

მარლენ გორდუზიანი

მონოოქსიგენაზების შედარებითი ბიოქიმიის
შესავალი

თბილისი
2017

მ. გორდეზიანი

მონოოქსიგენაზების შედარებითი ბიოქიმიის შესავალი

საქართველოს სახელმწიფო აგრარული უნივერსიტეტის
ს. ღურშიშვილის ბიოქიმიისა და ბიოტექნოლოგიის ინსტიტუტი.
ბიოლოგიური ჟანგვის ლაბორატორია

ანოტაცია:

ნაშრომში განხილულია მონოოქსიგენაზური ფერმენტული სისტემა, რომელიც ცოცხალ ორგანიზმებში უცხო წარმოშობის ნივთიერებათა (ქსენობიოტიკა) გაუვნებლობის, სტრესული მდგომარეობისადმი ადაპტირებისა და იმუნიტეტის გაძლიერებას უზრუნველყოფს. მოლეკულური სტრუქტურითა და ფუნქციონალური დატვირთვის მიხედვით ამ სისტემის ეტალონად ლეიძლის მონოოქსიგენაზა ითვლება, რადგან ენდოპლაზმური რეტიკულუმების მემბრანაშია ჩაშენებული და ამდენად უმაღლესი მეზუთეული სტრუქტურა აქვს შეძენილი. მცენარეული მონოოქსიგენაზები ამ სისტემის ზოგადი სქემიდან გარკვეული „გადახრებით“ ხასიათდებიან, რამაც გადაწყვეტინა ერთიან ჭრილში წარმოგვედგინა მათი შედარებითი ბიოქიმია და სათანადო ყურადღება გაგვემახვილებინა იმ თავისებურებებზე რომელიც ცხოველსა და მცენარეს ინდივიდუალური განვითარების ხანგრძლივ პროცესში გამოუმუშავდათ და დაეხვეწათ.

მონოგრაფია განკუთვნილია ბიოქიმიკოსებისათვის, ბიოფიზიკოსებისათვის, ტოქსიკოლოგებისათვის, ფარმაკოლოგებისათვის და ეკოლოგიურ ქიმიაში დასაქმებული სპეციალისტებისათვის. იგი შეიძლება სასარგებლო აღმოჩნდეს ბიოლოგიური, სამედიცინო და აგრარული პროფილის პედაგოგებისა და ზედა კურსის სტუდენტებისათვის.

რედაქტორი:

ბიოლოგიის მეცნიერებათა დოქტორი,
ასოცირებული პროფესორი

გ. ხატისაშვილი

რეცენზენტი:

აკადემიური დოქტორი,
ასოცირებული პროფესორი

ინგა აბდუშელიშვილი

*ექლენება მეგობრისა და კოლეგის, საქართველოს მეცნიერებათა
ეროვნული აკადემიის წევრ-კორესპონდენტის,
პროფესორ დევი უგრეხელიძის ნათელ ხსოვნას*

შესავლის ნაცვლად

„მწვანე ფილტრი“ – მცენარეთა ბიოქიმიაში ახალი კონცეფციის დაბადება

მცენარეთა ბიოქიმიაში ახალი ე.წ. „მწვანე ფილტრის“ კონცეფციის შექმნაზე საუბრისას ვალდებულად ვთვლი თავს ორიოდ სიტყვა ვთქვა თვით მისი ორი შემომქმედის შესახებ, რადგან ორივესთან საკმაოდ ახლო და ხანგრძლივი საქმიანი ურთიერთობები მაკავშირებდა. პირველი მათგანი ჩვენი მეცნიერებათა ეროვნული აკადემიის აკადემიკოსი სერგი ღურმიშიძეა, რომელიც ჩემი მეცნიერული ხელმძღვანელი გახლდათ და მისი „ფრთის ქვეშ“ მეოთხედი საუკუნის მანძილზე მიწევდა ბუშაობა. ეს წლები ჩემი ცხოვრების საუკეთესო პერიოდია. მყავდა არამარტო შესანიშნავი მრჩეველი, არამედ ჩინებული მკვლევარი და დიდი ცხოვრებისეული გამოცდილების მქონე პიროვნება. თანამშრომლებს მან გვაზიარა საქმისა და ადამიანებისადმი ურთიერთობების რთულ ხელოვნებას.

მეორე მათგანი საქართველოს მეცნიერებათა ეროვნული აკადემიის წევრ-კორესპონდენტი, პროფესორი დევი უგრეხელიძეა, რომელიც კოლევიალობასთან ერთად ნახევარ საუკუნეზე მეტი ხნის განმავლობაში ჩემი მეგობარიც იყო. იგი ფართო განათლების ქიმიკოსი გახლდათ და ამ დარგში მასთან ნებისმიერ საკითხზე შეგეძლოთ მაღალკვალიფიციური რჩევის მიღება. პირად ცხოვრებაში დევი ზნეობით აღსავსე, უაღრესად თავმდაბალი და უზადო იუმორის მქონე ადამიანი იყო. ორივე პიროვნება თამამად შეიძლება კაცობის საზომად ჩაითვალოს. ისინი იმის მაგალითს წარმოადგენდნენ თუ როგორი უნდა იყოს ჭეშმარიტი ქართველი მამულიშვილი. სამშობლოსა და საკუთარი ხალხის უზომოდ მოყვარულებს იოლი დიდებისათვის ერთი წამითაც არ უღვაწიათ. ორივეს მტკიცედ სწამდა რომ საყოველთაო აღიარება ღირსეულთა ხვედრია, რომელიც მხოლოდ დამსახურებების შედეგად მოდის. ნიშანდობლივია რომ თავისი ცხოვრების დასაღიერზე ბ-ნმა სერგიმ დაწერა და ახალგაზრდა თაობას მიუძღვნა უბრწყინვალესი წიგნი „ზოგი რამ წარსულიდან“ (მეცნიერება, 1985 წ.). კურჩევ ჩვენს ახალგაზრდობას ყურადღებით გაეცნოს მას.

ახალი მიმართულების ექსპერიმენტული რეალიზაცია 1965 წლიდან იწყება. ამ დროისათვის დამოუკიდებელ დაწესებულებად მცენარეთა ბიოქიმიის ინსტიტუტი ჯერ არ არსებობდა და იგი „საქართველოს მეცნიერებათა აკადემიის პრეზიდიუმთან არსებული მცენარეთა ბიოქიმიის პრობლემურ ლაბორატორიად“ იწოდებოდა. მიუხედავად ამისა, საშტატო განრიგით, ტექნიკური აღჭურვილობით და რაც მთავარია საკუთარი შენობით იგი ფაქტიურად უკვე ინსტიტუტს წარმოადგენდა და თვითონ შეიცავდა რამოდენიმე ლაბორატორიას. საკუთარ თავს ჩვენც ინსტიტუტის თანამშრომლებად ვთვლიდით. დამოუკიდებელ ინსტიტუტად საკავშირო მეცნიერებათა აკადემიის პრეზიდიუმმა 1971 წელს დაამტკიცა.



საქართველოს მეცნიერებათა
ეროვნული აკადემიის აკადემიკოსი
სერგი ღურმიშიძე



საქართველოს მეცნიერებათა
ეროვნული აკადემიის
წევრ-კორესპონდენტი
დევი უგრეხელიძე

აუცილებლად უნდა აღინიშნოს რომ ქსენობიოქიმიური კვლევის დასაწყებად ბ-ნმა სერგიმ დროულად იზრუნა. მან მიზანმიმართულად დაიწყო საზღვარგარეთიდან რადიოაქტიური ნახშირბადით (^{14}C -თი) მონიშნული განსხვავებული ქიმიური აღნაგობის მქონე ორგანული ნაერთების შეძენა და მათი საკმაოდ მდიდარი კოლექციის შექმნა. მათი შენახვის ოპტიმალურ რეჟიმზე კონტროლს ინსტიტუტის გამ-ოცდილი თანამშრომლები თენგიზ ბერიაშვილი და პარმენ (ეუკური) თხელიძე ახორციელებდნენ. საერთოდ, ინსტიტუტის ცხოვრებაში ამ ორი თანამშრომლის ღვაწლი უადრესად დიდია. მათ დანერგეს კვლევის იზოტოპური მეთოდი და ამ საფრთხის მომტან ნივთი-ერებებთან მუშაობის ჩვევებს დაგვაუფლეს. მრავალი საკანდიდატო და სადოქტორო დისერტაციაა შესრულებული ამ მეთოდის გამო-ყენებით. ყურადღებას არც მაშინდელი საბჭოთა ხელისუფლება გვაკლებდა: იზოტოპებთან მომუშავეებს ძირითადი ხელფასის ზევით 20%-ს გვინაზღაურებდა და ყოველდღიურად 1 ლ რძით „გვი-მასპინძლობდა“.

პროფესიონალი ქიმიკოს-ორგანიკოსის ხელში ორგანულ ნივთიერებათა ასეთი მდიდარი კოლექცია სწორედ რომ მისწრება იყო. მათი გამოყენებით სინთეზის გზით შეიძლებოდა სათანადო საცდელი ქსენობიოტიკის მიღება, რომლის მოლეკულაშიც ^{14}C მკვლევარისათვის საინტერესო პოზიციაში იქნებოდა „ჩამჯდარი“.

ინსტიტუტში დევი 1965 წელს მოვიდა და ამ დროისათვის იგი უკვე მეცნიერებათა კანდიდატი იყო. ბ-ნმა სერგიმ მას დაუყოვნებლივ ორგანული სინთეზის ლაბორატორია გაუხსნა. დევიმ მისი დაკომპლექტება ძირითადად უნივერსიტეტიდან თავისი ყოფილი სტუდენტებით დაიწყო და ლაბორატორიის სასტარტო შემადგენლობა ასე გამოიყურებოდა: ჯემალ წეველიძე, დალი ჭრიკიშვილი, არჩილ ჯიქია, შოთა რუხაძე. შედარებით მოგვიანებით ამ ჯგუფს შემოუერთდა ემზარ ლომიძე, თემურ მითაიშვილი და თემურ დევედარიანი. სამწუხაროდ მძიმე ავადმყოფობის გამო ლაბორატორიას გამოაკლდა ჯემალ წეველიძე. იგი სრულიად ახალგაზრდა წავიდა ამ ქვეყნიდან და ყდაში ჩასმული დისერტაცია დაგვიტოვა.



თანამშრომლები „მცენარეთა ბიოქიმიის ლაბორატორიის“ დამოუკიდებელ ინსტიტუტად დამტკიცებას ზეიმობენ. მარჯვნიდან: დევი უგრეხელიძე, მარლენ გორდეზიანი, პარმენ (კუკური) თხელიძე და ენგურ კირთაძე (1971 წელი).



დევი უგრეხელიძე და მარლენ გორდეზიანი ინსტიტუტის სამეცნიერო საბჭოს პირველ სხდომაზე (1971 წელი).

დევის ლაბორატორიაში საცდელ ^{14}C -ტოქსიკანტთა სინთეზი და მცენარის მიერ მათი შეთვისება-გარდაქმნის პროცესთა კვლევა შეიძლება ითქვას პარალელურ რეჟიმში მიმდინარეობდა. აქ ამწოვი კარადების გუგუნი დღე-ღამის განმავლობაში არ წყდებოდა. სინთეზს თუ არ ჩავთვლით, მეთოდურად პროცედურების თანმიმდევრობა (რადიოაქტოგრაფია, ქაღალდისა და თხელფენოვანი ქრომატოგრაფია და ა.შ.) რთული არ იყო, მაგრამ უაღრესად შრომატევად საქმეს წარმოადგენდა და რაც მთავარია დიდ დროს მოითხოვდა. ასე მაგალითად, მცენარის უჯრედში წარმოქმნილი სტანდარტული ^{14}C -მეტაბოლიტების (ორგანული- და ამინომჟავების, შაქრების და სხვ.) იდენტიფიკაცია და მათი რადიოაქტივობების გაზომვა რენტგენის ფირების ქვეშ ქრომატოგრაფების მინიმუმ ორი თვით დაყოვნებას საჭიროებდა. ეს გარემოება ცხადია გარკვეულად აფერხებდა შემდგომი ცდების დაგეგმვას. ექსპერიმენტების ცალკეულ სერიებში გამოიყენებოდა მცენარიდან მიღებული ჯამური (აცეტონური) ფერმენტული პრეპარატებიც. მათთან საცდელი ქსენობიოტიკის ინკუბირების შემდეგ გამ-

ოყოფილი $^{14}\text{CO}_2$ რადიოაქტივობის მიხედვით ფასდებოდა მოცემული ტოქსიკანტის ფერმენტულად სრული ჟანგვის ინტენსივობა.

წლების განმავლობაში მრავალ ბალახოვან, ბუჩქოვან და ხემცე-ნარეხებში შესწავლილი იქნა ქსენობიოტიკის ფართო სპექტრის (პარ-აფინების, ოლეფინების, არომატული, პოლიციკლური და ქლორი-რებული ნახშირწყალბადების, ალდეჰიდების, კეტონების, სპირტების, ამინების, მერკაპტანების და სხვ.) წარმომადგენელთა შეთვისება-გარ-დაქმნის შესაძლებლობები, ანუ მცენარის დეტოქსიკაციური პოტენ-ციალი. ცნობილია, რომ ჩამოთვლილ ქსენობიოტიკათა დიდი ნაწილი სამრეწველო კვამლთან, ავტოტრანსპორტის გამონაბოლქვთან და სო-ფლის მეურნეობის ქიმიზაციის ნარჩენებთან ერთად საგრძნობი კონ-ცენტრაციით ხვდებიან ატმოსფეროს აეროზოლებისა და მიკრო-მტკერის (ნისლის) შემადგენლობაში. დროთა განმავლობაში ისინი დედამიწაზე ილექებიან და ამდენად ნიადაგისა და წყლის დაბინ-ძურებასაც იწვევენ. ადამიანისა და ცხოველებისათვის ეს ქსენობი-ოტიკები დიდი საფრთხის შემცველნი არიან, რადგან აზიანებენ სისხლძარღვოვან, სისხლმზად და ნერვულ ქსოვილებს. მრავალი მათგანი კი ძლიერ მუტაგენურ და კანცეროგენურ აქტივობასაც ავ-ლენს. თავისთავად ბიოსფეროში ისინი აბიოტურ გარდაქმნას გან-იცდიან: იჟანგებიან ფოტოქიმიურად, ურთიერთქმედებენ ჰაერის ჟანგ-ბადთან და წარმოქმნიან აქტიურ რადიკალებს, ან პოლიმერიზდებიან. ამის შედეგად მთელ რიგ შემთხვევაში საწყის პოლუტანტთან შედა-რებით შეიძლება ადგილი ჰქონდეს ბევრად უფრო მაღალ ტოქსიკურ („მეორად დამაბინძურებელ“) ნაერთთა წარმოქმნას. აქედან გამომდი-ნარე ცხადი ხდება, თუ რაოდენ დიდი მნიშვნელობა ენიჭებოდა მწვა-ნე მცენარის ამ განუმეორებელი უნარის გამოვლენასა და შესწავლას.

1975 წელს ინსტიტუტის სამეცნიერო საბჭოს სხდომაზე დევიმ წარმოადგინა 10 წლის კვლევის შედეგი, რომლის ზოგადი არსი მან

შემდეგნაირად ჩამოაყალიბა: მცენარე მნიშვნელოვნად აჯანსაღებს ბიოსფეროს ეკოლოგიურ მდგომარეობას და მკვეთრად ასუსტებს გარემოდან ადამიანისაკენ მიმართულ ქსენობიოტიკთა ნაკადის სიმძლავრეს, აქ პირველად გაუღერდა „მწვანე ფილტრის“ ცნება: მცენარე იმ იშვიათ ეკოლოგიურ ფაქტორს წარმოადგენს, რომელიც გარემოდან (ჰაერიდან, წყლიდან და ნიადაგიდან) ინტენსიურად ითვისებს ქიმიურ დამბინძურებლებს და ორგანიზმისთვის უვნებელ პროდუქტად გარდაქმნის, ანუ ტოქსიკანტის მოლეკულის ნახშირწყალბადატომებს შიდა უჯრედულ მეტაბოლიტებად აქცევს და ამ გზით მათ კვლავ ნივთიერებათა წრებრუნვის ბუნებრივ კალაპოტში აბრუნებს. მოხსენებაში დევიმ დეტალურად განიხილა „მწვანე ფილტრის“ პრაქტიკული რეალიზაციის ღონისძიებათა მთელი კომპლექსი და მათი განხორციელების შედეგად მიღებული ეკოლოგიური ეფექტურობა. ყოველივე ეს მოცემულია დევისა და ბ-ნ სერგის მონოგრაფიაში „ბიოსფეროს ქიმიური გაჭუჭყიანება და მცენარე“ („მეცნიერება“, თბილისი, 1980 წ.).

ამჯერად ყურადღება მინდა გავამახვილო „მწვანე ფილტრის“ თეორიულ ანუ წმინდა ბიოქიმიურ ასპექტზე და ამ შემთხვევაშიც მნიშვნელოვნად მიმაჩნია მონოგრაფიის ავტორთა მიერ წარმოდგენილი ორი პრინციპული ხასიათის დასკვნა:

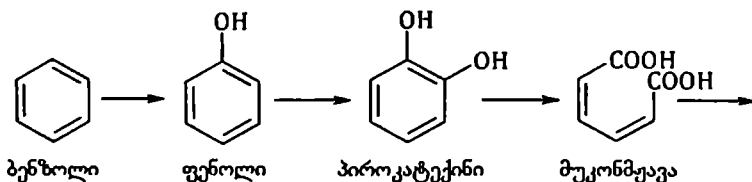
1. მცენარეში „მწვანე ფილტრის“ მექანიზმი ფერმენტულად ხორციელდება და მასში ძირითადი როლი მეტალშემცველ პროტეიდებს აკისრიათ;
2. ქსენობიოტიკთა ბიოდეგრადაციის პირველადი (საწყისი) აქტი ჰიდროქსილირებაა.

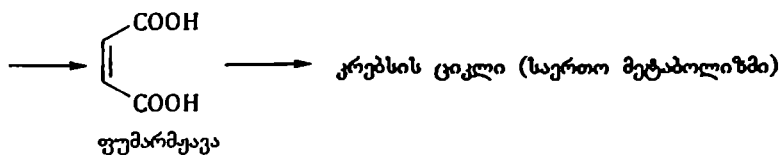
დევისა და ბ-ნ სერგის მომდევნო მონოგრაფიაში [26] რომელიც 1984 წელს გამოიცა, უკვე განხილულია ქსენობიოტიკთა ჰიდროქსილირებაში მონაწილე ფერმენტული სისტემები (გვ. 145-185) და

ხაზგასმითაა ნათქვამი, რომ ამ საკითხზე ჯერჯერობით ერთიანი აზრი არ არსებობს და ყველაზე მისაღებად შეიძლება ჩაითვალოს თვალსაზრისი იმის შესახებ, რომ ცხოველურის ანალოგიურად მცენარეშიც ეგზოგენური სუბსტრატები უჯრედის ენდოპლაზმური რეტიკულუმის მემბრანებში (მიკროსომულ ფრაქციაში) ლოკალიზებული ჰემური რკინის შემცველი ციტოქრომ P450-დამოკიდებული მონოოქსიგენაზებით (ჰემოპროტეიდებით) ჰიდროქსილირდებიან.

ადრინდელი შეხედულებით ითვლებოდა, რომ ცხოველებში ქსენობიოტიკთა ჟანგვითი დეგრადაცია დეტოქსიკაციის ერთ-ერთ, მაგრამ არა ერთადერთ გზას წარმოადგენს, ხოლო ძირითად გზად მაინც კონიუგირება განიხილებოდა. ეს ის პერიოდია, როდესაც ცხოველურ ობიექტებში მონოოქსიგენაზების როლის შესწავლა სიჩქარეს იკრებდა, ხოლო მცენარეში ეს ფერმენტული სისტემა ჯერაც „ჩვილის არტახებში“ იმყოფებოდა. მომდევნო ეტაპზე ცნობილ ფაქტად იქცა, რომ ცხოველებში კონიუგირებისთვისაც მონოოქსიგენირების გზით ქსენობიოტიკის მოლეკულის წინასწარი გააქტივებაა საჭირო და ამ რეაქციას (ფუნქციონალიზაციას) წმინდა ქიმიურის გარდა უაღრესად დიდი ბიოქიმიური დატვირთვაც გააჩნია (დეტალურად მასზე ძირითად ტექსტში გვექნება საუბარი).

მცენარეული ქსოვილის ჰომოგენატებსა და ფერმენტულ პრეპარატებში ბენზოლის არომატული ბირთვი ჰიდროქსილირების გზით შემდეგი თანმიმდევრობით დეტოქსიცირდება:





არომატული ბირთვის ჰიდროქსილირება უმთავრეს რეაქციას წარმოადგენს ფენოქსიმარმჟავას (2,4-D-ს), ბენზ(α)პირენისა და ბენზ(α)ანტრაცენის ჟანგვისას. ამდენად, სრული სიცხადით შეიძლება ითქვას, რომ მცენარეში ქსენობიოტიკის სრული დეგრადაციისთვის ჟანგვით გარდაქმნებს ალტერნატივა არ გააჩნიათ.

ბ-ნი სერგისა და დევის მიერ ნაჩვენები იქნა, რომ მცენარეში წარმოქმნილი ქსენობიოტიკის კონიუგატები ვაკუოლებში კომპარტ-მენტდებიან, ხოლო შემდგომ ტოვებენ მათ და ძირითადად ჟანგვითი გარდაქმნის გზით დეტოქსიცირდებიან [26]. დღევანდელი გადასახედიდან უკვე ნათელი ხდება, რომ ამის მიზეზი უჯრედში შეღწეული ქსენობიოტიკის სიჭარბისადმი მონოოქსიგენაზის ენზიმური სიმძლავრის უკმარისობა შეიძლება იყოს და ვაკუოლებში მათი დროებითი დეპონირება იძულებით ღონისძიებას წარმოადგენს.

ბ-ნი სერგისათვის მეცნიერულ ინტუიციას არც შემდგომში უღალატია, როდესაც მან შეუმცდარად განსაზღვრა, რომ „მწვანე ფილტრის“ მომავალი თეორიული კვლევა მცენარეულ უჯრედში ქსენობიოტიკთა მონოოქსიგენაზური (მიკროსომული) ჟანგვის მიმართულებით უნდა გაღრმავებულიყო. ამასთან დაკავშირებით, საჭიროდ ეთვლი ერთი ქრონოლოგიურად საინტერესო დეტალი გავიხსენო: დევის საანგარიშო მოხსენებამდე ერთი წლით ადრე, ანუ 1974 წელს ბ-ნმა სერგიმ დამიძახა და ყოველგვარი ახსნა-განმარტების გარეშე მითხრა რომ დამეჩქარებინა ჩემი დისერტაციის დაცვის საქმე, რადგან მცენარეული ჰიდროქსილაზების (მონოოქსიგენაზების

ადრინდელი სახელწოდების) კვლევითი ლაბორატორიის გახსნას და ხელმძღვანელად ჩემს დანიშვნას აპირებდა. ვფიქრობ ეს გადაწყვეტილება მან იმის გამო მიიღო, რომ ჩემი საკვალიფიკაციო თემა ბიოლოგიურ ჟანგვას ეხებოდა და ფერმენტ-ოქსიდაზებთან მუშაობის გარკვეული გამოცდილება გამაჩნდა. ბ-ნი სერგის გარდაცვალების შემდეგ (1989 წ.) მისი პირადი ბიბლიოთეკა ოჯახიდან ინსტიტუტში გადმოგვქონდა და მე სრულიად შემთხვევით ხელში მომხვდა იმ დროისათვის ჩემთვის უკვე კარგად ცნობილი 1975 წელს გამოცემული აკადემიკოს ა. არჩაკოვის შესანიშნავი მონოგრაფია [14], რომელიც ძირითადად ცხოველის ღვიძლის მიკროსოპულ ჟანგვას ასახავს. ბ-ნი სერგის მიერ ეს წიგნი ჩვეულებისამებრ საფუძვლიანად იყო დამუშავებული (წიგნის კიდეებზე შენიშვნებით), ხოლო თავ-ფურცელზე ჰქონდა გაკეთებული მინაწერი:

მისი მიზანშეწონილია
დასაბუთო და დასაბუთო

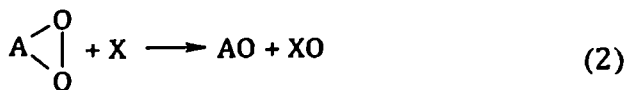
ეს მინაწერი აშკარად მიუთითებს როგორც ახალი ლაბორატორიის შექმნის აუცილებლობაზე, ასევე მისი მომავალი კვლევის ზუსტ მიმართულებაზე. როგორც ჩანს, ამ წიგნმა დააჩქარებინა ბ-ნ სერგის თავისი გადაწყვეტილების სასწრაფოდ სისრულეში მოყვანა. სათქმელი გასაგებად ვთქვი და განმარტებას არ საჭიროებს. დღეს მცენარეთა ქსენობიოქიმიის სასწავლო კურსს [132] „მწვანე ფილტრისა“ და „მიკროსოპული ჟანგვის“ ორი შეუცვლელი თავი ამშვენებს.

სადღეისოდ ვითარება საგრძნობლადაა შეცვლილი. ქვეყანაში შექმნილმა ცხოვრების პირობებმა ლაბორატორია იძულებული გახადა

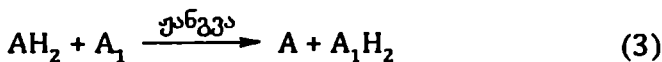
ფუნდამენტური გამოკვლევების ხარჯზე გამოყენებითი ბიოქიმიისათვის დაეთმო დრო და ადგილი. წინა პლანზე წამოიწია საგრანტო პროექტებზე მუშაობამ. მხედველობაში მაქვს ფიტორემედიაციული ტექნოლოგიები ანუ არსებული მეთოდების სრულყოფა და ახლის შექმნა. ტერმინი „ფიტორემედიაცია“ მცენარის საშუალებით გარემოზე მიყენებული ქიმიური ზარალის აღმოფხვრას გულისხმობს. გასაგებია, რომ ამ მიმართულებით კვლევაც მწვანე ფილტრისა და ქსენობიოტიკთა მიკროსოპული ჟანგვის თეორიულ პრინციპებს ეფუძნება. ამიტომ გასაკვირი სულაც არაა, რომ ამ მიმართულებით მუშაობას წარმატებით ართმევენ თავს ლაბორატორიის თანამშრომლები თამარ ვარაზი, მარიცა ყურაშვილი, მარინა ფრუიძე, გია ადამია და გია გიგოლაშვილი. საქმეს სათავეში უდგას ლაბორატორიაში აღზრდილი შესანიშნავი მკვლევარი გია ხატისაშვილი, რომელმაც 2009 წლიდან ხელმძღვანელის თანამდებობაზე შემცვალა. წლების განმავლობაში მან შეძლო მნიშვნელოვნად აემაღლებინა ჩვენი კვლევის როგორც თეორიული, ასე მეთოდური მხარე.

1. ბიოლოგიური ჟანგვის მოკლე ისტორიული მიმოხილვა და ოქსიგენაზების თანამედროვე კლასიფიკაცია

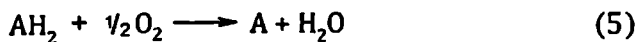
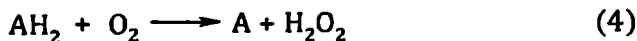
ბიოლოგიურ ჟანგვაზე, ანუ ქსოვილოვან სუნთქვაზე წარმოდგენების განვითარებას საუკუნეზე მეტი ხნის ისტორია გააჩნია. იგი აღსავსეა მრავალი წინააღმდეგობრივი და ზოგჯერ ურთიერთგამომრიცხავი თეორიებითაც კი. როგორც დამოუკიდებელი მეცნიერული მიმართულება იგი თავის სათავეს მეთვრამეტე საუკუნის ბოლოდან იღებს და ისეთ კორიფეთა სახელებს უკავშირდება როგორიც ა. ლავუაზიე და პ. ლაპლასია. 1789 წელს მათ პირველებმა შექმნეს აბსოლუტურად სწორი წარმოდგენები სუნთქვაზე, როგორც ორგანიზმში საკვებ ნივთიერებათა შენელებულ წვაზე, რომლის დროსაც შთანთქმული ჟანგბადი შაქრისა და ცხიმების ნახშირბადატომებს CO_2 -მდე, ხოლო წყალბადის ატომებს H_2O -მდე ჟანგავს. თითქმის ნახევარ საუკუნეზე მეტი ხნის შემდეგ 1845 წელს პ. შენბაინმა ჩამოაყალიბა ბიოლოგიურ ჟანგვაზე როგორც კატალიზურ პროცესზე და მისი წარმართვისათვის ჟანგბადით გააქტიურებით აუცილებლობაზე პირველი წარმოდგენა. მეცხრამეტე საუკუნის ბოლოს (1896 წ.) გ. ბერტრანმა აჩვენა რომ ცოცხალი ორგანიზმები შეიცავენ უამრავ ფერმენტს (მან ამ ფერმენტებს ოქსიდაზები უწოდა), რომლებიც მოლეკულურ ჟანგბადს ააქტივებენ და შემდგომ სუბსტრატს აჟანგვინებენ. ამავე პერიოდში გამოჩენილი რუსი მეცნიერის ა. ბახისა [1, 2] და გერმანელი მკვლევარების კ. ენგლერის და პ. ვილანდის [3] მიერ შემუშავებული იქნა თეორია რომლის თანახმადაც მოლეკულური ჟანგბადი რეაგირებს A-აქცეპტორთან და ორგანულ პეროქსიდს (ზეჟანგს) წარმოქმნის, ხოლო ეს უკანასკნელი სუბსტრატს (X-ს) შესაბამის ოქსიდად გარდაქმნის:



გასული საუკუნის 30-იან წლებში პ. ვილანდისა [4, 5] და გ. პალადინის [6] გამოკვლევათა საფუძველზე შეიქმნა სრულიად ახალი და პრინციპულად განსხვავებული წარმოდგენა, რომლის თანახმად ბიოლოგიურ ჟანგვაში ჟანგბადი შეიძლება საერთოდ არც მონაწილეობდეს და ეს პროცესი სუბსტრატის ფერმენტული დეჰიდრირების ანუ მისგან წყალბადის მოცილების შედეგი იყოს. ახალი თეორიის თანახმად ბიოლოგიური ჟანგვა ნიშნავს წყალბადის ატომის გადატანას დასაჟანგი სუბსტრატიდან (პროტონების დონორიდან) A_1 აქცეპტორზე:



მოლეკულური ჟანგბადი უჯრედში ელექტრონთა ერთ-ერთ შესაძლო აქცეპტორის კერძო შემთხვევას წარმოადგენს:



ადრინდელი თეორიებისაგან განსხვავებით ამ ახალი თეორიის არსი იმაში მდგომარეობს რომ მოლეკულური ჟანგბადი არასოდეს არ ერთვება დასაჟანგ სუბსტრატში და იგი მხოლოდ წყალბადის პეროქსიდის (როდესაც O_2 ორ ელექტრონს იერთებს) ან წყლის წარმოსაქმნელად (თუ იგი ოთხ ელექტრონს იძენს) გამოიყენება. ამ შემთხვევაში ფერმენტი ოქსიდაზები დეჰიდროგენაზების განსაკუთრებულ

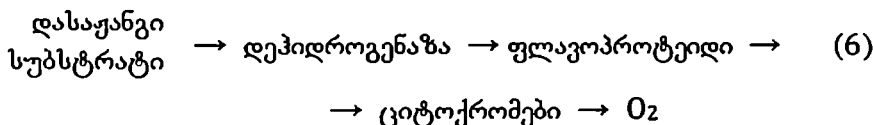
კლასად განიხილებიან, რომლებიც O_2 -ს მხოლოდ წყალბადის აქცეპტორად იყენებენ. ამ ახალი თეორიის შემოქმედთა დიდმა მეცნიერულმა ავტორიტეტმა და მოტოქონდრიული ჟანგვის სფეროში კვლევების თავებრუდამხვევმა განვითარებამ მეოცე საუკუნის 60-იან წლებამდე თეორიის სრული ბატონობა განაპირობა. მასში პირველი დიდი ბზარი გააჩინა იაპონელი მკვლევარის ო. ხაიაშისა და თანაავტ. [7], აგრეთვე მეცნიერების გ. მასონისა და თანაავტ. [8] ერთმანეთისაგან დამოუკიდებლად მიღებულმა კვლევის შედეგებმა. კატექოლებისა და ფენოლების ჟანგვის შესწავლით, როდესაც ისინი ამ მიზნით $^{18}O_2$ -ს იყენებდნენ, სავსებით სარწმუნოდ აჩვენეს, რომ ჟანგვის პროდუქტებში ^{18}O -ის ჩართვა აბსოლუტურად ჟანგბადიდან (როგორც ამას ბახინგლერის თეორია თვლის) და არა წყლიდან (როგორც ვილანდ-პალადინის წარმოდგენითა) ხდება.

მოლეკულური ჟანგბადის ფიქსაციის ფაქტი შემდგომში მრავალჯერად იქნა დადასტურებული და გასული საუკუნის 60-იანი წლებიდან ოქსიგენაზურმა თეორიამ კვლავ მოიპოვა დამსახურებული აღიარება.

პირიდინუკლეოტიდების აღმოჩენამ და მათი სტრუქტურის დადგენამ, აგრეთვე დეჰიდროგენაზებთან მათმა ორგანულმა კავშირმა ო. ვარბერგს [9] საშუალება მისცა მთელი სიცხადით გაეცნობიერებინა სუნთქვაში ჟანგბადის გადამწყვეტი როლი და ექსპერიმენტულად დაედასტურებინა რომ უჯრედის ჟანგბადით უზრუნველყოფა თუ სრულიად არა, მნიშვნელოვანწილად მაინც რკინა(ჰემ)-შემცველი ცილებით, ე.წ. „სუნთქვის ენზიმებით“ (ჰემოპროტეიდებით) ხორციელდება. მათი აქტივობები ეფექტურად ითრგუნება ციანიდითა და ნახშირბადის მონოოქსიდით. ვარბერგის თეორია პრინციპში ბახის ჰიპოთეზას შეესაბამება.

ფლავოპროტეინების ფუნქციური როლის შესწავლით აღმოჩნდა,

რომ ელექტრონთა გადატანისას ისინი პირიდინნუკლეოტიდებსა და ციტოქრომულ კომპონენტებს შორის მედიატორის (შუამავლის) როლს ასრულებენ. ამ მონაცემთა საფუძველზე დადგინდა საწყისი ღონორიდან (დასაჟანგი სუბსტრატებიდან) ტერმინალურ (საბოლოო) აქცეპტორამდე (მოლეკულურ ჟანგბადამდე) ელექტრონთა სატრანსპორტო გზის (ე.წ. სუნთქვითი ჯაჭვის) ზუსტი თანამიმდევრობა:



ამგვარად, დეჰიდროგენაზებით სუბსტრატთა აქტივაციისა და სუნთქვითი ფერმენტებით ჟანგბადის აქტივაციის თეორიათა ერთმანეთთან შერწყმამ მათი შემდგომი „შეიღობიანი თანაარსებობა“ განაპირობა.

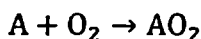
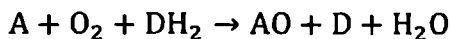
სადღეისოდ ოქსიგენაზების ორ ძირითად ტიპს არჩევენ. ესენია მონო- და დიოქსიგენაზები. მონოოქსიგენაზები დასაჟანგ სუბსტრატში მოლეკულური ჟანგბადის მხოლოდ ერთ ატომს ნერგავენ, მეორეს კი წყლამდე აღადგენენ (რედუცირებენ). დიოქსიგენაზები სუბსტრატში ჟანგბადის ორივე ატომის ჩართვას ახორციელებენ. ოქსიგენაზების თანამედროვე კლასიფიკაცია, რომელიც ო. ზაიაშისა და თანაავტ. [10] მიერაა შემუშავებული, ასე გამოიყურება:

მონოოქსიგენაზები:

დიოქსიგენაზები:

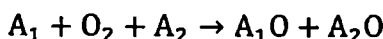
გარეგანი

შიდამოლეკულური



შინაგანი

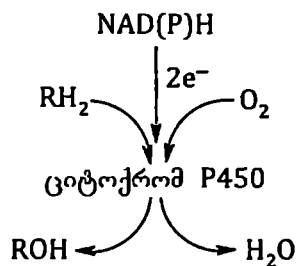
მოლეკულათშორისი



წარმოდგენილი კლასიფიკაციიდან ვხედავთ, რომ მონოოქსიგენაზები ორ კლასად იყოფიან: ფერმენტებად, რომლებიც ჟანგბადზე ელექტრონთა გადასატანად გარე ელექტრონულ დონორს საჭიროებენ (გარეგანი მონოოქსიგენაზები) და ფერმენტებად, რომლებიც გარე რედოქს-ექვივალენტებს (ელექტრონებს) არ ითხოვენ და მათ თვით დასაჟანგი სუბსტრატიდან იღებენ (შინაგანი მონოოქსიგენაზები). დიოქსიგენაზების ორი ქვეკლასი ერთმანეთისაგან იმით განსხვავდება რომ პირველები (შიდამოლეკულური დიოქსიგენაზები) ჟანგბადის ორივე ატომს უშუალოდ სუბსტრატის ერთ მოლეკულას უერთებენ, ხოლო მეორენი (მოლეკულათშორისი დიოქსიგენაზები) მოლეკულური ჟანგბადის ატომებს ორ დასაჟანგ სუბსტრატს შორის ანაწილებენ.

2. ციტოქრომ P450 და მიკროსომების მონოოქსიგენაზური რედოქს-ჯაჭვი

1958 წელს მ. კლინგენბერგმა [11] და დ. გარფინკელმა [12] თითქმის ერთდროულად და ერთმანეთისგან დამოუკიდებლად ცხოველის ღვიძლში გამოავლინეს ჰემოპროტეინი, რომელიც მოგვიანებით (1964 წ.) დეტალურად იაპონელმა მეცნიერებმა ტ. ომურამ და რ. სატომ [13] შეისწავლეს. აღმოჩნდა, რომ ეს რკინის იონის შემცველი ცილა CO-დაკავშირებულ მდგომარეობაში დითიონიტით აღდგენისას შთანთქმის მაქსიმუმს 450 ნმ-ზე იძლევა. აქედან წარმოდგება კიდევ მისი პირობითი სახელწოდება „ციტოქრომი P450“. იგი ტიპური გარეგანი მონოოქსიგენაზაა და დამატებით ელექტრონულ დონორებად აღდგენილ პირიდინოქლორეიდებს (NADH-ს, NADPH-ს ან ორივეს ერთად NAD(P)H-ს) საჭიროებს. მისი მოქმედების ზოგადი მექანიზმი შეიძლება ასე წარმოვიდგინოთ (ნახ. 1):



ნახ. 1. ციტოქრომ P450-ის მოქმედების ზოგადი მექანიზმი [14].

ჰემოპროტეინი იკავშირებს დასაჟანგ სუბსტრატს (RH_2 -ს) მოლეკულურ ჟანგბადს (O_2 -ს) და ორ ელექტრონს (e^- -ს). ჟანგბადის ერთი ატომი სუბსტრატში ინერგება, ანუ მის მოლეკულაში ჰიდროქსიდის ფუნქციური ჯგუფის (OH -ის) წარმოქმნას ხმარდება, ხოლო მეორე ატომი წყლის წარმოქმნაზე იხარჯება. ელექტრონების დონორს ამ შემთხვევაში $NADP(H)$ -რედუქტაზები (ანუ ფლავოპროტეინი-FP₁ E.N. 1.6.2.1 და ფლავოპროტეინი-FP₂ E.N. 1.6.2.4) წარმოადგენენ.

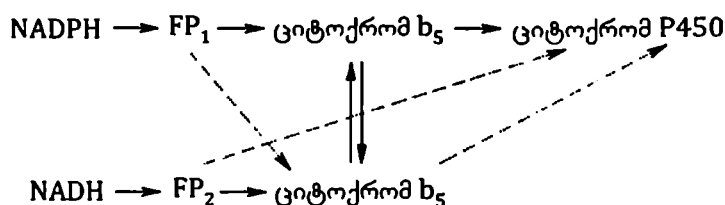
გარეგანი მონოოქსიგენაზების განმარტებიდან გამომდინარე, ციტოქრომ P450-ით კატალიზებულ ზოგად რეაქციას შემდეგი სახე აქვს:



ნახ. 1-დან ჩანს, რომ კატალიზური აქტის შესასრულებლად აუცილებელია ელექტრონთა დონორის გარდა ჰემოპროტეიდზე მათი შუალედი გადამტანის არსებობაც, ეს იმას ნიშნავს, რომ მიკროსომული ციტოქრომ 450-შემცველი მონოოქსიგენაზა სამკომპონენტო სისტემას, ანუ მულტიფერმენტულ კომპლექსს წარმოადგენს. მასში $NADPH$ -რედუქტაზა (FP₁), ციტოქრომ b₅ და ტერმინალურ კომპონენტად თვით ციტოქრომ P450 შედიან. ისინი აღდგენილი პირიდინოქლოტიდიდან ელექტრონთა გადატანით თავისუფალ, ანუ ე.წ. არაშეუღლებულ სატრანსპორტო გზას ქმნიან, „არაშეუღლებული ჟანგვის“ ცნება აქ იმისათვის გამოიყენება, რომ განასხვავონ ენერ-

გიის გენერირებასთან შეუღლებული (მიტოქონდრიული) სუნთქვითი ჯაჭვისაგან. ამ მიკროსომულ რედოქს-ჯაჭვს ენერგეტიკულის ნაცვლად პლასტიკური (ნივთიერი ცვლის) ფუნქცია აკისრია.

მიკროსომაში არსებულ მეორე, NADH-დამოკიდებულ რედოქს-ჯაჭვში შესაბამისი რედუქტაზის (FP₂-ის) მომდევნო შუალედი გადამტანის ბუნება კარგა ხნის მანძილზე უცნობი რჩებოდა; ამიტომ მას x-ით აღნიშნავდნენ. 1973-74 წლებში აკადემიკოს ა. არჩაკოვის [15-17] ლაბორატორიაში სარწმუნოდ იქნა ნაჩვენები, რომ მიკროსომებში ციტოქრომ b₅-ის ორი ქვეფრაქცია ფუნქციონირებს და ამდენად ჟანგვის NADH-ჯაჭვში ელექტრონების შესაძლო გადამტანად ციტოქრომ b₅-ის ერთ-ერთი ქვეფრაქცია უნდა იყოს. მისი რაოდენობრივი შემცველობა მთლიანი შიდაუჯვრედული ციტოქრომ b₅-ის ფონდის ~30%-ს აღწევს. აღმოჩნდა ისიც, რომ ამ ციტოქრომ b₅-ს ერთდროულად NAD(P)H-ის ჟანგვის უნარი აქვს, და ამგვარად ორივე NAD(P)H-შემცველი სატრანსპორტო გზა მძლავრი აუტოოქსიდაბელური ტერმინალური აქცეპტორით, - ციტოქრომ P450-ით მთავრდება (ნახ. 2).



ნახ. 2. მიკროსომული NAD(P)H-შემცველი რედოქს-ჯაჭვები უწყვეტი ისრებით ნაჩვენებია მათ შორის ელექტრონთა ყველაზე სააღბათო მიგრაციის გზები [17].

ჰიდროქსილირების პროცესის მთლიანი კატალიზური დატვირთვა ციტოქრომ P450-ზე მოდის, ე.ი. ეს ჰემოპროტეიდი მონოოქსიგენა-

ზური კომპლექსის ერთგვარი აქტიური ცენტრის მოვალეობას ასრულებს, ხოლო მის მიმართ ტერმინ „ციტოქრომის“ გამოყენება რამდენადმე უმართებულოა, რადგან ციტოქრომების უძირითადეს ფუნქციას ელექტრონთა ტრანსპორტი და არა სუბსტრატის ოქსიგენირების რეაქციის კატალიზებაა.

3. ორგანული ქსენობიოტიკები, – ციტოქრომ P450-ის ჟანგვის სუბსტრატები

ქსენობიოტიკები, ანუ უცხო წარმოშობის ნივთიერებები (ბერძნ. „ქსენოს“ – უცხო, „ბიოს“ – სიცოცხლე) ნორმალურად მოფუნქციონირე უჯრედში არ გვხვდებიან და ისინი ორგანიზმში თვითნებურად (შემთხვევით) ან თვით ადამიანის მიზანმიმართული ქმედების შედეგად აღწევენ. წარმოშობის მიხედვით მათ სამ ჯგუფად ყოფენ: 1. ადამიანის სამეურნეო მოღვაწეობის (მრეწველობის, სოფლის მეურნეობის, ტრანსპორტის და ა.შ.) პროდუქტებად; 2. საყოფაცხოვრებო ქიმიის (ლაქ-საღებავების, გამრეცხი, გამხსნელი, პარფიუმერული, საკვები დანამატების, პარაზიტებთან ბრძოლის საშუალებების და ა.შ.) და 3. სამკურნალწამლო (ფარმაცევტულ) პრეპარატებად.

ბიოსფეროში ქსენობიოტიკების კონცენტრაციათა კატასტროფულმა ზრდამ, განსაკუთრებით XIX საუკუნის მეორე ნახევრიდან მთელი XX საუკუნის მანძილზე, სერიოზული პრობლემები შეუქმნა ადამიანთა არამარტო ჯანმრთელობას, არამედ საერთოდ ჩვენი მოდგმის არსებობას. ვერ ვიტყვით, რომ შექმნილ სიტუაციას ცოცხალი უჯრედი შეძლებისდაგვარად მობილიზებული არ დახვდა. მასში თავიდანვე მოქმდება დაიწყო უცხო წარმოშობის აგენტთა წინააღმდეგ ბრძოლის ეფექტურმა და მოქნილმა მექანიზმებმა, რომლებსაც შიდა-უჯრედული მეტაბოლიზმის ნორმალურ კალაპოტში მათ ჩართვას

აიძულებდა. შესაბამის გარდაქმნათა ჯაჭვი როგორც წესი ქსენობიოტიკთა ბიოქიმიური აქტივობის დაქვეითებისაკენ (დეზაქტივაციისკენ) იყო მიმართული, ხოლო ტოქსიკურ ნაერთთა შემთხვევაში მათი ბიოდეგრადაცია გაუვნებლობას (დეტოქსიკაციას) ითვალისწინებდა. ორივე შემთხვევაში ცენტრალური პოზიცია ციტოქრომ P450-შემცველ მონოოქსიგენაზას ეკავა. მთელი პასუხისმგებლობით შეიძლება ითქვას, რომ სუბსტრატთა მრავალფეროვნებით არცერთ ფერმენტულ სისტემას არ ძალუძს ამ მონოოქსიგენაზასთან კონკურირება და ეს უპირატესობა მის უაღრესად დაბალ სუბსტრატულ სპეციფიკურობაში მდგომარეობს.

ევოლუციური თვალთახედვით მეტად საინტერესოა ციტოქრომ P450-ის ბედი. საეჭვო არაა, რომ გენეზისითა და ასაკით იგი პლანეტაზე ცოცხალი ორგანიზმების გაჩენასთანაა უშუალოდ დაკავშირებული. მარტივი მიზეზის გამო მის კატალიზურ ფუნქციაში სულაც არ შედიოდა დეტოქსიკაციურ პროცესებში მონაწილეობა. ამ დროისათვის ქსენობიოტიკები საერთოდ არ არსებობდნენ. მოსახლეობის სიმცირე და დასახლების მეჩხერიანობა საწარმოო ძალებისა და საწარმოო ურთიერთობათა დაბალი დონე გარემოს ქიმიური სისუფთავის გარანტიას ქმნიდა. ამასთან, წარმოქმნილი უცხო ნაერთების უაღრესად მიზერული კონცენტრაციები ბიოსფეროში ძლიერ განზავებასაც განიცდიდნენ, და ამდენად ორგანიზმთა საცხოვრისი ეკოლოგიურად სუფთა რჩებოდა. ცხადია, ამ პერიოდში და ასეთ სიტუაციაში ციტოქრომ P450-ის ფუნქცია გაცილებით „ჰუმანური“ უნდა ყოფილიყო. მართლაც, იგი ძირითადად შიდა უჯრედულ „ენდოგენურ“ მეტაბოლურ გზებს „აწესრიგებდა“: მონაწილეობდა უამრავ ბუნებრივ ნაერთთა კატაბოლურ გარდაქმნებსა და ბიოსინთეზებში. ცხოველურ ორგანიზმებში იგი ჩართული იყო სტეროიდების, პროსტაგლანდინების, ნაღვლის მჟავების, უჯერი და ნაჯერი ცხიმ-

მჟავების და სხვ. ჟანგვაში. მცენარეში იგი ეფექტურად აზორციელებდა ფენოლური ნაერთების, გიბერელინების, ალკალოიდების ბიოსინთეზებს და აკონტროლებდა აზოტფიქსაციას [18].

ქსენობიოტიკებით გარემოს „გამდიდრებაში“ უჯრედის შიდა „მეურნეობაში“ გარკვეული ადაპტური ხასიათის ცვლილებები და შესაბამისი კორექტივების განხორციელება განაპირობა; მიზანი ერთი იყო: შიდაუჯრედული მეტაბოლიზმის საერთო კალაპოტში უცხო ნაერთთა იძულებითი „ჩაჯენა“. ჩვენი აზრით ეს პრობლემა უმტკივნეულოდ მოსაგვარებელი შეიქმნა, რადგან ამ შემთხვევაში ორი მეტად მნიშვნელოვანი ფაქტორი შეერწყა ერთმანეთს: მოქმედებაში მოვიდა „ხელისა და ხელთათმანის“, ანუ ფერმენტისა და სუბსტრატის მოლეკულათა ურთიერთქმედი ჯგუფების ერთმანეთისადმი „მორგების“ პრინციპი და თვით ციტოქრომ P450-ის კატალიზური მოქმედების სპეციფიკა. ამჟამად ეს ორი ფაქტორი უჯრედში სრული ნაცვალებით ურთიერთობს.

მოკლედ განვიხილოთ ამ მოვლენის არსი.

ორგანულ ქსენობიოტიკთა დიდი უმრავლესობა (~98%) არაპოლარულ, ჰიდროფობურ (წყალში უხსნად) ნივთიერებებს მიეკუთვნება. სამაგიეროდ ისინი კარგად იხსნებიან ცხიმებში, ანუ ლიპოფილურები არიან. ამ თვისების გამო ისინი ორგანიზმში ძირითადად ბიომემბრანებსა (ფოსფოლიპიდური შემაღგენლობის ორგანელთა) და ცხიმოვან ნივთიერებათა მოლეკულების ჰიდროფობურ უბნებში კონცენტრირდებიან. ფიზიოლოგიური მდგომარეობის ცვლილებისას (ორსულობისას, შიმშილობისას, სტრესული სიტუაციებისას და ა.შ.) ცხიმები დაშლას განიცდიან და მათთან ერთად ქსენობიოტიკები სისხლში იწყებენ გამოსვლას და თავის უარყოფით ეფექტებს ავლენენ. (ამიტომ უნდა გავითვალისწინოთ, თუ რაოდენ საფრთხის შემცველია ორგანიზმის სწრაფი გახდომის ყოველგვარი მცდელობა და ღიეტისას წონაში უზომო კლება!)

უჯრედში მოხვედრილი ქსენობიოტიკის მეტაბოლიზებისათვის აუცილებელია მისი წინასწარი გააქტივება ანუ ლიპოფილური მოლეკულის ქიმიური ინერტულობის დაძლევა და ჰიდროფილურ ნივთიერებად მისი გარდაქმნა, რადგან ფერმენტი-ოქსიდაზები, რომლებიც მათ ჟანგვით დეტოქსიკაციას ახორციელებენ უპირატესად წყლოვან ფაზაში ფუნქციონირებენ. ჰიდროფილურობის გაზრდა ტოქსიკანტის მოლეკულაში რომელიმე პოლარული ჯგუფის (კარბოქსოლის, ეპოქსიდის, ან ყველაზე ხშირად ჰიდროქსიდის) ჩანერგვით ან წარმოქმნით შეიძლება იქნას მიღწეული. ეს რეაქცია (ფუნქციონალიზაცია) მაღალი აქტივაციის ენერგიით ხასიათდება. შემდგომი გარდაქმნისადმი უცხო ნაერთის მოლეკულა ოქსიდაზებისთვის გაცილებით ადვილწვდომადი („დამყოლი“) ხდება.

რაში მდგომარეობს ამ თითქოსდა „უმნიშვნელო“ რეაქციის დიდი ბიოქიმიური აზრი? ნათქვამიდან ცხადი ხდება, რომ

1. რაც უფრო სწრაფად განხორციელდება უჯრედში შეღწეული ქსენობიოტიკის ფუნქციონალიზაცია, მით უფრო დაჩქარდება მისი შემდგომი სრული დეგრადაცია;
2. ფუნქციონალიზაცია ქსენობიოტიკ-ტოქსიკანტის გაუვნებლობის რთული პროცესის სიჩქარემაღლიმიტირებელი (სიჩქარის განმსაზღვრელი) ფაზაა და ამიტომ სრული დეტოქსიკაციის რეგულირებაც ამ რეაქციის ენერგეტიკული ბარიერის დაძლევის დონეზე უნდა ხორციელდებოდეს [19, 20].

თავისი დადებითი როლის მიუხედავად არ შეიძლება არ აღინიშნოს ფუნქციონალიზაციის (ჰიდროქსილირების) გარკვეული ნაკლიც. შესავალ ნაწილში აღვნიშნეთ, რომ გარდაქმნისას ქსენობიოტიკის ტოქსიკურობა შეიძლება გაიზარდოს კიდევ („მეორადი დაბინძურება“). მაგალითად, საერთო ნარკოზისათვის საუკეთესო საშუალება ქლოროფორმი ორგანიზმისათვის უადრესად საშიშ საბრძოლო საშუ-

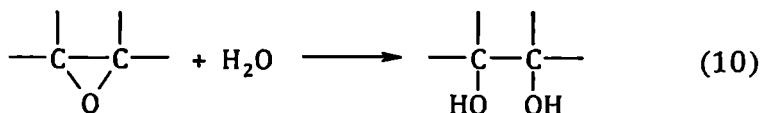
აღებად გარდაქმნას განიცდის ($\text{CHCl}_3 \rightarrow \text{CCl}_2\text{C}=\text{O}$). ამიტომაც ქლოროფორმი მაღალტოქსიკური; პოლიციკლური არომატული ნახშირწყალბადი ბენზ(α)პირენი, რომელიც პროკანცეროგენს წარმოადგენს, ფუნქციონალიზაციის შედეგად ძლიერ კანცეროგენურ – დიჰიდროეპოქსიდს იძლევა; პოპულარული ტკივილგამაყუჩებელი და სიცხის დამწევი პრეპარატი პარაცეტამოლი წარმოქმნის მეტაბოლიტს, რომელიც მაღალი დოზებისას ღვიძლსა და თირკმელს აზიანებს [21]. ამდენად ამ ორგანოთა დაავადებისას აღნიშნული პრეპარატის გამოყენება მეტად მოსაფრთხილებელია.

ნაკლისაგან არც დეტოქსიკაციის პროცესის მომდევნო კონიუგაციის ფაზაა დაზღვეული. ფაქტიურად ეს ფაზა ფუნქციონალიზაციის სტადიას აგრძელებს, რაც ქსენობიოტიკთა ჰიდროფილურობის გაზრდასა და ტოქსიკურობის დაქვეითებაში მდგომარეობს. მასში მონაწილე ფერმენტები ტრანსფერაზების კლასს მიეკუთვნებიან. განსაკუთრებით ფართოდაა გავრცელებული და მრავალფეროვანია გლუტათიონტრანსფერაზების ოჯახობის წარმომადგენლები. ძირითადი რეაქცია აღდგენილ გლუტათიონთან (GSH-თან) კონიუგირებაა, რომელიც ორ ვარიანტად შეიძლება ხორციელდებოდეს: 1. GSH-ის მთლიან მოლეკულასთან სუბსტრატის (ქსენობიოტიკის) მიერთებით, ან 2. ქსენობიოტიკთა ნახშირბადის, აზოტის, გოგირდის, ფოსფორის ელექტროფილურ ატომებთან ნუკლეოფილური ჩანაცვლებით:



გლუტათიონური კონიუგატების შემდგომი მეტაბოლიზმი მერკაპტურმჟავას ან მერკაპტანების წარმოქმნაში გადადის. გლუტათიონტრანსფერაზები ორგანული ჰიდროპეროქსიდების სპირტებად აღდგენისა და სტეროლების ან პროსტაგლანდინების იზომერიზაციასაც

აკატალიზებენ [21-25]. კონიუგაციის ფაზას მიეკუთვნება აგრეთვე ფერმენტი ეპოქსიდჰიდროლაზა, რომელიც ბენზ(α)პირენის, ბენზოლის და სხვა ეპოქსიდებს წყალს უერთებს დიოლების წარმოქმნით [23]:



კონიუგაციის ფაზის ფერმენტთა მოქმედება იმითაა შეზღუდული, რომ ისინი მხოლოდ იმ ნივთიერებებს ამეტაბოლიზებენ, რომელთაც ფუნქციონალიზაცია უკვე გავლილი აქვთ. მათი ღირსება იმაში მდგომარეობს, რომ აგრძელებენ ან ამთავრებენ დეტოქსიკაციას, ხოლო ზოგიერთ შემთხვევაში პირველ – ფუნქციონალიზაციის ფაზაში დაშვებულ „შეცდომებსაც“ ასწორებენ. კონიუგირების არსებითი ნაკლი იმაშია, რომ ამ დროს ქსენობიოტიკებთან რეაქციაში შედიან და „იბოჭებიან“ უჯრედისათვის განსაკუთრებით მნიშვნელოვანი ისეთი ნივთიერებები, როგორიც ამინომჟავები, პეპტიდები, ცილები, კარბონმჟავები და სხვ. არიან [26], ანუ კონიუგაცია უჯრედში ამ ნივთიერებათა საგრძნობ დეფიციტს ქმნის ყველა შესაძლო მოსალოდნელი უარყოფითი შედეგით.

დეტოქსიკაციის ორივე ფაზა (ფუნქციონალიზაცია და კონიუგაცია) ქსენობიოტიკის მოლეკულის ჰიდროფობურობის დაძლევის ემსახურება. უცხო ნივთიერებათა სრულიად განსხვავებული ქიმიური აღნაგობის მიუხედავად, ჟანგვით გარდაქმნებში გადამწყვეტი როლი მიკროსომულ ციტოქრომ P450-შემცველ სისტემას ეკისრება. იგი რეაქციათა ფართო წრეს მოიცავს, მაგრამ ყველა ისინი ერთ ზოგად მექანიზმზე დაიყვანება და მისი არსი ჰიდროქსილირებაა [27]. ეს რეაქციებია ძირითადად:

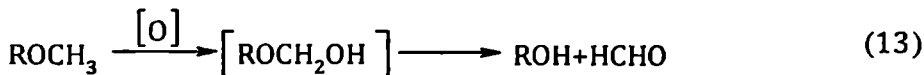
არომატული ჰიდროქსილირება:



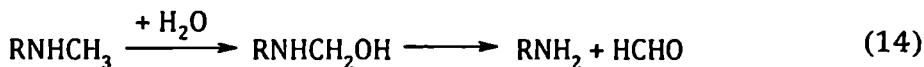
აცთვური ჟანგვა:



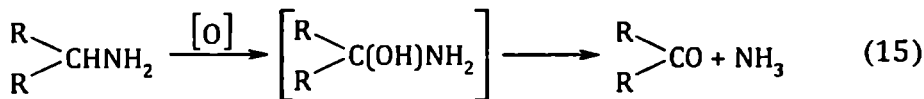
O-დეჰალკილირება:



N-დეჰალკილირება:



N-დეჰამინირება:

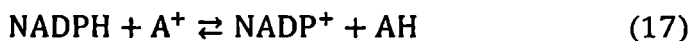


სულფოჟანგვა:



ჰიდროქსილირების ყველა ჩამოთვლილი რეაქცია NADPH-სა და O₂-ს საჭიროებს. იმის გამო, რომ უცხო ნივთიერებების მოლეკულაში წარმოქმნილი ჰიდროქსილის ჯგუფის ჟანგბადი მოლეკულური ჟანგბადიდან და არა წყლიდანაა აღებული, ამიტომ ქსენობიოტიკის მიკროსომული ჟანგვა თვით NADPH-ის ჟანგვის შესაბამისად ხორციელდება. ამ ვითარებაში კი დეტოქსიკაციასა და უჯრედში მიმდინარე NADPH-დამოკიდებულ „ენდოგენურ“ პროცესებს შორის კონკურენტული ინჰიბირება უნდა ვლინდებოდეს.

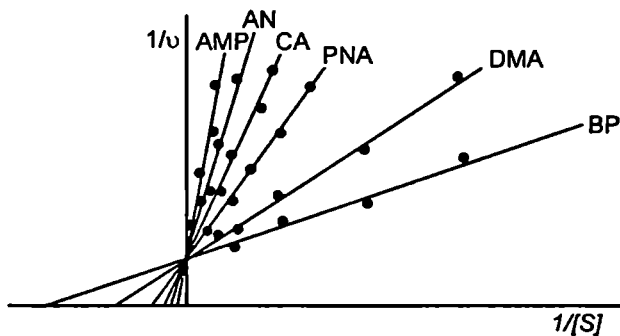
ჩვენი გამოკვლევებით [28, 29] ნაჩვენებია იქნა, რომ აქტიური მონოოქსიგენაზური სისტემის მქონე მიკროსომულ ფრაქციაში ქსენობიოტიკების ჟანგვასთან შეუღლებული NADPH-ის ჟანგვის სიჩქარე მისი თავისუფალი ჟანგვის სიჩქარესთან შედარებით ყოველთვის მაღალია. ამასთან, ამ კოფერმენტის ჟანგვის კინეტიკურ სურათს პროდუქტით ინჰიბირების კლასიკური მრუდის სახე აქვს. მიუხედავად ამისა, შემდგომმა ცდების სერიებმა დაგვანახა, რომ დაჟანგული კოფერმენტი მისი აღდგენილი ფორმის ჟანგვას ვერ თრგუნავს, ანუ იგი ინჰიბირების კონკრეტულ მიზეზს არ წარმოადგენს. ამიტომ დასაშვებად მივიჩნიეთ, რომ ამ ფუნქციას უცნობი აქცეპტორი უნდა ასრულებდეს, რომელსაც რედუცირებადი ექვივალენტები სუბსტრატზე გადააქვს და ეს პროცესი მოლეკულური ჟანგბადისა და სუბსტრატის კონცენტრაციებით ლიმიტირდება. სქემატურად ეს შემდგენიარად შეიძლება წარმოვიდგინოთ:



რეაქციებში A^+ – აქცეპტორი, AH – აღდგენილი აქცეპტორი, SH და SOH – შესაბამისად ქსენობიოტიკი და მისი ჰიდროქსილირების პროდუქტია.

მაშასადამე, მისაღებად შეიძლება ჩაითვალოს, რომ მიკროსომული ჰიდროქსილირება შეუღლებული ჟანგვა-აღდგენითი რეაქციებით მიმდინარეობს, რომელშიც NADPH-ის მიერ გარკვეული აქცეპტორი აღდგენას განიცდის და რომელიც შემდგომ ჟანგბადთან ურთიერთქმედების გზით ააქტივებს მას. აქცეპტორებად შეიძლება იყონ ლიბიდების ან ქინონების ანალოგები, ხოლო ფერმენტებიდან (E.N. 1.1.1.24)-ტიპის დეჰიდროგენაზა ან (E.N. 1.6.99.2)-ტიპის რედუქტაზა [28].

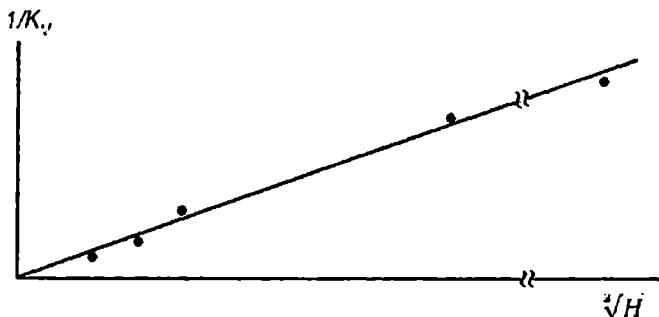
მე-3 ნახაზზე წარმოდგენილია ზოგიერთი სუბსტრატის NADPH-დამოკიდებული ჟანგვის კინეტიკური მრუდები (ლაინუივერ-ბერკის კო-ორდინატებში), საიდანაც ჩანს, რომ ფერმენტისადმი სწრაფვით (თვისობით) ისინი შემდეგი თანამიმდევრობით (მარჯვნიდან მარცხნივ) ლაგდებიან.



ნახ. 3. სოიას ფესვების მიკროსომებში ციტოქრომ P450-ის ზოგიერთი სუბსტრატის NADPH-დამოკიდებული ჟანგვის კინეტიკა [28]. BP (ბენზ- α -პირენი) > DMA (დიმეთილანილინი) > PNA (პარანიტროანიზოლი) > CA (დარიჩინმჟავა) > AN (ანილინი) > AMP (ამინოპირინი).

მეტად საყურადღებოა, რომ ზუსტად ამ რიგით ლაგდებიან ეს ნივთიერებები ჰიდროფობურობის ხარისხის მიხედვით. ამ სიდიდეებში იგულისხმება არაპოლარულ (ჰექსანში) და პოლარულ (წყალში) გამხსნელებს შორის მათი განაწილების კოეფიციენტი. მოველოდით, რომ ამ ორ მახასიათებელს შორის სწორხაზობრივი დამოკიდებულება გამოვლინდებოდა, რამდენადაც ჟანგვაში კონკურენციას მათი ფიზიკურ-ქიმიური თვისებები და განსაკუთრებით ჰიდროფობურობა განსაზღვრავს. აღმოჩნდა, რომ ასეთი დამოკიდებულება ვლინდება $1/K_m$ – სიდიდესა და ჰიდროფობურობის ხარისხიდან კუბურ ფესვს შორის, ანუ ნივთიერების ჰიდროფობურობა ერთერთი უმნიშვნელო-

ვანესი პარამეტრია იმ თვისებათაგან, რომელიც მონოოქსიგენაზური მექანიზმით ჟანგვას ახასიათებს. (ნახ. 4) [28].



ნახ. 4. ციტოქრომ P450-ით სუბსტრატთა ჟანგვისას ფერმენტისადმი სწრაფვასა და ჰიდროფობურობის ხარისხს შორის კორელაცია [28].

ამგვარად, ქსენობიოტიკის გარეშე NADPH არაშეუღლებულად იჟანგება და უჯრედში მისი აღდგენილი ფორმის განსაზღვრული დონე მუდმივად შენარჩუნებულია. უცხო ნივთიერების უჯრედში შეღწევისას კოფერმენტის რედუცირებადი პოტენციალი უპირატესად შეუღლებულ ჟანგვაზე რეალიზდება და ამ პირობებში ციტოქრომ P450 განსაკუთრებულ თვისობას ძლიერ ჰიდროფობურ სუბსტრატთა მიმართ იჩენს. ჰიდროქსილირების გზით ქსენობიოტიკთა ფუნქციონალიზაცია ამ ჰემოპროტეიდს როგორც იტყვიან პირდაპირ „კაკალ გულში“ მოხვდა. მის მიერ ნივთიერებათა „საკუთარ“ სუბსტრატად „შეცნობა“ მათი ფიზიკურ-ქიმიური თვისებებით და არა „ენდოგენურ“ თუ „ეგზოგენურ“ ცვლაში მონაწილეობით დგინდება. ამის ექსპერიმენტულ შემოწმებას ითვალისწინებდა ჩვენს ლაბორატორიაში ჩატარებული გამოკვლევები [29-32].

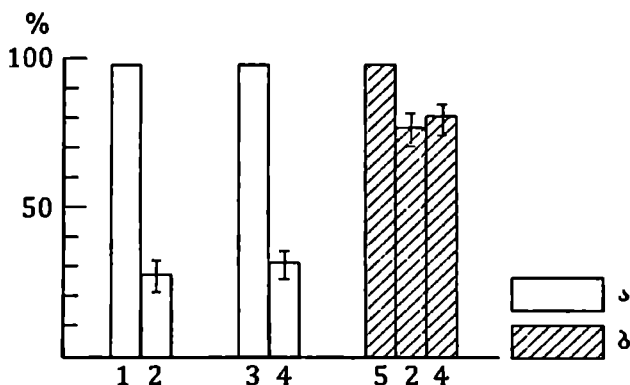
ადრე აღვნიშნეთ, რომ ციტოქრომ P450 მონაწილეობას ღებუ-

ლობს ფენოლურ ნაერთთა ბიოსინთეზში. აქედან გამომდინარე ცდებში მოდელად შევარჩიეთ ამ ნივთიერებათა (ფლავანოიდების, ფენოლ-კარბონმჟავების, ტანინებისა და ლიგნინების) წარმოქმნის ფენილპროპანოიდური გზა, რომელშიც ერთ-ერთ საკვანძო ფერმენტად დარიჩინ-მჟავა-4-ჰიდროქსილაზა (CA4H) ფიგურირებს. ეს ფერმენტი დღესაც ამ სახელწოდებით მოიხსენიება ანუ ფაქტიურად იგი ციტოქრომ P450-შემცველი მონოოქსიგენაზაა. დეტოქსიკაციის პროცესი ფასდებოდა მიკროსომული ჟანგვის სტანდარტული სუბსტრატის N,N-დიმეთილანილინის (DMA-ს) N-დემეთილირების რეაქციის (ფორმალდეჰიდის – FA-ს წარმოქმნის) მიხედვით. ცდებში გამოყენებული გეკონდა აგრეთვე ფენილალანინისა (Phe-ისა) და ტრანსდარიჩინმჟავას (tCA-ს) რადიოაქტიური იზოტოპები ($4\text{-}^3\text{H-Phe}$ და $4\text{-}^{14}\text{C-tCA}$)

სოიას 10-დღიანი ნაზარდების ფესვებიდან მიღებულ მიკროსომულ ფრაქციაში NADPH-თან ერთად DMA-ს შეტანისას ჟანგბადის მოხმარება ძლიერდება და აქტიურად ითრგუნება ნახშირბადის მონოოქსიდით. ფენოლურ ნაერთთა ბიოსინთეზის სუბსტრატის (Phe-ის და CA-ს) და DMA-თან მიკროსომების ერთდროულად ინკუბირებისას ორივე პროცესი დათრგუნვას განიცდის: ფორმალდეჰიდის წარმოქმნა 25-30%-ით, ხოლო CA-ს ჟანგვა 70-80%-ით ქვეითდება (ნახ. 5).

ანალოგიური შედეგი მივიღეთ Phe-ისა და CA-ს რადიოაქტიური პრეპარატების გამოყენების შემთხვევაშიც: DMA მკვეთრად ამცირებს ფენოლურ ნაერთთა ჯამურ ფრაქციაში $4\text{-}^3\text{H-Phe}$ -ისა და $4\text{-}^{14}\text{C-CA}$ -ს რადიოაქტიური ნიშნის ჩართვას.

NADPH-დამოკიდებული ჟანგვის კინეტიკურმა ანალიზმა გვიჩვენა რომ CA-სადმი სწრაფვასთან შედარებით ($K_M = 2.5 \cdot 10^{-6} \text{ M}$) DMA-სადმი ციტოქრომ P450-ის სწრაფვა ($K_M = 0.7 \cdot 10^{-6} \text{ M}$) ~3.5-ჯერ უფრო მაღალია.



ნახ. 5. CA-ს ჰიდროქსილირებისა და DMA-ს N-დემეთილირების რეაქციათა ურთიერთგავლენა.

საინკუბაციო ხსნარი (3 მლ) შეიცავდა 1/15 M ფოსფატის ბუფერს pH 7.4; 2 მგ/მლ მიკროსომულ ცილას; 6 მგ M NADPH-ს; 1. 60 mkM Phe; 2. 60mk M Phe + 18mkM DMA; 3. 60mkM CA; 4. 60mkM CA + 18 mkM DMA; 5. 18mkM DMA; ა – გარდაქმნილი CA; ბ – წარმოქმნილი FA. (100%-ად მიღებულია ცდის 1, 3 და 5 კარიანტები).

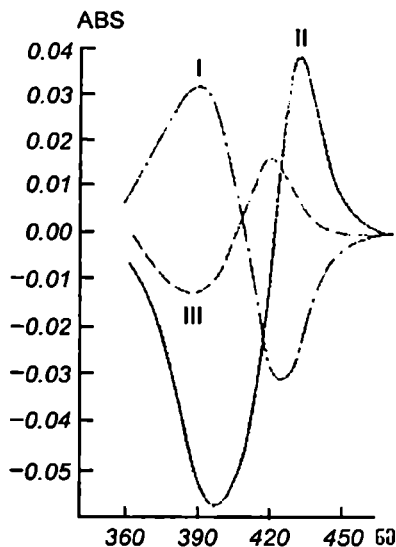
ნაჩვენები იქნა აგრეთვე DMA-ით CA₄H-ს ინჰიბირების კონკურენტული ბუნება. ეს მონაცემები საშუალებას გვაძლევს დავასკვნათ, რომ უჯრედში ქსენობიოტიკის შეღწევა იმ რეგულატორულ სიგნალს წარმოადგენს, რომლის საშუალებითაც ციტოქრომ P450-ის საერთო შიდა უჯრედული ფონდიდან „ენდოგენურიდან“ „ეგზოგენურ“ ცვლაზე მისი უპირატესი ნაწილის გადანაწილება ხდება, ანუ ბიოსინთეზების შესუსტების ხარჯზე ქსენობიოტიკის დეტოქსიკაციის პროცესი ძლიერდება. ეს გასაგებიცაა, რადგან ცოცხალ უჯრედს „სიკვდილს სიღუხჭირეში ცხოვრება“ ურჩევნია.

ჩვენს ცდებში კიდევ ერთი საინტერესო ფაქტი იქნა გამოვლენილი [29]: უჯრედში შეღწეული DMA-ს N-დემეთილირებისას რეაქციაში ორივე NAD(P)-დამოკიდებული რედოქს-ჯაჭვი მონაწილე-

ობს, რადგან ამ ქსენობიოტიკის დეტოქსიკაციის მაქსიმალური სიმძლავრე ორივე კოფერმენტის ერთდროული თანაარსებობისას ვლინდება, ანუ ადგილი აქვს სინერგიზმის მოვლენას. DMA-ს ჟანგვა სამმაგდება NADPH/NADH-ის კონცენტრაციათა 1:4-თან თანაფარდობისას. როგორც ჩანს, ამ დროს ორივე მიკროსომული რედოქსისისტემის მიერ ციტოქრომ P450-ის ელექტრონებით ყველაზე ოპტიმალური უზრუნველყოფა ხორციელდება.

ციტოქრომ P450-ის უნიკალურ თვისებას თავის სუბსტრატებთან და ინჰიბიტორებთან სპექტროფოტომეტრულად ადვილრეგისტრირებადი კომპლექსის წარმოქმნა წარმოადგენს. მიკროსომულ მემბრანებში მათი იდენტიფიკაციისთვის საზღვრავენ და ერთმანეთს უდარებენ კომპლექსისა და თავისუფალი ჰემოპროტეინის შთანთქმის სპექტრებს. ამ მიმართულებით კვლევის დაწყება ნარასიმპულუს და თანავეტ. [33] სახელს უკავშირდება. მათ მიერ დადგენილი იქნა, რომ მიკროსომებზე სრულიად განსხვავებული ქიმიური ნივთიერებების დამატება შთანთქმის დიფერენციალურ სპექტრებში დამახასიათებელ ცვლილებებს იწვევს. შესაბამისად შეიქმნა ამ ცვლილებების გამომწვევ სუბსტრატთა კლასიფიკაცია [34-37], რომელიც განსაზღვრული ტალღის სიგრძეზე მათი შთანთქმის მაქსიმუმებითა და მინიმუმებით ხასიათდებიან. ამის მიხედვით სუბსტრატებს ყოფენ I, II და მოდიფიცირებულ III ტიპებად (ნახ. 6) უნდა შევნიშნოთ, რომ ციტოქრომ P450-ის ეს უჩვეულო თვისება სხვა ჰემოპროტეიდებისათვის დამახასიათებელი არაა.

I-ტიპის სუბსტრატები ძირითადად ციტოქრომ P450-ის დაბალსპინურ ფორმასთან ურთიერთქმედებენ და ჰემური რკინის ატომი ექვსკოორდინირებული დაბალსპინური მდგომარეობიდან ზუთკოორდინირებულ მაღალსპინურ მდგომარეობაში გადაყავთ. ამ ტიპის კომპლექსთა წარმოქმნაში წამყვანი როლი ფერმენტის აქტიურ ცენტ-



ნახ. 6. მიკროსომების დიფერენციალური სპექტრების ტიპები სხვადასხვა სუბსტრატებთან ურთიერთქმედებისას.

I-ტიპის სპექტრალური ცვლილებები ხასიათდება შთანთქმის მაქსიმუმით 390 ნმ-ზე და მინიმუმით 420 ნმ-ზე (მრუდი I. სუბსტრატი 8.4 ნმოლი ჰექსობარბიტალი); მე-II ტიპის სპექტრული ცვლილებები ხასიათდებიან შთანთქმის მაქსიმუმით 420-430 ნმ-ზე და მინიმუმით 390 ნმ-ზე (მრუდი II, სუბსტრატი 2.5 ნმოლი ანილინი); მოდიფიცირებული მე-II ტიპი წარმოადგენს „შებრუნებულ I-ტიპს“, ანუ I-ტიპის სპექტრული ცვლილებების სარკისებურ ასახვას (მრუდი III. სუბსტრატი-1.6 ნმოლი აგროკლაინი) [33].

რთან არაპოლარული სუბსტრატის ჰიდროფობურ ურთიერთქმედებას უკავია. I-ტიპის სპექტრალური ცვლილებები მჭიდროდაა დაკავშირებული ნივთიერებათა მეტაბოლიზმთან, რომლებიც თვით ციტოქრომ P450-ის სუბსტრატებს წარმოადგენენ და მის ინდუქციას იწვევენ. მათ მიეკუთვნებიან ნაჯერი და არომატული ნახშირწყალბადები, მესამეული ამინები, ეთერები, ალიციკლური და ჰეტეროციკლური ნაერთები და სხვ.

I-ტიპის ნივთიერებათა მიერ აღძრული სპექტრული ცვლილებების ასახსნელად რამოდენიმე მოსაზრებაა პოსტულირებული და მათ შორის ჩვენი აზრით ყველაზე მისაღებად უნდა ჩაითვალოს ვარაუდი, რომლის თანახმადაც ამ დროს ფერმენტის აქტიურ ცენტრში აღვილი აქვს კონფორმაციულ ძვრებს, რასაც საბოლოო ჯამში კოორდინაციული კომპლექსის საერთო ცვლილებებთან მივყავართ: აღდგენილ ციტოქრომ P450-თან ნახშირბადის მონოოქსიდის მიერთებისას CO-ს მოლეკულა კოორდინაციული სფეროდან დევნის პერკაპტიდურ ჯგუფს, რომელიც მას დაჟანგული ფორმის ჰემოპროტეინში ეკავა. ამის შედეგად მიიღება კომპლექსი, სადაც მეტალი პორფირინის ბირთვის სიბრტყიდან CO-ს მიმართულებითაა გადაწეული, ხოლო ტრანს-მდგომარეობა ან თავისუფალია, ან მეტალთან სუსტად ბმული ლიგანდითაა დაკავებული [38]. როგორც ჩანს, ფერმენტული სისტემის ფუნქციონირებისათვის აუცილებელია, რომ ჟანგბადის მოლეკულა ჰემთან ამგვარადვე იყოს დაკავშირებული.

I-ტიპის სუბსტრატთა მიერთებისას ციტოქრომ P450-ის რედოქს-პოტენციალი -300 mV-დან -230 mV-მდე იზრდება. ამის შედეგად ელექტრონთა სატრანსპორტო ჯაჭვში მისი აღდგენა აღვილდება. ჟანგბადისადმი მაღალი სწრაფვა ($K_m=0.1-0.2$ μ M) და დიდი აუტოოქსილაბილობა (მეორე რიგის რეაქციის სიჩქარის კონსტანტა $1.4 \cdot 10^6$ მოლი $\cdot$ წმ $^{-1}$ -ს და ნახევარდაჟანგვის პერიოდი 300 მოლი $\cdot$ წმ $^{-1}$ -ს შეადგენს) ციტოქრომ P450-ის აერობულად აღდგენისას მისი სტაციონალური მდგომარეობის დაბალ დონეს აპირობებს [39, 40]. ამ შემთხვევაში იგი ციტოქრომოქსიდაზას წააგავს, მაგრამ მისგან განსხვავებით CO-ს მიმართ უფრო ძლიერი სწრაფვა აქვს. იმისათვის, რომ ციტოქრომოქსიდაზას აქტივობა დაითრგუნოს, საჭიროა CO₂:O₂ ფარდობა 10-ის ტოლი იყოს, მაშინ როდესაც ციტოქრომ P450-სთვის ეს ფარდობა 1-ს უტოლდება [40].

II-ე ტიპის კომპლექსების წარმოქმნა სუბსტრატთა (განსაკუთრებით ამინების) ამინოჯგუფისა და ჰემის რკინის ატომის ურთიერთმოქმედების შედეგია. ამ დროს რკინა შეიძლება როგორც მაღალსპინურ ასევე დაბალსპინურ მდგომარეობაში იმყოფებოდეს. ამასთან, მაღალსპინური რკინა დაბალსპინურში გადადის. ასეთ კომპლექსში ჰემის რკინა ექვსკოორდინაციულ მდგომარეობაში იმყოფება და ჟანგბადის დაკავშირების ადგილი სუბსტრატის აზოტითაა დაკავებული. მცირე გამონაკლისის (ანილინი, იმიდაზოლი და სხვ.) გარდა ეს ნივთიერებები ციტოქრომ P450-ის ტიპიურ სუბსტრატებს არ განეკუთვნებიან. ითვლება, რომ II-ტიპის ლიგანდები (სუბსტრატის ამინოჯგუფები) უშუალოდ უკავშირდებიან ჰემოპროტეიდის ჰემურ რკინას, როგორც ტიპიური ჰემოქრომოგენები და ფერმენტის მეექვსე აქსიალური ლიგანდები (ფერიჰემოქრომები) ხდებიან [34, 41]. ლიფერენციალურ სპექტრებში ეს 420 ნმ-ზე შთანთქმის მაქსიმუმისა და 390 ნმ-ზე შთანთქმის მინიმუმის წარმოქმნას იწვევს [42]. ციტოქრომ P450-თან II-ტიპის ლიგანდების ურთიერთქმედებისას დაბალსპინური კომპლექსები მიიღებიან, რამდენადაც ჰემური რკინა კოორდინაციულ სფეროში ექვს ლიგანდს შეიცავს. II-ტიპის ამინები რკინის ერთსა და იმავე ცენტრთან დაკავშირებისათვის კონკურენციას უწევენ CO-ს და შესაძლოა O₂-საც. მთელ რიგ შემთხვევებში (ანილინი, ნიკოტინამიდი და სხვ.) მიკროსომულ სუსპენზიასთან ურთიერთქმედებისას შეინიშნება ლიფერენციალური სპექტრი ორ-ორი მაქსიმუმითა და მინიმუმით, რაც შესაძლოა ციტოქრომ P450-ის სხვადასხვა ფორმის მონაწილეობის მიზეზი იყოს [42]. ამასთან დაკავშირებით უნდა შევნიშნოთ, რომ სადღეისოდ ყველაზე დეტალურად ლეიძლის მიკროსომებში ციტოქრომ P450-ის ორი ფორმაა შესწავლილი. ერთი მათგანი (P450 LM₂) ფენობარბიტალით, ხოლო მეორე (P450 LM₄) 3-მეთილქოლანტრენით ან β-ნაფტოფლავინით

ინდუცირდება [43, 44]. სპექტრული პარამეტრებით ჰემოპროტეიდის ეს ორი ფორმა ერთმანეთისაგან საკმაოდ განსხვავდება და ეს მკაფიოდ წრიული დიქროიზმის მეთოდითაც დადასტურდა [45], ნაჩვენები იქნა, რომ P450 LM₄-ის ფორმის ჰემი P450 LM₂-თან შედარებით უფრო მჭიდრო ჰიდროფობური „ჯიბითა“ გარემოცული.

არსებობს სპექტრული ცვლილებების ტიპი, რომელსაც შთანთქმის მაქსიმუმი 390 ნმ-ზე, ხოლო მინიმუმი 420 ნმ-ზე გააჩნია. ფაქტიურად იგი I-ტიპის სპექტრული ცვლილებების სარკისებური ასახვაა და ამიტომ მას „მოდიფიცირებულ II-ტიპს“ უწოდებენ. ლიტერატურაში იგი ინვერსიული ან რევერსიული სპექტრების სახელწოდებითაა ცნობილი. სპექტრის ასეთი ცვლილება სუბსტრატის ჰიდროქსილისა და მაღალსპინური რკინის ურთიერთმოქმედების შედეგია. ამ დროს შთანთქმის მაქსიმუმის 390 ნმ-დან 416 ნმ-მდე წანაცვლება ხდება.

მოდიფიცირებული II-ტიპის ნივთიერებები თავისი შემადგენლობით საკმაოდ არაერთგვაროვანია. მასში შედიან სპირტები, კეტონები, ალდეჰიდები, სტეროიდები და სხვ. [34, 46-48]. მცირე გამონაკლისის გარდა, ისინი მიკროსომული ფანჯვის სუბსტრატებს წარმოადგენენ. ციტოქრომ P450-ის სპირტებთან ურთიერთქმედება რთული ბუნებისაა და უპირველეს ყოვლისა მათი ალიფატური ჯაჭვის სიგრძეზეა დამოკიდებული. მცირე ზომის მოლეკულების მქონე სპირტების (მეთანოლის, ეთანოლის, პროპანოლის) ჰემურ რკინასთან კოორდინირება მეექვსე აქსიალურ მდგომარეობაში ხორციელდება, ხოლო სპირტის მოლეკულებს თუ გრძელი ან განტოტვილი ჯაჭვი აქვს, მაშინ მას I-ტიპის სუბსტრატთა მსგავსად ციტოქრომ P450 LM₂-თან ჰიდროფობური ურთიერთქმედებით დაკავშირება შეუძლია. იმის გამო, რომ სპირტები უკვე შეიცავენ პოლარულ OH-ჯგუფს, პრინციპში ისინი ამ ჰემოპროტეიდის სუბსტრატებს არ უნდა წარ-

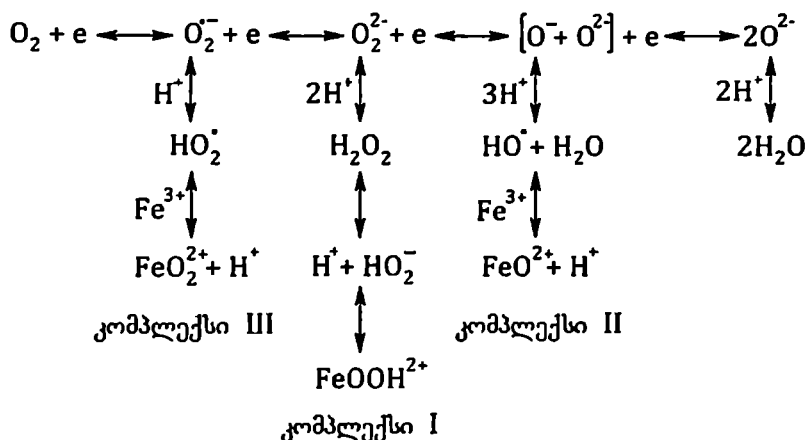
მოადგენდნენ. მიუხედავად ამისა, როგორც ირკვევა მცენარესა და ცხოველში ამ კლასის წარმომადგენელთა მეტაბოლიზმში ციტოქრომ P450 მაინც აქტიურად მონაწილეობს [26, 47].

4. ჟანგბადის აქტიური ფორმები (შპშ-ები) და ქსენობიოტიკთა ფუნქციონალიზაციაში მათი შესაძლო როლი

მოლეკულური ჟანგბადი ჩვეულებრივ პარამაგნიტურ ბირადიკალს წარმოადგენს და მდგრად ტრიპლეტურ ($^3\Sigma$) მდგომარეობაში იმყოფება. მასში ორი ელექტრონი გამფაშარავებელ π -ორბიტალზე განთავსებული და პარალელური სპინები გააჩნიათ. ეს ორი ელექტრონი თუ ერთ გამფაშარავებელ ორბიტალზე განთავსდება, მიიღება დიამაგნიტური, ანტიპარალელურ სპინიანი ჟანგბადი სინგლეტურ ($^1\Delta$) მდგომარეობაში, და მისი ენერგია პარამაგნიტურ მდგომარეობას ~ 23 კკალ/მოლით აღემატება [49]. სუბსტრატში ტრიპლეტური ჟანგბადის პირდაპირი ჩანერგვა პრაქტიკულად მეტად ძნელია, რადგან ციტოქრომ P450-ის სუბსტრატთა უმრავლესობის მოლეკულები სინგლეტურ მდგომარეობაში იმყოფებიან და სპინ-აკრძალვის პრინციპის გამო მათთან ტრიპლეტური ჟანგბადის ურთიერთქმედება და სინგლეტური პროდუქტის მიღება არ მოხდება. ეფექტურ დამჟანგველად მოლეკულური ჟანგბადი მხოლოდ გააქტივების შედეგად შეიძლება იქცეს და ამის მიღწევა ელექტრონებით მისი თანმიმდევრული აღდგენის გზით ხდება (ნახ. 7).

პირველი ელექტრონით O_2 -ის აღდგენისას სუპეროქსიდ ანიონ-რადიკალი (O_2^-) წარმოიქმნება, რომელსაც მყაურ არეში HO_2^- - რადიკალი შეესაბამება, ხოლო Fe^{3+} -იონების თანამყოფობისას პეროქსიდაზურ კატალიზში მიღებული ტერმინოლოგიით ე.წ. კომპლექსი

III გენერირდება; ორი ელექტრონით აღდგენისას წყალბადის პეროქსიდი (H_2O_2), ხოლო რკინის იონების ან მისი პროტოპორფირინის თანამყოფობისას კომპლექს I-ს ვლელულობთ. სამელექტრონიანი აღდგენა $-O-O-$ კავშირის გაზღეკას და $HO^{\cdot}$ -რადიკალის, ან Fe^{3+} -ის თანამყოფობისას კომპლექს II-ის (FeO^{2+} -ის) წარმოქმნას იწვევს და ბოლოს O_2 -ის ოთხი ელექტრონით აღდგენით წყლის ორი მოლეკულა წარმოიქმნება.



ნახ. 7. მოლეკულური ჟანგბადის თანმიმდევრული ოთხელექტრონიანი აღდგენა [50]. (განმარტება ტექსტში)

პირველი ელექტრონით O_2 -ის აღდგენისას სუპეროქსიდ-ანიონ-რადიკალი ($O_2^{\cdot-}$) წარმოიქმნება, რომელსაც მეაურ არეში $HO_2^{\cdot}$ -რადიკალი შეესაბამება, ხოლო Fe^{3+} -იონების თანამყოფობისას პეროქსიდაზურ კატალიზში მიღებული ტერმინოლოგიით ე.წ. კომპლექსი III გენერირდება; ორი ელექტრონით აღდგენისას წყალბადის პეროქსიდი (H_2O_2), ხოლო რკინის იონების ან მისი პროტოპორფირინის თანამყოფობისას კომპლექს I-ს ვლელულობთ. სამელექტრონიანი აღდ-

გენა $-O-O-$ კავშირის გახლეჩას და $HO^{\cdot}$ -რადიკალის, ან Fe^{3+} -ის თანამყოფობისას კომპლექს II -ის (FeO^{2+} -ის) წარმოქმნას იწვევს და ბოლოს O_2 -ის ოთხი ელექტრონით აღდგენით წყლის ორი მოლეკულა წარმოიქმნება.

მოლეკულური ჟანგბადის აქტივაცია ზორციელდება მისი ურთიერთქმედებით აღდგენილი მეტალის იონებთან და წარმოქმნილი მეტალ-ჟანგბადოვანი კომპლექსის კოორდინაციულ სფეროში ელექტრონების მიერთების გზით (ციტოქრომ P450). გარდა ამისა, შესაძლებელია ორი ელექტრონით წინასწარ გააქტივებულ ჟანგბადთან (მაგ., H_2O_2 -ის ან $ROOH$ -ის სახით) მეტალის ურთიერთქმედება (პეროქსიდაზები და კატალაზები). მეტალის იონების გარდა აუცილებელ მედიატორებად ფლავინები და ფტერინები მონაწილეობენ, რომლებიც თავის მხრივ საჭირო ელექტრონებით ბუნებრივი დონორებიდან (ასკორბატიდან, დიფენოლებიდან ან $NAD(PH)$ -დან) მარადებიან. გააქტივებული ჟანგბადის ერთი ან ორივე ატომის ფერმენტულად (შესაბამისად მონოქსიგენაზებითა და დიოქსიგენაზებით) დასაჟანგ სუბსტრატში ინერგება.

უჯრედში $შპშ$ -ების გენერაცია, მათი ელექტრონული აღნაგობა, თვისებები და ბიოქიმიური ნიშნადობა დეტალურადაა განხილული დ. მეტელიცას შესანიშნავ მონოგრაფიაში [42], ამიტომ ჩვენ აქ ძლიერ მოკლედ წარმოვადგენთ მათ ზოგიერთ არსებით მხარეს.

სუპეროქსიდური ანიონ-რადიკალის ($O_2^{\cdot-}$) ელექტრონულ აღნაგობას ასეთი სახე აქვს:



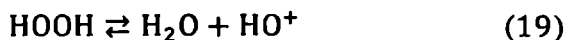
იგი ელექტრონების კენტ რიცხვს (13-ს) შეიცავს და ერთი ერთმაგი და ერთი სამელექტრონიანი კავშირის მქონე მოლეკულურ სისტემას წარმოადგენს. ატმოსფერულ ჟანგბადთან შედარებით იგი ნაკლებად

მტკიცება, მაგრამ აპროტონულ გამხსნელებში ხანგრძლივად არსებობა შეუძლია. ბიოქიმიურ პროცესებში ეს ანიონ-რადიკალი საკმაოდ ხშირად წარმოიქმნება, მაგრამ ძირითადად მაინც ფლავინშემცველი სისტემების ოქსიდაციისა და ციტოქრომ P450-ის აუტოოქსიდაციის შედეგს წარმოადგენს. ზოგიერთ აქცეპტორს O_2^- ადვილად აძლევს ელექტრონს. მაგ., მისი მონაწილეობით ციტოქრომ c-ს ალდგენის კონსტანტა $10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{C}^{-1}$ -ს უტოლდება. სუპეროქსიდი ამფოტერულ ჟანგვა-აღდგენით თვისებებს ფლობს. მას არამარტო ზოგიერთი ნივთიერების ჟანგვა, არამედ შესაფერისი აქცეპტორის ალდგენის უნარიც გააჩნია. მჟანგველუნარიანობით იგი განსაკუთრებით სუსტია და ელექტრონის მიბმა მხოლოდ ისეთი ნაერთებისაგან შეუძლია, რომლებიც ღაჟანგვის შედეგად მდგრად რადიკალებს წარმოქმნიან. მაგ., მისი გავლენით იონიზებულ მდგომარეობაში მყოფი პიროკატექინისაგან მდგრადი სემიკინონი მიიღება.

ფიზიოლოგიურ პირობებში სუპეროქსიდ-ანიონს შეუძლია ციტოქრომ P450-ის ისეთი სუბსტრატები ღაჟანგოს, როგორიც ალკენები და ალკანები არიან. არომატული ნაერთების ჰიდროქსილირებას რაც შეეხება, მისი მონაწილეობა ექსპერიმენტულად არ დასტურდება [42, 51-53]. ამიტომ მიიჩნევენ, რომ ფერმენტულ სისტემებში O_2^- -ის უნივერსალურ მაჰიდროქსილირებელ ნაწილაკად აღიარებას არავითარი ფიზიკურ-ქიმიური საფუძველი არ გააჩნია და ჟანგვის მაღალი დონე მხოლოდ O_2^- -ის პროტონთან ურთიერთქმედებით და პერჰიდროქსილური რადიკალის (HO_2^- -ის) წარმოქმნით შეიძლება იქნას მიღწეული [42]. მიუხედავად იმისა, რომ O_2^- -თან შედარებით ეს რადიკალი უფრო ძლიერი დამჟანგველია, მასაც შემონახული აქვს ამფოტერული ჟანგვა-აღდგენითი თვისებები. ჩვეულებრივ იგი სუპეროქსიდ-ანიონ რადიკალად დისოცირდება. თავისთავად HO_2^- -ს ალკანებისა და არომატული ნახშირწყალბადების ჟანგვა შეუძლია,

რადგან ამ ნივთიერებებთან ურთიერთქმედებების რეაქციები მნიშვნელოვანი ენდოთერმულობით ხასიათდებიან [54] და აღნიშნული სუბსტრატების ჟანგვა მას მხოლოდ მაღალ ტემპერატურაზე (80°C -ზე) ძალუძს [50], ამიტომ არომატულ ნაერთებთან მიმართებაში HO_2 -ის რეაქციისუნარიანობაში უპირატესად რადიაციულ-ქიმიურ პროცესებში მონაწილეობას გულისხმობენ, სადაც ალიფატური სპირტებისა და არომატული ნივთიერებების შეუღლებული ჟანგვის რეაქციებში მისი მონაწილეობაა ნაჩვენები [50, 55]. საერთოდ კი ბიოლოგიური ჟანგვის პროცესებში ხშირად აქვს ადგილი როგორც სუპეროქსიდური, ასევე პერჰიდროქსილური რადიკალების წარმოქმნას.

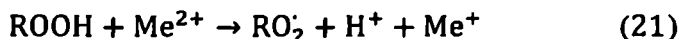
მეორე ელექტრონით მოლეკულური ჟანგბადის აღდგენის სტადიაზე წყალბადის პეროქსიდი (ზეჟანგი) წარმოიქმნება, რომელიც საშუალო სიძლიერის დამჟანგველს წარმოადგენს. მიუხედავად ამისა, ფიზიოლოგიურ პირობებში ცვალებადი ვალენტობის მქონე მეტალთა შემცველი კატალიზატორების გარეშე მას აქტიური მჟანგველუნარიანობა არ გააჩნია. გარდა ამისა, ჩვეულებრივ მისი ჰიდროლიზური დაშლისას $\text{HO}^{\cdot}$ -რადიკალის გენერირება არ ხდება, რადგან $\text{HO}-\text{OH}$ -კავშირის სიმტკიცე 52.2 ± 0.4 კკალ/მოლს შეადგენს [54] და ამისათვის მაღალი ტემპერატურა (100°C -ზე მეტი), დასხივება, ან ცვალებადი ვალენტობის მქონე მეტალის იონის, ან მისი კომპლექსის თანამყოფობაა საჭირო. $\text{RO}-\text{OH}$ -კავშირის სიმტკიცე 50 კკალ/მოლზე ნაკლებია, მაგრამ რადიკალებად მისი დაშლა კატალიზატორების გარეშე მაინც ძლიერ შენელებულად მიმდინარეობს. ვარაუდობენ, რომ წყალბადის პეროქსიდი შეიძლება მაღალრეაქტიისუნარიანი ელექტროფილური ნაწილაკის HO^+ -ის წყარო გახდეს:



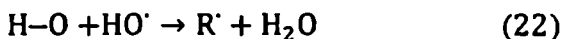
უნდა შევნიშნოთ, რომ თავისუფალი სახით ასეთი ნაწილაკის

არსებობა მაინც შეუძლებელია, რადგან მის წარმოსაქმნელად საკმარისად მაღალი ენერგიაა საჭირო. ასე, რომ მაჰიდროქსილირებელ ნაწილაკად მისი აღიარებაც საფუძველს მოკლებულია. თავისუფალი ოქსიკათიონიც (RO^+) უაღრესად მაღალი ენერგიის მქონე ნაწილაკს წარმოადგენს [56].

წყალბადის პეროქსიდი და ორგანული ჰიდროპეროქსიდები აქტიურ მეტაბოლიტებად (რადიკალებად) შეიძლება მხოლოდ კატალიზატორის თანამყოფობისას არსებობდნენ და ამ დროს მათი ინიცირება ჰაბერ-ვეისის [57] რეაქციებით ხორციელდება:



ჟანგბადის მოლეკულის მესამე ელექტრონით აღდგენის სტადიაზე $O-O$ კავშირი იხლიჩება და ჟანგბადის იონ-რადიკალი ($O^{\cdot-}$) წარმოიქმნება, რომელიც მკაურ არეში ჰიდროქსილის $HO^{\cdot-}$ რადიკალად გარდაქმნას განიცდის. ეს უკანასკნელი ყოველთვის წყალბადის პეროქსიდიდან გენერირდება სარეაქციო არეში თუ დაბალი დაჟანგულობის ხარისხში არსებული გარდამავალი ვალენტობის მეტალის იონი ან მისი კომპლექსი იმყოფება. $HO^{\cdot-}$ -რადიკალი ძლიერ რეაქციისუნარიანია და დაბალსელექტიური (დაბალშერჩევითი) თვისებებით გამოირჩევა. ფიზიოლოგიურ პირობებში ის ალკანების, ალკენების და არომატული ნახშირწყალბადების გვერდითი ჯაჭვების ნებისმიერ $C-H$ -ბმას უტევს:



ეს რეაქცია ყოველთვის ეგზოთერმულია და წარმოქმნილი $H-OH$ -კავშირის სიმტკიცე (119 კკალ/მოლი) ყოველთვის 10-25 კკალ/მოლით აღემატება გასახლეჩი კავშირის სიმტკიცეს [54]. $HO^{\cdot-}$ -

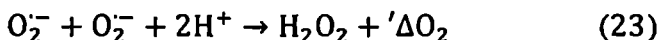
რადიკალების საოცრად დაბალი სელექტურობა მრავალი სუბსტრატის ჟანგვაში მონაწილე მონოოქსიგენაზების სელექტურობასთან სრულ შეუსაბამობაში იმყოფება.

მოლეკულური ჟანგბადისა და განზილულ მის აქტიურ ფორმებს თუ ანალიზს გაეუკეთებთ, შეიძლება შეჯამდეს მონოოქსიგენაზურ რექციებში სუბსტრატთა ჟანგვაში მათი სააღბათო მონაწილეობა და როლი:

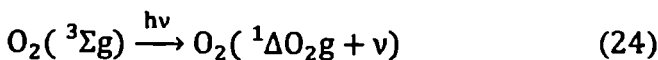
1. ფიზიოლოგიურ პირობებში ზოგიერთ სუბსტრატთან მოლეკულური ჟანგბადის პირდაპირი რეაქცია შესაძლებელია მხოლოდ მაშინ, როდესაც ამ რეაქციის მსვლელობას თან ახლავს სემიქინონური ტიპის მდგრადი რადიკალების წარმოქმნა;
2. იშვიათ შემთხვევაში შესაძლებელია სუბსტრატზე დამჟანგველი აგენტის ნუკლეოფილური შეტევა. ამ როლის შესრულება ჰიდროპეროქსიდებს (ROOH -ს) და სუპეროქსიდ ანიონ-რადიკალებს (O_2^-) შეუძლიათ;
3. ოქსიგენაზებს, რომელთაც მოლეკულურ ჟანგბადთან მორეაგირე კოფაქტორები არ გააჩნიათ, აქტიურ ცენტრში უნდა შეიცავდნენ ცვალებადი ვალენტობის მეტალის იონს ან მის კომპლექსს, რომელთაც ჟანგბადით გააქტივება შეუძლიათ;
4. მეტალის ან მისი კომპლექსის გარეშე კოფაქტორის მქონე მონოოქსიგენაზები კოფაქტორსა და მოლეკულურ ჟანგბადს შორის რადიკალური მექანიზმით ზეჟანგური ტიპის აქტიურ ფორმებს ინიცირებენ, რომლებიც გარდაქმნების შემდეგ სუბსტრატს უტევენ, გადასცემენ აქტიურ ჟანგბადს და წარმოქმნიან სინგლეტურ პროდუქტს [42].
5. ოქსიგენაზები, რომელთაც ცვალებადი ვალენტობის მეტალის იონი, ან მისი კომპლექსი გააჩნიათ, იერთებენ ჟანგბადის მოლეკულას და მის ისეთ აქტიურ ფორმად გარდაქმნიან, რომელიც,

შემდგომში სუბსტრატში ჩასანერგ მაჰიდროქსილირებელ ნაწილ-აკზე ელექტრონების დეფიციტით ხასიათდება. ეს შეიძლება იყოს თვით მეტალის იონთან ჟანგბადის კომპლექსი ან მისი ერთი ან რამოდენიმე ელექტრონით აღდგენის პროდუქტი [58].

ლიტერატურაში არც თუ იშვიათად ვხვდებით მტკიცებას იმის შესახებ, რომ ბიოლოგიურ ჟანგვაში ჟანგბადის აქტიურ ფორმას მისი სინგლეტური მდგომარეობა ($^1\Delta O_2$) უნდა წარმოადგენდეს. ეს მოსაზრება ბიოქიმიურ პროცესებში მისი ფართო გამოყენების შესაძლებლობას ეყრდნობა [42]. მართლაც, არსებობენ მონაცემები იმის შესახებ, რომ $^1\Delta O_2$ -ს შეუძლია მონაწილეობდეს დიოქსიგენაზურ რეაქციებში [59] ან ზოგიერთ არომატულ ქსენობიოტიკთა ჰიდროქსილირებაში [60]. უჯრედში იგი წყალბადის პეროქსიდის დაშლით მიიღება და მისი იდენტიფიკაცია $^1\Delta O_2$ -ის „დამჭერი“ ნივთიერებებით – 2.5-დიფენილფურანით ხერხდება [61]. გარდა ამისა, სინგლეტური ჟანგბადის წარმოქმნა ქსანტინოქსიდაზა-ქსანტინის სისტემაშიც რეგისტრირდება [62]. ღვიძლის მიკროსომებში O_2 -ის NADPH-თან თანამყოფობისას შემჩნეულია ქემილუმინესენციის მოვლენა, რასაც სინგლეტური ჟანგბადის არსებობას მიაწერენ [63]. ქემილუმინესენცია ვლინდება ქაფურის მაჰიდროქსილირებული ციტოქრომ P450-ის აუტოოქსიდაციის დროსაც და ეს სუპეროქსიდ ანიონ-რადიკალის რეკომბინაციით (დისმუტაციით) სინგლეტური ჟანგბადის წარმოქმნითაა ახსნილი [64]:



სინგლეტურ ჟანგბადს იღებენ ტრიპლეტური ჟანგბადის ნეოდი-ნური ლაზერით დასხივების გზითაც [65]:



თავისი მაღალი მყანგველუნარიანობის მიუხედავად სინგლეტური ჟანგბადი მთელი რიგი მიზეზების გამო მაინც არ შეიძლება ოქსიგენაზურ რეაქციებში უნივერსალურ მაჰიდროქსილირებელ აგენტად ჩათვალოს [42]: ჯერ ერთი, ტრიპლეტურიდან სინგლეტური ჟანგბადის გენერაციისათვის 22 კკალ/მოლი ენერგიაა საჭირო, ხოლო უჯრედში არ მოიპოვება ფერმენტული სისტემა, რომელსაც ტრიპლეტური ჟანგბადის აქტივაციისთვის ამ რაოდენობის ენერგიის მიწოდება შეეძლოს; სინგლეტური ჟანგბადი წარმოქმნის სპეციფიკურ ზეჟანგურ ნაერთებს, რომლებიც ფერმენტულ პროცესთა უმრავლესობაში ექსპერიმენტულად არ კლინდებიან; მონოოქსიგენაზების ისეთ ტიპიურ სუბსტრატებთან, როგორიც ალკანებისა და არომატული ნაერთების უმრავლესობაა, სინგლეტური ჟანგბადი არ რეაგირებს [66], ხოლო ქემილუმინესცენციის მეთოდით ბიოლოგიურ სისტემებში $^2\Delta O_2$ -ის იდენტიფიკაცია სუპეროქსიდ ანიონების რეკომბინაციის რეაქციით უფრო უნდა იყოს გამოწვეული.

რა ვითარება გვაქვს ამ მიმართებით მწვანე მცენარეში?

პრაქტიკულად მცენარე მუდმივად იმყოფება ჟანგბადის ძლიერი ზემოქმედების ქვეშ. მიუხედავად იმისა, რომ იგი მცენარის მიერ სუნთქვაში ინტენსიურად მოიხმარება, მისი კომპენსაცია და ჭარბწარმოქმნა უმნიშვნელოვანესი ოქსიგენური პროცესის – ფოტოსინთეზის საშუალებით ხორციელდება. თავისი ქიმიური სტაბილურობიდან გამომდინარე სტანდარტულ პირობებში უშუალოდ მოლეკულური ჟანგბადი მცენარისათვის არავითარ პრობლემას არ უნდა წარმოადგენდეს [67, 68].

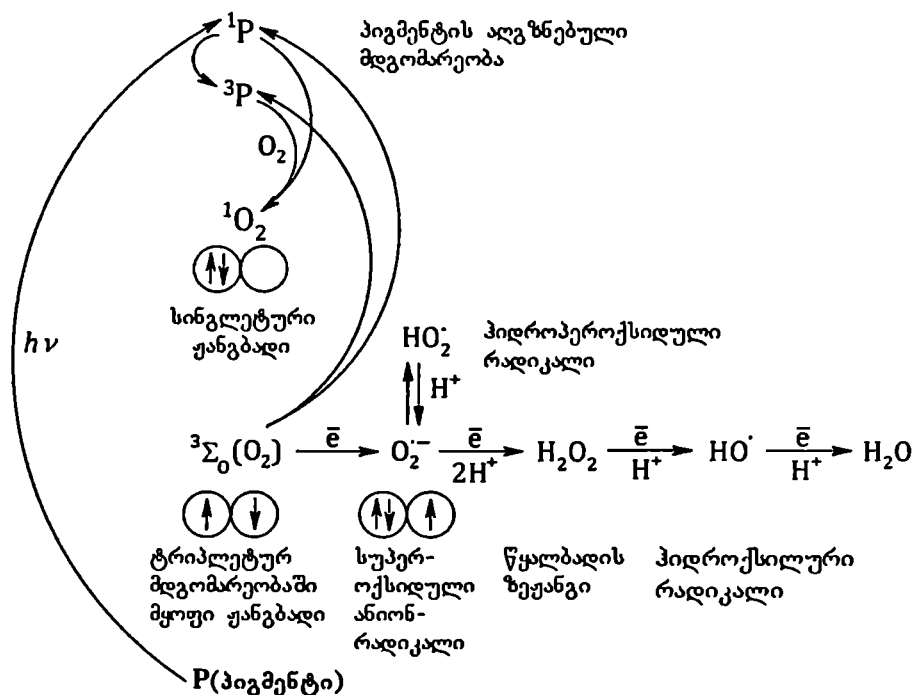
ადრე აღვნიშნეთ, რომ სინგლეტურ მდგომარეობაში მყოფი ანტიპარალელურსპინიანი ქსენობიოტიკების მოლეკულები სპინაკრძალვის პრინციპის გამო ტრიპლეტურ ჟანგბადთან არ ურთიერთქმედებენ. სამაგიეროდ ფოტოსინთეზის პროცესში არაფერმენტულად ინტენსიურად გენერირდება რეაქციისუნარიანი სინგლეტური ჟანგბადი, რო-

მელიც სპინაკრძალვის შეზღუდვის გამო შესაძლოა ეფექტურად იქნას გამოყენებული მონოოქსიგენაზურ რეაქციებში [69].

მცენარის ფოტოსინთეზური აპარატი საკმაოდ რთული აღნაგობისაა და ფოტოსისტემა-II-ისა და ფოტოსისტემა-I-საგან შედგება. პირველი წყალს O_2 -მდე ჟანგავს, ხოლო მეორე $NADP^+$ -ის $NADPH$ -მდე აღდგენას ახორციელებს. ქლოროპლასტების ძირითადი ერთეულის ე.წ. „ქვანტოსომის“ თითქმის ყველა პიგმენტი (ქლოროფილები, კაროტინოიდები) შთანთქმევენ და გადასცემენ სხივად $h\nu$ ქვანტის ენერგიას რეაქტიულ ცენტრს ანუ ასრულებენ „ანტენის“ როლს. ორივე ფოტოსისტემას საკუთარი რეაქტიული ცენტრი გააჩნია და ისინი შეიძლება მინიმალურ სტრუქტურულ წარმონაქმნებად იქნან განხილული, რომელთაც ამა თუ იმ ფოტოქიმიური რეაქციის განხორციელება შეუძლიათ.

ფოტოსისტემა-II რეაქტიული ცენტრის საანტენო სისტემის მიერ შთანთქმულ $h\nu$ -ენერგიას სუპეროქსიდ ანიონ-რადიკალების მუხტთა რეკომბინაციას და სინგლეტური ჟანგბადის პროდუცირებას ახმარს. $^1\Delta O_2$ -ს ნახევარსიცოცხლის ხანმოკლე პერიოდი (200 ns) აქვს და დიფუზიის კონსტანტა ~ 10 nm-ს უტოლდება [70, 71-73].

სინათლის მაღალი ინტენსივობისას ფოტოსისტემა-II-ში $^1\Delta O_2$ მნიშვნელოვანწილად იმ შემთხვევაში იწყებს გენერირებას, როდესაც შთანთქმული სხივადი ენერგია მისი გამოყენების შესაძლებლობებს აღემატება. ამ დროს ტრიპლეტურ მდგომარეობაში მყოფი აგზნებული ქლოროფილის მოლეკულიდან ძირითად ტრიპლეტურ მდგომარეობაში მყოფ მოლეკულურ ჟანგბადზე ამ ჭარბი ენერგიის გადატანა ხდება [69]. მცენარეში სინგლეტური ჟანგბადის წარმოქმნა სქემატურად შეიძლება ასე წარმოვიდგინოთ (ნახ. 8) [74].

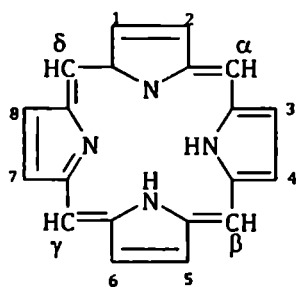


ნახ. 8. გააქტივებული ჟანგბადის ძირითადი ფორმები მცენარეში [74].

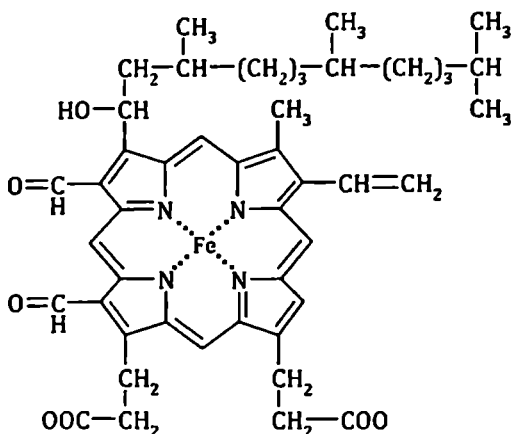
სინგლეთური ჟანგბადის წარმოქმნა უპირატესად ფოტოქიმიურ რეაქციებთანაა დაკავშირებული: P-პიგმენტით სინათლის ქვანტის ($h\nu$) შთანთქმასთან და მის აგზნებულ სინგლეთურ ($1P$) და ტრიპლეთურ ($3P$) მდგომარეობიდან მოლეკულურ ჟანგბადზე ენერგიის გადატანასთან.

ძლიერ ელექტრონულ აქცეპტორებთან რეაგირებისას სინგლეთური ჟანგბადი დონორულ თვისებებს ავლენს [75], დამჟანგველად კი იგი შეიძლება ელექტრონების მიერთებისას ამოქმედდეს. ეს ელექტრონები გამჟავარაველ ორბიტალებზე სახლდებიან და მათი რიცხვის ზრდასთან ერთად იზრდება მოლეკულაში ატომებს შორის მანძილი და მცირდება კავშირის სიმტკიცე [50, 76]. იმის გამო, რომ ქსენობიოტიკთა

ჰიდროქსილირება გააქტივებულ ჟანგბადს საჭიროებს, ამდენად ფუნქციონალიზაციის სტადია შპშ-ების გენერატორადაც ითვლება. ამდროს წარმოქმნილი სუპეროქსიდ ანიონ-რადიკალი ჟანგბადის ყველა სხვა აქტიური ფორმის წინამორბედს წარმოადგენს. არსებული ჰემოპროთეიდების (ჰემოგლობინის, მიოგლობინის და სხვ.) მსგავსად ციტოქრომ P450-იც პროსთეტულ ჯგუფად რკინა-პორფირინის ბირთვს შეიცავს, რომელიც მოლეკულურ ჟანგბადს იკავშირებს და ელექტრონული დონორებიდან მიღებულ აღმდგენელ ექვივალენტებს მის გააქტივებას ახმარს. (პორფირინის ბირთვს შეიცავს მწვანე მცენარის ქლოროფილიც). პორფირინი და ციტოქრომების პროსთეტული ჯგუფების ქიმიური აღნაგობა ნახ. 9-ზეა მოცემული. ციტოქრომ P450-ის ჰემის რკინას ჟანგბადი ისე უკავშირდება, რომ ფერმენტმა —O—O— კავშირის დაშლა შეძლოს. სუბსტრატი ამ დროს აქტიური ცენტრის ზუსტად იმ უბანს უკავშირდება, სადაც ნახშირბადის ატომი უშუალოდ ეკონტაქტება რკინა-დაკავშირებულ ჟანგბადის ატომს და ამის შედეგად ეფექტურად ზორ-



პორფირინი



ციტოქრომების პროსთეტული ჯგუფი (ჰემი-A)

ნახ. 9. პორფირინისა და ციტოქრომების პროსთეტული ჯგუფების სტრუქტურული ფორმულები.

ციელდება სტერეოსელექტური ჰიდროქსილირება. ცხადია, ამ მომენტისთვის ერთი მნიშვნელოვანი პრინციპი უნდა მოქმედებდეს: სუბსტრატის მოლეკულაში ჩასანერგი ჟანგბადი ამისათვის ქიმიურად მომზადებული უნდა დახვდეს.

ზოგადად ჰემი ტიპური ორგანული კომპლექსური ნაერთია, რომლის შემადგენლობაშიც შედის მეტალის კათიონი და რთული შემადგენლობის ანიონი. ეს უკანასკნელი თავის მხრივ კომპლექს-წარმოქმნელი ატომისა და მასთან დაკავშირებული იონების ან ნეიტრალური მოლეკულებისაგან (ლიგანდებისაგან) შედგება. ცენტრალური კათიონის გარშემო ლიგანდების რიცხვს კოორდინაციული ეწოდება. მისი რიცხვითი მნიშვნელობა ყოველთვის აღემატება კომპლექსწარმოქმნელი ატომის დაჟანგულობის ხარისხს. მეტალის კათიონთან ლიგანდები კოვალენტური და დონორულ-აქცეპტორული ანუ კოორდინაციული ბმებით კავშირდებიან (ეს კავშირი დონორიდან აქცეპტორისაკენ მიმართული წერტილებით აღინიშნება). პროტოპორფირინი „ოთხბირთვიან“ კომპლექსებს წარმოქმნის. მის ხელატურ კომპლექსს $Fe(II)$ -თან პროტოჰემი, ან უბრალოდ ჰემი ეწოდება. ანალოგიური კომპლექსი $Fe(III)$ -თან ჰემინის, ანუ ჰემატინის სახელწოდებითაა ცნობილი.

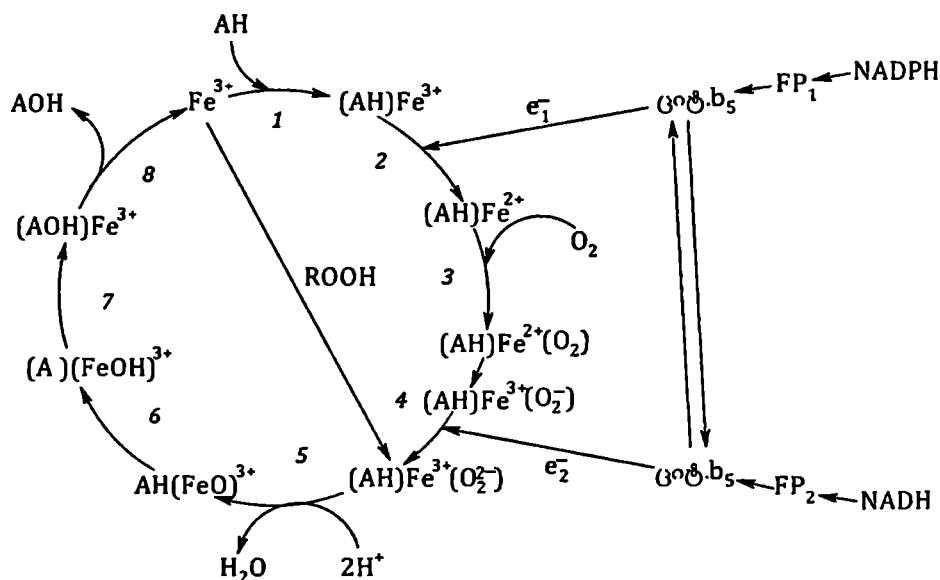
ციტოქრომ P450-ის მიერ სუბსტრატთა მონოოქსიგენირების თანადროულად $\Psi A\Phi$ -ების პროდუცირება უჯრედს ნებისმიერი ორგანული ქსენობიოტიკის მეტაბოლიზების უნარს ანიჭებს, რადგან მათ ყველა C—C და C—H-კავშირების დაწყვეტა შეუძლიათ [42]. ამ შემთხვევაში უადრესად საყურადღებოა ისიც, რომ სპინაკრძალვის პრინციპის მიუხედავად ასეთ პროცესს მაინც შეიძლება ჰქონდეს ადგილი და ამისათვის სამი შესაძლო ვარიანტი სახელდება [50]:

1. ჟანგბადსა და დასაჟანგ სუბსტრატს შორის რეაქციის ინიციატორად რადიკალური მექანიზმით. ამდროს ტრიპლეტური O₂ სინგლეტური სუბსტრატთან შეიძლება ორი დუბლეტის წარმოქმნით რეაგირებდეს, რომელთა რეკომბინაციის შედეგად სინგლეტური პროდუქტი წარმოიქმნება (დუბლეტების რეკომბინაცია სპინაკრძალული არაა!!!)
2. ტრიპლეტური ჟანგბადის სინგლეტურ მდგომარეობამდე წინასწარი აგზნება (მაგ., სინათლის ქვანტის შთანთქმით).
3. ფერმენტ-ოქსიდაზებით ტრიპლეტური ჟანგბადის სინგლეტურ ფორმად გააქტივება ინვერსიისა და სუბსტრატთან უშუალო დაკავშირებით. ეს გზა ექსპლოატაციაში შეიძლება შევიდეს ფერმენტის აქტიურ ცენტრში ცვალებადი ვალენტობის მქონე მეტალის სპინური მდგომარეობების ცვლილებებისას.

5. ქსენობიოტიკთა პიდროქსილირების მექანიზმი (მონოოქსიგენაზური ციკლი)

მიკროსომულ ჟანგვაში ცენტრალური პოზიცია სუბსტრატის მონოოქსიგენირების პროცესის მექანიზმის კვლევას უკავია. ნახ. 1-ზე წარმოდგენილი ციტოქრომ P450-ის მოქმედების ზოგადი არსი ჭეშმარიტად ზოგადი და ჯამურია. სინამდვილეში კი იგი გაცილებით რთულ და მრავალსტადიურ პროცესს წარმოადგენს. ლიტერატურაში ის მონოოქსიგენაზური ციკლის სახელწოდებითაა ცნობილი და მისი თავდაპირველი ვარიანტი 1968 წელს ამერიკელი მეცნიერების რ. ესტაბრუკის, ა. პილდებრანდტისა და ვ. ულრიხის [77] მიერ იქნა შემოთავაზებული. მომდევნო პერიოდში იგი მრავალი მკვლევარის ძალისხმევით გაღრმავდა, დაიხვეწა და მის თანამედროვე ვარიანტს ნახ. 10-ზე წარმოგიდგენთ [76]. აქვე შევნიშნავთ, რომ თავდაპირველად ციკლის ძირითადი სტადიები

მიკროორგანიზმ *Ps. putida*-ს, ანუ ქაფურის მაჰიდროქსილირებელ ($P450_{camph}$) სისტემაზე შესწავლილი [38, 78-80], მაგრამ სხვა ბიოლოგიურ სისტემებშიც მისი უნივერსალობა (ზოგიერთი არაპრინციპული გამონაკლისის მიუხედავად) სადღეისოდ არავითარ ეჭვს აღარ იწვევს და საყოველთაოდაა მიღებული. მოკლედ განვიხილით ამ მრავალსაფეხურიანი პროცესის ცალკეული სტადიები:



ნახ. 10. მონოოქსიგენაზური ციკლი [76]. (განმარტება ტექსტში)

სტადია I ციტოქრომ P450-ის დაჟანგულ ფორმასთან (ფერიციტოქრომთან) სუბსტრატის ურთიერთქმედება და ფერმენტ-სუბსტრატის კომპლექსის წარმოქმნაა, რასაც თან ახლავს პემოპროტიდის ჟანგვა-აღდგენითი და სპინური მდგომარეობის ცვლილებები: სუბსტრატთა უმრავლესობას ციტოქრომ P450 დაბალსპინურიდან მაღალსპინურ მდგომარეობაში გადაჰყავს, ხოლო ზოგიერთი ამინი უკუ-

გადასვლას იწვევს. მიიჩნევენ, რომ ჰემოპროტეიდის მაღალსპინურ ფორმას დაკარგული აქვს მეექვსე აქტიურ მდგომარეობაში მყოფი ლიგანდი, მაგრამ მეზუთე მდგომარეობაში ცისტეინილის ნაშთს ინარჩუნებს [81]. კომპლექსის წარმოქმნის სიჩქარე მაღალია და მისი კონსტანტა $10^2 \div 10$ ნლ/მოლის რიგისაა. გარდა ამისა, ფერმენტთან სუბსტრატის მიერთება აადვილებს კომპლექსის პირველი ელექტრონით აღდგენას, რომელიც მას NADPH-სპეციფიკური ელექტრონთა სატრანსპორტო ჯაჭვიდან მიეწოდება. მის შემადგენლობაში საწყის კომპონენტად NADPH-ციტოქრომ P450-რედუქტაზა, ანუ ფლავოპროტეიდი (FAD) იმყოფება (იხ. ნახ. 2). ამ ფერმენტის მოქმედების ზუსტი მექანიზმი საბოლოოდ არაა დადგენილი, რამდენადაც ჯერ-ჯერობით კვლავ უცნობი რჩება მასში შემავალი ორი ფლავინური ფრაგმენტის ერთმანეთის მიმართ წყობა.

სტადია II ციტოქრომ P450-სუბსტრატის კომპლექსის პირველი ელექტრონით აღდგენაა. როგორც ირკვევა, მიკროსომებში ამ რეაქციას ორფაზიანობა ახასიათებს [82-84]. I-ტიპის სუბსტრატები აჩქარებენ, ხოლო მეორე ტიპის ნაერთები ამ რეაქციას ანელებენ. საყურადღებო ფაქტი ისაა, რომ სწრაფი ფაზის სიჩქარე ჰიდროქსილირების რეაქციის საერთო სიჩქარეს უტოლდება. ამ მონაცემებზე დაყრდნობით გაკეთებულ იქნა დასკვნა, რომ ციტოქრომ P450-ის აქტიურ ცენტრზე პირველი ელექტრონის მიერთება ჰიდროქსილირების რეაქციის მალმიმტირებელ რგოლს უნდა წარმოადგენდეს. მოგვიანებით ეს თვალსაზრისი არ დადასტურდა [85]. უფრო სრულყოფილი შეჩერებული ნაკადის ტექნიკის გამოყენებით ნაჩვენები იქნა, რომ ორივე ფაზა პირველი რიგის რეაქციას წარმოადგენს და სწრაფი ფაზის სიჩქარის კონსტანტა $2C^{-1}$ -ის, ხოლო შენელებულის — $0.3C^{-1}$ -ის ტოლია. სწრაფ ფაზაში აღდგენას განიცდის ჰემოპროტეიდის $\sim 50\%$ და რედუქტაზული რეაქციის სიჩქარე ჰიდროქსილი-

რების რეაქციის სიჩქარეზე ბევრად მეტია (მაგ., ეთილმორფინის შემთხვევაში იგი $8.6 \text{ ნმოლი} \cdot \text{წთ}^{-1} \cdot \text{მგ}^{-1} \cdot \text{ცილას უტოლდება}$). ამდენად პირველი ელექტრონის მიერთება არ შეიძლება მონოოქსიგენაზურ ციკლს ალიმბირებდეს და მიზეზს ჰემოპროტეიდის შესაძლო ჰეტეროგენურობა წარმოადგენდეს [86, 87], ან რაც კიდევ უფრო საფიქრებელია რეაქციის განსხვავებული სიჩქარეთა მიზეზი ციტოქრომ P450-ის განსხვავებული სპინური მდგომარეობების არსებობაში უნდა იყოს საძებნი, რამდენადაც მაღალსპინური ჰემოპროტეიდი დაბალსპინურთან შედარებით უფრო სწრაფ აღდგენას განიცდის [81], და რეაქცია მემბრანული ფოსფოლიპიდის თანამყოფობას საჭიროებს [88-90].

სტადია III-ზე აღდგენილი ფერმენტ-სუბსტრატის კომპლექსი ურთიერთქმედებს ჟანგბადთან და დიდი სიჩქარით ($10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{წ}^{-1}$) ოქსიციტოქრომ P450 წარმოიქმნება. მიკროსომულ მაჰიდროქსილირებელ სისტემაში იგი ავტოჟანგვას განიცდის, რის შედეგადაც სუპეროქსიდური ანიონ-რადიკალისა და დაჟანგული რკინის, მაგრამ არა ჰიდროქსილირების პროდუქტის წარმოქმნას აქვს ადგილი. სუპეროქსიდები რეკომბინაციის (დისმუტაციის) რეაქციით H_2O_2 -ად გარდაიქმნიებიან. უნდა აღინიშნოს ისიც, რომ იზოლირებული სამმაგი კომპლექსის დაშლისა და სუპეროქსიდური რადიკალების წარმოქმნის ექსპერიმენტულად ჩვენება ჯერჯერობით წარუმატებელი რჩება.

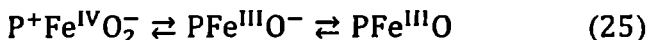
ციტოქრომ P450-ით ჟანგბადის აქტივაციისათვის პირველხარისხოვანი როლი ოქსიგენირებული ჰემოპროტეიდის შენებას ენიჭება, თუმცა სადისკუსიოა კომპლექსში ჟანგბადის მდგომარეობისა და მისი კონფიგურაციის საკითხი. ვარაუდობენ, რომ ოქსიჰემოგლობინის ანალოგიურად ჟანგბადი ელექტრონს აქაც ჰემური რკინიდან იღებს და მისი მდგომარეობა ყველაზე უკეთესად აიხსნება სტრუქტურით, რომელიც ოქსიჰემოგლობინისთვის ($\text{Fe}^{3+} \cdot \text{O}_2^-$) ვაისის [91] მიერაა შემოთავაზებული. ოქსიგენირებულ ციტოქრომ P450-ში ჟანგბადს $\text{Fe}-\text{O}=\text{O}$

კონფიგურაცია უნდა გააჩნდეს. ქვანტურ-მექანიკურმა გათვლებმა აჩვენეს, რომ ციტოქრომ P450-ის ჟანგბადოვანი და კარბონილური კომპლექსების უჩვეულო სპექტრალური თვისებები სრულადაა დაკავშირებული მეზუთე აქსიალურ მდგომარეობაში მყოფ თიოლურ ლიგანდთან და პირდაპირ დამოკიდებულებაშია ჰემურ რკინასა და თიოლური ლიგანდის გოგირდს შორის არსებულ მანძილზე [92, 93]. ამ მანძილის 0.2 Å-მდე ან მეტად გაზრდა სავსებით საკმარისია, რომ ციტოქრომ P450 თავის არააქტიურ ციტოქრომ P420-ად გარდაიქმნას [93]. ოქსიგენირებული მيوგლობინის რენტგენოსტრუქტურულმა კვლევამ აჩვენა, რომ O₂-ის მოლეკულის ღერძი პორფირინის ბირთვის სიბრტყეესთან 120°-თან მიახლოებულ კუთხეს ქმნის [94].

მე-IV სტადიაზე სამმაგი კომპლექსის მეორე ელექტრონით აღდგენა და პეროქსიციტოქრომ P450-ის წარმოქმნა ხდება. ითვლება, რომ ამ ელექტრონით მონოოქსიგენაზური ციკლი NADH-სპეციფიკური ელექტრონთა სატრანსპორტო ჯაჭვით მარაგდება, რომელიც NADH-ციტოქრომ b₅-რედუქტაზას, ანუ ფლავოპროტეიდ FP₂-ს და ციტოქრომ b₅-ს შეიცავს [95]. როგორც ირკვევა ამ სტადიიდან იწყება გარდაქმნები, რომლებიც მთლიანი მონოოქსიგენაზური ციკლის სიჩქარეს განსაზღვრავენ. ფაქტიურად ეს სტადია სამმაგი კომპლექსის დაშლის დასაწყისია. მისი ორი ელექტრონით აღდგენის შემდეგ მეოთხე სტადიაზე სუბსტრატის ჰიდროქსილირება, წყლის მოლეკულისა და რეაქციის პროდუქტის გამოთავისუფლება და ახალი ციკლის დასაწყებად საწყისი კატალიზატორის (ოქსიციტოქრომის) რეგენერაცია მიმდინარეობს. აუცილებელია ითქვას, რომ ამ პროცესებიდან არცერთი მათგანი დისკრეტულად ჯერაც არ შესწავლილა. უფრო მეტიც, უცნობია თუ რა თანმიმდევრობით ხორციელდებიან ისინი. უბრალოდ ნათელი ხდება, რომ სუბსტრატთა მიკროსოპული ჰიდროქსილირება რთულ კოოპერატიულ პროცესს წარმოადგენს.

მეოთხე დამამთავრებელ სტადიაზე სამმაგ კომპლექსში O—O-კავ-
შირის, ხოლო სუბსტრატში C—H-კავშირის დახლეჩა და ჰიდროქსი-
ლირების პროდუქტის წარმოქმნა ხდება, რომელიც სარეაქციო მოცუ-
ლობაში გამოდის.

მოლეკულური ჟანგბადიდან მაჰიდროქსილირებელი აგენტი (მის
სინონიმად ხშირად ტერმინ „ნაწილაკსაც“ ხმარობენ) მხოლოდ ერთ
ატომს იყენებს [86]. ამაზე მეტყველებს დაჟანგულ ციტოქრომ
P450-თან იოდიზობენზოლისა და ($C_6H_5I = O$) და მისი წარ-
მოებულების თანამყოფობისას ჰიდროქსილირების რეაქციის მძლავრი
სტიმულირებაც [96]. ფორმულიდან ვხედავთ, რომ იოდიზობენზოლი-
დან დამჟანგველ აგენტს ერთი ატომის აღება შეუძლია. ამასთან და-
კავშირებით შესაძლებელი გახდა შექმნილიყო იმ ნივთიერებების
მდგრადი ანალოგები, რომელთაც ციტოქრომ P450-ისათვის მაჰი-
დროქსილირებელი აგენტის მოდელირება შეუძლიათ [97, 98] და
უნარი აქვთ წარმოქმნან ნაწილაკები, რომელთა მაგნიტური ამთვისებლო-
ბაც რკინის მაღალსპინური მდგომარეობის (IV) შესაბამისია [98].
ითვლება, რომ ეს ნაერთი პეროქსიდაზას, ქლორპეროქსიდაზას და კატა-
ლაზას კომპლექს-I-ის (იხ. ნახ. 7) ანალოგები არიან [76]:



აქ P პორფირინია.

ასეთ მოდელურ კომპლექსებში რკინის მაღალი დაჟანგულობის
ხარისხი პორფირინის ბირთვითაა სტაბილიზებული, რომელიც რკინის ან
ჟანგბადის ატომს ერთ ელექტრონს აწოდებს. ამას ადასტურებს კიდევ
პორფირინის ბირთვის კატიონური ფორმით არსებობაც [99, 100].

ნაწილაკს, რომლის სტრუქტურაც 25-ე განტოლებაშია მოყვანი-
ლი ოქსენს უწოდებენ. მასში ჟანგბადის ატომს გარე გარსზე ექვსი
ელექტრონი აქვს და მაღალი რეაქციისუნარიანობით გამოირჩევა. სამ-

მაგ კომპლექსში მოლეკულური ჟანგბადის აქტივაციის შედეგად სწორედ ოქსენ ნაწილაკი წარმოიქმნება, რომელიც ფიზიოლოგიურ პირობებში მაღალი სიჩქარით მრავალფეროვანი ქსენობიოტიკების ჟანგვას და გასაოცარ სელექტიურობას უზრუნველყოფს. ვიტესა და კუუნის [86] თანახმად ზემოაღნიშნულების სტრუქტურა, რომელიც ციტოქრომ P450-ის ჟანგბადიან კომპლექსთან კარბოქსილის ჯგუფის ურთიერთქმედებითაა შექმნილი, კეთილსასურველ ფაქტორს წარმოადგენს O-O-კავშირის შემდგომი დაშლისა და მაჰიდროქსილირებელი ნაწილაკის წარმოქმნისათვის. ეს თვალსაზრისი არომატული და ალიფატური ნახშირწყალბადების მიმართ ზემოაღნიშნულების მაჰიდროქსილირებელი უნარიანობით დასტურდება. ზემოაღნიშნულთან მეტა-ლთა კომპლექსების კოორდინირების შედეგად ეს რეაქცია მნიშვნელოვან ზრდას განიცდის. ითვლება, რომ ოქსენოიდი სტაბილიზებულია ციტოქრომ P450-ის თიოლური ლიგანდით, რომელიც რეაქციაში ელექტრონთა თავისებურ რეზერვუარს წარმოადგენს [86]:



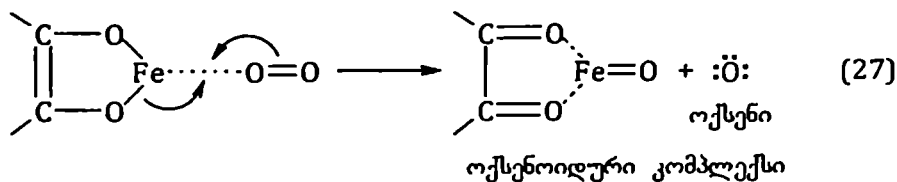
მონოქსიგენაზურ ციკლში პეროქსიკომპლექსის ($RH-Fe^{2+}-O_2^-$) დაშლა მე-V დამამთავრებელ სტადიაზე ხორციელდება, ყველა წინა სტადიისაგან განსხვავებით აქ გარდაქმნის გზამ შეიძლება განტოტვა განიცადოს, რაც საშუალებას იძლევა, რომ დასაყანგ სუბსტრატში გააქტივებული ჟანგბადის ჩანერგვა რამდენიმე მექანიზმით რეალიზდეს. ფაქტიურად ეს სტადია სამმაგი კომპლექსის დაშლის დასაწყისია, რადგან ფორმალურად მხოლოდ მასში იყრის თავს ყველა ის აღმდგენელი ექვივალენტი, რომელიც რეაქციის პროდუქტის, წყლის წარმოსაქმნელად და საწყისი ფერიპროპროტიდის რეგენერაციისთვისაა აუცილებელი. ეს გარდაქმნები და წარმოქმნილი ინტერმედიატები მნიშვნელოვანწილად ჰიპოთეტურია, რამდენადაც მათ რე-

ალურ არსებობაზე პირდაპირი ექსპერიმენტული მტკიცებულებები თითქმის არ გაგვაჩნია [101]. ეს განსაკუთრებით მაპიდროქსილირებული აგენტის ჭეშმარიტ ბუნებაზე და დასაჟანგ სუბსტრატში მისი ჩანერგვის მექანიზმზე ითქმის. მიგვაჩნია, რომ ამ შემთხვევაში უდიდესი როლი ჟანგვის ოქსენოიდური მექანიზმის შესახებ სრულიად ახალმა და უჩვეულო ჰიპოთეზამ შეასრულა, რომელიც 1964 წელს გ. ჰამილტონმა [102] შემოგვთავაზა. ამ ჰიპოთეზის არსებობის ნახევარ საუკუნეზე მეტი ხნის განმავლობაში ჩვენ არ შეგვხვედრია პუბლიკაცია, რომელშიც არგუმენტირებულად იყოს უარყოფილი მისი სისწორე. უფრო მეტიც: რაც დრო გადის თანდათან მრავლდება მისი მომხრე მეცნიერთა ჩამონათვალი და მათ რიცხვს ამ სტრიქონების ავტორიც ეკუთვნის.

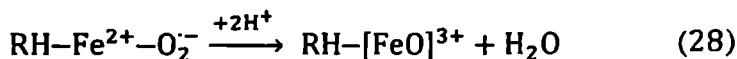
ჰამილტონმა ყურადღება გაამახვილა იმ გარემოებაზე, რომ მონო-ოქსიგენაზებითა და მისი მოდელებით კატალიზებულ რეაქციებსა და კარბენებით (CR_2 -ით) ან ნიტრენებით (NR -ით) განხორციელებულ რეაქციებს შორის არსებობს საოცარი ანალოგია. ამ ნაერთებში ნახშირბადისა და აზოტის ატომები ექვს-ექვს ელექტრონს შეიცავენ და უაღრესად რეაქტიუანია ანალოგები. ისინი აქტიურად ერთვებიან აირად და თხევადფაზურ რეაქციებში, მაგალითად, არსებობს უამრავი მონაცემები მონოოქსიგენაზებით ალკანების მოლეკულაში ჟანგბადის ატომის ჩართვაზე და საწყისი კონფიგურაციის შენარჩუნებით სპირტების წარმოქმნაზე. კარბენებიც უერთდებიან ალკენებს და ციკლოპროპანებს იძლევიან; ამ მეორე რეაქციის ანალოგიით მიმდინარეობს მონოოქსიგენაზებით კატალიზებული ალკენების ეპოქსიდირებაც; ცნობილია, რომ კარბენები ადვილად რეაგირებენ არომატულ ნაერთებთან ალკილბენზოლებისა და ნორკარადიენების წარმოქმნით, რომლებიც წონასწორობაში იმყოფებიან ციკლოჰექსატრიენებთან; ოქსიგენაზებიც ახორციელებენ არომატულ ნაერთთა ფენოლებად და

არენოქსიდებად გარდაქმნებს, რომლებიც წონასწორობაში იმყოფებიან ოქსეპინებთან და ა.შ. [42]. შეიძლება ითქვას, რომ კარბენები და ნიტრენები ოქსიგენაზების შორეულ მოდელს წარმოადგენენ. კარბენებისა და ნიტრენების ანალოგი შეიძლება იყოს ჟანგბადის ატომიც („ოქსენი“), რომელსაც გარე ელექტრონულ გარსზე ასევე ექვსი ელექტრონი უმოდრავებს.

დეტალური ანალიზის შედეგად ჰამილტონმა დაუშვა, რომ მრავალ ოქსიგენაზურ რეაქციაში ჰიდროქსილირებისათვის სუბსტრატს ჟანგბადის ატომი კარბენოიდურის მსგავსი ე.წ. ოქსენოიდური კომპლექსიდან მიეწოდება. ჟანგბადის მოლეკულა ასეთ ოქსენოიდს წარმოქმნის რკინის იონთან, ან რედოქს-აქტიურ ლიგანდთან (მაგ., ასკორბატთან) კომპლექსირებისას:



ოქსენოიდური ნაწილაკის წარმოქმნა შეიძლება განხილულ იქნას როგორც პეროქსიკომპლექსისაგან წყლის წართმევის შედეგი [101, 103]:



ჰიდროქსილირების რეაქციაში, სადაც სამმაგი კომპლექსი ორი ელექტრონით აღდგენას განიცდის, აქტიური კომპლექსი-I წარმოიქმნება, რომელშიც დაჟანგულობის მაღალი ხარისხის მქონე რკინის იონი იმყოფება. ეს კომპლექსი სხვადასხვა ფორმით (Fe^{2+}O_2 , $\text{Fe}^{3+}\text{O}_2^-$, Fe^{3+}O , Fe^{4+}O^-) არსებობს და O_2 -ს სინგლეტურ, ან ტრიპლეტურ მდგომარეობაში შეიცავს, ანუ O_2 -დან სუბსტრატზე ჟანგბადის რო-

გორც ტრიპლეტური, ასევე სინგლეტური ატომის გადატანაა შესაძლებელი [104]. სინგლეტური ოქსენოიდი ჟანგბადს სუბსტრატში ე.წ. სამელექტრონიანი სინქრონული მექანიზმით ნერგავს და რეაქციის სინგლეტური პროდუქტი მიიღება. ოქსენოიდი თუ ტრიპლეტია, მაშინ სუბსტრატში ჟანგბადის უშუალო ჩანერგვა სპინაკრძალვის გამო შეუძლებელია და მიიჩნევენ, რომ ამ შემთხვევაში ჟანგვა „წყალბადის ატომის მოგლეჯა-რეკომბინაციის“, ანუ ფარულ-რადიკალური მექანიზმით მიმდინარეობს, რომელიც სპეციფიკური ინჰიბიტორების მიმართ არამგძნობიარეა [104].

კომპლექს-I-ში ჟანგბადის განსხვავებულ მდგომარეობებს ჰემოპროტეიდის ჰემური რკინის მეხუთე ლიგანდის ბუნება აპირობებს. მაგალითად, ჰემოგლობინში, მიოგლობინში და ციტოქრომ c-ში ჰისტიდინის მეხუთე მდგომარეობა საზღვრავს არსებითად რეაქციის პეროქსიდაზურ (რადიკალურ) გზას, რომელშიც ჰემოპროტეიდი და ჰიდროპეროქსიდი (H_2O_2) მონაწილეობენ. ციტოქრომ P450-ის მეხუთე მდგომარეობაში მყოფი ცისტეინილი საზღვრავს რეაქციის ჰიდროქსილაზურ გზას და სხვა ჰემოპროტეიდთა კომპლექსებისგან განსხვავებით ამ ჰემოპროტეიდის კომპლექსების სპექტრალურ ცვლილებებს [104].

მეტალისა და ლიგანდის ბუნებისაგან დამოკიდებულებით ოქსენოიდური კომპლექსი შეიძლება ელექტროფილურობის სხვადასხვა ხარისხით გამოირჩეოდეს. გარდა ამისა, ამ კომპლექსს ნუკლეოფილური თვისებებიც გააჩნია. მოლეკულურ ჟანგბადთან ციტოქრომ P450-ის ურთიერთქმედებისას მიიღება კომპლექსი, რომელიც სუბსტრატთან საშუალო სიძლიერის ელექტროფილურ თვისებებს აკლენს [105].

სადისკუსიოდ რჩება საკითხი ოქსენოიდის ჭეშმარიტი ბუნების შესახებ. ერთი რამ, რაც შეიძლება უდაოდ მივიღოთ, ისაა, რომ ამ

ნაწილაკს სხვადასხვა აღნაგობა უნდა გააჩნდეს. ოქსენოიდი შეიძლება ერთი ელექტრონით აღდგენილი რკინისა და ჟანგბადის კომპლექსი, ან მისი მოდიფიკაციის პროდუქტი იყოს, რომელიც O—O—კავშირის დაშლის შედეგად მიიღება. მეორე მხრივ, ოქსენოიდი შეიძლება ფლავინ-ჰიდროპეროქსიდის სისტემის ან მისი დაშლის პროდუქტს წარმოადგენდეს, რომელიც სუბსტრატში ჩასანერგი ნაწილაკის ელექტრონული დეფიციტით ხასიათდება [42].

ციტოქრომ P450-ის ჰემითა და სხვა ჰემშემცველი ცილებით ჟანგბადის აქტივაციის თეორიული შეფასება $[Fe^{3+}-O_2^-]$ -ის სტრუქტურაზე ჩერდება. მასში ჟანგბადის კიდურა ატომი მოლეკულის ღერძის მიმართ ბლაგვი კუთხით (120° -ით) იმყოფება. გარდამავალ მდგომარეობაში ეს ნაწილაკი სუბსტრატს ჰემიდან სწორედ ამ კიდურა ჟანგბადის ატომს გადასცემს [92]:



$[Fe^{3+}...O_2^{2-}]$ -ნაწილაკი პეროქსიდაზურ რეაქციაში ცნობილი „კომპაუნდ-I“-ის ანალოგიურია, რომელიც საწყისი პეროქსიდის მოლეკულიდან ჟანგბადის მხოლოდ ერთ ატომს შეიცავს [103, 106]. ძნელია უპირატესობა მიენიჭოს ოქსენოიდური ნაწილაკის ამა თუ იმ ფორმას და არც საფუძველი გაგვიჩნია რომელიმე კონკრეტული ფორმის უნივერსალურად აღიარებისათვის.

მონოოქსიგენაზური ციკლი სხვადასხვა ფაქტორთა ზემოქმედებისას საკმაო ვარიაბელობას ამჟღავნებს, ხოლო საჭიროებისას კი „ჯიუტ კონსერვატიზმსაც“ იჩენს. ამის საილუსტრაციოდ შეიძლება თუნდაც მისი შუნტირება (ციკლის „დამოკლება“) დაგვესახელებინა.

ციკლის სიჩქარე სამმაგ კომპლექსში სუბსტრატის მოლეკულაში გააქტივებული ჟანგბადის ჩანერგვისა და კომპლექსის დაშლის სტადიით შეიძლება რეგულირდებოდეს. ამის შესაძლებლად ექსპერი-

მენტულად ერთმანეთს უდარებდნენ მიკროსოპული სისტემისა და მხოლოდ ციტოქრომ P450-ორგანული ჰიდროპეროქსიდის (მაგ., კუმოლის ჰიდროპეროქსიდის) შემცველ სისტემათა აქტივაციურ მახასიათებლებს. საქმე იმაშია, რომ ჰიდროპეროქსიდის მოლეკულა უკვე ორი ელექტრონით აღდგენილ ჟანგბადს შეიცავს და თუ ჰემოპროტეიდთან ერთად კოსუბსტრატად ჰიდროპეროქსიდი გამოიყენება, ციკლის „დამოკლება“ (შუნტირება) უნდა მოხდეს (ნახ. 10-ზე ეს გზა ციკლის ცენტრში გავლებული ისრითაა ნაჩვენები, ROOH- სიმბოლო კი ორგანული ჰიდროპეროქსიდის მოლეკულას აღნიშნავს), ანუ ამ გზის ამოქმედებისას ისრის მარჯვენა მხარეზე ციკლის მონაკვეთი ზედმეტი ხდება [107, 108]. ნავარაუდევია, რომ ამ დროს ციტოქრომ P450-ის ჰიდროპეროქსიდთან ურთიერთქმედებისას პეროქსიდაზას კომპლექს-I-ის ანალოგი უნდა წარმოიქმნას, რომელშიც ჰემური რკინა დაჟანგულობის მაღალ ხარისხში (Fe^{5+}) იმყოფება [109, 110].

ბუნებრივად არსებობდა საფუძვლიანი მოსაზრება, რომ კოსუბსტრატად ჰიდროპეროქსიდის გამოყენებისას (განსაკუთრებით ანაერობულ პირობებში) სრული მონოოქსიგენაზური ციკლის სიჩქარე სუბსტრატის მოლეკულაში ჰიდროპეროქსიდში არსებული ორი ელექტრონით გააქტიურებული ჟანგბადის ჩართვის სტადიით უნდა განსაზღვრულიყო.

ციკლის შუნტირების შემდგომმა დეტალურმა კინეტიკურმა კვლევამ აჩვენა, რომ იგი საკმაოდ რთული, მრავალფაზური და რადიკალური ბუნების პროცესს წარმოადგენს [111-113]. ამასთან დაკავშირებით შუნტირებული სისტემისადმი მზარდი ყურადღება გასული საუკუნის 80-იანი წლებიდან ფრთხილმა და სკეპტიკურმა დამოკიდებულებამაც შეცვალა. კუუნმა და თანაავტ. [114], აგრეთვე ესტაბრუკმა და თანაავტ. [115, 116] დამაჯერებლად აჩვენეს, რომ შუნტირებული სისტემებისა და სრული ციკლის მქონე მონოოქსიგენაზურ რეაქციათა მექანიზმები ერთმანეთისაგან არსებითად განსხვავდებიან, რაც

ჰიდროქსილირების შედეგად წარმოქმნილ შუალედ და საბოლოო პროდუქტთა ანაკრებით, ინჰიბიტორთა მოქმედების ან სამმაგი კომპლექსის ცვლილებების თავისებურებებში მდგომარეობს.

აღნიშნულთან დაკავშირებით ჩვენს ლაბორატორიაში შესწავლილ იქნა სპილენძ-თიროზინის კომპლექსის (სუპეროქსიდდისმუტაზის დაბალმოლეკულური ანალოგის) გავლენა NADPH- და კუმოლის ჰიდროპეროქსიდ-დამოკიდებულ ჟანგვაზე [117]. ცდებში სპეციალურად გამოვიყენეთ მცენარეთა (სიმინდისა და სოიას) გაჯირჯეებული ლეზების თხელი ანათლები, რომლებიც სრული მონოოქსიგენაზური სისტემის ექვივალენტს წარმოადგენენ. დასაჟანგ სუბსტრატებად აღებული გექონდა პირველი ტიპის ნაერთები – დიმეთილანილინი და ამინოპირინი, აგრეთვე მეორე ტიპის სუბსტრატი – ანილინი. როგორც მოსალოდნელი იყო, NADPH ყველა შემთხვევაში თავის დადებით შედეგს ავლენდა და გამოცდილ ქსენობიოტიკთა ჟანგვას აძლიერებდა. რაც შეეხება კუმოლის ჰიდროპეროქსიდს, სიმინდში აღებული სუბსტრატების მიმართ იგი აბსოლუტურად არამგზნობიარე აღმოჩნდა. ასევე არაეფექტურია მისი კოსუბსტრატად გამოყენება სოიაში ანილინის p-ჰიდროქსილირებაში. სამაგიეროდ ამ მცენარეში მისი გავლენით ძლიერდება პირველი ტიპის სუბსტრატთა N-დემეთილირება. მაშასადამე, როგორც სიმინდში, ასევე სოიაში ადგილი აქვს პირველი ტიპის სუბსტრატთა მონოოქსიგენაზური NADPH-დამოკიდებული ჟანგვის, ზოლო სოიაში პირველი ტიპის ჰიდროპეროქსიდ-დამოკიდებული (რადიკალური) ჟანგვის გაძლიერებას.

NADPH- და კუმოლის ჰიდროპეროქსიდ-სტიმულირება მნიშვნელოვნად (~50-65%-ით) ითრგუნება სპილენძ-თიროზინის კომპლექსის გამოყენებისას. აღმოჩნდა, რომ მისი ეფექტიანობა მნიშვნელოვანწილადაა დამოკიდებული როგორც დასაჟანგი ქსენობიოტიკის ტიპზე, ასევე მცენარის სახეობაზე. მიღებული შედეგები ჟანგვის რეაქციებში

სუპეროქსიდ ანიონ-რადიკალის მონაწილეობაზე მიუთითებენ, თუმცა ძნელი სათქმელია ამ შემთხვევაში ისინი ჰიდროქსილირების აქტში უშუალოდ ერთვებიან, თუ რეკომბინაციას განიცდიან და სინგლეტურ ჟანგბადს და შესაბამისად სინგლეტურ ოქსენოიდს იძლევიან, ამასთან ერთად უსათუოდ გასათვალისწინებელია ერთი უაღრესად მნიშვნელოვანი გარემოება: მრავალი ქსენობიოტიკის ჰიდროპეროქსიდურ ჟანგვას არასასურველ დამატებით პროცესად თან ახლავს ციტოქრომების – P450-ისა და b5-ის დესტრუქცია [111, 112, 118, 119], ანუ შუნტირებულ სისტემებში ჰიდროპეროქსიდები ციტოქრომ P450-ის სწრაფ ინაქტივაციას იწვევენ. ამიტომ მოდელურ სისტემებზე მუშაობისას, სადაც ჰიდროპეროქსიდის კოსუბსტრატად გამოყენების საჭიროება აუცილებელია, დიდი სიფრთხილეა საჭირო. საერთოდ კი დღემდე შექმნილი მონოოქსიგენაზის ნებისმიერი შედარებით ოპტიმალურად მიჩნეული მოდელი მაინც ბუნებრივთან მაქსიმალურად მიახლოების მცდელობა უფროა და არასრულად ასახავს პროცესების ჭეშმარიტ არსს. აქ აშკარად ვლინდება მიკროსომული მაჰიდროქსილირებელი სისტემის „კონსერვატიული“ ბუნება. იგი უპირატესობას ანიჭებს ჟანგბადის აქტივაციისა და სუბსტრატში მისი ჩანერგვის ევოლუციურად „გატკეპნილ“ სტადიურად რეალიზების ნაცად გზას და ვერ ითმენს ხელოვნურად „დამოკლება-გამარტივების“ ვარიანტს, ანუ მკვლევარის მიერ უნებართვოდ მის „პირად ცხოვრებაში ცხვირის ჩაყოფას“.

დასასრულს რა შეიძლება დამატებით ითქვას კიდევ ქსენობიოტიკთა ჰიდროქსილირებაში მონაწილე ჟანგბადის აქტიური ფორმის შესახებ?

უნდა ვაღიაროთ, კვლავაც სადისკუსიოდ რჩება მოსაზრება, რომლის თანახმადაც ჭეშმარიტ მაჰიდროქსილირებელ აგენტს სუპეროქსიდ ანიონ-რადიკალი უნდა წარმოადგენდეს და ამის სასარგებლოდ

ორი საკმაოდ საფუძვლიანი არგუმენტი შეიძლება დასახელდეს:

1. მიკროსომაში ამ ნაწილაკის ორი მძლავრი გენერატორი ფუნქციონირებს: პირველი მათგანი აღდგენილი NADPH-ციტოქრომ P450-რედუქტაზაა. ეს ფლავოპროთეინი ჟანგვისას სწორედ O_2^- -ებს იძლევა [120]. მეორე მძლავრი წყარო თვით ციტოქრომ P450-ია. ოქსიგენირებულ მდგომარეობაში იგი აუტოდაჟანგვას განიცდის და უხვად წარმოქმნის სუპეროქსიდებს [121-123].

2. მთელი რიგი ქსენობიოტიკების ჟანგვითი დემეთილირების რეაქციებზე ორვალენტური სპილენძის ნაერთები (სუპეროქსიდლისმუტაზის ანალოგები) ძლიერ მაინჰიბირებელ ზემოქმედებას ავლენენ [123].

მოყვანილი არგუმენტაციის მიუხედავად სუპეროქსიდ ანიონ-რადიკალი მაინც არ შეიძლება რეალურ მაჰიდროქსილირებელ ნაწილაკად ვაღიაროთ და მთავარი მიზეზი თვითონ მის თვისებაშია: იგი ძლიერ სუსტი დამჟანგველია და ფიზიოლოგიურ პირობებში ვერ ჟანგავს მიკროსომული სისტემის ისეთ ტიპურ სუბსტრატებსაც კი, როგორიც ალიფატური და არომატული ნახშირწყალბადები ან N-ალკილამინებია [53].

დემეთილირების რეაქციებზე სპილენძის ნაერთების მაინჰიბირებელ მოქმედებას რაც შეეხება, შემდგომში ამ რეაქციათა დეტალურმა შესწავლამ ნათლად აჩვენა, რომ $CuCl_2$ -ის ზემოქმედებისას არაკონკურენტულ, ხოლო $Cu-Tyr_2$ -ის, $Cu-Lys_2$ -ისა და $Cu-EDTA$ -ს შემთხვევაში შერეული ხასიათის ინჰიბირებას აქვს ადგილი [123]. დადგინდა აგრეთვე, რომ სპილენძის კომპლექსური ნაერთები ციტოქრომ P450-თან დაკავშირებაში სუბსტრატთან აქტიურად კონკურირებენ კიდევ.

დ. მეტელიცას [124] ლაბორატორიაში ჩატარებულმა გამოკვლევებმა დამაჯერებლად აჩვენეს, რომ ჰიდროპეროქსიდურ სისტემებში ორვალენტური სპილენძის ნაერთთა მაინჰიბირებელი მოქმედება დაკავშირებულია ციტოქრომ P450-ის დესტრუქციასთან და ამ ჰემო-

პროტეიდის დაშლასთან რადიკალთ, რომელიც სპილენძის კომპლექსებთან ჰიდროპეროქსიდების ურთიერთქმედების შედეგად წარმოიქმნებიან. თიროზინურ და განსაკუთრებით ლიპიდურ კომპლექსებს ციტოქრომ P450-თან დაკავშირებაში სუბსტრატებთან კონკურირება შეუძლიათ, რითაც შეიძლება აიხსნას დემეთილირებისა და ჰიდროქსილირების რეაქციებში სპილენძის კომპლექსური ნაერთებით ინჰიბირების შერეული ტიპი. მაშასადამე, ციტოქრომ P450-თან ჰიდროპეროქსიდულ სისტემაში სუპეროქსიდური ნაწილაკის გენერაცია საერთოდ არ ხდება, ანუ სრულ მონოოქსიგენაზურ სისტემაში მიმდინარე ჟანგვის რეაქციათა უმრავლესობა ეფექტურად შეიძლება ორგანულ ჰიდროპეროქსიდებთან მხოლოდ დაჟანგული ციტოქრომ P450-თან შეთანაწყობით განხორციელდეს [107, 124, 125]. ამ დროს მაჰიდროქსილირებელ ნაწილაკად შეიძლება წინა პლანზე ამ ჰემოპროტეიდის ფერილ-წარმოებული ($\text{Fe}^{3+}\text{O} \leftrightarrow \text{Fe}^{4+}\text{O}^-$) გამოვიდეს, რომელსაც ჟანგბადის სუბსტრატზე ოქსენოიდური მექანიზმით გადატანა შეუძლია.

6. ენდოპლაზმური რეტის კულუმის მემბრანები და მონოოქსიგენაზურ სისტემაში მათი კოფაქტორული როლი

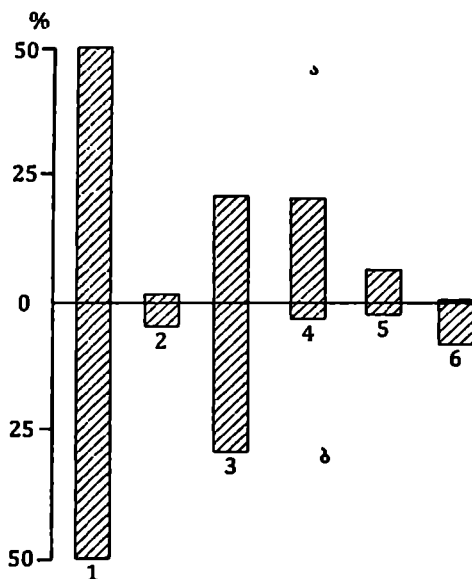
მემბრანული სისტემა უჯრედისათვის სასიცოცხლოდ მნიშვნელოვან სტრუქტურულ და ფუნქციონალურ ერთეულს წარმოადგენს. პლაზმური მემბრანა უჯრედს გარემოსაგან ანმხოლოებს და მაღალი შერჩევითობის მქონე განვლადობის ბარიერს ქმნის. მემბრანაში უამრავი სატრანსპორტო ცილა-ფერმენტი იმყოფება, რომლებიც შიდაუჯრედული შიგთავსის მეტნაკლებად მუდმივ მოლეკულურ და იონურ შემცველობას უზრუნველყოფს, ანუ სათანადო შიდაუჯრედულ „მიკროკლიმატს“ აყალიბებენ.

რთულ მემბრანადაკავშირებულ ფერმენტულ სისტემათა სპეციფი-

კურ მოქმედებაში უაღრესად დიდი როლი ბიომემბრანების ფოსფოლიპიდურ კომპონენტებს ენიჭებათ. დიდი ხანია, რაც ჩვენი წარმოდგენები გასცდა იმ არსებულ დოგმას, რომლის მიხედვითაც ბიომემბრანათა საერთო კონსტრუქციაში ამ კლასის ნაერთების მხოლოდ სტრუქტურულ, ანუ შემაკავშირებელ („შტატივის“ ან „დასამაგრებელი ბლოკის“) ფუნქციას უთმობდნენ [126]. სადღეისოდ უკვე ცნობილია, რომ მათ სხვა მრავალმხრივი ფუნქციებიც გააჩნიათ. ამ ნივთიერებათა ამფიფატური (ორმაგთვისებიანი) ბუნება ამის მტკიცების სრულ საფუძველს გვაძლევს. მათ მაღალი დენადობა, სიგრძივი დაგეგმარებით ჰეტეროგენურობა და განივი დაგეგმარებით ასიმეტრული განაწილება ახასიათებთ (ნახ. 11). ჰიდროფობურ ლიპიდ-ცილური ურთიერთქმედების მნიშვნელოვანი როლი საბოლოოდაა გამოვლენილი მიკროსოპულ ფოსფოლიპიდურ კომპონენტებსა და მონოოქსიგენაზურ ფერმენტულ სისტემათა შორის. უკვე სავსებით სარწმუნოდაა მიღებული, რომ მონოოქსიგენაზების რეაქციათა კინეტიკა სრულად ემორჩილება იმ თავისებურებებს, რომლებიც კი მხოლოდ ლიპიდ-წყლის ბიფაზურ სისტემაში მოფუნქციონირე ფერმენტათვისაა დამახასიათებელი [127-131].

მოგვყავს ის არასრული ჩამონათვალი (ჩვენთვის ჯერაც უცნობი ფუნქციების გარდა), რომელთა ერთიანობა ბიომემბრანათა გავლენით მრავალი ფერმენტის მოქმედების ეფექტურობის ახსნის საშუალებას გვაძლევს:

1. ცილების აქტიური კონფორმაციის შექმნა და მისი სტაბილიზება;
2. ფერმენტულ კომპლექსებში ცალკეულ კომპონენტთა აგრეგირება;
3. ცილა-ფერმენტის ჩაკეტილი უწყვეტი სტრუქტურის წარმოქმნა;
4. მემბრანაში მიმდინარე რეაქციებისათვის ოპტიმალური ჰიდროფობური გარემოს შექმნა;
5. ცხიმში ხსნადი ნივთიერებების ტრანსპორტის შემსუბუქება.

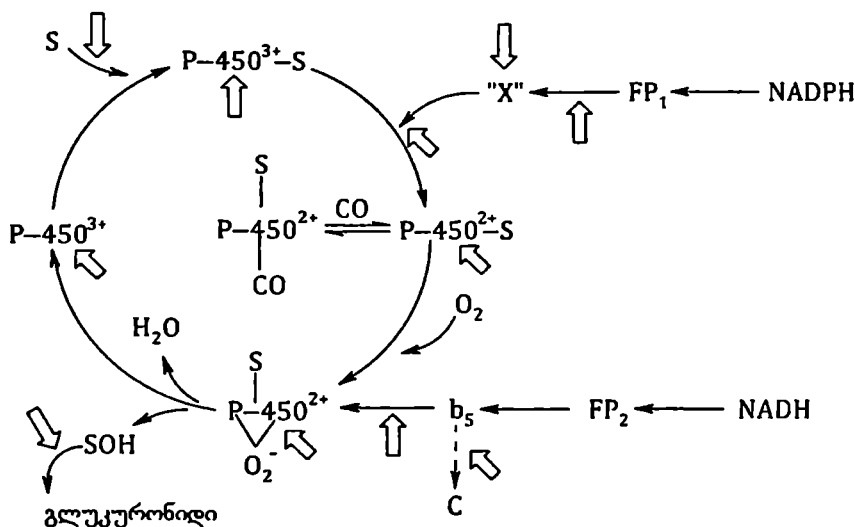


ნახ. 11. ფოსფოლიპიდების ასიმეტრიული განაწილება მიკროსომული მემბრანის განივ ჭრილში [128]. ა. ენდოპლაზმური მემბრანის „ციტოპლაზმური“ მხარე; ბ. ენდოპლაზმური არხის სანათურისაკენ მიმართული მხარე. 1. ფოსფოლიპიდების საერთო რაოდენობა; 2. სფინგომიელინი, 3. ფოსფატიდილქოლინი; 4. ფოსფატიდილეთანოლამინი; 5. ფოსფატიდილსერინი; 6. ფოსფატიდილინოზიტოლი.

ქსენობიოტიკთა ჰიდროქსილირების რთული პროცესის პრაქტიკულად ყველა სტადიაზე ფოსფოლიპიდების მოქმედების უბნები დეტალურადაა განხილული და გაანალიზებული ვ. ლიაზოვიჩისა და ი. ცირლოვის მონოგრაფიასა და [128] და მიმოხილვით პუბლიკაციაში [129] (ნახ. 12). ამ სქემის თანახმად:

1. ფოსფოლიპიდები მემბრანასთან დაკავშირებული მონოოქსიგენაზასთვის ჰიდროფობურ გარემოს ქმნიან;

2. ფოსფოლიპიდები ხელს უწყობენ ჰიდროფობური სუბსტრატების ციტოქრომ P450-თან დაკავშირებას;
3. ფოსფოლიპიდები ოპტიმალურ პირობებს ქმნიან ციტოქრომ P450-ისა და NAD(P)H-რედუქტაზას ურთიერთქმედებისათვის;
4. ფოსფოლიპიდები გავლენას ახდენენ მიკროსომულ რედოქს-ჯაჭვში ელექტრონთა ტრანსპორტზე.



ნახ. 12. მიკროსომული ფოსფოლიპიდების მონაწილეობა მონოოქსიგენაზური სისტემის ფუნქციონირებაში [129]. ისრებით მითითებულია მონოოქსიგენაზური სისტემის კომპონენტები და რეაქციები.

ეს ჩამონათვალი აშკარად მიუთითებს იმ ფაქტზე, რომ ფოსფოლიპიდები მონოოქსიგენაზებისთვის კოფაქტორის ფუნქციის მატარებელი არიან. მათ მნიშვნელოვან დანიშნულებას არამარტო სტრუქტურისა და ფუნქციის მთლიანობის შენარჩუნება, არამედ ცალკეულ რეაქციებში აუცილებელ კომპონენტად მონაწილეობაც წარმოადგენს.

სადღეისოდ არ გაგვაჩნია მონაცემები მხოლოდ ფოსფოლიპიდების როლზე ჰიდროქსილირების ჯერაც ისეთ იდუმალებით მოცულ სტადიაში, როგორიც სუბსტრატში გააქტივებული ჟანგბადის ჩანერგვაა.

ძლიერ მოკლედ განვიხილოთ ენდოპლაზმური რეტიკულუმის მორფოლოგია და მისი ლიპიდ-ცილური შემადგენლობა. უჯრედის ძირითად პლაზმაში (ჰიალოპლაზმაში) იდენტიფიცირდება არასტრუქტურული სუბსტანცია – მატრიქსი და შიდაუჯრედული მემბრანული სისტემა. ელექტრონული მიკროსკოპიით ნაჩვენებია, რომ იგი მთელ ენდოპლაზმურ ზონას მოიცავს და ამიტომ ენდოპლაზმური რეტიკულუმის, ანუ ენდოპლაზმური ბადის სახელი აქვს მიკუთვნებული (ნახ. 13). დიფერენციალური ცენტრიფუგირებით ($105-150 \cdot 10^3$ გ-ზე) ენდოპლაზმური მემბრანები ნახევრად გამტარ სფერული ფორმის პროტეოლიპოსომურ (ცილებისა და ცხიმების შემცველ) ბუშტებად იკვრებიან, რომელთა შიდა და გარე ზედაპირები ისევეა ორიენტირებული, როგორც *in vivo* მემბრანებში. სინათლის მიკროსკოპით ამ ნაწილაკების დანახვა შეუძლებელია და ამიტომ მათ მიკროსომებს ანუ მიკროსხეულებს უწოდებენ [132].

ენდოპლაზმური მემბრანები არაერთგვაროვანი, რთული წნულის მქონე სისტემაა და ძირითადად არხების, ცისტერნების, ფირფიტებისა და ბუშტებისაგან შედგება 1 მლ მოცულობის მემბრანის ფართობი, რომელიც მორფომეტრული გაზომვებითაა მიღებული ~ 11 მ²-ს შეადგენს და ყველა სხვა დანარჩენი უჯრედული მემბრანების ზედაპირს გაცილებით აღემატება.

ენდოპლაზმური მემბრანების არაერთგვაროვნება იმაშიც გამოიხატება, რომ მორფოლოგიურად მათი ორი, – გლუვი და ზორკლიანი ნაირსახეობა ვლინდება. ამ უკანასკნელის (გრანულარული ანუ აციტომემბრანის) მატრიქსისაკენ მიქცეულ ზედაპირზე 10-15 ნმ დიამეტრის მქონე რიბონუკლეოპროტეიდული გრანულები (რიბოსომები)

არიან განლაგებული. ზორკლიანი მემბრანების სისქე ~6 ნმ-ის რიგისაა და ისინი გარედან 30-35 ნმ-ის სიგანის მქონე სიღრუეებს მოიცავენ და ამგვარად არხებსა და ცისტერნებს წარმოქმნიან. გლუვი, აგრანულარული მემბრანები (β-ციტომემბრანები) არასწორი ფორმის სიღრუებითაა შემოსაზღვრული და რაიმე რეგულარულ წარმონაქმნებს ან რიბოსომებს არ შეიცავენ.



ნახ. 13. სიმინდის ნაზარდების ფესვთა ენდოპლაზმური რეტიკულუმის მემბრანები [132]. ნათლად ჩანს მემბრანის ორშრიანობა და მათ შორის არსებული არხები (ნათელი ზოლები). მემბრანათა ზედაპირზე არსებული მუქი წერტილები რიბოსომებია ($\times 75000$).

არჩევენ მიკროსომების სამ შემადგენელ ნაწილს: 1. საკუთრივ მემბრანას, 2. ბუშტის შიდა სივრცეს თავისი შიგთავსით (ცილებით, ფოსფოლიპიდებით, ნუკლეინმჟავებით, ქოლესტეროლით) და 3. მემბრანის გარე ზედაპირზე სორბირებულ ცილურ და არაცილურ ნაერთებს.

ზორკლიან და გლუვ მემბრანებში ცილის შემცველობა დაახლოებით თანაბარია. ასევე თანაბრად ნაწილდებიან ამ ქვეფრაქციებში

ფოსფოლიპიდებიც და ქოლესტეროლიც, რაც მიკროსომული მემბრანების ქიმიური შემადგენლობის ჰომოგენურობაზე მეტყველებს. ამდენად ენდოპლაზმური, მემბრანები და მიკროსომები ქიმიურად ექვსვალენტურნი არიან.

ენდოპლაზმური რეტიკულების მემბრანები ძირითადად ლიპიდური ბუნების წარმონაქმნებია. ესაა ნივთიერებათა საკმაოდ დიდი კლასი, რომელსაც დაბალმოლეკულურ ორგანულ ნაერთებს აკუთვნებენ. ქიმიური შემადგენლობით ისინი მრავალფეროვნებით გამოირჩევიან. ხშირად ნივთიერებათა ამ კლასში საკუთრივ ლიპიდების გარდა სტეროლებს, ტერპენებს და პროსტაგლანდინებსაც აერთიანებენ. ცხიმოვან მჟავებთან ერთად მემბრანებში იმყოფებიან ქიმიურად ბმული სპირტები, აზოტოვანი ფუძეები, ნახშირწყლები და სხვ.

თავისი სპეციფიკური ბუნებიდან გამომდინარე, წყლოვან ფაზაში, აგრეთვე წყლისა და ჰაერის გამყოფ ზედაპირზე ლიპიდები არაკოვალენტური ურთიერთქმედებით გიგანტურ აგრეგატებს წარმოქმნიან, რომლებიც გარკვეული აზრით „ბიოპოლიმერებად“ შეიძლება ჩაითვალოს. ამიტომ ცილებთან, ნუკლეინმჟავებთან და ნახშირწყლებთან ერთად მემბრანულ ლიპიდებს „დიდ ოთხეულში“ დამსახურებული ადგილი ეთმობათ [132].

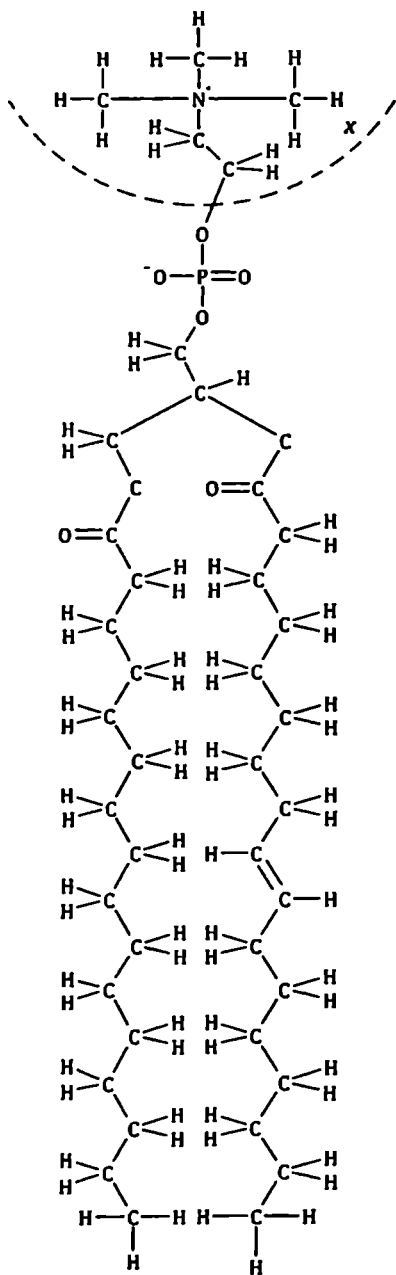
ორგანიზმისათვის ლიპიდებს კარდინალური მნიშვნელობა აქვთ, რამდენადაც არაუმცირეს ხუთ ფუნდამენტურ ფუნქციას ასრულებენ:

1. წარმოადგენენ ბიოლოგიური მემბრანების აუცილებელ სტრუქტურულ-ფუნქციონალურ კომპონენტებს;
2. წარმოადგენენ ფორმას, რომლის სახითაც მეტაბოლური საწვავი დეპონირდება;
3. წარმოადგენენ ფორმას, რომლის სახითაც მეტაბოლური საწვავი ტრანსპორტირდება;
4. ასრულებენ თერმორეგულატორულ ფუნქციას;

5. მონაწილეობენ უჯრედული განვითარების რეგულაციასა და ადგილობრივ სორბციულ პროცესებში [133].

მემბრანული ლიპიდების მნიშვნელოვან ჯგუფს მიეკუთვნებიან ფოსფოლიპიდები. სხვაგვარად მათ გლიცეროფოსფოლიპიდებს, გლიცეროფოსფატებს ან ფოსფოგლიცერიდებსაც უწოდებენ. ისინი გლიცერინისა და მაღალმოლეკულურ ცხიმოვან მჟავათა ორი ნაშთის ესთერებია და ამდენად დიგლიცერიდებს წარმოადგენენ. მესამე ცხიმოვანი მჟავის ადგილს ფოსფატური ჯგუფი იკავებს. მემბრანებში ამ ტიპის ხუთი ფოსფოლიპიდია იდენტიფიცირებული: თავისუფალი ფოსფატური ჯგუფის შემცველი ფოსფატიდის მჟავა, და ოთხი ფოსფოლიპიდი, რომლებშიც ფოსფატურ ჯგუფთან ქოლინი, ინოზიტი, B-ჯგუფის ვიტამინები ან ეთანოლამინია (ამინოსპირტი) მიერთებული. ამგვარად ფოსფოლიპიდთა მოლეკულები პოლარული „თავისა“ და ორი არაპოლარული ნახშირწყალბადოვანი „კუდისაგან“ შედგებიან (ნახ. 14). ამიტომ მათ ამფიფილურ (ამფიფატურ) ლიპიდებსაც უწოდებენ [132]. ესაა ორი საპირისპირო თვისების, – ჰიდროფობულის (აცილური ჯგუფის) და ჰიდროფილურის (მთავარი პოლარული ჯგუფის) ერთდროულად შემცველი ნივთიერებები.

ფოსფოლიპიდების მნიშვნელოვანი თვისება იმაში მდგომარეობს, რომ მემბრანის ბიშრეში ისინი თხევადკრისტალურ (თხევადმოზაიკურ) მდგომარეობაში იმყოფებიან და ლლობის გარეშე ორ განზომილებაში გადაადგილების უნარი აქვთ. ამდენად, თხევადკრისტალური მდგომარეობა წარმოადგენს სტრუქტურულ საფუძველს, რომელიც მოწესრიგებული კარკასის შიგნით მემბრანის კომპონენტთა ძვრადობას უზრუნველყოფს. ფოსფოლიპიდებს მყარი გელიდან თხევადკრისტალურ მდგომარეობაში ფაზური გადასვლა ახასიათებთ და ეს პროცესი სითბურ ეფექტთანაა დაკავშირებული.



ნახ. 14. ფოსფატილქოლინის (ლექციტინის) სტრუქტურა. ეს ამფიფატური მოლეკულა ჰიდროფილურ „თავს“ (გამოყოფილია ტეხილი მრუდით) და ჰიდროფობურ კუდს შეიცავს, რომელთაგანაც ერთი ნაჯერია (მარცხენა მხარე) მეორე უჯერი (მარჯვენა მხარე).

ფაზური გადასვლა წარმოებს კოოპერატიულად მოცემული ფოსფორლიპიდისათვის განსაზღვრულ ტემპერატურაზე. სრულად ნაჯერი ცხიმბაჟების მქონე ფოსფოლიპიდებისათვის ფაზური გადასვლის ტემპერატურა ჯაჭვის სიგრძის ზრდასთან ერთად მატულობს. ცხიმბაჟების ჯაჭვებში ცის-კონფიგურაციისას თუნდაც ერთი ორმაგი ბმის შეცვლა ფაზური გადასვლის ტემპერატურას მკვეთრად აქვეითებს. ტუბემწოვართა უჯრედების ფოსფოლიპიდთა უმრავლესობასულ მცირე ერთ ორმაგ ბმას მაინც შეიცავს, და ამიტომ მათი ფაზური გადასვლის ტემპერატურა სხეულის ტემპერატურაზე შედარებით დაბალია.

ფოსფოლიპიდთა ნარეგებს კომპონენტთა ურთიერთშერევის განსხვავებული ხარისხი გააჩნიათ. ნარეგში, სადაც კომპონენტები ფაზური გადასვლის ტემპერატურებით ერთმანეთისაგან ძლიერ განსხვავდებიან, ორი ერთმანეთისაგან დამოუკიდებელი ფაზური გადასვლა შეინიშნება. ეს იმის მაჩვენებელია, რომ თხევადკრისტალურ და გელის მდგომარეობაში მყოფი ფოსფოლიპიდები ნამდვილად წარმოქმნიან ორ ცალკეულ ფაზას. აქედან გამომდინარეობს, რომ ფოსფოლიპიდურ ბიშრეში შეიძლება ფაზათა ლატერალური (განივი) დაცალკეება ხდებოდეს.

ენდოპლაზმური მემბრანები ფოსფოლიპიდებთან ერთად ცილების მრავალფეროვანი ანაკრებით გამოირჩევიან. აქ ისინი მემბრანის მასის 50%-ს შეადგენენ. ზოგიერთი ცილის მემბრანიდან გამოყოფა რბილი დამუშავებით (მაგ., მაღალი იონური ძალის მქონე NaCl-ის ხსნარით) შეიძლება მოხდეს. მემბრანებთან მტკიცედ დაკავშირებული ცილების გამოცალკეება მხოლოდ დეტერგენტებით, ან რომელიმე ორგანული გამხსნელითაა შესაძლებელი. კავშირის სიმტკიცისაგან დამოკიდებულებით მემბრანულ ცილებს ორ ფართო ჯგუფად ყოფენ. პირველს პერიფერიული ანუ გარეგანი ცილები მიეკუთვნებიან, რომლებიც გან-

სხვაგვარი pH-ის ან იონური ძალის მქონე კომპლექსწარმოქმნელი აგენტის (მაგ., EDTA-ს) შემცველი ხსნარებით დამუშავებით (გამორეცხვით) ნალექსზედა სითხეში გადადიან. მეორე ჯგუფი შინაგანი ანუ ინტეგრალური ცილებია, რომლებიც მემბრანული ლიპიდების ნახშირბადურ ჯაჭვებთან მრავალრიცხოვან კავშირებს ქმნიან და ამიტომ მემბრანიდან მათი გამოცალკევება მხოლოდ ისეთი აგენტებით შეიძლება განხორციელდეს, რომლებიც არაპოლარულ ურთიერთქმედებებში კონკურენტულად მონაწილეობენ და ორმაგი შრის ფოსფოლიპიდური სტრუქტურის დარღვევას იწვევენ. ინტეგრალური ცილების მოლეკულათა მხოლოდ ნაწილია წყალთან უშუალო შეხებაში; მნიშვნელოვანი ნაწილი კი ცხიმშია „ჩაძირული“, ანუ ძირითადად ჰიდროფობური ამინომჟავებისაგან არიან შემდგარი.

ცილებსა და ლიპიდურ ბიშრეს შორის ძლიერი ჰიდროფობური ურთიერთქმედება არსებობს. ამ დროს ფოსფოლიპიდთა მოლეკულების ჰიდროფობული „კუდები“ მემბრანის ზედაპირისაღმეც ისე ორიენტირდებიან, რომ მემბრანის სისქე შემცირებას განიცდის. სამაგიეროდ იზრდება ბიშრის ზედაპირზე ფოსფოლიპიდის ყოველი მოლეკულის მიერ დაკავებული ზვედრითი ფართობი. ყოველივე ამის შედეგად ენდოპლაზმურ მემბრანაში წარმოიქმნებიან „კლასტერის“ პრინციპით ორგანიზებული უბნები, რაც მემბრანასთან ხისტად დაკავშირებულ ფერმენტულ კომპლექსებს გულისხმობს. კლასტერის შემადგენლობაში შედიან ისეთი ფოსფოლიპიდებიც, რომლებიც თავისი მახასიათებლებით მემბრანულ ლიპიდთა საერთო მასიდან რამდენადმე განსხვავდებიან. არსებობს ჰიპოთეზა, რომლის თანახმადაც მიკროსომულ მემბრანაში უნდა იმყოფებოდეს სუსტად ძვრადი გადამტანების კონები ანუ დაუმთავრებელი შენების კლასტერები, რომლებშიც ახალი დამატებით რეოქს-კომპონენტები შეიძლება ჩაშენდეს. ამ შემთხვევაში მეტაბოლური თვალსაზრისით NADPH-სპეციფიკური ჟანგვის სის-

ტემის მოძრავი კომპონენტები გადამწყვეტ როლს არ უნდა ასრულებდნენ და მათი ეფექტურობის ზრდა მხოლოდ მეგზრანასთან საკმაოდ მტკიცედ დაკავშირებული კომპლექსის, ანუ კლასტერად ჩამოყალიბების შედეგად მიიღწევა [132].

აღნიშნულთან დაკავშირებით ჩვენს ლაბორატორიაში ჩატარებული გამოკვლევებით [134] ნაჩვენები იქნა, რომ სოიასა და სიმინდის გაჯირჯეებული ლეზნების თხელ ანათლებზე ტრიტონ X-100-ის (დეტერგენტის) დამატებით ამილოპირინისა და დემეთილანილინის N-დემეთილირება, აგრეთვე ანილინის p-ჰიდროქსილირება 65-85%-ით ითრგუნება. ამავე დროს N-დემეთილაზური აქტივობის სრული და p-ჰიდროქსილაზური აქტივობის 60%-ით აღდგენა საინკუბაციო ხსნარში ფოსფატიდილქოლინის (ქათმის კვერცხიდან მიღებული „ნედლი“ ლეციტინის სახით) დამატებით ხერხდება. აქ საყურადღებოა ერთი გარემოება: ფოსფოლიპიდის მასტიმულირებელი ეფექტი აბსოლუტურად ერთნაირია იმის მიუხედავად საინკუბაციო არეში იგი დეტერგენტთან ერთად შეიტანება, თუ დეტერგენტული ინჰიბირების შემდეგ ემატება. ამდენად, ფოსფატიდილქოლინის მოქმედებას ორნაირი ახსნა შეიძლება მიეცეს: დეტერგენტის თანამყოფობისას ეს ფოსფოლიპიდი მონოოქსიგენაზის ირგვლივ ლიპიდდამოკიდებელ ჰიდროფობურ ზღუდეს ქმნის და ციტოქრომ P450-ის აქტიურ ცენტრს დეტერგენტისადმი შეუვალს ზღის. ინჰიბირების შემდეგ ფოსფოლიპიდი როგორც ჩანს, ფერმენტის აქტიური ჰიდროფობური უბნიდან აძევებს დეტერგენტს და მის ირგვლივ კვლავ ნატიური კლასტერის აღდგენას ემსახურება. აქვე უნდა შევნიშნოთ, რომ ფოსფატიდილქოლინის გავლენით სრულად იხსნება და მნიშვნელოვნად სტიმულირდება კიდევ სპილენძ-თიროზინის კომპლექსით ინჰიბირებული NADPH- და კუმოლის ჰიდროპეროქსიდ სტიმულირებული N-დემეთილირებისა და p-ჰიდროქსილირების რეაქციები [117]. ნავარაუდევია,

რომ ეს ფოსფოლიპიდი მემბრანასა და ციტოქრომ P450-ს იცავს იმ თავისუფალი რადიკალების დამანგრეველი ზემოქმედებისაგან, რომლებიც სპილენძ-თიროზინის კომპლექსისა და კუმოლის ჰიდროპეროქსიდის ურთიერთქმედების შედეგად გენერირდებიან.

ენდოპლაზმურ მემბრანებსა და მონოოქსიგენაზურ სისტემას შორის საინტერესო დამოკიდებულებას შევნიშნავთ, თუ მათ ურთიერთობას ევოლუციური განვითარების კუთხით განვიხილავთ.

სიცოცხლის უმარტივესი ფორმები – პროკარიოტები ხსნადი ფორმის ციტოქრომ P450-ს შეიცავენ. ეუკარიოტულ ფორმებზე გადასვლას კი ამ ცილის მემბრანაში ჩაშენება მოჰყვა. მაგალითად, სოკოს ზოგიერთი სახეობა (*Saccharomyces cerevisiae*, *Penicillium petuum*, *Claviceps purpurea* და სხვ.) ამ ჰემოპროტეიდს უკვე მემბრანაში ჩაშენებულს შეიცავს [135-137]. საყურადღებოა ის ფაქტი, რომ ისეთ ეუკარიოტულ მიკროორგანიზმში, როგორიც *Candida tropicalis*-ია, ციტოქრომ P450-ს ხსნადი ფორმით შეიცავს, მაგრამ თავისი აქტივობის გამოსავლენად ფოსფოლიპიდის თანამყოფობას საჭიროებს [138]. საფიქრებელია, რომ ხსნადიდან მემბრანულ ფერმენტზე გადასვლა ამ შუალედი ფორმის გავლით ხდება.

ამგვარად, ციტოქრომ P450 იმ უნიკალურ ცილას წარმოადგენს, რომელიც ყველაზე პრიმიტიული ფორმებიდან ბუბუმწოვრებამდე ევოლუციური კიბის ყველა საფეხურებზე იქნა შემონახული და ბოლოს მემბრანაში ჩაშენების თვისება შეიძინა. ასეთ სტრუქტურას „მეზუთელს“ უწოდებენ და ეს უმაღლესი ორგანიზაციული დონე მულტიფერმენტული სისტემებისათვისაა დამახასიათებელი. ციტოქრომ P450-მონოოქსიგენაზურ სისტემას მთლიანობაში თუ განვიხილავთ, აქაც შეიძლება უაღრესად საინტერესო ევოლუციური კანონზომიერება შევნიშნოთ (ცხრილი 1) [101].

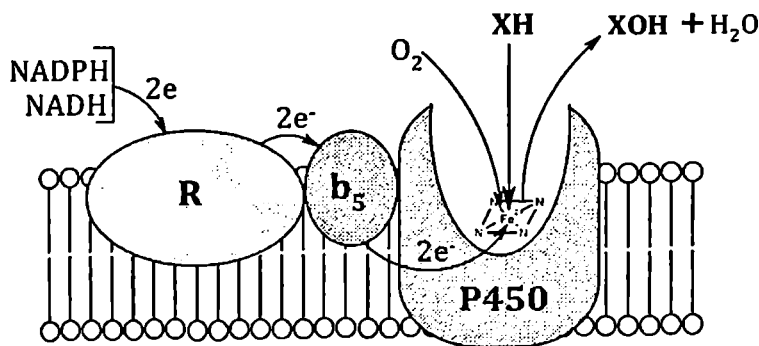
ციტოქრომ P450-შემცველი მონოოქსიგენაზური სისტემები

ბიოლო- გური ობიექტი	ლოკა- ლიზაცია უჯრედში	კომპონენტები	კომპონენტის თვისებები	ფუნქცია
<i>Ps. putida</i>	ხსნადი ფრაქცია	NADH- სპეციფიკური ფლავოპროთეიდი, პუტიდარედოქსინი, ციტოქრომ P450	ხსნადი ხსნადი ხსნადი	ქაფურის, როგორც ნახშირბადის წყაროს დაქანგვა
თირკმელ- ზედა ჯირკვალი	მიტოქონდ- რიული ფრაქცია	NADPH- სპეციფიკური ფლავოპროთეიდი, ადრენოქსინი, ციტოქრომ P450	ხსნადი ხსნადი მემბრანული	ქოლესტერინისა და სხვა სტეროლების ქანგვა
ღვიძლი	მიკოსო- მული ფრაქცია	NAD(P)H- სპეციფიკური ფლავოპროთეიდი, ციტოქრომ b ₅ , ციტოქრომ P450	მემბრანული მემბრანული მემბრანული	ქსენობიოტიკე- ბისა და სტერო- ლების ქანგვა ორგანიზმიდან მათი გამოდევნის მიზნით

ცხრილ 1-ში დაჯამებულია მონაცემები მონოოქსიგენაზათა თავი-
სებურებებსა და შემადგენლობაზე. მასში ვხვდებით, რომ შეიძლება
სამი ძირითადი მოლეკულური ორგანიზაციის მქონე ტიპის გამოყოფა.
პირველი ევოლუციურად ყველაზე უძველესი ბაქტერიალური მონო-
ოქსიგენაზაა, რომელიც წყალში ხსნადი სამი კომპონენტისაგან
შედგება. *Ps. putida*-ს შემთხვევაში ესენია NADH-სპეციფიკური
ფლავოპროთეიდი, არაპემინური გოგირდშემცველი ცილა პუტიდარე-
დოქსინი და ციტოქრომ P450. პირველი ორი კომპონენტი ელექტ-
რონთა ტრანსპორტს ემსახურება. გარდა ამისა, პუტიდარედოქსინი

თავისებურ ეფექტორულ ცილას წარმოადგენს, რომელიც კატალიზურ აქტში უშუალოდ მონაწილეობს და ფერმენტის აქტიურ ცენტრში ხელს უწყობს სამმაგი კომპლექსის (ჰემის რკინა-ჟანგბადი-ქაფური) დაშლას და დაჟანგული პროდუქტის წარმოქმნას. ამ სისტემის დამახასიათებელი თავისებურება თავისი სუბსტრატის (ქაფურის) მიმართ აბსოლუტური სპეციფიკურობა და სუბსტრატის გარეშე ლაბილურობის მაღალი ხარისხია [139, 140].

ევოლუციური კიბის ყველაზე მაღალ საფეხურზე ღვიძლის ციტოქრომ P450-შემცველი მონოოქსიგენაზური სისტემა დგას (ნახ. 15). მისი სამივე კომპონენტი ჭეშმარიტი მემბრანული ცილაა. მრავლობითი ფორმების არსებობის გამო მას ფართო სპეციფიკურობა ახასიათებს და მრავალი ქიმიურად სრულიად განსხვავებული არაპოლარული მოლეკულების დაჟანგვა შეუძლია. ამდენად იგი ორგანიზმში კრძალავს ტოქსიკური ჰიდროფობური ნაერთების დაგროვებას [141, 142].



ნახ. 15. ცხოველის ღვიძლის ციტოქრომ P450-შემცველი მონოოქსიგენაზა (R-NAD(P)H-ციტოქრომ P450-რედუქტაზა (E.N. 1.6.2.4)).

ევოლუციური კიბის შუალედურ სტადიაზე თირკმელზედა ჯირკვლის მიტოქონდრიული ჰიდროქსილაზური სისტემა იმყოფება. იგი თავისში ბაქტერიული ხსნადი სისტემის ნიშნებს აერთიანებს: ორი კომპონენტი – ფლავოპროტეიდი და ადრენოლოქსინი წყალში ხსნადდება და მიტოქონდრიის მატრიქსში ლოკალიზდებიან, მესამე კომპონენტი – ციტოქრომ P450 ისევე როგორც მიკროსომების პეროტეიდი მემბრანაშია ჩაშენებული. ამასთან, მიტოქონდრიის შიდა მემბრანაზე ორი ფორმის ციტოქრომ P450 ფუნქციონირებს. ერთი მათგანი ქოლესტეროლის გვერდითა ალიფატური ჯაჭვიდან მე-20 და 22-ე მდგომარეობაში მყოფ ნახშირბადს აცილებს და პრეგნელონის წარმოქმნის; მეორე, კორტიკოსტეროიდების ბიოსინთეზისათვის პრეგნელონის ჟანგვას 11 β და 18- მდგომარეობაში აკატალიზებს [143-147], ყურადღებას იმსახურებს ამ ორივე პეროტეიდის მაღალი სუბსტრატული სპეციფიკურობა და ბაქტერიალურთან დიდი მსგავსება.

რა სურათი გვაქვს ამმხრივ მწვანე მცენარეში, ანუ როგორაა მონოოქსიგენაზური სისტემა ორგანიზებული მემბრანულ სტრუქტურასთან მიმართებაში? ჩვენს ლაბორატორიაში ჩატარებული გამოკვლევების საფუძველზე [148-151] მიღებულია შედეგები, რომელთა თანახმადაც მცენარეში ფუნქციონირებს ამ სისტემის ორი, – მემბრანდაკავშირებული და ხსნადი ფორმა. ნაჩვენები იქნა, რომ:

1. ციტოქრომ P450-ის და NADPH-დამოკიდებული ფლავოპროტეიდის აქტივობები (შესაბამისად CO-ით ინჰიბირებადი NADPH-დამოკიდებული N- და O- დემეთილირების რეაქციათა სიჩქარეები და ციტოქრომ C-ს ან $[K_3Fe(CN_6)]$ -ის აღდგენის სიჩქარე) გააჩნია როგორც მიკროსომულ ფრაქციას, ასევე მის სუპერნატანტს (ციტოზოლს);
2. ხსნადი (ციტოზოლური) მონოოქსიგენაზა არაა მიკროსომებიდან

„ამოგლეჯილი“ ფერმენტი. ბუფერით მიკროსომების მრავალჯერადი გამორეცხვით მიღებულ ხსნარს მონოოქსიგენაზური აქტივობა აბსოლუტურად არ გააჩნია, ანუ ფრაქციონირებისას მიკროსომებთან უჯრედის ხსნად ფრაქციაში მონოოქსიგენაზას კომპონენტთა მიგრაცია არ ხდება;

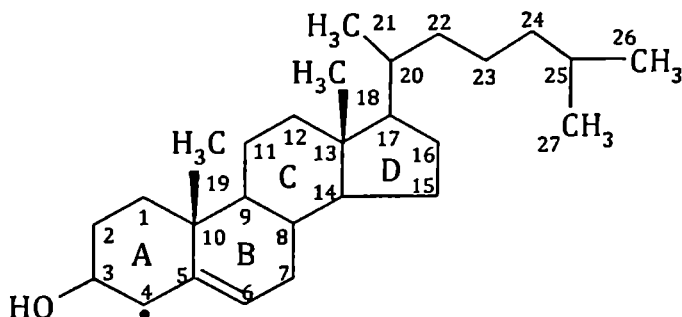
3. მიკროსომული და ციტოზოლური ფრაქცია ციტოქრომ P450-ისათვის დამახასიათებელ სპექტრულ მახასიათებლებს იძლევა;
4. იონური დეტერგენტის (დეზოქსიქოლატის) დამატებისას მიკროსომული მონოოქსიგენაზას აქტივობა მკვეთრ ვარდნას განიცდის და მისი სრული რეაბილიტაცია (შემდგომი სტიმულირებით) „ნედლი“ ლეციტინით შეიძლება განხორციელდეს. ამ ფოსფოლიპიდის თანამყოფობა ხსნადი ოქსიგენაზას აქტივობაზე პრაქტიკულად გავლენას არ ახდენს ანუ ფერმენტის ეს ფორმა ფუნქციონირებისათვის მემბრანის სტრუქტურულ ორგანიზებას არ საჭიროებს.

უნდა შევნიშნოთ, რომ ბოლო დასკვნის საფუძვლიანობას ადასტურებს მ. ზაპრომეტოვისა და ს. ერმაკოვას [152] მონაცემებიც, რომელიც ქერის ეთიოლირებულ აღმონაცენებზე ჩატარებული კვლევის შედეგადაა მიღებული.

ამგვარად, როგორც ვხედავთ ევოლუციური თვალსაზრისით ცხოველებთან შედარებით მცენარე გაცილებით გონიერულად „მოიქცა“. მან მონოოქსიგენაზური სისტემა მემბრანაში ჩააშენა, მაგრამ ამავდროულად შეინარჩუნა წინამორბედი ხსნადი ფორმაც, რითაც ორგანული ტოქსიკანტებისგან თავდაცვის ზღუდე უფრო ღრმად ეშელონირებული გახადა.

მცენარეში მიტოქონდრიულ ჰიდროქსილაზურ აქტივობას რაც შეეხება: მონოოქსიგენაზების ჩვენი კვლევა ქოლესტეროლის ჟანგვის შესწავლით დავიწყეთ და ეს თავის მხრივ ორმა გარემოებამ გა-

ნაპირობა. ამ პერიოდს (1975-1977 წ.წ.) დაემთხვა დევის ლაბორატორიაში მცენარის მიერ კონდენსირებულ ბირთვებიანი ნაერთების (ბენზპირენის, ბენზატრაცენის და სხვ.) შეთვისებისა და გარდაქმნის გზების კვლევა. მეორე მხრივ ინსტიტუტის მეორეული წარმოშობის ნაერთთა ბიოქიმიის ლაბორატორიაში (ხელმძღვანელი პროფ. არმაზ შალაშვილი) თანამშრომლებმა ღია თუმიშვილმა, ნათელა ზამბახიძემ და ნუგზარ კეკელიძემ [153] აირ-თხევადური ქრომატოგრაფიის მეთოდით მცენარე დეკაში (*Rhododendron caucasicum* Pall) შეძლეს სტიგმასტეროლთან და β -სიტოსტეროლთან ერთად ცხოველური ორგანიზმისათვის ტიპური ქოლესტეროლის იდენტიფიცირებაც. პრინციპში აქ უჩვეულო და საოცარი არაფერი არ უნდა იყოს. ეს სტეროლი (ნახ. 16) თავისი გრძელი ნახშირწყალბადოვანი „კუდით“ და მცირე ჰიდროფილური „თავით“ ბიომემბრანათა ის აუცილებელი კომპონენტია, რომელიც სიბლანტის ცვლილებების გზით მათ ზოგად თვისებას, კერძოდ თხევად-მოზაიკურ სტრუქტურას ასტაბილირებს. ამდენად მიტოქონდრიული ციტოქრომ P450-ის ფუნქციონირების გამოსავლენად იგი შესანიშნავი სუბსტრატია.



ქოლესტეროლი

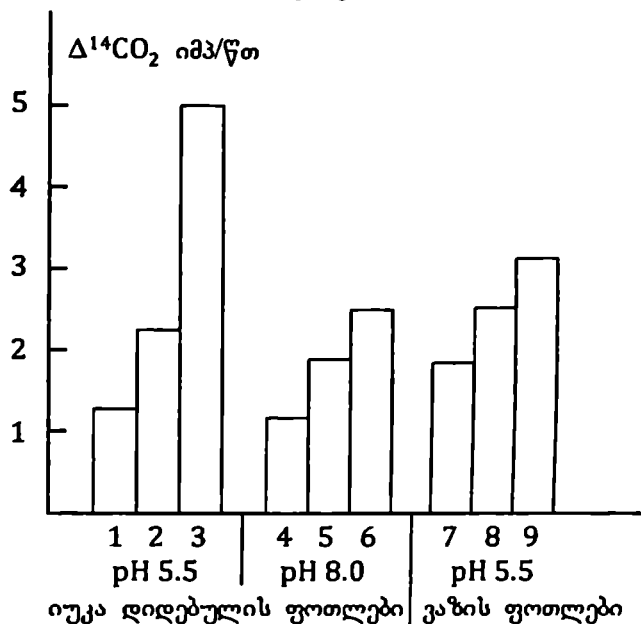
ნახ. 16. ქოლესტეროლი (მსხვილი შავი წერტილით აღნიშნულია $4\text{-}^{14}\text{C}$ -ნახშირბადატომი).

ცდები ტარდებოდა რქაწითელის ჯიშის ვაზისა და იუკა ღიღუბულის (*Yucca gloriosa*-ს) ფოთლების თხელ ანათლებზე [154, 155]. დასაყანგ სუბსტრატს წარმოადგენდა 4-¹⁴C-ქოლესტეროლი (მიკროსუსპენზიის ანუ „ქოლესტეროლური რძის“ სახით). მცენარის მიერ მის ჟანგვისუნარიანობას ვაფასებდით გამოყოფილი ¹⁴CO₂-ის რადიოაქტივობის მიხედვით. მეტაბოლიზმის პროდუქტთა იდენტიფიკაცია ხდებოდა ქაღალდის ქრომატოგრაფიით, ხოლო მათი რადიოაქტივობები იზომებოდა SL-30 ტიპის თხევად სცინტილაციურ მთვლელზე. მოხმარებული ჟანგბადის რაოდენობა ისაზღვრებოდა მანომეტრულად ვარბურგის აპარატში.

ჩატარებულმა ექსპერიმენტებმა გვიჩვენეს, რომ ორივე საცდელი მცენარე ჟანგავს ქოლესტეროლის A-ბირთვს და ამ პროცესში მნიშვნელოვანი როლი ნიკოტინამიდურ კოფერმენტებს უკავიათ. ჟანგბადის მოხმარების ზრდასთან ერთად მათი გავლენით ძლიერდება 4-¹⁴C-ქოლესტეროლიდან ¹⁴CO₂-ის გამოსავლიანობა, ანუ ეს შედეგი მიუთითებს, რომ პროცესი ციტოქრომ P450-მონოოქსიგენაზით კატალიზდება. გარდა ამისა, pH-საგან დამოკიდებულებით იუკა ღიღუბულის ფოთლებში ჟანგვის ორი მაქსიმუმი (pH 5.5 და pH 8.0) რეგისტრირდება. როგორც ჩანს, ამ მცენარეში ჰემოპროტეიდის ორი იზოფორმა ფუნქციონირებს (ნახ. 17 და 18).

მიღებული მონაცემები პასუხს არ გვაძლევენ და არც არავითარი საფუძველი არ გაგვაჩნია იმის მტკიცებისათვის, რომ მცენარეში ქოლესტეროლი მიტოქონდრიული მონოოქსიგენაზით იჟანგება. 4-¹⁴C-ქოლესტეროლის თვით მიტოქონდრიულ ფრაქციაზე უშუალო სუბსტრატად გამოყენებას აზრი არ ჰქონდა, რადგან ეს ორგანული თავის ინტაქტურობას ძლიერ სწრაფად კარგავს და გამოყოფილი ¹⁴CO₂-ის რადიოაქტივობის რეგისტრირება შეუძლებელი იქნებოდა. გარდა ამისა, ცხოველურისაგან განსხვავებით მცენარეული ქსოვილ-

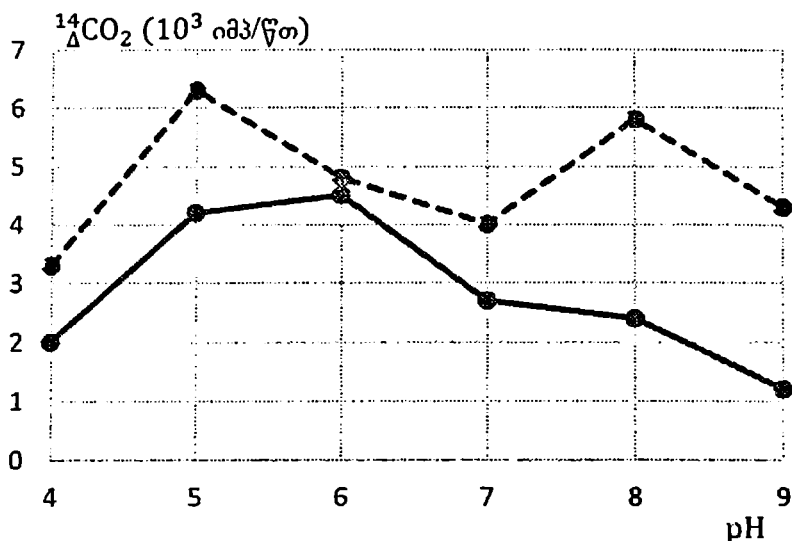
ები დიდი რაოდენობით ფენოლებსა და მათ წარმოებულებს შეიცავენ, რომლებიც მიტოქონდრიული ჟანგვისა და ფოსფორილების აქტიური გამთიშველები არიან. ამიტომ ჩვენ შევეცადეთ, რომ ჯერ არაპირდაპირი გზით მიგველო მონაცემები და მიახლოებითი პასუხი მაინც გაგვეცა აღნიშნულ კითხვაზე.



ნახ. 17. NADH-ისა და NADPH-ის გავლენა მცენარეში $4\text{-}^{14}\text{C}$ -ქოლესტეროლის A-ბირთვის ჟანგვაზე [154].

NAD(P)H – თითოეულად $4.2 \cdot 10^{-2} \text{ mM}$ (2 mkCu რადიოაქტივობით);
 ცდის ექსპოზიცია – 7 სთ; t – 30°C , მონაცემები გადაანგარიშებულია მცენარის მასალის 0.5 გ ნედლ მასაზე.

ცდის ვარიანტები: 1, 4, 7 – $4\text{-}^{14}\text{C}$ -ქოლესტეროლი (კონტროლი);
 2, 5, 8 – კონტროლი + NADH;
 3, 6, 9 – კონტროლი + NADPH.



ნახ. 18. სარეაქციო არეს pH-ის გავლენა იუკასა და ვაზის ფოთლებში $4\text{-}^{14}\text{C}$ -ქოლესტეროლის A-ბირთვის ჟანგვაზე. [154]. $4\text{-}^{14}\text{C}$ -ქოლესტეროლი 2 mkCu .

ადრე როგორც იყო ნათქვამი, ციტოქრომ P450-ით ქსენობიოტიკის მოლეკულაში C-H- კავშირების დაწყვეტისა და მასში გააქტივებული ჟანგბადის ჩანერგვის სტადია აქტივაციის მაღალი ენერგიით ხასიათდება და ამის გამო შენელებულად რეალიზდება. აქედან გამომდინარე დაეუშვით, რომ მიტოქონდრიაში ქოლესტეროლის ჟანგვა მის ძირითად ფუნქციასთან (ენერგიის გენერირებასთან) უშუალოდ და მჭიდროდ კავშირში უნდა იმყოფებოდეს. ამ მოსაზრების შესამოწმებლად ცდებში თანადასაჟანგ პროდუქტებად გამოვიყენეთ როგორც აერობული სუნთქვის (კრების ციკლის) ინტერმედიატები და ამინომჟავები, რომელთა გარდაქმნები უშუალოდ უკავშირდებიან ამ ციკლს, ასევე ფოსფორილების სუბსტრატი – ADP. მიღებული შედეგები ნაჩვენებია ცხრილში 2.

ჟანგვისა და ფოსფორილების სუბსტრატთა გავლენა
 $4\text{-}^{14}\text{C}$ -ქოლესტეროლიდან ვაზისა და იუკა ღიდებულის ფოთლის
 ანათლებიდან $^{14}\text{CO}_2$ -ის გამოსავლიანობაზე [155]

ცდის ვარიანტები	$^{14}\text{C}_2$ -ის რადიოაქტიურობები იმპ/წთ	
	ვაზი	იუკა ღიდებული
$4\text{-}^{14}\text{C}$ -ქოლესტეროლი (ქლ) კონტროლი	477 ± 17.9	356 ± 8.6
ქლ + ADP	611 ± 24.0	602 ± 7.1
ქლ + სუქცინატი + მალატი	614 ± 11.9	628 ± 17.8
ქლ + სუქცინატი + მალატი + ADP	661 ± 14.2	675 ± 4.4
ქლ + α -კეტოგლუტარატი	657 ± 4.4	400 ± 6.8
ქლ + α -კეტოგლუტარატი + ADP	1030 ± 26.9	847 ± 17.4
ქლ + ალანინი + ასპარტატი + გლუტამატი	770 ± 20.9	728 ± 12.5
ქლ + ალანინი + ასპარტატი + გლუტამატი + ADP	975 ± 14.0	828 ± 20.5

* ფოსფატის ბუფერი pH 6.0 ვაზისათვის და pH 5.0 იუკასათვის; მცენარეული მასალის წონა 0.5 გ; ცდის ხანგრძლივობა 3 სთ; სიბნელე; ცდების განმეორება 5-ჯერადი. ჟანგვის სუბსტრატების კონცენტრაციები – $6 \cdot 10^{-3}$ მოლი თითოეული; ADP – $1 \cdot 10^{-3}$ M; Mg^{2+} – 16 mM. ქოლესტეროლი – $2 \cdot 10^{-3}$ M (1.5 mkCu).

არავითარ აუცილებლობას არ წარმოადგენს მოყვანილი ცხრილის დეტალური განხილვა. ისედაც თვალსაჩინოდ ჩანს, რომ გამოყენებული ადვილდასაჟანგი სუბსტრატების გამოყენებისას იზრდება $4\text{-}^{14}\text{C}$ -ქოლესტეროლიდან $^{14}\text{CO}_2$ -ის გამოსავლიანობა და ეს სტიმულირება ADP-ს დამატებით კიდევ უფრო ძლიერდება. გარდა ამისა, ცდების ცალკე სერიაში ვაჩვენეთ 2,4-დინიტროფეროლის (ჟანგვისა და ფოსფორილების პროცესთა ტიპური გამთიშველის) გავლენით ამ

სტეროიდის ჟანგვის მძლავრი (ვაზში ~ 35-40%-ით და იუკაში ~ 45-50%-ით) ინჰიბირება [155]. მაშასადამე, ქოლესტეროლის მოლეკულის ციკლური კომპონენტის ჟანგვითი კატაბოლიზში უშუალოდაა დაკავშირებული მიტოქონდრიულ ენერგეტიკულ ცვლასთან. ამ კავშირის კიდევ უფრო წარმოჩენისთვის შევისწავლეთ ქოლესტეროლის ჟანგვის პროცესის დამოკიდებულება გარემოს ენერგეტიკულ პოტენციალთან („ენერგიის მუხტთან“) და კრიტერიუმად ავიღეთ დ. ატკინსონის [156] დამოკიდებულება, რომელიც 0-დან (სრული დეენერგიზაციიდან) 1-მდე (სრულ ენერგიზაციამდე) მნიშვნელობებს ღებულობს. ცნობილია, რომ მრავალი რეგულატორული ფერმენტისათვის განსაზღვრულია „ენერგიის მუხტსა“ და ენზიმურ აქტივობას შორის ფუნქციური დამოკიდებულება [157].

უჯრედში ნებისმიერი პროცესი, რომელშიც მაღალენერგეტიკული ფოსფატური კავშირები წარმოიქმნება ან იხარჯება, ADP-ისა ATP-ის შეფარდებითი კონცენტრაციებით კონტროლდება. ამდენად უჯრედში მუდმივად იმყოფება არამხოლოდ ATP და ADP, არამედ AMP-ც (ადენოზინმონოფოსფატი). დ. ატკინსონის [156] თანახმად უჯრედის ენერგეტიკული მდგომარეობა უმჯობესია [ATP-ADP-AMP]-სისტემის მაღალენერგეტიკული ფოსფატებით „შეესების“ ხარისხით, ანუ ე.წ. „ენერგეტიკული მუხტით“ (A) დახასიათდეს. იგი შეიძლება მარტივად იქნას გამოთვლილი ადენილატური სისტემის აღნიშნულ კომპონენტთა კონცენტრაციების თანაფარდობებისათვის შემდეგი ფორმულით:

$$A = \frac{[ADP] + \frac{1}{2}[ATP]}{[AMP] + [ADP] + [ATP]} \quad (30)$$

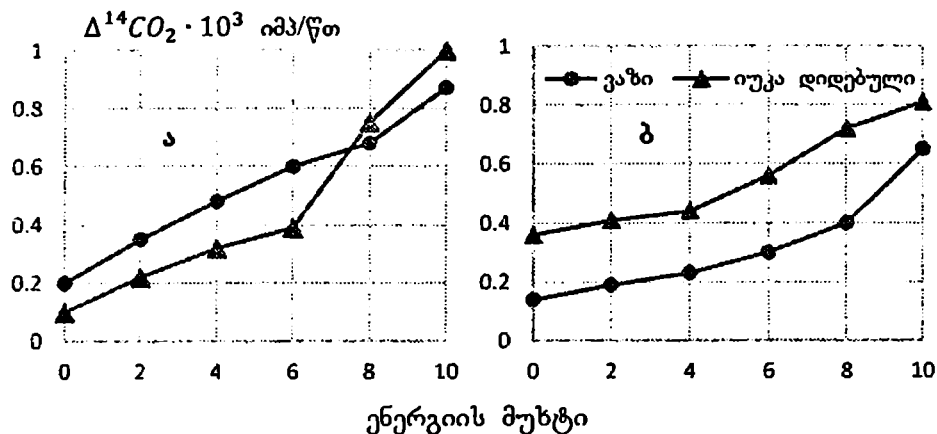
უჯრედში ყველა ადენოზინფოსფატი თუ ATP-ის ფორმით

იმყოფება, ეს იმას ნიშნავს, რომ სისტემა ენერგეტიკულად ზღვრულადაა შეკლებული (ენერგეტიკული მუხტი 1-ის ტოლია); მეორე ზღვრულ მდგომარეობას შეესაბამება შემთხვევა, როდესაც უჯრედში ადენოზინფოსფატები AMP-ფორმით იმყოფებიან, ანუ უჯრედი ენერგეტიკულად „დაცლილია“ (ენერგეტიკული მუხტი 0-ის ტოლია); ადენოზინფოსფატები თუ ADP-ს ფორმით ან ADP-სა და ATP-ს ექვიმოლარული ნარევის სახით იმყოფებიან, ეს იმას ნიშნავს, რომ სისტემა მაღალენერგეტიკული კავშირებით ნახევრადაა შეკლებული (ენერგეტიკული მუხტი 0.5-ს უტოლდება). [ATP-ADP-AMP]-სისტემა უზრუნველყოფს ოპტიმალური სტაციონალური მდგომარეობის, ანუ ATP-ს წარმოქმნისა და მისი ხარჯვის სინქარის ტოლობის შენარჩუნებას და ეწინააღმდეგება ამ მდგომარეობიდან ყოველ გადახრას.

ჩვენს მიერ დადგენილ იქნა, რომ საცდელ მცენარეთა ფოთლების თხელ ანათლებში ქოლესტეროლის მჟანგველი მონოოქსიგენაზას აქტივობა პირდაპირ დამოკიდებულებაში იმყოფება სარეაქციო არის ენერგეტიკულ პოტენციალთან [155, 158, 159]. ადენილატური აკუმულატორის საფეხურებრივი „დამუხტვა“ $4\text{-}^{14}\text{C}$ -ქოლესტეროლიდან $^{14}\text{CO}_2$ -ის რადიოაქტივობის გაზრდას იწვევს. ანალოგიური სურათი მივიღეთ ამ სტეროლის ჟანგვისას ჯამური ფერმენტული (აცეტონური) პრეპარატების გამოყენების დროსაც (ნახ. 19ა და 19ბ).

ჟანგვისა და ფოსფორილების სუბსტრატთა გაელენით ჟანგვის სტიმულაციამ და ენერგიის მუხტით მისი ზრდის ეფექტმა, როგორც მოსალოდნელი იყო, ერთმანეთის ექვივალენტურობა დაადასტურა. აქვე უნდა შევნიშნოთ, რომ სტიმულაცია ცდის საწყის პერიოდშივე რეგისტრირდება, რომელიც შვიდსაათიანი ექსპოზიციისას დაახლოებით პირველ საათს მოიცავს. მომდევნო პერიოდში კი საკონტროლო

ვარიანტთან შედარებით ჟანგვის მრუდები სტიმულაციის მხარეს წანაცვლებულები რჩებიან. ამ მომდევნო პერიოდში სუნთქვისა და ფოსფორილების სუბსტრატთა განმეორებითი დამატება მასტიმულირებელ მოქმედებას აღარ იძლევა.



ნახ. 19. $4\text{-}^{14}\text{C}$ -ქოლესტეროლის ჟანგვის დამოკიდებულება სარეაქციო არის ენერგეტიკულ პოტენციალთან ვაზისა და იუკას ფოთლებსა (ა) და ჯამურ ფერმენტულ პრეპარატებში (ბ). ცდის ექსპოზიცია 7 სთ [155].

საგულისხმო შედეგები მივიღეთ ცდებით, რომელიც მიკროსომებისა და მიტოქონდრიების შერეულ სისტემაზე იქნა ჩატარებული [159]. ამდროისათვის მცენარიდან მიტოქონდრიების გამოყოფისათვის არსებულ მეთოდებში [160, 161] გარკვეული კორექტივების განხორციელებით საცდელ მცენარეთა ფოთლებიდან ინტაქტური (ენერგეტიკული შეუღლების მაღალი დონის მქონე) მიტოქონდრიების მიღება შეუძლებელი. ფრაქციის სტაბილიზებისა და ფენოლურ ნაერთთა იზოლირებისათვის გამოყოფის არედან საინკუბაციო არეში გადატანის სტა-

დიაზე მიტოქონდრიულ სუსპენზიას 0.01%-იანი ხარის შრატის ალბუმინი, 0.1% პოლივინილპიროლიდონი და 0.01M EDTA ემატებოდა.

ნაჩვენები იქნა, რომ დაბალენერგეტიკული მდგომარეობის მიტოქონდრიებიდან მიკროსომაზე აღმდგენელი ექვივალენტების მიგრაცია ზორციელდება, ანუ ამისათვის სუნთქვით ჯაჭვში ელექტრონთა თავისუფალი (ATP-ს სინთეზთან არაშეუღლებული) ნაკადის არსებობაა საჭირო. ენერგეტიკული შეუღლების მაღალი დონისას იზღუდება დიმეთილანლინისა და Π -ნიტროანთროლის მიკროსომული N- და O-დეალკილირების რეაქციები. მსგავს მაინჰიბირებელ ეფექტს იძლევა ეგზოგენური ქოლესტეროლიც. აუცილებლად უნდა შევნიშნოთ, რომ მცენარეში ქოლესტეროლის მეტაბოლიზმში უპირატესი როლი მაღალმოლეკულურ ცხიმოვან მჟავებთან ეთერიფიცირებას ენიჭება და ეს პროცესი მის ღრობით დეპონირებას გულისხმობს, რადგან შემდგომში შესაძენის გზით უჯრედის მიერ საჭიროებისამებრ მოიხმარება. ჟანგვითი გზა კი გაცილებით ნაკლები ინტენსივობით ზორციელდება [162].

ცალკე მიტოქონდრიულ ფრაქციას მიკროსომული ჟანგვის აღნიშნულ ტიპიურ სუბსტრატთა მიმართ (რეაქციის პროდუქტის – ფორმალდეჰიდის წარმოქმნის მიხედვით) აბსოლუტური ინერტულობა ახასიათებს [159]. მიღებულმა მონაცემებმა სრული საფუძველი მოგვცა ჩაგვეთვალა, რომ

1. მცენარეში ქოლესტეროლის ჟანგვა მიტოქონდრიული პროცესია და შესაბამისი ციტოქრომ P450-შემცველი მონოოქსიგენაზა ამ სტეროლისადმი შედარებით მაღალ სუბსტრატულ სპეციფიკურობას ავლენს;
2. ქოლესტეროლის ჟანგვა ენერგოდამოკიდებული პროცესია და მისი ინტენსივობა მიტოქონდრიის ენერგეტიკული სტატუსით რეგულირდება;
3. ქსენობიოტიკთა მიკროსომული ჰიდროქსილირება ელექტრონთა

ტრანს-მემბრანული გადატანის გზით ძლიერდება ანუ თავის მხრივ ისიც მიტოქონდრიული კონტროლის ქვეშ იმყოფება.

ქოლესტეროლის ჟანგვას განსაკუთრებული ყურადღება უფრო იმისათვის დაევთმეთ, რათა გვეჩვენებინა მცენარეში მონოოქსიგენაზების მოლეკულა ორგანიზაციის სამივე ტიპის (ხსნადის, მემბრანადაკავშირებულისა და მიტოქონდრიულის) რეალურად არსებობა. ევოლუციური განვითარების აუცილებლობამ ცხოველებთან შედარებით მცენარის ამ ფერმენტულ სისტემას მოქმედების ფართო ასპარეზი შეუქმნა და ტოქსიკანტებთან ერთად ადამიანისათვის უსარგებლო (ზედმეტი) პოლუტანტებისაგან დასაცავად თავისებური ქიმიური „ქარსაფარის“ ანუ „მწვანე ფილტრის“ როლი დააკისრა.

ახლა განვიხილოთ თუ როგორია თანამედროვე წარმოდგენები ჰიდროქსილირების აქტში ბიომემბრანათა ფაქტიურ როლზე და თვით ციტოქრომ P450-ის აქტიური ცენტრის შენებაზე.

ადრე ძლიერ მოკლედ შევეხეთ განაწილების კოეფიციენტის ცნებას. ამჯერად კი იმას დავამატებდით, რომ ქსენობიოტიკთა ჰიდროქსილირება, რომელსაც წინ უძღვის ბიომემბრანის ლიპიდურ ბიშრეში მათი შეღწევა, სწორედ განაწილების კოეფიციენტისა და ჰიდროფობური დაკავშირების თეორიას ეფუძნება. მისი შექმნა კ. ჰანშისა და თანაავტ. [163-166] სახელთანაა დაკავშირებული. ამ თეორიის თანახმად განაწილების კოეფიციენტის ცნებაში წყლოვან და არაწყლოვან (ჰექსანში ან ოქტანში) ფაზებს შორის განაწილებისას საკვლევი ნივთიერების კონცენტრაციის წონასწორული თანაფარდობა (P) იგულისხმება. თერმოდინამიკის თანახმად $\log P$ სიდიდე ამ ფაზებში ნივთიერებების თავისუფალი ენერგიების სხვაობათა პროპორციულობას ასახავს.

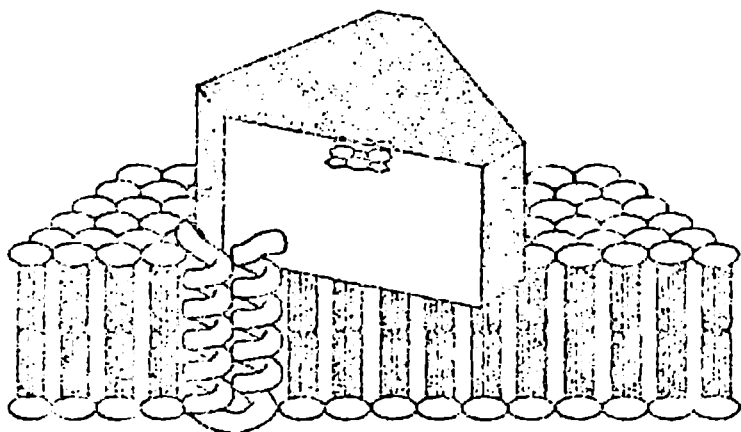
ჰიდროფობურ დაკავშირებაზე მსჯელობისას უპირველეს ყოვლისა მსჯელობაში იღებენ წყლოვანიდან ბიოფაზაში ორგანული

მოლეკულების გადაადგილებისას თავისუფალი ენერგიის ცვლილებებს. საერთოდ კი ამ ცნებაში მოლეკულებს შორის ისეთ ურთიერთქმედებებს გულისხმობენ, რომლებიც ნივთიერებების წყალთან ურთიერთქმედებაზე უფრო ძლიერია და იგი არაა განპირობებული არც კოვალენტური და წყალბადური ბმებით და არც ელექტროსტატიკური მიზიდულობით, ან მუხტის გადატანით. განაწილების პროცესის მამოძრავებელ ძალას სოლვატური გარსის შემოცილება წარმოადგენს, რომელიც წყალხსნარში ორგანული მოლეკულის გარშემოა შექმნილი. თეორიულად $\log P$ -ს გამოყენება გამართლებულია, რამდენადაც P -პარამეტრის ლოგარითმი წონასწორობის კონსტანტასა და პროცესის სიჩქარეს შორის ზაზოვანი დამოკიდებულების გამოვლენის საშუალებას იძლევა.

მეტად საყურადღებოა მიკროსომული სუბსტრატებისათვის $\log P$ -საგან დამოკიდებულებით მიხაელისის კონსტანტისა და V_{max} -ის ურთიერთშედარება. მრავალ ქსენობიოტიკა შემთხვევაში მათი ქიმიური სტრუქტურის სხვაობათა მიუხედავად V_{max} -ში სამჯერაღზე მეტი გადახრა არ შეინიშნება, მაშინ, როდესაც K_m -ის მნიშვნელობები თითქმის 1000-ჯერად გადახრას იძლევიან [167]. გაცილებით უარესი კორელაცია ფიქსირდება იონიზებულ ფორმათა მოლეკულების გამოყენებისას და ეს ვითარება მიკროსომებში ასეთი ფორმის ქსენობიოტიკებისა და ენდოგენური სუბსტრატების მეტაბოლიზების შესაძლებლობას საერთოდ გამორიცხავს. ამით შეიძლება აიხსნას თუ უჯრედში ბიოქიმიურად ისეთი მნიშვნელოვანი ადვილდასაყენი სუბსტრატები, როგორიც ორგანული მჟავები, ამინომჟავები, შაქრები და სხვა პოლარული ენდოგენური ნაერთებია, სუსტი სუბსტრატული სპეციფიკურობის მქონე მიკროსომული ციტოქრომ P450-შემცველი მონოოქსიგენაზებით ჟანგვას არ განიცდიან.

1988 წელს დ. ნელსონმა და ხ. სტრობელმა [168] წარმო-

ადგინეს მემბრანაში ლოკალიზებული ციტოქრომ P450-ის მოდელი, რომლის თანახმადაც ფერმენტული ცილის უპირატესი ნაწილი ლიპიდური ბიშრის გარეთ იმყოფება. სუბსტრატ-დამაკავშირებელი მონაკვეთი ლიპიდურ ბიშრესთან კონტაქტირებს, ხოლო ჰემი მემბრანის სიბრტყის პარალელურადაა განლაგებული და მისი ორი NH_2 -ტერმინალური ტრანსმემბრანული სეგმენტი „ღუზასავითა“ ჩაშვებული კრატერისებური სტრუქტურის მქონე ჰიდროფობური აპოფერმენტის სიღრმეში (ნახ. 20).



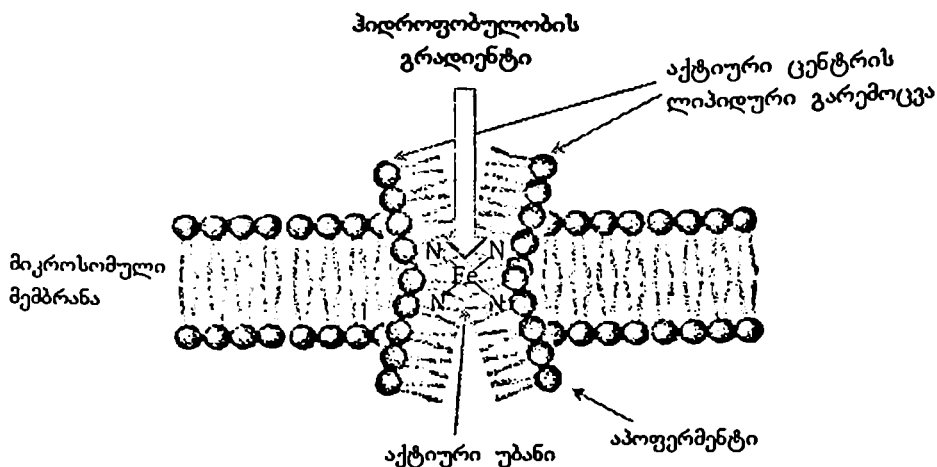
ნახ. 20. მიკროსოფული ციტოქრომ P450-ის სტრუქტურის მოდელი [168]. (განმარტება ტექსტში)

ყველა ციტოქრომ P450-ს აქვს კონსერვატორული სტრუქტურული ბირთვი და ვარიაბელური უბნები, რომლებიც სუბსტრატის შეცნობასა და რედოქს-პარტნიორის დაკავშირებაში მონაწილეობენ. სუბსტრატი ფერმენტის აქტიური ცენტრის ზუსტად იმ ადგილზე ფიქსირდება, სადაც ნახშირბადის ატომი რკინადაკავშირებულ ჟანგბადის ატომთან უშუალოდ ურთიერთქმედებს, რათა სტერეოსელექ-

ტიური ჰიდროქსილირება განხორციელდეს. გამოთქმულია აგრეთვე მოსაზრება, რომ წყლოვან ფაზასა და ჰემს შორის სიერცეში ფუნქციონირებს გადამტანი, რომელიც სუბსტრატს წყლიდან აქტიური ცენტრისაკენ, ხოლო ჟანგვის პროდუქტს საპირისპირო მიმართულებით ტრანსპორტირებას უზრუნველყოფს. ასეთი გადამტანის როლს კი იმ ფოსფოლიპიდებს აკუთვნებენ, რომლებიც წყლოვანი ფაზიდან აქტიური ცენტრის მიმართულებით ჰიდროფობურობის მზარდი გრადიენტის მიხედვით ლაგდებიან [169].

განხილულმა სქემებმა და ჩვენს ლაბორატორიაში მიღებულმა შედეგებმა [28] საშუალება მოგვცა წარმოგვედგინა მცენარის მიკროსომაში მემბრანადაკავშირებული ციტოქრომ P450-ის ლოკალიზაციისა და მისი მოქმედების მექანიზმის უმარტივესი, მაგრამ პრინციპული მოდელი (ნახ. 21) [170].

მე-21 სქემიდან გამომდინარეობს, რომ აპოფერმენტის კომპონენტები, რომლებიც ძირითადად მემბრანული ფოსფოლიპიდებით არიან წარმოდგენილი, ვერტიკალურად ზევიდან ქვევით (ციტოზოლიდან ფერმენტის აქტიურ ცენტრამდე) მზარდ ჰიდროფობურ გრადიენტს ქმნიან. ამიტომ არაპოლარული სუბსტრატის ზევიდან ქვევით ჩასაღწევად, ხოლო წარმოქმნილი პოლარული პროდუქტის უკან ამოსატყორცნად მამოძრავებელ ძალას შესაბამისად ჰიდროფობური ურთიერთქმედება და ლიპიდი-წყლის ურთიერთგანხილვა წარმოადგენს. მოდელი იმასაც ითვალისწინებს, რომ ფერმენტის აქტიურ ცენტრთან სუბსტრატის მისაღწევად კრატერული სიღრუე მემბრანული ბიშრის ორივე ზედაპირზე გამოდიოდეს. სტრუქტურული თვალსაზრისით ეს სავსებით დასაშვებია, ხოლო ფუნქციონალურად მისაღები, რადგან ასეთი კონსტრუქცია მნიშვნელოვნად ზრდის ციტოქრომ P450-ის სუბსტრატთან კონტაქტირების ალბათობას.



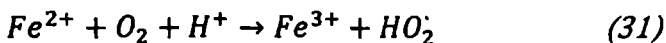
ნახ. 21. ციტოქრომ P450-ის აქტიური უბნის ლიპიდური გარემოცვა და მისადმი ჰიდროფობურ სუბსტრატთა წვდომის მექანიზმი [170]. (განმარტება ტექსტში)

ამგვარად, ქსენობიოტიკთა მიკროსომული ჰიდროქსილირების რთულ პროცესში ციტოქრომ P450-სა და ფოსფოლიპიდებს შორის ცილა-ლიპიდურ ურთიერთქმედებას განსაკუთრებული მნიშვნელობა ენიჭება და ამგვარად მიუთითებს ლიპიდის კოფაქტორულ როლზე. ამდენად, მონოოქსიგენაზურ სისტემაში იგი მეოთხე აუცილებელ კომპონენტად უნდა განიხილებოდეს.

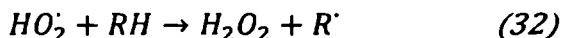
7. მიკროსომული მონოოქსიგენაზები და უჯერი ცხიმოვანი მჟავების ზეჟანგური ჟანგვა

უჯერ ცხიმოვან მჟავათა ზეჟანგური ჟანგვა (ტექსტში შემოკლებით ვიხმართ „ლიპიდთა პეროქსიდაციას“) რეაქციათა ტიპია, რომელიც ენდოპლაზმური რეტისკულუმის მემბრანებში ხორციელდება. ჯერ კიდევ 1963 წელს პ. პოსშტეინისა და ლ. ერნსტერის [171] მიერ იქნა ნაჩვენები ამ პროცესში ცხოველური უჯრედებისათვის დამახასიათებელი უნიკალური ფერმენტული სისტემების არსებობა. ამასთან, აღმოჩნდა, რომ მიკროსომულ ფრაქციაში ეს რეაქცია ფერმენტულის გარდა არაფერმენტულადაც შეიძლება წარიმართოს. რედუცირებადი ექვივალენტების დონორად პირველი (ფერმენტული) გზა NADPH-ს იყენებს და გაცხელებით ან პარაქლორმერკურიბენზოათით ითრგუნება. გარდა ამისა, მისი კინეტიკა ტიპური ფერმენტული რეაქციისა და NADPH-ის მიმართ $K_m 5.5 \cdot 10^{-6} M$ -ის ხოლო ჟანგბადის მიმართ $3.5 \cdot 10^{-5} M$ -ის რიგისაა. ლიპიდთა პეროქსიდაციის მეორე (არაფერმენტული) გზა აღმდგენელად ასკორბატს იყენებს და გაცხელებისა და სულფჰიდრილური შხამის მიმართ არამგბობიარეა.

ლიპიდთა ზეჟანგების წარმოქმნა, რაც საერთოდ მოლეკულური ჟანგბადით ორგანულ ნერთთა უშუალო ჟანგვისთვისაა დამახასიათებელი, ჯაჭვური, თავისუფალრადიკალური მექანიზმით ხორციელდება [172]. პროცესი მხოლოდ იმ შემთხვევაში შეიძლება დაიწყოს, თუ სისტემაში თავისუფალი რადიკალები ჩნდებიან. ამის მაგალითს წარმოადგენს მოლეკულური ჟანგბადით ორვალენტიანი რკინის იონის დაჟანგვა, რის შედეგადაც HO_2 რადიკალი მიიღება:



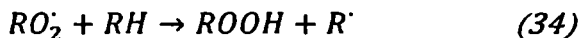
რეაქტიისუნარიან ჟანგბადის აქტიურ ფორმას შეუძლია ცხიმოვანი მჟავის მოლეკულასთან რეაგირება და ამ დროს ადგილი აქვს ლიპიდის $R^{\cdot}$ -რადიკალის წარმოქმნას:



ამ რეაქციაში იწყება ჟანგვის ჯაჭვური პროცესი და ამიტომ ამ სტადიას ჯაჭვის ინიცირების სტადიას უწოდებენ. ჟანგბადის თანამყოფობისას $R^{\cdot}$ -რადიკალები მას უერთდებიან და ახალი $RO_2^{\cdot}$ -თავისუფალი რადიკალი მიიღება, რომელსაც ზეჟანგურ რადიკალს უწოდებენ:



ზეჟანგურ რადიკალს უკერი ცხიმოვანი მჟავის ახალ მოლეკულასთან ურთიერთქმედება და ჰიდროზეჟანგის (ჰიდროპეროქსიდის) წარმოქმნა შეუძლია. ამასთან ახალი $R^{\cdot}$ -რადიკალი ჩნდება



ორი ბოლო რეაქტიის მორიგეობა იმას იწვევს, რომ პროცესში ლიპიდის (RH -ის) ახალ-ახალი მოლეკულები ერთვებიან და ჰიდროზეჟანგები მიიღებიან, ხოლო ($R + RO_2^{\cdot}$)-რადიკალების რიცხვი უცვლელი რჩება. პროცესის ამ სტადიას „პროლონგირების“, ანუ სხვაგვარად ჯაჭვის გაგრძელების სტადიას უწოდებენ. მთლიანი პროცესის სიჩქარეს ყველაზე შენელებული RH -ის მოლეკულასთან ზეჟანგური რადიკალის ურთიერთქმედების, ანუ ჯაჭვის გაგრძელების რეაქცია საზღვრავს. არსებითი ისაა, რომ ამ რეაქტიის სიჩქარის კონსტანტა დამოკიდებულია უკერი ცხიმოვანი მჟავის ქიმიურ ბუნებაზე, კერძოდ იგი მაქსიმალურია ორმაგი ბმებით მდიდარი ცხიმოვანი მჟავებისათვის, რითაც შეიძლება აიხსნას მათი ჟანგვის მაღალი სიჩქარეები [172].

ამ ფაქტის ასახსნელად ავტორთა მიერ გამოთქმულია მოსაზრება, რომლის თანახმადაც ორივე პროცესში ელექტრონთა ტრანსპორტის NADPH-ის დამჟანგველი საერთო ფერმენტული სისტემა მონაწილეობს. ახლად მიღებულ მიკროსომებში მაჰიდროქსილირებელ სუბსტრატებს რედოქს-ჯაჭვი „მონოპოლიზებული“ აქეთ და ზეჟანგური ჟანგვის რეაქციათა სიჩქარეები დაქვეითებულია, ხოლო NADPH ამ დროს ძირითადად ჰიდროქსილირებაზე უტილიზდება. „ხანდაზმულ“ მიკროსომებში სურათი რადიკალურადაა შეცვლილი. ასეთ პრეპარატებში NADPH-დამჟანგველი ფერმენტული სისტემა უპირატესად ლიპიდურ პეროქსიდაციას ხმარდება და ინჰიბირება იმ შემთხვევაშიც კი აღარ შეინიშნება, სარეაქციო არეში ჰიდროქსილირების სუბსტრატები თუ მაინც იმყოფებიან.

მაჰიდროქსილირებელ რედოქს-ჯაჭვში მოქმედი NADPH-სპეციფიკური ფლავოპროტეიდის (FPI-ის) ლიპიდურ პეროქსიდაციაში მონაწილეობის სასარგებლოდ შემდეგი არგუმენტები არსებობს [174-177]:

- NADPH-ის მიმართ პროცესი სპეციფიკურია და NADH-ით მისი შეცვლა არ ხდება, რადგან NADPH-დამოკიდებული მიკროსომული ჯაჭვის ეს საწყისი კომპონენტი მაღალი სპეციფიკურობით ხასიათდება;
- განსხვავებული ტიპის მემბრანებში გარკვეული კორელაცია შეინიშნება NADPH-ციტოქრომ P450-რედუქტაზას აქტივობასა და NADPH-სპეციფიკურ ლიპიდთა პეროქსიდაციის სიჩქარეთა შორის;
- დაჟანგული NADP^+ , რომელიც NADPH-რედუქტაზას კონკურენტული ინჰიბიტორია, ასევე ძლიერად თრგუნავს NADPH-დამოკიდებულ ლიპიდთა პეროქსიდაციას;
- ფერმენტულ რეაქციათა სამივე ტიპი (NADPH-ციტოქრომ

P450-ის ოქსიდორედუქცია, NADPH-სპეციფიკური ჰიდროქსილირება და NADPH-დამოკიდებული პეროქსიდაცია) ერთნაირად სტერეოსპეციფიკურია. სამივეში ჟანგვა 4A-დეჰიდროგენაზით კატალიზდება.

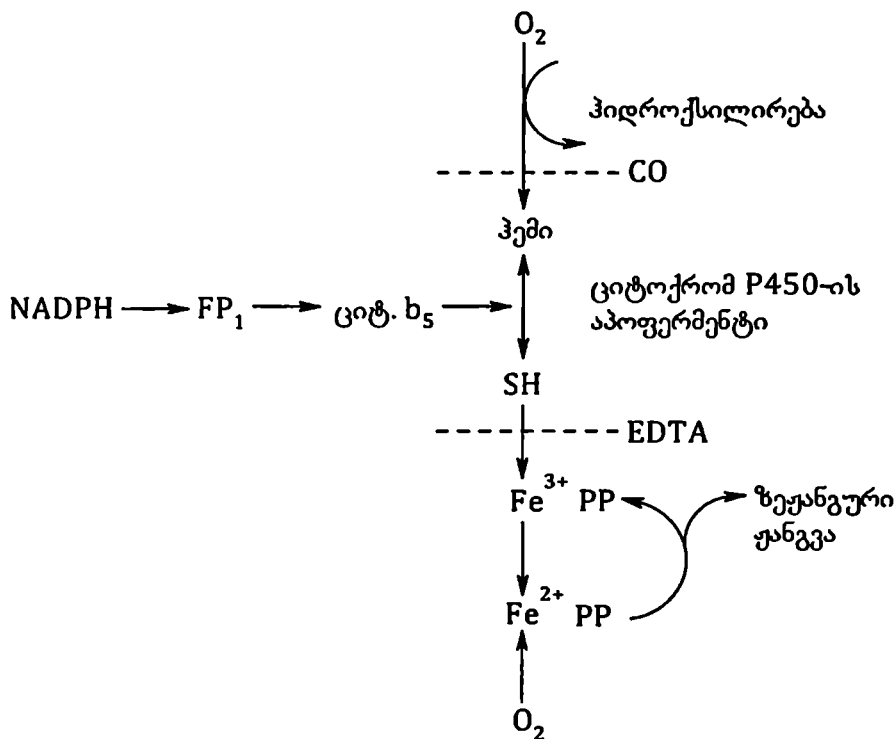
- მენადიონი (ვიტამინი K₃) – ხელოვნური აქცეპტორი, რომლის მიმართაც NADPH-სპეციფიკური ფლავოპროტეიდის თვისობა (სწრაფვა) ძლიერ მაღალია, ერთნაირად აინჰიბირებს დიმეთილანილინის N-დემეთილირებას და NADPH-დამოკიდებულ ლიპიდთა პეროქსიდაციას;
- NADPH-სპეციფიკური ფლავოპროტეიდი, ჰიდროქსილირება და პეროქსიდაცია ერთნაირად მგრძნობიარენი არიან პროტეაზების მიმართ. ტრიპსინისა და პრონაზას სულ მცირე კონცენტრაციებისას ძლიერ დაბალი ტემპერატურის დროსაც კი ფლავოპროტეიდის შერჩევით სოლუბილიზაციას და ჰიდროქსილირებისა და ლიპიდური პეროქსიდაციის მკვეთრ ინჰიბირებას იწვევენ;
- ლიპიდური პეროქსიდაციის ფერმენტული სისტემა შეიძლება რეკონსტრუირდეს ლიპოსომებისა და NADPH-სპეციფიკური ფლავოპროტეიდისაგან.

ჩამოთვლილი მტკიცებულებები ეჭვს არ გვიტოვებენ იმისათვის, რომ ერთიადიგივე ფერმენტი და კერძოდ, NADPH-ციტოქრომ P450-რედუქტაზა, როგორც ჰიდროქსილირების, ასევე ლიპიდური პეროქსიდაციის პროცესში აუცილებელ საწყის რგოლს წარმოადგენს. ამასთან უნდა აღვნიშნოთ ერთი მეტად საყურადღებო ფაქტი: ლიპიდური პეროქსიდაციის სისტემის რეკონსტრუქციისას დადგინდა, რომ ეფექტური ფუნქციონირებისათვის NADPH-ციტოქრომ P450-რედუქტაზასთან ერთად სისტემა კიდევ EDTA-Fe³⁺-ის კომპლექსის მსგავს რომელიმე ფაქტორს უნდა შეიცავდეს და მხოლოდ ამ შემ-

თხვევაში იმუშავებს წარმატებულად ფლავოპროტეიდი როგორც ლიპიდთა ზეჟანგების მაგენერირებელი სისტემა. ასეთი კომპლექსის თანამყოფობისას ლიპიდური პეროქსიდაციის უნარს ავლენს არამხოლოდ NADPH-, არამედ NADH-ციტოქრომ P450-რედუქტაზაც [178, 179].

ლიპიდთა პეროქსიდაციაში NADPH-ფლავოპროტეიდის მონაწილეობის კვლევასთან ერთად ინტენსიურად შეისწავლებოდა მიკროსომული რედოქს-ჯაჭვის სხვა კომპონენტთა ფუნქციური როლიც. ინჰიბიტორული ანალიზის შედეგად მიღებულ იქნა, რომ ამ პროცესში ელექტრონთა აქცეპტორიც, კერძოდ სისტემის ტერმინალური კომპონენტი ციტოქრომ P450-იც მონაწილეობს. ამ საკითხში სირთულეს ქმნიდა უკვე არსებული თვალსაზრისი იმის შესახებ, რომ ლიპიდთა NADPH-დამოკიდებულ პეროქსიდაციაში ეს ჰემოპროტეიდი არავითარ მონაწილეობას არ ღებულობს. ამასთან დაკავშირებით არსებობდა რამდენიმე ექსპერიმენტულად მიღებული საყურადღებო შედეგი, რომელთაგანაც ერთ-ერთი და უმთავრესი იმაში მდგომარეობდა, რომ ნახშირბადის მონოოქსიდი, რომელიც ციტოქრომ P450-ის კლასიკური ინჰიბიტორია, NADPH-სპეციფიკურ ლიპიდთა ზეჟანგურ ჟანგვაზე თავის დამთრგუნველ ზემოქმედებას არ ავლენს. ეს შედეგი მართლაც მძლავრი არგუმენტია ლიპიდთა პეროქსიდაციაში ციტოქრომ P450-ის ფუნქციონირების საწინააღმდეგოდ, მაგრამ ეს მოსაზრება შეიძლება იმ შემთხვევისათვის იყოს მისაღები, თუ ჩათვლით, რომ პეროქსიდაციისათვის ელექტრონთა გადატანა აუცილებლად ციტოქრომ P450-ის ჰემინურ ჯგუფზე ხდება.

1969 წელს ა. არჩაკოვის [180] ლაბორატორიაში ჩატარებული გამოკვლევის საფუძველზე გამოითქვა მოსაზრება, რომ ლიპიდთა პეროქსიდაციაში ციტოქრომ P450 რეალურადაა ჩართული და შესაბამისად შემოთავაზებულ იქნა პროცესში მისი მონაწილეობის რამდენადმე უჩვეულო სქემა (ნახ. 22) [14].



ნახ. 22. ციტოქრომ P450-ის ფუნქციონირება ჰიდროქსილირებასა და ზეჟანგურ ჟანგვაში [14]. (განმარტება ტექსტში)

სქემის თანახმად ჰემოპროტეიდის აქტიურ ცენტრში შემავალი აპოფერმენტის SH-ჯგუფის მიერ რკინის პიროფოსფატთან (PP) დაკავშირებას თავისუფალი რადიკალების მაგენერირებული ახალი ცენტრის წარმოქმნა შეუძლია, რომლის აქტივობა CO-ით არ ინჰიბირდება. ამ შემთხვევაში ციტოქრომ P450 მუშაობს არა როგორც ჰემოპროტეიდი, არამედ როგორც არაჰემური გოგირდშემცველი რკინ-აპროტეიდი.

მეორე ფაქტი, რომელიც ლიპიდურ პეროქსიდაციაში ციტოქრომ

P450-ის მონაწილეობას გამოიცხადებს, იმაში მდგომარეობს, რომ პროცესში არ ვლინდება ფენობარბიტალისა და 3-მეთილქოლანტრენის მაინდუცირებელი ეფექტი. ამასთან დაკავშირებით უნდა ითქვას, რომ ჯერ კიდევ უცნობია პეროქსიდაციაში რეაქციის მალიმიტირებელი რგოლი. ამიტომ აღნიშნულმა ავტორებმა ჩათვალეს, რომ არც NADPH-სპეციფიკური ფლავოპროტეინი და არც თვით ციტოქრომ P450, რომლებიც ფენობარბიტალით შესანიშნავად ინდუცირდებიან, ლიპიდური პეროქსიდაციის სიჩქარემალიმიტირებელ რგოლს არ წარმოადგენენ.

არსებობს მთელი რიგი დამატებითი მონაცემებისა (თუმცა არაპირდაპირი), რომელიც ლიპიდურ პეროქსიდაციაში ციტოქრომ P450-ის მონაწილეობის სასარგებლოდ მეტყველებენ. მათ რიცხვს უპირველეს ყოვლისა მიეკუთვნება ფაქტი, რომ რედოქს-ჯაჭვში მხოლოდ ეს ჰემოპროტეინი წარმოადგენს გადამტანს, რომლის ერთი SH-ჯგუფი მისი აქტიური ცენტრის შემადგენლობაში იმყოფება და ელექტრონთა გადატანაში მონაწილეობის მიღება შეუძლია. ამდროს კი როგორც ცნობილია ზეჟანგური ჟანგვის ფერმენტული სისტემა საკმაოდ მგძნობიარეა სულფჰიდრილური შხამების (პარაქლორმერკურიბენზოატის, მერსალილისა და $HgCl_2$ -ის) მიმართ [171, 180]. დაბოლოს, NADPH-დამოკიდებულ ლიპიდთა ზეჟანგურ ჟანგვაში ციტოქრომ P450-ის მონაწილეობას ადასტურებს ამ ჰემოპროტეინის სპეციფიკური ინჰიბიტორის – SKF-525A-ს მძლავრი დამთრგუნველი ეფექტიც.

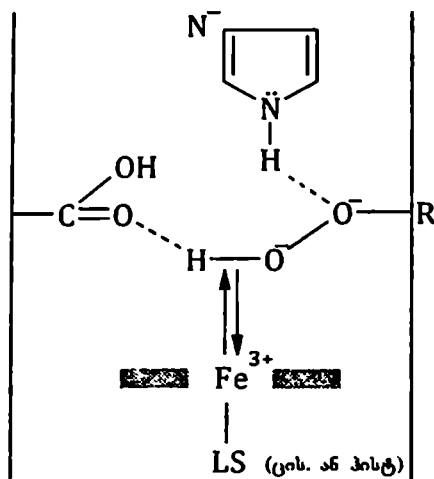
ლიპიდურ პეროქსიდაციაში ციტოქრომ P450-ის თუ მხოლოდ მისი ნაწილი, კერძოდ აპოფერმენტი მონაწილეობს, მაშინ სავსებით მოსალოდნელია, რომ ამ პროცესში აქტიურად იყოს ჩართული ჰემოპროტეინის არააქტიური P420-ის ფორმაც. მართლაც, შეტუტინება, რაც ციტოქრომ P450-ის P420-ად კონვერსიას იწვევს, ლიპიდური

პეროქსიდაციის სისტემის ინაქტივაციაზე აბსოლუტურად არ ისახება [181-184]. ნაჩვენებია აგრეთვე, რომ ციტოქრომ P450-ის ჰიდროპეროქსიდაზას ანუ უჯერ ცხიმოვან მჟავათა ჰიდროპეროქსიდების დამშლელი ფერმენტის როლის შესრულება შეუძლია [181, 182]. ციტოქრომ P420, რომელშიც რკინა მაღალსპინურ მდგომარეობაში იმყოფება, კიდევ უფრო ძლიერ ჰიდროპეროქსიდაზურ აქტივობას ამჟღავნებს. მიკროსომებში ლინოლმჟავას ჰიდროპეროქსიდის დაშლა ჰიდროქსილირების სუბსტრატებითა და ინჰიბიტორებით ითრგუნება, ხოლო ფენობარბიტალით აქტივდება. რედუცირებადი ექვივალენტების გარეშე ლინოლმჟავას ჰიდროპეროქსიდი ციტოქრომ P450-ის მაღალსპინურ P420-ად გარდაქმნას ახორციელებს. გლუტათიონი და NADPH ამ შემთხვევაში ჰემოპროტეიდის დამცველად გვევლინებიან [181, 182]. ამ მონაცემებზე დაყრდნობით ავტორები თვლიან, რომ ციტოქრომ P450-ით ჰიდროპეროქსიდების ჟანგვის თანმიმდევრობა ასე უნდა გამოიყურებოდეს: ჰიდროპეროქსიდი ჟანგავს ფერმენტის აქტიური ცენტრის SH-ჯგუფს და კონვერსიის გზით ციტოქრომ P450-ს მაღალსპინურ ციტოქრომ P420-ად გარდაქმნის. ეს უკანასკნელი ფუნქციონირებს როგორც პეროქსიდაზა და შლის ჰიდროპეროქსიდს, რის შემდგომაც იგი ციტოქრომ P450-ად აღდგენას განიცდის [181, 182]. (მცენარეში ციტოქრომ P420-ის პეროქსიდაზურ აქტივობაზე განსხვავებულ ჭრილში მოგვიანებით გვექნება საუბარი).

წარმოდგენილი მასალის განხილვის შედეგად ნათელი ხდება, რომ ლიპიდთა პეროქსიდაციაში ციტოქრომ P450-ის ჩართვის ორი მექანიზმი არსებობს: პირველი აპოფერმენტის SH-ჯგუფებზე რკინის პიროფოსფატის დაკავშირების შედეგად რადიკალწარმოქმნილი ცენტრებით გენერირებას ითვალისწინებს, რომლებიც თავის მხრივ ზე-ჟანგური ჟანგვის რეაქციების ინიცირებას ახორციელებენ; მეორე მექანიზმი ჰემოპროტეიდის დახმარებით ცხიმოვან მჟავათა ჰიდრო-

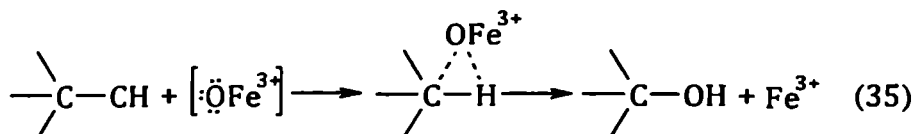
პეროქსიდების დაშლაში თანამონაწილეობას გულისხმობს. საერთოდ, ციტოქრომ P450 სხვა ჰემოპროტეიდების (ჰემოგლობინის, ციტოქრომ c-ს და სხვ.) მსგავსად ჰიდროპეროქსიდებთან ურთიერთქმედებისას კომპლექსებს წარმოქმნის. მიკროსომულ სუსპენზიაში კუმოლის ჰიდროპეროქსიდთან ციტოქრომ P450-ის კომპლექსირება პირველად ნ. ესტაბრუკის [185] ლაბორატორიაში იქნა ნაჩვენები. ამ ჰიდროპეროქსიდის შერევისას ბაჭიების ღვიძლის მიკროსომებთან, რომელთაც წინასწარ ფენობარბიტალი ეძლეოდათ, დარეგისტრირდა შთანთქმის დიფერენციალური სპექტრები 441, 525 ნმ-ზე მაქსიმუმებითა და 422, 579 ნმ-ზე მინიმუმებით. ანალოგიური სპექტრალური მახასიათებელი იქნა მიღებული ციტოქრომ P450-თან სხვა ჰიდროპეროქსიდების ურთიერთქმედების შედეგადაც, რაც იმას მოასწავებს, რომ კომპლექსწარმოქმნისას სხვადასხვა დამჟანგველისათვის მსგავსი ბუნების აქტიური ნაწილაკის წარმოქმნას აქვს ადგილი [186]. გამოითქვა მოსაზრება, რომ კომპლექსირებას განიცდის ჰიდროპეროქსიდის არადისოცირებადი ფორმა, რომლის ჟანგბადის ერთი ატომი (HO-დან) ჰემურ რკინას უკავშირდება, ხოლო მეორე წყალბადურ ბმას წარმოქმნის ჰისტიდინთან. პეროქსიდის ალკილური ნაშთი ჰიდროფობური დაკავშირების გზით აპოფერმენტთან ურთიერთქმედებს (ნახ. 23) [42].

ჰემოგლობინი და ციტოქრომ c ჰიდროპეროქსიდთან პეროქსიდაზული გზით რეაგირებენ და შუალედ პროდუქტებთან რადიკალებს წარმოქმნიან. ეს ფაქტი რადიკალური პროცესების ინჰიბიტორთა გამოყენებისას რეაქციის დამუხრუჭებით დასტურდება. ოქსენოიდურ, ანუ ჰიდროქსილაზურ მექანიზმს რადიკალური სტადია არ გააჩნია. ოქსენოიდი თუ ტრიპლეტურია, ჟანგვა ფარულრადიკალური მექანიზმით („წყალბადის ატომის მოგლეჯა- რეკომბინაცია“) ხორციელდება და რადიკალური რეაქციების ინჰიბიტორთა მიმართ არამგრძნობიარეა [187].



ნახ. 23. ჰემოპროტეიდის კომპლექსი ჰიდროპეროქსიდებთან [42].
(განმარტება ტექსტში)

სინგლეტური ოქსენოიდი ჟანგბადის ატომს სუბსტრატში სამ-ცენტრიანი სინქრონული მექანიზმით ნერგავს და რეაქციის სინგლეტურ პროდუქტს წარმოქმნის:



კომპლექს I-ში ჟანგბადის განსხვავებულ მდგომარეობებს ($\text{Fe}^{3+}\text{O}_2^-$, Fe^{3+}O , Fe^{4+}O^-) შეიძლება ჰემოპროტეიდის მოლეკულაში ჰემური რკინის მეხუთე ლიგანდის ბუნება საზღვრავდეს. საფიქრებელია, რომ ჰემოგლობინსა და ციტოქრომ C-ში ჰისტიდინის მეხუთე მდგომარეობა არსებით როლს ასრულებდეს ამ ჰემოპროტეიდთა და ჰიდროპეროქსიდით განხორციელებულ ჟანგვის პეროქსიდაზურ გზა-

ში. ციტოქრომ P450-ის მეხუთე მდგომარეობაში მყოფი ცისტეინილი საზღვრავს ამ ჰემოპროტეიდის ჰიდროპეროქსიდებთან წარმოქმნილი კომპლექსების სპექტრალურ ცვლილებებში სხვა ჰემოპროტეიდების კომპლექსებისაგან განსხვავებას და რეაქციის პეროქსიდზურ გზას, რომელიც კომპლექს I-ით სუბსტრატის მოლეკულიდან ორი ელექტრონის აქცეპტორებით ხასიათდება.

სრულ მიკროსომურ სისტემაში მთელი რიგი სტადიების შედეგად წარმოქმნილი ციტოქრომ P450-ის ოქსიგენირებული კომპლექსი თავისი თვისებებით კომპლექს-I-ის ანალოგიურია. სისტემაში, რომელიც NADPH-ისა და O_2 -ის თანამონაწილეობით ფუნქციონირებს და სისტემაში, რომელიც მხოლოდ ციტოქრომ P450-სა და პეროქსიდს შეიცავს, აქტიურ მაჰიდროქსილირებელ ნაწილაკად ერთიდაიგივე კომპლექს-I წარმოადგენს. ამ კომპლექსს სუბსტრატზე ჟანგბადის ატომის გადატანა შეუძლია წყლის მოლეკულის ერთდროული გამოთავისუფლებით, ან ჯერ თავიდან წყლის მოცილება და ფერილწარმოებულის ($Fe^{3+}O \rightleftharpoons Fe^{4+}O^-$) გარდაქმნა ხდება, რომელსაც შემდგომ ჟანგბადი გადააქვს სუბსტრატზე [188]. სარწმუნოდ იქნა ნაჩვენები ჰიდროქსილირების ერთიდაიგივე სუბსტრატის ($4\text{-}^3H\text{-}აცეტანილილის$) ჟანგვისას სრულ მიკროსომულ სისტემაში კოფაქტორების, NADPH-ისა და O_2 -ის მონაწილეობით ჰიდროქსილირების მექანიზმსა და ციტოქრომ P450-ის მონაწილეობით ჰიდროპეროქსიდულ სისტემათა მექანიზმებს შორის მსგავსება [188].

მიკროსომებში ცხიმოვან მჟავათა ზეჟანგურ ჟანგვაში მნიშვნელოვან თავისებურებას ორვალენტური რკინის იონზე აბსოლუტური მოთხოვნილება წარმოადგენს. მათი საჭირო რაოდენობით არსებობას ფერმენტულ სისტემაში NADPH-სპეციფიკური რედოქს-ჯაჭვის, ხოლო არაფერმენტულში აქ მყოფი აღმდგენელების მოქმედება უზრუნველყოფს. მიჩნეულია, რომ პროცესში რკინა დაკავშირებულ და არა

თავისუფალ მდგომარეობაში იმყოფება. ამ შეხედულების სასარგებლოდ მეტყველებს მიკროსომებზე დამატებული EDTA-სა და ოფენანტროლინის მაინჰიბირებელი ზემოქმედების შექცევადობა. ნაწილაკების გამორეცხვა ზეჟანგით ჟანგვის უნარის სრულ აღდგენას იწვევს. ამასთან, ნაჩვენები იქნა, რომ გამორეცხვის შედეგად კომპლექს-იონთან ერთად მიკროსომებიდან ჰემური და არაჰემური რკინის მოცილება არ ხდება [172, 189].

ამავე შეხედულებით ეგზოგენური რკინის მასტიმულირებელი მოქმედება იმითაა ახსნილი, რომ მემბრანაში ყოველთვის იმყოფებიან საკმარისი ოდენობით თავისუფალი ფუნქციური ჯგუფები, რომლებიც დამატებულ რკინას იკავშირებენ. მათი როლის გარკვევისას იმ მკვეთრ განსხვავებებს ითვალისწინებენ, რომლებიც მიკროსომებსა და მოდელურ სისტემებში მიმდინარე ლიპიდთა პეროქსიდაციის რეაქციებს შორის არსებობენ, რადგან პირველები (მიკროსომები) ფოსფოლიპიდებსა და სტრუქტურულ ცილებს, ხოლო მეორენი (მოდელები) მხოლოდ ფოსფოლიპიდებს შეიცავენ [190]. აღმოჩნდა, რომ ნაერთების მთელი რიგი, რომლებიც რკინასთან კომპლექსებს წარმოქმნიან (ფენანტროლინი, α,α-დიპირიდილი და სხვ.), ლეციტინის, ასკორბატის და რკინის პიროფოსფატის შემცველ მოდელურ სისტემებში პროოქსიდანტებად მოქმედებენ. ამავე დროს მიკროსომებში იგივე კომპლექსონები ან მკვეთრად გამოხატულ ანტიოქსიდანტურ თვისებებს აეღწევენ, ან საერთოდ არავითარ აქტივობას ვერ აჩვენებენ. მიღებულ შედეგებს მხოლოდ ერთი ახსნა შეიძლება მიეცეს: მოდელებში რკინა თავისუფალ მდგომარეობაში, ხოლო მიკროსომებში ცილებთან დაკავშირებული ფორმით ფუნქციონირებს [172]. მიკროსომული კომპლექსი (ლიპიდი – სტრუქტურული ცილა) თავისუფალი ლიპიდისაგან განსხვავდება, მაგრამ მიკროსომული ზეჟანგური ჟანგვის სისტემის მსგავსია.

NADPH-სპეციფიკური ფლავოპროტეიდისა და ლიპოსომებისაგან რეკონსტრუირებული ზეჟანგური ჟანგვის სისტემა თავისი მაქსიმალური აქტივობის გამოსავლენად EDTA-ს დამატებას საჭიროებს [179, 183, 191], მაშინ როდესაც ცნობილია, რომ მიკროსომებში იგივე კონცენტრაციის (50 mkM) EDTA მაინჰიბირებელი მოქმედებით ხასიათდება [172]. სარეაქციო ნარევეში ფოსფოლიპიდთან ცილის თანამყოფობა საგრძნობლად ცვლის ცხიმოვან მჟავათა ზეჟანგური ჟანგვის კინეტიკას; ამ ცვლილებათა ბუნება იმაზე მიუთითებს, რომ მოდელურისგან განსხვავებით ცილაშემცველ სისტემებში Fe^{2+} -იონები ამინომჟავათა განსაზღვრულ ფუნქციონალურ ჯგუფებთან არიან კომპლექსირებული. ცილური ჯგუფებიდან რკინის დამაკავშირებელი ცენტრების რკალურ კანდიდატებად SH-ჯგუფები მოიაზრებიან [182]. NADPH-დამოკიდებულ ზეჟანგური ჟანგვის მექანიზმში SH-ჯგუფები რომ ამ ფუნქციას ატარებენ, ის ფაქტიც ადასტურებს, რომ პროცესი სულფჰიდრილური შხამების (პარაქლორმერკურიბენზოატისა და $HgCl_2$ -ის) სულ მცირე კონცენტრაციებითაც კი მკვეთრ ინჰიბირებას განიცდის [192].

მიკროსომებსა და მიტოქონდრიებში მიმდინარე ლიპიდთა ზეჟანგურ ჟანგვაში მონაწილე სუპეროქსიდ ანიონ-რადიკალების მაგენერირებელ ფაქტორად მჟავა-ლაბილური გოგირდშემცველი არაჰემური რკინა-პროტეიდი ითვლება და ამას ადასტურებს ფ. ხანშტეინისა და გ. ხატეფის [193, 194] მიერ მიღებული შედეგებიც. მათ დაადგინეს, რომ 1. არსებობს პირდაპირი კორელაცია ლიპიდთა ზეჟანგური ჟანგვის სიჩქარესა და რკინა-პროტეიდის შემცველობას შორის; 2. არსებობს კორელაცია ანაერობულ პირობებში pH 4.0-ზე მემბრანათა ინკუბაციისას სუბმიტოქონდრიულ ელექტრონის გადამტან ნაწილაკებში ზეჟანგური ჟანგვის სიჩქარის დაქვეითებასა და არაორგანული სულფიდის გამოთავისუფლებას შორის. „ქაოტროპული“ აგენტებით

ინდუცირებული ზეჟანგური ჟანგვის კინეტიკის შენელება შეიძლება კარგად აიხსნას მემბრანებში გოგირდშემცველი რკინა-პროტეიდის დამლის კინეტიკით.

ტერმინით „ქოტროპული“ აღინიშნება ზედაპირულად აქტიური ნივთიერებების მსგავსი აგენტები, რომლებიც ცილების შექცევად დენატურაციასთან თანამოქმედებით არღვევენ არაკოვალენტურ ურთიერთქმედებებს (წყალბადურ კავშირებს, დიპოლ-დიპოლურ- და ჰიდროფობულ ურთიერთქმედებებს). ასეთ ნივთიერებებს მიეკუთვნება მაგ., შარდოვანა, ან სხვა დეტერგენტთან მისი კომბინაცია [195].

ერთნაირ როლს ასრულებს თუ არა ზეჟანგური ჟანგვის რეაქციათა ინიცირებაში ცილების ნუკლეოფილურ ჯგუფთან წარმოქმნილი რკინის ყველა კომპლექსი? მეტად სააღბათოა, რომ ამ შემთხვევაში წინა პლანზე სტერიული ფაქტორი უნდა გამოდიოდეს, ანუ მემბრანაში წარმოქმნილი ცენტრებისა და უჯერ ცხიმოვან მჟავათა ერთმანეთისადმი განლაგება. მართლაც, წყლოვან სისტემაში გენერირებული რადიკალები მეტად არასტაბილურები არიან [196] და ამდენად მათი მოქმედების ეფექტურობა უპირატესად დამოკიდებული უნდა იყოს რადიკალწარმომქმნელ ცენტრებსა და ცხიმოვან მჟავებს შორის მანძილზე ანუ ერთმანეთის მიმართ წვდომაზე. მნიშვნელობა ენიჭება არა იმას, თუ რა უნარი აქვთ ამ ჯგუფებს ელექტრონების გადატანაში, არამედ იმას, თუ ლიპიდებთან მიმართებაში რა პოზიციას იკავებენ ისინი. დასაშვებად თუ მივიღებთ, რომ ზეჟანგურ ჟანგვას განსხვავებული რადიკალწარმომქმნელი ცენტრები ინიცირებენ, ბუნებრივად გამოდის რომ მათში ასევე სხვადასხვა უჯერი რიგის ცხიმოვანი მჟავები უნდა განიცდიდნენ ჟანგვას. ეს მოსაზრება ექსპერიმენტულადაა დადასტურებული [172]. საინკუ-

ბაციო ხსნარში ასკორბატისა და NADPH-ის ერთდროულად თანამყოფობისას ცხიმოვან მჟავათა ფერმენტული და არაფერმენტული ზეჟანგური ჟანგვის სიჩქარეები მათი სუბსტრატებად ცალკეულად გამოყენებასთან შედარებით გაცილებით მაღალია.

არ შეიძლება არ აღინიშნოს, რომ ი. ვლადიმეროვისა და ა. არჩაკოვის [172] თვალსაზრისის იმის შესახებ, რომ NADPH-სპეციფიკურ ჯაჭვში დაკავშირებული რკინის იონი ფუნქციონირებს როგორც რადიკალ-წარმოქმნილი ცენტრი და ზეჟანგურ ჟანგვას ინიცირებს, ზოგი მკვლევარი არ იზიარებს. მაგალითად, გ. ბილლოკი და ა. ტაპელი [197] თვლიან, რომ რკინის იონის როლი რადიკალური გზით ჰიდროზეჟანგების დაშლაში მდგომარეობს. წარმოქმნილი ზეჟანგური რადიკალები თავის მხრივ ჰიდროზეჟანგებით ახალ რეაქციებს ინიცირებენ, ანუ რკინის იონები რადიკალ-წარმოქმნის ჯაჭვის დაგრძელების სტადიას ემსახურებიან. ამ ორი თვალსაზრისის ექსპერიმენტულად შემოწმება არ მომხდარა, რამდენადაც დასაშვებად იქნა მიღებული კომპრომისული ვარიანტი, რომლის თანახმადაც დაკავშირებულ რკინას შეუძლია იმუშაოს როგორც ზეჟანგური ჟანგვის „ინიციატორმა“, ასევე როგორც ჯაჭვის „დამგრძელებელმა“ [172].

წარმოდგენილი მასალიდან გამომდინარეობს, რომ მიკროსომული რედოქს-ჯაჭვის საწყისი ელექტრონული დონორი (NADPH-ფლავოპროტეინი) და ტერმინალური აქცეპტორი (ციტოქრომ P450) ჩართული არიან ქსენობიოტიკთა ჰიდროქსილირებისა და უჯერ ცხიმოვან მჟავათა ზეჟანგური ჟანგვის პროცესებში. ლიპიდთა ფერმენტულ პეროქსიდაციაში ციტოქრომ P450-ის არა მთლიანი მოლეკულა, არამედ მისი მხოლოდ აპოფერმენტი მონაწილეობს. ამიტომ ამ პროცესში ჩართული შეიძლება იყოს ჰემოპროტეინის არააქტიური ციტოქრომ P420-ის ფორმაც. ორივეს აქტიურ ცენტრში მყოფ აპოფერმენტის SH-ჯგუფთან რკინის პიროფოსფატის დაკავშირება

რადიკალწარმოქმნელი ახალი ცენტრის ფორმირებას იწვევს. ამ შემთხვევაში ციტოქრომ P450 მუშაობს არა როგორც ჰემოპროტეინი, არამედ როგორც მჟავალაბილური არაპემური გოგირდშემცველი რკინაპროტეინი. რა ვითარება გვაქვს მცენარეში?

ჩვენს ლაბორატორიაში შესწავლილ იქნა სოიის 7-8-დღიანი აღმონაცენების ფესვებიდან მიღებულ მიკროსომებში ცხიმოვან მჟავათა პეროქსიდაციისა და ქსენობიოტიკის ჰიდროქსილირების (დიმეთილანილინის N-დემეთილირების) რეაქციათა ცვლილებები მათი ერთდროულად მსვლელობისას [198]. ჰიდროქსილირების რეაქციის ინტენსივობას გამოყოფილი ფორმალდეჰიდის, ზოლო ზეჟანგური ჟანგვის პროცესს მალონის დიალდეჰიდის წარმოქმნის მიხედვით ვაფასებდით.

ჩატარებულმა ექსპერიმენტებმა გვიჩვენეს, რომ Fe^{2+} შესამჩნევად (~15%) ასტიმულირებს მალონის დიალდეჰიდის გენერირებას. შედარებით მცირე ინტენსივობით (~10%) აძლიერებს მას NADPH, ზოლო ამ კოფერმენტისა და Fe^{2+} -ს ერთდროულად თანამყოფობისას ცხიმოვან მჟავათა ჟანგვითი დეგრადაცია თავის მაქსიმალურ (~35%) მნიშვნელობას აღწევს. ამასთან უნდა შევნიშნოთ, რომ ეფექტურობის ხარისხით Fe^{2+} და Fe^{3+} ერთმანეთისაგან მეტად უმნიშვნელოდ განსხვავდებიან, რაც ცხოველურის მსგავსად მცენარის მიკროსომებშიც Fe^{3+} -ის აღმდგენელი სისტემის (მაგ., ასკორბატის) თანამონაწილეობაზე მეტყველებს.

ფოსფატიდილქოლინი, რომელიც NADPH-დამოკიდებულ ჰიდროქსილირებაში აქტიურ კოფაქტორულ ფუნქციას ასრულებს [134], რადიკალურ რეაქციებში ანტიოქსიდანტურ უნარს ამჟღავნებს [172]. ამიტომ მისი გავლენით მიღებული ცვლილებები, კერძოდ დიმეთილანილინის N-დეალკილირების რეაქციის სტიმულაციის პარალელურად ცხიმოვან მჟავათა პეროქსიდაციის 25%-მდე ინჰიბირება მოულოდნელი არ ყოფილა. როგორც ჩანს, ეს ფოსფოლიპიდი ცხი-

მოვან მჟავათა პეროქსიდაციის რეაქციებს თავისი კონტროლის ქვეშ ამყოფებს და მის ლიმიტირებას უზრუნველყოფს.

ცდების მომდევნო სერიაში ჰიდროქსილირებისა და ცხიმოვან მჟავათა ფერმენტულ პეროქსიდაციაში რადიკალური სტადიის არსებობის შესამოწმებლად ფორმალდეჰიდისა და მალონის დიალდეჰიდის მაღალი გამოსავლიანობის მქონე („ოპტიმალურ“) სარეაქციო ხსნარში ანტიოქსიდანტური თვისებების მატარებელი ნაერთები (ცისტეინი, გლუტათიონი, პიროკატეხინი, რუტინი და კვერცეტინი) შეგვექონდა. აღმოჩნდა, რომ ცალკეულად ყველა ეს ჩამოთვლილი ნივთიერება მეტ-ნაკლები ინტენსივობით ორივე პროცესის დამუხრუჭებას იწვევს.

ამგვარად, სადღეისოდ არსებული ექსპერიმენტული მონაცემები საშუალებას გვაძლევენ მივიღოთ, რომ:

1. ქსენობიოტიკის მონოოქსიგენირება და ცხიმოვან მჟავათა ფერმენტული პეროქსიდაციის პროცესების მსვლელობა საკმაოდ მაღალი ავტონომიურობით ხასიათდება;
2. მონოოქსიგენაზური რედოქს-ჯაჭვის საწყისი კომპონენტი – NADPH-დამოკიდებული ფლავოპროტეიდი როგორც სუპეროქსიდ ანიონ-რადიკალების გენერატორი, წარმატებით შეიძლება ჩართულ იქნას ცხიმოვან მჟავათა ფერმენტულ პეროქსიდაციაშიც;
3. ჰიდროქსილირებისა და ცხიმოვან მჟავათა პეროქსიდაციის პროცესებს შორის ციტოქრომ P450-ზე, როგორც რედოქს-ჯაჭვის ტერმინალურ პემოპროტეიდზე კონკურენტული დამოკიდებულება და ფერმენტზე „მონოპოლიზება“ არ ვლინდება;
4. ჰიდროქსილირებაში და ცხიმოვან მჟავათა პეროქსიდაციაში სუპეროქსიდ ანიონ-რადიკალები, როგორც ბიოლოგიური ჟანგვის დაბალი სიმძლავრის აგენტები უშუალოდ არ უნდა იყონ დაკავშირებული. მათი რეკომბინაციის (დისმუტაციის) შედე-

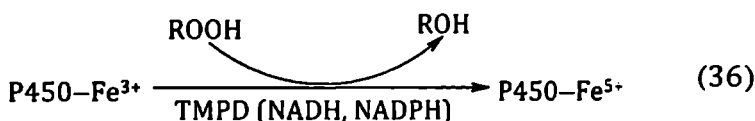
გად გამოთავისუფლებულმა მოლეკულურმა ჟანგბადმა სინ-გლუტური ან ტრიპლუტური ფორმით რკინის იონებთან ურთიერთქმედებით შეიძლება საშუალო სიმძლავრის მეანგველი ოქსენოიდური ნაწილაკები წარმოქმნან, რომლებიც აქტიურად შეიძლება იქნან ჩაბმული ორივე პროცესის დამამთავრებელ არარადიკალური მექანიზმით განხორციელებულ ჟანგვაში.

8. ციტოქრომ P450-ის პეროქსიდაზული აქტივობა; ჟანგვის მონოოქსიგენაზური მექანიზმის პეროქსიდაზურად ტრანსფორმაციის თავისებურებები მცენარეში

ო'ბრაინის [199] ლაბორატორიაში 1972 წელს პირველად იქნა ნაჩვენები, რომ ციტოქრომ P450 პეროქსიდაზურ თვისებებს ფლობს და წყალბადის ისეთი დონორის თანამყოფობისას, როგორიც $N,N,N'N'$ -ტეტრამეთილ-პარა-ფენილენდიამინია (TMPD) სტეროიდთა ჰიდროპეროქსიდების სპირტებამდე აღდგენას ახორციელებს. ამ ჰემოპროტეიდის პეროქსიდაზურ აქტივობაზე დამთრგუნველად არ მოქმედებენ ნახშირბადის მონოოქსიდი, აზოტი და EDTA. მცირე ინჰიბიტორულ ზემოქმედებას (~20%-მდე) მხოლოდ ნატრიუმის აზიდი ავლენს. საყურადღებოა, რომ ვირთხის ღვიძლის მიკროსომები ხარის თირკმელზედა ჯირკვლის მიკროსომებთან შედარებით ყველა შემთხვევაში გაცილებით აქტიურები არიან და გაცხელებით მათი ციტოქრომ P450 პეროქსიდაზურ აქტივობას კარგავს.

პეროქსიდაზურ აქტივობაზე მაინჰიბირებელ მოქმედებას ავლენენ მიკროსომული მონოოქსიგენაზური სისტემის სუბსტრატები. პირველი ტიპის სუბსტრატები (ამიღობირინი, ჰექსობარბიტალი და ლინოლ-მჟავა) 85-35%-ით, ხოლო მეორე ტიპის სუბსტრატები (ანილინი,

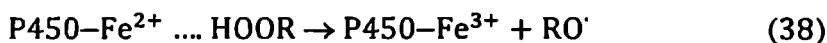
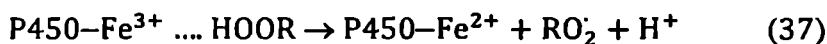
პირილინი და იმიდაზოლი) 85-50%-ით თრგუნავენ პეროქსიდაზურ აქტივობას. ეს მონაცემები იმაზე მეტყველებს, რომ პეროქსიდაზურ რეაქციებში ციტოქრომ P450 დაჟანგული ფორმით მონაწილეობს. ამასთან დაკავშირებით არსებობს ვარაუდი, რომ ჰიდროპეროქსიდებთან ციტოქრომ P450-ის ურთიერთქმედებისას პეროქსიდაზას კომპლექს-I-ის წარმოქმნას აქვს ადგილი, რომელშიც ჰემური რკინა დაჟანგულობის მაღალ ხარისხში იმყოფება [110]. TMPD-ს გარდა წყალბადის დონორად შეიძლება NADH-იცა და NADPH-იც რეალიზდებოდეს:



მრავალ სუბსტრატთა ჰიდროპეროქსიდაზული ჟანგვის არასასურველ თანმხლებ პროცესს ციტოქრომ P450-ის დესტრუქცია წარმოადგენს. მაგალითად, კუმოლის ჰიდროპეროქსიდი შლის არამხოლოდ ციტოქრომ P450-ს, არამედ მიკროსომული რედოქს-ჯაჭვის ისეთ აუცილებელ ელექტრონთა გადამტანს, როგორიც ციტოქრომ b₅-ია. დესტრუქციის კინეტიკის დეტალურმა კვლევამ აჩვენა, რომ ეს პროცესი საკმაოდ რთულია და ძირითადად სამი ფაზისგან შედგება. ჰიდროპეროქსიდის სიჭარბისას დესტრუქცია პროცესის ცალკეული ფაზისათვის სიჩქარის ბიმოლეკულური კონსტანტებით შეიძლება დახასიათდეს. პირველი ფაზის სიღრმე აღნიშნული ჰიდროპეროქსიდის საწყის კონცენტრაციაზე და დესტრუქციის ხანგრძლივობაზე დამოკიდებული [111-113].

მიკროსომული რედოქს-სისტემის სუბსტრატები (მაგ., ანილინი) ძლიერ ამუხრუჭებენ ჰიდროპეროქსიდებით ციტოქრომ P450-ის დესტრუქციას. საინკუბაციო ნარევი რადიკალური პროცესების ინჰიბი-

ტორის α -ნაფტოლის დამატება მისი ზარჯვის გაძლიერებას და დესტრუქციის მნიშვნელოვან დაქვეითებას იწვევს. ამ ანტიოქსიდანტის მაინჰიბირებელი მოქმედება ციტოქრომ P450-ის დესტრუქციის რადიკალური მექანიზმის ბუნებაზე მეტყველებს. ციტოქრომ P450-ისა და ჰიდროპეროქსიდისაგან შემდგარი კომპლექსი აქტიურ ჟანგბად-შემცველ რადიკალებად დაშლას განიცდის:



მიღებული RO_2' და RO' რადიკალები უტევენ ციტოქრომ P450-ის ჰემს ან აპოფერმენტს და შლიან მათ, ანუ ისინი ფერმენტის ქიმიურ მოდიფიკაციას იწვევენ და ავტობლოკირების ამგვარი მექანიზმით აინჰიბირებენ ან საერთოდ გამოყავთ ფერმენტი მწყობრიდან.

ბიოქიმიური თვალსაზრისით არსებობს ქიმიური მოდიფიკაციის მეტად მნიშვნელოვანი და გავრცელებული ტიპი, რომელიც კატალიზური აქტის დასრულებისას ფერმენტის ინაქტივაციაში მდგომარეობს. იგი დაკავშირებულია ჟანგბადის აქტიური ფორმებისა და მაღალი რეაქციისუნარიანი ინტერმედიატების (ქინონების, დიოლების, ეპოქსიდების, ალდეჰიდების, კეტონებისა და სხვ.) გენერაციასთან და ლიტერატურაში ფერმენტის „თვითინაქტივაციის“ სახელწოდებითაა ცნობილი (ცხრილი 3). ამასთან დაკავშირებით ოქსიდაზები, რომლებიც აღნიშნულ პროდუქტთა წარმოქმნა-რეალიზაციასთან არიან უშუალოდ დაკავშირებული, „სუიციდურ“ („თვითმკვლელ“) ფერმენტებს წარმოადგენენ [200-204].

ქიმიურ მოდიფიკაციაში ჩვეულებრივ მკვლევარის არსენალში მყოფი ტექნიკური მიდგომა იგულისხმება, რომელიც ფერმენტთა ყოველმხრივი შესწავლის მიზნით ქიმიური რეაგენტების გამოყენებას ეფუძნება. ამ მეთოდს კატალიზური აქტივობის განმსაზღვრელი

კატალიზის პროცესში ჟანგბადის აქტიური ფორმებით
ფერმენტთა ქიმიური მოდიფიკაცია (ინაქტივაცია) [201]

ფერმენტები	ინაქტივაციის გამომწვევი აგენტი	ქიმიური მოდიფიკაციის მიზეზი
ციტოქრომ P450 2B4	H_2O_2	ცისტეინისა და მეთიონინის ჟანგვა ჰემის დაკარგვა
CuZn- სუპეროქსიდლისმუტაზა	H_2O_2	პისტიდინის ჟანგვა
Fe-სუპეროქსიდლისმუტაზა	H_2O_2	ტრიპტოფანის, პისტიდინისა და ცისტეინის ჟანგვა
D-გლუკოზოქსიდაზა	H_2O_2	ტრიპტოფანის, პისტიდინისა და ცისტეინის ჟანგვა
ქსანთინოქსიდაზა	H_2O_2	ტრიპტოფანის, პისტიდინისა და ცისტეინის ჟანგვა
ქლორპეროქსიდაზა	H_2O_2	ტრიპტოფანის, პისტიდინისა და ცისტეინის ჟანგვა
ლაქტოპეროქსიდაზა	$HO\cdot$	ტრიპტოფანის, პისტიდინისა და ცისტეინის ჟანგვა
გლუტათიონპეროქსიდაზა	O_2^-	ტრიპტოფანის, პისტიდინისა და ცისტეინის ჟანგვა
მიელოპეროქსიდაზა	H_2O_2, ClO^-	მეთიონინის, თიოროზინის ჟანგვა
NADPH-ოქსიდაზა	H_2O_2, ClO^-	ჰემის დაკარგვა

ამინომჟაური ნაშთების რაოდენობისა და ტიპების შესახებ ინფორმაციის მოსაპოვებლად იყენებენ. მის მიზანს როგორც წესი ცილათა სტრუქტურისა და მათ აქტივობას შორის კავშირის ბუნების დადგენა წარმოადგენს. გარდა ამისა, მას პრაქტიკული ღირებულებაც გააჩნია, რამდენადაც ფართო გამოყენებას პოულობს მედიცინისათვის საინტერესო პრეპარატების მიღებისას და ბუნებრივ ნაერთთა ბიოლოგიურად აქტიური ანალოგების რეკონსტრუირებისას [195].

ამჟამად უკვე საყოველთაოდაა ცნობილი, რომ ქიმიური რეა-

გენტებით მანიპულირება თვით უჯრედისთვისაა დამახასიათებელი და ამ უნარს იგი არა ექსპერიმენტატორის ცნობისმოყვარეობის დასაკმაყოფილებლად, არამედ შექმნილი (ხშირად იძულებითი) მკაცრი აუსცილებლობის გამო აკეთებს. ამის საჭიროებას ის აპირობებს, რომ კატალიზური აქტის დასრულების შემდეგ ფერმენტის აქტიურ ცენტრში მოდიფიკაციის შედეგად აღძრული ტოპოქიმიური ცვლილებების ნორმალიზება (რეაბილიტაცია) ან შექმნილ სიტუაციასთან ადაპტირება მოხდეს. უჯრედის ეს უნიკალური თვისებაც ხანგრძლივი ევოლუციური პროცესის შედეგია. ამდენად ტერმინი „ქიმიური მოდიფიკაცია“ მეტად ტევადი აზრის შემცველი ცნებაა [205, 206]. აქვე უნდა შევნიშნოთ, რომ ქიმიური მოდიფიკაციის გზით ფერმენტთა ინაქტივაცია ჩართული უნდა იყოს შიდაუჯრედული ცილების ბრუნვის მექანიზმში, რათა ორგანიზმიდან მათი „დამახინჯებული“ (კონფორმაცია-ტოპოქიმია დაკარგული) მოლეკულების დროული გამოძევება მოხდეს [200]. მოდიფიცირებული ფერმენტი თავის შეცვლილ მდგომარეობას მანამდე ინარჩუნებს, ვიდრე სხვა სპეციალური ფერმენტები მოდიფიკაციის გამომწვევ ქიმიურ ჯგუფებს არ მოაცილებენ და ფერმენტს საწყის მდგომარეობას არ დაუბრუნებენ.

სუბსტრატის ქიმიური ბუნებიდან გამომდინარე, ციტოქრომ P450-ის ინაქტივაცია სამი გზით შეიძლება განხორციელდეს: 1. აპოფერმენტთან მეტაბოლიტების დაკავშირებით; 2. მეტაბოლიტების ჰემის რკინასთან დაკავშირებით და 3. ჰემის ალკილირებით ან დესტრუქციით. პირველი და მესამე გზა შეიძლება კომბინირებულად ხორციელდებოდეს. ჰემის მოდიფიკაცია მისი დაზიანებით შექცევად ინაქტივაციას იწვევს, მაშინ როდესაც აპოფერმენტის მოდიფიკაციით გამოწვეული ინაქტივაცია შეუქცევადია [207-210], ინაქტივაცია უფრო ხშირად ჰემის დეგრადაციის შედეგი უფროა, ვიდრე აპოფერმენტის დესტრუქცია.

აღნიშნულ გამოკვლევებში [209, 210] ციტოქრომ P450-ის P420-ად კონვერსია (ინაქტივაცია) არაა დარეგისტრირებული, ხოლო ა. არჩაკოვის [211] ლაბორატორიაში მიღებულ იქნა შედეგი, რომლის თანახმადაც დითიონიტით აღდგენილი იზოლირებული ციტოქრომ P450-ის იზოფორმა 2B4 აუტოოქსიდაციისას წარმოქმნილი ჟანგბადის აქტიური ფორმებით სწრაფ ინაქტივაციას განიცდის და ეს არააქტიურ ციტოქრომ P420-ად კონვერსიაში გადასვლის ფონზე მიმდინარეობს. მიკროსომული, ან ლიპოსომაში ჩაშენებული ციტოქრომ P450 ფერი- და ფერო მდგომარეობაში საკმაო სტაბილურობას ავლენს. გამოთქმული იქნა მოსაზრება, რომ ციტოქრომ P450-ის ინაქტივაციისათვის აუცილებელია თავისუფალ-რადიკალური სტადია, რომელშიც ციტოქრომ P420-ად მისი კონვერსია ჰემოპროტეიდის დეგრადაციის შუალედ საფეხურს წარმოადგენს, რადგან O_2^- -ის თანამყოფობისას იგი ადვილად კარგავს ჰემს. ოქსიდაზურ და ოქსიგენაზურ რეაქციებში წარმოქმნილი H_2O_2 -ით ჰემის დაჟანგვა და დაზიანება ციტოქრომ P450-ის ინაქტივაციაში „გასაღების“ როლს ასრულებს. მრავალი ფერმენტი და მათ შორის თვით ციტოქრომ P450 ოქსიდაზური სისტემის მხრიდან ინაქტივაციას განიცდის. ნაჩვენებია აგრეთვე ინაქტივაციის NADPH-დამოკიდებულება.

O_2^- და H_2O_2 თავისთავად ძლიერ დამჟანგველებს არ წარმოადგენენ, რადგან O_2^- -ს დაბალი რედოქს-პოტენციალი აქვს, ხოლო H_2O_2 შედარებით სტაბილურია. ამდენად ფერმენტებს ისინი უშუალოდ ვერ უნდა უტევდნენ და პირდაპირ დესტრუქციულ ზემოქმედებას ვერ უნდა ავლენდნენ. უფრო მისაღებად უნდა ჩაითვალოს, რომ ციტოქრომ P450-ის ინაქტივაციაში ძირითად დამჟანგველს $HO^\cdot$ -რადიკალი წარმოადგენს, რომელიც H_2O_2 -დან ჰაბერ-ვეისისა და ფენტონის რეაქციით მიიღება:

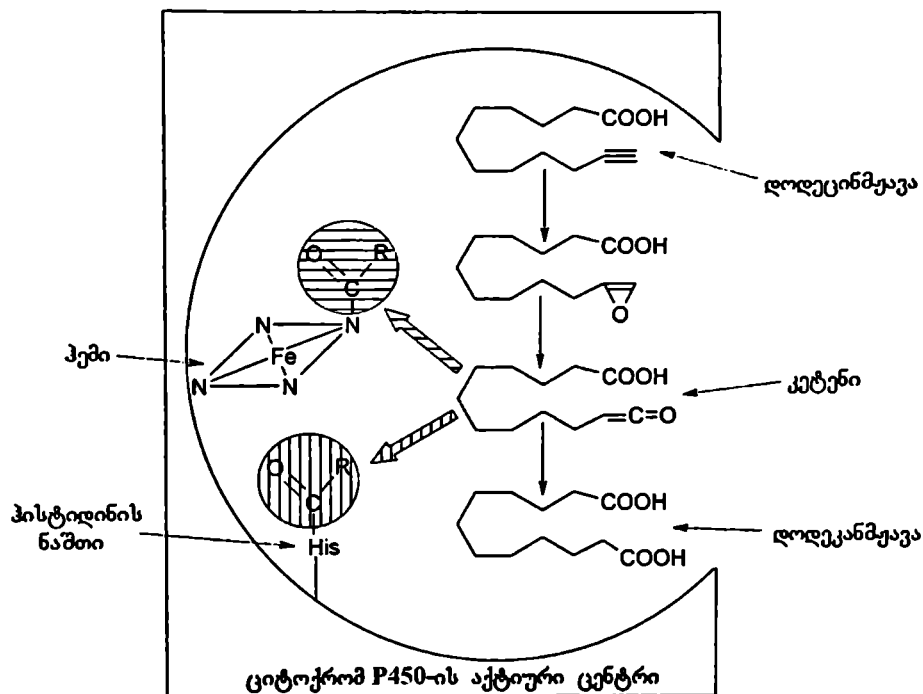


ჰიდროქსილის რადიკალს, რომელსაც მეტად ხანმოკლე სიცოცხლის-უნარიანობა გააჩნია, ძლიერ დამჟანგველად მხოლოდ მისივე გენერირების სიახლოვეს შუბლია მოქმედება. H_2O_2 -ს და O_2^- -ს რაც შეეხებათ, ისინი წარმოქმნის ადგილიდან დიფუზიის საშუალებით დიდ მანძილზე გადაადგილდებიან. H_2O_2 -ს უჯრედულ და შიდაუჯრედულ მემბრანულ ბარიერებში გავლა შეუძლია, მაშინ როდესაც O_2^- დიფუზიას მხოლოდ სპეციფიკური ანიონგამტარი არხების გავლით ახერხებს. O_2^- მეტად რეაქტივისუნარიანი ჰიდროფობურ ან მეტალთან კოორდინირებულ უბნებში ხდება. მისი თანამყოფობისას ჰიდროქსილის რადიკალები ცილების ფრაგმენტაციას და დესტრუქციას იწვევენ [42].

ციტოქრომ P450-ის ინაქტივაცია მნიშვნელოვნად მუხრუჭდება ფოსფოლიპიდებით. ამასთან ეფექტის ხარისხი დამოკიდებული არაა მემბრანაში მათ შემადგენლობაზე. ამ ჰემოპროტეიდის ინაქტივაციის ვარდნას ადგილი აქვს აგრეთვე ანაერობულ პირობებში ან ნახშირბადის მონოოქსიდისა და ციტოქრომ b5-ის თანამყოფობისას.

ჰემის ალკილირებით გამოწვეული ინაქტივაციის ერთ-ერთი ტიპური მაგალითია ბოცვრის ღვიძლის მიკროსომებში დოდეცინმჟავას ციტოქრომ P450-დამოკიდებული ჟანგვის ინჰიბირება. ამ დროს წარმოქმნილი აქტიური ინტერმედიატი — კეტენი ჰემის აცილირებას იწვევს, რაც ამ ჰემოპროტეიდის ინაქტივაციის მიზეზი ხდება [212]. ამასთან დაკავშირებით უდაოდ საყურადღებო შედეგი იქნა მიღებული კ. ჰელვიგისა და თანაავტ. [213, 214] მიერ, როდესაც მათ ანალოგიური გამოკვლევები ჩაატარეს და ობიექტად აღებული ჰქონდათ მცენარის (ცერცვის) ეთიოლირებული აღმონაცენების მიკროსომები. მათ მიერ დადგენილი იქნა, რომ ცხოველებისაგან განსხვავებით მცენარეში ინაქტივაციის მთავარი მიზეზი ჰემოპროტეიდის აქტიურ

ცენტრში ჰემთან ახლოს მყოფი ერთ-ერთი ამინომჟავის (სავარაუდოდ ცისტეინის ან ჰისტიდინის) ნუკლეოფილური ნაშთების აცილირება (ნახ. 24).

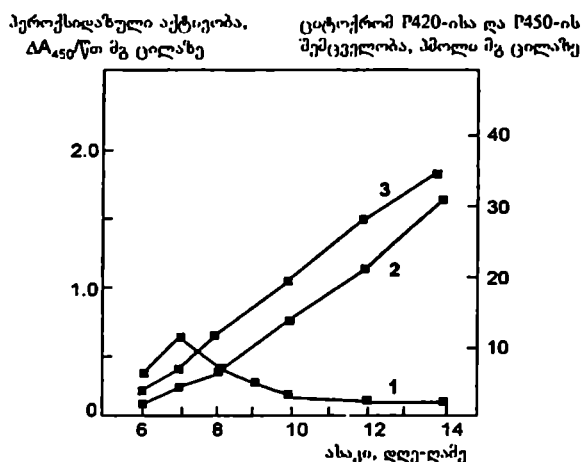


ნახ. 24. ციტოქრომ P450-ის ინაქტივაცია [213]. წრეებში ვერტიკალური შტრიხებით ნაჩვენებია მცენარეული ციტოქრომ P450-ის ქიმიური მოდიფიკაციის შედეგად ამინომჟავის ნაშთთან წარმოქმნილი აცილის ჯგუფი, ხოლო ჰორიზონტალური შტრიხებით – ცხოველური ციტოქრომ P450-ის ჰემთან წარმოქმნილი აცილის ჯგუფი (სიმარტივისათვის სურათში ჩვენს მიერ შეტანილია არაპრინციპული ხასიათის ცვლილებები).

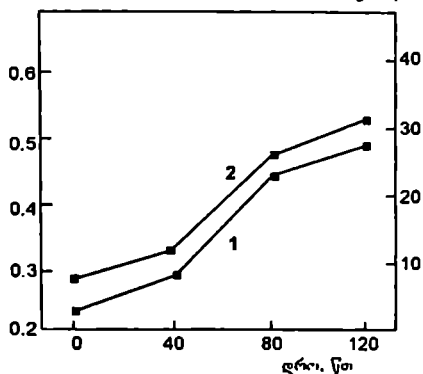
ამგვარად, ცხოველური და მცენარეული ციტოქრომ P450-ის ინაქტივაციაში არსებითი განსხვავება იმაში ვლინდება, რომ ცხოველურ ჰემოპროტეიდში ქიმიურ მოდიფიკაციას ჰემი, ხოლო მცენარეში აპოფერმენტი განიცდის.

მცენარეში ციტოქრომ P450-ის პეროქსიდაზული აქტივობის შესწავლას ჩვენ სათანადო ყურადღება და დრო დავუთმეთ [215-218]. უპირველესად საჭიროდ ჩათვალეთ დაგვედგინა მიკროსომული ციტოქრომ P450-ის პეროქსიდაზული აქტივობა და ის პირობები, რომლის დროსაც წინა პლანზე ამ ფენომენის უპირატესობა გამოდის.

ცდები ტარდებოდა ეთიოლირებულად გაზრდილ სიმინდის სხვადასხვა ასაკის (7-დან 14-დღემდე) აღმონაცენების ფესვებიდან მიღებულ მიკროსომულ ფრაქციაზე და მასში ციტოქრომ P450-ის არა-აქტიურ P420-ად კონვერსიის ფონზე ვაკვირდებოდით პეროქსიდაზას ინიციაციას (ნახ. 25 და 26).



ნახ. 25. მიკროსომებში ციტოქრომების P450-ისა და P420-ის შემცველობის და პეროქსიდაზული აქტივობის ცვლილებები მცენარის ასაკისაგან დამოკიდებულებით [216]. 1. ციტოქრომ P450; 2. ციტოქრომ P420; 3. პეროქსიდაზული აქტივობა.

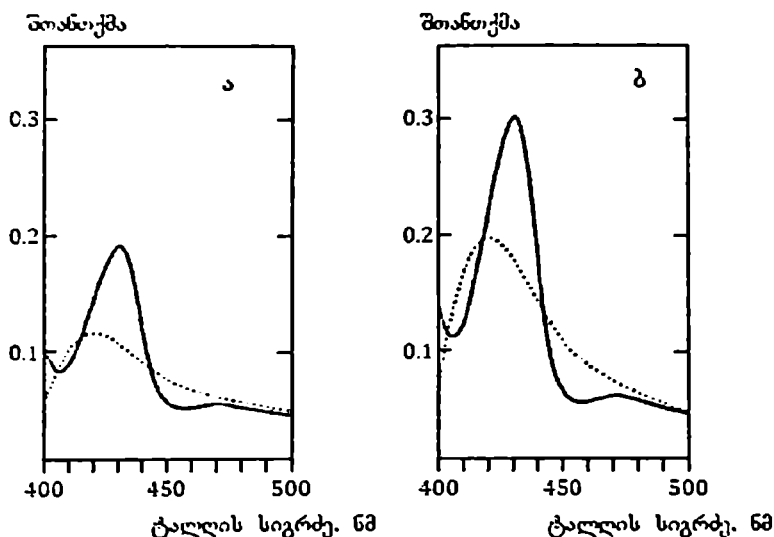


ნახ. 26. ციტოქრომების P420/P450-ის თანაფარდობაზე დამოკიდებულით, მიკროსომების 120 წთ-იანი აერაციისას [216].
1. პეროქსიდაზული აქტივობა; 2. P420/P450.

სქემებზე წარმოდგენილი მრუდებიდან ვხედავთ, რომ ციტოქრომულ კომპონენტთა შემცველობა და შესაბამისად მიკროსომებში პეროქსიდაზას ინიცირება უპირატესად მცენარის ასაკზეა დამოკიდებული. ამასთან დაკავშირებით მიკროსომები პირობითად დავყავით „ახალგაზრდა“ (7-დღიანებამდე) მიკროსომებად, რომელშიც ამ ციტოქრომების შემცველობა მაქსიმალურია და „ხანდაზმულ“ (7-დღიანზე მეტი ხნის) მიკროსომებად, რომელშიც მათი შემცველობა კლებას განიცდის. „ახალგაზრდა“ მიკროსომების პეროქსიდაზული აქტივობა უმნიშვნელოა და აქ ძირითადად ციტოქრომ P450 დომინირებს, ხოლო ფრაქციის ასაკში შესვლასთან ერთად არააქტიურ ციტოქრომ P420-ად კონვერსიის გზით ადგილი აქვს მისი შემცველობის მკვეთრ ვარდნას და პეროქსიდაზას შემცველობის განუხრელ ზრდას. მეტად საყურადღებოა, რომ ანალოგიური სურათი შეინიშნება „ახალგაზრდა“ მიკროსომული ფრაქციის 120 წთ-იანი

აერაციისას (ნახ. 26). P420/P450-ის ფარდობის 5-ჯერ ზრდას პეროქსიდაზას შემცველობის 1.5-ჯერ ზრდა შეესაბამება [215, 216].

„ხანდაზმული“ მცენარის მიკროსომებსა და პირშუშხას პეროქსიდაზას კომერციული პრეპარატის („რენალის“ ფორმის) სპექტრალურმა ანალიზმა მათი აბსოლუტური იდენტურობა გვიჩვენა [216]. კერძოდ, ორივე შთანთქმის ერთნაირ მაქსიმუმებს ავლენენ დაჟანგულ (420 ნმ-ზე) და აღდგენილ (432 ნმ-ზე) მდგომარეობაში (ნახ. 27).



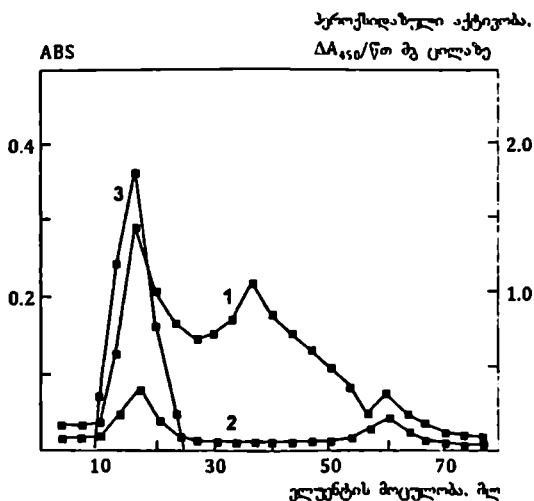
ნახ. 27. (ა) სიბინდის 9-დღიანი ეთიოლირებული ნაზარდების მიკროსომული ფრაქციის დიფერენციალური სპექტრები; (ბ) პირშუშხას პეროქსიდაზას კომერციული ფერმენტული პრეპარატის დიფერენციალური სპექტრი [216].

„ხანდაზმული“ მიკროსომული ფრაქცია და პეროქსიდაზას ფერმენტული პრეპარატი მსგავს თვისებებს ამჟღავნებდნენ პეროქსიდაზურ აქტივობასთან მიმართებაშიც. H_2O_2 -დამოკიდებული გვამაგონის

ჟანგვის ინტენსივობა ორივე შემთხვევაში ერთნაირად ითრგუნება NADPH-ით, აზიდით, დითიონიტით და იონური დეტერგენტით (CHAPS-ით). ნახშირბადის მონოოქსიდი პეროქსიდაზურ აქტივობაზე პრაქტიკულად არანაირ გავლენას არ ახდენს.

მიღებულმა შედეგებმა საფუძველი მოგვცა სარწმუნოდ მიგველო, რომ მცენარის მიკროსომებში ფუნქციონირებას იწყებს პეროქსიდაზული თვისებების მქონე ჰემოპროტეინი და მათი აქტივობის ზრდა მცენარის ასაკზე, ციტოქრომ P420-ის შემცველობის ზრდითა და ციტოქრომ P450-ის შემცველობის კლების პარალელურად ვითარდება, ანუ პეროქსიდაზული აქტივობა ციტოქრომ P420-ს ეკუთვნის [216].

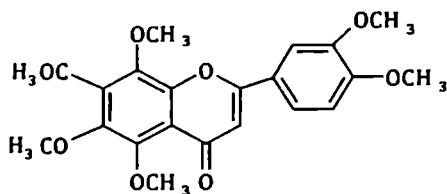
ჩვენს მოსაზრებას ადასტურებს მიკროსომული ფრაქციის ქრომატოგრაფიული ანალიზით მიღებული შედეგების (ნახ. 28). ნატრი-



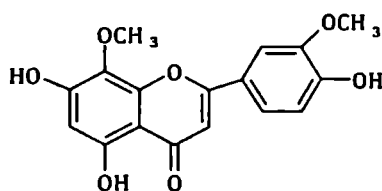
ნახ. 28. მიკროსომული ფრაქციის გელ-ფილტრაციის ქრომატოგრამა [216]. 1. A_{280} ; 2. A_{432} ; 3. პეროქსიდაზული აქტივობა; სვეტი- 50×1.6 სმ; გელი – ULTROGEL AcA 44; ელუენტი-0.05% Na-ლოდეცილსულფატი, 1/30M ფოსფატის ბუფერი (pH 7.4).

უმის დიდეცილსულფატით დამუშავებული მიკროსომების გელფილტრაციის ქრომატოგრამაზე მიღებულ იქნა ცილის სამი ძირითადი მრუდი, რომელთაგანაც პეროქსიდაზული აქტივობის მქონე პირველი ფრაქციაა, რომელთაგან პეროქსიდაზული აქტივობა მხოლოდ ~100 kD მოლეკულური მასის მქონეს გააჩნია და ეს მასა პეროქსიდაზას ფერმენტული პრეპარატის მასას (~40 kD) არ შეესაბამება. მეორე მრუდი შედარებით დაბალი მასის პეოპროტეინი – ციტოქრომ b₅-ია. ფრაქციაში იდენტიფიცირებულია არაჰემური ცილა (~30-40kD), სავარაუდოდ NADPH-ციტოქრომ 450-რედუქტაზა.

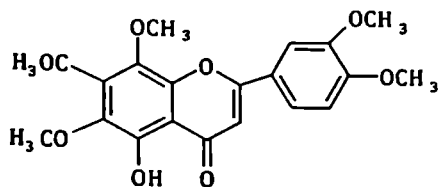
ჟანგვის მონოოქსიგენაზური მექანიზმის პეროქსიდაზურად შენაცვლების საინტერესო სურათი გამოიკვეთა ფლავონოიდების მიკროსომული ჟანგვის შედეგად [218]. ცდებში ჟანგვის სუბსტრატებად გამოეცადათ მეთოქსილირების განსხვავებული ხარისხის მქონე ოთხი ფლავონოიდი; მათი შერჩევა იმ პრინციპით მოხდა, რომ ორი მათგანი (ნობილეტინი და 5-OH-ნობილეტინი) მონოოქსიგენირების (O-დემეთილირების) გზით უნდა დაჟანგულიყო, ხოლო დანარჩენი ორი (ლიმოციტრინი და კვერცეტინი), რომლებიც უკვე ჰიდროქსილირებულ ნაერთებს წარმოადგენენ ძირითადად პეროქსიდაზული ჟანგვის მექანიზმით უნდა გარდაქმნილიყვნენ.



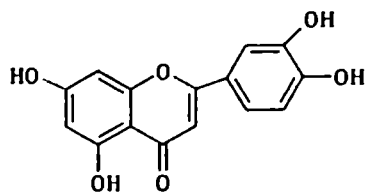
ნობილეტინი
(5,6,7,8,3',4'-ჰექსამეთოქსიფლავონი)



ლიმოციტრინი
(3,5,7,4'-ტეტრაოქსი-8,3'-დიმეთოქსიფლავონი)

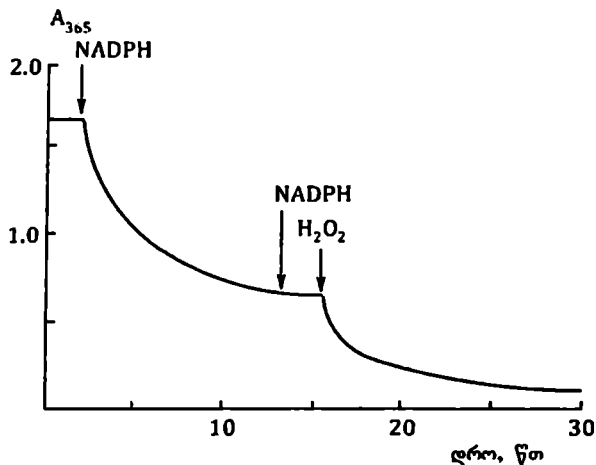


5-OH-ნობილეტინი
(5-ოქსი-6,7,8,3',4'-ჰენტამეთოქსიფლავონი)

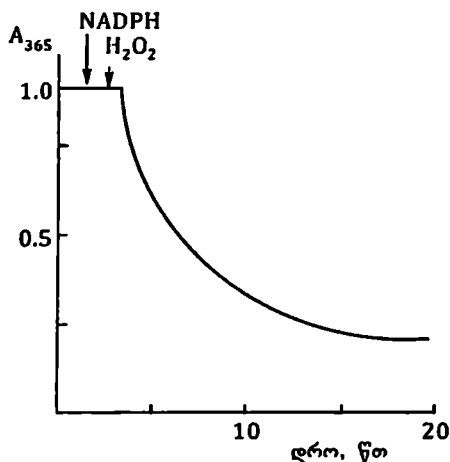


კვერცეტინი
(3,5,7,3',4'-ჰენტოქსიფლავონი)

აღმოჩნდა, რომ „ახალგაზრდა“ მიკროსომებში ნობილეტინი და მასთან ერთად 5-OH-ნობილეტინიც მხოლოდ NADPH-ის თანამყოფობისას განიცდიან ჟანგვას (ნახ. 29), და სარეაქციო არეში ფორმალდეჰიდი გროვდება. NADPH-ის ნაცვლად H_2O_2 -ის გამოყენება მათი O-დემეთილირების რეაქციის ინტენსივობაზე არავითარ გავლენას არ ახდენს. მაშასადამე, აღნიშნულ ფლავონოიდთა ჟანგვის საწყისი სტადია მონოოქსიგენაზური მექანიზმით ვითარდება და პლატოზე გასვლის შემდეგ NADPH-ის განმეორებითი დამატებით კინეტიკური მრუდი ცვლილებებს აღარ განიცდის. ეს შედეგი იმაზე მიუთითებს, რომ ამ მომენტისათვის O-დემეთილირების სუბსტრატი მთლიანადაა დახარჯული და რეაქცია დამთავრებულია. მიღებული პროდუქტის შემდგომი ჟანგვა (მისი კონცენტრაციის შემცირების მიხედვით) უკვე H_2O_2 -დამოკიდებული ხდება, ანუ მონოოქსიგენირებული ფლავონოიდი ამჯერად პეროქსიდაზას სუბსტრატადაა გარდაქმნილი. „ზანდაზმულ“ მიკროსომებში კვერცეტინისა და ლიმოციტინის NADPH-დამოკიდებული ჟანგვა საერთოდ არ შეინიშნება და რეაქცია მხოლოდ H_2O_2 -თანამყოფობით მიმდინარეობს (ნახ. 30) [218]. ამგვარად, მცენარეულ მიკროსომებში მეთოქსი-ჯგუფებით მდიდარი ფლავონოიდები მონოოქსიგენაზური, ხოლო ჰიდროქსი-წყარმომცემები პეროქსიდაზული მექანიზმებით გარდაიქმნებიან.

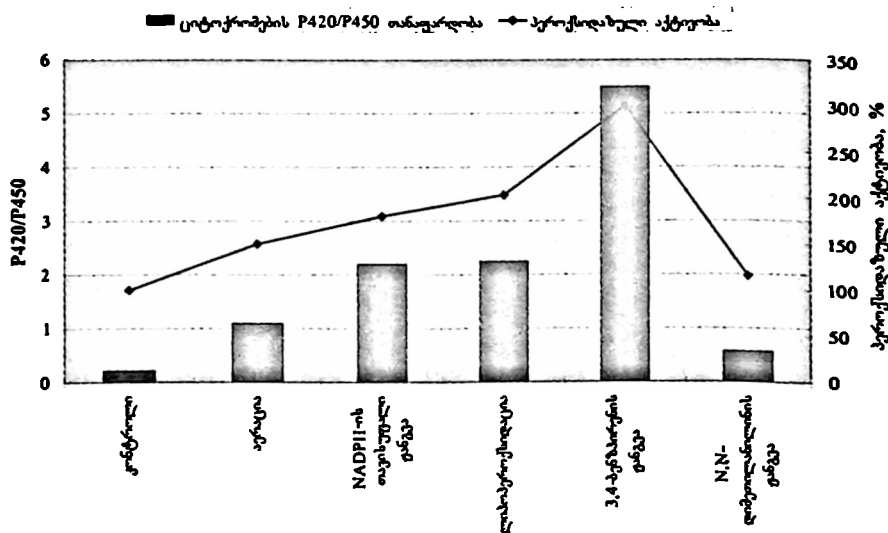


ნახ. 29. ნობილეტინის ჟანგვა 7-დლიანი ნაზარდების ფესვების მიკროსომებში. (1/15 M ფოსფატის ბუფერი pH 7.4; 0.33 მგ/მლ მიკროსომული ცილა; 100 μ M NADPH; 15 μ M H₂O₂; 25 μ M ნობილეტინი) [218].



ნახ. 30. კვერცეტინის ჟანგვა 14-დლიანი ნაზარდების ფესვების მიკროსომებში. (1/15 M ფოსფატის ბუფერი pH 7.4; 0.33 მგ/მლ მიკროსომული ცილა; 100 μ M NADPH; 15 μ M H₂O₂; 25 μ M კვერცეტინი) [218].

ციტოქრომ P450-ის ქიმიური მოდიფიკაცია აქტიურად ზო-
ციელდება მიკროსომული ფრაქციის აერაციისას და NADPH-ის
თავისუფალი (ჰიდროქსილირებასთან არაშეუღლებული) ჟანგვისას. ამ
რეაქციის მსვლელობისას P420/P450-ის ფარდობის 10-ჯერ ზრდას
პეროქსიდაზული აქტივობის 1.8-ჯერ ზრდა შეესაბამება, ხოლო მემ-
ბრანაში ინტენსიური ლიპოპეროქსიდაციისას პეროქსიდაზული აქტი-
ვობა ორმაგდება. ციტოქრომ P450-ის პეროქსიდაზად გარდაქმნის
მაქსიმალური მნიშვნელობა 3,4-ბენზპირენის ჟანგვისას მიიღება, რო-
დესაც P420/P450-ის თანაფარდობის 25-ჯერ ზრდისას პეროქსიდაზუ-
ლი აქტივობის გასამმაგებას აქვს ადგილი (ნახ. 31) [206].



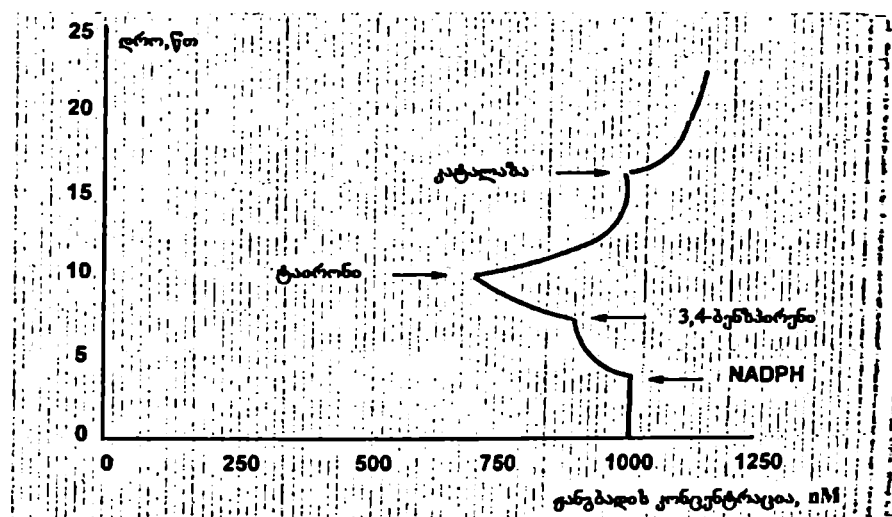
ნახ. 31. სიმიინდის ეთიოლირებული ნაზარდების მიკროსომული ფრაქ-
ციის პეროქსიდაზული აქტივობების ცვლილებები აერაციისა
და სხვადასხვა სუბსტრატების ჟანგვისას [206].

მიღებული შედეგების ასახსნელად ჩვენ დავუშვიტ, რომ ციტოქრომ P450-ის ქიმიურ მოდიფიკაციაში უმნიშვნელოვანეს როლს ჟანგბადის აქტიური ფორმა (ან ფორმები) უნდა ასრულებდეს. ამასთან დაკავშირებით შევეცადეთ (თუმცა არაპირდაპირი გზით) ექსპერიმენტულად გვეჩვენებინა ბენზპირენის ჟანგვაში სუპეროქსიდ ანიონ-რადიკალების ან წყალბადის პეროქსიდის შესაძლო მონაწილეობა. ამ მიზნით მიკროსომულ ფრაქციაში თანმიმდევრობით შეგვექონდა NADPH, 3,4-ბენზპირენი, ტაირონი (4,5-დიჰიდროქსი-1,3-დისულფო-მჟავა), რომელიც სუპეროქსიდისმუტაზას დაბალმოლეკულურ მემბრანაში განვლად ანალოგს წარმოადგენს და სუპეროქსიდ-რადიკალების „დამჭერია“ ($2H^+ + 2O_2^- \rightarrow H_2O_2 + O_2$) და ბოლოს სარეაქციო სუსპენზიაში ვამატებდით კატალაზას, რომლის მოქმედებითაც წარმოქმნილი H_2O_2 ასევე იშლება მოლეკულური ჟანგბადის გამოყოფით ($2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$). ფრაქციის მიერ ჟანგბადის მოხმარების კინეტიკას ვსაზღვრავდით პოლაროგრაფულად (ნახ. 32) [205].

სურათიდან ვხედავთ, რომ პირველი ორი ნაერთის (სუბსტრატისა და კოსუბსტრატის) დამატებისას ჟანგბადის მოხმარება ძლიერდება, ხოლო ტაირონის დამატებისთანავე მრუდის პროფილი მკვეთრ ცვლილებას განიცდის, რაც იმის მაჩვენებელია, რომ ჟანგბადის მოხმარებას მისი გამოყოფა ცვლის. ანალოგიურ ეფექტს ავლენს კატალაზაც. ამდენად სავსებით სავარაუდოა, რომ ბენზპირენის NADPH-დამოკიდებულ ჟანგვაში სუპეროქსიდ ანიონ-რადიკალების მონაწილეობას მართლაც აქვს ადგილი.

ერთი ჭეშმარიტი ფერმენტის – ციტოქრომ P450-ის (E.N. 1.14.14.1) ისეთ ქიმიურ მოდიფიკაციას, რომლის დროსაც ინაქტივაციის გზით მისი მოქმედების მონოოქსიგენაზური მექანიზმის მეორე ჭეშმარიტი ფერმენტის – პეროქსიდაზას (E.N. 1.11.1.1) ოქსიდაზური მექანიზმით შენაცვლება ხდება, ჩვენ ფერმენტის ტრანსფორმა-

ცია ვუწოდეთ. იმის გამო, რომ პეროქსიდაზურ აქტივაცია ციტოქრომ P420 ავლენს, რომელიც თავისი სპექტრალური მახასიათებლებით პეროქსიდაზას ფერმენტული პრეპარატის იდენტიფიკაციის მიზნით, რომ ტერმინი „ტრანსფორმაცია“ უფრო ესადაგება ამ ნომენის არსს, ხოლო პეროქსიდაზული აქტივობის მქონე ციტოქრომ P420-ს პირობითად „ტრანსფორმანტ-პეროქსიდაზა“ (T-პეროქსიდაზა) ვუწოდეთ. ციტოქრომ P450-ად მისი რეკონვერსია აღარ ხდება და დენად ტრანსფორმირება შეუქცევადი პროცესია [216, 217].



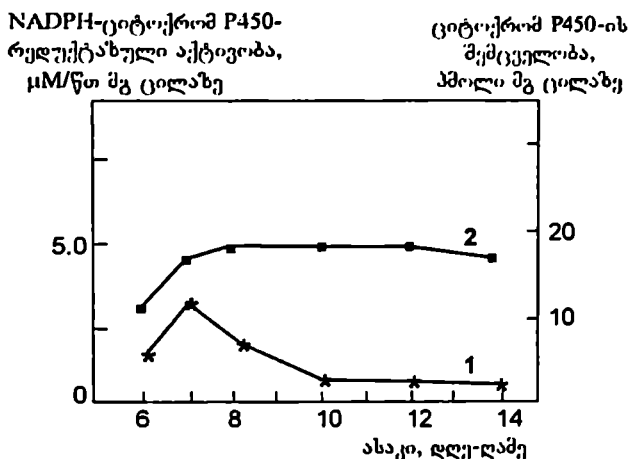
ნახ. 32. სიმიდის ეთიოლირებული ნაზარდების მიკროსოპული ფაქციის მიერ 3,4-ბენზპირენის NADPH-დამოკიდებული ოქსიდაციის პოლაროგრაფია [205]. (ფოსფატის ბუფერი pH 7.3, 3,4-ბენზპირენი 0.01 mM; NADPH – 0.24 mM, მიკროსოპული ფრაქცია – 1 მკ ცილა/მლ).

ციტოქრომ P450-ის ტრანსფორმაციის უპირატესი ბიოქიმიური დანიშნულება ფანგბადის აქტიური ფორმების (უპირატესად

სა და H_2O_2 -ის) ჭარბად დაგროვების აღკვეთაში მდგომარეობს. აერირებულ და „ხანდაზმულ“ მიკროსომებში ფერმენტთა ტანდემი – T-პეროქსიდაზა-სუპეროქსიდლისმუტაზა (E.N. 1.15.1.1) – კატალაზა (E.N. 1.11.1.6) ჟანგბადის ამ აქტიურ ფორმათა „უსარგებლო“ წილის „ჩაქრობის“ მტკიცე გარანტიას ქმნის [205, 206]. მაშასადამე, ჟანგბადშემცველი აქტიური პროდუქტების გენერატორი ფერმენტი-ციტოქრომ P450 თვითინაქტივაციის გზით მწყობრიდანაა გამოსული და ამ არასასურველი ინტერმედიატების წარმოქმნის შესაძლებლობა საფუძველშივეა ლიკვიდირებული.

ციტოქრომ P450-ის ტრანსფორმირების შედეგად მონოოქსიგენაზური სისტემის საწყისმა კომპონენტმა NADPH-ციტოქრომ P450-რედუქტაზამაც, როგორც ამ ჰემოპროტეიდისათვის აღმდგენელი ექვივალენტების ძირითადმა დონორმა, ცხადია თავისზე სხვა ფუნქციური დატვირთვა უნდა აიღოს. ამ მოსაზრების სასარგებლოდ მეტყველებს ექსპერიმენტული მონაცემები, რომლებიც ჩვენს ლაბორატორიაში იქნა მიღებული [217]. აღმოჩნდა, რომ აერაციისა და მცენარის ასაკში შესვლასთან ერთად ციტოქრომ P450-ის T-პეროქსიდაზად გარდაქმნის ფონზე NADPH-რედუქტაზას თავისი აქტივობის მაღალი დონე შენარჩუნებული აქვს (ნახ. 33). ამავე დროს გაირკვა ისიც, რომ მიკროსომულ ფრაქციაში გვიაკოლის ჟანგვის ინტენსივობა (ე.ი. პეროქსიდაზული აქტივობა) არამგძნობიარეა ტაირონის, სპილენძ-ლიზინის კომპლექსისა და ფეროციანიდის (ანუ O_2^- -ის „შეშოკავი“ ნაერთების) მიმართ. მაშასადამე, პეროქსიდაზურ რეაქციაში NADPH-რედუქტაზა და სუპეროქსიდ ანიონ-რადიკალები მონაწილეობას არ ღებულობენ. ციტოქრომ P450-სა და (T-პეროქსიდაზასა) და რედუქტაზას შორის ამ შემთხვევაში ფუნქციური კავშირი გაწყვეტილია. პარალელურად გამოვლინდა ერთი საყურადღებო ფაქტი: რედუქტაზაზე გენერირებული O_2^- ლიპიდთა

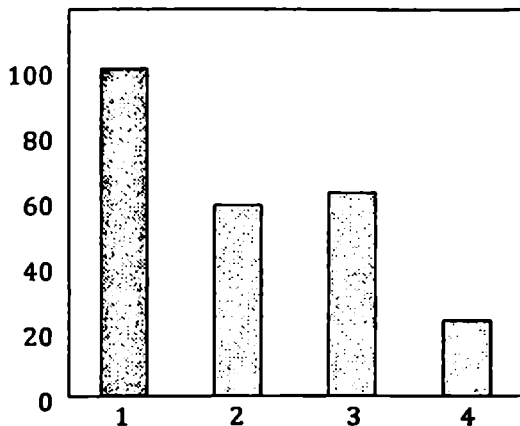
პეროქსიდაციის (მალონის დიალდეჰიდის გამოყოფის) გაძლიერებას ხმარდება, რასაც ამ პროცესზე ზემოთ ჩამოთვლილი „შემბოჭავი“ აგენტების მაინჰიბირებელი ზემოქმედება ადასტურებს (ნახ. 34). ამასთან აღმოჩნდა, რომ ლიპიდურ პეროქსიდაციაში რედუქტაზური აქტივობის მხოლოდ ~50%-მდე განიცდის რეალიზებას, ხოლო ფერმენტის დანარჩენი ენზიმატური სიმძლავრე მიტოქონდრიებში მიმდინარე ენერგეტიკულ პროცესებს ხმარდება (ნახ. 35) [151].



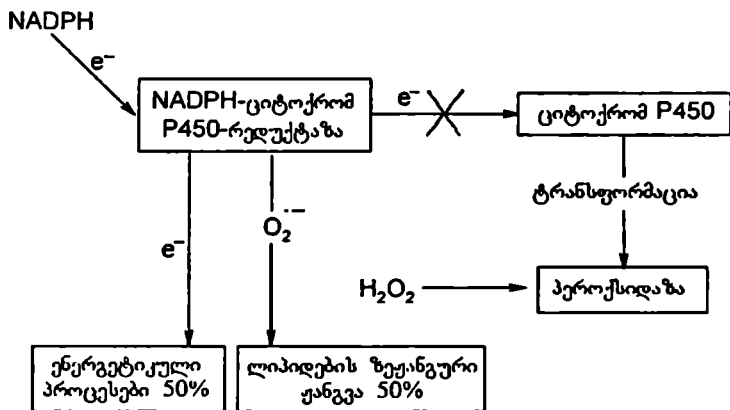
ნახ. 33. მცენარის ასაკისგან დამოკიდებულებით მიკროსომებში ციტოქრომ P450-ის შემცველობისა და NADPH-ციტოქრომ P450-რედუქტაზური აქტივობის ცვლილებები [217]. 1. ციტოქრომ P450-ის შემცველობა. 2. NADPH ციტოქრომ P450-რედუქტაზის აქტივობა.

მიკროსომიდან მიტოქონდრიაზე ან პირიქით ელექტრონთა ტრანსმემბრანული მიგრაციისათვის ცხადია აუცილებელ პირობას ამ მემბრანული სტრუქტურების მჭიდრო კონტაქტი უნდა წარმოადგენდეს. 1972 წ. დ. სინტისა და ი. შენკმანის [219, 220] მიერ ელექტრონული მიკროს-

მალონის დიალდეჰიდი, %



ნახ. 34. ტაირონის, სპილენძ-ამინომჟაური კომპლექსისა და ფერიციანიდის გავლენა ლიპიდების NADPH-დამოკიდებულ ზეუანგურ ჟანგვაზე სიმინდის 14-დღიანი ეთიოლირებული ნაზარდების მიკროსომებში [151]. 1. კონტროლი, 2. ტაირონი; 3. Cu^{2+} -Lys; 4. ფერიციანიდი.



ნახ. 35. NADPH-ციტოქრომ P450-რედუქტაზას შესაძლო ფუნქციები ციტოქრომ P450-ის ტრანსფორმირების პირობებში. ელექტრონის ტრანსპორტის ის გზა, რომელიც ამდროს აღარ ფუნქციონირებს გადახაზულია. [151].

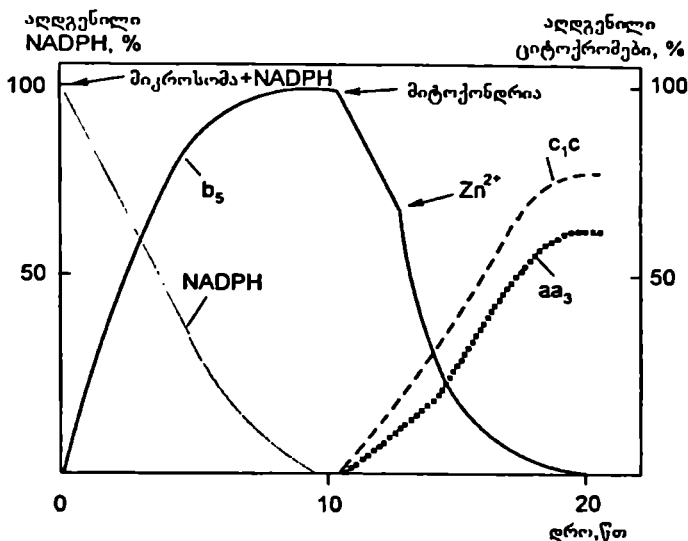
კოპით დაფიქსირებულ იქნა ქსენობიოტიკის თანამყოფობისას ენ-
დოპლაზმური რეტიკულუმის მემბრანათა ვეზიკულებად შეკვრა და
მიტოქონდრიის ირგვლივ კომპაქტურად ორიენტირება. მიტოქონდრი-
ული ჟანგვის (კრებსის ციკლის) სუბსტრატების დამატება ქსენობი-
ოტიკით მიკროსომული ჟანგვის მასტიმულირებელ ფეფექტს იძლეოდა.
ამ მოვლენას ავტორებმა „მიტოქონდრიული კონტროლი“ უწოდეს.
ოდნავ მოგვიანებით (1973-1974 წ.წ.) ამ მიმართულებით ერთო-
ბლივი კვლევა ჩატარდა ა. არჩაკოვისა და ვ. სკულაჩოვის [221,
222] ლაბორატორიებში. მათ მიერ დადგენილ იქნა, რომ „მიტოქონ-
დრიული კონტროლი“ ცალმხრივი პროცესი არაა და პარალელურად
არსებობს მიკროსომული რედოქს-ჯაჭვიდან მიტოქონდრიულ სუნ-
თქვით ჯაჭვზე აღმდგენელ ექვივალენტთა გადატანის შესაძლებლო-
ბაც. თავდაპირველად ამ მკვლევარებმა მიიჩნიეს, რომ გადატანის
როლს ციტოქრომ C უნდა ასრულებდეს, რამდენადაც მას მიტოქონ-
დრიიდან გამოსვლის, აღდგენის და უკან შეღწევის უნარი აქვს.
შემდგომში აღმოჩნდა, რომ მიკროსომებიდან მიტოქონდრიებში
ელექტრონების გადატანა ციტოქრომ C-ს გარეშეც ხორციელდება,
ხოლო ციტოქრომ b₅-ის დაშლისას ელექტრონთა მემბრანათაშორისი
ტრანსპორტი საერთოდ ქრება, ამის შედეგად მტკიცედ დამკვიდრდა
შეხედულება, რომ ორ მემბრანულ სტრუქტურას შორის ელექტრო-
ნის გადატანა ციტოქრომ b₅-ის მონაწილეობით ხორციელდება [222].
იგი რედუცირებადი ექვივალენტების თავისებური გამანაწილებლის
ფუნქციას ასრულებს და უჯრედისათვის საჭირო სიტუაციებში ოპ-
ტიმალურად ამარაგებს მიტოქონდრიებისა და მიკროსომების რედოქს-
ჯაჭვებს. მემბრანათა შორის ელექტრონთა ტრანსპორტს ისიც
აადვილებს, რომ მიკროსომულ და მიტოქონდრიულ მემბრანათა b₅-
ციტოქრომებს დადებითი რედოქს-პოტენციალი (შესაბამისად მიკრო-

სომულ b_5 -ს $+24$ mv, მიტოქონდრიულს $+40$ mv) გააჩნიათ და მათ შორის თითქმის იზოპოტენციური ველი იქმნება, ამასთან დაკავშირებით ვ. სკულაჩოვის [223] მიერ ფორმულირებულ იქნა შემბრანულ ფერმენტთა ე.წ. „ტაქსისის“ (მიმართულების შეცვლის) ჰიპოთეზა, რომლის თანახმადაც დროის მოცემულ მომენტში ელექტრონთა გადატანაში ციტოქრომ b_5 -ის გარკვეული ნაწილი ჩართული არაა და ეს „უმუშევარი“ b_5 -ციტოქრომები მაინც აუცილებელია ორ შემბრანულ სტრუქტურას შორის საკონტაქტო წერტილების მოსაძებნად და მათ შორის რედოქს-პოტენციალების გასათანაბრებლად, რათა ელექტრონთა გადატანისას ენერგიის ფუჭი კარგვა არ ხდებოდეს.

აღნიშნული მიმართულებით ჩვენი კვლევის მიზანს შეადგენდა მცენარეში ციტოქრომ P450-ის ტრანსფორმაციისას მიკროსომიდან მიტოქონდრიაზე ელექტრონთა მიგრაციის თავისებურებათა აღდგენა. ამისათვის მიკროსომულ ფრაქციას ვაინკუბირებდით NADPH-თან, რომ მისი თავისუფალი (არაშეუღლებული) ჟანგვის შედეგად რედოქს-ჯაჭვის მომდევნო კომპონენტის-ციტოქრომ b_5 -ის აღდგენა მომხდარიყო. კოფერმენტის ხარჯვა და შესაბამისად b_5 -ის აღდგენა 340 ნმ-ზე ექსტინქციის ვარდნის მიხედვით მოწმდებოდა. მისი ბილწევის შემდეგ მიკროსომებს მიტოქონდრიული ფრაქცია ემატებოდა და ამ მომენტიდან ციტოქრომ b_5 -ის შემდგომი ჟანგვის პარალელურად მიტოქონდრიული C1C და aa3 ციტოქრომების აღდგენა რეგისტრირდებოდა (ნახ. 36) [224].

ყველაზე საყურადღებო, რაც ჩვენს მიერ იქნა გამოვლენილი ისაა, რომ ელექტრონთა მიგრაციას პრაქტიკულად ერთნაირი სახე აქვს როგორც „ახალგაზრდა“, ასევე „ხანდაზმულ“ მიკროსომებში, ანუ მიკროსომიდან მიტოქონდრიაში ელექტრონთა გადატანა ციტოქრომ P450-ის ტრანსფორმაციისაგან ავტონომიურად ზორ-

ციელდება და მისი მხრიდან არ კონტროლდება. ორივე შემთხვევაში აღგილი აქვს მიკროსომიდან მიტოქონდრიებზე ელექტრონთა მიგრაციას და მასში უშუალოდ მიკროსომული რედოქს-ჯაჭვის საწყისი კომპონენტი – NADPH-ციტოქრომ- P450 და შუალედი გადამტანი – ციტოქრომ b_5 მონაწილეობენ.

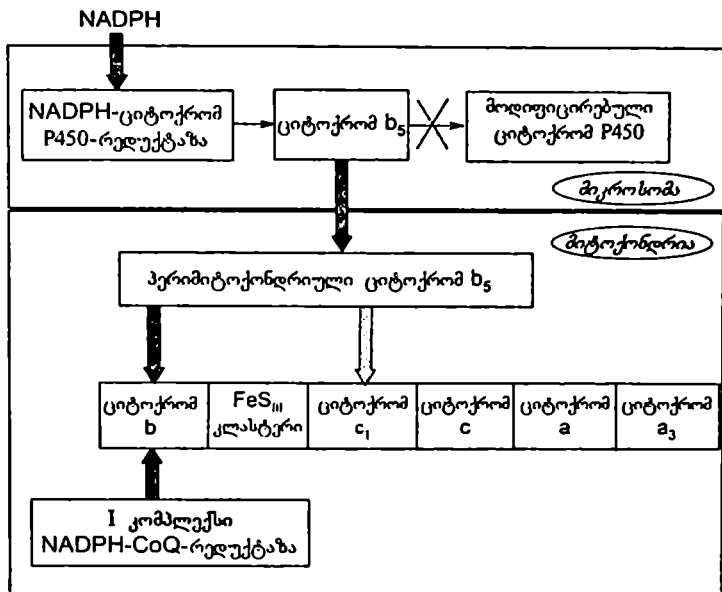


ნახ. 36. სიმიინდის ეთიოლირებული ნაზარდების ფესვების მიკროსომული და მიტოქონდრიული ციტოქრომების აღდგენისა და NADPH-ის ჟანგვის კინეტიკა კომბინირებულ სისტემაში – მიკროსომა + მიტოქონდრია [224]. (განმარტება ტექსტში)

მიღებულმა შედეგებმა საფუძველი მოგვცა გვევარაუდა, რომ ციტოქრომ P450 მონოოქსიგენაზური სისტემის მუდმივ კომპონენტს არ უნდა წარმოადგენდეს და აქ მისი ასოცირება დასაჟანგი სუბსტრატის მიერთებისას უნდა ხდებოდეს, როცა ფერმენტ-სუბსტრატის კომპლექსის ელექტრონებით აღდგენის საჭიროება დგება. მაშასადამე,

ციტოქრომ P450-თან ენდოგენური, თუ ეგზოგენური სუბსტრატების დაკავშირება იმ რეგულატორულ სიგნალს წარმოადგენს, რომელიც ამ ჰემოპროტეიდს სრულ მონოოქსიგენაზურ სისტემად აერთიანებს და მემბრანაში მის ჩაშენებას უზრუნველყოფს, რათა მან თავისი ჰიდროქსილირების უნარი გამოავლინოს. სხვა შემთხვევაში, კერძოდ NADPH-ის თავისუფალი ჟანგვისას, ან ციტოქრომ P450-ის პეროქსიდაზად ტრანსფორმირებისას NADPH-რედუქტაზას აღმდგენელი ექვივალენტების ტერმინალური აქცეპტორის ფუნქცია ენერგეტიკული მიზნებისთვის შეიძლება მიტოქონდრიის ციტოქრომოქსადაზურმა სისტემამ შეითავსოს. ამ პირობებში კი ცხოველურის ანალოგიურად მცენარეშიც ელექტრონთა გადატანის შესაძლო გზა მიკროსომულ და მიტოქონდრიულ ციტოქრომ b5-ებზე გადის [151, 206].

მიკროსომებისა და მიტოქონდრიების შერეულ სისტემაზე ცდების ცალკე სერიაში b- და c1- ციტოქრომებს შორის არსებული FeS_{III} კლასტერი Zn^{2+} -ის იონებით (10^{-6}M) დაებლოკეთ. ვვარაუდობდით, რომ ამდროს ციტოქრომ b-ზე ელექტრონთა გადატანისას ეს იონები c1c- და a23 ციტოქრომების აღდგენას შეასუსტებდა. სინამდვილეში კი საპირისპირო შედეგი მივიღეთ: Zn^{2+} -ის დამატების შემდეგ მიტოქონდრიულ სუნთქვით ჯაჭვში ამ ციტოქრომებზე ელექტრონთა გადატანა (აღდგენა) შესამჩნევად გაიზარდა (ნახ. 36). ეს შედეგი იმას მოასწავებს, რომ FeS_{III} კლასტერის გამოთიშვისას მიკროსომებიდან ელექტრონების გადატანის გზა შუნტირდება (მოკლდება) და ელექტრონები მიტოქონდრიული ციტოქრომ b-ს გვერდის ავლით უშუალოდ c1c და a23 ციტოქრომებზე ხვდებიან (ნახ. 37). ამ შემთხვევაში შუალედ გადამტანს პერიმიტოქონდრიალური (მემბრანათაშორისი სივრცის) ციტოქრომ b5 უნდა წარმოადგენდეს [151, 206].



ნახ. 37. მიკროსომული რედოქს-ჯაჭვიდან მიტოქონდრიის სუნთქვით ჯაჭვში ელექტრონების მიგრაციის შესაძლო გზები. დაშტ-რიხული ისრით აღნიშნულია Zn^{2+} -ით ბლოკირებული უბანი [224]. (განმარტება ტექსტში)

ამგვარად, ციტოქრომ P450-ის T-პეროქსიდაზად ტრანსფორმირებისას მნიშვნელოვნად ქვეითდება ჟანგბადის აგრესიული ფორმების (უპირატესად O_2^- -ისა და H_2O_2 -ის) გენერირება. პარალელურად მიკროსომული NADP-დამოკიდებული რედოქს-ჯაჭვის საწყისი ელექტრონული დონორი (NADPH-რედუქტაზა) და შუალედი გადამტანი (ციტოქრომ b_5) დამატებით ენერგეტიკულ ფუნქციას ითავსებენ, რომლის არსიც ტრანსმემბრანული მიგრაციის გზით მიტოქონდრიის სუნთქვითი ჯაჭვის ელექტრონებით უზრუნველყოფაში მდგომარეობს. პრინციპში, ციტოქრომ P450-ის T-პეროქსიდაზად მოდიფიცირება

უჯრედის დეტოქსიკაციურ პოტენციალს აძლიერებს. სხვა ოქსიდაზებთან შედარებით პეროქსიდაზას უპირატესობას მისი უნივერსალური სუბსტრატული სპეციფიკურობა და განსხვავებული ქიმიური სტრუქტურების მქონე ტოქსიკანტებისადმი მაღალი სწრაფვა აპირობებს [110]. ეს თვისებები განსაზღვრავს პეროქსიდაზას აქტიურ მონაწილეობას მთელ რიგ დეტოქსიკაციურ რეაქციაში. მაგალითად, მცენარის პეროქსიდაზებს შეუძლიათ დაჟანგონ მიკროსომული მონოოქსიგენაზას ისეთი ტიპური სუბსტრატები, როგორიც N,N-დიმეთილ-ანილინი, 3,4-ბენზპირენი [226] ან 4-ნიტრო-0-ფენილენდიამინია [227].

ჩვენს ლაბორატორიაში ჩატარებული გამოკვლევებით ნაჩვენებია, რომ ქსენობიოტიკის (ნიტრობენზოლის) ჟანგვაში მონოოქსიგენაზას შეიძლება ფენოლოქსიდაზაც (E.N. 1.14.13.7) შეენაცვლოს. [228]. პროცესში მისი რაოდენობრივი წილი აღმდგენელი ექვივალენტების ღონორის ჰიდროზეჟანგებისა და ფენოლურ ნაერთთა თანამყოფობაზეა დამოკიდებული. ამ პირობებში კი ფერმენტით ნიტრობენზოლის m-ჰიდროქსილირება თანადაჟანგვის მექანიზმით ხორციელდება.

INTRODUCTION TO COMPARATIVE BIOCHEMISTRY OF MONOOXYGENASES

Marlen Gordeziani

Summary

The work deals with monooxygenase enzyme system serving to neutralize substances of foreign origin (xenobiotics), adapt to stress conditions and maintain homeostasis in living organisms. It consists of three components: NADPH-cytochrome-reductase (flavoproteide FP_1 , E.N. 1.6.2.4), an initial electron donor, cytochrome b_5 , an interim electron transferor and cytochrome P450 (E.N. 1.14.14.1), a terminal (final) electron acceptor making a common transport redox-chain of reduced equivalents, i.e. it represents a multienzyme complex [10, 18-20]. None of the enzymatic systems is able to compete with this monooxygenase in diversity of metabolized substrates and its priority, first is conditioned by extremely low substrate specificity.

Excessive saturation of biosphere with xenobiotics that is characteristic of our century caused certain structural and functional changes in internal "economy" of animal and plant cells and relatively resulted in making proper correctives. Effective and fine mechanism against these substances, which "forced" them to behave within the common pattern of intercellular metabolism, sprang into action. Generally, the sequence of conversions is directed to lowering (deactivation) of biological activity of xenobiotics, and biodegradation of toxic substances envisages their neutralization (detoxification). In both cases, cytochrome P450-containing monooxygenase take a central position.

What does the role of this enzymatic system consist in?

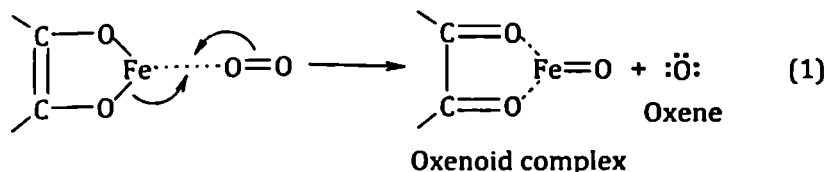
Most of organic xenobiotics are nonpolar (water insoluble) compounds. They are preferably solved in fats, i.e. are lipophylic, and enzyme-oxidases, which should perform their intracellular detoxification, function mainly in aqueous phase. Therefore, it is necessary that lipophylic molecule of xenobiotic to be preliminarily activated (to overcome its chemical inertness) and increased its polarity (water solubility) in order to become more easily accessible to oxidases. The initial stage of detoxification (functionalization), which is characterized by high energy of activation, consists in insertion of some polar groups (carboxyl, epoxy or hydroxyl groups, the most frequently) into the molecule of xenobiotic. Apparently, the faster xenobiotic penetrated into the cell becomes functionalized, the more accelerated is complete process of its further oxidative degradation, i.e. functionalization is a rate-limiting stage of xenobiotic detoxification and thus, its regulation must be performed at the level of this stage. This is the great biochemical meaning of allegedly "insignificant" chemical reaction of functionalization catalyzed by cytochrome P450-containing monooxygenase.

Initiation of xenobiotic degradation through the stage of functionalization is of common character and identical in animals and plants. Cytochrome P450 reveals special affinity (attraction) towards the strong hydrophobic substrates. Recognition of substances by them as "own" substrates is determined not by their "endogenic" or "exogenic" origin, but by physical and chemical properties of the molecule. It is shown that penetration of xenobiotic into plant cell is a regulatory signal, by means of which the significant part of cytochrome P450 (up to ~80%) out of the common pool, is switched from "endogenic" (biosynthetic) to "exogenic" (detoxicative) metabolism, i.e. at the expense of limiting of biosynthesis, detoxicative process is strengthened. In its turn, this result indicates that the same isoforms of hemoproteide participate in both processes. In addition, at detoxification of xenobiotics in

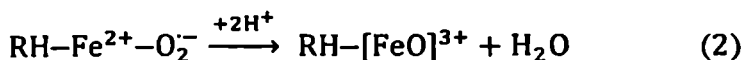
animals and plants, cytochrome P450 “is nourished” with electrons from both NADH- and NADPH-dependent redox-chains existing in a microsome, and at this time, the synergistic effect (interference) takes place. In plant, the initial N-demethylation reaction of dimethylaniline triples when the NADP/NADH concentration ratio is 1/4. Apparently, both redox-systems provide most optimally cytochrome P450 with electrons [30, 31].

In monooxygenase system, cytochrome P450 in the form of terminal oxidase represents a peculiar active center. To perform the act of hydroxylation, the oxygen to be inserted into the substrate must be chemically prepared, i.e. activated. In case of reduction by one electron, a superoxide-anion-radical (O_2^-), which is considered as precursor for other ROS (reactive oxygen species), is obtained from it. Its initiation in monooxygenase cycle occurs when reduced cytochrome P450-substrate complex binds to molecular oxygen at high rate, and oxygenated form of hemoproteide appears, i.e. cytochrome P450 also acts as a generator of reactive oxygen species and that of a true hydroxylation agent, respectively. The substrate “sets” just on the site of hemoproteide active center, where its carbon atom directly contacts oxygen connected with heme iron of porphyrine of cytochrome P450 and effective stereoselective hydroxylation is performed.

At the terminal stage of monooxygenation, the O–O bound is cleaved in triple complex (P450–substrate– O_2) and C–H bound – in the substrate, and a product of hydroxylation is formed. Hydroxylation agent (syn. “particle” is also used) applies only one atom from molecular oxygen, which is called oxen [102], and this atom of oxygen is supplied to the substrate from oxenoid complex. In its turn, oxenoid complex is obtained from the interaction of molecular oxygen with iron anion, or with a certain redox-active ligand (e.g. ascorbate):



Formation of oxenoid might be considered as a result of water formation from peroxycomplex:



In the reaction of hydroxylation, when triple complex undergoes reduction by the second electron, an active complex-I is formed, and it may possess different structures (Fe^{2+}O_2 , $\text{Fe}^{3+}\text{O}_2^-$, Fe^{3+}O , Fe^{4+}O^-). O_2 is in singlet or triplet state there, i.e. it is possible to transfer oxygen atom to substrate in both states. Singlet oxenoid inserts oxygen into the substrate by three-electron synchronous mechanism and a singlet product of reaction is formed. If oxenoid is a triplet, direct insertion of oxygen into the substrate is impossible due to spin prohibition; it is considered that in this case, oxidation is performed by “cleavage-recombination of hydrogen”, i.e. by latent-radical mechanism” [42].

The role of endoplasmic membranes, in particular their phospholipid components in functioning of monooxygenase system are dealt with in the monograph. At present, the earlier concept on biomembranes performing only structural function (“rack” or “fixing block”) for enzymes has significantly changed and their extremely versatile role established. The amphiphatic character of these substances makes a complete basis for confirmation. They are characterized by high fluidity, heterogeneity in spatial arrangement and asymmetry in lateral arrangement. The essential significance of lipid-protein interaction has already been reliably demonstrated between microsomal phospholipids

and monooxygenase systems. The kinetics of monooxygenation reactions is completely subjected to the peculiarities, which are only characteristic for the enzymes functioning in lipid-water biphasic system.

Endoplasmic membrane is a formation of lipid character. This is a wide class of substances, which apart from lipids themselves contain sterols, terpenes, prostaglandins, etc. Together with proteins, nucleic acids and carbohydrates they occupy deserved position in so-called "the Great four".

The cytochrome P450-containing monooxygenase represents a unique enzymatic complex, which has retained at all stages of evolutionary ladder, starting from the most primitive aerobes to mammals and eventually. gained the ability to be built into the membrane and relatively, to achieve the highest quinary organizational level, characteristic for multienzymatic systems. In this respect, NAD(P)H-dependent hydroxylation system of animal liver is considered as an etalon both structurally and functionally [101].

There is represented the incomplete list of functions (except of yet unknown ones), pool of which enable to explain the action of many enzymes bound with biomembranes under their influence:

1. Formation of active conformation of proteins and its stabilization;
2. Aggregation of certain components into enzyme complexes;
3. Creation of closed uninterrupted structure of protein-enzyme;
4. Creation of optimal conditions for the reactions proceeding in membranes;
5. Facilitation of transportation for fat-soluble (lipophilic) compounds.

The results obtained on sections of liquefied cotyledons of plants (soya and corn) are given as instance [134]. When treatment of the test object by detergent (triton X-100), N-demethylation of aminopirine and *dimethylaniline*, and dihydroxylation of aniline are inhibited by 65-

85%, respectively. When phosphatidilcholine (in the form of "row lecithin") is introduced into the incubation liquid, N-demethylation activity is completely recovered, while p-hydroxylase activity is recovered by 60%. Besides, recovery effect of phospholipid is absolutely the same in spite of that it is added together with detergent or after detergent inhibition. Thus, the action of this phospholipid can be explained in two ways: in the presence of the detergent, it strengthens hydrophobic ambient around the cytochrome P450 and makes the enzyme resistant to the detergent. And as a result of inhibition, it apparently excludes the detergent from hydrophobic zone of the enzyme and provides recovery of the native state of its active center. Under the influence of phosphatidilcholine may be completely explained and significantly stimulated the NADPH- and cumene hydroperoxide-dependent N-demethylation and p-hydroxylation reactions inhibited by copper-tyrosine complex (low molecular analog of superoxide dismutase) [117]. Supposedly, in this case, phosphatidilcholine protects hemoproteide from destroying action of aggressive forms of oxygen, which are generated during interaction of copper-tyrosine complex with cumene hydroperoxide.

In general, our data on functional relationship between plant monooxygenases and membranes are based on the facts as follows:

1. Changes in activity of cytochrome P450 and NADPH-reductase; in particular, inhibition of NADPH-dependent N- and O-demethylation reactions and that of reduction rate of cytochrome c or $[K_3Fe(CN)_6]$ by CO occur both in microsomal fraction and in its supernatant;
2. Soluble (cytosolic) components of monooxygenases are not the fragments "torn out" from a microsome. The solution obtained by multiple washing out of microsomes with buffer solution display no activity;

3. The activity of microsomal monooxygenase drops dramatically at treatment by ionic detergent (deoxycholate) and its complete rehabilitation (with further stimulation) can be reached by "raw lecithin." Phosphatidilcholine has practically no effect on activity of soluble monooxygenase. i.e. needs no structural organization of membrane for functioning:
4. Microsomal and cytosolic fractions give spectra characteristic of cytochrome P450 [148-151].

Thus, plants as compared with animals behaved much more "reasonably" from an evolutionary point of view: they built monooxygenase into the membrane, but at the same time, retained its soluble form as well, by means of which made the defensive barrier more deeply echeloned.

Oxidation of cholesterol has been studied in plants. This typical animal sterol with its long "tail" and small hydrophobic "head" containing condensed nucleus is unchangeable component of biomembranes, which stabilizes their liquid-mosaic structure through changing of the density.

The experiments were conducted on thin sections of leaves of vine variety Rkatsiteli (*Vitis vinifera*) and Spanish dagger (*Yucca gloriosa*). Microsuspension of 4-¹⁴C-cholesterol ("cholesterolic milk") and its oxidation intensity was estimated by radioactivity of released ¹⁴CO₂. The identification of formed ¹⁴C-metabolites was carried out by paper chromatography and the radioactivity was measured on SL liquid-scintillation counter. The respiration intensity (oxygen consumption) was determined monometrically in Warburg's apparatus [154, 155].

The conducted experiments have shown that both test plants oxidize A-nucleus of cholesterol stimulated by NADPH. Together with enhancement of oxygen consumption, increase in ¹⁴CO₂ radioactivity

under its influence is also observed indicating that oxidation of cyclic component of cholesterol molecule is catalyzed by monooxygenase. Besides, two oxidation maximums (pH 5.5 and 8.0), depending on pH, are recorded in leaves of *Yucca gloriosa* that speaks on participation of two forms of hemoproteide in the plant.

In order to establish localization of oxidation in mitochondrial cholesterol, intermediates of aerobic respiration (succinate, malate and α -ketoglutarate) and substrate of phosphorylation (ADP) were applied as cosubstrates in the experiments. In addition, aminoacids, oxidation conversions of which are directly connected with the Krebs cycle (glutamate and aspartate) were tested as well. All applied easily oxidizable substrates significantly increase the yield of $^{14}\text{CO}_2$ from 4- ^{14}C -cholesterol and this stimulating effect is still more strengthened in the presence of ADP.

Under the influence of 2,4-dinitrophenole, cholesterol oxidation is dramatically dropped (by ~35-40% in vine, and by ~45-50% – in *Yucca*). The obtained results reliably show that oxidation process of this sterol is in close connection with mitochondrial energetic metabolism. To verify existence of this connection in reality, direct dependence of cholesterol on “energy charge” of the environment has additionally been studied [156]. It is known that direct functional relation between this parameter and the enzyme activity were established for many enzymes. The analogical picture is received in case of cholesterol oxidation in plant: gradual “charge” of adenylate “accumulator” increases radioactivity of released $^{14}\text{CO}_2$.

In combined system of mitochondria and microsomes, reduction equivalents migrate from low energetic mitochondria to microsomes, i.e. in respiration chain, the existence of free flow of electrons is required for this. In case of existence in mixed system of mitochondria

with high energetic conjugation, N-demethylation of dimethylaniline and p-nitroanisole is either completely changed or inhibited insignificantly. Exogenically added cholesterol as well gives similar low inhibiting effect. The pure mitochondrial fraction does not oxidize at all these typical substrates of microsomal monooxygenase system.

Thus, experiments conducted on plants have shown that:

1. Oxidation of cholesterol is a mitochondrial process and cytochrome P450-containing monooxygenase existing in this organelle demonstrates comparatively high substrate specificity to sterol;
2. Oxidation of cholesterol is energy-dependent process and its intensity is regulated by energetic status of a mitochondrion.
3. For implementation of mitochondrial control, microsomal hydroxylation of xenobiotics requires existence of free flow of electrons in respiration chain [159].

The fact of cholesterol oxidation in plant is also important as it confirms the existence of all three types of molecule arrangement (microsomal, mitochondrial and soluble) for monooxygenase system. Evolutional development gave this enzymatic system wide functional opportunity of action and granted a special honorable role of a certain chemical "windbreak", i.e. "green filter" to protect from toxicants and pollutants, useless (unnecessary) for human.

In parallel with oxidation of xenobiotics, peroxidative oxidation of unsaturated fatty acids (in brief "lipid peroxidation") occurs in endoplasmic reticulum membranes. There are distinguished two enzymatic (NADPH-dependent) and non-enzymatic (ascorbat-dependent) characters of this process. In freshly obtained microsomes, foreign compounds have "monopolized" microsomal redox-chain and at this time, NADPH is mostly applied for hydroxylation. It was reliably shown that NADPH-cytochrome P450 reductase participates as an essential com-

ponent in hydroxylation and lipid peroxidation. The experiments conducted on reconstructed systems established that in addition to NADPH-reductase, the presence of some factors similar to EDTA-Fe³⁺ is also necessary for effective course of lipid peroxidation [178, 179].

According to primary concept, cytochrome P450 does not participate in lipid peroxidation, and the fact that CO does not inhibit the process was used as an argument. Later, on the basis of critical revision there was suggested an idea that the mentioned argument is acceptable only provided that electron transfer for lipid peroxidation occurs namely on heme group of this hemoproteide. It was convincingly shown that cytochrome P450 is involved in the process, and at this time, the linkage of SH-groups of apoenzyme with iron pyrophosphate is accompanied by new centers generating free radicals, which do not undergo inhibition by CO. In this case, cytochrome P450 functions not as hemoproteide but as nonheme sulphur-containing iron-proteide [180]. Besides, it should be taken into consideration that in microsomal redox-chain the only acceptor of electrons is cytochrome P450, one SH-group of which is in its active center and participates in electron transfer. Therefore, lipid peroxidation is rather susceptible to sulphidrilic poisons (parachlormercuribenzoate, mersalyl and HgCl₂) [171, 180], i.e. apoenzyme of cytochrome P450 must be participated in lipid peroxidation. Proceeding from the above mentioned, it is quite possible that also cytochrome P420, an inactive form of hemoproteide is successfully involved in the process. In favor of this speaks the conversion of cytochrome P450 to cytochrome P420 by alkalification, when in the course of lipid peroxidation, changes are not observed at all [181-184].

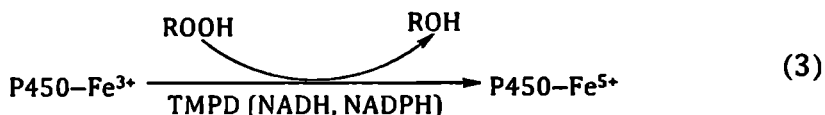
In microsomal fraction of plant (soya) roots, changes in the reactions of lipid peroxidation (by generation of malonic dialdehyde) and N-demethylation of dimethylaniline (by formation of formaldehyde)

have been studied during their simultaneous implementation [198]. The conducted experiments have shown that iron ions (Fe^{2+}) stimulate formation of malonic dialdehyde by $\sim 15\%$ and in the course of this reaction, metal oxidation state (Fe^{2+} or Fe^{3+}) has no essential importance. Apparently, similar to animal microsomes, reducing agent (e.g. ascorbate) of Fe^{3+} is in plant microsomes as well. The stimulating effect of NADPH on this reaction is still weaker ($\sim 10\%$). On the other hand, on simultaneous application of coenzyme and Fe^{2+} , lipid peroxidation is enhanced by $\sim 35\%$. In this case, enzymatic and nonenzymatic oxidation processes of fatty acids are allegedly summarized and characterized by enough autonomy due to lack of competition from the part of xenobiotic hydroxylation. Phosphatidylcholine, in parallel with stimulation of N-demethylation by $\sim 20\%$, inhibits lipid peroxidation by almost the same level (by $\sim 25\%$), i.e. this phospholipid controls both processes [198].

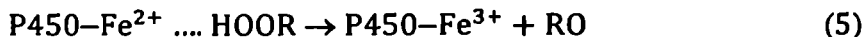
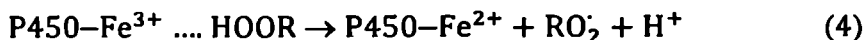
In order to check out participation of oxygen species in hydroxylation and lipid peroxidation, compounds (substances) with antioxidant properties (pyrocatechin, rutin, quercetin, etc.) have been examined in separate series of experiments. It was turned out that separately all of them inhibit both processes with more or less intensity, i.e. indicates their radical character. In spite of that, supposedly, superoxide-anion-radicals with low biological oxidation ability do not directly participate in the process, or most probably, the singlet molecular oxygen obtained as a result of their recombination, by complexification with iron ions, form oxidative oxenoid particle with medium strength, which performs the investigated reactions through radical mechanism.

Cytochrome P450 also reveals peroxidase activity. Existence of this phenomenon first was shown in '70s of the last century [199]. It was found that in liver microsomes, in the presence of such hydrogen

donor as is *N,N,N',N'*-tetramethyl-*para*-phenylene-diamine (TMPD), reduction of hydroperoxides to alcohol occurs and this activity is lost by heating. It is also noteworthy that peroxidase activity of cytochrome P450 is effectively inhibited by substrates of monooxygenase system that indicates functioning of oxidized form of hemoproteide in peroxidase reactions. It became known as well that on interaction of hemoproteide and hydroperoxides peroxidase complex-I, in which heme iron is in the high degree of oxidation, is formed [110]. In addition to TMPD, NADH- and NADPH can be also used as hydrogen donor:



Destruction of cytochrome P450 is an undesirable process accompanying oxidation of hydroperoxides. For instance, cumene hydroperoxide destroys not only cytochrome P450, but also cytochrome bs. Aniline, the substrate of microsomal monooxygenase strongly hinders destruction of cytochrome P450 by hydroperoxides; addition of inhibitor of radical processes (α -naphthol) also causes significant reduction of destruction that confirms radical character of this process. The complex formed by cytochrome P450 and hydroperoxides are destroyed to active oxygen-containing radicals:



Generated $\text{RO}_2^{\cdot}$ and $\text{RO}^{\cdot}$ radicals attack heme or apoenzyme of cytochrome P450 and destroy it trough chemical modification, i.e. enzyme is completely deactivated by such mechanism of auto-blocking.

There is very significant and widespread type of chemical modifi-

cation, which consists in “self-inactivation” of the enzyme at the end of catalytic activation. It is connected with generation of reactive oxygen species and intermediates with high reaction ability (quinones, dioles, epoxides, aldehydes, ketones, etc.). Thus, enzyme-oxidases, which are directly associated with formation and realization of the listed products refer to “suicidal” (“self-killer”) enzymes [200-204].

Modification (manipulation) of enzymes by chemical reagents is a characteristic property of cell and is used due to the circumstances (often compulsory ones), i.e. it is required for normalization (rehabilitation) of topochemical changes generated in enzyme active center at the end of catalytic act, or for adaptation to them. This unique ability of cell is established as a result of long evolutionary process. This unique ability of cell has been developed as a result of long-term evolutionary process. Thus, “chemical modification” is a term with extremely wide content [205, 206]. Modified enzyme maintains its changed active center until chemical groups, causatives of modification are not removed by other specific enzymes and returned to the initial condition.

On the assumption of chemical character of substrate, there are three ways of inactivation of cytochrome P450: (1) irreversible connection of metabolites with apoenzyme; (2) almost irreversible connection of metabolites with heme iron and (3) heme alkylation and destruction. The first and the third pathways can be performed combined.

More frequently, the inactivation is rather a result of heme degradation than the destruction of apoenzyme [207-210]. The 2B4 isoform of isolated cytochrome P450 reduced by dithionite undergoes a rapid inactivation by reactive oxygen species formed during autooxidation and results in its transformation into inactive cytochrome P420 through conversion [211].

One of the illustrative examples of inactivation caused by heme alkylation is inhibition of cytochrome P450-dependent oxidation of dodecene acid in rabbit liver microsomes. It was found that ketene, an intermediate formed in this period of time, causes heme alkylation and becomes a reason of hemoproteide inactivation [212]. Analogical experiments on microsomes of etiolated seedlings of plant (*Vicia faba*) have shown that the main reason of inactivation is acylation of nucleophilic residue of one of the aminoacids (supposedly, cysteine or histidine) close to heme in active center of cytochrome P450 [213, 214]. Thus, the essential difference between inactivation of animal cytochrome P450 and plant cytochrome P450 is that in animal hemoproteide heme undergoes chemical modification, while in plant – apoenzyme does.

In plant (microsomal fraction obtained from etiolated seedlings of corn at different ages), during the investigation of peroxidase properties of cytochrome P450, the attention was focused on those properties, in which the enzyme displays obvious priority [216]. It was shown that revealing of peroxidase activity by cytochrome P450 (oxidation of H_2O_2 -dependent guaiacol fraction), firstly depends on plant age; in this connection, microsomes were conditionally divided into “young” microsomes (of up to 7 day-old plants), which are characterized by maximal content of hemoproteide and “old” microsomes (of more than 7-day old plants), in which its content declines.

In “young” microsomes, peroxidase activity is practically insignificant since there mainly cytochrome P450 and consequently, monooxidase mechanism of oxidation dominates. Together with aging the fraction, this hemoproteide undergoes conversion into inactive cytochrome P420. and simultaneously, steady increase in peroxidase content and its activity takes place. It should be noted there that analogical picture is

observed when intensive aeration of “young” microsomes for 120 minutes: in both cases, 5-fold increase of P420/P450 ratio corresponds to 1,5-fold increase of peroxidase activity [215, 216].

Spectral analysis of “old” plant microsomes and commercial preparation of horseradish peroxidase (Reanal Ltd.) confirmed their absolute identity. Both of them reveal absorbance maximum in oxidized (at 420 nm) and reduced (at 432 nm) states. H_2O_2 -dependent oxidation intensity of guaiacol in both cases is inhibited with the same effectiveness by azide, dithionite and ionic detergent (CAPS). Carbon monoxide has no influence on initiated peroxidase activity. The obtained results gave a basis to suppose that peroxidase activity in microsomal fraction belongs to cytochrome P420 [216].

Such chemical modification of one true enzyme – cytochrome P450 (E.N. 1.14.14.1), when as a result of inactivation, its oxidation through monooxygenase mechanism is substituted by another true enzyme peroxidative (E.N. 1.11.1.1) oxidation, we called enzyme “transformation” since this term reflects more accurately the essence of the phenomenon. Cytochrome P420, which has gained peroxidative activity we named as “transformant-peroxidase (T-peroxidase). Its further reconversion into cytochrome P450 no longer occurs and thus, transformation is an irreversible process [216, 217]. There is no need in proof the circumstance that the leading role in transformation of cytochrome P450 belongs to reactive oxygen species.

The most principal biochemical designation of cytochrome P450 must be in preventing of accumulation of reactive oxygen species. In aerobic and “old” microsomes, the enzymatic tandem T-peroxidase-superoxidedismutase-catalase makes a firm warrantee “to extinguish” “useless” (“harmful”) part of reactive oxygen species [32, 205, 206]. Under their influence, generating enzyme – cytochrome P450 under-

goes self-reactivation and the probability of production these undesirable products is destroyed inherently through transformation to peroxidase.

Obviously, as a result of transformation of cytochrome P450, its electron donor NADPH-reductase should acquire another function. Moreover, in connection with aeration of microsomal fraction and plant aging it still maintains high level of activity [217]. Under the condition, T-peroxidase activity towards tiron, copper-tyrosine complex and ferricyanide (O_2^- "binding" agents) are inert, i.e. oxidation of xenobiotics gets completely free from co-participation of superoxide-anion-radicals. In parallel, another important fact has been revealed: O_2^- , generated on reductase is consumed for strengthening (by ~50%) lipid peroxidation that is confirmed by inhibitory effect of above-mentioned agents on this process. The rest of enzymatic strength of the enzyme serves to energetic processes proceeding in mitochondria [151].

Close contact between membrane structures is a compulsory condition for transmembrane electron transfer between a microsome and a mitochondrion [220, 221]. At oxidation of xenobiotics, arrangement of endoplasmic membranes as vesicles and compact orientation of mitochondria were observed by electron microscope. Substrates of mitochondrial oxidation (Krebs cycle) reveal stimulating effect for microsomal oxidation. This effect is known as "mitochondrial control". Afterwards it was found that electron migration from a mitochondrion to a microsome is not unilateral process and intensive migration of reducing equivalents from microsomal redox-chain to mitochondrial respiration chain is quite possible [222, 223]. In such kind of reciprocal (mutual) process, cytochrome *b₅* represents an intermediate transferor of electrons, performing a role of a peculiar distributor [223]. As it was established, a certain pool of cytochrome *b₅* does not participate directly in

electron transfer, and still such kind of "unemployed" cytochromes are necessary since they serve for searching of contact points between two membranous structures and for equalization of redox-potentials of cytochrome b_5 (microsomal +24 mV, mitochondrial +40 mV) participating in transferring process. By means of them waste of energy during transmigration of electrons is decreased to minimum and they allegedly move separately in isopotential field [224].

Electron migration from "young" and "old" microsomes to mitochondria was studied in their combined system [225]. NADPH was added to the fraction of microsomes for reduction of microsomal cytochrome b_5 (by dropping of extinction at 340 nm), and then mitochondrial fraction was added to microsomes and starting from this moment, in parallel with oxidation of cytochrome b_5 , reduction of mitochondrial c_{1c} and a_{a3} cytochromes were recorded. Important results obtained in these experiments consists in that electron transfer from "young" and "old" microsomes occur at actually the same intensity, i.e. in migration of reduced equivalents mainly participate initial and intermediate components of redox-chain and this process is not controlled by transformation of cytochrome P450.

Upon blocking of FeS_{III} -cluster existing between mitochondrial b and c_1 cytochromes by Zn^{2+} -ions, reduction of c_{1c} and a_{a3} cytochromes is remarkably increased, i.e. shunting occurs via transfer from a microsome to a mitochondrion, and in this case, perimitochondrial cytochrome b_5 must be acted as an intermediate transferor.

Thus, at transformation of cytochrome P450: (1) generation of reactive oxygen species is significantly limited; (2) detoxification potential of cell practically does not decrease since T-peroxidase is distinguished by universal substrate specificity and high attraction (affinity) to diverse toxicants; (3) the initial electron-donor of microsomal redox-

chain (NADPH-reductase) and intermediate transferor (cytochrome b₅) use mitochondrial respiration chain as terminal acceptor of electrons and by that combine additional energetic function as well.

- [1] Бах А. Н. Журн. Русского физико-химич. общ-ва 1894, т. 26, №1, ст. 101-106
- [2] Бах А. Н. Журн. Русского физико-химич. общ-ва 1897, т. 29, №2, ст. 377-398
- [3] Engler C., Wild W. Ber. Dt. Chem. Ges. 1897, 30, S. 1669-1681
- [4] Wieland H. Ber. Dt. Chem. Ges 1912, 45, S. 679-690
- [5] Wieland H. On the mechanism of oxidation. Gale Univ. press, New-Haven, 1932, p. 23
- [6] Палладин В. И. Изв. Акад. Наук, 1909, 3, ст. 459-478, 519-546
- [7] Hayashi O., Katogiri M., Rothberg S. J. Amer. Chem. Soc. 1955. 77, p. 5450-5451
- [8] Mason H. S., Fowlks W. L., Peterson E. J. Amer. Chem. 1955. 77, p. 2914-2915
- [9] Warburg O. Heavy Metal Prosthetic Groups and Enzyme Action. London, New York: Oxford Univ. Press 1949, 230 p
- [10] Hayashi O., Takikawa O., Sono M., Yoshida R. In: Microsomes drug oxidations and chemical carcinogenesis / Eds. M. I. Coon, et al. N. V etc: Acad Press 1980, 1, p. 1-13
- [11] Klingenberg M. Arch. Biochem. and Biophys. 1958, 75, p. 376-387
- [12] Garfinkel D. Arch. Biochem. and Biophys. 1958, 77, p. 493-509
- [13] Omura T., Sato R. J. Biol. Chem. 1964, 239 p. 2370-2377, 2379-2385
- [14] Арчаков А. И. Микросомальное окисление 1975. изд. "Наука", 327 ст
- [15] Арчаков А. И., Девиченский В. М. Биофизика, 1973, 18, ст. 1041-1045
- [16] Арчаков А.И., Девиченский В. М., Карузина И. И. ДАН СССР, 1973, 209, ст. 973-975
- [17] Арчаков А.И., Девиченский В.М. Биохимия 1974, 39, ст. 691-700, 1132-1137
- [18] Гордезиани М. Ш. Цитохром Р-450 в растениях. Изв. АН Груз. ССР, сер. биол. 1987. т. 13, №3. ст. 177-186
- [19] Gordeziani M., Khatisashvili G. The Hydroxylation of Xenobiotics and the Generation of Reactive Oxygen Species. Microbiol. and Biotec. 2013, №4, p. 36-62 (Georg.)
- [20] Gordeziani M., Varazi T., Pruidze M. Structural-functional organiza-

tion of cytochrome P450-containing monooxygenase and some aspects of modeling. Annals of Agrarian science 2016, vol. 14, №2, p. 62-74

- [21] Кулинский В. И. Обезвреживание ксенобиотиков. Соросовский образовательный журнал. 1999, №1, ст. 8-12
- [22] Колесниченко Л. С., Кулинский В. И. Успехи соврем. Биологии. 1989, т. 107, вып 2, ст. 179-194
- [23] Саприн А. Н. Успехи биол. химии 1991, т. 32, ст. 146-175
- [24] Кулинский В. И. Колесниченко Л. С. Успехи биол. химии 1990, т. 31, ст. 157-179
- [25] Кулинский В. И. Колесниченко Л. С. Успехи соврем. биол. 1990, т. 51, вып 1(4) ст. 20-33
- [26] Угрехелидзе. Д. Ш., Дурмишидзе С. В. Поступление и детоксикация органических ксенобиотиков в растениях. 1984, из. «Мецниереба», Тбилиси 230 ст
- [27] Деннис В. Парк. Биохимия чужеродных соединений 1973, изд., «Медицина» М, 287 ст
- [28] Гордезиани М. Ш., Хатисашвили Г. А., Квеситадзе Г. И. Свободное и сопряжённое с гидроксилированием ксенобиотиков окисление NADPH. ДАН СССР, 1991, т. 320, №2, ст. 467-469
- [29] Хатисашвили Г. А., Адамия Г. С., Гордезиани М. Ш., Ломидзе Е. П., Брискер В. А. Полярографическое исследование гидроксилирующей способности растительных микросом. Сообщ. АН Грузинской ССР. 1986, 123, №3, ст. 621-624
- [30] Гордезиани М. Ш., Дурмишидзе С. В., Хатисашвили Г. А., Адамия Г. С., Ломидзе Э. П. Исследование биосинтетической детоксикационной способности растительного цитохрома Р-450. ДАН СССР. 1987, 295, 6, стр. 1491-1993
- [31] Гордезиани М. Ш., Хатисашвили Г. А., Адамия Г. С., Ломидзе Э. П. Возможность переключения цитохрома Р-450 с "эндогенного" на "экзогенный" режим обмена. АН ГССР, 1987, 126, 1, ст. 161-164
- [32] Khatishashvili G., Gordeziani M., Kvesitadze G., Korte F. Plant monooxygenases participation in xenobiotic oxidation. Ecotoxicology and Environmental Safety. 1997, 36, 118-122
- [33] Narasimhulu S., Cooper DY., Rosenthal O. Spectrophotometric properties of a triton-clarified 21-hydroxylase system of adrenocortical microsomes. Life Sci. 1965, 4, 2101-2107

- [34] Schenkman J.B., Remmer H., Estabrook R.W. Spectral studies of drug interaction with hepatic microsomal cytochrome, *Mol. Pharmacol.* 1967, 3, p. 113-123
- [35] Imai Y., Sato R. Substrate interaction with hydroxylase system in liver microsomes, *Biochem. Res. Commun.* 1966, 22, p. 620-626
- [36] Orrenius S., Thor H., Fatty acid interaction with the hydroxylating enzyme system of rat liver microsomes. *Europ. J. Biochem.* 1969, 9, p. 415-41
- [37] Ахрем А. А., Бельский С. М., Метелица Д. И. Влияние температуры на взаимодействие цитохрома Р-450 с некоторыми аминами. *Биохимия*, 1977, 42, ст. 2116-2120
- [38] Tsai R., Yu C.A., Gunsalus I.C., Peisach J., Blumberg W., Orme-Johnson W.H., Bienert H. Spin-state changes in cytochrome P450_{cam} on binding of specific substrates. *Proc Natl. Acad. Sci. USA.* 1970, 66, p. 1157-1163
- [39] Rösen P., Stier A. Kinetics of CO and O₂ complexes of rabbit liver microsomal cytochrome P450. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1973, 51, p. 603-611
- [40] Ishimura Y., Veric V., Peterson Y.A. Oxygenated Cytochrome P450 and its possible role enzyme hydroxylation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1971, 42, p. 140-146
- [41] Remmer H. The role of the liver in drug metabolism. *Am. J. Med.* 1970, 49, p. 617-629
- [42] Метелица Д. И. Активация кислорода ферментными системами М. Наука 1982, 249 с.
- [43] Guengerich F. P. Isolation and purification of cytochrome P450. and the existence of multiple forms. *Pharmacol. Ther.* 1979, 6, 99-121
- [44] Imai Y., Hashimoto-Yutsubo C., Satake H., Girardin A., Sato R. Multiple forms of cytochrom P450 purified from liver microsomes of phenobarbital and 3-methyl-cholantrene-pretreated rabbits: 1. resolution, purification and molecular properties. *J. Biochem.* 1980, 88, p. 489-503
- [45] Chiang Y. L., Coon M. I. Comparative study of two highly purified forms of liver microsomal cytochrome P450: Circular dichroism and other properties. *Arch. Biochem. Biophys.* 1979, 195, p. 178-187
- [46] Ахрем А. А., Попова А. А., Метелица Д. И. Взаимодействие алифатических спиртов с цитохромом Р-450 микросом печени крысы. *Биохимия*, 1978, 43, ст. 1485-1491

- [47] Метелица Д. И., Попова А. А. Механизмы окисления алифатических спиртов ферментными системами печени. Биохимия, 1979, 44, стр. 1923-1935
- [48] Diehl H., Schädelin I., Ulrich V. Studies on the kinetics of cytochrome P450 reduction in rat liver microsomes. Hoppe Seyler's Z. Physiol. chem, 1970, 351, p. 1359-1371
- [49] Arnold S. J., Finlayson N., Ogryzlo E. A. J. Chem, Phys., 1966, v.44, p. 2529-2533
- [50] Метелица Д. И. Механизмы гидроксирования ароматических соединений Усп. Химии 1971, т.40, №7, ст. 1175-1210
- [51] Superoxide and superoxide dismutases / Ed. A. M. Michelson et al. L. etc. Acad. Press, 1977
- [52] Halliwell B. Biochem J. 1977, vol. 167, p. 317-32
- [53] Halliwell B. FEBS. Lett, 1978, vol. 92, p. 321-324
- [54] Веденеев В. И., Турвич Л. В., Кондратьев В. Н., Медведев В. А., Франкевич Е. Л. Энергия разрыва химических связей. Потенциалы ионизации и сродство к электрону. 1962, изд-во АН СССР, 215 с
- [55] Шибаева Л. В., Метелица Д. И. Кинетика и катализ, 1971, т.12, с.1130-1136
- [56] Уотерс У. Механизмы окисления органических соединений. 1966, изд. «Мир», М, 173 ст
- [57] Haber F., Weiss J. Naturwissenschaften, 1932, Bd. 2. S. 948
- [58] Hamilton G. A.- In: Molecular mechanisms of oxygen activation| Ed. O. Hayashi L; N. Y: Acad. Press. 1974, p. 405-451
- [59] Teng J. I., Smith L. L.- J. Amer. Chem. Soc. 1973, v. 95, p. 4060-4062
- [60] Sterson L. A., Wiley R. A. Chem. Biol. Interact. 1972 v.5 p. 317-320
- [61] Porte D. I. T., Ingraham L. L. Biochim. et biophys. acta 1974, v. 334, p. 97-103
- [62] Arneson R. M. Arch. Biochem. and Biophys. 1970, v. 136, p. 352-358
- [63] Howes R. M., Steele R. H. Res. Commun Chem. Pathol. Pharmacol, 1972, v. 3, p. 349, 350
- [64] Sligar E. G. Lipscomb J. D., Debrunner P.G., Gunsalus I. C. Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1974, v. 61, p. 290-294
- [65] Ячпольский Ю.П. Успехи химии 1972, т. 41, с. 1111-1124

- [66] Stauff H. *Nature* 1963, v. 198, p. 281-283
- [67] Scandalios I. G. *Plant physiol.* 1993, v. 101, p. 7-12
- [68] Ванюшин Б. Ф. Апоптоз у растений. *Усп. биол. химии*, 2001, т. 41, с. 3-38
- [69] Anja Krieger-Liszkay. Singlet oxygen production in photosynthesis. *J. of Exper. Botany.* 2005, v.56, № 411, p. 337-346
- [70] Gorman A. A., Rodgers M. A. Current perspectives of singlet oxygen detection in biological environments. *J. of Photochemistry and photobiotic.* 1992, v. 14, p. 159-176
- [71] Sies H., Menck C. F. Singlet oxygen induced DNA damage. *Mutation Research*, 1992, v. 275, p. 367-375
- [72] Фотосинтез т.1. Под редакцией Говинджи, 1987, изд. «Мир», М, 727с
- [73] Takamija A. – In: *Methods in enzymology* (A. San Pietro ed), 1971, v.23, Acad. Press New-York, p. 603-613
- [74] Мерзляк М. Н. Активированный кислород и жизнедеятельность растений. *Соросовский образоват. журнал*, 1999, №9, ст. 20-26
- [75] Taube H. *Gen. Physiol*, 1965, v. 49, p. 29-30
- [76] Метельца Д. И. Активация кислорода цитохромом Р-450 и другими гемопротеинами, *Усп. химии*, 1982, т. LI, вып 11, ст. 1818-1848
- [77] Estabrook R. W., Hildebrandt A. G., Ullrich V. *Hoppe-Beyler's Ztschr. Physiol Chem*, 1968, v. 348, p. 1604-1608
- [78] Katagiri M., Gungunli B.N., Gunsalus I. C. *J. Biol Chem.* 1968, v. 243, p. 3543-3546
- [79] Peterson J. A. *Arch. Biochem. and Biophys.* 1971, v. 144, p 678-69
- [80] Griffin B.W., Peterson J. A. *Biochemistry*, 1972, v. 11, p. 4740-4746
- [81] Rein H., Ristau O. *Parmazie* 1978. B.33, p. 325
- [82] Gigon P. L., Gram T. E., Gillette J. R. *Mol. Pharmacol*, 1969, v.5, p. 109-122
- [83] Sasame H.A., Gillette J. R. *Mol. Pharmacol.* 1969, v.5, p. 123-130
- [84] Gigon P. L., Gram T. E., Gillette J. R. *Biochem. and Biophys Res Commun.* 1968. v. 31, p. 558-562
- [85] Matsubara T., Baron J., Peterson L. L., Peterson J. A. *Arch. Biochem. and Biophys.* 1976, v.172, p. 463-469
- [86] White R. E., Coon M. J. *Ann. Rev. Biochem*, 1980. v. 49, p.315.

- [87] Mannering G. L. In: Concepts in Drug Metabolism, B. Eds. Jenner P. Testa B. New York: Marcel Dekker 1981, p. 53
- [88] Levin W., Ryan D., West S., Lu A. Y. H. J. Biol. Chem 1974, v. 249, p. 1747-1754.
- [89] Strobel H. W., Lu A. Y. H., Heidema J., Coon M. J. J. Biol. Chem, 1970, v. 245, p.4851-4854
- [90] Ichihara K., Kusunose E., Kusunose M. Biochem. et Biophys. acta, 1971, v. 139, p.178-189
- [91] Weiss J. J. Nature, 1964, v. 203, p. 83
- [92] Ei-Ichiro-Ochiai. J. Inorg Nucl. Chem, 1974, v. 36, p. 2129- 2132
- [93] Jung Chr., Friedrich I., Ristau O. Acta. bio. med. Germ. 1979. B. 38 s. 363
- [94] Watson H. C., Nobbs C. L. Coll Gesellschaft Biol. Chem. XIX Hospach. Berlin: Springer Verlag 1968
- [95] Курченко В. П., Усанов С. А., Метелица Д. И. Изв. АН БССР, сер. хим. 1982, №2, с.71
- [96] Lichtenberger F., Nastanczyk W., Ulrich v. Biochem. Biophys. Res. Communs, 1976, p. 939
- [97] Groves J. T., Nemo T. E., Meyers R. S. Amer. Chem. Soc. 1979, v. 101, p. 1032
- [98] Chang C. K., Kuo M. S. Ibid 1979, v. 101, p. 3413
- [99] Kaneko Yo., Tamura M., Yamazaki I. Biochemistry 1980, v. 19, p. 5795
- [100] Dolphin D., Forman A., Borg D. C., Fajer J., Felton R. H. Proc. Natl. Acad. Sci USA, 1971, v. 68, p. 614
- [101] Арчаков А. Н. Оксигеназы биологических мембран. Изд. «Наука» М 1983. 55 ст.
- [102] Hamilton G. A., J. Amer. Chem. Soc. 1964, v. 86 p. 3391-3394
- [103] Sliger E. G., Kennedy K. A., Pearson D. C. Proc. Nat. Acad. Sci. US, 1980, v. 77 p. 1240-1244
- [104] Метелица Д. И., Карасёва Е. И. Иницирование и ингибирование свободнорадикальных процессов в биохимических пероксидазных системах (обзор). Прик. биохим. и микробиол. 2007, т.43, №5, ст. 537-564
- [105] Davidson A. J., Norman R.O.C. J. Chem. Soc. 1964 p. 5404
- [106] Dunford H. B. Stillman J. S. Coord. Chem. Rev. 1976, v. 19, p. 187-251

- [107] Akhrem A. A., Metelitz D. I., Belski S. M., Kiselev P. A., Skurko M. E., Usanov S. A. *Croatia Chem. Acta*, 1977, v. 49 p. 223-235
- [108] Metelitz D. I., Akhrem A. A., Belski S. M., Bokut S. B., Usanov S. A. In: *Industrial and environmental xenobiotics* /Ed. J. R. Fouts, J. Gut. Amsterdam: Excerpta med. 1978 №440, p. 40-42
- [109] Yamazaki I., Yokota K. *Mol. and Cell. Biochem* 1973, v. 2, p. 39-52
- [110] Саундерс Б. К. Пероксидазы и каталазы – В. кн. Неорганическая биохимия. "Мир" М. 1978, т. 2, ст. 434-469
- [111] Metelitz D. I., Akhrem A. A., Bokut S. B., Erjomina A. N., Usanov S. A. In: *12th FEBS. Meeting, July 2-8. 1978, Abstr. №3044 Dresden*
- [112] Metelitz D. I., Akhrem A. A., Erjomina A. N., Kisel M. A., Usanov S. A. In: *Scientific Conference "Cytochrome P450: Structure and Functional Aspects". Ebervalde (GDR) 1978, July 9-13. Abstrs. p. 34-35*
- [113] Metelitz D. I., Akhrem A. A., Erjomina A. N., Kisel M. A., Usanov S. A. *Acta biol. med. Germ.* 1979. Bd 38, s. 511-518
- [114] Coon M. J., White R. E., Blake R. C. – In: *Oxidases and related redox systems/ Eds T. King et al. Baltimore: Univ. Park press. 1981. v. 1, p. 93-118*
- [115] Estabrook R. W. Werringloer J., Masters B.S.S., Peterson J. A. In: *Oxidases and related redox systems/ Eds T. King et al. Baltimore: Univ. Park press. 1980, v. 1, p. 156-173*
- [116] Capdevila J., Estabrook R. W. Prough R. A. *Arch. Biochem. and Biophys*, 1980, v. 200, p. 186-195
- [117] Гордезиани М. Ш., Дурмишидзе С. В., Курашвили Л. К. Ингибирующий эффект медь-тирозинового комплекса на NADPH- и гидроперекись-кумол-стимулированное гидрокселирование некоторых ксенобиотиков в растительной ткани. *Сообщ. АН Груз. ССР. 1981. т. 104, №3. ст. 725-728*
- [118] Jaffrey E., Kotake A., Azhary R., Mannering G. J. *Mol. Pharmacol*, 1977, vol. 13, p. 415-425
- [119] Sies H., Grosskopf M. *Europ. J. Biochem*, 1975, vol. 57, p. 513-520
- [120] Strobel H. W., Coon M. J. *J. Biol. Chem* 1971, 246, p. 7826-7830
- [121] Sasame H. A., Mitchell J. R., Gillette J. R. *Federal. Proc.* 1975. 34, p. 729
- [122] Kuthan H., Tsuji H., Graf H., Ullrich V., Werringloer J., Estabrook R. W. *FEBS Letter.* 1978, 91, p. 343-347

- [123] Kurchenko V. P., Usanov S. A., Metelitz D. I. Kinet. and Catal. Letters, 1979, 12, p. 31-37
- [124] Metelitz D. I., Akhrem A. A., Eremin A. N., Kisel M. A., Usanov S. A. Acta biol. med. Germ. 1979, 38, p. 511-518
- [125] Курченко В. П., Усанов С. А., Метелица Д. И. Ингибирующее действие соединения меди на окислительное деметилирование диметиланилина гидроперекисью кумила при участии цитохрома Р-450. Биохимия 1980, т. 45, вып. 7, ст. 1312-1318
- [126] Robertson J. D. Unit membranes: A review with recent new studies of experimental alternations and new subunit structure in synaptic membranes. In: Cellular membranes in development (Locke M., ed) 1964, p. 1-81. New York. Acad Press
- [127] Parry G., Palmer D. N., Williams D. J. Ligand partitioning info membranes: its significance in Determining K_m and K_s values for cytochrome P450 and other membrane bound receptors and enzymes. FEBS Letters 1976, v.67 p. 123-129
- [128] Ляхович В. В., Цырлов И. Б. Структурные аспекты биохимии монооксигеназ. Наука, Новосибирск 1978, 236 ст
- [129] Цырлов И. Б., Ляхович В. В. Роль микросомальных фосфолипидов в организации и регуляции активности монооксигеназной системы. Усп. Совр. Биол. 1977, т. 84 ст. 3-21
- [130] Anfinsen C. B. In: New perspectives in biology (Sela ed) 1964, p. 42
- [131] DePierre J. W., Dallner G. Structural aspects of the membrane of the endoplasmic reticulum. Biochim. Biophys acta 1975, v.415, p. 411-472
- [132] Gordeziani M., Khatisashvili G., Varazi T., Kurashvili M., Pruidze M. Xenobiochemistry with Bases of ecological chemistry (Monograph.) Georg. Tbilisi 2011, 320 p
- [133] Gordeziani M., Khatisashvili G. Membranous xenobiochemistry. (Tbilisi 2005, 280 p. Georg.)
- [134] Гордeziани М. Ш., Дурмишидзе С. В., Курашвили Л. К. Востановление фосфотидилхолином ингибированных детергентом реакции гидроксилировани в целой растительной ткани. Сообщ. АН Грузинской ССР, 1981, т. 104, №2, стр. 465-468
- [135] Lindenmayer A., Smith L. Biochem et Biophys acta 1964, v. 93 p. 445-461

- [136] Murphy G., Vogel G., Krippahl G., Lynen F. *Europ. J. Biochem* 1974, v. 49, p. 443-455
- [137] Ambike S. H., Baxter R. M., Zahid N. D. *Phytochemistry* 1970, v. 9, p. 1959-1962
- [138] Duppel W., Lebault J. M., Coon M. J. *Europ J. Biochem*, 1973, v. 36, p. 583-592
- [139] Ishimura Y., Ulrich V., Peterson J. A. *Fed. Proc* 1971, v. 30, p. 1092, 230 (ref)
- [140] Yu C.A., Gunsalus I. C., Katagiri M., et al *J. Biol. Chem* 1974, v. 249, p. 94-101
- [141] Lu A.Y.H., West S. B. *Pharmacol. Revs*, 1980, v. 31, p. 277-295
- [142] Verich V., Kremers P. *Arch. Toxicol.*, 1977, v. 39, p. 41-50
- [143] Omura T., Sanders E., Estabrook R. W. et al. *Arch. Biochem. and Biophys* 1966, v. 117, p. 660-673
- [144] Suhara K., Takemori S., Katagiri M. *Biochim. et biophys acta* 1972, v. 263, p. 272-278
- [145] Honeck H. *Pharmazie* 1978 v. 33, p. 317-321
- [146] DePierre J. W., Ernster L. - In: "Microsomes. drug oxidations, chemical carcinogenesis/Eds M. J. Coon et al. N. Y. etc: Acad press 1980, v. 1, p. 431-443
- [147] Hall P. F. - In: *Biochemistry, Biophysics and regulation of cytochrome P450* /Eds I. A. Gustafsson. Amsterdam etc: Elsevier/North-Holland Biomed. Press 1980. p. 461-477
- [148] Тогонидзе Л. Ш., Хатисашвили Г. А., Гордезани М. Ш., Кобахидзе М. Ж. NAD(P)H-зависимое фракционное окисление диметиланилина в листьях растений *Сообщ. АН Грузинской ССР*, 1990, т. 140, №1, ст. 125-128
- [149] Гордезани М. Ш., Хатисашвили Г. А., Курашвили М. В. Распределение NADPH- цитохром Р-450-редуктазы в растительной клетке. *Сообщ. АН Грузинской ССР*, 1991, т. 143, №3, стр. 321-324
- [150] Хатисашвили Г. А., Гордезани М. Ш., Курашвили М. В. Цитохромные компоненты растительных микросом и возможность их индукции. *Сообщ. АН Грузинской ССР*, т. 143, №2, ст. 189-192
- [151] Хатисашвили Г. А. Растительные монооксигеназы: детоксикация ксенобиотиков и внутриклеточная энергетика. Доктор. диссерт. 1999, Тбилиси, 187 с

- [152] Запромётов М. Н., Ермакова С. Е. Система цитохрома Р-450 в этилированных проростках ячменя и её участие в биосинтезе фенольных соединений. Физиол. Раст. 1989, т. 36, №6, стр. 1146-1154
- [153] Тушишвили Л. Ш., Замбахидзе Н. Е., Кекелидзе Н. А. β -Ситостерол стеблей и листьев рододендрона кавказского (*Rhododendron caucasicum* Pall). Сообщ. АН Грузинской ССР, 1975, т. 80, №1, стр. 181-184
- [154] Бобохидзе Е. А. Изучение условий окисления кольца - А холестерина растениями. Сообщ. АН Грузинской ССР. 1977, т. 88, №1, стр. 189-192
- [155] Дурмишидзе С. В., Гордезиани М. Ш., Бобохидзе Е. А. Об окислении холестерина в растительной клетке. Извес. АН Грузинской ССР, сер. биол. 1979, т.5, №1, стр.149-155
- [156] Atcinson D. E. In: Metabolic roles of citrate. Acad Press, London and New-York 1968
- [157] Atcinson D. E., Walton G. M. J. Biol. Chem 1967, v. 13, p. 32-39
- [158] Гордезиани М. Ш., Дурмишидзе С. В., Бобохидзе Е. А., Ломидзе Э. П. Участие митохондриальной и микросомальной окислительных систем в детоксикационных процессах ксенобиотиков листьями. Физиология растений. 1982, т. 23, вып 5. ст. 978-984
- [159] Гордезиани М. Ш., Дурмишидзе С. В., Бобохидзе Е. А., Ломидзе Э. П. Микросомальное деметилирование диметиланилина и п-нитроанизола в смешанной системе растительные микросомы - митохондрии. Изв. АН Грузинской ССР, сер. биол. 1986, т. 12 №1, ст 42-46
- [160] Андреева И. Н., Куркова Е. Б. Окислительное фосфорилирование митохондрий корней кукурузы. Физиол. растений 1966, 12, ст. 584-589
- [161] Титова З. В., Зайцева М. Г. Влияние температуры инкубационной среды на окислительную и фосфорилирующую активность митохондрий из корней проростков кукурузы. Физиол. растений, 1975, № 22, ст. 221-226
- [162] Гордезиани М. Ш., Бобохидзе Е. А. Изменение количественного соотношения процессов этерификации и окислительных превращений холестерина в листьях растений. Сообщ. АН Грузинской ССР, 1978, т. 92, № 2, ст. 449-452

- [163] Hansch C., Deutsch E.W., Smith R. N. The use of substituent constants and regression analysis in the study of enzymatic reaction mechanisms. *J. Amer. Chem. Sec.* 1965, v. 87, p. 2738-2742
- [164] Hansch C. In: *Drug. Design* (Ariëns E. J. ed), N.Y. Acad Press, 1971. p. 271
- [165] Hansch C. Quantitative relationships between lipophilic character and drug metabolism. "Drug Metab. Revs", 1972, v.1, p. 1-14
- [166] Hansch C., Dunn W. J. Linear relationships between lipophilic character and biological activity of drugs. *J. Pharmaceut. Sci.* 1972, v. 61, p. 1-19
- [167] Martin Y. Hansch C. Influence of hydrophobic character on the relative rate of oxidation of drugs by rat liver microsomes. *J. Med. Chem.* 1971, v.14, p. 777-779
- [168] Nelson D. R., Strobel H. W. On the membrane topology of vertebrate cytochrome P450 proteins. *J. Biol. Chem.* 1988, v.163, p. 6038-6050
- [169] Greham-Lorence S. E., Peterson J. A. P450: Structural similarities and functional differences. *FASEB J* 1996, v. 10, p. 206-214
- [170] Kiskeidze E., Khatisashvili G., Kurashvili M., Shavgulidze G. Action of lipid peroxidation of monooxygenase system participating in xenobiotic detoxification. *Bull. of Georgian Acad of Scien.* 2000, v. 162, p 156-158
- [171] Hochstein P., Ernster L. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1963, v. 12, p. 388-394
- [172] Владимиров Ю. А., Арчаков А. И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах 1972, изд. «Наука», М. 252 стр
- [173] Orrenius S., Dallner G., Ernster L. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1964, v. 14, p. 329-339
- [174] Archakov A. I., Karuzina I. I. Bokhon'ko A. I., Alexandrova T. A., Panchenko L. F. *Pharmacol.* 1972, v. 21, p. 1595-1602
- [175] Ernster L., Nordenbrandt K. *Methods in Enzymology*, 1964, v.10, p. 574-580
- [176] Ernster L., Nordenbrandt K., Orrenius S., Das M. L. Hoppe-Seuler's *Z. Physiol. Chem.* 1968, v. 1, p. 89-92
- [177] Das M. L., Orrenius S., Ernster L., Gnosspelius Y. *FEBS Letters* 1968, v. 1, p. 89-92
- [178] Pederson T. C., Aust S. D. *Fed. Proc.* 1972 v. 31, p. 3856 (ref)

- [179] Pederson T. C., Buege, J. A., Aust, S. D. J. Biol. Chem. 1973, v. 248, p. 7134-7141
- [180] Арчаков А. И., Панченко Л. Ф., Карузина И. И., Александрова Т. А. ДАН СССР, 1969, 187, ст 1208-1211
- [181] Hrysay E. G. Fed. Proc. 1974, v. 33, p. 371 (ref)
- [182] Hrysay, E. G., O'Brien, P. J., Arch. Biochem. Biophys, 1971, v. 147, p. 14-27
- [183] Hrysay, E. G., O'Brien, P. J., Arch. Biochem. Biophys, 1971, v. 147, p. 28-25
- [184] Radtke H. E., Coon M. J. Fed. Proc. 1974, v. 33, p. 2127 (ref)
- [185] Rahimtula A. D., O'Brien, P. J., Peterson J. A. Estambrook R. W. Biochem. and Biophys. Res. Commun 1974, v.60, p. 695-702
- [186] Ахрем А. А., Дворников С. С., Усанов С. А., Метелица Д. И. Изв. АН БССР, Сер. хим. 1976, №5 с. 93-97
- [187] Ахрем А. А., Бельский С. М. Метелица Д. И. Изв. АН БССР, Сер. хим. 1978, №1, с. 87-92
- [188] Rahimtula A. D., O'Brien, P. J., Seifried H. E. Jerina D. M., Europ. J. Biochem, 1978, v. 89, p. 133-138
- [189] Poyer J. L., McCay P. B. J. Biol. Chem, 1971, v. 246, p. 263-269
- [190] Victoria E. J., Barber A. A. Lipids, 1969 v.4, p. 582-588
- [191] Pederson T. C., Aust, S. D. Biochem Biophys. Res. Commun 1972, v. 48, 789-795
- [192] Wills E.D. Biochem J. 1969, v. 113, p. 333-341
- [193] Hanstein W. G., Hatefi Y. Arch. Biochem Biophys 1970, v. 138, p. 87-95
- [194] Hatefi Y., Hanstein W. G., Arch. Biochem Biophys 1970, v. 138, p. 73-86
- [195] Авчинников Ю. А. Биоорганическая химия. 1987 изд. "Просвещение" М. 815 ст
- [196] Nilsson R. On the Role of Free Radicals and Hydrogen Peroxide in some Biological Oxidations. Dis. Stokholm 1969
- [197] Bidlack W. R., Tappel A. L. Lipids 1972, v. 7, p. 564-565
- [198] Курашвили Л. К., Гордезиани М. Ш. Перекисное окисление мембранных липидов и реакция N-деметилирования диметиланилина в растительных микросомах. Сообщ. АН Груз. ССР, т.137, №2, 1980, стр. 397-400
- [199] Hrysay E. G., O' Brien P. J. Arch. Biochem. and Biophys. 1972, v. 153, p. 480-494

- [200] Archakov A. I. Bachmanova G. I. Cytochrome P450 and active oxygen. London Taylor and Francis, 1990. p. 170-181
- [201] Karuzina I. I. Archakov A. I. The oxidative inactivation of cytochrome P450 in monooxygenase reactions. Free radical. Biol. Med. 1993, 16, p. 73-97
- [202] Ruckpaul K., Rein H., Blanck J. Regulation of the activity on the hepatic endoplasmic cytochrome P450. In: Basis and mechanisms of regulation of cytochrome P450 (Ruckpaul K., Rein H. eds) Berlin, Academie-Verlag 1989. 1, p. 1-65
- [203] Archakov A. I., Zhukov A. A. Multiple activities of cytochrome P450 Stoichiometrical approach. In: Drug Metabolism – from Molecules to Man. London, Taylor and Francis, 473-476. In: Basis and mechanisms of regulation of cytochrome P450 (Ruckpaul K., Rein H. eds) Berlin, Academie-Verlag 1989, 1, p. 1-65
- [204] Zhukov A. A., Blanck J., Ristau O., Ruckpaul K., Archakov A. I. In: Cytochrome P450: Biochemistry and Biophysics (Schuster I. eds.) London, Taylor and Francis 1989. p. 85-88
- [205] Гордезиани М., Хатисашвили Г. Химическая модификация цитохрома Р-450. Тбилиси 2008, 46 ст. (груз)
- [206] Gordeziani M., Khatisashvili G. Enzymes. Conformational changes, chemical modification and modeling of hemoproteins. Tbilisi, 2013, 176 p. (Georg)
- [207] Ortiz de Montellano P. R., Mico B. A., Mathews J. M., Kunze K. L., Miwa G. T., Lu A. Y. Selective inactivation of cytochrome P450 isozymes by suicide substrates. Arch. Biochem. Biophys. 1981, v. 210, p.717-728
- [208] Ortiz de Montellano P. R., Reich N. O. Catalyst- dependent inhibition of cytochrome P450 Enzyme. In: Cytochrome P450: Structure, Mechanism and Biochemistry. (Ortiz de Montellano P. R. edt) New York, Plenum press 1986, p. 273-314
- [209] Farrell G. C., Correia M. A. Structural and functional reconstitution of hepatic cytochrome P450 in vivo. Reversal of allylisopropylacetamide - mediated destruction of the hemoprotein by exogenous heme. J. Biol. Chem. 1980, v. 255p. 10128-10133
- [210] 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 P450 isozymes in rats by allylisopropylacetamide: mechanistic implications. Mol. Pharmacol, 1987, v. 32, p. 299-308

- [211] Bachmanova G. I., Pogodina O. K., Kanaeva I. P., Archakov A. I. The in activation of the reduced cytochrome P450. In: Biochemistry, Biophysics and regulation of cytochrome P450 (Gustafsson I. A., Carlstedt-Duke. Mode A., Rafter I., eds) Amsterdam. Elserier Biomedical press 1980, p. 599-602
- [212] Cajacob C. A., Chan W. K., Shepard E., Ortiz de Montellano P. R. The catalytic site of rat hepatic lauric acid ω -hydroxylation of acetylenic fatty acids. J. Biol. Chem, 1988, v. 263, p. 18640-18649
- [213] Helvig C., Tardif F. J., Seyer A., Powles S. B., Mioskowski C., Durst F., Salaün J. P. Selective inhibition of cytochrome P450 enzyme in wheat that oxides both the natural substrate lauric acid and synthetic herbicide diclofop. Pestic. Biochem. Physiol. 1996, v.54, p. 161-171
- [214] Helvig C., Alayrac C., Mioskowski C., Koop D. P., Durst F., Salaün J. Suicide inactivation of Cytochrome P450, by Midchain and Terminal acetylenes. Biochem. and Molecular Biology. 1997, v. 3, p. 414-421
- [215] Khatisashvili G., Gordeziani M., Kvesitadze G., Korte F. Plant Monooxygenases: Participation in Xenobiotic Oxidation – Ecotoxicol. and Environ. Safety. 1997, vol. 36, p. 118-122
- [216] Khatisashvili G., Kurashvili M., Gordeziani M., Kvesitadze G. Monooxygenase and peroxydase pathways of xenobiotics detoxication in higher plant Fresenius envir. Bull. 1993, v.2, p. 103-108
- [217] Khatisashvili G., Kurashvili M., Gordeziani M., Kvesitadze G. Functional evolution of separate components of plant monooxygenase system involved in xenobiotic detoxication. Fresenius Envir. Bull. 1994, v.3, p. 621-626
- [218] Хатисашвили Г., Курашвили М., Чхиквишвили И., Гордезиани М., Квестеидзе Г. Трансформация монооксигеназного механизма в пероксидазный и микросомальное окисление флавоноидов в растении. Изв. АН Грузии, сер. биол., 1993, т. 19, ст. 318-323
- [219] Cinti D. L., Schenckman J. B. Hepatic organelle interaction I. Spectral investigation during drug biotransformation. Molec. Pharmacol. 1972, v. 8, p. 333-33
- [220] Cinti D.L., Ritchie A., Schenckman J. B. Hepatic organelle interaction II. Tricarmonic acid cycle components on N-demethylation and hydroxylation reactions in rat liver Molec. Pharmacol, 1972, v.8, p. 339-344

- [221] Арчаков А. И., Карякин А. В., Скулачев В. П. Перенос электронов между мембранами микросом и митохондрий. ДАН СССР, 1979, т. 209, ст. 221-223
- [222] Арчаков А. И., Карякин А. В., Скулачев В. П. Межмембранный транспорт электронов в отсутствии растворимых переносчиков. ДАН СССР, 1974, т. 217, ст. 1423-1426
- [223] Skulachev V. P. Integrating function of biomembranes Problems of lateral transport of energy metabolites and electrons. Biochem. Biophys. Acta 1980, v. 604, p. 297-320
- [224] Gordeziani M., Khatisashvili G., Ananiashvili T., Varazashvili T., Kurashvili M., Kvesitadze G., Tkheldze P. Energetic significance of plant monooxygenase individual components participating in xenobiotic degradation. International Biodeterioration and Biodegradation, 1999, v. 44, p. 49-54
- [225] Stiborova M., Anzenbacher D. Gen. Physiol, 1991, v.10, p. 209-216
- [226] Shinohara A., Kamataki T., Ichimura Y., Opochi H., Okuta K. Jap. J. Pharmacol. 1984, v. 45, p. 107-114
- [227] Wilson L., Williamson T., Gronowski J., Gentile G., Gentile J. Mutation Res. 1994, v. 307, p. 185-193
- [228] Kurashvili M., Pruidze M., Kiskeidze E., Varazashvili T., Ananiashvili T., Kvesitadze G., Gordeziani M. Influence of different factors on nitrobenzene oxidation in plant cell. J. Biol. Phys. and Chemistry. 2003, v.3, p. 45-49

დანართი

ბიოლოგიური ჟანგვის ლაბორატორიის თანამშრომელთა მიერ მონო-ოქსიგენაზების ბიოქიმიის აქტუალურ საკითხებზე გამოქვეყნებული მიმოხილვითი პუბლიკაციები

1. Khatisashvili G., Gordeziani M., Kvesitadze G., Korte F. Plant Monooxygenases: Participation in Xenobiotic Oxidation. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 1997, v.36, p. 118-122
2. Korte F., Kvesitadze G., Ugrekhelidze D., Gordeziani M., Khatisashvili G., Buadze O., Zaalishvili G., Coulston F. Review. Organic Toxicants and Plants. *Ecotoxicol. And Environm. Safety*, 2000, v.47, p. 1-26
3. Заалишвили Г., Хатисашвили Г., Угрехелидзе Д., Гордезиани М., Квеситадзе Г. Детоксикационный Потенциал Растении, Обзор. 2000. В. 36, №5, стр. 515-524
4. Гордезиани М. Монооксигеназные и пероксидазные механизмы метаболизма ксенобиотиков. *Изв. Аграрные Науки. Обзор*. 2012, в. 10, № 2, стр. 79-85
5. Gordeziani M., Khatisashvili G. The hydroxylation of xenobiotics and the generation of reactive oxygen species. Review, *Microbiol. And Biotech*. 2013, v. 4, n. 1, pp. 36-62
6. Gordeziani M., Kurashvili M., Khatisashvili G., Adamia G. Bioactivation of Molecular Oxygen-Phenomena of Enzyme Self-inactivation and the Apoptosis. Review, *Annals Agrarian Science*, 2015, v. 13, n. 2, pp. 19-33
7. Gordeziani M., Varazi T., Pruidze M. Structural-functional Organization of Cytochrome P450 Containing Monooxygenase and some Aspects of Modeling. Review, *Annals of Agrarian Science*, 2016, v. 14, n.2, pp. 62-74

სარჩევი

შესავლის ნაცვლად. „მწვანე ფილტრი“ — მცენარეთა ბიოქიმიკაში ახალი კონცეფციის დაბადება	5
1. ბიოლოგიური ჟანგვის მოკლე ისტორიული მიმოხილვა და ოქსიგენაზების თანამედროვე კლასიფიკაცია	16
2. ციტოქრომ P450 და მიკროსომების მონოოქსიგენაზური რედოქს-ჯაჭვი	20
3. ორგანული ქსენობიოტიკები, – ციტოქრომ P450-ის ჟანგვის სუბსტრატები	23
4. ჟანგბადის აქტიური ფორმები (შაშ-ები) და ქსენობიოტიკთა ფუნქციონალიზაციაში მათი შესაძლო როლი	40
5. ქსენობიოტიკთა პიდროქსილირების მექანიზმი (მონოოქსიგენაზური ციკლი)	53
6. ენდოპლაზმური რეტის მემბრანები და მონოოქსიგენაზურ სისტემაში მათი კოფაქტორული როლი	68
7. მიკროსომული მონოოქსიგენაზები და უჯვრი ცხიმოვანი მჟავების ზეჟანგური ჟანგვა	99
8. ციტოქრომ P450-ის პეროქსიდაზული აქტივობა; ჟანგვის მონოოქსიგენაზური მექანიზმის პეროქსიდაზურად ტრანსფორმაციის თავისებურებები მცენარეში	116
რეზიუმე (ინგლ.)	143
ლიტერატურა	161
დანართი	176