მ. გორდეზიანი, გ. ხატისაშვილი

ციტოქრომ P450-ის ქიმიური მოდიფიკაცია

თბილისი
2008

М. Гордезиани, Г. Хатисашвили

Химическая модификация цитохрома P450

M. Gordeziani, G. Khatisashvili

Chemical Modification of Cytochrome P450

Тбилиси – 2008 – Tbilisi

დურმიშიძის ბიოქიმიისა და ბიოტექნოლოგიის ინსტიტუტი
ბიოლოგიური ჟანგვის ლაბორატორია

Институт биохимии и биотехнологии им. С.В. Дурмишидзе
Лаборатория биологического окисления

Durmishidze Institute of Biochemistry and Biotechnology
Biological Oxidation Laboratory

მარლენ გორდეზიანი
გია ხატისაშვილი

ციტოქრომ P450 უაღრესად მნიშვნელოვან როლს ასრულებს უცხო ნაერთების გაუვნებელყოფის პროცესში. ეს ფერმენტი უნივერსალური გავრცელებისაა და სხვადასხვა ფორმით თითქმის ყველა ცოცხალ ორგანიზმში გვხვდება. როგორც ზოგიერთი სხვა მჟანგველი ფერმენტი, კატალიზური აქტის განხორციელების პროცესში ციტოქრომ P450 ქიმიურ მოდიფიკაციას განიცდის, რაც ინქტივაციის ან აქტივობის მექანიზმის შეცვლით გამოიხატება.

წინამდებარე ნაშრომი წარმოადგენს ავტორების ერთგვარ მცდელობას, გაეანალიზებინათ ბოლო ორი ათეული წლის მანძილზე მოპოვებული ინფორმაცია ციტოქრომ P450-ის ქიმიური მოდიფიკაციის შესახებ და ამ ჭრილში წარმოედგინათ საკუთარი კვლევის შედეგები. ავტორთა თვალსაზრისით, მცენარეული ციტოქრომ P450 ქიმიური მოდიფიკაციის შედეგად ინაქტივირდება, როგორც მონოოქსიგენაზა, მაგრამ ამავე დროს პეროქსიდაზას თვისებებს იძენს. ასეთი ტრანსფორმაციით ფერმენტი ერთი მხრივ, ჩართული რჩება ქსენობიოტიკების დეტოქსიკაციის პროცესში, მეორე მხრივ კი უზრუნველყოფს უჯრედის დაცვას ზეჟანგური ბუნების აგრესიული ნაწილაკებისაგან.

ავტორები მადლიერების გრძნობით მიიღებენ ყველა პრინციპულ და საქმიან შენიშვნას, რომელიც დაებადება მკითხველს ამ ნაშრომის წაკითხვისას.

რედაქტორი: საქართველოს მეცნიერებათა ეროვნული აკადემიის
წევრ-კორესპონდენტი დ. უგრეხელიძე

ISBN 978-9941-0-0912-9

სარჩევი

ციტოქრომ P450-ის ქიმიური მოდიფიკაცია 5

1. ციტოქრომ P450-ის ინაქტივაცია 5

2. პეროქსიდაზები და ციტოქრომ P450-ის
პეროქსიდაზული რეაქციები 10

3. NADPH-ციტოქრომ P450-რედუქტაზას შესაძლო ფუნქციები
ციტოქრომ P450-ის პეროქსიდაზად ტრანსფორმაციის პირობებში 23

ციტოქრომ P450-ის ქიმიური მოდიფიკაცია. რეზიუმე 28

Chemical Modification of Cytochrome P450. Summary 30

Химическая модификация цитохрома P450. Резюме 31

ლიტერატურა 33

ციტოქრომ P450-ის ქიმიური მოდიფიკაცია

1. ციტოქრომ P450-ის ინაქტივაცია

ფერმენტებზე არსებული ტრადიციული შეხედულება იმის შესახებ, რომ კატალიზური აქტის დასრულების შედეგად ისინი ცვლილებებს არ განიცდიან, უკანასკნელი ორი ათეული წლის მანძილზე კრიტიკულად იქნა გადასინჯული. აღმოჩნდა, რომ **მრავალი ფერმენტი რეაქციის მსვლელობისას ქიმიურ მოდიფიკაციას განიცდის და ეს განსაკუთრებით იმ ფერმენტებს ეხებათ, რომელთა ფუნქციონირებაც თავისუფალი რადიკალების, ჟანგბადის აქტიური ფორმების და რეაქციისუნარიანი ინტერმედიატების გენერირებას ან რეალიზაციას უკავშირდებიან [1-5]. მოდიფიკაცია, უპირველეს ყოვლისა, ინაქტივაციაში ვლინდება (ცხრილი 1). ეს მოვლენა "თვითინაქტივაციის" სახელწოდებითაა ცნობილი.**

ცხრილი 1.

კატალიზის პროცესში ჟანგბადის აქტიური ფორმებით
ფერმენტთა ქიმიური მოდიფიკაცია [2]

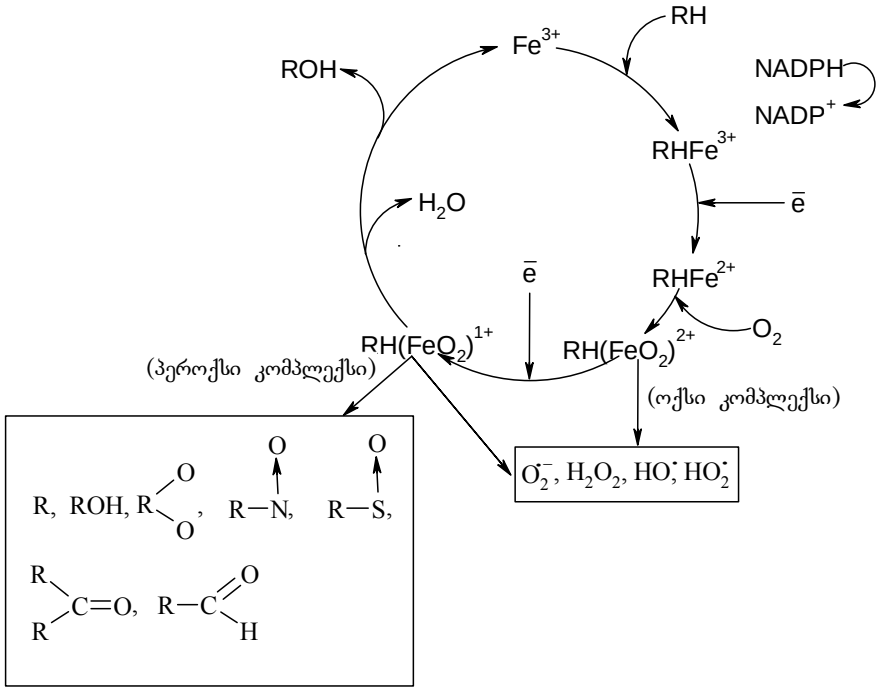
ფერმენტები	ინაქტივაციის გამომწვევი აგენტი	ქიმიური მოდიფიკაციის მიზეზი
ციტოქრომი P450 2B4	H_2O_2	ცისტეინის და მეთიონინის ჟანგვა, ჰემის დაკარგვა
CuZn-სუპეროქსიდდისმუტაზა	H_2O_2	ჰისტიდინის ჟანგვა
Fe-სუპეროქსიდდისმუტაზა	H_2O_2	ტრიფტოფანის, ჰისტიდინისა და ცისტეინის ჟანგვა
D-გლუკოზოოქსიდაზა	H_2O_2	ტრიფტოფანის, ჰისტიდინისა და ცისტეინის ჟანგვა
ქსანტინოქსიდაზა	H_2O_2	ტრიფტოფანის, ჰისტიდინისა და ცისტეინის ჟანგვა
ქლორპეროქსიდაზა	H_2O_2	ტრიფტოფანის, ჰისტიდინისა და ცისტეინის ჟანგვა
ლაქტოპეროქსიდაზა	$HO^{\bullet}$	ტრიფტოფანის, ჰისტიდინისა და ცისტეინის ჟანგვა
გლუტათიონპეროქსიდაზა	$O_2^{\bullet-}$	ტრიფტოფანის, ჰისტიდინისა და ცისტეინის ჟანგვა
მიელოპეროქსიდაზა	H_2O_2, ClO^-	მეთიონინის, თიროზინის ჟანგვა
NADH-ოქსიდაზა	H_2O_2, ClO^-	ჰემის დაკარგვა

თავისუფალი რადიკალების დაგროვება უჯრედისათვის განსაკუთრებით სახიფათოა, რადგან ისინი მრავალი პათოლოგიური პროცესის ინიციაციას იწვევენ. როდესაც მათი კონცენტრაცია საშიშ ზღვარს აჭარბებს და უჯრედიდან მოცილება შეუძლებელი ხდება, უჯრედი აპოპტოზს, ანუ წინასწარ დაპროგრამებულ "თვითმკვლელობას" მიმართავს. ტერმინი "აპოპტოზი" (ბერძნ. "ფოთოლცვენა") შესანიშნავად გამოხატავს მოვლენის არსს. მთელი რიგი პროცესების ჩართვის შედეგად დაზიანებული უჯრედი კი არ ნეკროზდება, არამედ განლევას განიცდის. ორგანელები იშლება, მაკრომოლეკულები ჰიდროლიზდება და ისინი სხვა უჯრედების მიერ საკვებ და საამშენებლო მასალად გამოიყენება.

ფერმენტთა თვითინაქტივაციის მოვლენა შეიძლება განხილულ იქნას, როგორც "აპოპტოზი ფერმენტულ დონეზე", რამდენადაც ამ დროს თავისუფალი რადიკალების გენერატორი ფერმენტი თვითონ გამოდის მწყობრიდან და უჯრედისათვის არასასურველი ინტერმედიატების წარმოქმნა საფუძველშივე ისპობა. აქვე უნდა აღვნიშნოთ ამჟამად არსებული, საკმაოდ დამაჯერებელი

მოსაზრება იმის შესახებ, რომ მოდიფიკაციის გზით მაკრომოლეკულების ინაქტივაცია ჩართული უნდა იყოს შიდაუჯრედული ცილების ბრუნვის მექანიზმში, რომლის საშუალებითაც უჯრედიდან მათი მოლეკულების მოცილება რეგულირდება. ეს გარემოება უაღრესად მნიშვნელოვანია ყველა იმ სიტუაციისათვის, რომელიც ქსენობიოტიკებისა და სხვადასხვა წამლების ჭარბი რაოდენობის ორგანიზმიდან გამოდევნასთანაა დაკავშირებული [1]. ფერმენტთა ინაქტივაციის მოლეკულური მექანიზმი და უჯრედში მისი ჭეშმარიტი როლი ჯერ კიდევ საფუძვლიან შესწავლას მოითხოვს. ამ მიმართებით მოგვეპოვება შემდეგი ფაქტები: ჟანგბადის აქტიური ფორმებით მრავალი ფერმენტი ჟანგვით მოდიფიკაციას განიცდის; ინაქტივაცია შეიძლება განხორციელდეს ფერმენტულად, ქიმიურად ან რადიოლიზურად გენერირებული რეაქციისუნარიანი ჟანგბადის ფორმებით; ჟანგბადოვანი რადიკალები ცილის აქტიურ ცენტრთან ახლოს მყოფი ამინომჟავური ნაშთების მოდიფიკაციის უნარს ამჟღავნებენ და ეს რეაქცია მეტად სპეციფიკურია; აქტიური ცენტრის ახლოს აღძრულმა სტრუქტურულმა ცვლილებებმა კონფორმაციული ძვრები და პროტეოლიზისადმი მგრძნობიარობის გაზრდა შეიძლება გამოიწვიონ.

კატალიზური ციკლის პროცესში ციტოქრომ P450-ის ინაქტივაცია სხვადასხვა მექანიზმით შეიძლება განხორციელდეს (ნახ. 1).



ნახ. 1. ოქსიდაზურ რეაქციებში აქტიური ინტერმედიატების წარმოქმნა.

RH – სუბსტრატი;

Fe – ციტოქრომ P450-ის ჰემური რკინა [2].

პირველი მექანიზმი ამ ჰემოპროტეინის პეროქსი-კომპლექსის დაშლის შედეგად აქტიური დროებითი სუბსტრატების წარმოქმნასთანაა დაკავშირებული. ასეთ რეაქციისუნარიან ინტერმედიატებს მიეკუთვნება თავისუფალი ორგანული რადიკალები, ეპოქსიდები, N-ოქსიდები, S-ოქსიდები, ალდეჰიდები, კეტონები და სხვ. ისინი თავის მხრივ კოვალენტურად უკავშირდებიან აპოციტოქრომ P450-ს და მის მოდიფიკაციას იწვევენ. ინაქტივაციის ეს მექანიზმი შეინიშნება ე.წ. "გამანადგურებელი" სუბსტრატების ჟანგვისას, რომლებიც შეუქცევადად ან თითქმის შეუქცევადად აინჰიბირებენ ფერმენტს. სუბსტრატის

რეაქციისუნარიანი ჯგუფების აქტივაციას თან სდევს პროსთეტულ ჯგუფთან ან აპოფერმენტთან კოვალენტურად დაკავშირებული რეაქციისუნარიანი მეტაბოლიტების ფორმირება. სუბსტრატებს, რომლებიც ციტოქრომ P450-ის ასეთი გზით ინაქტივაციას იწვევენ, "გამანადგურებელი" სუბსტრატები ეწოდებათ (მაგ., ქლორამფენიკოლი უკავშირდება აპოფერმენტის ლიზინის ნაშთს; პარათიონი, ქლოროფორმი უკავშირდებიან ცისტეინს და ა.შ.). ისინი ფერმენტისადმი მაღალ სპეციფიკურობას ავლენენ.

ციტოქრომ P450-ის ინაქტივაციის მეორე მექანიზმი დაკავშირებულია კატალიზურ ციკლში ფერმენტის აქტიურ ცენტრზე ჟანგბადის აქტიური ფორმების ($O_2^{\bullet-}$-ის, $HO^{\bullet}$-ისა და H_2O_2-ის) გენერირებასთან. ეს შეიძლება არაშეუღლებული მონოოქსიგენაზური რეაქციების შედეგიც იყოს, როდესაც NADPH-ის აღმდგენელი ექვივალენტები არასრულად ხმარდება ენდოგენური თუ ეგზოგენური ნაერთების ჰიდროქსილირებას. სუპეროქსიდული ანიონის გენერირება ძირითადად ციტოქრომ P450-ის პრეროგატივაა, რადგან ამ პროცესში სხვა მიკროსომული გადამტანების წვლილი ძალიან მცირეა. ციტოქრომ P450 უპირატესად მის აქტიურ ცენტრზე ფორმირებული H_2O_2-ით ინაქტივირდება, მაშინ როდესაც $O_2^{\bullet-}$-ის დისმუტაციით მიღებული H_2O_2 ინაქტივაცის უმნიშვნელო ეფექტს იძლევა [6-14].

საერთოდ, სუბსტრატის ქიმიური ბუნებიდან გამომდინარე, ციტოქრომ P450-ის ინაქტივაცია სამი გზით შეიძლება განხორციელდეს [9]. ესენია: 1.აპოფერმენტთან მეტაბოლიტების შეუქცევადი დაკავშირება; 2. მეტაბოლიტების ჰემის რკინასთან თითქმის შეუქცევადი დაკავშირება; 3. ჰემის ალკილირება ან დესტრუქცია. პირველი და მესამე შეიძლება კომბინირებული იყოს. ჰემის მოდიფიკაცია მისი შემდგომი დაზიანებით, შექცევად ინაქტივაციას იწვევს, მაშინ როდესაც აპოფერმენტის მოდიფიკაცია შეუქცევადია [15, 16].

ამგვარად, "გამანადგურებელი" სუბსტრატების ჟანგვისას ციტოქრომ P450-ის ინაქტივაციას წარმოქმნილი რეაქციისუნარიანი ინტერმედიატები (ჟანგბადის ნაწილობრივ აღდგენილი ფორმები) ახდენენ, რომლებიც ჰემის ან აპოფერმენტის ქიმიურ მოდიფიკაციას ახორციელებენ. ინაქტივაცია უფრო ხშირად ჰემის დეგრადაციის შედეგია, ვიდრე აპოპროტეინის დესტრუქცია. აღნიშნულ გამოკვლევებში ციტოქრომ P450-ის P420-ად კონვერსია არ დარეგისტრირდა. ამასთან დაკავშირებით, არ შეიძლება გვერდი ავუაროთ იმ განსხვავებული მონაცემების განხილვას, რომლებიც არჩაკოვის [17] ლაბორატორიაშია მოპოვებული: დითიონიტით რედუცირებული იზოლირებული ციტოქრომ P450-ის იზოფორმა 2B4 სწრაფ ინაქტივაციას განიცდის აუტოოქსიდაციისას წარმოქმნილი ჟანგბადის აქტიური ტიპებით და ეს ინაქტივაცია არააქტიურ ციტოქრომ P420-ად კონვერსიაში გადასვლის ფონზე მიმდინარეობს. მიკროსომულ ან ლიპოსომაში ჩაშენებული ციტოქრომ P450 მეტად სტაბილურია ფერი- და ფერო-მდგომარეობებში [18]. აქედან გამომდინარე, გამოითქვა მოსაზრება, რომ ციტოქრომ P450-ის ინაქტივაციისათვის აუცილებელია თავისუფალ-რადიკალური საფეხური, ხოლო ციტოქრომ P420-ად კონვერსია მისი დეგრადაციის შუალედ საფეხურად შეიძლება ჩაითვალოს, რადგან იგი საკმაოდ არასტაბილურია და O_2-ის თანამყოფობისას ადვილად კარგავს ჰემს [19].

ოქსიდაზურ და ოქსიგენაზურ რეაქციებში ფორმირებული H_2O_2-ით ჰემის დაჟანგვა ან დაზიანება "გასაღების" როლს ასრულებს ციტოქრომ P450-ის ინაქტივაციაში. მრავალი ფერმენტი ოქსიდაზური სისტემებით განიცდის ინაქტივაციას. მათ შორისაა თვით ციტოქრომ P450, NAD(P)H-ოქსიდაზები, ქსანტინოქსიდაზა და არაფერმენტული სისტემები, რომლებიც შეიცავენ ასკორბატს, O_2-ს და Fe(III)-ს ან Fe(II)-ს [20-22]. საკმაოდ დეტალურადაა შესწავლილი ბაქტერიული გლუტამინსინთეტაზას ჟანგვითი ინაქტივაციის მექანიზმი [23]. ნაჩვენებია, რომ ინაქტივაცია დამოკიდებულია O_2-ისა და NAD(P)H-ის თანამყოფობაზე: სტიმულირებას განიცდის Fe(III)-ით და ინჰიბირდება კატალაზით, Mn(II)-ით ან EDTA-ით. სისტემებისათვის, რომლებიც არაჰემური რკინის ცილას (ფერედოქსინს, პუტიდარედოქსინს) შეიცავენ, ინაქტივაცია ინჰიბირდება დიმეთილსულფოქსიდისა და მანიტოლის ტიპის რადიკალებით. დადგენილია, რომ ამ ფერმენტის ჟანგვითი მოდიფიკაცია ასოცირებულია ერთ სუბერთეულზე ჰისტიდინის ერთი ნაშთის დაკარგვასთან და კარბონილის ჯგუფის გაჩენასთან.

ფერმენტის შემდგომი ჟანგვა მეორე ჰისტიდინის დაზიანებას იწვევს, მაგრამ ინაქტივაცია არ ეხება მეთიონინის ან SH-ჯგუფების დაჟანგვას.

რეაქციისუნარიანობის მხრივ ჟანგბადის აქტივაციის პროდუქტები ერთმანეთისაგან განსხვავდება. თავისთავად H_2O_2 და $O_2^{\bullet-}$ არ არიან ძლიერი დამჟანგველები. $O_2^{\bullet-}$-ს დაბალი რედოქს-პოტენციალი გააჩნია, ხოლო H_2O_2 შედარებით სტაბილურია. ამდენად საფიქრებელია, რომ მაკრომოლეკულებს ისინი ეფექტურად პირდაპირ ვერ უტევენ. ამავე დროს ცნობილია $O_2^{\bullet-}$-ის ინაქტივაციური უნარი ისეთ ფერმენტებთან ურთიერთქმედებისას, როგორიცაა კატალაზა, პეროქსიდაზა, ტრანსფერაზა, ლაქტატდეჰიდროგენაზა და სხვ. აშკარაა აგრეთვე მაკრომოლეკულებზე $O_2^{\bullet-}$-ის პირდაპირი დესტრუქციული მოქმედება. ამიტომ საფიქრებელია, რომ ინაქტივაციის პროცესში ძირითად დამჟანგველს $HO^{\bullet}$-რადიკალი წარმოადგენს, რომელიც H_2O_2-დან ჰაბერ-ვეისისა და ფენტონის რეაქციის შედეგად მიიღება:

$$Fe^{3+} + O_2 \longrightarrow Fe^{2+} + O_2$$

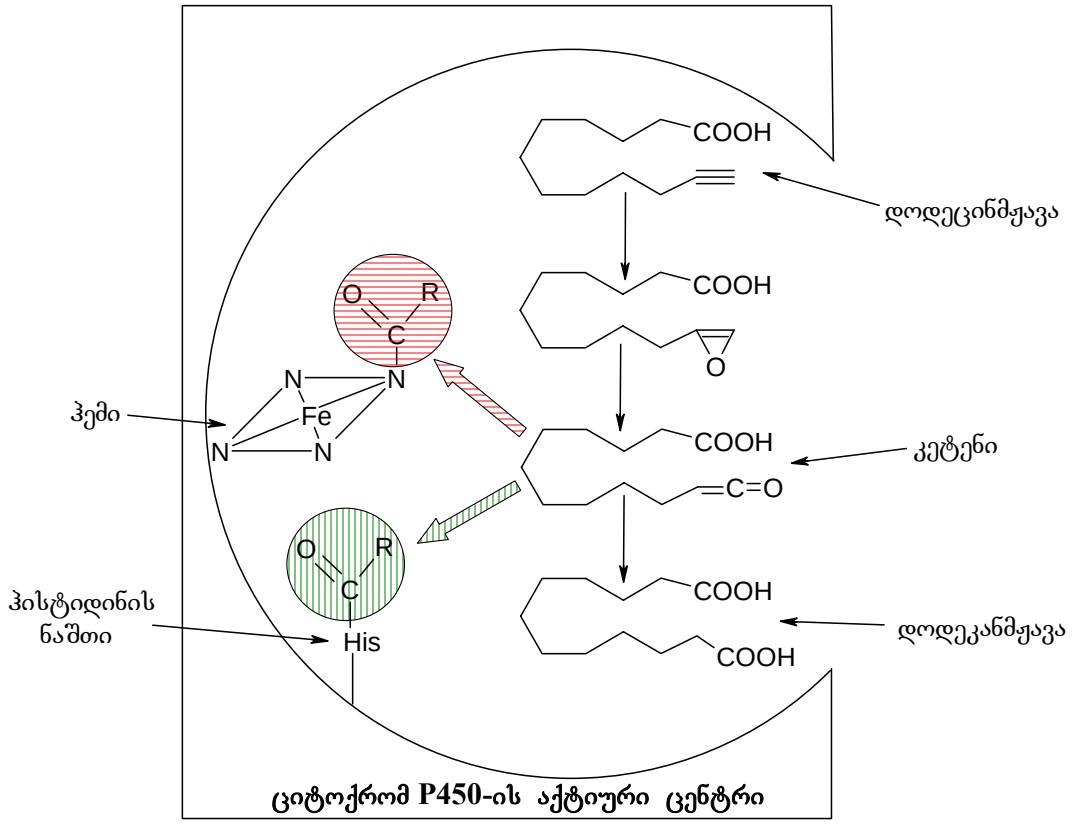
$$Fe^{2+} + H_2O_2 \longrightarrow Fe^{3+} + HO^{\bullet} + OH^{-}$$

ჯამურად: $H_2O_2 + O_2^{\bullet-} \longrightarrow O_2 + HO^{\bullet} + OH^{-}$

ჰიდროქსილ-რადიკალებმა, რომელთაც მეტად ხანმოკლე სიცოცხლისუნარიანობა აქვთ, შეიძლება იმოქმედონ, როგორც ძლიერმა დამჟანგველებმა უშუალოდ მათი გენერირების ადგილზე, მაშინ როდესაც H_2O_2 და $O_2^{\bullet-}$ ფორმირების ადგილიდან დიფუზიის გზით დიდ მანძილზე გადაადგილდებიან. H_2O_2-მა შეიძლება გაიაროს უჯრედულ და შიდაუჯრედულ მემბრანულ ბარიერში, ხოლო $O_2^{\bullet-}$ დიფუზიას მხოლოდ სპეციფიკური ანიონგამტარი არხების გავლით ახერხებს. სუპეროქსიდ-ანიონი მეტად რეაქციისუნარიანი ხდება ჰიდროფობულ ან მეტალთან კოორდინირებულ უბნებში. მისი თანამყოფობისას ჰიდროქსილის რადიკალები ცილების ფრაგმენტაციას იწვევენ. O_2-ს შეუძლია $HO^{\bullet}$-დამოკიდებული ჟანგვის პირველად პროდუქტებთან ურთიერთქმედება, რაც მაკრომოლეკულების დესტრუქციას იწვევს [24].

ციტოქრომ P450-ის ინაქტივაციას საგრძნობლად ამცირებენ ფოსფოლიპიდები და მათი ეს ეფექტი დამოკიდებული არაა მემბრანებში ფოსფოლიპიდების შემადგენლობაზე. ინაქტივაცია სუსტდება ანაერობულ პირობებში და ასევე ნახშირბადის მონოოქსიდის ან ციტოქრომ b_5-ის თანამყოფობისას [25].

ჰემის ალკილირებით გამოწვეული ინაქტივაციის ერთ-ერთი თვალსაჩინო მაგალითია ბოცვრის ღვიძლის მიკროსომებში დოდეცინმჟავას ციტოქრომ P450-დამოკიდებული ჟანგვა. ამ დროს წარმოქმნილი აქტიური ინტერმედიატი — კეტენი ჰემის აცილირებას იწვევს, რაც ციტოქრომ P450-ის ინაქტივაციის მიზეზი ხდება [26]. ამასთან დაკავშირებით უაღრესად საყურადღებო შედეგები მიიღეს ჰელვიგმა და თანაავტ. [27, 28], როდესაც მათ ანალოგიური გამოკვლევები ჩაატარეს ცერცვიდან მიღებულ ციტოქრომ P450-ზე და დაადგინეს, რომ ცხოველურისაგან განსხვავებით, მცენარეში ინაქტივაციის მთავარი მიზეზი ფერმენტის აქტიურ ცენტრში ჰემთან ახლოს მყოფი ერთ-ერთი ამინომჟავას (სავარაუდოდ, ცისტეინის ან ჰისტიდინის) ნუკლეოფილური ნაშთის აცილირებაა (ნახ. 2).



ნახ. 2. ციტოქრომ P450-ის ინაქტივაციის სავარაუდო სქემა ჰელვიგის და თანაავტ. [28] მიხედვით. ვერტიკალური შტრიხით ნაჩვენებია მცენარეული ციტოქრომ P450-ის ქიმიური მოდიფიკაციის შედეგად ამინომჟავას ნაშთთან წარმოქმნილი აცილის ჯგუფი, ხოლო ჰორიზონტალური შტრიხით — ცხოველური ციტოქრომ P450-ის ჰემთან წარმოქმნილი აცილის ჯგუფი.

ამგვარად, ცხოველური და მცენარეული ციტოქრომ P450-ის დოდეცინმჟავათი თვითინაქტივაციის პროცესში ერთი არსებითი განსხვავება ვლინდება: ცხოველურ ჰემოპროტეინში ქიმიურ მოდიფიკაციას ჰემი განიცდის, ხოლო მცენარეულში აპოფერმენტი. ცხოველურ ციტოქრომ P450-ში ჰემი ამდროს სრულად იშლება, ფერმენტი მწყობრიდან გამოდის და ამის შედეგად კარგავს თავის კატალიზურ აქტივობას. სხვა ვითარებაა გამოვლენილი მცენარეულ ციტოქრომ P450-ის შემთხვევაში. ჩვენს ლაბორატორიაში [29] ჩატარებულმა კვლევებმა დამაჯერებლად გვიჩვენეს, რომ ჰემოპროტეინი ინაქტივაციას განიცდის როგორც მონოოქსიგენაზა, მაგრამ იმავდროულად მაღალ პეროქსიდაზულ აქტივობას ამჟღავნებს. სხვაგვარად რომ ითქვას, გარკვეულ პირობებში ქიმიური მოდიფიკაციის შედეგად მონოოქსიგენაზას აქტიური ცენტრი პეროქსიდაზას აქტიური ცენტრის ანალოგად ტრანსფორმირდება. გამოვლენილ ეფექტს ადგილი აქვს როგორც მიკროსომულ ფრაქციაში (*in vitro* პირობებში), ასევე მთლიან მცენარეულ ქსოვილში (*in vivo* პირობებში).

2. პეროქსიდაზები და ციტოქრომ P450-ის

პეროქსიდაზული რეაქციები

კატალიზურ რეაქციებში მნიშვნელოვანი როლი პეროქსიდაზას ხუთ ჟანგვა-აღდგენით მდგომარეობას ეკუთვნის. ესენია აღდგენილი (Fe^{+2} ანუ მარტივად, მდგომარეობა 2), დაჟანგული (Fe^{+3} ანუ 3), I კომპლექსი (Fe^{+5} ანუ 5), II კომპლექსი (Fe^{+4} ანუ 4) დაბოლოს, მდგომარეობა Fe^{+6} (ოქსიპეროქსიდაზაში), რომელიც აღდგენილი ფერმენტის მოლეკულურ ჟანგბადთან ურთიერთქმედებით მიიღება [30]. ჩვენთვის საყურადღებოა I და II კომპლექსები.

I კომპლექსი (მწვანე ფერის) ხასიათდება შთანთქმის მაქსიმუმებით 407- და 658 ნმ-ებზე. ჯორჯის ჰიპოთეზის [31] თანახმად წყალბადის ზეჟანგთან ფერმენტის ურთიერთქმედებისას ჰემის რკინა +3-დან დაჟანგულობის ძლიერ მაღალ (+5) მდგომარეობაში გადადის და ამის შედეგად ოქსო-იონები FeO^{3+} (ოქსენოიდის ანალოგი) წარმოიქმნება.

I კომპლექსის წარმოქმნის კინეტიკა საფუძვლიანადაა შესწავლილი ჩანსის [32] კლასიკური გამოკვლევებით. მის მიერ პეროქსიდაზისა და H_2O_2-ის ურთიერთქმედება შემდეგი მარტივი რეაქციით შეიძლება გამოისახოს:

$$\left[FeOH_2\right]^{3+} + H_2O_2 \xrightleftharpoons{K_{3.5}} \left[FeO\right]^{3+} + 2H_2O \qquad (1)$$

ამ შემთხვევაში ფერმენტის პორფირინი და მეხუთე აქსიალური ლიგანდი სიბრტყის ქვევით იმყოფებიან, ხოლო რეაქციის სიჩქარის კონსტანტა (K_3) ბიმოლეკულურ პირდაპირ რეაქციას და პეროქსიდაზას ჟანგვის მდგომარეობის +3-დან +5-მდე ცვლილებას ახასიათებს. ეს რეაქცია სინამდვილეში არც ისე მარტივია, როგორც ზევითაა გამოსახული: პროცესის მალიმიტირებელ სტადიას წინ უსწრებს წონასწორობის დამყარება, ხოლო თვით პროცესი შეიძლება მრავალი სტადიისაგან შედგებოდეს.

H_2O_2-თან ან სხვა დამჟანგველებთან პეროქსიდაზას ურთიერთქმედების სიჩქარე pH-ზე პრაქტიკულად არაა დამოკიდებული. კატალაზასთან ძმარმჟავას ზეჟანგის ურთიერთქმედების შესწავლამ აჩვენა, რომ მჟავას არადისოცირებული ფორმა ფერმენტთან გაცილებით სწრაფად რეაგირებს, ვიდრე მისი ანიონი. პეროქსიდაზასთან H_2O_2-ის რეაქციისას არ შეიძლება გამოირიცხოს HO_2^--ის უპირატესი მონაწილეობა, რამდენადაც ეს ანიონი უფრო ძლიერი ლიგანდია.

I კომპლექსის ელექტრონული სტრუქტურა დიდი ხნის განმავლობაში დისკუსიის საგანს წარმოადგენდა, ვიდრე მესბაუერის სპექტროსკოპულმა გამოკვლევებმა I და II კომპლექსებში რკინის იონის მდგომარეობის ანალოგია არ დაადასტურეს. ამ მონაცემების თანახმად, Fe^{+5}-ის ფორმალური მდგომარეობიდან განსხვავებით, I კომპლექსში Fe^{+4} მდგომარეობა რეალიზდება, რადგან რკინის იონი ერთ ელექტრონს ჰემის პორფირინის ბირთვიდან იღებს, რომელიც I კომპლექსში კატიონ-რადიკალის (PO^+) სახით იმყოფება. დოლფინმა [33] აჩვენა, რომ პეროქსიდაზისა და კატალაზას I კომპლექსების შთანთქმის სპექტრები მთელი რიგი მეტალპორფირინული კომპლექსების π-კატიონ-რადიკალების სპექტრების ანალოგიურია, ანუ ჟანგვის მაღალი ხარისხის მდგომარეობაში მყოფი რკინის არსებობა შეიძლება აიხსნას პორფირინის ბირთვის და რკინის ატომზე ლოკალიზებულ ელექტრონების სპინური ურთიერთქმედებით. ამგვარად, პეროქსიდაზას I კომპლექსში ერთი მჟანგველი ექვივალენტი რკინის იონზეა ლოკალიზებული, ხოლო მეორე — ჰემოპროტეინის პორფირინის ბირთვზე. საყურადღებოა, რომ ციტოქრომ c-პეროქსიდაზაში ერთი მჟანგველი ექვივალენტი ფერმენტის აქტიური ცენტრის ერთ-ერთ ამინომჟავურ ნაშთზეა ლოკალიზებული და არა პორფირინულ ბირთვზე, როგორც პეროქსიდაზაშია.

II კომპლექსი, ანუ მდგომარეობა 4 (წითელი ფერის) ხასიათდება შთანთქმის მაქსიმუმებით 417, 530 და 561 ნმ-ებზე. იგი მიიღება H_2O_2-თან პეროქსიდაზას ურთიერთქმედებისას სხვადასხვა აღმდგენლების (არომატული ამინების, ფენოლების, ასკორბატის, ფეროციტოქრომ c-ს,

ფეროციანიდის, იოდიდის, ნიტრიტისა და სხვ.) თანამყოფობისას. ორ უკანასკნელ აღმდგენელთან რეაქციას თან ახლავს პროტონის მოხმარება. ვარაუდობენ, რომ II კომპლექსს ფერილ-იონის (FeO^{2+}) სტრუქტურა გააჩნია და +4 ჟანგვის ხარისხის რკინის (II) იონს შეიცავს. ამას ადასტურებს მესბაუერის სპექტრებიც. II კომპლექსი რადიკალური მექანიზმით რეაგირებს აღმდგენელთა მოლეკულებთან და საწყის ფერმენტს Fe^{+3} ჟანგვის ხარისხით უბრუნდება. II კომპლექსის წარმოქმნისა და მოხმარების ზოგიერთ კანონზომიერებას გამოსახავს მე-2 და მე-3 გარდაქმნები:

$$[FeO]^{3+} + AH_2 \longrightarrow [FeO]^{2+} + H_2O + AH^{\bullet} \qquad (2)$$

I კომპლექსი II კომპლექსი

$$[FeO]^{2+} + AH_2 \longrightarrow Fe^{3+} + H_2O + AH^{\bullet} \qquad (3)$$

ზოგიერთი მკვლევარი პეროქსიდაზებისა და სხვა ჰემოპროტეინების ჰემური რკინის მაღალ დაჟანგულ მდგომარეობის არსებობას უნდობლობით ეკიდება, თუმცა რკინის იონისათვის ასეთი მდგომარეობები არაორგანულ ქიმიაში საკმაოდ კარგადაა ცნობილი [34]. FeO^{2+} და FeO^{3+} იონები არსებობენ მჟავა ხსნარებში და შესაბამის კატიონებს, ხოლო ტუტე ხსნარებში შესაბამის ჰიდროქსიდებს წარმოქმნიან. პერფერიტიონი (FeO_3^{2-}) და ფერატიონი (FeO_4^{2-}) რკინის +4 და +6 მდგომარეობებით ხასიათდებიან და არსებობენ ტუტე არეში, მაშინ როდესაც მჟავა არეში ისინი სწრაფად იშლებიან ჟანგბადის გამოყოფით. პეროქსიდაზებში რკინის მაღალი ვალენტური მდგომარეობის სტაბილიზაციაში დიდ როლს ასრულებენ მისი ლიგანდური გარემოცვა და აქტიური ცენტრის ამინომჟავური ნაშთები. ასე მაგალითად, პირშუშხას პეროქსიდაზას II კომპლექსში Fe^{+4} მდგომარეობა შემდეგნაირადაა სტაბილიზებული: ერთი მჟანგველი ექვივალენტი რკინის ატომზე, ხოლო მეორე პორფირინის ბირთვზეა ლოკალიზებული, რომელიც π-კატიონ-რადიკალის სახით არსებობს. ნაჩვენებია ასეთი რადიკალის წარმოქმნა პირშუშხას ციტ-პეროქსიდაზაში [35]. მისი დაჟანგვისას K_2IrCl_6-ით, ერთი ექვივალენტით ღარიბი პეროქსიდაზა მიიღება, რომლის შთანთქმის სპექტრი პეროქსიდაზების I კომპლექსის მსგავსია, ხოლო **ეპრ**-სიგნალი 2g-ფაქტორით ხასიათდება. დაჟანგული ციტ-პეროქსიდაზა შეიძლება ხელახლა აღდგეს საწყის მდგომარეობამდე K_3IrCl_6-ით. რკინის მაღალვალენტური მდგომარეობის სტაბილიზაციაში არსებითი როლი შეიძლება შეასრულოს ფერმენტის აქტიურმა ცენტრმა. მაგ., ციტოქრომ c-პეროქსიდაზას I კომპლექსი სტაბილიზებულია ფერმენტის აქტიური ცენტრის ამინომჟავების ნაშთების თავისუფალი რადიკალებით. I კომპლექსის წარმოქმნასა და სტაბილიზაციაში, სულ ცოტა, ციტოქრომ c-პეროქსიდაზას აქტიური ცენტრის ოთხი ამინომჟავური ნაშთი მაინც მონაწილეობს: დისტალური ჰისტიდინი-52, არგინინი-48, პროქსიმალური ჰისტიდინი-174 და დისტალური ტრიფტოფანი-51.

არსებობს მონაცემები იმის შესახებ, რომ ფერმენტის შუალედი ფორმების (I და II კომპლექსების) სუბსტრატებთან ურთიერთქმედების დროს ადგილი აქვს პეროქსიდაზას, წყალ-ბადის ზეჟანგსა და სუბსტრატს შორის სამმაგი კომპლექსის წარმოქმნას [36], ციტოქრომ P450-ის კატალიზური ციკლის მსგავსად.

მკვლევართა რამდენიმე ჯგუფმა [37-44] მიიღო ოქსენოიდის ანუ I და II კომპლექსების ანალოგები, რომლებსაც არამარტო ფერმენტთა შუალედური კომპლექსების სტრუქტურის იმიტაცია, არამედ მათთვის დამახასიათებელ რეაქციებში მონაწილეობაც შეუძლიათ.

მიღებულია ციტოქრომ P450-ის, პეროქსიდაზისა და კატალაზას II კომპლექსის სტრუქტურული და ფუნქციური ანალოგები [41-44]. ზოგიერთი რკინის (III) პორფირინების ორბირთვული ზეჟანგური კომპლექსები N-მეთილიმიდაზოლის, პირიდინის ან პიპერიდინის მოქმედებისას $[PFe^{IV}=O]^{2+}$-ტიპის ნაერთებად გარდაიქმნება [42-44]. ამ შემთხვევაში ორი შესაძლო რეაქცია მიმდინარეობს:

$$2PFe^{III}–OO–Fe^{III}P \rightarrow 2PFe^{III}–O–Fe^{III}P + O_2 \quad (4)$$

$$2PFe^{III}–OO–Fe^{III}P + 2B \rightarrow 2[BPFe^{IV}=O] \quad (5)$$

სადაც, B-პირიდინი, პიპერიდინი ან N-მეთილიმიდაზოლია.

$[BPFe^{IV}=O]$-ში რკინის იონის მდგომარეობა I და II კომპლექსებში მისი მდგომარეობის ანალოგიურია (ცხრილი 2).

ცხრილი 2.

ციტოქრომ P450-ისა და მისი კომპლექსების სტრუქტურული მოდელები

მოდელური სისტემა	**მოდელის დახასიათება**
$OEP–Fe^{III}Cl$ + 2-იოდოზო-მეტა-ქსილოლი	ოქსენოიდის, ანუ ციტოქრომ P450-ის კომპლექს I-ის, კატალაზისა და პეროქსიდაზას მოდელი: $[Fe^{V}=O]^{3+}$
PFe–OO–FeP + N-მეთილ-იმიდაზოლი $[PFe^{IV}=O]$	ციტოქრომ P450-ის კომპლექს II-ის, კატალაზისა და პეროქსიდაზას მოდელი: $[Fe^{IV}=O]^{2+}$

სადაც OEP — 2,3,7,8,12,13,17,18-ოქტაეთილპორფირინის დიანიონია.

1972 წელს ო'ბრაიენის [45] ლაბორატორიაში პირველად იქნა ნაჩვენები, რომ ციტოქრომ P450-ს პეროქსიდაზას თვისებები გააჩნია. ფერმენტი სტეროლების ჰიდროზეჟანგების სპირტებად აღდგენას აკატალიზებს წყალბადის ისეთი დონორის თანამყოფობისას, როგორიც N,N,N,N'-ტეტრამეთილ-*p*-ფენილენ-დიამინია (TMPD). ამ შემთხვევაში პეროქსიდაზულ აქტივობაზე გავლენას არ ახდენენ CO, აზოტი, EDTA და 2-ფენილ-2-პროპანოლი. მხოლოდ მცირე მაინჰიბირებელ (20%-ით) მოქმედებას ავლენდა ნატრიუმის აზიდი. მიკროსომების 80°C-მდე გაცხელებით პეროქსიდაზული აქტივობა 95%-ით ქვეითდებოდა.

ღვიძლის მიკროსომების პეროქსიდაზულ რეაქციებზე დამთრგუნველ მოქმედებას ამჟღავნებენ მიკროსომული რედოქს-ჯაჭვის სუბსტრატები, კერძოდ, I ტიპის სუბსტრატები: ანდროსტენდიონი, ტესტოსტერონი, 17β-ესტრადიოლი, ამინოპირინი, ჰექსობარბიტალი და ლინოლის მჟავა. მათ მიერ გამოწვეული ინჰიბირება 65-34%-ს აღწევს, მაშინ როდესაც II ტიპის სუბსტრატები — ანილინი, იმიდაზოლი, პირიდინი, კორტიკოსტეროლი და n-ოქტილამინი პეროქსიდაზულ აქტივობას 83-50%-ით აქვეითებენ. აღმოჩნდა აგრეთვე, რომ **სხვა ჰემშემცველი ნაერთებისაგან (ჰემატინი, მეტჰემოგლობინი, ციტოქრომი c, ციტოქრომ P420) განსხვავებით ყველაზე მაღალი პეროქსიდაზული აქტივობა ციტოქრომ P450-ს გააჩნია.**

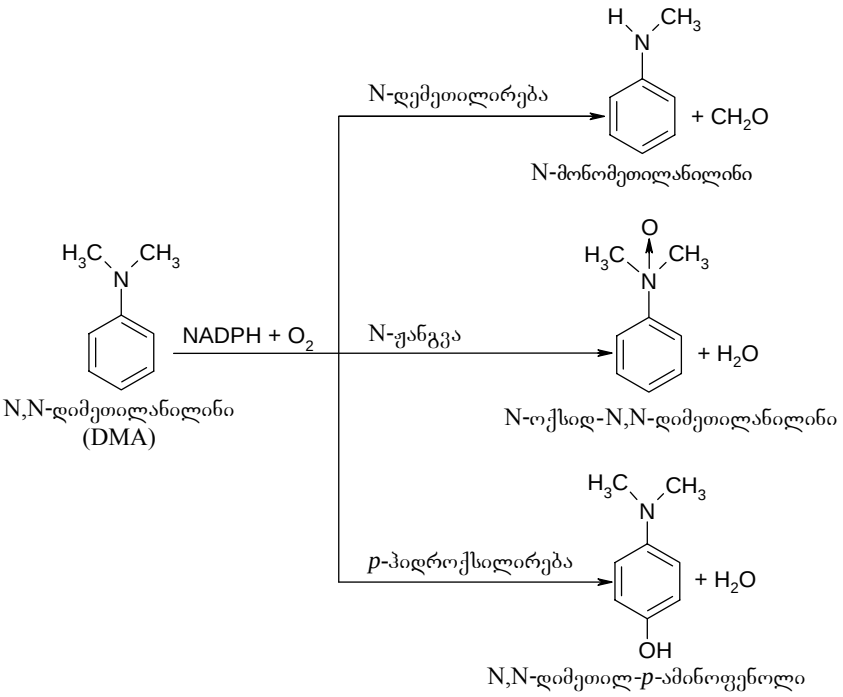
ციტოქრომ P450-ის პეროქსიდაზულ რეაქციებში წყალბადის დონორებად შეიძლება გამოყენებულ იქნას NADH ან NADPH [46]. ექსპერიმენტულ მონაცემთა ერთობლიობა [45, 46] იმაზე მიუთითებს, რომ პეროქსიდაზულ აქტივობას ციტოქრომ P450-ის დაჟანგული ფორმა ფლობს. ამ აქტივობას CO იმიტომ არ აინჰიბირებს, რომ იგი კომპლექსირებას მხოლოდ ჰემოპროტეინის აღდგენილ ფორმასთან განიცდის. გამოთქმულია მოსაზრება, რომ ჰიდროზეჟანგებთან ციტოქრომ P450-ის ურთიერთქმედებისას წარმოიქმნება პეროქსიდაზას I კომპლექსის ანალოგიური ფორმა [47], რომელშიც ჰემური რკინა შეიძლება ჟანგვის მაღალ ხარისხში იმყოფებოდეს:

(6)

ცნობილია, რომ პირველადი ალიფატური სპირტები პეროქსიდაზას სუბსტრატებს არ წარმოადგენენ [48]. მიუხედავად ამისა, ვირთხის ღვიძლის მიკროსომები და მაღალი სისუფთავის ციტოქრომ P450 აკატალიზებს სპირტების ალდეჰიდებამდე ჟანგვის რეაქციებს [49]. კუმილის ჰიდროზეჟანგით და ციტოქრომ P450-ის ან კატალაზას მონაწილეობით სპირტების დაჟანგვის უნარი ალიფატური რადიკალის ზომის ზრდის მიხედვით მცირდება. ციტოქრომ P450 განსაკუთრებით ეფექტურ კატალიზატორს წარმოადგენს კუმილის ჰიდროზეჟანგით ეთანოლის დაჟანგვაში, მაშინ როდესაც ციტოქრომ c, ჰემოგლობინი და პეროქსიდაზა სპირტის ჟანგვას პრაქტიკულად არ ახორციელებენ. ფენობარბიტალით მიკროსომების ინდუქცია 5-ჯერ ზრდის კუმილის ჰიდროზეჟანგით ეთანოლის ჟანგვას [50].

არასასურველი დამატებითი პროცესი, რომელიც თან ახლავს მრავალი სუბსტრატის ჰიდროზეჟანგურ ჟანგვას, თვით ამ ნაერთების მხრიდან ციტოქრომ P450-ის დესტრუქციაა [51, 52]. კუმილისა და მესამეული ბუთილის ჰიდროზეჟანგები არამარტო ციტოქრომ P450-ს, არამედ მიკროსომულ ჯაჭვში ელექტრონთა ტრანსპორტის მნიშვნელოვან კომპონენტს — ციტოქრომ b_5-საც შლიან [52].

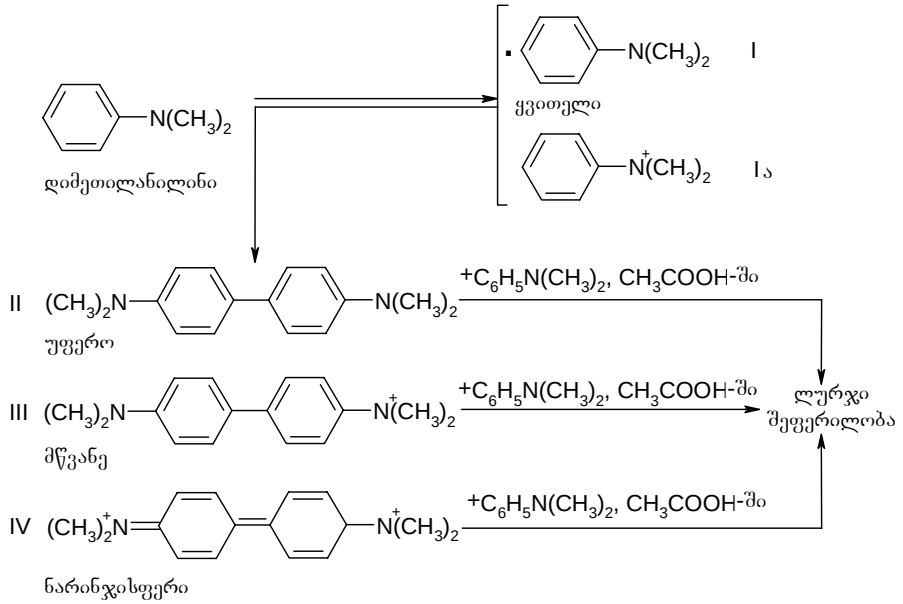
არჩაკოვისა და მისი თანაშრ. მიერ [53, 54] ჩატარებულ იქნა გამოკვლევა, რომელიც მიზნად ისახავდა მიკროსომული ჟანგვის ტიპიური სუბსტრატის — N,N-დიმეთილანილინის (DMA-ს) მონოოქსიგენაზური მექანიზმით ჟანგვის შესწავლას, ანუ DMA-სთან კომპლექსში ციტოქრომ P450-ით სტიმულირებული აღდგენის გავლენის დადგენას ამ სუბსტრატის N-დემეთილირების, *p*-ჰიდროქსილირებისა და N-ჟანგვის რეაქციათა სიჩქარეებზე. NADPH-ციტოქრომ P450-რედუქტაზული რეაქციის მასტიმულირებელ ფაქტორად გამოიყენებოდა Mg^{2+}-ის იონები [55, 56]. ასეთი მიდგომა საკმაოდ ორიგინალური იყო ჰიდროქსილირების მექანიზმში კომპლექსის აღდგენის რეაქციის როლის სრულად გამოსავლენად: ჰიდროქსილირების ჯაჭვში რედუქტაზული რეაქცია თუ მართლაც მალიმიტირებელია, მაშინ Mg^{2+}-ის დახმარებით მისი სიჩქარის გაზრდას ერთი სუბსტრატის ჟანგვის სამივე ტიპის რეაქციის სტიმულირება უნდა მოეხდინა. ამ შემთხვევაში სუბსტრატად DMA-ს გამოყენება ამის სრულ საშუალებას იძლევა. მისი გარდაქმნის შესაძლო გზები მოცემულია სქემა 1-ზე:



სქემა 1. დიმეთილანილინის ჟანგვის გზები ღვიძლის მიკროსომებში.

Mg^{2+}-ის სხვადასხვა კონცენტრაციების მოქმედების შესწავლამ DMA-ს N-დემეთილირებასა და *p*-ჰიდროქსილირებაზე განსხვავებული მასტიმულირებელი ეფექტები გამოავლინა. აქტივაციის კოეფიციენტები შესაბამისად 1.5 და 2.2-ს შეადგენდა. N-დემეთილირების მაქსიმალური სტიმულაცია მიიღწეოდა 15 მმოლი $MgCl_2$-ის თანამყოფობისას. *p*-ჰიდროქსილირებისათვის აუცილებელი აღმოჩნდა Mg^{2+}-ის უფრო მაღალი კონცენტრაციები. რაც შეეხება DMA-ს N-ჟანგვას, მასზე ამ მეტალის გამააქტიურებელი მოქმედება არ გამოვლინდა და ამ შედეგს ავტორებმა ორგვარი ახსნა მისცეს: დემეთილირება და ჰიდროქსილირება ან NADPH-სპეციფიკური ფლავოპროტეინის მეშვეობით არ ხორციელდება, ან N-ჟანგვაში სხვა, Mg^{2+}-ისადმი არამგრძნობიარე ფლავოპროტეინი მონაწილეობს [53].

DMA-ს პეროქსიდაზული გზით ჟანგვის პროცესი საუნდერსისა და ნეილორის [47, 57] მიერაა შესწავლილი. ამ ავტორებს დეტალურად აქვთ განხილული ცდის მსვლელობა და ჩვენც აქ უცვლელად მოგვაქვს მისი აღწერა (სქემა 2).



სქემა 2. დიმეთილანილინის პეროქსიდაზული მექანიზმით ჟანგვა [47, 57].

ძმარმჟავაში (pH 4.5) განზავებულ DMA-ს ხსნარს ემატებოდა ფერმენტი და H_2O_2. სარეაქციო არე ჯერ ყვითლდებოდა (I სტადია), მაგრამ მალე შეფერილობა მუქ მწვანეში გადადიოდა (II სტადია). წარმოიქმნებოდა ცისფერი ნალექი, ხოლო ხსნარი მწვანედან მეწამულ-ლურჯ შეფერილობას იღებდა. მწვანე ხსნარს თუ ჭარბად დაემატებოდა წყალბადის ზეჟანგი და პეროქსიდაზა, ჩნდებოდა ჟოლოსფერი, რომელიც სწრაფად ბრუნდებოდა მწვანე ფერში (III სტადია).

ჟანგვის დამთავრების შემდეგ ნალექი იფილტრებოდა და ცალკეული კომპონენტები ქრომატოგრაფიით ცალკევდებოდა. კვალის სახით ბევრი შეფერილი ნივთიერება გამოვლინდა, ხოლო ძირითად პროდუქტს TMPD წარმოადგენდა (გავიხსენოთ, რომ ეს ნივთიერება, სტეროლების პეროქსიდაზული მექანიზმით ჟანგვაში წყალბადის დონორის როლს ასრულებს [52]).

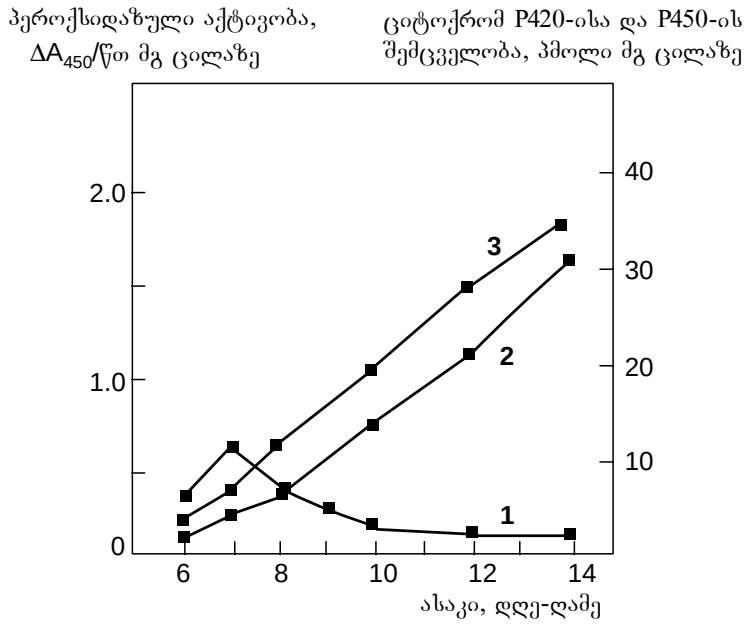
სქემაში მოყვანილი II ნაერთის წარმოსაქმნელად, რომელიც DMA-ს *p*-მდგომარეობიდან წყალბადის მოცილების შედეგად მიიღება, აღნიშნულმა მკვლევარებმა ორი ალტერნატული მექანიზმი წარმოადგინეს: მათგან უმარტივესის თანახმად, თავდაპირველად გენერირდება I

ნაერთის თავისუფალი რადიკალები, რომლებიც ტეტრამეთილბენზიდინს (II-ს) წარმოქმნიან. მეორე მექანიზმი გულისხმობს, რომ რეაქციის პირველ სტადიას წარმოადგენს დიმეთილანილინიდან ელექტრონის მოგლეჯა და იონ-რადიკალის (I-ის) წარმოქმნა. ასეთ ნაწილაკებს პროტონთა ელიმინირებით შეუძლიათ გაორმაგება და H-ის მოცილება. როგორც არ უნდა იყოს, სწრაფად ქრობადი ყვითელი შეფერილობა (I სტადია) შესაძლოა ლაბილური რადიკალური ნაწილაკების (I-ისა და II-ის) თანამყოფობით იყოს განპირობებული.

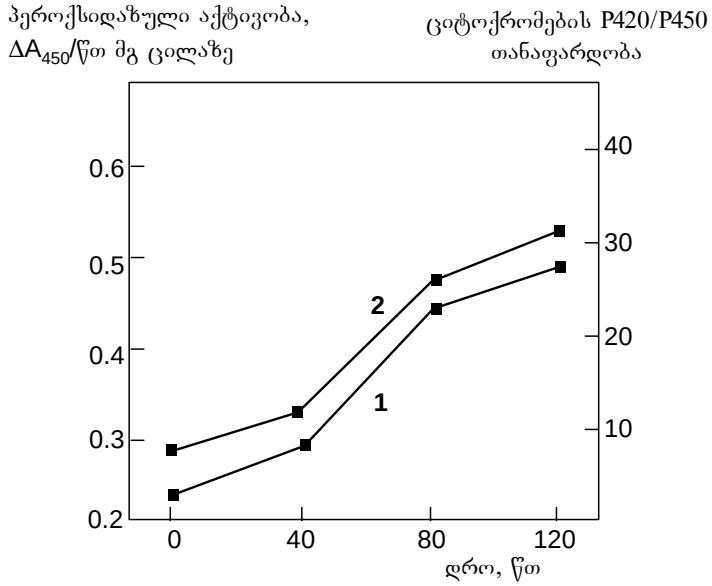
წარმოქმნილი TMPD-ს ნაწილი ნალექად გამოყოფას ასწრებს, მაშინ, როდესაც დარჩენილი ნაწილი შემდგომ ჟანგვას განიცდის. მართლაც, განზავებულ ძმარმჟავაში ამ ნაერთის პეროქსიდაზული ჟანგვის სუბსტრატად გამოყენებისას, პირველდაწყებითი მომწვანო-ყვითელი შეფერილობა მუქ მწვანე შეფერილობაში გადადიოდა. შემდგომი ჟანგვით ხსნარი ნარინჯისფერ შეფერილობას იღებდა. ამგვარად, შეინიშნებოდა იგივე შეფერილობები, როგორსაც ადგილი ჰქონდა DMA-ს ჟანგვისას II და III სტადიებზე.

ხსნარის მწვანე ფერი განპირობებულია III კატიონ-რადიკალის თანამყოფობით, რომელიც TMPD-დან ელექტრონის მოწყვეტისას წარმოიქმნება. შემდგომი ჟანგვისას კიდევ ერთი ელექტრონი იხარჯება, რის შედეგადაც IV-ის ქინოიდური სტრუქტურა მიიღება. მასზე გადასვლა დაკავშირებულია რეზონანსის შესაძლებლობათა შემცირებასთან და ამიტომ თან უნდა სდევდეს ფერის ინტენსიურ მატებას. ვარაუდობებ, რომ IV სტადიაზე ნარინჯისფერი შეფერილობა განპირობებულია IV-ის დიკატიონით, რომელიც შუალედი ნაერთის როლს თამაშობს მცირე რაოდენობის შეფერილ ნივთიერებათა წარმოქმნაში და რომლებიც თავისთავად მუხტის გადამტან კომპლექსებს წარმოადგენენ. საყურადღებოა ერთი ფაქტი: DMA-ს არც მონოოქსიგენაზურ და არც პეროქსიდაზულ ჟანგვით გარაქმნებში ოქსიდაზური სისტემების Mg^{2+}-ით გააქტივების შემთხვევაშიც კი არ ფიგურირებს ამ სუბსტრატის N-ჟანგვის შემდეგ N-ოქსიდის წარმოქმნა. როგორც ზევით აღინიშნა, N-ჟანგვაში მონაწილე ფლავოპროტეინი არამგრძნობიარეა მაგნიუმის იონების მიმართ [58].

ჩვენს მიერ [29, 59-62] დადგენილია, რომ პრაქტიკულად ყველა ის ჟანგვითი პროცესი, რომელიც მიკროსომებში მიმდინარეობს, მეტ-ნაკლები ხარისხით ციტოქრომი P450-ის არააქტიურ ციტოქრომ P420-ად შეუქცევად კონვერსიას იწვევს. სიმინდის 7-დღიანი აღმონაცენების ფესვებში მიკროსომების ციტოქრომული კომპონენტების შემადგენლობის შესწავლამ აჩვენა, რომ მასში ძირითადად ციტოქრომი P450 დომინირებს. მიკროსომების "ასაკში შესვლასთან" (7-9 დღიანი) დაკავშირებით შეინიშნება ციტოქრომ P450-ის შემცირება და ციტოქრომ P4520-ის შემცველობის ზრდა, რასაც იმავდროულად ფრაქციაში პეროქსიდაზული აქტივობის განუხრელი ზრდაც თან ახლავს (ნახ. 3). ანალოგიური სურათი შეინიშნაება "ახალგაზრდა" (7-9 დღიანი) ნაზარდებიდან გამოყოფილი მიკროსომული ფრაქციის 120 წთ-იანი ინტენსიური აერაციისას: ციტოქრომების P420/P450-ის თანაფარდობის 5-ჯერ ზრდას პეროქსიდაზული აქტივობის 1.5-ჯერ მატება შეესაბამება (ნახ. 4).



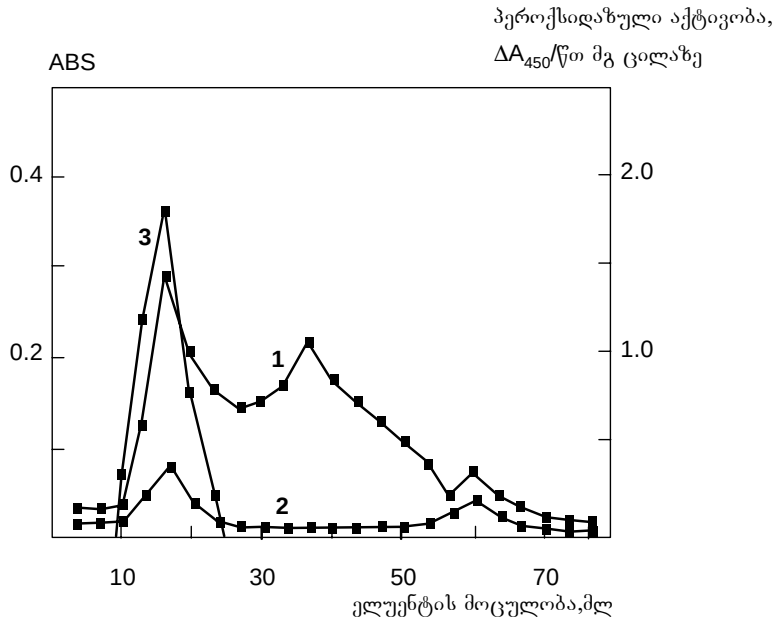
ნახ. 3. მიკროსომებში ციტოქრომ P450-ისა და P420-ის შემცველობის და პეროქსიდაზული აქტივობის ცვლილებები მცენარის ასაკისაგან დამოკიდებულებით [29].
1 — ციტოქრომი P450;
2 — ციტოქრომი P420;
3 — პეროქსიდაზული აქტივობა.



ნახ. 4. ციტოქრომების P420/P450-ის თანაფარდობისაგან დამოკიდებულებით. პეროქსიდაზული აქტივობის ცვლილებები მიკროსომების 120 წთ-იანი აერაციის პირობებში [29].
1 — პეროქსიდაზული აქტივობა;
2 — P420/P450.

“ხანდაზმული” (14-დღიანი) მცენარეებიდან გამოყოფილი მიკროსომებისა და პირშუშხას პეროქსიდაზული პრეპარატის სპექტრულმა ანალიზმა მათი აბსოლუტური იდენტურობა დაგვიდასტურა, კერძოდ, ორივე შთანთქმის მაქსიმუმს 420 ნმ-ზე ამჟღავნებს, ხოლო დითიონიტით აღდგენისას მაქსიმუმის 432 ნმ-ზე წანაცვლება ხდება. წყალბადის ზეჟანგს ჰემი კვლავ დაჟანგულ მდგომარეობაში გადაჰყავს. ანალოგიური სპექტრები გააჩნიათ ნახშირბადის მონოქსიდით აღდგენილ მათ კომპლექსებსაც. აქედან გამომდინარე, ნათელი ხდება, რომ მიკროსომაში არსებობს ჰემოპროტეინი, რომლის ჰემის მდგომარეობა პეროქსიდაზას ჰემის იდენტურია.

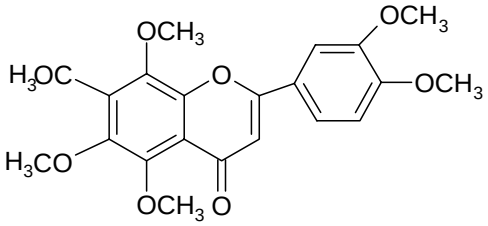
გელ-ფილტრაციული ქრომატოგრაფიის ანალიზით დადგინდა, რომ მიკროსომული ფრაქცია ორ ჰემოპროტეინს შეიცავს, რომელთაგან პეროქსიდაზული აქტივობა მხოლოდ ~100 kD მოლეკულური მასის მქონეს გააჩნია (ნახ. 5). ცილის ეს მასა არ შეესაბამება პეროქსიდაზის ფერმენტული ცილის პრეპარატის მოლეკულურ მასას (40 kD). მეორე, შედარებით დაბალი მოლეკულური მასის (10-15 kD) მქონე ჰემოპროტეინი ციტოქრომ b_5-ს წარმოადგენს. ფრაქციაში იდენტიფიცირებულია არაჰემური ცილაც (~30-40 kD), სავარაუდოდ —NADPH-ციტოქრომ P450-რედუქტაზა.



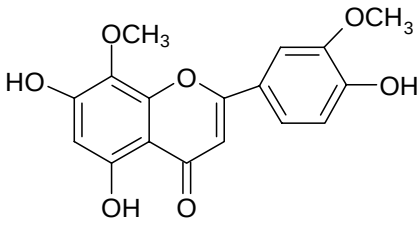
ნახ. 5. მიკროსომული ფრაქციის გელფილტრაციის ქრომატოგრამა [29].
1 — A_{280};
2 — A_{432};
3 — პეროქსიდაზული აქტივობა.
სვეტი — 50×1.6 სმ;
გელი — ULTROGEL AcA 44;
ელუენტი — 0.05% Na-SDS 1/30 M ფოსფატის ბუფერში (pH 7.4).

მონოოქსიგენაზური მექანიზმის პეროქსიდაზულით შენაცვლების სურათი სავსებით აშკარად გამოიკვეთა ფლავონოიდების მიკროსომული ჟანგვის შესწავლით [59]. ამ მიზნით ჩვენს მიერ გამოცდილ იქნა მეთოქსილირების განსხვავებული ხარისხის მქონე ოთხი ფლავონოიდი. მათი შერჩევა იმ მოსაზრებით მოხდა, რომ ორი მათგანი (ნობილეტენი და 5-OH-ნობილეტინი) უნდა დაჟანგულიყო მონოოქსიგენირებით (O-დემეთილირებით), ხოლო ორი (ლიმოციტრინი და

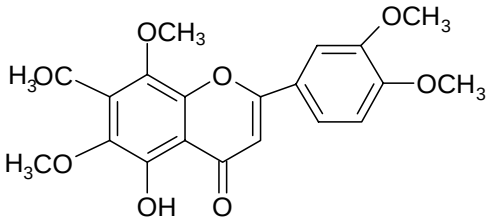
კვერცეტინი), რომლებიც უკვე ჰიდროქსილირებულ პროდუქტებს წარმოადგენენ, პეროქსიდაზული ჟანგვის მექანიზმით უნდა გარდაქმნილიყვნენ. გარდა ამისა, ცხოველურ ობიექტებში ეს ნივთიერებები მონოოქსიგენაზების მძლავრ ინდუქტორებად ითვლებიან [63].



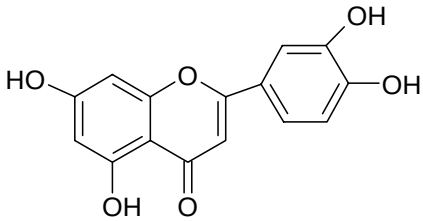
ნობილეტინი
(5,6,7,8,3',4'-ჰექსამეთოქსიფლავონი)



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

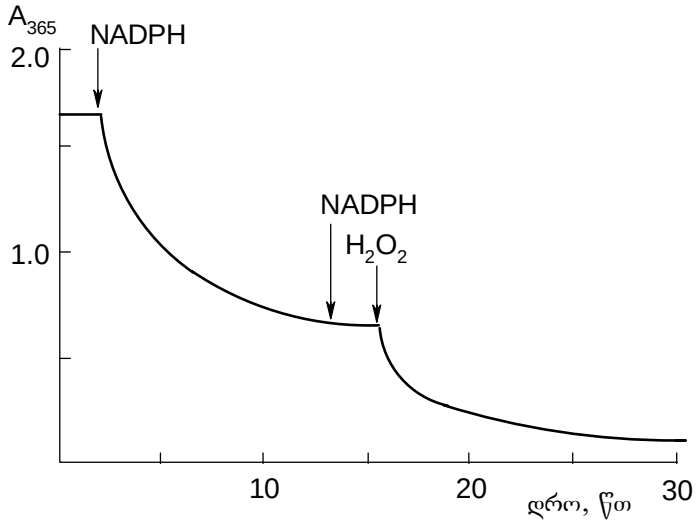


5-OH-ნობილეტინი
(5-ოქსი-6,7,8,3',4'-ჰენტამეთოქსიფლავონი)

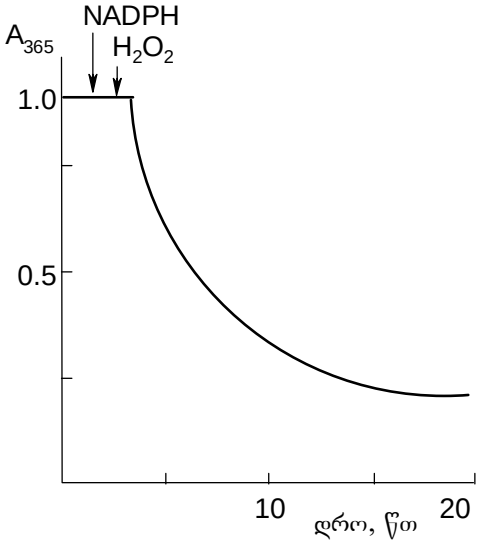


კვერცეტინი
(3,5,7,3',4'-პენტაოქსიფლავონი)

ნობილეტინი და 5-OH-ნობილეტინი მიკროსომებში მხოლოდ NADPH-ის თანამყოფობისას იჟანგებიან (ნახ. 6). ამის შედეგად სარეაქციო არეში ადგილი აქვს ფორმალდეჰიდის დაგროვებას. კოსუბსტრატად H_2O_2-ის გამოყენება მოცემული რეაქციის მსვლელობაზე გავლენას არ ახდენს, ე. ი. აღნიშნული ფლავონოიდებიდან მეთილის ჯგუფის მოცილება მონოოქსიგენირების გზით ხორციელდება. კინეტიკური მრუდის პლატოზე გასვლის შემდეგ NADPH-ის განმეორებითი დამატება რეგისტრირებად ცვლილებებს აღარ იძლევა. ეს იმაზე მიუთითებს, რომ ამ მომენტში O-დემეთილირების სუბსტრატი მთლიანადაა დახარჯული და რეაქცია დამთავრებულია. წარმოქმნილი პროდუქტების შემდგომი ჟანგვა (მისი კონცენტრაციის შემცირება) ამ შემთხვევაში უკვე H_2O_2-დამოკიდებული ხდება, ანუ მონოოქსიგენირებული ფლავონოიდი ამჯერად უკვე პეროქსიდაზას სუბსტრატადაა გადაქცეული. ლიმოციტრინისა და კვერცეტინის NADPH-დამოკიდებული ჟანგვა მიკროსომულ ფრაქციაში საერთოდ არ ხორციელდება და რეაქცია მხოლოდ H_2O_2-ის თანამყოფობით მიმდინარეობს (კვერცეტინის ჟანგვის მრუდი მოცემულია ნახ. 7-ზე).



ნახ. 6. ნობილეტინის ჟანგვა ეთიოლირებული სიმინდის 7-დღიანი ნაზარდების ფესვების მიკროსომებში. საინკუბაციო ხსნარის (3მლ) შემადგენლობა: 1/15M ფოსფატის ბუფერი pH 7.4; 0.33 მგ/მლ მიკროსომული ცილა; 100 μM NADPH; 15 μM H_2O_2; 25 μM ნობილეტინი [59].



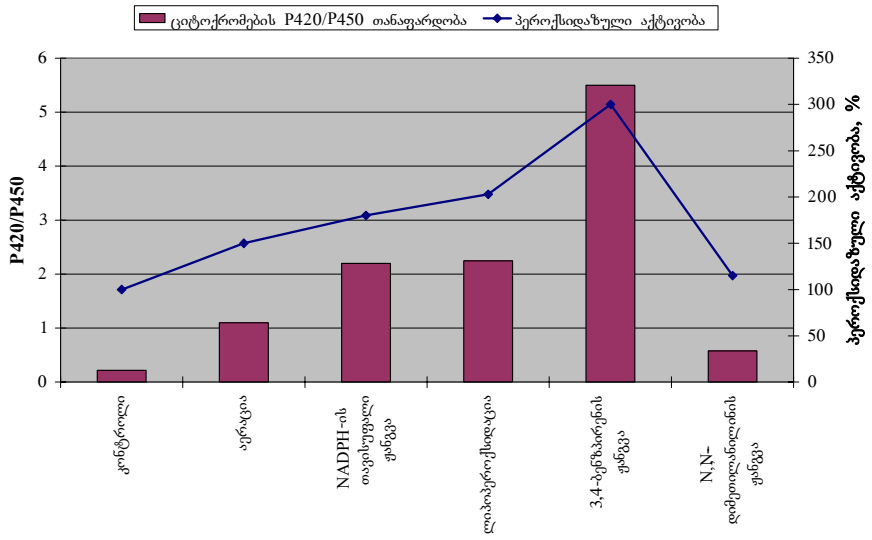
ნახ. 7. კვერცეტინის ჟანგვა ეთიოლირებულ სიმინდის 14-დღიანი ნაზარდების ფესვების მიკროსომებში. საინკუბაციო ხსნარის (3მლ) შემადგენლობა: 1/15 M ფოსფატის ბუფერი pH 7.4; 0.33 მგ/მლ მიკროსომული ცილა: 100 μM NADPH; 15 μM H_2O_2, 25 μM კვერცეტინი [59].

ამგვარად, მცენარეულ მიკროსომებში მეთოქსილირებული ფლავონოიდები მონოოქსიგენაზური, ხოლო ჰიდროქსილირებული — პეროქსიდაზული მექანიზმებით

გარდაქმნებიან. ამ ორი რეაქციის თანმიმდევრული შენაცვლება ციტოქრომ P450-ის ქიმიური მოდიფიკაციის ანუ არააქტიურ ციტოქრომ P420-ად მისი კონვერსიის შედეგია.

ციტოქრომ P450-ის ისეთ ქიმიურ მოდიფიკაციას, რომლის დროსაც ადგილი აქვს ფერმენტული მოქმედების მექანიზმის შენაცვლებას, უფრო ესადაგება ტერმინი "ტრანსფორმაცია", რადგან იგი უკეთესად ასახავს მოვლენის არსს.

ციტოქრომ P450-ის ქიმიურ მოდიფიკაციაში მნიშვნელოვან ადგილს იკავებს NADPH-ის თავისუფალი (ჰიდროქსილირებასთან არაშეუღლებული) ჟანგვა. ამ პროცესის მსვლელობას ციტოქრომების P420/P450-ის თანაფარდობის 10-ჯერ ზრდა და პეროქსიდაზული აქტივობის 1.8-ჯერ ზრდა შეესაბამება. ასევე, მიკროსომულ მემბრანაში ინტენსიური ლიპოპეროქსიდაციისას პეროქსიდაზული აქტივობა ორმაგდება. ციტოქრომ P450-ის პეროქსიდაზად მაქსიმალური ტრანსფორმაცია მიიღება მიკროსომული ჟანგვის სუბსტრატის — 3,4-ბენზპირენის გარდაქმნისას, როდესაც P420/P450 თანაფარდობის 25-ჯერ ზრდისას პეროქსიდაზული აქტივობა სამმაგდება. შედარებით დაბალი ხარისხის ტრანსფორმაცია ახლავს მიკროსომული რედოქს-ჯაჭვის მეორე ტიპიური სუბსტრატის — დიმეთილანილინის ჟანგვას (მონაცემები დიაგრამების სახით წარმოდგენილია ნახ. 8-ზე).



ნახ. 8. სიმინდის 7-დღიანი ეთიოლირებული ნაზარდების მიკროსომებში პეროქსიდაზული აქტივობების ცვლილებები აერაციისა და სხვადასხვა სუბსტრატების ჟანგვისას [61].

მიღებული შედეგების ასახსნელად ჩვენს მიერ გამოთქმულ იქნა მოსაზრება, რომ ციტოქრომ P450-ის ამგვარ ტრანსფორმაციას საინკუბაციო არეში წარმოქმნილი თავისუფალი რადიკალები უნდა იწვევდნენ. ცნობილია, მაგ., რომ NADPH-ის თავისუფალი ჟანგვის პროცესი ოთხი განსხვავებული გზით შეიძლება წარიმართოს [64]:

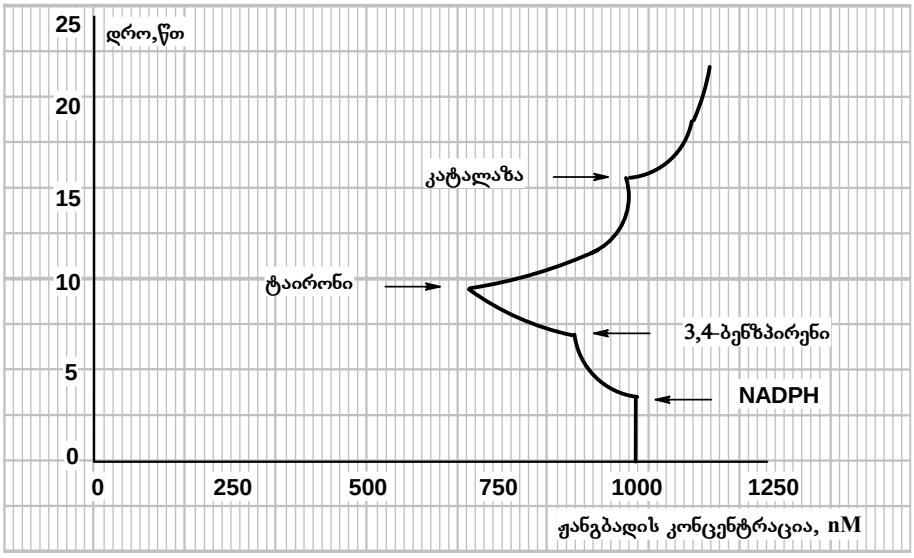
$$NADPH + 2O_2 \rightarrow NADP + H^+ + 2\,O_2^{\bullet -} \qquad (7)$$

$$NADPH + H^+ + O_2 \rightarrow NADP^+ + H_2O_2 \qquad (8)$$

$$2NADPH + 2H^+ + O_2 \rightarrow 2NADP^+ + 2H_2O_2 \qquad (9)$$

$$NADPH + H^+ + O_2 + XH \rightarrow NADP^+ + XOH + H_2O \qquad (10)$$

პირველი სამი რეაქცია ოქსიდაზურია, ხოლო მეოთხე ჰიპოთეზური ენდოგენური სუბსტრატის (XH) მონოოქსიგენაზური მექანიზმით ჟანგვას ასახავს. პირველი რეაქციის შედეგად სუპეროქსიდული ანიონ-რადიკალი ($O_2^{\bullet -}$) წარმოიქმნება. მიკროსომული ფრაქციის აერაციისას ჟანგბადის მუდმივი მიწოდება აჩქარებს სარეაქციო არეში ენდოგენური NADPH-ისა და სუბსტრატების ჟანგვას. იმის გამო, რომ ამ უკანასკნელთა რაოდენობა უაღრესად ლიმიტირებულია, შესაბამისად ეფექტიც დაბალია. ამ მოსაზრების შესამოწმებლად შევეცადეთ გამოგვევლინა ის აქტიური ინტერმედიატი, რომელიც ციტოქრომ P450-ის ციტოქრომ P420-ში გადასვლას იწვევს და მონოოქსიგენაზური აქტივობის პეროქსიდაზულით შეცვლას განაპირობებს; კერძოდ, შევეცადეთ დაგვედგინა, არის თუ არა ეს ნაწილაკი სუპეროქსიდული ანიონ-რადიკალი, რომელიც, როგორც ცნობილია, ზოგიერთი სუბსტრატის ჟანგვისას უშუალოდ ციტოქრომ P450-ის აქტიურ ცენტრზე გენერირდება [1-3]. ამ მიზნით ჩვენს მიერ ჩატარებულ იქნა ექსპერიმენტი [62]: მიკროსომულ ფრაქციაში თანმიმდევრობით შეგვქონდა NADPH, 3,4-ბენზპირენი, ტაირონი (4,5-დიჰიდროქსი-1,3-დისულფომჟავა), კატალაზა (EC 1.11.1.6) და ამ პირობებში პოლაროგრაფიულად ვაკვირდებოდით ჟანგბადის ცვლილებების დინამიკას (ნახ. 9).



ნახ. 9. სიმინდის ეთიოლირებული ნაზარდების მიკროსომული ფრაქციის მიერ 3,4-ბენზპირენის NADPH-დამოკიდებული ჟანგვის პოლაროგრამა. 0.067 M KH_2PO_4-Na_2HPO_4 ბუფერი, pH 7.4; 3,4-ბენზპირენი – 0.01 mM; NADPH – 0.24 mM, მიკროსომული ფრაქცია 1.0 მგ/მლ [62].

პოლაროგრაფიული მრუდიდან ჩანს, რომ პირველი ორი ნაერთის დამატებისას რეგისტრირდება ჟანგბადის შთანთქმა, ხოლო ტაირონი, რომელიც სუპეროქსიდდისმუტაზას (EC 1.15.1.1) დაბალმოლეკულური, მემბრანაში განვლადი ანალოგია და სუპეროქსიდული ანიონ-რადიკალების დამჭერად ითვლება ($2H^+ + 2\,O_2^{\bullet -} \rightarrow H_2O_2 + O_2$), ჟანგბადის მოხმარების მრუდის მიმართულების მკვეთრ ცვლილებას იწვევს, რაც ჟანგბადის გამოყოფის მაჩვენებელია. ანალოგიური ეფექტი გააჩნია კატალაზასაც, რომლის მოქმედებითაც წარმოქმნილი წყალბადის ზეჟანგი ასევე იშლება ჟანგბადის გამოყოფით ($2H_2O_2 \rightarrow H_2O + O_2$).

ამ ექსპერიმენტით (თუმცა არაპირდაპირი გზით) დასტურდება, რომ 3,4-ბენზპირენის NADPH-დამოკიდებული ჟანგვისას მართლაც ადგილი აქვს სუპეროქსიდული რადიკალების

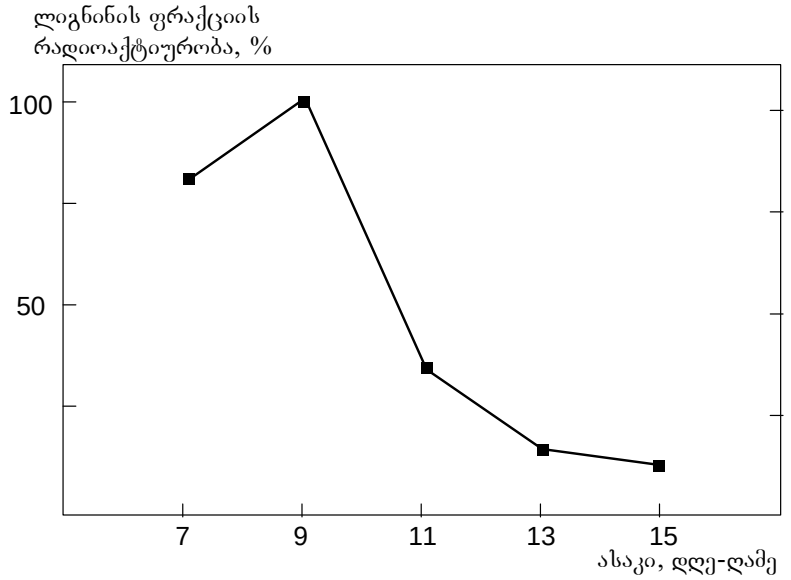
წარმოქმნას, რომლებიც მოქმედებენ ციტოქრომ P450-ის ჰემზე და მის თვისობრივ და რაოდენობრივ ცვლილებებს იწვევენ.

ტაირონი და კატალაზა გამოცდილ იქნა N,N-დიმეთილანილინის NADPH-დამოკიდებული ჟანგვისა და Fe^{2+}-ით ინიცირებული მიკროსომული არაფერმენტული ლიპოპეროქსიდაციის პროცესის მიმართაც: არც ერთ შემთხვევაში ადგილი არ აქვს ჟანგბადის გამოყოფას; ე.ი. აღნიშნულ პროცესში სუპეროქსიდული რადიკალები არ გენერირდებიან. როგოც ჩანს, ლიპიდთა ზეჟანგური ჟანგვისას ჟანგბადის სხვა ტიპის აქტიური ფორმები წარმოიქმნებიან.

ციტოქრომ P450-ის პეროქსიდაზად ტრანსფორმიაციის პროცესი აშკარად შეინიშნება მცენარის ასაკში შესვლასთან დაკავშირებითაც. სიმინდის 7-დღიანი ეთიოლირებული ნაზარდების ფესვებიდან მიღებულ მიკროსომულ ფრაქციაში ციტოქრომ P450-ის რაოდენობა და, შესაბამისად, მონოოქსიგენაზური აქტივობა მაქსიმალურია. მომდევნო დღეებში ციტოქრომი P450 ციტოქრომ P420-ად შეუქცევად კონვერსიას განიცდის, რასაც პარალელურად თან ახლავს პეროქსიდაზული აქტივობის ზრდა. 7-დღიანთან შედარებით 14-დღიანი ნაზარდების მიკროსომებში P420/P450 თანაფარდობა 30-32-ჯერ, ხოლო პეროქსიდაზული აქტივობა 5-6-ჯერაა გაზრდილი [65].

ბუნებრივია, ასაკზე დამოკიდებულ ციტოქრომ P450-ის ტრანსფორმაციას თან უნდა ახლდეს ციტოქრომ P450-დამოკიდებული ბიოსინთეზური პროცესების ინტენსივობის ცვლილებებიც. ამ საკითხის კვლევისას, შიდაუჯრედული პროცესის მოდელად შერჩეულ იქნა ლიგნინის ბიოსინთეზის ფენილპროპანოიდური გზა, რომელშიც რამდენიმე ციტოქრომ P450-შემცველი მონოოქსიგენაზა მონაწილეობს [66-68]. მათგან უმთავრესია დარიჩინმჟავა-4-ჰიდროქსილაზა, რომელიც ფენილალანინ-ამიაკ-ლიაზასთან ერთად ბიოსინთეზის უმნიშვნელოვანეს ფერმენტს წარმოადგენს. კვლევის მიზანს შეადგენდა იმის დადგენა, თუ როგორ იცვლება აღნიშნული პროცესის ინტენსივობა ციტოქრომ P450-ის ტრანსფორმაციის პირობებში. ამისათვის შეისწავლებოდა ბიოსინთეზში მონაწილე ზემოთაღნიშნული ფერმენტების აქტივობა 7- და 14-დღიანი ნაზარდების მიკროსომებში. აღმოჩნდა, რომ 7-დღიანთან შედარებით 14-დღიანი ნაზარდების მიკროსომებში ორივე ფერმენტის აქტივობა მკვეთრად მცირდება [65], ე.ი. ციტოქრომ P450-ის ტრანსფორმაციის პირობებში მიკროსომებში წყდება დარიჩინმჟავას ჰიდროქსილირებით მიმდინარე მეტაბოლური გზა, რასაც თან ახლავს წინა, ამიაკ-ლიაზური რეაქციის ბლოკირებაც.

ეთიოლირებულ ნაზარდებში, სადაც ფოტოსინთეზი გამორიცხულია, ლიგნინის ბიოსინთეზი მნიშვნელოვნად უნდა იყოს დამოკიდებული ციტოქრომ P450-ის აქტივობაზე, რამდენადაც ამ პროცესში ერთ-ერთი სიჩქარე-მალიმიტირებელი სტადია — დარიჩინმჟავას *p*-კუმარმჟავად გარდაქმნა ციტოქრომ P450-შემცველი მონოოქსიგენაზით — დარიჩინმჟავა-4-ჰიდროქსილაზით (CYP73) კატალიზდება [69]. როდესაც მცენარის ზრდას თან სდევს ციტოქრომ P450-ის ტრანსფორმაცია, ცხადია, ლიგნიფიკაციის პროცესიც უნდა შეიცვალოს. ამის დასადგენად ვაკვირდებოდით ლიგნინის ფრაქციაში რადიოაქტიური (4-^{14}C)დარიჩინმჟავას ნიშანდებული ნახშირბადის ჩართვას [61, 65]. აღმოჩნდა, რომ ლიგნინში ^{14}C-ის ჩართვა მაქსიმალურია 7-9 დღის ინტერვალში, შემდეგ კი მკვეთრად მცირდება (ნახ. 10).

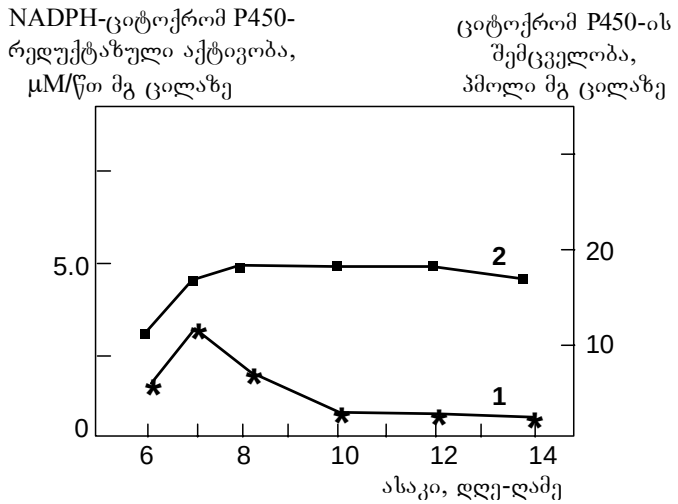


ნახ. 10. ლიგნინის ფრაქციაში დარიჩინმჟავას ^{14}C-ნიშნის ჩართვის დინამიკა სიმინდის ეთიოლირებული ნაზარდების ასაკთან დამოკიდებულებით [60].

ლიგნინში რადიოაქტიური ნიშნის ჩართვის შემცირების პერიოდი მცენარის ასაკთან დაკავშირებულ ციტოქრომ P450-ის ტრანსფორმაციას ემთხვევა. ამ ექსპერიმენტის შედეგები გვიჩვენებენ, რომ ციტოქრომ P450-ის ტრანსფორმაცია ბუნებრივი პროცესია და იმ ბიოქიმიური რეაქციების ინტენსივობის დაქვეითებას იწვევს, რომლებიც ამ ჰემოპროტეინით კატალიზდებიან.

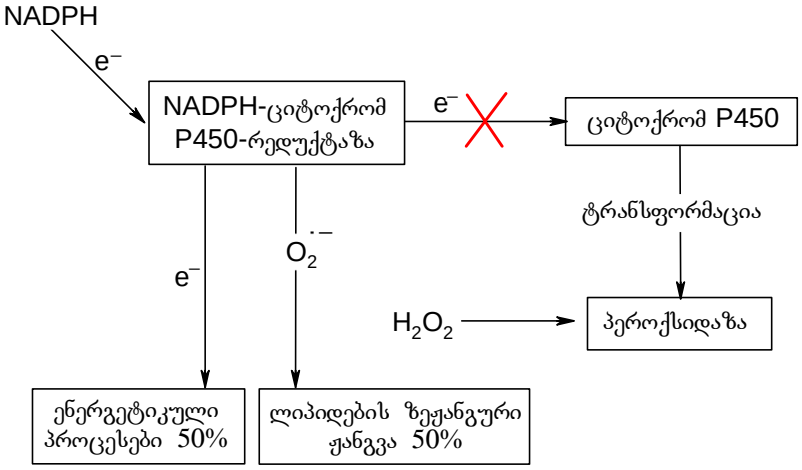
3. NADPH-ციტოქრომ P450-რედუქტაზას შესაძლო ფუნქციები ციტოქრომ P450-ის პეროქსიდაზად ტრანსფორმაციის პირობებში

ციტოქრომ P450-ის ქიმიური მოდიფიკაციის შედეგად ცხადია, მონოოქსიგენაზური სისტემის დანარჩენი კომპონენტები ახალ ფუნქციურ დატვირთვას უნდა იძენდნენ. ჩვენს მიერ [70] დადგენილ იქნა, რომ ამ ჰემოპროტეინის პეროქსიდაზად ტრანსფორმირების ფონზე NADPH-ციტოქრომ P450-რედუქტაზა აქტივობის მაღალ დონეს მაინც ინარჩუნებს (ნახ. 11), მიუხედავად იმისა, რომ პეროქსიდაზული აქტივობის გამოვლენაში მასზე გენერირებული სუპეროქსიდული რადიკალები არ მონაწილეობენ. აღნიშნულიდან გამომდინარე, ბუნებრივად იბადება კითხვა: შექმნილ ვითარებაში რა ფუნქციურ როლს ასრულებს NADPH-ციტოქრომ P450-რედუქტაზა?



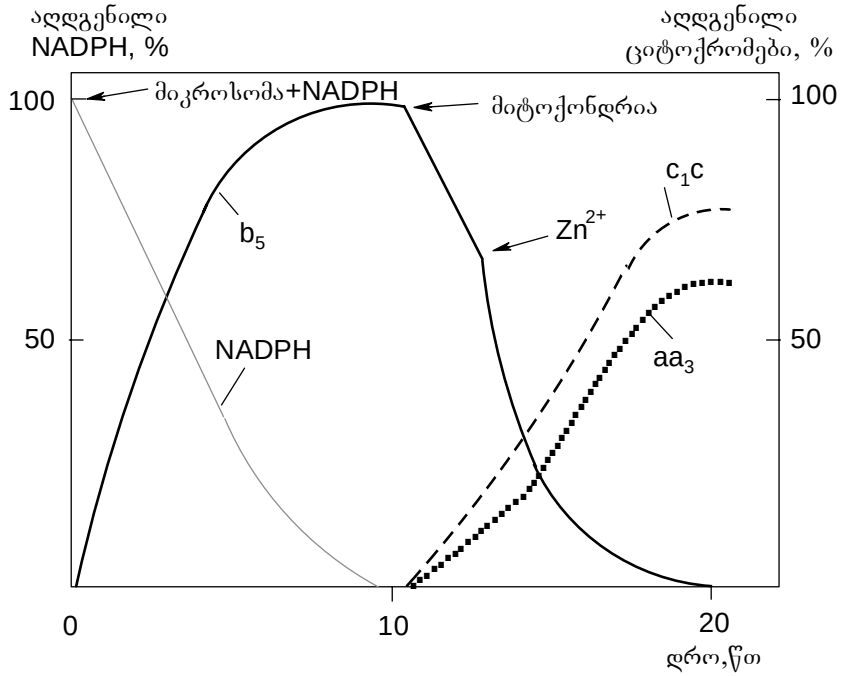
ნახ. 11. მიკროსომებში ციტოქრომ P450-ის შემცველობისა და NADPH-ციტოქრომ P450-რედუქტაზული აქტივობის ცვლილებები მცენარის ასაკისაგან დამოკიდებულებით. 1 — ციტოქრომი P450; 2 — NADPH-ციტოქრომ P450-რედუქტაზული აქტივობა [70].

აღმოჩნდა, რომ რედუქტაზაზე გენერირებული $O_2^{\bullet -}$ უპირატესად ლიპიდურ პეროქსიდაციაშია ჩართული (ნახ. 12). როგორც გამოირკვა, ლიპიდთა ზეჟანგურ ჟანგვას ციტოქრომი P450 სუპეროქსიდული რადიკალების გენერატორად სჭირდება და ჰემოპროტეინის მოდიფიკაციის შემთხვევაში ამ ფუნქციას მთლიანად რედუქტაზა ითავსებს. გარდა ამისა, ჩვენ შევძელით გვეჩვენებინა, რომ ლიპიდურ პეროქსიდაციას რედუქტაზული აქტივობის მხოლოდ ნახევარი (50%-მდე) ხმარდება და ეს სავსებით საკმარისია აღნიშნული პროცესის ნორმალური მსვლელობისათვის (ნახ. 12) [70]. რედუქტაზას დარჩენილი ენზიმური სიმძლავრე მიკროსომული რედოქს-ჯაჭვის საწყისი კომპონენტების საშუალებით უჯრედის ენერგეტიკულ პროცესებს ემსახურება [65]. ასეთი კავშირის განხორციელება მიკროსომიდან მიტოქონდრიაზე ელექტრონთა ტრანსმემბრანული მიგრაციის გზითაა შესაძლებელი [71, 72].



ნახ. 12. NADPH-ციტოქრომ P450-რედუქტაზას შესაძლო ფუნქციები ციტოქრომ P450-ის ტრანსფორმირების პირობებში. ელექტრონის ტრანსპორტის ის გზა, რომელიც ამ დროს აღარ ფუნქციონირებს, გადახაზულია [65].

მცენარის უჯრედში მიკროსომებიდან მიტოქონდრიაზე ელექტრონების გადატანის შესაძლო გზების არსებობისა და მექანიზმების დასადგენად ჩვენ ფართო ექსპერიმენტული კვლევა ჩავატარეთ [65, 72]. ცდების ერთ სერიაში მიკროსომულ ფრაქციას ვაინკუბირებდით NADPH-თან, რათა რედოქს-ჯაჭვის კომპონენტები წინასწარ აღდგენილიყვნენ (ნახ 13). ნიკოტინამიდური კოფერმენტის სრულ ხარჯვას ვაფასებდით 340 ნმ-ზე მისი შთანთქმის მაქსიმუმის შემცირებით. ციტოქრომ b_5-ის აღდგენის მაქსიმუმის მიღწევის შემდეგ მიკროსომებს ვამატებდით მიტოქონდრიების ფრაქციას. ციტოქრომ b_5-ის ჟანგვის პარალელურად ამ შემთხვევაში შეინიშნებოდა ციტოქრომების c_1c-ისა და aa_3-ს აღდგენა. მაშასადამე, უჯრედის ამ ორგანელათა უშუალო კონტაქტისას მიკროსომიდან მიტოქონდრიაზე რედოქს-ექვივალენტების ტრანსმემბრანული მიგრაცია ხორციელდება და ამ პროცესში პირდაპირ არიან ჩართული მიკროსომული NADPH-ციტოქრომ P450-რედუქტაზა და ციტოქრომი b_5. აქვე უნდა შევნიშნოთ, რომ ცხოველურ ობიექტებში მიკროსომებსა და მიტოქონდრიებს შორის რედუცირებადი ექვივალენტების ორმხრივი ტრანსმემბრანული მიგრაცია და მასში ამ ორგანელათა ციტოქრომ b_5-ების შესაძლო მონაწილეობა გამოვლენილია გასული საუკუნის 70-80-იან წლებში [73-75].

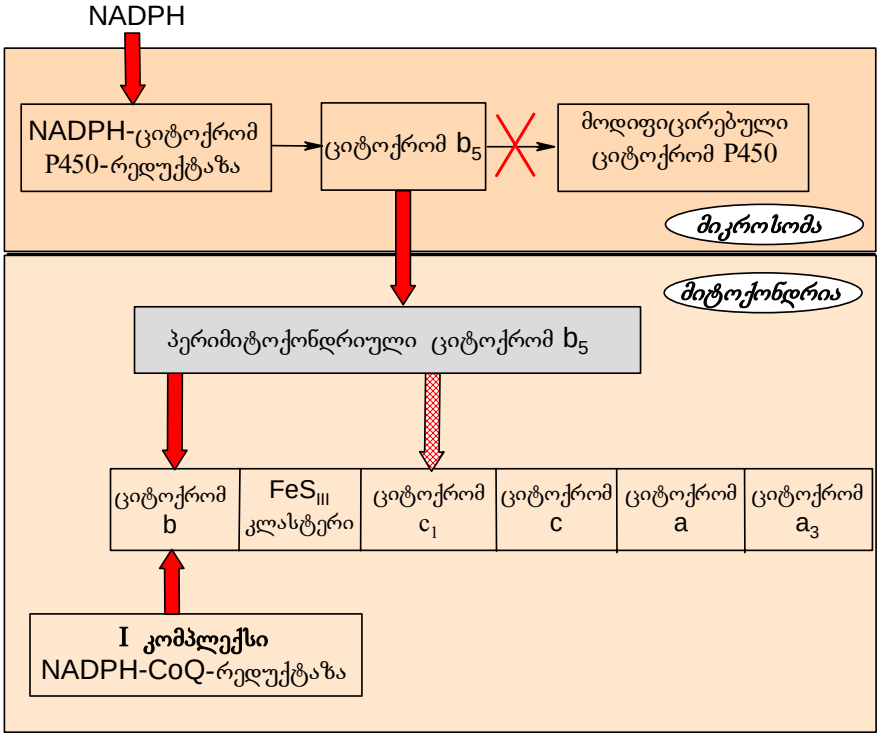


ნახ.13. მიკროსომული და მიტოქონდრიული ციტოქრომებისა და NADPH-ის აღდგენის კინეტიკა კომბინირებულ სისტემაში მიტოქონდრია+ მიკროსომა [72].

განხილული მონაცემები ყოველგვარ საფუძველს გვაძლევენ მისაღებად ჩავთვალოთ მოსაზრება იმის შესახებ, რომ ციტოქრომ P450 ყოველთვის არ წარმოადგენს მიკროსომული რედოქს-ჯაჭვის მუდმივ ტერმინალურ კომპონენტს და საერთოდ, მონოოქსიგენაზური სისტემა მემბრანაში, ჩვეულებრივ, დისოცირებული, და არა ერთ კომპლექსად შეკრული აგრეგატის სახით უნდა არსებობდეს. როგორც ჩანს, NADPH-ციტოქრომ P450-რედუქტაზასთან და ციტოქრომ b_5-თან დაკავშირება და მონოოქსიგენაზურ სისტემაში გაერთიანება მას შემდეგ ხდება, როდესაც ციტოქრომ P450 სუბსტრატს იკავშირებს და თანმიმდევრულად ფერმენტ-სუბსტრატის პირველი ან სამმაგი კომპლექსის მეორე ელექტრონით აღდგენა ხდება საჭირო. ამ ჰემოპროტეინთან ენდოგენური ან ეგზოგენური სუბსტრატის დაკავშირება იმ რეგულატორულ სიგნალს წარმოადგენს, რომლის შედეგადაც დისოცირებულ მდგომარეობაში მყოფი რედოქს-

ჯაჭვის კომპონენტებისაგან მონოოქსიგენაზური კომპლექსი ყალიბდება. სხვა შემთხვევაში, როდესაც ამის საჭიროება არაა (მაგ., NADPH თავისუფლად იჟანგება, ციტოქრომ P450 სუბსტრატს არ ჟანგავს, ან პეროქსიდაზადაა ტრანსფორმირებული), NADPH-ციტოქრომ P450-რედუქტაზასათვის ელექტრონის აქცეპტორის ფუნქცია შეიძლება ციტოქრომოქსიდაზურმა სისტემამ შეასრულოს. ამისათვის აუცილებელია უჯრედში მიკროსომებისა და მიტოქონდრიების უშუალო კონტაქტი და ამ შემთხვევაში ელექტრონთა გადატანა ამ ორი სტრუქტურული წარმონაქმნის b-ტიპის ციტოქრომების გზით განხორციელდება. იმის გამო, რომ მიკროსომული ციტოქრომ b_5-ის რედოქს-პოტენციალი (+24 mV) ყველაზე ახლოსაა მიტოქონდრიული ციტოქრომ b-ს რედოქს-პოტენციალთან, აღმდგენელი ექვივალენტების ამ გადატანას არ უნდა ახლდეს ენერგიის რაიმე შესამჩნევი კარგვა.

ცნობილია, რომ Zn^{2+} (10^{-6} M) სუნთქვითი ჯაჭვის III კომპლექსში b და c_1 ციტოქრომებს შორის არსებული FeS_{III}-კლასტერის ბლოკირებას იწვევს [76, 77]. ამიტომ მცენარიდან მიღებულ მიკროსომებისა და მიტოქონდრიების კომბინირებულ სისტემაზე დაყენებულ ჩვენს ცდებში მოველოდით, რომ ციტოქრომ b-ზე ელექტრონების მიგრაციისას Zn^{2+} დააქვეითებდა ციტოქრომების c_1c-სა და aa_3-ის აღდგენის სიჩქარეს. სინამდვილეში მივიღეთ საპირისპირო შედეგები: Zn^{2+}-ის მოქმედების შედეგად ადგილი ჰქონდა მიტოქონდრიულ ციტოქრომებზე ელექტრონთა გადატანის სიჩქარის შესამჩნევ ზრდას (ნახ.13). ამასთან დაკავშირებით გამოვთქვით ვარაუდი, რომ სუნთქვითი ჯაჭვის FeS_{III}-კლასტერის ბლოკირებისას შეიძლება ელექტრონის სატრანსპორტო გზის შუნტირება მოხდეს და ელექტრონები მიტოქონდრიული ციტოქრომ b-ს გვერდის ავლით, მიკროსომული ციტოქრომ b_5-იდან უშუალოდ c_1c- და aa_3-ციტოქრომებზე მოხვდნენ (ნახ. 14). ამ შემთხვევაშიც შუალედ გადამტანად პერიმიტოქონდრიული ციტოქრომ b_5 უნდა ფუნქციონირებდეს [65].



ნახ. 14. მიკროსომული რედოქს-ჯაჭვიდან მიტოქონდრიაზე ელექტრონების მიგრაციის შესაძლო გზები. დაშტრიხული ისრით აღნიშნულია Zn^{2+}-ით ბლოკირებული უბანი [72].

ამრიგად, ციტოქრომ P450-ის პეროქსიდაზად ქიმიური მოდიფიკაციისას NADPH-ციტოქრომ P450-რედუქტაზა და ციტოქრომ b_5 ახალ, ენერგეტიკულ ფუნქციას იძენენ, რაც მიტოქონდრიული სუნთქვის ჯაჭვის აღმდგენელი ექვივალენტებით დამატებით უზრუნველყოფაში მდგომარეობს. ქსენობიოტიკის უჯრედში მოხვედრისას NADPH-ის მიკროსომული ჟანგვის შეუღლებული სისტემა ენერგეტიკულიდან კვლავ დეტოქსიკაციურ რეჟიმს უბრუნდება.

ქიმიური მოდიფიკაციის გზით ციტოქრომ P450-ის პეროქსიდაზად ტრანსფორმაცია უჯრედის საერთო დეტოქსიკაციურ პოტენციალს კი არ ამცირებს, არამედ გარკვეულწილად აძლიერებს კიდევაც. ამ დროს მონოოქსიგენაზას პეროქსიდაზა ენაცვლება, რომელიც ქსენობიოტიკების ჟანგვით დეგრადაციაში არანაკლებ როლს ასრულებს. საქმე იმაშია, რომ ზოგიერთი მკვლევარის თვალსაზრისით მცენარეებში ორგანული ტოქსიკური ნაერთების ძირითადი ნაწილი პეროქსიდაზებით იჟანგება [78]. ეს ჰიპოთეზა ექსპერიმენტულად დასაბუთებულ შემდეგ მოსაზრებებს ეყრდნობა:

- მცენარეებში პეროქსიდაზას ფართო გავრცელებას;
- ფერმენტის მაღალ სწრაფვას სხვადასხვა ქიმიური სტრუქტურის მქონე ორგანული ქსენობიოტიკების მიმართ;
- უნივერსალურ სუბსტრატულ სპეციფიკურობას.

ეს თავისებურებები განსაზღვრავს პეროქსიდაზას აქტიურ მონაწილეობას მთელ რიგ დეტოქსიკაციურ პროცესებში. ქსენობიოტიკების ჰიდროქსილირების რეაქციებში მცენარეული პეროქსიდაზების მონაწილეობაზე მრავალი ფაქტი მიუთითებს, მაგ., სხვადასხვა მცენარეების პეროქსიდაზებს შეუძლიათ დაჟანგონ N,N-დიმეთილანილინი [79], 3,4-ბენზპირენი, 4-ნიტრო-*o*-ფენილენდიამინი [80], 4-ქლორანილინი [81], ფენოლი, ამინოფლუორენი, პარაოქსიაცეტანილიდი, დიეთილსტილბესტროლი, ჰიდროქსიბუთილტოლუოლი, ჰიდროქსიანიზოლები და სხვ. [82]. ტრითიუმით ნიშანდებული მეთილის ჯგუფის შემცველი [C^3H_3] TNT-ს გამოყენებით ნაჩვენებია, რომ პირშუშხას პეროქსიდაზას სუფთა პრეპარატს შეუძლია ისეთი ძნელად დასაჟანგი ჯგუფიც კი დაჟანგოს, როგორსაც TNT-ს მეთილის ჯგუფი წარმოადგენს [83].

მრავალი უცხო ნაერთის ჟანგვის დასაწყისში ციტოქრომ P450-ს შეუძლია ფუნქციონირება, როგორც მონოოქსიგენაზას, შემდგომში კი ჟანგვა გააგრძელოს პეროქსიდაზად ტრანსფორმირებულმა ჰემოპროტეინმა. ამ შემთხვევაში ქსენობიოტიკის დეგრადაცია ფერმენტთა ურთიერთშენაცვლების პრინციპით ხორციელდება. ჩვენს ლაბორატორიაში ნაჩვენები იქნა, რომ **ქსენობიოტიკთა ჟანგვის პროცესში ერთმანეთს შეიძლება შეენაცვლონ არამხოლოდ მონოოქსიგენაზა და პეროქსიდაზა, არამედ ფენოლოქსიდაზაც** [84-86]. ამ ფერმენტების კოორდინირებული მოქმედება მრავალი უცხო ნაერთის ჟანგვითი დეგრადაციის პროცესის მთავარ რეგულატორულ მექანიზმს უნდა წარმოადგენდეს.

განხილული ფაქტების შეჯერებას ერთ მნიშვნელოვან დასკვნამდე მივყავართ:

ცხოველური უჯრედებისაგან განსხვავებით, რომელშიც თავისუფალი რადიკალები ჰემის მოდიფიკაციის და მისი შემდგომი დესტრუქციის გზით ციტოქრომ P450-ის სრულ ინაქტივაციას იწვევენ, მცენარეულ უჯრედში ამ ჰემოპროტეინის ქიმიური მოდიფიკაცია ისე ხორციელდება, რომ ციტოქრომ P450 თავის კატალიზურ აქტივობას პეროქსიდაზას სახით ინარჩუნებს. ე.ი. მცენარეული ფერმენტი მხოლოდ თვისობრივ გარდაქმნას — ტრანსფორმაციას განიცდის. ამ დროს ციტოქრომ P450-დამოკიდებული შიდაუჯრედული მეტაბოლური პროცესების ინტენსივობა ქვეითდება. ციტოქრომ P450-ის ტრანსფორმაციის შედეგად მონოოქსიგენაზური სისტემის შემადგენელ კომპონენტებს შორის ადრე არსებული ფუნქციური კავშირი წყდება და ისინი ახალ ფუნქციებს იძენენ. ასეთი ტრანსფორმაციით მცენარეული უჯრედი, ერთი მხრივ, ცხოველურის მსგავსად თავიდან იცილებს აგრესიული ინტერმედიატების გენერატორს — ციტოქრომ P450-ს, მეორე მხრივ, ცხოველურისაგან განსხვავებით, ამავე ფერმენტს პეროქსიდაზას ფუნქციას ანიჭებს. ამ გზით უჯრედი იძენს ფერმენტს, რომელსაც ერთდროულად ქსენობიოტიკების ჟანგვა და აგრესიული H_2O_2-ის ლიკვიდაცია შეუძლია. სწორედ ამაში უნდა მდგომარეობდეს ქიმიური მოდიფიკაციის გზით ციტოქრომ P450-ის ტრანსფორმაციის ბიოლოგიური აზრი.

ციტოქრომ P450-ის ქიმიური მოდიფიკაცია

რეზიუმე

ბოლო ორი ათეული წლის მანძილზე ბიოქიმიკოსთა და, კერძოდ, ენზიმოლოგთა ინტენსიური კვლევის საგნადაა ქცეული მეტად საინტერესო მოვლენა, რომელიც ამჟამად ფერმენტის ქიმიური მოდიფიკაციის სახელითაა ცნობილი და ფერმენტული აქტივობის სრული ან არასრული შეწყვეტით (ინაქტივაციით) ან მოქმედების მექანიზმის შეცვლით (ტრანსფორმირებით) ვლინდება. მოდიფიკაციას განსაკუთრებით ის ფერმენტები განიცდიან, რომელთა ფუნქციონირებაც თავისუფალი რადიკალების, ჟანგბადის აქტიური ფორმების და რეაქციისუნარიანი ინტერმედიატების გენერირებას ან რეალიზაციას უკავშირდება. ზოგადად რომ ითქვას, ქიმიური მოდიფიკაციის ფენომენი, უპირველეს ყოვლისა, ოქსიდაზური სისტემებისათვისაა დამახასიათებელი.

ფერმენტთა თვითინაქტივაცია შეიძლება განხილულ იქნას, როგორც „აპოპტოზი“ (ბერძნ. „ფოთოლცვენა“) – „თვითმკვლელობა” ფერმენტულ დონეზე, რამდენადაც ამ დროს თავისუფალი რადიკალების გენერატორი ფერმენტი თვითონ გამოდის მწყობრიდან და უჯრედისათვის არასასურველი პროდუქტების წარმოქმნა საფუძველშივე ისპობა. არსებობს დამაჯერებელი მოსაზრება იმის შესახებ, რომ მოდიფიკაციის გზით ფერმენტთა ინაქტივაცია ჩართული უნდა იყოს შიდაუჯრედული ცილების ბრუნვის მექანიზმში, რომლის საშუალებითაც უჯრედიდან მათი მოლეკულების მოცილება რეგულირდება. ეს გარემოება უაღრესად მნიშვნელოვანია ყველა იმ სიტუაციისათვის, რომლებიც დაკავშირებულია ქსენობიოტიკებისა და სამკურნალწამლო საშუალებების ჭარბი რაოდენობის ორგანიზმიდან გამოდევნასთან. ჟანგბადოვანი რადიკალები ცილის აქტიურ ცენტრთან უშუალო სიახლოვეში მყოფი ამინომჟავური ნაშთების მოდიფიკაციის უნარს ამჟღავნებენ და ეს რეაქცია მეტად სპეციფიკურია. აქტიურ ცენტრში აღძრულმა სტრუქტურულმა ცვლილებებმა შეიძლება გამოიწვიონ კონფორმაციული ძვრები და პროტეოლიზისადმი მგრძნობიარობის გაზრდა.

კატალიზური ციკლის პროცესში ციტოქრომ P450-ის ინაქტივაცია სხვადასხვა გზით შეიძლება განხორციელდეს. ერთი მათგანი ამ ჰემოპროტეინის პეროქსი-კომპლექსის დაშლის შედეგად აქტიური, დროებითი სუბსტრატების წარმოქმნას უკავშირდება. ასეთ რეაქციისუნარიან ინტერმედიატებს მიეკუთვნებიან თავისუფალი ორგანული რადიკალები, ეპოქსიდები, N-ოქსიდები, S-ოქსიდები, ალდეჰიდები, კეტონები და სხვ. ისინი თავის მხრივ კოვალენტურად უკავშირდებიან აპოციტოქრომ P450-ს და მის მოდიფიკაციას იწვევენ. ინაქტივაციის ეს მექანიზმი შეინიშნება ზოგიერთი სუბსტრატის ჟანგვისას, რომლებიც შეუქცევადად აინჰიბირებენ ფერმენტს. სუბსტრატის რეაქციისუნარიანი ჯგუფების აქტივაციას თან ახლავს პროსთეტულ ჯგუფთან ან აპოფერმენტთან კოვალენტურად დაკავშირებული რეაქციისუნარიანი მეტაბოლიტების ფორმირება. ისეთ სუბსტრატებს, რომლებიც ციტოქრომ P450-ის ასეთი გზით ინაქტივაციას იწვევენ, „გამანადგურებელ“ სუბსტრატებს უწოდებენ.

ციტოქრომ P450-ის ინაქტივაციის მეორე მექანიზმი დაკავშირებულია კატალიზური ციკლის განხორციელებისას ფერმენტის აქტიურ ცენტრზე ჟანგბადის აქტიური ფორმების ($O_2^{\bullet-}$-ის $HO^{\bullet}$-სა და H_2O_2-ის) გენერირებასთან. ეს შეიძლება არაშეუღლებული მონოოქსიგენაზური რეაქციების შედეგიც იყოს, როდესაც NADPH-ის აღმდგენელი ექვივალენტები არასრულად ხმარდება ენდოგენური თუ ეგზოგენური ნაერთების ჰიდროქსილირებას.

სუბსტრატის ქიმიური ბუნებიდან გამომდინარე, ციტოქრომ P450-ის ინაქტივაცია სამი მექანიზმით შეიძლება განხორციელდეს. ესენია:

1. აპოფერმენტთან მეტაბოლიტების შეუქცევადი დაკავშირება;
2. ჰემის რკინასთან მეტაბოლიტების შეუქცევადი დაკავშირება;
3. ჰემის ალკილირება ან დესტრუქცია.

შესაძლოა აგრეთვე ადგილი ჰქონდეს პირველი და მესამე მექანიზმის კომბინირებულ მოქმედებას. ჰემის დაზიანებისას მოდიფიკაცია მის შექცევად ინაქტივაციას იწვევს, მაშინ როდესაც აპოფერმენტის მოდიფიკაცია შეუქცევადია.

ცხოველური და მცენარეული ციტოქრომ P450-ის თვითინაქტივაციაში ერთი არსებითი განსხვავება ვლინდება: ცხოველურ ჰემოპროტეინში ქიმიურ მოდიფიკაციას განიცდის ჰემი, ხოლო მცენარეულში — აპოფერმენტი. ცხოველურ ციტოქრომ P450-ში ჰემი ამ დროს სრულად იშლება, ფერმენტი მწყობრიდან გამოდის და კარგავს თავის კატალიზურ აქტივობას. სხვა ვითარებაა მცენარეული ციტოქრომ P450-ის შემთხვევაში. წარმოდგენილი ნაშრომის ავტორების მიერ ჩატარებულმა გამოკვლევებმა დამაჯერებლად აჩვენეს, რომ ჰემოპროტეინი ინაქტივაციას განიცდის, როგორც მონოოქსიგენაზა, მაგრამ ის იმავდროულად მაღალ პეროქსიდაზულ აქტივობას იძენს. ეს კანონზომიერება ციტოქრომ P450-ის არააქტიურ ციტოქრომ P420-ად კონვერსიის ფონზე ვლინდება. **მცენარეში პეროქსიდაზულ აქტივობას ციტოქრომ P420 ფლობს!**

ასეთ მდგომარეობაში მცენარეული უჯრედი, ერთი მხრივ, ცხოველურის მსგავსად, თავიდან იცილებს აგრესიული ინტერმედიატების გენერატორს — ციტოქრომ P450-ს, მეორე მხრივ კი ცხოველურისაგან განსხვავებით, მოდიფიცირებული ფერმენტი პეროქსიდაზას ფუნქციას ასრულებს. ამგვარად, ქიმიური მოდიფიკაციის გზით უჯრედი იძენს ფერმენტს, რომელსაც ერთდროულად ქსენობიოტიკების ჟანგვა და აგრესიული H_2O_2-ის ლიკვიდაცია შეუძლია. სწორედ ამაში უნდა მდგომარეობდეს ციტოქრომ P450-ის პეროქსიდაზად ტრანსფორმაციის ბიოლოგიური აზრი.

Chemical Modification of Cytochrome P450

Summary

For the last two decades, a very interesting phenomena, which is known as the phenomena of chemical modification of enzyme, has become the subject of keen interest of biochemists and namely of enzymologists. It is revealed by full or partial ceasing (inactivation) of enzymatic activity or by change (transformation) of the mechanism of activity. Especially are modified enzymes, connected with generation or realization of free radicals, oxygen active species and intermediates with high activity. In general, chemical modification is characteristic of oxidizing systems.

Self-inactivation of enzymes can be discussed as "Apoptosis" (Greek "leaf fall") – "Suicide" on enzymatic level, as during this process, enzyme, generating free radicals is destructed, and formation of products undesirable for cell is ceased instantly. There is a corroborative supposition that via modification, inactivation of enzymes must be inserted into the mechanisms of intracellular proteins circulation, which regulates move out of proteins molecules from the cell. This fact is very important in all situations linked with the release of redundants of xenobiotics and other medicaments from the organism. The oxygenic radicals have potential to modify amino acid residue, locating near enzyme active site and this reaction is very specific. The structural changes, evoked in the active site can induce conformation changes and intensify the sensitivity towards proteolysis.

Inactivation of Cytochrome P450 in the process of catalytic cycle can be accomplished via different pathways. One of them is linked with the process of formation of active temporary substrates due to destruction of peroxy-complex of hemoprotein. Such reactive intermediates are free organic radicals, epoxides, N-oxides, S-oxides, aldehydes, ketones, etc. They are covalently bound with apocytochrome P450 and cause its modification. Such mechanism of inactivation is detected at oxidation of substrates, which inhibit enzyme irreversibly. Activation of reactive substrates is accompanied by formation of reactive metabolites, covalently bound with prosthetic group or apoenzyme. Substrates inducing cytochrome P450 inactivation via such pathway are called "suicide" substrates. The second mechanism of cytochrome P450 inactivation is linked with generation of oxygen active forms ($O_2^{\bullet -}$, $HO^{\bullet}$, H_2O_2), due to catalytic cycle on enzyme active site. It can be the result of uncoupled monooxygenase reactions, when NADPH reducing equivalents are not completely consumed for hydroxylation of endogenous or exogenous substrates. According to chemical nature of the substrate, inactivation of cytochrome P450 can be accomplished via following three mechanisms:

1. Metabolites irreversible binding with apoenzyme;
2. Metabolites irreversible binding with hem iron;
3. Hem alkylation or destruction.

The first and the third mechanisms can be combined. Modification as a result of hem destruction causes reversible inactivation, but modification of apoenzyme is irreversible.

There is one significant difference revealed between self-inactivation of animal and plant cytochromes P450: The subject of chemical modification in animal hemprotein is an hem, but in plant apoenzyme is modified. In animal cytochrome P450 hem is fully destructed, the enzyme is damaged and looses its catalytic activity. Another picture is seen in case of plant cytochrome P450. Investigations of the authors of the presented work confirmed that hemoprotein is inactivated as a monooxygenase, but simultaneously acquires high peroxidase activity. This regularity is revealed at the conversion of cytochrome P450 into inactive cytochrome P420. **In plants cytochrome P420 have the peroxidase activity!**

In such state plant cell, on the one hand, similar to animal cell avoids generator of aggressive intermediates as a cytochrome P450, and on the other hand, unlike the animal cell, the modified enzyme acts as peroxidase in plant cell. Via chemical modification the cell acquires enzyme, capable to oxidize xenobiotics and liquidate simultaneously aggressive H_2O_2. This must be the biological sense of transformation of cytochrome P450 into peroxidase.

Химическая модификация цитохрома P450

Резюме

На протяжении последних двух десятилетии предметом интенсивного исследования биохимиков и, в частности, энзимологов, стало весьма интересное явление, известное как феномен химической модификации фермента. Оно проявляется в полном или неполном прекращении (инактивации), или изменении механизма действии (трансформации) активности фермента. Модификации особенно подлежат те ферменты, функционирование которых связано с генерацией или реализацией свободных радикалов, активных форм кислорода и реакционноспособных интермедиатов. Если обобщить, феномен химической модификации, в первую очередь, характерен для оксидазных систем.

Самоинактивацию ферментов можно рассматривать, как «Апоптоз» (по греч. – «Листопад») – «самоубийство» на уровне фермента, так как при этом процессе фермент, генерирующий свободные радикалы, выходит из строя, чем блокируется основа образования нежелательных для клетки продуктов. Существует убедительные доводы, что инактивация ферментов путем химической модификации включена в механизм оборота внутриклеточных белков, с помощью которого регулируется удаление белковых молекул из клетки. Это обстоятельство является весьма значительным для всех случаев, связанных с выведением из организма ксенобиотиков и избытка лекарственных средств. Кислородные радикалы способны модифицировать аминокислотные остатки, находящиеся в непосредственной близости активного центра фермента, и эта реакция весьма специфичная. Структурные изменения, возникшие в активном центре, могут вызывать конформационные сдвиги и повышение чувствительности к протеолизу.

В процессе каталитического цикла инактивация цитохрома P450 осуществляется разными путями. Один из них связан с образованием активных временных субстратов, в результате разрушения перокси-комплекса данного гемопротейна. К таким реакционноспособным интермедиатам относятся свободные органические радикалы, эпоксиды, N-оксиды, S-оксиды, альдегиды, кетоны и др. Они в свою очередь ковалентно связываются с апоцитохром P450 и вызывают модификацию фермента. Такого рода механизм инактивации наблюдается при окислении субстратов, необратимо ингибирующих фермент. Активацию реакционноспособных групп субстратов сопутствует формирование реакционноспособных метаболитов, ковалентно-связанных с простетическими группами или апоферментом. Субстраты, вызывающие таким путем инактивацию цитохрома P450, называются «суицидными».

Второй механизм инактивации цитохрома P450 связан с генерацией активных форм кислорода ($O_2^{\bullet -}$, $HO^{\bullet}$, H_2O_2) на активном центре фермента при осуществлении каталитического цикла. Это может быть результатом несопряженных монооксигеназных реакций, когда восстановительные эквиваленты NADPH неполно употребляются на гидроксилирование эндогенных и экзогенных субстратов. Исходя из химической природы субстрата, инактивация цитохрома P450 может осуществиться тремя механизмами:

1. Необратимое связывание метаболитов с апоферментом;
2. Необратимое связывание метаболитов с железом гема;
3. Алкилирование или деструкция гема.

Возможно также комбинированное действие первого и третьего механизмов. Модификация гема при его повреждении вызывает обратимую инактивацию, тогда как модификация апофермента является необратимым процессом.

Разница между самоинактивациями животного и растительного цитохрома P450 весьма существенна. В животном гемопротейне химической модификации подвергается гем, а в растительной – апофермент. Гем животного цитохрома P450 полностью разрушается, фермент выходит из строя и теряет свою каталитическую активность. Другое обстоятельство в случай растительного цитохрома P450. Исследования авторов представленной работы убедительно

показывают, что гемопротейн инактивируетсяб как монооксигеназа, но он при этом приобретает высокую пероксидазную активность. Эта закономерность проявляется на фоне конверсии цитохрома Р450 в. **В растениях пероксидазной активностью обладает цитохром Р420!**

В таком состоянии растительная клетка, с одной стороны, как и животная, избавляется от генератора агрессивных интермедиатов – цитохрома Р450, с другой стороны, в отличие от животного, модифицированный фермент выполняет функцию пероксидазы. Путем химической модификации клетка приобретает фермент, способный одновременно окислять ксенобиотики и ликвидировать агрессивный H_2O_2. Именно в этом и состоит биологическая суть трансформации цитохрома Р450 в пероксидазу.

ლიტერატურა

1. Arcakov, A.I., Bachmanova, G.I. Cytochrome P-450 and Active Oxygen. London, Taylor & Francis, 1990, 170-481.
2. Karuzina, I.I., Archakov, A.I. The oxidative inactivation of cytochrome P-450 in monooxygenase reactions. Free Radic. Biol. Med., 1993, 16, 73-97.
3. Ruckpaul, K., Rein, H., Blanck, J. Regulation of the activity of the hepatic endoplasmic cytochrome P-450. In: Basis and mechanisms of regulation of cytochrome P-450 (Ruckpaul, K., Rein, H. eds.). Berlin, Academie-Verlag, 1989, 1, 1-65.
4. Archakov, A.I., Zhukov, A.A. Multiple activities of cytochrome P-450. Stoichiometrical approach. In: Drug Metabolism—from Molecules to Man, London, Taylor & Francis, 473-476. In: Basis and mechanisms of regulation of cytochrome P-450 (Ruckpaul, K., Rein, H., eds.). Berlin, Academie-Verlag, 1989, 1, 1-65.
5. Zhukov, A. A., Blanck, J., Ristau,O., Ruckpaul, K., Arcakov, A.I. Stoichiomerty of cytochrome P-450-catalized oxygenase and oxidase reactions. Correlations with the spin state of the ferric heme. In: Cytochrome P-450: Biochemistry and Biophysics (Schuster, J., eds.). London, Taylor & Francis, 1989, 85-88.
6. Halpert, J.R., Balfour, C., Miller, N.E., Kaminsky, L.S. Dichloromethyl compounds as mechanism-based inactivators of rat liver cytochromes P-450 in vitro. Mol. Pharmacol., 1986, 30, 19-24.
7. Stevens, J.C., Halpert, J. Selective inactivation of four rat liver microsomal androstenedione hydroxylases by chloramphenicol analogs. Mol. Pharmacol., 1988, 33, 103-110.
8. Ortiz de Montellano, P.R., Mico, B.A., Mathews, J.M., Kunze, K.L., Miwa, G.T., Lu, A.Y. Selective inactivation of cytochrome P-450 isozymes by suicide substrates. Arch. Biochem. Biophys., 1981, 210, 717-728.
9. Ortiz de Montellano, P.R., Reich, N.O. Catalyst-dependent inhibition of cytochrome P-450 enzyme. In: Cytochrome P-450: Structure, Mechanism and Biochemistry (Ortiz de Montellano P.R., ed.). New York, Plenum Press, 1986, 273-314.
10. Ortiz de Montellano, P.R. Cytochrome P-450 catalysis: radical intermediates and dehydrogenation reactions. Trends Pharmacol. Sci., 1989, 10, 354-359.
11. Reed, C.J., Lock, E.A., De Matteis, F. Olfactory cytochrome P-450. Studies with suicide substrates of the haemoprotein. Biochem. J., 1988, 253, 569-576.
12. Guengerich, F.P., Willard, R.J., Shea, J.P., Richards, L.E., Macdonald, T.L. Mechanism-based inactivation of cytochrome P-450 by heteroatom-substituted cyclopropanes and formation of ring-opened products. J. Amer. Chem. Soc., 1984, 106, 6446-6447.
13. Guengerich, F.P., Bцcker, R.H. Cytochrome P-450-catalyzed dehydrogenation of 1,4-dihydropyridines. J. Biol. Chem., 1988, 263, 8168-8175.
14. Guengerich, F.P. Mechanism-based inactivation of human liver microsomal cytochrome P-450 IIIA4 by gestodene. Chem. Res. Toxicol., 1990, 3, 363-371.
15. Farrell, G.C., Correia, M.A. Structural and functional reconstitution of hepatic cytochrome P-450 in vivo. Reversal of allylisopropylacetamide-mediated destruction of the hemoprotein by exogenous heme. J. Biol. Chem., 1980, 255, 10128-10133.
16. Bornheim, L.M., Underwood, M.C., Caldera, P., Rettie, A.E., Trager, W.F., Wrighton, S.A., Correia, M.A. Inactivation of multiple hepatic cytochrome P-450 isozymes in rats by allylisopropylacetamide: mechanistic implications. Mol. Pharmacol., 1987, 32, 299-308.
17. Bachmanova, G.I., Pogodina, O.K., Kanaeva, I.P., Archakov, A.I. The inactivation of the reduced cytochrome P-450. In: Biochemistry, Biophysics and Regulation of Cytochrome P-450

(Gustafsson, J.A., Carlstedt-Duke, Mode, A, Rafter, J., eds.). Amsterdam, Elsevier Biomedical Press, 1980, 599-602.

18. Bachmanova, G.I., Uvarov, V.V., Kanaeva, I.P., Archakov, A.I. Suicide inactivation of reduced cytochrome P-450 in soluble and membrane-bound states. In: Cytochrome P-450, Biochemistry, Biophysics and Environmental implications (Hietanen, E., Laitinen, M., Hanninen, O., eds.). Amsterdam, Elsevier Biomedical Press, 1982, 599-602.
19. Ingelman-Sundberg, M., Paul, K.G. Heme release from rabbit liver microsomal cytochrome P-450 LM2. Acta Chem. Scand. B., 1986, 40, 233-234.
20. Levine, R.L. Oxidative modification of glutamine synthetase. II. Characterization of the ascorbate model system. J. Biol. Chem., 1983, 258, 11828-11833.
21. Levine, R.L., Oliver, C.N., Fulks, R.M., Stadtman, E.R. Turnover of bacterial glutamine synthetase: oxidative inactivation precedes proteolysis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 1981, 78, 2120-2124.
22. Oliver, C.N., Fucci, L., Levine, R.L., Wittenberger, M.E., Stadtman, E.R. Inactivation of key metabolic enzymes by P-450 linked mixed function oxidation systems. In: Cytochrome P-450, Biochemistry, Biophysics and Environmental implications (Hietanen, E., Laitinen, M., Hanninen, O., eds.). Amsterdam, Elsevier Biomedical Press, 1982, 531-538.
23. Rivett, A.J., Levine, R.L., Stadtman, E.R. Mixed function oxidation of proteins can modify multiple amino-acid leading to varying effects on the protein. Fed. Proc., 1985, 44, 1399.
24. Метелица, Д.И. Активация кислорода ферментными системами. М., Наука, 1982, 249 с.
25. Ляхович, В.В., Цырлов, И.Б. Структурные аспекты биохимии монооксигеназ. Новосибирск, Наука, 1978, 236 с.
26. CaJacob, C.A., Chan, W.K., Shephard, E., Ortiz de Montellano, P.R. The catalytic site of rat hepatic lauric acid ω-hydroxylase: Protein versus prostetic heme alkylation in the ω-hydroxylation of acetylenic fatty acids. J. Biol. Chem., 1988, 263, 18640-18649.
27. Helvig, C., Tardif, F.J., Seyer, A., Powles, S.B., Mioskowski, C., Durst, F., Salaьn, J.P. Selevtive inhibition of a cytochrome P450 enzyme in wheat that oxides both the natural substrate lauric acid and the synthetic herbicide diclofop. Pestic. Biochem. Physiol., 1996, 54, 161-171.
28. Helvig, C., Alayrac, C., Mioskowski, C., Koop, D.P., Durst, F., Salaьn, J.P. Suicide inactivation of cytochrome P450 by middle chain and terminal acetylenes. Biochemistry and Molecular Biology, 1997, 3, 414-421.
29. Khatisashvili, G., Kurashvili, M., Gordeziani, M., Kvesitadze, G. Monooxygenase and peroxшdase pathwayes of xenobiotics detoxication in higher plants. Fresenius Environmental Bulletin, 1993, 2, 103-108.
30. Yamazaki, I., Yokota, K. Oxidation states of peroxidase. Mol. Cell Biochem., 1973, 2, 39-52.
31. George, P. The chemical nature of the second hydrogen peroxide compound formed by cytochrome c peroxidase and horseradish peroxidase. I. Titration with reducing agents. Biochem. J., 1953, 54, 267-276.
32. Chance, B. The enzyme-substrate compounds of horseradish peroxidase and peroxides; kinetics of formation and decomposition of the primary and secondary complexes. Arch. Biochem., 1949, 22, 224-252.
33. Dolphin, D., Forman, A., Borg, D.C., Fajer, J., Felton, R.H. Compounds I of catalase and horse radish peroxidase: pi-cation radicals. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 1971, 68, 614-618.
34. Ингрем, Л. Механизмы биохимических реакций. М., Мир, 1964, 100-116.
35. Kaneko, Y., Tamura, M., Yamazaki, I. Formation of porphyrin pi cation radical in zinc-substituted horseradish peroxidase. Biochemistry, 1980, 19, 5795-5799.

36. Саундерс, Б.К. Пероксидазы и каталазы. В кн: Неорганическая биохимия. М., Мир, 1978, 2, 434-470.
37. Groves, J.T., Nemo, T.E., Myers, R.S. Hydroxylation and epoxidation catalyzed by iron-porphine complexes. Oxygen transfer from iodosylbenzene. J. Amer. Chem. Soc., 1979, 101, 1032-1033.
38. Chang, C.K., Kuo, M.S. Reaction of iron(III) porphyrins and iodosoxylene. The active oxene complex of cytochrome P-450. J. Amer. Chem. Soc., 1979, 101, 3413-3415.
39. Hill, C.L., Schardt, B.C. Alkane activation and functionalization under mild conditions by a homogeneous manganese(III)porphyrin-iodosylbenzene oxidizing system. J. Amer. Chem. Soc., 1980, 102, 6374-6375.
40. Groves, J.T., Kruper, W.J., Haushalter, R.C. Hydrocarbon oxidations with oxometalloporphinates. Isolation and reactions of a (porphinato)manganese(V) complex. J. Amer. Chem. Soc., 1980, 102, 6375-6377.
41. Chin, D.H., Balch, A.L., La Mar, G.N. Formation of porphyrin ferryl (FeO2+) complexes through the addition of nitrogen bases to peroxo-bridged iron(III) porphyrins. J. Amer. Chem. Soc., 1980, 102, 1446-1448.
42. Chin, D.H., Del Gaudio, J., La Mar, G.N., Balch, A.L. Detection and characterization of the long-postulated iron-dioxygen-iron intermediate in the autoxidation of ferrous porphyrins. J. Amer. Chem. Soc., 1977, 99, 5486-5488.
43. Chin, D.H., La Mar, G.N., Balch, A.L. Mechanism of autoxidation of iron(II) porphyrins. Detection of a peroxo-bridged iron(III) porphyrin dimer and the mechanism of its thermal decomposition to the oxo-bridged iron(III) porphyrin dimer. J. Amer. Chem. Soc., 1980, 102, 4344-4350.
44. Chin, D.H., La Mar, G.N., Balch, A.L. Role of ferryl (FeO2+) complexes in oxygen atom transfer reactions. Mechanism of iron (II) porphyrin catalyzed oxygenation of triphenylphosphine. J. Amer. Chem. Soc., 1980, 102, 5945-5947.
45. Hrycay, E.C., O'Brien, P.J. Cytochrome P-450 as a microsomal peroxidase in steroid hydroperoxide reduction. Arch. Biochem. Biophys., 1972, 153, 480-94.
46. Bidlack, W.R., Hochstein, P. Hydroperoxide peroxidase activity in liver microsomes. Life Sci., 1974, 14, 2003-20010.
47. Shinohara, A., Kamataki, T., Ichimura, Y., Opochi, H., Okuda, K., Kato, R. Drug oxidation activities of horse-redish peroxidase, myoglobin and cytochrome P-450cam reconstituted with synthetic hemes. Jap. J. Pharmacol., 1984, 45, 107–114.
48. Диксон. М., Уэбб, Э. Ферменты. М., Иностранная литература, 1961, 350-353.
49. Rahimtula, A.D., O'Brien, P.J. The role of cytochrome P-450 in the hydroperoxide-catalyzed oxidation of alcohols by rat-liver microsomes. Eur. J. Biochem., 1977, 77, 201-208.
50. Metelitza, D.I., Akhrem, A.A., Erjomin, A.N., Kissel, M.A., Usanov, S.A. The mechanism of hydroperoxide-dependent reactions with participation of cytochrome P-450. Acta Biol. Med. Ger., 1979, 38, 511-518.
51. Jeffery, E., Kotake, A., Azhary, R.E. Effects of linoleic acid hydroperoxide on the hepatic monooxygenase systems of microsomes from untreated, phenobarbital-treated, and 3-methylcholanthrene-treated rats. Mol. Pharmacol., 1977, 13, 415-425.
52. Sies, H., Grosskopf. Oxidation of cytochrome b5 by hydroperoxides in rat liver. Eur. J. Biochem., 1975, 57, 513-520.
53. Archakov, A.I., Karuzina, I.I., Kokareva, I.S., Bachmanova, G.I. The effect of magnesium ions on the diemthylaniline oxidation rate and electron transfer in liver microsomal fraction. Biochem. J., 1973, 136, 371-379.

54. Archakov, A.I., Karuzina, I.I., Tveritinov, V.N., Kokareva, I.S. Hydroxylation of aniline and aminoantipyrine (1-phenyl-2,3-dimethyl-aminopyrasolon-5) derivatives in liver endoplasmatic reticulum. Biochem. Pharmac., 1974, 23, 1053-1063.
55. Fouts, J.R., Pohl, R.J. Further studies on the effects of metal ions on rat liver microsomal reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-cytochrome P-450 reductase. J. Pharmacol. Exp. Ther., 1971, 179, 91-100.
56. Peters, M.A., Fouts, J.R. A study of some possible mechanisms by which magnesium activates hepatic microsomal drug metabolism in vitro. J. Pharmacol. Exp. Ther., 1970, 173, 233-241.
57. Saunders, B.C., Watson, G.H. Studies in peroxidase action; the oxidation of 4-methoxy-2:6-dimethylaniline. Suggestions for a mechanism. Biochem. J., 1950, 46, 629-633.
58. Archakov, A.I., Karuzina, I.I., Kokareva, I.S., Bachmanova, G.I. The effect of magnesium ions on the dimethylaniline oxidation rate and electron transfer in liver microsomal fraction. Biochem. J., 1973, 136, 371-379.
59. Хатисашвили, Г.А., Курашвили, М.В., Чхиквишвили, И.Д., Гордезиани, М.Ш., Квеситадзе, Г.И. Трансформация монооксигеназного механизма в пероксидазный и микросомальное окисление флавоноидов в растений. Известия АН Грузии, серия биологическая, 1993, 19, 318-323.
60. Khatisashvili, G., Gordeziani, M., Kvesitadze, G., Korte, F. Plant monooxygenases: participation in xenobiotic oxidation. Ecotoxicology and Environmental Safety, 1997, 36, 118-122.
61. Гордезиани, М., Хатисашвили, Г. Мембранная ксенобиохимия. 2005, Тбилиси, Аграрикоси, 281 с. (на Груз.)
62. Kiskeidze, E., Zaalishvili, G., Ebelashvili. M., Khatisashvili, G., Kurashvili, M., Gordeziani, M. Changes of plant monooxygenase system during xenobiotics oxidation. Proc.Georg.Acad.Sci.,Biol.Ser.A., 2003, 29, 639-644.
63. Wood, A.W., Smith, D.S, Chang, R.L., Huang, M.T., Conney, A.H. Plant flavonoids in biology and medicine: biochemical, pharmacological and structure-activity relationship. 1986, 195-210.
64. Жуков, А.А., Арчаков, А.И. стехиометрия реакций микросомального окисления. Распределение редокс-эквивалентов между монооксигеназными и оксидазными реакциями, катализируемыми цитохромом Р-450. Биохимия, 1985, 50, 1939-1952.
65. Хатисашвили, Г.А. Растительные монооксигеназы: детоксикация ксенобиотиков и внутриклеточная энергетика. Докторская дисс., 1999, Тбилиси.
66. Grand, C. Ferulic acid 5-hydroxylase: a new cytochrome P-450-dependent enzyme from higher plant microsomes involved in lignin synthesis. FEBS Letters, 1984, 1969, 7-11.
67. Heller, W., Kьhnl, T. Elicitor induction of a microsomal 5-O-(4-coumaroyl) shikimate 3'-hydroxylase in parsley cell suspension cultures. Arch.Biochem.Biophys., 1985, 241, 453-460.
68. Werck-Reichhart, D., Gabriac, B., Teutsch, H.G., Durst, F. Two cytochrome P-450 isoforms catalysing O-deethylation of ethoxycoumarin and ethoxyresofurin in higher plants. Biochem.J., 1990, 170, 729-735.
69. Durst, F. Physiology and biochemistry of plant cytochrome P-450. In Frontiers in Biotransformation, vol. 4, Berlin, Akademy Verlag, 1991, 191-232.
70. Khatisashvili, G., Kurashvili, M., Gordeziani, M., Kvesitadze, G. (1994) Functional evalution of separate components of plant monooxygenase system involved in xenobiotic detoxication. Fresenius Environmental Bulletin, 3, 621-626.
71. Гордезиани, М.Ш., Дурмишидзе, С.В., Бобохидзе, Е.А., Ломидзе, Э.П. Микросомальное деметилирование диметиланилина и п-нитроанизола в смешанной системе растительные микросомы-митохондрии. Известия АН Грузии, серия биологическая, 1986, 12, 42-46.

72. Gordeziani, M., Khatisashvili, G., Ananiashvili, T., Varazashvili, T., Kurashvili, M., Kvesitadze, G., Tkhelidze, P. Energetic significance of plant monooxygenase individual components partisipating in xenobiotic degradation. International Biodeterioration and Biodegradation, 1999, 44, 49-54.

73. Арчаков, А.И., Карякин, А.В., Скулачев, В.П. Перенос электронов между мембранами микросом и митохондрии. ДАН СССР, 1973, 209, 221-223.

74. Арчаков, А.И. Девиченский, В.М. Перенос электронов в мембранах эндоплазматического ретикулума: Участие цитохрома b5 в реакциях окисления NADPH. Биохимия, 1974, 39, 691-699.

75. Арчаков, А.И., Карякин, А.В., Скулачев, В.П. Межмембранный транспорт электронов в отсутствии растворимых переносчиков. ДАН СССР, 1974, 217, 1423-1426.

76. Чистяков, В.В., Поспелова, Л.Н. Перенос электронов от митохондрии к микросомам в реконструированной системе клеточных органелл. Биохимия, 1982, 47, 55-61.

77. Скулачев, В.П. Энеретика биологических мембран. М., Наука, 1989, 409 с.

78. Stiborova M, Anzenbacher P (1991) What are the principal enzymes oxidizing the xenobiotics in plants: cytochrome P-450 or peroxidase? Gen Physiol 10: 209–216

79. Shinohara A, Kamataki T, Ichimura Y, Opochi H, Okuda K, Kato R (1984) Drug oxidation activities of horse-redish peroxidase, myoglobin and cytochrome P-450cam reconstituted with synthetic hemes. Jap J Pharmacol 45: 107–114.

80. Wilson L, Williamson T, Gronowski J, Gentile GI, Gentile JM (1994) Characterization of 4-nitro-o-phenylen-di-am-ine activities by plant systems. Mutation Res 307: 185–193.

81. Laurent FMG (1994) Chloroaniline peroxidation by soybean peroxidases. Pestic Sci 40: 25–30

82. Sandermann H (1994) Higher plant metabolism of xenobiotics: the “green liver” concept. Pharmacogenetics 4: 225–241.

83. Adamia, G., Ghoghoberidze, M., Graves, D., Khatisashvili, G., Kvesitadze, G., Lomidze, E., Ugrekhelidze, D., Zaalishvili, G. Absorption, distribution and transformation of TNT in higher plants. Ecotoxicol. Environ. Saf., 2006, 64, 136–145.

84. Varazashvili T., Khatisashvili G., Kurashvili M., Pruidze M., Ananiashvili T., Zaalishvili G., Gordeziani M. Nitrobenzene oxidizing enzymes in plant cells. Journal of Biological Physics and Chemistry. 2001, 1, 85–88.

85. Kurashvili M., Pruidze M., Kiskeidze E., Varazashvili T., Ananiashvili T., Khatisashvili G., Gordeziani M. Influence of different factors on nitrobenzene oxidation in the plant cell. J. Biological Physics and Chemistry. 2003, 3, 45–49.

86. Pruidze, M., Khatisashvili, G., Omiadze, N. Oxidation of organic xenobiotics by phenoloxidase from tea leaves. Annals of Agrarian Science, 2006, 4, 69-72.