მიკრობული სტერინესთერაზას სტერინდეჰიდროგენაზასა და სტერინჰიდროქსილაზასთვის ოპტიმალურია სუსტი ფუძე არე (pH 8-9). მათში ჰიდროქსილირებას ახორციელებს ფლავოპროტეინი, რომელიც რკინის, ან თუთიის იონებს შეიცავს. ამ ფერმენტის დაჟანგული ფორმის რეგენერაცია NADPH-ით ხდება. სტერინ-1,2-დეჰიდროგენაზა ფლავინურ პროსთეტულ ჯგუფს შეიცავს და ელექტრონის აქცეპტორად  $\text{K}_2$ -ვიტამინს საჭიროებს. უუჯრედო პრეპარატებში მისი შეცვლა ქინონ-



ბით, ან სხვადასხვა საღებავებით შეიძლება. როგორც გამოიჩვენა, სტერინთა მიკრობულ ტრანსფორმაციაში მონაწილე ფერმენტთა აქტივობები მაღალი სპეციფიკურობით (ჰიდროლიზურის გარდა) გამოირჩევიან. ისინი მოქმედებენ სტერინებთან, როგორც ნაერთთა კლასთან და სხვა ტიპის ნაერთებს იშვიათი გამონაკლისის გარდა, მცირე სიჩქარით გარდაქმნიან [142].

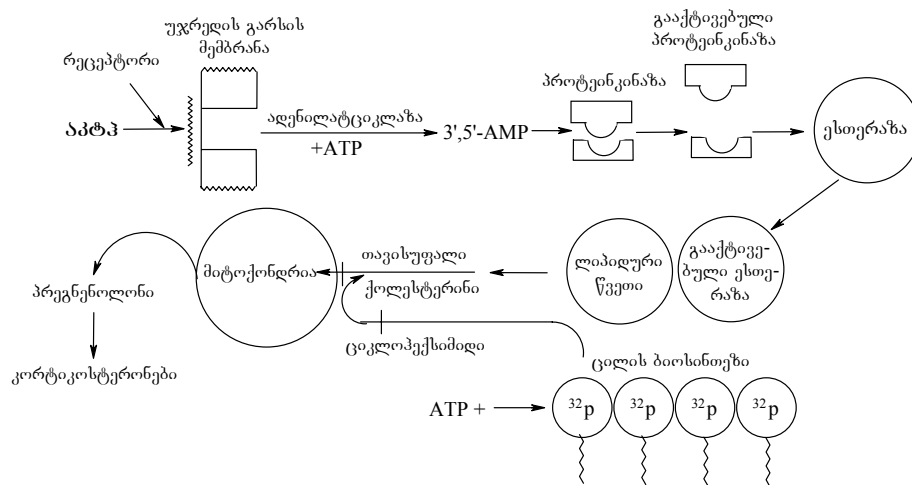
მიკროორგანიზმებში სტერინების, კერძოდ ქოლესტერინის ჟანგვითი დეგრადაცია შეიძლება იყოს სრული ( $\text{CO}_2$ -მდე და  $\text{H}_2\text{O}$ -მდე) ან ნაწილობრივი, რომლის დროსაც მეტაბოლიზმის საბოლოო პროდუქტებს შენარჩუნებული აქვთ სტერინების მოლეკულის ძირითადი ჩონჩხი და ჟანგვას მხოლოდ მათი ცალკეული ფრაგმენტები განიცდიან. მიკროორგანიზმთა ზოგიერთი სახეობა ქოლესტერინს რამდენიმე თვის განმავლობაში შლის, მაშინ როცა *Aspergillus wentii*-ს შერეული კულტურები ამ ნივთიერების აციკლურ ნაერთებად გარდაქმნას რამდენიმე საათს ანდომებენ. ჟანგვის პროდუქტებს მიკროორგანიზმები გარეთ გამოყოფენ. ქოლესტერინის A-ბირთვის გარდაქმნისას საწყის სტადიაზე C-4-ნახშირბადატომის ჩამოცილება ხდება და  $\Delta^4$ 3-კეტოწარმოებული მიიღება.  $4\text{-}^{14}\text{C}$ -ტესტოსტერინის ფერმენტაციისას გამოყოფილი  $\text{CO}_2$  რადიოაქტიური მხოლოდ ორსაათიანი ინკუბირების (როგორც ჩანს ინდუქციის პერიოდის) შემდეგ ხდება, მაშინ როცა საკვები არედან სტერინის უკვე მესამედია შეთვისებული. ეს ფაქტი იმაზე მიუთითებს, რომ ქოლესტერინისაგან განსხვავებით ტესტოსტერინის A-ბირთვი არ წარმოადგენს დაშლის პირდაპირ სამიზნეს.  $26\text{-}^{14}\text{C}$  და  $27\text{-}^{14}\text{C}$ -ქოლესტერინის ნახშირბადატომები პროპიონმჟავას მეთილისა და კარბოქსილის ჯგუფში ერთვებიან [142].

ძუძუმწოვართა ქსოვილების ფერმენტულ სისტემებს ქოლესტერინის ალიფატური ფრაგმენტის შერჩევითად დაჟანგვის უნარი აქვთ, რის შედეგადაც ნაღვლის მჟავები და განსხვავებული კლასების სტერინური ჰორმონები მიიღებიან. მცენარეს რაც შეეხება, მათში აღნიშნული პროცესის მიმართულებას და სიჩქარეს თვით ამ ნივთიერების მოქმედების ხანგრძლივობა, კვების რეჟიმი, ფიზიოლოგიური მდგომარეობა, ვეგეტაციის ფაზა და სხვ. განსაზღვრავს.

მცენარეში არომატული და პოლიციკლური ნაერთების შესაძლო დეგრადაციის სისტემატური კვლევა დაწყებულია ჩვენს ინსტიტუტში. ს. ღურმიშიძის [143], აგრეთვე ს. ღურმიშიძისა და თ. ბერიაშვილის მიერ [144] პირველად იქნა ნაჩვენები ქოლესტერინის ციკლური კომპონენტის, კერძოდ მისი A-ბირთვის ჟანგვითი დეგრადაციის განხორციელება. ამ მიზნით მათ გამოიკვლიეს სტერილურ პირობებში გაზრდილი სტაფილოსა და

სიმიინდის ნახარდების ქსოვილები, რომლებიც ინკუბირდებოდნენ  $4\text{-}^{14}\text{C}$ -ქოლესტერინის შემცველ ხსნარში. აღმოჩნდა, რომ 7-საათიანი ინკუბაციის შედეგად მთლიანად მიცემული ქოლესტერინის რადიოაქტიურობის 4-8% ჟანგვის პროდუქტებში [80%-იან ეთანოლში ხსნად ფრაქციაში და  $\text{CO}_2$ -ში) იყო ჩართული. მიღებულ ნაერთთა ბუნების გათვალისწინებით, აღნიშნულმა მკვლევარებმა წარმოადგინეს ქოლესტერინის A-ბირთვის ჟანგვის სავარაუდო თანმიმდევრობა: A-ბირთვის დეჰიდრირება (არომატიზაცია), ჰიდროქსილირება მე-4 მდგომარეობაში, B-ბირთვის დაშლა და სეკო-ნაერთის წარმოქმნა, კარბოქსილში მე-4 ნახშირბადის დაჟანგვა  $\text{C}_6$ -ფრაგმენტად (პიროკატექინად), A-ბირთვის მოცილება და კეტომჟავას წარმოქმნა.

ეთერიფიკაციასთან ერთად ქოლესტერინის გარდაქმნებში ATP-ს და  $3',5'$ -AMP-ს მასტიმულირებელი მოქმედების ჩვენს მიერ გამოვლენილმა ფაქტმა [141] საშუალება მოგვცა მისაღებად ჩავვეთვალა, რომ მცენარეში ამ სტერინის კატაბოლიზმი მთლიანობაში დაახლოებით ისეთივე თანმიმდევრული მექანიზმით უნდა ხორციელდებოდეს, როგორც ეს გარინისა და თანაავტორების მიერ [145-147] თირკმელზედა ჯირკვლის ქერქში იქნა დადგენილი. ამ მკვლევართა თანახმად პროცესი სქემატურად ასე გამოიყურება:



ნახ. 2.16. თირკმელზედა ჯირკვლის ქერქში ქოლესტერინის ეთერების ესტერონის აქტჰ-ით აქტივაცია [147] (განმარტება ტექსტში).

სქემის თანახმად კორტიკოტროპინი (ადრენოკორტიკოტროპული ჰორმონი – აქტჰ) ურთიერთქმედებს უჯრედული მემბრანის გარე ზედაპირზე

მყოფ რეცეპტორთან. დაკავშირების შესახებ სიგნალი ფერმენტ ადენილატ-ციკლაზას (EC 4.6.1.1) გადაეცემა. იგი მემბრანის შიდა ზედაპირზეა ლოკალიზებული და აკატალიზებს ATP-ს გარდაქმნას ციკლურ ადენოზინმონოფოსფატად ( $ATP=3',5'-AMP + \text{პიროფოსფატი}$ ). ქოლესტერინის ეთერების დონეზე ეს ნაერთი სრულად იმიტირებს კორტიკოტროპინის მოქმედებას, რომელიც მცენარეში საერთოდ არ გვხვდება.

კორტიკოტროპინის ფუნქციონირებასი მნიშვნელოვანი მომენტია მისი გავლენით  $3',5'-AMP$ -ით ციტოპლაზმური პროტეინკინაზას (EC 2.7.1.37) გააქტივება. ეს ფერმენტი ATP-ს დახმარებით აკატალიზებს რიბოსომებში ცილების ფოსფორილებას ( $ATP + \text{პროტეინი} \rightarrow ADP + \text{ფოსფოპროტეინი}$ ). ამ გზით ფერმენტი რომელიც მექანიზმით ააქტიურებს ესთერაზას, რომელიც ლიპიდურ წვეთში ქოლესტერინის ეთერების ჰიდროლიზს აკატალიზებს და თავისუფალ ქოლესტერინს წარმოქმნის. პროცესი არამგრძობიარეა ცილის სინთეზის ინჰიბიტორის – ციკლოპექსიმიდის მიმართ, ანუ იგი არ საჭიროებს *de novo* ცილის სინთეზს. სამაგიეროდ, ეს ინჰიბიტორი სრულად აბლოკირებს კორტიკოსტერინების სინთეზში კორტიკოტროპინისა და  $3',5'-AMP$ -ის მასტიმულირებელ მოქმედებას. მისი თანამყოფობისას ქოლესტერინის ეთერები თავისუფალ ქოლესტერინს წარმოქმნიან, ანუ აქტიური ესთერაზა არ ითრგუნება, მაგრამ ცხიმოვანი წვეთიდან მიტოქონდრიაში თავისუფალი ქოლესტერინის გადატანა აღარ ხდება.

პროტეინკინაზა თირკმელზედა ჯირკვალში ააქტიურებს ფოსფორილაზა B-ს კინაზასაც, რომელიც ფოსფორილებით აქტიურ ფოსფორილაზა A-ს იძლევა და გლიკოგენს გლუკოზო-1-ფოსფატად შლის. ეს უკანასკნელი პენტოზურ ციკლში ქოლესტერინის ოქსიგენირებისათვის საჭირო აღდგენილ NADPH-ს გენერირებს. ამგვარად  $3',5'-AMP$ -სა და პროტეინკინაზას სამივე ეფექტი: ესთერაზას გააქტიურება, რიბოსომების ფოსფორილება და ფოსფორილაზა B-ს სტიმულირება კორტიკოსტეროიდების გაძლიერებული სინთეზისკენაა მიმართული.

ქოლესტერინის პრეგნენოლოად გარდაქმნა დესმოლაზური კომპლექსის (ციტოქრომ P450-შემცველი მონოოქსიგენაზას) მონაწილეობით ხორციელდება, რომელიც მიტოქონდრიაში იმყოფება. ქოლესტერინმა აუცილებლად უნდა შეაღწიოს ამ ორგანელაში და ამიტომ სტეროიდოგენეზისათვის საჭიროა მიტოქონდრიისაკენ მისი უწყვეტი ნაკადის არსებობა. ვარაუდობენ, რომ ამისათვის გამოიყენება სპეციალური სატრანსპორტო ცილები, რომელთა ბიოსინთეზი გააქტიურებული პროტეინკინაზით სტიმულირდება და ციკლოპექსიმიდით მუხრუჭდება [147].

ესთერაზის აქტივაციის მექანიზმის შესახებ გარენისა და თანაავტ. [145-147] წარმოდგენის სამართლიანობამ შემდგომში აბსოლუტური დადასტურება ჰპოვეს სხვა მკვლევართა ექსპერიმენტულ გამოკვლევებში [148, 149], სადაც დადგინდა იქნა სრული კორელაცია 3',5'-AMP-ს კონცენტრაციის ცვლილებებსა, ესთერაზასა და პროტეინკინაზის აქტივობებსა და აგრეთვე ლიპიდურ წვეთებში ქოლესტერინის ეთერების კლებას შორის.

ამგვარად, ნახ. 2.16-ის თანახმად, თირკმელზედა ჯირკვლის ქერქოვან ნაწილში ქოლესტერინის ალიფატური ფრაგმენტის მოცილება (პრეგნენოლონად გარდაქმნა) შიდამიტოქონდრიულ პროცესს წარმოადგენს. აღნიშნულიდან გამომდინარე, ჩვენ შევეცადეთ მცენარეშიც გამოგვევლინა ანალოგიური თუ არა მსგავსი სურათის არსებობა და გვეჩვენებინა უჯრედის ამ ორგანელის შესაძლო როლი ქოლესტერინის A-ბირთვის ჟანგვაში და მისი კავშირი მიტოქონდრიუმში მიმდინარე ენერგეტიკულ პროცესებთან [150].

კვლევის ობიექტად ამჯერადაც აღებული გვექონდა ვაზისა და იუკა დიდებულის ახლადმოჭრილი ფოთლების თხელი ანათლები [141]. 4-<sup>14</sup>C-ქოლესტერინის გარდაქმნის ინტენსივობაზე მიტოქონდრიული ჟანგვისა და ფოსფორილების სუბსტრატის, ლიმონმჟავას ციკლის ინჰიბიტორების, აგრეთვე მიკროსომული რედოქს-ჯაჭვის სტიმულატორებისა და ინჰიბიტორების გავლენას ვაფასებდით გამოყოფილი <sup>14</sup>CO<sub>2</sub>-ის რადიოაქტიურობის მიხედვით.

ჩატარებულმა გამოკვლევებმა გვიჩვენეს, რომ ქოლესტერინის A-ბირთვის ჟანგვა საგრძნობლად სტიმულირდება სარეაქციო არეში მიტოქონდრიული ჟანგვის სუბსტრატთა თანამყოფობისას, კერძოდ, მალატი და სუქცინატი, აგრეთვე ამინომჟავები, რომელთა ჟანგვითი გარდაქმნები უშუალოდ არიან ამ ციკლთან დაკავშირებული (ალანინი, ასპარტატი და გლუტამატი), მნიშვნელოვნად ზრდიან გამოყოფილი <sup>14</sup>CO<sub>2</sub>-ის რადიოაქტიურობას (ცხრილი 2.6). ჟანგვის სუბსტრატებთან ფოსფორილების სუბსტრატის (ADP-ს) თანამყოფობა პროცესის უფრო მეტ სტიმულირებას იწვევს. საინკუბაციო ხსნარში α-კეტოგლუტარატთან ADP-ს თანამყოფობა სტერინის A-ბირთვის ჟანგვის 60-85%-იან სტიმულაციას იძლევა. ლიმონმჟავას ციკლის სპეციფიკური ინჰიბიტორები – მალონატი და მონოფტორაცეტატი <sup>14</sup>CO<sub>2</sub>-ის რადიოაქტიურობას ვაზისა და იუკას ფოთლებში შესაბამისად ~35-40% და ~50%-ით თრგუნავენ. ინჰიბიტორულად მოქმედებს პროცესზე ჟანგვისა და ფოსფორილების გამთიშველი – 2,4-დინიტროფენოლი და ეს მისი ინჰიბიტორული მოქმედება სრულად კომპენსირდება ATP-ით (ცხრილი 2.7).

ცხრილი 2.6 [150]

ვაზისა და იუკა დიდებულის ფოთლების ანათლებში  $4\text{-}^{14}\text{C}$ -ქოლესტერინის ( $4\text{-}^{14}\text{C}$ ) ჟანგვისას გამოყოფილ  $^{14}\text{CO}_2$ -ის რადიოაქტიურობაზე მიტოქონდრიული ჟანგვისა და ფოსფორილების სუბსტრატთა გავლენა\*

ცდის პირობები	$^{14}\text{CO}_2$ -ის რადიოაქტიურობები იმპ/წთ	
	ვაზი	იუკა დიდებული
$4\text{-}^{14}\text{C}$ -ქოლესტერინი (კონტროლი)	477±17.9	356±8.6
„+ADP	611±24.0	602±7.1
„+სუქცინატი+მალატი	614±11.9	628±17.8
„+,„+,„+ADP	661±14.2	675±4.4
„+α-კეტოგლუტარატი	657±4.4	400±6.8
„+,„+ADP	1031±26.3	847±17.4
„+ალანინი+ასპარტატი+გლუტამატი	771.7±20.3	729±12.5
„+,„+,„+,„+ADP	975±14.0	828±20.5

\*ფოსფატის ბუფერი pH 6.0 (ვაზისათვის) და pH 5.0 (იუკასათვის);  
 ჟანგვის სუბსტრატთა კონცენტრაციები –  $6\cdot 10^{-3}$  M თითოეული; ADP –  $1\cdot 10^{-3}$  M;  $\text{Mg}^{2+}$  – 16 mM;  $4\text{-}^{14}\text{C}$ -ქოლესტერინი –  $2\cdot 10^{-3}$  M (1.5  $\mu\text{Ci}$ ) ცდის ხანგრძლივობა – 3 სთ; ცდების განმეორების რიცხვი – ხუთჯერადი.

ცხრილი 2.7 [150]

ვაზისა და იუკა დიდებულის ფოთლების ანათლებში  $4\text{-}^{14}\text{C}$ -ქოლესტერინის ჟანგვისას გამოყოფილი  $^{14}\text{CO}_2$ -ის რადიოაქტიურობაზე 2,4-დინიტროფენოლის (2,4-DNP-ს) და ATP-ს გავლენა\*

ცდის პირობები	$^{14}\text{CO}_2$ -ის რადიოაქტიურობები იმპ/წთ	
	ვაზი	იუკა დიდებული
$4\text{-}^{14}\text{C}$ -ქოლესტერინი (კონტროლი)	469.0±21.0	760.0±20.3
„+ANP	350.0±22.7	550.0±21.9
„+ATP	570±19.8	940±21.3
„+ATP+2,4-DNP	430±22.9	670±19.5

\* პირობები იგივე რაც 2.6 ცხრილში 2,4-DNP –  $1\cdot 10^{-3}$  M; ATP – 300  $\mu$ .

მიტოქონდრიების ენერგეტიკულ მდგომარეობასა და ქოლესტერინის A-ბირთვის ჟანგვას შორის პირდაპირი კავშირის არსებობა კიდევ უფრო მტკიცედ აისახა ჩვენს ცდებში, სადაც საინკუბაციო ხსნარის „ენერჯის მუხტის“ მუდმივ მატებას (ადენილატური აკუმულატორის ენერჯით მდიდარი ფოსფატური კავშირებით შევსებას) თან ახლდა  $^{14}\text{CO}_2$ -ის რადიოაქტიურობის ზრდაც. როგორც ცნობილია ამ სიდიდეს, ე.წ. ატკინსონის [151] თანაფარდობას ( $[\text{ATP}]+1/2[\text{ADP}]$ ) : ( $[\text{ATP}]+[\text{ADP}]+[\text{AMP}]$ ) შეუძლია მიიღოს 0-დან (სრული დეენერჯიზაცია) 1-მდე (სრული ენერჯიზაცია) მნიშვნელობები და მთელი რიგი რეგულატორული ფერმენტისათვის გამოვლენილია ამ სიდიდესა და ენზიმურ აქტივობებს შორის დადებითი ფუნქციური დამოკიდებულება [152, 153].

იღებს თუ არა მცენარის მიკროსომული ციტოქრომ P450-შემცველი რედოქს-ჯაჭვი ქოლესტერინის ჟანგვაში მონაწილეობას? ამ კითხვაზე პასუხის გასაცემად ჩვენ მიერ [150] ჩატარებულ იქნა ექსპერიმენტები, რომლებშიც აღნიშნულ სტერინთან ერთად გამოვიყენეთ ჟანგვის ამ სისტემის ტიპური სუბსტრატი ამილოპირინი, ჰემოპროტეინის სპეციფიკური ინჰიბიტორი SKF-525A და ინდუქტორი ფენობარბიტალი. აღმოჩნდა, რომ ამილოპირინი ქოლესტერინის ჟანგვის მიმართ არავითარ კონკურენტულ ზემოქმედებას არ ავლენს. არაეფექტურია ინჰიბიტორის თანამყოფობაც, რაც ამ შხამის მიტოქონდრიულ მემბრანაში განუვლადობით შეიძლება აიხსნას; რაც შეეხება ფენობარბიტალს, მისი ინდუქციური ზემოქმედება არ გამოძლავნდა მაშინაც კი, თუ ფოთლები წინასწარ 20-30 სთ-ით ინკუბირდებოდა მის ხსნარში.

ამგვარად, მცენარეში ორი – მიკროსომული და მიტოქონდრიული NADPH-დამოკიდებული რედოქს-ჯაჭვის არსებობა არავითარ ეჭვს არ იწვევს. ისინი ფუნქციურად განსხვავდებიან ერთმანეთისაგან. ქოლესტერინის, როგორც ალიფატური ფრაგმენტის, ასევე მოლეკულის ციკლური კომპონენტის ჟანგვა მცენარეშიც მიტოქონდრიის ფუნქციაა. ქოლესტერინის კატაბოლიზმსა და მცენარეული ქსოვილის აერობულ სუნთქვას შორის მჭიდრო ურთიერთკავშირი არსებობს; ქოლესტერინის A-ბირთვის ჟანგვა ენერგოდამოკიდებული პროცესია, რამდენადაც მასში მონაწილე ფერმენტები უჯრედის ენერგეტიკული პოტენციალის მაღალ დონეს საჭიროებენ.

მიღებულმა შედეგებმა საშუალება მოგვცა დასაშვებად მიგველო ქოლესტერინის A-ბირთვის ჟანგვის თანმიმდევრული პროცესის შედარებით მარტივი სქემა: 1. NADPH- და  $\text{O}_2$ -დამოკიდებული ჰიდროქსილირება მეშვიდე მდგომარეობაში; 2. ორმაგი კავშირის გადანაცვლება 4-5-მდგომარეობაში.

რეობაში და მესამე ჰიდროქსილის დაჟანგვა; 3. მეორე სტადიაზე მიღებული პროდუქტის შემდგომი ჟანგვა შესაბამისი კარბონმჟავასა და CO<sub>2</sub>-ის წარმოქმნით.

ცხადია, სტერილიზაციის და ქოლესტერინის ჟანგვითი დეგრადაციის შესაძლო გზის ძიება და დაზუსტება მცენარეში მომავალ საფუძვლიან კვლევას მოითხოვს. ერთი რამ სავსებით გარკვეულად გამოიყურება: შედაუჯრედულ მეტაბოლიზმსა და განსაკუთრებით ენერგეტიკულ ცვლასთან უაღრესად მჭიდრო კავშირი საფუძველს იძლევა, რომ არავითარ შემთხვევაში არ გავაიგივოთ ქოლესტერინის გარდაქმნები დეტოქსიკაციასთან.

## 2.7 ურთიერთკავშირი ოქსიგენაზურ და იმუნურ სისტემებს შორის

გასული საუკუნის სამოცდაათიანი წლების დასასრულს გამოიკვეთა ციტოქრომ P450-შემცველი მონოოქსიგენაზური სისტემის ახალი, მეტად მნიშვნელოვანი ფუნქცია – იმუნურ მექანიზმში მონაწილეობა. ცოცხალ ორგანიზმში ამ ორი სისტემის (მონოოქსიგენაზურის და იმუნურის) ფუნქციურ აქტივობათა შედარებისა და შეჯერების საფუძველზე ჩამოყალიბდა თვალსაზრისი იმის შესახებ, რომ ისინი ზოგადი უნივერსალური პრინციპებით უნდა იყვნენ ერთმანეთთან დაკავშირებული და ეს უპირველეს ყოვლისა მათ ადაპტურობასა და ინდუციბელობაში მჟღავნდება. ორივე სისტემა მიმართულია მრავალფეროვანი უცხო და ენდოგენური ნაერთის შეკავშირება-მეტაბოლიზირებისაკენ და ინდუქციის გამომწვევი ქიმიური ნაერთებისადმი განსხვავებულად გამოსახული „მანსოვრობა“ გააჩნიათ. სულ უფრო თვალსაჩინო და სარწმუნო გახდა მონოოქსიგენაზურ და იმუნურ ფუნქციათა მექანიზმების ერთმანეთთან მჭიდროდ შერწყმის ფაქტები.

საერთოდ იმუნიტეტი განიხილება როგორც გენეტიკურად განსხვავებული ინფორმაციის მატარებელი ცოცხალი სხეულებისა და ნივთიერებებისაგან ორგანიზმის დაცვის ფენომენი. იგი ძირითადად უჯრედის მაკროფაგურ-ლიმფოციტური კომპლექსით ზორციელდება, რომელიც ანტიგენის (უცხო გენეტიკური ინფორმაციის შემცველი მაკრომოლეკულების) „დაპყრობას“, „გადამუშავებას“ და ანტისხეულების (ანტიგენის შემკავშირებელი და გამანეიტრალებელი იმუნოგლობულინების) პროდუცირებას ემსახურება.

გარკვეულ მიზეზთა გამო ქსენობიოტიკების ორი ტიპი (დაბალ- და მაღალმოლეკულური) ორი მეცნიერული მიმართულების – ბიოქიმიური ფარმაკოლოგიის (დაბალმოლეკულური აგენტებისათვის) და იმუნოლოგიის (მა-

ღალმოლეკულური ნაერთებისათვის) ერთმანეთთან სუსტად დაკავშირებულ კვლევის ობიექტებად განიხილებოდა.

ეკოლუციური და სისტემური მიდგომის პოზიციიდან გამომდინარე, მოლეკულური ფარმაკოლოგიისა და არაინფექციური იმუნიტეტის კვლევაში მოპოვებულმა მიღწევებმა და მათმარანალიზმა რუს მეცნიერს ი. კოვალიოვს [154] საშუალება მისცა წამოეყენებინა ახალი კონცეფცია, რომლის თანახმადაც იმუნური სისტემა გაცილებით ფართო (ზოგად) ფუნქციური სისტემის ნაწილს წარმოადგენს და იგი კონკრეტულად ქიმიურ ნაერთთა შეცნობას, მეტაბოლიზმსა და ორგანიზმიდან გამოძევებას ემსახურება. კონცეფციის თანახმად იმუნოლოგიური სისტემა მონაწილეობს ჰომეოსტაზში არამხოლოდ უჯრედულ (უარყოს უცხო ან საკუთარი სახეშეცვლილი უჯრედები) და მაკრომოლეკულურ, არამედ დაბალმოლეკულურ ნაერთთა დონეზეც; ანუ იმუნოლოგიური კონტროლი ტოტალურია და მრავალფეროვან უცხო და საკუთარ ნივთიერებათათვის საერთოა. მონოოქსიგენაზური და იმუნოლოგიური სისტემების ფუნქციურმა შეუღლებამ შემოსაზღვრა ქიმიური ჰომეოსტაზის მეტაბოლურ-იმუნოლოგიური (იმუნოქიმიური) სისტემის კონტურები.

კონიუგირებული ანტიგენის სინთეზში, რომელიც ქიმიურ ნივთიერებაზე სპეციფიკურ პასუხს იძლევა, დიდ როლს ასრულებს ციტოქრომ P450-შემცველი სისტემა. მასზე „იკვეთება“ ჰიდროფობული ბუნების მქონე ენდოგენური და ეგზოგენური ნაერთების მძლავრი „ნაკადები“. უნდა აღინიშნოს ისიც, რომ ამ ფერმენტული კომპლექსის გარდა, კონიუგირებული ანტიგენების სინთეზში მონაწილეობა შეიძლება მიიღოს სხვა ფერმენტებმაც (მაგ., ქსანთინოქსიდაზამ, პეროქსიდაზებმა, თიროზინაზამ და სხვ.).

ბარბიტურატებისა და ზოგიერთი სხვა მედიკამენტების განმეორებითი გამოყენების შემდეგ ყალიბდება წამლების მიმართ ორგანიზმის ტოლერანტობა, რასაც ხშირად მეტაბოლიზმის დაჩქარებას და წამლის დეზაქტივაციას უკავშირებენ და რაც მიკროსომული ოქსიგენაზების ინდუქციის შედეგად მიიღწევა [155]. წამლების ეს უნარი – დააჩქარონ საკუთარი მეტაბოლიზმი, დადგენილია ფენობარბიტალის, ჰექსობარბიტალის, ფენილბუტაზინის, მეპრობამატის, ტოლბუტამიდის, ქლორციკლიზინისა და სხვათა მიმართ. ბარბიტალის შემთხვევაში, რომელიც სუსტად მეტაბოლიზდება, ტოლერანტობა შეიძლება იმ რეცეპტორთა (იხ. 2.6.6.1) მგრძობიარობის ცვლილებათა შედეგად განვითარდეს, რომლებზედაც ესა თუ ის წამალი მოქმედებს. მეპრობამატის მიმართ ტოლერანტობა თავდაპირველად წამლის მიერ ინდუცირებული მეტაბოლიზმის გაზრდის გამო, ხოლო შემდგომ ცენტრალური ნერვული სისტემისა და წამლის უშუალო ზემოქმედების ქვეშ



მყოფ სხვა ორგანოთა რეაქციის ცვლილებათა შედეგად შეიძლება ჩამოყალიბდეს. მორფინისა და კოდეინისადმი ტოლერანტობა, უწინარეს ყოვლისა, ამთვისებელ ორგანოთა რეაქციის ცვლილებებითაა განპირობებული, რამდენადაც ცხოველში მათი მეორადი ინექცია ღვიძლის იმ მიკროსომაული ფერმენტების არასპეციფიკურ დათრგუნვას იწვევენ, რომლებიც ამ წამლების მეტაბოლიზმს უზრუნველყოფენ [155].

ცხოველთა იმუნური რეაქციების ანალიზისას მხედველობაშია მისაღები იმუნური პასუხის ორი – სპეციფიკურობისა და მანსოვრობის პარამეტრი, რადგან განმეორებით იმუნიზაციაზე ერთსა და იმავე ანტიგენით გაძლიერებულ და დაჩქარებულ პასუხს განაპირობებენ. ორივე სისტემას (დეტოქსიკაციურს და იმუნურს) ეს ორი პარამეტრი ნამდვილად გააჩნია. ძლიერ განვითარებული მანსოვრობის უნარის მქონე ნერვული სისტემის მიერ გარე გაღიზიანების მიღების მსგავსად, იმუნური სისტემაც შეიცავს ანტიგენებით აღქმის საშუალებას, ანუ უჯრედებში იმყოფება მათი შესაბამისი რეცეპტორები. ციტოქრომ P450-ის სისტემას რაც შეეხება, იგი მოქმედებს როგორც სრულყოფილი ქემორეცეპტორი და ქემოანალიზატორი, ერთნაირად რეაგირებს როგორც შინაგან, ასევე გარეგანი ქიმიური გარემოს ცვლილებებზე. ეს ტიპური კიბერნეტიკული „მანქანა“, რომელიც აღიქვამს და აანალიზებს მანსოვრობისა და ავტომატური თვითრეგულაციის შემცველ ქიმიურ სიგნალს.

საერთოდ, სისხლის პლაზმის ცილური სისტემა შედარებით მარტივად არეგულირებს ორგანიზმში ქიმიურ ნივთიერებათა დონეებს. განცვიფრებას იწვევს ბუნების „სიბრძნე“, რომელმაც ნებისმიერი მუდმივად ცვალებადი ვითარებისათვის ყველაზე „გონიერი“ გადაწყვეტის ავტომატურად მისაღები მექანიზმები შეიმუშავა. ჰომეოსტაზის თეორიის შემქმნელი ამერიკელი ფიზიოლოგი კენონი [156] თვლიდა, რომ ჰომეოსტაზი „დამცველი მექანიზმების“ დიდი ჯგუფის ის ერთ-ერთი ვარიანტია, რომელთა ზოგად თვისებასაც ფუნქციონირების ავტომატური ბუნება აქვს. ამ მკვლევარის აზრით, ისინი შეგნებისა და ნებისყოფისაგან დამოუკიდებლად მოქმედებენ, როგორც „სხეულის სიბრძნის“ თავისთავადი გამოვლენა. იგი თვლიდა, რომ ეს თვისებები ყველა ცოცხალ სხეულს დასაწყისიდანვე გააჩნია, ვინც კი „სიბრძნითაა“ აღჭურვილი. 1932 წ. კენონმა გამოსცა მონოგრაფია „სხეულის სიბრძნე“ [156], რომელსაც სამეცნიერო წრეები გაცხოველებული ინტერესით შეხვდნენ. შემდგომში კენონის ამ სხვა შრომებმა საფუძველი ჩაუყარეს დღევანდელ კიბერნეტიკას.

ექსპერიმენტში ანტისხეულები ადვილად ინდუცირდება არამხოლოდ

უცხო წარმოშობის დაბალ- ან მაღალმოლეკულური ნაერთებისადმი, არამედ საკუთარი ენდოგენური ნაერთების მიმართაც. ეს იმაზე მიუთითებს, რომ ანტისხეულები არ წარმოადგენენ იმ ცილებს, რომლებიც მხოლოდ მაკრომოლეკულური ქსენობიოტიკების ნეიტრალიზაციასა და მათი ორგანიზმიდან გამოდევნას ემსახურებიან: მიკროსომული ფერმენტების ინდუქციისა და ქსენობიოტიკებით გამოწვეულ იმუნურ პასუხებს შორის გარკვეული კავშირი არსებობს. დაბალმოლეკულური ქსენობიოტიკები ინდუცირებენ ჰიდროქსილაზურ სისტემას, მაღალმოლეკულური კი ლიმფოციტურ იმუნურ სისტემას [157]. ამ თვალსაზრისიდან გამომდინარე, ჰიდროქსილაზური და იმუნური სისტემები დაბალ- და მაღალმოლეკულური ქსენობიოტიკებისაგან ორგანიზმის დაცვის ერთიანი სისტემის კონტექსტში განიხილება. ამ მიზნით ჩატარებული გამოკვლევებით ნაჩვენებია იქნა, რომ ცხოველში თავისუფალი ფენობარბიტალის შეყვანა ზრდის ღვიძლში ციტოქრომ P450-ის ხვედრით შემცველობასა და N-დემეთილაზურ აქტივობას. ალბუმინთან კოვალენტურად დაკავშირებული ფენობარბიტალი კი ამ უნარს მოკლებულია. ეს ფაქტი დაკავშირებული არაა ალბუმინის ინჰიბიტორულ მოქმედებასთან. ექსპერიმენტებმა აჩვენეს, რომ ხარის შრატის ალბუმინის ცხოველში შეყვანა არ მოქმედებს ციტოქრომ P450-ის შემცველობასა და მიკროსომულ ჰიდროქსილაზას აქტივობაზე. ფენობარბიტალისა და ალბუმინის ერთდროული ინექცია ისეთივე მაინდუცირებელ ეფექტს იძლევა, როგორც ცალკე ფენობარბიტალი. მხოლოდ ამ უკანასკნელის ალბუმინთან კოვალენტურად დაკავშირებისას მაინდუცირებელი ეფექტის დაკარგვა გამოწვეული უნდა იყოს მიღებული კონიუგატის უნართი ლიმფოციტების ზედაპირზე წარმოქმნას ფენობარბიტალის დამკავშირებელი რეცეპტორი [157]. მაკრომოლეკულურ მატარებელთან, მაგალითად, ცილასთან კოვალენტურად მიერთებული ფენობარბიტალის ცხოველში შეყვანა ლიმფოციტებში იმუნოგლობულინების ინდუცირებას იწვევს, რომლებიც სპეციფიკურად იკავშირებენ ფენობარბიტალს და მასთან სტრუქტურულად ახლო მდგომ ნივთიერებებს და მათ ინაქტივაციას ახდენენ.

იმუნოლოგიური სისტემისათვის არსებული „ძირითადი დგომა“, რომელიც ცნობს როგორც „თავისიანს“, ასევე „უცხოს“, მაგრამ მხოლოდ „უცხოს“ ინაქტივაციას ახდენს, ნაწილობრივად სამართლიანი. სინამდვილეში იმუნური სისტემა ჩვეულებრივ რეაგირებს როგორც უცხო, ასევე საკუთარ დაბალ- და მაღალმოლეკულურ ნაერთებთან. უცხო ნივთიერებები, რომლებიც ორგანიზმში ადრე არ გვხვდებოდნენ, იმუნურ სისტემას *de novo* აინდუცირებენ. ამიტომ მსჯელობა შეიძლება ქსენობიოტიკების მიერ ინდუქ-

ციის როგორც ადაპტურ რეაქციებზე (მიკროსომული ფერმენტების სინთეზზე), ასევე იმუნოლოგიური მექანიზმების გაძლიერებულ ინდუქციაზე (ანტისხეულების სინთეზზე). როგორც ჩანს, ორგანიზმში ქსენობიოტიკების გარკვეული (არალეტალური) დოზებით მუდმივი ზემოქმედებისას თანდათანობით ვითარდებიან მეტაბოლიზებადი ადაპტური მექანიზმები. ქსენობიოტიკი შეიძლება თავისებურ ენდოგენურ ნაერთად იქცეს და შემდეგ იმდენად „შევიდეს ამ როლში“, რომ უჯრედში მისი შეღწევის შეწყვეტამ სხვადასხვა ფუნქციური დარღვევებიც კი გამოიწვიოს. პრევენცია შეიძლება ქსენობიოტიკის ხელახალი მიწოდებით განხორციელდეს. ამდენად, ხანგრძლივი გამოყენების შედეგად უცხო ნივთიერება ორგანიზმის რომელიღაცა მეტაბოლური რეაქციის სუბსტრატი ხდება. ამის საუკეთესო მაგალითებია მორფინი, ბარბიტურატები, ალკოჰოლი და სხვ. [158].

მონოოქსიგენაზურ სისტემასთან ქიმიურ ნივთიერებათა ურთიერთქმედებისას, როგორც წესი მათი შედარებით პოლარულ და ორგანიზმიდან აღვილად გამოძევებად ფორმებად გარდაქმნა ხდება. გარდა ამისა, სუბსტრატთა ჟანგვა ხშირად დაკავშირებულია შუალედ მაღალრეაქციისუნარიან პროდუქტთა (ეპოქსიდების, ქინონების, თავისუფალი რადიკალების) წარმოქმნასთან. მიუხედავად ამისა, შემდგომში ისინი ამ რეაქციისუნარიანობას კარგავენ, რამდენადაც მათი გენერაცია ოპტიმალურად კონტროლდება ფერმენტული, ანტიოქსიდანტური და სხვა მრავალი მექანიზმებით. უჯრედში მოხვედრილ ქიმიურ ნივთიერებათა მაღალრეაქციისუნარიანი მეტაბოლიტების ან თავისუფალრადიკალური ნაწილაკების ( $O_2^{\cdot-}$ ,  $HO^{\cdot}$ ) კონცენტრაცია დასამკვირვებლს თუ აღმატება, მაშინ აღძრული დისბალანსი მემბრანათა ლიპიდური კომპონენტების, ცილის მოლეკულების და თვით ციტოქრომ P450-ის ინაქტივაციაში აისახება [159, 160].

ციტოქრომ P450-ის დაზიანება ქიმიურ ნივთიერებათა მეტაბოლიზმისა და, ბუნებრივია, მათი რეაქციისუნარიანი მეტაბოლიტების წარმოქმნის შესუსტებას გამოიწვევს. მაგ., ცხოველში შეყვანილი ბრომბენზოლი, ტრიქლორეთილენი და ვინილქლორიდი ღვიძლის მიკროსომულ ცილებს უკავშირდებიან. შემდგომში ამ ტოქსიკანტთა მრავალჯერადი შეყვანის შედეგად ციტოქრომ P450-ის დონის შემცირების პარალელურად დაკავშირების ალბათობაც მცირდება [161]. განხილული მოვლენა დამახასიათებელია სიტუაციისათვის, რომლის დროსაც ტოქსიკანტთა მაღალი დოზებით მოწამვლა ხდება. ყოფაცხოვრებაში ჩვეულებრივ განუზომლად ხშირად ორგანიზმზე ნივთიერებათა მცირე დოზები ზემოქმედებენ. ამიტომ იგივე მექანიზმი მონოოქსიგენაზური სისტემის არა ტოტალური დაზიანებით, არამედ შერჩევი-

თად, – ციტოქრომ P450-ის იმ ცალკეული იზოფორმის სპეციფიკური გამოთიშვით გამოძღვანდება, რომელიც კონკრეტული ნივთიერების რეაქციისუნარიანი მეტაბოლიტების არაადექვატურ რაოდენობას გენერირებს. პრინციპში მოცემული სიტუაციისათვის მიმდინარეობს უსარგებლო ციტოქრომ P450-ის „წუნდება“ და „გამოხშირვა“. ეს მეტაბოლიზმის თვითრეგულირების საოცრად მარტივი და ეფექტური მექანიზმია. გარდა ამისა, ციტოქრომ P450-ის დაზიანების იგივე პროცესი ავტომატურად ქმნის ბუნებრივ კონიუგირებულ ანტიგენს: ციტოქრომთან კოვალენტურად დაკავშირებულ ნივთიერებას შეუძლია იმუნური პასუხის ინდუცირება და უჯრედში მოცემული ტიპის ნივთიერების მოქმედების დამუხრუჭება [158].

ქიმიურ ნაერთთა ჟანგვის მონოოქსიგენაზურმა სისტემამ ევოლუციის მილიონი წლები გამოიარა და ამ ხანგრძლივ პერიოდში ცენტრალური პოზიცია შეინარჩუნა. ციტოქრომ P450-ის სახით ბუნებამ „გამოძერწა“ ფერმენტი, რომელიც „ოპტიმალურად გახსნილ“ ურთიერთობებს ამყარებს უსაზღვრო რაოდენობის და ამავე დროს სრულიად განსხვავებული ქიმიური ბუნების მქონე ნაერთებთან. მონოოქსიგენაზურ სისტემაზე გამავალ ქსენობიოტიკებს გამუდმებით მოაქვთ გარემოს ქიმიურ შემადგენლობაზე და მასში მიმდინარე ცვლილებების შესახებ ინფორმაცია. ეს ცვლილებები თუ ხანგრძლივი პერიოდისაა, ისინი შესაბამისი ადაპტური ბუნების რეაქციებს ინდუცირებენ. ქსენობიოტიკებს შეუძლიათ უჯრედის გენეტიკურ აპარატთან ურთიერთქმედება (რნმ-ის სინთეზის ინდუცირება) და თავისივე მეტაბოლიზმში მონაწილე ფერმენტების წარმოქმნა. ახალ ნივთიერებათა გაჩენა აიძულებს ცოცხალს სათანადო კორექტივები მოახდინოს და ასე გრძელდება დაუსრულებლად. სახეზეა თვითგანვითარებადი სისტემა, რომელიც ისეთ პრინციპზეა აგებული, რომ ქიმიური ევოლუცია ბიოლოგიურ ევოლუციას იწვევს. სავსებით სამართლიანად აღნიშნავს პროფ. ა. არჩაკოვი [20], რომ ციტოქრომ P450-ის სახით არსებობს ფერმენტი, რომელსაც წარმატებით შეუძლია დაიცვას ორგანიზმი არამხოლოდ არსებული სინთეზური ტოქსიკანტებისაგან, არამედ იმათგანაც, რომლებიც ადამიანის მიერ მომავალში იწარმოება. ციტოქრომ P450-ის მონაწილეობით წარმოქმნილი ენდოგენური ჰიდროფობული ნივთიერებები (სტეროიდული ჰორმონები, ქოლესტერინი, თიროქსინი, პროსტაგლანდინები, ცხიმოვანი მჟავები და სხვ.) უკავშირდებიან რა სპეციფიკურ რეცეპტორებს, თავის რეგულატორულ ფუნქციებს ასრულებენ. გამორიცხული არაა მათი ზემოქმედება ციტოქრომ P450-ის შემცველ ქემოანალიზატორულ სისტემაზეც ვრცელდებოდეს, რომელიც უჯრედის ჰორმონალური რეგულაციის მდუბლირებელი მექანიზმი შეიძლე-

ბა იყოს. ციტოქრომ P450-ის სისტემა ავტომატურად მონაწილეობს პლაზმური მემბრანების მოლეკულური კომპოზიციის რეგულაციაში, რომლებიც რეცეპტორულ და სხვა მნიშვნელოვან ფუნქციებს ატარებენ. ნაჩვენებია მაგალითად, რომ ფენობარბიტალის გამოყენებისას ტვინში საგრძნობლად იზრდება β-ადრენორეცეპტორების რაოდენობა [158].

დასასრულს განხილულ პრობლემას ბიოლოგიური უნივერსალობის პრინციპით თუ მიგუდებით, ძნელი არ იქნება წარმოვადგინოთ ის არასრული ჩამონათვალი, რომელიც მონოქსიგენაზურ და იმუნურ სისტემათა შორის დიდ მსგავსებაზე მიუთითებენ:

1. სხვა სისტემებისაგან განსხვავებით ისინი განუსაზღვრელი წრის ქიმიურ სტრუქტურებთან ურთიერთქმედებენ;
2. ორივე სისტემა რეაგირებს როგორც ქსენობიოტიკებთან, ასევე ენდოგენურ ნაერთებთან;
3. ორივე სისტემა ინდუქციურია;
4. არსებობს განსხვავებული სპეციფიკურობის მიხედვით სუბსტრატებზე შემტევი ციტოქრომ P450-ის და ასევე იმუნოლოგიური რეცეპტორებისა და ანტისხეულების მრავლობითი ფორმები;
5. ორივე სისტემას გააჩნია „მახსოვრობის“ უნარი; მეორადი იმუნური მახსოვრობა დიდი ხნის საყოველთაოდ ცნობილი მოვლენაა, ხოლო მონოქსიგენაზური სისტემის ინდუქციის მეორადი პასუხის არსებობა თავის ექსპერიმენტულ დადასტურებას ამჟამად ღებულობს;
6. ორივე სისტემის ზოგადი ფიზიოლოგიური ფუნქცია ქიმიური ჰომეოსტაზის შენარჩუნებაა;
7. ციტოქრომ P450-ის მონაწილეობით მონოქსიგენაზური და იმუნოლოგიური სისტემის შეუღლებული ფუნქცია უჯრედში ბუნებრივი კონიუგირებული ანტიგენების წარმოქმნაში მდგომარეობს, რის შედეგადაც შემდგომში ამა თუ იმ დაბალმოლეკულური ნაერთის მიმართ სპეციფიკური იმუნური პასუხი ინდუცირდება;
8. შეუღლების ფუნქციაში დამატებით იგულისხმება უმნიშვნელოვანესი მომენტი იმის შესახებ, რომ იმუნური რეაქციები რეგულირდება მონოქსიგენაზური სისტემით სინთეზირებული პროსტაგლანდინებით, კორტიკოსტეროიდებით, ჰიბერელინებითა და სხვ.;
9. მონოქსიგენაზური და იმუნოლოგიური სისტემებისათვის საერთო რეგულატორები არსებობს.

უჯრედში ქიმიური ნივთიერებების დაკავშირების ორი ტიპი – ქემოა-ნალიზატორული (ციტოქრომ P450 ან სხვა ფერმენტული სისტემები) და

რეცეპტორული (იმუნური) ჰარმონიულად ავსებენ ერთმანეთს და ორგანიზმის შეუვალლობის ერთიან დაუძლეველ ზღუდეს ქმნიან.

### 2.7.1 მოლეკულური რეცეპტოროლოგიის ზოგადი პრინციპები

იმუნურ და მონოქსიგენაზურ სისტემათა მოქმედებასა და რეგულაციაში თვალსაჩინო ადგილი რეცეპტორებს უკავია. ამასთან დაკავშირებით საჭიროა მათზე არსებული წარმოდგენების თანამედროვე ინტერპრეტაციის ზოგადი ცოდნა მაინც. ანალიზური მიდგომის საშუალებით შესწავლილია რეცეპტორების ქსოვილოგანი და უჯრედული განაწილება, ხოლო ზოგიერთი მათგანისათვის დადგენილია მოლეკულური აღნაგობაც [162].

მრავალრიცხოვანი ბუნებრივი და სინთეზური მოლეკულა-მედიატორების (აგონისტებისა და ანტაგონისტების) სახით არსებობს „გასაღების დიდი ასხმა“, რომელთა დახმარებითაც მკვლევარები ცდილობენ გამოავლინონ „ბოქლომების“ – რეცეპტორულ სისტემათა „აქტიური ცენტრების“ სტრუქტურა და მოქმედების პრინციპები. „გასაღები-ბოქლომისა“ და „აქტიური ცენტრების“ ცნებები ენზიმოლოგიიდანაა ნასესხები. ფერმენტთა შენების ანალოგიურად მათ მიმართ პეპტიდური ბუნების შესახებ შეხედულებებმა რეცეპტოროლოგიაშიც შეაღწია. აქვე უნდა აღინიშნოს, რომ არაფერმენტული რეცეპტორული სტრუქტურების ცილური აღნაგობის შესახებ დამკვიდრებული მტკიცებულებები არაპირდაპირ მონაცემებს ეყრდნობა.

რეცეპტორთა პეპტიდური აღნაგობის დამამტკიცებელი თვალსაზრისი [163] აღიარებს განსაზღვრული რეცეპტორებისა და განსაზღვრული მედიატორების (აგონისტებისა და ანტაგონისტების) მაღალსპეციფიკური ურთიერთქმედების ფაქტს, რაც თავის მხრივ განპირობებულია შესაბამისი მედიატორების მიმართ პეპტიდური რეცეპტორული სტრუქტურების კომპლემენტარობით. ამის საპირისპიროდ შეიძლება ითქვას ის, რომ მოლეკულური ბიოლოგიის ფუნდამენტური პრინციპი – კომპლემენტარობა სულაც არ არის პეპტიდური სტრუქტურის პრეროგატივა. ნებისმიერი ბიომოლეკულა, რომელიც კი მეორე მოლეკულას წყალბადური ბმის წარმოქმნით უკავშირდება, ამ პრინციპს ემორჩილება. ამის მაგალითია თუნდაც აზოტოვან ფუძეთა კომპლემენტარობა.

თანამედროვე რეცეპტოლოგიის თეორიულად დასაბუთებული პრინციპები რუსმა მკვლევარმა ვ. პოლიმოვმა [163] წარმოადგინა. ამ ავტორის თანახმად რეცეპტორის ცნებაში იგულისხმება მემბრანის მრავალკომპონენტური მოლეკულური სტრუქტურა, რომელიც შემდეგი ფუნქციური ბლოკებისაგან შედგება: 1. მედიატორის (აგონისტის, ანტაგონისტის) „დასაჯდომი მოედნისაგან“, ანუ ნაწილისაგან, რომელიც შეიცნობს და იკავშირებს მედიატორს; 2. ფრაგმენტისაგან, რომელიც „დასაჯდომი მოედნისა“ და მედიატორის (აგონისტის) ურთიერთქმედების შედეგების (სიგნალის) რეცეპტორული სტრუქტურის ეფექტორულ უბნებზე გადაცემის მექანიზმზეა პასუხისმგებელი; ანტაგონისტი ურთიერთქმედებს რა „დასაჯდომი მოე-

დანთან“, ან არ იწვევს მის სტრუქტურაში ცვლილებებს, ან ცვლის მას, მაგრამ აბლოკირებს სიგნალის გადაცემის მექანიზმს. წარმოდგენილი თეორია თვლის, რომ რეცეპტორ-მედიატორის ურთიერთქმედება სამ – მიზიდვის, ორიენტაციის და ფიქსაციის – ეტაპად მიმდინარეობს. ამასთან, ურთიერთქმედების სხვადასხვა ეტაპზე განსაზღვრულ როლს კავშირის სხვადასხვა ტიპები ასრულებენ: საკმაოდ სტაბილური იონური და წყალბადური ბმები მედიატორის (აგონისტის, ანტაგონისტის) ასოცირებაში მონაწილეობენ; დიპოლ-დიპოლური კავშირები მონაწილეობას ღებულობენ მედიატორის ფიქსირებაში; აპოლარული ვანდერვაალსის კავშირები მედიატორ-რეცეპტორის კომპლექსს ასტაბილირებენ; კოვალენტური კავშირები მოქმედებას იწვევენ რეცეპტორების სხვადასხვა სახეებსა და ანტაგონისტის ცალკეულ ტიპებს შორის; დასაშვებია ხელატური კომპლექსების წარმოქმნა რეცეპტორის შემადგენლობაში მყოფ მეტალის იონთა მედიატორის ურთიერთქმედებისას (მაგ.,  $\alpha$ -ადრენორეცეპტორში რკინის იონებსა და კატექოლამინებს შორის).

მეტალის იონები მნიშვნელოვან როლს ასრულებენ რეცეპტორების ფუნქციონირებაში და „დასაჯდომი მოედნების“ სტრუქტურირებაში. ისინი არამხოლოდ რეცეპტორული ბიოქიმიური სტრუქტურების ეფექტურ რგოლებს (მაგ., Ca), ან ფერმენტულ ეფექტორულ რგოლებზე გადაცემის ფრაგმენტებს წარმოადგენენ (მაგ., Mn-ადენილციკლაზა, Mg, K, Na-ATP-აზა), არამედ „დასაჯდომი მოედნების“ კომპონენტთა ერთმანეთისადმი ორიენტირებასაც უზრუნველყოფენ.

არსებული და საკუთარი მონაცემების საფუძველზე ვ. პოდიმოვმა [163] რეცეპტორების სტრუქტურისა და ფუნქციონირებაზე წარმოადგინა ახლებური კონცეფცია, რომელიც შემდეგს ითვალისწინებს: რეცეპტორების „დასაჯდომი მოედნის“ პეპტიდურ ბუნებაზე წარმოდგენების უარყოფას; რეცეპტორების სტრუქტურის მრავალკომპონენტურობის აღიარებას; კომპლემენტარობის პრინციპის გაფართოებას მედიატორ-„დასაჯდომი მოედნის“ ურთიერთქმედებაში და „დასაჯდომი მოედნის“ კომპონენტებს შორის ურთიერთქმედებაში; რეცეპტორების ფუნქციონირების პრინციპის გაფართოებულ განხილვას „დასაჯდომი მოედნის“ კონფორმაციული ცვლილებებიდან, „დასაჯდომი მოედნის“ პირველადი კომპლექსის დაშლამდე, რის შედეგადაც მედიატორებსა (აგონისტებსა) და „დასაჯდომი მოედნის“ კომპონენტებს შორის მეორადი კომპლექსები წარმოიქმნებიან; მეტალთა იონების (Ca, Mg, Mn) როლის აღიარებას „დასაჯდომი მოედნის“ სტრუქტურირებასა და ფუნქციონირებაში.

ჩათვალა რა, რომ ყველა რეცეპტორული სისტემის „დასაჯდომი მოედანი“ ერთიანი მოლეკულურ-არქიტექტურული გეგმითაა ნაშენები, ვ. პოდიმოვმა [163] მისი შემადგენელი (კანდიდატი) მოლეკულებისადმი შემდეგი მოთხოვნები წამოაყენა:

1. ეს მოლეკულები უნდა იმყოფებოდნენ უჯრედულ მემბრანებში, სადაც მუდმივად ვლინდება რეცეპტორების არსებობა;
2. ისინი უნდა ფლობდნენ რეცეპტორული ტიპის მოქმედების უნარს და გააჩნდეთ მაღალი ბიოლოგიური აქტივობა;

3. ცალკეულად აღებულს არ უნდა გააჩნდეს რეცეპტორული მოქმედების მაღალი სპეციფიკურობა;
4. ეს მოლეკულები უნდა წარმოადგენდნენ ნაერთთა რიგს, რომელთა ცალკეული წარმომადგენლიდან შეიძლება აიწყოს არანაკლებ რამოდენიმე ათეული სხვადასხვა „დასაჯდომი მოედანი“;
5. ნაერთთა კლასების ცალკეული წარმომადგენლები ერთმანეთისადმი კომპლემენტარული უნდა იყონ, ანუ ერთი კლასის წარმომადგენლისათვის უნდა არსებობდეს სხვა კლასის კომპლემენტარული მოლეკულა;
6. ამ მოლეკულებს უნდა გააჩნდეთ მეტალის იონებთან ურთიერთქმედების მქონე ჯგუფები;
7. ასეთი მოლეკულებისა და იონებისაგან შექმნილი „დასაჯდომი მოედანი“ უნდა ურთიერთქმედებდნენ ფოსფოლიპიდებთან და შეიცავდნენ დამუხტულ ფრაგმენტებს, რომელთა დახმარებითაც ხდება მედიატორის (აგონისტის, ანტაგონისტის) მიზიდვა და ორიენტირება;
8. ასეთი მოლეკულებისაგან ნაგები თითოეული „დასაჯდომი მოედანი“ კომპლემენტარული უნდა იყოს გარკვეული მედიატორის მიმართ, ანუ უნდა არსებობდეს გარკვეული სტერეოქიმიური შერჩევითობა;
9. მოქმედების შერჩევითობა უნდა ეფუძნებოდეს აგრეთვე ასეთი მოლეკულებისაგან ფორმირებული „დასაჯდომი მოედნის“ ჯგუფებს, რომლებიც გარკვეული მედიატორების რეაქციისუნარიან ჯგუფებთან იურთიერთქმედებენ;
10. მედიატორთან (აგონისტთან) ურთიერთქმედებამ „დასაჯდომი მოედნის“ პირველადი კომპლექსის დაშლა უნდა გამოიწვიოს, რის შედეგადაც მედიატორისა და „დასაჯდომი მოედნის“ ერთ-ერთ კომპონენტს შორის კომპლექსი წარმოიქმნება. „დასაჯდომი მოედანთან“ ანტაგონისტის ურთიერთქმედებამ მისი კომპლექსის დაშლა არ უნდა გამოიწვიოს;
11. ასეთი მოლეკულისაგან კონსტრუირებული „დასაჯდომი მოედნები“ უნდა შეიცავდნენ ფრაგმენტების მიბმის ადგილს, რომლებიც რეცეპტორული ბიოქიმიური სტრუქტურების ეფექტორულ ელემენტებზე გადაცემას განახორციელებდნენ.  
რეცეპტორული მექანიზმების შესახებ პოლიმოვის მიერ წამოყენებული ჰიპოთეზა შემდგომში შეიძლება ანალოგიურად პუნქტად ქცეულიყო მოლეკულური ინფორმაციის ზოგადი თეორიის შესაქმნელად. სამწუხაროდ ავტორს ამის განხორციელება არ დასცალდა ნაადრევი სიკვდილის გამო (გარდაიცვალა 42 წლის ასაკში).



## 2.7.2 ოქსიდაზები და ოქსიგენაზები მცენარის მდგრადობასა და ფიტომიუნიტეტში

მცენარეს შეიძლება გააჩნდეს შეძენილი ან მემკვიდრულად მიღებული მდგრადობა (რეზისტენტობა), რომელიც კონსტიტუციურ ფიტომიუნიტეტად განიხილება. მდგრადობა, რომელიც მას სიცოცხლის პერიოდში უყალიბდება, შეძენილი, ანუ ინდუქციური იმუნიტეტია. მდგრადობა და შემგუებლობა პათოგენის მიერ დაზიანების ხარისხს ახასიათებს. მაღალი მდგრადობა ახლოს დგას იმუნიტეტთან. მცენარეს ტოლერანტულს უწოდებენ, თუ მას სუსტი მდგრადობა გააჩნია, მაგრამ პათოგენით იშვიათად ზიანდება. იმუნური ტოლერანტობა იმუნორეგულაციის მნიშვნელოვანი ფენომენია [164]. დაავადებათა გამომწვევების მიმართ ფიტოპათოლოგები ფიტომიუნიტეტის ორ ფორმას ანსხვავებენ: პასიურს, რომელიც პათოგენის არსებობის მიუხედავად მცენარეს გააჩნია და აქტიურს, რომელიც მცენარეს პათოგენის შელწვევის შემდეგ უყალიბდება. მცენარეში შეიძლება შეძენილი იმუნიტეტიც აღიძრას, მაგრამ იგი ცხოველური იმუნიტეტისაგან განსხვავდება თუნდაც თავისი ლოკალური ბუნების გამო. გამოჯანმრთელებული მცენარე ჩვეულებრივ ვირუსის მატარებელია, მაგრამ დაავადების სიმპტომებს აღარ ატარებს. გარდა ამისა ვირუსის ერთი შტამით დაავადებისას მცენარე ამავე ვირუსის ახლო მდგომი შტამით დაავადების მიმართ მდგრადი ხდება [164]. მიუხედავად აღნიშნულისა, გამოჯანმრთელებულ მცენარეში არაა ნაპოვნი ცხოველის იმუნიტეტისათვის დამახასიათებელი ანტისხეულები. ამ უკანასკნელთა შეყვანით აღძრული პასიური იმუნიტეტი მცენარეზე დემონსტრირებული არაა. მთელ რიგ შემთხვევებში მცენარეში ორგანული ქსენობიოტიკის მეტაბოლიზმი ძლიერ წააგავს ძუძუმწოვრებსა და მიკრობულ სისტემებში მათ მეტაბოლიზმს. მცენარეებსაც შეუძლიათ ამ ნივთიერებათა ფართო სპექტრის ნაკლებ-, ან საერთოდ არატოქსიკურ პროდუქტებად ტრანსფორმირება.

ისეთი პირობებისათვის, რომლის დროსაც რეალურად დგინდება ცხოველისა და მცენარის იმუნურ რეაქციათა შორის მსგავსება, არასრულად და ხშირად არაადექვატურად იყენებენ ზოომიუნიტეტის ისეთ ტერმინებს, როგორცაა აგლუტინაცია (ანტისხეულების გავლენით ბაქტერიული უჯრედების ან ანტიგენის შეწებება), პრეციპიტაცია (ანტისხეულების გავლენით ანტიგენური ნაწილაკების გამსხვილება და დალექვა) და ლიზისი (ბაქტერიული უჯრედების გახსნა – ბაქტერიოლიზისი, ან ერითროციტის უჯრედების გახსნა – ჰემოლიზი) [165]. ანტისხეულების აქტივაციის მქონე მცენარეული ტოქსინები (რიცინი, აბრინი, კროტინი) არაცილური დაბალმო-

ლექულური ნაერთებია და ცხოველური ანტისხეულებისაგან განსხვავებით ანტიგენტან მოქმედების გაცილებით დაბალი სპეციფიკურობა და მაღალი თერმოსტაბილურობა გააჩნიათ. არსებობს მონაცემები [165] იმის შესახებ, რომ კურდღლის სისხლიდან მომზადებული ანტიშრატი, რომელიც ბაქტერიითა ავლუტინაციას იწვევს, მცენარეს ამ პათოგენით დაავადებისაგან იცავს. ცნობილია აგრეთვე, რომ მთელ რიგ მცენარეთა ცილურ ექსტრაქტებს ჰემაგლუტინაციის უნარის გარდა ბაქტერიების ავლუტინაციის თვისებებიც გააჩნია. ნაჩვენებია, რომ პარკოსნების ცილურ ექსტრაქტებს სისხლის შრატის პრეციპიტაციაც შეუძლიათ [166].

მდგრადობა შეიძლება განხილულ იქნას ერთი მხრივ, როგორც პარაზიტის შხამის დეტოქსიკაციისა და მცენარის მიერ მის უვნებელ ფორმად დაქანვის, მეორე მხრივ კი პარაზიტის ჰიდროლიზურ ფერმენტთა აქტივობის დათრგუნვის უნარი. ამ შემთხვევაში სუნთქვის გაძლიერება ჩანერგილი პათოგენის და მის მიერ გამოყოფილი ტოქსინების მიმართ მცენარის უნივერსალურ დამცველ ფუნქციად გვევლინება.

ოქსიდაზური ფერმენტული სისტემებიდან მცენარის მდგრადობაში აქტიურადაა ჩართული კატალაზა, პეროქსიდაზა, გლუტათიონპეროქსიდაზა, სუპეროქსიდდისმუტაზა, პოლიფენოლოქსიდაზა, ასკორბატოქსიდაზა და სხვ. ისინი სხვადასხვა სუბუჯრედულ კომპონენტებშია ლოკალიზებული. მათი უმრავლესობა კონსტიტუციურად ექსპრესირდება, თუმცა ტოქსიკანტებს მათი ინდუქციის ექსპრესიაც შეუძლიათ. მცენარის დაზიანებისას ყველაზე ხშირად და ეფექტურად პეროქსიდაზა აქტიურდება. მისი გავლენით მნიშვნელოვნად მატულობს წყალბადის ზეჟანგის, თავისუფალი რადიკალების და პოლიმერიზაციის პროდუქტთა (კოლაგენის, ლიგნინის) კონცენტრაციები. ამის გამო წარმატებით ითრგუნება პათოგენური სოკოს უჯრედგარე ფერმენტები [167, 168]. ტოქსინების მიმართ განსაკუთრებულ მდგრადობას ფლავოპროტეინული ოქსიდაზები ავლენენ, რომელთა აქტივობები მცენარის ინფიცირებისას მკვეთრად იზრდება.

პოლიფენოლოქსიდაზური აქტივობის გაზრდით ჩქარდება პოლიფენოლების ქინონებად გარდაქმნა, რომლებიც ანტისხეულების მსგავსად პათოგენის ცილებთან რეაგირებენ და მათ პრეციპიტაციას იწვევენ. ამ ფერმენტს უკავშირებენ აგრეთვე ე.წ. “ზემგრძნობიარობის“ (“ჰიპერმგრძნობიარობის“) იმუნურ რეაქციას, რაც მცენარის მდგრადი ჯიშებისთვისაა დამახასიათებელი; დაზიანებულ მცენარეში მდგრადობის გაძლიერებას თან ახლავს პენტოზური და ლიმონმჟავაციკლების ფერმენტთა გააქტივება. გლუკოზო-ნ-ფოსფატ- და ნ-ფოსფოგლუკონატდეჰიდროგენაზას აქტივობათა ზრდა მდგრადი

ჯიშების ქსოვილებში სუნთქვის ინტენსივობის გაძლიერებითა და ფოტოსინთეზის დაქვეითებით მიმდინარეობს.

არომატულ ნაერთთა ბიოსინთეზის რეგულაციაში პენტოზური ციკლის ფერმენტთა მონაწილეობა მდგრადობისა და პათოლოგიურ პროცესთა უშუალო კავშირის არსებობაზე მიუთითებს. დაზიანებული ქსოვილების ფენოლებით, ფიტოალექსინებით, გლუკოზიდებით გაჯერება, აგრეთვე სუნთქვის და ენერგიის აკუმულირების სინქარეთა ცვლილებები ამ კავშირის არსებობის რეალური ასახვაა. ჩამოთვლილ პროცესთა დამამთავრებელი ეტაპებიც კონტროლდება ფერმენტებით, რომლებიც უშუალოდ მონაწილეობენ მდგრადობის ფაქტორთა ფორმირებაში.

პირუვატ- და მალაქდეჰიდროგენაზების აქტივობათა ზრდა ლიმონმჟავას ციკლის ბრუნთა რიცხვის გაზრდას იწვევს. ამის შედეგად ადგილი აქვს ორგანულ მჟავათა დაგროვებას, რომლებიც ხშირ შემთხვევაში პათოგენების მიმართ ტოქსიკურებია. ციკლში წარმოქმნილი NADH ენერგიის გენერირებაში მონაწილეობს, რაც მდგრადობისათვის აუცილებელი პირობაა [169]. ასკორბატ- და ციტოქრომოქსიდაზას აქტივობათა გაძლიერება NADH-ისა და NADPH-ის დაჟანგვის მაღალ ხარისხზე და მცენარის დაავადებათა მიმართ მდგრადობის უნარის გამომჟღავნებაზე მიუთითებენ.

მცირე მონაცემები გაგვაჩნია, რომლებიც მცენარის მდგრადობასა და ენერგეტიკულ ცვლას შორის პირდაპირ კავშირს ეხება. ეს გარემოება გარკვეულად აძნელებს საკითხის განზოგადებას. ფრაგმენტულად ნაჩვენებია, რომ მცენარეში დაავადების მიმართ მდგრადობის განვითარებას თან სდევს ATP-სა და ალდენილი პირიდინ-უკლეოტიდების დაგროვება, ციკლური და არაციკლური ფოტოფოსფორილებისა და მიტოქონდრიული ჟანგვითი ფოსფორილების გააქტიურება. სარწმუნოდაა ნაჩვენები, რომ 2,4-დინიტროფენოლი (სუნთქვისა და ფოსფორილების გამთიშველი) ნარკოტიკების მსგავსად მცენარის მდგრადობის მნიშვნელოვან დაქვეითებას იწვევს [170].

ინფიცირებულ უჯრედში ცილების ფუნქციური აქტივობის ცვლილებებს თუ თან სდევს ენერგეტიკული ცვლის მოშლა, მაშინ დაავადების მიმართ მდგრადობაში ენერგიის წარმომქმნელ და მომხმარებელ პროცესებს შორის სტაციონარული მდგომარეობის (ჰომეოსტაზის) შენარჩუნება უნდა ვიგულისხმოდ. ამ მდგომარეობის ყოველგვარი დარღვევა ინფექციასთან ბრძოლის ეფექტურობის ვარდნით აღინიშნება.

მიტოქონდრიებსა და ქლოროპლასტებში საკუთარი ცილამასინთეზირებელი გენეტიკური აპარატის არსებობა აუცილებელს ხდის მცენარის მდგრადობაში არამარტო ამ ორგანელთა ურთიერთობის როლის გარკვევას,

არამედ მოცემულ პროცესში ქრომოსომული და არაქრომოსომული რეგულატორული ურთიერთქმედების შესწავლასაც. ცნობილია, რომ მცენარეებს შეუძლიათ ქსენობიოტიკების მუტაგენებამდე გააქტივება [171]. პეროქსიდაზები და ციტოქრომები 2-ამინოფლუორენის, ბენზპირენისა და პენტაქლოროფენოლის გარდაქმნას ახორციელებენ რეაქციის უნარიან პროდუქტებად. ორი უკანასკნელი ქინოიდურ წარმოებულებს იძლევა, რომელთაც ჟანგბადის ნაირგვარი რადიკალების წარმოქმნის უნარი აქვთ. დასაშვებადაა მიჩნეული, რომ მცენარეში (ისევე როგორც ცხოველში) მეტაბოლიტების მუტაგენური მოქმედების მოლეკულური მექანიზმი ღწმ-თან მათ კოვალენტურ დაკავშირებაში ან მის ფრაგმენტაციაში მდგომარეობს.

გაცილებით მცირე და ამავე დროს არაპირდაპირი მონაცემები გავგაჩნია ადაპტური და ფიზიოლოგიური დაცვის სისტემაში მცენარეული ციტოქრომ P450-შემცველი მონოოქსიგენაზების უშუალო მონაწილეობისა და ამ პროცესებში მათი ფუნქციონირების მექანიზმის შესახებ.

სანდერმანის მიერ [172] შემოთავაზებული ე.წ. „მწვანე ღვიძლის“ ჰიპოთეზის თანახმად მონოოქსიგენაზების სხვადასხვა ვარიანტები ქსენობიოტიკთა მეტაბოლიზმში (განსაკუთრებით ფუნქციონალიზაციის სტადიაზე) განსხვავებულ აქტივობებს ამჟღავნებენ და აყალიბებენ მცენარეთა უნარს, რათა თავი გაართვან მათგან გამოწვეულ ქიმიურ სტრესებს. ასე მაგალითად, ცნობილია, რომ სარეველა ბალახების პოპულაციებში ამ ფერმენტული სისტემის აქტივაციის ზრდა ჰერბიციდებისადმი რეზისტენტობასთან კორელირებს [173]. სხვადასხვა ფაქტორის (სინათლის, მექანიკური დაზიანების, პათოგენის, ქსენობიოტიკის) გავლენით მცენარეულ უჯრედში ციტოქრომ P450-ის შერჩევითი ინდუცირების შესაძლებლობა საკმაოდ დეტალურადაა გადმოცემული დურსტისა და თანაავტორთა [174] ვრცელ პუბლიკაციაში. ამ მიმართულებით კვლევითი სამუშაოები ჩატარებულია ჩვენს ლაბორატორიაში თ. ვარაზაშვილის და თანაავტორების მიერ [175-177]; კერძოდ შესწავლილ იქნა მცენარის (სოიასა და სიმინდის) 5-6 დღიანი ნაზარდების ფესვების მიკროსომულ ფრაქციაში მონოოქსიგენაზური კომპლექსის კომპონენტთა ცვლილებები დაბალტემპერატურული სტრესისას, აგრეთვე სოკოთი (*Fusarium*) ინფიცირებისა და ქსენობიოტიკით (ნიტრობენზოლით) ზემოქმედების პირობებში. ეს უკანასკნელი შერჩეული იყო იმის გამო, რომ იგი ქიმიურად მდგრადია, არ ახასიათებს აუტოოქსიდაცია და ჰაერზე არ იჟანგება; გარდა ამისა მისი გარდაქმნა მხოლოდ ჰიდროქსილირებით შეიძლება წარიმართოს (ნიტრო-ჯგუფის ამინო-ჯგუფამდე აღდგენის ალტერნატიული გზა ანაერობულ პირობებს მოითხოვს და ამდენად

ცდების ვარიანტებში გამორიცხული იყო).

გამოკვლევებმა აჩვენეს, რომ დაბალტემპერატურული სტრესი მნიშვნელოვნად ზრდის მონოქსიგენაზის საწყისი კომპონენტის NADPH-ციტოქრომ P450-რედუქტაზას აქტივობას; პარალელურად კი ქვეითდება ციტოქრომ P450-ის კატალიზური აქტივობა. შექმნილ სიტუაციაში ელექტრონულ-მიკროსკოპული მეთოდით დარეგისტრირდა ენდოპლაზმური და მიტოქონდრიული მემბრანების გახშირებული კონტაქტები [176]. როგორც ცნობილია, ცხოველში ასეთი ანალოგიური სტრუქტურული რეორგანიზაციისას NADPH-ის აღმდგენელი ექვივალენტები ციტოქრომ P450-ის ნაცვლად მიტოქონდრიუმში გადაიტანება (ტრანსმემბრანული მიგრაცია), რის შედეგადაც ადგილი აქვს არაშეუღლებელი ჟანგვის სისტემების გააქტიურებას და ელექტრონთა ენერჯის თერმორეგულაციურ პროცესებში მოხმარებას [178].

სოკო ფუზარიუმით მცენარის ინფიცირებისას მიკროსომული მონოქსიგენაზა საპირისპირო და ამავე დროს, არაერთმნიშვნელოვან ცვლილებებს განიცდის: იზრდება ციტოქრომ P450-ის და მისი არააქტიური ფორმის ციტოქრომ P420-ის რაოდენობრივი შემცველობა; ანუ ციტოქრომ P450-ის ინდუქციას იმავდროულად თან ახლავს მისი P420-ად კონვერსია, ხოლო NADPH-ციტოქრომ P450-რედუქტაზას აქტივობა საგრძნობლად ითრგუნება. სოკოს ტოქსინისადმი ჰემოპროტეინისა და მისი შესაბამისი რედუქტაზას ასეთი განსხვავებული დამოკიდებულება ინფექციის მიმართ მათი განსხვავებული მგრძობიარობით შეიძლება იქნას ახსნილი.

ნიტრობენზოლის შემცველ ხსნარზე გაზრდილი მცენარის ფესვებში გამოვლინდა მონოქსიგენაზური სისტემის კომპონენტთა აქტივობების მნიშვნელოვანი ზრდა (ინდუქციის ეფექტი). გარდა ამისა ამ შემთხვევაშიც კონტაქტები ხშირდება ორ (მიტოქონდრიულ და მიკროსომულ) მემბრანას შორის (ნახ. 2.19). ეს იმის მაჩვენებელია, რომ ნიტრობენზოლის ჟანგვის გასაძლიერებლად (დასაჩქარებლად) უჯრედი ოპტიმალურ პირობებს ქმნის სუნთქვითი ჯაჭვიდან მიკროსომაზე აღმდგენელი ექვივალენტების ტრანსმემბრანული მიგრაციის უზრუნველსაყოფად (მიტოქონდრიული კონტროლის ფენომენი) [177, 179].



ნახ. 2.19. სიმინდის ფესვის კორტიკალურ უჯრედებში აღძრული ულტრასტრუქტურული ცვლილებები ნიტრობენზოლით ზემოქმედების შემდეგ. მიტოქონდრიები გარშემორტყულია ენდოპლაზმური მემბრანებით  $\times 36\ 000$  [177].

მიღებული ექსპერიმენტული მონაცემები საფუძველს გვაძლევს დავასკვნათ, რომ მცენარის ციტოქრომ P450-შემცველი მონოოქსიგენაზა აქტიურადაა ჩართული შექმნილი სტრესული სიტუაციების აღმოფხვრისა და მათ მიმართ აღძრული ადაპტური რეაქციების რეალიზაციაში.

## ლიტერატურა

1. Кретович, В.А. Биохимия растений. М., Высшая школа, 1980, 359
2. Кретович, В.Л., Мелик-Саркисян, С.С., Матус, В.К. Состав цитохромов клубеньков люпина желтого. Биохимия, 1972, 37, 711-719
3. Райхинштейн, М.В., Мелик-Саркисян, С.С., Арчаков, А.И., Кретович, В.Л. Спектральные свойства цитохрома P-450 из бактериоидов клубеньков люпина. ДАН СССР, 1974, 216, 1185-1187
4. Appleby, C.A. A soluble hemoprotein P-450 from nitrogen-fixed Rhizobium bacteroids. Biochem. Biophys. Acta, 1967, 142, 399-402
5. Appleby, C.A., Turner, G.L., Macnicol, P.C. Involvement of oxylewhemoglobin and cytochrome P-450 in an efficient oxidative phosphorylation pathway which support nitrogen fixation in Rhizobium. Biochem. Biophys. Acta, 1975, 387, 461-474
6. Hochstein, P., Ernster, L. Adp-activated lipid peroxidation coupled to the t<sub>pnh</sub> oxidase system of microsomes. Biochem. Biophys. Res. Commun., 1963, 12, 388-394
7. Hochstein, P., Nordenbrand, K., Ernster L. Evidence for the involvement of iron in the adp-activated peroxidation of lipids in microsomes and mitochondria. Biochem. Biophys. Res. Commun., 1964 14, 323-328
8. Orrenius, S., Berg, A., Ernster, L. Effects of trypsin on the electron transport systems of liver microsomes. Eur. J. Biochem., 1969, 11, 193-200
9. Ernster, L., Nordenbrand, K. Microsomal lipid peroxidation. Methods Enzymol. 1967, 10, 574-580
10. Ernster, L., Nordenbrand, K., Orrenius, S., Das, M.L. Microsomal lipid peroxidation. Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem., 1968, 349, 1604-1605
11. Арчаков, А.И., Панченко, Л.Ф., Карузина, И.И., Александрова, Т.А. О локализации N- и С-окисления жирных кислот в НАДФ-Н<sub>2</sub>-оксигеназной системе микросом. ДАН СССР, 1969, 187, 1415-1418
12. Курашвили, Л.К., Гордезиани, М.Ш. Перекисное окисление мембранных липидов и реакция N-деметилирования диметиланилина в растительных микросомах. Сообщ. АН ГССР, 1990, 137, 397-400
13. Погосян, Г.Г., Налбандян, Р.М., Ингибирование липидной пероксидации супероксиддисмутазой и церулоплазмином. Биохимия, 1983, 48, 1129-1134
14. Каган, В.Е., Сербинова, Е.А., Савов, В.М., Новиков, К.Н., Осипов, А.Н., Зубарев, В.Е., Азизова, О.А. Изучение механизма иницирования ферментативного NADPH-зависимого перекисного окисления липидов в мембранах эндоплазматического ретикула. Биохимия, 1985, 50, 986-991

15. Васильев, Р.Ф., Вичутинский, А.А. Хемилюминесцентный метод измерения соотношении элементарных констант в реакциях жидкофазного окисления углеводов. ДАН СССР, 1962, 145, 1301-1304
16. Васильев, Р.Ф., Вичутинский, А.А. О природе связи хемилюминесценции и окисления молекулярным кислородом. ДАН СССР, 1962, 142, 615-618
17. Владимиров, Ю.А., Сулова, Т.Б., Оленев, В.И., Черемисина, З.П. Хемилюминесценция сопряженная с образованием липидных перекисей в митохондриях. «Митохондрии: биологические функции в системе клеточных органелл». М., Наука, 1969, 203-207
18. Владимиров, Ю.А., Сулова, Т.Б., Оленев, В.И., Черемисина, З.П. Хемилюминесценция сопряженная с образованием липидных перекисей в биологических мембранах. IV. Роль измерения валентности железа в этих процессах. Биофизика, 1970, 15, 622-628
19. Владимиров, Ю.А., Арчаков, А.И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. М., Наука, 1972, 252
20. Арчаков, А.И. Микросомальное окисление. М., Наука, 1975, 327
21. Дмитриев, Л.Ф., Белевич, Н.П., Давлетшина, Л.Н., Иванов, И.И. Взаимосвязь участия свободнорадикального липидного интермедиата в гидроксилировании полициклических углеводов. Биохимия, 1983, 42, 2041-2048
22. Ellin, A., Jakobsson, S.V., Schenkman, J.B., Orrenius, S. Cytochrome P 450K of rat kidney cortex microsomes: its involvement in fatty acid  $\omega$ - and ( $\omega$ -1)-hydroxylation. Arch. Biochem. Biophys., 1972, 150, 64-71
23. Погосян, С.И., Цеденбал, З., Мерзляк, М.Н., Шевченко, Н.В. Стимулируемое восстановленными пиридиннуклеотидами перекисное окисление липидов микросом растений. Физиол. растений, 1981, 28, 286-293
24. Beloff-Chain, A., Catanzaro, R., Serlupi-Crescenzi, G. Oxidation of Reduced Nicotinamide-Adenine Dinucleotide Phosphate in Rat Liver Microsomes Nature, 1963, 198, 351- 354
25. Beloff-Chain, A., Serlupi-Crescenzi, G., Catanzaro, R., Venettacci, D., Balliano, M. Influence of iron on oxidation of reduced nicotinamide-adenine-dinucleotide phosphate in rat-liver microsomes. Biochim. Biophys. Acta, 1965, 97, 416-421
26. Orrenius, S., Dallner, G., Ernster, L. Inhibition of the TPNH-linked lipid peroxidation of liver microsomes by drugs undergoing oxidative demethylation. Biochem. Biophys. Res. Commun., 1964, 14, 329-334
27. Черемисина, З.П., Оленев, В.И., Владимиров, Ю.А. Биофизика, 1972, 17, 605-610
28. Bidlack, W.R., Tappel, A.L. A proposed mechanism for the TPNH enzymatic



- lipid peroxidizing system of rat liver microsomes. *Lipids*, 1972, 7, 564-565
29. Högberg, J., Bergstrand, A., Jakobsson, S.V. Lipid Peroxidation of Rat-Liver Microsomes. *Eur. J. Biochem.*, 1973, 37, 51-59
  30. May, H.E., McCay, P.B. Reduced triphosphopyridine nucleotide oxidase-catalyzed alterations of membrane phospholipids. II. Enzymic properties and stoichiometry. *J. Biol. Chem.*, 1968, 243, 2296-2305
  31. McCay, P.B., Poyer, J.L., Pfeifer, P.M., May, H.E., Gilliam, J.M. A function for alpha-tocopherol: stabilization of the microsomal membrane from radical attack during TPNH-dependent oxidations. *Lipids*, 1971, 6, 297-306
  32. Barber, A.A., Bernheim, F. In: *Adv. Gerontol. Research*. N.Y. London, Acad. Press, 1967, 355-403
  33. May, H.E., McCay, P.B. Reduced triphosphopyridine nucleotide oxidase-catalyzed alterations of membrane phospholipids. I. Nature of the lipid alterations. *J. Biol. Chem.*, 1968, 243, 2288-2295
  34. May, H.E., Poyer, J.L., McCay, P.B. lipid alterations occurring in microsomes during the enzymic oxidation of TPNH. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1965, 19, 166-170
  35. Dillard, C.J., Tappel, A.L. Fluorescent products of lipid peroxidation of mitochondria and microsomes. *Lipids*, 1971, 6, 715-721
  36. Fletcher, B.L., Dillard, C.J., Tappel, A.L. Measurement of fluorescent lipid peroxidation products in biological systems and tissues. *Anal. Biochem.*, 1973, 52, 1-9
  37. Arstila, A.U., Smith, M.A., Trump, B.F. Microsomal lipid peroxidation: morphological characterization. *Science*, 1972, 175, 530-533
  38. Tam, B.K., McCay, P.B. Reduced triphosphopyridine nucleotide oxidase-catalyzed alterations of membrane phospholipids. 3. Transient formation of phospholipid peroxides. *J. Biol. Chem.*, 1970, 245, 2295-2300
  39. Kolattukudy, P.E. In: *Lipids- and lipid polymers in higher plants*. Springer-Verlag. Berlin, Heidelberg, New-York, 1977, 271-292
  40. Salaün, J.-P., Benveniste, I., Reichhart, D., Durst, F. A microsome (cytochrome P-450)-linked lauric acid-monooxygenase from aged Jerusalem-artichoke-tuber tissues. *Eur. J. Biochem.*, 1978, 90, 155-159
  41. Durst, F. Physiology and biochemistry of plant cytochrome P-450. In *Frontiers in Biotransformation* (Ruckpaul, K., ed.), vol. 4, Berlin, Akademie Verlag, 1991, 191-232
  42. Pinot, F., Salaün, J.-P., Bosch, H., Lesot, A., Mioskowski, C., Durst, F.  $\omega$ -Hydroxylation of 9-octadenoic z-9,10-epoxystearic and 9,10-dihydroxystearic acids by microsomal cytochrome P-450 system from *Vicia sativa*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1992, 184, 183-193
  43. Pinot, F., Alayrac, C., Mioskowski, C., Durst, F., Salaün, J.-P. New cytochrome P-450-dependent reactions from wheat: Terminal and sub-terminal hydroxylase

- of oleic acid by microsomes from naphthalic acid anhydride and phenobarbital induced wheat seedlings. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1994, 198, 795-803
44. Salaün, J.-P., Benveniste, I., Reichhart, D., Durst, F. Induction and specificity of a cytochrome P-450 dependent laurate in-chain hydroxylase from higher plant microsomes. *Eur. J. Biochem.*, 1981, 119, 651-655
  45. Werck-Reichhart, D., Salaün, J.-P., Durst, F., Pflieger, P., Mioskowski, C. Regioselectivity of a plant lauric acid omega hydroxylase. Omega hydroxylation of cis- and trans- unsaturated lauric acid analogs and epoxygenation of terminal olefin by plant cytochrome P-450. *Biochem. Biophys. Acta.*, 1124, 1992, 135-142
  46. Oldham, M.L., Brash, A.R., Newcomer, M.E. The structure of coral allene oxide synthase reveals a catalase adapted for metabolism of a fatty acid hydroperoxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2005, 102, 297-302
  47. Chapple, C. Molecular-genetic analysis of plant cytochrome P450-dependent monooxygenases. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 1998, 49, 311-343
  48. Norton, G., Pappusamy, A., Yosuf, F., Pujade-Renaud, V., Perkins, M., Griffiths, D., Jones, H. Characterization of recombinant *Hevea brasiliensis* allene oxide synthase: effects of cyclooxygenase inhibitors, lipoxygenase inhibitors and salicylates on enzyme activity. *Plant Physiol. Biochem.*, 2007, 45, 129-138
  49. Creelman, R.A., Mullet, J.E. Jasmonic acid distribution and action in plants: Regulation during development and response to biotic and abiotic stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1995, 92, 4114-4119
  50. Kessler, A., Halitschke, R., Baldwin, I.T. Silencing the jasmonate cascade: induced plant defenses and insect populations. *Science*, 2004, 305 (5684), 665-668
  51. Xu, Y., Ishida, H., Reisen, D., Hanson, M.R. Upregulation of a tonoplast-localized cytochrome P450 during petal senescence in *Petunia inflata*. *BMC Plant Biol.*, 2006, 13, 6-8
  52. Von Wachefeldt, C., Jonhson, E.F. Structures of eukariotic cytochrome P450 enzymes, 1995, 108, 183-223
  53. Song, W.-C, Funk, C.D., Brash, A.R. Molecular cloning of an allene oxide synthase: a cytochrome P450 specialized for the metabolism of fatty acid hydroperoxides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, 90, 8519-8523
  54. Hughes, R.K., Belfield E.J., Casey, R. CYP74C3 and CYP74A1, plant cytochrome P450 enzymes whose activity is regulated by detergent micelle association, and proposed new rules for classification of CYP74 enzymes. 2006, 34, 1123-1227
  55. Brash, A.R., Song, W.-Ch. Allene oxide synthesis: Novel reaction of cytochrome P-450. *J. Basic and Clin. Physiol. and Pharmacol.*, 1992, 3, 52-53
  56. Гагнидзе, Л.П., Миминошвили, Т.В., Арзиани, Б.А., Ломидзе, Э.П. Окисление арахидоновой кислоты липоксигеназой гороха. Тр. 6-ой междуниверситетской конф. "Биологические мембраны в норме и патологии",

- Тбилиси, 1989, 29-30
57. Russel, D.W. The metabolism of aromatic compounds in higher plants. *J. Biol. Chem.*, 1971, 246, 3870-3878
  58. Benveniste, I., Salaün, J.-P., Durst, F. Phytochrome mediated regulation of a monooxygenase hydroxylating cinnamic acid in etiolated pea seedlings. *Phytochemistry*, 1978, 17, 359-363
  59. Billett, E.E., Wallace, W., Smith, H. A specific and reversible macromolecular inhibitor of phenylalanine ammonia-lyase and cinnamic acid-4-hydroxylase in gherkins. *Biochim. Biophys. Acta*, 1978, 524, 219-230
  60. Запрометов, М.Н., Ермакова, С.А. Система цитохрома P-450 в этиолированных проростках ячменя и ее участие в биосинтезе фенольных соединений. *Физиол. растений*, 1989, 36, 1146-1154
  61. Rich, P.R., Lamb, Ch.J. Biophysical and enzymological studies upon the interaction of trans-cinnamic acid with higher plant microsomal cytochromes P-450. *Eur. J. Biochem.*, 1977, 72, 353-360
  62. Stafford, H.A. Transformations of a Large Aggregate of Hydroxycinnamate Hydroxylase to Lower Molecular Weight Forms by Sulfhydryl Agents in Green Leaves of Sorghum. *Plant Physiol.* 1975, 55, 145-149
  63. Stafford, H.A. Changes in phenolic compounds and related enzymes in young plants of sorghum. *Phytochemistry*, 1969, 8, 743-752
  64. Saunders, J.A., Conn, E.E., Lin, C.H., Shimada, M. Localization of cinnamic acid 4-monooxygenase and the membrane-bound enzyme system for dhurrin biosynthesis in sorghum seedlings. *Plant Physiol.*, 1977, 60, 629-634
  65. Büche, T., Sandermann, H.Jr. Lipid dependence of plant microsomal cinnamic acid 4-hydroxylase. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1973, 158, 445-447
  66. Menting, J., Scopes, R.K., Stevenson, T.W. Characterization of flavonoid 3[prime],5[prime]-hydroxylase in microsomal membrane fraction of petunia hybrida flowers. *Plant Physiol.* 1994, 106, 633-642
  67. Stotz, G., Forkmann, G. Hydroxylation of the B-ring of flavonoids in the 3'- and 5'-position with enzyme extracts from flower of *Verbana hybrida*. *Z. naturforsch. Teil C*, 1981, 37, 19-23
  68. Holton, T.A., Brugliera, F., Lester, D.R., Tanaka, Y., Hyland, C.D., Menting, J.G., Lu, C.Y., Farcy, E., Stevenson, T.W., Cornish, E.C. Cloning and expression of cytochrome P450 genes controlling flower colour. *Nature*. 1993, 366(6452), 276-279
  69. Holton, T.A. Modification of flower colour via manipulation of P450 gene expression in transgenic plants. *Drug Metabol. Drug Interact.*, 1995, 12, 359-368
  70. Ричардс, Дж. Биогенез алкалоидов. в кн: Биохимия растений (под ред. В.Л. Креговича), М., Мир, 1968, 311-328
  71. Орехов, А.П. Химия алкалоидов. М., АН СССР, 1955, 566, 814
  72. Ambike, S.H., Baxter, R.M. Cytochrome P-450 and alkaloid synthesis in clavi-

- ceps purpurea. J. Pharm. Sci., 1970, 59, 1149-1152
73. Ambike, S.H., Baxter, R.M., Zahid, N.D. The relationship of cytochrome P-450 levels and alkaloid synthesis in *claviceps purpurea*. *Phytochemistry*, 1970, 39, 1953-1958
  74. Meehan, T.B., Coscia, C.J. Hydroxylation of geraniol by a monooxygenase from *Vinca rosea*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1973, 53, 1043-1048
  75. Madyastha, K.M., Meehan, T.D, Coscia, C.J. Characterization of a cytochrome P-450-dependent monoterpene hydroxylase from the higher plant *Vinca rosea*. *Biochem. J.*, 1976, 15, 1097-1102
  76. Chadha, A., Madyastha, K.M. Metabolism of geraniol and linalool in the rat and effects on liver and lung microsomal enzymes. *Xenobiotica*, 1984, 14, 365-374.
  77. Meehan, T.D., Coscia, C.J. Hydroxylation of geraniol and nerol by a monooxygenase from *Vinca rosea*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1973, 53, 1043-1048
  78. McFarlane, J., Madyastha, K.M., Coscia, C.J. Regulation of secondary metabolism in higher plants. Effect of alkaloids on a cytochrome P-450 dependent monooxygenase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1975, 66, 1263-1269
  79. Cassels, B.K., Breitmaier, E., Zenk, M.H. Bisbenzylisoquinoline alkaloids in *Berberis* cultures. *Phytochemistry*, 1987, 26, 1005-1008.
  80. Муромцев, Г.С., Агнестикова, В.Н. Гиббереллины. М., Наука, 1984
  81. Dennis, D.T., West, Ch.A. Biosynthesis of gibberellins. III. The conversion of (-)-kaurene to (-)-kauren-19-oic acid in endosperm of *Echinocystis macrocarpa* greene. *J. Biol. Chem.*, 1967, 242, 3293-3300
  82. Graebe, J.E. The enzymatic preparation of 14C-kaurene. *Planta*, 1969, 85, 171-174
  83. Graebe, J.E. Gibberellin Biosynthesis and Control. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 1987, 38, 419-465
  84. Hedden, P., Kamiya, Y. Gibberellin biosynthesis: enzymes, genes and their regulation *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 1997, 48, 431-460
  85. Graebe, J.E. Biosynthesis of kaurene, squalene and phytoene from mevalonate-2-14C in a cell-free system from pea fruits. *Phytochemistry*, 1968, 7, 2003-2020
  86. Hasson, E.P., West, Ch.A. Properties of the system for the mixed function oxidation of kaurene and kaurene derivatives in microsomes of the immature seed of *Marah macrocarpus*. *Plant Physiol.*, 1976, 58, 473-478
  87. Hasson, E.P., West, Ch.A. Properties of the system for the mixed function oxidation of kaurene and kaurene derivatives in microsomes of the immature seed of *Marah macrocarpus*. *Plant Physiol.*, 1976, 58, 479-484
  88. Thomas, C., Moore, Susan, A., Barlow, Ronald, C. Coolbaugh. Participation of noncatalytic 'carrier' protein in the metabolism of kaurene in cell-free extracts of pea seeds. *Phytochemistry*, 1972, 11, 3225-3233
  89. Murphy, P.J., West, Ch.A. The role of mixed function oxidases in kaurene metabolism in *Echinocystis macrocarpa* green endosperm. *Arch. Biochem. Biophys.*,

- 1969, 133, 395-407
90. Schleyer, H., Cooper, D.Y., Rosenthal, O. The heme protein P-450 in steroid hydroxylation. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1973, 222, 102-117
  91. Hamberg, M., Samuelsson, B. In: *Molecular mechanisms of oxygen activation* (O.Hayashi, ed.) N.Y. London, Acad.Press, 1974, 58-76
  92. Schleyer, H., Cooper, D.Y., Rosenthal, O. Cheung P. *Croatica Chem. Acta*, 1977, 49, 179-206
  93. Honeck, H. The mixed function monooxygenase systems of the adrenal cortex. *Pharmazie*. 1978, 33, 317-321
  94. Akhrem, A.A., Lapko, V.N., Lapko, A.G., Shkumatov, V.M., Chashchin, V.L. Isolation, structural organization and mechanism of action of mitochondrial steroid hydroxylating systems. *Acta Biol. Med. Ger.*, 1979, 38, 257-273
  95. Akhrem, A.A., Vasilevskii, V.I., Adamovich, T.B., Lapko, A.G., Shkumatov, V.M., Chashchin, V.L. Differences in the structural organization of cytochrome P-450 from bovine adrenal cortex mitochondria and their orientation in the mitochondrial membrane. In: *Biochemistry, Biophysics and regulation of cytochrome P-450* (J.A. Gustafsson ed.) Amsterdam, Elsevier, 1980, 57-64
  96. Myant, N.B., Mitropoulos, K.A. Cholesterol 7 alpha-hydroxylase. *J. Lipid Res.*, 1977, 18, 135-153
  97. Rydström, J., Gustafsson, J.A., Ingelman-Sundberg, M., Montelius, J., Ernster, L. The topology of the mitochondrial 11beta-hydroxylase system in bovine adrenal cortex. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1976, 73, 555-561
  98. Метелица, Д.И. Активация кислорода ферментными системами. М., Наука, 1982, 249
  99. Katagiri, M., Takemori, S., Itagaki, E., Sahara, K., Gomi, T., Sato, H., In: *Iron copper proteins* (K.T. Yashunobu, H.F. Mower O.Hayashi, eds.). N.Y. London, Plenum.Press, 1976, 1509-1512
  100. Ахрем, А.А., Шкуматов, В.Л., Чашин, В.Л. *ДАН СССР*, 1977, 237, 1509-1512
  101. Dus, K.M. In: *Biochemistry, Biophysics and Regulation of Cytochrome P-450*. (J.A. Gustafsson ed.) Amsterdam, Elsevier, 1980, 129-132
  102. Shikita, M., Hall, P.F. Cytochrome P-450 from bovine adrenocortical mitochondria: an enzyme for the side chain cleavage of cholesterol. I. Purification and properties. *J. Biol. Chem.*, 1973, 248, 5598-5604
  103. Cooper, D.Y., Narasimhulu, S., Slade, A., Raich, W., Foroff, O., Rosenthal, O. Hemoprotein content and activity of solubilized steroid 11 beta-hydroxylase preparations from adrenocortical mitochondria. *Life Sci.*, 1965, 4, 2109-2114
  104. Jefcoate, C.R., Simpson, E.R., Boyd, G.S. Spectral properties of rat adrenal-mitochondrial cytochrome P-450. *Eur. J. Biochem.*, 1974, 42, 539-551
  105. Light, D.R., Orme-Johnson, N.R. Beef adrenal cortical cytochrome P-450 which catalyzes the conversion of cholesterol to pregnenolone. *Oxidation-reduction po-*

- tentials of the free, steroid-complexed, and adrenodoxin-complexed P-450. *J. Biol. Chem.*, 1981, 256, 343-350
106. Gunsalus, I.C., Lipscomb, J.D. In: *Molecular basis of electron transport* (Schulz, J, B.F. Cameron, eds.). 1972, pp. 179-196, Academic Press, New York
  107. Schleyer, H., Cooper, D.Y., Rosenthal, O. In: *Oxidases and related redox systems* (King, T.E., Mason, H.S., Morrison E.M., eds.). 1973, pp. 469-484, Univ. Park Press. Baltimore
  108. Katagiri, M., Takikawa, O., Sato, H., Suhara, K. Formation of a cytochrome P-450<sub>scc</sub>-adrenodoxin complex. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1977, 77, 804-809
  109. Tanaka, M., Haniu, M., Yasunobu, K.T., Kimura, T. The amino acid sequence of bovine adrenodoxin. *J Biol. Chem.*, 1973 Feb 25;248(4):1141-57
  110. Rieske, J.S., MacLennan, D.H., Coleman, R. Isolation and properties of an iron-protein from the (reduced coenzyme Q)-cytochrome C reductase complex of the respiratory chain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, Volume Issue 4, 6 April 1964, 15, Pages 338-344
  111. Hardy, R.W., Knight, E.Jr., D'Eustachio, A.J. An energy-dependent hydrogen-evolution from dithionite in nitrogen-fixing extracts of *Clostridium pasteurianum*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1965, 20, 539-544
  112. Shethna, Y.I., DerVartanian, D.V., Beinert, H. Non heme (iron-sulfur) proteins of *Azotobacter vinelandii*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1968, Jun 28;31(6):862-8
  113. Schleyer, H., Cooper, D.Y., Levin, S.S., Rosenthal O. In: *Biological hydroxylation mechanisms*. (Boyd, G.S., Smellic, R.M.S., eds.). 1972, pp. 187-206, Acad. Press, N.Y
  114. Lambeth, J.D., Kamin, H. Adrenodoxin reductase. Properties of the complexes of reduced enzyme with NADP<sup>+</sup> and NADPH. *J. Biol. Chem.*, 1976, 251, 4299-4306
  115. Lambeth, J.D., Seybert, D.W., Kamin, H. Adrenodoxin reductase . adrenodoxin complex. Rapid formation and breakdown of the complex and a slow conformational change in the flavoprotein. *J. Biol. Chem.*, 1980, 255, 4667-4672
  116. Lambeth, J.D., Seybert, D.W., Kamin, H. Ionic effects on adrenal steroidogenic electron transport. The role of adrenodoxin as an electron shuttle. *J. Biol. Chem.*, 1979, 254, 7255-7264
  117. Seybert, D.W., Lancaster, J.R. Jr., Lambeth, J.D., Kamin, H. Participation of the membrane in the side chain cleavage of cholesterol. Reconstitution of cytochrome P-450<sub>scc</sub> into phospholipid vesicles. *J. Biol. Chem.*, 1979, 254, 12088-12098
  118. Hanukoglu, I., Jefcoate, C.R. Mitochondrial cytochrome P-450<sub>sec</sub>. Mechanism of electron transport by adrenodoxin. *J. Biol. Chem.*, 1980, 255, 3057-3061
  119. Chu, J.W., Kimura, T. Studies on adrenal steroid hydroxylases. Complex forma-

- tion of the hydroxylase components. *J. Biol. Chem.*, 1973, 248, 5183-5187
120. Lambeth, J.D., Kamin, H. Adrenodoxin reductase and adrenodoxin. Mechanisms of reduction of ferricyanide and cytochrome c. *J. Biol. Chem.*, 1977, 252, 2908-2917
  121. Hanukoglu, I., Spitsberg, V., Bumpus, J.A., Dus, K.M., Jefcoate, C.R. Adrenal mitochondrial cytochrome P-450<sub>scc</sub>. Cholesterol and adrenodoxin interactions at equilibrium and during turnover. *J. Biol. Chem.*, 1981, 256, 4321-4328
  122. Kido, T., Kimura, T. The formation of binary and ternary complexes of cytochrome P-450<sub>scc</sub> with adrenodoxin and adrenodoxin reductase. adrenodoxin complex. The implication in ACTH function. *J. Biol. Chem.*, 1979, 254, 11806-11815
  123. Ахрем, А.А., Шкуматов, В.Л., Чашин, В.Л. Биорганическая химия, 1978, 4, 688-693
  124. Ахрем, А.А., Марцев, С.П., Шкуматов, В.Л., Чашин, В.Л. Биорганическая химия, 1979, 5, 937-939
  125. Ueda, T., Coon, M.J. Enzymatic oxidation. VII. Reduced diphosphopyridine nucleotide-rubredoxin reductase: properties and function as an electron carrier in hydroxylation. *J. Biol. Chem.*, 1972, 247, 5010-5016
  126. Foust, G.P., Mayhew, S.G., Massey, V. Complex formation between ferredoxin triphosphopyridine nucleotide reductase and electron transfer proteins. *J. Biol. Chem.*, 1969, 244, 964-970
  127. Биохимия гормонов и гормональной регуляции. Под ред. Н.Аю Юдина. М., Наука, 1976, 171-189
  128. Morisaki, M., Bannai, K., Ikekawa, N., Shikita, M. Cholesterol 20, 22-epoxides: no conversion to pregnenolone by adrenal cytochrome P-450<sub>SCC</sub>. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1976, 69, 481-488
  129. Van Lier, J.E., Rousseau, J. Mechanism of cholesterol side-chain cleavage: enzymic rearrangement of 20 $\beta$ -hydroperoxy-20-isocholesterol to 20 $\beta$ ,21-dihydroxy-20-isocholesterol. *FEBS Lett.*, 1976, 70, 23-27.
  130. Duque, C., Morisaki, M., Ikekawa, N., Shikita, M. The enzyme activity of bovine adrenocortical cytochrome P-450 producing pregnenolone from cholesterol: kinetic and electrophoretic studies on the reactivity of hydroxycholesterol intermediates. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1978, 82, 179-187
  131. Morisaki, M., Sato, S., Ikekawa, N., Shikita, M. Stereochemical specificity at carbon-20 and -22 of hydroxylated cholesterols for side-chain cleavage by adrenocortical cytochrome P-450<sub>scc</sub>. *FEBS Lett.*, 1976, 72, 337-340
  132. Hall, P.F. In: Iron copper proteins (K.T. Yashunobu, H.F. Mower, O. Hayachi, eds.). N.Y. London, Plenum.Press, 1976, 303-313
  133. Kraaiipoel, R.J., Degenhart, H.J., Leferink, J.G., Van Beek, V., De Leeuw-Boon, H., Visser, H.K. Pregnenolone formation from cholesterol in bovine adrenal cortex mitochondria: proposal of a new mechanism. *FEBS Lett.*, 1975, 50, 204-209

134. Kraaiipoel, R.J., Degenhart, H.J., van Beek, V., de Leeuw-Boon, H., Abeln, G., Visser, H.K., Leferink, J.G. Evidence for 20, 22-epoxycholesterol as an intermediate in side-chain cleavage of 22-R-OH cholesterol by adrenal cortex mitochondria. *FEBS Lett.*, 1975, 54, 172-179
135. Jefcoate, C.R. Cytochrome P-450 of adrenal mitochondria. Steroid binding sites on two distinguishable forms of rat adrenal mitochondrial cytochrome P-450sec. *J. Biol. Chem.*, 1977, 252, 8788-8796
136. Замбахидзе, Н.Е., Дурмишидзе, С.В. Стерины плодов и масла шелковицы. *Сообщ. АН ГССР*, 1981, 102, 169-172
137. Замбахидзе, Н.Е. Динамика стероидов в листьях шелковицы в вегетационном периоде. *Физиол. и биох. культ. растений*, 1980, 12, 420-423
138. Замбахидзе, Н.Е., Мусеридзе, Т.Т., Амашукели, Н.Д. Стерины кожуры и мякоти плодов лимона сорта Диоскурия. *Физиол. и биох. культ. растений*, 1989, 20, 590-593
139. Bae, M., Mercer, E.I. The effect of long- and short-day photoperiods on the sterol levels in the leaves of solanum andigena. *Phytochemistry*, 1970, 9, 63-68
140. Cowley, P.S., Evans, F.J., Ginman, R.F. Simultaneous spectrometric determination of 5-ene and 7-ene sterols from the leaves and seeds of *Digitalis purpurea* L. *Planta Med.*, 1971, 19, 249-257
141. Гордезиани, М.Ш., Бобохидзе, Е.А. Изменение количественного соотношения процессов этерификации и окислительных превращений холестерина в листьях растений. *Сообщ. АН ГССР*, 1978, 92, 449-452
142. მ. გორდეზიანი, გ. საბუხაშვილი. მემბრანული ქსენობიოქიმიის თბილისი, აგრობიოქიმიის, 2005, 281
143. Дурмишидзе, С.В. Расщепление ароматического кольца некоторых экзогенных соединений в растении. Тбилиси, Мецниереба, 1975, 50
144. Дурмишидзе, С.В., Бериашвили, Т.В. Окислительное расщепление кольца – А холестерина растительными тканями в стерильных условиях. *ДАН СССР*, 1975, 220, 729-732
145. Davis, W.W., Garren, L.D. On the mechanism of action of adrenocorticotrophic hormone. The inhibitory site of cycloheximide in the pathway of steroid biosynthesis. *J. Biol. Chem.*, 1968, 243, 5153-5157
146. Davis, W.W., Garren, L.D. Evidence for the stimulation by adenocorticotrophic hormone of the conversion of cholesterol esters to cholesterol in the adrenal, *in vivo*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1966, 22, 805-810
147. Garren, L.D., Gill, G.N., Masui, H., Walton, G.M. On the mechanism of action of ACTH. *Recent Prog. Horm. Res.*, 1971, 27, 433-478
148. Trzeciak, W.H., Boyd, G.S. The effect of stress induced by ether anaesthesia on cholesterol content and cholesteryl-esterase activity in rat-adrenal cortex. *Eur. J. Biochem.*, 1973, 37, 327-333
149. Boyd, G.S., Trzeciak, W.H. Cholesterol metabolism in the adrenal cortex: stu-



- dies on the mode of action of ACTH. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1973, 212, 361-377
150. Гордезиани, М.Ш., Дурмишидзе, С.В., Бобохидзе, Е.А. Об окислении холестерина в растительной клетке. *Известия АН Грузии, серия биологическая*, 1979, 5, 149-155
  151. Atkinson, D.E. Citrate cycle in the regulation of energy metabolism. In: *Metabolic roles of citrate*. NY London, Acad. Press., 1968, 23
  152. Atkinson, D.E., Walton, G.M. Adenosine triphosphate conservation in metabolic regulation. Rat liver citrate cleavage enzyme. *J. Biol. Chem.*, 1967, 242, 3239-3241
  153. Haddock, B.A., Garland, P.B. Effect of sulphate-limited growth on mitochondrial electron transfer and energy conservation between reduced nicotinamide-adenine dinucleotide and the cytochromes in *Torulopsis utilis*. *Biochem. J.*, 1971, 124, 155-170
  154. Ковалев, И.Е. Иммуниет как функция системы организма, инактивирующей чужеродные химические соединения. *Химич. фармацевт. Журн.*, 1977, 12, 3-14
  155. Деннис, В. Парк. Биохимия чужеродных соединений. М., Медицина, 1973, 140-141
  156. Cannon, W. *The wisdom of the body*. L., 1932, 321
  157. Арчаков, А.И., Карузина, И.И., Менгазетдинов, Д.Е., Ковалев И.Е., Асташина, Н.В., Полевая, О.Ю., Данилова, Н.П. Индукция свободным и ковалентно связанным с альбумином фенобарбиталом цитохрома Р-450 и иммунного ответа. *Бюлл. экспер. биол. и мед.*, 1980, 3, 323-324
  158. Ковалев, И.Е., Полевая, О.Ю. Биохимические основы иммунитета к низкомолекулярным химическим соединениям. 1985, М., Наука, 1985, 303
  159. Testa, R., Jenner, P. Inhibitors of cytochrome P-450 and their metabolism of action. *Drug Metab. Revs.* 1981, 12, 1-117
  160. Karuzina, I.I., Archakov, A.I. The oxidative inactivation of cytochrome P-450 in monoxygenase reactions. *Free Radic. Biol. Med.*, 1993, 16, 73-97
  161. Pessayre, D., Wandscheer, J.C., Descatoire, V., Dolder, A., Degott, C., Benhamou, J.P. Cumulative effects of repeated doses of compounds transformed into reactive metabolites. *Biochem. Pharmacol.*, 1980, 29, 1041-1047
  162. Подымов, В.К., Пирузян, Л.А., Гладких, С.П., Кац, М.М., Нижний, С.В. Простагландины, стероиды и рецепция. *Изв. АН СССР, сер. биол.*, 1980, 1, 27-44
  163. Подымов, В.К. Общие принципы молекулярной рецепторологии. *Изв. АН СССР, сер. биол.*, 1980, 6, 831-835
  164. Вавылов, Н.И. Иммуниет растений к инфекционным заболеваниям. М., Наука, 1986
  165. Ярошенко, Т.В. Краткий курс иммунитета растений к инфекционным заболеваниям. Изд Харьковского Государственного университета, 1988

166. Курсанова, Т.А. Развитие представлений о природе иммунитета растений. М., Наука, 1988
167. Foyer, C.H., Descourvieres, P. Kunert. Protection against oxygen radicals: an important defense mechanism studied in transgenic plants. *Plant Cell. Environ.*, 1994, 17, 507-523
168. Macek, T., Macková, M., Pavlíková, D., Száková, J., Truska, M., Singh-Cundy, A., Kotraba, P., Yancey, N., Scouten, W.H. Accumulation of cadmium by transgenic tobacco. *Acta Biotechnologica*, 2002, 22, 101–106
169. Hoffmann, A.A., Parsons, P.A. *Evolutionary genetics and Environmental stress*. Oxford University Press, Oxford, UK, 1991
170. Vicente, J.A.F., Santos, M.S., Vercesi, A.E., Madeira, V.M.C. Comparative effects of the herbicide dinitro-o-cresol on mitochondrial bioenergetics. *Pestic. Sci.*, 1998, 54, 43-51
171. Sandermann, H. Mutagenic activation of xenobiotics by plant enzymes. *Mutation Res.*, 1988, 197, 183-194
172. Sandermann, H. Higher plant metabolism of xenobiotics: the “green liver” concept. *Pharmacogenetics*, 1994, 4, 225-241
173. Werck-Reichhart, D., Hehn, A., Didierjean, L. Cytochromes P450 for engineering herbicide tolerance. *Trends Plant Sci.*, 2000, 5, 116-123
174. Durst, F., Benveniste, I., Lesot, A.A., Salaün, J.-P., Werck-Reichhart, D. Induction of plant cytochrome P-450. In: *Redulation of Enzymatic Systems Detoxifying Xenobiotics in Plants*, (Hatzios, K.K., ed.) Dordrecht/Boston/London, Kluwer Academic Publishers, 1997, 19-34
175. Gordeziani, M., Khatisashvili, G., Ananiashvili, T., Varazashvili, T., Kurashvili, M., Kvesitadze, G. Tkhelidze P. Energetic significance of plant monooxygenase individual components participating in xenobiotic degradation. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 1999, 44, 49-54
176. Варазашвили, Т.Г., Курашвили, М.В., Пруидзе, М.В., Гордзениани, М.Ш. Об участии монооксигеназной системы в процессах адаптации растений. *Известия Академии Наук Грузии, сер. биол.*, 2001, 27, 33-37
177. Varazashvili, T., Khatisashvili, G., Kurashvili, M., Pruidze, M., Ananiashvili, T., Zaalishvili, G., Gordeziani, M. Nitrobenzene oxidizing enzymes in plant cells. *Journal of Biological Physics and Chemistry*, 2001, 1, 85-88
178. Archakov, A.I., Karyakin, A.V. Intermembrane electron transfer in the absence of added watersoluble carriers. *Biochem.Biophys.Acta*, 1975, 408, 93-100
179. Cinti, D.L., Ritchie, A., Schenckman, J.B. Hepatic organelle interaction. II. Tricarboxylic acid cycle components on N-demethylation and hydroxylation reactions in rat liver. *Molec. Pharmacol.*, 1972, 8, 339-344

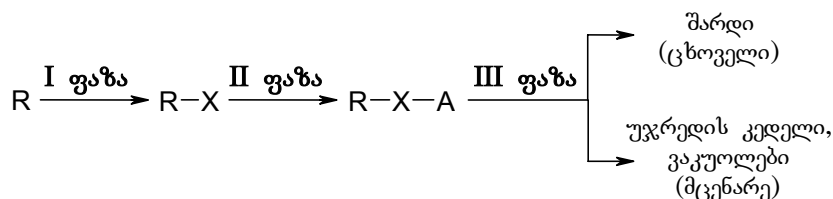
### თავი 3

#### ოქსიგენაზები ძსენობიოტიკების დეტოქსიკაციაში

##### 3.1 ციტოქრომ P450-ის როლი ქსენობიოტიკების მეტაბოლიზმში

წინა თავში აღვნიშნეთ, რომ ციტოქრომ P450-შემცველი მონოოქსიგენაზა ერთ-ერთ საკვანძო ფერმენტს წარმოადგენს მთელი რიგი მეორეული ნაერთების ბიოსინთეზებში. ასევე დიდია ფერმენტის მნიშვნელობა სხვადასხვა ქიმიური სტრუქტურის, ლიპოფილური ბუნების მქონე ორგანული ქსენობიოტიკების მეტაბოლიზმში [1]. შეიძლება განვაზოგადოთ, რომ ციტოქრომ P450-ის დანიშნულებაა ლიპოფილური ბუნების მქონე ორგანული ნაერთების მონოოქსიგენირება და ამ დროს მნიშვნელობა არა აქვს, სუბსტრატი ენდოგენური წარმოშობისა თუ ქსენობიოტიკია.

აქ საჭიროდ ვთვლით მოკლედ წარმოვადგინოთ ციტოქრომ P450-შემცველი მონოოქსიგენაზის როლი და ადგილი ქსენობიოტიკთა დეტოქსიკაციის პროცესში. მიღებულია, რომ ცხოველსა და მცენარეში შეღწეულმა ქსენობიოტიკმა სამი თანმიმდევრული ფაზა უნდა გაიაროს (ნახ. 3.1) [2-5]:



ნახ. 3.1. უჯრედში ქსენობიოტიკის გარდაქმნის სამი თანმიმდევრული ფაზა.

**პირველი ფაზა წარმოადგენს ფუნქციონალიზაციას**, ანუ ქსენობიოტიკის მოლეკულაში ახალი ფუნქციური ჯგუფის ფორმირებას. ქსენობიოტიკების უმრავლესობა არაპოლარული, წყალში მცირედ ხსნადი ნაერთებია და არ შეიცავს ისეთ ფუნქციურ ჯგუფებს, რომლებიც წყლოვან ფაზაში მოფუნქციონირე ფერმენტ-ოქსიდაზებისათვის ხელმისაწვდომი იქნებოდა. ამისათვის საჭიროა უცხო ნაერთის წინასწარი გააქტიურება პოლარული ფუნქციური ჯგუფის საშუალებით. ამ მიზანს ძირითადად მემბრანაში მიმდინარე ჟანგვა-აღდგენითი რეაქციები ემსახურება. მათი საშუალებით ხდება ქსენობიოტიკის მოლეკულაში ახალი ფუნქციური ჯგუფის (ჰიდროქსიდის, კარბოქსიდის, ეპოქსიდის და სხვ.) შეყვანა, ან არსებულის გართულება. ამ გზით ნივთიერების ქიმიური ინერტულობის დაძლევა ხდება და მიღებული პროდუქტების პოლარული ჯგუფი შემდგომი ფერმენტული გარდაქმნებისადმი გაცილებით ხელმისაწვდომია. I ფაზის შედეგად უცხო ნაერთის მოლეკულა ისეთ პირველად გარდაქმნებს განიცდის, რომ ის

შედარებით ადვილად „შეიცნოს“ ფერმენტმა. ფუნქციონალიზაციის ფაზას ახორციელებენ ოქსიგენაზები, რედუქტაზები, ესთერაზები, დეჰალოგენაზები და სხვა ფერმენტები. ზოგ შემთხვევაში კი ეს პროცესი მათი ურთიერთშე-  
ნაცვლებით მიმდინარეობს [6].

ფუნქციონალიზაციის ყველაზე გავრცელებული ფორმაა ჰიდროქსილი-  
რება. ეს რეაქცია უპირატესად ქსენობიოტიკის მოლეკულის C–H ბმის  
გაწყვეტით და ამ ატომებს შორის წინასწარ გააქტივებული ჟანგბადის  
ატომის ჩანერგვით ხორციელდება. პროცესი ცხოველში ძირითადად ღვიძლ-  
ში ხდება და ციტოქრომ P450-შემცველი მონოოქსიგენაზებით კატალიზ-  
დება. ამ მხრივ მცენარე უფრო ფართო არჩევანს აკეთებს და ჰიდროქსი-  
ლირებისათვის იგი ციტოქრომ P450-ის გარდა, პეროქსიდაზებსა და  
ფენოლოქსიდაზებსაც იყენებს. რეაქცია მაღალი აქტივაციის ენერგიას  
საჭიროებს და ამის გამო შენელებულად მიმდინარეობს. აქედან გამომ-  
დინარე, ქსენობიოტიკის სრული, მრავალსაფეხურიანი დეგრადაციის  
პროცესისათვის ფუნქციონალიზაცია სინჩარის მალიმიტირებელ სტადიას  
წარმოადგენს და ამდენად, უცხო ნაერთის გაუვნებლობის პროცესის  
რეგულაციაც სწორედ ამ სტადიაზე ხორციელდება.

**მეორე ფაზის – კონიუგაციის დროს** ახლად შექმნილი ფუნქციური  
ჯგუფის ხარჯზე გააქტიურებული ქსენობიოტიკი შიდაუჯვრედულ ნაერთებს  
უკავშირდება. ასეთი ნაერთები შეიძლება იყოს როგორც დაბალმოლეკუ-  
ლური – მონო-, დი- და ტრისაქარიდები (ხშირად გლუკოზა), ამინო-  
მჟავები, პეპტიდები (უპირატესად გლუტათიონი და ჰომოგლუტათიონი),  
ისე მაღალმოლეკულური – ცილები, პოლისაქარიდები (მაგ., ჰემიცელუ-  
ლოზა), ლიგნინი და სხვ. კონიუგაცია უჯრედისათვის იმიტომაც მოხერხე-  
ბული, რომ ქსენობიოტიკის კონიუგატს ნაწილობრივ ან სრულად აქვს  
დაკარგული ტოქსიკურობა, გააჩნია წყალში მაღალი ხსნადობა და  
შესაბამისად, ადვილდება უჯრედშიდა მისი გადაადგილება ან უჯრედიდან  
გამოსვლა [7]. კონიუგაციის ფაზა ერთნაირად დამახასიათებელია მცენარისა  
და ცხოველისათვის, თუმცა მცენარეში ეს ფაზა გაცილებით მოცულობითია  
იმ ბიოპოლიმერების მრავალგვარობის გამო, რომლებიც ქსენობიოტიკის  
ფუნქციონალიზებულ მეტაბოლიტს იკავშირებენ (ლიგნინი, ცელულოზა და  
ჰემიცელულოზა, სახამებელი, პექტინური ნაერთები, პოლიპეპტიდები და  
სხვ.) [8]. საყურადღებოა, რომ ამ ნაერთებთან ქსენობიოტიკის დაკავშირება  
შესაძლოა მოხდეს როგორც არსებულ ბიოპოლიმერთან უშუალო მიერ-  
თებით, ისე თანაპოლიმერიზაციით, ანუ იმ მონომერთან კონიუგაციით,  
რომლიდანაც შემდგომ ბიოპოლიმერი წარმოიქმნება. კონიუგაცია შესაბამისი  
ფერმენტებით (გლუტათიონ-S-ტრანსფერაზებით, გლუკოზილ-ტრანსფერა-  
ზებით, მალონილ-ტრანსფერაზებით და სხვ.) კატალიზდება.

**მესამე, ელიმინაციის ფაზაში** უჯრედი საბოლოოდ იცილებს ქსენობიოტიკს. ამდროს კონიუგირებული ქსენობიოტიკი უჯრედიდან გამოდის და ორგანიზმს ტოვებს (ცხოველის შემთხვევაში), ან გარკვეულ ნაკვეთურებში გროვდება (მცენარის შემთხვევაში) [9]. ამ ფაზაში მცენარესა და ცხოველს შორის არსებითი განსხვავებაა: ცხოველის ორგანიზმი სრულად გამოდევნის უცხო ნაერთს; ამ შესაძლებლობით შეზღუდული მცენარე კი კონიუგირებული ქსენობიოტიკის „დებონირებას“ ახდენს და მას ვაკუოლებში (თუ კონიუგატი ხსნადია) ან უჯრედშორის სივრცეში (თუ კონიუგატი უხსნადია) ინახავს [10-12]. მიუხედავად ასეთი განსხვავებისა, ელიმინაციის ფაზა მცენარესა და ცხოველში ერთნაირია როგორც მექანიზმით, ისე არსით: ორივე შემთხვევაში პროცესი წარიმართება ე.წ. ATP-ტრანსპორტერებით (მეორეული მეტაბოლიტების გადატანაში სპეციალიზებული ფერმენტებით) [13], და მისი დანიშნულებაა სასიცოცხლო პროცესებისაგან ტოქსიკური ნაერთის იზოლირება.

განხილული ფაზების ხანგრძლივობა მრავალ ფაქტორზეა დამოკიდებული, კერძოდ, ქსენობიოტიკის ქიმიურ ბუნებაზე, მის კონცენტრაციაზე და ზემოქმედების ხანგრძლივობაზე, მცენარის სახეობაზე, ზრდის პირობებზე, ტემპერატურაზე, ტენიანობაზე, განათებაზე და ა.შ. გარკვეულ პირობებში მცენარეული უჯრედი მასში შეღწეული ქსენობიოტიკის სრულ ასიმილაციას ახდენს. ასეთი ტიპის გარდაქმნები ძირითადად ჟანგვითია და მათ ერთობლიობას ქსენობიოტიკის ღრმა ჟანგვას, ანუ ჟანგვით დეგრადაციას ვუწოდებთ. ამ პროცესის შესახებ სადღეისოდ არსებული უმნიშვნელოვანესი მონაცემები შეიძლება შემდეგი დებულებების სახით განვაზოგადოთ [5]:

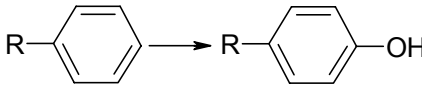
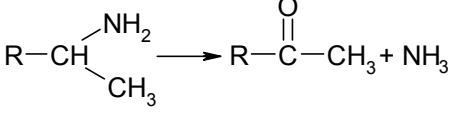
1. ორგანული ქსენობიოტიკის ჟანგვითი დეგრადაცია მნიშვნელოვანწილად უჯრედის ენდოპლაზმური რეტიკულუმის მემბრანებში (ენდოპლაზმური მემბრანებში) ხორციელდება;
2. ქსენობიოტიკთა გარდამქმნელ ფერმენტულ კასკადში ცენტრალური პოზიცია მემბრანასთან დაკავშირებულ მონოოქსიგენაზებს უკავიათ; ამ მულტიფერმენტულ სისტემასა და მემბრანულ სტრუქტურებს შორის არსებულ ცილა-ლიპიდური ბუნების ურთიერთქმედებას გადამწყვეტი როლი ენიჭება;
3. მემბრანული ლიპიდები განაპირობებენ მემბრანაში ქსენობიოტიკების შეღწევასა და ფერმენტებთან მათ დაკავშირებას;
4. ქსენობიოტიკთა ჟანგვის რეაქციების კინეტიკა ყველა იმ თავისებურებებს ემორჩილება, რომლებიც ორფაზიან (ლიპიდი-წყალი) სისტემაში მოქმედ ყველა ფერმენტს ახასიათებს;
5. მონოოქსიგენაზები, ერთი მხრივ, ფლობენ უაღრესად დაბალ სუბსტრატულ სპეციფიკურობას, მეორე მხრივ კი აუცილებლად საჭიროებენ

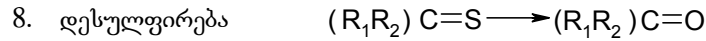
სუბსტრატის (ქსენობიოტიკის) მოლეკულაში არაპოლარული ჯგუფების შემცველობას.

უაღრესად მნიშვნელოვანია, რომ ზემოთ ჩამოთვლილი სუთივე დებულება თანაბრად ეხება როგორც მცენარეულ, ასევე ცხოველურ ორგანიზმებს.

### 3.2 ციტოქრომ P450-ის მიერ კატალიზებული რეაქციები

ბაქტერიულ, მცენარეულ და ცხოველურ უჯრედებში მიმდინარე რეაქციები, რომლებიც ენდოგენური ან ეგზოგენური სუბსტრატების გარდაქმნისას ციტოქრომ P450-ის მონაწილეობით კატალიზდება, 9 ტიპად იყოფა [1].

1. ალიფატური ჰიდროქსილირება  $R-CH_3 \longrightarrow R-CH_2OH$
2. ეპოქსილირება  $R-CH=CH-R \longrightarrow R-\overset{\text{O}}{\text{C}}H-CH-R$
3. არომატული ჰიდროქსილირება 
4. ჟანგვითი დეალკილირება:
  - N-დეალკილირება  $R-NH-CH_3 \longrightarrow R-NH_2 + CH_2O$
  - O-დეალკილირება  $R-O-CH_3 \longrightarrow R-OH + CH_2O$
  - S-დეალკილირება  $R-S-CH_3 \longrightarrow R-SH + CH_2O$
5. N-ჟანგვა:
  - პირველადი ამინები  $R-NH_2 \longrightarrow R-NHOH$
  - მეორეული ამინები  $(R_1R_2)NH \longrightarrow (R_1R_2)NOH$
  - მესამეული ამინები  $(R_1R_2R_3)N \longrightarrow (R_1R_2R_3)N=O$
6. S-ჟანგვა  $(R_1R_2)S \longrightarrow (R_1R_2)S=O$
7. დეზამინირება 



აქვე შევნიშნოთ, რომ მოცემული კლასიფიკაცია არაზუსტია, რადგან, როგორც შემდგომში იქნება ნაჩვენები, N-, O- და S-დეალკილირება ალიფატური ჰიდროქსილირების შემდგომ ეტაპს წარმოადგენს. ასევე მიმდინარეობს დეჰალოგენირებისა და დეჰამინირების რეაქციებიც. გარდა ამისა, მნიშვნელოვანი განსხვავებაა ალიფატური ჯაჭვის პირველად და მეორეულ ნახშირბადატომების ჟანგვას შორის, არაა წარმოდგენილი დეჰიდრირების რეაქცია, რომელიც ზოგიერთ შემთხვევაში ასევე ციტოქრომ-P450-დამოკიდებული პროცესია. ამიტომ ჩვენ შევეცდებით, შედარებით განსხვავებული ინტერპრეტაციით მოვახდინოთ მონოოქსიგენაზური სისტემის მიერ კატალიზებული რეაქციების კლასიფიკაცია.

### 3.2.1 ჰიდროქსილირება

**ჰიდროქსილირება** ყველაზე გავრცელებული პროცესია, რომელშიც ციტოქრომ P450 მონაწილეობს და რომელსაც ადგილი აქვს როგორც ენდოგენური, ასევე ეგზოგენური ნაერთების გარდაქმნისას. ჰიდროქსილირება შეიძლება განიცადოს ნახშირბადის, აზოტის ან გოგირდის ატომებმა, რომლებიც შედიან როგორც ნაჯერი ან არომატული ციკლის, ასევე აციკლური რადიკალის შემადგენლობაში.

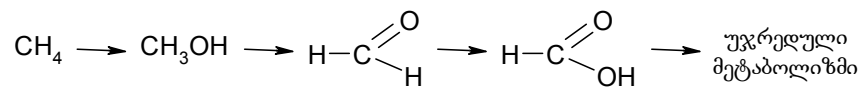
ნებისმიერი სტრუქტურის მქონე ქსენობიოტიკების მოლეკულაში ჰიდროქსილის ჯგუფის ჩანერგვა არსებითად ზრდის მის პოლარობას და ჰიდროფილურობას. ჰიდროქსილირება აუცილებლად საჭიროებს გააქტიურებული ჟანგბადის ატომს, ამიტომ რეაქციას მაღალი აქტივაციის ენერგია აქვს. უმრავლეს შემთხვევაში ეს პროცესი მთელი დეტოქსიკაციის პროცესის საწყის და ამასთანავე სინჯარის მალიმიტირებელ სტადიას წარმოადგენს. ორგანული ქსენობიოტიკების ჰიდროქსილირებას შემდგომ მათი კონიუგაციის ან სრული ჟანგვის პროცესები მოსდევს [14, 15].

**ალიფატური ჰიდროქსილირება** ციტოქრომ P450-დამოკიდებული პროცესია, რომელიც ზოგიერთი მეორეული წარმოშობის ნაერთის ბიოსინთეზის საწყის სტადიას აკატალიზებს. მაგ., მცენარის უმწიფარი თესლების მიკროსომებში ამ გზით მიმდინარეობს ჰიბერელინების წინამორბედი ტერპენოიდის – ენტ-კაურ-16-ენის დაჟანგვა 7-β-ჰიდროქსი-კაურ-16-ენ-19-მჟავამდე (იხ. ქვეთავი 2.5). ჟანგვის შუალედურ პროდუქტებს სპირტი, ალდეჰიდი და მჟავა წარმოადგენენ.

ალიფატური ჰიდროქსილირებით მიმდინარეობს აგრეთვე ციტოქრომ P450-ის მიერ კატალიზებული ცხიმოვანი მჟავების ჟანგვის რეაქციები. ჰიდროქსილირება შეიძლება განიცადოს როგორც ტერმინალური მეთილის ჯგუფის, ისე ალიფატური ჯგუფის შიდა ნახშირბადატომებმა. გაირკვა, რომ შიდაჯგუფური მონოოქსიგენირებისას ერთი და იგივე მჟავა შეიძლება სხვადასხვა მდგომარეობაშიც დაიჟანგოს, რაც მკაფიოდ ჩანს მიწავაშლას მიკროსომების მიერ ლაურინმჟავას 8-, 9- და 10-პოზიციებში ჰიდროქსილირების მაგალითზე (იხ. ქვეთავი 2.2.2).

ეგზოგენური ალკანების და N-ალკილ-წარმოებულების ჟანგვითი დეგრადაცია, ჩვეულებრივ, ალკილური ჯგუფების ჰიდროქსილირებით იწყება. მიუხედავად იმისა, რომ ამ ნაერთების მეტაბოლიზმის პროდუქტებს შორის შესაბამისი ჰიდროქსი-წარმოებულების იდენტიფიკაცია ყოველთვის არაა შესაძლებელი, მათი შემდგომი მეტაბოლიზმის პროდუქტები ერთმნიშვნელოვნად მიუთითებენ ჰიდროქსილის ჯგუფების შემცველი შუალედური პროდუქტების წარმოქმნას. ექსპერიმენტულად დამტკიცებულია, რომ ფოთლებით შთანთქმული დაბალმოლეკულური  $[C_1-C_5-^{14}C]$  ალკანები განიცდიან ჟანგვით დეგრადაციას  $^{14}CO_2$ -მდე [16-19]. მეტაბოლიზმის პროდუქტების ანალიზი საშუალებას იძლევა ვივარაუდოთ, რომ ეს ნახშირწყალბადები იჟანგებიან მონოტერმინალურად; შუალედურ პროდუქტებს წარმოადგენენ პირველადი სპირტები, რომლებიც შემდგომ კანბონმჟავებამდე იჟანგებიან. ეს უკანასკნელები კრებსის ციკლში ერთვებიან და ნახშირორჟანგამდე იჟანგებიან. ქვემოთ მოყვანილ რეაქციებში (ნახ. 3.2-3.4) ვხედავთ, რომ ალკანების ჟანგვის პროცესის საწყის სტადიას ჰიდროქსილირება წარმოადგენს.

დადგენილია, რომ მცენარის მიერ შთანთქმული მეთანის რადიოაქტიური ნიშანი ძირითადად დაბალმოლეკულურ ნაერთებში – ორგანულ მჟავებში (ლიმონის, ქარვის, ფუმარისა და ვაშლის მჟავები) ერთვება. ექსპოზიციის განხანგრძლივებისას ხდება რადიოაქტიური ნიშნის გადანაწილება ამინომჟავებში, მცირე რაოდენობით – ბიოპოლიმერებში, ხოლო შაქრების ფრაქცია არარადიოაქტიური რჩება. ექსპერიმენტის მსვლელობისას შეინიშნება მცენარეებიდან რადიოაქტიური ნახშირორჟანგის გამოყოფა, რაც მცენარის მიერ მეთანის სრული მინერალიზაციის მაჩვენებელია (ნახ. 3.2):



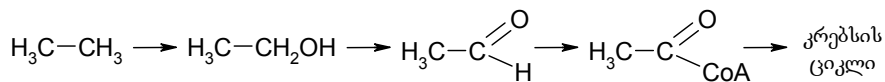
ნახ. 3.2. მეთანის ჟანგვითი დეგრადაცია მცენარეულ უჯრედში.

უფრო გრძელი ჯგუფის მქონე ნახშირწყალბადების (ეთანი, პროპანი, პენტანი) შემთხვევაშიც ძირითადი რადიოაქტიური მეტაბოლიტები ასევე



ორგანული მჟავებია (უმეტესად – ფუმარისა და ქარვის მჟავები, გვხვდება აგრეთვე მალონის, ლიმონისა და რძის მჟავები). ყველა შემთხვევაში შეინიშნება მცენარეებიდან  $^{14}\text{CO}_2$ -ის გამოყოფა, რომელიც გრძელდება მცენარის გარემომცველი ატმოსფეროდან ალკანების მოცილების შემდეგაც, ე.ი. მცენარეული უჯრედი განაგრძობს შეთვისებული ნახშირწყალბადების ჟანგვის პროცესს მათ სრულ გაუვნებლობამდე.

ეთანის ნახშირბადატომების ჩართვა აღნიშნულ მჟავებში გვაძლევს საფუძველს ვივარაუდოთ, რომ ეს ალკანი მცენარეებში მონოტერმინალურად იჟანგება. დიტერმინალური ჟანგვის შემთხვევაში უნდა წარმოქმნილიყო მჟაუნმჟავა, აგრეთვე გლიკოლისა და გლიოქსალის მჟავები, რაც ექსპერიმენტულად არ დასტურდება. ეთანის მონოტერმინალურ ჟანგვის შედეგად მიიღება აცეტილ-CoA, რომლის საშუალებითაც ეთანის ნახშირბადატომები კრებსის ციკლში ერთვება. ყოველივე ზემოთქმული სქემატურად ასე შეიძლება წარმოვიდგინოთ (ნახ. 3.3):

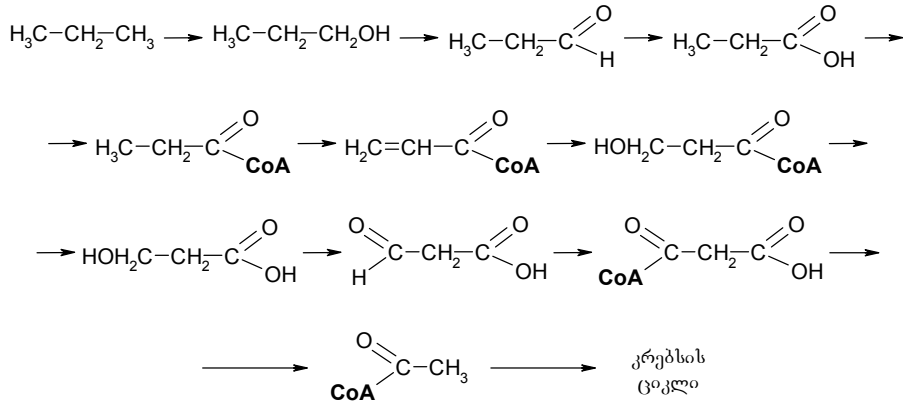


ნახ. 3.3. ეთანის ჟანგვითი დეგრადაცია მცენარეულ უჯრედში.

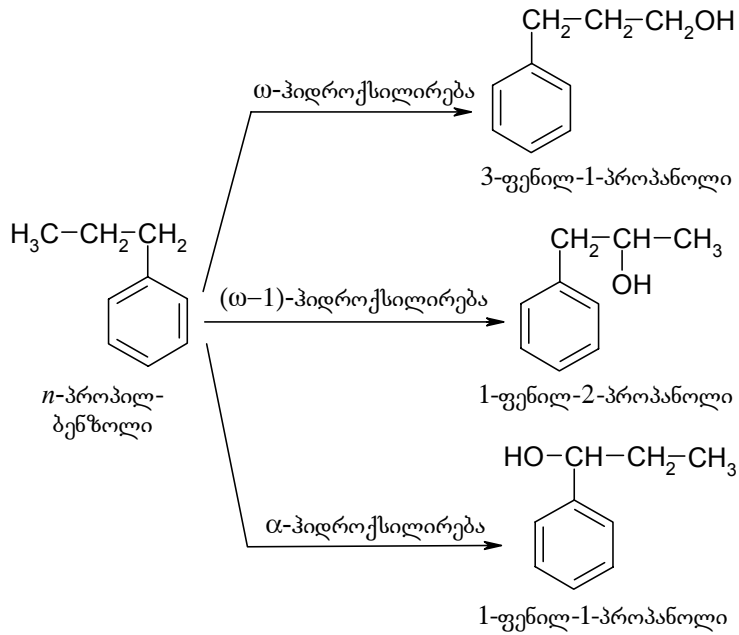
ანალოგიური პრინციპით მიმდინარებს პროპანის ნახშირბადატომების ჩართვა კრებსის ციკლში: პროპანის მონოტერმინალური ჟანგვისას მიიღება პროპიონმჟავა, რომელიც, როგორც ცნობილია,  $\beta$ -ჟანგვისას წარმოქმნის მალონილ-CoA-ს; ამ უკანასკნელის დეკარბოქსილირებისას კი აცეტილ-CoA წარმოიქმნება (ნახ. 3.4):

ნ-ალკანების ჰიდროქსილირებისას ციტოქრომ P450-თან სუბსტრატის დაკავშირება ჰიდროფობული ურთიერთქმედების ძალით ხდება, ამიტომ ალიფატური ჯაჭვის სიგრძის ზრდასთან ერთად სუბსტრატისადმი ფერმენტის სწრაფვაც იზრდება. ნაჩვენებია, რომ მონოოქსიგენირებისას ყველაზე ინტენსიური შეტევა მიმდინარეობს მესამეულ C-H ბმაზე, უფრო ნაკლებად ხდება ჟანგბადის ჩართვა მეორეულ ნახშირბადატომთან და კიდევ უფრო ნაკლებად – პირველადთან [20].

ზოგიერთი არომატული ბირთვის შემცველი ქსენობიოტიკი, რომელიც ალიფატურ გვერდით ჯაჭვს შეიცავს, მცენარის უჯრედში სწორედ ალკილის ჯგუფში ჰიდროქსილირდება. ამ დროს უპირატესად იმ ნახშირბადატომების ჰიდროქსილირება ხდება, რომლებიც ბირთვიდან დაშორებულია. მაგ., ნ-პროპილბენზოლის ციტოქრომ P450-დამოკიდებული ჰიდროქსილირების ძირითადი მეტაბოლიტებია 3-ფენილ-1-პროპანოლი და 1-ფენილ-2-პროპანოლი, ხოლო 1-ფენილ-1-პროპანოლი მცირე რაოდენობით წარმოიქმნება (ნახ. 3.5) [4, 5].



ნახ. 3.4. პროპანის ჟანგვითი დეგრადაცია მცენარეულ უჯრედში.

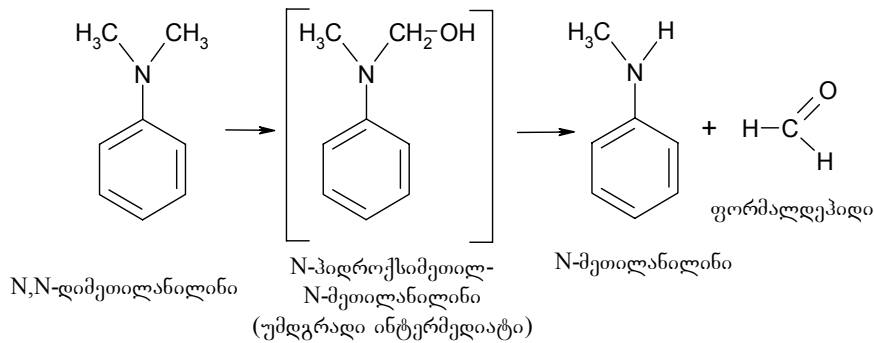


ნახ. 3.5. ციტოქრომ P450-დამოკიდებული *n*-პროპილბენზოლის ალიფატური უბნის ჰიდროქსილირების რეაქციები.

ალკილური ჯგუფების ჰიდროქსილირება ძირითადი დამახასიათებელი რეაქციაა მცენარეებში შარლოვანას ნაწარმი ჰერბიციდების მეტაბოლიზმის პროცესისათვის. ეს ჰერბიციდები განიცდიან N-ალკილჯგუფების ჰიდროქსილირებას. N-ჰიდროქსილალკილური ჯგუფები, როგორც წესი, უმდგრადია

და სწრაფად იჟანგება, ამიტომ ჰიდროქსილირების პროცესის შედეგად საწყისი ქსენობიოტიკების N-დეალკილირება ხდება (ნახ. 3.6). მაგ., ჰერბიციდი N-მეთილფენილი მეტაბოლური ტრანსფორმაციის დროს სწორედ ასეთ N-დეალკილირებას განიცდის [21].

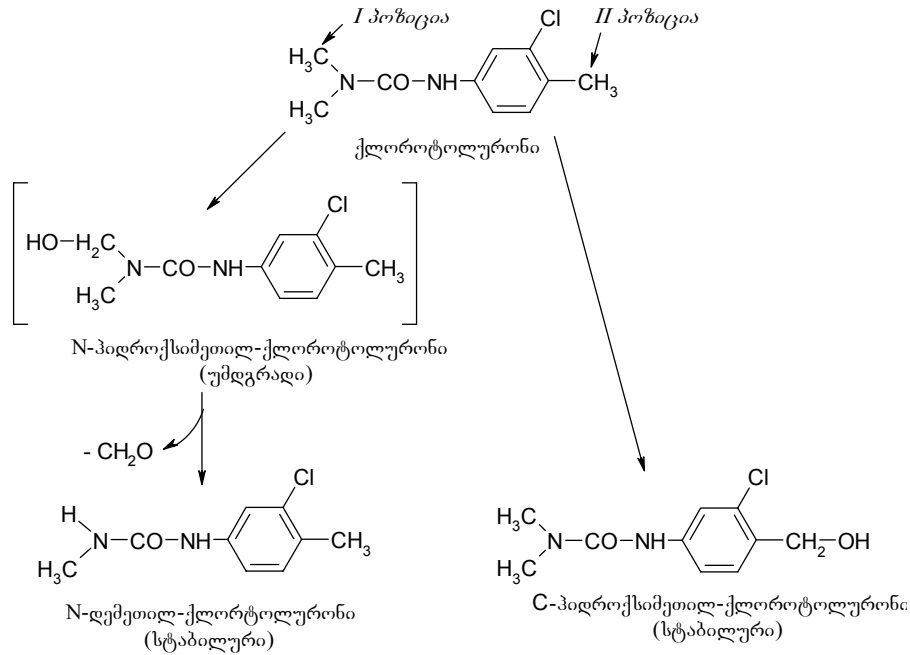
ზოგიერთ შემთხვევაში წარმოქმნილი ჰიდროქსილის ჯგუფები მყისიერად კონიუგირებენ გლუკოზასთან. მაგ., ბამბის ფოთლებში [ $^{14}\text{C}$ ] მონურონისაგან ჯერ ჰიდროქსიმეთილ-წარმოებული, შემდეგ კი ამ ინტერმედიატისაგან იმდენად სწრაფად წარმოიქმნება  $\beta$ -D-გლუკოზიდი, რომ მეტაბოლიტებს შორის ჰიდროქსილირებული შუალედური პროდუქტის იდენტიფიცირება ვერ ხერხდება. ასეთივე  $\beta$ -D-გლუკოზიდი ფორმირდება შაქრის ლერწამში (*Saccharum officinarum*) დიურონის ჰიდროქსიმეთილ-წარმოებულის კონიუგაციის შედეგად [22].



ნახ. 3.6. ჰერბიციდ N-მეთილფენილის N-დემეთილირება N-ალკილის ჯგუფის ჰიდროქსილირების შედეგად.

მცენარეებში მეთილის ჯგუფების ჰიდროქსილირების პროდუქტები (ჰიდროქსიმეთილ-წარმოებულები) შარდოვანას წარმოებული მრავალი სხვა ჰერბიციდების პირველადი გარდაქმნების პროცესების დროსაც წარმოიქმნებიან, მაგ., ასეთი სახის ტრანსფორმაციას განიცდიან: ბუტურონი ხორბალში [23], მონოლინურონი ისპანახში (*Spinacia oleracea*) [24], ტერბუტიურონი შაქრის ლერწამში [25], ქლორტოლურონი ხორბალში [26]. საინტერესოა, რომ ქლორტოლურონის ჰიდროქსილირება ორ პოზიციაში ხდება (ნახ. 3.7): N-მეთილის ჯგუფის ჰიდროქსილირება იწვევს დემეთილირებას, ხოლო არომატულ რგოლთან დაკავშირებული მეთილის ჯგუფის ჰიდროქსილირების შედეგად მდგრადი ჰიდროქსიმეთილ-წარმოებული ფორმირდება, რადგანაც, N-ჰიდროქსიმეთილ-ჯგუფისაგან განსხვავებით, C-ჰიდროქსიმეთილ-ჯგუფი ბევრად უფრო მდგრადია. ამას ადასტურებს პერ-

ბიციდების მოქმედების მიმართ მდგრად და მგრძობიარე ხორბლის ჯიშებში შთანთქმული ქლორტოლურონისაგან წარმოქმნილი მეტაბოლიტების ანალიზი. მათ შორის გვხვდება როგორც N-დემეთილირების პროდუქტი, ასევე C-ჰიდროქსიმეთილ-წარმოებული.



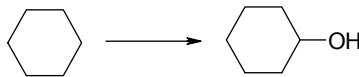
ნახ. 3.7. მცენარეში ქლორტოლურონის პირველადი გარდაქმნის გზები.

მცენარეებში ანალოგიურ N-დეალკილირებას განიცდიან სიმეტრიული ტრიაზინებიც. ამ შემთხვევაში N-დეალკილირება გვერდითი ჯაჭვების (ალკილური ჯგუფების) ჰიდროქსილირებით მიმდინარეობს [27]. ამ შემთხვევაშიც ჰიდროქსილირებული შუალედური პროდუქტები სწრაფად კონიუგირდებიან შიდაჯვრედულ ნაერთებთან, ამიტომ მცენარეული ბიომასიდან შესაბამისი ჰიდროქსი-წარმოებულების გამოყოფა ყოველთვის არ ხერხდება. მაგ., ატრაზინი და სიმაზინი ადვილად დეალკილირდებიან, თუმცა მეტაბოლიტებს შორის შესაბამისი შუალედური ჰიდროქსი-წარმოებულები არ იდენტიფიცირდება [28-30]. საერთოდ, ჰიდროქსილირების პროდუქტების აღმოჩენა მხოლოდ ერთეულ შემთხვევებშია შესაძლებელი, ისიც მაშინ, როდესაც ისინი ძირითად მეტაბოლიტებს არ წარმოადგენენ. მაგ., კარტოფილის (*Solanum tuberosum*) და სიმინდის სუსპენზიურ კულტურებში ატრაზინის მეტაბოლიტებს შორის ჰიდროქსი-წარმოებულები არაა

აღმოჩენილი, მაგრამ იონჯის მცენარეებში იდენტიფიცირებულია სხვა სიმეტრიული ტრიაზინის – ტერბუტრინის ჰიდროქსილირების პროდუქტი [31]. ზემოთქმულის დამადასტურებელი კიდევ ერთი მაგალითია მეთილის ჯგუფის ჰიდროქსილირების პროდუქტის აღმოჩენა [2-<sup>14</sup>C] ტერბაცილით დამუშავებულ იონჯის მცენარეებში [32].

ზოგიერთი ქსენობიოტიკის მოლეკულებში ჰიდროქსილირებას მეთილენის (-CH<sub>2</sub>-) ჯგუფები განიცდიან. მაგ., ქერში, სიმინდსა და მარწყვში (*Fragaria vesca*) ჰიდროქსილირდება კარბოფურანის მესამე ლოკანტის მეთილენური ჯგუფის ნახშირბადატომი, და არა ტერმინალური მეთილის ჯგუფი [33,34].

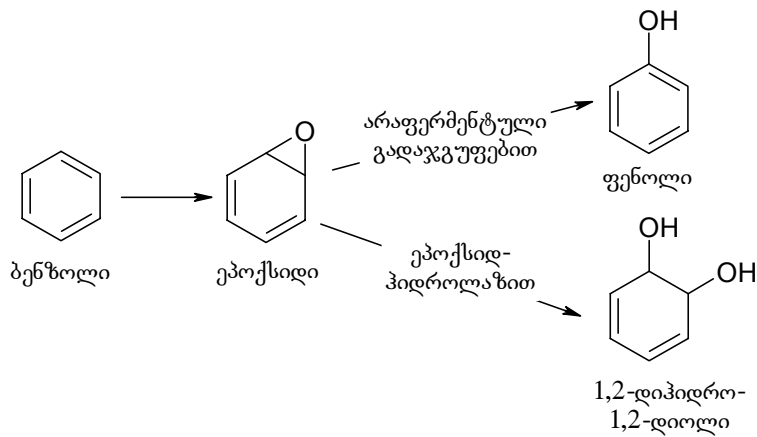
[<sup>14</sup>C] ციკლოპექსანის მეტაბოლიზმი მიუთითებს, რომ ამ ნახშირწყალბადის ციკლი იშლება შესაბამისი ალიფატური პროდუქტების წარმოქმნით. დადგენილია, რომ ციკლოპექსანის მეტაბოლიზმის პირველი ეტაპია მისი ჰიდროქსილირებით ციკლოპექსანოლის წარმოქმნა (ნახ. 3.8) [35].



ნახ. 3.8. ციკლოპექსანის ჰიდროქსილირება.

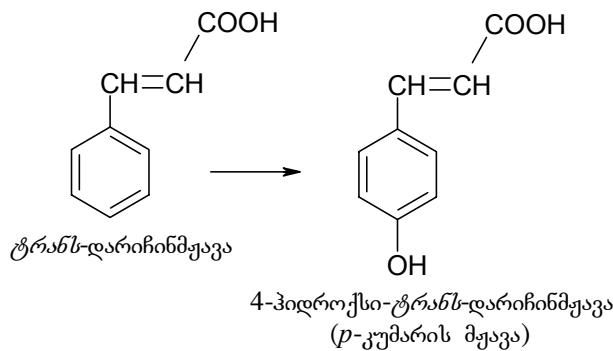
**არომატული ჰიდროქსილირება.** ჰიდროქსი-წარმოებულების წარმოქმნა მეტაბოლიზმის საწყის ეტაპს წარმოადგენს გარემოს ისეთი მნიშვნელოვანი დამბინძურებლების გარდაქმნისას, როგორებიც არომატული ნახშირწყალბადებია. დადგენილია, რომ მცენარეებში [1-6-<sup>14</sup>C] ბენზოლის დაშლით ალიფატური პროდუქტების (მუკონისა და ფუმარის მჟავების) ფორმირება ხდება. ბენზოლიდან ანალოგიური პროდუქტები ნაყოფებშიც წარმოიქმნება. სიმინდის, ბარდის და გოგრას (*Cucurbita pepo*) სტერილურ აღმონაცენებში, რომლებიც ნიშანდებული ბენზოლის ხსნარზე ინკუბირდებოდა, ნიშანდებული ფენოლია იზოლირებული. ფენოლი ქსოვილებში უმნიშვნელო რაოდენობით იდენტიფიცირდება, თუმცა ალიფატურ პროდუქტებში ბენზოლის ნიშანდებული ნახშირბადის ჩართვის ხარისხი ბევრად მაღალია. აქედან გამომდინარე, ფენოლი იმდენად სწრაფად განიცდის შემდგომ გარდაქმნებს, რომ იგი მხოლოდ უმნიშვნელო რაოდენობით, კვალის სახით რჩება მეტაბოლიტებს შორის [35].

არომატული ბირთვის ჰიდროქსილირება ორ სტადიას მოიცავს. სავარაუდოდ, შუალედური პროდუქტია ეპოქსიდი, რომლისგანაც შემდგომში არაფერმენტული ან ფერმენტული გზით შესაბამისად მონოფენოლი ან 1,2-დიჰიდრო-1,2-დიოლი უნდა წარმოიქმნას (ნახ. 3.9) [36].



ნახ. 3.9. არომატული ბირთვის ჰიდროქსილირება ბენზოლის მაგალითზე.

ამ ტიპის რეაქციებს ადგილი აქვს ფენოლური ნაერთების ბიოსინთეზშიც, კერძოდ, ლიგნინის, ფლავონოიდებისა და დარიჩინმჟავას ეთერების ფორმირების ფენილპროპანოიდულ გზაზე. მათგან ძირითადია ტრანს-დარიჩინმჟავას გარდაქმნა *p*-კუმარმჟავად (ნახ. 3.10), რომლის განხორციელებაშიც მონაწილეობს პროცესის ერთ-ერთი საკვანძო ფერმენტი – ციტოქრომ P450-დამოკიდებული დარიჩინმჟავა-4-ჰიდროქსილაზა [37].

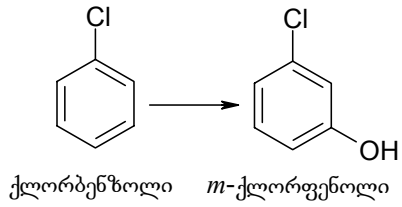


ნახ. 3.10. ტრანს-დარიჩინმჟავას გარდაქმნა არომატული ბირთვის ჰიდროქსილირებით.

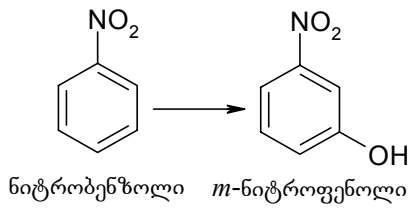
დარიჩინმჟავა ციტოქრომ P450-ის პირველი ტიპის სუბსტრატს წარმოადგენს [38-40]. პროდუქტით (*p*-კუმარის მჟავით) ინჰიბირების გამო დარიჩინმჟავა-4-ჰიდროქსილაზა ფენილალანინ-ამიაკ-ლიაზასთან ერთად ფენილპროპანოიდური გზის ერთ-ერთი მარეგულირებელი ფერმენტია. როგორც წინა თავში აღვნიშნეთ, ამ ფერმენტს ქსენობიოტიკების გარდაქმნაც შეუძლია (იხ. ქვეთავი 2.7.2)

არომატული ბირთვის შემცველი ორგანული ქსენობიოტიკების დიდი ნაწილი ციტოქრომ P450-დამოკიდებული არომატული ჰიდროქსილირების გზით გარდაიქმნება. ასეთ ტრანსფორმაციას განიცდიან არამარტო მოდელური ქსენობიოტიკები (მაგ., ქლორბენზოლი, ნიტრობენზოლი, ანილინი და სხვ. [41]) (ნახ. 3.11-13), არამედ ბენზოლის ბირთვის შემცველი მრავალი პესტიციდიც (მაგ., ქლორსულფურონი [42], ბენტაზონი [43], დიქლოფოპი [44] და სხვ.) (ნახ. 3.14-3.16). აქვე უნდა აღინიშნოს, რომ ბენზოლის ბირთვში ნუკლეოფილური ჩამნაცვლების შემთხვევაში ჰიდროქსილირება უფრო აქტიურ, მე-3 (მეტა-) მდგომარეობაში ხორციელდება (ნახ. 3.11 და 3.12), ხოლო ელექტროფილური ჩამნაცვლებელი, რომელიც მე-2 და მე-4 (ორთო- და პარა-) მდგომარეობის წყალბადატომების ძვრადობას ზრდის, *p*-ჰიდროქსილირებულ პროდუქტის წარმოქმნას უწყობს ხელს (ნახ. 3.13). როგორც ჩანს, ორთო-მდგომარეობა სტერიულად მიუწვდომელია ფერმენტის აქტიური ცენტრისათვის (ეკრანირებულია ამინო ჯგუფით), ამიტომ ანილინის მეტაბოლიტებს შორის *o*-ჰიდროქსილირების პროდუქტი არ იდენტიფიცირდება.

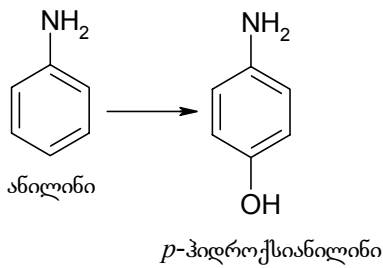
უმეტეს შემთხვევაში, არომატული ბირთვის ჰიდროქსილირების პროდუქტები, წარმოქმნილი ჰიდროქსილის ჯგუფის საშუალებით დაუყოვნებლივ გლუკოზილირებას განიცდიან. სწორედ ამიტომ ჰიდროქსილირების პროდუქტების გამოყოფა ყოველთვის არ არის შესაძლებელი. მაგ., ჰერბიციდი ბენტაზონი ჰიდროქსილირდება *n*-ჰიდროქსიბენტაზონის ან 8-ჰიდროქსიბენტაზონის წარმოქმნით, ეს ინტერმედიატები შემდგომში გლუკოზილირებით კონიუგირდებიან [43]. ბენტაზონით დამუშავებულ მცენარეულ ქსოვილებში, გლუკოზიდებთან ერთად ჰერბიციდის საწყისი ჰიდროქსი-წარმოებულები მხოლოდ უმნიშვნელო რაოდენობითაა აღმოჩენილი. ეს ცხადია, მიუთითებს, რომ არომატული ბირთვის ჰიდროქსილირება ქსენობიოტიკის ტრანსფორმაციის მთელი შემდგომი პროცესის მაღლიმტირებელი სტადიაა.



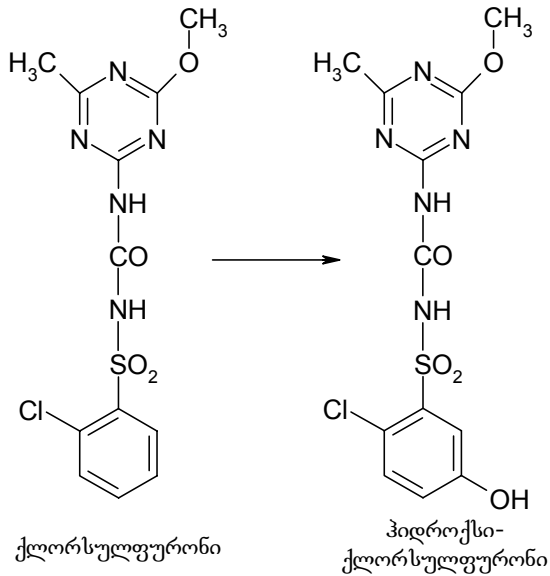
ნახ. 3.11. ქლორბენზოლის არომატული ბირთვის  $m$ -ჰიდროქსილირება.



ნახ. 3.12. ნიტრობენზოლის არომატული ბირთვის  $m$ -ჰიდროქსილირება.

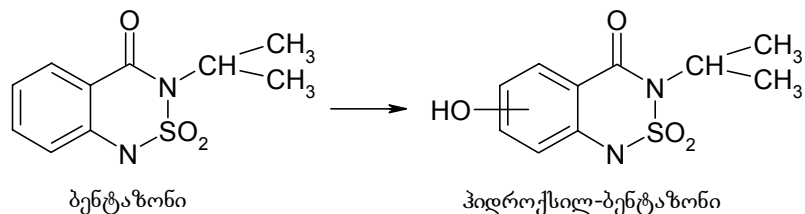


ნახ. 3.13. ანილინის არომატული ბირთვის  $p$ -ჰიდროქსილირება.

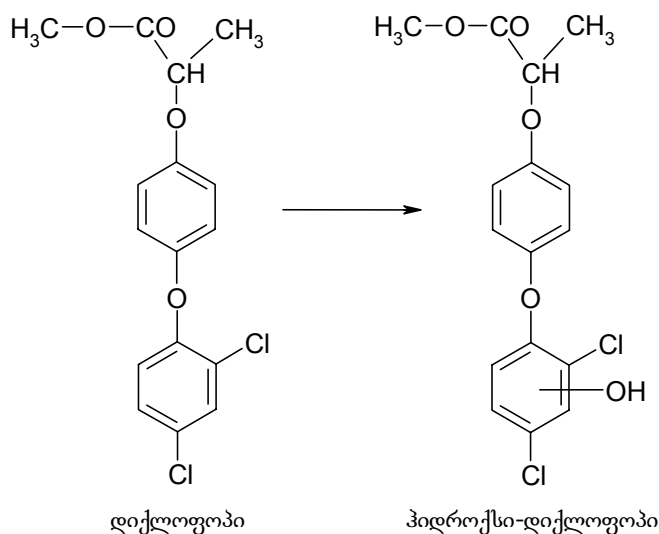


ნახ. 3.14. პესტიციდ ქლორსულფურონის არომატული ბირთვის ჰიდროქსილირება.





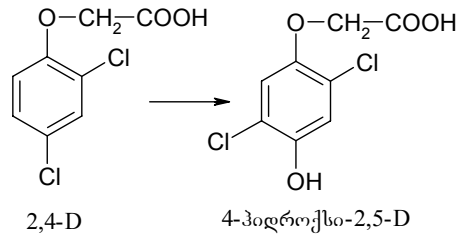
ნახ. 3.15. პესტიციდ ბენტაზონის არომატული ბირთვის ჰიდროქსილირება.



ნახ. 3.16. პესტიციდ დიქლოფოპის არომატული ბირთვის ჰიდროქსილირება.

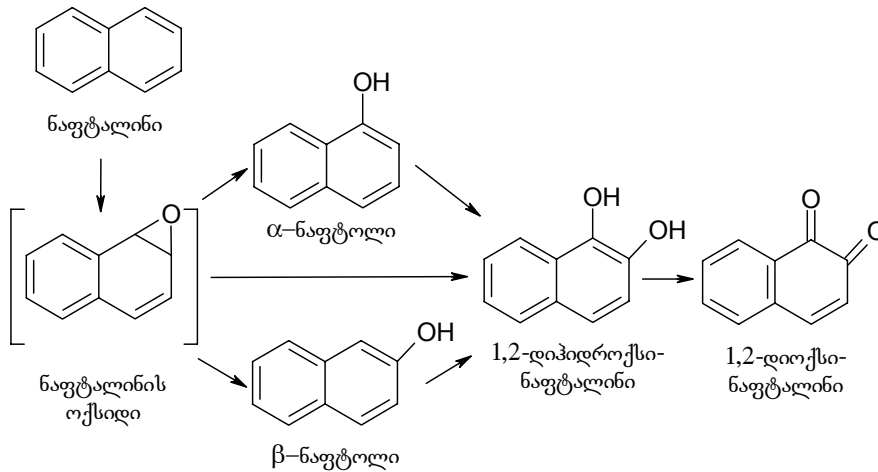
ფენოქსიმარმჟავა და მისი წარმოებული ჰერბიციდები უმთავრესად, არომატული რგოლის მე-4 მდგომარეობაში ჰიდროქსილირდებიან [45]. ამავე დროს, ჩანერგილი ჰიდროქსილური ჯგუფი ხშირად გლიკოზილირების საშუალებით კონიუგირდება. არომატულ ბირთვში ჰალოგენირებული ფენოქსიმარმჟავები ჰიდროქსილირდებიან ჰალოგენებით ჩაუნაცვლებელ ბენზოლის ბირთვის ნახშირბადის ატომებში. ამავე დროს, 2,4-დიქლოროფენოქსი მმარმჟავას (2,4-D) შემთხვევაში ჰიდროქსილირება ხშირად მე-4 მდგომარეობაში ხდება და ქლორის ატომი მე-3 ან მე-5 მდგომარეობაში გადაინაცვლებს (ნახ.3.17) [46]. მაგ., 4-ჰიდროქსი-2,5-D წარმოადგენს 2,4-D-ს ჰიდროქსილირების ძირითად მეტაბოლიტს ისეთ სარეველა ბალახებში, როგორებიცაა: ყანის ჭლექი (*Polygonum convolvulus*), რძიანა (*Euphorbia esula*), ყვითელი ბურწა (*Setaria glauca*), შვრიუკა (*Avena fatua*), ველური მღოვი, ღიჭა (*Sonchnus arvensis*) და

ყვითელი ცოცხი (*Kochia scoparia*). ჰერბიციდების მიმართ მგრძობიარე და მდგრადი სოიის ჯიშებში 2,4-D-ს ტრანსფორმაციამ უჩვენა, რომ ჰერბიციდის მიმართ მდგრად სახეობაში განსაკუთრებით ინტენსიურად 4-ჰიდროქსი-წარმოებული წარმოიქმნება, რომელიც შემდეგ მხოლოდ გლუკოზიდის ფორმით კონიუგირებს [47].



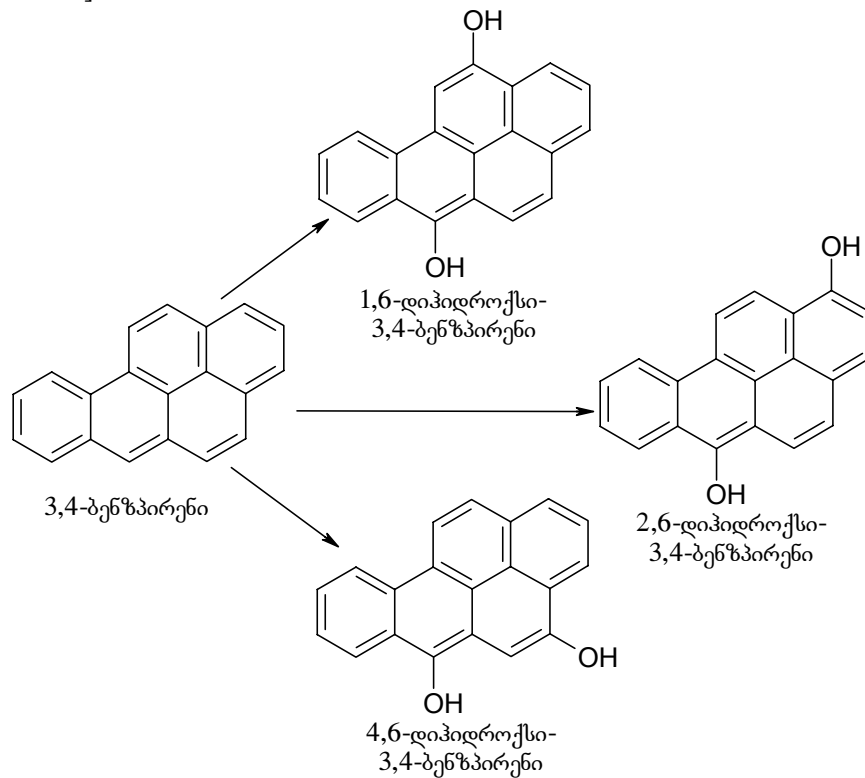
ნახ. 3.17. 2,4-D-ს ჰიდროქსილირება, რის შედეგადაც ქლორის ატომი არომატულ ბირთვში პოზიციას იცვლის.

ციტოქრომ P450-დამოკიდებული მონოოქსიგენაზა პოლიციკლური არომატული ნაერთების ჰიდროქსილირებასაც აკატალიზებს. ამის მაგალითია ნაფტალინისა და 3,4-ბენზპირენის ტრანსფორმაცია. ნაფტალინის არომატული ბირთვი 1 და 2 პოზიციებში ჰიდროქსილირდება, რასაც მოჰყვება 1,2-დიჰიდროქსინაფტალინის და შესაბამისი ქინონის წარმოქმნის სტადიები (ნახ. 3. 18) [48, 49].



ნახ. 3.18. არომატული ბირთვის ჰიდროქსილირებით მიმდინარე ნაფტალინის გარდაქმნის რეაქციები.

პოლიარომატულ ნაერთთა ჟანგვის შემდგომი ეტაპია ქინონების წარმოქმნა, რაც ხშირად არომატული ბირთვის გახლეჩას იწვევს. უნდა აღინიშნოს, რომ არაჩანაცვლებულ პოლიარომატულ ბირთვში ყოველთვის არსებობს აქტიური, ე.წ. L-უბანი, რომელიც ციტოქრომ P450-დამოკიდებული ჰიდროქსილირების სამიზნეა. მაგ., 3,4-ბენზპირენში ასეთი უბანია 6-მდგომარეობა, რომელიც ყველა შემთხვევაში ჰიდროქსილირდება (ნახ. 3.19) [48, 50-53].

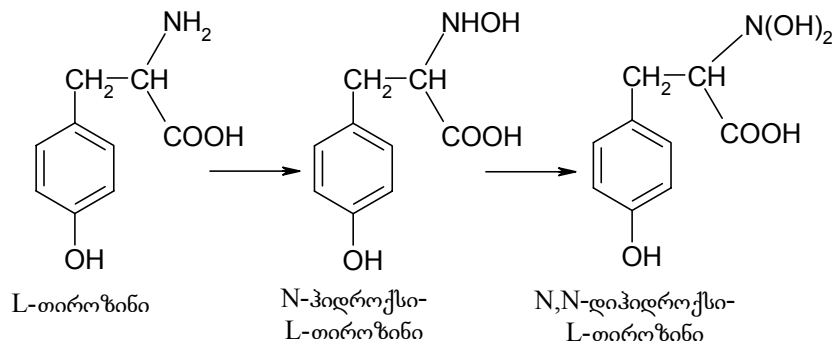


ნახ. 3.19. არომატული ბირთვის ჰიდროქსილირებით მიმდინარე 3,4-ბენზპირენის გარდაქმნის რეაქციები.

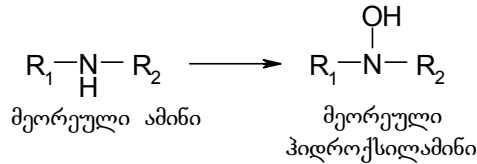
**N-ჰიდროქსილირება**, რომელსაც ციტოქრომ P450 აკატალიზებს, L-თიროზინის გარდაქმნის ორ თანმიმდევრულ რეაქციაში გვხვდება (ნახ. 3.20) [54]. წარმოქმნილი N,N-დიჰიდროქსითიროზინი შემდგომში არაფერმენტულ დეჰიდრირებას და დეკარბოქსილირებას განიცდის, რის შედეგადაც ციანოგენური გლიკოზიდის – დარინის მეტაბოლიტი მიიღება. რეაქცია ხორციელდება რეკონსტრუირებულ სისტემაშიც, რომელიც ლიპიდურ მი-

ცვლებზე იმობილიზებული NADPH-ციტოქრომ P450-რედუქტაზისა და ციტოქრომ P450-ისაგან შედგება.

ქსენობიოტიკები, რომლებიც მეორეულ ამინებს წარმოადგენენ, დეგრადაციის პირველ ეტაპზე ციტოქრომ P450-დამოკიდებული N-ჰიდროქსილირების გზით გარდაიქმნებიან (ნახ. 3.21) [20, 41, 55, 56]. მათი შემდგომი ტრანსფორმაცია სხვადასხვა გზით მიმდინარეობს.

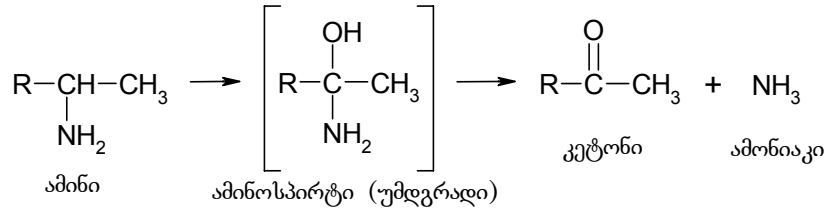


ნახ. 3.20. L-თიროზინის ციტოქრომ P450-დამოკიდებული N-ჰიდროქსილირება ციანოგენური გლიკოზიდების ბიოსინთეზის პროცესში.

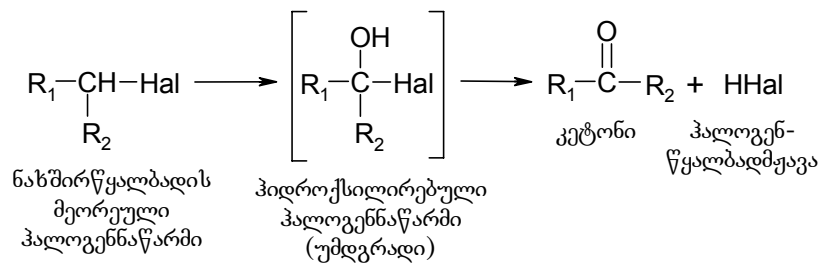


ნახ. 3.21. მეორეული ამინების ციტოქრომ P450-დამოკიდებული N-ჰიდროქსილირება.

**C-ჰიდროქსილირება**, რომელსაც ამინებისა და ჰალოგენიდების მეორეული ნახშირბადატომი განიცდის, ასევე P450-დამოკიდებული პროცესია. ამ რეაქციების შედეგად უმდგრადი ინტერმედიატები, შესაბამისად – ამინოსპირტი და ჰიდროქსილირებული ჰალოგენნაწარმი წარმოიქმნებიან, რომელთა დაშლის საბოლოო პროდუქტი კეტონია (ნახ. 3.22 და 3.23) [55]. ამ გზით აზოტისა და ჰალოგენის ატომები წყალბადნაერთის სახით სცილდება ტოქსიკანტის მოლეკულას, რაც შემდგომ გარდაქმნებს ბევრად აადვილებს.



ნახ. 3.22. ამინების ციტოქრომ P450-დამოკიდებული C-ჰიდროქსილირება.



ნახ. 3.23. ჰალოგენალკანების ციტოქრომ P450-დამოკიდებული C-ჰიდროქსილირება.

ამ ორი უკანასკნელი მაგალითიდან აშკარად ჩანს, რომ ციტოქრომ P450-დამოკიდებული დეჰაიდრირება და დეჰალოგენირება თავისი არსით ჰიდროქსილირების რეაქციებს წარმოადგენენ.

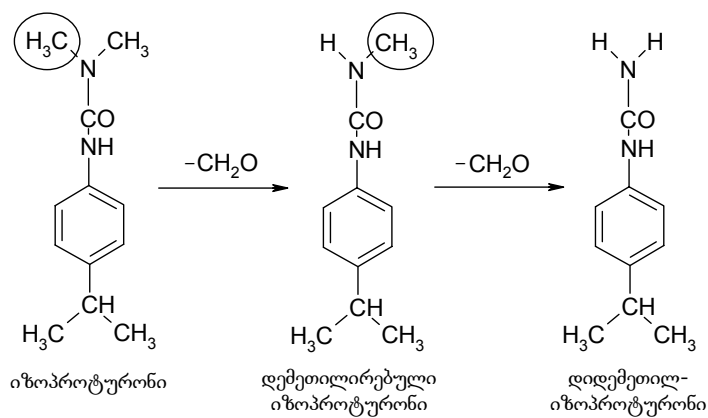
### 3.2.2 დემეთილირება

დემეთილირება, რომელსაც მრავალი ქსენობიოტიკი განიცდის, როგორც წესი, ციტოქრომ P450-ით კატალიზებული N-, O- და S-მეთილის ჯგუფების ჰიდროქსილირების შედეგია [56]. ამ დროს წარმოიქმნება შესაბამისი ჰიდროქსიმეთილწარმოებულები, რომლებიც ქიმიურად არასტაბილურ რადიკალებს წარმოადგენენ და ფორმალდეჰიდის სახით ადვილად სცილდებიან მოლეკულას. შესაბამისად, არჩევენ N-, O- და S-დემეთილირების რეაქციებს.

**N-დემეთილირების** თვალსაჩინო მაგალითია N-მეთილფენილის (ნახ. 3.6), N,N-დიმეთილანილინისა და შარლოვანას წარმოებული ჰერბიციდის – ქლორთოლურონის გარდაქმნა (ნახ. 3.7), რომლებიც ზევით განვიხილეთ. ეს ჰერბიციდი N- და C-მეთილის ჯგუფებს შეიცავს. ჰიდროქსილირებას განიცდის ორივე ტიპის მეთილის ჯგუფი, მაგრამ N-ჰიდროქსიმეთილის ჯგუფი უმდგრადია და იგი ფორმალდეჰიდის სახით ეხლიჩება აზოტის ატომს (ხდება N-

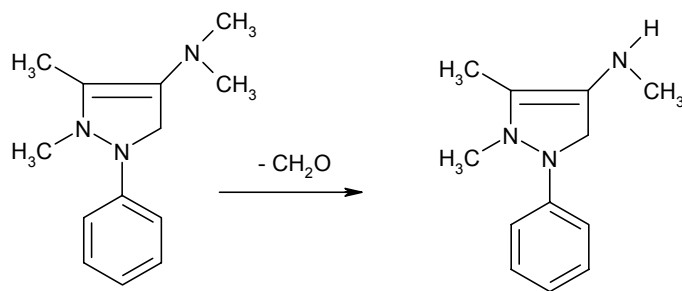
დემეთილირება). ამიტომ მეტაბოლიტებს შორის იდენტიფიცირდება არა უშუალოდ N-ჰიდროქსიმეთილქლოროტოლურონი, არამედ N-დემეთილირებული ქლოროტოლურონი. არომატულ ბირთვთან მიერთებული C-ჰიდროქსიმეთილის ვგუფი გაცილებით მდგრადია და იგი დემეთილირებას არ განიცდის.

N-დემეთილირებას ექვემდებარება ჰერბიციდი იზოპროტურონიც (ნახ. 3.24) [57]. საინტერესოა აღინიშნოს, რომ ეს ნაერთი ფიტოტოქსიკურია, N-დემეთილირების პირველი სტადიის შედეგად მისი ფიტოტოქსიკურობა საგრძნობლად მცირდება, ხოლო ორივე N-მეთილის მოცილების შემდეგ მთლიანად ქრება.



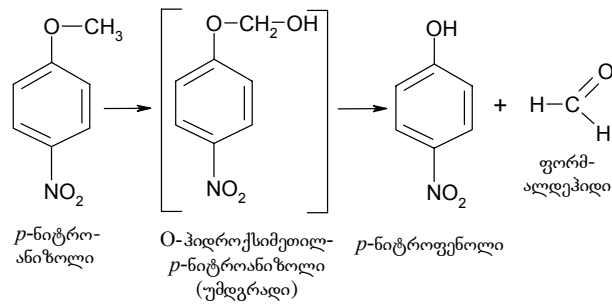
ნახ. 3.24. ჰერბიციდ იზოპროტურონის ორჯერადი N-დემეთილირების რეაქციები.

დემეთილანილინის N-დემეთილირების ანალოგიური მექანიზმით წარმართება მიკროსომებში ციტოქრომ P450-დამოკიდებული ამინოპირინის ჟანგვა (ნახ. 3.25) [20, 41, 58]:



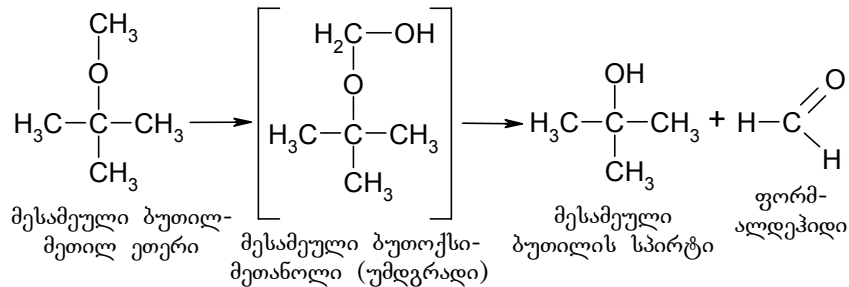
ნახ. 3.25. ამინოპირინის N-დემეთილირების რეაქცია.

**O-დემეთილირება** ეთერების ტიპის სუბსტრატებიდან მეთოქსიჯგუფების მოცილების ფართოდ გავრცელებულ რეაქციას წარმოადგენს. რეაქციის მექანიზმი N-დემეთილირების ანალოგიურია და პროდუქტებს შესაბამისი ჰიდროქსიწარმოებული და ფორმალდეჰიდი წარმოადგენენ, რაც მკაფიოდ ჩანს *p*-ნიტროანიზოლის გარდაქმნის მაგალითით (ნახ. 3.26) [20, 55].



ნახ. 3.26. *p*-ნიტროანიზოლის O-დემეთილირების რეაქცია.

O-დემეთილირების გზით მნიშვნელოვნად კარგავს თავის ტოქსიკურობას გარემოს დამაბინძურებელი ნაერთი – მესამეული ბუთილ-მეთილ ეთერი ანუ მეთილ-ტერტ-ბუთილ ეთერი (MTBE) (ნახ. 3.27) [59-61], რომელიც ტეტრამეთილ-ტყვიის ნაცვლად გამოიყენება, როგორც საწვავის ანტიდეტონატორული დანამატი.

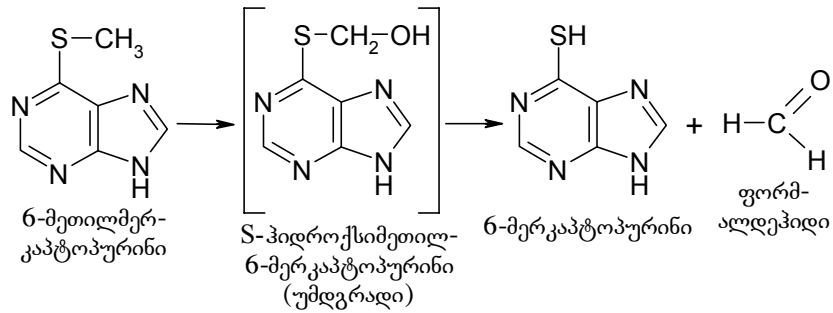


ნახ. 3.27. MTBE-ს O-დემეთილირების რეაქცია.

ციტოქრომ P450-ის მიერ კატალიზებულ ბიოსინთეზურ პროცესებს რაც შეეხება, აქ O-დემეთილირების რეაქციაა ლიგნინის ბიოსინთეზში ეთოქსიკუმარინის O-დემეთილირება [62, 63].

**S-დემეთილირებას**, როგორც უკვე აღვნიშნეთ, წინ უძღვის ციტოქრომ P450-ის მიერ კატალიზებული S-მეთილის ჯგუფის ჰიდროქსილირება, რომლის პროდუქტი – S-ჰიდროქსიმეთილის ჯგუფი არასტაბილურობის

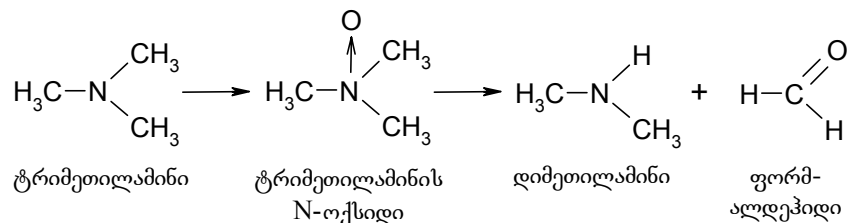
გამო შიდამოლეკულურ გადაჯგუფებას განიცდის და ფორმალდეჰიდის გენერირებით იშლება (ნახ. 3.28) [55].



ნახ. 3.28. 6-მეთილმერკაპტოპურინის S-დემეთილირების რეაქცია.

### 3.2.3 N- და S-ჟანგვა

**N-ჟანგვა**, რომლის დროსაც ციტოქრომ P450 აზოტის ატომის უშუალო მონოქსიგენირებას ახდენს, არასტაბილურ პროდუქტს – N-ოქსიდს წარმოქმნის. N-ჟანგვას ამინების ჰიდროქსილირების ერთ-ერთ შესაძლო გზად მიიჩნევენ. ციტოქრომ P450 მხოლოდ პირველადი ამინების N-ჟანგვაში მონაწილეობს, მეორეული და მესამეული ამინები კი მიკროსომული NADPH-სპეციფიკური ფლაავოპროტეინით იჟანგებიან. N-ოქსიდი ხშირად საწყის ქსენობიოტიკზე უფრო ტოქსიკურია. ციტოქრომ P450-ს შეუძლია N-ოქსიდებთან შემდგომი ურთიერთქმედებაც და საბოლოოდ N-დემეთილირებული პროდუქტი მიიღება (ნახ. 3.29) [41, 55].

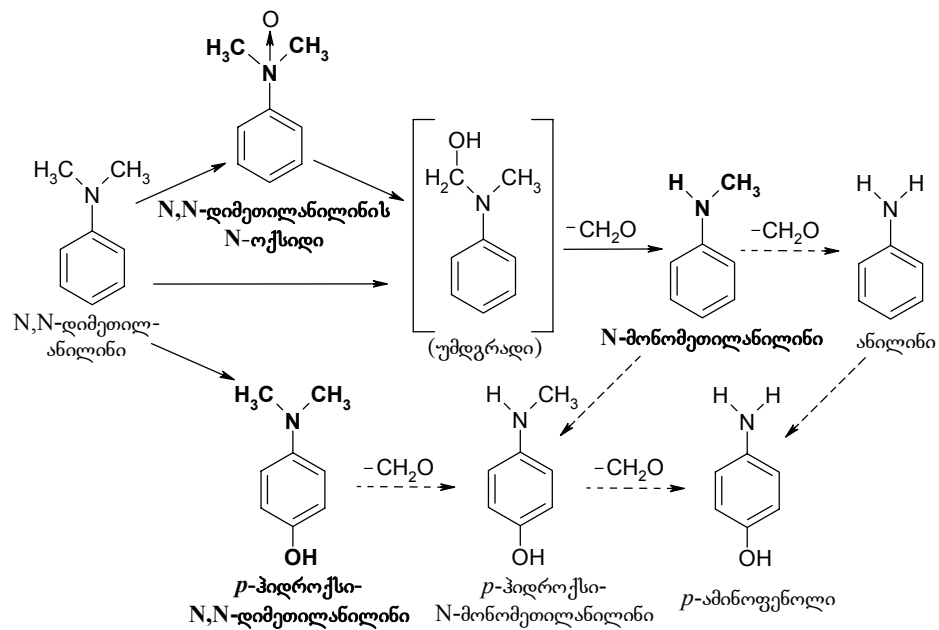


ნახ. 3.29. ტრიმეთილამინის N-ჟანგვის და შემდგომი N-დემეთილირების რეაქცია.

N-ჟანგვის არსებობა არაერთ მაგალითზეა ნაჩვენები და ყველაზე თვალსაჩინოს კლასიკური მიკროსომული სუბსტრატი – N,N-დიმეთილანლინინი



წარმოადგენს [20]. თუმცა ისიც უნდა აღინიშნოს, რომ ეს ქსენობიოტიკი რამდენიმე გზით შეიძლება დაიჟანგოს. ეს, როგორც წესი, თვით ნაერთის ქიმიურ აღნაგობაზე, კერძოდ, არაპოლარული ჯგუფების განლაგებაზეა დამოკიდებული. N,N-დიმეთილანილინის მოლეკულა ორ ჰიდროფობულ უბანს შეიცავს: ერთ მხარეს მეთილის ჯგუფებს, მეორე მხარეს კი ფენილის რადიკალს. ამის გამო მიკროსომული NADPH-დამოკიდებული მონოოქსიგენაზა დიმეთილანილინის სამი ალტერნატიული გზით: N-ჟანგვით, N-დემეთილირებით ან *p*-ჰიდროქსილირებით ჟანგავს (ნახ. 3.30).



ნახ. 3.30. N,N-დიმეთილანილინის ციტოქრომ P450-დამოკიდებული ჟანგვის გზები. მსხვილი შრიფტით მოცემულია ჟანგვის ძირითადი იდენტიფიცირებული პროდუქტები, ხოლო წყვეტილი ისრებით ნაჩვენებია თეორიულად შესაძლებელი რეაქციები.

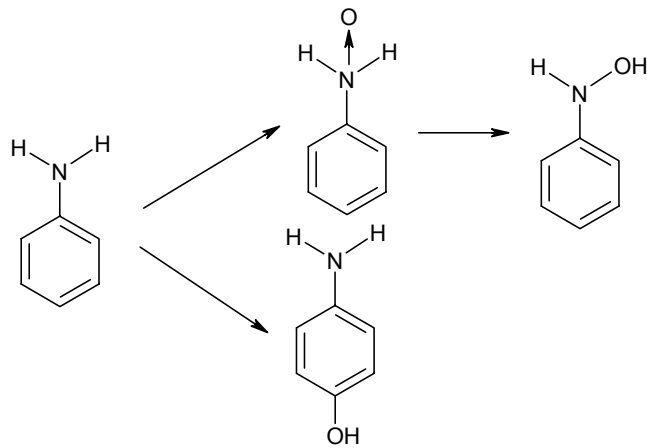
N-ჟანგვის შედეგად ფორმირებული N,N-დიმეთილანილინის N-ოქსიდი შემდგომში ციტოქრომ P450-ის მოქმედებით უმდგრად N-ჰიდროქსიმეთილ-წარმოებულად გარდაიქმნება, რომელსაც ადვილად სცილდება ფორმალდეჰიდი და N-მონომეთილანილინი მიიღება.

N-ჰიდროქსიმეთილ-წარმოებული შესაძლოა N-ჟანგვის შუალედური

რგოლის გარეშეც, კერძოდ, უშუალოდ N,N-დიმეთილანილინის ჰიდროქსილირების საშუალებით წარმოიქმნას. ამ შემთხვევაშიც ჟანგვის ტიპი N-დემეთილირებაა და პროდუქტს N-მონომეთილანილინი წარმოადგენს.

ციტოქრომ P450-ით N,N-დიმეთილანილინის ჟანგვის მესამე გზაა არომატული ბირთვის ჰიდროქსილირება, რომელიც *p*-მდგომარეობაში ხორციელდება და კიდევ ერთ პროდუქტს – *p*-ჰიდროქსი-N,N-დიმეთილანილინს გენერირებს.

უნდა შევნიშნოთ, რომ მიკროსომული NADPH-დამოკიდებული ჟანგვის შედეგად სარეაქციო არეში სწორედ ეს სამი პროდუქტი – N-ოქსიდი, მონომეთილანილინი და *p*-ჰიდროქსი-N,N-დიმეთილანილინი იდენტიფიცირდება, თუმცა თეორიულად შესაძლებელია, რომ დიმეთილანილინის მონო-ოქსიგენირების პროდუქტებს ციტოქრომ P450 შემდგომი ჟანგვის სუბსტრატებად იყენებდეს, რის შედეგადაც საბოლოო ჯამში *p*-ამინოფენოლი უნდა წარმოიქმნას. პრაქტიკულად ეს მომდევნო რეაქციები უფრო ნაკლებად უნდა იყოს დამოკიდებული ციტოქრომ P450-ზე, რადგან ჰემოპროტეინი სპეციფიკურია ჰიდროფობული სუბსტრატების მიმართ, განხილულ შემთხვევაში კი ყოველი რეაქციის შემდეგ მიღებული პროდუქტის პოლარობა საგრძნობლად იზრდება. ციტოქრომ P450-დამოკიდებული N-ჟანგვა მიმდინარეობს ანილინის ბიოტრანსფორმაციის შემთხვევაშიც (ნახ. 3.31) [20, 41].

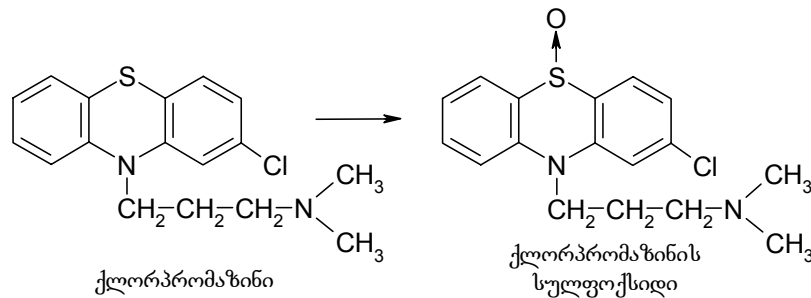


ნახ. 3.31. ანილინის ციტოქრომ P450-დამოკიდებული ჟანგვის გზები.

ანილინის N-ჟანგვაზე გაცილებით უფრო მაღალი სიჩქარით მიმდინარეობს *p*-ჰიდროქსილირების რეაქცია. ამ დროს წარმოქმნილი *p*-ამინოფენოლის პოლარობა უფრო მეტია, ვიდრე N-ჰიდროქსიანილინისა, ამიტომ უჯრედისთვის, დეტოქსიკაციის თვალსაზრისით, *p*-ჰიდროქსილირება უფრო ხელსაყრელი უნდა იყოს.

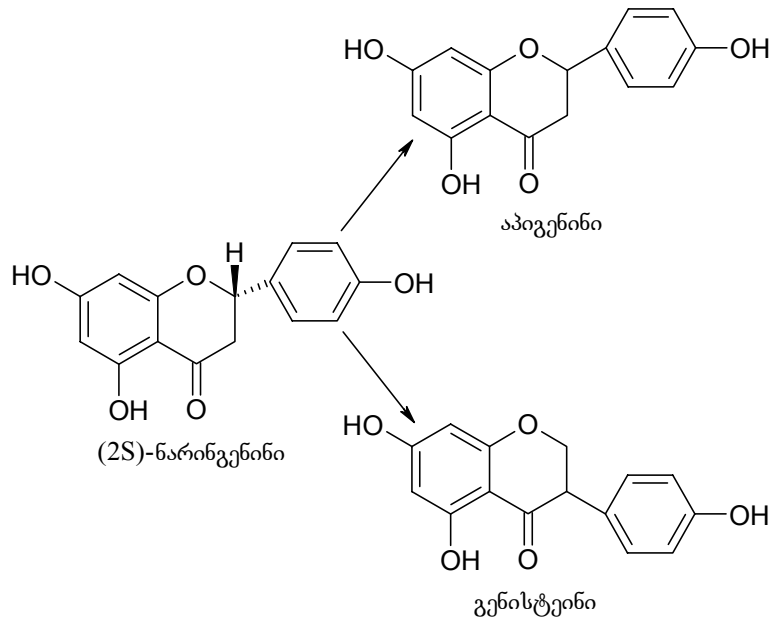
**S-ჟანგვა**, რომლის საშუალებითაც მიკროსომული მონოოქსიგენაზები გოგირდშემცველ ჰიდროფობულ ნაერთებს გარდაქმნიან, N-ჟანგვისაგან განსხვავებით, ყოველთვის ციტოქრომ P450-დამოკიდებულია. უნდა აღინიშნოს, რომ ამ დროს მიღებული პროდუქტი უფრო მაღალი ინსექტიციდური აქტივობით გამოირჩევა, ვიდრე საწყისი ნაერთი. წარმოქმნილი S-ოქსიდი შემდგომში სულფოჯგუფამდე იჟანგება.

მცენარეული ციტოქრომ P450-დამოკიდებული S-ჟანგვის მაგალითებია ქლორპრომაზინისა (ნახ. 3.32) და მეთიოკარბის გარდაქმნა შესაბამის სულფოქსიდში [55].



ნახ. 3.32. ქლორპრომაზინის S-ჟანგვა.

ციტოქრომ P450-დამოკიდებულ პროცესებს შორის ყველაზე იშვიათად **დეჰიდრირების** ტიპური რეაქცია გვხვდება. ციტოქრომ P450-შემცველი მონოოქსიგენაზა ასეთი ტიპის აქტივობას ამჟღავნებს ფლავონოიდების ბიოსინთეზში, როდესაც იგი C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> ნახშირბადოვანი ჩონჩხის მქონე ნაერთებიდან ფლავონოიდების სინთეზს აკატალიზებს. ამ დროს ციტოქრომ P450 ფუნქციონირებს, როგორც იზოფლავოსინთაზა, რომელიც აწარმოებს (2S)-ნარინგენინიდან იზოფლავონების – აბიგენინის და გენისტეინის წარმოქმნას (ნახ. 3.33) [62, 63].



ნახ. 3.33. ციტოქრომ P450-დამოკიდებული დეჰიდრირების რეაქციები იზოფლავონების ბიოსინთეზში.

ზემოთგანხილული მასალიდან ჩანს ერთი მხრივ, მცენარეული ციტოქრომ P450-შემცველი მონოოქსიგენაზური სისტემის პოლიფუნქციურობა, მეორე მხრივ კი მისი სპეციფიკურობა ჰიდროფობული ბუნების მქონე ნაერთების მიმართ. შეიძლება დავასკვნათ, რომ როგორც ბიოსინთეზურ, ასევე დეტოქსიკაციურ პროცესებში ციტოქრომ P450-ის მონაწილეობა გამოიხატება ენდოგენური ან ეგზოგენური ნაერთის ერთი კონკრეტული უბნის სპეციფიკურ გააქტიურებაში, რითაც ხშირ შემთხვევაში მეტაბოლური გზის მიმართულების განსაზღვრა ხდება.

## ლიტერატურა

1. Головенко, Н.Я. Некоторые аспекты биохимии, химии, молекулярной биологии и генетики цитохрома P450 (обзор литературы). [http://www.medved.kiev.ua/arhiv\\_mg/st\\_2001/01\\_3\\_3.htm](http://www.medved.kiev.ua/arhiv_mg/st_2001/01_3_3.htm)
2. Sandermann, H. Higher plant metabolism of xenobiotics: the "green liver" concept. *Pharmacogenetics*, 1994, 4, 225-241
3. მ. გორდეზიანი, გ. ხატისაშვილი. მემბრანული ქსენობიოქიმია. თბილისი, 2005
4. ვ. პაპუნძე, გ. ხატისაშვილი. თ.სადუნიშვილი. მცენარე ჯანმრთელი გარემოსათვის. ბათუმი, აჭარა, 2005
5. Kvesitadze, G., Khatisashvili, G., Sadunishvili, T., Ramsden, J.J. *Biochemical Mechanisms of Detoxification in Higher Plants: Basis of Phytoremediation*. Berlin, Heidelberg, Springer, 2006
6. Varazashvili T., Khatisashvili G., Kurashvili M., Pruidze M., Ananiashvili T., Zaalishvili G., Gordeziani M. Nitrobenzene oxidizing enzymes in plant cells. *Journal of Biological Physics and Chemistry*, 2001, 1, 85-88
7. Burken, J.G. Uptake and metabolism of organic compounds: green liver model. In: McCutcheon SC, Schnoor JL (eds) *Phytoremediation. Transformation and control of contaminants*. Wiley-Interscience, Hoboken, New Jersey, 2003, 59-84
8. Kvesitadze, G., Gordeziani, M., Khatisashvili, G., Sadunishvili, T., Ramsden, J.J. Some aspects of the enzymatic basis of phytoremediation. *J. Biol. Phys. Chem.*, 2001, 1, 49-57
9. Sandermann, H. Pestizid-Rückstände in Nahrungspflanzen. Die Rolle des pflanzlichen Metabolismus. *Naturwissenschaften*, 1987, 74, 573-578
10. Coleman, J.O.D., Mechteld, M.A., Kalf B, Davies, T.G.E. Detoxification of xenobiotics in plants: chemical modification and vacuolar compartmentation. *Trends Plant Sci.*, 1997, 2, 144-151
11. Lamoureux, G.L., Rusnes, D.G. Propachlor metabolism in soybean plants, excised soybean tissues, and soil. *Pestic Biochem. Physiol.*, 1989, 34, 187-204
12. Marrs, K.A. The function and regulation of glutathione S-transferases in plants. In: *Annu Rev Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 1996, 47, 127-158
13. Martinova, E. An ATP-dependent glutathione-S-conjugate "export" pump in the vacuolar membrane of plants. *Nature*, 1993, 364, 247-249
14. Korte, F., Kvesitadze, G., Ugrekhelidze, D., Gordeziani, M., Khatisashvili, G., Buadze, O., Zaalishvili, G., Coulston, F. Review: Organic toxicants and plants. *Ecotoxicol Environ Saf.*, 2000, 47, 1-26
15. Kvesitadze, G., Gordeziani, M., Khatisashvili, G., Sadunishvili, T., Ramsden, J.J. Some aspects of the enzymatic basis of phytoremediation. *J. Biol. Phys. Chem.*, 2001, 1, 49-57
16. Durmishidze, S., Ugrekhelidze, D. Assimilation and translocation of gaseous hydrocarbons by higher plants. In: *7th Int Congr Biochem. Tokyo, Abstr.*, 1967, J-302
17. Durmishidze, S., Ugrekhelidze, D. Absorption and conversion of butane by higher plants (in Russian). *Dokladi Akademii Nauk SSSR*, 1968, 182, 214-216

18. Durmishidze, S., Ugrekhelidze, D. Oxidation of ethane, propane and pentane by higher plants (in Russian). *Bull. Georg. Acad. Sci.*, 1968, 50, 661-666
19. Durmishidze, S., Ugrekhelidze, D. Absorption and transformation of methane by plants (in Russian). *Fiziol Rast (Moscow)*, 1975, 22, 70-73
20. Арчаков, А.И. Микросомальное окисление. М., Наука, 1975, 327
21. Frear, D.S., Swanson, H.R. New metabolites of monuron in excised cotton leaves. *Phytochemistry*, 1972, 11, 1919-1923
22. Liu, L.C., Shimabukuro, R.H., Nalevaja, J.D. Diuron metabolism in two sugarcane (*Saccharum officinarum*) cultivars. *Weed Sci* 26, 1978, 642-648
23. Haque, A., Weisgerber, J., Klein, W. Absorption, efflux and metabolism of the herbicide (14C) buturon as affected by plant nutrition. *J Exp Bot.*, 1977, 28, 468-472
24. Schuphan, I., Ebmz, W. Metabolism and balance studies of (14C) monolinuron after use in spinach followed by cress and potato cultures. *Pestic Biochem Physiol.*, 1978, 9, 107-113
25. Loh, A., West, S.D., Macy, T.D. Gas chromatographic analysis of tebuthiuron and its grass, sugarcane and sugarcane by-products. *J Agric Food Chem.*, 1978, 26, 410-415
26. Gross, D., Laanio, T., Dupius, T., Esser, H.O. The metabolic behaviour of chlorotoluron in wheat and soil. *Pestic Biochem Physiol.*, 1979, 10, 49-53
27. Ogawa, K., Tsuda, M., Yamauuchi, F., Yamaguchi, I., Misato, T. Metabolism of 2-sec. butylphenol N-methyl carbamate (Bassa, BMPC) in rice plants and its degradation in soils. *Pestic Sci.*, 1976, 1, 219-224
28. Pillai, C.G., Parthasarathy Weete, J.D., Davis, D.E. Metabolism of atrazine by *Spartina alterniflora*. 1. Chloroform-soluble metabolites *J Agric Food Chem.*, 1977, 25, 852-856
29. Weimer, M.R., Swisher, B.A., Vogel, K.P. Metabolism as a basis for differential atrazine tolerance in warm-season forage grasses. *Weed Sci.*, 1988, 36, 436-440
30. Wichman, J.R., Byrnes, W.R. Uptake, distribution and degradation of simazine by black walnut and yellow poplar seedlings. *Weed Sci.*, 1975, 23, 448-454
31. Edwards, R., Owen, W.J. The comparative metabolism of the 5-triazine herbicides atrazine and terbutryne in suspension cultures of potato and wheat. *Pestic Biochem Physiol.*, 1989, 34, 246-254
32. Rhodes, R. Metabolism of (2-14C)terbacil in alfalfa. *J Agric Food Chem.*, 1977, 25, 1066-1070
33. Penner, D., Early, R.W. Effect of alachlor, butylate and chlorbromuron on carbofuran distribution and metabolism in barley and corn. *Weed Sci.*, 1973, 21, 360-366
34. Archer, T.E., Stokes, J.D., Bringhurst, R.S. Fate of carbofuran and its metabolites in strawberries in the environment. *J. Agric. Food Chem.*, 1977, 25, 536-541
35. Ugrekhelidze, D. Metabolism of exogenous alkanes and aromatic hydrocarbons in plants (in Russian). *Metsnieraba, Tbilisi*, 1976
36. Durmishidze, S., Ugrekhelidze, D., Djikiya, A., Tsevelidze, D. The intermediate products of enzymatic oxidation of benzene and phenol (in Russian). *Dokladi Akademii Nauk SSSR*, 1969, 184, 466-469

37. Russel, D.W. The metabolism of aromatic compounds in higher plants. *J.Biol.Chem.*, 1971, 246, 3870-3878
38. Benveniste, I., Durst, F. Mise en evidence dans les tissues de tubercule de Zeopimber (*Helianthus tuberosus* 2 variet blanc commun) d'une enzyme a cytochrome P-450, l'acide trans-cinnamique 4-hydroxylase. *C.R.Acad.Sci., Paris*, 1974, 273, 11D, 1487
39. Rowell, Y., Potts, M., Wekluch, R., Conn, E.F. The hydroxylation of cinnamic acid by sorghum microsomes and reguilirement for cytochrome P-450. *J.Biol.Chem.*, 1974, 249, 5019-5026
40. Tanaka, Y., Kojima, M., Uritani, J. Propertiwis, development and cellular localization of cinnamic acid 4-hydroxylase in cut-injured sweet potato. *Plant and Cell Physiol.*, 1974, 15, 843-854
41. Парк, Д.В. Биохимия чужеродных соединений. М., Медицина, 1973, 287
42. Sweetser, P.B., Schow, G.S., Hutchinson, J.M. Metabolism of chlorsulfuron by plants: biological basis for selectivity of a new herbicide for cereals. *Pestic Biochem Physiol.*, 1982, 17, 18-23
43. McFadden, J.J., Gronwald, J.W., Eberlein, C.V. In vitro hydroxylation of benza-ton by microsomes from naphtallic anhydride-treated corn shoots. *Biochem Biophys Res Comm.*, 1990, 168, 206-211
44. McFadden, J.J., Frear, D.S., Mansager, E.R. Aryl hydroxylation of diclofop by a cytochrome P-450 dependent monooxygenase from wheat. *Pestic Biochem Physiol.*, 1989, 34, 92-100
45. Hutber, G.N., Lord, E.I., Loughman, B.C. The metabolic fate of phenoxyacetic acids in higher plants. *J Exp Bot.*, 1978, 29, 619-624
46. Fleeker, J., Steen, R. Hydroxylation of 2,4-D in several weed species. *Weed Sci.*, 1971, 19, 507-513
47. White, R.H., Liebel, R.A., Hymowitz, T. Examination of 2,4-D tolerance in perennial Glycine species. *Pestic Biochem Physiol.*, 1990, 38, 153-161
48. Devdariani, T. Biotransformation of cancerogenic polycyclic aromatic hydrocarbons in plants (in Russian). In: (Durmishidze, S. ed.) Biotransformation of xenobiotics in plants. Metsniereba, Tbilisi, 1988, 79-162
49. Мимигошвили, Т.В., Гагнидзе, Л.П., Гордезиани, М.Ш., Ломидзе, Э.П., Джикия А.Н. Окисление нафталина микросомами корней гороха. Труды II республиканской конференции на тему: "Проблемы экологической биофизики". Тбилиси, 1986, 129-131
50. Miminoshvili, T. V., Gagnidze, L. P., Gordeziani, M. Sh., Lomidze, E. P., and Djikya, A. N. Naphthalene oxidation by the microsomes of pea roots. In: Georgian 2<sup>nd</sup> Resp. Conf. Ecological Problems of Biosphere, Tbilisi, 1986, 129-131
51. Harms, H. Metabolisierung von Benzo(a)pyren in pflanzlichen Zellsuspensionkulturen and Weizenkeimpflanzen. *Landbauforsch Völkenrode*, 1975, 25, 83-90
52. Harms, H., Dehnen, W., Monch, W. Benzo[a]pyrene metabolites formed by plant cells. *Z Naturforsch*, 1977, 320, 321-326
53. Trenck, T., Sandermann, H. Oxygenation of benzo[a]pyrene by plant microsomal fractions. *FEBS Lett*, 1980, 119, 227-231
54. Devdariani, T., Durmishidze, S. Isolation and identification of the main ben-

- zo(a)pyrene oxidation products in plants (in Russian). In: Durmshidze S (ed) Methods of biochemical studies of plants. Metsniereba, Tbilisi, 1983, 101-124
55. Sibbesen, O., Koch, B., Halkier, B.A., Moller, B.L. Cytochrome P-450 TYR is a multifunctional heme-thiolate enzyme catalyzing the conversion of L-tyrosine to p-hydroxyphenylacetaldehyde oxime in the biosynthesis of the cyanogenic glucoside dhurrin in *Sorghum Bicolor* (L.) Moench. *J.Biol.Chem.*, 1995, 270, 3506-3511
  56. Schuler, M.A. Plant cytochrome P450 monooxygenases. *Crit Rev Plant Sci.*, 1996, 15, 235-284
  57. Morant, M., Bak, S., Moller, B.L., Werck-Reichhart, D. Plant cytochromes P450: tools for pharmacology, plant protection and phytoremediation. *Curr Opin Biotechnol.*, 2003, 2, 151-162
  58. Didierjean, L., Gondet, L., Perkins, R., Lau, S-M.C., Schaller, H., O'Keefe, D.P., Werck-Reichhart, D. Engineering herbicide metabolism in tobacco and *Arabidopsis* with CYP76B1, a cytochrome P450 enzyme from Jerusalem artichoke. *Plant Physiol.*, 2002, 130, 179-189
  59. Reichhart, D., Salaün, J.-P., Durst, F. Instability of plant cytochrome P-450 during incubation with NADPH. In: *Microsomes and Drug Oxid.*, 6-th Inter. Symp. Brighton, Aug. 5-10, 1984. London, Philadelphia, 1984, 33
  60. Hong, J.Y., Yang, C.S., Lee, M., Wang, Y.Y., Huang, W.Q., Tan, Y., Patten, C.J., Bondoc, F.Y. Role of cytochromes P450 in the metabolism of methyl tert-butyl ether in human livers. *Arch Toxicol.* 1997, 71(4), 266-9
  61. Hong, J.Y., Wang, Y.Y., Mohr, S.N., Bondoc, F.Y., Deng, C. Human cytochrome P450 isozymes in metabolism and health effects of gasoline ethers. *Res Rep Health Eff Inst.* May;(102):7-27; discussion 2001, 95-109
  62. Fayolle, F., Vandecasteele, J.P., Monot, F. Microbial degradation and fate in the environment of methyl tert-butyl ether and related fuel oxygenates. *Appl Microbiol Biotechnol.* Aug; 56(3-4), 2001, 339-49
  63. Durst, F. Physiology and biochemistry of plant cytochrome P-450. In *Frontiers in Biotransformation*, vol. 4, Berlin, Akademie Verlag, 1991, 191-232
  64. Chapple, C. Molecular-genetic analysis of plant cytochrome P450-dependent monooxygenases. *Annu Rev Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 1998, 49, 311-343



## თავი 4. მონოქსიგენაზური სისტემის რეგულაცია

ციტოქრომ P450-შემცველი მონოქსიგენაზური სისტემის ფუქციონირების თავისებურებათა გათვალისწინებით შეიძლება გამოიყოს მისი რეგულაციის შემდეგი დონეები:

- **რეგულაცია აღმდგენელი ექვივალენტების დონეზე** – კატალიზური ციკლის შესრულებისას ციტოქრომ P450 სუბსტრატში ჩასანერგ ჟანგბადს აღმდგენელი ექვივალენტების საშუალებით ააქტიურებს, ამიტომ ქსენობიოტიკთა ჟანგვა თავისთავად დამოკიდებული უნდა იყოს ყველა იმ ელექტრონის სატრანსპორტო სისტემაზე, რომელთაც ციტოქრომ P450-ის სათანადო ელექტრონებით უზრუნველყოფა შეუძლიათ;
- **რეგულაცია სუბსტრატულ დონეზე** – ციტოქრომ P450 სპეციფიკურია ჰიდროფობული სუბსტრატების მიმართ, ამიტომ მისი თვისობა რომელიმე კონკრეტული ქსენობიოტიკის მიმართ ამ უკანასკნელის ჰიდროფობულობის ხარისხზეა დამოკიდებული;
- **რეგულაცია ინდუქციის დონეზე** – ციტოქრომ P450 ინდუცირებადი ცილაა, უჯრედში მისი შემცველობა მკვეთრად იზრდება სხვადასხვა ფაქტორთა (მაგ., ქსენობიოტიკების ან პათოგენების მოქმედებით, განათების რეჟიმით და სხვ.) გავლენით;
- **რეგულაცია მემბრანულ დონეზე** – ციტოქრომ P450-ის, როგორც ჭეშმარიტად მემბრანული ფერმენტის მიერ კატალიზური აქტივობის გამომჟღავნება მნიშვნელოვნადაა დამოკიდებული მიკროსომების მემბრანულ ორგანიზაციასა და თვით მათში მიმდინარე ფიზიკურ-ქიმიურ პროცესებზე;
- **რეგულაცია ციტოქრომ P450-ის ქიმიური მოდიფიკაციის დონეზე** – ინდუქციის საპირისპიროდ, უჯრედში შეიძლება ადგილი ჰქონდეს ციტოქრომ P450-ის ინაქტივაციას ან ტრანსფორმაციას, რაც მის მიერ გენერირებული თავისუფალი რადიკალების ფერმენტზე ზემოქმედების შედეგია.

### 4.1 რეგულაცია აღმდგენელი ექვივალენტების დონეზე

#### 4.1.1 ურთიერთქმედება ელექტრონ-სატრანსპორტო გზებს შორის

მიკროსომულ NADH- და NADPH-სპეციფიკურ რედოქს-ჯაჭვების ურთიერთქმედებაში ძირითადად მათ შორის აღმდგენელი ექვივალენტების ცვლა და ჰიდროქსილირების აქტის განხორციელებაში თითოეული მათგან-

ნის თანამონაწილეობის დონის განსაზღვრა იგულისხმება. განსაკუთრებით მნიშვნელოვანია ელექტრონთა გადატანის მექანიზმისა და ამ პროცესში ციტოქრომ  $b_5$ -ის როლის გარკვევა. ამთავითვე აღვნიშნავთ, რომ [1] უამრავი გამოკვლევების შედეგად დაგროვილი ფაქტები იმის სასარგებლოდ მეტყველებენ, რომ:

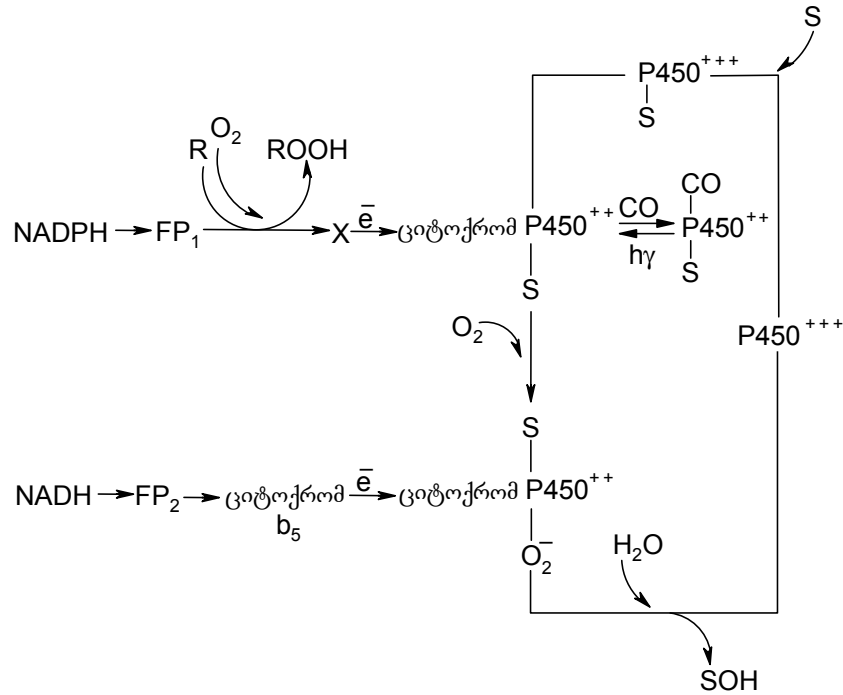
1. NADH-ის ჟანგვის ჯაჭვიდან NADPH-ის ჟანგვის ჯაჭვზე ადგილი აქვს აღმდგენელი ექვივალენტების გადატანას;
2. NADH-ციტოქრომ  $b_5$ -რედუქტაზა უშუალოდ მონაწილეობს ქსენობიოტიკთა ჰიდროქსილირებაში.

პირველი არგუმენტის ექსპერიმენტული დადასტურება აღდგენილი NADH-ით დიმეთილანილინის NADPH-დამოკიდებული ჰიდროქსილირების (N-დემეთილირების) სტიმულაციაა [1]. საინკუბაციო ხსნარში NADPH-ის დაბალი ( $K_M$ -ის რიგის) კონცენტრაციებისას, NADH-ის დამატება მნიშვნელოვნად აჩქარებს დიმეთილანილინისა და ეთილმორფინის N-დემეთილირების რეაქციებს. ეს შედეგი საშუალებას იძლევა მიღებულ იქნას, რომ NADH-ის ჟანგვის პროცესში მისი რედუცირებადი ექვივალენტები შეიძლება მოხდნენ NADPH-ის რედოქს-ჯაჭვში და როდესაც ეს უკანასკნელი სრულადაა გაჯერებული თავისი სუბსტრატით, მასტიმულირებელი გავლენა მოახდინოს ჰიდროქსილირების რეაქციაზე. შემდგომ დადგენილ იქნა, რომ NADH-ის მასტიმულირებელი ეფექტი ვლინდება NADPH-ის როგორც დაბალი, ასევე მაღალი კონცენტრაციებისას და აგრეთვე NADPH-გენერირებადი სისტემის (გლუკოზისა და გლუკოზო-6-ფოსფატდეჰიდროგენაზის ნარევის) დამატებისას. ამ ფაქტებზე დაყრდნობით ესტაბრუება და თანამშრომლობა (1971 წ.) [2, 3], ხოლო ცოტა მოგვიანებით არჩაკოვმა და თანამშრომლობა (1974 წ.) [1] წარმოადგინეს NAD(P)H-სისტემათა მონაწილეობის სქემები ციტოქრომ P450-ის მიერ განხორციელებულ ჰიდროქსილირების რეაქციებში. საჭიროდ ვთვლით თვალსაჩინოებისათვის მოვიყვანოთ ორივე სქემა (ნახ. 4.1 და 4.2).

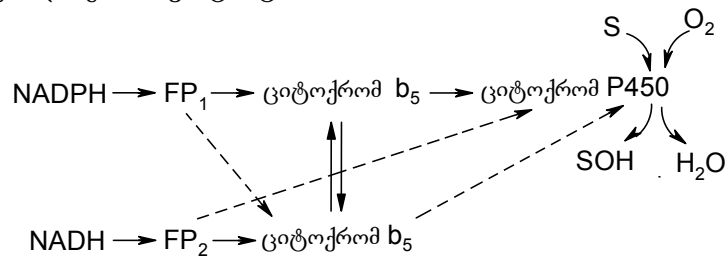
როგორც ვხედავთ, ამ ორ სქემას შორის პრინციპული განსხვავებაა. ნახ. 4.1-ზე მოცემულ სქემაზე არაა დაკონკრეტებული ფლავოპროტეინისა და ციტოქრომ P450-ს შორის არსებული შუალედური გადამტანი და იგი დაუდგენელ X-კომპონენტად ითვლება. ნახ. 4.2-ზე წარმოდგენილი სქემის თანახმად კი ამ უბანზე ფუნქციონირებს ციტოქრომ  $b_5$ -ის ქვეფრაქცია, რომელიც მიკროსომებში ამ ჰემოპროტეინის საერთო შემცველობის 20–30%-ს არ აღემატება.

ესტაბრუების სქემის მიხედვით ელექტრონთა გადატანის NADPH-ისა და NADH-ის რედოქს-ჯაჭვები დამოუკიდებლად ფუნქციონირებენ. NADPH-ის ჟანგვის სისტემა ციტოქრომ P450-ის აღდგენისათვის საჭირო

პირველ ელექტრონს, ხოლო NADH-ის ჟანგვის გზა ციტოქრომ  $b_5$ -ის გავლით ჟანგბადის გააქტივებისათვის საჭირო მეორე ელექტრონს იძლევა. არჩაკოვის სქემის მიხედვით კი ელექტრონთა გადატანის ორივე გზას საერთო უბანი გააჩნია და ყოველ ჯაჭვს ჰიდროქსილირებისათვის აუცილებელი ორივე ელექტრონით უზრუნველყოფს.



ნახ. 4.1. ელექტრონების გადატანა ენდოპლაზმური რეტიკულუმის მემბრანებში (ესტაბრუკის მიხედვით) [2, 3]. R – უჯერი ცხიმოვანი მჟავაა, S – ჰიდროქსილირების სუბსტრატია.



ნახ. 4.2. რედოქს-ჯაჭვებს შორის რედუცირებადი ექვივალენტების ცვლის შესაძლო გზები (არჩაკოვის მიხედვით)[4]. სრული ისრებით აღნიშნულია ელექტრონთა ყველაზე სავარაუდო ცვლის გზები.

არსებული ფაქტები ჯერჯერობით არ იძლევიან რომელიმე სქემის უტყუარობის სრულ გარანტიას.

ნიკოტინამიდური კოფერმენტების თანამყოფობისას ჰემოპროტეინის ალდგენის სიჩქარის გაზომვა საშუალებას იძლევა, დადგინდეს რედოქს-ჯაჭვების შიგნით ელექტრონთა გადატანის სიჩქარეების კონსტანტები, აგრეთვე NADH-ის ჟანგვის ჯაჭვიდან NADPH-ის ჟანგვის ჯაჭვზე ელექტრონთა გადატანის რეაქციის სიჩქარეთა კონსტანტები. ამ შემთხვევაში შეუძლებელია გაიზომოს მხოლოდ NADPH-სპეციფიკური რედოქს-ჯაჭვიდან NADH-ის ჟანგვის ჯაჭვზე ელექტრონის გადატანის სიჩქარე. მიუხედავად ამისა, NADPH-ით ციტოქრომ  $b_5$ -ის ალდგენის მრუდი გვიჩვენებს, რომ ეს სიჩქარე საკმაოდ მაღალია და NADPH-ის ჟანგვის ჯაჭვში ციტოქრომ  $b_5$ -ის ალდგენის სიჩქარესთან სავსებით შესადარებელი სიდიდეა [1]. ამ მრუდზე არ ჩნდება „გადატეხის წერტილები“, რომელთაც შეიძლება ჰქონდეს NADPH-სადმი სპეციფიკური ფლავოპროტეინ-რედუქტაზით ციტოქრომ  $b_5$ -ის ორი ქვეფრაქციის განსხვავებული სიჩქარით ალდგენა ეჩვენებინათ. საფიქრებელია, რომ NADPH-სპეციფიკური ფლავოპროტეინით ორივე ციტოქრომი ერთნაირი სიჩქარით ალდგება, ანუ NADPH-ის ჟანგვის ჯაჭვიდან NADH-ის ჟანგვის ჯაჭვზე ელექტრონთა გადატანა მიმდინარეობს იმავე, ან უფრო მეტი სიჩქარით, რაც თვით NADPH-ის ჟანგვის ჯაჭვში ციტოქრომ  $b_5$ -ის ალდგენას გააჩნია. ვინაიდან NADH-ის ჟანგვის ჯაჭვში ციტოქრომ  $b_5$ -ის შემცველობა NADPH-ის ჟანგვის ჯაჭვთან შედარებით გაცილებით მაღალია, ამიტომ NADPH-ის ჟანგვის ჯაჭვიდან NADH-ის ჟანგვის ჯაჭვზე ელექტრონთა გადატანის რეაქციის სიჩქარის კონსტანტა არ შეიძლება NADPH-ციტოქრომ  $b_5$ -რედუქტაზული რეაქციის სიჩქარის კონსტანტაზე ნაკლები იყოს.

რედოქს-ჯაჭვებს შორის ელექტრონთა გადანაწილების ზუსტი უბნების დასადგენად შესწავლილ იქნა ფერმენტ პრონაზას ეფექტურობა [1]: დაბალი კონცენტრაციებისას მას NADPH-სპეციფიკური ფლავოპროტეინის შერჩევითი სოლუბილიზებისა და ამდენად, ციტოქრომების  $b_5$ -ისა და P450-ის ალდგენის სიჩქარეზე ზემოქმედების უნარი გააჩნია. საინკუბაციო ნარევეში პრონაზის დამატებისას მნიშვნელოვნად ქვეითდება NADPH-ით ციტოქრომ  $b_5$ -ის ალდგენის რეაქციის სიჩქარე, მაგრამ პრაქტიკულად არ იცვლება NADH-ით მისი ალდგენა. ამგვარად, თუ NADH-ის თანამყოფობისას ციტოქრომ P450-ის ალდგენა NADH-რედოქს-ჯაჭვიდან NADPH-ის ჟანგვის ჯაჭვზე ელექტრონების გადასვლის შედეგია, მაშინ მიკროსომების პრონაზით დამუშავებას ამ რეაქციის ისეთივე ინჰიბირება უნდა გამოეწვიოს, როგორსაც ელექტრონთა NADPH-სპეციფიკური გადატანის სხვა რეაქციები განიცდიან. ამის საპირისპიროდ აღმოჩნდა, რომ მიკროსომების პროტეაზუ-

ლი დამუშავება NADH-ციტოქრომ P450-რედუქტაზულ რეაქციაზე არ მოქმედებს [1]. ეს შედეგი თავისთავად გამორიცხავს NADPH-სპეციფიკური ფლავოპროტეინის მონაწილეობას ელექტრონთა საბოლოო გადატანაში NADH-ის ჟანგვის ჯაჭვიდან NADPH-ის ჟანგვის ჯაჭვზე. სხვაგვარად რომ ითქვას, რედოქს-ჯაჭვებს შორის ელექტრონთა გადაწვლილება წარმოებს არა საწყის – ფლავოპროტეინულ უბანზე, არამედ მომდევნო – ციტოქრომების დონეზე. ამის სასარგებლოდ მეტყველებს ის ფაქტიც, რომ მიკროსომებში არაა იდენტიფიცირებული  $NADH + NADP \rightarrow NAD + NADPH$  რეაქციის მაკატალიზებელი ფერმენტი – ტრანსდეჰიდროგენაზა.

ანალოგიური შედეგები იქნა მიღებული დიმეთილანილინის N-დემეთილირების რეაქციის სიჩქარეზე პროპილგალატის მაინჰიბირებელი მოქმედების შესწავლითაც, როდესაც კოსუბსტრატებად NADPH და NADH გამოიყენებოდა [1]. ეს ნივთიერება ურთიერთქმედებს და თრგუნავს NADPH-სპეციფიკურ ფლავოპროტეინს. NADH-ის ჟანგვის ჯაჭვიდან NADPH-ის ჟანგვის ჯაჭვში ელექტრონთა გადატანა საწყის ფლავოპროტეინულ უბანზე რომ ხდებოდეს, აღნიშნულ ინჰიბიტორს უნდა მოეხსნა NADPH-ის თანამყოფობით ინდუცირებულ დემეთილირების რეაქციაზე NADH-ის მასტიმულირებელი მოქმედება. გარდა ამისა, პროპილგალატს უნდა დაეთრგუნა NADH-ის თანამყოფობისას ციტოქრომების –  $b_5$ -ისა და P450-ის ალდგენის სიჩქარე. ჩატარებულმა გამოკვლევებმა აჩვენეს, რომ ეს ინჰიბიტორი აბსოლუტურად არაეფექტურია NADH-დამოკიდებული რეაქციების მიმართ.

მიკროსომების ორ სუნთქვით ჯაჭვს შორის ელექტრონთა ცვლის შესაძლო პუნქტი, როგორც ჩანს, ციტოქრომ  $b_5$ -ის დონეა. ამასთან, ყოველთვის არ ხდება ელექტრონთა გადატანა  $FP_2$ -დან ციტოქრომ P450-ზე [5, 6]. მძლავრი NADH-ციტოქრომ  $b_5$ -რედუქტაზული სისტემის არსებობისას NADH-ის ჟანგვის ჯაჭვში ციტოქრომ  $b_5$  მთლიანად ალდგენილ მდგომარეობაშია და მხოლოდ NADH-ის სიჭარბისას შეიძლება ელექტრონის გადატანის ეს გზა ჩაირთოს:  $NADH \rightarrow FP_2 \rightarrow$  ციტოქრომ P450.

არსებობს ექსპერიმენტული მონაცემები, რომლებიც მიკროსომებში ასეთი ფერმენტული კომპლექსის ფუნქციონირებას ადასტურებენ [7]. თუმცა NADH-ციტოქრომ P450-რედუქტაზის გამოყოფილი პრეპარატი ციტოქრომ  $b_5$ -ს მხოლოდ კვალის სახით შეიცავს.

განხილული ფაქტებიდან გამომდინარე, უნდა აღინიშნოს, რომ NADPH-ის ჟანგვის ჯაჭვიდან NADH-ის ჟანგვის ჯაჭვზე რედუცირებადი ექვივალენტების გადატანა შეიძლება ხდებოდეს ან ამ უკანასკნელში მყოფი ციტოქრომ  $b_5$ -ის NADPH-სპეციფიკური ფლავოპროტეინით უშუალო ალდგენის გზით, ან ამ ციტოქრომზე ელექტრონთა გადატანით NADPH-დამოკიდე-

ბული გზის ციტოქრომ  $b_5$ -დან. ამ რეაქციის სიჩქარე NADPH-ის ჟანგვის ჯაჭვში ციტოქრომ  $b_5$ -ის ალდგენის სიჩქარის ტოლია.

NADH-სპეციფიკური ჯაჭვიდან NADPH-ის ჟანგვის ჯაჭვზე ელექტრონთა გადასატანად შეიძლება გამოირჩეს სამი ყველაზე შესაძლო გზა:

1. უშუალოდ NADH-სპეციფიკური ფლავოპროტეინიდან ციტოქრომ P450-ზე;
2. უშუალოდ NADH-დამოკიდებული გზის ციტოქრომ  $b_5$ -დან ციტოქრომ P450-ზე;
3. NADH-ის ჟანგვის ჯაჭვის ციტოქრომ  $b_5$ -დან NADPH-ის ჟანგვის გზით ციტოქრომ  $b_5$ -ზე.

ამ რეაქციათა სიჩქარეები ძლიერ მცირეა.

წარმოდგენილ სქემებს საერთო ის გააჩნიათ, რომ ორივეში დაშვებულია ციტოქრომ  $b_5$ -დან ციტოქრომ P450-ზე ელექტრონთა უშუალო გადატანის შესაძლებლობა. NADH-რედოქს-ჯაჭვიდან ციტოქრომ P450-ჰიდროქსილაზურ სისტემაზე ციტოქრომ  $b_5$ -ის საშუალებით ელექტრონთა გადატანა ამჟამად დადასტურებულ ფაქტად შეიძლება მივიჩნიოთ.

ამგვარად, შეგვიძლია სარწმუნოდ მივიღოთ, რომ NADH-ის ჟანგვით ჯაჭვში არ არსებობს ელექტრონთა ტერმინალური აუტოოქსიდაბელური აქცეპტორი. ამ ჯაჭვში ციტოქრომ  $b_5$  მუდმივად ალდგენილ მდგომარეობაში იმყოფება და ელექტრონთა თავისებური კოლექტორის როლს ასრულებს, საიდანაც ალდგენელი ექვივალენტების გადინება შეიძლება განხორციელდეს ან მიკროსომების NADPH-დამოკიდებული რედოქს-ჯაჭვით, ან მიტოქონდრიის ციტოქრომოქსიდაზული სისტემით, რომელზეც მომდევნო პარაგრაფში გვექნება საუბარი.

#### 4.1.2 ელექტრონთა ტრანსმემბრანული ცვლა მიკროსომასა და მიტოქონდრიას შორის

ელექტრონთა ტრანსმემბრანული მიგრაცია საყოველთაოდ ცნობილი ფაქტია [8, 9]. კონკრეტულ შემთხვევებში რედუცირებადი ექვივალენტების მემბრანათა შორის გადატანა შეიძლება განხორციელდეს ორ მეზობელ მიკროსომულ მემბრანას შორის, ორ მიტოქონდრიულ მემბრანას შორის, ან მიკროსომულ და მიტოქონდრიულ მემბრანებს შორის. მემბრანული ქსენობიოქიმიისათვის განსაკუთრებით საყურადღებოსა და საინტერესოს მესამე შემთხვევა წარმოადგენს, რადგან:

1. მიტოქონდრიიდან მიკროსომაზე, კერძოდ, NADPH-სპეციფიკურ რედოქს-

ჯაჭვზე ელექტრონთა გადასვლას თან ახლავს ამ უკანასკნელის ჟანგვითი უნარის გაძლიერება და შესაბამისად, ქსენობიოტიკთა მთლიანი ბიოდევრადაციის პროცესის საწყისი, სინქარემალიმიტირებელი სტადიის – ჰიდროქსილირების რეაქციის სინქარის მნიშვნელოვანი ზრდა. მაშასადამე, ამ შემთხვევაში აღვილი აქვს მიტოქონდრიის მხრიდან ქსენობიოტიკთა ჟანგვითი გარდაქმნების რეგულაციას აღმდგენელი ექვივალენტების დონეზე. ლიტერატურაში ეს ფენომენი „მიტოქონდრიული კონტროლის“ სახელწოდებით მოიხსენიება. ამ რეგულატორული მექანიზმის კიდევ ერთი ბიოლოგიური მნიშვნელობა იმაში მდგომარეობს, რომ ენდოპლაზმურ მემბრანებში ქსენობიოტიკთა ჟანგვის გაძლიერებით, მიტოქონდრია თავს იზღვევს მაღალი კონცენტრაციებით მასში უცხო ნივთიერებების მოხვედრისაგან, რომლებიც სუნთქვითი ჯაჭვის (ციტოქრომოქსიდაზური სისტემის, განსაკუთრებით პირველი კომპლექსის – NADH-CoQ-რედუქტაზის) ძლიერ ინჰიბირებასა და ენერგეტიკული ცვლიდან მიტოქონდრიის გამოთიშვას იწვევს.

2. მიკროსომული NADPH-სპეციფიკური ჟანგვის ჯაჭვიდან მიტოქონდრიაზე რედოქს-ექვივალენტების გადატანით აქტიურდება ციტოქრომოქსიდაზური სისტემა, რაც ენერგეტიკული შეუღლებისა და მიტოქონდრიის (მთლიანად უჯრედის) ენერგეტიკული სტატუსის ზრდაში მდგომარეობს. ასეთი ფუნქციის შეძენით მიკროსომული ჟანგვის სისტემა, სხვა მეტაბოლური გზების ანალოგიურად, „სრულ უფლებებშია აღდგენილი“ ენერგეტიკული და პლასტიური ცვლის თვალსაზრისით. აქ მნიშვნელოვანია მეორე გარემოებაც: მიტოქონდრიის შიდა მემბრანა ექსტრამიტოქონდრიული NADPH-ისათვის განუვლადია; ამიტომ ენერგეტიკული საჭიროებებისათვის მისი აღდგენილი ექვივალენტების ასეთი უშუალო და პირდაპირი გამოყენება შეუძლებელია. იმ შემთხვევაში, როდესაც მიკროსომული NADPH-სპეციფიკური ჯაჭვი ქსენობიოტიკის ჰიდროქსილირებით არაა დაკავებული (მისი ციტოქრომ  $b_5$  „მოცლილია“), მას ამ ნიკოტინამიდური კოფერმენტის თავისუფალი, ჰიდროქსილირებასთან არაშეუღლებული ჟანგვა და მისი აღმდგენელი ექვივალენტების მიტოქონდრიაზე გადაცემა ძალუძს. მაშასადამე, NADPH-ის თავისუფალმა ჟანგვამ შეიძლება მიკროსომისა და მიტოქონდრიის ენერგეტიკული შეუღლება განახორციელოს. ცხადია, ამ შემთხვევაში სახეზე გვექნება NADPH-ის ელექტრონების მიტოქონდრიული რეალიზაციის კიდევ ერთი ალტერნატიული გზა.

#### 4.1.2.1 მიტოქონდრიული კონტროლი

პირველად იგი ღვიძლის ჰეპატოციტებში იქნა გამოვლენილი [10-16] (სინტი, შენკმანი და სხვ., 1972-1973 წ.წ.) და მისი არსი მიტოქონდრიული ჟანგვის სუბსტრატებით ციტოქრომ P450-ის I-ტიპის ქსენობიოტიკთა ჰი-

დროქსილირების სტიმულაციაში მდგომარეობს. სხვაგვარად რომ ვთქვათ, მიტოქონდრიები ენდოპლაზმურ მემბრანებში უცხო ნაერთთა ბიოტრანსფორმაციის უჯრედული კონტროლის ადგილს წარმოადგენენ. მიტოქონდრიებისა და მიკროსომების კომბინირებულ სისტემაში ამ კონტროლის განსახორციელებლად ორი ყველაზე შესაძლო მექანიზმი იკვეთება:

1. მიტოქონდრიიდან მიკროსომაზე რელუცირებადი ექვივალენტების გადატანა ორი (მიტოქონდრიული და მიკროსომული) ციტოქრომ  $b_5$ -ის საშუალებით, რისთვისაც აუცილებელი პირობაა ორივე ტიპის მემბრანულ სტრუქტურათა უშუალო კონტაქტი;
2. პირიდინუკლეოტიდების გაშუალებული გადატანა მალატ-ასპარტატული და იზოციტრატული შუნტირებით (მაქოსებური მექანიზმით), როდესაც შიდამიტოქონდრიულ NADH-ს მიკროსომულ ჰიდროქსილირებაში მონაწილეობის მიღება შეუძლია ციტოქრომ P450-სუბსტრატის კომპლექსზე ელექტრონის გადატანის გზით.

მაშასადამე, მიტოქონდრიული კონტროლის განხორციელებისას მიკროსომის ელექტრონთა სატრანსპორტო სისტემა ქსენობიოტიკთა ჟანგვითი დეგრადაციისათვის საჭირო ენერგიას მიტოქონდრიებიდან იღებს არა ATP-ს ქიმიური ენერგიის, არამედ სათანადო ენერგიის მქონე ელექტრონების სახით.

მიტოქონდრიულ კონტროლს სტრუქტურული ასპექტებიც გააჩნია. ელექტრონული მიკროსკოპიით ნაჩვენებია, რომ კომბინირებულ სისტემაში პირუვატის დამატებისას ენდოპლაზმური რეტიკულუმის მემბრანები ვეზიკულებად გარდაიქმნებიან და მიტოქონდრიის გარშემო ორიენტირდებიან [10]. ამ დროს, როგორც ჩანს, აუცილებელი ხდება „მოცლილი“ ციტოქრომ  $b_5$ -ის დიდი რაოდენობით გამოყენება, რათა მოძებნილ იქნას მემბრანულ სტრუქტურათა საკონტაქტო ადგილები ამ უბნებზე რედოქს-პოტენციალების სწრაფად გასათანაბრებლად. ელექტრონთა ტრანსმემბრანული გადატანა მიტოქონდრიული ფილამენტის ერთგანზომილებიან და ენდოპლაზმური ბადის ცისტერნათა ორგანზომილებიან სივრცეში დიფუზიის გაძლიერების პირობებს ქმნის. საფიქრებელია, რომ უჯრედის სხვადასხვა უბნებში რედოქს-პოტენციალები ამ გზით უფრო სწრაფად თანაბრდება, ვიდრე ციტოზოლის სამგანზომილებიან სივრცეში მეტაბოლიტებისა და კოფაქტორების თავისუფალი დიფუზიით.

ცხოველურ ქსოვილში მიტოქონდრიული კონტროლის რეალური არსებობა მომდევნო წლებში სხვა ავტორთა მიერაც იქნა დადასტურებული [14-17]. პროცესის რეგულატორულ მექანიზმს დღეს შემდეგი ახსნა აქვს: ქსენობიოტიკის მაღალი კონცენტრაცია, რომელმაც ციტოქრომ P450 სრულად გააჯერა, მიტოქონდრიაში შეიღწევა და სუნთქვითი ჯაჭვის ინჰიბირებას

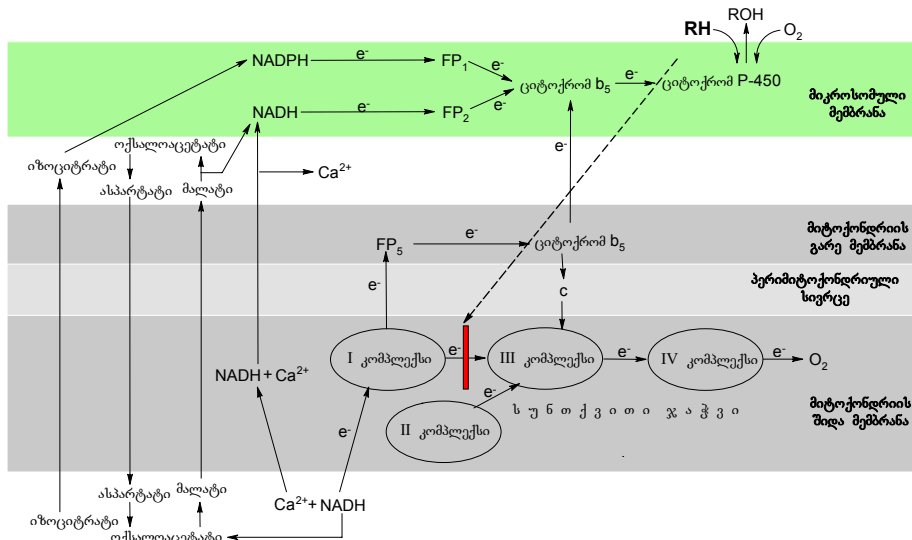


იწვევს. ამ პირობებში ადგილი აქვს მიტოქონდრიდან მიკროსომაზე ციტოქრომ P450-ის მაქსიმალური ფუნქციონირებისათვის საჭირო აღმდგენელი ექვივალენტების დამატებითი ნაკადის წარმოქმნას. ამის შედეგად იზრდება ქსენობიოტიკის ჟანგვის სიჩქარე, რის შედეგადაც მიტოქონდრიულ სუნთქვაზე მისი მახლოკირებელი მოქმედება მოიხსნება. საფიქრებელია, რომ მიტოქონდრიის NADH-დეჰიდროგენაზიდან (სუნთქვითი ჯაჭვის I ანსამბლიდან) ელექტრონთა ტრანსმემბრანულ გადატანაში ჩართულია ციტოქრომ  $b_5$ -ის ორივე (მიტოქონდრიის გარე მემბრანისა და მიკროსომის) ქვეფრაქცია. ამ ვარაუდს ადასტურებს ერთი მხრივ, მიტოქონდრიულ კონტროლში სუქცინატის (სუნთქვითი ჯაჭვის II ანსამბლის სუბსტრატის) აბსოლუტური არაეფექტურობა, ხოლო მეორე მხრივ, ქსენობიოტიკის ჟანგვის გაძლიერება I კომპლექსის ინჰიბიტორებით – როტენონითა და ამიტალით. ქსენობიოტიკთა ჟანგვაში ასეთი დახვეწილი რეგულატორული მექანიზმის არსებობის მიუხედავად, მაინც ითვლება, რომ ელექტრონთა მიტოქონდრიული წყარო ჰიდროქსილირების პროცესისათვის მაინც დამხმარეა და იმ წყაროსთან შედარებით, რომელსაც მიკროსომული NADPH-დამოკიდებული ელექტრონთა სატრანსპორტო გზა წარმოადგენს, მეორეხარისხოვანია.

ყოველივე ზემოთქმული შეგვიძლია წარმოვიდგინოთ სქემატურად (ნახ. 4.3), რომელშიც გათვალისწინებულია მიტოქონდრიულ კონტროლში იზოციტრატული და მალატ-ასპარტატული მაქოსებური მექანიზმების მონაწილეობაც.

რა ვითარება გვაქვს ამ მიმართებით მცენარეულ უჯრედში? ჩვენს ლაბორატორიაში, უპირველეს ყოვლისა, შეისწავლებოდა ქსენობიოტიკის (დიმეთილანილინის) გავლენა მიტოქონდრიებში სუქცინატისა და იზოციტრატის ჟანგვაზე [16]. აღმოჩნდა, რომ პირველის ჟანგვის სიჩქარე 1/3-ით ქვეითდება, მაგრამ სუნთქვითი კონტროლი უცვლელი რჩება. უფრო ძლიერ ინჰიბირებას განიცდის იზოციტრატის ჟანგვა. ამ პროცესის სიჩქარე ნახევრდება, ხოლო სუნთქვითი კონტროლის მნიშვნელობა 3-დან 2.5-მდე მცირდება. მაშასადამე, დიმეთილანილინი უდავოდ ინჰიბიტორულად მოქმედებს სუნთქვითი ჯაჭვის, და განსაკუთრებით, მისი I კომპლექსის ფუნქციონირებაზე.

მცენარის მიკროსომებისა და მიტოქონდრიების კომბინირებულ სისტემაში დიმეთილანილინის N-დემეთილირება ძლიერდება მალატის, იზოციტრატის და სუქცინატის დამატებით [17], ე.ი. დიმეთილანილინის მიკროსომული ჟანგვა მიტოქონდრიული კონტროლის ქვეშ იმყოფება. საყურადღებოა, რომ ეს ეფექტი ვლინდება კომბინირებულ სისტემაში, მაგრამ არა მთლიან ქსოვილში.



ნახ. 4.3. ქსენობიოტიკების ჰიდროქსილირების „მიტოქონდრიული კონტროლის“ სავარაუდო სქემა. პუნქტირით მოცემული ქსენობიოტიკის მანიპულირებელი მოქმედება სუნთქვით ვჯაჯვზე.

ლიმონმჟავას ციკლის ინტერმედიატების მასტიმულირებელი მოქმედება ჩამორჩება NADPH-ის ეფექტს. ამასთან, NADPH-ით მიღწეული ქსენობიოტიკის ჟანგვის სტიმულაცია მიტოქონდრიის სუბსტრატთა დამატებისას აღარ იზრდება, ე.ი. საინკუბაციო სუსპენზიაში ეგზოგენურად დამატებული NADPH-ის თანამყოფობისას, მიტოქონდრიული კონტროლი აზრს კარგავს და იხსნება. მნიშვნელოვანია ისიც, რომ ქსენობიოტიკის დასაჟანგად საჭირო ელექტრონები ციტოქრომ P450-მა შეიძლება ცალკეულად მიიღოს ან მხოლოდ NADPH-დან, ან მხოლოდ მიტოქონდრიიდან, მაგრამ უპირატესობა პირველს ენიჭება.

ცდების ცალკე სერიაში კომბინირებულ სისტემას ციტოქრომოქსიდაზის დასაბლოკად ნატრიუმის აზიდს ვამატებდით [17]. ამ დროს მიტოქონდრიიდან მიკროსომაზე ელექტრონთა მიგრაციისათვის ოპტიმალური პირობები იქმნება. პროცესის ინტენსივობას ამჯერად ციტოქრომების P450-ისა და ხ<sub>5</sub>-ის ალდეგენის კინეტიკით ვაფასებდით. მიტოქონდრიულ ჟანგვის სუბსტრატებთან შედარებით, NADPH-ის მოქმედების ეფექტი ამ შემთხვევაშიც უფრო მაღალი აღმოჩნდა. უნდა აღინიშნოს, რომ ორივე ციტოქრომის ალდეგენის დონეები ყველა ვარიანტში ერთმანეთთან კორელაციაშია, რაც მიტოქონდრიულ კონტროლში ციტოქრომ ხ<sub>5</sub>-ის უშუალო მონაწილეობაზე მი-

უთითებს.

მიღებული შედეგებიდან ყურადღებას იმსახურებს N-დემეთილირებაზე სუქცინატის მასტიმულირებელი მოქმედება, რაც პროცესში სუნთქვითი ჯაჭვის II კომპლექსის (სუქცინატდეჰიდროგენაზის) მონაწილეობის მაჩვენებელია. როგორც ჩანს, ამ კომპლექსიდან ელექტრონები პირდაპირ ხვდებიან მიკროსომების NADPH-სპეციფიკურ ჟანგვით ჯაჭვზე. ამ ფაქტს ადასტურებს სუქცინატდეჰიდროგენაზის ინჰიბიტორების – მალონატისა და ოქსალოაცეტატის დამთრგუნველი მოქმედება მიკროსომული ციტოქრომების აღდგენაზე [17]. გარდა ამისა, სუქცინატის ეფექტი არამგრძნობიარე აღმოჩნდა როტენონის მოქმედების მიმართ, რაც იმის მაჩვენებელია, რომ ამ დროს მიგრაციაში სუნთქვითი ჯაჭვის I კომპლექსი არ მონაწილეობს.

მიტოქონდრიებიდან მიკროსომებზე ელექტრონების გადატანის ინტენსივობა დამოკიდებულია ჟანგვისა და ფოსფორილების შეუღლების ხარისხზე. ჩვენ შევძელით გვეჩვენებინა [17], რომ ციტოქრომ P450-ის აღდგენის მაღალი სიჩქარე დაბალი ენერგეტიკული შეუღლების, ან ჟანგვისა და ფოსფორილების 2,4-დინიტროფენოლით გათიშვისას მიიღება. ADP-ს დამატებით შეუღლების გაზრდისას პირიქით, ჰემოპროტეინის აღდგენის სიჩქარე მუხრუჭდება. მაშასადამე, მიტოქონდრიიდან მიკროსომაზე ელექტრონების მიგრაციის ერთ-ერთ აუცილებელ პირობას სუნთქვითი ჯაჭვში ელექტრონების თავისუფალი ნაკადის არსებობა წარმოადგენს.

სავსებით მისაღებია, რომ მიტოქონდრიიდან მიკროსომაზე ელექტრონების გადატანაში ერთდროულად სუნთქვითი ჯაჭვის I, II და III კომპლექსები მონაწილეობენ, მაგრამ ენერგეტიკული თვალსაზრისით უფრო ხელსაყრელია, რომ ელექტრონთა მიგრაცია II და III კომპლექსიდან ხდებოდეს, რადგან აქ ელექტრონს შედარებით დაბალი ენერგია აქვს. რაც შეეხება I კომპლექსიდან მიკროსომებზე ელექტრონთა პირდაპირ გადატანას, იგი იძულებითი გზა უნდა იყოს, რომელიც III კომპლექსის ბლოკირებისას იწყებს ფუნქციონირებას. მიტოქონდრიული კონტროლის განხორციელებაში ციანიდ-რეზისტენტული სუნთქვის სისტემებიც შეიძლება მონაწილეობდნენ, რადგან მათ  $\text{bc}_1$ -კომპლექსზე ელექტრონთა უშუალო შემოტანის უნარი აქვთ.

#### 4.1.2.2 NADPH-ის თავისუფალი მიკროსომული ჟანგვა

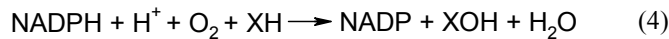
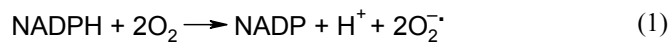
ცხოველური ქსოვილისა და ბაქტერიების მონოოქსიგენაზებისაგან განსხვავებით, ღვიძლის ციტოქრომ P450 არც ერთ სუბსტრატს არ ჟანგავს სრული შეუღლებით და NADPH-ის რედოქს-ექვივალენტების ხარჯვა ყოველთვის არაა დაკავშირებული ქსენობიოტიკის ჰიდროქსილირებასთან

[18]. მისი გარკვეული ნაწილი სხვა ოქსიდაზურ რეაქციებს ხმარდება. ნი-კოტინამიდიური კოფერმენტის ასეთ ჟანგვას თავისუფალი ეწოდება.

მთელ რიგ კვლევით ცენტრებში, და მათ შორის ჩვენს ლაბორატორია-შიც [19], ნაჩვენებია იქნა, რომ რეაქციაში  $\text{SH}_2 + \text{NADPH} + \text{H}^+ + \text{O}_2 \rightarrow \text{SHOH} + \text{NADP} + \text{H}_2\text{O}$ , ექსპერიმენტულად მიღებული მონაცემები არასოდეს პასუხობენ სტექიომეტრიას:  $\text{NADPH} : \text{SH}_2 : \text{O}_2 = 1 : 1 : 1$ . აღმოჩნდა, რომ ელექტრონული დონორის მოლეკულათა ნაწილი იმ ჟანგბადის აღდგენას ხმარდება, რომლის სუბსტრატში ჩანერგვაც არ ხდება. ამ მოვლენას გათიშვას, ხოლო სუბსტრატებს, რომელთა თანამყოფობის დროსაც ეს მოვლენა შეინიშნება, გამთიშველებს უწოდებენ.

გათიშვის ეფექტს ჩვეულებრივ უკავშირებენ სხვადასხვა სუბსტრატული სპეციფიკურობის მქონე ციტოქრომ P450-ის მრავლობითი ფორმების არსებობას, რადგან მრავალ ოქსიდაზურ რეაქციაში, რომლებიც თავისუფალი ჟანგვის სისტემებს მიეკუთვნებიან,  $\text{O}_2$ -ის აღდგენა ამ ჰემოპროტეინით კატალიზდება. ამ დროს NADPH-ის რედოქს-ექვივალენტები სხვადასხვა ოქსიდაზურ რეაქციებზე ნაწილდება, სადაც ელექტრონულ დონორს  $\text{O}_2$  წარმოადგენს. ამ უკანასკნელის ნაწილი აქტიურ ფორმებად (სუპეროქსიდად და პეროქსიდად) აღდგება, ნაწილი კი ენდოგენური სუბსტრატის ჟანგვას ხმარდება.

ეგზოგენური სუბსტრატის გარეშე მიკროსომებში NADPH-ის თავისუფალი ჟანგვა ოთხი სხვადასხვა გზით შეიძლება წარიმართოს [18]:



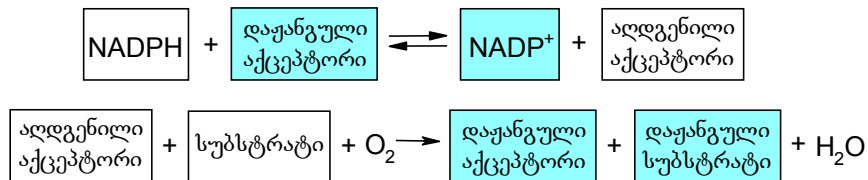
პირველი სამი – ოქსიდაზური რეაქციაა, მეოთხე – მონოოქსიგენაზური მექანიზმით ენდოგენური სუბსტრატის (XH) ჟანგვაა. პირველ რეაქციაში 2 მოლი  $\text{O}_2^-$ -ის წარმოქმნაზე 1 მოლი NADPH იხარჯება.  $\text{H}_2\text{O}_2$ -ის წარმოქმნისას NADPH ექვიმოლურად იჟანგება, ხოლო მისი სიჭარბე, რომელიც  $\text{O}_2^-$ -ისა და  $\text{H}_2\text{O}_2$ -ის წარმოქმნაზე არ იხარჯება, წყლის წარმოქმნას ხმარდება. ეგზოგენური სუბსტრატების თანამყოფობისას ციტოქრომ P450-ს სამი ტიპის ოქსიდაზური რეაქციის კატალიზება შეუძლია. ამოცანა აქ იმაში მდგომარეობს, რომ გაირკვეს ამ რეაქციებიდან რომელი მიმდინარეობს ნამდვილად მიკროსომებში და როგორია თითოეული მათგანის წილი ჟანგბადის აქტივაციის საერთო რეაქციაში.

ჩვენს ლაბორატორიაში ინჰიბიტორული ანალიზით სარწმუნოდ იქნა ნაჩვენები [20-22], რომ მცენარის მიკროსომებში NADPH-ის თავისუფალი ჟანგვა რამდენიმე ოქსიდაზური რეაქციით ხორციელდება. მათი დათრგუნვა მხოლოდ ნახშირბადის მონოოქსიდის, ნატრიუმის აზიდის და *p*-ქლორ-მერკურიბენზოატის ერთობლივი მოქმედებით მიიღება. მაშასადამე, მიკროსომებში NADPH სპეციფიკური (ციტოქრომ P450-დამოკიდებული) და არასპეციფიკური ( $Fe^{3+}$ -ისა და SH-ჯგუფების შემცველ ფერმენტებზე დამოკიდებული) გზებით იჟანგება. აზიდით არასპეციფიკური გზის ინჰიბირება NADPH-ციტოქრომ P450-რედუქტაზის აქტივობის ზრდას იწვევს. ამასთან, ქსენობიოტიკის მონოოქსიგენირებასთან შეუღლებული NADPH-ის ჟანგვა ყოველთვის თავისუფალ ჟანგვაზე უფრო მაღალი სიჩქარით მიმდინარეობს. ეს შედეგები იმაზე მიუთითებენ, რომ NADPH-ის მომხმარებელ სპეციფიკურ და არასპეციფიკურ ოქსიდაზებს შორის მარტივი კონკურენცია არსებობს, რაც ელექტრონული აქცეპტორების განსხვავებული რედოქს-პოტენციალებით უნდა იყოს განპირობებული. ქსენობიოტიკის თანამყოფობისას NADPH-ის მოხმარების სიჩქარის ზრდა იმის მაჩვენებელია, რომ ციტოქრომ P450-ის სუბსტრატთან დაკავშირება სპეციფიკური ჟანგვის გზის გაძლიერებას იწვევს, სადაც ნიკოტინამილური კოფერმენტის მთელი აღმდგენელი პოტენციალი ქსენობიოტიკის ჟანგვას ხმარდება.

მცენარის მიკროსომულ ფრაქციაში NADPH-ის მზარდი კონცენტრაციების შეტანისას ჯერ გაჯერების მომენტი, შემდეგ კი ჟანგვის სიჩქარის დაქვეითება დავაფიქსირეთ [20, 21]. განსაზღვრულ კონცენტრაციამდე NADPH-ის თავისუფალი ჟანგვა მიხაელის-მენტენის განტოლებას ემორჩილება ( $K_M=0.2 \text{ mM}$ ), ანუ კლასიკურ ფერმენტულ რეაქციას წარმოადგენს. NADPH-ის გამჯერებელი კონცენტრაციებისას თვით კოფერმენტით მიღებული ინჰიბირება მისი დაჟანგული ფორმით ან თავისუფალი ჟანგვის რომელიმე პროდუქტით უნდა იყოს გამოწვეული. ეს მოვლენა ციტოქრომ P450-ის ინაქტივაციის შედეგი არაა, რადგან შექმნილ სიტუაციაში ჰემოპროტეინი მონოოქსიგენაზურ აქტივობას ინარჩუნებს (ფრაქცია მაღალი სიჩქარით ჟანგავს დიმეთილანილინს). საფიქრებელია, რომ NADPH-ის სიჭარბისას მოქმედებაში მოდის გარკვეული რეგულატორული მექანიზმი, რომლის საშუალებითაც NADPH-ის აღმდგენელი ექვივალენტების უფრო რაციონალური რეალიზაცია ხდება. ასეთი მექანიზმის არსებობას სხვა მონაცემებიც ადასტურებენ [21, 23]: ანაერობულ პირობებში NADPH-ის თავისუფალი ჟანგვის შეწყვეტისას, ჟანგბადის დეფიციტის დადგომისთანავე, ნიკოტინამილური კოფერმენტის დაჟანგული ფორმის აღდგენა შეინიშნება. NADPH-ის ამგვარი „უკუაღდგენა“ განსაკუთრებით მკაფიოდ სარეაქციო არეში  $NADP^+$ -ის დამატებისას შეინიშნება. ასეთ სურათს ადგილი არ აქვს

ციტოქრომ c-ს ან  $K_3[Fe(CN)_6]$ -ის საშუალებით მიკროსომული რედოქს-ჯაჭვის შუნტირებისას და ნახშირბადის მონოოქსიდით ან მეთირაპონით ციტოქრომ P450-ის ბლოკირებისას. ეს შედეგები თავის მხრივ იმაზე მიუთითებენ, რომ რეგულირების აღნიშნული მექანიზმის ამოქმედებაში მონოოქსიგენაზური სისტემის ყველა კომპონენტი მონაწილეობს.

გამორიცხული არაა, რომ NADPH-ის რაციონალურ ხარჯვას ელექტრონების უცნობი, ლიპიდის ან ქინონის ტიპის აქცეპტორი წარმოადგენდეს, რომლის ფუნქციაც NADPH-ის ელექტრონების დასაყანგ სუბსტრატზე გადატანაში მდგომარეობს. ეს ჰიპოთეზა სქემატურად შეიძლება შემდეგნაირად წარმოვიდგინოთ (ნახ. 4.4).



ნახ. 4.4. NADPH-ის აღმდგენელი ექვივალენტების ხარჯვის რეგულაციის სავარაუდო მექანიზმი.

სქემაზე შექცევადი რეაქციის წონასწორობის ერთ რომელიმე მხარეს გადახრას აქცეპტორის, სუბსტრატის ან ჟანგბადის კონცენტრაციული ცვლილებები უნდა განაპირობებდეს. მაგ., ჟანგბადის დეფიციტისას კოფერმენტსა და აქცეპტორს შორის რეაქცია NADPH-ის აღდგენის მხარეს (მარჯვნიდან მარცხნივ) უნდა მიმდინარეობდეს. სუბსტრატის დაბალი კონცენტრაციისას აქცეპტორის აღდგენის შემდეგ წონასწორობა მყარდება, რაც სუბსტრატით ინჰიბირების მსგავს კინეტიკურ სურათს იძლევა.

ამგვარად, მცენარეულ მიკროსომებში უნდა მოქმედებდეს რეგულატორული მექანიზმი, რომელიც NADPH-ის თავისუფალი ჟანგვისას მისი აღმდგენელი ექვივალენტების განსაზღვრული ფონდის შენარჩუნებას უზრუნველყოფს. ამ შემთხვევაში ქსენობიოტიკის უჯრედში შეღწევა იმ რეგულატორულ სიგნალს წარმოადგენს, რომლის საშუალებითაც NADPH-ის აღდგენითი პოტენციული მონოოქსიგენაზური სისტემის მიერ ქსენობიოტიკების შეუღლებულ ჟანგვაში მოიხმარება.

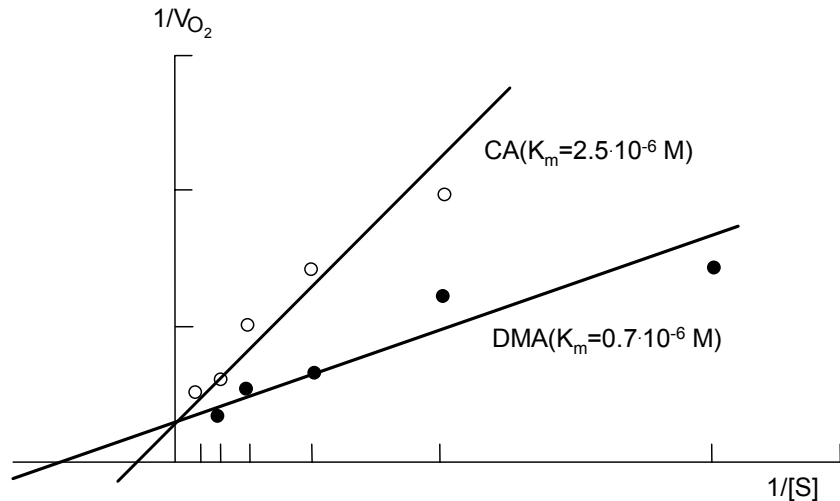
## 4.2 მონოქსიგენაზური სისტემის აქტივობის სუბსტრატული რეგულაცია

უაღრესად ფართო სუბსტრატული სპეციფიკურობის მქონე ციტოქრომ P450-ის კატალიზური აქტივობის „სამიზნეს“ ლიპოფილური (ჰიდროფობული) ბუნების მქონე ნაერთები წარმოადგენენ, რომლებიც შესაძლოა იყვნენ როგორც შიდაუჯრედული წარმოშობის, ასევე ქსენობიოტიკები. აქედან გამომდინარე, ციტოქრომ P450-ის საერთო ფონდი შეიძლება გაიყოს „ენდოგენურ“ (ფიზიოლოგიურ) და „ეგზოგენურ“ (დეტოქსიკაციურ) რეაქციებში მონაწილეობის მიხედვით. ადრე არსებობდა შეხედულება [24, 25], რომლის მიხედვითაც უჯრედში ფუნქციონირებს ციტოქრომ P450-ის სხვადასხვა – სპეციფიკური (მაგ., ფენოლური ნაერთების ბიოსინთეზში მონაწილე) და არასპეციფიკური (ქსენობიოტიკების დეტოქსიკაციაში მონაწილე) ფორმები. აქვე უნდა შევნიშნოთ, რომ ამ მოსაზრების ავტორთა მცდელობას, გამოეკლინათ და ამგვარად ერთმანეთისაგან გაემიჯნათ ციტოქრომ P450-ის ფორმები, რომლებიც ცალკეული პროცესების მიმართ სპეციფიკურობას გამოამჟღავნებდნენ, სასურველი შედეგი არ მოჰყოლია.

ჩვენი თვალსაზრისით, პრინციპულად წარმოუდგენელია, რომ უჯრედში წინასწარ, ცალ-ცალკე არსებობდეს სპეციალურად ქსენობიოტიკის ჟანგვისათვის და „ენდოგენური“ ცვლისათვის განკუთვნილი ჰემოპროტეინის ფორმები. ეს, უპირველეს ყოვლისა, ეწინააღმდეგება ცოცხალი უჯრედისათვის დამახასიათებელ ფუნდამენტურ, ეკონომიურობის პრინციპს. ამასთან დაკავშირებით, საჭიროდ ჩავთვალეთ დაგვედინა, ფიზიოლოგიურ და დეტოქსიკაციურ პროცესებში ციტოქრომ P450-ის განსხვავებული ფორმები მონაწილეობენ, თუ არსებობს ჰემოპროტეინის საერთო ფონდი, რომელსაც ორივე რეჟიმში ფუნქციონირების უნარი გააჩნია.

ჩვენს ლაბორატორიაში [24-26] ნაჩვენებია იქნა, რომ ქსენობიოტიკთა დეტოქსიკაციაში და ენდოგენური ცვლის პროცესებში შეიძლება ციტოქრომ P450-ის ერთი და იგივე იზოფორმა მონაწილეობდეს. ამის დასადაგენად სოიას (*Glycine hispida*) 10-დღიანი ნაზარდების ფესვებიდან მიღებულ მიკროსომულ ფრაქციაში შევისწავლეთ ფენოლური ნაერთების ბიოსინთეზსა (ენდოგენური ცვლის მოდელი) და დიმეთილანილინის ჟანგვის (დეტოქსიკაციის მოდელი) რეაქციებს შორის ციტოქრომ P450-ის რაოდენობრივი განაწილებები. აღმოჩნდა, რომ მიკროსომულ სუსპენზიაში ამ ორი პროცესის ერთდროული მსვლელობისას ადგილი აქვს ორივე პროცესის დამუხრუჭებას. ამასთან, ფენოლების ბიოსინთეზის საწყისი ნივთიერების – ტრანსდარიჩინმჟავას ციტოქრომ P450-დამოკიდებული ჰიდროქსილირება 75-80%-ით, ხოლო დიმეთილანილინის ასევე ციტოქრომ P450-დამოკიდებული N-

დემეთილირება მხოლოდ 15-25%-ით ითრგუნება. NADPH-დამოკიდებული ჟანგვის  $K_m$ -სიდიდეების შედარებამ და კინეტიკურმა ანალიზმა გვიჩვენა, რომ დარიჩინმჟავასაგან განსხვავებით დიმეთილანილინის მიმართ ჰემოპროტეინს 3.5-ჯერ მაღალი სწრაფვა გააჩნია და დიმეთილანილინი კონკურენტულად აინჰიბირებს დარიჩინმჟავა-4-ჰიდროქსილასას (ნახ. 4.5).



ნახ. 4.5. მიკროსომულ ფრაქციაში დიმეთილანილინისა (DMA) და ტრანს-დარიჩინმჟავას (CA) NADPH-დამოკიდებული ჟანგვის კინეტიკა ლაინუივერბერგის კოორდინატებში [24]. (საინკუბაციო ხსნარი: 3 მლ; 2 მგ/მლ მიკროსომული ცილა, 1/15-ფოსფატის ბუფერი pH 7.4, NADPH – 6  $\mu$ M).

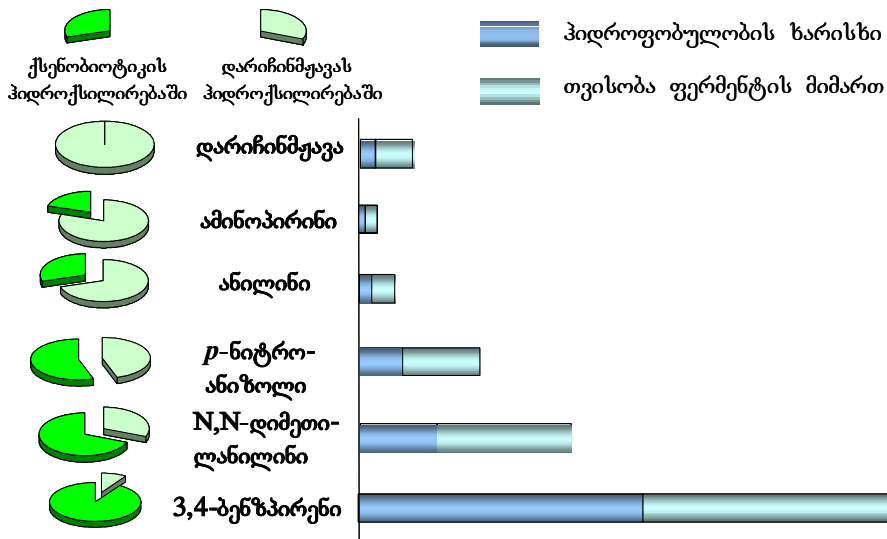
ფენილალანინისა და ტრანს-დარიჩინმჟავას რადიოაქტიური პრეპარატების გამოყენებით დადგენილ იქნა, რომ დიმეთილანილინი ერთნაირი ინტენსივობით თრგუნავს არამარტო ბიოსინთეზის ამ საწყისი სუბსტრატების გარდაქმნას, არამედ ფენოლურ ნაერთთა ჯამურ რეაქციაში  $4\text{-}^3\text{H}$ -ფენილალანინისა და  $4\text{-}^{14}\text{C}$ -ტრანს-დარიჩინმჟავას რადიოაქტიური ნიშნის ჩართვასაც [25]. დიმეთილანილინის გარდა ციტოქრომ P450-ის ბიოსინთეზურ (დარიჩინმჟავა-4-ჰიდროქსილასურ) აქტივობაზე გავლენას ახდენენ სხვა ქსენობიოტიკებიც (ნახ. 4.6). საყურადღებოა, რომ ქსენობიოტიკის მაინჰიბირებელი მოქმედება კორელაციაში იმყოფება ფერმენტის სუბსტრატისადმი თვისობისა და ამ უკანასკნელთა ჰიდროფობულობის ხარისხის სიდიდეებთან [26].

ამგვარად, სარწმუნოდ შეიძლება ჩაითვალოს, რომ ქსენობიოტიკის ჟანგვა ორგანულადაა დაკავშირებული ციტოქრომ P450-დამოკიდებულ შიდაუჯრედულ პროცესებთან. ამ ურთიერთობის არსი იმაში მდგომარეობს,



რომ „ენდოგენური“ ნაერთის გარდაქმნაში მონაწილე ჰემოპროტეინს უცხო ნაერთის დეტოქსიკაციის კატალიზებაც შეუძლია.

ციტოქრომ P450-ის საერთო ფონდის მონაწილეობა



ნახ. 4.6. ექსპერიმენტული მონაცემები ციტოქრომ P450-ის „ენდოგენურიდან“ „ეგზოგენურ“ ცვლაზე გადართვის შესახებ. წრიული დიაგრამებით (მარცხნივ) ნაჩვენებია, როგორ თრგუნავს თითოეული ქსენობიოტიკი „ენდოგენურ“ პროცესს – დარიჩინმჟავას ჰიდროქსილირებას. აქვე დიაგრამებზე (მარჯვნივ) მოყვანილია ამ ქსენობიოტიკების ჰიდროფობულობის ხარისხის (ჰექსანსა და წყალს შორის განაწილების კოეფიციენტის) და ციტოქრომ P450-ის მიმართ მათი თვისობის ( $1/K_m$ ) სიდიდეები. სურათიდან ვხედავთ, რომ რაც უფრო ჰიდროფობულია სუბსტრატი და მეტია მისი ფერმენტთან თვისობა, მით უფრო მეტი ციტოქრომ P450 გადაერთვება საერთო შიდაუჯრედული ფონდიდან ქსენობიოტიკის ჰიდროქსილირებაზე [26].

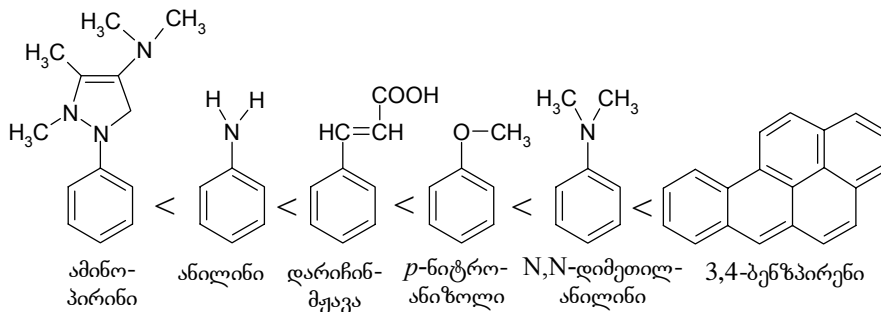
ქსენობიოტიკის უჯრედში შეღწევა იმ ადაპტურ-რეგულატორულ სიგნალს წარმოადგენს, რომელიც მონოოქსიგენაზას „ენდოგენურიდან“ „ეგზოგენურ“ ცვლაზე გადართვას აპირობებს.

რა ბუნებისაა ეს სიგნალი? როგორ ხდება ქსენობიოტიკის „შეცნობა“? ცხადია, ამ კითხვაზე პასუხები თვით ქსენობიოტიკის ფიზიკურ-ქიმიურ თვისებებში უნდა ვეძიოთ. ამის შესამოწმებლად შევისწავლეთ განსხვავებული ქიმიური ბუნების სუბსტრატების NADPH-დამოკიდებული ჟანგვის

კინეტიკა. საკვლევ ნივთიერებად გამოვიყენეთ ციტოქრომ P450-დამოკიდებული დეალკილირების და არომატული ბირთვის ჰიდროქსილირების სუბსტრატები – დიმეთილანილინი და ამინოპირინი (N-დემეთილირება), p-ნიტროანიზოლი (O-დემეთილირება) და არომატული ჰიდროქსილირებისათვის შერჩეულ იქნა ჩანაცვლებულბირთვიანი (დარიჩინმჟავა, ანილინი) და კონდენსირებულ ბირთვიანი (ბენზპირენი) ნაერთები [26].

მიღებული შედეგებიდან უპირველეს ყოვლისა ყურადღებას იმსახურებს ის ფაქტი, რომ თითოეული სუბსტრატი ჟანგვის მაქსიმალურ სიჩქარეს მხოლოდ მისთვის დამახასიათებელ კონცენტრაციაზე აღწევს. ამაში მჟღავნდება სუბსტრატთა ინდივიდუალობა.  $V_{max}$ -ის მნიშვნელობების მიხედვით კი მათ შორის დიდი სხვაობა არ არის. ჟანგვითი პროცესების გრაფიკების ლაინუივერ-ბერკის კოორდინატებში გამოსახვისას კონკურენტული ინჰიბირების კლასიკური სურათი მიიღება. ეს კი იმას ნიშნავს, რომ ქიმიურ თვისებებსა და ჟანგვითი რეაქციის ტიპის განსხვავების მიუხედავად სუბსტრატებს შორის ფერმენტის აქტიური ცენტრისათვის მარტივი კონკურენცია არსებობს. ეს კონკურენცია თავის მხრივ სუბსტრატების ფიზიკურ თვისებებზე, კერძოდ მათ ჰიდროფობულობის ხარისხზე აღმოჩნდა დამოკიდებული.

ჰიდროფობულობის ხარისხისა და ფერმენტისადმი სწრაფვის ზრდის მიხედვით საკვლევი სუბსტრატები შემდეგი თანმიმდევრობით განლაგდნენ:



საყურადღებოა, რომ ამ ორ სიდიდეს შორის მხოლოდ მარტივი კორელაცია კი არ ვლინდება, არამედ ფერმენტის სუბსტრატისადმი თვისობის სიდიდე წრფივ დამოკიდებულებაშია სუბსტრატის ჰიდროფობულობის ხარისხიდან კუბური ფესვის მნიშვნელობასთან. ეს კი იმაზე მიუთითებს, რომ მოლეკულის პოლარობა წარმოადგენს ერთ-ერთ (და არა ერთადერთ) ძირითად პარამეტრს იმ თვისებებიდან, რომლებიც ციტოქრომ P450-შემცველი მონოოქსიგენაზას მიერ ნივთიერების ჟანგვას განაპირობებენ. სხვა მაღლიმიტირებელ ფაქტორებს უნდა მიეკუთვნებოდეს სუბსტრატში ის ქიმიური ბმა, რომელიც ჰიდროქსილირებისას იშლება; ლიპიდებთან და

ფერმენტის აქტიურ ცენტრებთან განლაგებულ ამინომჟავას ნაშთებთან სუბსტრატის მოლეკულის ურთიერთქმედება და ა.შ.

ანგარიშგასაწევია ის ფაქტიც, რომ ზემოთაღნიშნულ კანონზომიერებას ერთნაირად ემორჩილება როგორც ქსენობიოტიკები, ასევე მცენარეული ციტოქრომ P450-ის ბუნებრივი ენდოგენური სუბსტრატები. როგორც ჩანს ჰემოპროტეინის მიერ ნივთიერების „სუბსტრატად შეცნობა“ ხდება მისი ფიზიკურ-ქიმიური თვისებების და არა მისი ენდოგენური თუ ეგზოგენური წარმოშობის მიხედვით.

ციტოქრომ P450-ის სუბსტრატული სპეციფიკურობის ფენომენი მნიშვნელოვნად განისაზღვრება თვით ფერმენტის აქტიური ცენტრის თავისებური აღნაგობით. სადღეისოდ დადგენილია, რომ ციტოქრომ P450-ის ჰემი კრატერის მაგვარი სტრუქტურის მქონე აპოფერმენტის სიღრმეში მდებარეობს და აქტიური ცენტრის  $Fe^{2+}$ -დან წყლის ფაზამდე მანძილი 1.4 ნმ-ს აღწევს [27, 28]. ჰემი წყლის ფაზისაგან დაშორებულია ჰიდროფობული ჯგობით, რომელიც დავიწროებასთან ერთად ჰიდროფობულობის მზარდ გრადიენტს ქმნის. ასეთი გრადიენტი შეიძლება წარმოქმნას ფოსფოლიპიდებმა, ან აპოციტოქრომის შემადგენლობაში მყოფმა ჰიდროფობული ამინომჟავების ნაშთებმა. გრადიენტის დანიშნულებაა სუბსტრატის გადატანა წყლიდან ფერმენტის აქტიური ცენტრის მიმართულებით. ლიპოფილური სუბსტრატი, ციტოქრომ P450-თან მიახლოებისთანავე, მაგნიტივით მიიზიდება ამ გრადიენტის მიერ, ადვილად მოსწყდება წყლის ფაზას და ჰემოპროტეინის აქტიური ცენტრისაკენ გადაიტანება. ამასთან, რაც მეტად ჰიდროფობულია სუბსტრატი, მით უფრო სწრაფად მიაღწევს იგი აქტიურ ცენტრს და შესაბამისად, მაღალი იქნება მისი თვისობა ფერმენტის მიმართ. მონოოქსიგენაზური ციკლის განხორციელების შემდეგ ჟანგვის პროდუქტი, საწყის სუბსტრატთან შედარებით, უკვე პოლარულ მოლეკულას წარმოადგენს, ამიტომ მისი მოლეკულა იგივე გრადიენტის არსებობის გამო გამოიდევენება ციტოქრომ P450-ის აქტიური ცენტრიდან. ხატოვანი შედარება რომ ვიხმაროთ, პოლარული პროდუქტი თითებშუა მოქცეული ალუბლის კურკის მსგავსად დასნლტება აქტიური ცენტრიდან და წყლოვან ფაზაში გადაინაცვლებს.

### 4.3 ციტოქრომ P450-ის რეგულაცია ინდუქციის დონეზე

ციტოქრომ P450-ის რაოდენობის რეგულაცია შესაძლებელია მისი ინდუქციით. მცენარეულ უჯრედში ციტოქრომ P450-ის ინდუქციის ფაქტორებია მონოოქსიგენაზას სუბსტრატები, პათოგენები, დაზიანება-დაბერება და განათება [29, 30].

ქსენობიოტიკები მცენარეული ციტოქრომ P450-ის ძლიერ ინდუქტორებს

წარმოადგენენ. მიწავაშლას ტუბერების ანათლებში ნაჩვენებია ეთანოლის, ფენობარბიტალის, სხვადასხვა ჰერბიციდების მოქმედებით გამოწვეული ციტოქრომ P450-ის შემცველობის ზრდა [31, 32]. უნდა აღინიშნოს, რომ ფენობარბიტალი, როგორც ინდუქტორი, განსხვავებულად მოქმედებს ციტოქრომ P450-ის სუბსტრატულ სპეციფიურობაზე. მაგალითად, თუ დარიჩინმჟავა-4-ჰიდროქსილაზური აქტივობა 1.5-ჯერ იზრდება, ლაურინმჟავას შიდაჯაჭვური ჰიდროქსილირების ინტენსივობა 26-ჯერ მატულობს [33]. საინტერესოა აგრეთვე, რომ ძუძუმწოვრების ლაურინმჟავა- $\omega$ -ჰიდროქსილაზას სპეციფიური ინდუქტორი – ქლოფიბრატი მცენარეებში იგივე მჟავას შიდაჯაჭვურ ჰიდროქსილაზას ინდუცირებს. ქსენობიოტიკით ინდუქცია ინდუქტორის ქიმიური ბუნებისა და კონცენტრაციის გარდა, დამოკიდებულია პრეინკუბაციის პერიოდზე, მცენარის სახეობაზე, მის ორგანოზე, ასაკზე, განათებაზე და სხვა ფაქტორებზე.

ჩვენს ლაბორატორიაში მიღებული ექსპერიმენტული შედეგების მიხედვით [34], ციტოქრომ P450-ის ინდუქტორებს წარმოადგენენ როგორც ენდოგენური (დარიჩინმჟავა), ისე ეგზოგენური (დიმეთილანილინი, 3,4-ბენზპირენი) სუბსტრატები. ქსენობიოტიკების ინდუქციური ეფექტი გაცილებით აღემატება დარიჩინმჟავათი მიღებულ შედეგს. ეს ენდოგენური სუბსტრატი 72-სთ-იანი პრეინკუბაციის შემდეგ ციტოქრომების P450-ის და P420-ის მატებას მხოლოდ 1.3–1.4-ჯერ იწვევს. დროის იგივე მონაკვეთში დიმეთილანილინის მოქმედებით ციტოქრომ P450-ის შემცველობა საკონტროლო ვარიანტთან შედარებით 3–4-ჯერ იზრდება.

განსხვავებულ ეფექტს ამჟღავნებს 3,4-ბენზპირენი. მისი მოქმედებით ციტოქრომ P450-ის ზრდა თითქმის არ შეინიშნება, მაშინ როდესაც ციტოქრომ P420-ის მკვეთრ მატებას აქვს ადგილი. მიუხედავად ამისა, ინდუქტორზე გაზრდილ მცენარეებში ციტოქრომების P450-ის და P420-ის ჯამური შემცველობა ერთნაირად იზრდება. საფიქრებელია, რომ თავდაპირველად ადგილი აქვს ქსენობიოტიკის მოქმედებით ციტოქრომ P450-ის ინდუქციას, ხოლო შემდეგ ინდუცირებული ჰემოპროტეინის P420-ად კონვერსია ხდება. აღნიშნული მოსაზრების სასარგებლოდ მეტყველებს დიმეთილანილინისა და 3,4-ბენზპირენის ინდუქციური ეფექტებისა და მათი ჟანგვის შედეგად წარმოქმნილი მეტაბოლიტების რეაქციისუნარიანობის შედარება. აღმოჩნდა, რომ 3,4-ბენზპირენის NADPH-დამოკიდებული მიკროსომული ჟანგვის შედეგად ფორმირდება შესაბამისი დიოლები და ქინონები. თავის მხრივ, ცნობილია, რომ ქინონებს ნაირგვარი ჟანგბადოვანი რადიკალების გენერირების უნარი აქვთ. დიმეთილანილინის ჟანგვის არც ერთი შესაძლო პროდუქტი (მონომეთილანილინი, ანილინი, *p*-ჰიდროქსიდიმეთილანილინი და სხვ.) არ იძლევა ასეთ „აგრესიულ“ პროდუქტებს.

იგივეს ადასტურებს 3,4-ბენზპირენისა და დიმეთილანილინის ჰიდროქსილირების პარალელურად მიმდინარე ლიპიდთა ზეჟანგური ჟანგვის ინტენსივობა, რომელიც 3,4-ბენზპირენის ჟანგვისას 3-ჯერ უფრო მეტად სტიმულირდება, ვიდრე დიმეთილანილინის შემთხვევაში [34].

ამრიგად, 3,4-ბენზპირენის ჟანგვის დროს წარმოქმნილი რეაქციისუნარიანი ინტერმედიატები ინდუცირებული ციტოქრომ P450-ის P420-ად გარდაქმნას იწვევენ და ციტოქრომ P450-ის მიმართ 3,4-ბენზპირენის ინდუქციური აქტივობა მკაფიოდ იმიტომ არ ვლინდება, რომ ეფექტი ფერმენტის ინაქტივაციითაა ეკრანირებული.

სხვაგვარად რომ ითქვას, ქსენობიოტიკების ინდუქციური ეფექტი მნიშვნელოვნადაა დამოკიდებული მათი ჟანგვის პროდუქტების ქიმიურ ბუნებაზე. რაც უფრო ნაკლებია რადიკალწარმოქმნის უნარი, მით მეტად გამოიწვევენ ისინი ციტოქრომ P450-ის შემცველობის ზრდას.

მცენარეული ციტოქრომ P450-ის ინდუქტორებია მისი ენდოგენური სუბსტრატებიც, რასაც მოწმობს მაშა-ლობიოს აღმონაცენებში ინდუქციის შესწავლა [34]. ნაჩვენებია, რომ დარიჩინმჟავა 1,8-ჯერ, ხოლო გერანიოლი 2,7-ჯერ იწვევს ციტოქრომ P450-ის მატებას. ინდუქციის ეფექტი ძლიერ ბლოკირდება ციკლოჰექსიმიდის ან ლევულინატის თანაობისას ცილის და ჰემის სინთეზის დათრგუნვის გამო.

ინდუქტორის როლის შესრულება შეუძლია ზოგიერთი ლითონის იონსაც. მიწავაშლას ტუბერების ანათლებში მიღებულია ციტოქრომ P450-ის ინდუქცია  $Mn^{2+}$ - და  $Fe^{3+}$ -იონებით [31]. ასეთივე ეფექტია მიღებული კარტოფილის ნორჩ ფესვებზე  $HgCl_2$  და  $CdSO_4$ -ის მოქმედებით: ჰემოპროტეინის რაოდენობა  $Cd^{2+}$ -იონებით 50%-ით, ხოლო  $Hg^{2+}$ -იონებით - 100%-ით იზრდებოდა [36].

პათოგენური სოკოები ან ელიციტორები (პათოგენური ან არაპათოგენური სოკოებიდან მიღებული სხვადასხვა ფრაქციები) დასნებოვნებულ მცენარეში ციტოქრომ P450-ის მატებას იწვევენ. ციტოქრომ P450-შემცველი მონოქსიგენაზები აკატალიზებენ ფლავონოიდური და ტერპენოიდული ფიტოალექსინების ბიოსინთეზს. ამდენად, ციტოქრომ P450-ის ინდუქცია მოცემულ შემთხვევაში პათოგენების ტოქსინების მოქმედებაზე მცენარის საპასუხო რეაქციას წარმოადგენს. პათოგენებით ან ელიციტორებით ინდუქცია სპეციფიურია. მაგალითად, *Phytophthora megaspermas*-ის ელიციტორი განსხვავებულად მოქმედებს ოხრახუმის უჯრედულ კულტურაში ფენილპროპანოიდური გზის ციტოქრომ P450-დამოკიდებულ აქტივობებზე. მიღებულია, რომ ინდუცირებადია ამ ბიოსინთეზის მთავარი ფერმენტი – დარიჩინმჟავა 4-ჰიდროქსილაზა, აგრეთვე შიკიმატ-3'-ჰიდროქსილაზა, ხოლო ფლავონოიდ-3'-ჰიდროქსილაზა არ ინდუცირდება

[37-39]. ინდუქციური ეფექტები აღწერილია სხვა შემთხვევებშიც. დაზიანება ან "დაბერება", ე.ი. მცენარეული ქსოვილების ანათლების ინკუბაცია ტენიან ატმოსფეროში ან კარგად აერირებულ ხსნარებში, მრავალრიცხოვანი პროცესების, მათ შორის ჟანგვითი ფერმენტების ბიოსინთეზის აქტივაციას იწვევს. ამ დროს ინდუცირდება ციტოქრომ P450-იც, რასაც ცხადყოფს დარიჩინმჟავა-4-ჰიდროქსილაზას მატება მიწავაშლას ანათლების "დაბერებისას" [38]. საინტერესოა, რომ ქსენობიოტიკით ინდუქციისას, "დაბერების" შემთხვევაშიც დარიჩინმჟავა-4-ჰიდროქსილაზასთან ერთად, ლაურინმჟავას შიდაჯაჭვური ჰიდროქსილაზაც ინდუცირდება [40].

ციტოქრომ P450-ის სინათლით ინდუქცია პირველად ნაჩვენები იქნა ბარდის ეთიოლირებული ნაზარდების მოკლელტალდიანი თეთრი სინათლით დასხივების შედეგად, დარიჩინმჟავა-4-ჰიდროქსილაზას აქტივობის 5-ჯერადი მატების მაგალითზე [41]. შემდგომში იგივე ეფექტი აღმოაჩნდა წითელი და გრძელტალდიანი წითელი სინათლის იმპულსებსაც [42], ამასთანავე აღმოჩნდა, რომ დარიჩინმჟავა-4-ჰიდროქსილაზას ზრდის ფონზე ციტოქრომ P450-ის ჯამური შემცველობა მხოლოდ უმნიშვნელოდ იმატებს. ანალოგიური ეფექტი შეინიშნება ცხიმოვან მჟავათა ჰიდროქსილაზების მიმართაც: მიკროსომული ჰიდროქსილაზების მთლიანი რაოდენობა მცირდება კიდევაც, თუმცა ამ დროს  $\omega$ -ჰიდროქსილაზური აქტივობა გაზრდილია [43, 44].

უნდა აღინიშნოს, რომ ჰემოპროტეინის სინათლით ინდუქციასთან დაკავშირებით ერთმანეთისაგან რადიკალურად განსხვავებული ექსპერიმენტული მონაცემები არსებობს. მაგალითად, სიბნელეში გაზრდილი ოხრახუშის უჯრედულ კულტურაში ციტოქრომ P450-ის რაოდენობა არარეგისტრირებადია, ხოლო 24 სთ-იანი დასხივების შემდეგ მაქსიმუმს აღწევს [45]. ამის საპირისპიროდ ნაჩვენებია, რომ მაშა-ლობის სამდღიანი ნაზარდების სინათლეზე გადატანისას ციტოქრომ P450-ის რაოდენობა სწრაფად კლებულობს, რაც სინათლეზე ჰემის ნგრევითაა გამოწვეული [46]. ნათესების სიბნელეში დაბრუნება კიდევ ერთხელ იწვევს ციტოქრომ P450-ის დაგროვებას. ასეთი ურთიერთგამომრიცხავი მონაცემების არსებობა იმით აიხსნება, რომ ციტოქრომ P450-ის ყველა იზოფორმა არაა სინათლით ინდუცირებადი [29, 30].

ჩვენი მონაცემების მიხედვით [47, 48], სინათლეზე გაზრდილი მცენარის მიკროსომების შთანთქმის სპექტრში, 434–438 ნმ-ის უბანში, ინტენსიური შთანთქმის მაქსიმუმი ჩნდება. ეს პიკი იწვევს 420 და 450 ნმ-ებზე მაქსიმუმების გადაფარვას, რაც ციტოქრომების რაოდენობრივ განსაზღვრას აძნელებს. სავარაუდოა, რომ ასეთი ექსტინქცია სწორედ იმ ნაწილაკებს ახასიათებთ, რომლებიც სინათლეზე ციტოქრომ P450-ის ჰემის დაშლის შედეგად წარმოიქმნებიან. ეთიოლირებულ მცენარეებში, რომელთა ფესვები

ბუნებრივთან უფრო მიახლოებულ პირობებში ვითარდებიან, ციტოქრომული კომპონენტების შემცველობა ყოველთვის მეტია, ვიდრე სინათლეზე გაზრდილ იმავე ასაკის მცენარეებში.

#### **4.4 მონოქსიგენაზური სისტემის აქტივობის რეგულაცია მემბრანულ დონეზე**

##### **4.4.1 მემბრანული ფოსფოლიპიდების გავლენა ციტოქრომ P450-ის მეორეულ სტრუქტურაზე და აქტივობაზე**

ციტოქრომ P450-შემცველი მონოქსიგენაზური სისტემის მნიშვნელოვანი თავისებურება ჰიდროფობული თვისებების ფლობაა, რაც მემბრანაში მისი ჩაშენების საშუალებას იძლევა. ამასთან დაკავშირებით ბუნებრივად იბადება კითხვები: როგორია მემბრანის როლი ჰემოპროტეინის ფუნქციონირებაში და რაში მდგომარეობს ამ ევოლუციური გამოგონების ბიოლოგიური აზრი? რა დონით შეიძლება ამ ფერმენტს მივუსადაგოთ სხვა ფერმენტებისადმი (მაგ., ATP-აზებისადმი ან დეჰიდროგენაზებისადმი) საყოველთაოდ აღიარებული წარმოდგენები, რომელთა თანახმადაც მემბრანის ფოსფოლიპიდებს წყლოვან ფაზაში არააქტიური ფორმით მყოფი ფერმენტები კონფორმაციულად აქტიურ მდგომარეობაში გადააქცევათ?

მოცემულ კითხვებზე საპასუხოდ შესწავლილ იქნა  $\alpha$ -სპირალის შემცველობა მაღალი სისუფთავის იზოლირებულ და ფოსფოლიპიდურ ბიშრეში ჩაშენებულ ჰემოპროტეინში [49]. პარალელურად ისაზღვრებოდა ციტოქრომ P450-ის ჰიდროქსილაზური აქტივობა რეაქციებში, რომლებშიც აქტიური ჟანგბადის დონორად კუმოლის ჰიდროზეჟანგი გამოიყენებოდა. აღმოჩნდა, რომ იზოლირებულ ციტოქრომ P450-ს ხსნარში გაცილებით ნაკლები ჰიდროქსილაზური აქტივობა გააჩნია, ვიდრე გასუფთავების შემდეგ ხელოვნურ ლიპოსომურ მემბრანაში ჩაშენებულ მიკროსომულ ჰემოპროტეინს. ამ დროს ფერმენტის რეაქტივირება და საწყისი ჰიდროქსილაზური აქტივობის სრული აღდგენა ხდება. ამასთან, მისი კონფორმაციის არსებით ცვლილებებს ადგილი არ აქვს. კორელაცია არ ვლინდება ცილის მოლეკულაში  $\alpha$ -სპირალის შემცველობის ცვლილებასა და ლიპოსომურ მემბრანაში ჩაშენებისას მისი აქტივობის ზრდას შორის. ეს მონაცემები იმ წარმოდგენის საწინააღმდეგოდ მეტყველებენ, რომლის თანახმადაც ამ მემბრანული ცილის კონფორმაციაში უნდა არსებობდეს მნიშვნელოვანი განსხვავებები სოლუბილიზებულ და მემბრანადაკავშირებულ მდგომარეობაში. აქედან გამომდინარე, ფოსფოლიპიდის რეაქტივაციულ უნარს შესაბამისად სხვა ახსნა უნდა მისცემოდა.

ჰემოპროტეინის თვისებებზე ფოსფოლიპიდური ბიშრის გავლენის სისტემატურმა კვლევამ [49] აჩვენა, რომ მემბრანაში ციტოქრომ P450-ის ჩაშენებისას ცილის მოლეკულის სინთეზი იზრდება. ხსნართან შედარებით ხელოვნურ მემბრანაში ჩაშენებული ჰემოპროტეინი აღდგენისას, ან II-ტიპის სუბსტრატთან დაკავშირებისას თავის კონფორმაციულ მდგომარეობას გაცილებით ნაკლებად იცვლის.

მკვეთრად იზრდება ლიპიდურ ბიშრეში ჩაშენებული ჰემოპროტეინის თერმოსტაბილურობაც. პროტეოლიპოსომებში თითქმის სრულადაა გამქრალი ხსნარში არსებული, ფერმენტისათვის დამახასიათებელი ფაზური დენატურაციული გადასვლა; ე.ი. მემბრანაში ფერმენტის ჩაშენებას თან ახლავს ჰემოპროტეინის მოლეკულის სტაბილიზაცია და მისი კონფორმაციული ძვრადობის შემცირება.

ჰემოპროტეინზე ფოსფოლიპიდური ბიშრის მასტაბილიზებელი მოქმედების ეფექტი ნათლად უჩვენებს ფერმენტის ხსნადი ფორმიდან მემბრანულზე გადასვლის უაღრესად დიდ მნიშვნელობას.

ციტოქრომ P450 ლაბილურ, სწრაფად ინაქტივირებად ფერმენტებს განეკუთვნება. იზოლირებულ ჰემოპროტეინს ხსნარში აღდგენილ მდგომარეობაში ინაქტივაციის უმაღლესი სიჩქარე გააჩნია [48]. სუბსტრატის დამატებით ინაქტივაციის სიჩქარე უმნიშვნელოდ მცირდება. მემბრანის შემადგენლობაში ჰემოპროტეინი ძლიერ სტაბილურია როგორც აღდგენილ, ასევე დაუანგულ მდგომარეობაში. მასტაბილიზებელი მოქმედების მოდელირება ადვილად შეიძლება იზოლირებულ ჰემოპროტეინზე ფოსფოლიპიდების დამატებით. ამასთან, ნათლად ჩნდება მათი სპეციფიკურობა. დამცველი ეფექტი გააჩნია მიკროსომული ფოსფოლიპიდების ნარევის და ფოსფატიდილეთანოლამინს. ასეთ ცდებში ფოსფატიდილქოლინს დამცველი უნარი არ გააჩნია, მაგრამ თუ ჰემოპროტეინი წინასწარაა ჩაშენებული ფოსფატიდილქოლინურ ლიპოსომაში, მაშინ ამ ფოსფოლიპიდსაც ექნება გამოსახული დამცველი მოქმედება. ამ შედეგების ახსნა შეიძლება, თუ დაუშვებთ, რომ ფოსფოლიპიდის მუხტი მოქმედებს მხოლოდ ციტოქრომთან მისი ურთიერთქმედების სიჩქარეზე. უარყოფითად დამუხტული ფოსფოლიპიდები ცილასთან უფრო სწრაფად ურთიერთქმედებენ. ფოსფატიდილეთანოლამინ-ციტოქრომ P450-ის კომპლექსის წარმოქმნა სწრაფად ხდება და ამიტომ ამ ფოსფოლიპიდის მასტაბილიზებელი მოქმედებაც უცბად, ციტოქრომ P450-ის შემცველ ხსნარში მისი ჩამატებისთანავე ვლინდება. ფოსფატიდილქოლინის შემთხვევაში აუცილებელია წინასწარი ინკუბაცია, რომლის დროსაც ცილა უნდა ჩაშენდეს ფოსფოლიპიდურ ბიშრეში და მხოლოდ ამის შემდეგ ლეციტინიც გამოამუღავნებს თავის დამცველ მოქმედებას.

ეუკარიოტულ უჯრედებში ჰემოპროტეინის მემბრანული ფორმა შეიძ-



ლება არსებობდეს სუბსტრატის გარეშე. პროკარიოტებში ხსნადი ციტოქრომ P450 სუბსტრატის გარეშე სწრაფ ინაქტივაციას განიცდის, და შესაბამისად, სუბსტრატის კონცენტრაციის შემცირებისას იშლება. ეუკარიოტებში არსებობს ამ სისტემის აქტივობის რეგულირების სხვა შესაძლებლობებიც. უჯრედში ჰემოპროტეინის შემცველობა არ შემცირდება მასში ჰიდროქსილირების სუბსტრატის კონცენტრაციის დაქვეითებისას, ანუ ფოსფოლიპიდის დახმარებით ციტოქრომი „გამოდის“ სუბსტრატის მხრიდან კონტროლიდან [49].

#### 4.4.2 მემბრანული ფოსფოლიპიდების როლი NADPH-ციტოქრომ P450-რედუქტაზისა და ციტოქრომ P450-ის ურთიერთქმედებაში

ენდოპლაზმურ მემბრანებში არსებული ძირითადი რედოქს-ჯაჭვი, რომელიც NADPH-ის მიმართ მკაცრ სპეციფიკურობას ამჟღავნებს, ფოსფოლიპიდურ მატრიქსთანაა დაკავშირებული. ჯაჭვის საწყისი კომპონენტის – NADPH-დამოკიდებული ფლავოპროტეინის აქტივობას ჩვეულებრივ აფასებენ ან ეგზოგენურად დამატებული ელექტრონთა აქცეპტორების, ან ენდოგენური აქცეპტორის – ციტოქრომ P450-ის ალდგენის სიჩქარეების მიხედვით. მეორე კრიტერიუმი ყველაზე სარწმუნოდ ასახავს მონოქსიგენაზური ტიპის რეაქციებში ფლავოპროტეინის მონაწილეობას.

ანაერობულ პირობებში ციტოქრომ P450-ის ალდგენის სიჩქარის გაზომვა იმ ფაქტს ემყარება, რომლის თანახმადაც ჰემოპროტეინის მიერ ელექტრონთა აქცეპტორების სიჩქარე (კონსტანტა –  $10\text{--}20 \text{ წთ}^{-1}$ ) გაცილებით ნაკლებია ალდგენილი ციტოქრომის CO-სთან ურთიერთქმედების სიჩქარეზე (კონსტანტა –  $1.7 \cdot 10^4 \text{ წთ}^{-1}$ ). ერთი კატალიზური ციკლის შესასრულებლად მონოქსიგენაზა ორ ელექტრონს საჭიროებს და პირველი ელექტრონის აქცეპტირება მოწმდება ანაერობულ პირობებში ციტოქრომ P450-ის CO-სთან კომპლექსის წარმოქმნით [49].

მიკროსომულ სუსპენზიაში NADPH-ის დამატება ციტოქრომ P450-ის სრულ ალდგენას იწვევს. ამასთან, რედუქტაზული რეაქცია ორფაზიანობით ხასიათდება. პირველი (სწრაფი) ფაზა 1–2 წმ-ს იკავებს და ანაერობიუზის სიღრმეზე დამოკიდებული არაა. ამ სტადიაზე ციტოქრომ P450-ის ალდგენის სიჩქარე ოთახის ტემპერატურაზე 2–8 ნმოლიწმ<sup>-1</sup> მგ ცილაზე ფარგლებშია.

მეორე სტადიაზე ციტოქრომ P450-ის ალდგენის სიჩქარე ძლიერ დაბალია. მისი დაფიქსირება რამდენიმე წუთის განმავლობაში შეიძლება. ეს სტადია მიკროსომულ სუსპენზიაში ჟანგბადის შემცველობაზეა დამოკი-

დებული, რომელსაც ჰემოპროტეინის კვლავ დაჟანგვა და რეაქციაში მონაწილე ციტოქრომ P450-ის მოლეკულათა რაოდენობის შემცირება შეუძლია. NADPH-ციტოქრომ P450-რედუქტაზული რეაქციის ორფაზიანობა შეიძლება აიხსნას ორი მიზეზით:

1. სუბსტრატთან დაკავშირებული და თავისუფალი ციტოქრომ P450-ის აღდგენის განსხვავებული სიჩქარეებით;
2. მიკროსომულ ფრაქციაში ჰემოპროტეინის სხვადასხვა ფორმების არსებობით, რომელთაც სუბსტრატისა და რედუქტაზის მიმართ განსხვავებული თვისობა გააჩნიათ.

I-ტიპის სუბსტრატების დაკავშირება რედუქტაზული რეაქციის საწყისი ფაზის სიჩქარის მნიშვნელოვან ზრდას იწვევს. ამასთან, რეაქციის სწრაფ ფაზაში აღდგენილი ციტოქრომ P450-ის რაოდენობა კორელაციაშია ჰემოპროტეინ-სუბსტრატის კომპლექსის შემცველობასთან. ვარაუდობენ, რომ ციტოქრომთან I-ტიპის სუბსტრატთა დაკავშირების შედეგად ჰემოპროტეინის ელექტრონული სტრუქტურა ისეთ ცვლილებებს განიცდის, რომელიც აუქოზობებს მის მიერ ელექტრონის აქცეპტორების უნარს და აჩქარებს რედუქტაზული რეაქციის მსვლელობას.

სუბსტრატის თანამყოფობისას NADPH-რედუქტაზული რეაქციის აჩქარება შეიძლება აიხსნას ციტოქრომ P450-ის რედოქს-პოტენციალის მატებით, ან რედუქტაზის აქტივაციის ენერჯის დაქვეითებით. ეს იმით უნდა იყოს გამოწვეული, რომ ჰემოპროტეინი და მისი რედუქტაზა „კომპარტმენტალიზებულია” მემბრანის ფოსფოლიპიდური მატრიქსის იზოლირებულ ზონაში, რომლისთვისაც დამახასიათებელია ტემპერატურული ფაზური გადასვლები. ამიტომ ამ ზონას რედუქტაზის აქტივაციის ენერჯის შემცირების უნარი უნდა გააჩნდეს. თავის მხრივ, I-ტიპის სუბსტრატებიც მემბრანული ფოსფოლიპიდების ტემპერატურული ფაზური გადასვლების შემცირების უნარს ფლობენ. ამიტომ რედუქტაზული რეაქციის საწყის სიჩქარეზე სუბსტრატთა მასტიმულირებელი მოქმედება ეჭვს არ უნდა იწვევდეს. ამის სასარგებლოდ მოწმობს მონაცემები ფოსფოლიპიდურ მატრიქსში სუბსტრატების მიერ ინდუცირებული კონფორმაციული ცვლილებების შესახებ, რომელთა შედეგადაც იზრდება ციტოქრომისა და მისი რედუქტაზის ეფექტურ შეჯახებათა რიცხვი [48].

I-ტიპის სუბსტრატებით NADPH-რედუქტაზული რეაქციის სტაბილიზაციის ფენომენის გადაუჭარბებლად შეფასება ძალიან ძნელია, რადგან მონოოქსიგენაზური სისტემით მრავალი ქსენობიოტიკის (პირველ რიგში ბარბიტურატებისა და პირაზოლინების წარმოებულების) ჰიდროქსილირების ინტენსივობა არსებითად დამოკიდებულია ციტოქრომ P450-სუბსტრატის კომპლექსის NADPH-რედუქტაზით აღდგენაზე.

ჰიდროქსილირების რეაქციებზე მასტიმულირებელ გავლენას ახდენს  $Mg^{2+}$ . აღმოჩნდა, რომ ამ ეფექტის არსი NADPH-რედუქტაზის გააქტიურებაში მდგომარეობს. გარდა ამისა, შენიშნულია  $D_2O$ -ს მაინჰიბირებელი მოქმედება რედუქტაზული რეაქციის სიჩქარეზე და ეთილმორფინის N-დემეთილირებაზე.

ხანმოკლე მოქმედების ბარბიტურატების შემთხვევაში, რომელთა კონცენტრაციებიც მკურნალობის დროს  $5 \cdot 10^{-5}$  M-ს არ აღემატება, რედუქტაზული რეაქციის აქტივობა მნიშვნელოვან ფაქტორს წარმოადგენს მათი მეტაბოლიზმის რეგულაციაში. ღვიძლში წამლების მეტაბოლიზმის შესწავლით დადგინდა, რომ ამინოპირინის N-დემეთილირება მჭიდრო კორელაციაშია NADPH-ციტოქრომ P450-რედუქტაზული რეაქციის აქტივობასთან და არა თვით ციტოქრომ P450-ის რაოდენობასთან. კორელაციის გამოვლენის მიზნით ჩატარებულია შედარებითი ანალიზი NADPH-რედუქტაზული რეაქციის სიჩქარეს, სხვადასხვა სუბსტრატთა ჰიდროქსილირებასა და ამ პროცესთა აქტივაციის ენერგიებს შორის. აღმოჩნდა, რომ ამინოპირინის N-დემეთილირების მაქსიმალური სიჩქარე ( $7$  ნმოლიწთ $^{-1}$  მგ ცილაზე  $37^{\circ}C$ -ზე) და ამ პროცესის აქტივაციის ენერგია ( $53.6$  კჯ/მოლი), NADPH-რედუქტაზული რეაქციის იმავე მაჩვენებლებს უტოლდება ( $V_{max}=7.26$  ნმოლიწთ $^{-1}$  მგ ცილაზე, აქტივაციის ენერგია –  $53.3$  კჯ/მოლი). ეს მონაცემები სარწმუნო მტკიცებულებაა იმის შესახებ, რომ რედუქტაზული რეაქცია ამინოპირინის მეტაბოლიზმის სიჩქარემალმიტირებელი რგოლია [48].

განხილული ფაქტები განსაკუთრებულ აზრს შეიძენენ, თუ რედუქტაზის ფუნქციონირებაში ფოსფოლიპიდური კომპონენტის როლს გავითვალისწინებთ. ფერმენტი მაღალ მგრძობიარობას ამჟღავნებს მიკროსომების ფოსფოლიპიდური ბიშრის და მათ მიერ წარმოქმნილი ჰიდროფობული ზონების ყოველგვარი დაზიანების მიმართ. შენიშნულია რედუქტაზული აქტივობის მკვეთრი დათრგუნვა ფოსფოლიპაზების C-სა და D-ს, ტრიტონ X-100-ის და დიმეთილსულფოქსიდის დაბალი კონცენტრაციების გამოყენებისას. ცნობილია რედუქტაზაზე საწინააღმდეგო ეფექტის მაგალითებიც, რომლებიც გამოწვეულია მიკროსომის ფოსფოლიპიდური კომპონენტის ჰიდროფობულობის ზრდით  $Mg^{2+}$ -ის თანამყოფობისას.

რეკონსტრუირებული მონოოქსიგენაზური სისტემის ფუნქციონირებაში ფოსფატიდილქოლინის როლის შესწავლამ აჩვენა მისი აბსოლუტური აუცილებლობა ციტოქრომ P450-CO კომპლექსზე ელექტრონების გადატანაში. ლეციტინზე დამოკიდებული აღმოჩნდა NADPH-რედუქტაზული რეაქციის სწრაფი (საწყისი) ფაზა, რომელიც იზოლირებული ციტოქრომ P450-ის მაქსიმალურ აქტივობასთანაა შეუღლებული. საფიქრებელია, რომ ეს დამოკიდებულება დაკავშირებულია ციტოქრომის მიერ ელექტრონთა აქცეპტირე-

ბის უნართან, რადგან აღწერილია ციტოქრომ P450-ის ალდგენის შესაძლებლობა ქსანტინ/ქსანთინოქსიდაზური სისტემით, მხოლოდ ფოსფორილიქოლინის თანამყოფობისას. თავისთავად სუბსტრატის მისაერთებლად ციტოქრომ P450 ფოსფორილიდს უშუალოდ ნამდვილად არ საჭიროებს, მაგრამ მისი გავლენით იზრდება ფერმენტის სუბსტრატთან თვისობა. ფერმენტის კონფორმაციული ცვლილება ინდუცირდება ფოსფორილიდის ან სუბსტრატის განაწილებით არაწყლოვან ფაზაში. წამლების მეტაბოლიზმის კვლევისას ნაჩვენებები იქნა ლიპიდების მონაწილეობა სუბსტრატის განაწილებაზე მიკროსომებსა და წყალხსნარებს შორის. დადგენილ იქნა აგრეთვე, რომ ბუფერისა და ჰეპატანის ხსნარში N,N-დიმეთილამინის უმუხტო წარმოებულები უმთავრესად ჰიდროფობულ, მუხტიანები კი წყლოვან ფაზაში ნაწილდებიან [49].

სუბსტრატის განაწილების კოფიციენტის განსაზღვრისას აღმოჩნდა, რომ იგი დამოკიდებულია ლიპიდის კონცენტრაციაზე; გარდა ამისა, ციტოქრომ P450-ის ალდგენის ხარისხიც კორელაციაშია ლიპიდის კონცენტრაციასთან, რაც იმაზე მიუთითებს, რომ ეს უკანასკნელი გავლენას ახდენს ციტოქრომ P450-სუბსტრატის კომპლექსის წარმოქმნაზე. დასაშვებადაა მიჩნეული ლეციტინის არასპეციფიკური როლიც, რომელიც ხსნადი მონოოქსიგენაზური სისტემის კომპონენტთა ეფექტური ურთიერთქმედებისათვის აუცილებელი ჰიდროფობული ზონის შექმნაში მდგომარეობს. ეს ვარაუდი, უპირველეს ყოვლისა, გამომდინარეობს იმ უფრო ჰიდროფობულ დიოლეილ- და დილაუროილ-ფოსფატიდილქოლინების შემცველ სისტემათა უმაღლესი აქტივობებიდან, რომლებიც ღვიძლის ლეციტინების შემადგენლობაში არ შედიან. დადგენილია, რომ ზოგიერთ დეტერგენტს, რომლებიც წყლოვან ფაზაში მაღალჰიდროფობული შიდა ზედაპირის მქონე მიცელებს წარმოქმნიან, უნარი აქვთ რეკონსტრუირებულ სისტემაში შეცვალონ ფოსფორილიპიდები. ამასთან დაკავშირებით გასათვალისწინებელია, რომ ხსნად რეკონსტრუირებულ სისტემაში, სადაც ლეციტინის თანამყოფობისას მემბრანისმაგვარი სტრუქტურები არ წარმოიქმნებიან, მონოოქსიგენაზისა და ფოსფორილიპიდებისაგან შემდგარი, ადვილად დისოცირებადი კომპლექსების არსებობა მაინც სავსებით მოსალოდნელია.

საყურადღებოა, რომ რეკონსტრუირებული მონოოქსიგენაზური სისტემის ამოქმედება მხოლოდ დეტერგენტების საშუალებით გამოყოფილ რედუქტაზას შეუძლია. იზოლირებული ფერმენტის ტრიფსინით დამუშავება რედუქტაზას ამ თვისებას უკარგავს, მაგრამ ციტოქრომ C-ს ალდგენის უნარს უნარჩუნებს. ნაჩვენებია, რომ პროტეოლიზი ფერმენტს პოლიპეპტიდური ჯაჭვის ნაწილს აცილებს. თვლიან, რომ რედუქტაზის მოლეკულის ეს ნაწილი ფოსფორილიდურ მატრიქსში თავისებური „ლუზის“ როლს ასრულებს და NADPH-

რელექტაზას მემბრანაში ლატერალური გადამორავების საშუალებას აღ-  
ლევს. გამოვლენილია ერთი, მეტად საყურადღებო ფაქტიც: მიკროსომულ  
მემბრანაში შესაძლებელია დეტერგენტული რელექტაზის დამატებითი ჩაშე-  
ნება. ამის შედეგად მონოოქსიგენაზის კატალიზური აქტივობა მნიშვნელოვ-  
ნად იზრდება. ამასთან დაკავშირებით ჩამოყალიბებულია რელექტაზისა და  
ციტოქრომ P450-ის კომპლექსის ე.წ. „ხისტი“ ორგანიზაციისა და ურ-  
თიერთქმედების ალტერნატიული სქემა, რომელშიც ფლავოპროტეინის ერთ  
მოლეკულაზე ჰემოპროტეინის 12–20 მოლეკულა მოდის [48].

მოცემული ფერმენტები მემბრანაში თუ მართლაც იძლევიან სტეიო-  
მეტრულ კომპლექსს, მაშინ მათი თანაფარდობა ყველა შემთხვევაში მუდმი-  
ვი უნდა იყოს. მიუხედავად ამისა, მონოოქსიგენაზური სისტემის კომპონენ-  
ტებზე ამის თქმა არ შეიძლება. მაგ., ახალდაბადებულ ვირთაგვებში  
NADPH-ციტოქრომ P450-რელექტაზა უფრო ადრე ჩნდება, ვიდრე ციტო-  
ქრომ P450. ცხოველში ფენობარბიტალის შეყვანის შემდეგ რელექტაზის  
შემცველობა ღვიძლში დაუყოვნებლივ მატულობს, მაშინ როდესაც ციტო-  
ქრომ P450-ის რაოდენობის ზრდა მხოლოდ ინექციიდან 5 სთ-ის შემდეგ  
იწყება. ეს ფაქტები არ გამორიცხავენ კომპლექსების არსებობის შესაძ-  
ლებლობას. კომპლექსის ცალკეულ კომპონენტებს შეუძლიათ ერთმანეთისა-  
გან დამოუკიდებლად სინთეზირება, ხოლო კომპლექსებად მათი „შეგ-  
როვება“ შეიძლება მოგვიანებით მოხდეს.

ჩატარებულ ექსპერიმენტულ მონაცემებზე დაყრდნობით სტიერი, საკმე-  
ნი და ესტაბრუკი [50] მივიდნენ დასკვნამდე, რომლის თანახმადაც ციტო-  
ქრომ P450 რელექტაზიანად ლოკალიზებულია მიკროსომული ფოსფოლი-  
პიდების „სპეციალიზებულ“ ზონაში, რომელიც ფოსფოლიპიდური მატ-  
რიქსის ძირითადი მასისაგან განსხვავდება თავისი დაბალი აქტივობით და  
თხევადკრისტალურიდან თხევად მდგომარეობაში ფაზურ გადასვლას განიც-  
დის. ნავარაუდებია, რომ ამ ზონაში იმყოფება მიკროსომული ფოსფოლიპი-  
დის არაუმეტეს 20%-ისა, რომლებიც მონოოქსიგენაზის კომპონენტებს შო-  
რის კონტაქტის დამყარების გარდა, ციტოქრომ P450-ისაკენ ლიპოფილური  
სუბსტრატების ლატერალურ დიფუზიასაც უზრუნველყოფენ.

იგივე ავტორთა მიერ მიღებული მონაცემების საფუძველზე წარმოდგე-  
ნილ იქნა მიკროსომულ მემბრანაში მონოოქსიგენაზური კომპლექსის ორგა-  
ნიზაციის მოდელი [50]. ციტოქრომ P450-ისა და NADPH-ციტოქრომ  
P450-რელექტაზის ცნობილი მოლეკულური მასებიდან გამომდინარე, კომპ-  
ლექსში ამ კომპონენტთა მოლეკულური თანაფარდობა 20 : 1-ის ტოლია.  
გამოთვლილია, რომ სწრაფ ფაზაში ციტოქრომ P450-ის 50%-ით აღსადგე-  
ნად დაბალ ტემპერატურაზე აუცილებელია რელექტაზის ყოველი მოლე-  
კულის 8–12 მოლეკულა ციტოქრომით გარემოცვა. ფოსფოლიპიდურ მა-

ტრიქსში მონოქსიგენაზური სისტემის კომპონენტთა ამ კომპლექსს მოგვიანებით, როგორც აღნიშნული იყო, „კლასტერი“ ეწოდა. ვარაუდობენ, რომ ტემპერატურის ცვლილებისას „კლასტერის“ ზომა ვარიირებს კომპლექსის შიგნით და გარეთ ციტოქრომ P450-ის მოლეკულათა ცვლის განსხვავებული სიჩქარის გამო.

რედუქტაზული რეაქციის ნელი ფაზის შეფასებისას იმ გარემოებას ითვალისწინებენ, რომ იგი ახასიათებს რედუქტაზისაგან მოცილებული (ე.ი. „კლასტერის“ გარეთ მყოფი) ციტოქრომ P450-ის აღდგენას და თვლიან, რომ ჰემოპროტეინის მოცემული მოლეკულებისათვის შესაძლებელია მიკროსომულ ფოსფოლიპიდებში ლატერალური დიფუზია. ნელი ფაზის მაღალი აქტივაციის ენერგია (ფაზური გადასვლის ზევით ტემპერატურაზე), როგორც ჩანს, უნდა აიხსნას „კლასტერის“ შიგნით და გარეთ ციტოქრომ P450-ის მოლეკულების ცვლით [51].

საჭიროდ მიგვაჩნია მოკლედ შევეხოთ ფოსფოლიპიდების მონაწილეობას ესტაბრუკისა და ჰილდენბრანდტის სქემის შემდგომ რეაქციებში. მონოქსიგენაზურ რეაქციებში NADH-ისა და NADPH-ის ცალკეულად ან ერთდროულად გამოყენებისას ციტოქრომ  $b_5$ -ის ჟანგვა-აღდგენის კინეტიკის ანალიზმა შესაძლებელი გახდა გაკეთებულიყო დასკვნა, რომ ამ ციტოქრომის აღდგენილი ფორმა არის სამმაგი კომპლექსისათვის მეორე ელექტრონის აუცილებელი დონორი. ამასთან, რეკონსტრუირებულ სისტემაზე და მიკროსომულ მემბრანებში რედოქს-ჯაჭვების განლაგების სქემებზე პირდაპირი მონაცემების თანახმად მიღებულია, რომ ფოსფოლიპიდური კომპონენტი საჭიროა  $b_5$ -სა და P450-ს შორის ურთიერთქმედებისათვის.

რეკონსტრუირებულ მონოქსიგენაზურ სისტემაში ნაჩვენებია, რომ მაჰიდროქსილირებელ აგენტს სუპეროქსიდული ანიონ-რადიკალი ( $O_2^-$ ) წარმოადგენს. მისი მონაწილეობა ასეთ სისტემაში მოწმდება დისმუტაზის (ერიტროკუპრინის) და ტაირონის (სუპეროქსიდული რადიკალების დამჭერის) გამოყენებით. NADPH-ითა და ციტოქრომ P450-რედუქტაზით, აგრეთვე ქსანტინ/ქსანტიოქსიდაზური სისტემით ან არაფერმენტული ფოტოქიმიური სისტემის (რიბოფლავინისა და მეთიონინის შემცველი) სუპეროქსიდის გენერაცია ერთნაირად მოითხოვს ფოსფოლიპიდის აუცილებელ თანამყოფობას. გარდა ამისა, არსებობს მონაცემები, რომლებიც უჩვენებენ ფოსფოლიპიდების მნიშვნელოვან როლს გლუკურონილტრანსფერაზული ფერმენტით მონოქსიგენაზური რეაქციის პროდუქტთა გამოყოფაში.

განხილული ფაქტების დაჯამებით შეიძლება სქემატურად წარმოვადგინოთ მემბრანული ფოსფოლიპიდების მონაწილეობა ლიპოფილური ქსენობიოტიკების ჟანგვით ჰიდროქსილირებაში (იხ. ქვეთავი 1.5, ნახ. 1.8).

მემბრანის მონოქსიგენაზური სისტემისათვის ფოსფოლიპიდების აუცი-

ლებლობას რამდენიმე ზოგადი პრინციპი არსებობს [48]:

1. ფერმენტული აქტივობის დაქვეითება ფოსფოლიპიდის მოცილებისას;
2. ფერმენტის რეაქტივაცია ფოსფოლიპიდის დამატებისას;
3. ფერმენტის აქტიური ასოციაცია მემბრანის ფოსფოლიპიდებთან;
4. ციტოქრომ P450-ის ფუნქციურად აქტიური კონფორმაციის შენარჩუნება;
5. ელექტრონების ტრანსპორტის მოდულაციის უზრუნველყოფა.

მონოოქსიგენაზური სისტემისათვის ჩამოთვლილი კანონზომიერებები ბიოლოგიურად განმტკიცებულ ნიშან-თვისებას წარმოადგენს, რადგან ბაქტერიებისა და თირკმელზედა ჯირკვლის მიტოქონდრიების მაჰიდროქსილირებელი სისტემაც თავისი აქტივობებისათვის ასევე ამჟღავნებენ ფოსფოლიპიდებისადმი მკაცრ დამოკიდებულებას.

ამგვარად, დაბეჯითებით შეიძლება ითქვას, რომ მიკროსომული მემბრანის ფოსფოლიპიდური კომპონენტი აბსოლუტურად აუცილებელია მთელი რიგი სინჯარემალიმითრებელი რეაქციების მსვლელობისა და მონოოქსიგენაზური სისტემის ფუნქციონირების რეგულირებისათვის. ორგანულ ქსენობიოტიკთა ბიოტრანსფორმაციაში სუბსტრატის მემბრანაში შეღწევის, ციტოქრომ P450-ის მოლეკულის ჰიდროფობულ უბნებთან მისი დაკავშირების, მიკროსომული გადამტანების ცილა-ლიპიდურ კომპლექსებთან მიმაგრებისა და ელექტრონთა გადატანის ჯაჭვში რედუქტაზული რეაქციების ყველა სტადია მემბრანული ლიპიდებისადმი უშუალო დამოკიდებულებაში იმყოფება. ცხადია, უადრესად მნიშვნელოვანია ფოსფოლიპიდური კომპონენტის იმ ყველაზე „პერსპექტიული“ ფუნქციის გამოვლენა, რომელიც განსაზღვრავს მის როლსა და ადგილს „თავისუფალი ჟანგვის“ მთლიან სისტემაში.

#### **4.4.3 NADH-ციტოქრომ $b_5$ -რედუქტაზისა და ციტოქრომ $b_5$ -ის დამოკიდებულება მემბრანულ ფოსფოლიპიდებზე**

NADH-სპეციფიკური ფლავოპროტეინის აქტივობა ჩვეულებრივ ფასდება ფერიციანიდის ან ციტოქრომ c-ს აღდგენის სინჯარით [48]. ეს რეაქციები განსხვავებულ მგრძობიარობას ამჟღავნებენ იმ აგენტების მიმართ, რომლებიც მიკროსომებში ჰიდროფობული ურთიერთქმედების დაზიანებას იწვევენ. მაგ., მიკროსომული ფრაქციის აცეტონით დამუშავება NADH-ციტოქრომ c-რედუქტაზულ აქტივობას 80–85%-ით თრგუნავს. ასეთ ფრაქციაზე ულტრაბერით დამუშავებული ფოსფოლიპიდური მიცელების დამატება, რომელიც 70%-მდე ფოსფატიდილქოლინს შეიცავს, რედუქტაზის არამარტო სრულ აღდგენას, არამედ საწყისთან შედარებით გაოთხმაგებულ სტიმულაციას იწვევს.

ფერიციანიდთან მიმართებაში ფერმენტის აქტივობა 10–15%-ით ქვეითდება ტრიფსინით დამუშავებისას და პრაქტიკულად არ იცვლება C და D ტიპის ფოსფოლიპაზების თანამყოფობისას [49]. აქტივობის ~30%-იანი ვარდნა შეინიშნება ნატრიუმის დეზოქსიქოლატით, ბუთანოლითა და ტრიტონ X-100-ით ზემოქმედებისას. მხოლოდ ფოსფოლიპაზა A იწვევს ფერიციანიდის NADH-დამოკიდებული აღდგენის რეაქციის სიჩქარის ორჯერ დაქვეითებას. აღნიშნული ფერმენტული აქტივობის გაძლიერება არ ხდება საინკუბაციო ხსნარში ფოსფოლიპიდების დამატებით. ეს ფაქტები მემბრანაში NADH-დამოკიდებული რედოქს-ჯაჭვის განივ განლაგებაზე (ანუ ფოსფოლიპიდური მატრიქსის გადაკვეთაზე) მიუთითებენ.

დეზოქსიქოლატის შემცველ გელზე ქრომატოგრაფიის საშუალებით მიღებულ ფოსფოლიპიდებისაგან თავისუფალ მიკროსომულ ფრაქციაში ციტოქრომ  $b_5$ -ის აღდგენის სიჩქარე 80%-ითაა ინჰიბირებული. მიკროსომების საერთო ფრაქციიდან მიღებული ფოსფოლიპიდებისაგან მომზადებული ლიპოსომების დამატება კი ფერმენტის სრულ რეაქტივაციას იწვევს.

რედუქტაზის ქიმოტრიფსინით ან კატეფსინით დამუშავებისას ფერმენტს სცილდება პოლიპეპტიდური ფრაგმენტები, რომლებიც 65%-ზე მეტ ჰიდროფობული ამინომჟავების ნაშთებს შეიცავენ. საყურადღებოა ერთი გარემოება: ე.წ. P-რედუქტაზა (მოლეკულური მასა 28 kD), რომელიც მემბრანიდან სოლუბილიზებულია კობრას შხამში არსებული ფოსფოლიპაზების ნარევით, მიკროსომაში ჩაშენების უნარს არ ამჟღავნებს და ციტოქრომ  $b_5$ -ის მიმართ სუსტ რედუქტაზულ აქტივობას ფლობს. მეორე მხრივ, ნებისმიერი სხვა საშუალებით სოლუბილიზებული ფერმენტი NADH-ისა და ციტოქრომ  $b_5$ -ის მიმართ ერთნაირი თვისობით ხასიათდება. მიღებული შედეგები იმაზე მეტყველებენ, რომ NADH-ციტოქრომ  $b_5$ -რედუქტაზის ამფიპათური მოლეკულის კატალიზურად აქტიური ცენტრი მემბრანის ჰიდროფილურ ნაწილში იმყოფება.

მოყვანილი ფაქტები და აგრეთვე D-რედუქტაზის (ტრიტონ X-1000-ისა და დეზოქსიქოლატის ნარევით სოლუბილიზებული ფერმენტი, მოლეკულური მასით 45 kD) უნარი, ერთნაირად ეფექტურად იმოქმედოს გამოყოფილ და მემბრანასთან ბმულ ციტოქრომ  $b_5$ -თან [48], საშუალებას იძლევა გაკეთდეს დასკვნა, რომ ფერმენტის ეს ფორმა ნატიურია. მისი არაპოლარული ნაწილი მოლეკულის 25%-ს შეადგენს და უნარი აქვს მიკროსომულ მემბრანაში იმ რაოდენობით ჩაშენდეს, რაც ორი რიგით აღემატება მის ენდოგენურ შემცველობას. ნაჩვენებია, რომ მიკროსომული მემბრანის ფოსფოლიპიდები წარმოადგენენ ადგილს, რომელსაც უკავშირდებიან როგორც ენდოგენური, ასევე დამატებით ჩაშენებული რედუქტაზები. უფრო მეტიც, ფოსფოლიპიდები განსაზღვრავენ ფერმენტის მაქსიმალურად დაკავშირების



დონეს, მის ფუნქციურ იდენტურობას ენდოგენურ რედუქტაზასთან და ციტოქრომ  $b_5$ -ის დაკავშირების საერთო წერტილებისათვის კონკურენციას.

მიკროსომული მემბრანიდან კატეფსინით რედუქტაზის მოცილებისას სუპერნატანტში ციტოქრომ  $b_5$ -ის 6%-ზე მეტი არ გადმოდის [49]. 50%-ზე ნაკლები რედუქტაზის მოცილებისას NADH-ით ციტოქრომ  $b_5$ -ის აღდგენით საწყისი (სწრაფი) სიჩქარე არ იცვლება, მაგრამ მნიშვნელოვნად ქვეითდება ხსნარში რედუქტაზის გადასვლის ზრდასთან ერთად. მაშასადამე, NADH-ციტოქრომ  $b_5$ -რედუქტაზა და ციტოქრომ  $b_5$  მემბრანაში უნდა ქმნიდნენ „მტკიცე კომპლექსებს“, რომელთაგან თითოეული 5 მოლეკულა რედუქტაზას და 50 მოლეკულა ციტოქრომს შეიცავს. N-ეთილმალეიმით რედუქტაზის 90%-იანი ინაქტივაციის დროსაც კი ციტოქრომ  $b_5$  დაბალი სიჩქარით, მაგრამ მაინც სრულ აღდგენას განიცდის. უფრო მეტიც, ენდოგენურ რედუქტაზას შეუძლია ელექტრონების მაღალი სიჩქარით გადაცემა მიკროსომულ მემბრანაში მაქსიმალურად ჩაშენებული ეგზოგენური ციტოქრომ  $b_5$ -ის არაუმეტეს 60%-ზე. ეს მონაცემები კი თავისთავად უარყოფენ რაიმე „კომპლექსის“ არსებობას და პირდაპირ მიუთითებენ, რომ რედუქტაზას „ტივტივას“ მსგავსად მემბრანის გასწვრივ ლატერალური მოძრაობა შეუძლია და ციტოქრომ  $b_5$ -თან მისი ურთიერთქმედება შემთხვევით დაჯახებებზეა დამოკიდებული.

ლიტერატურაში გვხვდება მონაცემები მემბრანაში ციტოქრომ  $b_5$ -ის ლატერალური დიფუზიის შესაძლებლობის შესახებ [49]. ეს ვარაუდი მტკიცდება ჰემოპროტეინის აღდგენის სიჩქარის გაზრდით მიკროსომაში მისი დამატებითი ჩაშენების შემდეგ. ამ დროს მრუდზე, რომელიც გვიჩვენებს აღდგენის სიჩქარის კონსტანტის დამოკიდებულებას ტემპერატურის შებრუნებულ მნიშვნელობასთან, ტეხილი ჩნდება. ამასთან, რედუქტაზული რეაქციის აქტივაციის ენერჯის უაღრესად დაბალი მნიშვნელობა (28 კჯ/მოლი), ციტოქრომ  $b_5$ -ის აღდგენის დიფუზიურ ბუნებაზე მიუთითებს. არსებობს იმის მცდელობაც, რომ ციტოქრომ  $b_5$ -ისათვის განისაზღვროს ლატერალური დიფუზიის კოეფიციენტი. ამასთან დაკავშირებით პირობითად მიღებულ იქნა მიკროსომული ბუშტის საშუალო ფართობი –  $12.6 \cdot 10^{-10} \text{ სმ}^2$ -ის, ბუშტის მოცულობა –  $1.26 \cdot 10^{-15} \text{ სმ}^3$ -ის, ციტოქრომ  $b_5$ -ისა და მისი რედუქტაზის ჯამური რადიუსი  $3 \cdot 10^{-7} \text{ სმ}$ -ის ტოლად და ამ მონაცემებზე დაყრდნობით გამოანგარიშებულია აღნიშნული სიდიდე, რომელიც  $10^\circ\text{C}$ -ზე  $0.92 \cdot 10^{-12} \text{ სმ}^2/\text{წმ}$ -ს უდრის. ციტოქრომ  $b_5$ -ისა და რედუქტაზის მოლეკულათა ეფექტური დაჯახებების წილის გათვალისწინებით ლატერალური დიფუზიის კოეფიციენტის ჭეშმარიტი მნიშვნელობა  $3 \cdot 10^{-9} \text{ სმ}^2/\text{წმ}$ -ის ტოლი აღმოჩნდა. საჭიროა ხაზი გაესვას იმ გარემოებას, რომ ციტოქრომ  $b_5$ -ის ლატერალური დიფუზია ფოსფოლიპიდური მატრიქსის დენადობის კიდევ

ერთი გამოვლენაა, რამდენადაც ამ ჰემოპროტეინისათვის ლატერალური დიფუზიის კოეფიციენტი მიკროსომულ ფოსფოლიპიდებთან შედარებით 100-ჯერ ნაკლებია. გარკვეული აზრით შეიძლება ითქვას, რომ ჰემოპროტეინის მოლეკულების ლატერალური დიფუზიის სიჩქარე სრულადაა უზრუნველყოფილი „გამხსნელის“, ანუ ფოსფოლიპიდის მოლეკულების ლატერალური დიფუზიის სიჩქარით.

სადღეისოდ შეუძლებელია ამომწურავად ვუპასუხოთ კითხვას, თუ რა ფუნქციური დატვირთვა აქვს ენდოპლაზმურ მემბრანაში ციტოქრომ  $b_5$ -ს და საერთოდ, NADH-სპეციფიკურ რედოქს-ჯაჭვს. არსებობს მონაცემები იმის შესახებ, რომ ციტოქრომ  $b_5$  მონაწილეობს ცხიმოვან მჟავათა დესატურაციის რეაქციებში და რომ ამ ციტოქრომს სხვა ხსნადი გადამტანების დაუხმარებლად შეუძლია განახორციელოს ელექტრონთა მემბრანათაშორისი გადატანა. მონოოქსიგენაზური სისტემის ფუნქციონირების სქემაში (იხ. ქვეთავი 1.3.4.1, სქემა 1.2) ციტოქრომ  $b_5$ -ს დათმობილი აქვს სამმაგ კომპლექსში – ციტოქრომ P450–სუბსტრატი–ჟანგბადი მეორე ელექტრონის „შემომტანის“ როლი. არჩაკვს და მის თანამშრომლებს [1, 4] მიღებული აქვთ სარწმუნო მონაცემები ციტოქრომ  $b_5$ -ის მონაწილეობის შესახებ NADPH-ის ჟანგვასთან ქსენობიოტიკთა ჰიდროქსილირების შეუღლებულ რეაქციებში.

ცნობილია, რომ ციტოქრომ  $b_5$  გაცილებით ადვილად სოლუბილიზდება პროტეაზული დამუშავებით, ვიდრე ორგანული გამხსნელებით, ტრიტონ X-1000-ით ან A ტიპის ფოსფოლიპაზით. ფოსფოლიპაზა C საერთოდ არ მოქმედებს მიკროსომებში ციტოქრომ  $b_5$ -ის შემცველობაზე.

P-რედუქტაზასთან დაკავშირებული ციტოქრომ  $b_5$  (P- $b_5$ ) 11 kD მოლეკულური მასის მქონე მონომერი აღმოჩნდა, რომელსაც მიკროსომულ მემბრანაში ჩაშენების უნარი არ გააჩნია. ნაჩვენები იქნა, რომ იგი ციტოქრომ  $b_5$ -ის მოლეკულის ნაწილს წარმოადგენს, შეიცავს ჰემს და პასუხისმგებელია დონორულ-აქცეპტორულ ურთიერთქმედებაზე. ნატიური სახით D- $b_5$  გამოყოფილია დეტერგენტების გამოყენებით [49]. იგი 141 ამინომჟავურ ნაშთს შეიცავს და 16.7 kD მოლეკულური მასა გააჩნია; წყალხსნარებში აგრეგაციას განიცდის და ოქტამერის ფორმას იღებს, რომლის მოლეკულური მასა ~120 kD-ია. სპეციალურად ჩატარებული გამოკვლევებით შესაძლებელი გახდა დადგენილიყო, რომ ტრიტონ X-100-თან ციტოქრომ  $b_5$ -ის „დელიპიდიზებული“ ხსნადი კომპლექსების წარმოქმნისას დეტერგენტი ციტოქრომის ჰიდროფობულ და არა ჰიდროფილურ გლობულურ ნაწილს უკავშირდება. ტრიფსინით დამუშავებისას ციტოქრომ  $b_5$ -ს სცილდება კატალიზურად აქტიური პოლიპეპტიდური კომპონენტი, რომელიც 97 ამინომჟავურ ნაშთს შეიცავს. დამატებითი კომპონენტი 44 ამინომჟავური ნაშ-

თის შემცველია, რომელთაგან 60% არაპოლარულია.

ციტოქრომ b<sub>5</sub>-ისა და ფოსფოლიპიდების ურთიერთქმედებაზე განსაკუთრებით საინტერესო მონაცემები იქნა მოპოვებული ჰემოპროტეინის ჰიდროფობული კომპონენტის აღმოჩენის შემდეგ [48]. სწორედ ეს კომპონენტი, რომელსაც ~4 kD მოლეკულური მასა აქვს, წარმოადგენს ჰიდროფობულ „კუდს“, რომლითაც D-b<sub>5</sub> მემბრანას ემაგრება. ამასთან, მიკროსომული სუსპენზიის ულტრაბგერით და ჰომოგენიზებით შემდგომი დამუშავებისას ეს კომპონენტი სუპერნატანტში არ გადადის.

ციტოქრომ b<sub>5</sub>-ისათვის დამახასიათებელია უნარი, ჩაშენდეს მიკროსომში ჰემოპროტეინის ენდოგენურ შემცველობასთან შედარებით 5–20-ჯერადი სიჭარბით [49]. დამატებით ჩაშენებული ციტოქრომის დაკავშირების უბნები ფოსფოლიპიდები აღმოჩნდნენ. ამფიპათური ცილის დამატებითი დაკავშირების ფენომენი შეიძლება ბიომემბრანების შენების „მოზაიკური“ მოდელით აიხსნას [48]. მისი თეორია ითვალისწინებს ფოსფოლიპიდური მატრიქსის განსხვავებული უბნების (ზონების) შესაძლებლობას, სხვადასხვა ტემპერატურაზე ფაზური გადასვლები განახორციელონ. როგორც ირკვევა, კონკრეტულ პირობებში ბიომემბრანებში ფოსფოლიპიდები შეიძლება იმყოფებოდნენ „ლატერალური გამყოფი ფაზის“ მდგომარეობაში, როდესაც თხევადკრისტალური და თხევადი ზონების თანაფარდობა მატრიქსის გარკვეული უბნების ლატერალურ „კუმშვას“ განსაზღვრავს. თვლიან, რომ ლატერალური გამყოფი ფაზა და ლატერალური კუმშვა განაპირობებენ ცილის მოლეკულის არამართო კონფორმაციულ ცვლილებებს, არამედ ბიომემბრანებში მათ დამატებით ჩაშენებას.

ჰიდროფობულ პოლიპეპტიდურ ფრაგმენტში არსებული ტრიფტოფანის ფლუორესცენციის უნარის გამოყენებით დადგენილ იქნა, რომ ერთი მოლეკულა ციტოქრომ b<sub>5</sub>-ის დაკავშირებისათვის ფოსფატიდილქოლინის არაუმცირეს 35 მოლეკულაა საჭირო. ეს ცილა/ლიპიდის წონითი თანაფარდობის 0.5 კოეფიციენტს შეესაბამება. გარემოს ტემპერატურის ცვლილებისას ციტოქრომ b<sub>5</sub>-ლეციტინის კომპლექსის ფლუორესცენციის ცვლილებამ შესაძლებელი გახადა გამოთქმულიყო მოსაზრება, რომ ჰემოპროტეინის ჰიდროფობული ნაწილი აქტიურად ასოცირდება მიკროსომული ლეციტინების ცხიმოვანი მჟავების ნაშთებთან.

#### 4.4.4 მონოოქსიგენაზების და ლიპიდების ერთიანი სისტემა

ენდოპლაზმურ მემბრანებში არსებული ქსენობიოტიკთა მჟანგველი ფერმენტები თავის აქტივობას არ კარგავენ მარილთა მაღალი კონცენტრაციებით ან ხელატორებით დამუშავებისას [48]. რეაგენტები, რომლებიც

ცილის მოლეკულის კონფიგურაციას არღვევენ (მარდოვანა, გუანიდინი), ან მათ ჰიდროლიზს იწვევენ (ტრიფსინი), ფერმენტთა სოლუბილიზაციას ვერ ახდენენ. მხოლოდ ისეთი დეტერგენტები, რომლებსაც მემბრანის ლიპიდურ მატრიქსთან უალრესად მტკიცედ დაკავშირებული ცილები ხსნად მდგომარეობაში გადააყვავთ (Na-ის ქოლატი და დეზოქსიქოლატი, ტრიტონ X-100 და ტვინ-80), ახდენენ ამ ფერმენტულ სისტემათა ცალკეული კომპონენტების სოლუბილიზაციას. აქედან ცხადი ხდება, რომ ენდოპლაზმური მემბრანების სუნთქვითი ჯაჭვის კომპონენტები გარეგან, პერიფერიულ ცილებს არ მიეკუთვნება. ისინი ძირითადი, ინტეგრალური ცილა-ფერმენტებია, რომლებიც მემბრანის სიღრმეში იჭრებიან და მტკიცე კონტაქტს ამყარებენ მის ფოსფოლიპიდურ მატრიქსთან.

მიკროსომულ რედოქს-სისტემათა ცხოველმყოფელობაში ფოსფოლიპიდების გადამწყვეტ მნიშვნელობაზე მიუთითებს მათი გავლენით სხვადასხვა ქსენობიოტიკების მეტაბოლიზმის რეაქტივაცია [49]. რეაგენტები, რომლებიც უარყოფითად მოქმედებენ მემბრანათა ჰიდროფობულ თვისებებზე, როგორც წესი, აქვეითებენ მასში მყოფ მჟანგველ ფერმენტთა აქტივობებსაც. ამ ვითარებაში ეგზოგენურად დამატებულ ფოსფატიდილქოლინს უნარი აქვს საკონტროლო დონემდე აღადგინოს ზოგიერთი პროცესის სინქარე, მაგ., Na-ის დეზოქსიქოლატით დაქვეითებული ამინოპირინის N-დემეთილირების რეაქცია, ან ბუთანოლითა და აცეტონით დათრგუნული 3,4-ბენზპირინის დაქვეითებული ჰიდროქსილირება. ამასვე ადასტურებს ჩვენს ლაბორატორიაში [19] ნაჩვენები მცენარეში ტრიტონ X-100-ის დამთრგუნველი (65-85%-ით) მოქმედება ამინოპირინის, დიმეთილანილინის N-დემეთილირებაზე და ანილინის *p*-ჰიდროქსილირებაზე, რაც დეტალურად იყო განხილული ქვეთავში 1.5.

მთელ რიგ ლაბორატორიებში [48, 49] ნაჩვენებია, რომ რეკონსტრუირებულ პროტეოლიპოსომებში (სინთეზურ მიკროსომებში) სამკურნალო პრეპარატების, ჰორმონების, ცხიმოვანი მჟავების, ნაჯერი ნახშირწყალბადებისა და კანცეროგენების მეტაბოლიზება მხოლოდ ლიპიდური ბუნების მქონე თერმოსტაბილური ფაქტორის თანამყოფობისას ხორციელდება და იგი იდენტიფიცირებულია როგორც ფოსფატიდილქოლინი. გამოსახულ რეაქტივაციულ უნარს ფლობს როგორც „ნედლი“, ასევე სინთეზური ლეციტინი.

მიკროსომების დამუშავებისას ულტრაბერით, მაღალი კონცენტრაციის მარილების ხსნარებით ან გაყინვა-გათბობით NADPH-ციტოქრომ P450-რედუქტაზის მემბრანიდან სოლუბილიზება არ ხდება. მხოლოდ პროტეოლიზური ფერმენტებით, ლიპაზით ან დეტერგენტებით ზემოქმედებისას ხდება მემბრანათა სხვა კომპონენტებისაგან მისი იზოლირება. ითვლება, რომ

ინტაქტურსა და ფენობარბიტალით ან ქოლანტრენით ინდუცირებულ და შემდეგ იზოლირებულ NADPH-სპეციფიკურ ფლავოპროტეინს შორის არსებითი განსხვავება არაა.

პროტეოლიზით და დეტერგენტით გამოყოფილი ფლავოპროტეინები ერთმანეთისაგან მოლეკულური მასებით განსხვავდება. დეტერგენტით მიღებული ფერმენტის მოლეკულური მასა ~8 kD-ით მეტია. ამასთან დაკავშირებით გამოთქმულია მოსაზრება, რომ ფლავოპროტეინი მიკროსომულ მემბრანას უკავშირდება თავისი ჰიდროფობული ნაწილით, რომელიც 50–100 ამინომჟავურ (უპირატესად არაპოლარულ) ნაშთს შეიცავს და მიკროსომების პროტეოლიზურად დამუშავებისას ფერმენტს მხოლოდ ჰიდროფილური ნაწილი წყდება, ჰიდროფობული კი მემბრანის სიღრმეში რჩება. პროტეოლიზისაგან განსხვავებით დეტერგენტი საშუალებას იძლევა ფერმენტი გამოყოფილ იქნას თავის „ჰიდროფობულ კუდთან“ ერთად.

შემდგომმა გამოკვლევებმა [49] აჩვენეს, რომ ფლავოპროტეინის ჰიდროფობული „კუდი“ არსებით როლს არ ასრულებს ფლავინების ჟანგვისას აღძრულ სპექტრულ ცვლილებებში, ელექტრონის აქცეპტორთა აღდგენასა და ფერმენტ-ინჰიბიტორის ურთიერთქმედებაში. ყველა ეს თვისება ფერმენტის ჰიდროფილური ნაწილის ფუნქცია აღმოჩნდა. დადგინდა ისიც, რომ ფერმენტი, რომელიც პროტეოლიზურადაა მიღებული, რეკონსტრუირებულ მემბრანაში შემდგომი „ჩაშენებისას“ ქსენობიოტიკთა გარდაქმნის უნარს ვეღარ ამჟღავნებს. სამაგიეროდ, რეკონსტრუირებულ სისტემაში „ჩაშენებული“ დეტერგენტული ფლავოპროტეინი აქტიურად მონაწილეობს ქსენობიოტიკთა ჟანგვით კატაბოლიზმში და ამ თვისებას კარგავს ტრიფსინით დამუშავებისას, თუმცა ლიპიდების ჟანგვის უნარი შენარჩუნებული აქვს.

რაც შეეხება მიკროსომული სუნთქვითი ჯაჭვის ტერმინალურ კომპონენტს – ციტოქრომ P450-ს, იგი გამოყოფის მანიპულაციების მიმართ საკმაოდ მდგრადია. ელექტროფორეზულად ჰომოგენურ მდგომარეობაში გამოყოფილი ფერმენტის მონომერი, რომლის მოლეკულური მასა 49 kD-ის ტოლია, 409 ამინომჟავურ ნაშთს შეიცავს და მათგან 50% არაპოლარულია. მაშასადამე, ფერმენტი ერთ-ერთ ყველაზე ჰიდროფობულ მემბრანულ ცილას წარმოადგენს. სოლუბილიზებული ფერმენტის მიკროსომულ მემბრანაში „ჩამონტაჟებისას“ მისი მჟანგველი უნარი მკვეთრად იზრდება. ამჟამად დადგენილია, რომ ფერმენტი თავისი სუბსტრატებისაგან ლიპიდური „ბარიერთა“ განმსოლოებული. ამიტომ ჟანგვას წინ უძღვის ლიპიდურ მატრიქსში სუბსტრატთა შეღწევის აქტი. მთელი რიგი ციკლური და ალიფატური ნახშირწყალბადების უნარი, წარმოქმნან ციტოქრომ P450-თან კატალიზურად აქტიური კომპლექსი, დამოკიდებულია იმ სიჩქარეზე, რომლითაც ეს ქსენობიოტიკები ტოვებენ მემბრანის პოლარულ ფაზას და გადაადგილდებიან არა-

პოლარული საკენ, რომელიც ფოსფოლიპიდების ნახშირწყალბადოვანი ჯაჭვებითაა წარმოდგენილი და რომელშიც ციტოქრომ P450 იმყოფება.

მაშასადამე, როდესაც ორგანულ ნაერთთა ბიოტრანსფორმაციაზე ვმსჯელობთ, ამ პროცესში ვგულისხმობთ სუბსტრატის მემბრანაში შეღწევის, ციტოქრომ P450-ის მოლეკულის ჰიდროფობულ უბნებთან მისი დაკავშირების, მემბრანის ლიპიდ-ცილოვან კომპლექსთან მიკროსომული გადამტანების მიმაგრების და ელექტრონთა ტრანსპორტის რედუქტაზული რეაქციების მთლიან თანმიმდევრობას.

მონოოქსიგენაზურ რეაქციათა სუბსტრატები გაცილებით ინტენსიურად უკავშირდებიან უჯერ ფოსფოლიპიდებს (მაგ., ნელლ ლეციტინს), ვიდრე ნაჯერს (მაგ., დიპალმიტოილლეციტინს). ციტოქრომ P450 და მისი რედუქტაზა ლოკალიზებულია ფოსფოლიპიდების „სპეციალიზებულ“ ზონაში, რომელიც შედარებით არააქტიურ მდგომარეობაში იმყოფება, ვიდრე ფოსფოლიპიდური მატრიქსის ძირითადი მასა. ამ ზონისათვის დამახასიათებელია ფაზური გადასვლა თხევად-კრისტალურიდან თხევად მდგომარეობაში. ვარაუდობენ, რომ ამ ზონაში 20%-მდე მიკროსომული ფოსფოლიპიდი იმყოფება. ისინი არამარტო მონოოქსიგენაზური სისტემის ცალკეულ კომპონენტთა ურთიერთკონტაქტს ამყარებენ, არამედ ციტოქრომ P450-ისაკენ ლიპიდური სუბსტრატების ლატერალურ დიფუზიასაც უზრუნველყოფენ.

მოლეკულური ორგანიზაციის რა უპირატესობას იძლევა წყალში ხსნად ფორმებთან შედარებით მონოოქსიგენაზური სისტემის მემბრანაში ევოლუციური ჩამონტაჟება? პრინციპში შესაძლებელია ამ ფერმენტულ სისტემათა ორგანიზაციის ორი ტიპის არსებობა. პირველია გარკვეული სტეკიომეტრიის მქონე, მტკიცე, მრავალკომპონენტური ფერმენტული სისტემების მემბრანაში ფუნქციონირება. ელექტრონთა გადატანა შესაძლებელია მხოლოდ ასეთი „კლასტერის“ შიგნით. მოდელი, რომელსაც „კლასტერულ ორგანიზაციას“ უწოდებენ, რედუქტაზისა და ციტოქრომ P450-ის მოლეკულებს შორის ხისტ კავშირს ითვალისწინებს [51]. მიკროსომულ მემბრანასთან მაქსიმალურად მიახლოებულ სისტემებზე ჩატარებულმა ცდებმა საჭირო გახადა მონოოქსიგენაზური სისტემის ფუნქციური ინტეგრაციის არსებობის აღიარება. ნაჩვენები იქნა, რომ ციტოქრომ P450 მიკროსომულ მემბრანაში წარმოქმნის არა უმცირეს ორი მოლეკულისაგან შემდგარ კომპლექსს [51-53]. ნანახია კომპლექსის წარმოქმნის შესაძლებლობა ჰემოპროტეინსა და შესაბამის რედუქტაზას შორის თანაფარდობით 2 : 1. ასეთი ბინარული კომპლექსის არსებობა მართლაც გამოვლენილია ინტეგრირებულ მიკროსომებში. აღმოჩნდა, რომ მისი წარმოქმნა 0°C-ზეც კი ხდება, როდესაც მოლეკულათა მოძრაობის სიჩქარე მნიშვნელოვნადაა დაქვეითებული. აქედან შეიძლება გაკეთდეს დასკვნა, რომ ჰემოპროტეინი და მისი რედუქ-

ტაზა მემბრანაში უშუალო სიახლოვეში იმყოფებიან. ითვლება, რომ ქსენობიოტიკთა დეგრადაციაში ოქსიგენაზათა კლასტერული ორგანიზაცია ამ ფერმენტულ სისტემას უმაღლეს კატალიზურ აქტივობას ანიჭებს. არსებობს მონაცემები, რომ ფოსფატიდილქოლინი კლასტერული კომპლექსის აუცილებელი შემადგენელი კომპონენტია.

მონოოქსიგენაზების მოლეკულური ორგანიზაციის მეორე ტიპი ფერმენტ-სუბსტრატის ურთიერთქმედებაში გულისხმობს ენდოპლაზმურ მემბრანებში გადამტანების შემთხვევით შეჯახებებს (ლატერალურ დიფუზიას) [7, 54]. რეკონსტრუირებულ არამემბრანულ სისტემებზე და აგრეთვე გადამტანებით „აღჭურვილ“ ლიპოსომებზე ჩატარებული ცდებით შესაძლებელი გახდა ამ ტიპის რეალურად არსებობის დადგენა. ცხადი გახდა, რომ გადამტანები მეტად ძვრადია, ადვილად დიფუნდირებენ მემბრანის სიბრტყეში და შემთხვევითი დაჯახებისას ადგილი აქვს ელექტრონის გადატანას. ამასთან, ბუნებრივია, წარმოიქმნება მუხტის გადამტანი შესაბამისი ბინარული კომპლექსები. იმის გამო, რომ ენდოპლაზმური მემბრანები თხევადკრისტალური სტრუქტურისაა, რომელშიც ცილის მოლეკულებს ლატერალური მოძრაობა შეუძლია, სწორედ ამიტომ გადამტანების ერთმანეთთან თვისობის მანსიათებელი კონსტანტა უნდა იყოს ის სიდიდე, რომელიც მემბრანაში ფერმენტულ სისტემათა მოლეკულურ ორგანიზაციას განსაზღვრავს. სადღეისოდ, რამდენადაც ჩვენთვის ცნობილია, ენდოპლაზმურ მემბრანებში ელექტრონთა გადამტანებისათვის ამ სიდიდის რაოდენობრივი შეფასება არ მომზდარა. ამიტომ მონოოქსიგენაზური სისტემის მოლეკულური ორგანიზაციის პრობლემა ისევ გადაუჭრელია. ამასთან დაკავშირებით ინტენსიური კვლევა ჩატარდა ლიპიდური ბიშრის მიკროსიბლანტზე ელექტრონთა გადატანის სიჩქარის დამოკიდებულების გამოსავლენად. საწყის კრიტერიუმად იქცა ის ვარაუდი, რომ მემბრანის ფოსფოლიპიდური კომპონენტის მიკროსიბლანტის დაქვეითებისას (რაც მიკროსომიდან ქოლესტეროლის მოცილებით მიიღწევა), შესაძლებელი გახდებოდა დადგენილიყო დიფუზიაზე დამოკიდებული ელექტრონთა გადატანის რეაქციები და ამ გზით გამოვლენილიყო ელექტრონის გადამტანი თავისუფალი დიფუზიის უნარის მქონე ცილა.

აღნიშნული მიდგომით ცნობილი გახდა, რომ NAD(P)H-ციტოქრომ b<sub>5</sub>-რედუქტაზული რეაქცია დამოკიდებულია დიფუზიის სიჩქარეზე, NAD(P)H-ციტოქრომ P450-რედუქტაზული კი არა [49]. ეს შედეგები შეიძლება განხილულ იქნას, როგორც NADH-დამოკიდებული ჟანგვითი ჯაჭვის ორი საწყისი კომპონენტის – ფლავოპროტეინის და ციტოქრომ b<sub>5</sub>-ის ლატერალური ძვრადობის პირდაპირი ექსპერიმენტული დადასტურება. ისინი სარწმუნოდ გვიჩვენებს მემბრანაში ამ გადამტანთა უწესრიგო განაწილებას.

მასადაამე, ციტოქრომ P450-ისა და NADPH-სპეციფიკური ფლავო-

პროტეინის შემთხვევაში ადგილი უნდა ჰქონდეს შედარებით მტკიცე კომპლექსის წარმოქმნას, ვიდრე ამ ფლავოპროტეინისა და ციტოქრომ  $b_5$ -ის შემთხვევაშია. განხილული შედეგები გვაფიქრებინებს, რომ მემბრანული და წყალში ხსნადი მონოქსიგენაზური სისტემების მოლეკულურ ორგანიზაციაში პრინციპული განსხვავება არ არსებობს.

#### 4.4.5 ლიპიდების ფერმენტული პეროქსიდაცია და ქსენობიოტიკების ჟანგვა ენდოპლაზმურ მემბრანებში ერთი და იგივე ელექტრონის სატრანსპორტო სისტემით კატალიზდება

ფოსფოლიპიდთა უჯერი რივის ცხიმოვანი მჟავების ფერმენტული ზე-ჟანგური ჟანგვა რეაქციათა იმ ერთ განსაკუთრებულ კლასს წარმოადგენს, რომელიც ენდოპლაზმურ მემბრანებში ლოკალიზებული ფერმენტული კომპლექსებით ხორციელდება. განსაკუთრებულ მნიშვნელობას იძენს ამ პროცესში მიკროსომული NADPH-სპეციფიკური ფლავოპროტეინისა და ციტოქრომ P450-ის მონაწილეობის საკითხი.

პირველი მონაცემები იმის შესახებ, რომ ლიპიდთა პეროქსიდაცია და ქსენობიოტიკთა ჟანგვა ერთიდაიმავე ფერმენტებით კატალიზდება, ერნსტერსა და მის თანამშრომლებს [55, 56] ეკუთვნის. ამ დასკვნამდე ავტორები შემდეგ ფაქტებზე დაყრდნობით მივიდნენ:

1. ქსენობიოტიკთა ჟანგვის პროდუქტები აინჰიბირებენ ლიპიდთა ზეჟანგურ ჟანგვას;
2. მიკროსომული პრეპარატების „დაბერებისას“, როდესაც ქსენობიოტიკთა ჟანგვის მკვეთრი დაქვეითება ხდება, იხსნება ამ პროდუქტთა მიერ NADPH-დამოკიდებული ზეჟანგური ჟანგვის ინჰიბირება.

აღნიშნული ფაქტების ასახსნელად ავტორთა მიერ წამოყენებულ იქნა ჰიპოთეზა, რომლის თანახმადაც ორივე პროცესში მონაწილეობს NADPH-ის დამჟანგავი ელექტრონის ტრანსპორტის საერთო ფერმენტული სისტემა. ახლად გამოყოფილ მიკროსომებში ქსენობიოტიკები ამ სისტემაზე „ბატონდებიან“, რის გამოც NADPH-ის ძირითადი ფონდი მათ დეგრადაციაშია ჩართული, ხოლო ლიპიდთა ზეჟანგური ჟანგვა დათრგუნულია. „მონოპოლირების“ ეფექტი არ შეინიშნება „ასაკოვან“ მიკროსომებში და NADPH-ის მჟანგავი სისტემა აქტიურად მონაწილეობს ლიპიდურ პეროქსიდაციაში.

სადღეისოდ მოპოვებული ექსპერიმენტული მონაცემები [48] ადასტურებენ NADPH-სპეციფიკური ფლავოპროტეინის გადამწყვეტ როლს მემბრანული ლიპიდების ზეჟანგურ ჟანგვაში. იგი წარმატებით აკატალიზებს ამ პროცესს  $ADP-Fe^{2+}$ -ისა და  $EDTA-Fe^{2+}$ -ის კომპლექსებთან თანამყოფობი-



სას. ორივე შემთხვევაში ადგილი აქვს რეაქციის საბოლოო პროდუქტის – მალონის დიალდეჰიდის ერთნაირი რაოდენობით დაგროვებას. როგორც ირკვევა, მიკროსომებში ლოკალიზებულია ლიპიდთა პეროქსიდაციის, სულ მცირე, სამი ფერმენტული სისტემა, რომლებიც დაახლოებით ერთნაირი სიჩქარით, მაგრამ განსხვავებული სტექიომეტრიით ახორციელებენ ზეჟანგურ ჟანგვას, რადგან თითოეულ მათგანს ფარდობის  $[O_2]$  : [მალონის დიალდეჰიდი] სხვადასხვა მნიშვნელობა გააჩნია. სამიდან ორი სისტემა დაკავშირებულია NADPH-სპეციფიკურ, ხოლო ერთი – NADH-სპეციფიკურ ფლავოპროტეინის ფუნქციონირებასთან. პირველის თავისებურებას ის წარმოადგენს, რომ მას გააჩნია ძლიერ სტაბილური აღდგენილი მდგომარეობა, რის გამოც ფუნქციონირებს როგორც ერთელექტრონიანი გადამტანი და ადვილად გადადის მთლიანად აღდგენილ მდგომარეობაში.

უნდა აღინიშნოს, რომ ფლავოპროტეინის კატალიზური აქტივობა ერთნაირია ხსნარსა და ფოსფოლიპიდურ ბიშრეში [49]. ეს ამფიფილური ცილებისათვის დამახასიათებელი თვისებაა, რაც იმაში მდგომარეობს, რომ ისინი კონფორმაციული ცვლილებების მიმართ მდგრადობას ამჟღავნებენ წყლიდან ლიპიდურ ფაზაში გადასვლისას. იგივე ხდება ციტოქრომების  $b_5$ -ისა და P450-ის შემთხვევაში. ამ უკანასკნელს მემბრანაში ფუნქციონირებისას კონფორმაციული ცვლილებები არ სჭირდება, რადგან მის აქტიურ ცენტრს ორგანიზებული მდგრადი სისტემა აქვს, რაც აგრეთვე მისი მოქმედების საფუძველსაც წარმოადგენს.

დეტერგენტით სოლუბილიზებული NADPH-სპეციფიკური ფლავოპროტეინი რეკონსტრუირებულ სისტემებში ჩაშენებისას ფუნქციურად აქტიურია როგორც ქსენობიოტიკების მეტაბოლიზმში, ასევე ლიპიდთა პეროქსიდაციაში. ამ ფაქტს წინა პლანზე გამოყავს აღნიშნულ რეაქციებში ფერმენტის ჰიდროფობული ფრაგმენტის როლი. ეჭვგარეშეა, რომ ამ კომპონენტს არსებითი მნიშვნელობა აქვს ფლავოპროტეინის ფუნქციის რეალიზაციაში. უცნობი რჩება მხოლოდ ის, მონაწილეობს თუ არა იგი ფერმენტის მემბრანასთან დაკავშირებისა და მისი განსაზღვრული სივრცობრივი ორიენტაციის ჩამოყალიბებაში, თუ კატალიზური თვისებებიც გააჩნია.

ღვიძლის მიკროსომებიდან გამოყოფილი ფლავოპროტეინის ხელოვნურ ლიპოსომში ჩაშენების შემდეგ ლიპიდთა ზეჟანგური ჟანგვის იგივე დონე რეგისტრირდება. ეს შედეგი თავისთავად იმაზე მეტყველებს, რომ ეს ფერმენტი არაა ზეჟანგური ჟანგვის მალიმიტირებელი ფაქტორი.

დეტერგენტი, რომელიც ენდოპლაზმური მემბრანებში ლიპიდ-ცილურ და ლიპიდ-ლიპიდურ ურთიერთქმედებათა ცვლილებებს იწვევს, რკინის იონებისათვის დაკავშირების უბანთა რიცხვსაც ცვლის [48]. როგორც აღნიშნული იყო, მემბრანასთან დაკავშირებული რკინის იონები რადიკალწარმოქმნის

ცენტრებს ქმნიან და ლიპიდურ ფაზაში ჯგჯვური რეაქციების განვითარებას იწყებენ. საფიქრებელია, რომ ანიონური დეტერგენტები ზრდიან რკინის იონთა დაკავშირების ცენტრთა რიცხვს და ამ გზით ლიპიდთა პეროქსიდაციას აძლიერებენ. კატიონური დეტერგენტი – აცეტილტრიმეთილამონიუმბრომიდი საპირისპირო ეფექტს ავლენს, ხოლო არაიონური დეტერგენტი – ტრიტონ X-100 – პეროქსიდაციის სიჩქარეზე პრაქტიკულად არ მოქმედებს. ეს შედეგები მემბრანულ სტრუქტურებში ლიპიდთა ზეჟანგურ ჟანგვაზე ჰიდროფობული ურთიერთქმედების ცვლილებების მარეგულირებელი გავლენის საუკეთესო მაგალითს წარმოადგენს.

არსებობს მონაცემები [48], რომლებიც ლიპიდთა ფერმენტულ ზეჟანგურ ჟანგვაში და ქსენობიოტიკთა ჰიდროქსილირებაში NADPH-სპეციფიკური ფლავოპროტეინის უდავო მონაწილეობაზე მიუთითებენ. მათი ანალიზი საშუალებას იძლევა გაკეთდეს შემდეგი დასკვნები:

1. ორივე პროცესი მაღალსპეციფიკურია NADPH-ის მიმართ;
2. NADPH-ციტოქრომ P450-რედუქტაზის კონკურენტული ინჰიბიტორი – დაჟანგული NADP ეფექტურად თრგუნავს ლიპიდთა ფერმენტულ ზეჟანგურ ჟანგვას და ქსენობიოტიკთა ჰიდროქსილირებას;
3. არსებობს სრული შესაბამისობა სხვადასხვა ტიპის მემბრანებში NADPH-ციტოქრომ P450 რედუქტაზულ აქტივობასა და ლიპიდთა ფერმენტულ ზეჟანგურ ჟანგვას შორის;
4. ფერმენტული რეაქციის სამივე ტიპი – NADPH-ციტოქრომ P450-ის ჟანგვა-აღდგენა, NADPH-დამოკიდებული ჰიდროქსილირება და NADPH-დამოკიდებული ლიპიდთა ფერმენტული ზეჟანგური ჟანგვა სუბსტრატის მიმართ ერთნაირად სტერეოსპეციფიკურია;
5. NADPH-სპეციფიკური ფლავოპროტეინისადმი ძლიერ მაღალი თვისობის მქონე ხელოვნური აქცეპტორი მენადიონი (ვიტამინი K<sub>3</sub>) ერთნაირად ეფექტურად თრგუნავს NADPH-დამოკიდებულ პროცესებს – დიმეთილანილინის ჟანგვასა და ლიპიდთა პეროქსიდაციას;
6. NADPH-ის ოქსიდორედუქცია, ქსენობიოტიკთა ჟანგვა და ლიპიდთა ფერმენტული ზეჟანგური ჟანგვა უაღრესად მგრძობიარეა პროტეაზების მოქმედების მიმართ. ფლავოპროტეინის სოლუბილიზაცია მიკროსომული მემბრანების ტრიფსინითა და პრონაზით ხანმოკლე დამუშავებისას ჰიდროქსილირებისა და ლიპიდთა პეროქსიდაციის მკვეთრ ინჰიბირებას ახდენს;
7. ელექტრონთა გადატანის NADPH-სპეციფიკური სისტემა და ლიპიდთა ფერმენტული ზეჟანგური ჟანგვა მიკროსომული მემბრანის იმ საერთო ფრაგმენტებშია ლოკალიზებული, რომლებიც ფრაქციის ულტრაბერით ან იზოამილის სპირტით დამუშავებისას მიიღება.

ჩამოთვლილი არგუმენტების მიუხედავად, არსებობს ფაქტები, რომელთა თანახმადაც ორივე პროცესის განსახორციელებლად ფლავოპროტეინის გარდა, საჭიროა ელექტრონის გადამტანი სხვა კომპონენტების არსებობაც. საკმარისია აღინიშნოს, რომ ეს ფერმენტი მემბრანის ზედაპირზეა განლაგებული და მასთან დასაკავშირებლად გამოიყენება არა ლიპიდები, არამედ მემბრანული ცილების ამინომჟავური ნაშთები (ამის მიზეზია პროტეაზების მაღალი მასოლუბილიზებელი აქტივობა). მემბრანულ ცილებთან სუსტი კონტაქტი გვაფიქრებინებს, რომ ზეჟანგური ჟანგვის ინიციაციაში ფლავოპროტეინი უშუალოდ არ მონაწილეობს. ამისათვის საჭიროა რადიკალების წარმოქმნელ ცენტრებსა და ფერმენტულ ზეჟანგურ ჟანგვას შორის სივრცობრივი სიახლოვე. ამიტომ თვლიან [49], რომ ლიპიდთა ფერმენტულ პეროქსიდაციას წარმატებით განხორციელებისათვის NADPH-სპეციფიკური ფლავოპროტეინი აუცილებელია, მაგრამ პროცესის ინიციაცია მაინც არა ამ პირველ კომპონენტთან, არამედ უფრო მოშორებით, სადღაც შუალედ ან საბოლოო უბანზე ხდება.

ენდოპლაზმურ მემბრანებში NADPH-სპეციფიკური ელექტრონის სატრანსპორტო ჯაჭვის მომდევნო კომპონენტი საბოლოოდ ცნობილი არაა. ვარაუდობენ, რომ ფლავოპროტეინსა და ციტოქრომ P450-ს შორის აქცეპტორის ყველაზე შეუცვლელ კომპონენტს არაჰემური, ფერედოქსინის მსგავსი რკინის შემცველი ცილა უნდა წარმოადგენდეს, რომელიც ზოგიერთ რეკონსტრუირებულ სისტემაში მართლაც ეფექტურად ფუნქციონირებს. ამ ცილის არსებობა დადგენილია თირკმელზედა ჯირკვლის მიტოქონდრიულ მემბრანაში (იხ. ქვეთავი 2). ღვიძლის მიკროსომულ ფრაქციაში ასეთი ცილის იდენტიფიკაციის ყველა მცდელობა უშედეგო აღმოჩნდა. ამიტომ, სადღეისოდ ითვლება, რომ მჟანგველი სისტემის ამ უბანზე ციტოქრომ b<sub>5</sub> ფუნქციონირებს [48].

ენდოპლაზმური მემბრანების NADPH-სპეციფიკური რედოქს-სისტემის ცალკეული კომპონენტის თვისებათა განხილვა არ იძლევა რომელიმე მათგანზე ლიპიდთა პეროქსიდაციის ზუსტი ლოკალიზაციის დადგენის საშუალებას, რადგან თავისუფალი რადიკალები, რომლებიც ზეჟანგურ ჟანგვას ინიცირებენ, შეიძლება წარმოიქმნან როგორც საწყის (თვითჟანგვადი ფლავინის), ასევე ტერმინალურ (ციტოქრომ P450-ის) უბნებზე. მითუმეტეს, ძნელია ამ პროცესში ელექტრონის სატრანსპორტო ჯაჭვის შუალედური უბნის როლზე მსჯელობა.

ახლა განვიხილოთ NADPH-სპეციფიკური რედოქს-სისტემის საბოლოო ელექტრონული აქცეპტორის, ციტოქრომ P450-ის შესაძლო მონაწილეობა ლიპიდთა ფერმენტულ ზეჟანგურ ჟანგვაში. ამთავითვე უნდა ითქვას, რომ მთელი რიგი მკვლევარებისა უარყოფს ამ ფაქტს და ამის საფუძველად

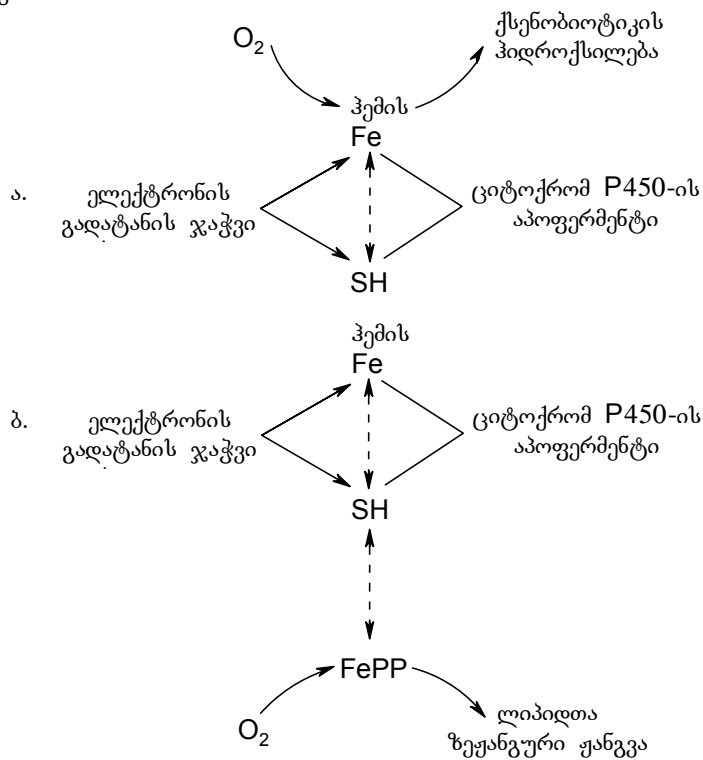
ასახელებენ საკმაოდ დამაჯერებელ არგუმენტს: აღნიშნული ჰემოპროტეინის კლასიკური ინჰიბიტორი – ნახშირბადის მონოოქსიდი ფერმენტულ ზეჟანგურ ჟანგვაზე არავითარ გავლენას არ ახდენს. რა თქმა უნდა, ეს არგუმენტი სამართლიანი იქნებოდა იმ შემთხვევაში, თუ ჩავთვლით, რომ ზეჟანგური ჟანგვისათვის აუცილებელია ელექტრონის გადატანა ჰემოპროტეინის ჰემურ უბანზე. ამასთან, გასათვალისწინებელია ციტოქრომ P450-ის სამი მეტად საყურადღებო თავისებურება [48]:

1. აპოფერმენტის SH-ჯგუფები, როგორც ლიგანდები, მონაწილეობენ ჰემური რკინის დაკავშირებაში;
2. ფერმენტი ლოკალიზებულია მემბრანის ჰიდროფობულ ზონაში, ანუ ზეჟანგური ჟანგვის სუბსტრატთა უშუალო სიახლოვეში;
3. ციტოქრომ P450 წარმოადგენს რედოქს-სისტემის იმ კომპონენტს, რომელზეც ყველაზე მეტადაა მოსალოდნელი თავისუფალი რადიკალების წარმოქმნა. ჰიდროქსილის რადიკალებთან ერთად გამორიცხული არაა ორგანული რადიკალების, კერძოდ, ამინომჟავათა რადიკალების გენერირებაც. ყოველივე ზემოთქმულის გათვალისწინებით არჩაკვება წარმოადგინა ლიპიდთა ფერმენტულ ზეჟანგურ ჟანგვაში ციტოქრომ P450-ის მონაწილეობის რამდენადმე უჩვეულო მექანიზმის სქემა (ნახ. 4.7).

ამ მკვლევარის [4] თანახმად, ჰემოპროტეინის აქტიურ ცენტრში მყოფ აპოფერმენტის SH-ჯგუფთან რკინის პიროფოსფატის დაკავშირებისას ხდება თავისუფალი რადიკალების გენერირებადი ახალი ცენტრის ჩამოყალიბება (სქემაზე FePP), რომლის აქტივობაც ნახშირბადის მონოოქსიდით არ ინჰიბირდება. ამ შემთხვევაში ციტოქრომ P450 ფუნქციონირებს არა როგორც ჰემოპროტეინი, არამედ როგორც არაჰემური გოგირდშემცველი რკინაპროტეინი. მიკროსომების ელექტრონების სატრანსპორტო სისტემაში ციტოქრომ P450 წარმოადგენს იმ ერთადერთ გადაამტანს, რომელსაც აქტიურ ცენტრში SH-ჯგუფი გააჩნია და ელექტრონის გადატანაში მონაწილეობის მიღება შეუძლია. ზეჟანგური ჟანგვის ფერმენტული სისტემა კი მგრძობიარეა SH-ჯგუფების ისეთი შხამების მიმართ, როგორც *p*-ქლორმერკურიბენზოატი,  $HgCl_2$  და მერსალილია. როგორც ჩანს, SH-ჯგუფი ლიპიდურ პეროქსიდაციაში მხოლოდ ენდოგენურ რკინასთან კომპლექსირებისას ერთვება. არაფერმენტულ, ასკორბატდამოკიდებულ ზეჟანგურ ჟანგვაში SH-ჯგუფების რაიმე როლი გამორიცხებულია, რადგან ეს პროცესი სულფჰიდრილური ჯგუფების შხამების მიმართ არამგრძობიარეა.

სოიის ნახარდებიდან მიღებულ მიკროსომულ ფრაქციაზე ჩვენს ლაბორატორიაში ჩატარებული გამოკვლევებით [19] დადგენილია, რომ ლიპოპეროქსიდაციის როგორც ფერმენტული, ასევე არაფერმენტული პროცესი ქსენობიოტიკის (დიმეთილანლინის) ჟანგვის გაძლიერებას იწვევს.  $Fe^{2+}$ -

ისა და NADPH-ის თანამყოფობისას ლიპიდთა ზეჟანგური ჟანგვის ორივე რეაქცია თითქმის სინერგულად ჯამდება. პარალელურად ადგილი აქვს ფრაქციის N-დემეთილაზური აქტივობის ზრდას. ფოსფატიდილქოლინი, რომელსაც ანტიოქსიდანტური თვისებები გააჩნია, ლიპიდთა ზეჟანგური ჟანგვის ინჰიბირებასთან ერთად აღნიშნული ქსენობიოტიკის N-დემეთილირებას ასტიმულირებს. ფოსფატიდილეთანოლამინს ასეთი გამოკვეთილი მოქმედება არ გააჩნია. როგორც ჩანს, მისი ნახშირწყალბადოვანი ნაშთის უჯერი ბმები თვითონ წარმოადგენს თავისუფალი რადიკალებისათვის მოხერხებულ სამიზნეს, რაზეც მიუთითებს ლიპოპეროქსიდაციის ერთერთი საბოლოო პროდუქტის – მალონის დიალდეჰიდის დაგროვება სარეაქციო არეში. მიღებული მონაცემების საფუძველზე დასაშვებად მივიჩნიეთ მოსაზრება, რომ ქსენობიოტიკის ჟანგვის პროცესი რადიკალურ სტადიას შეიცავს, თუმცა იგი ლიპიდური პეროქსიდაციისადმი დამოუკიდებლობით ხასიათდება.



ნახ. 4.7. ციტოქრომ P450-ის მონაწილეობა ქსენობიოტიკთა ჰიდროქსილირებისა (ა) და ლიპიდთა ფერმენტული ზეჟანგური ჟანგვის (ბ) რეაქციებში (განმარტება იხ. ტექსტში) [4].

არსებითია მემბრანის ჰიდროფობულ ზონაში ციტოქრომ P450-ის ლოკალიზაციის ფაქტორიც: დანარჩენი გადამტანებისაგან განსხვავებით, მისი სოლუბილიზაცია მხოლოდ ლიპაზებითა და დეტერგენტებით ხერხდება [49]. ჰემოპროტეინი მემბრანასთან მტკიცედ ბმული ფერმენტია და მისთვის დაცულია თავისუფალი რადიკალების ინიციაციის ცენტრებისა და ზეჟანგური ჟანგვის სუბსტრატთა სივრცობრივი სიახლოვის პირობა. ფერმენტულ ზეჟანგურ ჟანგვაში ციტოქრომ P450-ის მონაწილეობაზე მიუთითებს ამ პროცესის დათრგუნვა ჰემოპროტეინის ისეთი სპეციფიკური ინჰიბიტორებით, როგორებიც SKF-S25A (β,β-დიეთილამინოეთილდიფენილპროპილ-აცეტატი) და ნიკოტინამიდა.

ამგვარად, არსებულ მონაცემებზე დაყრდნობით შეგვიძლია მივიღოთ, რომ:

1. ენდოპლაზმურ მემბრანებში არსებობს ლიპიდთა ზეჟანგური ჟანგვის ორი სისტემა, რომელიც ერთმანეთისაგან პრინციპულად განსხვავდება ინიციაციის სტადიით. NADPH-სპეციფიკური სისტემის შემთხვევაში რადიკალწარმოქმნელი ცენტრები – რკინის (II) იონები ელექტრონის გადამტანი ჯაჭვით ფერმენტულად აღდგება, ხოლო არაფერმენტულ სისტემაში რკინის აღდგენა ასკორბატით ან შესაფერისი რედოქს-პოტენციალის მქონე სხვა აღმდგენელით ხდება;
2. ორივე პროცესის კინეტიკა და სტექიომეტრია იმის სასარგებლოდ მეტყველებს, რომ ამ რეაქციათა განვითარებას ერთიანი, რადიკალურ-ჯაჭვური მექანიზმი უძევს საფუძვლად;
3.  $Fe^{2+}$  ან  $Fe^{3+}$  უკავშირდება ცილის გარკვეულ ფუნქციურ ჯგუფს, რის შედეგადაც ეს უკანასკნელი რადიკალების წარმოქმნის (რეაქციის ინიციაციის) ცენტრი ხდება. ლიპიდთა ფერმენტული ზეჟანგური ჟანგვის შემთხვევაში ასეთი ჯგუფი შეიძლება იყოს ციტოქრომ P450-ის აქტიურ ცენტრში არსებული სულფჰიდრილური ჯგუფი, ხოლო არაფერმენტულ ზეჟანგურ ჟანგვაში ეს როლი შეიძლება შეასრულოს იმ მემბრანული ცილების ფუნქციურმა ჯგუფებმა, რომლებიც ჰიდროფობული ფაზიდან არ სოლუბილიზდება.

#### 4.5 რეგულაცია ციტოქრომ P450-ის ქიმიური მოდიფიკაციის დონეზე

ფერმენტებზე არსებული ტრადიციული შეხედულება იმის შესახებ, რომ კატალიზური აქტის დასრულების შედეგად ისინი ცვლილებებს არ განიცდიან, უკანასკნელი ორი ათეული წლის მანძილზე კრიტიკულად იქნა გადასინჯული. აღმოჩნდა, რომ მრავალი ფერმენტი რეაქციის მსვლელობისას

ქიმიურ მოდიფიკაციას განიცდის და ეს განსაკუთრებით იმ ფერმენტებს ეხებათ, რომელთა ფუნქციონირებაც თავისუფალი რადიკალების, ჟანგბადის აქტიური ფორმების და რეაქციისუნარიანი ინტერმედიატების გენერირებას ან რეალიზაციას უკავშირდებიან [57-61]. მოდიფიკაცია, უპირველეს ყოვლისა, ინაქტივაციაში ვლინდება (ცხრილი 4.1). ეს მოვლენა “თვითინაქტივაციის” სახელწოდებითაა ცნობილი.

ცხრილი 4.1

კატალიზის პროცესში ჟანგბადის აქტიური ფორმებით ფერმენტთა ქიმიური მოდიფიკაცია [58]

ფერმენტები	ინაქტივაციის გამომწვევი აგენტი	ქიმიური მოდიფიკაციის მიზეზი
ციტოქრომი P450 2B4	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	ცისტეინის და მეთიონინის ჟანგვა, პემის დაკარგვა
CuZn-სუპეროქსიდისმუტაზა	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	პისტიდინის ჟანგვა
Fe-სუპეროქსიდისმუტაზა	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	ტრიფტოფანის, პისტიდინისა და ცისტეინის ჟანგვა
D-გლუკოზოქსიდაზა	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	ტრიფტოფანის, პისტიდინისა და ცისტეინის ჟანგვა
ქსანთინოქსიდაზა	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	ტრიფტოფანის, პისტიდინისა და ცისტეინის ჟანგვა
ქლორპეროქსიდაზა	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	ტრიფტოფანის, პისტიდინისა და ცისტეინის ჟანგვა
ლაქტოპეროქსიდაზა	HO <sup>•</sup>	ტრიფტოფანის, პისტიდინისა და ცისტეინის ჟანგვა
გლუტათიონპეროქსიდაზა	O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	ტრიფტოფანის, პისტიდინისა და ცისტეინის ჟანგვა
მიელოპეროქსიდაზა	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , ClO <sup>-</sup>	მეთიონინის, თიროზინის ჟანგვა
NADH-ოქსიდაზა	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , ClO <sup>-</sup>	პემის დაკარგვა

თავისუფალი რადიკალების დაგროვება უჯრედისათვის განსაკუთრებით საშიფათოა, რადგან ისინი მრავალი პათოლოგიური პროცესის ინიციაციას იწვევენ. როდესაც მათი კონცენტრაცია საშიშ ზღვარს აჭარბებს და უჯრედიდან მოცილება შეუძლებელი ხდება, უჯრედი აპოპტოზს, ანუ წინასწარ დაპროგრამებულ “თვითმკვლელობას” მიმართავს. ტერმინი “აპოპტოზი” (ბერძნ. “ფოთოლცვენა”) შესანიშნავად გამოხატავს მოვლენის არსს. მთელი რიგი პროცესების ჩართვის შედეგად დაზიანებული უჯრედი კი არ ნეკროზდება, არამედ განლევას განიცდის. ორგანოები იშლება, მაკრომოლეკულები ჰიდროლიზდება და ისინი სხვა უჯრედების მიერ საკვებ და სააშენებლო მასალად გამოიყენება.

ფერმენტთა თვითინაქტივაციის მოვლენა შეიძლება განხილულ იქნას, როგორც “აპოპტოზი ფერმენტულ დონეზე”, რამდენადაც ამ დროს თავისუფალი რადიკალების გენერატორი ფერმენტი თვითონ გამოდის მწყობრიდან და უჯრედისათვის არასასურველი ინტერმედიატების წარმოქმნა საფუძველშივე ისპობა. აქვე უნდა აღვნიშნოთ ამჟამად არსებული, საკმაოდ დამაჯერებელი მოსაზრება იმის შესახებ, რომ მოდიფიკაციის გზით მაკრომოლეკულების ინაქტივაცია ჩართული უნდა იყოს შიდაუჯრედული ცილების ბრუნვის მექანიზმში, რომლის საშუალებითაც უჯრედიდან მათი მოლეკულების მოცილება რეგულირდება. ეს გარემოება უაღრესად მნიშვნელოვანია ყველა იმ სიტუაციისათვის, რომელიც ქსენობიოტიკებისა და სხვადასხვა წამლების ჭარბი რაოდენობის ორგანიზმიდან გამოდევნასთანაა დაკავშირებული [57]. ფერმენტთა ინაქტივაციის მოლეკულური მექანიზმი და უჯრედში მისი ჭეშმარიტი როლი ჯერ კიდევ საფუძვლიან შესწავლას მოითხოვს. ამ მიმართებით მოგვეპოვება შემდეგი ფაქტები: ჟანგბადის აქტიური ფორმებით მრავალი ფერმენტი ჟანგვით მოდიფიკაციას განიცდის; ინაქტივაცია შეიძლება განხორციელდეს ფერმენტულად, ქიმიურად ან რადიოლიზურად გენერირებული რეაქციისუნარიანი ჟანგბადის ფორმებით; ჟანგბადოვანი რადიკალები ცილის აქტიურ ცენტრთან ახლოს მყოფი ამინომჟავური ნაშთების მოდიფიკაციის უნარს ამჟღავნებენ და ეს რეაქცია მეტად სპეციფიკურია; აქტიური ცენტრის ახლოს აღძრულმა სტრუქტურულმა ცვლილებებმა კონფორმაციული ძვრები და პროტეოლიზისადმი მგრძობიარობის გაზრდა შეიძლება გამოიწვიონ.

ძუძუმწოვრების უჯრედებში ჟანგბადის აქტიური ფორმების მთავარი პროდუცენტებია მემბრანული NADPH-ოქსიდაზები და მიტოქონდრიების ელექტრონ-სატრანსპორტო ჯაჭვების კომპონენტები [62]. ჟანგბადის აქტიური ფორმები გარკვეულ ფიზიოლოგიური როლს ასრულებენ ციტოქრომ P450-ით მდიდარ ქსოვილებსა და უჯრედებში: ჰეპატოციტებში, ეპითელიურ უჯრედებში და ენდოთელიოციტებში [63]. ნაჩვენებია, რომ ანთებითი პროცესებისას და იშემიით გამოწვეული ჟანგვითი სტრესის დროს ჟანგბადის აქტიური ფორმების გენერაცია მნიშვნელოვანია სისხლძარღვების ტონუსის რეგულაციისათვის, სხვადასხვა ბიოლოგიური პროცესების მედიატორებისა და რეგულატორების ბიოსინთეზის წარმართვისათვის [64-66]. მაგრამ უმეტეს შემთხვევებში ჟანგბადის აქტიური ფორმების წარმოქმნა საზიანო პროცესების ინიცირებას იწვევს, მაგალითად, ალკოჰოლის ქრონიკული მოხმარებისას ეს აგრესიული ნაწილაკები ციტოქრომ P450 2E-ის კატალიზური აქტიურობის შედეგად ლვიდლის ციროზის განვითარებას იწვევენ [67]. ციტოქრომ P450-ის მკვლევართა ერთ-ერთი ავტორიტეტული ჯგუფი (ვ. ლიანოვიჩი და მისი თანამშრომლები – რუსეთის



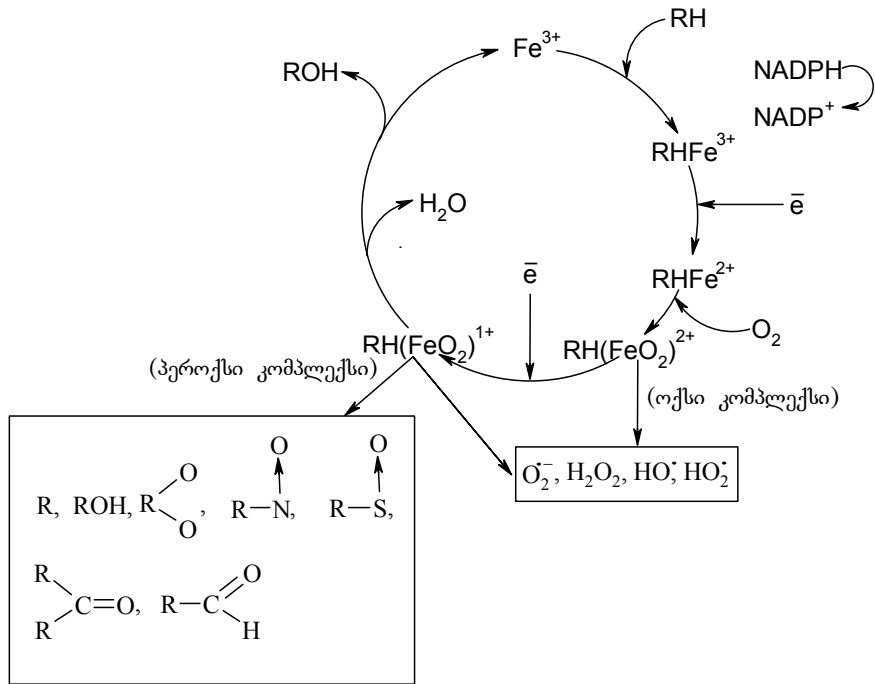
მეცნიერებათა აკადემიის ციმბირის ფილიალიდან) თვლის, რომ მიკროსო-  
მული მონოოქსიგენაზების მიერ ჟანგბადის აქტიური ფორმების წარმოქმნა  
თვით ქსენობიოტიკების მეტაბოლიზმში მონაწილე ფერმენტული სისტემების  
ფუნქციონირებისათვისაა მნიშვნელოვანი, რამდენადაც ამ დროს ხორციელდება  
ციტოქრომ P450-ის საპირისპირო, ანუ ნეგატიური რეგულაცია, ინდუცირდება  
ქსენობიოტიკების მეორე მეტაბოლიზმის ფაზის (კონიუგაციის) ფერმენტები,  
იზრდება უჯრედების ანტიოქსიდანტური დაცვა [62].

ციტოქრომ P450-ის საპირისპირო, ანუ ნეგატიური რეგულაცია (ე.წ.  
downregulation) ჟანგბადის აქტიური ფორმების მონაწილებით შეიძლება  
მიმდინარებდეს ტრანსკრიპციულ დონეზე, ბირთვული NF1-ფაქტორის  
ინაქტივაციით, ან პროტეასომური დეგრადაციის გაძლიერებით. ცნობილია,  
რომ გლუკოკორტიკოიდები, ანთების საწინააღმდეგო ციტოკინები (სიმსივ-  
ნის ნეკროზის  $\alpha$ -ფაქტორი,  $\gamma$ -ინტერფერონი, ინტერლეიკინები), ზრდის  
ფაქტორები და ბაქტერიული ლიპოპოლისაქარიდები აინჰიბირებენ ციტოქ-  
რომ P450-ის მრავალი იზოფორმის (CYP1A, CYP3A, CYP2B, CYP2E)  
გენების ექსპრესიას, რაც ჟანგბადის აქტიური ფორმების გენერაციის  
გაძლიერებისას NF1-ფაქტორის ინჰიბირებით რეალიზდება [68]. NF1-  
ფაქტორი სინერგიულად მოქმედებს პოლიციკლური არომატული ნახშირ-  
წყალბადების AhR-რეცეპტორთან. იგი შეიცავს ცისტეინის ნაშთს  
(Cys427), რომლის დაჟანგვის შემთხვევაშიც NF1-ფაქტორი ვეღარ უკავ-  
შირდება **RN**-ს შესაბამის რეგულატორულ უბანს [69]. ამას ადასტურებს  
შემდეგი ფაქტები: წყალბადის ზეჟანგის ან კატალაზას ინჰიბიტორის – 3-  
ამინო-1,2,4-ტრიაზოლის დამატება ვირთაგვების ჰეპატოციტებზე, რომ-  
ლებიც ინკუბირდებიან ინდუქციისათვის ხელისშემწყობ პირობებში (ფენო-  
ბარბიტალის შემცველ არეში), იწვევს ციტოქრომ P450-ის იზოფორმის –  
CYP2B1-ის ტრანსლაციაში მონაწილე მატრიცული **RN**-ის რაოდენობის  
მკვეთრ შემცირებას, ხოლო 5 mM N-აცეტილცისტეინის დამატება პირი-  
ქით, 5-10-ჯერ ზრდის ინდუქციის ხარისხს [97].

ჟანგბადის აქტიური ფორმების პროდუქცია მიკროსომული მონო-  
ოქსიგენაზების მიერ მრავალი ცილის, მათ შორის ციტოქრომ P450-ის  
ჟანგვით მოდიფიკაციას იწვევს [71, 72]. ჟანგბადის აქტიური ფორმების  
მიმართ განსაკუთრებით მაღალმგრძობიარე იზოფორმაა CYP2E1, რომელიც  
სხვა იზოფორმებთან (CYP1A1, CYP1A2, CYP2B1, CYP2B2 და CYP3A)  
შედარებით გაცილებით ხანმოკლე სიცოცხლისუნარიანობით ხასიათდება.  
ვირთაგვის ღვიძლის მიკროსომებში ჟანგვითი სუბსტრატის არარსებობისას  
CYP2E1 იზოფორმის შემცველობა 6-7 სთ-ში ნახევრდება, ხოლო ეთანო-  
ლის დამატების შემთხვევაში ნახევარდაშლის პერიოდი 37 სთ-მდე  
ხანგრძლივდება [73]. CYP2E1-ის დეგრადაციას აჩქარებს NADPH (1 mM),

ხოლო ანტიოქსიდანტები ტროლოქსი (50  $\mu\text{M}$ ) და  $\alpha$ -ტოკოფეროლი (20  $\mu\text{M}$ ), ისევე როგორც რკინის იონების ხელატორები დეფეროქსამინი (40  $\mu\text{M}$ ) და (100  $\mu\text{M}$ ) ხელს უწყობენ მიკროსომებში ჰემოპროტეინის ნატიური ფორმით შენარჩუნებას.

კატალიზური ციკლის პროცესში ციტოქრომ P450-ის ინაქტივაცია სხვადასხვა მექანიზმით შეიძლება განხორციელდეს (ნახ. 4.8).



ნახ. 4.8. ოქსიდაზურ რეაქციებში აქტიური ინტერმედიატების წარმოქმნა.

RH – სუბსტრატი;

Fe – ციტოქრომ P450-ის ჰემური რკინა [58].

პირველი მექანიზმი ამ ჰემოპროტეინის პეროქსი-კომპლექსის დაშლის შედეგად აქტიური დროებითი სუბსტრატების წარმოქმნასთანაა დაკავშირებული. ასეთ რეაქციისუნარიან ინტერმედიატებს მიეკუთვნება თავისუფალი ორგანული რადიკალები, ეპოქსიდები, N-ოქსიდები, S-ოქსიდები, ალდეჰიდები, კეტონები და სხვ. ისინი თავის მხრივ კოვალენტურად უკავშირდებიან აპოციტოქრომ P450-ს და მის მოდიფიკაციას იწვევენ. ინაქტივაციის ეს მექანიზმი შეინიშნება ე.წ. “გამანადგურებელი” სუბსტრატების ჟანგვისას, რომლებიც შეუქცევადად ან თითქმის შეუქცევადად

აინჰიბირებენ ფერმენტს. სუბსტრატის რეაქციისუნარიანი ჯგუფების აქტივაციას თან სდევს პროსთეტულ ჯგუფთან ან აპოფერმენტთან კოვალენტურად დაკავშირებული რეაქციისუნარიანი მეტაბოლიტების ფორმირება. სუბსტრატებს, რომლებიც ციტოქრომ P450-ის ასეთი გზით ინაქტივაციას იწვევენ, “გამანადგურებელი” სუბსტრატები ეწოდებათ (მაგ., ქლორამფენიკოლი უკავშირდება აპოფერმენტის ლიზინის ნაშთს; პართიონი, ქლოროფორმი უკავშირდებიან ცისტეინს და ა.შ.). ისინი ფერმენტისადმი მაღალ სპეციფიკურობას ავლენენ.

ციტოქრომ P450-ის ინაქტივაციის მეორე მექანიზმი დაკავშირებულია კატალიზურ ციკლში ფერმენტის აქტიურ ცენტრზე ჟანგბადის აქტიური ფორმების ( $O_2^-$ -ის,  $HO^{\cdot}$ -ისა და  $H_2O_2$ -ის) გენერირებასთან. ეს შეიძლება არაშეუღლებელი მონოოქსიგენაზური რეაქციების შედეგად იყოს, როდესაც NADPH-ის აღმდგენელი ექვივალენტები არასრულად ხმარდება ენდოგენური თუ ეგზოგენური ნაერთების ჰიდროქსილირებას. სუპეროქსიდული ანიონის გენერირება ძირითადად ციტოქრომ P450-ის პრეროგატივია, რადგან ამ პროცესში სხვა მიკროსომული გადამტანების წვლილი ძალიან მცირეა. ციტოქრომ P450 უპირატესად მის აქტიურ ცენტრზე ფორმირებული  $H_2O_2$ -ით ინაქტივირდება, მაშინ როდესაც  $O_2^-$ -ის დისმუტაციით მიღებული  $H_2O_2$  ინაქტივაციას უმნიშვნელო ეფექტს იძლევა [74-82].

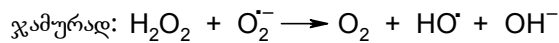
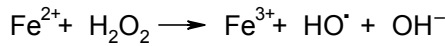
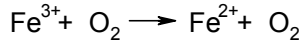
საერთოდ, სუბსტრატის ქიმიური ბუნებიდან გამომდინარე, ციტოქრომ P450-ის ინაქტივაცია სამი გზით შეიძლება განხორციელდეს [77]. ესენია: - 1) აპოფერმენტთან მეტაბოლიტების შეუქცევადი დაკავშირება; 2) მეტაბოლიტების ჰემის რკინასთან თითქმის შეუქცევადი დაკავშირება; 3) ჰემის ალკილირება ან დესტრუქცია. პირველი და მესამე შეიძლება კომბინირებული იყოს. ჰემის მოდიფიკაცია მისი შემდგომი დაზიანებით, შექცევად ინაქტივაციას იწვევს, მაშინ როდესაც აპოფერმენტის მოდიფიკაცია შეუქცევადია [83, 84].

ამგვარად, “გამანადგურებელი” სუბსტრატების ჟანგვისას ციტოქრომ P450-ის ინაქტივაციას წარმოქმნილი რეაქციისუნარიანი ინტერმედიატები (ჟანგბადის ნაწილობრივ აღდგენილი ფორმები) ახდენენ, რომლებიც ჰემის ან აპოფერმენტის ქიმიურ მოდიფიკაციას ახორციელებენ. ინაქტივაცია უფრო ხშირად ჰემის დეგრადაციის შედეგია, ვიდრე აპოპროტეინის დესტრუქცია. აღნიშნულ გამოკვლევებში ციტოქრომ P450-ის P420-ად კონვერსია არ დარეგისტრირდა. ამასთან დაკავშირებით, არ შეიძლება გვერდი ავუაროთ იმ განსხვავებული მონაცემების განხილვას, რომლებიც არჩაკოვის [85] ლაბორატორიაშია მოპოვებული: დითიონიტით რედუცირებული იზოლირებული ციტოქრომ P450-ის იზოფორმა 2B4 სწრაფ ინაქტივაციას განიცდის აუტოოქსიდაციისას წარმოქმნილი ჟანგბადის

აქტიური ტიპებით და ეს ინაქტივაცია არააქტიურ ციტოქრომ P420-ად კონვერსიაში გადასვლის ფონზე მიმდინარეობს. მიკროსომულ ან ლიპოსომაში ჩაშენებული ციტოქრომ P450 მეტად სტაბილურია ფერი- და ფერო-მდგომარეობებში [86]. აქედან გამომდინარე, გამოითქვა მოსაზრება, რომ ციტოქრომ P450-ის ინაქტივაციისათვის აუცილებელია თავისუფალ-რადიკალური საფეხური, ხოლო ციტოქრომ P420-ად კონვერსია მისი დეგრადაციის შუალედ საფეხურად შეიძლება ჩაითვალოს, რადგან იგი საკმაოდ არასტაბილურია და  $O_2$ -ის თანამყოფობისას ადვილად კარგავს ჰემს [87].

ოქსიდაზურ და ოქსიგენაზურ რეაქციებში ფორმირებული  $H_2O_2$ -ით ჰემის დაჟანგვა ან დაზიანება “გასაღების” როლს ასრულებს ციტოქრომ P450-ის ინაქტივაციაში. მრავალი ფერმენტი ოქსიდაზური სისტემებით განიცდის ინაქტივაციას. მათ შორისაა თვით ციტოქრომ P450, NAD(P)H-ოქსიდაზები, ქსანთინოქსიდაზა და არაფერმენტული სისტემები, რომლებიც შეიცავენ ასკორბატს,  $O_2$ -ს და Fe(III)-ს ან Fe(II)-ს [88-90]. საკმაოდ დეტალურადაა შესწავლილი ბაქტერიული გლუტამინსინთეტაზას ჟანგვითი ინაქტივაციის მექანიზმი [91]. ნაჩვენებია, რომ ინაქტივაცია დამოკიდებულია  $O_2$ -ისა და NAD(P)H-ის თანამყოფობაზე: სტიმულირებას განიცდის Fe(III)-ით და ინჰიბირდება კატალაზით, Mn(II)-ით ან EDTA-ით. სისტემებისათვის, რომლებიც არაჰემური რკინის ცილას (ფერედოქსინს, პუტი-დარედოქსინს) შეიცავენ, ინაქტივაცია ინჰიბირდება დიმეთილსულფოქსიდისა და მანიტოლის ტიპის რადიკალებით. დადგენილია, რომ ამ ფერმენტის ჟანგვითი მოდიფიკაცია ასოცირებულია ერთ სუბერთეულზე ჰისტიდინის ერთი ნაშთის დაკარგვასთან და კარბონილის ჯგუფის გაჩენასთან. ფერმენტის შემდგომი ჟანგვა მეორე ჰისტიდინის დაზიანებას იწვევს, მაგრამ ინაქტივაცია არ ეხება მეთიონინის ან SH-ჯგუფების დაჟანგვას.

რეაქციისუნარიანობის მხრივ ჟანგბადის აქტივაციის პროდუქტები ერთმანეთისაგან განსხვავდება. თავისთავად  $H_2O_2$  და  $O_2^{\cdot-}$  არ არიან ძლიერი დამჟანგველები.  $O_2^{\cdot-}$ -ს დაბალი რედოქს-პოტენციალი გააჩნია, ხოლო  $H_2O_2$  შედარებით სტაბილურია. ამდენად საფიქრებელია, რომ მაკრომოლეკულებს ისინი ეფექტურად პირდაპირ ვერ უტევენ. ამავე დროს ცნობილია  $O_2^{\cdot-}$ -ის ინაქტივაციური უნარი ისეთ ფერმენტებთან ურთიერთქმედებისას, როგორცაა კატალაზა, პეროქსიდაზა, ტრანსფერაზა, ლაქტატდეჰიდროგენაზა და სხვ. აშკარაა აგრეთვე მაკრომოლეკულებზე  $O_2^{\cdot-}$ -ის პირდაპირი დესტრუქციული მოქმედება. ამიტომ საფიქრებელია, რომ ინაქტივაციის პროცესში ძირითად დამჟანგველს  $HO^{\cdot}$ -რადიკალი წარმოადგენს, რომელიც  $H_2O_2$ -დან ჰაბერ-ვეისისა და ფენტონის რეაქციის შედეგად მიიღება:



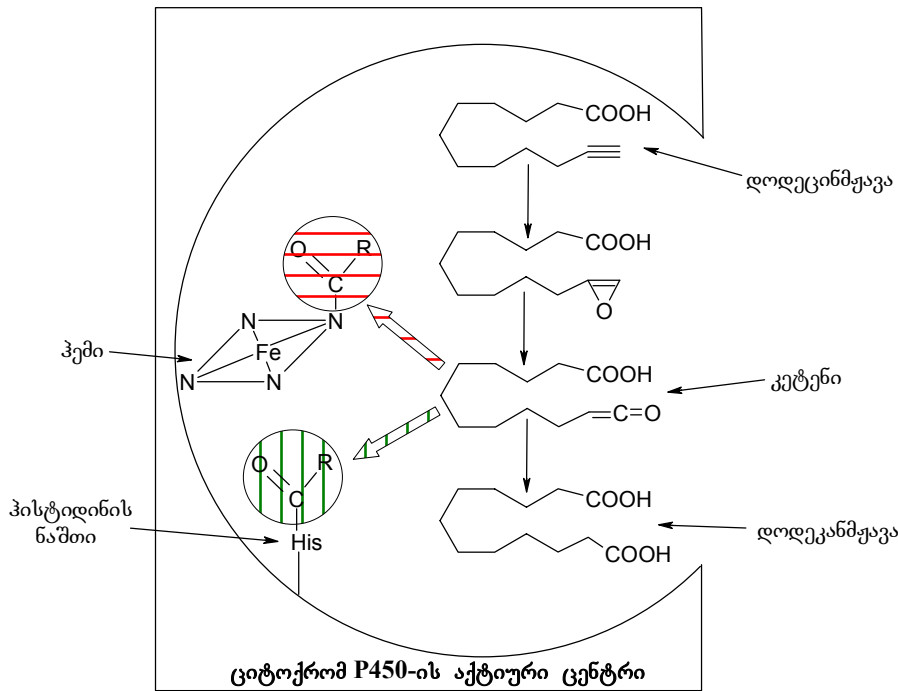
ჰიდროქსილ-რადიკალებმა, რომელთაც მეტად ხანმოკლე სიცოცხლისუნარიანობა აქვთ, შეიძლება იმოქმედონ, როგორც ძლიერმა დამჟანგველებმა უშუალოდ მათი გენერირების ადგილზე, მაშინ როდესაც  $\text{H}_2\text{O}_2$  და  $\text{O}_2^-$  ფორმირების ადგილიდან დიფუზიის გზით დიდ მანძილზე გადაადგილდებიან.  $\text{H}_2\text{O}_2$ -მა შეიძლება გაიაროს უჯრედულ და შიდაუჯრედულ მემბრანულ ბარიერში, ხოლო  $\text{O}_2^-$  დიფუზიას მხოლოდ სპეციფიკური ანიონგამტარი არხების გავლით ახერხებს. სუპეროქსიდ-ანიონი მეტად რეაქციისუნარიანი ხდება ჰიდროფობულ ან მეტალთან კოორდინირებულ უბნებში. მისი თანამყოფობისას ჰიდროქსილის რადიკალები ცილების ფრაგმენტაციას იწვევენ.  $\text{O}_2$ -ს შეუძლია  $\text{HO}^\bullet$ -დამოკიდებული ჟანგვის პირველად პროდუქტებთან ურთიერთქმედება, რაც მაკრომოლეკულების დესტრუქციას იწვევს [92].

ციტოქრომ P450-ის ინაქტივაციას საგრძნობლად ამცირებენ ფოსფოლიპიდები და მათი ეს ეფექტი დამოკიდებული არაა მემბრანებში ფოსფოლიპიდების შემადგენლობაზე. ინაქტივაცია სუსტდება ანაერობულ პირობებში და ასევე ნახშირბადის მონოოქსიდის ან ციტოქრომ b<sub>5</sub>-ის თანამყოფობისას [49].

ჰემის ალკილირებით გამოწვეული ინაქტივაციის ერთ-ერთი თვალსაჩინო მაგალითია ბოცვრის ღვიძლის მიკროსომებში დოდეცინმჟავას ციტოქრომ P450-დამოკიდებული ჟანგვა. ამ დროს წარმოქმნილი აქტიური ინტერმედიატი – კეტენი ჰემის აცილირებას იწვევს, რაც ციტოქრომ P450-ის ინაქტივაციის მიზეზი ხდება [93]. ამასთან დაკავშირებით უაღრესად საყურადღებო შედეგები მიიღეს ჰელვიგმა და თანაავტ. [94, 95], როდესაც მათ ანალოგიური გამოკვლევები ჩაატარეს ცერცვიდან მიღებულ ციტოქრომ P450-ზე და დაადგინეს, რომ ცხოველურისაგან განსხვავებით, მცენარეში ინაქტივაციის მთავარი მიზეზი ფერმენტის აქტიურ ცენტრში ჰემთან ასლოს მყოფი ერთ-ერთი ამინომჟავას (სავარაუდოდ, ცისტეინის ან ჰისტიდინის) ნუკლეოფილური ნაშთის აცილირებაა (ნახ. 4.9).

ამგვარად, ცხოველური და მცენარეული ციტოქრომ P450-ის დოდეცინმჟავათი თვითინაქტივაციის პროცესში ერთი არსებითი განსხვავება ვლინდება: ცხოველურ ჰემოპროტეინში ქიმიურ მოდიფიკაციას ჰემი

განიცდის, ხოლო მცენარეულში აპოფერმენტი. ცხოველურ ციტოქრომ P450-ში ჰემი ამდროს სრულად იშლება, ფერმენტი მწყობრიდან გამოდის და ამის შედეგად კარგავს თავის კატალიზურ აქტივობას. სხვა ვითარებაა გამოვლენილი მცენარეულ ციტოქრომ P450-ის შემთხვევაში. ჩვენს ლაბორატორიაში [96] ჩატარებულმა კვლევებმა დამაჯერებლად გვიჩვენეს, რომ ჰემოპროტეინი ინაქტივაციას განიცდის როგორც მონოოქსიგენაზა, მაგრამ იმავდროულად მალალ პეროქსიდაზულ აქტივობას ამჟღავნებს. სხვაგვარად რომ ითქვას, გარკვეულ პირობებში ქიმიური მოდიფიკაციის შედეგად მონოოქსიგენაზას აქტიური ცენტრი პეროქსიდაზას აქტიური ცენტრის ანალოგად ტრანსფორმირდება. გამოვლენილ ეფექტს ადგილი აქვს როგორც მიკროსომულ ფრაქციაში (*in vitro* პირობებში), ასევე ძოლიან მცენარეულ ქსოვილში (*in vivo* პირობებში).

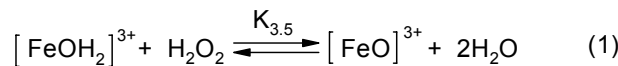


ნახ. 4.9. ციტოქრომ P450-ის ინაქტივაციის სავარაუდო სქემა ჰელვიგის და თანაავტ. [95] მიხედვით. ვერტიკალური შტრიხით ნაჩვენებია მცენარეული ციტოქრომ P450-ის ქიმიური მოდიფიკაციის შედეგად ამინომჟავას ნაშთთან წარმოქმნილი აცილის ჯგუფი, ხოლო ჰორიზონტალური შტრიხით – ცხოველური ციტოქრომ P450-ის ჰემთან წარმოქმნილი აცილის ჯგუფი.

კატალიზურ რეაქციებში მნიშვნელოვანი როლი პეროქსიდაზას ხუთ ჟანგვა-აღდგენით მდგომარეობას ეკუთვნის. ესენია აღდგენილი ( $\text{Fe}^{+2}$  ანუ მარტივად, მდგომარეობა 2), დაჟანგული ( $\text{Fe}^{+3}$  ანუ 3), I კომპლექსი ( $\text{Fe}^{+5}$  ანუ 5), II კომპლექსი ( $\text{Fe}^{+4}$  ანუ 4) დაბოლოს, მდგომარეობა  $\text{Fe}^{+6}$  (ოქსი-პეროქსიდაზაში), რომელიც აღდგენილი ფერმენტის მოლეკულურ ჟანგბადთან ურთიერთქმედებით მიიღება [97]. ჩვენთვის საყურადღებოა I და II კომპლექსები.

I კომპლექსი (მწვანე ფერის) ხასიათდება შთანთქმის მაქსიმუმებით 407- და 658 ნმ-ებზე. ჯორჯის ჰიპოთეზის [98] თანახმად წყალბადის ზეჟანგთან ფერმენტის ურთიერთქმედებისას ჰემის რკინა +3-დან დაჟანგულობის ძლიერ მაღალ (+5) მდგომარეობაში გადადის და ამის შედეგად ოქსო-იონები  $\text{FeO}^{3+}$  (ოქსენოიდის ანალოგი) წარმოიქმნება.

I კომპლექსის წარმოქმნის კინეტიკა საფუძვლიანადაა შესწავლილი ჩანსის [99] კლასიკური გამოკვლევებით. მის მიერ პეროქსიდაზისა და  $\text{H}_2\text{O}_2$ -ის ურთიერთქმედება შემდეგი მარტივი რეაქციით შეიძლება გამოისახოს:



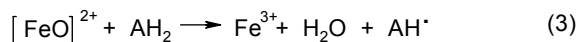
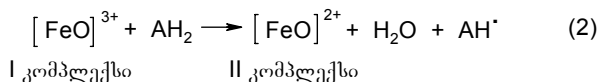
ამ შემთხვევაში ფერმენტის პორფირინი და მეხუთე აქსიალური ლიგანდი სიბრტყის ქვევით იმყოფებიან, ხოლო რეაქციის სიჩქარის კონსტანტა ( $K_3$ ) ბიომოლეკულურ პირდაპირ რეაქციას და პეროქსიდაზას ჟანგვის მდგომარეობის +3-დან +5-მდე ცვლილებას ახასიათებს. ეს რეაქცია სინამდვილეში არც ისე მარტივია, როგორც ზევითაა გამოსახული: პროცესის მალიმიტირებელ სტადიას წინ უსწრებს წონასწორობის დამყარება, ხოლო თვით პროცესი შეიძლება მრავალი სტადიისაგან შედგებოდეს.

$\text{H}_2\text{O}_2$ -თან ან სხვა დამჟანგველებთან პეროქსიდაზას ურთიერთქმედების სიჩქარე pH-ზე პრაქტიკულად არაა დამოკიდებული. კატალაზასთან ძმარმჟავას ზეჟანგის ურთიერთქმედების შესწავლამ აჩვენა, რომ მჟავას არადისოცირებული ფორმა ფერმენტთან გაცილებით სწრაფად რეაგირებს, ვიდრე მისი ანიონი. პეროქსიდაზასთან  $\text{H}_2\text{O}_2$ -ის რეაქციისას არ შეიძლება გამოირიცხოს  $\text{HO}_2^-$ -ის უპირატესი მონაწილეობა, რამდენადაც ეს ანიონი უფრო ძლიერი ლიგანდია.

I კომპლექსის ელექტრონული სტრუქტურა დიდი ხნის განმავლობაში დისკუსიის საგანს წარმოადგენდა, ვიდრე მესბაუერის სპექტროსკოპულმა გამოკვლევებმა I და II კომპლექსებში რკინის იონის მდგომარეობის ანალოგია არ დაადასტურეს. ამ მონაცემების თანახმად,  $\text{Fe}^{+5}$ -ის ფორმალური მდგომარეობიდან განსხვავებით, I კომპლექსში  $\text{Fe}^{+4}$  მდგომარეობა რეალიზდება, რადგან რკინის იონი ერთ ელექტრონს ჰემის პორფირინის ბირთვი-

დან იღებს, რომელიც I კომპლექსში კატიონ-რადიკალის (RO<sup>+</sup>) სახით იმყოფება. დოლფინმა [100] აჩვენა, რომ პეროქსიდაზისა და კატალაზას I კომპლექსების შთანთქმის სპექტრები მთელი რიგი მეტალპორფირინული კომპლექსების π-კატიონ-რადიკალების სპექტრების ანალოგიურია, ანუ ჟანგვის მაღალი ხარისხის მდგომარეობაში მყოფი რკინის არსებობა შეიძლება აიხსნას პორფირინის ბირთვის და რკინის ატომზე ლოკალიზებულ ელექტრონების სპინური ურთიერთქმედებით. ამგვარად, პეროქსიდაზას I კომპლექსში ერთი მჟანგველი ექვივალენტი რკინის იონზეა ლოკალიზებული, ხოლო მეორე – ჰემოპროტეინის პორფირინის ბირთვზე. საყურადღებოა, რომ ციტოქრომ c-პეროქსიდაზაში ერთი მჟანგველი ექვივალენტი ფერმენტის აქტიური ცენტრის ერთ-ერთ ამინომჟავურ ნაშთზეა ლოკალიზებული და არა პორფირინულ ბირთვზე, როგორც პეროქსიდაზაშია.

II კომპლექსი, ანუ მდგომარეობა 4 (წითელი ფერის) ხასიათდება შთანთქმის მაქსიმუმებით 417, 530 და 561 ნმ-ებზე. იგი მიიღება H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-თან პეროქსიდაზას ურთიერთქმედებისას სხვადასხვა აღმდგენლების (არომატული ამინების, ფენოლების, ასკორბატის, ფეროციტოქრომ c-ს, ფეროციანიდის, იოდიდის, ნიტრიტისა და სხვ.) თანამყოფობისას. ორ უკანასკნელ აღმდგენელთან რეაქციას თან ახლავს პროტონის მოხმარება. ვარაუდობენ, რომ II კომპლექსს ფერილ-იონის (FeO<sup>2+</sup>) სტრუქტურა გააჩნია და +4 ჟანგვის ხარისხის რკინის (II) იონს შეიცავს. ამას ადასტურებს მესბაუერის სპექტრებიც. II კომპლექსი რადიკალური მექანიზმით რეაგირებს აღმდგენელთა მოლეკულებთან და საწყის ფერმენტს Fe<sup>3+</sup> ჟანგვის ხარისხით უბრუნდება. II კომპლექსის წარმოქმნისა და მოხმარების ზოგიერთ კანონზომიერებას გამოსახავს მე-2 და მე-3 გარდაქმნები:



ზოგიერთი მკვლევარი პეროქსიდაზებისა და სხვა ჰემოპროტეინების ჰემური რკინის მაღალ დაჟანგულ მდგომარეობის არსებობას უნდობლობით ეკიდება, თუმცა რკინის იონისათვის ასეთი მდგომარეობები არაორგანულ ქიმიაში საკმაოდ კარგადაა ცნობილი [101]. FeO<sup>2+</sup> და FeO<sup>3+</sup> იონები არსებობენ მჟავა ხსნარებში და შესაბამის კატიონებს, ხოლო ტუტე ხსნარებში შესაბამის ჰიდროქსიდებს წარმოქმნიან. პერფერიტიონი (FeO<sub>3</sub><sup>2-</sup>) და ფერატიონი (FeO<sub>4</sub><sup>2-</sup>) რკინის +4 და +6 მდგომარეობებით ხასიათდებიან და



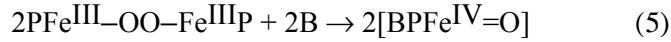
არსებობენ ტუტე არეში, მაშინ როდესაც მჟავა არეში ისინი სწრაფად იშლებიან ჟანგბადის გამოყოფით. პეროქსიდაზებში რკინის მაღალი ვალენტური მდგომარეობის სტაბილიზაციაში დიდ როლს ასრულებენ მისი ლიგანდური გარემოცვა და აქტიური ცენტრის ამინომჟავური ნაშთები. ასე მაგალითად, პირშუშხას პეროქსიდაზას II კომპლექსში  $Fe^{+4}$  მდგომარეობა შემდეგნაირადაა სტაბილიზებული: ერთი მჟანგველი ექვივალენტი რკინის ატომზე, ხოლო მეორე პორფირინის ბირთვზეა ლოკალიზებული, რომელიც  $\pi$ -კატიონ-რადიკალის სახით არსებობს. ნაჩვენებია ასეთი რადიკალის წარმოქმნა პირშუშხას ცინკ-პეროქსიდაზაში [102]. მისი დაჟანგვისას  $K_2IrCl_6$ -ით, ერთი ექვივალენტით ღარიბი პეროქსიდაზა მიიღება, რომლის შთანთქმის სპექტრი პეროქსიდაზების I კომპლექსის მსგავსია, ხოლო მპრ-სიგნალი 2გ-ფაქტორით ხასიათდება. დაჟანგული ცინკ-პეროქსიდაზა შეიძლება ხელახლა აღდგეს საწყის მდგომარეობამდე  $K_3IrCl_6$ -ით. რკინის მაღალვალენტური მდგომარეობის სტაბილიზაციაში არსებითი როლი შეიძლება შეასრულოს ფერმენტის აქტიურმა ცენტრმა. მაგ., ციტოქრომ c-პეროქსიდაზას I კომპლექსი სტაბილიზებულია ფერმენტის აქტიური ცენტრის ამინომჟავების ნაშთების თავისუფალი რადიკალებით. I კომპლექსის წარმოქმნასა და სტაბილიზაციაში, სულ ცოტა, ციტოქრომ c-პეროქსიდაზას აქტიური ცენტრის ოთხი ამინომჟავური ნაშთი მაინც მონაწილეობს: დისტალური ჰისტიდინი-52, არგინინი-48, პროქსიმალური ჰისტიდინი-174 და დისტალური ტრიფტოფანი-51.

არსებობს მონაცემები იმის შესახებ, რომ ფერმენტის შუალედი ფორმების (I და II კომპლექსების) სუბსტრატებთან ურთიერთქმედების დროს აღდგლი აქვს პეროქსიდაზას, წყალბადის ზეჟანგსა და სუბსტრატს შორის სამმაგი კომპლექსის წარმოქმნას [103], ციტოქრომ P450-ის კატალიზური ციკლის მსგავსად.

მკვლევართა რამდენიმე ჯგუფმა [104-111] მიიღო ოქსენოიდის ანუ I და II კომპლექსების ანალოგები, რომლებსაც არამარტო ფერმენტთა შუალედური კომპლექსების სტრუქტურის იმიტაცია, არამედ მათთვის დამახასიათებელ რეაქციებში მონაწილეობაც შეუძლიათ.

მიღებულია ციტოქრომ P450-ის, პეროქსიდაზისა და კატალაზას II კომპლექსის სტრუქტურული და ფუნქციური ანალოგები [108-111]. ზოგიერთი რკინის (III) პორფირინების ორბირთვული ზეჟანგური კომპლექსები N-მეთილიმიდაზოლის, პირიდინის ან პიპერიდინის მოქმედებისას  $[PF_6^{IV}=O]^{2+}$ -ტიპის ნაერთებად გარდაიქმნება [109-111]. ამ შემთხვევაში ორი შესაძლო რეაქცია მიმდინარეობს:





სადაც, B – პირიდინი, პიპერიდინი ან N-მეთილიმიდაზოლია.

[BPFe<sup>IV</sup>=O]-ში რკინის იონის მდგომარეობა I და II კომპლექსებში მისი მდგომარეობის ანალოგიურია (ცხრილი 4.2).

ცხრილი 4.2

ციტოქრომ P450-ისა და მისი კომპლექსების სტრუქტურული მოდელები

მოდელური სისტემა	მოდელის დახასიათება
OEP-Fe <sup>III</sup> Cl + 2-იოლოხო- მეტა-ქსილოლი	ოქსენოიდის, ანუ ციტოქრომ P450-ის კომპლექს I-ის, კატალაზისა და პეროქსიდაზას მოდელი: [Fe <sup>V</sup> =O] <sup>3+</sup>
PFe-OO-FeP + N-მეთილ- იმიდაზოლი [PFe <sup>IV</sup> =O]	ციტოქრომ P450-ის კომპლექს II-ის, კატალაზისა და პეროქსიდაზას მოდელი: [Fe <sup>IV</sup> =O] <sup>2+</sup>

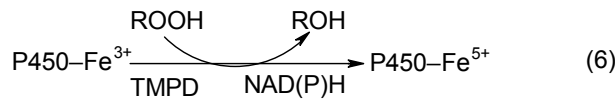
სადაც OEP – 2,3,7,8,12,13,17,18-ოქტაეთილპორფირინის დიანიონია.

1972 წელს ობრაიენის [112] ლაბორატორიაში პირველად იქნა ნაჩვენები, რომ ციტოქრომ P450-ს პეროქსიდაზას თვისებები გააჩნია. ფერმენტი სტეროლების ჰიდროზეჟანგების სპირტებად აღდგენას აკატალიზებს წყალბადის ისეთი დონორის თანამყოფობისას, როგორც N,N,N,N'-ტეტრამეთილ-*p*-ფენილენ-დიამინია (TMPD). ამ შემთხვევაში პეროქსიდაზულ აქტივობაზე გავლენას არ ახდენენ CO, აზოტი, EDTA და 2-ფენილ-2-პროპანოლი. მხოლოდ მცირე მაინჰიბირებელ (20%-ით) მოქმედებას ავლენდა ნატრიუმის აზიდი. მიკროსომების 80°C-მდე გაცხელებით პეროქსიდაზული აქტივობა 95%-ით ქვეითდებოდა.

ღვიძლის მიკროსომების პეროქსიდაზულ რეაქციებზე დამთრგუნველ მოქმედებას ამჟღავნებენ მიკროსომული რედოქს-ჯაჭვის სუბსტრატები, კერძოდ, I ტიპის სუბსტრატები: ანდროსტენდიონი, ტესტოსტერონი, 17β-ესტრადიოლი, ამინოპირინი, ჰექსობარბიტალი და ლინოლის მჟავა. მათ მიერ გამოწვეული ინჰიბირება 65-34%-ს აღწევს, მაშინ როდესაც II ტიპის სუბსტრატები – ანილინი, იმიდაზოლი, პირიდინი, კორტიკოსტეროლი და *n*-ოქტილამინი პეროქსიდაზულ აქტივობას 83-50%-ით აქვეითებენ. აღმოჩნდა აგრეთვე, რომ სხვა ჰემშემცველი ნაერთებისაგან (ჰემატინი, მეტჰემოგლობინი, ციტოქრომი *c*, ციტოქრომ P420) განსხვავებით ყველაზე მაღალი პეროქსიდაზული აქტივობა ციტოქრომ 450-ს გააჩნია.

ციტოქრომ P450-ის პეროქსიდაზულ რეაქციებში წყალბადის დონორებად შეიძლება გამოყენებულ იქნას NADH ან NADPH [113]. ექსპერიმენტულ მონაცემთა ერთობლიობა [112, 113] იმაზე მიუთითებს, რომ

პეროქსიდაზულ აქტივობას ციტოქრომ P450-ის დაჟანგული ფორმა ფლობს. ამ აქტივობას CO იმიტომ არ აინჰიბირებს, რომ იგი კომპლექსირებას მხოლოდ ჰემოპროტეინის ალდგენილ ფორმასთან განიცდის. გამოთქმულია მოსაზრება, რომ ჰიდროზეჟანგებთან ციტოქრომ P450-ის ურთიერთქმედებისას წარმოიქმნება პეროქსიდაზას I კომპლექსის ანალოგიური ფორმა [114], რომელშიც ჰემური რკინა შეიძლება ჟანგვის მაღალ ხარისხში იმყოფებოდეს:



ცნობილია, რომ პირველადი ალიფატური სპირტები პეროქსიდაზას სუბსტრატებს არ წარმოადგენენ [115]. მიუხედავად ამისა, ვირთხის ღვიძლის მიკროსომები და მაღალი სისუფთავის ციტოქრომ P450 აკატალიზებს სპირტების ალდეჰიდებამდე ჟანგვის რეაქციებს [116]. კუმილის ჰიდროზეჟანგით და ციტოქრომ P450-ის ან კატალაზას მონაწილეობით სპირტების დაჟანგვის უნარი ალიფატური რადიკალის ზომის ზრდის მიხედვით მცირდება. ციტოქრომ P450 განსაკუთრებით ეფექტურ კატალიზატორს წარმოადგენს კუმილის ჰიდროზეჟანგით ეთანოლის დაჟანგვაში, მაშინ როდესაც ციტოქრომ c, ჰემოგლობინი და პეროქსიდაზა სპირტის ჟანგვას პრაქტიკულად არ ახორციელებენ. ფენობარბიტალით მიკროსომების ინდუქცია 5-ჯერ ზრდის კუმილის ჰიდროზეჟანგით ეთანოლის ჟანგვას [117].

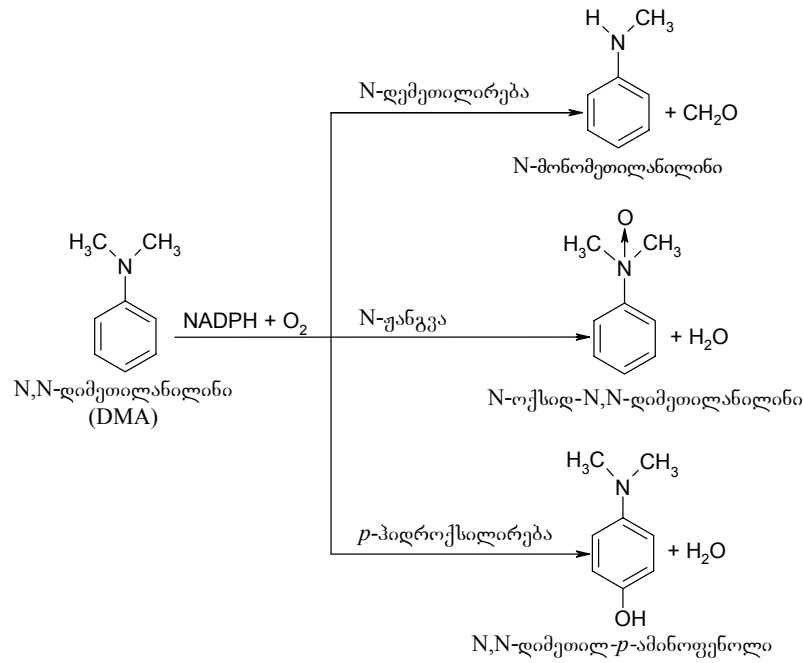
არასასურველი დამატებითი პროცესი, რომელიც თან ახლავს მრავალი სუბსტრატის ჰიდროზეჟანგურ ჟანგვას, თვით ამ ნაერთების მხრიდან ციტოქრომ P450-ის დესტრუქციაა [118, 119]. კუმილისა და მესამეული ბუთილის ჰიდროზეჟანგები არამარტო ციტოქრომ P450-ს, არამედ მიკროსომულ ჯაჭვში ელექტრონთა ტრანსპორტის მნიშვნელოვან კომპონენტს – ციტოქრომ b<sub>5</sub>-საც შლიან [119].

არჩაკოვისა და მისი თანამშ. მიერ [120, 121] ჩატარებულ იქნა გამოკვლევა, რომელიც მიზნად ისახავდა მიკროსომული ჟანგვის ტიპური სუბსტრატის – N,N-დიმეთილანილინის (DMA-ს) მონოოქსიგენაზური მექანიზმით ჟანგვის შესწავლას, ანუ DMA-სთან კომპლექსში ციტოქრომ P450-ით სტიმულირებული ალდგენის გავლენის დადგენას ამ სუბსტრატის N-დემეთილირების, *p*-ჰიდროქსილირებისა და N-ჟანგვის რეაქციათა სინქარებზე. NADPH-ციტოქრომ P450-რედუქტაზული რეაქციის მასტიმულირებელ ფაქტორად გამოიყენებოდა Mg<sup>2+</sup>-ის იონები [122, 123]. ასეთი მიდგომა საკმაოდ ორიგინალური იყო ჰიდროქსილირების მექანიზმში კომპ-

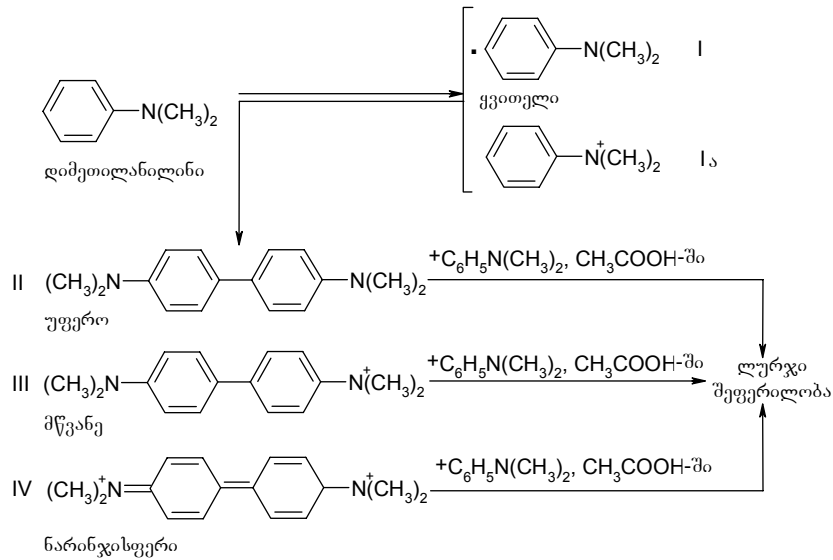
ლექსის აღდგენის რეაქციის როლის სრულად გამოსავლენად: ჰიდროქსილირების ჯაჭვში რედუქტაზული რეაქცია თუ მართლაც მალიმიტირებელია, მაშინ  $Mg^{2+}$ -ის დახმარებით მისი სინქარის გაზრდას ერთი სუბსტრატის ჟანგვის სამივე ტიპის რეაქციის სტიმულირება უნდა მოეხდინა. ამ შემთხვევაში სუბსტრატად DMA-ს გამოყენება ამის სრულ საშუალებას იძლევა. მისი გარდაქმნის შესაძლო გზები მოცემულია სქემაზე (ნახ. 4.10).

$Mg^{2+}$ -ის სხვადასხვა კონცენტრაციების მოქმედების შესწავლამ DMA-ს N-დემეთილირებასა და *p*-ჰიდროქსილირებაზე განსხვავებული მასტიმულირებელი ეფექტები გამოავლინა. აქტივაციის კოეფიციენტები შესაბამისად 1.5 და 2.2-ს შეადგენდა. N-დემეთილირების მაქსიმალური სტიმულაცია მიიღწეოდა 15 მმოლი  $MgCl_2$ -ის თანამყოფობისას. *p*-ჰიდროქსილირებისათვის აუცილებელი აღმოჩნდა  $Mg^{2+}$ -ის უფრო მაღალი კონცენტრაციები. რაც შეეხება DMA-ს N-ჟანგვას, მასზე ამ მეტალის გამააქტიურებელი მოქმედება არ გამოვლინდა და ამ შედეგს ავტორებმა ორგვარი ახსნა მისცეს: დემეთილირება და ჰიდროქსილირება ან NADPH-სპეციფიკური ფლავოპროტეინის მეშვეობით არ ხორციელდება, ან N-ჟანგვაში სხვა,  $Mg^{2+}$ -ისადმი არამგრძობიარე ფლავოპროტეინი მონაწილეობს [120].

DMA-ს პეროქსიდაზული გზით ჟანგვის პროცესი ნეილორის [124] მიერაა შესწავლილი. ამ ავტორს დეტალურად აქვთ განხილული ცდის მსვლელობა და ჩვენც აქ უცვლელად მოგვაქვს მისი აღწერა (ნახ. 4.11).



ნახ. 4.10. დემეთილანილინის ჟანგვის გზები ღვიძლის მიკროსომებში.



ნახ. 4.11. დიმეთილანილინის ჰეროქსიდაზული მექანიზმით ჟანგვა [124].

ძმარმჟავაში (pH 4.5) განზავებულ DMA-ს ხსნარს ემატებოდა ფერმენტი და  $H_2O_2$ . სარეაქციო არე ჯერ ყვითლდებოდა (I სტადია), მაგრამ მალე შეფერილობა მუქ მწვანეში გადადიოდა (II სტადია). წარმოიქმნებოდა ცისფერი ნალექი, ხოლო ხსნარი მწვანედან მეწამულ-ლურჯ შეფერილობას იღებდა. მწვანე ხსნარს თუ ჭარბად დაემატებოდა წყალბადის ზეჟანგი და პეროქსიდაზა, ჩნდებოდა ჟოლოსფერი, რომელიც სწრაფად ბრუნდებოდა მწვანე ფერში (III სტადია).

ჟანგვის დამთავრების შემდეგ ნალექი იფილტრებოდა და ცალკეული კომპონენტები ქრომატოგრაფიით ცალკეედებოდა. კვალის სახით ბევრი შეფერილი ნივთიერება გამოვლინდა, ხოლო ძირითად პროდუქტს TMPD წარმოადგენდა (გავიხსენოთ, რომ ეს ნივთიერება, სტეროლების პეროქსიდაზული მექანიზმით ჟანგვაში წყალბადის დონორის როლს ასრულებს [119]).

სქემაში მოყვანილი II ნაერთის წარმოსაქმნელად, რომელიც DMA-ს *p*-მდგომარეობიდან წყალბადის მოცილების შედეგად მიიღება, აღნიშნულმა მკვლევარებმა ორი ალტერნატიული მექანიზმი წარმოადგინეს: მათგან უმარტივესი თანახმად, თავდაპირველად გენერირდება I ნაერთის თავისუფალი რადიკალები, რომლებიც ტეტრამეთილბენზიდინს (II-ს) წარმოქმნიან. მეორე მექანიზმი გულისხმობს, რომ რეაქციის პირველ სტადიას წარმოადგენს დიმეთილანილინიდან ელექტრონის მოგლეჯა და იონ-რადიკალის (I-ის) წარმოქმნა. ასეთ ნაწილაკებს პროტონთა ელიმინირებით შეუძლიათ გაორმაგება და H-ის მოცილება. როგორც არ უნდა იყოს, სწრაფად ქრობადი ყვითელი შეფერილობა (I სტადია) შესაძლოა ლაბილური რადიკალური ნაწილაკების (I-ისა და II-ის) თანამყოფობით იყოს განპირობებული.

წარმოქმნილი TMPD-ს ნაწილი ნალექად გამოყოფას ასწრებს, მაშინ, როდესაც დარჩენილი ნაწილი შემდგომ ჟანგვას განიცდის. მართლაც, განზავებულ ძმარმჟავაში ამ ნაერთის პეროქსიდაზული ჟანგვის სუბსტრატად გამოყენებისას, პირველდაწყებითი მომწვანო-ყვითელი შეფერილობა მუქ მწვანე შეფერილობაში გადადიოდა. შემდგომი ჟანგვით ხსნარი ნარინჯისფერ შეფერილობას იღებდა. ამგვარად, შეინიშნებოდა იგივე შეფერილობები, როგორსაც ადგილი ჰქონდა DMA-ს ჟანგვისას II და III სტადიებზე.

ხსნარის მწვანე ფერი განპირობებულია III კატიონ-რადიკალის თანამყოფობით, რომელიც TMPD-დან ელექტრონის მოწყვეტისას წარმოიქმნება. შემდგომი ჟანგვისას კიდევ ერთი ელექტრონი იხარჯება, რის შედეგადაც IV-ის ქინოიდური სტრუქტურა მიიღება. მასზე გადასვლა

დაკავშირებულია რეზონანსის შესაძლებლობათა შემცირებასთან და ამიტომ თან უნდა სდევდეს ფერის ინტენსიურ მატებას. ვარაუდობენ, რომ IV სტადიაზე ნარინჯისფერი შეფერილობა განპირობებულია IV-ის დიკატიონით, რომელიც შუალედი ნაერთის როლს თამაშობს მცირე რაოდენობის შეფერილ ნივთიერებათა წარმოქმნაში და რომლებიც თავისთავად მუხტის გადამტან კომპლექსებს წარმოადგენენ. საყურადღებოა ერთი ფაქტი: DMA-ს არც მონოქსიგენაზურ და არც პეროქსიდაზურ ჟანგვით გარაქმნებში ოქსიდაზური სისტემების  $Mg^{2+}$ -ით გააქტივების შემთხვევაშიც კი არ ფიგურირებს ამ სუბსტრატის N-ჟანგვის შემდეგ N-ოქსიდის წარმოქმნა. როგორც ზევით აღინიშნა, N-ჟანგვაში მონაწილე ფლავოპროტეინი არამგრძნობიარეა მაგნიუმის იონების მიმართ [120].

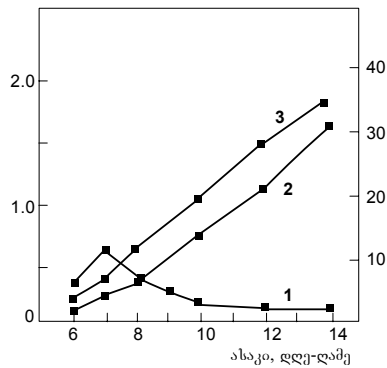
ჩვენს მიერ [96, 125, 126] დადგენილია, რომ პრაქტიკულად ყველა ის ჟანგვითი პროცესი, რომელიც მიკროსომებში მიმდინარეობს, მეტ-ნაკლები ხარისხით ციტოქრომი P450-ის არააქტიურ ციტოქრომ P420-ად შეუქცევად კონვერსიას იწვევს. სიმინდის 7-დღიანი აღმონაცენების ფესვებში მიკროსომების ციტოქრომული კომპონენტების შემადგენლობის შესწავლამ აჩვენა, რომ მასში ძირითადად ციტოქრომი P450 დომინირებს. მიკროსომების “ასაკში შესვლასთან” (7-9 დღიანი) დაკავშირებით შეინიშნება ციტოქრომ P450-ის შემცირება და ციტოქრომ P420-ის შემცველობის ზრდა, რასაც იმავდროულად ფრაქციაში პეროქსიდაზული აქტივობის განუხრელი ზრდაც თან ახლავს (ნახ. 4.12). ანალოგიური სურათი შეინიშნება “ახალგაზრდა” (7-9 დღიანი) ნაზარდებიდან გამოყოფილი მიკროსომული ფრაქციის 120 წთ-იანი ინტენსიური აერაციისას: ციტოქრომების P420/P450-ის თანაფარდობის 5-ჯერ ზრდას პეროქსიდაზული აქტივობის 1.5-ჯერ მატება შეესაბამება (ნახ. 4.13).

“ხანდაზმული” (14-დღიანი) მცენარეებიდან გამოყოფილი მიკროსომებისა და პირშუშხას პეროქსიდაზული პრეპარატის სპექტრულმა ანალიზმა მათი აბსოლუტური იდენტურობა დაგვიდასტურა, კერძოდ, ორივე შთანთქმის მაქსიმუმს 420 ნმ-ზე ამჟღავნებს, ხოლო დითიონიტით აღდგენისას მაქსიმუმის 432 ნმ-ზე წანაცვლება ხდება. წყალბადის ზეჟანგს ჰემი კვლავ დაჟანგულ მდგომარეობაში გადაჰყავს. ანალოგიური სპექტრები გააჩნიათ ნახშირბადის მონოქსიდით აღდგენილ მათ კომპლექსებსაც. აქედან გამომდინარე, ნათელი ხდება, რომ მიკროსომაში არსებობს ჰემოპროტეინი, რომლის ჰემის მდგომარეობა პეროქსიდაზას ჰემის იდენტურია.

გელ-ფილტრაციული ქრომატოგრაფიის ანალიზით დადგინდა, რომ მიკროსომული ფრაქცია ორ ჰემოპროტეინს შეიცავს, რომელთაგან პეროქსიდაზული აქტივობა მხოლოდ ~100 kD მოლეკულური მასის მქონეს გააჩნია (ნახ. 4.14). ცილის ეს მასა არ შეესაბამება პეროქსიდაზის

ფერმენტული ცილის პრეპარატის მოლეკულურ მასას (40 kD). მეორე, შედარებით დაბალი მოლეკულური მასის (10-15 kD) მქონე ჰემოპროტეინი ციტოქრომ  $b_5$ -ს წარმოადგენს. ფრაქციაში იდენტიფიცირებულია არაჰემური ცილაც (~30-40 kD), სავარაუდოდ –NADPH-ციტოქრომ P450-რედუქტაზა.

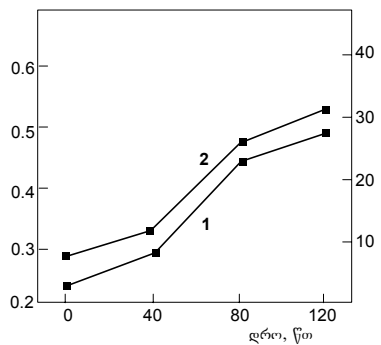
პეროქსიდაზული აქტივობა,  $\Delta A_{450}/\text{წთ მგ ცილაზე}$  ციტოქრომ P420-ისა და P450-ის შემცველობა, პმოლი მგ ცილაზე



ნახ.4.12. მიკროსომებში ციტოქრომ P450-ისა და P420-ის შემცველობის და პეროქსიდაზული აქტივობის ცვლილებები მცენარის ასაკისაგან დამოკიდებულებით [96].

- 1 – ციტოქრომი P450;
- 2 – ციტოქრომი P420;
- 3 – პეროქსიდაზული აქტივობა.

პეროქსიდაზული აქტივობა,  $\Delta A_{450}/\text{წთ მგ ცილაზე}$  ციტოქრომების P420/P450 თანაფარდობა

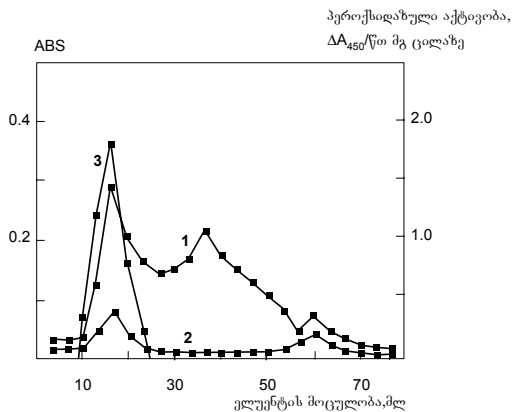


ნახ.4.13. ციტოქრომების P420/P450-ის თანაფარდობისაგან დამოკიდებულებით. პეროქსიდაზული აქტივობის ცვლილებები მიკროსომების 120 წთ-იანი აერაციის პირობებში [96].

- 1 – პეროქსიდაზული აქტივობა;
- 2 – P420/P450.

მონოოქსიგენაზური მექანიზმის პეროქსიდაზულით შენაცვლების სურათი საესებით აშკარად გამოიკვეთა ფლავონოიდების მიკროსომული ჟანგვის შესწავლით [125]. ამ მიზნით ჩვენს მიერ გამოცდილ იქნა მეთოქსილირების განსხვავებული ხარისხის მქონე ოთხი ფლავონოიდი. მათი შერჩევა იმ მოსაზრებით მოხდა, რომ ორი მათგანი (ნობილეტენი და 5-OH-ნობილეტენი) უნდა დაჟანგულიყო მონოოქსიგენირებით (O-დემეთილირებით), ხოლო ორი (ლიმოციტინი და კვერცეტინი), რომლებიც უკვე ჰიდროქსილირებულ პროდუქტებს წარმოადგენენ, პეროქსიდაზული ჟანგვის მექანიზმით უნდა გარდაქმნილიყვნენ. გარდა ამისა, ცხოველურ ობიექტებში ეს ნივთიერებები მონოოქსიგენაზების მძლავრ ინდუქტორებად ითვლებიან [127].





ნახ. 4.14. მიკროსომული

ფრაქციის გელფილტრაციის ქრომატოგრამა [96].

1 – A<sub>280</sub>;

2 – A<sub>432</sub>;

3 – პეროქსიდაზული აქტივობა.

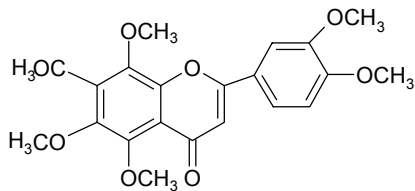
სვეტი – 50×1.6 სმ;

გელი – ULTROGEL AcA 44;

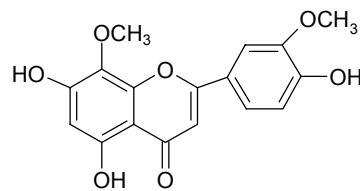
ელუენტი – 0.05% Na-SDS

1/30 M ფოსფატის ბუფერში

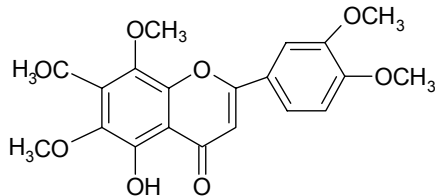
(pH 7.4).



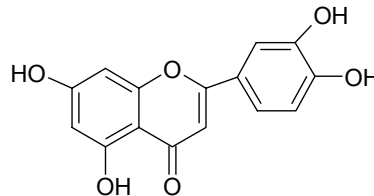
ნობილეტინი  
(5,6,7,8,3',4'-პექსამეთოქსიფლავონი)



ლიმოციტრინი  
(3,5,7,4'-ტეტრაოქსი-8,3'-დიმეთოქსიფლავონი)



5-OH-ნობილეტინი  
(5-ოქსი-6,7,8,3',4'-პენტამეთოქსიფლავონი)

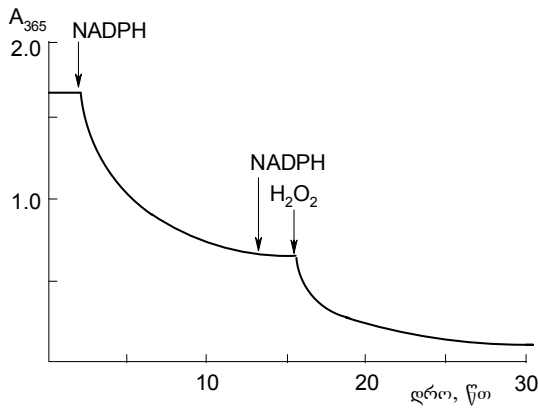


კვერცეტინი  
(3,5,7,3',4'-პენტაოქსიფლავონი)

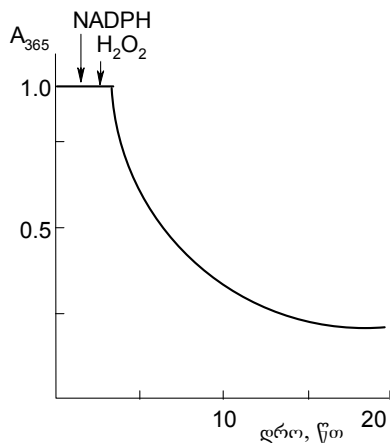
ნობილეტინი და 5-OH-ნობილეტინი მიკროსომებში მხოლოდ NADPH-ის თანამყოფობისას იჟანგებიან (ნახ. 4.15). ამის შედეგად სარეაქციო არეში ადგილი აქვს ფორმალდეჰიდის დაგროვებას. კოსუბსტრატად H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-ის გამოყენება მოცემული რეაქციის მსვლელობაზე გავლენას არ ახდენს, ე.ი. აღნიშნული ფლავონოიდებიდან მეთილის ჯგუფის მოცილება მონოოქსიგენირების გზით ხორციელდება. კინეტიკური მრუდის პლატოზე გასვლის შემდეგ NADPH-ის განმეორებითი დამატება რეგისტრირებად ცვლილებებს აღარ იძლევა. ეს იმაზე მიუთითებს, რომ ამ მომენტში O-დემეთილირების სუბსტრატი მთლიანადაა დახარჯული და რეაქცია დამთავრებულია. წარმოქმნილი პროდუქტების

შემდგომი ჟანგვა (მისი კონცენტრაციის შემცირება) ამ შემთხვევაში უკვე  $H_2O_2$ -დამოკიდებული ხდება, ანუ მონოოქსიგენირებული ფლავონოიდი ამჯერად უკვე პეროქსიდაზას სუბსტრატადაა გადაქცეული. ლიმოციტინისა და კვერცეტინის NADPH-დამოკიდებული ჟანგვა მიკროსომულ ფრაქციაში საერთოდ არ ხორციელდება და რეაქცია მხოლოდ  $H_2O_2$ -ის თანამყოფობით მიმდინარეობს (კვერცეტინის ჟანგვის მრუდი მოცემულია ნახ. 4.16-ზე).

ამგვარად, მცენარეულ მიკროსომებში მეთოქსილირებული ფლავონოიდები მონოოქსიგენაზური, ხოლო ჰიდროქსილირებული – პეროქსიდაზული მექანიზმებით გარდაქმნიან. ამ ორი რეაქციის თანმიმდევრული შენაცვლება ციტოქრომ P450-ის ქიმიური მოდიფიკაციის ანუ არააქტიურ ციტოქრომ P420-ად მისი კონვერსიის შედეგია.



ნახ. 4.15. ნობილეტინის ჟანგვა ეთილირებული სიმინდის 7-დღიანი ნაზარდების ფესვების მიკროსომებში. საინკუბაციო ხსნარის (3 მლ) შემადგენლობა: 1/15M ფოსფატის ბუფერი pH 7.4; 0.33 მგ/მლ მიკროსომული ცილა; 100  $\mu$ M NADPH; 15  $\mu$ M  $H_2O_2$ ; 25  $\mu$ M ნობილეტინი [125].

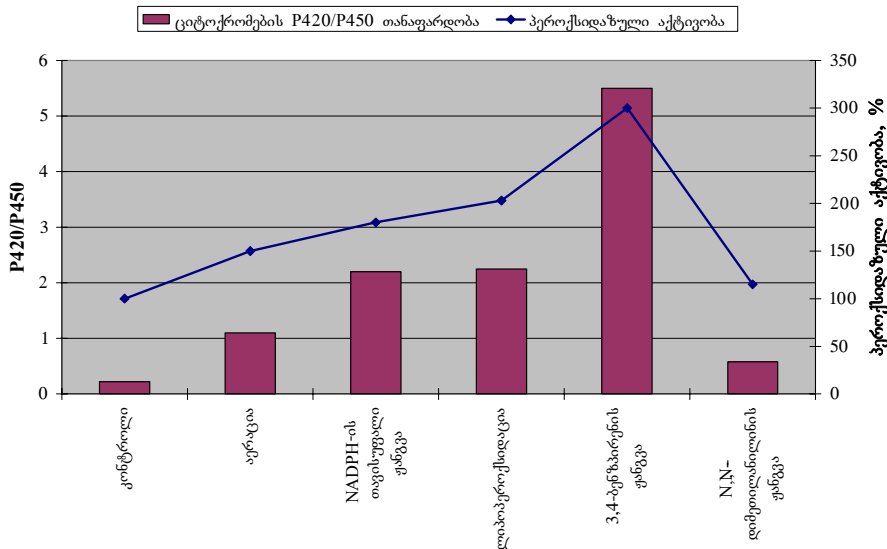


ნახ. 4.16. კვერცეტინის ჟანგვა ეთილირებულ სიმინდის 14-დღიანი ნაზარდების ფესვების მიკროსომებში. საინკუბაციო ხსნარის (3 მლ) შემადგენლობა: 1/15 M ფოსფატის ბუფერი pH 7.4; 0.33 მგ/მლ მიკროსომული ცილა; 100  $\mu$ M NADPH; 15  $\mu$ M  $H_2O_2$ , 25  $\mu$ M კვერცეტინი [125].

**ციტოქრომ P450-ის ისეთ ქიმიურ მოდიფიკაციას, რომლის დროსაც**

ადგილი აქვს ფერმენტული მოქმედების მექანიზმის შენაცვლებას, უფრო ესადაგება ტერმინი “ტრანსფორმაცია”, რადგან იგი უკეთესად ასახავს მოვლენის არსს.

ციტოქრომ P450-ის ქიმიურ მოდიფიკაციაში მნიშვნელოვან ადგილს იკავებს NADPH-ის თავისუფალი (ჰიდროქსილირებასთან არაშეუღლებული) ფანგვა. ამ პროცესის მსვლელობას ციტოქრომების P420/P450-ის თანაფარდობის 10-ჯერ ზრდა და პეროქსიდაზული აქტივობის 1.8-ჯერ ზრდა შეესაბამება. ასევე, მიკროსომულ მემბრანაში ინტენსიური ლიპოპეროქსიდაციისას პეროქსიდაზული აქტივობა ორმაგდება. ციტოქრომ P450-ის პეროქსიდაზად მაქსიმალური ტრანსფორმაცია მიიღება მიკროსომული ფანგვის სუბსტრატის – 3,4-ბენზპირენის გარდაქმნისას, როდესაც P420/P450 თანაფარდობის 25-ჯერ ზრდისას პეროქსიდაზული აქტივობა სამმაგდება. შედარებით დაბალი ხარისხის ტრანსფორმაცია ახლავს მიკროსომული რედოქს-ჯაჭვის მეორე ტიპური სუბსტრატის – დიმეთილანილინის ფანგვას (მონაცემები დიაგრამების სახით წარმოდგენილია ნახ. 4.17-ზე).



ნახ. 4.17. სიმინდის 7-დღიანი ეთიოლირებული ნაზარდების მიკროსომებში პეროქსიდაზული აქტივობების ცვლილებები აერაციისა და სხვადასხვა სუბსტრატების ფანგვისას [126].

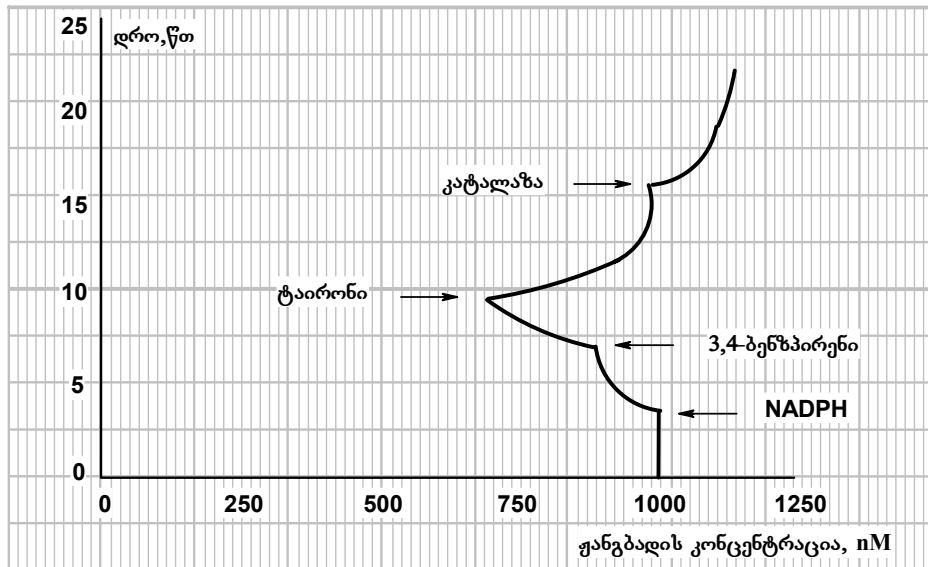
მიღებული შედეგების ასახსნელად ჩვენს მიერ გამოთქმულ იქნა

მოსაზრება, რომ ციტოქრომ P450-ის ამგვარ ტრანსფორმაციას საინკუბაციო არეში წარმოქმნილი თავისუფალი რადიკალები უნდა იწვევდნენ. ცნობილია, მაგ., რომ NADPH-ის თავისუფალი ფანგვის პროცესი ოთხი განსხვავებული გზით შეიძლება წარიმართოს (იხ. ქვეთავი 4.1.2.2) [18].

პირველი სამი რეაქცია ოქსიდაზურია, ხოლო მეოთხე ჰიპოთეზური ენდოგენური სუბსტრატის (XH) მონოოქსიგენაზური მექანიზმით ფანგვას ასახავს. პირველი რეაქციის შედეგად სუპეროქსიდული ანიონ-რადიკალი ( $O_2^-$ ) წარმოიქმნება. მიკროსომული ფრაქციის აერაციისას ფანგბადის მუდმივი მიწოდება აჩქარებს სარეაქციო არეში ენდოგენური NADPH-ისა და სუბსტრატების ფანგვას. იმის გამო, რომ ამ უკანასკნელთა რაოდენობა უაღრესად ლიმიტირებულია, შესაბამისად ეფექტიც დაბალია. ამ მოსაზრების შესამოწმებლად შევეცადეთ გამოგვევლინა ის აქტიური ინტერმედიტი, რომელიც ციტოქრომ P450-ის ციტოქრომ P420-ში გადასვლას იწვევს და მონოოქსიგენაზური აქტივობის პეროქსიდაზულით შეცვლას განაპირობებს; კერძოდ, შევეცადეთ დაგვედგინა, არის თუ არა ეს ნაწილაკი სუპეროქსიდული ანიონ-რადიკალი, რომელიც, როგორც ცნობილია, ზოგიერთი სუბსტრატის ფანგვისას უშუალოდ ციტოქრომ P450-ის აქტიურ ცენტრზე გენერირდება [57-59]. ამ მიზნით ჩვენს მიერ ჩატარებულ იქნა ექსპერიმენტი [126]: მიკროსომულ ფრაქციაში თანმიმდევრობით შეგვკონდა NADPH, 3,4-ბენზპირენი, ტაირონი (4,5-დიჰიდროქსი-1,3-დისულფომჟავა), კატალაზა (EC 1.11.1.6) და ამ პირობებში პოლაროგრაფიულად ვაკვირდებოდით ფანგბადის ცვლილებების დინამიკას (ნახ. 4.18).

პოლაროგრაფიული მრუდიდან ჩანს, რომ პირველი ორი ნაერთის დამატებისას რეგისტრირდება ფანგბადის შთანთქმა, ხოლო ტაირონი, რომელიც სუპეროქსიდლისმუტაზას (EC 1.15.1.1) დაბალმოლეკულური, მემბრანაში განვლადი ანალოგია და სუპეროქსიდული ანიონ-რადიკალების დამჭერად ითვლება ( $2H^+ + 2O_2^- \rightarrow H_2O_2 + O_2$ ), ფანგბადის მოხმარების მრუდის მიმართულების მკვეთრ ცვლილებას იწვევს, რაც ფანგბადის გამოყოფის მაჩვენებელია. ანალოგიური ეფექტი გააჩნია კატალაზასაც, რომლის მოქმედებითაც წარმოქმნილი წყალბადის ზეჟანგი ასევე იშლება ფანგბადის გამოყოფით ( $2H_2O_2 \rightarrow H_2O + O_2$ ).

ამ ექსპერიმენტით (თუმცა არაპირდაპირი გზით) დასტურდება, რომ 3,4-ბენზპირენის NADPH-დამოკიდებული ფანგვისას მართლაც ადგილი აქვს სუპეროქსიდული რადიკალების წარმოქმნას, რომლებიც მოქმედებენ ციტოქრომ P450-ის ჰემზე და მის თვისობრივ და რაოდენობრივ ცვლილებებს იწვევენ.



ნახ. 4.18. სიმინდის ეთილირებული ნაზარდების მიკროსომული ფრაქციის მიერ 3,4-ბენზპირენის NADPH-დამოკიდებული ჟანგვის პოლაროგრაფია. 0.067 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{HPO}_4$  ბუფერი, pH 7.4; 3,4-ბენზპირენი – 0.01 mM; NADPH – 0.24 mM, მიკროსომული ფრაქცია 1.0 მგ/მლ [126].

ტაირონი და კატალაზა გამოცდილ იქნა N,N-დიმეთილანლინის NADPH-დამოკიდებული ჟანგვისა და  $\text{Fe}^{2+}$ -ით ინიცირებული მიკროსომული არაფერმენტული ლიპოპეროქსიდაციის პროცესის მიმართაც: არც ერთ შემთხვევაში აღვლი არ აქვს ჟანგბადის გამოყოფას; ე.ი. აღნიშნულ პროცესში სუპეროქსიდული რადიკალები არ გენერირდებიან. როგორც ჩანს, ლიპიდთა ზეჟანგური ჟანგვისას ჟანგბადის სხვა ტიპის აქტიური ფორმები წარმოიქმნებიან.

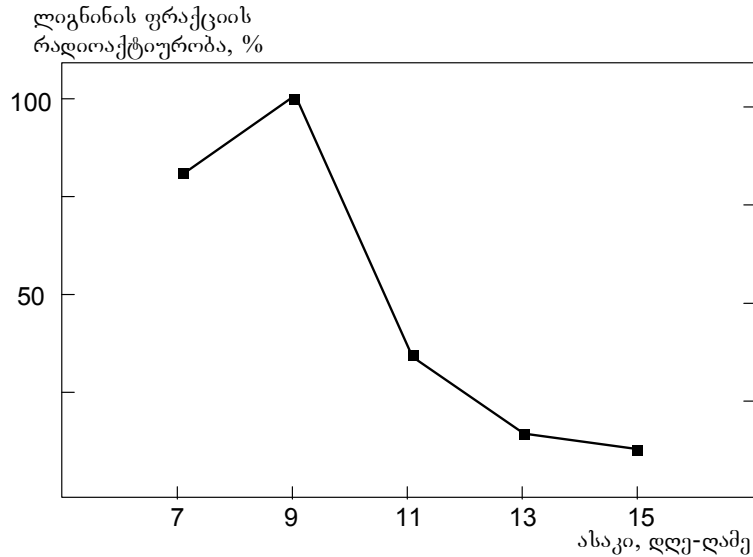
ციტოქრომ P450-ის პეროქსიდაზად ტრანსფორმაციის პროცესი აშკარად შეინიშნება მცენარის ასაკში შესვლასთან დაკავშირებითაც. სიმინდის 7-დღიანი ეთილირებული ნაზარდების ფესვებიდან მიღებულ მიკროსომულ ფრაქციაში ციტოქრომ P450-ის რაოდენობა და, შესაბამისად, მონოოქსიგენაზური აქტივობა მაქსიმალურია. მომდევნო დღეებში ციტოქრომი P450 ციტოქრომ P420-ად შეუქცევად კონვერსიას განიცდის, რასაც პარალელურად თან ახლავს პეროქსიდაზული აქტივობის ზრდა. 7-დღიანთან შედარებით 14-დღიანი ნაზარდების მიკროსომებში P420/P450 თანაფარდობა 30-32-ჯერ, ხოლო პეროქსიდაზული აქტივობა 5-6-ჯერაა გაზრდილი [128].

ბუნებრივია, ასაკზე დამოკიდებულ ციტოქრომ P450-ის ტრანს-

ფორმაციას თან უნდა ახლდეს ციტოქრომ P450-დამოკიდებული ბიოსინთეზური პროცესების ინტენსივობის ცვლილებებიც. ამ საკითხის კვლევისას, შიდაუჯრედული პროცესის მოდელად შერჩეულ იქნა ლიგნინის ბიოსინთეზის ფენილპროპანოიდური გზა, რომელშიც რამდენიმე ციტოქრომ P450-შემცველი მონოოქსიგენაზა მონაწილეობს [129-131]. მათგან უმთავრესია დარიჩინმჟავა-4-ჰიდროქსილაზა, რომელიც ფენილალანინ-ამიაკ-ლიაზასთან ერთად ბიოსინთეზის უმნიშვნელოვანეს ფერმენტს წარმოადგენს. კვლევის მიზანს შეადგენდა იმის დადგენა, თუ როგორ იცვლება აღნიშნული პროცესის ინტენსივობა ციტოქრომ P450-ის ტრანსფორმაციის პირობებში. ამისათვის შეისწავლებოდა ბიოსინთეზში მონაწილე ზემოთაღნიშნული ფერმენტების აქტივობა 7- და 14-დღიანი ნაზარდების მიკროსომებში. აღმოჩნდა, რომ 7-დღიანთან შედარებით 14-დღიანი ნაზარდების მიკროსომებში ორივე ფერმენტის აქტივობა მკვეთრად მცირდება [128], ე.ი. ციტოქრომ P450-ის ტრანსფორმაციის პირობებში მიკროსომებში წყდება დარიჩინმჟავას ჰიდროქსილირებით მიმდინარე მეტაბოლური გზა, რასაც თან ახლავს წინა, ამიაკ-ლიაზური რეაქციის ბლოკირებაც.

ეთიოლოგიურ ნაზარდებში, სადაც ფოტოსინთეზი გამორიცხულია, ლიგნინის ბიოსინთეზი მნიშვნელოვნად უნდა იყოს დამოკიდებული ციტოქრომ P450-ის აქტივობაზე, რამდენადაც ამ პროცესში ერთ-ერთი სინჯარე-მალიმიტირებელი სტადია – დარიჩინმჟავას *p*-კუმარმჟავად გარდაქმნა ციტოქრომ P450-შემცველი მონოოქსიგენაზით – დარიჩინმჟავა-4-ჰიდროქსილაზით (CYP73) კატალიზდება [29]. როდესაც მცენარის ზრდას თან სდევს ციტოქრომ P450-ის ტრანსფორმაცია, ცხადია, ლიგნიფიკაციის პროცესიც უნდა შეიცვალოს. ამის დასადაგენად ვაკვირდებოდით ლიგნინის ფრაქციაში რადიოაქტიური ( $4\text{-}^{14}\text{C}$ )დარიჩინმჟავას ნიშანდებული ნახშირბადის ჩართვას [25, 128]. აღმოჩნდა, რომ ლიგნინში  $^{14}\text{C}$ -ის ჩართვა მაქსიმალურია 7-9 დღის ინტერვალში, შემდეგ კი მკვეთრად მცირდება (ნახ. 4.19).

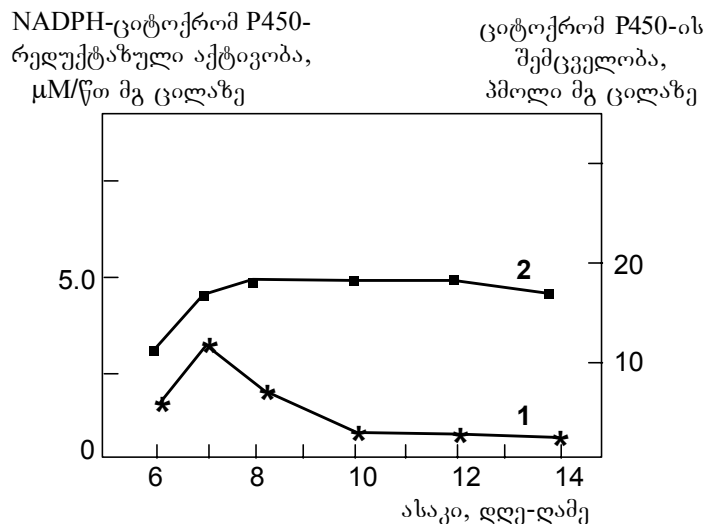
ლიგნინში რადიოაქტიური ნიშნის ჩართვის შემცირების პერიოდი მცენარის ასაკთან დაკავშირებულ ციტოქრომ P450-ის ტრანსფორმაციას ემთხვევა. ამ ექსპერიმენტის შედეგები გვიჩვენებენ, რომ ციტოქრომ P450-ის ტრანსფორმაცია ბუნებრივი პროცესია და იმ ბიოქიმიური რეაქციების ინტენსივობის დაქვეითებას იწვევს, რომლებიც ამ ჰემოპროტეინით კატალიზდებიან.



ნახ. 4.19. ლიგნინის ფრაქციაში დარიჩინმჟავას  $^{14}\text{C}$ -ნიშნის ჩართვის დინამიკა სიმინდის ეთიოლირებული ნაზარდების ასაკთან დამოკიდებულებით [26].

#### 4.5.1 NADPH-ციტოქრომ P450-რედუქტაზას შესაძლო ფუნქციები ციტოქრომ P450-ის პეროქსიდაზად ტრანსფორმაციის პირობებში

ციტოქრომ P450-ის ქიმიური მოდიფიკაციის შედეგად ცხადია, მონოოქსიგენაზური სისტემის დანარჩენი კომპონენტები ახალ ფუნქციურ ლატვირთვას უნდა იძენდნენ. ჩვენს მიერ [97] დადგენილ იქნა, რომ ამ ჰემოპროტეინის პეროქსიდაზად ტრანსფორმირების ფონზე NADPH-ციტოქრომ P450-რედუქტაზა აქტივობის მაღალ დონეს მაინც ინარჩუნებს (ნახ. 4.20), მიუხედავად იმისა, რომ პეროქსიდაზული აქტივობის გამოვლენაში მასზე გენერირებული სუპეროქსიდული რადიკალები არ მონაწილეობენ. აღნიშნულიდან გამომდინარე, ბუნებრივად იბადება კითხვა: შექმნილ ვითარებაში რა ფუნქციურ როლს ასრულებს NADPH-ციტოქრომ P450-რედუქტაზა?

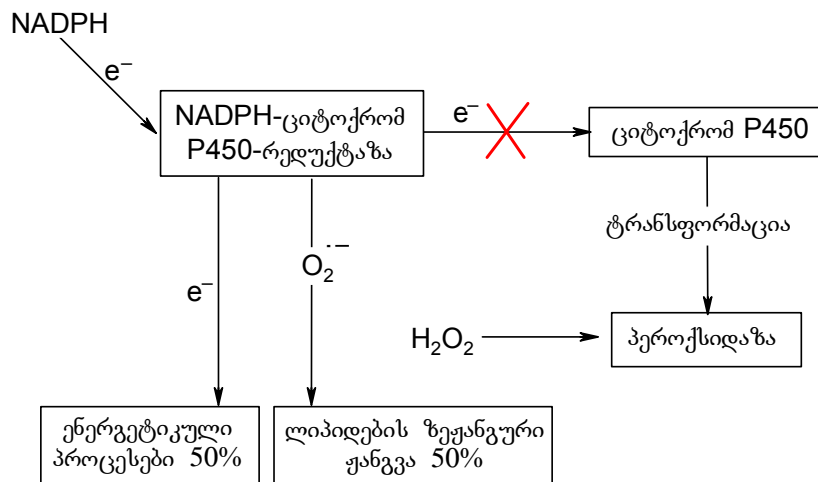


ნახ. 4.20. მიკროსომებში ციტოქრომი P450-ის შემცველობისა და NADPH-ციტოქრომი P450-რედუქტაზული აქტივობის ცვლილებები მცენარის ასაკისაგან დამოკიდებულებით.

1 – ციტოქრომი P450; 2 – NADPH-ციტოქრომი P450-რედუქტაზული აქტივობა [97].

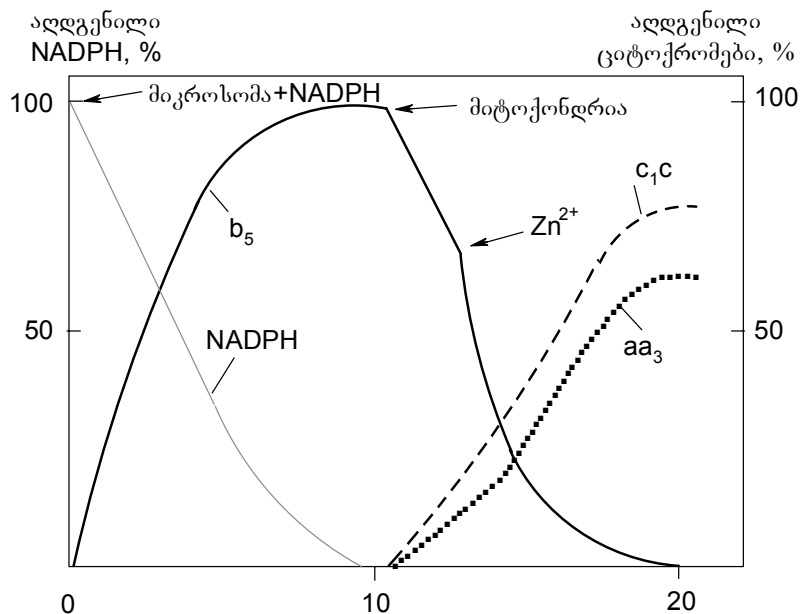
აღმოჩნდა, რომ რედუქტაზაზე გენერირებული  $O_2^-$  უპირატესად ლიპიდურ პეროქსიდაციაშია ჩართული (ნახ. 4.21). როგორც გამოირკვა, ლიპიდთა ზეჟანგურ ჟანგვას ციტოქრომი P450 სუპეროქსიდული რადიკალების გენერატორად სჭირდება და ჰემოპროტეინის მოდიფიკაციის შემთხვევაში ამ ფუნქციას მთლიანად რედუქტაზა ითავსებს. გარდა ამისა, ჩვენ შევძელით გვეჩვენებინა, რომ ლიპიდურ პეროქსიდაციას რედუქტაზული აქტივობის მხოლოდ ნახევარი (50%-მდე) ხმარდება და ეს სავსებით საკმარისია აღნიშნული პროცესის ნორმალური მსვლელობისათვის (ნახ.4.21) [97]. რედუქტაზას დარჩენილი ენზიმური სიმძლავრე მიკროსომული რედოქს-ჯაჭვის საწყისი კომპონენტების საშუალებით უჯრედის ენერგეტიკულ პროცესებს ემსახურება [128]. ასეთი კავშირის განხორციელება მიკროსომიდან მიტოქონდრიაზე ელექტრონთა ტრანსმემბრანული მიგრაციის გზითაა შესაძლებელი [17, 132].





ნახ. 4.21. NADPH-ციტოქრომ P450-რედუქტაზას შესაძლო ფუნქციები ციტოქრომ P450-ის ტრანსფორმირების პირობებში. ელექტრონის ტრანსპორტის ის გზა, რომელიც ამ დროს აღარ ფუნქციონირებს, გადახაზულია [128].

მცენარის უჯრედში მიკროსომებიდან მიტოქონდრიაზე ელექტრონების გადატანის შესაძლო გზების არსებობისა და მექანიზმების დასადგენად ჩვენ ფართო ექსპერიმენტული კვლევა ჩავატარეთ [128, 132]. ცდების ერთ სერიაში მიკროსომულ ფრაქციას ვაინკუბირებდით NADPH-თან, რათა რედოქს-ჯაჭვის კომპონენტები წინასწარ აღდგენილიყვნენ (ნახ. 4.22). ნიკოტინამიდური კოფერმენტის სრულ ხარჯვას ვაფასებდით 340 ნმ-ზე მისი შთანთქმის მაქსიმუმის შემცირებით. ციტოქრომ  $b_5$ -ის აღდგენის მაქსიმუმის მიღწევის შემდეგ მიკროსომებს ვამატებდით მიტოქონდრიების ფრაქციას. ციტოქრომ  $b_5$ -ის ჟანგვის პარალელურად ამ შემთხვევაში შეინიშნებოდა ციტოქრომების  $c_1c$ -ისა და  $aa_3$ -ს აღდგენა. მამასადაამე, უჯრედის ამ ორგანელათა უშუალო კონტაქტისას მიკროსომიდან მიტოქონდრიაზე რედოქს-ექვივალენტების ტრანსმემბრანული მიგრაცია ხორციელდება და ამ პროცესში პირდაპირ არიან ჩართული მიკროსომული NADPH-ციტოქრომ P450-რედუქტაზა და ციტოქრომი  $b_5$ . აქვე უნდა შევნიშნოთ, რომ ცხოველურ ობიექტებში მიკროსომებსა და მიტოქონდრიებს შორის რედუცირებადი ექვივალენტების ორმხრივი ტრანსმემბრანული მიგრაცია და მასში ამ ორგანელათა ციტოქრომ  $b_5$ -ების შესაძლო მონაწილეობა გამოვლენილია გასული საუკუნის 70-80-იან წლებში [9, 133-134].



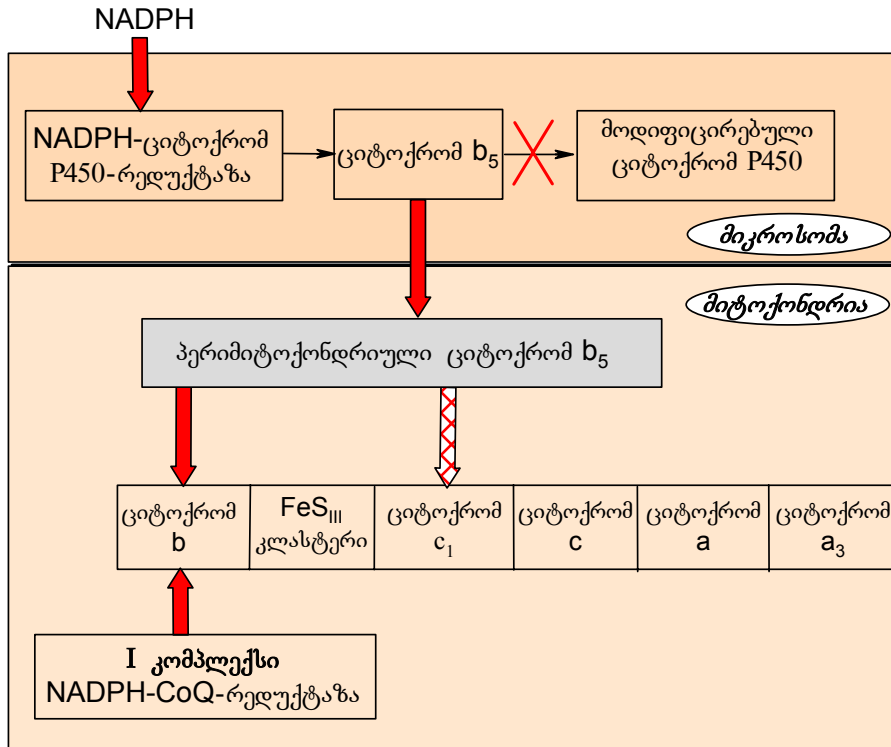
ნახ. 4.22. მიკროსომული და მიტოქონდრიული ციტოქრომებისა და NADPH-ის აღდგენის კინეტიკა კომბინირებულ სისტემაში მიტოქონდრია+მიკროსომა [132].

განხილული მონაცემები ყოველგვარ საფუძველს გვაძლევენ მისაღებად ჩაეთვალოთ მოსაზრება იმის შესახებ, რომ ციტოქრომ P450 ყოველთვის არ წარმოადგენს მიკროსომული რედოქს-ჯაჭვის მუდმივ ტერმინალურ კომპონენტს და საერთოდ, მონოოქსიგენაზური სისტემა მემბრანაში, ჩვეულებრივ, დისოცირებული, და არა ერთ კომპლექსად შეკრული აგრეგატის სახით უნდა არსებობდეს. როგორც ჩანს, NADPH-ციტოქრომ P450-რედუქტაზასთან და ციტოქრომ  $b_5$ -თან დაკავშირება და მონოოქსიგენაზური სისტემაში გაერთიანება მას შემდეგ ხდება, როდესაც ციტოქრომ P450 სუბსტრატს იკავშირებს და თანმიმდევრულად ფერმენტ-სუბსტრატის პირველი ან სამმაგი კომპლექსის მეორე ელექტრონით აღდგენა ხდება საჭირო. ამ ჰემოპროტეინთან ენდოგენური ან ეგზოგენური სუბსტრატის დაკავშირება იმ რეგულატორულ სიგნალს წარმოადგენს, რომლის შედეგადაც დისოცირებულ მდგომარეობაში მყოფი რედოქს-ჯაჭვის კომპონენტებისაგან მონოოქსიგენაზური კომპლექსი ყალიბდება. სხვა შემთხვევაში, როდესაც ამის საჭიროება არაა (მაგ., NADPH თავისუფლად იჟანგება, ციტოქრომ P450 სუბსტრატს არ ჟანგავს, ან პეროქსიდაზადაა

ტრანსფორმირებული), NADPH-ციტოქრომ P450-რედუქტაზასათვის ელექტრონის აქცეპტორის ფუნქცია შეიძლება ციტოქრომოქსიდაზურმა სისტემამ შეასრულოს. ამისათვის აუცილებელია უჯრედში მიკროსომებისა და მიტოქონდრიების უშუალო კონტაქტი და ამ შემთხვევაში ელექტრონთა გადატანა ამ ორი სტრუქტურული წარმონაქმნის ხ-ტიპის ციტოქრომების გზით განხორციელდება. იმის გამო, რომ მიკროსომული ციტოქრომ ხ<sub>5</sub>-ის რედოქს-პოტენციალი (+24 mV) ყველაზე ახლოსაა მიტოქონდრიული ციტოქრომ ხ-ს რედოქს-პოტენციალთან, აღმდგენელი ექვივალენტების ამ გადატანას არ უნდა ახლდეს ენერჯის რაიმე შესამჩნევი კარგვა.

ცნობილია, რომ  $Zn^{2+}$  ( $10^{-6}$  M) სუნთქვითი ჯაჭვის III კომპლექსში ხ და c<sub>1</sub> ციტოქრომებს შორის არსებული FeS<sub>III</sub>-კლასტერის ბლოკირებას იწვევს [15, 135]. ამიტომ მცენარიდან მიღებულ მიკროსომებისა და მიტოქონდრიების კომბინირებულ სისტემაზე დაყენებულ ჩვენს ცდებში მოველოდით, რომ ციტოქრომ ხ-ზე ელექტრონების მიგრაციისას  $Zn^{2+}$  დააქვეითებდა ციტოქრომების c<sub>1</sub>C-სა და aa<sub>3</sub>-ის აღდგენის სიჩქარეს. სინამდვილეში მივიღეთ საპირისპირო შედეგები:  $Zn^{2+}$ -ის მოქმედების შედეგად ადგილი ჰქონდა მიტოქონდრიულ ციტოქრომებზე ელექტრონთა გადატანის სიჩქარის შესამჩნევ ზრდას (ნახ.4.22). ამასთან დაკავშირებით გამოვთქვით ვარაუდი, რომ სუნთქვითი ჯაჭვის FeS<sub>III</sub>-კლასტერის ბლოკირებისას შეიძლება ელექტრონის სატრანსპორტო გზის შუნტირება მოხდეს და ელექტრონები მიტოქონდრიული ციტოქრომ ხ-ს გვერდის ავლით, მიკროსომული ციტოქრომ ხ<sub>5</sub>-იდან უშუალოდ c<sub>1</sub>C- და aa<sub>3</sub>-ციტოქრომებზე მოხვდნენ (ნახ. 4.23). ამ შემთხვევაშიც შუალედ გამამტანად პერიმიტოქონდრიული ციტოქრომ ხ<sub>5</sub> უნდა ფუნქციონირებდეს [128].

ამრიგად, ციტოქრომ P450-ის პეროქსიდაზად ქიმიური მოდიფიკაციისას NADPH-ციტოქრომ P450-რედუქტაზა და ციტოქრომ ხ<sub>5</sub> ახალ, ენერგეტიკულ ფუნქციას იძენენ, რაც მიტოქონდრიული სუნთქვის ჯაჭვის აღმდგენელი ექვივალენტებით დამატებით უზრუნველყოფაში მდგომარეობს. ქსენობიოტიკის უჯრედში მოხვედრისას NADPH-ის მიკროსომული ჟანგვის შეუღლებული სისტემა ენერგეტიკულიდან კვლავ დეტოქსიკაციურ რეჟიმს უბრუნდება.



ნახ. 4.23. მიკროსომული რედოქს-ჯაჭვიდან მიტოქონდრიაზე ელექტრონების მიგრაციის შესაძლო გზები. დაშტრიხული ისრით აღნიშნულია  $Zn^{2+}$ -ით ბლოკირებული უბანი [132].

ქიმიური მოდიფიკაციის გზით ციტოქრომ P450-ის პეროქსიდაზად ტრანსფორმაცია უჯრედის საერთო დეტოქსიკაციურ პოტენციალს კი არ ამცირებს, არამედ გარკვეულწილად აძლიერებს კიდევაც. ამ დროს მონოოქსიგენაზას პეროქსიდაზა ენაცვლება, რომელიც ქსენობიოტიკების უანგვით დეგრადაციაში არანაკლებ როლს ასრულებს. საქმე იმაშია, რომ ზოგიერთი მკვლევარის თვალსაზრისით მცენარეებში ორგანული ტოქსიკური ნაერთების ძირითადი ნაწილი პეროქსიდაზებით იჟანგება [136]. ეს ჰიპოთეზა ექსპერიმენტულად დასაბუთებულ შემდეგ მოსაზრებებს ეყრდნობა:

- მცენარეებში პეროქსიდაზას ფართო გავრცელებას;
- ფერმენტის მაღალ სწრაფვას სხვადასხვა ქიმიური სტრუქტურის მქონე ორგანული ქსენობიოტიკების მიმართ;
- უნივერსალურ სუბსტრატულ სპეციფიკურობას.

ეს თავისებურებები განსაზღვრავს პეროქსიდაზას აქტიურ მონაწილეობას მთელ რიგ დეტოქსიკაციურ პროცესებში. ქსენობიოტიკების ჰიდროქსილირების რეაქციებში მცენარეული პეროქსიდაზების მონაწილეობაზე მრავალი ფაქტი მიუთითებს, მაგ., სხვადასხვა მცენარეების პეროქსიდაზებს შეუძლიათ დაჟანგონ N,N-დიმეთილანილინი [137], 3,4-ბენზპირენი, 4-ნიტრო-*o*-ფენილენდიამინი [138], 4-ქლორანილინი [139], ფენოლი, ამინოფლუორენი, პარაოქსიაცეტანილიდი, დიეთილსტილბესტროლი, ჰიდროქსითილტოლოლი, ჰიდროქსიანიზოლები და სხვ. [140]. ტრითიუმით ნიშანდებული მეთილის ჯგუფის შემცველი [C<sup>3</sup>H<sub>3</sub>] TNT-ს გამოყენებით ნაჩვენებია, რომ პირშუშას პეროქსიდაზას სუფთა პრეპარატს შეუძლია ისეთი ძნელად დასაჟანგი ჯგუფიც კი დაჟანგოს, როგორც TNT-ს მეთილის ჯგუფი წარმოადგენს [141].

მრავალი უცხო ნაერთის ჟანგვის დასაწყისში ციტოქრომ P450-ს შეუძლია ფუნქციონირება, როგორც მონოოქსიგენაზას, შემდგომში კი ჟანგვა გააგრძელოს პეროქსიდაზად ტრანსფორმირებულმა ჰემოპროტეინმა. ამ შემთხვევაში ქსენობიოტიკის დეგრადაცია ფერმენტთა ურთიერთშენაცვლების პრინციპით ხორციელდება. ჩვენს ლაბორატორიაში ნაჩვენებია იქნა, რომ **ქსენობიოტიკთა ჟანგვის პროცესში ერთმანეთს შეიძლება შეენაცვლონ არამხოლოდ მონოოქსიგენაზა და პეროქსიდაზა, არამედ ფენოლოქსიდაზაც** [142-144]. ამ ფერმენტების კოორდინირებული მოქმედება მრავალი უცხო ნაერთის ჟანგვითი დეგრადაციის პროცესის მთავარ რეგულატორულ მექანიზმს უნდა წარმოადგენდეს.

განხილული ფაქტების შეჯერებას ერთ მნიშვნელოვან დასკვნამდე მივყავართ:

ცხოველური უჯრედებისაგან განსხვავებით, რომელშიც თავისუფალი რადიკალები ჰემის მოდიფიკაციის და მისი შემდგომი დესტრუქციის გზით ციტოქრომ P450-ის სრულ ინაქტივაციას იწვევენ, მცენარეულ უჯრედში ამ ჰემოპროტეინის ქიმიური მოდიფიკაცია ისე ხორციელდება, რომ ციტოქრომ P450 თავის კატალიზურ აქტივობას პეროქსიდაზას სახით ინარჩუნებს. ე.ი. მცენარეული ფერმენტი მხოლოდ თვისობრივ გარდაქმნას – ტრანსფორმაციას განიცდის. ამ დროს ციტოქრომ P450-დამოკიდებული შიდაუჯრედული მეტაბოლური პროცესების ინტენსივობა ქვეითდება. ციტოქრომ P450-ის ტრანსფორმაციის შედეგად მონოოქსიგენაზური სისტემის შემადგენელ კომპონენტებს შორის ადრე არსებული ფუნქციური კავშირი წყდება და ისინი ახალ ფუნქციებს იძენენ. ასეთი ტრანსფორმაციით მცენარეული უჯრედი, ერთი მხრივ, ცხოველურის მსგავსად თავიდან იცილებს აგრესიული ინტერმედიატების გენერატორს – ციტოქრომ P450-ს, მეორე მხრივ, ცხოველურისაგან განსხვავებით, ამავე ფერმენტს

პეროქსიდაზას ფუნქციას ანიჭებს. ამ გზით უჯრედი იძენს ფერმენტს, რომელსაც ერთდროულად ქსენობიოტიკების ჟანგვა და აგრესიული H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-ის ლიკვიდაცია შეუძლია. სწორედ ამაში უნდა მდგომარეობდეს ქიმიური მოდიფიკაციის გზით ციტოქრომ P450-ის ტრანსფორმაციის ბიოლოგიური აზრი.

### ლიტერატურა

1. Арчаков, А.И. (1975) Микросомальное окисление. М., Наука, 327с.
2. Estabrook, R.W., Baron, J., Hilderbrandt, A.G. (1971a) A new spectral species associated with cytochrome P-450 in liver microsomes. *Chem.Biol.Interactions*, 3, 260-261.
3. Estabrook, R.W., Hilderbrandt, A.G., Baron, J., Netter, L.J., Leibman, K.A. (1971b) A new spectral intermediate associated with cytochrome P-450 function in liver microsomes. *Biochem.Biophys.Res.Communs.*, 42, 132-139.
4. Арчаков, А.И. (1983) Оксигеназы биологических мембран. XXXVII Баховские чтения. М., Наука, 54с.
5. Archakov, A.I., Devichensky, V.M., Karuzina, I.I., Karyakin, A.V. (1975b) The electron transfer in the membranes of endoplasmic reticulum. The interaction of NADPH and NADH-electron transfer chains in microsomes. *Arch.Biochem.Biophys.* 166, 308-312.
6. Archakov, A.I., Devichensky, V.M., Karyakin, A.V. (1975a) The electron transfer in the membranes of endoplasmic reticulum. Participation of cytochrome b<sub>5</sub> in the NADPH-oxidation reaction. The evidence for two cytochrome b<sub>5</sub> in liver microsomes. *Arch.Biochem.Biophys.* 166, 295-307.
7. Archakov, A.I., Devichensky, V.M. (1975) The electron transfer in the membranes of endoplasmic reticulum. A quantitative estimation of cytochrome b<sub>5</sub> content in the NADPH and NADH-oxidation chains. *Arch.Biochem.Biophys.* 166, 313-317
8. Archakov, A.I., Karyakin, A.V. (1975) Intermembrane electron transfer in the absence of added watersoluble carriers. *Biochem.Biophys.Acta*, 408, 93-100.
9. Арчаков, А.И., Карякин, А.В., Скулачев, В.П. (1973) Перенос электронов между мембранами микросом и митохондрии. *ДАН СССР*, 209, 221-223.
10. Cinti, D.L., Schenckman, J.B. (1972) Hepatic organelle interaction. I. Spectral investigation during drug biotransformation. *Molec.Pharmacol.*, 8, 333-338.
11. Cinti, D.L., Ritchie, A., Schenckman, J.B. (1972) Hepatic organelle interaction. II. Tricarboxylic acid cycle components on N-demethylation and hydroxylation reactions in rat liver. *Molec.Pharmacol.*, 8, 339-344.
12. Moldeus, P. W., Cha, Y. N., Cinti, D. L., Schenckmann, J. B. (1973) Hepatic organelle interaction. III. Mitochondrial modification of microsomal drug metabolism. *J.Biol.Chem.*, 248, 8574-8584.
13. Schenckman, J.B., Cinti, D.L., Moldeus, P.W. (1973) The mitochondrial role in hepatic cell mixed-function oxidations. *Ann.N.-Y.Acad.Sci.*, 212, 420-427.

14. Ратникова, Л.А., Чистяков, В.В., Ягужинский, Л.С. (1978) Регуляторные взаимодействия дыхательной цепи митохондрии и окислительной системы эндоплазматического ретикулула. *Биохимия*, 43, 1809-1815.
15. Чистяков, В.В., Поспелова, Л.Н. (1982) Перенос электронов от митохондрии к микросомам в реконструированной системе клеточных органелл. *Биохимия*, 47, 55-61.
16. Гордезиани, М.Ш., Дурмишидзе, С.В., Бобохидзе, Е.А., Ломидзе, "П. (1982) Участие митохондриальной и микросомальной окислительных систем в детоксикационных процессах ксенобиотиков листьями. *Физиол.растений*, 29, 978-984.
17. Гордезиани, М.Ш., Дурмишидзе, С.В., Бобохидзе, Е.А., Ломидзе, "П. (1986) Микросомальное деметилирование диметиланилина и п-нитроанизола в смещанной системе растительные микросомы-митохондрии. *Изв. АН ГССР, сер.биол.*, 12, 42-46.
18. Жуков, А.А., Арчаков, А.И. стехиометрия реакций микросомального окисления. Распределение редокс-эквивалентов между монооксигеназными и оксидазными реакциями, катализируемыми цитохромом Р-450. *Биохимия*, 1985, 50, 1939-1952.
19. Гордезиани, М.Ш. (1992) Монооксигеназы высших растений и их роль в детоксикации ксенобиотиков. Дисс... докт. биол. наук в форме науч. докл., Тбилиси, Ин-т биохимии АН Грузии, 45с.
20. Хатисашвили Г.А., Адамия Г.С., Гордезиани М.Ш., Ломидзе Э.П., Брискер В.Л. (1986) Полярнографическое исследование гидроксилирующей способности растительных микросом. *Сообщ. АН ГССР*, 123, 3, 621-623.
21. Гордезиани М.Ш., Хатисашвили Г.А., Квеситадзе Г.И. (1991) Свободное и сопряженное с гидроксилированием ксенобиотиков окисление NADPH. *ДАН СССР*, 320, 2, 417-420.
22. Гордезиани М.Ш., Хатисашвили Г.А., Курашвили М.В. (1991) Распределение NADPH-цитохром Р-450-редуктазы в растительной клетке. *Сообщ. АН Грузии*, 143, 3, 321-324.
23. Хатисашвили Г.А., Гордезиани М.Ш., Ломидзе Э.П., Адамия Г.С. (1989) Редокс-цикл НАДФН при недостатке кислорода в бес-клеточной системе растений. Тез. докл. V Всесоюз. конф. «Цитохром Р-450 и модификация макромолекул». Ялта, 155.
24. Гордезиани М.Ш., Дурмишидзе С.В., Хатисашвили Г.А., Адамия Г.С., Ломидзе "П. (1987) Исследование биосинтетической и детоксикационной способности растительного цитохрома Р-450. *ДАН СССР*, 295, 6, 1491-1493.
25. Гордезиани М.Ш., Хатисашвили Г.А., Адамия Г.С., Ломидзе Э.П. (1987) Возможность переключения цитохрома Р-450 с «эндогенного» на «экзогенный» режим обмена. *Сообщ. АН ГССР*, 126, 1, 161-164.
26. Khatisashvili, G., Gordeziani, M., Kvesitadze, G., Korte, F. (1997) Plant monooxygenases: participation in xenobiotic oxidation. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 36, 118-122.
27. Gogoberidze, M., Zaalishvili, G., Khatisashvili, G., Ugrekhelidze, D., Gordezia-

- ni, M., Kvesitadze, G. Bioremediation – contemporary strategy of xenobiotics' detoxification. *Contaminated Soil 2000* (Proceedings of the 7th International FZK/TNO Conference). 2000, 1, 397–404
28. Kiskeidze, E., Khatisashvili, G., Kurashvili, M., Shavgulidze, G. Action of lipid peroxidation on monooxygenase System participating in xenobiotic detoxification. *Bulletin of the Georgian Academy of Sciences*. 2000, 162, 1,156–158
  29. Durst, F. Physiology and biochemistry of plant cytochrome P-450. In *Frontiers in Biotransformation*, Berlin, Akademie Verlag, 1991, 4, 191-232
  30. Durst, F., Benveniste, I., Lesot, A.A., Salaün, J.-P., Werck-Reichhart, D. Induction of plant cytochrome P-450. In *Redulation of Enzymatic Systems Detoxifying Xenobiotics in Plants*, Dordrecht/Boston/London, Kluwer Academic Publishers, 1997, 19-34
  31. Reichhart, D., Salaün, J.-P., Benveniste, I., Durst, F. Induction by manganese, ethanol, phenobarbital and herbicides of microsomal cytochrome P-450 in higher plant tissues. *Arch.Biochem.Biophys.*, 1979, 196, 301-303
  32. Reichhart, D., Salaün, J.-P., Benveniste, I., Durst, F. Time course of induction of cytochrome P-450, NADPH-cytochrome c reductase, and cinnamic acid hydroxylase by phenobarbital, ethanol, herbicides and manganese in higher plant microsomes. *Plant Physiol.*, 1980, 66, 600-604
  33. Salaün, J.-P., Benveniste, I., Reichhart, D., Durst, F. Induction and specificity of a cytochrome P-450 dependent laurate in-chain hydroxylase from higher plant microsomes. *Eur.J.Biochem.*, 1981, 119, 651-655
  34. Khatisashvili, G., Kurashvili, M., Gordeziani, M., Kvesitadze, G. (1994) Functional evaluation of separate components of plant monooxygenase system involved in xenobiotic detoxication. *Fresenius Environmental Bulletin*, 3, 621-626.
  35. Hendry, G.A.F. Jones, O.T.G. Induction of cytochrome P-450 in intact mung beans *New Phytol.*, 1984, 96, 153-159
  36. Fujita, M. *Agric.Biol.Chem.*, 1985, 49, 3045-3047
  37. Hagemann, M.-L., Heller, W., Grisebach, H. Induction and characterization of a microsomal flavonoid 3'-hydroxylase from parsley cell cultures. *Eur.J.Biochem.*, 1983, 134, 547-554
  38. Heller, W., Kühnl, T. Elicitor induction of a microsomal 5-O-(4-coumaroyl) shikimate 3'-hydroxylase in parsley cell suspension cultures. *Arch.Biochem.Biophys.*, 1985, 241, 453-460
  39. Benveniste, I., Salaün, J.-P., Durst, F. Wounding-induced cinnamic acid hydroxylase in Jerusalem artichoke tuber. *Phytochem.*, 1977, 16, 69-73.
  40. Salaün, J.-P., Benveniste, I., Reichhart, D., Durst, F. A microsome (cytochrome P-450)-linked lauric acid-monoxygenase from aged Jerusalem-artichoke-tuber tissues. *Eur.J.Biochem.*, 1978, 90, 155-159
  41. Russel, D.W. The metabolism of aromatic compounds in higher plants. *J.Biol.Chem.*, 1971, 246, 3870-3878
  42. Benveniste, I., Salaün, J.-P., Durst, F. Phytochrome mediated regulation of a monooxygenase hydroxylating cinnamic acid in etiolated pea seedlings. *Phytochem.*, 1978, 17, 359-363



43. Benveniste, I., Salaün, J.-P., Reichhart, D., Durst, F. In: Photoreceptors and Plant Development. Antwerpen, 1979. Antwerpen Univ. Press., 1980, 297-304
44. Benveniste, I., Salaün, J.-P., Simon, A., Reichhart, D., Durst, F. Cytochrome P-450-dependent  $\omega$ -hydroxylation of lauric acid by microsomes from pea seedlings. *Plant Physiol.*, 1982, 70, 122-126
45. Hahlbrock, K., Knobloch, K.H., Potts, J.R.M, Wellmann, E.W. *Eur.J.Biochem.*, 1976, 61, 199-206
46. Hendry, G.A.F., Huoghton, J.D., Jones, O.T.G. Light-dependent cytochrome P-450 changes in mung beans (*Paseolus aureus*). *Biochem.J.*, 1981b, 196, 825-829
47. Хатисашвили Г.А., Гордезиани М.Ш., Курашвили М.В. (1991) Цитохромные компоненты растительных микросом и возможность их индукции. *Собщ. АН Грузии*, 143, 2, 189-192.
48. მ. გორდეზიანი, გ. სატისაშვილი. მემბრანული ქსენობიოქიმია. თბილისი, 2005, 281
49. Ляхович, В.В., Цырлов, И.Б. (1978) Структурные аспекты биохимии монооксигеназ. Наука, Новосибирск, 238.
50. Stier A, Sackmann E. Spin labels as enzyme substrates. Heterogeneous lipid distribution in liver microsomal membranes. *Biochim Biophys Acta.* 1973 Jul 6;311(3):400-408
51. Peterson JA, Ebel RE, O'Keeffe DH, Matsubara T, Estabrook RW. Temperature dependence of cytochrome P-450 reduction. A model for NADPH-cytochrome P-450 reductase:cytochrome P-450 interaction. *J Biol Chem.* 1976 Jul 10;251(13):4010-6.
52. Estabrook, R.W., Baron, J., Franklin, M., Mason, H.S., Waterman, M., Peterson, J.A. Cytochrome P-450 – panacea or plague. In: *The molecular Basis of electron transport* (Schultz, J., Cameron, D.F., eds.) N.Y. London, Acad. Press. 1972, pp. 197-230.
53. Ebel R.E., O'Keeffe D.H., Peterson J.A. The molecular architecture of the microsomal membrane: cytochrome P-450 – cytochrome P-450 reductase interaction. – In *Abstracts of the 10-th Internat. Congr. Biochem. Hamburg, 1973*, 296
54. Уваров, В.Ю., Бачманова, Г.И., Арчаков, А.И., {айтина, С.В., Сухомудренко, А.Г. (1980б) Конформационное состояние растворимого и встроенного в искусственную мембрану цитохрома  $b_5$ . *Биохимия*, 45, 1859-1862.
55. Ernster, L., Nordenbrand, K. Microsomal lipid peroxidation. – “*Methods in Enzymology*”, 1967, 10, 574-580
56. Ernster, L., Nordenbrand, K., Orrenius, S., Das, M.L. Microsomal lipid peroxidation. – “*Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*”, 1968, 349, 1604-1605
57. Arcakov, A.I., Bachmanova, G.I. *Cytochrome P-450 and Active Oxygen*. London, Taylor & Francis, 1990, 170-481.
58. Karuzina, I.I., Archakov, A.I. The oxidative inactivation of cytochrome P-450 in monoxygenase reactions. *Free Radic. Biol. Med.*, 1993, 16, 73-97.
59. Ruckpaul, K., Rein, H., Blanck, J. Regulation of the activity of the hepatic endoplasmic cytochrome P-450. In: *Basis and mechanisms of regulation of cytochrome P-450* (Ruckpaul, K., Rein, H. eds.). Berlin, Akademie-Verlag, 1989, 1, 1-65.

60. Archakov, A.I., Zhukov, A.A. Multiple activities of cytochrome P-450. Stoichiometrical approach. In: *Drug Metabolism—from Molecules to Man*, London, Taylor & Francis, 473-476. In: *Basis and mechanisms of regulation of cytochrome P-450* (Ruckpaul, K., Rein, H., eds.). Berlin, Academie-Verlag, 1989, 1, 1-65.
61. Zhukov, A. A., Blanck, J., Ristau, O., Ruckpaul, K., Arcakov, A.I. Stoichiometry of cytochrome P-450-catalyzed oxygenase and oxidase reactions. Correlations with the spin state of the ferric heme. In: *Cytochrome P-450: Biochemistry and Biophysics* (Schuster, J., eds.). London, Taylor & Francis, 1989, 85-88.
62. Ляхович, В.В., Вавилин, В.А., Зенков, Н.К., Меньщикова, Е.Б. Активированные кислородные метаболиты в монооксигеназных реакциях. *Бюллетень СО РАМН*, 2005, 4 (118), 7-12
63. Гуляева, Л.Ф., Вавилин, В.А., Ляхович, В.В. Ферменты биотрансформации ксенобиотиков в химическом канцерогенезе. Новосибирск, 2000, 84.
64. Fleming, I. Cytochrome P450 and vascular homeostasis. *Circ. Res.*, 2001, 89, 753-762.
65. Gottlieb, R.A. Cytochrome P450: major player in reperfusion injury. *Arch. Biochem. Biophys.*, 2003, 420, 262-267.
66. Symons, A.M., King, L.J. Inflammation, reactive oxygen species and cytochrome P450. *Inflammopharmacology*. 2003, 11, 75-86.
67. Caro, A.A., Cederbaum, A.I. Oxidative stress, toxicology, and pharmacology of CYP2E1. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 2004, 44, 27-42.
68. Morel, Y. Coumoul, X., Nalpas, A., Barouki, R. Repression of gene expression by oxidative stress. *Biochem. J.*, 1999, 342, 481-496.
69. Morel, Y. Nuclear factor I/CCAAT box transcription factor trans-activating domain is a negative sensor of cellular stress. *Mol. Pharmacol.*, 2000, 58, 1239-1246.
70. Hirsch-Ernst, K.I., Schlaefter, K., Bauer, D., Heder, A.F., Kahl, G.F. Repression of phenobarbital-dependent CYP2B1 mRNA induction by reactive oxygen species in primary rat hepatocyte cultures. *Mol. Pharmacol.*, 2001, 59, 1402-1409.
71. Choi, D.W., Leininger-Muller, B., Wellman, M., Kim, Y.H., Siest, G. Cytochrome P-450-mediated differential oxidative modification of proteins: albumin, apolipoprotein E, and CYP2E1 as targets. *J. Toxicol. Environ. Health.*, 2004, 67, 2061-2071.
72. Goasduff, T., Cederbaum, A.I. NADPH-dependent microsomal electron transfer increases degradation of CYP2E1 by the proteasome complex: role of reactive oxygen species. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1999, 370, 258-270.
73. Roberts BJ, Song BJ, Soh Y, Park SS, Shoaf SE. Ethanol induces CYP2E1 by protein stabilization. Role of ubiquitin conjugation in the rapid degradation of CYP2E1. *J. Biol. Chem.*, 1995, 270, 29632-29635.
74. Halpert, J.R., Balfour, C., Miller, N.E., Kaminsky, L.S. Dichloromethyl compounds as mechanism-based inactivators of rat liver cytochromes P-450 in vitro. *Mol. Pharmacol.*, 1986, 30, 19-24.
75. Stevens, J.C., Halpert, J. Selective inactivation of four rat liver microsomal androstenedione hydroxylases by chloramphenicol analogs. *Mol. Pharmacol.*,

- 1988, 33, 103-110.
76. Ortiz de Montellano, P.R., Mico, B.A., Mathews, J.M., Kunze, K.L., Miwa, G.T., Lu, A.Y. Selective inactivation of cytochrome P-450 isozymes by suicide substrates. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1981, 210, 717-728.
  77. Ortiz de Montellano, P.R., Reich, N.O. Catalyst-dependent inhibition of cytochrome P-450 enzyme. In: *Cytochrome P-450: Structure, Mechanism and Biochemistry* (Ortiz de Montellano P.R., ed.). New York, Plenum Press, 1986, 273-314.
  78. Ortiz de Montellano, P.R. Cytochrome P-450 catalysis: radical intermediates and dehydrogenation reactions. *Trends Pharmacol. Sci.*, 1989, 10, 354-359.
  79. Reed, C.J., Lock, E.A., De Matteis, F. Olfactory cytochrome P-450. Studies with suicide substrates of the haemoprotein. *Biochem. J.*, 1988, 253, 569-576.
  80. Guengerich, F.P., Willard, R.J., Shea, J.P., Richards, L.E., Macdonald, T.L. Mechanism-based inactivation of cytochrome P-450 by heteroatom-substituted cyclopropanes and formation of ring-opened products. *J. Amer. Chem. Soc.*, 1984, 106, 6446-6447.
  81. Guengerich, F.P., Bucker, R.H. Cytochrome P-450-catalyzed dehydrogenation of 1,4-dihydropyridines. *J. Biol. Chem.*, 1988, 263, 8168-8175.
  82. Guengerich, F.P. Mechanism-based inactivation of human liver microsomal cytochrome P-450 IIIA4 by gestodene. *Chem. Res. Toxicol.*, 1990, 3, 363-371.
  83. Farrell, G.C., Correia, M.A. Structural and functional reconstitution of hepatic cytochrome P-450 in vivo. Reversal of allylisopropylacetamide-mediated destruction of the hemoprotein by exogenous heme. *J. Biol. Chem.*, 1980, 255, 10128-10133.
  84. Bornheim, L.M., Underwood, M.C., Caldera, P., Rettie, A.E., Trager, W.F., Wrighton, S.A., Correia, M.A. Inactivation of multiple hepatic cytochrome P-450 isozymes in rats by allylisopropylacetamide: mechanistic implications. *Mol. Pharmacol.*, 1987, 32, 299-308.
  85. Bachmanova, G.I., Pogodina, O.K., Kanaeva, I.P., Archakov, A.I. The inactivation of the reduced cytochrome P-450. In: *Biochemistry, Biophysics and Regulation of Cytochrome P-450* (Gustafsson, J.A., Carlstedt-Duke, Mode, A, Rafter, J., eds.). Amsterdam, Elsevier Biomedical Press, 1980, 599-602.
  86. Bachmanova, G.I., Uvarov, V.V., Kanaeva, I.P., Archakov, A.I. Suicide inactivation of reduced cytochrome P-450 in soluble and membrane-bound states. In: *Cytochrome P-450, Biochemistry, Biophysics and Environmental implications* (Hietanen, E., Laitinen, M., Hanninen, O., eds.). Amsterdam, Elsevier Biomedical Press, 1982, 599-602.
  87. Ingelman-Sundberg, M., Paul, K.G. Heme release from rabbit liver microsomal cytochrome P-450 LM2. *Acta Chem. Scand. B.*, 1986, 40, 233-234.
  88. Levine, R.L. Oxidative modification of glutamine synthetase. II. Characterization of the ascorbate model system. *J. Biol. Chem.*, 1983, 258, 11828-11833.
  89. Levine, R.L., Oliver, C.N., Fulks, R.M., Stadtman, E.R. Turnover of bacterial glutamine synthetase: oxidative inactivation precedes proteolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1981, 78, 2120-2124.
  90. Oliver, C.N., Fucci, L., Levine, R.L., Wittenberger, M.E., Stadtman, E.R. Inactivation of key metabolic enzymes by P-450 linked mixed function oxidation sys-

- tems. In: Cytochrome P-450, Biochemistry, Biophysics and Environmental implications (Hietanen, E., Laitinen, M., Hanninen, O., eds.). Amsterdam, Elsevier Biomedical Press, 1982, 531-538.
91. Rivett, A.J., Levine, R.L., Stadtman, E.R. Mixed function oxidation of proteins can modify multiple amino-acid leading to varying effects on the protein. *Fed. Proc.*, 1985, 44, 1399.
  92. Метелица, Д.И. Активация кислорода ферментными системами. М., Наука, 1982, 249 с.
  93. CaJacob, C.A., Chan, W.K., Shephard, E., Ortiz de Montellano, P.R. The catalytic site of rat hepatic lauric acid  $\omega$ -hydroxylase: Protein versus prosthetic heme alkylation in the  $\omega$ -hydroxylation of acetylenic fatty acids. *J. Biol. Chem.*, 1988, 263, 18640-18649.
  94. Helvig, C., Tardif, F.J., Seyer, A., Powles, S.B., Mioskowski, C., Durst, F., Salaьn, J.P. Selective inhibition of a cytochrome P450 enzyme in wheat that oxidizes both the natural substrate lauric acid and the synthetic herbicide diclofop. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 1996, 54, 161-171.
  95. Helvig, C., Alayrac, C., Mioskowski, C., Koop, D.P., Durst, F., Salaьn, J.P. Suicide inactivation of cytochrome P450 by middle chain and terminal acetylenes. *Biochemistry and Molecular Biology*, 1997, 3, 414-421.
  96. Khatisashvili, G., Kurashvili, M., Gordeziani, M., Kvesitadze, G. Monooxygenase and peroxidase pathways of xenobiotics detoxication in higher plants. *Fresenius Environmental Bulletin*, 1993, 2, 103-108.
  97. Yamazaki, I., Yokota, K. Oxidation states of peroxidase. *Mol. Cell Biochem.*, 1973, 2, 39-52.
  98. George, P. The chemical nature of the second hydrogen peroxide compound formed by cytochrome c peroxidase and horseradish peroxidase. I. Titration with reducing agents. *Biochem. J.*, 1953, 54, 267-276.
  99. Chance, B. The enzyme-substrate compounds of horseradish peroxidase and peroxides; kinetics of formation and decomposition of the primary and secondary complexes. *Arch. Biochem.*, 1949, 22, 224-252.
  100. Dolphin, D., Forman, A., Borg, D.C., Fajer, J., Felton, R.H. Compounds I of catalase and horse radish peroxidase: pi-cation radicals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1971, 68, 614-618.
  101. Ингрем, Л. Механизмы биохимических реакций. М., Мир, 1964, 100-116.
  102. Kaneko, Y., Tamura, M., Yamazaki, I. Formation of porphyrin pi cation radical in zinc-substituted horseradish peroxidase. *Biochemistry*, 1980, 19, 5795-5799.
  103. Саундерс, Б.К. Пероксидазы и каталазы. В кн: Неорганическая биохимия. М., Мир, 1978, 2, 434-470.
  104. Groves, J.T., Nemo, T.E., Myers, R.S. Hydroxylation and epoxidation catalyzed by iron-porphine complexes. Oxygen transfer from iodosylbenzene. *J. Amer. Chem. Soc.*, 1979, 101, 1032-1033.
  105. Chang, C.K., Kuo, M.S. Reaction of iron(III) porphyrins and iodosoxylene. The active oxene complex of cytochrome P-450. *J. Amer. Chem. Soc.*, 1979, 101, 3413-3415.
  106. Hill, C.L., Schardt, B.C. Alkane activation and functionalization under mild

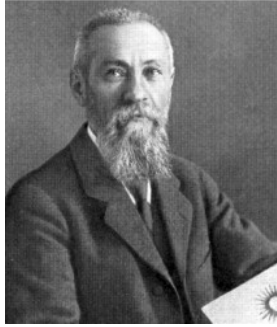
- conditions by a homogeneous manganese(III)porphyrin-iodosylbenzene oxidizing system. *J. Amer. Chem. Soc.*, 1980, 102, 6374-6375.
107. Groves, J.T., Kruper, W.J., Haushalter, R.C. Hydrocarbon oxidations with oxo-metalloporphyrins. Isolation and reactions of a (porphyrinato)manganese(V) complex. *J. Amer. Chem. Soc.*, 1980, 102, 6375-6377.
  108. Chin, D.H., Balch, A.L., La Mar, G.N. Formation of porphyrin ferryl (FeO<sub>2</sub><sup>+</sup>) complexes through the addition of nitrogen bases to peroxy-bridged iron(III) porphyrins. *J. Amer. Chem. Soc.*, 1980, 102, 1446-1448.
  109. Chin, D.H., Del Gaudio, J., La Mar, G.N., Balch, A.L. Detection and characterization of the long-postulated iron-dioxygen-iron intermediate in the autoxidation of ferrous porphyrins. *J. Amer. Chem. Soc.*, 1977, 99, 5486-5488.
  110. Chin, D.H., La Mar, G.N., Balch, A.L. Mechanism of autoxidation of iron(II) porphyrins. Detection of a peroxy-bridged iron(III) porphyrin dimer and the mechanism of its thermal decomposition to the oxo-bridged iron(III) porphyrin dimer. *J. Amer. Chem. Soc.*, 1980, 102, 4344-4350.
  111. Chin, D.H., La Mar, G.N., Balch, A.L. Role of ferryl (FeO<sub>2</sub><sup>+</sup>) complexes in oxygen atom transfer reactions. Mechanism of iron (II) porphyrin catalyzed oxygenation of triphenylphosphine. *J. Amer. Chem. Soc.*, 1980, 102, 5945-5947.
  112. Hrycay, E.C., O'Brien, P.J. Cytochrome P-450 as a microsomal peroxidase in steroid hydroperoxide reduction. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1972, 153, 480-94.
  113. Bidlack, W.R., Hochstein, P. Hydroperoxide peroxidase activity in liver microsomes. *Life Sci.*, 1974, 14, 2003-20010.
  114. Shinohara, A., Kamataki, T., Ichimura, Y., Ouchi, H., Okuda, K., Kato, R. Drug oxidation activities of horse-redish peroxidase, myoglobin and cytochrome P-450 reconstituted with synthetic hemes. *Jap. J. Pharmacol.*, 1984, 45, 107-114.
  115. Диксон. М., Уэбб, Э. Ферменты. М., Иностранная литература, 1961, 350-353.
  116. Rahimtula, A.D., O'Brien, P.J. The role of cytochrome P-450 in the hydroperoxide-catalyzed oxidation of alcohols by rat-liver microsomes. *Eur. J. Biochem.*, 1977, 77, 201-208.
  117. Metelitz, D.I., Akhrem, A.A., Erjomin, A.N., Kissel, M.A., Usanov, S.A. The mechanism of hydroperoxide-dependent reactions with participation of cytochrome P-450. *Acta Biol. Med. Ger.*, 1979, 38, 511-518.
  118. Jeffery, E., Kotake, A., Azhary, R.E. Effects of linoleic acid hydroperoxide on the hepatic monooxygenase systems of microsomes from untreated, phenobarbital-treated, and 3-methylcholanthrene-treated rats. *Mol. Pharmacol.*, 1977, 13, 415-425.
  119. Sies, H., Grosskopf. Oxidation of cytochrome b5 by hydroperoxides in rat liver. *Eur. J. Biochem.*, 1975, 57, 513-520.
  120. Archakov, A.I., Karuzina, I.I., Kokareva, I.S., Bachmanova, G.I. The effect of magnesium ions on the diethylamine oxidation rate and electron transfer in liver microsomal fraction. *Biochem. J.*, 1973, 136, 371-379.
  121. Archakov, A.I., Karuzina, I.I., Tveritinov, V.N., Kokareva, I.S. Hydroxylation of aniline and aminoantipyrine (1-phenyl-2,3-dimethyl-aminopyrasolon-5) deriva-

- tives in liver endoplasmatic reticulum. *Biochem. Pharmac.*, 1974, 23, 1053-1063.
122. Fouts, J.R., Pohl, R.J. Further studies on the effects of metal ions on rat liver microsomal reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-cytochrome P-450 reductase. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1971, 179, 91-100.
  123. Peters, M.A., Fouts, J.R. A study of some possible mechanisms by which magnesium activates hepatic microsomal drug metabolism in vitro. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1970, 173, 233-241.
  124. Saunders, B.C., Watson, G.H. Studies in peroxidase action; the oxidation of 4-methoxy-2:6-dimethylaniline. Suggestions for a mechanism. *Biochem. J.*, 1950, 46, 629-633.
  125. Хатисашвили, Г.А., Курашвили, М.В., Чхиквишвили, И.Д., Гордезиани, М.Ш., Квеситадзе, Г.И. Трансформация монооксигеназного механизма в пероксидазный и микросомальное окисление флавоноидов в растений. Известия АН Грузии, серия биологическая, 1993, 19, 318-323.
  126. Kiskeidze, E., Zaalishvili, G., Ebelashvili, M., Khatisashvili, G., Kurashvili, M., Gordeziani, M. Changes of plant monooxygenase system during xenobiotics oxidation. *Proc. Georg. Acad. Sci., Biol. Ser. A.*, 2003, 29, 639-644.
  127. Wood, A.W., Smith, D.S, Chang, R.L., Huang, M.T., Conney, A.H. Plant flavonoids in biology and medicine: biochemical, pharmacological and structure-activity relationship. 1986, 195-210.
  128. Хатисашвили, Г.А. Растительные монооксигеназы: детоксикация ксенобиотиков и внутриклеточная энергетика. Докторская дисс., 1999, Тбилиси.
  129. Grand, C. Ferulic acid 5-hydroxylase: a new cytochrome P-450-dependent enzyme from higher plant microsomes involved in lignin synthesis. *FEBS Letters*, 1984, 169, 7-11.
  130. Heller, W., Kьhnl, T. Elicitor induction of a microsomal 5-O-(4-coumaroyl) shikimate 3'-hydroxylase in parsley cell suspension cultures. *Arch.Biochem.Biophys.*, 1985, 241, 453-460.
  131. Werck-Reichhart, D., Gabriac, B., Teutsch, H.G., Durst, F. Two cytochrome P-450 isoforms catalysing O-deethylation of ethoxycoumarin and ethoxyresofurin in higher plants. *Biochem.J.*, 1990, 170, 729-735.
  132. Gordeziani, M., Khatisashvili, G., Ananiashvili, T., Varazashvili, T., Kurashvili, M., Kvesitadze, G., Tkhelidze, P. Energetic significance of plant monooxygenase individual components partisipating in xenobiotic degradation. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 1999, 44, 49-54.
  133. Арчаков, А.И. Девиченский, В.М. Перенос электронов в мембранах эндоплазматического ретикулума: Участие цитохрома b5 в реакциях окисления NADPH. *Биохимия*, 1974, 39, 691-699.
  134. Арчаков, А.И., Карякин, А.В., Скулачев, В.П. Межмембранный транспорт электронов в отсутствии растворимых переносчиков. *ДАН СССР*, 1974, 217, 1423-1426.
  135. Скулачев, В.П. Энергетика биологических мембран. М., Наука, 1989, 409 с.
  136. Stiborova M, Anzenbacher P (1991) What are the principal enzymes oxidizing the xenobiotics in plants: cytochrome P-450 or peroxidase? *Gen Physiol* 10:

209–216

137. Shinohara A, Kamataki T, Ichimura Y, Opochi H, Okuda K, Kato R (1984) Drug oxidation activities of horse-radish peroxidase, myoglobin and cytochrome P-450cam reconstituted with synthetic hemes. *Jap J Pharmacol* 45: 107–114.
138. Wilson L, Williamson T, Gronowski J, Gentile GI, Gentile JM (1994) Characterization of 4-nitro-o-phenylen-di-am-ine activities by plant systems. *Mutation Res* 307: 185–193.
139. Laurent FMG (1994) Chloroaniline peroxidation by soybean peroxidases. *Pestic Sci* 40: 25–30
140. Sandermann H (1994) Higher plant metabolism of xenobiotics: the “green liver” concept. *Pharmacogenetics* 4: 225–241.
141. Adamia, G., Ghoghoberidze, M., Graves, D., Khatisashvili, G., Kvesitadze, G., Lomidze, E., Ugrehelidze, D., Zaalishvili, G. Absorption, distribution and transformation of TNT in higher plants. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 2006, 64, 136–145.
142. Varazashvili T., Khatisashvili G., Kurashvili M., Pruidze M., Ananiashvili T., Zaalishvili G., Gordeziani M. Nitrobenzene oxidizing enzymes in plant cells. *Journal of Biological Physics and Chemistry*. 2001, 1, 85–88.
143. Kurashvili M., Pruidze M., Kiskeidze E., Varazashvili T., Ananiashvili T., Khatisashvili G., Gordeziani M. Influence of different factors on nitrobenzene oxidation in the plant cell. *J. Biological Physics and Chemistry*. 2003, 3, 45–49.
144. Pruidze, M., Khatisashvili, G., Omiadze, N. Oxidation of organic xenobiotics by phenoloxidase from tea leaves. *Annals of Agrarian Science*, 2006, 4, 69-72.

მეცნიერები, რომლებმაც მნიშვნელოვანი წვლილი შეიტანეს  
ბიოლოგიური ჟანგვის ოქსიგენაზური მექანიზმების გამოკვლევაში



ა. ბაზნი



კ. ენგლერი



ბ. ბროდი



ო. ვარბურგი



რ. ვილიამსი



ჯ. აქსელროდი



კ. მასონი



ო. ჰაიაიში



ბ. და ჯ. მილერები





ო. როზენტალი



ჯ. ვილეტი



რ. ვილიამსი



გ. შენკმანი



ა. ჰილდებრანდტი



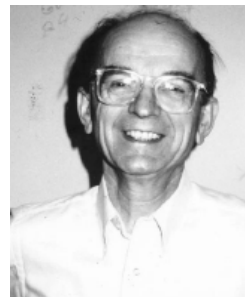
ბ. ჩანსი



კ. რემერი



კ. ტეორელი



მ. კლინგენბერგი



რ. სატო



ც. ომურა



დ. კუპერი



კ. შტაუნგერი



რ. ესტაბრუკი



ა. არჩაკოვი



კ. გელბონი



ჯ. კუნი



ვ. ულრიში