

მ. გორდეზიანი, გ. ხატისაშვილი

მემბრანული ქსენობიოქიმია

მეორე გამოცემა

თბილისი
2008

საქართველოს მეცნიერებათა აკადემიის ს. დურმიშიძის
სახ. ბიოქიმიისა და ბიოტექნოლოგიის ინსტიტუტი
ბიოლოგიური ჟანგვის ლაბორატორია

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

Georgian Academy of Sciences
Durmishidze Institute of Biochemistry and Biotechnology
Biological Oxidation Laboratory

ISBN 978-9941-0-0506-0

М. Гордезиани, Г. Хатисашвили

Мембранная
ксенобиохимия

Второе издание

M. Gordeziani, G. Khatisashvili

Membranous
Xenobiochemistry

2nd edition

Тбилиси - 2008 - Tbilisi

გორდენიანი მარლენ შალვას ძე ხატისაშვილი გაია აღფეზის ძე

წინამდებარე წიგნის მომზადების აუცილებლობა იმ ვითარებამ განაპირობა, რომ მემბრანული ქსენობიოქიმიის სფეროში ბოლო 2–3 ათეული წლის მანძილზე უაღრესად მრავალმხრივი ფაქტობრივი მასალა დაგროვდა, რომელიც თავის მხრივ სათანადო განზოგადებას და სისტემაში მოყვანას საჭიროებდა. ცოცხალ ორგანიზმებზე უცხო ნაერთთა (ქსენობიოტიკთა) ზემოქმედების თანმხლები ბიოქიმიური ძვრები და საპასუხო რეაქციები სადღეისოდ სამეცნიერო ლიტერატურაში, სამწუხაროდ, არასრულადაა ასახული. ქსენობიოქიმიის ყველა საკვანძო საკითხის ყოველმხრივი ანალიზის პრეტენზია არც ამ მონოგრაფიას გააჩნია. მასში ძირითადად განხილულია მემბრანებში მიმდინარე ქსენობიოტიკთა ჟანგვითი მეტაბოლიზმი, ამ პროცესში მონაწილე მონოოქსიგენაზური ტიპის ფერმენტული სისტემები, მათი მოლეკულური ორგანიზაცია და კატალიზურ აქტივობათა რეგულაცია.

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

ავტორები თავის სასიამოვნო მოვალეობად თვლიან დიდი მადლობა გადაუხადონ საქართველოს მეცნიერებათა აკადემიის ს. ღურმიშვილის სახ. ბიოქიმიისა და ბიოტექნოლოგიის ინსტიტუტის ბიოლოგიური ჟანგვის ლაბორატორიის თანამშრომლებს, ბიოლოგიის მეცნიერებათა კანდიდატებს: მ. ფრუიძეს, თ. ანანიაშვილს, მ. ყურაშვილს, თ. ვარაზს და გ. ადამიას წიგნის მომზადებისას გაწეული დიდი დახმარებისათვის.

ავტორები მადლიერების გრძნობით მიიღებენ ყველა პრინციპულ და საქმიან შენიშვნას, რომელიც დაებადება მკითხველს წიგნის გაცნობისას.

რედაქტორი: საქართველოს მეცნიერებათა აკადემიის
აკადემიკოსი, გ. კვესიტაძე

რეცენზენტები: საქართველოს მეცნიერებათა აკადემიის
აკადემიკოსი, ნ. ნუსტუბიძე

საქართველოს მეცნიერებათა აკადემიის
წევრ-კორესპონდენტი, დ. უგრეჭელოძე

შესავალი	8
თაპი 1. ენდოპლაზმური მემბრანების შემადგენლობა და სტრუქტურა	15
1.1 ენდოპლაზმური მემბრანა – უჯრედის სტრუქტურული და ფუნქციური ერთეული	15
1.1.1 ენდოპლაზმური მემბრანის ცილური კომპონენტი	21
1.1.1.1 მემბრანის პერიფერიული ცილები	21
1.1.1.2 ინტეგრალური მემბრანული ცილები	22
1.1.1.3 ლიპიდებთან კოვალენტურად ბმული ცილები	23
1.1.2 მიკროსომული ოქსიდორედუქტაზები	23
1.1.3 ენდოპლაზმური მემბრანის ფოსფატაზები	29
1.1.3.1 არასპეციფიკური ესთერაზა	31
1.2 ენდოპლაზმური მემბრანის ლიპიდური კომპონენტები	32
1.2.1 ფოსფოლიპიდების ამფიფილურობა და მათი შიდამემბრანული ორიენტაცია	39
1.2.1.1 ფაზური გადასვლები	44
1.2.1.2 ორმაგი შრის დენადობა და ძერადობა	45
1.2.2 ცხიმოვანი მჟაეები	46
1.2.3 აცილგლიცერიდების ბიოდევრადცია	49
1.2.4 ბიოლოგიურ მემბრანებში ლიპიდთა ზეჟანგური ჟანგვა	51
1.2.4.1 ფერმენტული ზეჟანგური ჟანგვა მიკროსომებში	56
1.2.4.2 ფერმენტული ზეჟანგური ჟანგვა მიტოქონდრიის მემბრანებში	59
1.2.4.3 ცხიმოვან მჟაეთა როლი ორგანიზმის დაბალტემპერატურულ ადაპტაციაში	61
1.2.4.4 ცილა-ლიპიდური ურთიერთქმედება ენდოპლაზმურ მემბრანებში	63
1.2.4.5 მაჰიდროქსილირებელ სისტემათა „კლასტერული“ წყობის შესახებ ...	67
1.2.5 ენდოპლაზმური მემბრანების ლიპიდური კომპონენტებისა და ოქსი- გენაზების ურთიერთობის ბიოქიმიური ევოლუცია	70
1.2.5.1 ენდოპლაზმური მემბრანების სტეროლური კომპონენტი (ქოლესტეროლი)	72
1.2.5.2 მიტოქონდრიული მემბრანის სტეროლმაჰიდროქსილირებელი მონო- ოქსიგენაზა	184
1.3 ქსენობიოტიკთა მემბრანული ტრანსფორმაცია და კონიუგაცია	94
1.3.1 ქსენობიოტიკთა შეთვისება ორგანიზმის მიერ და მათი მემბრანული ტრანსპორტი	94
1.3.2 განაწილების კოეფიციენტი და ჰიდროფობული დაკავშირება	106

1.3.3 ენდოპლაზმური მემბრანების ურიდინდიფოსფატგლუკურონილ-ტრანსფერაზა (EC 2.7.7.9)	109
თავი 2. მიკროსომული ელექტრონის სატრანსპორტო სისტემები	116
2.1 მემბრანული ოქსიდაზები და მათი როლი ქსენობიოქიმიში	116
2.1.1 ოქსიგენაზები	118
2.2 რედუქტაზები	122
2.2.1 NADPH-ციტოქრომ P450-რედუქტაზა (EC 1.6.2.4)	122
2.2.2 NADH-ციტოქრომ b_5 -რედუქტაზა (EC 1.6.2.2)	128
2.3 ციტოქრომ b_5	132
2.4 ფოსფოლიპიდი – მიკროსომული მემბრანის ელექტრონის სატრანსპორტო სისტემის აუცილებელი კომპონენტი	136
2.5 ციტოქრომ P450	137
2.5.1 აღნაგობა და თვისებები	137
2.5.2 ციტოქრომ P450-ის მრავლობითი ფორმები და თანამედროვე ნომენკლატურა	155
2.5.3 ციტოქრომ P450-ის მოქმედების მექანიზმი	166
2.5.4 ციტოქრომ P450-ით კატალიზებული რეაქციები	174
თავი 3. ქსენობიოტიკთა ციტოქრომ 450-დამოკიდებულ ჟანგვის პროცესთა რეგულაცია	192
3.1 რეგულაცია მემბრანულ დონეზე	193
3.1.1 მემბრანული ფოსფოლიპიდების გავლენა ციტოქრომ P450-ის მეორეულ სტრუქტურაზე და აქტივობაზე	193
3.1.2 მემბრანული ფოსფოლიპიდების როლი NADPH-ციტოქრომ P450-რედუქტაზისა და ციტოქრომ P450-ის ურთიერთქმედებაში	195
3.1.3 NADH-ციტოქრომ b_5 -რედუქტაზისა და ციტოქრომ b_5 -ის ფოსფოლიპიდდამოკიდებულება	202
3.1.4 ენდოპლაზმურ მემბრანებში ქსენობიოტიკთა მჟანგველი ფერმენტები და ლიპიდები ერთიან დინამიკურ სისტემას ქმნიან	207
3.1.5 ლიპიდების ფერმენტული პეროქსიდაცია და ქსენობიოტიკების ჟანგვა ენდოპლაზმურ მემბრანებში ერთი და იგივე ელექტრონის სატრანსპორტო სისტემით კატალიზდება	212
3.2 რეგულაცია აღმდგენელი ექვივალენტების დონეზე	219
3.2.1 მიკროსომულ მემბრანებში ელექტრონთა სატრანსპორტო გზებს შორის ურთიერთქმედება	219
3.2.2 მიკროსომის NADPH-სპეციფიკურ რედოქს-ჯაჭვსა და მიტოქონდრიის ციტოქრომოქსიდაზურ სისტემას შორის ელექტრონთა ტრანსმემბრანული ცვლა	224

3.2.2.1 მიტოქონდრიული კონტროლი	225
3.2.2.2 NADPH-ის თავისუფალი ჟანგვა მიკროსომებში	230
3.3 რეგულაცია სუბსტრატულ დონეზე	233
3.4 რეგულაცია ინდუქციის დონეზე	238
3.5 რეგულაცია ციტოქრომ P450-ის ქიმიური მოდიფიკაციის დონეზე	242
დამატება: 4. ზოგიერთი მეთოდური მიდგომა	254
4.1 კვლევის ობიექტები	254
4.1.1 მიკროსომული ფრაქციის მიღება ცხოველის ღვიძლიდან	254
4.1.2 მიკროსომების მიღება მცენარეული ობიექტებიდან	255
4.2 მონოქსიგენაზური სისტემის ცალკეული კომპონენტების განსაზღვრა	257
4.2.1 ციტოქრომული კომპონენტების რაოდენობრივი განსაზღვრა	257
4.2.2 NADPH-ციტოქრომ P450-რედუქტაზის აქტივობის განსაზღვრა	257
4.3 მონოქსიგენაზური აქტივობის განსაზღვრის მეთოდები	258
4.3.1 პოლაროგრაფიული მეთოდი	258
4.3.2 სპექტროფოტომეტრული მეთოდი	259
4.4 ლიპიდების ზეჟანგური ჟანგვის შეფასება (მალონის დიალდეჰიდის განსაზღვრა)	261
Мембранная ксенобиохимия (резюме)	265
Membranous Xenobiochemistry (summary)	270
ლიტერატურა	275

ადამიანის ყოველდღიური სამეურნეო მოღვაწეობა განუხრელადაა დაკავშირებული მის მიერ სხვადასხვა ქიმიური ნაერთების წარმოებასთან და მათ გამოყენებასთან. ასეთ ნაერთებს მიეკუთვნება მრავალი სინთეზური და ბუნებრივი სამკურნალო საშუალება, სამრეწველო ნარჩენები, პესტიციდები, საღებავები, ნავთობპროდუქტები, პლასტმასები, საყოფაცხოვრებო მოხმარების პროდუქტები, საკვები დანამატები, კონსერვანტები, კოსმეტიკური საშუალებები და სხვ. პირდაპირი თუ არაპირდაპირი გზით გარემოში ამ ნივთიერებათა კოლოსალური რაოდენობა კონცენტრირდება. ეს პროცესი დღესაც აქტიურად მიმდინარეობს და თავის უარყოფით გავლენას ახდენს გარემოზე და, საბოლოო ჯამში, ადამიანის ჯანმრთელობაზე. ცოცხალი ორგანიზმებისთვის ეს ნივთიერებები უცხოა და სწორედ ამიტომ უწოდებენ მათ ქსენობიოტიკებს (ბერძნ. „ქსენოს“ – უცხო, „ბიოს“ – სიცოცხლე).

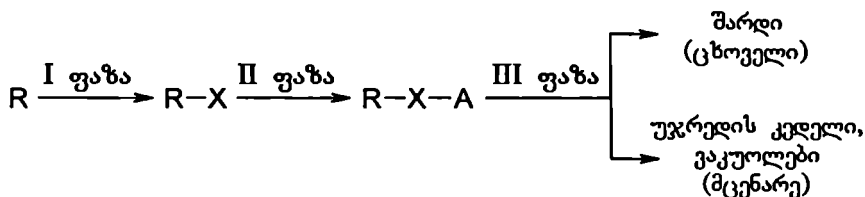
ამჟამად ქსენობიოტიკების საერთო რიცხვი რვა მილიონს უახლოვდება. მათგან 96% ორგანულია. „საერთო მოხმარების“ ქიმიკატების რიცხვი 630 ათასს შეადგენს, საიდანაც 610 ათასი საკვები პროდუქტებისა და ფარმაცევტული პრეპარატების შემადგენლობაში შედის. მთელ მსოფლიოში ყოველწლიურად 30 მილიონი ტონა ქიმიური პროდუქტი იწარმოება. აქედან 640 ათასი ტონა მცენარეთა დაცვის საშუალებებია, რომლებიც მხოლოდ ქიმიური სინთეზის გზით მიიღება. ქსენობიოტიკთა მავნე ზემოქმედების თავიდან ასაცილებლად საჭიროა მათი ბიოლოგიური აქტივობის შესწავლა. მუდმივად მკაცრად უნდა კონტროლდებოდეს იმ ნივთიერებების წარმოება და მოხმარება, რომლებიც უარყოფითად ზემოქმედებენ ადამიანზე.

გარემოს დაბინძურებასთან დაკავშირებით არსებულმა მძიმე ეკოლოგიურმა სიტუაციამ წარმოშვა იმის აუცილებლობა, რომ ორგანიზმში ქსენობიოტიკთა მეტაბოლიზმის კვლევა ბიოქიმიის სავსებით დამოუკიდებელ მიმართულებად ჩამოყალიბდა. თანამედროვე ქსენობიოქიმია წარმოადგენს თავისებურ დარგთაშორის დისციპლინას და მოიცავს ბიოქიმიის, ორგანული ქიმიის, ფარმაცოლოგიის, ეკოლოგიის, ტოქსიკოლოგიისა და სხვა დარგების გარკვეულ ასპექტებს. მას გააჩნია თავისი საკუთარი თეორიული ბაზა და ტექნიკური მიდგომები.

ქსენობიოტიკების ქიმიური ბუნება ერთმანეთისაგან პრინციპულად განსხვავებულია. მათი ბიოლოგიური აქტივობა საკმაოდ მრავალფეროვნებით

გამოირჩევა. ეს ძლიერ ართულებს მათ გარდაქმნებში მონაწილე ფერმენტთა მოქმედების მექანიზმებისა და განსაკუთრებით, ამ პროცესების რეგულაციის გზების დადგენას. მიუხედავად ამისა, ქსენობიოქიმიას ამ მიმართებით გარკვეული წარმატებები აქვს. ქვემოთ შევეცდებით მოკლედ ჩამოვაცალიბოთ ზოგიერთი თანამედროვე შეხედულება.

ცხოველსა და მცენარეში შეღწეულ ქსენობიოტიკებს გარკვეულწილად ერთი საერთო „ბედი აქვთ“. სადღეისოდ მიღებულია, რომ როდესაც ქსენობიოტიკი ფერმენტულ გარდაქმნებს ემორჩილება, მაშინ მან სამი თანმიმდევრული ფაზა უნდა გაიაროს:



ნახ. 1. უჯრედში ქსენობიოტიკის გარდაქმნის სამი თანმიმდევრული ფაზა.

- I ფაზა** – ფუნქციონალიზაცია, რომლის დროსაც ქსენობიოტიკის მოლეკულა გარკვეულ ფუნქციურ ჯგუფს იძენს;
- II ფაზა** – კონიუგაცია, რომლის დროსაც ახლად შეძენილი ფუნქციური ჯგუფის ხარჯზე ქსენობიოტიკი შიდაუჯრედულ ნაერთებს უკავშირდება;
- III ფაზა** – ელიმინაცია, როდესაც კონიუგირებული ქსენობიოტიკი უჯრედიდან გამოდის და ორგანიზმს ტოვებს (ცხოველის შემთხვევაში), ან გარკვეულ ნაკვეთურებში გროვდება (მცენარის შემთხვევაში).

მოკლედ განვიხილოთ თითოეული ფაზის ბიოლოგიური არსი:

ფუნქციონალიზაციის ფაზა. ქსენობიოტიკების უმრავლესობა (~98%) არაპოლარულია და წყალში მცირედ იხსნება. როგორც წესი, ისინი ცხიმში ხსნად, ანუ ლიპოფილურ ნაერთებს მიეკუთვნებიან, ამიტომ ორგანიზმში ძირითადად ბიომემბრანებში ან ცილოვან მოლეკულათა ჰიდროფობულ უბნებში კონცენტრირდებიან. სწორედ ეს ფაქტორი წარმოადგენს დიდ საშიშროებას ორგანიზმისათვის, რადგან ზოგიერთ შემთხვევაში (შიმშილობა, ორსულობა, სტრესული სიტუაციები) ცხიმის დაშლასთან ერთად ქსენობიოტიკები გამოდიან ცხიმოვანი ქსოვილიდან და თავის ტოქსიკურ

ზემოქმედებას ავლენენ (აქედან თვითონ განსაჯეთ, რამდენ საფრთხეს შეიცავს დღევანდელ დღეს სწრაფი გახდომის ყოველგვარი მცდელობა).

არაპოლარული ქსენობიოტიკების მოლეკულები არ შეიცავენ ისეთ ფუნქციურ ჯგუფებს, რომლებზეც წარმატებით განხორციელდებოდა ფერმენტ-ოქსიდაზების „შეტევა“ (ისინი ძირითადად პოლარულ, წყლოვან ფაზაში ფუნქციონირებენ) და მათი ნაწილობრივი ან სრული ჟანგვითი დეგრადაცია. ამისათვის საჭირო ხდება უცხო ნაერთის წინასწარი გააქტიურება, რასაც შეიძლება ფუნქციონალიზაცია ვუწოდოთ. ამ მიზანს ძირითადად მეგბრანაში მიმდინარე ჟანგვა-აღდგენითი რეაქციები ემსახურება. მათი საშუალებით ხდება ქსენობიოტიკის მოლეკულაში ახალი ფუნქციური ჯგუფის (ჰიდროქსილის, კარბოქსილის, ეპოქსიდის და სხვ.) შეყვანა, ან არსებულის გართულება. ამ გზით ნივთიერების ქიმიური ინერტულობის დაძლევა ხდება და მიღებული პროდუქტების პოლარული ჯგუფი შემდგომი ფერმენტული გარდაქმნებისადმი გაცილებით ხელმისაწვდომია. ქსენობიოტიკის მოლეკულაში რამდენიმე ფუნქციური ჯგუფის შეყვანა კიდევ უფრო ეფექტურს ხდის მასზე ფერმენტთა ერთდროულ მოქმედებას და მოლეკულის განსხვავებულ უბნებში სწრაფი ცვლილებების განხორციელებას უზრუნველყოფს. სხვა სიტყვებით რომ ითქვას, I ფაზის შედეგად უცხო ნაერთის მოლეკულა ისეთ პირველად გარდაქმნებს განიცდის, რომ ის შედარებით ადვილად „შეიცნოს“ ფერმენტმა. ფუნქციონალიზაციის ფაზას ახორციელებენ ოქსიდაზები, რედუქტაზები, ესთერაზები, დეჰალოგენაზები და სხვა ფერმენტები. ზოგ შემთხვევაში კი ეს პროცესი მათი ურთიერთშენაცვლებით მიმდინარეობს.

ფუნქციონალიზაციის ყველაზე გავრცელებული ფორმაა ჰიდროქსილირება. ეს რეაქცია უპირატესად ქსენობიოტიკის მოლეკულის C—H ბმის გაწყვეტით და ამ ატომებს შორის წინასწარ გააქტივებული ჟანგბადის ატომის ჩანერგვით ხორციელდება. პროცესი ცხოველში ძირითადად ღვიძლში ხდება და ციტოქრომ P450-შემცველი მონოოქსიგენაზებით კატალიზდება. ამ მხრივ მცენარე უფრო ფართო არჩევანს აკეთებს და ჰიდროქსილირებისათვის იგი ციტოქრომ P450-ის გარდა, პეროქსიდაზებსა და ფენოლოქსიდაზებსაც იყენებს. რეაქცია მაღალი აქტივაციის ენერგიას საჭიროებს და ამის გამო შენელებულად მიმდინარეობს. აქედან გამომდინარე, ქსენობიოტიკის სრული, მრავალსაფეხურიანი დეგრადაციის პროცესისათვის ფუნქციონალიზაცია სიჩქარის მაღალიმითიერებელ სტადიას წარმოადგენს და უცხო ნაერთის გაუვნებლობის პროცესის რეგულაციაც სწორედ ამ სტადიაზე ხორციელდება.

კონიუგაციის ფაზა. ამ ფაზაში ხდება გააქტიურებული ქსენობიოტიკის კონიუგაცია (დაკავშირება, შეუღლება) შიდაუჯრედულ ნაერთებთან. ასეთი ნაერთები შეიძლება იყოს როგორც დაბალმოლეკულური – მონო-, დი- და ტრისაქარიდები (ხშირად გლუკოზა), ამინომჟავები, პეპტიდები (უპირატესად გლუტათიონი და ჰომოგლუტათიონი), ისე მაღალმოლეკულური – ცილები, პოლისაქარიდები (მაგ., ჰემიცელულოზა), ლიგნინი და სხვ. კონიუგაცია უჯრედისათვის იმიტომაც მოხერხებული, რომ ქსენობიოტიკის კონიუგატს ნაწილობრივ ან სრულად აქვს დაკარგული ტოქსიკურობა, გააჩნია წყალში მაღალი ხსნადობა და შესაბამისად, ადვილდება უჯრედშიდა მისი გადაადგილება ან უჯრედიდან გამოსვლა. კონიუგაციის ფაზა ერთნაირად დამახასიათებელია მცენარისა და ცხოველისათვის, თუმცა მცენარეში ეს ფაზა გაცილებით მოცულობითაა იმ ბიოპოლიმერების მრავალგვარობის გამო, რომლებიც ქსენობიოტიკის ფუნქციონალიზებულ მეტაბოლიტს იკავშირებენ (ლიგნინი, ცელულოზა და ჰემიცელულოზა, სახამებელი, პექტინური ნაერთები, პოლიპეპტიდები და სხვ.). საყურადღებოა, რომ ამ ნაერთებთან ქსენობიოტიკის დაკავშირება შესაძლოა ორი გზით მოხდეს: 1) არსებულ ბიოპოლიმერთან უშუალო მიერთებით; 2) თანაპოლიმერიზაციით, ანუ იმ მონომერთან კონიუგაციით, რომლიდანაც შემდგომ ბიოპოლიმერი წარმოიქმნება. კონიუგაცია შესაბამისი ფერმენტებით (გლუტათიონ-S-ტრანსფერაზებით, გლუკოზილ-ტრანსფერაზებით, მალონილ-ტრანსფერაზებით და სხვ.) კატალიზდება.

ელემინაციის ფაზა. ბოლო ფაზაში უჯრედი საბოლოოდ იცილებს ქსენობიოტიკს. ამ ფაზაში მცენარესა და ცხოველს შორის არსებითი განსხვავებაა: ცხოველის ორგანიზმში სრულად გამოდევნის უცხო ნაერთს; ამ შესაძლებლობით შეზღუდული მცენარე კი კონიუგირებული ქსენობიოტიკის „დეპონირებას“ ახდენს და მას ვაკუოლებში (თუ კონიუგატი ხსნადია) ან უჯრედშორის სივრცეში (თუ კონიუგატი უხსნადია) ინახავს. მიუხედავად ასეთი განსხვავებისა, ელემინაციის ფაზა მცენარესა და ცხოველში ერთნაირია როგორც მექანიზმით, ისე არსით: ორივე შემთხვევაში პროცესი წარიმართება ე.წ. ATP-ტრანსპორტერებით (მეორეული მეტაბოლიტების გადატანაში სპეციალიზებული ფერმენტებით), და მისი დანიშნულებაა ტოქსიკური ნაერთის იზოლირება სასიცოცხლო პროცესებისაგან.

არსებობს ექსპერიმენტული მონაცემები, რომლებიც მცენარეში ელემინაციის ფაზის დროებითობაზე მიუთითებენ: როდესაც მცენარე ქსენობიოტიკთან გარკვეული ექსპოზიციის შემდეგ უცხო ნაერთისაგან თავისუფალ საკვებ არეზე გადააქვთ, ვაკუოლებში მოთავსებული კონიუგატები თანდა-

თანობით იშლება და იწყება მათი სრული მინერალიზაცია ნახშირორჟანგისა და წყლის წარმოქმნით.

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

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

უაღრესად საინტერესოა, რომ ზემოთ ჩამოთვლილი ხუთივე დებულება თანაბრად ეხება როგორც მცენარეულ, ასევე ცხოველურ ორგანიზმებს.

აქ უსათუოდ უნდა განვიხილოთ ერთი, მეტად პრინციპული საკითხი: რამდენად მისაღებია, რომ ქსენობიოტიკთა გარდაქმნის პროცესს დეტოქსიკაცია ეუწოდოთ, რომელშიც ჩვეულებრივ ტოქსიკანტის გაუვნებლობა იგულისხმება. მცენარესა და ცხოველში მიმდინარე ქსენობიოტიკთა დეტოქსიკაციის პროცესი წმინდა ბიოქიმიური თვალსაზრისით სხვა არაფერია, თუ არა ქსენობიოტიკის მეტაბოლიზმი. საქმე იმაშია, რომ უჯრედისათვის

ამოცანა მხოლოდ ერთში მდგომარეობს: მაქსიმალურად „ამოქაჩოს“ დასა-
ყანგ მოლექულაში განივთებული ენერგეტიკული და პლასტიკური რესურსი,
და მნიშვნელობა არა აქვს, ეს ნივთიერება გლუკოზა იქნება, თუ რომელიმე
ქსენობიოტიკი. ამის შესანიშნავი მაგალითია ბენზოლი, რომელიც ფერმენტუ-
ლი გარდაქმნების შედეგად უჯრედის სტანდარტულ მეტაბოლიტებს (მაგ.,
მუკონის, ფუმარის და კრების ციკლის მჟავებს) წარმოქმნის. ეს მეტად
უნიკალური მოვლენაა, რომლის დროსაც ტოქსიკანტის არომატული ჩონჩხის
ნახშირბადატომები სტანდარტულ მეტაბოლიტებად უნიფიცირდება.

მცენარის ბიოქიმიკა ცნობს პიდროარომატულ და ფენოლურ ნაერთებს,
გლიკოზიდებს, ეთერზეთებს, ფისებს და სხვ. მათ ერთი საერთო სახელ-
წოდება – „მეორეული წარმოშობის ნივთიერებები“ – აერთიანებთ, რადგან
მათ გარეშე სიცოცხლე შესაძლებელია. ევოლუციურად ქსენობიოტიკები
ცოცხალი ბუნებისათვის გაცილებით უფრო გვიან ფორმირებულ ჟანგვის
სუბსტრატებს წარმოადგენენ. ამიტომ დღევანდელი თვალსაწიერიდან მიგ-
ვაჩნია, რომ უფრო მიზანშეწონილი იქნებოდა მათი გარდაქმნებისათვის
„მესამეული წარმოშობის ნაერთთა მეტაბოლიზმი“ გვეწოდებინა. განზი-
ლული მოსაზრების სასარგებლოდ შეიძლება კიდევ რამდენიმე არსებითი
არგუმენტის მოყვანა:

- უცხო ნაერთების ტრანსფორმაციის პროცესი თავისი არსით მხოლოდ
იშვიათ შემთხვევაში წარმოადგენს სრულ გაუგებლობას – დეტო-
ქსიკაციას. ქსენობიოტიკების უმეტესობისათვის მხოლოდ ტოქსიკური
თვისებების შემცირება ხდება. უფრო მეტიც, ზოგიერთი ქსენობიოტიკი
(მაგ., პოლიციკლური არომატული ნახშირწყალბადები) მცენარეებში
გარდაქმნისას თავისზე გაცილებით უფრო ტოქსიკურ ნაერთებს წარ-
მოქმნის. როგორც უკვე აღვნიშნეთ, მცენარის უჯრედი ასეთი ნაერთე-
ბის ზემოქმედებას თავიდან იცილებს მათი კონიუგაციისა და ეაკულებში
განმხოლვების გზით. მაგრამ თუ ეს მცენარე საკვებად გამოიყენა
ცხოველმა, მისი საჭმლის მომნელებელი ტრაქტის ფერმენტების საშუა-
ლებით კონიუგატი დაიშლება (ჰიდროლიზდება) და ცხოველი გააქტიუ-
რებული ქსენობიოტიკის ზემოქმედების ქვეშ აღმოჩნდება;
- ქსენობიოტიკის დეტოქსიკაცია მხოლოდ იმ შემთხვევაში მიიღწევა, თუ
მცენარის უჯრედმა მოახერხა მისი სტანდარტულ მეტაბოლიტებად
გარდაქმნა. ე.ი. სრული დეტოქსიკაცია თავისთავად სრულ მეტაბო-
ლიზმს გულისხმობს. სხვაგვარად რომ ვთქვათ, ქსენობიოტიკის დეტო-
ქსიკაცია იმ ხარისხით ხდება, რა ხარისხითაც მისი გარდაქმნის პროდუქ-
ტები „მოერგებიან“ საერთო მეტაბოლიზმს;

– ქსენობიოტიკთა მეტაბოლიზმის განსაზოციელებლად ცოცხალი უჯრედი არ საჭიროებს ახალი, სპეციალიზებული რეგულატორული მექანიზმების ჩამოყალიბებას. ეს პროცესი შეთანაწყობილია სხვა დანარჩენ მეტაბოლურ გზებთან, რომლებიც ყველა იმ კომპონენტს იძლევიან, რომლებიც ქსენობიოტიკთა მეტაბოლიზმისთვისაა აუცილებელი. ფუნქციონალიზაცია, კონიუგაცია და ელიმინირება იმ ფერმენტების, კოფერმენტების და შიდაუჯრედული ნაერთების ანაკრებით ზოციელდება, რომლებიც უჯრედს უზენაესმა შემოქმედმა ნორმალური ცხოველმყოფელობისათვის მიანიჭა. ეს საკითხები წიგნში დეტალურად იქნება განხილული.

ქსენობიოქიშია, როგორც საგანი, თავისი არსით კომპლექსურია. როგორ მარტივადაც არ უნდა წარმოვიდგინოთ ორგანიზმში ქსენობიოტიკთა მოხვედრა, გარდაქმნა და მიღებულ პროდუქტთა გამოყოფა, ამ საერთო სქემას თან ახლავს უამრავი ანგარიშგასაწევი ნიუანსი. მაგ., მცენარის შემთხვევაში კომპლექსური კვლევა შემდეგ ეტაპებს ითვალისწინებს: ქსენობიოტიკთა შეთვისებას, მათ ურთიერთსაპირისპირო მიმართულებით (ფოტოლი $\rightleftharpoons$ ფესვი) გადამოძრაებას, მათი გარდაქმნისა და დეპონირების კანონზომიერ პროცესებს. პარალელურად ქსენობიოქიშია ჯეროვან ყურადღებას უთმობს ორგანიზმში მიმდინარე თანმხლებ პროცესებს და აგრეთვე მთელ რიგ შინაგან (მცენარის ვეგეტაციის ფაზებს, ფიზიოლოგიურ აქტივობას და სხვ.) და გარეგან (ატმოსფერულ, კლიმატურ, ნიადაგობრივ) ფაქტორებს.

ცხოველურ ორგანიზმში ქსენობიოტიკთა დაგროვება და გადამუშავება ძირითადად ღვიძლში ხდება. უცხო ნივთიერებათა ჟანგვითი დეგრადაცია ღვიძლის უჯრედების (პეპატოციტების) მემბრანებში ზოციელდება. მათი საშუალებით ქსენობიოტიკთა გარდაქმნელი ფერმენტული კომპლექსების „აწყობა“ და თავის სტრუქტურაში „ჩაშენება“ ხდება. ორგანულ ტოქსიკანტთა დეგრადაციის საერთო სქემის კვლევის გარდა, ქსენობიოქიშია დაინტერესებულია იმ ცვლილებებითაც, რასაც განიცდის ამ დროს უჯრედის საერთო პომეოსტაზი (ფიზიოლოგიურ პროცესთა კოორდინირებული ფუნქციონირება), ენერგეტიკული სტატუსი (ადენილატური სისტემის ენერგიით მდიდარი ფოსფატებით შევსების დონე) და, განსაკუთრებით, იმუნური სისტემა. ბოლო პერიოდში ჩამოყალიბებული საინტერესო კონცეფციის თანახმად, ცხოველის მონოოქსიგენაზური და იმუნური სისტემები ერთიან მოლეკულურ ფუნდამენტს ეფუძნებიან და ურთიერთმარეგულირებელი მექანიზმებით იმართებიან.

თავი 1. ენდოპლაზმური მემბრანების შიშვანდებლობა და სტრუქტურა

1.1 ენდოპლაზმური მემბრანა — უჯრედის სტრუქტურული და ფუნქციური ერთეული

ქსენობიოტიკების დეგრადაციისათვის ცოცხალ უჯრედს მძლავრი და მეტად ეფექტური სტრუქტურულ-ფუნქციური რესურსები გააჩნია. ეს, უპირველეს ყოვლისა, სასიცოცხლოდ მნიშვნელოვანი მემბრანული სისტემაა, რომლის როლი შიდაუჯრედულ მეტაბოლიზმში განსაკუთრებულია. უჯრედული კომპარტმენტების ჩამოყალიბება და სათანადო შიდაუჯრედული „მიკროკლიმატის“ შექმნა, ჰომეოსტაზის შენარჩუნება, ნივთიერებათა შერჩევითი ტრანსპორტი და სხვ. არის ის არასრული ჩამონათვალი, რომლებშიც მემბრანები მონაწილეობენ და უჯრედის ცხოველმყოფელობას არეგულირებენ. მემბრანათა უზოგადეს დანიშნულებას სტრუქტურისა და ფუნქციის მთლიანობის შენარჩუნება წარმოადგენს.

ქსენობიოტიკების ჟანგვით დეგრადაციაში მეორე უძლიერეს თავდაცვით ეშელონს შენგველ ფერმენტთა ანაკრები ქმნის. მისი თითოეული წარმომადგენელი შესანიშნავად „აგნებს“ და „უტევს“ უცხო ნაერთთა მოლეკულების „მოწყვლად“ უბნებს.

ბიოქიმიურმა ევოლუციამ ეს ორი შიდაუჯრედული დამცველი ბარიერი ერთმანეთთან ორგანულად დააკავშირა. მრავალი ფერმენტი თავის აქტივობას მხოლოდ მემბრანაში ჩაშენების (მეზუთეული სტრუქტურის შეძენის) შემდეგ ავლენს. როგორც ირკვევა, მემბრანა არამარტო შემდგომი დაბეჭდვის („ცემენტის“), არამედ ფერმენტების აქტივობისათვის საჭირო კოფაქტორის ფუნქციასაც ასრულებს.

წარმოდგენილ მასალას ბიომემბრანების, კერძოდ, ენდოპლაზმური მემბრანების ქიმიური შემადგენლობისა და აღნაგობის განხილვით დავიწყებთ. ისინი სხვა მემბრანული სტრუქტურებიდან პრაქტიკულად არ განსხვავდება და მათ მეტ-ნაკლებად ერთნაირი შემადგენლობა გააჩნიათ. გარდა ამისა, ენდოპლაზმური მემბრანები იმითაცაა უფრო საყურადღებო, რომ მათში ლოკალიზებული ჟანგვა-აღდგენითი ფერმენტული სისტემები ქსენობიოტიკთა ჟანგვით მეტაბოლიზმს ახორციელებენ. ქსენობიოტიკთა ბიოდეგრადაციაში ცენტრალური პოზიცია ენდოპლაზმურ მემბრანებში არსებულ ციტოქრომ P450-შემცველ ელექტრონთა სატრანსპორტო სისტემას უკავია. მემბრანის ჰიდროფობული გარემო ამ მულტიფერმენტული სისტემის ოპტიმალური სამოქმედო არეა.

ჯერ კიდევ 1949 წელს მიუღერმა და მილერმა გამოაქვეყნეს კვლევის შედეგები (*J. Biol. Chem.*, 1949, 180, №7, 1125–1134), რომელშიც ნაჩვენებია იყო, რომ ცხოველთა ღვიძლის პეპატოციტების (პარენქიმული უჯრედების) ენდოპლაზმური მემბრანები აკატალიზებენ დიმეთილამინოაზო-ბენზოლის დემეთილირებას და ამისათვის NADPH-ს და მოლეკულურ ჟანგბადს საჭიროებენ. ამ სამუშაომ მძლავრი ბიძგი მისცა ენდოპლაზმურ მემბრანებში მიმდინარე მრავალგვარი ქსენობიოტიკების მეტაბოლიზმის შესწავლას. მოგვიანებით დადგინდა, რომ ენდოპლაზმურ მემბრანებში მიმდინარეობს მეორე, უჯრედისათვის მეტად მნიშვნელოვანი, უჯერ ცხიმოვან მჟავათა ზეჟანგური ჟანგვის პროცესიც.

სხვა სუბუჯრედული წარმონაქმნებისაგან განსხვავებით, რომლებიც ნებისმიერ უჯრედში ერთსა და იმავე ფუნქციას ასრულებენ (მაგ., ცილებისა და ნუკლეინმჟავების ბიოსინთეზი ბირთვისა და რიბოსომებში, ენერგიის გარდაქმნა და აკუმულაცია მიტოქონდრიებში, უჯრედული შიგთავსისა და გარედან შეთვისებული მაღალმოლეკულური ქიმიური მასალის დაშლა ლიზოსომებში და ა.შ.), ენდოპლაზმური მემბრანები სრულიად განსხვავებული ფუნქციების მატარებელ სისტემას წარმოადგენს. ასე მაგალითად, კუნთოვან ქსოვილში იგი აგზნებისა და შეკუმშვის პროცესთა შეუღლებას ახორციელებს; კუჭქვეშა ჯირკვალში ეს მემბრანა უშუალოდ მონაწილეობს პანკრეატული ცილა-ფერმენტების სინთეზსა და ტრანსპორტში; თირკმელზედა ჯირკვალში მემბრანა სტეროიდული ჰორმონების მეტაბოლიზმშია ჩართული, ხოლო ღვიძლში – სამკურნალო ნივთიერებებისა და გარედან მოხვედრილი სხვა ქსენობიოტიკების ჟანგვით დეგრადაციას ემსახურება.

საყურადღებოა აღინიშნოს, რომ ცხოველის სხვადასხვა ორგანოების, აგრეთვე მცენარეებისა და ზოგიერთი უმარტივესი ორგანიზმის ენდოპლაზმური მემბრანები მორფოლოგიურად საოცრად მსგავსია. განსხვავება მხოლოდ ქიმიურ კომპონენტთა რაოდენობრივ თანაფარდობაში ვლინდება. სხვადასხვა ქსოვილის უჯრედების ენდოპლაზმური მემბრანების მორფოლოგიური მსგავსების საპირისპიროდ, მკვეთრი კონტრასტია ამ სტრუქტურების ფერმენტულ სპეციალიზაციებს შორის. შეიძლება დაბეჯითებით ითქვას, რომ არ არსებობს ორი ორგანო, რომელთაც ენდოპლაზმური მემბრანების ერთნაირი ფერმენტული შემადგენლობა გააჩნიათ.

უჯრედის ჰიალოპლაზმში (ძირითადი პლაზმა) დიფერენცირებულია არასტრუქტურიზებული სუბსტანცია – მატრიქსი და შიდაუჯრედული მემბრანული სისტემა. ელექტრონული მიკროსკოპიით ნანახია, რომ იგი მთელ ენდოპლაზმურ ზონას მოიცავს და ამიტომ მიკუთვნებული აქვს

ენდოპლაზმური რეტიკულუმის, ანუ ენდოპლაზმური ბადის სახელწოდება (ნახ. 2).

ენდოპლაზმური მემბრანა არაერთგვაროვანი, რთული წნულის მქონე სისტემაა და ძირითადად არხების, ცისტერნების, ფირფიტებისა და ბუშტებისაგან შედგება. 1 მლ მოცულობის მემბრანების საერთო ფართობი, რომელიც მორფომეტრული გაზომვებითაა მიღებული, ~11 მ²-ს შეადგენს და ყველა სხვა დანარჩენი მემბრანების ზედაპირს აღემატება. სამაგიეროდ, მისი სიღრუეების მოცულობა მცირეა და მთლიანი ციტოპლაზმის ~16%-ს მოიცავს.



ნახ. 2. სიმინდის ფესვის კორტიკალური უჯრედის ენდოპლაზმური მემბრანები. ნათლად ჩანს მემბრანათა ორშრიანობა და მათ შორის არსებული არხები (ნათელი ზოლები). მემბრანათა ზედაპირზე არსებული შავი წერტილები რიბოსომებია. x 75 000.

ენდოპლაზმური მემბრანების არაერთგვაროვნება იმაშიც მჟღავნდება, რომ მორფოლოგიურად მათი ორი — გლუვი და ზორკლიანი ნაირსახეობა გამოირჩევა. ამ უკანასკნელის (გრანულური ანუ α-ციტომემბრანა) მატრიქსისაკენ მიქცეულ ზედაპირზე მოთავსებულია 10–15 ნმ დიამეტრის მქონე რიბონუკლეოპროტეინული გრანულები (რიბოსომები), რომლებშიც ცილის სინთეზი ხორციელდება. მემბრანათა საერთო ზედაპირის 60% რიბოსომებითაა დაფარული. ერთ უჯრედში 13 მილიონი რიბოსომაა. ზორკლიანი

მემბრანის სისქე საშუალოდ 6 ნმ-ს შეადგენს. ისინი გარედან შემოსაზღვრავენ 30–35 ნმ სიგანის მქონე სიღრუეებს და ამგვარად, წარმოქმნიან არხებსა და ცისტერნებს, რომლებიც ადვილად ფართოვდებიან, შიგთავსის რაოდენობის მომატების შესაბამისად.

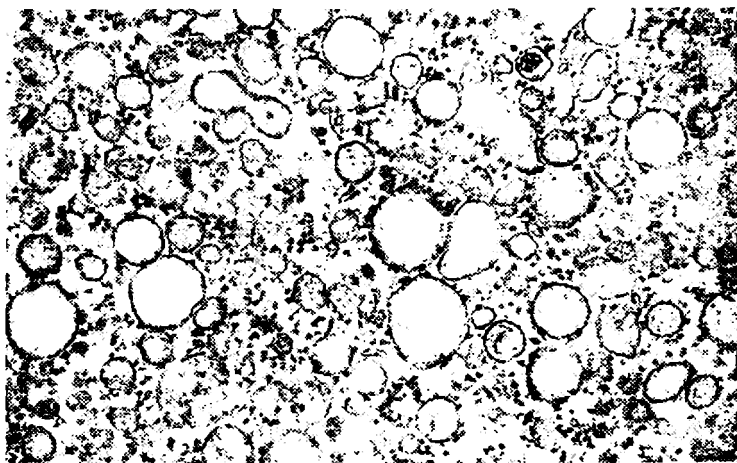
გლუვი, აგრანულური მემბრანებით (β-ციტომემბრანები) შემოსაზღვრულია არასწორი ფორმის სიღრუეები, რომლებიც არ ქმნიან რაიმე რეგულარულ წარმონაქმნებს. მათ ზედაპირზე რიბოსომები არაა განლაგებული. ზორკლიანი მემბრანების მსგავსად, გლუვი მემბრანებიც 6 ნმ სისქისაა, თუმცა ეს პარამეტრი უფრო მეტ ვარიირებას შეიძლება განიცდიდეს. მათ მიერ შემოსაზღვრული სიღრუის საშუალო დიამეტრი 40 ნმ სისქისაა. ელექტრონული მიკროსკოპით გამოვლენილია უბნები, სადაც ზორკლიანი და გლუვი მემბრანების ფორმების ურთიერთგადასცლა ხდება. გარდა ამისა, დადგენილია ბირთვულ, მიტოქონდრიულ და სხვა პლაზმურ მემბრანებთან (მაგ., გოლჯის აპარატთან) ენდოპლაზმური მემბრანების დაკავშირების ზონები. საყურადღებოა, რომ ქიმიური შემადგენლობითა და ფერმენტული ანაკრებით ენდოპლაზმური და ბირთვული მემბრანები მსგავსია. ენდოპლაზმური მემბრანების სიღრუის სანათურები პერინუკლეალურ (ბირთვის გარის შიდა და გარე მემბრანებს შორის არსებულ) სივრცეში იხსნებიან.

საბოლოოდ დადგენილი არაა, არსებობს თუ არა უშუალო კავშირი ენდოპლაზმური მემბრანების არხებსა და გარემო არეს შორის. ერთი რამ სარწმუნოა, რომ უჯრედული და ენდოპლაზმური მემბრანები თავისი ქიმიური და ფერმენტული შემადგენლობით, აგრეთვე ფიზიკურ-ქიმიური და იმუნოლოგიური თვისებებით ერთმანეთისაგან რამდენადმე განსხვავდებიან. ენდოპლაზმური მემბრანების არხებისა და გარემოს შორის კონტაქტები, როგორც ჩანს, დროებითი ხასიათისაა და უჯრედის ფუნქციურ მდგომარეობაზეა დამოკიდებული.

ცხოველისა და მცენარის ენდოპლაზმურ მემბრანებზე ლოკალიზებულია ფართო სპექტრის ფერმენტები და ფერმენტული სისტემები. მათში ზორციელდება მრავალი ცილის (გლიკოპროტეინების, ლიპოპროტეინების), ფოსფოლიპიდებისა და ტრიგლიცერიდების სინთეზი. სორბირებული და არამემბრანული ცილების შემცველობა მნიშვნელოვნადაა დამოკიდებული მემბრანული ფრაქციის გამოყოფის მეთოდზე. რაც შეეხება ფოსფოლიპიდებს, მათი შემცველობა ნებისმიერ შემთხვევაში მუდმივია. სწორედ ამიტომ, მრავალი მკვლევარის რეკომენდაციით, ყველა სახის ბიოლოგიური მემბრანის შესწავლისას ფერმენტთა ზვედრითი აქტივობები უნდა გამოიხაზოს არა ცილებთან, არამედ ფოსფოლიპიდებთან ფარდობით. სორბირე-

ბული ცილების მოცილების შემდეგ ცილა/ფოსფოლიპიდის მასური ფარდობა ზორკლიან მემბრანებში დაახლოებით 3.5-ის, გლუვ მემბრანებში კი 3.1-ის ტოლია. ფოსფოლიპიდი/ცილის ფარდობის განსაზღვრით დადგენილია, რომ ორივე ტიპის მემბრანისათვის იგი თითქმის მუდმივია. გარდა ამისა, ორივე ტიპის მემბრანის ფოსფოლიპიდური ფრაქცია ძირითადად ფოსფატიდილქოლინით (~54%), ფოსფატიდილეთანოლამინით (~25%), ფოსფატიდილსერინით (~6%), ფოსფატიდილინოზიტით (~4%) და აგრეთვე სფინგომიელინით (~5%) არის წარმოდგენილი. ერთნაირია ორივე ტიპის მემბრანაში ცხიმოვანი მჟავების (პალმიტინის, სტეარინის, ოლეინის, ლინოლის, არაქიდონის და სხვ.) რაოდენობაც. სამაგიეროდ, ფოსფოლიპიდის ერთეულზე გლუვი მემბრანები ორჯერ მეტ ქოლესტეროლს და 1.4-ჯერ მეტ ვიტამინ K-ს შეიცავენ.

დიფერენციული ცენტრიფუგირებისას (105 000 გ × 80 წთ) ენდოპლაზმური მემბრანები ნახევარგამტარ, სფერული ფორმის პროტეოლიპოსომურ (ცილისა და ცხიმის შემცველ) ბუშტებად იკვრებიან, რომლებშიც შიდა და გარე ზედაპირები ისევეა ორიენტირებული, როგორც *in vivo* მემბრანებში. იმის გამო, რომ სინათლის მიკროსკოპში ამ ნაწილაკების დანახვა შეუძლებელია, მათ მიკროსომები (მიკროსხეულაკები) უწოდეს (ნახ. 3).



ნახ. 3. ლვიძლის ჰეპატოციტების მიკროსომების ფრაქცია. x 100 000.

მიკროსომული ფრაქციის ქიმიური შემადგენლობა მნიშვნელოვანწილად ასახავს ენდოპლაზმური მემბრანების შემადგენლობას. არჩევენ მიკროსომის სამ შემადგენელ ნაწილს: ბუშტის შიდა სივრცეს თავისი შიგთავსით (ცილები, ფოსფოლიპიდები, ნუკლეინმჟავები, ქოლესტეროლი), საკუთრივ მემბრანას და მემბრანის გარე ზედაპირზე სორბირებულ ცილოვან და არაცილოვან ნერთებს. ისევე როგორც ზორკლიან მემბრანებში, მიკროსომებშიც რიბოსომები გარე ზედაპირზეა ლოკალიზებული.

არაიონურ გარემოში გამოყოფილი მიკროსომების გაურეცხავი პრეპარატების მთლიანი ცილის ~60% უშუალოდაა მემბრანასთან დაკავშირებული. ცილის შემცველობა ზორკლიან და გლუვ მემბრანებში დაახლოებით ტოლია. ამ ქვეფრაქციებში თანაბრად ნაწილდება ფოსფოლიპიდები და ქოლესტეროლიც, რაც მიკროსომული მემბრანების ქიმიური შემადგენლობის ჰომოგენურობაზე მეტყველებს. ამდენად, ენდოპლაზმური მემბრანები და მიკროსომები მორფოლოგიურად და ფუნქციურად ერთმანეთის ტოლფასია.

სხვადასხვა ტონურობისა და იონური ძალის მქონე გარემოში მიკროსომული ნაწილაკები ტიპური ოსმომეტრებივით იქცევიან. ისინი ადვილად ატარებენ 600 D-მდე მოლეკულური მასის მქონე ნეიტრალურ და დადებითად დამუხტულ ნაწილაკებს. აცეტატის და მალონატის ანიონებისათვის მიკროსომული მემბრანა განუვლადია, რაც მის ზედაპირზე მნიშვნელოვანი სიდიდის მქონე უარყოფითი მუხტის არსებობაზე მიუთითებს. ამასვე ადასტურებს ელექტროფორეზის პროცესში მიკროსომების ანოდისაკენ ძვრადობა.

0.25 M საქაროზის ხსნარში გამოყოფილი მიკროსომული პრეპარატები (ფრაქციები) 1 მგ ცილოვან აზოტზე 0.35% K^+ -ს, 0.147% Na^+ -ს, 0.043% Ca^{2+} -ს და 0.422% Mo^{2+} -ს შეიცავენ. ორვალენტიანი კატიონები მემბრანებს შედარებით მტკიცედ და ხისტად უკავშირდებიან და ამიტომ მიკროსომათა ძლიერ აგრეგაციას იწვევენ, თუმცა მემბრანის მოლეკულური სტრუქტურის სტაბილიზაციაში მონაწილეობას არ ღებულობენ. მიკროსომული ფრაქციის მიღებისას განსაკუთრებული ყურადღება ექცევა იმას, რომ მინიმუმამდე იქნას დაყვანილი სუსპენზიაში ნაწილაკთა აგრეგაცია. ამიტომ საკვლევად მიკროსომული ცილის ოპტიმალურ კონცენტრაციად 4–5 მგ/მლ ითვლება. აგრეგაციის თავიდან ასაცილებლად ფრაქციის მიღების სტადიაზე ერიდებიან იონთა მაღალი კონცენტრაციებისა და ჰიპოტონური ხსნარების გამოყენებას. არცთუ იშვიათად ამ მიზნით იყენებენ მილიფოროვან ფილტრებს.

1.1.1 ენდოპლაზმური მემბრანის ცილური კომპონენტები

1.1.1.1 მემბრანის პერიფერიული ცილები

მემბრანულ ცილებს ორ ფართო ჯგუფად ყოფენ. პირველს მიეკუთვნება ე.წ. პერიფერიული, ანუ გარეგანი ცილები, რომლებიც განსხვავებული pH-ის ან იონური ძალის მქონე, კომპლექსწარმოქმნელი ნივთიერებების (მაგ., EDTA-ს) ბუფერული ხსნარებით მემბრანათა რეცხვისას ნალექზედა სითხეში გადადიან.

მეთოდები, რომლებიც მემბრანებიდან პერიფერიული ცილების გამო-საყოფად გამოიყენება, არღვევს პოლარულ ან იონურ ურთიერთქმედებებს. აქედან ორი დასკვნა შეიძლება გაკეთდეს:

1. ეს ცილები ორმაგი შრის ზედაპირთან კონტაქტს პოლარული ან დამუხტული ჯგუფებით ამყარებენ. მაგ., ხსნადი ცილა – ციტოქრომ c მიტოქონდრიის შიდა მემბრანის გარე ზედაპირზეა ლოკალიზებული და თავისუფლდება მარილთა მზარდი კონცენტრაციებით მიტოქონდრიების დამუხავებისას. ამასთან ერთად, მრავალი შესწავლილი პერიფერიული ცილა წარმოადგენს ცხოველური უჯრედის ე.წ. „ციტოჩონჩხის“ კომპონენტს და დაკავშირებულია შეკუმშვად ელემენტებთან, რომლებიც ერთობლიობაში საზღვრავენ უჯრედის ფორმასა და მის მოძრაობას. ისინი განაპირობებენ აგრეთვე ორმაგი შრის შიგნით მემბრანის ინტეგრალური ცილების ძვრადობას.
2. ბაქტერიული და მცენარეული უჯრედებისაგან განსხვავებით, რომელთაც ხისტი გარეგანი კედელი გააჩნიათ (რაც უჯრედს ფორმასა და სტრუქტურის სიმტკიცეს ანიჭებს), ცხოველური უჯრედები მოკლებულნი არიან „ეგზოჩონჩხის“ შენარჩუნების უნარს. ისინი ეყრდნობიან შინაგან კარკასს, რომელიც სწორედ ამ „ციტოჩონჩხს“ წარმოადგენს. „ციტოჩონჩხის“ მოლეკულური ბუნება საკმაოდ დეტალურადაა გამოკვლეული ერიტროციტებში. მათი უჯრედული ჩონჩხი შედგება პერიფერიული ცილებისაგან, რომლებიც პლაზმური მემბრანის ციტოპლაზმისაკენ მიქცეულ მხარეს არიან განლაგებულნი. ისინი განაპირობებენ ძუძუმწოვართა ერიტროციტების ფორმის შენარჩუნებას და უზრუნველყოფენ მნიშვნელოვან მოქნილობას, რათა სისხლის ეს ელემენტები გავიდნენ კაპილარებში, რომელთა დიამეტრიც მათზე ნაკლებია.

1.1.1.2 ინტეგრალური მემბრანული ცილები

მემბრანული ცილების მეორე ჯგუფი ინტეგრალური ანუ შინაგანი ცილებია, რომლებიც მემბრანებთან კავშირს ინარჩუნებენ აღნიშნული მანუპულაციის მიმართ. მათი გამოთავისუფლებისათვის აუცილებელია ორმაგი შრის ფოსფოლიპიდური სტრუქტურის დარღვევა.

ინტეგრალური ცილები, როგორც „აისბერგი“, პირველებმა სინგერმა და ნიკოლსონმა აღწერეს. თავისი აღნაგობით ისინი უაღრესად დიდი მრავალფეროვნებით გამოირჩევიან. ასევე მრავალმხრივია მათი ფუნქციებიც, კერძოდ, ისინი ასრულებენ ჰიდროლიზური ფერმენტების, უჯრედის ზედაპირის რეცეპტორების, ელექტრონთა სატრანსპორტო სისტემის ჟანგვა-აღდგენითი კომპონენტების, სპეციფიკური გადამტანების როლს და სხვ.

ზოგიერთი ინტეგრალური ცილა ერთდროულად შეიცავს ჰიდროფობულ და ჰიდროფილურ უბნებს. ასეთი ცილის საუკეთესო მაგალითია ციტოქრომ b_5 . ეს გარემოება საშუალებას გვაძლევს დავუშვათ, რომ ინტეგრალურ ცილას ამფიფილური სტრუქტურა აქვს. მიუხედავად ამისა, საჭიროა შევნიშნოთ, რომ ყველა ინტეგრალურ ცილაში არაა ჰიდროფობული ამინომჟეური ნაშთების რაოდენობრივი სიჭარბე, როგორც ამას ადგილი აქვს მაგალითად ბაქტერიოროდოფსინში. ამფიფილური ცილების სოლუბილიზაცია დეტერგენტების საშუალებით ხდება. მემბრანულ ცილებთან კომპლექსირებული დეტერგენტის მოცილება შეიძლება გელ-ფილტრაციით, სიმკვრივის გრადიენტში ცენტრიფუგირებით ან დიალიზით განხორციელდეს. ზოგიერთი ინტეგრალური ცილა დეტერგენტის მოცილების შემდეგ უხსნად შენადდეს, ზოგიერთი კი გარკვეული ზომის წყალში ხსნად აგრეგატებს (მიცელებს) წარმოქმნის.

მემბრანის ბიშრეში ინტეგრალური ცილები ასიმეტრიულად არიან განლაგებული. ჰისტოლოგიური გამოკვლევებით მიღებულია, რომ გლიკოზილის ჯგუფის შემცველი ინტეგრალური ცილის ნახშირწყლის უბანი განლაგებულია ან უჯრედის ზედაპირზე, ან ენდოპლაზმური რეტიკულუმის სიღრუის შიგნით. ზოგიერთი ინტეგრალური ცილა ბიშრეს მრავალჯერადად კვეთავს. მაგ., სარკოპლაზმური რეტიკულუმის Ca^{2+} -ATP-აზა მემბრანას რამდენიმეჯერ განჭოლავს, რასაც დიდი მნიშვნელობა აქვს მისი ძირითადი — იონური არხის ფუნქციის შესრულებაში.

1.1.1.3 ლიპიდებთან კოვალენტურად ბმული ცილები

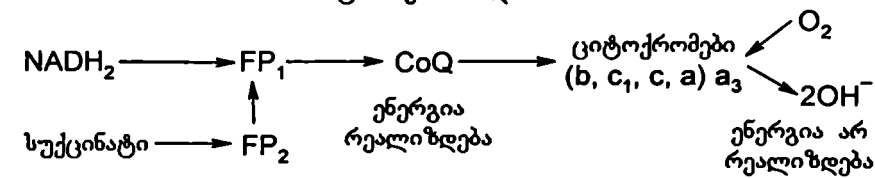
ყველა ინტეგრალური ცილა თავისი პოლიპეპტიდური ჯაჭვების თანმიმდევრობაში ჰიდროფობულ ამინომჟავურ ნაშთებს შეიცავს. მიუხედავად ამისა, ზოგიერთი ინტეგრალური ცილა ორმაგ შრეს სრულიად განსხვავებული მექანიზმით უკავშირდება. მაგ., *E. coli*-ს მცირე ზომის ლიპოპროტეინი, რომელიც 58 ამინომჟავურ ნაშთს და ცილის N-ბოლოსთან დაკავშირებულ ცხიმოვან მჟავათა სამ ძეწკვს შეიცავს, ბაქტერიის გარე მემბრანის კომპონენტს წარმოადგენს. ცხიმოვან მჟავათა დახმარებით ცილა გარე მემბრანის პერიპლაზმურ მხარეს უკავშირდება. გრამდადებითი ბაქტერია *Bacillus licheniformis* შეიცავს პენიცილინაზის როგორც მემბრანასთან ბმულ, ასევე სეკრეტირებად ფორმას. ნიშანდებული გლიცერინისა და პალმიტატის გამოყენებით დადგენილ იქნა, რომ პენიცილინაზის ერთ მემბრანულ ფორმას გააჩნია ცისტეინის კიდურა ნაშთი, რომელიც ისევე მოდიფიცირებული, როგორც *E. coli*-ს ლიპოპროტეინი. აღნიშნული ცილა და მისგან გამოყოფილი C-კიდურა პეპტიდი დეტერგენტის გარეშე თვითაგრეგაციას განიცდიან, თუმცა მათში არ შედიან ჰიდროფობული ამინომჟავები. ლიპიდებთან კოვალენტურად ბმული სხვა ცილების მსგავსად, ეს ცილაც იხსნება ქლოროფორმ/მეთანოლის ნარევეში.

ლიპიდებთან კოვალენტურად დაკავშირებული ინტეგრალური ცილები ნაპოვნია პროკარიოტულ და ეუკარიოტულ უჯრედებში. უცნობი რჩება მათში ლიპიდ-ცილური კავშირის ბუნების იდენტურობა.

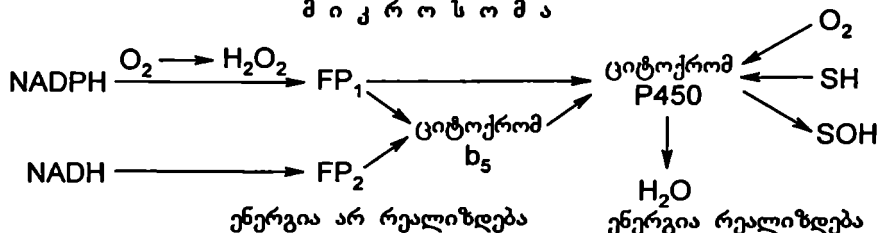
1.1.2 მიკროსომული ოქსიდორედუქტაზები

მემბრანული ქსენობიოქიმიისათვის ყველაზე მნიშვნელოვანს ენდოპლაზმურ მემბრანებში არსებული ოქსიდორედუქტაზები, კერძოდ, NAD(P)H-დამოკიდებული ელექტრონის სატრანსპორტო სისტემები (მიკროსომული რედოქს-ჯაჭვები) წარმოადგენენ, რომლებიც ქსენობიოტიკების ჟანგვას ახორციელებენ. მასალის შემდგომი განხილვისათვის ამჯერად აუცილებელია თუნდაც ზოგადად (დეტალურად მათ მოგვიანებით განვიხილავთ) წარმოვადგინოთ მათი სტრუქტურა და შემადგენლობა. აქვე შედარებისათვის მოგვყავს მიტოქონდრიული სუნთქვის ჯაჭვის (ციტოქრომ-ოქსიდაზური სისტემის) გამარტივებული სქემა (ნახ. 4), რათა თვალსაჩინოდ დავინახოთ მათ შორის მსგავსება და განსხვავება.

მ ი ტ ო ქ ო ნ დ რ ი ა



მ ი კ რ ო ს ო მ ა



ნახ. 4. მიტოქონდრიული და მიკროსომული რედოქს-ჯაჭვები. FP_1 და FP_2 – შესაბამისად NADPH - და NADH -სპეციფიკური ფლავოპროტეინებია, SH – დასაყენი სუბსტრატი.

როგორც ვხედავთ, ორივე ჯაჭვის საწყის სტადიებზე ფლავოპროტეინები, ხოლო ტერმინალურზე – ციტოქრომები ფუნქციონირებენ. მსგავსება მათ შორის ამით მთავრდება. კომპონენტთა სპეციფიკით და ფუნქციებით ისინი ძლიერ განსხვავდებიან ერთმანეთისაგან:

პირველი მიკროსომული ჯაჭვის საწყისი კომპონენტია FAD -შემცველი ფლავოპროტეინი – NADPH -ციტოქრომ P450 -რედუქტაზა, რომელიც მიტოქონდრიაში არ გვხვდება. მეორე ჯაჭვის საწყისი ფერმენტი – NADH -ციტოქრომ c -რედუქტაზაც FAD -შემცველი ფლავოპროტეინია. მიტოქონდრიულ NADH -ციტოქრომ c -რედუქტაზასთან მას მხოლოდ ფორმალური მსგავსება აქვს. ამ მიკროსომულ ფლავოპროტეინს მხოლოდ ციტოქრომ b_5 -ის ალდგენის უნარი აქვს. ამ ციტოქრომის გარეშე იგი ციტოქრომ c -ს ალდგენას ვერ ახორციელებს. თავისი ბუნებით იგი NADH -ციტოქრომ b_5 -რედუქტაზა უფროა. მიტოქონდრიული NADH -ციტოქრომ c -რედუქტაზაც ფერმენტული კომპლექსია, მაგრამ ელექტრონის შუალედ გადამტანად კოფერმენტ Q -ს (CoQ -ს) იყენებს; ე.ი. სინამდვილეში იგი NADH - CoQ -რედუქტაზაა. მიკროსომული ფლავოპროტეინისაგან განსხვავებით, მიტოქონდრიული რედუქტაზა პროსტითულ ჯგუფად ფლავინმონონუკლეოტიდს

(FMN) შეიცავს და CoQ-ზე ელექტრონის გადატანაში მის გარდა, არა-პემური რკინაშემცველი ცილაც მონაწილეობს.

მიკროსომული რედოქს-სისტემა მიტოქონდრიულთან შედარებით ღარიბ-ია ციტოქრომული ანაკრებით. მასში მხოლოდ b_5 და P450 ციტოქრომე-ბია. არც ერთი მათგანი მიტოქონდრიის სუნთქვითი ჯაჭვის შემადგენლო-ბაში არ შედის. ამიტომ ელექტრონის სატრანსპორტო გზა მიკროსომებში გაცილებით მოკლეა. ყურადღებას იმსახურებს ციტოქრომ P450-ის ჟანგ-ვის პოტენციალი (იგი -285 -დან -410 mV-ის საზღვრებში იცვლება). ეს ფერმენტი ყველაზე დაბალი რედოქს-პოტენციალის, და შესაბამისად, ყვე-ლაზე დაბალი სპეციფიკურობის მქონე ჰემოპროტეინია. აქედან გამომ-დინარე, მიკროსომული ელექტრონის სატრანსპორტო სისტემა მიტოქონდ-რიულისაგან პრინციპულად განსხვავდება: მიკროსომულ რედოქს-ჯაჭვში ელექტრონთა გადამტანები არაა განლაგებული რედოქს-პოტენციალის ზრდის მიხედვით. ამიტომ ჯაჭვის საწყის და საბოლოო კომპონენტებს შორის პოტენციალის ვარდნა ძლიერ მცირეა. აქ ელექტრონი თითქმის იზოპოტენციურ ველში მოძრაობს და ამიტომ მის ტრანსპორტს თან არ ახლავს ენერგიის მნიშვნელოვანი რაოდენობით გამოყოფა. იმ შემთხვევა-შიც კი, როდესაც ციტოქრომ P450 სუბსტრატს უკავშირდება და კონ-ფორმაციული გადასვლები რედოქს-პოტენციალს ცვლიან, მაინც წარ-მოუდგენელია ამ სიდიდის ისე გაზრდა, რომ რედოქს ჯაჭვში პოტენცია-ლის მნიშვნელოვანი ვარდნა შეიქმნას. ამრიგად, მიკროსომულ რედოქს-ჯაჭვში მოხვედრილი ელექტრონის მთელი ენერგია პლასტიკურ მიზნებში გამოი-ყენება. მაშასადამე, ის ძირითადი პრინციპი, რაც მიტოქონდრიულ ელექტრო-ნის სატრანსპორტო კომპლექსებისთვისაა გამოსაყენებელი, მიკროსომები-სათვის მიუღებელია. ის გარემოება, რომ აღნიშნულ სისტემაში ჟანგვისა და ფოსფორილების შეუღლება არ არსებობს, მკვლევართა აზრით, არ შეიძლება იყოს თავისუფალი ენერგიის უმნიშვნელო ცვლილების მიზეზი. არსებულ შეუსაბამობაში შეიძლებოდა ნაწილობრივი გარკვეულობა შეგ-ვეტანა, თუ საკითხს ცოტა განსხვავებულად მივუდგებით: ტოქსიკანტთა დეგრადაციისათვის ბუნებამ თავისუფალი ჟანგვის სისტემა იმიტომ აირ-ჩია, რომ იგი გაცილებით მარტივი და დამოუკიდებელია. შემთხვევითი არაა ისიც, რომ ეს სისტემა ენდოპლაზმურ მემბრანებშია ლოკალიზებუ-ლი. ნებისმიერი ქსენობიოტიკის ჟანგვა მისი უჯრედში შეღწევისთანავე „შორეულ მისადგომებთან“ ხდება, რათა მისი მოლეკულები არ დაიშვან ინფორმაციულ ცენტრთან — ბირთვთან და ენერგეტიკულ ცენტრთან — მიტოქონდრიასთან.

ორ რედოქს-სისტემათა შორის არსებითი განსხვავებაა ენერგიის რეალიზების მხრივაც. ციტოქრომოქსიდაზური ჟანგვის ჯაჭვში ენერგიის რეალიზება მხოლოდ საწყის, და არა ტერმინალურ სტადიებზე ხორციელდება, მაშინ როდესაც მიკროსომულ რედოქს-სისტემაში ენერგია ტერმინალურ კომპონენტთან, ციტოქრომ P450-ის ღონეზე რეალიზდება. ამასთან, აქ ჟანგვის ენერგია კი არ თავისუფლდება, არამედ NADPH-ის აღმდგენელი ექვივალენტები O_2 -ის აღდგენისათვის გამოიყენებიან. ამას პრინციპული მნიშვნელობა აქვს მიკროსომული რედოქს-ჯაჭვის ძირითადი ფუნქციის — ქსენობიოტიკების ჟანგვის განსახორციელებლად.

რეაქციათა მექანიზმში სხვაობა ვლინდება ინჰიბიტორების მიმართებაშიც. მიტოქონდრიული NADH-რედუქტაზა ინჰიბირდება ამიტალით, როტენონით და პიერიციდინით, მაშინ როდესაც მიკროსომული ოქსიდორედუქტაზა ამ რეაგენტთა მიმართ მდგრადია.

ჯერჯერობით ბოლომდე არაა გადაწყვეტილი გლუვ და ხორკლიან მემბრანებში სუნთქვითი ჯაჭვების კომპონენტთა რაოდენობრივი თანაფარდობის საკითხი, რამდენადაც მისი დადგენა მთელ რიგ მეთოდურ სიძნელებებთანაა დაკავშირებული (ფრაქციონირების არასრულფასოვნება, ფერმენტთა ზედრითი აქტივობის განსაზღვრის არსებულ მეთოდთა არაადექტურობა და სხვ.).

ღვიძლში ელექტრონის გადამტანთა ზეედრითი შემცველობა და აქტივობა ხორკლიანთან შედარებით გლუვ მემბრანებში რამდენადმე მეტია. თუმცა გადანაგარიშების სხვა მიდგომების (მაგ., 1 მგ ფოსფორიპიდზე ან რიბოსომულ ცილაზე) გამოყენებისას სხვაობა არ მჟღავნდება. განსხვავება იმ შემთხვევებშიც ქრება, თუ ოქსიგენაზური აქტივობა NADPH-ციტოქრომ P450-რედუქტაზის აქტივობის ერთეულზე იანგარიშება. მიუხედავად ამისა, ითვლება, რომ გლუვი მემბრანების სპეციფიკა მაინც NADPH-დამოკიდებულ სატრანსპორტო სისტემას ასახავს და მემბრანის ეს ფორმა ჟანგვითი რეაქციების მიმართაა სპეციალიზებული.

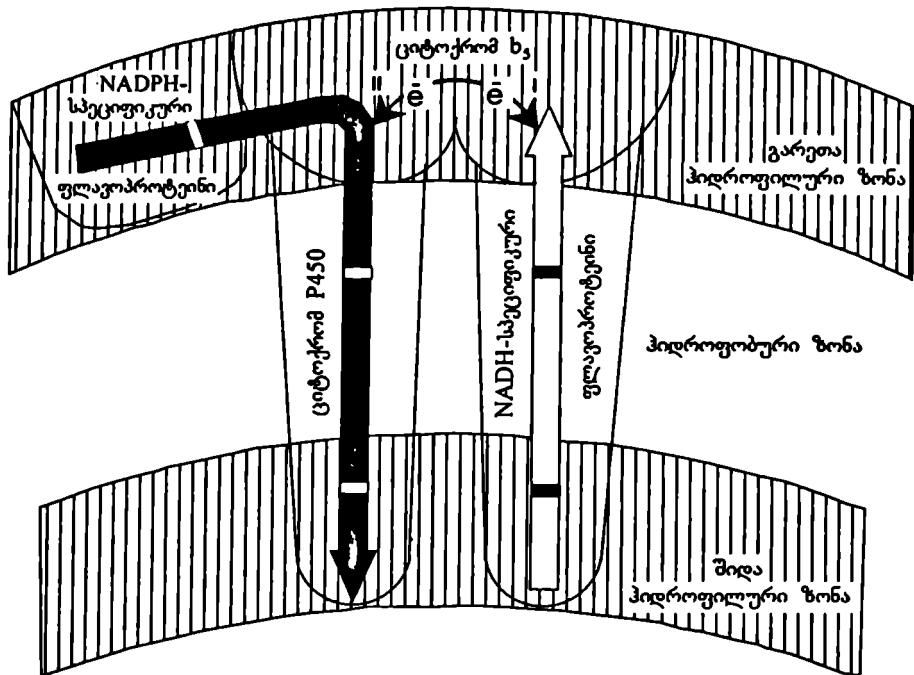
ხორკლიანი მემბრანების ულტრაბერით დამუშავებითა და შემდგომი სუბფრაქციონირებით მიღებულია მიკროსომების ორი ქვეფრაქცია ნაწილაკთა კიდევ უფრო მცირე (30 ნმ) დიამეტრით და ისინი, როგორც ვარაუდობენ, გაცილებით უკეთესად შეესაბამებიან ელემენტარული მემბრანის შენებას. პირველი ქვეფრაქცია NADPH-დამოკიდებული ჯაჭვის კომპონენტებითაა მდიდარი და 15 სრულ NADPH-სპეციფიკურ და 2 სრულ NADH-სპეციფიკურ სისტემას შეიცავს. მეორე ქვეფრაქცია NADH-დამოკიდებული ჯაჭვებითაა მდიდარი და მასში 25 სრული NADH-

დამოკიდებული და 3 სრული NADPH-დამოკიდებული სისტემა.

როგორია ენდოპლაზმურ მემბრანებში რედოქს-ჯაჭვების სივრცობრივი ორიენტაცია? ამ მიმართებით მნიშვნელოვანია ესტაბრუკისა და სხვ. მიერ წარმოდგენილი სქემა, რომელშიც პირველადაა მოცემული ციტოქრომების (b_5 -ის, P450-ის), ფლავოპროტეინების და პირიდინოქლოროფილების შესაძლო ურთიერთგანლაგება. ამ სქემის მიხედვით ციტოქრომების კონცენტრაციებთან შედარებით, ფლავოპროტეინისა და NADPH-ციტოქრომ P450-რედუქტაზის შემცველობა ძლიერ მცირეა. მის ყოველ მოლეკულაზე 20 მოლეკულა P450 მოდის. სტექიომეტრიის შენარჩუნება საჭიროებს, რომ NADP-სპეციფიკური ფლავოპროტეინი გარემოცული იყოს ციტოქრომ P450-ის მოლეკულებით; გამოთვლილია, რომ ამ უკანასკნელის 50%-ით აღსადგენად აუცილებელია, რომ რედუქტაზის ყოველი მოლეკულა გარემოცული იყოს ციტოქრომის 8–12 მოლეკულით, ე.ი. მემბრანის ფოსფოლიპიდურ მატრიქსში რედოქს-ჯაჭვები ბლოკურ სტრუქტურებს („კლასტერებს“) ქმნიან, რომლებიც ტემპერატურის გავლენით სტრუქტურულ ცვლილებებს განიცდიან.

ტრიფსინით დამუშავებისას მემბრანის ზედაპირულ ცილებთან ერთად სოლუბილიზაციას განიცდის NADPH-დამოკიდებული რედოქს-ჯაჭვის საწყისი და შუა კომპონენტი და აგრეთვე NADH-რედოქს-ჯაჭვის ტერმინალური კომპონენტი. ეს შედეგები ახსნილია ენდოპლაზმურ მემბრანებში ელექტრონთა გადამტანი სისტემების განივი სივრცული ორიენტაციით. ამასთან ითვლება, რომ ერთი ჯაჭვის საწყისი კომპონენტი – NADPH-სპეციფიკური ფლავოპროტეინი – ლოკალიზებულია მემბრანის გარე ზედაპირზე, ხოლო მეორე ჯაჭვის საწყისი კომპონენტი – NADH-სპეციფიკური ფლავოპროტეინი – მემბრანის შიდა სივრცეშია მოთავსებული (ნახ. 5). რედოქს-ჯაჭვების ასეთი ორიენტაცია საშუალებას იძლევა როგორც NADPH-ის, ასევე NADH-ის ჟანგვისას განხორციელდეს მემბრანის შიგნით ელექტრონთა ანტიპარალელური გადატანა.

კვლევისათვის, რა თქმა უნდა, სასურველია მიღებულ იქნას მემბრანებით მდიდარი მიკროსომული ფრაქცია მჟანგველ ფერმენტთა მაღალი აქტივობებით. ამისათვის მიმართავენ მათ ინდუქციას. ინდუქტორებად იყენებენ ფენობარბიტალს, მეთილქოლანტრენს, β -ნაფტოფლავონს ან სხვა რომელიმე ქსენობიოტიკს. საექსპერიმენტოდ ცხოველს დეკაპიტაციამდე ერთი კვირის განმავლობაში მუცლის ღრუში ყოველდღიურად უკეთდება რომელიმე მათგანის ინექცია. გარდა ამისა, ცხოველს ხშირად დაკვლამდე 18–20 საათით ადრე აშიმშილებენ. ენდოპლაზმური მემბრანების მოცუ-



ნახ. 5. ენდოპლაზმურ მემბრანებში რედოქს-ჯაჭვების განლაგების სქემა (განმარტება ტექსტში).

ლობა და ზედაპირის ფართობი ამ დროს მკვეთრად იზრდება (ორმაგდება ფენობარბიტალით). პარალელურად მნიშვნელოვან ზრდას განიცდის ციტოქრომ P450-ის შემცველი მუანგველი სისტემის ხვედრითი აქტივობა (ხუთმაგდება ფენობარბიტალით).

მცენარის შემთხვევაში ჩვენს ლაბორატორიაში ვიყენებთ მიკროსოპების ჯაშურ ფრაქციას, არ მივმართავთ მის შემდგომ ქვეფრაქციებად დაყოფას. ამისათვის მცენარის (უპირატესად ერთწლიანების) 3–4 დღიანი ნაზარდები ანალიზამდე 4–5 დღით ადრე გადაგვაკვს ინდუქტორის შემცველ ხსნარზე. ინდუქტორებად ჩვეულებრივ ვხმარობთ ან ქსენობიოტიკს (N,N-დიმეთილანილინის, ფენობარბიტალს, ბენზოლს, 3,4-ბენზპირენს და სხვ.), ან ციტოქრომ P450-ის ენდოგენურ სუბსტრატებს (ლაურინმჟავას ან დარიჩინმჟავას). დიმეთილანილინი ციტოქრომ P450-დამოკიდებული სისტემის რაოდენობრივ შემცველობას ასამბავებს, ხოლო დარიჩინმჟავა მას

~30%-ით ზრდის. გარკვეული თავისებურებებით გამოირჩევა 3,4-ბენზ-პირენის ინდუქციური ეფექტი: იგი ციტოქრომ P450-ის არააქტიური ფორმის, P420-ის საერთო რაოდენობის გაზრდას იწვევს.

ციტოქრომ P450-ის ინდუქციის საკითხს დაწერილებით მოგვიანებით განვიხილავთ.

1.1.3 ენდოპლაზმური მემბრანის ფოსფატაზები

ენდოპლაზმური რეტიკულუმის მემბრანის ფერმენტებიდან კარგადაა შესწავლილი ფოსფატაზები (EC 3.1.3), მათ შორის გლუკოზო-ნ-ფოსფატაზა. მიტოქონდრიული ფოსფატაზების გარდა, არც ერთი სხვა დანარჩენი ფოსფატაზისათვის გამოვლენილი არაა ელექტრონთა გადატანის პროცესთან მათი უშუალო კავშირი. მაშინ რა აუცილებლობას წარმოადგენს მოცემულ მონოგრაფიაში ამ ფერმენტთა ცალკე განხილვა? საქმე იმაშია, რომ მათი შედარებითი შესწავლა უაღრესად მნიშვნელოვანია ენდოპლაზმური მემბრანების ფერმენტული ორგანიზაციის კვლევისას. გარდა ამისა, ფოსფატაზები, ისევე როგორც ოქსიდორედუქტაზები, გამოიყენებიან ეფექტურ საკონტროლო ფერმენტულ ტესტებად მიკროსომული მემბრანის პეტეროგენულობის, ცილა-ლიპიდურ კომპლექსებთან ფერმენტთა დაკავშირებაში მოქმედი ძალებისა და მემბრანის შიგნით ფერმენტთა მოლეკულების განლაგების დასადგენად. ენდოპლაზმური მემბრანების ფოსფატაზური ფერმენტული სისტემები დღესაც ინტენსიური კვლევის საგანს წარმოადგენენ. ისტორიული ასპექტებიდან გამომდინარე, მიკროსომული მჟანგველი ფერმენტების შესწავლა ბიოქიმიის გაცილებით ახალი დარგია და ამიტომ ფოსფატაზებზე მონაცემები შეიძლება ენდოპლაზმური მემბრანების ელექტრონთა გამტანის სისტემათა კვლევაში ამოსავალ პუნქტებად იქცნენ. ფოსფატაზების ლოკალიზაციისა და ფუნქციონირების შესახებ ძირითადი პრინციპების ცოდნა უაღრესად აუცილებელია მოცემული კლასის მემბრანული ფერმენტების ორგანიზაციის თავისებურებათა შესაცნობად. ამ მოსაზრებით საჭიროდ ვთვლით, თუნდაც ზოგადად განვიხილოთ მნიშვნელოვანი და ფოსფატაზებს შორის უეჭველად პირველ ადგილზე მდგომი გლუკოზო-ნ-ფოსფატაზა.

ბოლო პერიოდამდე ითვლებოდა, რომ ეს ფერმენტი მხოლოდ ენდოპლაზმურ მემბრანებშია ლოკალიზებული და იგი ამ სუბუჯრედული ფრაქციის სპეციფიკური კომპონენტია. ამჟამად საქაროზის გრადიენტში ზონალური როტორით ცალკეული ფრაქციების მიღებამ და მათში გლუკოზო-

ნ-ფოსფატაზის ფერმენტის განაწილების დეტალურმა გამოკვლევამ მისი საკმაოდ მაღალი ჰეტეროგენულობა ცხადყო. აღმოჩნდა, რომ იგი მიტოქონდრიის გარე მემბრანაზე იმყოფება. ფერმენტი, რომელიც სისხლის მიმოქცევაში გლუკოზის შემოსვლას უზრუნველყოფს, უპირატესად ციტომემბრანაში, განსაკუთრებით კი ზორკლიანშია (~25%) ლოკალიზებული.

ზორკლიან მემბრანებში გლუკოზო-ნ-ფოსფატაზის მაღალი ხვედრითი აქტივობა იმით უნდა იყოს გამოწვეული, რომ ამ ქვეფრაქციაში ფერმენტისათვის სუბსტრატი უფრო ხელმისაწვდომია. მიუხედავად ამისა, დეტერგენტებითა და ჰიდროქსილამინით მისი ინაქტივაციის ხარისხი გლუვ მემბრანებში უფრო მაღალია; ამიტომ საფიქრებელია, რომ აქ საქმე გვაქვს მემბრანაში ფოსფატაზის ლოკალიზაციის თავისებურებებთან.

გლუკოზო-ნ-ფოსფატი მემბრანის ჰიდროფობულ ზონაშია ლოკალიზებული. ამის სასარგებლოდ მეტყველებს ის, რომ ფერმენტის ინაქტივაცია ხდება ფოსფოლიპაზა A-ს გავლენით, ხოლო რეაქტივაცია – ფოსფოლიპიდებით. ინაქტივაციას თან ახლავს სოლუბილიზაცია. რაც შეეხება ფოსფოლიპაზა C-ს, იგი ფერმენტის ინაქტივაციას სოლუბილიზების გარეშე ახდენს. როგორც ჩანს, ფოსფოლიპიდთა ცხიმოვანი მჟავების β-ნაშთები აპოფერმენტთან ჰიდროფობულ ურთიერთქმედებას, ხოლო პოლარული დაჯგუფებები – ფერმენტის აქტიური ცენტრის ფორმირებას განაპირობებენ. პროტეაზების დაბალი კონცენტრაციებით მემბრანის დამუშავება ფერმენტს აქტიურებს, მაგრამ მის სოლუბილიზებას ვერ იწვევს. საფიქრებელია, რომ ეფექტი ზედაპირული ცილოვანი შრის მოცილების შემდეგ ფერმენტის სუბსტრატთან წვდომის გაუმჯობესებასთანაა დაკავშირებული.

ნაჩვენებია, რომ ფერმენტი აქტიურდება დეზოქსიქოლატის, ქოლატის და ტრიტონ X-100-ის დაბალი კონცენტრაციებით. ამ რეაგენტთა მაღალი კონცენტრაციები, პირიქით, მის ინჰიბირებას იწვევენ. დეტერგენტთა უმრავლესობას გლუკოზო-ნ-ფოსფატაზა სოლუბილიზებულ მდგომარეობაში ვერ გადაჰყავს ინაქტივაციის გარეშე. ეს შედარებით წარმატებით ზორციელდება დიგიტონინის, ან მასთან ერთად დეზოქსიქოლატის გამოყენებით.

გლუვ მიკროსომულ მემბრანაში ფენობარბიტალი შესაძინევად ზრდის გლუკოზო-ნ-ფოსფატაზისა და ციტოქრომ b₅-ის შემცველობას. იმავდროულად მნიშვნელოვნად იზრდება ამ ფრაქციაში ფოსფოლიპიდთა შემცველობაც. მემბრანასთან დაკავშირებული ფორმით გლუკოზო-ნ-ფოსფატაზას სუბსტრატისადმი უფრო განსხვავებული სწრაფვა აქვს, ვიდრე თავისუფალ ფორმას. საერთოდ, მემბრანადაკავშირებულ ფერმენტებზე არაპოლარული სუბსტრატების განსხვავებული კონცენტრაციებით ურთიერთქმედებისას, მემბრანულ

მიცელებში ფერმენტულ აქტივობათა არსებითი ცვლილებები შეინიშნება. გლუკოზო-ნ-ფოსფატაზის სოლუბილიზება მოქმედებს მის კინეტიკურ თვისებებზე. იცვლება ფერმენტის თვისობა სუბსტრატისადმი და ენზიმი უაღრესად თერმოლაბილური და არა აბსოლუტურად სპეციფიკური ხდება.

ენდოპლაზმური მემბრანების ბიოგენეზის პროცესში გლუკოზო-ნ-ფოსფატაზა ელექტრონის გადამტანი ჯაჭვის კომპონენტთა მსგავსად იქცევა: მისი აქტივობა ორგანიზმის დაბადებისთანავე ჩნდება და სწრაფად იზრდება სიცოცხლის პირველი სამი დღის განმავლობაში. ასეთ დინამიკას ადგილი აქვს მიკროსომების ორივე ქვეფრაქციაში. უჯრედში მისი ფუნქციური როლის განხილვისას, ჰიდროლაზურ აქტივობასთან ერთად საჭიროა აღინიშნოს ტრანსფოსფორილების რეაქციებში ფერმენტის მონაწილეობის უნარი. მას შეუძლია მანოზო-ნ-ფოსფატის, ნუკლეოზიდდი- და ტრიფოსფატების არაორგანული პიროფოსფატიდან გლუკოზაზე ფოსფატური და პიროფოსფატური ჯგუფების გადატანა. ფერმენტის ლიპიდური ლოკალიზაციის არსი გასაგები გახდება, თუ დავეშვებით, რომ ფერმენტს უშუალო კავშირი აქვს ენდოპლაზმური მემბრანის ჰიდროფობულ ზონაში გავლით გლუკოზის გადატანაში.

გლუკოზო-ნ-ფოსფატაზა ისეთი ფერმენტის კლასიკური მაგალითია, რომლის აქტივობის დონეც ძლიერ მგრძნობიარეა ცხოველის საკვები რაციონის მიმართ. ზანგრძლივი შიმშილობისას მისი შემცველობა ციტომემბრანებში საგრძნობლად ქვეითდება. ამის პარალელურად მოცემულ პირობებში ითრგუნება სამკურნალწამლო პრეპარატებისა და სხვა ტოქსიკური ქსენობიოტიკის ჟანგვითი (მაგრამ არა აღდგენითი) მეტაბოლიზმი. აღნიშნულიდან გამომდინარე, გლუკოზო-ნ-ფოსფატაზის აქტივობა წარმოადგენს თავისებურ მაღალმგრძნობიარე ტესტს მემბრანაში ლიპიდური პეროქსიდაციის შესაფასებლად. ცხიმოვან მჟავათა ზეჟანგური ჟანგვის გაძლიერება ამ ფერმენტის აქტივობის მომენტალურ დაქვეითებას იწვევს და პირიქით.

1.1.3.1 არასპეციფიკური ესთერაზა

გლუკოზო-ნ-ფოსფატაზის გარდა, ენდოპლაზმურ მემბრანებში ესთერაზების მთელი ჯგუფი ფუნქციონირებს და მათი pH-ოპტიმუმი 6.5–7.5-ის საზღვრებში იმყოფება. დაბალი სუბსტრატული სპეციფიკურობა მათ დეტალურ კლასიფიკაციას აძნელებს. სხვადასხვა სუბსტრატების გამოყენებით ამ არასპეციფიკური ესთერაზების აქტივობათა განაწილების შეს-

წავლამ აჩვენა, რომ ფერმენტი დაახლოებით თანაბრად ნაწილდება მემბრანის გლუვ და ზორკლიან ქვეფრაქციებში. მას მცირე ლატენტური აქტივობა აქვს და ტრიტონ X-100-ის საშუალებით შეიძლება მისი აქტივობის არაუმეტეს 10–20%-ით გაზრდა. ამასთან, დეტერგენტის უმნიშვნელო კონცენტრაცია (0.05–0.1%) ფერმენტის სწრაფ და სრულ სოლუბილიზაციას იწვევს. არასპეციფიკური ესთერაზის სოლუბილიზაციას ადგილი აქვს არამარტო *in vitro*, არამედ *in vivo* ცდებშიც, ოთხქლორიანი ნახშირბადით ღვიძლის დაზიანების ან იშემიის დროს. სოლუბილიზაცია წარმოადგენს დეტერგენტებითა და ჰიდროფობული სპირტების საშუალებით მემბრანის ლიპიდური კომპონენტის დაშლის შედეგს. ტრიფსინითა და მარილთა მაღალი კონცენტრაციებით დამუშავების შედეგად ფერმენტი სუპერნატანტში არ გადადის.

არსებული ექსპერიმენტული მონაცემები ორი დასკვნის გაკეთების საშუალებას იძლევა: 1) არასპეციფიკური ესთერაზის სოლუბილიზაციის სიადვილის მიუხედავად, მემბრანის ლიპიდური კომპონენტი მის შეკავებაში წამყვან როლს ასრულებს; 2) მცირე ლატენტური აქტივობა იმის მაჩვენებელია, რომ ესთერაზა მემბრანის ზედაპირზე იმყოფება, თუმცა ეს დასკვნა საბოლოო არაა, რადგან სუბსტრატთა მაღალი ცხიმში სხნადობა, როგორც ჩანს, ფერმენტთან მათ ადვილად წვდომას განაპირობებს, თუნდაც ეს უკანასკნელი მიკროსომული ბუშტის შიგნით იმყოფებოდეს. გარდა ამისა, მემბრანის ზედაპირზე ფერმენტის ლოკალიზაციის საწინააღმდეგოდ მეტყველებს ისიც, რომ პროტეოლიზურ ფერმენტებს არ გააჩნიათ არასპეციფიკური ესთერაზის გახსნის ან ინჰიბირების უნარი. ამგვარად, ამ ფერმენტის მემბრანაში ლოკალიზაციის საკითხი კვლავაც უცნობია.

1.2 ენდოპლაზმური მემბრანის ლიპიდური კომპონენტები

მემბრანები ლიპიდური ბუნების წარმონაქმნებია (ბერძ. „ლიპოს“ – ცხიმი). ესაა ნივთიერებათა საკმაოდ დიდი ჯგუფი, რომელსაც დაბალმოლეკულურ ორგანულ ნაერთებს მიაკუთვნებენ. ცხოველური, მცენარეული და მიკრობული უჯრედებიდან ისინი არაპოლარული გამხსნელებით (ქლოროფორმით, ეთერით ან ბენზოლით) ექსტრაგირდებიან. ორგანიზმისათვის ლიპიდებს კარდინალური მნიშვნელობა აქვთ, რამდენადაც არაუმცირეს ზუთ ძირითად ფუნქციას ასრულებენ:

1. წარმოადგენენ ფორმას, რომლის სახითაც მეტაბოლური საწყავის მა-

რაგი დეპონირდება;

2. წარმოადგენენ ფორმას, რომლის სახითაც ეს საწვავი ტრანსპორტირდება;
3. მონაწილეობენ უჯრედული განვლადობის რეგულაციასა და ადსორბციულ პროცესებში, რაც მემბრანული ქსენობიოქიმიისათვის ყველაზე მნიშვნელოვანია;
4. წარმოადგენენ ბიოლოგიური მემბრანების აუცილებელ სტრუქტურულ-ფუნქციურ კომპონენტებს;
5. ასრულებენ თერმორეგულატორულ ფუნქციებს.

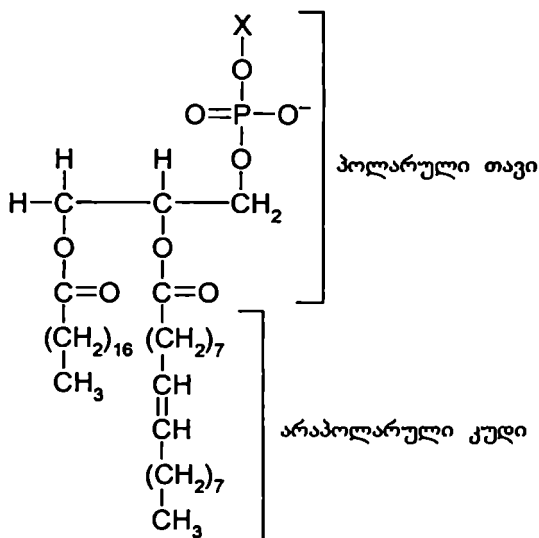
შემადგენლობით ლიპიდები მრავალფეროვნებით გამოირჩევიან. ხშირად ამ კლასს აკუთვნებენ სტეროლებს, ტერპენებს, პროსტაგლანდინებს და ა.შ. ცხიმოვან მჟავებთან ერთად მემბრანებში მათთან ერთადაა ქიმიურად ბმული სპირტები, აზოტოვანი ფუძეები, ნახშირწყლები და სხვ.

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

მემბრანული ლიპიდების მნიშვნელოვან ჯგუფს მიეკუთვნება ფოსფოლიპიდები (სხვაგვარად მათ გლიცეროფოსფოლიპიდებს, გლიცეროფოსფატებს და ფოსფოგლიცერიდებსაც უწოდებენ). ისინი გლიცერინისა და მაღალმოლეკულურ ცხიმოვან მჟავათა ორი ნაშთის ესთერებია და ამდენად, დიგლიცერიდებს წარმოადგენენ. მესამე ცხიმოვანი მჟავას ადგილს ფოსფატური ჯგუფი იკავებს, რომელთანაც, ჩვეულებრივ, წყალში ხსნადი ნაშთია მიერთებული. ბიომემბრანებში ამ ტიპის ხუთი ფოსფოლიპიდია იდენტიფიცირებული: თავისუფალი ფოსფატური ჯგუფის შემცველი ფოსფატიდის მჟავა და ოთხი ფოსფოლიპიდი, რომლებშიც ფოსფატურ ჯგუფთან ქოლინი, ინოზიტი (ექვსნახშირბადატომიანი შაქარსპირტი), ეთანოლამინი ან ამინომჟავა სერინია მიერთებული. ქოლინი და ინოზიტი B-ჯგუფის ვიტამინებია, ეთანოლამინი კი ამინოსპირტია. სხვა ფოსფოლიპიდებთან შედარებით მეტად გავრცელებულია ფოსფატიდილქოლინი (ლეციტინი).

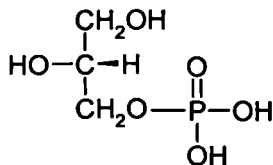
ფოსფოლიპიდთა მოლეკულები პოლარული „თავისა“ და ორი არაპოლარული ნახშირწყალბადოვანი „კუდისაგან“ შედგებიან. ამიტომ მათ ამფიფილურ (ამფიპატურ) ლიპიდებსაც უწოდებენ. ესაა ორი საპირისპირო თვისების – ჰიდროფობულის (აცილური ჯგუფის ხარჯზე) და ჰიდროფი-

ლურის (მთავარი პოლარული ჯგუფის) ერთდროული ფლობა. ფოსფო-ლიპიდები ერთმანეთისაგან ძირითადად α -ჯგუფების ზომით, ფორმით, პოლარობითა და მუხტის სიდიდით განსხვავდებიან. გარდა ამისა, ფოსფო-ლიპიდის ესა თუ ის ტიპი ორი ცხიმოვანი მჟავას ნაშთის ბუნებითაც ხასიათდება. ჩვეულებრივ, ისინი თითო ნაჯერ და უჯერ ცხიმოვან მჟავათა ნაშთებს შეიცავენ. ამასთან, უჯერი ნაშთი (მაგ., ოლეინისა და ლინოლის მჟავათა ნაშთები) გლიცერინს მეორე მდგომარეობაში უკავშირდება:



ფოსფოლიპიდის მოლეკულის სტრუქტურა

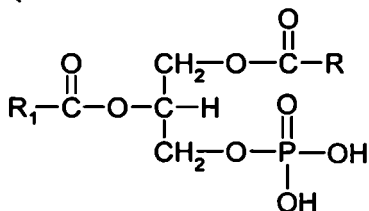
ყველა ფოსფოგლიცერიდის საერთო სტრუქტურულ ფრაგმენტს გლიცეროფოსფატი წარმოადგენს. იგი ერთ ასიმეტრიულ ნახშირბადს შეიცავს და შეიძლება იყოს ან D-გლიცერო-1-ფოსფატი, ან L-გლიცერო-3-ფოსფატი. ამასთან დაკავშირებით მიღებულია, რომ გლიცერინის წარმოებულთა სტერეოქიმიური კლასიფიკაცია აიგოს ნახშირბადატომთა სტერეოსპეციფიკური ნუმერაციის (შემოკლებით — sn) საფუძველზე. ამ ნუმერაციის შესაბამისად ნივთიერების პროექციულ ფორმულაში მეორად ჰიდროქსილის ჯგუფს მარცხნივ ათავსებენ. გლიცეროფოსფორმჟავას იზომერი, რომელიც ბუნებრივ ფოსფოგლიცერიდებში გვხვდება, მიეკუთვნება L-რიგს და მას sn-გლიცერო-3-ფოსფორმჟავას უწოდებენ:



5H-გლიცერო-3-ფოსფორმჟავა

გლიცეროფოსფატში ორი დანარჩენი ჰიდროქსილის ჯგუფი ჩანაცვლებულია ნახშირწყალბადოვანი რადიკალით, რომელიც გლიცერინს ეთერული ან ესთერული ბმებით უკავშირდება.

გლიცეროფოსფოლიპიდების უმარტივესი წარმომადგენელია ფოსფატიდმჟავა, რომლის მოლეკულაშიც ფოსფატური ჯგუფი მხოლოდ გლიცერინის ნაშთთანაა ბმული:

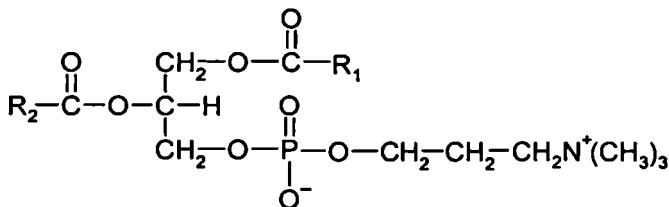


ფოსფატიდმჟავა

(1,2-დიაცილ-5H-გლიცეროფოსფორმჟავა)

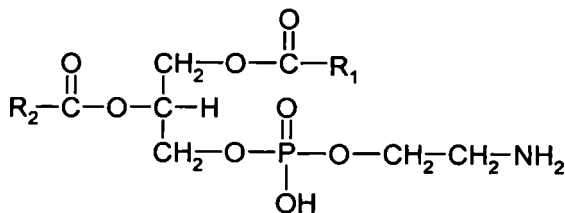
ეს ნივთიერება ფოსფოგლიცერიდების ბიოსინთეზის მთავარი წინამორბედი.

მცენარეული და ცხოველური ქსოვილებიდან გამოყოფილი და იდენტიფიცირებულია გლიცეროფოსფოლიპიდების მთელი რიგი. მოგვყავს ზოგიერთი მათგანის მოლეკულური აღნაგობის ფორმულები (ყველა ფორმულაში R – ნახშირწყალბადოვანი რადიკალია):

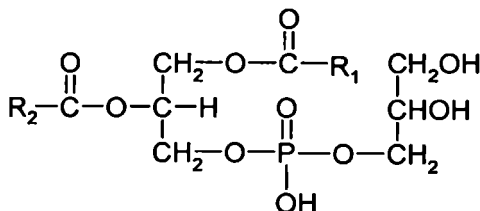


ფოსფატიდილქოლინი

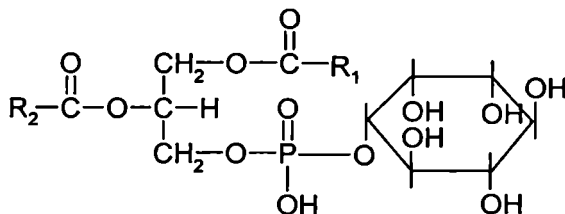
(1,2-დიაცილ-5H-გლიცეროფოსფოქოლინი)



ფოსფატიდილეთანოლამინი
(1,2-დიაცილ-SN-გლიცეროფოსფოეთანოლამინი)



ფოსფატიდილგლიცერინი
(1,2-დიაცილ-SN-გლიცერო-3-ფოსფო-1-SN-გლიცერინი)



ფოსფატიდილინოზიტი
(3-SN-ფოსფატიდილ-SN-1-მიოინოზიტი)

მცენარეებში განსაკუთრებით დიდი რაოდენობით ფოსფატიდილეთანოლამინი და ფოსფატიდილქოლინი გვხვდება (აღრე მათ კეფალინსა და ლეციტინს უწოდებდნენ). X-კომპონენტებად (იხ. ფოსფოლიპიდის მოლეკულის სტრუქტურა) ისინი შესაბამისად ამინოსპირტ ეთანოლამინსა და ქოლინს შეიცავენ. ფოსფატიდების პოლარული X-ჯგუფი შეიძლება იყოს შაქრის მოლეკულა. მცენარეში იდენტიფიცირებულია ასეთი გლიკოფოს-

ფოგლიცერიდები (ფოსფატიდილშაქრები). ისინი განსხვავდებიან გლიკო-ლიპიდებისაგან, რომლებიც აგრეთვე შეიცავენ შაქრებს, მაგრამ არა ფოს-ფორმჟავას.

ერთწლიანი მცენარეების (სოიოს, სიმინდის, მზესუმზირის, ზორბლის და სხვ.) თესლებიდან გამოყოფილია ფიტოგლიკოლიპიდები, რომლებიც ჯამური ფოსფოლიპიდების 5%-ს შეადგენენ. მათი პიდროლიზით მიღებუ-ლია ფიტოსფინგოზინი, ცხიმოვანი მჟავები, ინოზიტი, გლუკოზამინი, გალაქ-ტოზა, ჰექსურონმჟავა, არაბინოზა, მანოზა და ფოსფატი.

სუფთა ფოსფოლიპიდები მოთეთრო ცვილისებური ნივთიერებებია. პერ-თან შეხებისას ისინი მუქდება, რაც ფოსფოლიპიდის უჯერი ცხიმოვანი მჟავას კომპონენტების ჟანგბადთან ურთიერთქმედების შედეგია. ამ დროს სხვადასხვა ზეჟანგური ტიპის ნაერთი წარმოიქმნება. ფოსფოგლიცერიდები ადვილად იხსნებიან ქლოროფორმ-სპირტის ნარევიში; უწყლო აცეტონში სუსტი ხსნადობა გააჩნიათ, ხოლო წყალში უპირატესად მიცელების (უმ-ცირესი აგრეგატების) ფორმით იმყოფებიან.

ყველა სხვა ლიპიდთან შედარებით, ფოსფოგლიცერიდებს მეტად მკაფი-ოდ გამოსახული პოლარული თვისებები აქვთ. pH 7.0-ზე მათი ფოსფა-ტური ჯგუფი ყოველთვის უარყოფით მუხტს ატარებს. ამ ჯგუფის ნაერთებისთვის pK' (დისოციაციის მოჩვენებითი კონსტანტის ათობითი ლოგარიტმის შებრუნებული სიდიდე) 1-2-ის საზღვრებშია.

ეს მუდმივა განსხვავდება დისოციაციის ჭეშმარიტი თერმოდინამიკური კონსტანტისაგან (K). იგი შესწორებულია სისტემის იდეალური მდგო-მარეობიდან ისეთი გადახრების გათვალისწინებით, რომელიც შეიძლება გამოწვეულ იყოს კონცენტრაციულ და იონურ ძალთა ფაქტორებით. pK' -ის მნიშვნელობები ძლიერი მჟავების შემთხვევაში 3-ზე დაბალია, ხოლო ძლიერ ფუძეებისათვის 11-ზე მაღალი მნიშვნელობები გააჩნიათ.

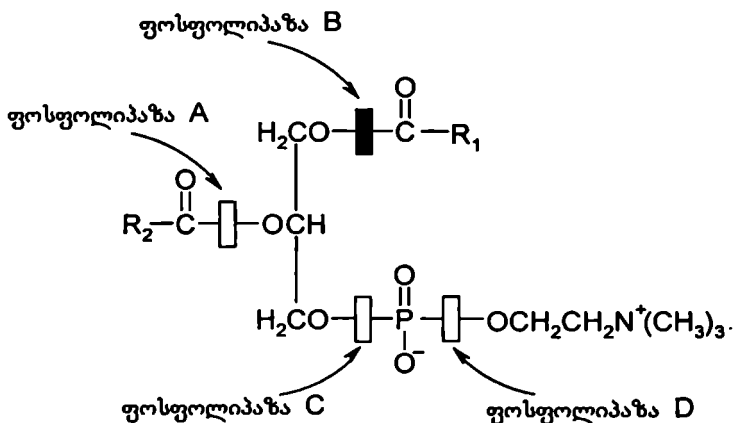
მიუხედავად იმისა, რომ ფოსფატიდილინოზიტის, ფოსფატიდილგლიცე-რინის და ფოსფატიდილშაქრების X-ჯგუფებს ელექტრული მუხტი არ გააჩნიათ, ისინი მაინც ძლიერ პოლარულები არიან. ფოსფატიდილეთანოლა-მინისა და ფოსფატიდილქოლინის X-ჯგუფები pH 7.0-ზე დადებით მუხტს ატარებენ, რამდენადაც მათი ამინოჯგუფებისათვის pK' შესაბამისად 10-ისა და 13-ის ტოლია. ამგვარად, pH 7.0-ზე ეს ორი ფოსფოგლიცერიდი ბიპო-ლარულ ცვიტერიონებს წარმოადგენენ და მათი ჯამური მუხტი ნულის ტოლია. ფოსფატიდილსერინის X-ჯგუფი ($-OCH_2CH(NH_2)COOH$) α -ამი-ნოჯგუფს ($pK'=10$) და კარბოქსილის ჯგუფს ($pK'=3$) შეიცავს. მაშასადამე, pH 7.0-ზე ამ ფოსფოგლიცერიდის მოლეკულას ორი უარყოფითი და ერთი

დადებითი მუხტი აქვს, ე.ი. უარყოფითი ჯამური მუხტის მატარებელია.

ფოსფოგლიცერიდების მოლეკულათა თავების ზომების, ფორმების, პოლარობისა და მუხტის ყველა ვარიაცია მნიშვნელოვან გავლენას ახდენს ლიპიდური მოლეკულების მონო- და ბიმოლეკულურ შრეებსა და საერთოდ, მემბრანულ სისტემათა სტრუქტურაზე.

ფოსფოგლიცერიდების რბილი ტუტე ჰიდროლიზისას ცხიმოვან მჟავათა მოცილება ხდება, მაგრამ არ იცვლება საწყისი მოლეკულის გლიცერო-ფოსფოსპირტული ღერძი. მაგ., ასეთ პირობებში ფოსფატიდილქოლინის ჰიდროლიზით გლიცეროლ-3-ფოსფორიდილქოლინი მიიღება. ძლიერ ტუტე არეში ჰიდროლიზისას ფოსფოგლიცერიდს სცილდება როგორც ორივე ცხიმოვანი მჟავა, ასევე $X-OH$ სპირტი. გლიცერინსა და ფოსფორმჟავას შორის კავშირი ტუტე ჰიდროლიზისადმი შედარებით მდგრადია. ამიტომ, ასეთი ჰიდროლიზისას კიდევ ერთი პროდუქტი — გლიცეროლ-3-ფოსფატი წარმოიქმნება, რომელიც შემდგომ მჟავა ჰიდროლიზს განიცდის.

ფოსფოგლიცერიდების ჰიდროლიზის განხორციელება შეიძლება სპეციფიკური ფერმენტებით — ფოსფოლიპაზებით (ნახ. 6). ეს ზემოქმედება ძლიერ ეფექტურია ამ ნივთიერებათა სტრუქტურის დადგენისათვის. A-კლასის ფოსფოლიპაზები (მაგ., ფოსფოლიპაზა A_2), რომელთაც ზოგიერთი გველის და ფუტკრის შხამი შეიცავს, სპეციფიკურად აკატალიზებენ მეორე მდგომარეობაში მყოფ ცხიმოვანი მჟავას მოცილებას. მიღებული პროდუქტი ლიზოფოსფატიდის სახელწოდებითაა ცნობილი.



ნახ. 6. ფოსფატიდილქოლინის მოლეკულაში არსებული კავშირები, რომლებსაც ფოსფოლიპაზები „უტყვენ“.

ნორმალურ უჯრედებსა და ქსოვილებში ეს ნივთიერება არ გვხვდება. იგი ტოქსიკურია და მემბრანების დაშლას იწვევს. ფოსფოლიპაზა B აკატალიზებს მეორე (ან ორივე) ცხიმოვანი მჟავას მოცილების რეაქციას. ამ ფერმენტით ფოსფატიდილქოლინის დამუშავებისას გლიცეროლ-3-ფოსფორილქოლინი მიიღება. ფოსფოლიპაზა C აპიდროლიზებს გლიცერინისა და ფოსფორმჟავას შორის კავშირს, ხოლო ფოსფოლიპაზა D აცილებს X-ჯგუფებს. პიდროლიზის პროდუქტი ფოსფატიდის მჟავაა.

1.2.1 ფოსფოლიპიდების ამფიფილურობა და მათი შიდამემბრანული ორიენტაცია

სტრუქტურული მრავალფეროვნების მიუხედავად, ბიოლოგიურ მემბრანათა ლიპიდები ერთიანი პრინციპით არიან ნაგები. მათი საშუალებით მემბრანული სტრუქტურების ჩამოყალიბება ევოლუციის ერთ-ერთ ყველაზე მნიშვნელოვან ეტაპად შეიძლება ჩაითვალოს. გარემომცველი მემბრანით შიდაუჯრედული სივრცის დაცვის გარდა, უჯრედში ისინი წარმოქმნიან ცალკეულ კომპარტმენტებს (ნაკვეთურებს) და ამ გზით აღწევენ კატაბოლიზმის მიზანდასახულ მსვლელობას. ხშირ შემთხვევაში ეს კომპარტმენტები საკუთარი, სპეციფიკურ ფუნქციებთან ადაპტირებული მემბრანებით არიან წარმოდგენილი.

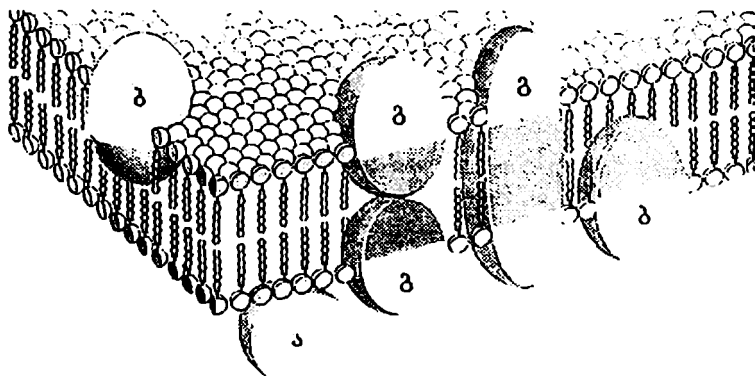
მემბრანათა მრავალწლიანი კვლევისა და დაგროვილი კოლოსალური ინფორმაციის მიუხედავად, სადღეისოდ კვლავაც უცნობი რჩება საკითხი იმის შესახებ, თუ რა განსაკუთრებული თვისებები გააჩნიათ ლიპიდებს სპეციფიკური ფუნქციების განსაზოციელებლად. სხვაგვარად რომ ითქვას, დასადგენია, ლიპიდთა მოლეკულების რა შესაძლებლობები განსაზღვრავენ მემბრანათა ღირებულ თვისებებს.

ამჟამად დანამდვილებით ერთი ფაქტია ცნობილი: მემბრანის ძირითად კომპონენტებს უნდა გააჩნდეთ სტრუქტურათა წარმოქმნის უნარი. პრობლემის ამ კუთხით დაყენებისას კი წინა პლანზე უსათუოდ ფოსფოლიპიდები და სტეროლები გამოდიან. მათ მემბრანისათვის შესანიშნავად „მორგებული“ ამფიფილური შენება გააჩნიათ.

მეტაბოლური პროცესების კონტროლში ამ ნივთიერებებს მაღალი პოტენციალის მქონე სპეციფიკური ფიზიოლოგიური უნარი აქვთ. მემბრანულ სტრუქტურებში წონასწორობიდან მათ ყოველ გადახრას ან უკმარობას უშუალო კავშირი აქვს რაიმე პათოლოგიასთან (სიმსუქნესთან, დია-

ბეტან, კეტოციდოზთან, ათეროსკლეროზთან და სხვ.). ამფიფილურობა ლიპიდური კომპლექსების მოქნილობის ფაქტორია.

ფოსფოლიპიდებისა და ქოლესტეროლის გარდა, ამფიფილებს მიეკუთვნებიან ინტეგრალური და პერიფერიული, ანუ ადჰეზიური ცილებიც. ცნობილია ფოსფატიდილინოზიტოლი, რომელიც ამ ცილებისათვის ლიპიდური სამაგრის როლს ასრულებს. მემბრანადაკავშირებული ცილა-ფერმენტები ქიმიურ გარდაქმნათა მაღალწესრიგიანობას მხოლოდ ლიპიდური კომპონენტების გარემოცვის პირობებში ახორციელებენ. პერიფერიული ცილები მემბრანასთან სუსტად არიან ასოცირებული და მარილთა კონცენტრული ხსნარებით ადვილად სოლუბილიზდებიან (ნახ. 7).



ნახ. 7. მემბრანის (4.5 ნმ სისქის) ლიპიდური ბიშრე. მეორე კომპონენტს წარმოადგენენ ცილები, რომლებიც შეიძლება ორ ჯგუფად დაიყოს: პირველი (ა) იმყოფება მემბრანის ზედაპირზე (ან ზედაპირის მოსაზღვრედ). ეს ე.წ. პერიფერიული ცილებია; მეორე – ჩაძირულია ლიპიდურ შრეში. ამ შემთხვევაში ცილის მოლეკულები ან მემბრანის განსაზღვრულ სიღრმეს აღწევენ (ბ), ან მთლიანად განჭოლდებიან მას ცალკეულად ან წყვილებად (გ). ეს უკანასკნელი ინტეგრალურ ცილებს მიეკუთვნება.

ბიომემბრანაში მოლეკულათა ორიენტაციისათვის ყველაზე მნიშვნელოვანი ძალის მოქმედება ნივთიერებათა სწორედ ამფიფილურ თვისებას ეფუძნება და მას „ამფიფილურ ძალას“ უწოდებენ. როგორც ჩანს, ფოსფოლიპიდების მოლეკულათა ეს ამფიფილური უნარი წარმოადგენს მემბრანაში მათი ორგანიზებული ორიენტაციის მიზეზს. მემბრანულ სტრუქტურაში ფოსფოლიპიდების ჰიდროფობული ჯაჭვები ერთმანეთს სუსტი

მოლეკულათაშორისი, ე.წ. ვან-დერ-ვაალსის ძალებით უკავშირდებიან. ეს ძალები სინერგიულად ჯამდება (ე.ი. არითმეტიკულ ჯამზე მეტია) ერთ მთლიან, საკმაოდ ძლიერ „ორიენტაციულ ძალად“. მაგ., ფოსფატიდილქოლინისათვის იგი 92.5 კჯმოლ⁻¹-ს შეადგენს.

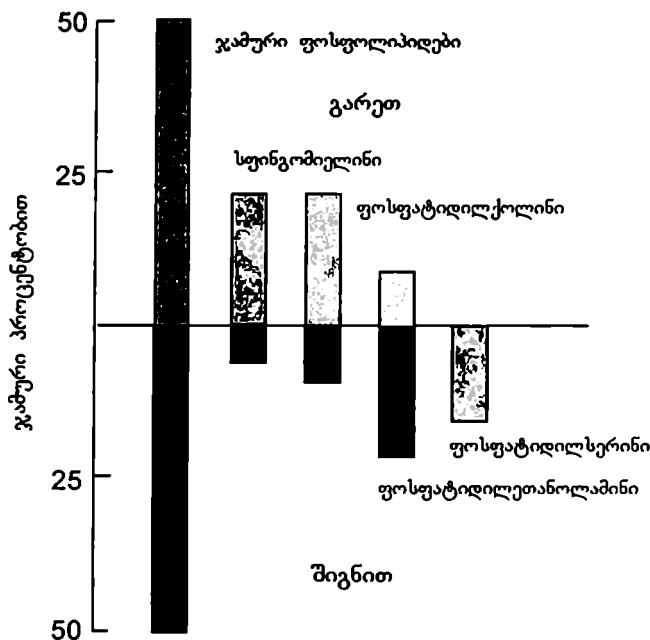
ფოსფოლიპიდების ერთი აცილური ჯგუფი, როგორც ზევით აღინიშნა, უჯერია. მეორე პოზიციაში ძირითადად მაღალი რიგის ცხიმოვანი მჟავების (ოლეინის ან ლინოლის) პოლიუჯერი ჯაჭვებია წარმოდგენილი. ფოსფოლიპიდის მოლეკულის აღნაგობაში აცილური ჯაჭვის ცის- ან ტრანს- კონფიგურაციების როლზე მსჯელობა ძალიან ძნელია. ლიპიდური მოლეკულის ქცევის შესახებ შედარებით დამაჯერებელ და სრულყოფილ ინფორმაციას იძლევა ლენგმიურის მიერ შემოთავაზებული ე.წ. „ბალანსის ტექნიკა“, რომლის მიხედვითაც ფოსფოლიპიდების ამფიფილური მოლეკულები წყლის ზედაპირისადმი ვერტიკალურ პოზიციას იკავებენ, მისკენ პიკროფილური თავებით არიან მიმართული და ფაშარად უკავშირდებიან ცილოვან შრეს. ასეთი წყობა ცხიმოვანი შიგთავსით გამოვსებული „სენდვიჩს“ წააგავს.

თანამედროვე წარმოდგენით ბიოლოგიური მემბრანები აკმაყოფილებენ თხევად-მოზაიკური (თხევად-კრისტალური) სტრუქტურის მქონე მოდელს, რომლის მიხედვითაც მემბრანა წარმოადგენს ორიენტირებულ, ორგანოზომილებიან, ამფიფილური ცილებისა და ლიპიდებისაგან შემდგარ ბლანტ „ხსნარს“ იგი დროის ნებისმიერ მომენტში თერმოდინამიკურ წონასწორობაშია.

ბალანსის ტექნიკა საშუალებას იძლევა გაიზომოს ის საჭირო ძალა, რომელიც ლიპიდურმა მოლეკულებმა უნდა განავითარონ პარალელური ორიენტაციის შესანარჩუნებლად და დადგინდეს აგრეთვე თითოეული მოლეკულის მიერ დაკავებული ფართობი.

ლიპიდური კომპონენტები ენდოპლაზმურ მემბრანებში ასიმეტრიული განაწილების პრინციპს ემორჩილებიან. ფოსფოლიპიდების პიკროფილური მოქმედებისადმი ფოსფოლიპიდების მგრძნობიარობის საფუძველზე შექმნილია მემბრანის ვერტიკალურ ჭრილში მათი ასიმეტრიული განლაგების მოდელი (ნახ. 8).

ბიოლოგიური მემბრანები ფუნქციური ასიმეტრიით ხასიათდებიან, რამდენადაც საზღვრავენ უჯრედის განსხვავებულ კომპარტმენტებს. ამჟამად დადგენილ ფაქტად ითვლება, რომ მემბრანის ფუნქციის ასიმეტრია ისახება ბიშრის ორ ზედაპირს შორის ლიპიდებისა და სხვა კომპონენტების სხვადასხვაგვარ განაწილებაზე. მაგ., ქოლინშემცველი ფოსფოლიპი-



ნახ. 8. ენდოპლაზმური მემბრანების განივ კრისში ფოსფოლიპიდების ასიმეტრიული განაწილება.

დები მემბრანის ორმაგი ბიშრის ერთ მხარეს იმყოფებიან. ადამიანის ერითროციტებში ეს ფოსფოლიპიდები ძირითადად ბიშრის გარე ზედაპირზე არიან ლოკალიზებული, მაშინ როდესაც ფოსფატიდილეთანოლამინი, ფოსფატიდილსერინი და ფოსფატიდილინოზიტი უპირატესად შიდა ზედაპირს უკავშირდებიან. ფოსფოლიპიდთა ასიმეტრიული განლაგების დადგენა მოხერხდა მას შემდეგ, რაც შესაძლებელი გახდა „სრულად გადმობრუნებული“ მემბრანული ბუშტების მიღება. სადღეისოდ გამოკვლეულ ყველა მემბრანაში ფოსფოლიპიდები ასიმეტრიულად არიან განაწილებული. თვლიან, რომ ქოლესტეროლიც ასევე ასიმეტრიულად ნაწილდება და უპირატესად მონოშრის გარე ზედაპირზეა ლოკალიზებული. მიუხედავად ამისა, ფოსფოლიპიდებისა და ქოლესტეროლის ასიმეტრია აბსოლუტური არაა. სხვაგვარად რომ ითქვას, ისინი უპირატესად, მაგრამ არა უკლებლად არიან დაკავშირებული ორმაგი შრის ერთ მხარეს. გლიკოლიპიდები ნამდვილად აბსოლუტურად ასიმეტრიულად არიან განაწილე-

ბული. ისინი ყოველთვის მემბრანის ციტოპლაზმურ მხარეს იმყოფებიან.

ლიპიდები ორმაგი შრის სიბრტყეში საკმაოდ მაღალი ძვრადობით გამოირჩევიან. მიუხედავად ამისა, შრეებს შორის მათი გადაადგილება („ფლიპ-ფლოპი“) შედარებით ნელი პროცესია. მოდელურ სისტემებში ასეთი გადამძრავების სიჩქარე განისაზღვრება ფოსფოლიპიდების რაოდენობით, რომელთაც ცვლაში მონაწილეობა შეუძლიათ ფოსფოლიპიდ-მცვლელი ცილის მონაწილეობით. ჯერჯერობით ფერმენტი, რომელიც „ფლიპ-ფლოპს“ აკატალიზებს, ნაპოვნი არაა, მაგრამ მისი რეალური არსებობა საკვებით მოსალოდნელია. ფოსფოლიპიდების მოლეკულები მონოშრეში ცვლის უნარს პრაქტიკულად არ ფლობენ. ფოსფატიდილქოლინის ბიშრეში გადაადგილების სიჩქარის ნახევარპერიოდი რამდენიმე დღეა.

ბიოლოგიურ მემბრანებში „ფლიპ-ფლოპის“ სიჩქარე რამდენიმე დღიდან (ვირუსების გარსში) რამდენიმე წუთამდე (სწრაფად მზარდ ბაქტერიულ მემბრანებში) ვარირებს. ერთთროციტების მემბრანებში ფოსფატიდილქოლინის გადაადგილება 8 საათიანი ნახევარ-პერიოდით ხასიათდება. სიჩქარეთა ასეთი განსხვავებული მნიშვნელობის მიზეზი უცნობია. შესაძლოა, რომ ზოგიერთ შემთხვევაში ორმაგი შრის გამჭოლი ცილები მინიმუმამდე აქვეითებენ ლიპიდთა გადაადგილებისათვის საჭირო აქტივაციას, რაც არ შეინიშნება ვირუსულ მემბრანებში.

ლიპიდთა ტიპურ ასიმეტრიულ განლაგებას ვხვდებით ერთთროციტებში. აქ მხოლოდ ფოსფატიდილქოლინია მემბრანის მთლიან სივრცეში თანაბრად განაწილებული. რაც შეეხება ფოსფატიდილეთანოლამინს და ფოსფატიდილსერინს, ისინი მემბრანის არხის სანათურისაკენ (შიგნით) არიან მიქცეული. მემბრანის სიღრმეში თანაბრად ნაწილდება ქოლესტეროლიც.

ლიპიდთა ასიმეტრია შეიძლება გამოწვეული იყოს მემბრანული ცილებით, რომლებიც ლიპიდებს მხოლოდ განივი მიმართულებით გადაადგილების საშუალებას აძლევენ. გლიცეროფოსფოლიპიდებისა და სფინგოლიპიდების არაკატალიზური განივი, ანუ ლატერალური მოძრაობა უადრესად ნელი პროცესია. ერთთროციტების 120-დღიანი სიცოცხლის მანძილზე ამ გზით არც ახალი მემბრანის სინთეზი, და არც რაიმე მნიშვნელოვანი განახლება არ ხდება.

მემბრანის ისეთ მნიშვნელოვან ფიზიკურ პარამეტრს, როგორც მისი სიბლანტეა, ძირითადად ლიპიდური მოლეკულების საკუთარი სიგრძივი ღერძის გარშემო ბრუნვა და შენელებული ლატერალური დიფუზია განაპირობებს, რადგან ე.წ. „ფლიპ-ფლოპი“, ანუ ლიპიდის მოლეკულის მემბრანებს შორის შინაგანი გადაადგილება ნაკლებად ეფექტურია.

1.2.1.1 ფაზური გადასვლები

ფოსფოლიპიდების მნიშვნელოვანი თვისება იმაში მდგომარეობს, რომ ორმაგ შრეში ისინი თხევადკრისტალურ მდგომარეობაში იმყოფებიან. ამასთან, მათ შეუძლიათ გადაადგილება ორ განზომილებაში, ისე რომ არ განიცადონ ჭეშმარიტი ლღობა. ამდენად, თხევადკრისტალური მდგომარეობა წარმოადგენს სტრუქტურულ საფუძველს, რომელიც უზრუნველყოფს მემბრანის კომპონენტთა ძვრადობას მოწესრიგებული კარკასის შიგნით.

ფოსფოლიპიდებს ახასიათებთ ფაზური გადასვლა მყარი გელიდან თხევადკრისტალურ მდგომარეობაში. ისევე, როგორც სხვა მდგომარეობის ცვლილებისას, ეს გადასვლაც დაკავშირებულია სითბურ ეფექტთან. ფაზური გადასვლა წარმოებს კოოპერატიულად, მოცემული ფოსფოლიპიდისათვის განსაზღვრულ ტემპერატურაზე. მაგ., დიპალმიტოილ-ფოსფატიდილქოლინი (ორი ნაჯერი ცხიმოვანი მჟავას ჯაჭვით, რომელთაგან თითოეული 16 ნახშირბადატომისაგან შედგება), ფაზურ გადასვლას განიცდის 42°C -ზე.

სრულად ნაჯერი ცხიმოვანი მჟავების მქონე ნებისმიერი კლასის ფოსფოლიპიდებისათვის ფაზური გადასვლის ტემპერატურა იზრდება ჯაჭვის სიგრძის ზრდასთან ერთად. ფოსფოლიპიდთა ცხიმოვანი მჟავების ჯაჭვებში ცის-კონფიგურაციის თუნდაც ერთი ორმაგი კავშირის არსებობისას, ფაზური გადასვლის ტემპერატურა მკვეთრად ქვეითდება. ბუბუ-მწოვართა უჯრედების ბუნებრივ ფოსფოლიპიდთა უმრავლესობა სულ მცირე, ერთ ორმაგ ბმას მინც შეიცავს. ამიტომ მათი ფაზური გადასვლის ტემპერატურა სხეულის ტემპერატურასთან შედარებით დაბალია.

ფაზური გადასვლის ხასიათზე ძლიერ ზეგავლენას ახდენს ფოსფოლიპიდური „თავი“. ფოსფატიდილეთანოლამინისა და ფოსფატიდილქოლინისათვის, რომელთა შემადგენლობა ცხიმოვანი მჟავების მხრივ ერთნაირია, ფაზური გადასვლის ტემპერატურული სხვაობა 20°C -ს აღწევს. N-მეთილის ჯგუფების შუალედური რიცხვის შემცველ ანალოგებს ასევე შუალედური ფაზური გადასვლის ტემპერატურა აქვთ. ეს პარამეტრი იზრდება მემბრანებში ორვალენტთან მეტალთა იონების (Ca^{2+} და Mg^{2+}) თანამყოფობის დროსაც.

ერთი ტიპის ფოსფოლიპიდთა შემცველი სისტემებისათვის ფაზური გადასვლის მონაცემები არ იძლევიან ნათელ წარმოდგენას იმაზე, თუ რა ხდება ბუნებრივ მემბრანებში, რომლებიც სხვადასხვა ფოსფოლიპიდთა რთულ ნარევს წარმოადგენენ. მაგ., ერთირობის მემბრანა სულ მცირე,

20 განსხვავებულ ფოსფატიდილქოლინის შეიცავს. ამასთან, ბუნებრივი მემბრანების შემადგენლობაში შედის ქოლესტეროლი და ცილებიც.

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

1.2.1.2 ორმაგი შრის დენადობა და ძვრადობა

მემბრანათა უმრავლესობისათვის დამახასიათებელია არა ხისტი და სტატიკური, არამედ დინამიკური და ძვრადი სტრუქტურა. „დენადობა“ და „ძვრადობა“ შედარებით განუსაზღვრელი ცნებებია, რომელთაც ჩვეულებრივ იყენებენ მემბრანებისა და მისი კომპონენტების თვისებათა დასახასიათებლად.

დენადობა არის ცნება, რომელიც მემბრანის სიბლანტეს ასახავს. თავის მხრივ, სიბლანტე ძვრადობითაა განპირობებული. რაც შეეხება ფოსფოლიპიდებს, მათი ძვრადობა ორი, შიდამოლეკულური და მოლეკულათა-შორისი მოძრაობით ხასიათდება. პირველი ძვრადობა სამი ძირითადი სახის მოძრაობას მოიცავს:

1. ბრუნვას ან ვიბრაციას ყოველი C—C ბმის მიმართ ცხიმოვან მჟავათა ჯაჭვში (სეგმენტთა მოძრაობა);
2. მთლიანი მოლეკულის ბრუნვას იმ გრძელი ღერძის გარშემო, რომელიც ორმაგი შრის სიბრტყისადმი პერპენდიკულარულია;
3. ცხიმოვან მჟავათა ჯაჭვების ქანქარისებურ მოძრაობას.

მოლეკულათა-შორისი მოძრაობა წარმოადგენს ფოსფოლიპიდების მთლიანი მოლეკულების ლატერალურ დიფუზიას და, როგორც ჩანს, ლიპიდის ერთი მოლეკულის მეორით შეცვლის გზით ხორციელდება. ჩამოთვლილ მოძრაობათა სახეები დროის ერთი და იმავე სკალით არ ითვლება. მაგ., სეგმენტთა მოძრაობა ძლიერ სწრაფად ხდება (10^{12} – 10^{13} წმ⁻¹), მაშინ როდესაც ლატერალური დიფუზია გაცილებით ნელა მიმდინარეობს (ციკლის სიჩქარე $\sim 10^7$ წმ⁻¹).

დაკვირვებებმა აჩვენეს, რომ ორმაგი შრის ცენტრალური ნაწილი

უფრო მაღალი დენადობით ხასიათდება, ვიდრე ცხიმოვან მჟავათა ჯაჭვების ის უბნები, რომლებიც ფოსფოლიპიდთა მოლეკულების პოლარულ „თავებთან“ ახლოს იმყოფებიან. აქედან გამომდინარეობს დასკვნა, რომ მოდელურ და ბუნებრივ მემბრანათა განივად უნდა არსებობდეს დენადობის გრადიენტი.

მემბრანის მეორე მთავარი ლიპიდური კომპონენტი ქოლესტეროლი ბიშრეში ისეა განთავსებული, რომ მისი ჰიდროქსილის ჯგუფი ზედაპირზეა, ხოლო ჰიდროფობული ფრაგმენტი მემბრანის სიღრმეშია ჩაძირული. ამ სტეროლის ბირთვული სტრუქტურისათვის დამახასიათებელია საკმაოდ მაღალი სიხისტე, მაშინ როდესაც გვერდით ალკილურ ჯგუფს შედარებით თავისუფლად შეუძლია მოძრაობა.

მემბრანის სტრუქტურის დენადი მოზაიკური მოდელის ჰიპოთეზა ითვალისწინებს უწყვეტი ფოსფოლიპიდური ბიშრის არსებობას, რომლის შიგნითაც ცილა ადვილად გადაადგილდება. ამასთან, ბოლო პერიოდში ჩატარებული გამოკვლევებით ნათელი ხდება, რომ ყველა ცილას არ გააჩნია თავისუფალი გადაადგილების უნარი და ზოგიერთი მათგანის ძვრადობა ძლიერ შეზღუდულია. მიღებულია კიდევ ორი შესაძლო გარემოება:

1. ლიპიდური ბიშრის ზოგიერთი უბანი ნაკლებად დენადია, ვიდრე ლიპიდთა ბიშრის ძირითადი მასა;
2. მემბრანის ცალკეულ უბნებზე ლიპიდები ორმაგი ბიშრის სახით არ ლაგდება.

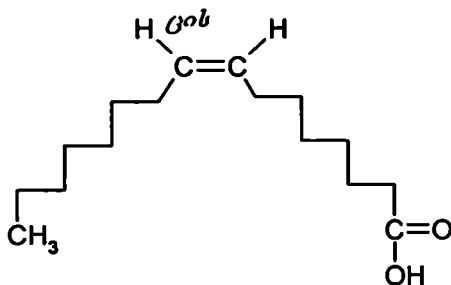
მოუხდავად ამისა, მემბრანის მოზაიკური მოდელი მაინც ძლიერ სასარგებლო აღმოჩნდა, რადგან მას შეიძლება დაეფუძნოს დამატებითი მონაცემები მემბრანების სტრუქტურული ორგანიზაციის შესახებ, რომლებიც მომავალში იქნება მოპოვებული.

1.2.2 ცხიმოვანი მჟავები

ფოსფოლიპიდთა სტრუქტურული მრავალფეროვნება, უპირველეს ყოვლისა, მათ შემადგენლობაში არსებული ცხიმოვანი მჟავებითაა განპირობებული. ამჟამად 200-მდე ცხიმოვანი მჟავაა ცნობილი, რომლებიც ერთმანეთისაგან განსხვავდებიან ორმაგი კავშირების რიცხვით, სხვა ფუნქციური ჯგუფების შემცველობითა და რაოდენობით, მათი ბუნებით, და ბოლოს, ნახშირბადატომთა ჯაჭვის სიგრძით. ცხიმოვანი მჟავები, რომლებიც მცენარისა და ცხოველის ლიპიდების შემადგენლობაში შედიან, როგორც

წესი, ნახშირბადატომთა წყვილ რიცხვს შეიცავენ. ამასთან, უპირატესობა 16–20 ნახშირბადატომიან მჟავებს ენიჭება. ბუნებრივი ცხიმოვანი მჟავების უმარტივესი წარმომადგენლებია ნაჯერი ან უჯერი, არაგანშტოებული ნახშირბადატომების ჯაჭვის მქონე მჟავები საერთო ფორმულით $R-COOH$. ეს ე.წ. ძირითადი ცხიმოვანი მჟავებია.

ნაჯერ ცხიმოვან მჟავებში ნახშირწყალბადოვან კუდს შეუძლია უამრავი კონფორმაციის მიღება ერთმაგი კავშირების გარშემო თავისუფალი ბრუნვის გამო. სხვა სურათი გვაქვს უჯერი ცხიმოვანი მჟავას შემთხვევაში: ორმაგი ბმები თავისუფალ ბრუნვას აძნელებენ, ამიტომ მოლეკულას ხისტ, მოხრილ კონფორმაციას ანიჭებენ.



უჯერი ცხიმოვანი მჟავას ცის-კონფორმაცია

ვარაუდობენ, რომ ცხიმოვან მჟავათა ასეთ სტრუქტურულ აღნაგობას გარკვეული ბიოლოგიური მნიშვნელობა უნდა გააჩნდეს, რაც განსაკუთრებით ბიომემბრანებში მჟავანდება.

რენტგენოსტრუქტურული ანალიზით ნაჩვენებია, რომ ცხიმოვან მჟავათა მონოკრისტალებში ნაჯერ ნახშირწყალბადოვან ჯაჭვს ზიგზაგისებური სტრუქტურა აქვს, სადაც ნახშირბადატომები ერთმანეთთან თანაბარ მანძილზე იმყოფება და ორ პარალელურ რიგს ქმნის. $C-C$ ბმებს შორის კუთხე $110-114^\circ$ -ის საზღვრებშია, რაც ტეტრაედრულს ($109^\circ 28'$) ადმატება. ჯაჭვის ერთი ნახშირბადატომით გაზრდა მის 0.127 ნმ-ით დაგრძელებას იწვევს.

ძირითადი ცხიმოვანი მჟავების მნიშვნელოვანი წარმომადგენლები ჩამოთვლილია ცხრილში (ცხრილი 1). მათ შორის განსაკუთრებული ადგილი უკავია პალმიტინმჟავას. იგი პირველადი პროდუქტია, რომელიც ცხიმოვან მჟავათა სინთეზის მოქმედებით მიიღება და მონაწილეობს სტეარინის, ლაურინის, მირისტინის და სხვა მჟავათა ბიოსინთეზში.

უმაღლეს მცენარეთა ძირითადი ცხიმოვანი მჟავები

ტრივიალური სახელწოდება	C : n*	ემპირიული ფორმულა
ნაჯერი ცხიმოვანი მჟავები		
სტეარინის	18 : 0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COOH}$
პალმიტინის	16 : 0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH}$
ლაურინის	12 : 0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{COOH}$
მირისტინის	14 : 0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{COOH}$
არაქიდის (არაქინის)	20 : 0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{18}\text{COOH}$
უჯერი ცხიმოვანი მჟავები		
ოლეინის	18 : 1	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CHCH}_2(\text{CH}_2)_6\text{COOH}$
ლინოლის	18 : 2	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_2(\text{CH}_2)_6\text{COOH}$
ლინოლენის	18 : 3	$\text{CH}_3\text{CH}_2(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_3(\text{CH}_2)_6\text{COOH}$
არაქიდონის	20 : 4	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_4(\text{CH}_2)_2\text{COOH}$

* ნახშირბადატომთა რიცხვის (C) ფარდობა ორმაგი ბმების რიცხვთან (n)

ბუბუქმოვრებსა და ზოგიერთ ბაქტერიებში პალმიტინისა და სტეარინის მჟავები წარმოადგენენ ორ, ფართოდ გავრცელებულ ნაჯერ ცხიმოვან მჟავას. მონოენურ (ერთი უჯერი ბმის შემცველ) ცხიმოვან მჟავებს მიეკუთვნება ოლეინის ციხ-იზომერი. მცენარეთა ლიპიდები საკმაო რაოდენობით შეიცავენ პოლიენურ ცხიმოვან მჟავებს. ყველა ბუნებრივი პოლიენური მჟავა არაშეუღლებულია: ნახშირწყალბადოვან ჯაჭვში ციხ-ორმაგი ბმები, როგორც წესი, განმზოლოებულია ერთი მეთილენის ჯგუფით. ამის შედეგად მჟავათა მოლეკულებში იქმნება ერთი ან რამდენიმე განმეორებადი უბანი ($-\text{CH}=\text{CH}-$ ან $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-$), რის გამოც მათ დივინილ-მეთენური რიგის მჟავებსაც უწოდებენ, ზოგადი ფორმულით:



ლინოლის და ლინოლენის მჟავები ცხოველურ ორგანიზმებში არ სინთეზდება. უჯრედის ნორმალური ცვლისათვის ისინი აუცილებელია, ამიტომ მათ შეუცვლელ ცხიმოვან მჟავებს უწოდებენ. ადამიანი ამ მჟავებს მცენარეული საკვებიდან იღებს. გარდა ამისა, არაქილონისა და დიჰომო-γ-ლინოლენის მჟავები პროსტაგლანდინებისა და ლეიკოტრიენების ბიოსინთეზში წინამორბედი ნაერთებია.

მცენარეებში იდენტიფიცირებულია ციკლოპროპანული ბირთვის შემცველი ცხიმოვანი მჟავები. ასეთი მჟავების ბიოსინთეზი შეიძლება განხორციელდეს S-ადენოზილმეთიონინიდან მეთილენური ჯგუფის გადატანით მონოენური მჟავების ორმაგ ბმაზე. ნახშირბადატომთა განშტოებულ-ჯგუფიანი ცხიმოვანი მჟავები უმაღლესი მცენარეებისათვის დამახასიათებელი არაა, თუმცა, უნდა აღინიშნოს, რომ მცენარეთა ცალკეული სახეობებიდან გამოყოფილია ე.წ. „ურვეულო“ ცხიმოვანი მჟავები.

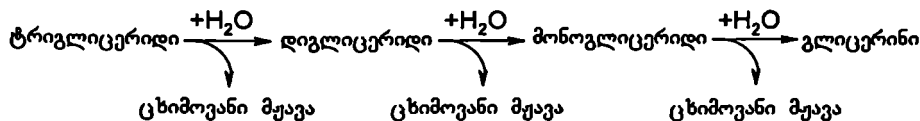
1.2.3 აცილგლიცერიდების ბიოდეგრადაცია

აცილგლიცერიდების კატაბოლიზმს ჩვეულებრივ სამ ფაზად ყოფენ. ესენია:

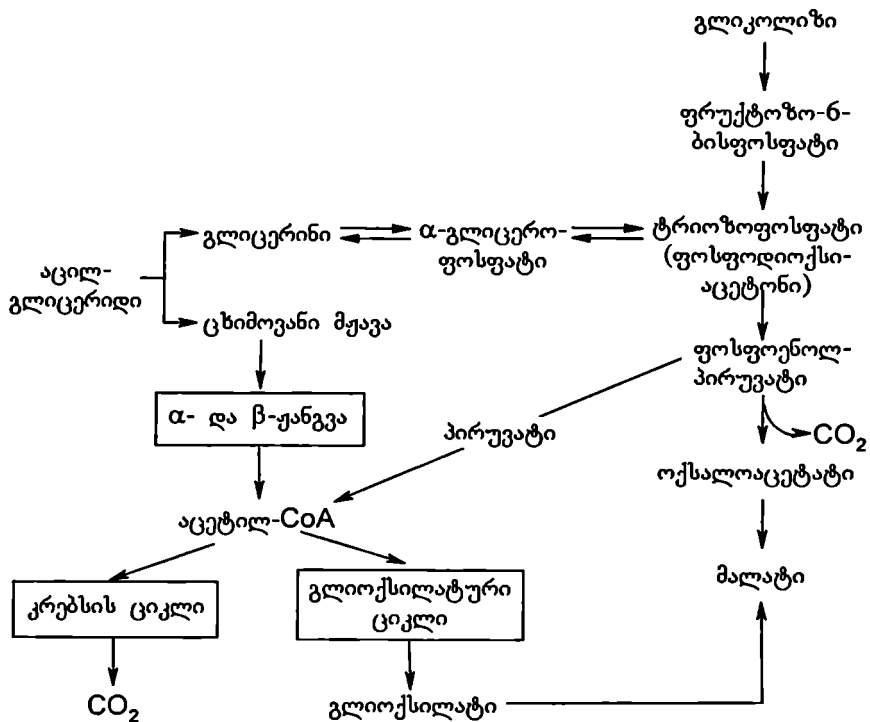
1. სამი ესთერული ბმის ჰიდროლიზური დაშლა გლიცერინისა და ცხიმოვანი მჟავას წარმოქმნით;
2. გლიცერინის კატაბოლიზმი;
3. ცხიმოვან მჟავათა კატაბოლიზმი. პროცესი განსაკუთრებით ინტენსიურად ზეთოვან მცენარეთა აღმონაცენებში მიმდინარეობს.

ამ გარდაქმნებში ნახშირბადატომის მსვლელობის ძირითადი გზები მოცემულია მე-9 ნახაზზე.

აცილგლიცერიდების დეგრადაცია (ჰიდროლიზი) ფერმენტ ლიპაზის მონაწილეობით ხორციელდება. ფერმენტის თანმიმდევრული მოქმედება შეგვიძლია ასე წარმოვიდგინოთ:



გლიცერიდების ჰიდროლიზის სიჩქარე იზრდება მათ მოლეკულებში შემავალი ცხიმოვანი მჟავას ნაშთების სიგრძისა და უჯერობის ხარისხის მატების შესაბამისად.



ნახ. 9. ცხიმების დისიმილაციის ძირითადი გზა და მისი კავშირი მეტაბოლიზმის სხვა პროცესებთან.

მცენარეულ ქსოვილს გლიცერინის საქაროზად გარდაქმნის უნარი აქვს. ამასთან, გლიცერინის ნახშირბადატომები მოლეკულის წინასწარი დაშლის გარეშე ერთნაირი ინტენსივობით ერთვებიან საქაროზის მოლეკულის როგორც გლუკოზურ, ასევე ფრუქტოზულ ფრაგმენტში. გლიცერინი შეიძლება დაიშალოს CO_2 -მდე და ეს პროცესი კოფაქტორებად ATP-ს, თიამინპიროფოსფატს, Mg^{2+} -ს, α-კეტოგლუტარატსა და NAD-ს საჭიროებს.

მიტოქონდრიები აკატალიზებენ α-გლიცეროფოსფატის დაჟანგვას ტრიოზოფოსფატამდე (ფოსფოდიოქსიაცეტონამდე). ერთი მოლეკულის დაჟანგვას ჟანგბადის ერთი ატომი ხმარდება და რეაქცია კოფაქტორების თანამყოფობას არ საჭიროებს.

1.2.4 ბიოლოგიურ მემბრანებში ლიპიდთა ზეჟანგური ჟანგვა

მემბრანებში ცხიმოვან მჟავათა ჟანგვის ორი გზაა ცნობილი. პირველი, ე.წ. β-ჟანგვა ძირითადად მიტოქონდრიებში ხორციელდება. ენერგომომარაგების თვალსაზრისით ეს უჯრედის ერთ-ერთი უმნიშვნელოვანესი და მსხვილმასშტაბური პროცესია. ცხიმები ნახშირწყლებთან შედარებით გაცილებით მეტად აღდგენილ ნახშირბადატომებს შეიცავენ. ამიტომ მათი სრული ჟანგვისათვის უფრო მეტი ჟანგბადი იხარჯება, და შესაბამისად, წვის მეტი ენერგიაც გამოიყოფა. ამის გამო ტრიაცილგლიცერიდების შენახვა-მომარაგება ენერგეტიკულად გაცილებით ეფექტურია ნახშირწყლებთან (გლიკოგენის ჩათვლით) შედარებით. ამ პროცესს ჩვენ აქ არ განვიხილავთ, რადგან იგი ბიოენერგეტიკის ინტერესების სფეროს წარმოადგენს.

ლიპიდთა ჟანგვის მეორე გზა ზეჟანგების (პეროქსიდების) გენერაციას მოიცავს. პროცესი აბსოლუტურად მემბრანულია და უპირატესად უჯრედის მიკროსომულ ფრაქციაში მიმდინარეობს. შედარებით ნაკლები ინტენსივობით ხორციელდება იგი მიტოქონდრიულ და ლიზოსომურ მემბრანებში.

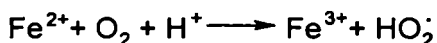
ზეჟანგები უმდგრადია. მათი დაშლისას ჟანგბადის აქტიური ფორმები წარმოიქმნება, ამიტომ ფოსფოლიპიდების ცხიმოვანი მჟავას ნაშთებში ზეჟანგური დაჯგუფებების გაჩენამ შეიძლება ისეთი ბიოლოგიური ეფექტები გამოიწვიოს, როგორებიცაა მემბრანის დაზიანება, იონებისა და არაელექტროლიტებისადმი მისი განვლადობის ცვლილება, მემბრანა-დაკავშირებული ფერმენტული კომპლექსების ინაქტივაცია და ა.შ.

სადღეისოდ არ შეგვიძლია საბოლოოდ გავცეთ პასუხი კითხვას: რაში სჭირდება ლიპიდთა ზეჟანგური ჟანგვის პროცესი უჯრედს? სამაგიეროდ, არსებობს საკვებით სარწმუნო ფაქტობრივი მასალა იმის შესახებ, რომ ლიპიდთა ზეჟანგური ჟანგვა დამახასიათებელია ყველა, ნორმალური მეტაბოლიზმის მქონე ქსოვილისათვის. რაც უფრო აქტიურად ხორციელდება ნივთიერებათა ცვლა, მით მეტია ლიპოპეროქსიდაციის დონე. არსებობს მოსაზრება (თუმცა ჯერ კიდევ სადისკუსიო) იმის შესახებ, რომ ეს პროცესი მემბრანათა მუდმივ თვითგანახლებას ემსახურება და განსაკუთრებით ინტენსიურად იმ მემბრანებში მიმდინარეობს, რომლებიც ელექტრონის სატრანსპორტო სისტემებს შეიცავენ. ჩვენის მხრივ იმას დავამატებდით, რომ ლიპოპეროქსიდაცია უპირატესად დამახასიათებელია მემბრანებისათვის, რომლებშიც ენერგეტიკულად არაშეუღლებული ჟანგვის სისტემებია ლოკალიზებული.

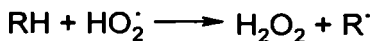
ენდოპლაზმურ მემბრანებში ცხიმოვან მჟავათა ზეჟანგურ ჟანგვას ქსენობიოქიმიური თვალსაზრისით პრინციპული მნიშვნელობა აქვს და ჩვენთვის იმდენად საყურადღებო, რამდენადც აღნიშნული პროცესი ფერმენტთა იგივე ანაქრებით კატალიზდება, ქსენობიოტიკთა ჟანგვაში მონაწილეობს. ამდენად, ეს ორი პროცესი ერთმანეთთან მჭიდროდაა დაკავშირებული.

ენდოპლაზმურ მემბრანებში ლიპიდთა ზეჟანგური ჟანგვის ორი, პრინციპულად განსხვავებული სისტემა ფუნქციონირებს. თავისი მსვლელობისათვის პირველი NADPH-ს, პიროფოსფატს და რკინის (II) იონებს საჭიროებს. ეს ე.წ. NADPH-დამოკიდებული ფერმენტული ზეჟანგური ჟანგვაა და მხოლოდ ენდოპლაზმური მემბრანებისთვისაა დამახასიათებელი. იგი ითრგუნება გათბობითა და სულფჰიდრილური შხამით — p -ქლორმერკურიბენზოატი. მეორე სისტემა, ე.წ. ასკორბატდამოკიდებული არაფერმენტული ზეჟანგური ჟანგვა ამ ფაქტორების მიმართ არამგრძნობიარეა. მისთვის აუცილებელია ასკორბატი და Fe^{2+} . იგი დამახასიათებელია ყველა მემბრანული სისტემებისათვის. მაშასადამე, ერთ შემთხვევაში მოლეკულური ჟანგბადის აქტივატორად Fe^{2+} -NADPH-ის, ხოლო მეორეში კი Fe^{2+} -ასკორბატის კომპლექსი გვევლინება.

ლიპიდთა ზეჟანგვის წარმოქმნის პროცესი იმ თავისუფალ-რადიკალური ჯაჭვური მექანიზმით ხორციელდება, რომელიც მოლეკულური ჟანგბადით ნებისმიერი ორგანული ნაერთის უშუალო ჟანგვის რეაქციებისთვისაა დამახასიათებელი. პროცესი მხოლოდ იმ შემთხვევაში დაიწყება, თუ სისტემაში თავისუფალი რადიკალები გაჩნდებიან. მაგ., მოლეკულური ჟანგბადით ორგანულენტიანი რკინის დაჟანგვისას წარმოიქმნება $HO_2^{\cdot}$ -ტიპის რადიკალი:



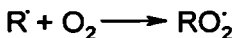
მაღალი რეაქტიურობის გამო წარმოქმნილი რადიკალი რეაგირებს გარემომცველ მოლეკულებთან, კერძოდ, ცხიმოვან მჟავებთან და ნახშირწყალბადოვანი ($R^{\cdot}$) ტიპის რადიკალი მიიღება:



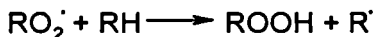
ამ ორი რეაქციით იწყება ჟანგვის ჯაჭვური პროცესი. ამიტომ მათ ჯაჭვის ინიცირების სტადიის რეაქციებს უწოდებენ.

თავისუფალ რადიკალთა მნიშვნელოვანი თვისება იმაში მდგომარეობს, რომ რამდენჯერაც არ უნდა მოხდეს მოლეკულებთან ურთიერთქმედება, მათი რიცხვი მაინც უცვლელი რჩება (თავისუფალი ვალენტობის მოუს-

პოზლობის პრინციპი). ჟანგბადის თამაწყოფობის პირობებში R· რადიკალები მასთან ურთიერთქმედებენ, რის შედეგადაც ახალი RO₂· რადიკალი მიიღება, რომელსაც ზეჟანგურ რადიკალს უწოდებენ:



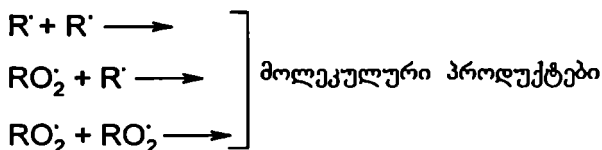
ზეჟანგურ რადიკალს უჯერი ცხიმოვანი მჟავას ახალ მოლეკულასთან რეაგირება შეუძლია. ამ დროს წარმოიქმნება პიდროზეჟანგი (ROOH) და ხელახლა R· რადიკალი მიიღება:



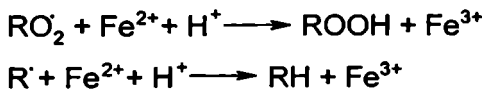
ორი უკანასკნელი რეაქციის მონაცვლეობას იქამდე მივყავართ, რომ პროცესში ლიპიდისა (RH-ის) და ჟანგბადის ახალი მოლეკულები ერთდება. ამის შედეგად წარმოიქმნება პიდროზეჟანგები, ხოლო R· და RO₂· რადიკალების ჯამური რაოდენობა ამის შედეგად პრაქტიკულად უცვლელი რჩება. პროცესის ამ სტადიას „პროლონგაციის“ (გახანგრძლივების) სტადიას უწოდებენ. მთლიანი პროცესის სიჩქარეს ზეჟანგური რადიკალებისა და ლიპიდის მოლეკულების შედარებით ნელი ურთიერთქმედების რეაქცია განსაზღვრავს.

თავისუფალი რადიკალები უჯერი ცხიმოვანი მჟავას მხოლოდ ახალ-ახალ მოლეკულებთან რომ რეაგირებდნენ, მაშინ, ჟანგბადით საკმარისად უზრუნველყოფისას, ერთადერთი რადიკალიც კი მოცემულ ნიმუშში არსებულ ყველა ცხიმოვან მჟავას ზეჟანგად გარდაქმნიდა. სინამდვილეში ეს ასე არ ხდება, რადგან ადგილი აქვს რადიკალების „ჩაქრობას“. ეს იმ შემთხვევაშია შესაძლებელი, როდესაც რადიკალები მოქმედებენ:

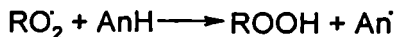
– ერთმანეთთან, მაგ.,



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



— ანტიოქსიდანტების მოლეკულებთან, მაგ., α -ტოკოფეროლთან (AnH-თან)

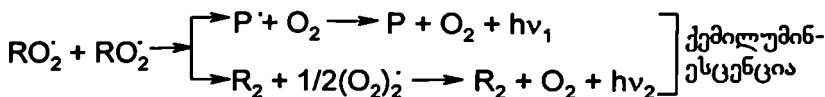


პირველ ორ შემთხვევაში მოლეკულური პროდუქტები წარმოიქმნებიან, ხოლო მესამეში — მცირედ აქტიური რადიკალები მიიღებიან, რომელთაც ახალ ცხიმოვან მჟავებთან რეაქციაში შესვლის უნარი დაკარგული აქვთ. ნებისმიერ შემთხვევაში ხდება ჯაჭვური რეაქციების შეჩერება, ანუ ჯაჭვის გაწყვეტა. თავისუფალი რადიკალის წარმოქმნის მომენტიდან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

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



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



აქ P – რეაქციის პროდუქტია (შესაძლოა ეს იყოს კეტონი), ხოლო $h\nu_1$ და $h\nu_2$ – სინათლის ენერგიის (ფოტონის) თითო ქვანტია.

მაგ., ოლეინმჟავას ჟანგვისას ქემილუმინესცენციის სპექტრში რამდენიმე მაქსიმუმი (390, 460, 550 და 600 ნმ) ჩნდება, რომელთაგან ნაწილი, როგორც ჩანს, კარბონილის ჯგუფებს, ნაწილი კი – ჟანგბადის დიმერებს ეკუთვნის.

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



ამ პროცესს Fe^{2+} -ის რეგენერაცია ეწოდება, რადგან ჰიდროზეჟანგებთან ან ჟანგბადთან ურთიერთქმედებისას Fe^{2+} იჟანგება.

ამგვარად, მოლეკულური ჟანგბადით ლიპიდთა ჟანგვა წარმოადგენს ჯაჭვურ, თავისუფალ-რადიკალურ რეაქციას. მისი პროდუქტი, რომელიც ჯაჭვების განტოტვისას ნაწილობრივ შუალედური პროდუქტი ხდება, ჰიდროზეჟანგს წარმოადგენს.

ფერმენტულ და არაფერმენტულ ზეჟანგურ ჟანგვას შორის ძირითადი განსხვავება რკინის აღსადგენად სხვადასხვა აღმდგენელების გამოყენებაში მდგომარეობს. პირველ შემთხვევაში ეს NADPH ან ლიპოის მჟავაა, მეორეში კი – ასკორბატი ან გლუტათიონი. გარდა ამისა, ფერმენტული ზეჟანგური ჟანგვა მკვეთრად აქტიურდება პიროფოსფატით და ითრგუნება ფოსფატის ანიონებით, მაშინ როდესაც არაფერმენტული ზეჟანგური ჟანგვა ორივე ანიონით ინჰიბირებას განიცდის. რკინის (II) იონის მიმართ განსაკუთრებით მაღალი თვისობა (100-ჯერ მეტი) ფერმენტულ ზეჟანგურ ჟანგვას გააჩნია. ზოგიერთ შემთხვევაში ამ პროცესში გარედან Fe^{2+} -ის დამატება არცაა საჭირო, რადგან ჯაჭვის ინიციაციის სტადიისათვის ენდოგენური Fe^{2+} -ის, ან თუნდაც გამოყენებულ რეაქტივებში კვალის სახით მყოფი ამ იონის შემცველობაც კი საკმარისია. არაფერმენტული ზეჟანგური ჟანგვა პირიქით, ყოველთვის განიცდის რკინის (II) იონების მნიშვნელოვან რაოდენობაზე მოთხოვნილებას. ინჰიბიტორებთან მიმართე-

ბაში ფერმენტული და არაფერმენტული ლიპოპეროქსიდაცია ნაწილობრივ ერთმანეთის მსგავსია.

ლიპიდების ზეჟანგური ჟანგვის ფერმენტულ და არაფერმენტულ პროცესებს განვითარების ერთი საერთო რადიკალურ-ჯაჭვური მექანიზმი გააჩნიათ. ორივე ტიპის ზეჟანგურ ჟანგვას საფუძვლად უდევს რადიკალთა წარმოქმნის რეაქციები, გარდაქმნათა შემდგომი საერთო მსვლელობით. საკმარისია დავაკვირდეთ NADPH-დამოკიდებული ზეჟანგური ჟანგვის სტექიომეტრიას, სადაც ყოველ მოლ NADPH-ზე 4 მოლი O_2 იხარჯება (ე.ი. გაცილებით მეტი, ვიდრე ამას ჩვეულებრივი, არარადიკალური რეაქციის სტექიომეტრია მოითხოვს), რომ სრულად ნათელი გახდეს მათი გარდაქმნების ჯაჭვური ბუნება.

ლიპიდთა ფერმენტულ და არაფერმენტულ პეროქსიდაციებს ბევრი საერთო აქვთ და ეს, უპირველეს ყოვლისა, Fe^{2+} -ზე მათი მოთხოვნილებაა. სხვა იონები, მაგ., Ca^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} და Hg^{2+} , ასკორბატ- და NADPH-დამოკიდებული ზეჟანგური ჟანგვის სტიმულაციას არ ახდენენ. როგორც ირკვევა, მიკროსომების ენდოგენური Fe^{2+} მემბრანაში საკმაოდ მტკიცედ შეკავშირებულ მდგომარეობაშია. მიკროსომულ ფერმენტულ და არაფერმენტულ ზეჟანგური ჟანგვის სისტემებში ცხიმოვან მჟავათა პეროქსიდაცია ერთნაირად ითრგუნება საინკუბაციო არეში რკინის (II) იონების სხვადასხვა ხარისხით შეოჭვის უნარის მქონე კომპლექსონებით (EDTA-თი, ო-ფენანტროლინით, 8-ოქსიქინოლინით, დეზფერიოქსამინით და სხვ.). ორივე სისტემაში რკინის (II) იონის დაკავშირებული ფორმით მონაწილეობა ეჭვს არ უნდა იწვევდეს. მემბრანულ სტრუქტურებში ყოველთვის არსებობს სათანადო კონცენტრაციით თავისუფალი ფუნქციური ჯგუფები, რომლებსაც გარედან დამატებული Fe^{2+} -ის შეკავშირების უნარი აქვთ. კომპლექსონებით დამუშავებული მიკროსომების შემდგომი გარეცხვა მათში ზეჟანგური ჟანგვის პროცესის მთლიან აღდგენას იწვევს. ამასთან, კომპლექსონთან ერთად მიკროსომების ჰემური და არაჰემური რკინის გამორეცხვა არ ხდება.

1.2.4.1 ფერმენტული ზეჟანგური ჟანგვა მიკროსომებში

მიკროსომულ მემბრანებში ტიპური ანტიოქსიდანტები (ტოკოფეროლი, პროპაზინი, EDTA და სხვ.) ფერმენტულ ლიპოპეროქსიდაციაზე ისეთივე მაღალეფექტურ ზემოქმედებას ავლენენ, როგორც მოდელურ სისტე-

მებში. საყურადღებოა, რომ მათი ეს მოქმედება ერთნაირია როგორც რეაქციის დასაწყისში, ასევე ჟანგვის განვითარების სტადიაზე დამატებისას.

დიფენილური წარმოებულებისა და ტოკოფეროლის, როგორც ტიპური რადიკალური „დამჭერების“ ანტიოქსიდანტური აქტივობა ზეჟანგური ჟანგვის მიკროსოპულ რეაქციებში თავისუფალი რადიკალების წარმოქმნის საფუძვლიანი დადასტურებაა.

ლიპიდთა ფერმენტული ზეჟანგური ჟანგვის რეაქციათა სტექიომეტრიის გამოკვლევამ აჩვენა, რომ NADPH-ის ერთი მოლის დაჟანგვა მიკროსოპებში 20 მოლი ჟანგბადის აღდგენას იწვევს, როდესაც ზეჟანგური ჟანგვა $ADP-Fe^{2+}$ -ის კომპლექსითაა ინიცირებული. ამ კომპლექსის გარეშე ელექტრონთა NADPH-დამოკიდებული გადატანის პროცესში 1 მოლი NADPH 1 მოლ O_2 -ს ააქტიურებს. მოგვიანებით მიღებულ იქნა $\Delta NADPH : \Delta O_2$ ფარდობის ზუსტი მნიშვნელობა და იგი 1 : 4-ის ტოლი აღმოჩნდა. პარალელურად გამოვლინდა ერთი მეტად საინტერესო ფაქტი: კოფეციენტი $\Delta O_2 : \Delta[\text{ფერმენტული ზეჟანგური ჟანგვა}]$ მუდმივი არაა და რეაქციის მსვლელობაში იცვლება 1-დან (დასაწყისში) 4-მდე (დასასრულს). კოფეციენტის ამგვარი ცვლილება არ შეიძლება აიხსნას რეაქციაში წარმოქმნილი კარბონილური ნივთიერებების შემდგომი დაჟანგვით. სხვაგვარად რომ ითქვას, ამის მიზეზი არაა ის, რომ რეაქციის შედეგად მიღებული დაუჟანგავი პროდუქტების ჟანგვაზე ჟანგბადი იხარჯება. ჩატარებულმა გამოთვლებმა აჩვენეს რეაქციის მთლიანი დროის მანძილზე გამქრალი ორმაგი კავშირების რაოდენობასა და ჟანგბადის მოხმარებას შორის ზუსტი შესაბამისობა.

მაშასადამე, მიკროსოპებში ზეჟანგური ჟანგვის განვითარებასთან ერთად NADPH-ის ყოველ დაჟანგულ მოლეკულაზე სულ უფრო მეტი ზეჟანგების მოლეკულები წარმოიქმნებიან. ეს სიტუაცია ძლიერ წააგავს პროცესებს, რომლებიც ჯაჭვურ რეაქციებში შეინიშნება, სადაც ინიციატორის ყოველ მოლეკულაზე პროდუქტის რამდენიმე მოლეკულა მოდის და მათი რიცხვი ჯაჭვის სიგრძეზეა დამოკიდებული. პროცესის შედეგად ადგილი აქვს სისტემაში ანტიოქსიდანტების დაშლასაც, რაც აგრეთვე ტიპურია ჯაჭვური რეაქციებისათვის, კერძოდ, ორვალენტიანი რკინით კატალიზებული ფოსფოლიპიდების ზეჟანგური ჟანგვისათვის.

ამგვარად, ანტიოქსიდანტთა მაინჰიბირებელი მოქმედება და ლიპიდური ზეჟანგების წარმოქმნის რეაქციათა სტექიომეტრია პროცესის თავისუფალ-რადიკალურ ბუნებაზე მიუთითებს, რომელიც NADPH-ის ჟანგვასთანაა შეუღლებული. ამ მიმართებით ფერმენტული ზეჟანგური ჟანგვა პრინციპულად არ განსხვავდება არაფერმენტული ზეჟანგური ჟანგვისა-

გან. სხვაობა მათ შორის, როგორც ჩანს, ინიციაციის რომელიღაც ადრეულ სტადიებშია, ხოლო შემდგომ ორივე პროცესი ერთი და იგივე მექანიზმით ვითარდება და ერთნაირი პროდუქტების წარმოქმნით მთავრდება.

შედარებით დეტალურადაა შესწავლილი NADPH-სპეციფიკური ზე-
ჟანგური ჟანგვის სუბსტრატები და პროდუქტები. აღმოჩნდა, რომ ამ პროცესის შედეგად ესთერული კავშირების რიცხვი არც იცვლება. სამაგიეროდ, მკვეთრად მცირდება ორმაგი კავშირების რაოდენობა და ამინური აზოტის შემცველობა. ორმაგი ბმების შემცველი ცხიმოვანი მჟავების ზე-
ჟანგური ჟანგვის ანალიზმა აჩვენა, რომ ჟანგვას უპირველეს ყოვლისა, 6, 4 და 2 ორმაგი კავშირები განიცდიან. ხშირ შემთხვევაში ასეთი მჟავებია შესაბამისი დოკოზოპენსენსჟავა, არაქილონსჟავა და ლინოლენსჟავა. სწორედ ეს უჯერი ცხიმოვანი მჟავები წარმოადგენენ ფერმენტული ზეჟანგური ჟანგვის ძირითად სუბსტრატებს. იმის გამო, რომ ცხიმოვან მჟავათა ნაშთები გლიცერინის ჩონჩხის მიმართ β -მდგომარეობაში იმყოფებიან, ბუნებრივია, ჟანგვა მათზე განხორციელდება, რასაც ადასტურებს ფოსფოლიპაზა A-ს შერჩევითი „შეტევა“ β -ესთერულ ბმებზე. მემბრანული ფრაქციის ფოსფოლიპაზით წინასწარი დამუშავება ზეჟანგურ ჟანგვას აინჰიბირებს, ხოლო უკვე დაჟანგული ფრაქციის ამ ფერმენტით დამუშავება წარმოქმნილი პოლარული პროდუქტის სრულ გამოთავისუფლებას იწვევს.

მიუხედავად იმისა, რომ ფერმენტულ და არაფერმენტულ ზეჟანგური ჟანგვის რეაქციებში უპირატესად პოლიუჯერი ცხიმოვანი მჟავები გამოიყენება, როგორც ირკვევა, პროცესში შეიძლება ის ცხიმოვანი მჟავებიც ჩაერთონ, რომლებიც ქსენობიოტიკთა მიკროსომული ჟანგვის ფერმენტებისათვის ლიპიდურ გარემოცვას ქმნიან. თხელფენოვანი ქრომატოგრაფიით იდენტიფიცირებულია 18 ალდეჰიდი და კეტონი, რომლებიც ცხიმოვან მჟავათა ჟანგვის საბოლოო პროდუქტთა შემადგენლობაში შედიან. ყველა ისინი ერთსაფეხურიანი ჟანგვის შედეგად მიიღება. კარბონილური ნაერთების შემდგომი დაჟანგვა კარბოქსილამდე აღარ ხდება. ამის სასარგებლოდ მეტყველებს ის, რომ სემიკარბაზიდი, რომელიც ალდეჰიდებისა და კეტონების „დამჭვრია“ და ისინი შემდგომი ჟანგვის რეაქციებიდან გამოყავს, მთლიანი პროცესის სტექიომეტრიაზე არ მოქმედებს.

უჯერი ცხიმოვან მჟავათა ზეჟანგური ჟანგვა მიკროსომებში შეიძლება სრულად წარიმართოს. ამ შემთხვევაში მალიმიტირებელი ფაქტორები აღმდგენელი ექვივალენტების დონორები NADPH და ასკორბატი. ეს გასაგებია, რადგან მემბრანული სისტემის მკაცრი ორიენტაციის გამო ჟანგვის ჯაჭვი გრძელი არაა და პროცესი ავტოკატალიზურად არ წარი-

მართება. მემბრანულ პრეპარატებში ბუნებრივ ანტიოქსიდანტთა შემცველობა ძლიერ დაბალია, ამიტომ მათ ფერმენტულ და არაფერმენტულ ზეჟანგურ ჟანგვაზე რაიმე არსებითი გავლენის მოხდენა არ შეუძლიათ. არაფერმენტული ზეჟანგური ჟანგვის სიჩქარე უჯრედში რკინის (II) იონების კონცენტრაციით ლიმიტირდება.

1.2.4.2 ფერმენტული ზეჟანგური ჟანგვა მიტოქონდრიის მემბრანებში

ლიპიდთა ზეჟანგების წარმოქმნა მიტოქონდრიულ მემბრანებშიც მიმდინარეობს. ორგანელაში მოქმედ მჟანგველ ფერმენტებთან მიმართებაში პროცესის დამოკიდებულება სუსტადაა გამოხატული. ზეჟანგური ჟანგვის სიჩქარეს აქ ქემილუმინესცენციის ინტენსივობით აფასებენ, რაც იმის მაჩვენებელია, რომ ამ შემთხვევაშიც თავისუფალ-რადიკალურ მექანიზმთან გვაქვს საქმე და ამისათვის აუცილებელი პირობა რკინის (II) იონების თანამყოფობაა. მათი დამატებით ლიპიდთა ზეჟანგური ჟანგვა მრავალჯერადად ძლიერდება.

მიტოქონდრიული სუნთქვის პროცესებთან ზეჟანგური ჟანგვის ურთიერთობაზე მონაცემები საკმაოდ წინააღმდეგობრივია. ერთი მხრივ სახეზეა ადენოზინფოსფატების გამააქტიურებელი და სუნთქვითი ჯაჭვის ბლოკატორების (ამიტალის, როტენონის), აგრეთვე ჟანგვისა და ფოსფორილების გამთიშველის (დინიტროფენოლის) ინჰიბიტორული ზეგავლენა ლიპიდური პეროქსიდების გენერაციაზე. ეს შედეგები შეიძლება აიხსნას ჟანგვითი ფოსფორილებისა და ზეჟანგური ჟანგვის კავშირის არსებობის პოზიციიდან. მეორე მხრივ, რიგი ფაქტებისა უარყოფს ასეთი კავშირის არსებობას: ADP-ს შეცვლა AMP-ით, ან ორთოფოსფატისა და ჟანგვის სუბსტრატების სარეაქციო არიდან მოცილება, როდესაც ჟანგვითი ფოსფორილება სრულად ითიშება, ქემილუმინესცენციას მხოლოდ უმნიშვნელოდ აქვეითებს. რკინის (II) იონების დამატება ქემილუმინესცენციას მიტოქონდრიული ჟანგვის პროცესებისაგან კიდევ უფრო დამოუკიდებელს ხდის. მიტოქონდრიის ჰიპოტონური ხსნარით დამუშავებისას, როდესაც მისგან ციტოქრომ C-ს ნაწილობრივი გამორეცხვა ხდება, სუნთქვა (და შესაბამისად, ფოსფორილებაც) პრაქტიკულად მთლიანად ითრგუნება, მაგრამ ქემილუმინესცენციის დაქვეითება არ შეინიშნება.

მოყვანილი ფაქტები ჭეშმარიტებასთან მხოლოდ მიახლოებული გაანა-

ლიზების საშუალებას იძლევა. მიტოქონდრიებში ელექტრონთა ტრანსპორტსა და ლიპიდთა პეროქსიდაციას შორის პირდაპირი კავშირი არ არსებობს. უფრო მეტიც, ზეჟანგური ჟანგვა უშუალოდ არაა დამოკიდებული მემბრანის ენერგიზაციაზე და ჟანგვით ფოსფორილებაზე. მისაღებია მხოლოდ ის, რომ არსებობს ზეჟანგურ ჟანგვაზე მემბრანული ცილების ან ლიპიდების გარკვეული ჯგუფების, აგრეთვე ორთოფოსფატისა და ადენოზინფოსფატების გავლენა. ფოსფატთა გამააქტიურებელი მოქმედება, როგორც ჩანს, დაკავშირებულია რკინის (II) იონების ჟანგვისას რადიკალების წარმოქმნის დაჩქარებასთან.

საფიქრებელია, რომ პეროქსიდაციის შედეგად რკინის (III) იონების აღდგენა დაკავშირებული იყოს მიტოქონდრული ელექტრონთა სატრანსპორტო ჯაჭვის მუშაობასთან: გადამტანთა აღდგენილ მდგომარეობაში დაფიქსირებისას (დინიტროფენოლის ან ამიტალის დამატებისას, ჰიპოტონიური შოკისას) ზეჟანგური ჟანგვა ინჰიბირებას განიცდის. როგორც ჩანს, Fe^{3+} -ის დაკავშირება მიტოქონდრიულ გადამტანებთან სუნთქვითი ჯაჭვის ფლავოპროტეინის მომდევნო უბანზე ხდება: ამიტალის თანამყოფობისას ეს უბანი იჟანგება, მაგრამ Fe^{2+} აღარ წარმოიქმნება.

ამგვარად, ისეთ მიტოქონდრიებში, რომლებშიც სუნთქვის სუბსტრატები და ჟანგვითი ფოსფორილების კოფაქტორები იმყოფებიან, ლიპიდთა ზეჟანგური ჟანგვა საბოლოო ჯამში მაინც რკინის იონებით კატალიზდება.

არსებობს რკინის, როგორც კატალიზატორის სხვა წყაროც. ესაა მიტოქონდრიის არაჰემური რკინა. მისი გამოთავისუფლება შეიძლება ასკორბინმჟავათი, რაც ლიპიდური პეროქსიდაციის მკვეთრ სტიმულირებას იწვევს. ასკორბატი მეორე ფუნქციასაც ასრულებს: Fe^{3+} -ის Fe^{2+} -ად აღდგენით გარკვეულ დონეზე ინარჩუნებს პროოქსიდანტთა კონცენტრაციას.

ასკორბატის ორმაგი ფუნქციის არსებობა გასაგებს ხდის SH-ჯგუფების შემცველი რეაგენტების უუნარობას, რკინის იონების გარეშე მოახდინონ ზეჟანგური ჟანგვის სტიმულაცია. მაღალი აღმდგენი უნარის მიუხედავად, ეს რეაგენტები (ცისტეინი, ცისტეამინი) მიტოქონდრული სტრუქტურებიდან რკინის სოლუბილიზაციას არ იწვევენ და ამდენად, არც პროოქსიდანტებს წარმოადგენენ.

ზეჟანგურ ჟანგვასა და ელექტრონის გადატანის პროცესებს შორის ცალკეულ შემთხვევაში გამოვლენილი კავშირი კიდევ არ ადასტურებს ამ უკანასკნელის ლიპიდთა პეროქსიდაციაში მონაწილეობას. მიტოქონდრიების ენერგეტიკულად შეუღლებული რეაქციები ძლიერ მგრძნობიარე არიან ზეჟანგური ჟანგვის მიმართ, რომლის პროდუქტებიც ბუნებრივ ეფექ-

ტურ გამოთქმელებს წარმოადგენენ. ასეთივე უნარი გააჩნიათ თვით ცხიმოვან მჟავებს და მათი ეს თვისება დაკავშირებულია ორგანიზმის დაბალტემპერატურულ ადაპტაციასთან.

1.2.4.3 ცხიმოვან მჟავათა როლი ორგანიზმის დაბალტემპერატურულ ადაპტაციაში

ცხიმოვანი მჟავები უჯრედისათვის არამხოლოდ ენერგეტიკულ საწყავს, არამედ სუნთქვისა და ფოსფორილების გათიშვის მნიშვნელოვან რეგულატორებსაც წარმოადგენენ. ამით ისინი ძლიერ ამარტივებენ ჟანგვის სუბსტრატთა ენერგიის სითბოდ გარდაქმნის გზას. დიდი ზანი არაა, რაც ცნობილი გახდა, რომ ენერგეტიკული გათიშვის მექანიზმი საფუძვლად უდევს ორგანიზმთა შეგუებას დაბალი ტემპერატურების მიმართ. ეს კონკრეტული საკითხი წარმოდგენილი ნაშრომის ინტერესებში არ შედის. მიუხედავად ამისა, საჭიროდ ჩავთვალეთ მისი მოკლედ განხილვა, მითუმეტეს, რომ მასალის შემდგომ მსვლელობაში არაერთხელ მოგვიწევს ჟანგვისა და ფოსფორილების პროცესებთან შეხება.

დაბალტემპერატურული ადაპტაციის პროცესში თავისუფალი ცხიმოვანი მჟავების (განსაკუთრებით პალმიტინისა და სტეარინის) გავლენით მიტოქონდრიული მემბრანის პროტონული პოტენციალი აღმერისთანავე (ATP-ს წარმოქმნამდე) სითბოდ გარდაიქმნება. ეს პროტონებისადმი მემბრანის განვლადობის გაძლიერების შედეგია. როგორც გაირკვა, მიტოქონდრიის გარე ზედაპირზე ცხიმოვან მჟავათა ანიონები (RCOO^-) იკავშირებენ ორგანელიდან გამოტუმბულ პროტონებს. ცხიმოვანი მჟავას პროტონირებული ფორმა (RCOOH) გადაკვეთს მემბრანას, შეაღწევს მის შიდა სივრცეში, დისოცირდება და კვლავ RCOO^- -ს და H^+ -ს წარმოქმნის; ე.ი. ადგილი აქვს პროტონების უკუტრანსპორტს. ეს უკანასკნელი მიტოქონდრიის H^+ -ის იმ უკმარობის კომპენსაციას ახდენს, რომელიც სუნთქვითი ჯაჭვით (პროტონების გარეთ გამოქაჩვის შედეგად) იყო შექმნილი. ანიონური გადამტანების, კერძოდ, ATP/ADP-ანტიპორტერის მონაწილეობით RCOO^- ანიონი ისევ მიტოქონდრიის გარეთ გამოდის. ეს ანტიპორტერი, რომლის მთავარი ფუნქცია H^+ -ATP-სინთაზის საშუალებით ციტოზოლური ADP- და მიტოქონდრიული ATP- ანიონების ცვლაა, განსაკუთრებით უშეცდომოდ არჩევს ჰიდროფილურ ანიონებს. ჰიდროფობული ანიონების შემთხვევაში ასეთი შერჩევითობა არ შეინიშნება. სწორედ

ამიტომ ATP/ADP-ანტიპორტერს ცხიმოვან მჟავათა ანიონების ტრანსპორტირებაც შეუძლია.

ცხოველურ ორგანიზმში არსებობს განსაკუთრებული ქსოვილი, რომელიც ფოსფორილებისაგან გათიშული სუნთქვის საშუალებით სითბოს პროდუცირებაზეა სპეციალიზებული. ეს რუხი ცხიმი, რომელიც თავის სახელწოდებას ატარებს მიტოქონდრიების უაღრესად მაღალი შემცველობის გამო (მიტოქონდრიები მოყავისფროა). რუხი ცხიმის მიტოქონდრიები H^+ -ATP-სინთაზასთან შედარებით სუნთქვის ფერმენტებს უფრო ჭარბად შეიცავს, ხოლო მთლიანი ცილების დაახლოებით 10% მოდის ე.წ. გამთიშველ ცილაზე, რომელსაც თერმოგენინს უწოდებენ. თავისი სტრუქტურით იგი ძლიერ ახლოს დგას ATP/ADP-ანტიპორტერთან და მისგან იმით განსხვავდება, რომ ნუკლეოტიდების ტრანსპორტირების უნარი არ გააჩნია. სამაგიეროდ, მას აქტიურად გადააქვს ცხიმოვან მჟავათა ანიონები. მიტოქონდრიების გარდა, რუხი ცხიმი დიდი რაოდენობით ლიპიდურ წვეთებს შეიცავს. ორგანიზმის გაცივების საპასუხოდ ლიპოლიზის აქტივაცია თავისუფალი ცხიმოვანი მჟავების მაღალი კონცენტრაციით დაგროვებას იწვევს, რომლებიც მიტოქონდრიებით იჟანგება და ამავე დროს საკუთარ ჟანგვას ფოსფორილებისაგან თიშავს.

თერმოგენინის მსგავსი გამთიშველი ცილა ბოლო პერიოდში სხვა ქსოვილებშიცაა ნაპოვნი. მიიჩნევენ, რომ სიცივისადმი ადაპტაციისას იგი, ATP/ADP-ანტიპორტერის მსგავსად, მიტოქონდრიულ მემბრანაში ცხიმოვან მჟავათა ანიონების ტრანსპორტს ახორციელებს.

თერმორეგულატორული გათიშვა შენიშნულია მცენარეებშიც. მაგ., ნანახია, რომ ზოგიერთ შროშანისებრთა ყვავილები ცივ ამინდში შეხებისას უფრო თბილია, ვიდრე ღერო ან ფოთლები. აღმოჩნდა, რომ ყვავილის შეთბობა საჭიროა ეთერზეთების ასაორთქლებლად, მწერების მოზიდვის მიზნით. ეს შედეგები კი მიიღწევა სუნთქვის დაჩქარებით და ფოსფორილებისაგან მისი გათიშვის გზით. ჩვენს ლაბორატორიაში გამოკვლეულია მცენარეული (სიმინდისა და სოიის ფესვების) უჯრედების ულტრასტრუქტურული ცვლილებები და მათში მიმდინარე ბიოქიმიური პროცესები დაბალტემპერატურული სტრესისას. აღმოჩნდა, რომ ამ პირობებში, სუნთქვისა და ფოსფორილების გათიშვასთან ერთად, ადგილი აქვს ენდოპლაზმური მემბრანების ცისტერნებსა და მიტოქონდრიებს შორის ზშირი კონტაქტების გაჩენას, რაც მიკროსომიდან მიტოქონდრიაზე აღმდგენელი ექვივალენტების მიგრაციას და სუნთქვის გაძლიერებას უზრუნველყოფს. დაბალ ტემპერატურაზე მემბრანულ სტრუქტურათა ერთმანეთის მიმართ ახალი სივრცობ-

რივი ორიენტაციის დამყარებას, როგორც ჩანს, სუნთქვისა და ფოსფორილების კომპენსატორულ ცვლილებათა აუცილებლობა განსაზღვრავს.

1.2.4.4 ცილა-ლიპიდური ურთიერთქმედება ენდოპლაზმურ მემბრანებში

მონაცემები მემბრანაში ცილებისა და ლიპიდების ურთიერთქმედების ძალების ჭეშმარიტი ბუნების შესახებ საკმაოდ წინააღმდეგობრივია. მემბრანის ცილა-ლიპიდურ ურთიერთქმედებაში უპირატესად ლიპიდებისა და ცილა-ფერმენტების ურთიერთქმედება იგულისხმება.

მემბრანებთან ურთიერთქმედების მიხედვით შემოღებულია ცილების კლასიფიკაცია, რომლის თანახმადაც ისინი სამ – ჰიდროფობულ, ამფიფილურ და სორბირებულ ჯგუფებად იყოფა. პირველი ჯგუფი მემბრანაში ღრმა „ჩაძირვით“ ხასიათდება და ამას მემბრანის ძლიერ განვითარებული ჰიდროფობული ზედაპირი განსაზღვრავს. ATP-აზები, ციტოქრომ c-ოქსიდაზები, ბაქტერიოროდოფსინი და შესაძლოა, ციტოქრომ P450-იც, ამ ჯგუფის ტიპიურ პროტეინებს წარმოადგენენ. მეორე ჯგუფის ცილებს სტრუქტურულად და ფუნქციურად მკვეთრად განსხვავებული, სულ მცირე, ორი ფრაგმენტი გააჩნიათ. მათგან ერთი, როგორც წესი, ზომით უფრო მცირეა და მემბრანასთან დაკავშირებაზეა პასუხისმგებელი. თავისი ფიზიკურ-ქიმიურ თვისებებით იგი ახლოსაა ჰიდროფობულ ცილებთან. მეორე ფრაგმენტი, რომელიც კატალიზური აქტივობის მატარებელია, წყლოვან ფაზაშია და ოდნავ განსხვავდება ჰიდროფობული პროტეინებისაგან. მისი კატალიზური აქტივობა ფოსფოლიპიდის თანამყოფობას არ საჭიროებს და ამდენად, არც მემბრანიდან გამოცალკევებისას იკარგება. ამ ჯგუფის ტიპიური წარმომადგენლებია ციტოქრომ b_5 და NAD(P)H-სპეციფიკური ფლავოპროტეინები. მესამე ჯგუფის ცილები მემბრანაში არაა „ჩაძირული“ („ჩაღრმავებული“) და მხოლოდ მისი ზედაპირის დამუხტულ უბნებზე სორბირდება. მემბრანას ისინი იონური ძალის მქონე ხსნარებით სცილდება. როგორც ირკვევა, მემბრანის ზედაპირზე ცილის სორბცია მრავალკომპონენტიანი ფერმენტული სისტემების ჩამოყალიბებისა და მათი აქტივობის რეგულაციის უმნიშვნელოვანესი ბერკეტია. ფერმენტთა ამ ჯგუფს მიეკუთვნება მიტოქონდრიული მემბრანის NADPH-სპეციფიკური მონოოქსიგენაზური სისტემა.

სოლუბილიზებულ ციტოქრომ P450-ს ჰიდროქსილაზური აქტივობა

დაქვეითებული აქვს. გასუფთავებული ჰემობროტიკის ლიპოსომურ მემბრანაში ჩაშენებისას კვლავ იზრდება მისი მონოოქსიგენაზური, და განსაკუთრებით, პეროქსიდაზული აქტივობა. ფერმენტულ რეაქტივაციას თან არ ახლავს რაიმე შესაძენვეი კონფორმაციული ცვლილებები. არ არსებობს კორელაცია ჰემობროტიკის მოლეკულაში α -სპირალის შემცველობის ცვლილებასა და ლიპოსომურ მემბრანაში მისი აქტივობის მატებას შორის. ეს ფაქტი ეწინააღმდეგება შეზღუდლებას იმის შესახებ, რომ ხსნად მდგომარეობაში მყოფი ფერმენტის მეორადი სტრუქტურა არსებითად განსხვავდება მემბრანასთან დაკავშირებული ცილის სტრუქტურისაგან.

ცნობილია, რომ პროტეაზებით ხანგრძლივი დამუშავების შემთხვევაშიც კი მემბრანის მთლიანობა არ ირღვევა და მხოლოდ გარეგანი თხელი ოსმოფილური ფენა განიცდის $\sim 30\%$ -ით სოლუბილიზებას. ეს ენდოპლაზმურ მემბრანებში ჰიდროფობული ბარიერის არსებობაზე მიუთითებს, რომელიც მემბრანის შიგთავსს პროტეაზური „შეტევისათვის“ შეუვალს ხდის. ელექტრონულ-მიკროსკოპული ანალიზიც ადასტურებს, რომ პროტეაზების ზემოქმედებისას მემბრანა თავის ნატიურობას ინარჩუნებს. მეორე მხრივ, ფოსფოლიპაზა A-ს მოქმედება მემბრანის ფრაგმენტაციას და მთელი რიგი ცილების სოლუბილიზებას იწვევს. ანალოგიურ ეფექტს ამჟღავნებენ დეტერგენტებიც. იონების მოქმედება მემბრანის ნატიური სტრუქტურის შენარჩუნებაში არაა არსებითი. 10% წყლის შემცველი აცეტონით ლიპიდების მოცილება ენდოპლაზმური მემბრანების სტრუქტურის სრულ რღვევას იწვევს. ყველა ეს ფაქტი იმაზე მიუთითებს, რომ მიტოქონდრიის შიდა მემბრანისაგან განსხვავებით, ენდოპლაზმური მემბრანების სტრუქტურულ მთლიანობას განსაზღვრავს არა ცილა-ცილური-ჰიდროფობული, არამედ ცილა-ლიპიდური ან ლიპიდ-ლიპიდური-ჰიდროფობული ურთიერთქმედება. უნდა აღინიშნოს, რომ მემბრანის ფოსფოლიპაზა C-თი დამუშავება, რომელიც ფოსფოლიპიდების მხოლოდ დამუხტული ჯგუფების მოცილებას იწვევს, ცვლის ენდოპლაზმური მემბრანების სტრუქტურას, მაგრამ მის ნატიურ შენებას ვერ არღვევს. ამ დროს ადგილი აქვს მემბრანის სისქის 50–60 ნმ-დან 75 ნმ-მდე გაზრდას, რაც საინკუბაციო არეში ფოსფოლიპიდების დამატებით შექცევადად ნორმალდება. პარალელურად საკონტროლო დონეს უბრუნდებიან ფერმენტთა აქტივობები და მათი კინეტიკური პარამეტრები, რომლებიც კონტროლირებადი დელიპიდიზაციით იყო გამოწვეული. ფოსფოლიპაზების გამოყენებით მიღებული შედეგები ცილა-ლიპიდური კომპლექსების ისეთ შეფუთვის ადასტურებენ, რომელშიც ფოსფოლიპიდების მოლეკულები ინ-

ტაქტურ მემბრანებშიც კი ჰიდროლიზისადმი მაღალ მგრძნობიარობას ავლენენ.

უთუოდ საყურადღებოა ჰეიდონისა და მისი თანამშრომლების გამოკვლევები, რომლებმაც აჩვენეს, რომ ზედაპირულ ცილებსა და ლიპიდურ ბიშრეს შორის ძლიერი ჰიდროფობული ურთიერთქმედება არსებობს. ამის შედეგად ფოსფოლიპიდების მოლეკულის ჰიდროფობული კუდები მემბრანის ზედაპირისადმი ისე ორიენტირდება, რომ ბიშრის სისქე შემცირებას განიცდის. ამასთან, იზრდება ბიშრის ზედაპირზე ფოსფოლიპიდის ყოველი მოლეკულის მიერ დაკავებული ხვედრითი ფართობი. გარდა ამისა, სავსებით შესაძლებელია, რომ ფოსფოლიპიდის ყველა პოლარული დაჯგუფება არ იყოს ცილით ეკრანირებული. სწორედ ამ, დაუცველ უბნებს უტყვენ ფოსფოლიპაზები C და D. ფოსფოლიპიდების პოლარულ ჯგუფებსა და მათ მეზობელ ცილის მოლეკულებს შორის დარჩენილი „ხვრელები“ კი ფოსფოლიპიდებს ფოსფოლიპაზა A-ს „სამიზნედ“ ხდიან.

იგივე ავტორების მიერ დადგენილია, რომ 21 ნმ სისქის მქონე ენდოპლაზმური მემბრანების ბიშრეში ფოსფოლიპიდის მოლეკულის ხვედრითი ფართობი 98 ნმ^2 -ს უნდა შეადგენდეს. ეს ასეც უნდა იყოს, რათა $4.5 \cdot 10^{17}$ მოლეკულა ფოსფოლიპიდმა (ფოსფოლიპიდების მოლეკულების რიცხვი 1 მკ ცილაზე ღვიძლის ჰეპატოციტებისათვის) წარმოქმნას 0.44 მ^2 ზედაპირის ფართობის მქონე ბიშრე. მოყვანილი სიდიდე სავსებით რეალურია; იგი ოპტიმალურად „ჯდება“ ფოსფოლიპიდების ხვედრითი ფართობის ღიაპაზონში, რომელიც სხვა ბიოლოგიური მემბრანებისთვისაა გამოთვლილი და კარგად ესადაგება ელექტრონული მიკროსკოპიის საშუალებით გამოთვლილ ენდოპლაზმური მემბრანების ლიპიდური ბიშრის სისქეს. გამოითქვა მოსაზრება, რომ ფოსფოლიპიდური ჯგუფის ნაწილი უშუალოდაა გამოსული მემბრანის ზედაპირზე და არაა დაფარული ცილით. ამ ჯგუფების რაოდენობაზე მსჯელობა შეიძლება ლიპიდების ფოსფოლიპაზა C-ს მოქმედების ეფექტურობით, რომელიც ყველა ფოსფოლიპიდის არაუმეტეს 70%-ის ჰიდროლიზს იწვევს. მაშასადამე, ცილით დაუცველი პოლარული ფოსფოლიპიდების მაქსიმალური რიცხვი მათი საერთო რაოდენობის 70%-ს არ უნდა აღემატებოდეს, რაც მიკროსომული ცილის 1 მგ-ზე ჯამური ფართობის 0.14 მ^2 -ს შეადგენს და ერთი პოლარული ჯგუფის საშუალო ხვედრით ფართობს 48 ნმ^2 -ის ტოლად ხდის.

ყოველივე ზემოთქმულმა საფუძველი შექმნა მემბრანაში არსებული ლიპიდ-დამოკიდებული, ანუ ლიპიდის მომთხოვნი ფერმენტები გამოყოფილიყო ცალკე ჯგუფად. მათ ქცევაზე ორი მოსაზრება არსებობს: პირვე-

ლი თვლის, რომ ფერმენტთა აქტივობაზე გავლენას ლიპიდური გარემოცვა ახდენს, რომელიც საშუალებას იძლევა ფერმენტი იმყოფებოდეს კატალიზურად მომგებიანი ფორმით. ამ მოსაზრების თანახმად, ლიპიდების შემადგენლობის ცვლილება ან მემბრანის სრული დელიპიდაცია (დესტრუქცია) ცილის მოლეკულის სტრუქტურის, და შესაბამისად, კატალიზური აქტივობის შეცვლას იწვევს. მეორე თვალსაზრისი წინა პლანზე აყენებს მემბრანის ლიპიდური ფაზის სიბლანტის როლს ფერმენტ-სუბსტრატის კომპლექსის წარმოქმნაში. ეს თვალსაზრისი პრობლემას რამდენადმე განსხვავებული ასპექტით განიხილავს: თვლიან, რომ ლიპიდური გარემოცვის ცვლილება ფერმენტული რეაქციის მაქსიმალურ სიჩქარეზე და K_M -ზე პრინციპულად არ მოქმედებს; სამაგიეროდ, იცვლება ჰილის კოეფიციენტი – ფერმენტული რეაქციის სიჩქარის ეფექტორის კონცენტრაციაზე დამოკიდებულება. სხვაგვარად რომ ითქვას, ლიპიდები ზემოქმედებას ძირითადად ახდენენ მემბრანადაკავშირებული ფერმენტების არა კატალიზურ, არამედ ალოსტერულ ცენტრზე. ამ თვალსაზრისის მომხრეები მიიჩნევენ, რომ ლიპიდური კომპონენტების სიბლანტი განაპირობებს ფერმენტების სუბერთეულების სტრუქტურულ მდგომარეობას და სიბლანტის ცვლილება (გამომწვევი მიზეზის მიუხედავად) როგორც ეუკარიოტებში, ასევე პროკარიოტებში მემბრანული ფერმენტების რეგულაციის საყოველთაო მექანიზმს წარმოადგენს.

უნდა აღინიშნოს, რომ განხილულ მიდგომაში არაა გათვალისწინებული განსაზღვრული ლიპიდებისათვის ფერმენტის მოლეკულაში სპეციფიკური ლიპიდთან დამაკავშირებელი ცენტრების არსებობა. ამიტომ ზოგიერთი მკვლევარი თვლის, რომ ლიპიდ-დამოკიდებულ ფერმენტებს გააჩნიათ ლიპიდებთან, როგორც ალოსტერულ ეფექტორებთან დასაკავშირებელი საკუთარი განსაკუთრებული ცენტრი. მტკიცება იმის შესახებ, რომ ლიპიდები ალოსტერულ ეფექტორებს წარმოადგენენ, ეყრდნობა მონაცემებს, რომლებიც ფერმენტთა რეაქტივაციასა და განსაზღვრული ფოსფოლიპიდების შეცველობას შორის მჭიდრო კავშირზე მიუთითებენ. ისევე, როგორც სხვა ალოსტერული ეფექტორები, ლიპიდებიც გავლენას ახდენენ არამხოლოდ ფერმენტული რეაქციის სიჩქარეზე, არამედ სხვა ეფექტორების მიმართ ფერმენტთა მგრძნობიარობაზეც.

ენდოპლაზმური მემბრანა ქიმიურად ფოსფოლიპიდ-რიბონუკლეოპროტეინულ კომპლექსს წარმოადგენს. აქ არსებული ფოსფოლიპიდები მთელი უჯრედული ჰომოგენატის ფოსფოლიპიდთა 47–54%-ის შეადგენენ. როგორც დადგინდა, ისინი განსაზღვრულ მნიშვნელობას იძენენ ცილა-

ლიპიდურ ურთიერთქმედებაში. თუ დავუშვებთ, რომ ფოსფოლიპიდის საშუალო მოლეკულური მასა ~800 kD-ის, ხოლო ცილის საშუალო მოლეკულური მასა ~50 000 kD-ის ტოლია, მივიღებთ, რომ მემბრანული ცილის ყოველ მოლეკულაზე ფოსფოლიპიდის ~23 მოლეკულა მოდის. ამ ფარდობის მუდმივობა თავისთავად წარმოადგენს გარკვეული მარეგულირებელი მოქმედების გამოვლენას, რომელიც, შესაძლოა, მემბრანაში ფოსფოლიპიდთა ბიოსინთეზის დონეზე ხორციელდებოდეს.

1.2.4.5 მაჰიდროქსილირებელ სისტემათა „კლასტერული“ წყობის შესახებ

ენდოპლაზმური მემბრანების მაჰიდროქსილირებელ რედოქს-ჯაჭვის სტრუქტურული ორგანიზაციისა და NADPH-სპეციფიკური ფლავოპროტეინის ციტოქრომ P450-თან ურთიერთქმედების ბუნების დადგენა მემბრანული ქსენობიოქიმიის ერთ-ერთი ცენტრალური პრობლემაა. ექსპერიმენტული მონაცემების მიხედვით ენდოპლაზმურ მემბრანებში უნდა არსებობდეს სპეციალური უბნები, რომლებიც „კლასტერის“ პრინციპითაა ორგანიზებული, რაც გულისხმობს მემბრანასთან ხისტად დამაგრებულ NADPH-ის ჟანგვის კომპონენტთა კომპლექსს (ზოგიერთი მკვლევარი საერთოდ უარყოფს მიკროსომებში კლასტერების არსებობას!). „კლასტერის“ შემადგენლობაში, როგორც აღნიშნული იყო, ჩართულია იმ ფოსფოლიპიდების მოლეკულებიც, რომლებიც თავისი ფიზიკურ-ქიმიური მახასიათებლებით მემბრანული ფოსფოლიპიდების ძირითადი მასიდან რამდენადმე განსხვავდება. ამის სასარგებლოდ მეტყველებს ფოსფოლიპიდური კომპონენტის აუცილებლობა NADPH-სპეციფიკურ ფლავოპროტეინსა და ციტოქრომ P450-ის დონეზე ელექტრონთა ტრანსპორტის პროცესში. აღნიშნული მონაცემები ეყრდნობა ჰიდროქსილირებასა და რედუქტაზულ რეაქციებზე მერსალილის (ვერცხლისწყლის ნაერთი, რომელიც უკავშირდება SH-ჯგუფებს) ინჰიბიტორულ მოქმედებას, რომლის შედეგადაც ციტოქრომ P450-ის მოლეკულებსა და NADPH-სპეციფიკურ ფლავოპროტეინს შორის დადგენილია ზუსტი თანაფარდობა (20 : 1 ან 12 : 1).

ციტოქრომ P450-ის მთლიანი ფონდის შენელებული აღდგენა მერსალილით დამუშავებული მიკროსომებით, აგრეთვე ფლავოპროტეინისა და ჰემოპროტეინის მემბრანაში ჩაშენების უნარი, ქსენობიოტიკთა მეტაბოლიზმში ამ ორი კომპონენტის „კლასტერად“ ჩამოყალიბების დადას-

ტურება უფროა, ვიდრე მისი უარყოფა. ეს მონაცემები მოწმობენ მიკროსომულ მემბრანაში სუსტად ძვრადი გადამტანების ფონდის, ან „დაუმთავრებელი შენების“ მქონე „კლასტერების“ არსებობას, რომლებშიც ახალ რედოქს-კომპონენტთა ჩაშენება შეიძლება მოხდეს.

ვარაუდობენ, რომ NADPH სპეციფიკური ჟანგვის სისტემის მოძრავი კომპონენტები მეტაბოლურ აქტივობაში გადამწყვეტ როლს არ უნდა ასრულებდნენ და მათი ეფექტურობის ზრდა მხოლოდ მემბრანასთან საკმაოდ მტკიცედ დაკავშირებული კომპლექსის წარმოქმნით მიიღწევა, რომელიც „კლასტერულ“ სტრუქტურად არის ორგანიზებული.

მიკროსომული NADPH-დამოკიდებული რედოქს-ჯაჭვის „კლასტერული“ შენების ჰიპოთეზიდან გამომდინარე, საჭირო ზდება სხვა კუთხით შევხედოთ მონოოქსიგენაზათა რეკონსტრუირებას ხსნად სისტემაში ან მემბრანულ სტრუქტურაში. ბოლო პერიოდში დამუშავებულია მეთოდები, რომელთა საშუალებითაც შესაძლებელია მიკროსომულ რედოქს-სისტემათა მაღალი სისუფთავის მქონე კომპონენტების მიღება. მათ სხვადასხვა ქსენობიოტიკების, ჰორმონებისა და სხვ. მეტაბოლიზების უნარი აღმოაჩნდათ. მიუხედავად ამისა, ეს მონაცემები არ იძლევიან იმის საფუძველს, რათა სრულად შევიცნოთ მემბრანაში მონოოქსიგენაზური სისტემის ორგანიზაცია და ფლავოპროტეინიდან ციტოქრომზე ელექტრონის გადატანის ჭეშმარიტი მექანიზმი. ასეთ სისტემათა მეტად საინტერესო თავისებურებას წარმოადგენს ცხიმოვან მჟავათა განსაზღვრული შემადგენლობის მქონე ლეციტინის თანამყოფობა. სავსებით შესაძლებელია, რომ ეს ფოსფოლიპიდი მემბრანაში გადამტანთა ირგვლივ სპეციფიკურ ჰიდროფობულ გარემოცვას ქმნის და მთლიან კომპლექსს „კლასტერის“ ორგანიზაციას ანიჭებს. თუმცა აქვე უნდა შევნიშნოთ, რომ ხსნად სისტემაში კომპლექსების წარმოქმნა არ შეინიშნება თვით ლეციტინის თანამყოფობის პირობებშიც.

ციტოქრომ P450, რომელიც დეტერგენტით დამუშავებისას არააქტიურ ციტოქრომ P420-შია გადასული, მემბრანადაკავშირებულ რეკონსტრუირებულ ჰიდროქსილაზურ სისტემაში ჩამონტაჟებისას ნაწილობრივ რეკონვერტაციას განიცდის. „კლასტერიდან“ სოლუბილიზების შემდეგ ჰემოპროტეინის უმეტესი ნაწილი (88%) ციტოქრომ P450-ის ფორმითაა. ამ პირობებში გლიცერინის დამატებით ზდება ფოსფოლიპიდებთან ციტოქრომის ბმის ჰიდროფობული გარემოცვის შენარჩუნება, რაც ფერმენტის ჰემურ ჯგუფს დეტერგენტების მოქმედებისადმი შეუვალს ხდის. საყურადღებოა, რომ თვითაწყობის შედეგად მიღებულ პრეპარატებში პირდაპირი განსაზღვრით, და არა NADPH-ის კონცენტრაციის შემცირების სიჩქარით,

მკაფიოდ რეგისტრირდება NADPH-ციტოქრომ P450 რედუქტაზა, რაც იმას ადასტურებს, რომ რეკონსტრუირებულ კომპლექსურ სტრუქტურაში ნაწილობრივ მაინც შენარჩუნებულია ფლავოპროტეინისა და ციტოქრომების დამაკავშირებელი უბანი.

თვითაწყობის ან სოლუბილიზაციის პროცესში ციტოქრომ P450-ის სპექტრული თვისებებისა და ფერმენტული აქტივობის შენარჩუნება ჯერ კიდევ არ ნიშნავს მაღალეფექტური მაჰიდროქსილირებელი სისტემის მიღებას. მიკროსომებში NADPH-სპეციფიკური სისტემის „კლასტერული“ ორგანიზაციის არსებობის ჰიპოთეზა ცხადყოფს მხოლოდ იმას, რომ დეტერგენტით მემბრანული სტრუქტურის სოლუბილიზაცია „კლასტერული“ უბნების ნგრევას იწვევს. საფიქრებელია, რომ ფოსფოლიპიდების ის მცირე ფონდი, რომელიც მემბრანაში რედოქს-კომპონენტთა სპეციფიკურ ორგანიზაციას უზრუნველყოფს, სოლუბილიზებულ ფრაქციაში შედარებით თანაბრად ნაწილდება და შემდგომი თვითაწყობისას აღრინდელი რეკონსტრუირების უნარს კარგავს. ეს მოსაზრება ილუსტრირებულია შემდეგი ექსპერიმენტით: მიღებულ იქნა რეკონსტრუირებული სისტემა, რომელიც შეიცავდა ნატრიუმის ქოლატით სოლუბილიზებულ და ტრიფსინით დამუშავებულ მიკროსომებს (შესაბამისად 1 : 1 და 1 : 3 თანაფარდობებით). მიღებული პრეპარატები განსხვავდებოდა ციტოქრომ P450-ისა და მისი რედუქტაზის თანაფარდობითაც. მიუხედავად ამისა, ყველა მათგანს საწყისი პრეპარატთან შედარებით 15-20%-ით შენარჩუნებული აღმოაჩნდათ 3,4-ბენზაპირენის მეტაბოლიზების უნარი.

სადღეისოდ მიღებული ფაქტების გათვალისწინებით შეგვიძლია გავაკეთოთ დასკვნა, რომ არც ციტოქრომ P450-ის კონვერსიის შეზღუდვა, არც ჰიდროქსილაზური სისტემის ცალკეული კომპონენტებით რეკონსტრუირებული სისტემების „გამდიდრება“, ჯერჯერობით თავისი მახასიათებლებით არ იძლევა საწყის მიკროსომებთან მიახლოებულ სისტემებს. როგორც ჩანს, ძირითადი სიძნელეა ისეთი „კლასტერული“ სტრუქტურის ოპტიმალურად რეკონსტრუირება, რომელიც ერთდროულად NADPH-სპეციფიკურ ფლავოპროტეინს, ციტოქრომ P450-ს და ფოსფოლიპიდთა სპეციფიკურ ანაკრებს შეიცავს. შესაძლოა, რომ რეკონსტრუქციის ჩატარება ისეთ არეში, რომელიც სხვადასხვა ინდივიდუალურ ფოსფოლიპიდს ან ლიპოპროტეინებს შეიცავს, საშუალებას მოგვცემს მიუახლოვდეთ მიკროსომულ მემბრანებში „კლასტერულ“ უბნებზე ჩვენი რეალური წარმოდგენების ჩამოყალიბებას. მიკროსომაში არსებული ჟანგვის ორი რედოქს-ჯაჭვი მემბრანულ სტრუქტურაში განსხვავებულადაა ჩამონტაჟებული

ლი. ქსენობიოტიკების NADPH-სპეციფიკური მეტაბოლიზმის სისტემა, როგორც ჩანს, „კლასტერულ“ სტრუქტურადაა ორგანიზებული, რაც საშუალებას იძლევა მიღწეულ იქნას სუბსტრატთა პიდროქსილირების მაქსიმალური ეფექტურობა.

1.2.5 ენდოპლაზმური მემბრანების ლიპიდური კომპონენტებისა და ოქსიგენაზების ურთიერთობის ბიოქიმიური ევოლუცია

ციტოქრომ P450-შემცველი ოქსიდორედუქტაზების ყველაზე დამახასიათებელ თავისებურებას უჯრედში მათი განაწილება წარმოადგენს. სიცოცხლის უმარტივესი ფორმები – პროკარიოტები ჰემოპროტეინებს ხსნადი სახით შეიცავენ. ეუკარიოტულ ფორმებზე გადასვლას თან ახლდა ამ ცილის მემბრანაში ჩაშენება. მაგ., ზოგიერთი საფუარი და მიკროსკოპული სოკო (*Sacharomyces cerevisiae*, *Claviceps purpurea*, *Penicilium petulum*) უკვე ენდოპლაზმურ მემბრანებთან დაკავშირებულ ჰემოპროტეინს შეიცავს. უნდა აღინიშნოს, რომ ისეთი ეუკარიოტი მიკროორგანიზმი როგორიც *Candida tropicalis*-ია, მართალია, ამ ფერმენტს ხსნად ფაზაში შეიცავს, მაგრამ თავისი აქტივობის გამომჟღავნებისათვის ფოსფოლიპიდის თანამყოფობას საჭიროებს. საფიქრებელია, რომ ესაა ჰემოპროტეინის ხსნადსა და მემბრანულს შორის გარდამავალი ფორმა. ცხოველური ორგანიზმების ყველა ციტოქრომ P450 მემბრანული ფერმენტია. იგი უნიკალური ცილაა, რომელიც ევოლუციური კიბის ყველა საფეხურზეა შემონახული და მემბრანაში ჩაშენების უნარი აქვს შეძენილი. მთლიანობაში თუ წარმოიდგენთ მონოოქსიგენაზურ სისტემას, აქაც შევნიშნავთ საინტერესო ევოლუციურ კანონზომიერებას. მისი მრავალფეროვნებიდან შეიძლება გამოყოფილ იქნას მოლეკულური ორგანიზაციის სამი ძირითადი ტიპი:

1. ევოლუციურად ყველაზე უძველესია ბაქტერიული ოქსიგენაზა, რომელიც წყალში ხსნადი სამი კომპონენტისაგან შედგება. *Pseudomonas putida*-ს შემთხვევაში ესენია NADH-სპეციფიკური ფლავოპროტეინი, არაჰემური გოგირდშემცველი ცილა – პუტიდარედოქსინი და ციტოქრომ P450. პირველი ორი კომპონენტი ელექტრონთა გადამტანებია. გარდა ამისა, პუტიდარედოქსინი თავისებური ეფექტორული ცილაა, რომელიც უშუალოდ მონაწილეობს კატალიზურ აქტში და ხელს უწყობს ფერმენტის აქტიურ ცენტრში სამმაგი კოპლექსის – ჰემის რკინა-ჟანგბადი-ჟანგურის დაშლას და დაჟანგული პროდუქტის წარმოქმნას. ამ სისტემის მნიშ-

ვნელოვანი თავისებურებაა საკუთარი სუბსტრატის მიმართ დამოკიდებულება: ფერმენტი აბსოლუტურად სპეციფიკურია და ქაფურის გარეშე უაღრესად ლაბილურია;

2. ევოლუციური კიბის შუა საფეხურზე დგას თირკმელზედა ჯირკვლის მიტოქონდრიების ჰიდროქსილაზური სისტემა. იგი ითავებს ბაქტერიული ხსნადი მონოოქსიგენაზური სისტემის ზოგიერთ ნიშან-თვისებას: მისი ორი კომპონენტი – ფლავოპროტეინი და ადრენოლქსინი – წყალში ხსნადია და მიტოქონდრიის მატრიქსშია ლოკალიზებული; ხოლო მესამე კომპონენტი – ციტოქრომ P450 მემბრანაშია ჩაშენებული. მიტოქონდრიის შიდა მემბრანაზე ორი ტიპის ციტოქრომ P450 იმყოფება. ერთი მათგანი ქოლესტეროლის მოლეკულიდან ალიფატურ ჯგაჭვს აცილებს პრეგნენოლონის წარმოქმნით, ხოლო მეორე პრეგნენოლონს ჟანგავს, რითაც სათავეს უდებს კორტიკოსტეროლების სინთეზს. ყურადღებას იმსახურებს ორივე პემოპროტეინის მაღალი სუბსტრატული სპეციფიკურობა, რითაც ეს სისტემა ბაქტერიულს ემსგავსება;
3. ევოლუციური კიბის უმაღლეს საფეხურზე ღვიძლის ციტოქრომ P450-შემცველი მონოოქსიგენაზური სისტემა დგას. მისი სამივე კომპონენტი ჭეშმარიტად მემბრანული ცილაა. ფართო სუბსტრატული სპეციფიკურობა ამ სისტემას საშუალებას აძლევს განახორციელოს რადიკალურად განსხვავებული ქიმიური ბუნების ქსენობიოტიკთა არაპოლარული მოლეკულების ჟანგვითი დეგრადაცია და ამით ააცილოს ორგანიზმს მასში მოხვედრილი ტოქსიკანტების მავნე ზემოქმედება. ეს სისტემა, სულ მცირე, ორ ცილას მაინც შეიცავს. ესენია NADPH-სპეციფიკური ფლავოპროტეინი და ციტოქრომ P450. ელექტრონთა ორი დანარჩენი გადამტანი, NADH-სპეციფიკური ფლავოპროტეინი და ციტოქრომ b₅ აუცილებელია მხოლოდ NADH-ის ელექტრონთა დონორად გამოყენებისას; ამასთან, მიკროსომებში NADH შეიძლება დაიჟანგოს NADPH-სპეციფიკური ფლავოპროტეინითაც და ამ დროს ციტოქრომ b₅-ის თანაარსებობაა საჭირო.

როგორაა ორგანიზებული ამ მხრივ უმაღლესი მცენარეების მონოოქსიგენაზური სისტემა? ჩვენს ლაბორატორიაში ჩატარებული ექსპერიმენტული მონაცემები გვიჩვენებენ, რომ მცენარეში საქმე გვაქვს მონოოქსიგენაზური სისტემის ორ – მემბრანადაკავშირებულ და ხსნად ფორმასთან. ამას შემდეგი ფაქტები ადასტურებს:

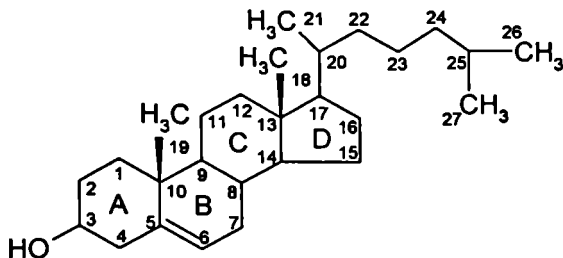
1. ციტოქრომ P450-ის აქტივობა (CO-ინჰიბირებადი NADPH-დამოკიდებული N- და O-დემეთილაზური აქტივობები) და NADPH-დამოკიდებული

- ბული ფლავოპროტეინის აქტივობა ($K_3[Fe(CN)_6]$ -ის აღდგენის სიჩქარე) გააჩნია არამხოლოდ 105 000 გ-ზე მიღებულ მიკროსომულ ფრაქციას, არამედ მის სუპერნატანტსაც (ციტოზოლსაც);
2. ხსნადი მონოოქსიგენაზა არაა მიკროსომული ფრაქციის მიღებისას მემბრანიდან შემთხვევით „ამოგლეჯილი“ ფერმენტი. მიკროსომების მრავალჯერადი გამორეცხვით მიღებული ხსნარი მონოოქსიგენაზურ აქტივობას საერთოდ არ ამჟღავნებს;
 3. ციტოზოლური ფერმენტის მონოოქსიგენაზური აქტივობა არ იცვლება დეტერგენტის ან ლიპიდური კომპონენტების დამატებისას, ე.ი. ხსნადი მონოოქსიგენაზა ფუნქციონირებისათვის მემბრანის სტრუქტურულ ორგანიზაციას არ საჭიროებს.

ეს მონაცემები გარკვეულ საფუძველს გვაძლევს გავაკეთოთ დასკვნა: დელამიწის სხვა ბინადართაგან განსხვავებით, ევოლუციური თვალსაზრისით მცენარე ყველაზე „გონივრულად მოიქცა“. მან მონოოქსიგენაზური სისტემა მემბრანაში ჩააშენა, მაგრამ იმავდროულად შეინარჩუნა მისი ხსნადი ფორმა, რითაც ორგანული ტოქსიკანტებისაგან თავდაცვის ზღუდე უფრო ღრმად ეშელონირებული გახდა. მცენარეთა ამ უნიკალური თვისებების მრავალწლიანმა კვლევამ, რომელიც ჩვენს ინსტიტუტში ტარდება, ჩამოაყალიბა მცენიერულად დასაბუთებული ე.წ. „მწვანე ფილტრის“ კონცეფცია, რომლის თანახმადაც მცენარეული საფარის მიზანმიმართული განაშენიანება მნიშვნელოვნად შეამცირებს გარემოდან ადამიანისაკენ მიმართულ ქსენობიოტიკთა უწყვეტი ნაკადის ინტენსივობას.

1.2.5.1 ენდოპლაზმური მემბრანების სტეროლური კომპონენტი (ქოლესტეროლი)

სტეროლები შეიძლება განვიხილოთ, როგორც ტეტრაციკლური ტრიტერპენების წარმოებულები. აქვე მოგვყავს ქოლესტეროლის მოლეკულური ფორმულა ნახშირბადატომების ნუმერაციით (ნახ. 10). როგორც ვხედავთ, მოლეკულა შეიცავს ოთხ (A, B, C და D) კონდენსირებულ ბირთვს – პერჰიდროციკლოპენტანოფენანტრენს; ერთ ჰიდროქსილის ჯგუფს C-3 მდგომარეობაში; ორმაგ ბმას C-5 და C-6 ატომებს შორის; ციკლთან მიერთებულ მეთილის ჯგუფებს (C-10 და C-13 პოზიციებში), და ბოლოს, D-ბირთვთან მე-17-ე პოზიციაში დაკავშირებულ რვაწევრიან განტოტვილ ნახშირწყალბადოვან ჯაჭვს.

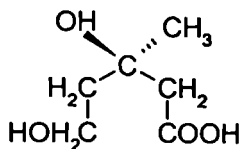


ნახ. 10. ქოლესტეროლის მოლეკულური ფორმულა ნახშირბადატომების ნუმერაციით.

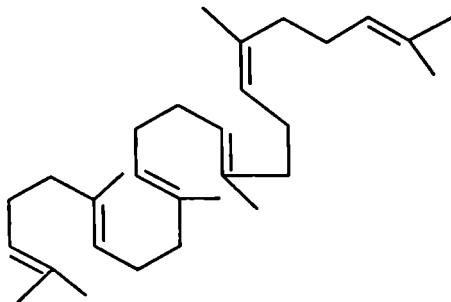
მე-18-ე და მე-19-ე ნახშირბადატომები შეიძლება ციკლური სისტემის სიბრტყის ზემოდან ან ქვემოდან განლაგდნენ. ქოლესტეროლში ორივე მეთილის ჯგუფი სიბრტყის ზემოდან იმყოფება და ე.წ. β -კონფიგურაციას ქმნის.

სტეროლების ალიფატურ ნაწილში სხვადასხვა სტრუქტურული თავისებურებები გვხვდება: მაგ., მცენარეული სტეროლებიდან β -სიტოსტეროლის 24-ე ნახშირბადატომთან ეთილის ჯგუფი აქვს მიერთებული; სტიგმასტეროლის 22-ე და 24-ე ნახშირბადატომებს შორის ორმაგი ბმაა; ხოლო 24-ე ნახშირბადატომთან ეთილის ჯგუფია; ბრასიკასტეროლს 24-ე მდგომარეობაში მეთილის ჯგუფი აქვს დაკავშირებული და ა.შ. ჩანაცვლებული ჯგუფები მოლეკულაში ტრანსმეთილირების რეაქციათა შედეგად შედიან. ქოლესტეროლს 24-ე მდგომარეობაში ასეთი დამატებითი ალკილური ჩანაცვლებული არ გააჩნია.

სტეროლების ბიოსინთეზის მსვლელობა როგორც ცხოველებში, ასევე მცენარეებშიც ერთნაირი გზით ხორციელდება და ორივე შემთხვევაში საწყისია მევალონმჟავა. ეს მეტაბოლიტი უჯრედში ძმარმჟავადან წარმოიქმნება და შემდგომში სკვალენსა (დიჰიდროტრიტერპენს) და სხვა იზოპრენოიდულ ნივთიერებებს აძლევს დასაბამს.



მევალონმჟავა



სკვალენის ნახშირბადატომთა ჩონჩხი

ქოლესტეროლის მთლიანი მოლეკულაც იზოპრენული ერთეულებისაგანაა ნაშენები. სკვალენის ციკლიზაციის პირველი პროდუქტი ცხოველში ლანოსტეროლი, ხოლო მცენარეში ციკლოარტენოლია, რომლიდანაც შემდგომ სხვა სტეროლები იწარმოება. ქოლესტეროლის მოლეკულის როგორც კონდენსირებული ოთხბირთვიანი, ასევე ალიფატური გვერდითი ფრაგმენტი სკვალენიდან არის წარმოქმნილი.

ქოლესტეროლით განსაკუთრებით მდიდარია ცხოველური პროდუქტები. ნაღვლის კენჭოვანი წარმონაქმნები ხშირად მხოლოდ მისგან შედგება. დიდი რაოდენობით შედის იგი ცენტრალურ და პერიფერიულ ნერვულ ქსოვილში, კვერცხის ლიპიდებში და კანის ცხიმებში. ნერვულ ქსოვილთა უმრავლესობაში ქოლესტეროლის მნიშვნელოვანი ნაწილი მოლეკულის A-ბირთვის C-3 პიდროქსილით გრძელჯაჭვიან ცხიმოვან მჟავებს უკავშირდება და ესთერებს (ქოლესტერიდებს) წარმოქმნის. სისხლის პლაზმის ჯაჭური ქოლესტეროლის 70–75% ეთერიფიცირებულია. ჯანმრთელი ადამიანის პლაზმაში მისი კონცენტრაციაა 15–20 მგ/ლ. წყალში ქოლესტეროლის ხსნადობა 25°C-ზე 0.2 მგ/ლ-ს შეადგენს. სისხლში ამ სტეროლის წყალთან შედარებით ბევრად მაღალი ხსნადობა პლაზმაში არსებული ლიპოპროტეინებითაა განპირობებული. მათ უნარი აქვთ დაიკავშირონ და ხსნად მდგომარეობაში გადაიყვანონ ქოლესტეროლი.

ქოლესტეროლის ეთერების წარმოქმნის სხვა მექანიზმი ფოსფატიდილქოლენისა და მას შორის ტრანსეთერიფიკაციაში მდგომარეობს:

ფოსფატიდილქოლინი + ქოლესტეროლი $\rightleftharpoons$

$\rightleftharpoons$ ლიზოფოსფატიდილქოლინი + ქოლესტეროლის ეთერი

თავისუფალთან შედარებით ეთერიფიცირებული ქოლესტეროლი მეტაბოლურად უფრო მობილურია, თუმცა მემბრანებში იგი უპირატესად თავისუფალი ფორმით გვხვდება და მნიშვნელოვან როლს ასრულებს მათ ძერადობაში. ეს ყველაზე უკეთესად სუფთა ფოსფოლიპიდის შემცველ დისპერსიულ სისტემებში მჟღავნდება. მისი რაოდენობის გაზრდისას ფაზური გადასვლა უფრო ფართო და ნაკლებ მკვეთრი ხდება. ლიპალმიტოილფოსფატიდილქოლინის ფაზური გადასვლა ნულამდე ეცემა, როცა ქოლესტეროლის კონცენტრაცია 30-დან 50%-მდე იზრდება. 50%-ის ზევით ფოსფოლიპიდი გამოკრისტალდება იწყებს. ქოლესტეროლის ~20%-იანი კონცენტრაციისას დამატებითი ფართო ფაზური გადასვლა ჩნდება, რასაც ბიშრეში ქოლესტეროლით მდიდარი უბნების წარმოქმნით ხსნიან. ე.ი. პლაზმურ მემბრანებში ქოლესტეროლი ჰეტეროგენულადაა განაწილებული.

ქოლესტეროლს ხშირად დენადობის რეგულატორს უწოდებენ, რადგან იგი აქვეითებს ფაზური გადასვლის ფარულ სიბოხს. თვლიან, რომ ქოლესტეროლი ზრდის ცხიმოვან მჟავათა ჯაჭვების ძერადობას ფაზური გადასვლის ტემპერატურაზე ქვევით და ამცირებს მათ ძერადობას ფაზური გადასვლის ტემპერატურაზე ზევით.

ძუძუმწოვრების მემბრანები მკაფიოდ გამოსახულ ფაზურ გადასვლას არ ამჟღავნებენ. ამას განაპირობებს მათში ქოლესტეროლის არსებობა. ქსოვილოვანი კულტურების უჯრედები თუ გამოიზრდება ქოლინის ანალოგებზე, რომლებიც შესაბამის ფოსფოლიპიდთა ფაზური გადასვლის ტემპერატურას ზრდიან, მაშინ უჯრედთა ცხიმოვანი მჟავების შემადგენლობა უფრო უჯერი ხდება. უაღრესად მნიშვნელოვანია მემბრანული ლიპიდების შენარჩუნება ფაზური გადასვლის ტემპერატურასთან შედარებით უფრო მაღალ ტემპერატურაზე. მაგ., სარკობლაზმურ რეტიკულუმში ლიპიდთა ნახშირწყალბადოვანი ჯაჭვების 3%-ზე ნაკლები 1°C-ზეც კი გელის მდგომარეობაში იმყოფება.

ბიოლოგიურ მემბრანებში, როგორც ჩანს, არსებობს მემბრანული ლიპიდების ლოკალური უბნები, რომელთაც შეზღუდული ძერადობა გააჩნიათ. ძირითადი ფაზური გადასვლა 0°C-ზე უფრო დაბალ ტემპერატურაზე ხდება; თუმცა ერითროციტების მემბრანებში შესაძლებელი გახდა გამოვლენილიყო ლიპიდთა ფაზური გადასვლები ფიზიოლოგიური ტემპერატურების უბანში. თვლიან, რომ ეს განპირობებულია ლიპიდური ბიშრის

მონაკვეთების მიკროსიბლანტის ცვლილებებით.

გრძელი ნახშირწყალბადოვანი „კუდით“ და მცირე ჰიდროფილური „თავით“ ქოლესტეროლი ის აუცილებელი კომპონენტია, რომელიც სიბლანტის გაზრდის გზით მემბრანის თხევად-მოზაიკურ სტრუქტურას აყალიბებს. მაღალი დენადობის გამო იგი თანაბრად ნაწილდება მემბრანებს შორის სივრცეში და ზღუდავს ლიპიდთა ნახშირწყალბადური ჯაჭვების ძვრადობას. „არადენად“ ბიშრეში ქოლესტეროლი აქვეითებს „თხევად“ მდგომარეობაში მემბრანის ფაზური გადასვლის ენერგიას. მისი ჰიდროქსილის ჯგუფი წყალბადური ბმით უკავშირდება ორი მეზობელი ფოსფოლიპიდის ესთერულ ჯგუფებს. კავშირის ეს ზონა ბიშრის ჰიდროფობულ ნაწილს („სენდვიჩის“ შიგთავსს) იცავს გარემომცველი პოლარული სივრცისაგან. ამდენად, ქოლესტეროლს მემბრანის ფოსფოლიპიდურ კომპონენტთა დენადობის რეგულატორის როლს აკუთვნებენ. მემბრანათა ასაკში შესვლასთან დაკავშირებით იზრდება ქოლესტეროლისა და ფოსფოლიპიდის თანაფარდობა, რის გამოც მცირდება ცხიმში ხსნადი სუბსტრატებისათვის მემბრანებთან დაკავშირების უბანთა რიცხვი. ზანდაზმულ მემბრანებში ქოლესტეროლი და ერგოსტეროლი აქვეითებენ გლუკოზისა და მრავალატომიანი სპირტების განვლადობასაც.

ფოსფოლიპიდები ახდენენ ქოლესტეროლის უკმარობის კომპენსაციას, რასაც, მაგ., ადგილი აქვს იშემიური დაავადებებისას. მიუხედავად იმისა, რომ ყველა ჰორმონული სტეროლი ქოლესტეროლიდანაა წარმოებული, მათ მაინც ძლიერ განსხვავებული ფიზიოლოგიური თვისებები გააჩნიათ, რაც სპეციფიკურად ვლინდება სპერმატოგენეზში, ლაქტაციაში, მინერალური ბალანსის (განსაკუთრებით კალციუმისა და ფოსფორის) შენარჩუნებაში, ცხიმში ხსნადი ვიტამინების აბსორბციაში, ენერგეტიკულ მეტაბოლიზმში და სხვა პროცესებში.

ზანგრძლივი პერიოდის განმავლობაში ქოლესტეროლი ტიპურ ცხოველურ სტეროლად ითვლებოდა. ამჟამად მისი არსებობა დადგენილია ბაქტერიებში და მათთან ნათესაურად ახლო მყოფ ლურჯ-მწვანე წყალმცენარეებში. უმაღლესი მცენარეები მას მცირე რაოდენობით შეიცავენ. გამონაკლისს წარმოადგენს თესლის ზეთები და ყვავილის მტვერი. ჩვენს ინსტიტუტში შესწავლილია თუთის (ჯიში „საქართველო“) ფოთლებში თავისუფალი, ეთერიფიცირებული და გლიკოზილირებული სტეროლების დინამიკა ვეგეტაციის ფაზების მიხედვით. მათი იდენტიფიკაცია ხდებოდა თხელფენოვანი ქრომატოგრაფიით სილიკაგელზე („L 5/40“) გამხსნელთა სისტემით n -ჰექსანი : დიეთილის ეთერი : ძმარმევა (80 : 20 0.5).

სტერილურ პრეპარატებში გამოვლენილ იქნა β -სიტოსტეროლი, სტიგმასტეროლი, კამპესტეროლი და ქოლესტეროლი. უკანასკნელის შემცველობა ჯამურ პრეპარატში 4–13%-ს არ აღემატებოდა, ხოლო დომინირებდა (~60%-მდე) β -სიტოსტეროლი. გამოირკვა აგრეთვე, რომ ქოლესტეროლის ეთერიფიკაციაში უპირატესად სტეარინის, პალმიტინის, ოლეინისა და ლინოლის მჟავები მონაწილეობენ.

სტეროლები მცენარეში აქტიურ მეტაბოლიტებს წარმოადგენენ. ქოლესტეროლი წინამორბედი ნივთიერებაა კაროტინოიდების, სტეროლური საპოგენინების, ალკალოიდების, ფიტოჰორმონებისა და სხვათა ბიოსინთეზში. ამ გარდაქმნათა დროს მოლეკულის ციკლური კომპონენტი უცვლელი რჩება. გვერდითი ალიფატური ნაწილი ცხოველურის მსგავსად მცენარეშიც შეიძლება ორნახშირბადატომიანი ფრაგმენტით დამოკლდეს, რის შედეგადაც პრეგნენოლონი და პროჟესტეროლი მიიღება.

ქოლესტეროლის ეთერიფიკაციებისა და მისი ჟანგვითი გარდაქმნების რაოდენობრივი ცვლილებების დასადგენად ჩვენს ლაბორატორიაში ჩატარებულია გამოკვლევები მცენარის (ვაზისა და იუკა დიდებულის) ფოთლებზე. ამ მიზნით ცდებში გამოიყენებოდა $4\text{-}^{14}\text{C}$ -ქოლესტეროლი. აღმოჩნდა, რომ პალმიტატი და სტეარატი საგრძნობლად აჩქარებენ ეგზოგენურად დამატებული ქოლესტეროლის ეთერიფიკაციას, ხოლო ATP და $\text{ATP} + \text{c-AMP} +$ გლუტათიონი ეთერიფიკაციების პროცესის ზრდის პარალელურად აძლიერებენ მეტაბოლურად აქტიური ნაერთების (80%-იან ეთანოლში ხსნადი ფრაქციის) წარმოქმნას. ყურადღებას იმსახურებს ჰექსანით ექსტრაქციის შედეგად დარჩენილი მშრალი ნაშთის საკმაოდ მაღალი რადიოაქტიურობა. როგორც ჩანს, ქოლესტეროლი ადსორბციული ან სხვა რომელიმე ძალებით უკავშირდება დენატურირებულ ცილებს ან პოლისაქარიდებს. წარმოქმნილი მტკიცე ლიპოპროტეინული კომპლექსებიდან ლიპიდი მხოლოდ მღუღარე ეთანოლით ექსტრაგირდება. მსგავსი კომპლექსების წარმოქმნის დასადგენად მიემართეთ თანმიმდევრულ საფეხურებრივ ექსტრაქციას: 96%-იანი ეთანოლით (1.5 სთ), ჰექსანით (30 სთ) და ქლოროფორმ-ეთანოლის 2 : 1-თან ნარევით (20 სთ). მიღებულ ფრაქციათა რადიოაქტიურობამ გვიჩვენა, რომ ეთანოლი მშრალი მასიდან ^{14}C -ის მხოლოდ ნაწილობრივ გამოწვლილვას იწვევს, მაგრამ მის შემდეგ ჰექსანით ექსტრაქცია უფრო ეფექტური ხდება. როგორც ჩანს, ეთანოლი ასუსტებს იმ ძალებს, რომლებიც ქოლესტეროლს შეკავშირებულ მდგომარეობაში ამყოფებს. მეთანოლისა და ქლოროფორმის ნარევით შემდგომი ექსტრაქციის შედეგად მშრალ ნაშთს სრულად აქვს დაკარგული რადიო-

აქტიურობა. ექსტრაქტში გადასული ნივთიერებები იდენტიფიცირდა, როგორც სტეროლგლიკოზიდები. ამგვარად, უმაღლეს მცენარეთა ქსოვილში ეგზოგენური ქოლესტეროლი მონაწილეობს ეთერიფიკაციაში, იჟანგება ალიფატური რიგის სტანდარტულ ნაერთებამდე და წარმოქმნის მტკიცე ლიპოპროტეინულ და გლიკოლიპიდურ კომპლექსებს.

სტეროლები სუნთქვის პროცესის ორგანიზებაშიც მონაწილეობენ. საფუე-რებზე ჩატარებული გამოკვლევებით ნაჩვენებია, რომ ჟანგბადის დეფიციტი-სას ძლიერ მცირე რაოდენობის სტეროლები სინთეზდება. აერაციით მათი სინთეზის გასაოცარი სტიმულაცია ხდება. მეტაბოლური გზების სპეცი-ფიკური ინჰიბიტორებით დათრგუნვისას სტეროლთა სინთეზიც ქვეითდება, რის შედეგადაც უჯრედის სუნთქვის უნარიანობა მკვეთრად მუხრუჭდება.

როგორც ვიცით, უჯრედის აერობულ სუნთქვას, ენერგიის გენერირე-ბის გარდა, პლასტიკური ცვლის ფუნქციაც გააჩნია. მისი მიზანი აუცილე-ბელი მეტაბოლიტების წარმოქმნაა. ამის შესანიშნავი მაგალითია ქოლეს-ტეროლიდან სტეროიდული ჰორმონების წარმოქმნა. ამ შემთხვევაში ამოცანა იმაში მდგომარეობს, რომ ჟანგბადის ატომთა ჩანერგვის გზით სტეროლის მოლეკულის ჩონჩხის განსაზღვრული უბნები დაიჟანგოს. შესაბამისი რეაქციები სპეციალური ფერმენტებით, კერძოდ, ციტოქრომ P450-შემცვე-ლი ოქსიგენაზებით კატალიზდება. ჟანგბადის მიერთებისათვის ეს ჰემო-პროტეინი აღდგენილ მდგომარეობაში უნდა იმყოფებოდეს. პროცესი მი-ტოქონდრიის შიდა მემბრანაზე ხორციელდება (სტეროლჰიდროქსილაზა დეტალურად მომდევნო პარაგრაფში იქნება განხილული).

ქოლესტეროლიდან სტეროლური ჰორმონების სინთეზს მრავალი საერთო აქვს ქსენობიოტიკთა ჟანგვით დეგრადაციასთან. აქაც აღგილი აქვს უცხო ნაერთის მოლეკულაში ჟანგბადის ატომის ჩანერგვას და აქაც აღდგენილი ციტოქრომ P450 მონაწილეობს. დაჟანგული ჰემოპროტეინის კვლავ აღდ-გენა ენდოპლაზმურ მემბრანებში არსებულ სუნთქვით ჯაჭვში ხდება. თავისუფალი ჟანგვის ეს სისტემა არაა შეუღლებული პროტონული გრა-დიენტის აღძვრასთან.

რეაქციები, რომელთაც თან ახლავს სტეროლთა მოლეკულაში C—O კავშირების წარმოქმნა-გახლეჩა, საკმაოდ მრავალმხრივია. მათ, უპირველეს ყოვლისა, ჰიდროქსილირება მიეკუთვნება. სტეროლის მოლეკულაში ჩვეუ-ლებრივ ერთი, იშვიათად ორი და უფრო იშვიათად სამი ჟანგბადის ატომი ინერგება. სტეროლჰიდროქსილაზები ფართოდ გავრცელებული ფერმენტ-ებია. მცენარეულ სამყაროში ისინი უპირატესად კარდენოლიდებისა და საპოგენინების ბიოსინთეზში მონაწილეობენ.

მიკროორგანიზმებში, მცენარეებში და ცხოველებში სტეროლთა პიდროქსილირების მსგავსება შემდეგ პუნქტებში შელანდება:

1. პიდროქსილირებისათვის აუცილებელია ატმოსფერული მოლეკულური ჟანგბადი;
2. ანაერობულ პირობებში პიდროქსილირება არ ხდება;
3. პიდროქსილირებას მეტალების შემცველი ფერმენტები აკატალიზებენ;
4. პიდროქსილირებისათვის აუცილებელია აღდგენილი აგენტის თანამყოფობა და ამ მიზნისთვის ჩვეულებრივ NADPH ან ფლავინური ფერმენტი გამოიყენება.

სტეროლთა პიდროქსილირების რეაქციას დისკრეტულ სტადიებად ყოფენ, რომლებიც სხვადასხვა ფერმენტებით კატალიზდება. ეს სტადიებია:

1. მოლეკულური ჟანგბადის აქტივაცია მეტალოფერმენტით (უპირატესად რკინის შემცველი კომპლექსით, სადაც მეტალი უმაღლეს ვალენტურ მდგომარეობაშია და კატიონის თვისებებს ავლენს);
2. გააქტიურებული კომპლექსით ჟანგბადის ერთი ექვივალენტის უშუალო გადატანა სტეროლის მოლეკულაზე. ეს სტადია უნდა კატალიზდებოდეს ფერმენტით, რომელსაც ზუსტი სიერცობრივი ორიენტაცია გააჩნია სტეროლის მოლეკულის შესაბამისი მდგომარეობის მიმართ;
3. მაპიდროქსილირებელი ფერმენტის რეგენერაცია სხვა ფერმენტით ან NADPH-ით.

სტეროლთა ტრანსფორმაციაში ჩართულ ფერმენტებს შემდეგი შესაძლებლობები გააჩნიათ:

1. სტეროლთა ტრანსფორმაცია, როგორც „შემთხვევითი“ პროცესი;
2. მონაწილეობა ენდოგენურ სტეროლთა მეტაბოლიზმში;
3. სტეროლების გამოყენება ნახშირბადატომების წყაროდ;
4. სტეროლების ტრანსფორმაცია, როგორც მათი დეტოქსიკაციის რეაქცია.

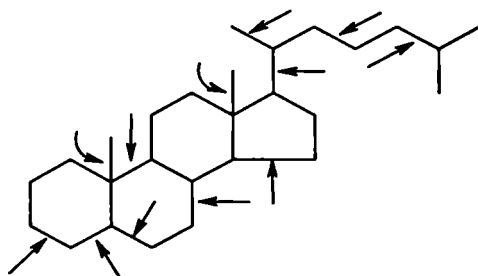
სტეროლთა ბიოქიმიური ტრანსფორმაცია გარკვეული აზრით შეიძლება განხილულ იქნას დეტოქსიკაციისა და უჯრედიდან მათი მოცილების თავისებურ რეაქციად. პარალელურად ანგარიში უნდა გაეწიოს სტეროლთა სრულ ფერმენტულ დაშლას და მათი ნახშირბადატომების პლასტიკური მიზნებისათვის გამოყენებას.

სტეროლთა ტრანსფორმაციაში მონაწილე ფერმენტები ძირითადად ინდუქციური ბუნებისაა, და სათანადო სუბსტრატთა გამოყენებით მათი აქტივობა მრავალჯერადად იზრდება. მაქსიმალური აქტივობიდან დაახლოებით 1–5% ეთმობა კონსტიტუციურ ფერმენტებს და სუბსტრატთა თანამყოფობისას მათი აქტივობა პრაქტიკულად არ იცვლება.

მიკრობულ უჯრედებში სტეროლთა ტრანსფორმაციაში მონაწილე ფერმენტები არაა სათანადოდ შესწავლილი. ცნობილია, რომ მათი აქტივობისათვის საჭირო ელექტრონთა სატრანსპორტო სისტემა გარკვეულ მსხვილ სუბუჯრედულ ნაწილაკებშია ლოკალიზებული. ისინი სრულად 7 500 გ-ზე ილექება, ხოლო მათში არსებული ქოლესტეროლჰიდროგენაზა 110 000 გ-ზეც კი არ ილექება. მიკრობული სტეროლდეჰიდროგენაზის, სტეროლჰიდროქსილაზისა და სტეროლესთერაზისათვის ოპტიმალურია სუსტი ფუძე არე (pH 8–9). ცხოველურ ქსოვილებში ეს ფერმენტული სისტემები აბსოლუტურად ენდოპლაზმურ მემბრანებშია მოთავსებული და აღნიშნულ პირობებში სრულად ილექება.

სტეროლების მიკრობიოლოგიური ჰიდროქსილირება მოლეკულურ ჟანგბადს მოითხოვს და კატალიზდება ფლავოპროტეინით, რომელიც რკინის ან თუთიის იონებს შეიცავს. ამ ფერმენტის დაჟანგული ფორმის რეგენერაცია NADPH-ით ხდება. სტეროლ-1,2-დეჰიდროგენაზა ფლავინურ პროსტეტულ ჯგუფს შეიცავს და ელექტრონულ აქცეპტორს საჭიროებს. ბუნებრივ აქცეპტორად K_2 -ვიტამინი ითვლება. უუჯრედო პრეპარატებში მისი შეცვლა ქინონებითა და სხვადასხვა საღებავებით შეიძლება. არსებობს მონაცემები, რომლებიც სტეროლთა მიკრობული ტრანსფორმაციის ფერმენტთა მაღალ სპეციფიკურობაზე (ჰიდროლიზურის გარდა) მიუთითებენ. ისინი მოქმედებენ სტეროლებთან, როგორც ნაერთთა კლასთან და სხვა ტიპის ნაერთებს მხოლოდ იშვიათ შემთხვევებში, ისიც მცირე სიჩქარით გარდაქმნიან.

მიკროორგანიზმებში სტეროლების ჟანგვითი დეგრადაცია შეიძლება იყოს სრული (H_2O -მდე და CO_2 -მდე), ან ნაწილობრივი, რომლის დროსაც მეტაბოლიზმის საბოლოო პროდუქტებს შენარჩუნებული აქვთ სტეროლის ჩონჩხის ძირითადი ნაწილი და დაშლას მხოლოდ მათი ცალკეული ფრაგმენტები განიცდიან. მოლეკულაზე ფერმენტთა შეტევის უბნები ფორმულაში ისრებითაა ნაჩვენები:



მითითებული რეაქციების ფიზიოლოგიური აზრია სტეროლის ნახშირბადატომთა პლასტიკური მიზნებისათვის გამოყენება. უნდა აღინიშნოს, რომ ბუბუშწოვართა ქსოვილების ფერმენტულ სისტემებს ქოლესტეროლის ალიფატური ფრაგმენტის შერჩევითად დაჟანგვის უნარი აქვთ, რის შედეგადაც ნაღვლის მჟავები და განსხვავებული კლასის სტეროლური ჰორმონები მიიღება. რაც შეეხება მცენარეს, ცნობილია მხოლოდ ის, რომ მათში აღნიშნული პროცესების ჯამური სიჩქარე დამოკიდებულია თვით ნივთიერების ზემოქმედების ზანგრძლივობაზე, კვების რეჟიმზე, ფიზიოლოგიურ მდგომარეობაზე, ვეგეტაციის ფაზაზე და სხვ.

ამჟამად შესწავლილია სტეროლის სრული დაშლის პროცესის საწყისი და საბოლოო სტადიები. დეგრადაციის დასკვნითი ეტაპი, როგორც მოსალოდნელი იყო, დაკავშირებულია ლიმონმჟავას ციკლთან, რადგან ტესტოსტეროლის ჟანგვის მაგალითზე ნაჩვენები იქნა, რომ იგი ითრგუნება ამ ციკლის ფერმენტთა სპეციფიკური ინჰიბიტორებით — მონოფტორაცეტატითა და მალონატით.

სტეროლური ჩონჩხის სრულ ჟანგვას ჩვეულებრივ წინ უსწრებს ფერმენტული რეაქციები, რომლებიც სუბსტრატის კონფიგურაციისა და აღნაგობის წინასწარ „შეზადებას“ უზრუნველყოფს. ეს, უპირველეს ყოვლისა, ჟანგბადიანი ჩამნაცვლებლებით განხორციელებული ჟანგვა-აღდგენის ან A-ბირთვის დეჰიდრირების რეაქციებია. შედარებით სპეციფიკურია საკუთრივ მოლეკულის დაშლის სტადიები. მათთვის დადგენილია სამი შესაძლო ვარიანტი, რომელთა მიხედვითაც დაშლა შეიძლება დაიწყოს A-ბირთვით, B-ბირთვით ან ალიფატური ჯაჭვის ჩამოცილებით. ქოლესტეროლის ფერმენტაციისას ადგილი აქვს A-ბირთვის დაშლას გვერდითი ალიფატური ფრაგმენტის ერთდროული ჩამოცილებით. $4\text{-}^{14}\text{C}$ და $26\text{-}^{14}\text{C}$ მდგომარეობაში მონიშნული ამ სტეროლის გამოყენებით დადგინდა, რომ A-ბირთვის დაშლა გაცილებით სწრაფად ხორციელდება.

მიკროორგანიზმთა ზოგიერთი სახეობა ქოლესტეროლს რამდენიმე თვის განმავლობაში შლის, მაშინ როდესაც *Aspergillus wentii*-ს შერეული კულტურები ამ ნივთიერების აციკლურ პროდუქტებად გარდაქმნას რამდენიმე საათს ანდომებენ. ჟანგვის პროდუქტებს მიკროორგანიზმები უჯრედს გარეთ გამოყოფენ. გარდაქმნის პირველ სტადიაში ქოლესტეროლის A-ბირთვის გარდაქმნისას, პირველ რიგში, C-4 ნახშირბადატომის ჩამოცილება ხდება. ამ დროს ადგილი აქვს $\Delta^4\text{-}3$ -კეტოწარმოებულის წარმოქმნას. $4\text{-}^{14}\text{C}$ -ტესტოსტეროლის ფერმენტაციისას გამოყოფილი CO_2 რადიოაქტიური მხოლოდ ორსაათიანი ინკუბირების (ინდუქციური პერიოდის) შემდეგ

ხდება, მაშინ როდესაც საკვები არედან სტეროლის უკვე მესამედია შეთვისებული. ეს ფაქტი იმაზე მიუთითებს, რომ ქოლესტეროლისაგან განსხვავებით ტესტოსტეროლის A-ბირთვი არ წარმოადგენს დაშლის საწყის სამიზნეს. $26\text{-}^{14}\text{C}$ და $27\text{-}^{14}\text{C}$ ქოლესტეროლის ნახშირბადატომები პროპინმჟავას მეთილისა და კარბოქსილის ჯგუფებში ჯდება.

ჩვენს ლაბორატორიაში დადგენილია მცენარის (ვაზისა და იუკა ღიღებულის) ფოთლების უნარი, დაჟანგონ ქოლესტეროლის A-ბირთვი. როგორც გამოირკვა, ეს პროცესი მიტოქონდრიის მემბრანაში ლოკალიზებული ოქსიდაზური სისტემით ხორციელდება. ჩატარებულმა ექსპერიმენტებმა შემდეგი გვიჩვენეს:

- ქოლესტეროლის დეგრადაცია სტიმულირდება სარეაქციო არეში მიტოქონდრიული ჟანგვის სუბსტრატთა თანამყოფობისას. ლიმონმჟავას ციკლის ინტერმედიატები (მალატი და სუქცინატი), აგრეთვე ამინომჟავები, რომელთა ჟანგვითი გარდაქმნები უშუალოდაა დაკავშირებული ამ ციკლთან (ალანინი, ასპარტატი და გლუტამატი) პროცესს მნიშვნელოვნად აძლიერებენ. ფოსფორილების სუბსტრატების და ADP-ს გავლენით მცენარეული ქსოვილის სუნთქვის გაძლიერება $4\text{-}^{14}\text{C}$ -ქოლესტეროლიდან გამოყოფილი $^{14}\text{CO}_2$ -ის რადიოაქტიურობის საგრძნობ ზრდას (შესაბამისად 28 და 70%-ით) იწვევს. ჟანგვისა და ფოსფორილების სუბსტრატთა ერთდროული მოქმედება კიდევ უფრო ეფექტურია. სარეაქციო არეში ADP-სთან ერთად α -კეტოგლუტარატის დამატება სტეროლის A-ბირთვის ჟანგვის 60–85%-იან სტიმულაციას იწვევს;

- ლიმონმჟავას ციკლის სპეციფიკური ინჰიბიტორები – მალონატი და მონოფტორაცეტატი $^{14}\text{CO}_2$ -ის რადიოაქტიურობას შესაბამისად 35–40%-ითა და ~50%-ით თრგუნავენ. ინჰიბიტორულად მოქმედებს პროცესზე 2,4-დინიტროფენოლიც და ეს ინჰიბირება სრულად იხსნება ATP-ით.

უჯრედის ენერგეტიკულ სტატუსთან ქოლესტეროლის A-ბირთვის დაჟანგვის უშუალო კავშირზე მეტყველებს მონაცემებიც, რომლებიც მიღებულია ჩვენს მიერ „ენერგიის მუხტთან“ (ენერგეტიკულ პოტენციალთან) ამ პროცესის დამოკიდებულების შესწავლით. ადენილატური „აკუმულატორის“ ($\text{AMP} + \text{ADP} + \text{ATP}$) თანდათანობით დამუხტვით (ფოსფატური კავშირებით შევსების დონის გაზრდით) იზრდება $4\text{-}^{14}\text{C}$ -ქოლესტეროლიდან $^{14}\text{CO}_2$ -ის გამოსავალიც.

ქოლესტეროლის A-ბირთვის ჟანგვის გაძლიერება სუნთქვისა და ფოსფორილების სუბსტრატთა გავლენით, მიტოქონდრიაში ATP-ს სინთეზი-

სათვის ოპტიმალური პირობების შექმნაზე დაიყვანება. ამიტომ ATP-სა და $ADP + \text{ფანგვის სუბსტრატთა მასტიმულირებელი ეფექტი ადექვატურია}$. გამოყენებული ნივთიერებები თავის ზემოქმედებას მხოლოდ ცდის საწყის სტადიაზე ავლენენ, რომელიც 7 სთ-იანი ექსპოზიციისას მხოლოდ პირველი საათის განმავლობაში გრძელდება. შემდგომში თანდათანობით ქრება 2,4-დინიტროფენოლის ინჰიბიტორული მოქმედებაც. ამდენად, ქოლესტეროლის A-ბირთვის ფანგვითი დეგრადაცია მცენარეში პირობითად ორ სტადიად შეიძლება დაიყოს: საწყისად, რომელიც სუნთქვის სტიმულატორებისა და ინჰიბიტორების ზემოქმედებას ემორჩილება და მომდევნოდ, რომელიც მათი ზემოქმედებისაგან დამოუკიდებლად მიმდინარეობს და, როგორც ჩანს, სხვა შიდაუჯრედული რეგულატორული სისტემებით კონტროლდება.

მიკროსომული ფანგვის ტიპური სუბსტრატი – ამინოპირინი, მიკროსომული მონოოქსიგენაზების ინდუქტორი – ფენობარიტალი და ციტოქრომ P450-ის სპეციფიკური ინჰიბიტორი – SKF-525A, 4- ^{14}C -ქოლესტეროლიდან გამოყოფილი $^{14}CO_2$ -ის რადიოაქტიურობაზე შესამჩნევ გავლენას არ ახდენენ. სამაგიეროდ, ბენზჰიდროქსამატი, რომელიც მიტოქონდრიაში სუბსტრატთა ალტერნეტიული გზით ფანგვას აინჰიბირებს, მნიშვნელოვნად აქვეითებს აღნიშნულ პროცესს.

მიღებული შედეგების საფუძველზე გავაკეთეთ დასკვნები, რომ:

1. ქოლესტეროლის კატაბოლიზმსა და მცენარეული ქსოვილის სუნთქვის უნარს შორის მჭიდრო, უტყუარი კავშირი არსებობს;
2. ქოლესტეროლის A-ბირთვის ფანგვა ენერგოდამოკიდებული პროცესია;
3. ფერმენტები, რომლებიც ქოლესტეროლის A-ბირთვის ფანგვას აზორციელებენ, უჯრედის ენერგეტიკული პოტენციალის მაღალი დონის არსებობას საჭიროებენ;
4. ქოლესტეროლის A-ბირთვის ფანგვა მიტოქონდრიული მემბრანის პრე-როგატივია, რომელიც SKF-525A-სათვის განუვლადი უნდა იყოს.

დასასრულს, გვინდა ყურადღება გაავამახვილოთ მეტად მნიშვნელოვან გარემოებაზე: ქოლესტეროლის ფანგვის პროდუქტები სტეროლების ტრანსფორმაციაში მონაწილე ფერმენტებს არათუ თრგუნავენ, არამედ უჯრედულ სუნთქვას ააქტიურებენ კიდევ; ე.ი. ამ შემთხვევაში არ მოქმედებს რეგულაციის უარყოფითი უკუკავშირის პრინციპი. უფრო მეტიც, მცენარეული ქსოვილის (ვაზისა და იუკა ღიდეხულის ფოთლების) მასალაზე ჩვენს ლაბორატორიაში ჩატარებული ცდებით ვაჩვენეთ, რომ NADPH-ის თანამყოფობისას ქოლესტეროლის გავლენით მნიშვნელოვნად იზრდება მცენარის მიერ აზოტის ასიმილაციის უნარი. პარალელურად ადგილი აქვს

გლუტამატდეჰიდროგენაზული აქტივობის გაძლიერებას და მოცემულ პირობებში რეაქცია უპირატესად გლუტამატის ჟანგვითი დეჰამინირებისაკენ არის გადახრილი. აღნიშნული ამინომჟავადან ჟანგვისა და ამინირების პროდუქტთა წარმოქმნა დადასტურებულ იქნა მასსპექტროფოტომეტრულად $K^{15}NO_3$ -ის გამოყენებით. მიუხედავად იმისა, რომ ქოლესტეროლი შესაძენვედ თრგუნავს (~20%-ით) გლუკოზონ-ფოსფატდეჰიდროგენაზის აქტივობას, პენტოზურ ციკლსა და ქოლესტეროლის ჟანგვით პროცესს შორის NADPH-ისათვის კონკურენცია არ გამოვლინდა, ე.ი. ქოლესტეროლის ჰიდროქსილირებისას პენტოზურ ციკლში აღდგენილი NADPH არ გამოიყენება. ყოველივე ზემოთქმული სრულ საფუძველს გვაძლევს დავასკვნათ, რომ ქოლესტეროლით აღძრული დადებითი ეფექტები (მეტაბოლური გზების გაძლიერება, მემბრანათა აქტიურ ფუნქციონირებისათვის მისი თანამყოფობის აუცილებლობა და ა.შ.) აბსოლუტურად გამორიცხავენ მისი ჟანგვის პროცესის დეტოქსიკაციასთან გაიგივებას.

1.2.5.2 მიტოქონდრიული მემბრანის სტეროლმაჰიდროქსილირებული მონოოქსიგენაზა

სტეროლთა ჰიდროქსილირება პროცესია, რომელიც ციტოქრომ P450-შემცველი მონოოქსიგენაზებით კატალიზდება. მის ცალკეულ რეაქციებს მიეკუთვნებიან ქოლესტეროლის გვერდითი ალიფატური ჯაჭვის მოხლეჩა პრეგნელონონის წარმოქმნით და შემდგომი 11 β -, 17-, 18- ან 21 β -ჰიდროქსილირება. აღნიშნული რეაქციები თირკმელზედა ჯირკვლის ქერქოვანი ნაწილის მიტოქონდრიულ და მიკროსომულ მემბრანებში ზორციელდება. რეაქციათა მეორე ჯგუფი ქოლესტეროლიდან ნაღვლის მჟავების ბიოსინთეზს ემსახურება. იგი სტეროლის 7 α -მდგომარეობაში ჰიდროქსილირებით ლიმიტირდება და ლეიძლის მიკროსომების ფუნქციაა. ქოლესტეროლიდან კორტიკოსტეროლების ბიოსინთეზშიც აუცილებლად მონაწილეობს ციტოქრომ P450, რომლის 80% მიტოქონდრიაში იმყოფება.

მიტოქონდრიისა და მიკროსომების სტეროლმაჰიდროქსილირებული სისტემები შემადგენლობით არსებითად განსხვავდებიან ერთმანეთისაგან. პირველი შედგება არაკემური ცილის – ადრენოლქსინის კლასტერული სისტემისაგან. იგი აკატალიზებს ქოლესტეროლის ალიფატური ფრაგმენტის მოცილებას და 11 β -ჰიდროქსილირებას, მაშინ როდესაც მიკროსომული ელექტრონთა სატრანსპორტო სისტემა ასეთ კლასტერს საერთოდ

არ შეიცავს.

მიტოქონდრიული მემბრანის მაჰიდროქსილირებელი სისტემა შედგება NADPH-ადრენოლოქსინრედუქტაზისა (EC 1.6.7.1) და ადრენოლოქსინისაგან. სუბსტრატულ სპეციფიკურობაზე პასუხისმგებელია სისტემის მესამე კომპონენტი – ციტოქრომ P450.

ადრენოლოქსინები შემდეგ გარემოებათა გამო არიან საყურადღებო:

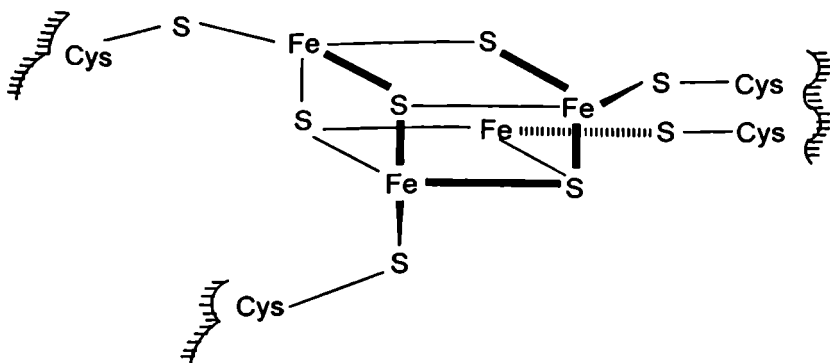
1. ისინი თითქმის ყველა სასიცოცხლოდ მნიშვნელოვან ჟანგვა-აღდგენით პროცესებში მონაწილეობენ, ახორციელებენ რა ელექტრონთა გადატანას ფოტოსინთეზში, მიტოქონდრიულ სუნთქვასა და აზოტფიქსაციაში;
2. მათ შეუძლიათ ერთი, ან ზოგიერთ შემთხვევაში ორი ისეთი ელექტრონის გადაცემა, რომელთა ენერგია $H_2/2H^+$ -წყვილის რედოქს-პოტენციალს უახლოვდება;
3. ჰემოპროტეინებისაგან განსხვავებით, რომლებშიც კომპლექსწარმოქმნა პორფირინის უკვე ჩამოყალიბებულ ხისტ დაჯგუფებებთან ხდება, ადრენოლოქსინების ქიმიური შენება საშუალებას იძლევა შეიქმნას ლიგანდების აუცილებელი, უფრო პლასტიკური სივრცობრივი წყობა.

რას წარმოადგენენ ადრენოლოქსინი და მისი რედუქტაზა?

უჯრედში არსებობს დაბალმოლეკულური (~6–14 kDa) ცილები, რომლებშიც რკინის ატომები დაკავშირებულია არა პორფირინის ბირთვთან, არამედ გოგირდშემცველ ლიგანდებთან. მათ რკინა-გოგირდპროტეინებს უწოდებენ. ასეთი ცილების შემადგენლობაში გოგირდშემცველი კომპლექსწარმოქმნელი ორი ტიპის ჯგუფი შეიძლება შედიოდეს: პირველს – ცისტეინის სულფჰიდრილური ჯგუფები, ზოლო მეორეს – ე.წ. „ლაბილური გოგირდი“ მიეკუთვნება. ამ ფორმის გოგირდი იმით ხასიათდება, რომ ცილის ხსნარის შემთავებისას H_2S -ის, HS^- -ის ან S^{2-} -ის სახით გამოიყოფა. უფრო რთულ ცილას, რომელიც ფლავინთან რკინისა და გოგირდის შეთანაწყობას შეიცავს, სუქცინატდეჰიდროგენაზა წარმოადგენს.

უმარტივესი რკინა-გოგირდშემცველი ცილები რკინის ერთიდან რვაამდე ატომს შეიცავენ, რომლებიც ერთმანეთს პოლიპეპტიდური ჯაჭვების ცისტეინის ნაშთებით უკავშირდება. როგორც ირკვევა, ამ ნაშთების სივრცობრივი განლაგება თითოეული ასეთი ცილის ტიპისათვის განმსაზღვრელ მნიშვნელობას იძენს. ცილის მოლეკულა თუ რკინის ორ ან მეტ ატომს შეიცავს, ის თავისებურ „გალიისმაგვარ“ კლასტერს წარმოქმნის, რომლის შემადგენლობაშიც „ლაბილური გოგირდი“ (შესაძლოა სულფიდის სახით) და ცისტეინის ნაშთი (შესაძლოა თიოლატის სახით) შედის (ნახ. 11).

ასეთ მრავალბირთვიან კლასტერს შეუძლია მიიღოს ან გასცეს ერთი



ნახ. 11. ადრენოლოქსინის სავარაუდო აქტიური ცენტრი. დაჯგუფება, რომელიც „გალის“ წაგავს (Cys – ცისტეინის ნაშთი).

ელექტრონი. გოგირდი, როგორც ლიგანდი, Fe(II)-ის უმდგრადობას განაპირობებს, რითაც შეიძლება აიხსნას მეტაბოლურ პროცესებში ამ ცილების ძლიერი აღმდგენელი უნარი. Fe^{2+} და Fe^{3+} იონებს შორის ერთელექტრონიან გადასვლაში „გალის“ მსგავსი დაჯგუფების ბიოქიმიური ფუნქცია ელექტრონთა გადატანაში უფრო მდგომარეობს, ვიდრე ამა თუ იმ გარდაქმნის კატალიზებაში.

ადრენოლოქსინის სახელწოდება გამოსახავს იმ ფაქტს, რომ იგი პირველად გამოყოფილ იქნა თირკმელზედა ჯირკვლის ქერქიდან (adrenal cortex). რვა ატომი რკინისა და რვა ატომი „ლაბილური გოგირდის“ შემცველი ცილის აღსანიშნავად „ადრენოლოქსინის“ სინონიმად გამოიყენება „ფერედოქსინი“ (Fer – რკინა, redoxin – ელექტრონის გადამტანი ცილა). ტაგავამ და არნონმა ეს ტერმინი გაავრცელეს ორ-ორი ატომი რკინისა და „ლაბილური გოგირდის“ შემცველ ცილაზეც, რომელიც ქლოროპლასტებიდან გამოყვეს და ადრე „მეტჰემოგლობინის აღმდგენელ ფაქტორად“ ან „ფოტოსინთეზურ პირიდიინ-უკლეოტიდ-რედუქტაზად“ იწოდებოდა. ამჟამად რეკომენდირებულია, რომ მათ „რკინაგოგირდშემცველი“ ცილების სახელწოდება მიეკუთვნოთ. ამის გარდა, გამოიყენება აღნიშვნაც, კერძოდ, $n\text{-Fe-S}^*$ -ცილები, სადაც ვარსკვლავი „ლაბილური გოგირდის“ აღმნიშვნელია, ხოლო n – მისი ატომების რაოდენობას გვიჩვენებს, რომელიც ჩვეულებრივ, რკინის ატომთა რიცხვის ტოლია; მაგ., რუბრედოქსინი აღინიშნება, როგორც 1-Fe-S^* -ცილა, ისპანახიდან გამოყოფილი ფერედოქსინი –

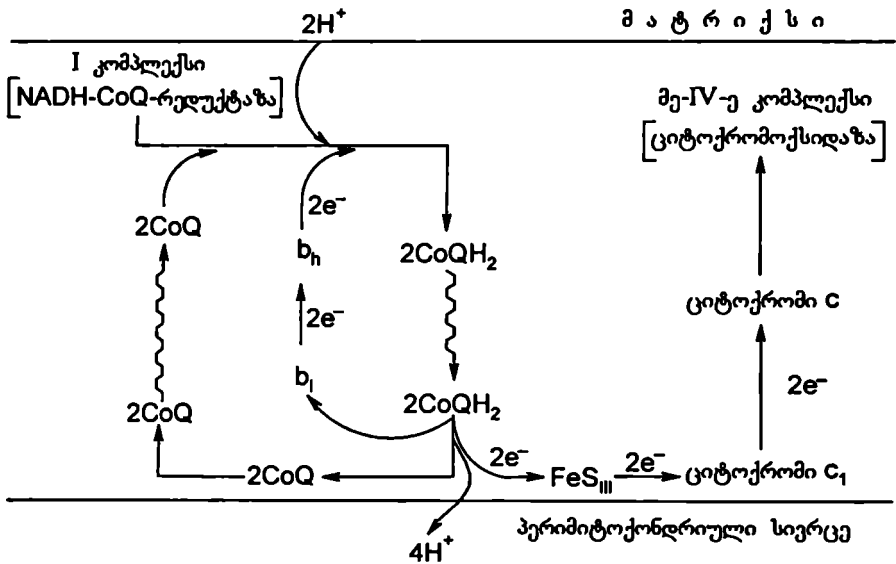
2-Fe-S*-ცილა და ა.შ.

2-Fe-S* ადრენოლოქსინი და ტესტოდოქსინი გამოყოფილია შესაბამისად თირკმელზედა ჯირკვლიდან და სათესლეებიდან. მათი ფუნქცია იმ ფერმენტ-ოქსიგენაზების ელექტრონებით უზრუნველყოფაა, რომლებიც სტეროლური ჰორმონების სინთეზისას ქოლესტეროლის ჰიდროქსილირებას ან ნახშირწყალბადოვანი გვერდითი ჯაჭვის მოცილებას აკატალიზებენ. ამ ტიპის ცილებს შეიცავს ზოგიერთი აზოტმაფიქსირებელი ბაქტერია. თუმცა ჯერჯერობით დაუდგენელია, მონაწილეობენ თუ არა ეს ცილები უშუალოდ აზოტფიქსაციის პროცესში.

მცენარეული ტიპის ფერედოქსინი სუქცინილური წარმოებულის სახით გამოყოფილია სუნთქვითი ჯაჭვის bc_1 -კომპლექსიდან, რომელიც მიტოქონდრიული ელექტრონთა სატრანსპორტო გზის ცენტრალური უბანია. ამასთან დაკავშირებით საჭიროდ ვთვლით ზოგადად წარმოვადგინოთ ამ კომპლექსის (მიტოქონდრიული სუნთქვითი ჯაჭვის III კომპლექსის ანუ bc_1 -კომპლექსის, ანუ Q-ციკლის) აღნაგობა (ნახ. 12). პირველი კომპლექსით ($\text{NADH-CoQ-რედუქტაზით}$) აღდგენილი CoQH_2 შემდგომ III კომპლექსით იჟანგება. იგი მოიცავს რკინა-გოგირდოვან Fe-S-კლასტერს (ბიოენერგეტიკაში იხმარება FeS_{III} – აღნიშვნა, სადაც ინდექსი კომპლექსის მაჩვენებელია) და ციტოქრომ b-სთან დაკავშირებულ ორ – მაღალპოტენციურ (b_L -ს) და დაბალპოტენციურ (b_H -ს) ჰემს. CoQH_2 -ისთვის ელექტრონის უშუალო აქცეპტორს FeS_{III} კლასტერი წარმოადგენს. აქედან ელექტრონები ჯერ ციტოქრომ c_1 -ზე, ხოლო შემდგომ ციტოქრომ c-ზე ხვდება.

FeS_{III} -ცილა (სხვა სახელწოდებები: სლეიტერის ფაქტორი, რისკეს ცილა, ბრიტანული ანტილუიზიტის – BAL-ის მიმართ მგრძნობიარე ფაქტორი) ერთ კლასტერს შეიცავს. იგი აგებულია რკინისა და სულფიდის (S^{2-}) ორ-ორი იონისა და ცისტეინის ოთხი ნაშთისაგან. Q-ციკლის მოქმედებისათვის უპირველესი მოთხოვნა სტაბილური ფორმის სემიქინონური ანიონის (CoQ^-) თანამყოფობაა, რომელიც FeS_{III} -ზე წარმოიქმნება და შემდგომ b_L -ის ჰემით იჟანგება.

როგორც დადგინდა, მიტოქონდრიული ციტოქრომ b-ს აღდგენის ბლოკირებისათვის საჭიროა ორი ინჰიბიტორის – BAL-ისა და ანტიმიცინ A-ს ერთდროული ზემოქმედება. ეს შედეგი ციტოქრომ b-ზე ელექტრონთა გადატანის ორი გზის არსებობაზე მიუთითებს. პირველი, რომელიც ანტიმიცინით ითრგუნება, CoQ-სა და ციტოქრომ b-ს ჰემს მოიცავს; ეს გზა მატრიქსისაკენ მიქცეული მემბრანის მაზლობლად იმყოფება. მეორე



ნახ. 12. სუნთქვითი ჯაჭვის III კომპლექსის ზოგადი წყობა (განმარტება იხ. ტექსტში).

გზა სადღაც მემბრანის შუაშია, b_L -ს ჰემთან მიდის და FeS_{III} -ს საჭიროებს. ეს გზა მგრძნობიარეა BAL-ის მიმართ. ჟანგბადის თანამყოფობისას ეს ინჰიბიტორი FeS_{III} -კლასტერს შლის. b_C -კომპლექსზე მაინჰიბირებელ მოქმედებას ავლენს Zn^{2+} ($10^{-6} M$). ვარაუდობენ, რომ დათრგუნვის ეფექტი FeS_{III} -ზე (ანუ b და c_1 ციტოქრომებს შორის მყოფ უბანზე) ამ მეტალის ზემოქმედების შედეგია. როგორც ჩანს, Zn^{2+} აძევებს რკინას არაჰემური რკინაპროტეინის აქტიური ცენტრიდან და რადგან მას რკინის იონივით მუხტის შეცვლა არ შეუძლია, ჟანგვა-აღდგენა და შესაბამისად, ელექტრონთა გადატანაც წყდება.

CoQ-ციტოქრომ c-რედუქტაზულ სისტემაში მყოფ ელექტრონთა გადამტანების რედოქს-პოტენციალები შესაბამისობაშია Q-ციკლის ფუნქციონირებასთან. b_L -ისა და b_H -ის ჰემებისათვის ისინი შესაბამისად $-0.04 V$ -ისა და $+0.04 V$ -ის ტოლია; FeS_{III} -კლასტერისათვის იგი $+0.28 V$ -ს, ხოლო c_1 და c ციტოქრომებისათვის $+0.22 V$ -სა და $+0.25 V$ -ს შეადგენს.

მუხტის ტრანსმემბრანული გადატანა, რომელიც b_C კომპლექსით კატალიზდება, შედგება b_L -ის ჰემიდან b_H -ის ჰემზე ელექტრონების გადატანისა

და FeS_{11} -ის მიერ CoQH_2 -ის ჟანგვისას გამოთავისუფლებული პროტონების გადატანისაგან. მნიშვნელოვანია, რომ b_h -ის ჰემის რედოქს-პოტენციალი b_l -ის ჰემთან შედარებით დადებითია, რის გამოც b_l -იდან b_h -ზე ელექტრონის გადატანა ენერგიის გენერაციით ხასიათდება.

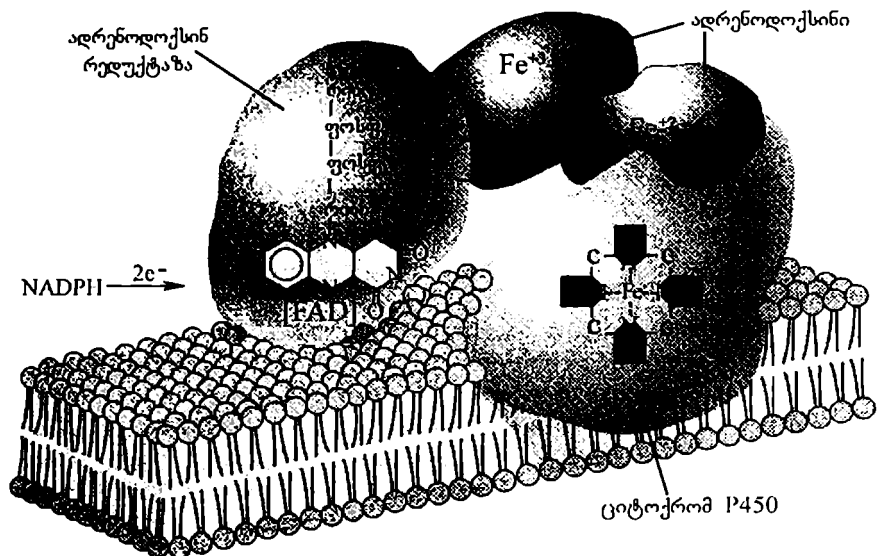
მიტოქონდრიის შიდა მემბრანაზე ფუნქციონირებს განსაკუთრებული რედოქს-ჯაჭვი, რომელიც ციტოქრომ P450-ის აღდგენას იწვევს. იგი შიდამიტოქონდრიულ NADPH-ს ჟანგავს FAD-შემცველი NADPH-ადრენოლოქსინრედუქტაზით. ეს უკანასკნელი აღადგენს ადრენოლოქსინს, რომელიც თავის მხრივ ციტოქრომ P450-ის ელექტრონული დონორია. ჟანგვის ეს სისტემა არაა შეუღლებული $\Delta\mu\text{H}^+$ -ის (მემბრანული პოტენციალის) გენერაციასთან და ამდენად, იგი თავისუფალი ჟანგვის არადამფოსფორებელი სისტემაა.

ქოლესტეროლის 11β -ჰიდროქსილირებაში და გვერდითი ჯაჭვის მოცილებაში ორი განსხვავებული ციტოქრომ P450 მონაწილეობს. მიუხედავად ამისა, ორივე ციტოქრომში ელექტრონებს ადრენოლოქსინიდან იღებს. ორივე ციტოქრომში მიტოქონდრიის მემბრანადაკავშირებული ინტეგრალური ფერმენტი. მათი გამოყოფისათვის ულტრაბგერა ან ლეტერგენტია საჭირო. ორივე ციტოქრომ P450 მსგავსი ფიზიკურ-ქიმიური თვისებებით ხასიათდება, თუმცა P450_{11β} უფრო ჰიდროფობულია. მცირედ განსხვავდება მათი მოლეკულური მასებიც (43 და 50 kDa).

ადრენოლოქსინი და მისი რედუქტაზა ინტაქტური მიტოქონდრიიდან აღვილად ირეცხება. ეს რედუქტაზა ხსნადი ფერმენტი. მის შემადგენლობაში ნაპოვნი არაა მემბრანასთან ასოცირებისათვის აუცილებელი ჰიდროფობული სეგმენტი. ამიტომ თვლიან, რომ იგი ფუნქციონირებს, როგორც მემბრანასთან იონური ურთიერთქმედებით დაკავშირებული პერიფერიული ცილა (ნახ. 13).

NADPH-ადრენოლოქსინრედუქტაზას, ადრენოლოქსინის გარდა, მხოლოდ ერთელექტრონიანი (ფერიცინილის) და ორელექტრონიანი (დიქლორფენოლინდოფენოლის) აქცეპტორების აღდგენის უნარი აქვს. ეს რედუქტაზა ადრენოლოქსინთან მტკიცე კომპლექსს (1 : 1 თანაფარდობით) ქმნის, რომელსაც დისოციაციის მაღალი კონსტანტა გააჩნია. ამ დროს რედუქტაზის ჟანგვა-აღდგენითი პოტენციალი არ იცვლება, თუმცა არსებით ცვლილებებს განიცდის მისი სტაბილურობა და ენზიმური აქტივობა.

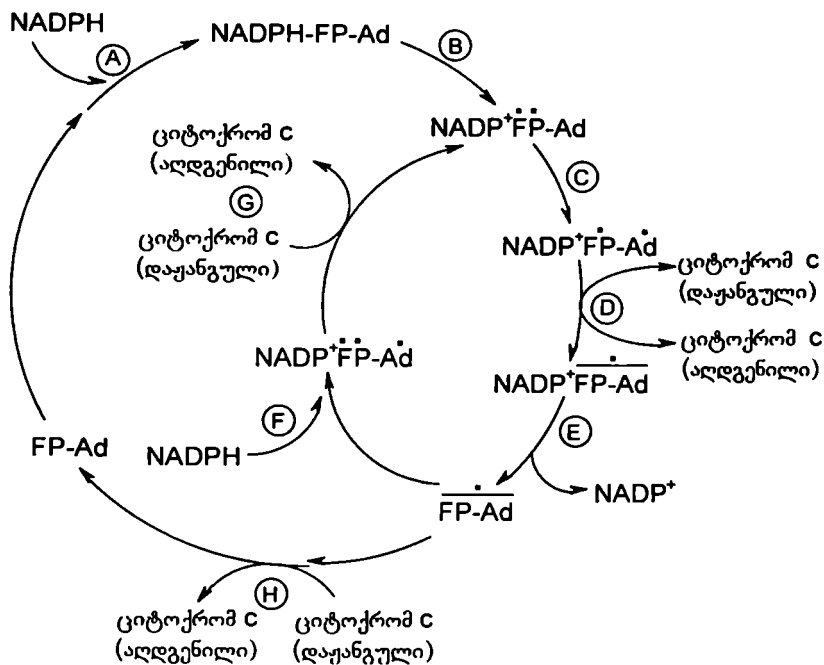
სადღეისოდ კვლავაც სადისკუსიო საგნად რჩება მიტოქონდრიული სტეროლჰიდროქსილაზური სისტემის ფუნქციური ორგანიზაციის საკითხი. ამ სისტემას ადარებენ ციტოქრომ c-ს NADPH-დამოკიდებულ აღმდ-



ნახ. 13. მიტოქონდრიული მემბრანის ციტოქრომ P450-შემცველი სისტემის კომპონენტები. ციტოქრომ P450 მიტოქონდრიული მემბრანის ინტეგრალური ცილაა. NADPH-ადრენოლოქსინრედუქტაზა და ადრენოლოქსინი პერიფერიული ცილებია; ისინი არაა მემბრანაში „ჩამონტაჟებული“

გენ სისტემას, რომელიც ადრენოლოქსინრედუქტაზისა და ადრენოლოქსინის აუცილებელ თანამყოფობას მოითხოვს. ციტოქრომ c-ს კატალიზური აღდგენის ციკლი მოცემულია მე-14 ნახაზზე.

საწყის სტადიაზე ორი დაფანგული ცილის მტკიცე კომპლექსი (FP-Ad) რეაგირებს NADPH-თან. წარმოქმნილ სამმაგ კომპლექსში გადატანილი ელექტრონული წყვილი რედუქტაზის ფლავინურ დაჯგუფებაზეა ლოკალიზებული (რეაქციები A და B). C-სტადიაზე ხდება ფლავინიდან ერთი ელექტრონის გადატანა ადრენოლოქსინის FeS -კლასტერზე, რომელსაც მხოლოდ ერთი ელექტრონის აქცეპტირება შეუძლია. აღდგენილი ადრენოლოქსინი სწრაფად რეაგირებს ციტოქრომ c-სთან და საბოლოო ჯამში FP-სა და Ad-ს ექვიმოლარული კონცენტრაციები NADPH-ის თანამყოფობისას აღადგენენ მას. F-სტადიაზე წარმოიქმნება სამი ელექტრონით აღდგენილი სამმაგი კომპლექსი, რომელიც G-სტადიაზე ასევე ადვილად აღადგენს ციტოქრომ c-ს. ერთელექტრონიან $[\text{FP-Ad}]^{\bullet}$ -ის კომპლექსს



ნახ. 14. ადრენოლოქსინრედუქტაზა-ადრენოლოქსინის კომპლექსით ციტოქრომ-
c-ს NADPH-დამოკიდებული კატალიზური ალდგენის ციკლი. FP –
ადრენოლოქსინრედუქტაზა, Ad – ადრენოლოქსინი (განმარტება იხ. ტექ-
სტში).

ასევე ციტოქრომ c-ს მესამე მოლეკულის ალდგენის უნარიც აქვს (H-
სტადია). ამგვარად, NADPH-დამოკიდებული ციტოქრომ c-ს ალდგენაში
მონაწილეობენ 1 და 3 ელექტრონით ალდგენილი კომპლექსები. პროცესი
ციკლური ბუნებისაა.

მიჩნეულია, რომ მიტოქონდრებში ზუსტად ასეთივე მექანიზმით ზორ-
ციელდება ციტოქრომ P450-ის ალდგენაც. ამის დადასტურებაა ჰემოპრო-
ტეინის ადრენოლოქსინთან კომპლექსწარმოქმნის უნარი, იმ შემთხვევაშიც
კი, როდესაც ქოლესტეროლი არ იყანება. სამაგი კომპლექსი FP-Ad-P450
მნიშვნელოვან როლს უნდა ასრულებდეს მიტოქონდრიულ ჰიდროქსილ-
ირებაში.

ზოგიერთი მკვლევარი უარყოფს მიტოქონდრიის ელექტრონთა სა-

ტრანსპორტო სისტემაში სამმაგი კომპლექსის როლს და თვლის, რომ ადრენოლოქსინი წარმოადგენს ადვილად ძერად გადამტანს რედუქტაზასა და ციტოქრომ P450-ს შორის აღმოჩნდა, რომ ადრენოლოქსინსა, P450-სა და ქოლესტეროლს შორის კომპლექსის წარმოქმნა შემთხვევითია და მას რეგულარული ხასიათი არ გააჩნია. ადრენოლოქსინის ურთიერთქმედება ციტოქრომ P450-თან სუბსტრატის თანამყოფობისაგან თითქმის დამოუკიდებელი აღმოჩნდა. რეკონსტრუირებულ სისტემაში მაქსიმალური აქტივობა მიიღწევა Ad:P450-ის 1 : 1 ფარდობაზე უფრო მაღალი მნიშვნელობებისას, ანუ სისტემის მაღალ ბრუნთა რიცხვის მისაღწევად აუცილებელია Ad-ის სიჭარბე, რაც ეწინააღმდეგება 1 : 1 ფარდობის მქონე სამმაგი კომპლექსის ფუნქციურ როლს.

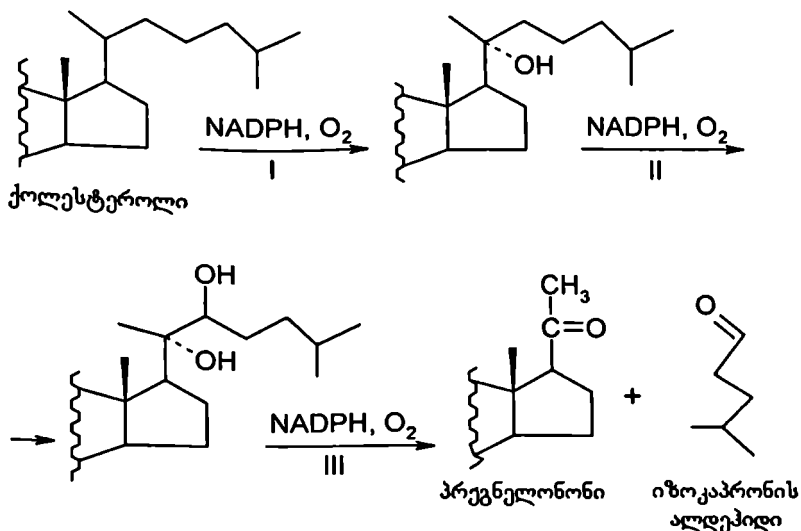
არსებობს მონაცემები იმის შესახებაც, რომ მტკიცედ დაკავშირებული სამმაგი კომპლექსის არსებობა შეუძლებელია, როდესაც სამივე კომპონენტი (FP-Ad-P450) დაჟანგულ მდგომარეობაშია; უფრო მეტიც, მთელ რიგ შემთხვევებში FP-AD-ის კომპლექსი ციტოქრომ P450-ს პრაქტიკულად არ იკავშირებს. როგორც ჩანს, კომპლექსირება მთელ რიგ ფაქტორებზეა დამოკიდებული, რომელთაგან მნიშვნელოვანია სისტემის რეკონსტრუირების წესი, pH, ხსნარის იონური ძალა, ქოლესტეროლის თანამყოფობა და სხვ.

ქოლესტეროლის შეტანისას ისეთ ფოსფოლიპიდურ ვეზიკულებში, რომლებიც დიმირიტოილფოსფატიდილქოლინისაგან არიან წარმოქმნილი, დაბალი იონური ძალის პირობებში სამმაგი კომპლექსი რეალურად არსებობს. ქოლესტეროლის არყოფნისას სამმაგი კომპლექსი კარგავს ციტოქრომ P450-ს და ბინარულ სისტემად (FP-Ad) გარდაიქმნება. მაღალი იონური ძალისას და ქოლესტეროლის არყოფნისას სამივე კომპონენტი დისოცირებულ მდგომარეობაშია.

ჯერჯერობით ზუსტად არაა განსაზღვრული მიტოქონდრიის მემბრანებში სამი ცილის სტექომეტრული თანაფარდობები. არჩევანი იმის შესახებ, მიტოქონდრიებში სისტემის როგორ ურთიერთქმედებებს მიენიჭოს უპირატესობა, სათანადო მეთოდის უქონლობის გამო გაძნელებულია.

სტეროლპიდროქსილაზური სისტემის მოქმედების მექანიზმში ერთ-ერთ ცენტრალურ საკითხს ქოლესტეროლის გვერდითი ალიფატური ფრაგმენტის მოცილების პროცესი წარმოადგენს. ამ დროს პრეგნელონონის გარდა, იზოკაპრონის ალდეჰიდიც წარმოიქმნება (ნახ. 15).

ციტოქრომ P450-ის კატალიზურ აქტივობას, რომელიც ამ რეაქციას ახორციელებს, დესმოლაზურ აქტივობასაც უწოდებენ. პროცესი მინიმუმ სამი თანმიმდევრული სტადიისაგან შედგება: პირველად ხდება ქოლეს-



ნახ. 15. ქოლესტეროლის (ნახაზზე ჩანს მხოლოდ მისი D-ბირთვი და გვერდითი ჯაჭვი) ჰიდროქსილირება ალიფატური ჯაჭვის მოცილებით.

ტეროლის ჰიდროქსილირება C-20, ხოლო შემდეგ C-22 მდგომარეობაში და შუალედურ პროდუქტად დიოქსიქოლესტეროლი წარმოიქმნება. მიღებულ დიოლს C-22 მდგომარეობის C-H ბმას კიდევ ერთხელ „უტევენ“ გააქტიურებული ჟანგბადი და მასში ინერგება. ამის შედეგად გვერდითი ჯაჭვი იზოკაპრონის ალდეჰიდის სახით სცილდება. ასეთი სქემა სარწმუნოა, რამდენადაც დაცულია სტექიომეტრია: ერთი მოლეკულა პრეგნენოლის წარმოქმნაზე იხარჯება სამი მოლეკულა NADPH, სამი მოლეკულა O_2 და სამი H^+ -იონი; ე.ი. თანმიმდევრულად ხორციელდება სამი მონოოქსიგენაზური რეაქციის აქტი. აღმოჩნდა, რომ სამივე რეაქციას ციტოქრომ P450-ის ერთი და იგივე ფორმა აკატალიზებს.

მცენარეში ქოლესტეროლის ციკლური კომპონენტის ჟანგვის შესასწავლად ჩატარებული კვლევის საფუძველზე ღერმიშიძისა და ბერიაშვილის მიერ ჩამოყალიბებულია გარდაქმნათა შემდეგი თანმიმდევრობა: A-ბირთვის დეჰიდრირება (არომატიზაცია), ჰიდროქსილირება მეოთხე მდგომარეობაში, B-ბირთვის დაშლა და სეკო-ნაერთის წარმოქმნა, კარბოქსილში მეოთხე ნახშირბადის დაჟანგვა C_6 -ფრაგმენტად (პიროკატეჟინად), A-ბირთვის მოცილება და კეტომჟავას წარმოქმნა.

ჩვენს ლაბორატორიაში ჩატარებული გამოკვლევების შედეგად შემოთავაზებულია გარდაქმნათა შედარებით მარტივი სქემა: 1) NADPH და O_2 -დამოკიდებული ჰიდროქსილირება მეშვიდე მდგომარეობაში; 2) ორმაგი კავშირის გადანაცვლება 4–5-მდგომარეობაში და მესამე ჰიდროქსილის დაჟანგვა; 3) მეორე სტადიაზე მიღებული პროდუქტის შემდგომი დაჟანგვა შესაბამისი კარბონმჟავასა და CO_2 -ის წარმოქმნით.

ცხადია, ქოლესტეროლის გარდაქმნათა შესაძლო გზების დაზუსტება მომავალ კვლევებს მოითხოვს.

1.3 ქსენობიოტიკთა შემბრანული ტრანსფორმაცია და კონიუგაცია

1.3.1 ქსენობიოტიკთა შეთვისება ორგანიზმის მიერ და მათი შემბრანული ტრანსპორტი

ჰაერში, წყალში ან ნიადაგში არსებული მდგრადი ქიმიური ნაერთები ეკოლოგიური რგოლებით ერთი ჯაჭვიდან მეორეში ხვდება და საბოლოოდ მცენარის ან ადამიანის ორგანიზმში იყრის თავს. მათი განსხვავებული კონცენტრაციებით ზემოქმედება არაერთგვაროვან ეფექტებს იწვევს. ამის მიხედვით არჩევენ:

- ქსენობიოტიკის მინიმალურად მოქმედ, ანუ ზღერულ კონცენტრაციას. იგი ნიშნავს მის უმცირეს რაოდენობას, რომელიც ცხოველმყოფელობის შესაძრწევ, მაგრამ შექცევად ცვლილებებს იწვევს;
- ქსენობიოტიკის შედარებით დიდ დოზას, რომელიც მკვეთრად გამოხატული მოწამელით (ორგანიზმში პათოლოგიური ძვრებით) ხასიათდება;
- ქსენობიოტიკის ლეტალური კონცენტრაცია, რომელიც მკურნალობის გარეშე ორგანიზმის დაღუპვით მთავრდება.

გასათვალისწინებელია ორი გარემოება: ორგანიზმში ტოქსიკური ქსენობიოტიკის გარდაქმნების შედეგად, მთელ რიგ შემთხვევებში ნაკლებად ტოქსიკური ნივთიერებები წარმოიქმნებიან. მაშასადამე, ამ დროს ადგილი აქვს მისი მოქმედების ეფექტურობის დაქვეითებას. მეორე მხრივ, ცნობილია არაერთი შემთხვევა, როდესაც ქსენობიოტიკის ტოქსიკურობა მისი მოლეკულის სტრუქტურის შეცვლის გამო, პირიქით, ძლიერდება. შხამის გარკვეული რაოდენობა შეიძლება ორგანიზმიდან გამოიყოს, ან უჯრედში ცილებსა და ენდოგენურ ნაერთებს დაუკავშირდეს და ქსოვილებში დაფიქსირდეს. წარმოქმნილი „შხამი-ცილის“ ან სხვა ნაერთთან კომპლექსის სიმტკიცეზეა შემდგომ დამოკიდებული ტოქსიკანტის მოქ-

მედების გაძლიერება-შესუსტება.

ცხოველი. ქსენობიოტიკები ორგანიზმში, უპირველეს ყოვლისა, კანიდან ინტენსიურად შეიღწევიან. კანის ეპიდერმისი ლიპოპროტეინული ბარიერია, რომელშიც სწრაფად გადაიან მხოლოდ ცხიმში ხსნადი ქსენობიოტიკები. დერმა, რომელიც ძლიერ ფოროვანია, ადვილად განვლადია როგორც ცხიმში ხსნადი, ასევე პოლარული ნაერთებისათვის. სხვადასხვა ქლორი-რებული ნივთიერების შეღწევის ხარისხი იცვლება ადამიანის კანის სის-ქის, ვასკულარიზაციის, ასაკის და ქიმიური შედგენილობის მიხედვით. საცდელი ცხოველების კანზე სულ მცირე ოდენობით (1 მლ-მდე) პოლიქლორირებული ბიფენილების (საპოხი და ტრანსფორმატორის ზეთების, მელნების, პესტიციდების და სხვ. დანამატების) დატანისას, შესაძინევად იზრდება ენდოპლაზმური მემბრანის ოქსიდორედუქტაზების აქტივობა და ქვეითდება ზოქსაზოლამინის (კუნთის მოღუნების პრეპარატის) ან პექსო-ბარბიტალის ფარმაკოლოგიური მოქმედება. გამოვლენილია ნივთიერებათა მთელი რიგი, რომლებიც კანთან კონტაქტისას აეთვისებიან ზრდას ინიცირ-ებენ. ისეთი პოლიციკლური ნახშირწყალბადი, როგორიც ბენზანტრაცენია, ციტოქრომ P450-ის შემცველი მჟანგველი სისტემის ინდუცირებას ახდენს. ამ ტიპის ნაერთები შეიძლება გამოყენებულ იქნას მოხერხებულ ტესტე-ბად კანცეროგენების ჟანგვაში ამა თუ იმ ქსოვილის განსხვავებული ინდივიდუალური უნარის გამოსავლენად. ქსენობიოტიკთა კანში შეღწევის მნიშვნელოვან როლზე მიუთითებს ის ფაქტი, რომ კეთრის საწინააღმდეგო სამკურნალო საშუალება დიტოფალი (დიეთილდითიოლიზოფტალატი) მხოლოდ კანიდან შეღწევისას არის ეფექტური და სხვა გზებით მიღები-სას მისი მოქმედება არაა დამაკმაყოფილებელია. აღნიშნულიდან გამომდინა-რეობს, რომ ადამიანის მიერ ყოფაცხოვრებაში ყოველდღიურად გამოყენე-ბულ სხვადასხვა ქიმიურ რეაგენტებთან კონტაქტისას დიდი სიფრთხილეა საჭირო, რადგან მათ არცთუ უმნიშვნელო და ხშირად მავნე ბიოლოგიური შედეგების გამოწვევა შეუძლიათ.

ცხიმში ხსნადი მაღალი წნევის მქონე აირები და მათი ორთქლი განსაკუთრებით ინტენსიურად ფილტვებიდან (პარენტერალურად) შეითვისე-ბა. ასეთ ნივთიერებათა შორისაა ანესთეტიკები, აზოტის მონოოქსიდი, ეთერები, ქლორირებული არომატული ნახშირწყალბადები და სხვ. სა-სუნთქი გზების გავლით ზემოქმედებისას ქსენობიოტიკის ტოქსიკურობის ხარისხი (T) ჰაბერის ე.წ. მოდიფიცირებული ფორმულით ფასდება:

$$T = \frac{c \cdot v \cdot t}{g}$$

სადაც: c პერში ქსენობიოტიკის კონცენტრაციაა (მგ/ლ), t – ზემოქმედების დრო (წთ), v – ფილტვების სავენტილაციო მოცულობა (ლ/წთ), g – სხეულის მასა (კგ).

პარენტერალურთან შედარებით ქსენობიოტიკის საკვებთან ერთად მიღებისას მოქმედების ეფექტი უფრო დაბალია, რაც იმის მაჩვენებელია, რომ უცხო ნივთიერების ძირითადი ნაწილი საჭმლის მომნელებელ სისტემაში იშლება. პირის ღრუში იგი ლორწოვანი გარსიდან ღიფუზიის გზით სისხლის მიმოქცევაში ერთვება. ამდენად, ამ სტადიაზე მისი გარდაქმნა არ ხდება და, რაც მთავარია, უცვლელი სახით უშუალოდ ღვიძლში არ ხვდება, როგორც ამას ადგილი აქვს კუჭიდან და ნაწლავებიდან შეწოვისას. მაშასადამე, პირის ღრუდან შეწოვა აყვონებს ქსენობიოტიკის მეტაბოლიზმის დაწყებას და წამლის შემთხვევაში ახანგრძლივებს მის აქტივობას.

კუწის ლორწოვანი გარსი და ნაწლავების ეპითელიუმი ადვილად ატარებენ ქსენობიოტიკის არადისოცირებულ მოლეკულებს მარტივი ღიფუზიის გზით. სუსტი ფუძეებისა და მჟავების შეწოვა მათი დისოციაციის კონსტანტებითა და ცხიმში ხსნადობით ისაზღვრება. მაღალიონიზებული ფუძეები და მჟავები შენელებულად შეიწოვებიან. როგორც ჩანს, ამ დროს უცხო ნივთიერება ნაწლავის ლორწოსთან კომპლექსს წარმოქმნის. ნაწლავის შიგთავსის pH-ის ცვლილება ქსენობიოტიკის იონიზაციის ხარისხს, და შესაბამისად, შეთვისების ინტენსივობასაც ცვლის.

კუჭ-ნაწლავიდან შეწოვაზე მთელი რიგი ფაქტორები მოქმედებენ. მათგან მნიშვნელოვანია:

- საკვების მოძრაობის სიჩქარე. კუჭის დაჩქარებული დაცლა, რის შედეგადაც შეწოვა ამ ორგანოში მცირდება, მაგრამ ნაწლავებში იზრდება;
- გულიდან გამოტყორცნილი და საჭმლის მომნელებელ ორგანოებთან დაკავშირებული სისხლის მოძრაობის სიჩქარე ხელს უწყობს ქსენობიოტიკის შეწოვის სიჩქარის გაზრდას;
- კუჭ-ნაწლავის სეკრეციამ შეიძლება შეცვალოს pH და ამ გზით გამოიწვიოს უცხო ნივთიერების იონიზაციის ხარისხისა და შესაბამისად, მისი შეწოვის ცვლილებაც;
- სხვა ნივთიერებების თანამყოფობა. მეტაბოლიზმით იონებმა შეიძლება ქსენობიოტიკის მოლეკულასთან უხსნადი ხელატური კომპლექსები წარმოქმნან და დაქვეითონ შეთვისება;
- უცხო ნივთიერების ნაწილაკთა ზომები მოქმედებენ გახსნის ხარისხზე და ამდენად შეწოვაზეც, რადგან გადატანა მხოლოდ ხსნარიდან ხდება. ორგანიზმში მოხვედრილი ქსენობიოტიკები მრავალფეროვან ბიოქიმი-

ურ გარდაქმნებს განიცდიან. მათი საერთო სახელწოდებაა ბიოტრანსფორმაცია და ამ პროცესში განუზომელია ლეიძლის როლი. ორგანობიდან ზომით იგი ყველაზე დიდია და მოზრდილ ადამიანში მისი წონა 1.2 კგ-ს უტოლდება. მისი ფუნქციები უაღრესად მრავალმხრივია. იგი მიმღებ და გამანაწილებელ პუნქტს წარმოადგენს საკვების მომწოდებელი სისტემიდან შეღწეული თითქმის ყველა ნივთიერებისათვის. მთლიანი სისხლი, რომელიც საკვების გარდაქმნის პროდუქტებითა და სხვა ნივთიერებებითაა მდიდარი, ფართო კარის ვენით ლეიძლში ჩაედინება. ეს ვენა ვიწრო არხებად იტოტება, რომელთა საშუალებითაც სისხლი ნელა გარშემოედინება ლეიძლის უჯრედებს. აქ ენდოგენური და უცხო ნივთიერებები სისხლიდან ქსოვილში გადადიან, გარდაქმნებს განიცდიან, ხოლო ზოგიერთ შემთხვევაში გროვდებიან და შემდეგ კვლავ ბრუნდებიან სისხლის საერთო მიმოქცევაში. მეტად საყურადღებოა ერთი გარემოება: საკვებ ნივთიერებებთან ერთად ქსენობიოტიკებიც არასრულად გარდაიქმნებიან ლეიძლში სისხლის პირველივე გავლაზე. ამას ეფუძნება სამკურნალო ნივთიერებათა გამოყენება. ისინი ორგანიზმს ისეთი დოზებით მიეწოდება, რომ მათმა საკმარისმა რაოდენობამ ლეიძლი უცვლელად გაიაროს და დანიშნულების ადგილს მიაღწიოს. დაავადების ჩამთავრების შემდეგ დარჩენილი პრეპარატი, რომელიც უკვე ტოქსიკური ქსენობიოტიკია, ლეიძლში მრავალჯერადი მოხვედრის შემდეგ განიცდის გარდაქმნებს.

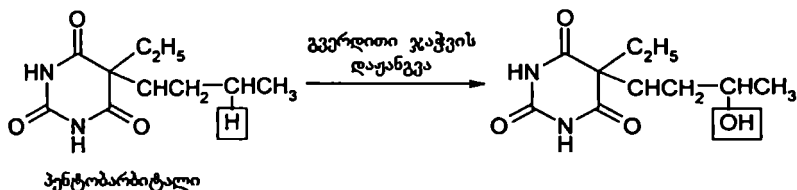
სამკურნალო ნივთიერებებისა და სხვა ქსენობიოტიკების ბიოქიმიურ გარდაქმნებში მონაწილეობენ ლეიძლში არსებული მეტად მგრძნობიარე ფერმენტული სისტემები, რომლებიც ენდოპლაზმურ მემბრანებშია ლოკალიზებული. მათ საჭმლის მომწოდებელი ტრაქტიდან, აგრეთვე კანიდან და ფილტვებიდან ლეიძლში მოხვედრილ ქსენობიოტიკებზე ზემოქმედების უნარი აქვთ. ლეიძლში ქსენობიოტიკთა გარდაქმნის პროცესი რეაქციათა მეტად განსაზღვრულ რამდენიმე ტიპს მოიცავს. ესენია ჟანგვა, აღდგენა, ჰიდროლიზი და დაკავშირება (კონიუგაცია). ამ რეაქციათა არსი მოლეკულის ლიპოფილობის დაძლევისა და ჰიდროფილურობის გაზრდაში მდგომარეობს, რის შედეგადაც წყალში ხსნადი ნაერთები შემდგომ სისხლიდან ადვილად გადადიან თირკმელებში და ორგანიზმს ტოვებენ.

გარდაქმნათა უმეტესობა ხშირ შემთხვევაში ჟანგვასთანაა დაკავშირებული. ეს იმით შეიძლება აიხსნას, რომ ნებისმიერი რთული ნივთიერება მრავალი განსხვავებული გზით იჟანგება. მაგ., ბარბიტურატებისა და ზოგიერთი მედიკამენტის ალკილური ჯგუფები სპირტებად იჟანგება; არომატული ბირთვის მქონე ნაერთები, როგორებიც ბენზოლის ჰომოლოგები,

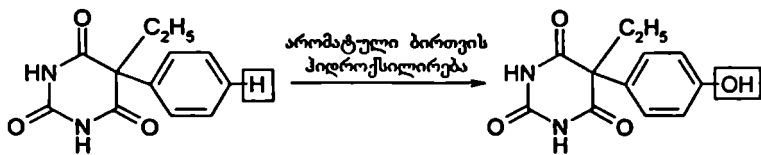
პოლიციკლური ნახშირწყალბადები და მრავალი სამკურნალო პრეპარატი, ბირთვში ჰიდროქსილირებას განიცდიან. სხვა შემთხვევებში ზდება აზოტის ან ჟანგბადის ატომებიდან ალკილური ჯგუფების ჩამოცილება (დეალკილირება), ამინოჯგუფების მოხლეჩა (დეზამინირება) ან სულფოქსიდების წარმოქმნა (S-ჟანგვა). ლეიძლის ფერმენტულ სისტემებს შეუძლიათ აღდგენისა და ჰიდროლიზის რეაქციათა კატალიზებაც, თუმცა ჟანგვასთან შედარებით ისინი უფრო იშვიათად მიმდინარეობს. ჰიდროლიზდება ესთერული ბმის შემცველი ზოგიერთი პესტიციდი, ფტალის მჟავას ესთერები, ნოვოკაინი და სხვ. აღდგენას განიცდიან ნიტროარომატული ნაერთები (მაგ., 2,4,6-ტრინიტროტოლუოლი, ქლორამფენიკოლი და სხვ.), დიაზოჯგუფის შემცველი მედიკამენტები (მაგ., პრონტოზილი).

კონიუგაციის რეაქცია ქსენობიოტიკთან რომელიმე ბუნებრივი კომპონენტის, მაგ., გლუკურონმჟავას, ამინომჟავა გლიცინის, ან ტრიპეპტიდ გლუტათიონის მიერთებაში მდგომარეობს. შესაბამისი ფერმენტის თანამყოფობისას ეს ფიზიოლოგიური აგენტები ადვილად უერთდებიან კარბოქსილის, სულფჰიდრილის, ამინისა და ჰიდროქსილის ჯგუფების შემცველ ნივთიერებებს. ზოგიერთი მედიკამენტი თავის საწყის აქტიურ ფორმაში უკვე შეიცავს ასეთ ჯგუფებს და მათ ლეიძლი უცბად „უსწორდება“ კონიუგაციის გზით. კონიუგაცია უმეტეს შემთხვევაში მაინც მეორადი ეტაპია და ჟანგვის, აღდგენის ან ჰიდროლიზის შემდეგ ხორციელდება. ამ პროცესის შედეგად ნივთიერება ყოველთვის კარგავს თავის ფარმაკოლოგიურ (ისევე როგორც სხვა ბიოლოგიურ) აქტივობას. მოგვყავს ლეიძლში მიმდინარე მეტაბოლურ გარდაქმნათა ძირითადი ტიპები¹ (რეაქციები ა, ბ, გ და დ):

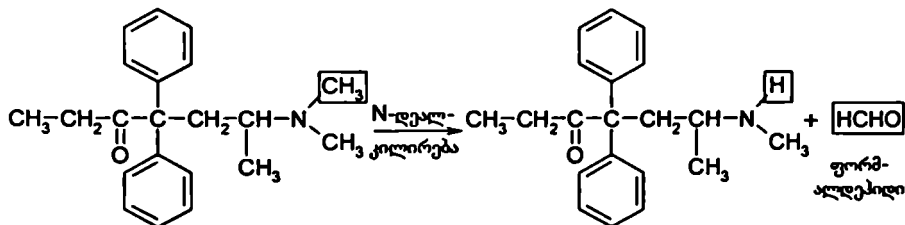
ა. ჟანგვა:



¹ ზოგიერთი დამატებითი პროდუქტი ნაჩვენები არაა. მოლეკულის გარდაქმნისადმი დაქვემდებარებული უბანი ჩაბმულია ჩარჩოში. ცალკეულ შემთხვევაში ფარმაკოლოგიურად არააქტიური ნივთიერება (მაგ., პრონტოზილი) აქტიურდება სულფანილამიდად, მაგრამ უმეტეს შემთხვევაში რეაქციის შედეგად ადვილი აქვს ინაქტივაციას.

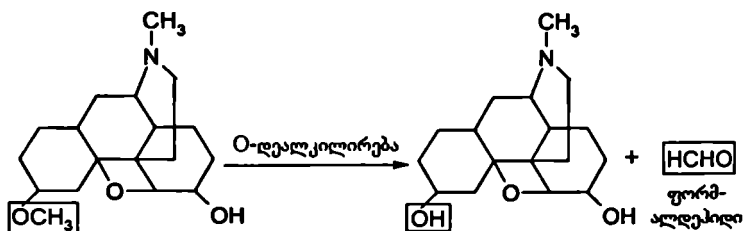


ფენობარბიტალი



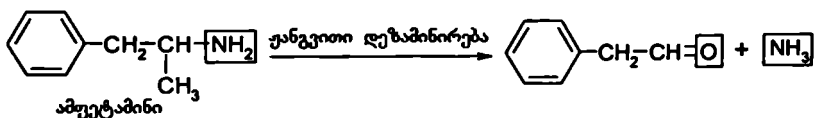
მეთაღონი

ფორმალდეჰიდი

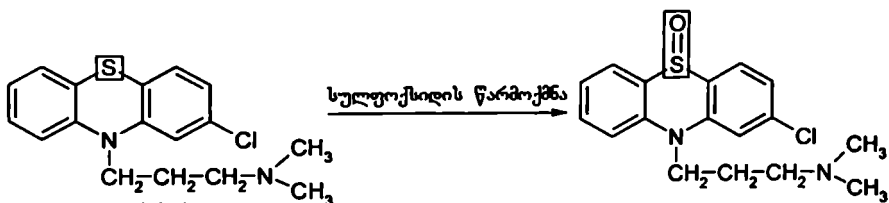


კოდეინი

ფორმალდეჰიდი

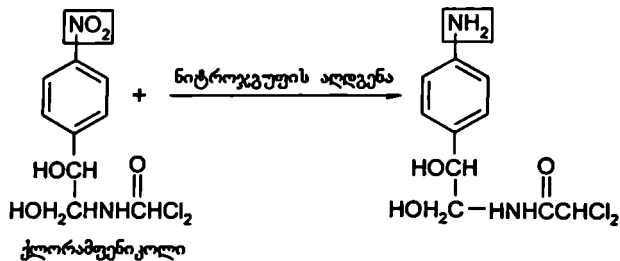
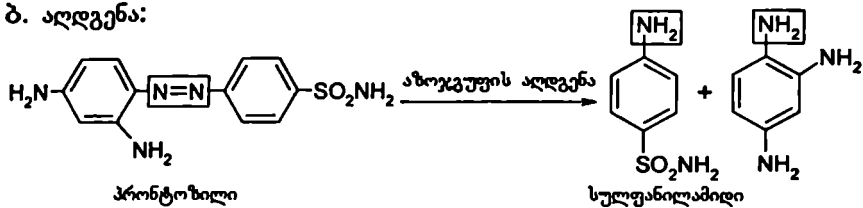


ამფეტამინი

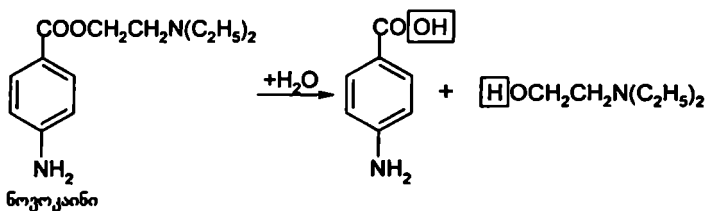


ქლორპრომაზინი

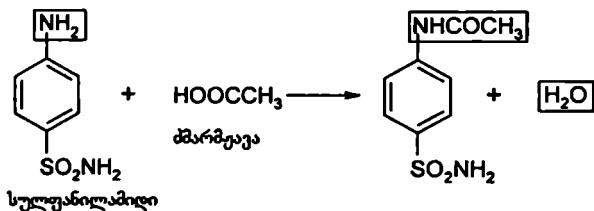
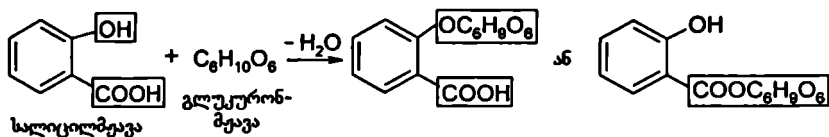
ბ. აღდგენა:



ბ. ჰიდროლიზი:



დ. დაკავშირება (კონიუგაცია):



საკამათო არაა, რომ ცხოველურ ორგანიზმს ღვიძლის ის ფერმენტული სისტემები, რომლებიც ზევით ჩამოთვლილ რეაქციებს აკატალიზებენ, გარემოში გაცილებით გვიან გამოჩენილი ქსენობიოტიკების „დეტოქსიკაციისთვის“ არ „გამოუგონია“. მათი ძირითადი ფუნქცია ენდოგენური სუბსტრატების – ფენოლური ნაერთების, სტეროლური ჰორმონების, ქოლესტეროლის, ცხიმოვანი მჟავებისა და სხვ. გადამუშავება უნდა ყოფილიყო. უცხო ნაერთთა მეტაბოლიზმში მათი მონაწილეობა ევოლუციურად შეძენილი ადაპტურ-ბიოქიმიური ფუნქციაა.

ქსენობიოტიკთა შეთვისება-გამოყოფა ორგანიზმის სხვადასხვა მემბრანულ ბარიერებში მათი მოლეკულების ტრანსპორტს მოიცავს. ეს მემბრანები შეიძლება აგებული იყოს რამდენიმე შრის მქონე უჯრედებისაგან (კანი, პლაცენტა), ერთშიანი უჯრედებისაგან (ნაწლავის ეპითელიუმი, ღვიძლის პარენქიმა), ან იყოს ერთ უჯრედზე უფრო თხელი (უჯრედული მემბრანები). ნებისმიერ მემბრანაში ნივთიერებათა ტრანსპორტი ოთხი ძირითადი მექანიზმით ხორციელდება:

1. მარტივი დიფუზიით (კონცენტრაციული გრადიენტის მიმართულებით გადაადგილებით);
2. ფილტრაციით (მემბრანის წყლიანი ფორებით მცირე რადიუსის მქონე ნივთიერებების გადაადგილებით);
3. პინოციტოზით (უჯრედის კედლის ინვაგინაციით არაუჯრედული სითხის წვეთების გადაადგილებით);
4. აქტიური ტრანსპორტით (მემბრანაში ნივთიერებების კონცენტრაციული გრადიენტის საწინააღმდეგო გადაადგილებით სპეციალური გადამტანებით და ენერგიის ხარჯვით).

ქსენობიოტიკთა უმრავლესობის მემბრანული ტრანსპორტი ძირითადად მარტივი დიფუზიის მექანიზმით ხორციელდება და მისი სიჩქარე კონცენტრაციული გრადიენტის ფუნქციას წარმოადგენს.

მცენარე ქსენობიოტიკებს ფოთლებიდან და ფესვებიდან შთანთქავს. ბიოსფეროს ქიმიური დაბინძურების ზრდასთან ერთად იზრდება ამ პროცესში ფოთლების ზვედრითი წილი. ამასთან, შთანთქმის მექანიზმები ფოთლებსა და ფესვებში ერთმანეთისაგან რამდენადმე განსხვავებულია. ფესვში მოსახვედრად ნივთიერებამ უნდა გააღწიოს უჯრედის გაუკორპებელ კედელში, რომელიც კუტიკულას (ცვილის აფსკს) არ შეიცავს. ფოთოლში შესაღწევად კი საჭიროა ბაგეების, ან ეპიდერმისის კუტიკულის გავლა. ამიტომ ფესვები ქსენობიოტიკებს უფრო დაბალი შერჩევითობით ითვისებენ.

ფესვებში ქსენობიოტიკი წყალთან ერთად შეიწოვება. გამტარი ქსოვილისაქენ ისინი შეიძლება ორი გზით გადაადგილდნენ: სიმპლასტურად (უჯრედების გავლით) ან აპოპლასტურად (უჯრედშორისი თავისუფალი სივრცის გავლით). სიმპლასტში გადაადგილება მეტაბოლიზმის შედეგად გენერირებულ ენერგიას მოითხოვს და თვლიან, რომ ნივთიერებათა ტრანსპორტში მისი როლი უმნიშვნელოა. აპოპლასტი, ანუ ფესვების თავისუფალი სივრცე მიკროკაპილარული სისტემითაა წარმოდგენილი, რომლებსაც ცელულოზური, არაგაზხევებული უჯრედული კედლები შეიცავენ. წყალი და მასში გახსნილი ნივთიერებები ამ კაპილარებში თავისუფლად მოძრაობენ, რამდენადაც განვლადობის მემბრანულ ბარიერს არ ხვდებიან, ამასთან ხსნარებისათვის ფესვთა სისტემის ეს მოცულობა საესებით საკმარისი და ხელმისაწვდომია. ამ მოცულობას მოჩენებითი თავისუფალი სივრცე ეწოდება. მცენარის სხვადასხვა ქსოვილებისათვის მისი მნიშვნელობები ფართო საზღვრებში იცვლება. ზოგიერთ შემთხვევაში იგი ქსოვილის თითქმის ნახევარს შეადგენს, ხოლო ღეროს მუხლთაშორის მონაკვეთებში 2.5-ჯერ აღემატება ქსილემის საერთო მოცულობას.

წყალხსნარებიდან ფესვების მიერ ორგანული ქსენობიოტიკების შეთვისება, როგორც წესი, ორ ფაზად ხორციელდება. პირველი — გარემოდან ფესვის აპოპლასტში სწრაფად მიმდინარე დიფუზიაა და ღროის მოკლე მონაკვეთში მთავრდება. მეორე ფაზაში ხდება ნივთიერების შეწელებული დაგროვება, რაც თავის მხრივ დეგრადაციის სიჩქარეზეა დამოკიდებული.

თავისუფალ სივრცეში ნივთიერებების დიფუზიური გავრცელება გარკვეულწილად ფიკის კანონს ემორჩილება, რომლის თანახმადაც პროცესის სიჩქარე პირდაპირპროპორციულ დამოკიდებულებაში იმყოფება დიფუზიური ნაკადის განიკვეთთან და უკუპროპორციულ დამოკიდებულებაშია ნაკადის სიგრძესთან. ეს კანონზომიერება მრავალრიცხოვანი ექსპერიმენტებითაა დადასტურებული. ნაჩვენებია, რომ ინკუბაციის დაწყებისას ფესვების მიერ ხსნარიდან შთანთქმული ნივთიერების რაოდენობა პირდაპირპროპორციულ დამოკიდებულებაშია ხსნარში ნივთიერების კონცენტრაციასთან.

ფესვების მიერ ორგანულ ქსენობიოტიკთა შთანთქმისას ანგარიშგასაწევი ფაქტორია ტემპერატურა. აქტიური ტრანსპორტის არსებობის გამოვლენაში ტემპერატურულ კოეფიციენტს (Q_{10}) ერთ-ერთი გადამწყვეტი მნიშვნელობა ენიჭება. ეს სიდიდე გვიჩვენებს, თუ რამდენჯერ იზრდება რეაქციის სიჩქარე ტემპერატურის 10°C -ით აწვეისას (ვანტ-ჰოფის პრინციპი). ისეთი პროცესებისათვის, როგორებიც დიფუზია ან ფოტოქიმიური რეაქციებია,

Q_{10} შედარებით მცირეა (1.2–1.4), ხოლო ფერმენტული რეაქციებისათვის – გაცილებით მაღალი (1.3–დან 5.0-მდე). ამიტომ, თუ რეაქციის $Q_{10} \geq 1.5$, იგი მეტაბოლურ პროცესებში მიიღებს მონაწილეობას, რასაც, მაგ., ადგილი აქვს გარემოდან უჯრედში ნივთიერებათა აქტიური ტრანსპორტისას. ზოგიერთი მკვლევარი თვლის, რომ ცალკეულ შემთხვევებში შესაძენევი ენერგეტიკული ბარიერის არსებობისას დიფუზიის პასიური პროცესი შეიძლება მაღალი ტემპერატურული კოეფიციენტიტ ხასიათდებოდეს. ქსენობიოტიკთა დიფუზია ფესვის თავისუფალ სივრცეში ხშირად არაა ტემპერატურაზე დამოკიდებული. მაგ., სიმინდის ფესვების მიერ ფუნგიციდ კარბენდაზიმის შთანთქმა ორფაზიანია: სწრაფი საწყისი ფაზა (~2 სთ), რომელსაც ცვლის მომდევნო, მუდმივი სიჩქარის მქონე ნელი აბსორბციის ფაზა. პირველი ფაზისას ტემპერატურის 3–დან 20°C-მდე გაზრდა ამ ფუნგიციდის შთანთქმაზე არსებით გავლენას არ ახდენს, რაც ამ პროცესის პასიურ ბუნებაზე მიუთითებს.

ფესვების მიერ ქსენობიოტიკთა პასიურ შთანთქმას მათი აქტიური ტრანსპორტი მოსდევს. ამის შედეგად პროცესის გახანგრძლივებისას შთანთქმა ტემპერატურაზე დამოკიდებული ხდება და მას საკმაოდ რთული ბუნება აქვს. მაგ., ჰერბიციდების – ატრაზინის, ლინურონის და ტრიფლურალინის შთანთქმა სიმინდის ფესვების მიერ 25°C-ზე უფრო ინტენსიურია, ვიდრე 20°C-ზე, მაგრამ ტემპერატურის 30°C-მდე გაზრდისას შთანთქმის გაძლიერება აღარ შეინიშნება. მრავალ შემთხვევაში ტემპერატურის გაზრდა ქსენობიოტიკთა შთანთქმასთან დადებით კორელაციაშია.

ფესვთა სისტემის შთანთქმაში გამოკვლეულია ნივთიერების მოლეკულური მასის როლი. სხვადასხვა მოლეკულური მასის მქონე პოლიეთილენგლიკოლის მაგალითზე ნაჩვენებია, რომ შთანთქმის ინტენსივობა მოლეკულური მასის უკუპროპორციულია. თუმცა აღმოჩნდა ისიც, რომ ეს ნივთიერება მცენარის მიერ შთანთქმება და გადაადგილდება მოლეკულური მასისათებლების ცვლილების გარეშე. მაშასადამე, ფესვების მიერ შთანთქმება არამარტო დაბალმოლეკულური (~1 kD), არამედ უფრო მაღალმოლეკულური ნაერთებიც. გამოვლენილია, მაგ., შეღწეული რიბონუკლეაზისა და სხვა ძირითადი ცილების მასტიმულირებელი გავლენა ფესვების ზრდასა და მეტაბოლიზმზე.

ფესვების მიერ უცხო ნივთიერებათა შთანთქმაზე გავლენას ახდენს ნიადაგში ან საკვებ არეში ქსენობიოტიკების კონცენტრაცია. მთელი რიგი ნივთიერებებისათვის (ბრუცინი, ბენზპირენი, დიმეთილნიტროზამინი, ჰერბიციდი სანდოზი-670 და სხვ.). დადგენილია პირდაპირპროპორციული დამოკი-

დებულება კონცენტრაციასა და შთანთქმის ინტენსივობას შორის. ამ დამოკიდებულების მექანიზმი შეიძლება სხვადასხვა იყოს, მაგრამ ჩვეულებრივ მას უკავშირებენ ნივთიერებათა განსხვავებული სწრაფვის („ტაქსისის“) არსებობას.

ნივთიერებათა შთანთქმაში მნიშვნელოვან ფაქტორს წარმოადგენს ნიადაგის ან საკვები ხსნარის pH. მასზე ერთი მხრივ დამოკიდებულია ნიადაგის მიერ ქსენობიოტიკების აბსორბცია და იონოგენური მოლეკულების დისოციაცია, მეორე მხრივ კი ნიადაგის მჟავიანობა, რომელიც არსებით გავლენას ახდენს მშთანთქმელი ქსოვილის განვლადობაზე. ნაჩვენებია, რომ სუსტი მჟავები უპირატესად არადისოცირებული მოლეკულების სახით შთანთქმებიან. ანალოგიური შედეგია მიღებული ბენზიმიდაზოლისა და თიოფანატის წარმოებული ფუნგიციდის მიმართაც. სიმინდის იზოლირებული ფესვები ამ ნივთიერებებს შთანთქავენ იონებად დისოციაციის გარეშე. pH-ის ნეიტრალურ და სუსტ მჟავურ მნიშვნელობებზე ისეთი სისტემური ფუნგიციდი, როგორიც თიაბენდაზოლია, უფრო ინტენსიურად შთანთქმება, ვიდრე ფუძე არეში. აღმოჩნდა, რომ ამ ქსენობიოტიკის მოლეკულები უჯრედში ნეიტრალური ფორმით შეიღწევა, ხოლო მისი კატიონი ლიპიდში უფრო ცუდად იხსნება და ამდენად ნეიტრალურ ფორმასთან შედარებით შთანთქმის უფრო დაბალი უნარით ხასიათდება.

ფოთლების ბაგეებიდან და ეპიდერმისის კუტიკულიდან ქსენობიოტიკთა შეთვისება ფაქტიურად ერთდროულად ხორციელდება, თუმცა არაორგანული აირების შთანთქმა კუტიკულიდან მეორეხარისხოვანია, რადგან ბაგეებიდან მათი შეღწევა ასჯერ უფრო სწრაფად ხდება. მიუხედავად ამისა, განსაზღვრულ შემთხვევებში, მაგ., ქოლგოსნებში, უმდაბლეს მცენარეებში, წყალმცენარეებში და სხვ., რომელთაც ბაგეები არ გააჩნიათ, კუტიკულის გზით შეთვისებას არსებითი მნიშვნელობა ენიჭება. გარდა ამისა, ლიპოფილური თვისებების მქონე ორგანული ნივთიერებები ძირითადად კუტიკულით შთანთქმება. ამის მაგალითია აირადი ნახშირწყალბადების შთანთქმა ჰიპოსტომატური (მხოლოდ ქვედა ზედაპირზე განლაგებული ბაგეების მქონე) ფოთლების მიერ. რადიოაქტიური ალკანისა (^{14}C მეთანის) და არომატული ნახშირწყალბადის ($1-6-^{14}\text{C}$ -ბენზოლის) გამოყენებით ვაზის ფოთლებზე ჩატარებული ცდებით ნაჩვენებია, რომ მათი შთანთქმა ხდება არამხოლოდ ბაგეებით, არამედ ეპიდერმისიდან ღიფუზიის გზითაც. ანალოგიური სურათი შეინიშნება ქსენობიოტიკთა ხსნარების შემთხვევაშიც: ზედაპირულად აქტიურ ნივთიერებათა 0.1%-იან წყალხსნარებზე ჩატარებული ცდებით დადგინდა, რომ მათი ინტენსიური შეთ-

ვისება მთელ რიგ მცენარეთა ფოთლების ორივე ზედაპირიდან ხდება. უნდა აღინიშნოს, რომ ამ ნივთიერებების ფოთლის ზედა ზედაპირით შთანთქმის უნარი ყველა გამოცდილ მცენარეს დაახლოებით თანაბარი აქვს, ხოლო ფოთლის ქვედა მხრიდან შეთვისება მცენარის სახეობაზე დამოკიდებული აღმოჩნდა.

ეგ ზოგენურ ნივთიერებათა უმრავლესობა (პესტიციდები, წვიმის წვეთებში შემაჯალი ატმოსფერული დამბინძურებლები და ა.შ.) ფოთლებში ხსნარების სახით შეიღწევა. ამდენად, სხვადასხვა სითხის ბაგეებში შეღწევის უნარის შესწავლას პრინციპული მნიშვნელობა აქვს. ამ მიმართულებით ჩატარებულმა კვლევებმა აჩვენეს, რომ სითხეების ბაგეებით შეთვისება დამოკიდებულია ფოთლის ზედაპირის დასველების უნარზე, ბაგეების მორფოლოგიაზე და შესაღწევი სითხის ზედაპირულ დაჭიმულობაზე. ამ უკანასკნელის კრიტიკული მნიშვნელობა 25–30 დინი/სმ-ს შეადგენს. ნივთიერებები, რომელთაც ნაკლები ზედაპირული დაჭიმულობა გააჩნიათ, ბაგეებში მომენტალურ ინფილტრაციას განიცდიან, ხოლო უფრო მაღალი მნიშვნელობისას ფოთლის ზედაპირი არ სველდება და ნივთიერება ბაგეში არ შეიღწევა.

ფოთლის ბაგეებით ზოგიერთი ქსენობიოტიკის შეთვისების მექანიზმზე განსხვავებული შეხედულებები არსებობს. სამაგიეროდ, კუტიკულური განვლადობის ერთიანი მექანიზმის არსებობა მკვლევარებში არავითარ ეჭვს არ ბადებს. ეს წარმონაქმნი არაუჯრედული შრეა, რომელიც უმაღლესი მცენარის ყველა მიწისზედა ნაწილს ფარავს. მცენარის სახეობის, ასაკის და გარემოს პირობებისაგან დამოკიდებულებით ეპიდერმისის სისქე და შემადგენლობა ფართო საზღვრებში იცვლება. ნორჩ ფოთლებში კუტიკულა ჩვეულებრივ თხელია და არათანაბრადაა განვითარებული. გარდა ამისა, ფოთლის ზედა ზედაპირზე იგი უფრო სქელია. მისი ძირითადი ნაწილი ცვილით გაჟღენთილი კუტინისაგან შედგება. ფოთლის ზედაპირზე ცვილი წყალგაუმტარ ფენას ქმნის და რთული გრძელჯაჭვიანი ალკანებით, სპირტებით, ესთერებითა და კარბონმჟავებითა წარმოდგენილი.

ორგანული ნაერთის პიდროფობული მოლეკულები ფოთლის ცვილის ლიპოფილურ ზედაპირზე სორბირდება, კუტიკულაში გროვდება და თანდათანობით ფოთლის სიღრმეში გადადის. ამგვარად, ცვილის შრე ქსენობიოტიკებისათვის ფოთოლში შესაღწევად არსებით ბარიერს წარმოადგენს. ცვილის ფენის გარეშე კარბოფოსი 3–4 საათის შემდეგ უკვე მთლიანადაა შეთვისებული ფოთლის მაფოტოსინთეზზე გელი ქსოვილის მიერ. მრავალი ქსენობიოტიკი მოქმედებს კუტიკულის ცვილების როგორც შე-

მადგენლობაზე, ასევე სტრუქტურაზე და ცვლიან მის განვლადობას.

მცენარის თესლში ქსენობიოტიკის შესვლის სიჩქარე მისი კანის განვლადობით ლიმიტირდება, თუმცა შთანთქმული ნივთიერების რაოდენობა სხვა პარამეტრებზეცაა დამოკიდებული. მათგან მნიშვნელოვანი ნივთიერების კონცენტრაცია, ინკუბაციის ხანგრძლივობა და ტემპერატურაა.

1.3.2 განაწილების კოეფიციენტი და ჰიდროფობული დაკავშირება

ქსენობიოტიკთა ჟანგით ღვერადაციას ორგანიზმში წინ უძღვის ბიომემბრანის ლიპიდურ ბარიერში მათი შეღწევა. ამ პროცესის თეორიული საფუძვლების კვლევას მემბრანულ ქსენობიოქიმიაში მნიშვნელოვანი ადგილი ეთმობა. საწყის პოზიციად აქ განაწილების კოეფიციენტისა და ჰიდროფობული დაკავშირების ცნებები ითვლება. პირველი წარმოადგენს პარამეტრს, რომელიც წყლოვან სისტემაში მაკრომოლეკულებთან მოქმედ მცირე მოლეკულების ერთ-ერთ გადამწყვეტ თვისებას ახასიათებს.

ორ წონასწორულ ფაზაში მყოფი მარტივი მოლეკულების კონცენტრაციულ ფარდობას მუდმივი მნიშვნელობა გააჩნია. ეს დამოკიდებულება ასე გამოისახება:

$$P = k \frac{C_2}{C_1}$$

აღნიშნული თანაფარდობა იმ დაშვებიდან გამომდინარეობს, რომ ორ-ფაზიან სისტემაში არ არსებობს კომპონენტთა შორის რაიმე შესაძენე ურთიერთქმედება, ან სპეციფიკური ურთიერთქმედება გამხსნელისა და გახსნილ ნივთიერებას შორის, რომელთაც განაწილების პროცესზე ზეგავლენის მოხდენა შეუძლიათ. კონცენტრაციებს გამოსახავენ ნივთიერების რაოდენობის ერთეულით მოცულობის ერთეულში. C_1 წარმოადგენს ნივთიერების კონცენტრაციას წყლოვან, C_2 – კი არაწყლოვან ფაზაში. წონასწორობის კონსტანტას (P), რომელიც მოცემულ სისტემას ახასიათებს, განაწილების კოეფიციენტს ან ზოგჯერ გამანაწილებელ ფარდობას უწოდებენ. მაშასადამე, განაწილების კოეფიციენტი არის ნივთიერების წონასწორული კონცენტრაციების ფარდობა წყლოვან და არაწყლოვან ფაზებში განაწილებისას. თერმოდინამიკის პრინციპების თანახმად სიდიდე $\log P$ ამ ფაზებში ნივთიერების თავისუფალი ენერგიის სხვაობის პროპორციულია.

განაწილების პროცესზე ქსენობიოტიკთა განსხვავებული ჯგუფების

ველ ჯაჭვებისათვის.

$\text{Log } K_{\text{OH}}$ -ს გამოთვლისათვის იყენებენ π_{X} -ის შემდეგ მნიშვნელობებს: CH_3 -ისა და CH_2 -სთვის – 0.50-ს; $\text{C}_6\text{H}_5\text{OH}$ -ისთვის – 2.69-ს; $(\text{CH}_3)_2\text{N}$ -ისთვის – 0.94-ს; $(\text{CH}_3)_2\text{CH}$ -ისთვის – 1.37-ს; CH_3COO -სთვის – 0.76-ს; $\text{CH}_2 = \text{CH}$ -ისთვის – 0.70-ს და ა.შ.

ბიოლოგიური მემბრანები რთულ, დინამიკურ ჰეტეროგენულ სისტემებს წარმოადგენენ და არ შეიძლება განხილულ იქნან ინერტულ ლიპოპროტეინულ ზღუდედ. მარტივი დიფუზიის გზით მათში ადვილად მხოლოდ ცხიმში ხსნადმა არაიონიზებულმა მოლეკულებმა შეიძლება შეაღწიონ. ამდენად, არაელექტროლიტები ლიპიდებში მათი ხსნადობის, ხოლო ელექტროლიტები – იონიზაციის ხარისხისა და არაიონიზირებული მოლეკულების ხსნადობის შესაბამისად ტრანსპორტირდება. ორგანული ელექტროლიტების იონიზაციის ხარისხი დისოციაციის კონსტანტისა და გარემოს pH-ის ფუნქციაა.

მემბრანით განმზოვრებულ ორ სივრცეს ერთნაირი pH თუ გააჩნია (მაგ., პლაზმისა და ზურგის ტვინის შემთხვევაში), მაშინ ქსენობიოტიკის კონცენტრაცია მემბრანის ორივე მხარეზე თანაბარი იქნება. წინააღმდეგ შემთხვევაში pH-ის განსხვავებული მნიშვნელობისას (მაგ. ნაწლავებისა და პლაზმის შემთხვევაში), ქსენობიოტიკის კონცენტრაციებიც განსხვავებულია, რადგან pH-ით ნივთიერების მხოლოდ იონიზებული რაოდენობა (წილი) განისაზღვრება, ხოლო ამ ფორმით მისი მემბრანაში შეღწევა არ ხდება.

განაწილების კოეფიციენტით შეფასებული მთელი რიგი იონიზებული ამინების ლიპოფილურობა 3–4 რიგით დაბალია შესაბამის ნეიტრალურ ფორმებთან შედარებით. ეს გარემოება გამორიცხავს მიკროსომულ მემბრანაში იონიზებული ფორმის ქსენობიოტიკებისა და ენდოგენური სუბსტრატების მეტაბოლიზების შესაძლებლობას. ამით შეიძლება აიხსნას, თუ რატომ არ იყანგებიან მრავალი შიდაუჯვრედული ნაერთების – ამინომჟავების, ორგანული მჟავებისა და სხვ. მოლეკულები მემბრანული მონოოქსიგენაზებით, რომლებიც უაღრესად დაბალი სუბსტრატული სპეციფიკურობით ხასიათდებიან.

ჰიდროფობულ დაკავშირებაში, უპირველეს ყოვლისა, იგულისხმება ორგანული მოლეკულის თავისუფალი ენერგიის ცვლილება წყლოვანიდან ბიოფაზაში გადასვლისას. სხვაგვარად რომ ითქვას, ჰიდროფობული დაკავშირება შეიძლება განისაზღვროს მოლეკულებს შორის ისეთ ურთიერთქმედებად, რომელიც გაცილებით ძლიერია წყლის მოლეკულებთან ურთიერთქმედებად, რომელიც გაცილებით ძლიერია წყლის მოლეკულებთან ურთიერთქმედებად.

ბაზე. იგი არაა განპირობებული არც კოვალენტური ან წყალბადური ბმებით და არც ელექტროსტატიკური მიზიდულობით ან მოლეკულებს შორის მუხტის გადატანის ვან-დერ-ვაალსის ძალებით. მოლეკულათა ურთიერთქმედებას თუ თან ახლავს ენტროპიის შემცირება (თავისუფალი ენერგიის ზრდა) და გამხსნელის „სტრუქტურიზაცია“, ადგილი ექნება ჰიდროფობული ურთიერთქმედების მოდელს. განაწილების პროცესის მთავარ მამოძრავებელ ძალას წარმოადგენს ორგანული მოლეკულიდან სოლვენტური გარსის შემოცლა, რომელიც წყალხსნარში მის ირგვლივს წარმოქმნილი.

1.3.3 ენდოპლაზმური მემბრანების ურიდინდიფოსფატ-გლუკურონილტრანსფერაზა (EC 2.7.7.9)

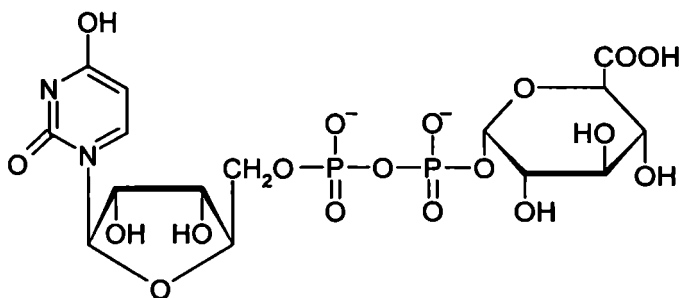
კონიუგაცია თავისთავად ბიოსინთეზია, რომლის დროსაც ქსენობიოტიკი ან მისი მეტაბოლიტი უჯრედის რომელიმე ადვილად გარდაქმნად (სტანდარტულ) სუბსტრატს უკავშირდება. ისევე, როგორც ჟანგვით ღებრადაციას, კონიუგაციასაც წინ უსწრებს ქსენობიოტიკის მოლეკულაში რომელიმე ფუნქციური ჯგუფის (ჰიდროქსილის, კარბოქსილის, ეპოქსიდის, ამინურის და სხვ.) ჩანერგვა. ფუნქციონალიზაციის შედეგად, როგორც აღნიშნული იყო, მოლეკულა უფრო პოლარული და ცხიმში მცირედ ხსნადი ხდება. ეს თავის მხრივ საშუალებას იძლევა, რომ ქსენობიოტიკი გაცილებით სწრაფად და ეფექტურად ღებრადირდეს, ან მან საერთოდ დატოვოს ორგანიზმი. კონიუგაციაც აღნიშნული ფუნქციური ჯგუფების უშუალო მონაწილეობით ხორციელდება. ამიტომ ეს პროცესი ჟანგვითი გარდაქმნების შემდეგ ქსენობიოტიკთა ბიოდეგრადაციის მეორე ფაზადაა მიჩნეული.

მრავალ კონიუგაციურ რეაქციაში ენდოგენური სუბსტრატი საერთო მეტაბოლიზმში მოქმედ კოფერმენტებს შემოაქვთ. სამაგიეროდ ის ფერმენტები, რომლებიც შემდეგ ამ რეაქციებს აკატალიზებენ, საკმაოდ მაღალი სპეციფიკურობით გამოირჩევიან. ჩვეულებრივ, კონიუგაციაში ურიდინდიფოსფატური, ადენოზინური და A-კოენზიმური კოფერმენტები მონაწილეობენ. ძალიან ხშირად აღნიშნულ პროცესში ჩართულია გლუტათიონი და მასთან კონიუგირებას ფართო გავრცელება აქვს მცენარეულ ორგანიზმებში.

კონიუგაციის ერთ-ერთ ყველაზე მნიშვნელოვან მექანიზმად მიღებულია კონიუგაცია გლუკურონის მჟავასთან. გავრცელების მხრივ იგი შეიძ-

ლება ქსენობიოტიკთა გარდაქმნის უნივერსალურ ტიპად ჩაითვალოს, რადგან მიმდინარეობს მრავალ (თევზების გარდა) ზერზემლიანში, ყველა ბუბუმ-წოვარსა და მცენარეებში. პროცესი (გლუკურონიზაცია) უაღრესად საყურადღებოა იმდენად, რომ ქსენობიოტიკთა ჟანგვითი დეგრადაციისაგან განსხვავებით ამ დროს ადგილი არა აქვს შუალედური ტოქსიკური პროდუქტების წარმოქმნას. მემბრანული ქსენობიოქიმიისათვის ეს პროცესი იმ კუთხითაცაა საინტერესო, რომ მისი საწყისი ეტაპი – სხვადასხვა გლუკურონიდების ბიოსინთეზი კატალიზდება ფერმენტით ურიდინდიფოსფატ-გლუკურონილტრანსფერაზით (სიმარტივისათვის შემოკლებულად აღვნიშნოთ, როგორც **უდფბტ**), რომელიც ტიპური მემბრანული ცილაა. შიდაუჯრედული განაწილების შესწავლამ აჩვენა, რომ მისი ძირითადი ნაწილი მიკროსომებში, ხოლო მცირე ნაწილი – ბირთვულ მემბრანებში იმყოფება. არსებობს მონაცემებიც, რომელთა თანახმადაც ფერმენტის სულ უმნიშვნელო ნაწილს უჯრედის (ლვიძლის ჰეპატოციტის) ზედაპირული მემბრანა შეიცავს.

მცენარეებში გლუკოზიდური კონიუგატები მიიღებიან ურიდინდიფოსფატ-გლუკურონმჟავადან (**უდფბმ-დან**) ქსენობიოტიკის მოლეკულაზე გლუკოზის გადატანით. ამ დროს ადგილი არა აქვს გლუკურონიდების წარმოქმნას. ბუბუმწოვრებში პირიქით, გლუკოზიდების სინთეზი არ ხდება. მაშასადამე, მცენარეში შაქრებთან კონიუგაციას გლუკოზიდების, ხოლო ზერზემლიანთა უმრავლესობაში – გლუკურონიდების წარმოქმნასთან მივყავართ. ამის მიზეზს ურთიერთქმედების მექანიზმის ევოლუციური შეცვლა უნდა წარმოადგენდეს.

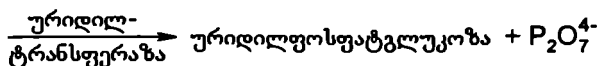


ურიდინდიფოსფატ- α -D-გლუკურონმჟავა (**უდფბმ**)

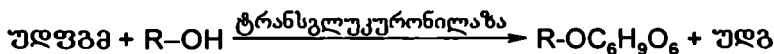
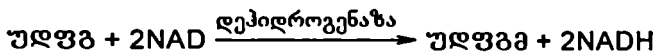
ქსენობიოტიკთა გლუკურონიდების მიღება ისევე, როგორც სხვა მრავალი კონიუგაციების შემთხვევაში, ჯერ უნდა დასინთეზდეს **უდფბმ**, კოფერ-

მენტულის დონორი, ხოლო შემდგომ მისი დახმარებით განზოცეულდეს გლუკურონული ნაწილის სუბსტრატზე (აგლიკონზე) გადატანა.

α -D-გლუკოზო-1-ფოსფატი + ურიდილტრიფოსფატი $\longrightarrow$



ფერმენტი უმე-გლუკოზოდეჰიდროგენაზა (EC 1.1.1.22) აკატალიზებს უმე-ს გარდაქმნას უმე-მ-ად და ჟანგვის ეს რეაქცია ორ სტადიად მიმდინარეობს: პირველად ჰიდროქსილის მეექვსე მდგომარეობაში მყოფი ჯგუფი აღდგენილად იჟანგება, რომელიც შემდგომ კარბოქსილში გადადის.



თვით უმე-მ უჯრედის გლუკურონატქსილულოზურ ციკლში წარმოიქმნება. მისი ფუნქციონირებით, რომელიც შაქრების გარდაქმნის პენტოზურ ციკლთან (პექსოზომონოფოსფატურ შენტთან) არის შეუღლებული, შეიძლება დიდი რაოდენობით დაგროვდეს თავისუფალი გლუკურონმჟავა უმე-მ-ს ჰიდროლიზით, ან ინოზიტის მონოოქსიგენაზური (EC 1.1.3.1.11) დაჟანგვით. ქსენობიოტიკებთან გლუკურონმჟავას კონიუგატებს β -პირანოზული სტრუქტურა აქვთ და O-, N-, S- და C-გლუკურონიდებად კლასიფიცირდებიან.

უმე-მ ინდუცირებადი ფერმენტი. აქვე უნდა აღინიშნოს, რომ მისი ინდუქციის გამოწვევ ქსენობიოტიკთა რიცხვი გაცილებით ნაკლებია ნივთიერებათა იმ რაოდენობასთან, რომლებიც ციტოქრომ P450-შემცველი მონოოქსიგენაზების მიმართ ანალოგიურ ეფექტს იძლევიან. ფერმენტის ყველაზე ძლიერ ინდუქტორებს მიეკუთვნებიან ბარბიტურატები, ქლორციკლოზინები და პოლიციკლური ნახშირწყალბადები (3-მეთილქოლანტრენი და 3,4-ბენზპირენი).

ენდოპლაზმურ მემბრანებში უმე-მ არათანაბრად ნაწილდება. ასე მაგალითად, ფერმენტი, რომელიც ფენოლფტალეინის გლუკურონიდის ასინთეზებს, ლოკალიზებულია როგორც ზორკლიან, ასევე გლუვ მემბრანებში. *p*-ნიტროფენოლისა და *o*-ამინოფენოლის კონიუგაციის მაკატალიზებელი ფერმენტი ჰეპატოციტების მხოლოდ ზორკლიან მემბრანებში გვხვდება. ეს

ფაქტი და აგრეთვე ფერმენტის საში pH-ობტიუმის არსებობა მისი მრავლობითი ფორმების არსებობაზე მიუთითებს.

უღვბტ-ს კატალიზური აქტივობა მნიშვნელოვანწილადაა დამოკიდებული მემბრანის ლიპიდურ გარემოცვაზე. ისინი ფერმენტული აქტივობის მოდულირებას ახორციელებენ. მკვლევარები თვლიან, რომ ინტაქტურ მიკროსომებში ეს ფერმენტი ე.წ. ლატენტურ მდგომარეობაშია, რადგან ნებისმიერი აგენტი, რომელიც მიკროსომაში ჰიდროფობულ ურთიერთქმედებაზე ზემოქმედებას ავლენს, ზრდის მის აქტივობას. მემბრანაში ფერმენტის განლაგებისა და მიმაგრების ფორმის კვლევა ძირითადად დეტერგენტების, ორგანული გამხსნელების, ტრიფსინისა და ულტრაბგერის გამოყენებითაა ჩატარებული.

ღვიძლის მიკროსომების ფრაქციის ღიგიტონინით დამუშავებისას უღვბტ-ს კატალიზური აქტივობა ფრაქციის გამოყოფის პირობებზე დამოკიდებულებით 2—4-ჯერ იზრდება. მერსალილი და ტრიტონ X-100 დაბალ კონცენტრაციებზე ააქტიურებენ, ხოლო მაღალ კონცენტრაციებზე აინჰიბირებენ ფერმენტს. მსგავსი სურათი შეინიშნება ფოსფოლიპაზების A-ს და C-ს გამოყენების დროსაც. „რბილ“ პირობებში ისინი აძლიერებენ, ხოლო ხანგრძლივი დამუშავებისას თრგუნავენ ამ ფერმენტის აქტივობას.

ფერმენტის აქტივობაზე ზემოქმედებასთან ორგანულ გამხსნელთა ფიზიკურ-ქიმიურ თვისებათა შეჯერებით ნაჩვენებია, რომ ინაქტივაციის ხარისხის დამოკიდებულება ექსპონენციალურია სპირტების ალიფატური ჩაზნაცვლებების სიგრძის მიმართ და ხაზოვანია მათი ლიპოფილურობის სიდიდესთან. გამხსნელებიდან ყველაზე ეფექტურად ქლოროფორმი აძლიერებს ტრანსფერაზის კატალიზურ თვისებებს. ამასთან, არსებითი მნიშვნელობა აქვს ამ გამხსნელის კონცენტრაციას, რადგან მისი გაზრდისას ენზიმური აქტივობა მკვეთრად ქვეითდება. აცეტონი ააქტიურებს ანილინის *p*-ჰიდროქსილირებას. ექვივალენტური დოზით იგი ანალოგიურ ზემოქმედებას ავლენს *p*-ნიტროფენოლის გლუკურონიდის სინთეზზეც. 1—3 მოლი/ლ-ზე კონცენტრაციით ეთანოლი და მეთანოლი ფერმენტის აქტივობაზე შესამჩნევ გავლენას არ ახდენენ, ხოლო ამ გამხსნელთა 5—7 მოლი/ლ-მდე გაზრდისას *p*-ნიტროფენოლის გლუკურონიდის წარმოქმნის სიჩქარე მყისიერად ეცემა.

0.25 M საქაროზის ხსნარში გამოყოფილ მიკროსომაში არ ხდება ლიპიდების ჰიდროლიზი და მემბრანათა დაშლა. ამასთან დაკავშირებით გამოთქმულია მოსაზრება, რომ ფოსფოლიპიდები ზღუდავენ უღვბტ-ს აქტივობას მისი რომელიმე გარკვეული კონფორმაციის შენარჩუნების

გზით. არსებობს კიდევ ერთი თვალსაზრისი, რომლის თანახმადაც ამ ფერმენტის მოლეკულები ჩაძირული არიან მემბრანის სიღრმეში და ფოსფოლიპიდები გლუკურონიდების სინთეზის უბანთან სუბსტრატთა მიღწევისათვის ჰიდროფობული ბარიერის როლს ასრულებენ. ამ მოსაზრების სასარგებლოდ ის ფაქტი მეტყველებს, რომ მიკროსომების დამუშავებისას დეტერგენტებით, რომლებიც ფოსფოლიპიდთა ჰიდროლიზს ან მემბრანულ სტრუქტურათა დაშლას იწვევენ, შეინიშნება მემბრანულ განვლადობაზე დამოკიდებული "პლზმტ"-ს გააქტიურება. 154 mM KCl-ის შემცველ ხსნარში გამოყოფილ მიკროსომებში ეს ფერმენტი მაღალ კატალიზურ აქტივობას ამჟღავნებს და დეტერგენტებით დამუშავება ტრანსფერაზულ აქტივობაზე არ მოქმედებს. მეორე მხრივ, ფოსფოლიპაზები A და C ფერმენტის ინაქტივაციას იწვევენ.

რა გამოდის? გამოდის ის, რომ "პლზმტ"-ზე მემბრანული ფოსფოლიპიდები ორგვარ ზემოქმედებას ახდენენ. სწორედ ამ გარემოებამ აიძულა მკვლევარები, ელიარებინათ მემბრანაში ფერმენტის ე.წ. ლატენტური მდგომარეობის არსებობა. საქაროზის 0.25 M ხსნარში გამოყოფილი ფერმენტის ლატენტურობა შეიძლება დაძლეულ იქნას ფოსფოლიპაზა C-თი. იგი შესაძლოა კვლავ დაუბრუნდეს ამ ფორმას ფოსფოლიპიდების დამატებით. მასასადამე, მიკროსომებში ჰიდროფობულ ურთიერთქმედებაზე მოქმედი აგენტები, რომლებიც მემბრანის დესტრუქციას იწვევენ, ორ, ურთიერთსაწინააღმდეგო და ერთმანეთზე ზედდებულ ეფექტს იწვევენ: ისინი აძლიერებენ ტრანსფერაზულ აქტივობას, ზრდიან გლუკურონიდების სინთეზის უბნებამდე სუბსტრატის წვდომას, მაგრამ ამავე დროს მნიშვნელოვანი ფოსფოლიპიდის (საფიქრებელია ფოსფატიდილქოლინის) დაშლას და ფერმენტის ინაქტივაციასაც იწვევენ.

ხანგრძლივი დროის განმავლობაში უცნობი რჩებოდა საკითხი იმის შესახებ, ფერმენტი სტრუქტურულად ლატენტურ მდგომარეობაში იმყოფება, თუ ეს მისი ჰიდროფობული გარემოცვითაა განპირობებული. საკითხის რადიკალური გადაწყვეტა უაღრესად მნიშვნელოვანია გლუკურონიდების წარმოქმნის რეგულატორული მექანიზმებისა და "პლზმტ"-ს კატალიზურ თვისებებში ლიპიდთა ჭეშმარიტი როლის დასადგენად.

აღნიშნულთან დაკავშირებით გამოკვლეულია ფოსფოლიპაზა A-თი და ტრიტონ X-100-ით დამუშავებულ მიკროსომებში ფერმენტის კატალიზური თვისებები. აღმოჩნდა, რომ ინტაქტურ მიკროსომებში ტრანსფერაზული რეაქციები მხოლოდ იმ შემთხვევაში ემორჩილება მიხაელის-მენტენის განტოლებას, თუ საინკუბაციო არეში ფერმენტის კონცენტრაცია 2.5

მომ-ზე მეტია. ორმაგ შებრუნებულ სიდიდეთა მეთოდით აგებული მრუდების გასწორება არ ხდება ამ კონცენტრაციის უფრო დაბალი მნიშვნელობისას. ასეთი კინეტიკური ანომალიის მიზეზი დადგენილი არაა, მაგრამ იგი მაინც ასახავს სუბსტრატის უღვბტ-სთან დაკავშირების უარყოფით კოოპერატიულობას.

ანალოგიური შედეგია მიღებული ურიდინდიფოსფატის (უღვ-ს) კონცენტრაციაზე ფერმენტის დამოკიდებულების შესწავლითაც. ტრიტონ X-100-ით ან ფოსფოლიპაზა A-თი მიკროსომების ხანმოკლე დამუშავებისას ფერმენტის აქტივაციასთან ერთად ადგილი აქვს უღვ-სა და უღვბ-სადმი თვისობის ზრდას. უღვბ-ს კონცენტრაციის ფართო საზღვრებში პირდაპირი და შებრუნებული რეაქციების სიჩქარეები ამ დროს მიხედვის-მენტენის განტოლებას ემორჩილებიან. მიკროსომებზე აღნიშნულ აგენტთა ზემოქმედების გახანგრძლივებისას მსგავსი კანონზომიერება არ ვლინდება. ამავე დროს, ტრიტონ X-100 და ფოსფოლიპაზა A ფერმენტის კინეტიკურ მახასიათებლებზე განსხვავებულად მოქმედებენ.

ტრიტონ X-100-ით მიკროსომების დამუშავებისას უღვ-სა და უგღვ-ს ფერმენტთან დაკავშირების თავისუფალი ენერგია ~1 800 კკალ/მოლით მცირდება. ფერმენტ-სუბსტრატის კავშირის განმტკიცება სუბსტრატის უღვ-ნაწილთან უღვბტ-ს სწრაფვის გაძლიერებითაა განპირობებული. ლვიძლის ინტაქტურ მიკროსომებზე ფოსფოლიპაზა A-ს ზემოქმედებისას ძლიერდება ფერმენტთან უღვ-ს, მაგრამ არა უღვბტ-ს დაკავშირება. ეს იმის მაჩვენებელია, რომ ქვეითდება ფერმენტის თვისობა გლუკურონილის ნაწილთან. ფოსფოლიპაზით დამუშავებულ ფერმენტით წარმართული პირდაპირი რეაქციის სიჩქარე ოთხჯერ აღემატება ინტაქტურს, ხოლო შებრუნებული რეაქციის სიჩქარე პირველი ფერმენტისათვის ერთი რიგით მაღალია მეორეზე. პარალელურად, ინტაქტურ და ტრიტონ X-100-ით დამუშავებულ მიკროსომებში პირდაპირი რეაქციის მაქსიმალური სიჩქარის მნიშვნელობები ერთნაირია, ხოლო შებრუნებული რეაქციისათვის ეს სიდიდე დეტერგენტულ ფერმენტთან შედარებით 3.5-ჯერ მაღალია.

ამგვარად, ის მონაცემები, რომ უღვბტ-ს კინეტიკური პარამეტრები სტიმულაციის სახესთან დამოკიდებულებით მნიშვნელოვან ვარიაციას განიცდიან, უარყოფს ფერმენტის სტრუქტურულ-ლატენტური ფორმით არსებობას და აძლიერებს აგრეთვე არსებულ წარმოდგენას მის არაპირდაპირ ლატენტურობაზე.

დასასრულს დავამატებთ, რომ ცხოველებს, რომელთაც უღვბტ-ს ზოგიერთი ფორმა არ გააჩნიათ (კატებს), ჩვეულებრივ ორგანიზმიდან

ქსენობიოტიკების გამოდევნის უფრო ეფექტური უნარის მქონე სხვა ფერ-მენტული სისტემები აქვთ. მაგ., კატებს განვითარებული აქვთ სულფატ-ტრანსფერაზული, ვირთაგვებს – ეპოქსიდჰიდრატაზული და გლუტათიონ-S-ეპოქსიდტრანსფერაზული და სხვ. სისტემები.

თავი 2. მიკროსოფული ელემენტრონის სატრანსპორტო სისტემები

2.1 მემბრანული ოქსიდაზები და მათი როლი ქსენობიოქიმიში

ბიოლოგიურ ჟანგვაზე წარმოდგენების ქრონოლოგიურ განვითარებას თვალს თუ გავაღვენებთ, ადვილად შევნიშნავთ ერთ პრინციპულ შეუსაბამობას: ნაკლებადაა შეფასებული ისეთი ჟანგვითი რეაქციების როლი, რომელთა მსვლელობაც არაა ენერგეტიკულად შეუღლებული, ანუ რომელთაც თან არ ახლავს ენერგიის ტრანსფორმაცია-აკუმულაცია. მხოლოდ მემბრანათა ზოგიერთი რედოქს-სისტემისთვისაა ნაჩვენები ოქსიგენაზურ რეაქციებში მოლეკულური ჟანგბადის პლასტიკური მიზნებისათვის გამოყენების განუზომელი როლი.

სადღეისოდ დაბეჯითებით შეიძლება ვთქვათ: ბიოლოგიურ მემბრანებში რედოქს-ჯაჭვების არსებობა, რომლებშიც ელექტრონთა ტრანსპორტი ენერგიის აკუმულაციას უშუალოდ არ უკავშირდება, აბსოლუტურ რეალობას წარმოადგენს და უკანა პლანზე მისი გადაწევა არავითარ შემთხვევაში არ შეიძლება. ასეთი დასკვნის გამოტანა, უპირველეს ყოვლისა, ენდოპლაზმური მემბრანებისთვისაა სამართლიანი. მათთვის ცალკეა გამოყოფილი ის ჟანგვითი რეაქციები, რომელთა მექანიზმებითაც ამ ტიპის მემბრანებში ქსენობიოტიკების მოლეკულები გარდაიქმნიებიან და „მიკროსოფული ჟანგვის“ სახელწოდებით არიან ცნობილნი. ესენია ჰიდროქსილაზური და რედუქტაზული რეაქციები, ზეჟანგური ჟანგვის რეაქციები, H_2O_2 -ის წარმოქმნისა და რედოქს-ჯაჭვებში ელექტრონთა გადატანის პარციალური რეაქციები, დეჰიდრირების რეაქციები და სხვ.

ოქსიდაზების საფუძვლიანი კვლევის დაწყება ბერტრანის სახელს უკავშირდება. პირველად მან განახორციელა სუბსტრატთა მიმართ სპეციფიკურობის მიხედვით ამ ფერმენტთა ინდივიდუალური დაყოფა. მანვე გამოიკვლია ოქსიდაზების ქიმიური ბუნება და მცენარეულ ობიექტებში მათი ფართო გავრცელება აჩვენა.

ბერტრანის გამოკვლევებზე დაყრდნობით ლინოსიურმა 1898 წ. გამოყო ფერმენტი, რომელიც გვიაკოლური ფისის დაჟანგვას მხოლოდ წყალბადის ზეჟანგის თანამყოფობისას იწვევდა და მას პეროქსიდაზა უწოდა. რამდენადმე მოგვიანებით (1900 წ.) ლოუმ შეძლო მიეღო ფერმენტი, რომელიც წყალბადის ზეჟანგის დესტრუქციას იწვევდა და მას კატალაზა უწოდა. ამ პერიოდიდან იწყება ოქსიდაზების ფართო მასშტაბით შესწავ-

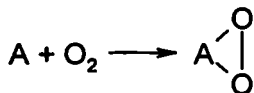
ლა. ფერმენტთა ამ კლასის მიმართ ასეთი ინტერესი სუნთქვისას ჟანგბადის გააქტიურების უნარით იყო გამოწვეული.

ბიოლოგიური ჟანგვის შესწავლაში მნიშვნელოვანი იყო კეილინის მიერ ციტოქრომული სისტემის როლის გამოვლენა სუნთქვაში. სპექტრული ანალიზით მის მიერ იდენტიფიცირებულ იქნა სამი: a, b და c-ტიპის ციტოქრომი. ვარბურგის აზრით, ციტოქრომოქსიდაზა (ვარბურგის მიხედვით – Fe-ენზიმი) წარმოადგენს სუნთქვის ტერმინალურ (ჟანგბადის გამააქტივებელ) ფერმენტ-ოქსიდაზას.

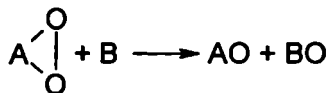
გასული საუკუნის 60-იან წლებში კლინგენბერგმა და გარფინკლმა აღმოაჩინეს ჰემოპროტეინი, რომელსაც b-ტიპის ციტოქრომებისათვის უჩვეულო თვისებები აღმოაჩნდა. დითიონიტით აღდგენილ და CO-სთან დაკავშირებულ მდგომარეობაში იგი ამჟღავნებდა სინათლის შთანთქმას მაქსიმუმით 450 ნმ-ზე. იაპონელმა მკვლევარებმა ომურამ და სატომ დეტალურად შეისწავლეს ამ ჰემოპროტეინის სპექტრული და კინეტიკური მახასიათებლები და ფერმენტს პირობითად „ციტოქრომ P450“ უწოდეს. მათ შეძლეს ეჩვენებინათ, რომ ეს ციტოქრომი უჯრედის სწორედ იმ ფერმენტული სისტემის უძირითადესი კომპონენტია, რომლის ფუნქციასაც ქსენობიოტიკების ჟანგვითი დეგრადაცია წარმოადგენს.

ბიოლოგიურ ჟანგვაში (სუნთქვაში) ჟანგბადის აქტივაციის აუცილებლობაზე პირველი აზრი შონბეიენმა გამოთქვა, ხოლო ამ მოსაზრებამ თავისი მეცნიერული დასაბუთება შენელებულ ჟანგვის ზეჟანგურ თეორიაში შეიძინა, რომელიც ერთდროულად და ერთმანეთისაგან დამოუკიდებლად 1897 წ. ბახმა და ენგლერმა დაამუშავეს (იხ. Бах А.Н., Собрание Трудов по химии и биохимии. Изд. АН.СССР, М, 1990).

გამომდინარე იმ ფაქტიდან, რომ O=O ბმის სრული გაწყვეტისათვის უფრო მეტი ენერგიაა საჭირო, ვიდრე —O—O—ად გარდასაქმნელად, ბახმა და ენგლერმა ჩათვალეს, რომ შენელებული ჟანგვისას ჟანგბადის მოლეკულა სწორედ ასეთ გარდაქმნას უნდა განიცდიდეს. იგი ხორციელდება არამდგრად წონასწორობაში მყოფი აუტოოქსიდაზური ნივთიერებების ხარჯზე, რომლებიც ჟანგბადთან ურთიერთქმედებისას ზეჟანგს წარმოქმნიან.



ზეჟანგი ადვილად იძლევა ჟანგბადის ატომს, რომელიც აქტიური დამჟანგველია:

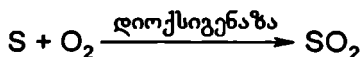


ბაზი-ენგლერის „გააქტიურებული მოლეკულური ჟანგბადით შენელებული ჟანგვის თეორიას“ მიკროსოპული ჟანგვის თანამედროვე წარმოდგენებთან თუ შევაჯერებთ, შეგვიძლია დავასკვნათ, რომ უჯერი, ადვილად დასაჟანგი ნივთიერება—ფერმენტი, რომელსაც შეუძლია ზეჟანგური დაჯგუფების მიერთება და შემდგომ აქტიური ჟანგბადის გადატანა ძნელად დასაჟანგი ნივთიერებაზე, სხვა არაფერია, თუ არა მიკროსოპული ჟანგვის ძირითადი ფერმენტი — ციტოქრომ P450.

მიტოქონდრიული ჟანგვისაგან განსხვავებით, სადაც წამყვანი როლი დეჰიდრირების რეაქციებს ეკუთვნით, ხოლო მოლეკულური ჟანგბადი მხოლოდ წყლის წარმოსაქმნელად გამოიყენება, მიკროსოპული ჟანგვის პროცესში გააქტიურებული ჟანგბადი უშუალოდ ერთვება დასაჟანგი ნივთიერებაში. ამდენად, მიტოქონდრიული და მიკროსოპული ჟანგვის რეაქციათა ფუნქციური როლი ერთმანეთისაგან პრინციპულად განსხვავდება: მიტოქონდრიული ჟანგვა ჟანგბადის გამოყენების მექანიზმია ბიოენერგეტიკული პროცესებისათვის, ხოლო მიკროსოპული ჟანგვა — პლასტიკური მიზნებისათვის.

2.1.1 ოქსიგენაზები

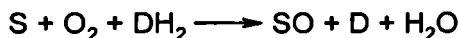
ცხოველურ და მცენარეულ უჯრედებში, აგრეთვე მიკროორგანიზმებში ქსენობიოტიკთა მეტაბოლიზმში მონაწილე ფერმენტებს შორის ოქსიგენაზურ სისტემებს ცენტრალური პოზიცია უკავიათ. მათ მიერ კატალიზებული რეაქციები ერთ უძირითადეს მიზანს ემსახურება, რომელიც უცხო ნივთიერებების მოლეკულაში ჰიდროქსილის ფუნქციური ჯგუფის შეყვანაში მდგომარეობს. ამ უკანასკნელის წყაროს შეიძლება წარმოადგენდეს წყალი ან მოლეკულური ჟანგბადი. ოქსიგენაზებს, რომლებიც ქსენობიოტიკების დასაჟანგად მოლეკულურ ჟანგბადს იყენებენ, დიოქსიგენაზებად და მონოოქსიგენაზებად ყოფენ. პირველები სუბსტრატის (S) მოლეკულაში ჟანგბადის ორივე ატომს რთავენ:



მონოოქსიგენაზები ისე ფუნქციონირებენ, რომ მოლეკულური ჟანგბადის მხოლოდ ერთ ატომს ნერგავენ დასაჟანგი სუბსტრატში, ხოლო მეო-

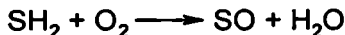
რეს წყალბადე აღადგენენ, ე.ი. ერთდროულად გააჩნიათ ოქსიდაზური და რედუქტაზული თვისებები. ამიტომ მათ შერეული ფუნქციის ოქსიდაზებსაც უწოდებენ. თანამედროვე კლასიფიკაციით მონოოქსიგენაზები მიეკუთვნებიან ოქსიდორედუქტაზების კლასს (EC 1), ოქსიდაზების ქვეკლასს (EC 1.14) და ერთიანდებიან ქვექვეკლასად (EC 1.14.14). მოქმედების მექანიზმის მიხედვით მათ ორ ჯგუფად ყოფენ:

1. ფერმენტებად, რომლებიც თავისი ფუნქციონირებისათვის საჭიროებენ ელექტრონთა გარეგან დონორს ჟანგბადზე მათი შემდგომი გადატანისათვის:



სადაც DH_2 – ელექტრონის გარეგანი დონორი ანუ კოსუბსტრატია.

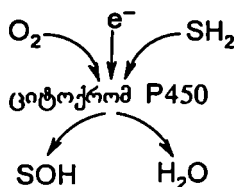
2. ფერმენტებად, რომლებიც არ საჭიროებენ გარეგან რედოქს-ექვივალენტებს და მათ თვით დასაჟანგი (შინაგანი) სუბსტრატის მოლეკულიდან იღებენ:



ასეთი კლასიფიკაციის გარდა, მონოოქსიგენაზები შეიძლება დაიყოს იმის მიხედვით, შეიცავენ თუ არა მათი მოლეკულები მეტალის იონებს ან მათ კომპლექსებს. ყველაზე ხშირად ამ ფერმენტთა შემადგენლობაში სპილენძის ან რკინის იონები იმყოფებიან. მათ მიეკუთვნება ჰემოპროტეინი ციტოქრომ P450 (EC 1.14.14.1).

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

კატალიზურ რეაქციებში, რომლებიც მონოოქსიგენაზური კომპლექსით ხორციელდება, ციტოქრომ P450 თავისებური „აქტიური ცენტრის“ როლს ასრულებს. იგი ურთიერთქმედებს სუბსტრატთან, მოლეკულურ ჟანგბადთან და შესაბამისი დონორებიდან იღებს ელექტრონებს:



ჰემოპროტეინის ურთიერთქმედება ჟანგბადთან, სუბსტრატთან და ელექტრონებთან, ბიოქიმიაში საკმაოდ გავრცელებული მოვლენაა. ამჟამად ცნობილია ოქსიგენაზები, რომლებიც უშუალოდ მოლეკულურ ჟანგბადს კი არ იყენებენ, არამედ მისი ერთი ელექტრონით აღდგენილ ფორმას – სუპეროქსიდულ რადიკალს (მაგ., ინდოლამინ-დიოქსიგენაზა).

რაში მდგომარეობს ოქსიგენაზური რეაქციის ფუნქცია? სადღეისოდ ამ კითხვაზე პასუხი სავსებით ნათელი და ერთმნიშვნელოვანია: ოქსიგენაზური სისტემა პოლიფუნქციურია. ბაქტერიულ და საფუვრის უჯრედებში მათ ძირითადად პლასტიკური ფუნქცია აკისრიათ. ორგანულ ნივთიერებათა ჟანგვის გზით ისინი ამ უჯრედებს ნახშირბადით უზრუნველყოფენ. მცენარეების, ცხოველებისა და ადამიანის უჯრედებში შემონახული პლასტიკური ფუნქციის (ამინომჟავების გარდაქმნების, სტეროლური ჰორმონების, ნაღვლის მჟავების, ბიორეგულატორების და პროსტაგლანდინების სინთეზის, ნაჯერი და უჯერი ცხიმოვანი მჟავების დაშლის და სხვ.) გარდა, მონოოქსიგენაზებმა კიდევ ერთი, დაცვითი ფუნქციაც იტვირთეს. უჯრედში მოხვედრილი უცხო წარმოშობის ჰიდროფობული მოლეკულების ჟანგვით ეს ფერმენტული სისტემა მათ პოლარულ, წყალში ხსნად ნაერთებად გარდაქმნის, რომლებიც შემდეგ ორგანიზმში ან სრულად დეგრადირდებიან, ან გარეთ იდევნებიან. ამგვარად, ციტოქრომ P450-ის თვისებათა განხილვის საფუძველზე შეგვიძლია გავაკეთოთ ზოგადი დასკვნები: მოცემული ჰემოპროტეინი ძლიერ უჩვეულო თვისებების მქონე ფერმენტული ცილაა; ჰიდროქსილირების რეაქციებში იგი რამდენიმე ფუნქციას ასრულებს. ერთი მათგანი – მოლეკულური ჟანგბადის გააქტიურება – არასპეციფიკურია და ყველა ციტოქრომ P450-ისთვისაა დამახასიათებელი; მეორე – სუბსტრატის დაკავშირება – პირიქით, საკმაოდ სპეციფიკურია. სხვადასხვა ციტოქრომები განსხვავებულ სუბსტრატებს იკავშირებენ. ჰემოპროტეინი თავისებური „რეცეპტორული“ ცილის ფუნქციას ასრულებს და სპეციფიკურია არა ერთი რომელიმე სუბსტრატის, არამედ განსაზღვრული კლასის ტოქსიკანტების მიმართ. მიკროსომული ჰემოპროტეინის „რეცეპტორული“ შესაძლებლობები გაფართოებულია კიდევ ერთი, დეტოქსიკაციური ფუნქციის შესრულებასთან დაკავშირებით. პრინციპში, მიკროსომულ ციტოქრომ P450-ს შეუძლია დაიკავშიროს და შემდგომ დაჟანგოს ან აღადგინოს თითქმის ყველა არაპოლარული ნივთიერება.

ცოცხალ სისტემაში ოქსიგენაზური რეაქციები მხოლოდ ორგანულ მოლეკულათა მოდიფიკაციისათვის არ გამოიყენებიან. ამ რეაქციათა უფრო ზოგადი მიზანი დასაჟანგ სუბსტრატთა პოლარობის ზრდაში მდგომარე-

ობს, რაც განსაკუთრებით მნიშვნელოვანია ენდოგენური პიდროფობული ნივთიერებების — სტეროლების, ნახშირწყალბადების და გრძელჯაჭვიანი ცხიმოვანი მჟავების ტიპის მოლეკულებისათვის. პრინციპში, ოქსიგენირება მემბრანის პიდროფობული ფაზიდან ამ ნივთიერებათა წყლოვან ფაზაში მოხვედრის და ტრანსფერაზული რეაქციებით მათი შემდგომი გარდაქმნის ერთადერთ რეალურ გზას წარმოადგენს. გარდაქმნათა ეს სქემა ერთნაირად შესანიშნავად ესადაგება როგორც ენდოგენური წარმოშობის პიდროფობულ მოლეკულებს, ასევე ქსენობიოტიკებს.

ამრიგად, მიტოქონდრიული ჟანგვისაგან და არაცოცხალ ბუნებაში მიმდინარე წვის ნებისმიერი პროცესისაგან განსხვავებით, ოქსიგენაზური რეაქციებით ორგანულ ნივთიერებათა შენელებული ჟანგვა, როგორც წესი, არავითარ ენერგეტიკულ მოთხოვნილებას არ ავსებს და მხოლოდ დამცველ ან პლასტიკურ მიზნებს ემსახურება.

მემბრანული მონოოქსიგენაზა ფერმენტული კომპლექსია, რომელიც ფოსფოლიპიდურ მატრიქსშია ჩაშენებული. რეაქციისათვის საჭირო ელექტრონების წყაროს უმრავლეს შემთხვევაში NADPH წარმოადგენს, საიდანაც აღმდგენელი ექვივალენტები ციტოქრომ P450-ზე ფლავოპროტეინით ტრანსპორტირდება. ამ ფერმენტის სახელწოდებაა NADPH-ციტოქრომ P450-რედუქტაზა (EC 1.6.2.4). მიკროსომულ მემბრანაში იმყოფება კიდევ ორი კომპონენტი, რომლებიც აგრეთვე მონაწილეობენ ქსენობიოტიკების მეტაბოლიზმის რეაქციებში და ელექტრონთა სატრანსპორტო ჯაჭვის შემადგენლობაში შედიან. ესენია NADH-ციტოქრომ b_5 -რედუქტაზა (EC 1.6.2.2) და ციტოქრომ b_5 . ხანგრძლივი პერიოდის მანძილზე ითვლებოდა, რომ აღნიშნული ფერმენტული სისტემა ერთადერთია, რომელიც ენდოპლაზმურ მემბრანაში NADPH-ს ჟანგავს. შემდგომში მიკროსომებიდან იზოლირებულ იქნა კიდევ ერთი NADPH-საეციფიკური ფლავოპროტეინი, რომელიც თავისი მოლეკულური თვისებებით განსხვავდება ციტოქრომ P450-ის შემცველი მონოოქსიგენაზის ფლავოპროტეინისაგან. იგი შესამეული მეთილჩანაცვლებული ამინების N-ჟანგვაში მონაწილეობს. ამიტომ ამჟამად შეგვიძლია ვთქვათ, რომ მიკროსომაში NADPH-ის ჟანგვის ორი ფერმენტული სისტემა ფუნქციონირებს.

დასასრულს უნდა მოვიხსენიოთ მეცნიერები, რომლებიც გასული საუკუნის მეორე ნახევარში მონოოქსიგენაზების კვლევის სათავეებთან იდგნენ:

1956 წ. აქსელროდმა აღწერა ნარკოტიკული პრეპარატების N-დემეთილირება ღვიძლში და დაადგინა ამ რეაქციის ფერმენტული ბუნება;

1956—1958 წლებში კონეიმ და მისმა თანამშრომლებმა, აგრეთვე რე-

მერმა და თანამშრომლებმა გამოავლინეს, რომ ზოგიერთი ქიმიური ნივთიერების, და მათ შორის წამლების გარდაქმნები ხორციელდება ფერმენტებით, რომლებიც ენდოპლაზმურ მემბრანებშია ლოკალიზებული. მათ მიერვე შემჩნეულ იქნა მნიშვნელოვანი ფაქტი: ცხოველებში პოლიციკლური ნახშირწყალბადის (ბენზპირენის) ან ბარბიტურატის (ფენობარბიტალის) შეყვანის შედეგად იზრდება მათი მჟანგველი ფერმენტების აქტივობები.

ამ გამოკვლევებმა მძლავრი ბიძგი მისცა იმ ფერმენტულ სისტემაზე წარმოდგენების განვითარებას, რომლის სახელწოდება დღეს „მიკროსომული მონოოქსიგენაზაა“. ეს სახელწოდება ფერმენტის ორ ნიშან-თვისებას განსაზღვრავს: 1) რეაქციის ტიპს, რომლითაც ქსენობიოტიკი მეტაბოლიზდება; 2) მეტაბოლური აქტივობის მიკროსომულ ლოკალიზაციას, რომელიც ენდოპლაზმური რეტიკულუმის ბიოქიმიური ექვივალენტია.

ორგანიზმთა სრულიად განსხვავებულ სახეობებში ელექტრონთა თავისუფალი ტრანსპორტის რედოქს-სისტემათა ცალკეული კომპონენტებისა და მათი მოლეკულური ორგანიზაციის შესახებ არსებულ მონაცემთა გაანალიზებისას, ყურადღებას იმსახურებს ის გასაოცარი მსგავსება (ზოგიერთი ნიუანსის გამოკლებით), რომელიც ცხოველური და მცენარეული მონოოქსიგენაზებისთვისაა დამახასიათებელი. აქედან გამომდინარე, გასაკვირი არაა, რომ ღვიძლის მჟანგველი სისტემა ყველა ეუკარიოტული ორგანიზმისათვის მემბრანადაკავშირებული ციტოქრომ P450-დამოკიდებული ოქსიგენაზების დასახასიათებლად ამოსავალ მოდელს წარმოადგენს.

უფრო დაწერილობით გავეცნოთ მიკროსომულ ელექტრონის სატრანსპორტო სისტემების ცალკეულ კომპონენტებს.

2.2 რედუქტაზები

2.2.1 NADPH-ციტოქრომ P450-რედუქტაზა (EC 1.6.2.4)

ფერმენტი ენდოპლაზმური მემბრანის ძირითადი რედოქს-ჯგუფის საწყისი კომპონენტია (ხშირად აღნიშნავენ როგორც FP_1 -ს). მისი ფიზიოლოგიური როლი NADPH-დან ციტოქრომ P450-ზე ელექტრონთა გადატანაში მდგომარეობს, რომელთაც ჰემოპროტეინი ჯერ ფერმენტ-სუბსტრატის კომპლექსის, ზოლო შემდგომ სამმაგი კომპლექსის (ფერმენტი-სუბსტრატი- O_2) თანმიმდევრული აღდგენისათვის იყენებს.

რედუქტაზის აქტივობა ორმაგდება ფენობარბიტალით და არ იცვლება

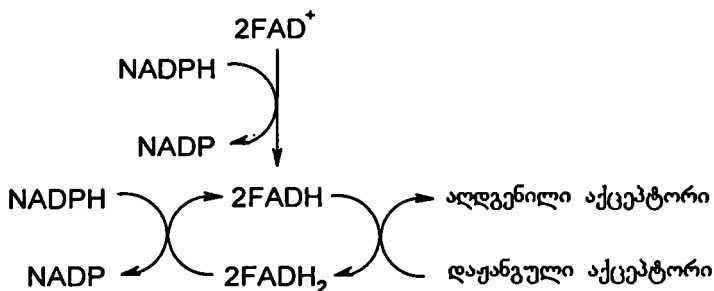
3-მეთილქოლანტრენით. მისი სინთეზი მიკროსომულ მემბრანებზე არსებულ რიბოსომებში ხორციელდება და შემდეგ მემბრანებზე გადაიტანება. იმყოფება რა მემბრანის გარე ზედაპირზე, იგი პროტეაზებისადმი ადვილად მისაწვდომია. ტრიფსინი რედუქტაზას მიკროსომული ცილის იმ ნაწილს აცილებს, რომელიც მემბრანის გარეთაა გამოშვებული. ამ დროს მოლეკულის დანარჩენი ნაწილის სოლუბილიზება არ ხდება. ტრიფსინით სოლუბილიზებული რედუქტაზა ელექტრონული აქცეპტორების აღდგენის უნარს ინარჩუნებს. ჰომოგენურ მდგომარეობამდე ფერმენტი შეიძლება გასუფთავდეს მიკროსომული ფრაქციის ლიპაზებით, იონური და არაიონური დეტერგენტებით ან მათი კომბინაციით დაშუშავების გზით. გასუფთავების ხარისხი ამ დროს 100-ს არ აღემატება. ნატრიუმის დოდეცილსულფატის თანამყოფობისას პოლიაკრილამიდის გელში ელექტროფორეზისას მჟღავნდება 79–80 kD მოლეკულური მასის მქონე ცილის შესაბამისი ძირითადი ზოლი. პროტეოლიზურად მიღებული ფერმენტის მოლეკულური მასა 71 kD-ს არ აღემატება. გამოყოფის ხერხი მნიშვნელოვნად განსაზღვრავს რედუქტაზის კატალიზურ მახასიათებლებსაც. მიკროსომებიდან დეტერგენტებით სოლუბილიზებულ ფერმენტს ციტოქრომ P450-ის აღდგენის უნარი აქვს, ამიტომ ასეთ ფერმენტს ჩვეულებრივ იყენებენ მაჰიდროქსილირებელი სისტემის რეკონსტრუქციის დროს, ციტოქრომ P450-ისა და ფოსფოლიპიდის თანამყოფობისას. პროტეაზებით სოლუბილიზებულ რედუქტაზის პრეპარატებს ელექტრონთა მხოლოდ ხელოვნური აქცეპტორების აღდგენა შეუძლიათ, მაგრამ ციტოქრომ P450-ის აღდგენის უნარი დაკარგული აქვთ. ტრიფსინით სოლუბილიზებული რედუქტაზა ციტოქრომ b_5 -ს მხოლოდ გარემოს მაღალი იონური ძალის პირობებში აღადგენს, ხოლო დეტერგენტებით მიღებულ ფლავოპროტეინს ჰემოპროტეინის აღდგენა მარილთა დაბალი კონცენტრაციების დროსაც შეუძლია. რედუქტაზის იმ ფრაგმენტის სპეციფიკური ფუნქცია, რომელიც პროტეოლიზურად არ სოლუბილიზდება, ბოლომდე გარკვეული არაა. გარემოს იონური ძალის შემცირებისას ფერმენტის ხვედრითი აქტივობაც მცირდება. ნატიური ფორმით რედუქტაზა დიმერს წარმოადგენს და ორი სუბერთეულისაგან შედგება. გამოყოფის მეთოდის მიუხედავად, რედუქტაზა ერთ პოლიპეპტიდურ ჯაჭვზე თითო მოლეკულა FMN-ს და FAD-ს შეიცავს. როგორც ირკვევა, ორივე ფლავინი ცილასთან არაა კოვალენტურად დაკავშირებული და ამიტომ ფერმენტისაგან მათი მოხლეჩა შეიძლება pH-ის დაქვეითებით, ან ხსნარის მაღალი იონური ძალისა და დაბალი ტემპერატურის პირობებში. რედუქტაზის მოლეკულის სტოქსის რადიუსი 4 ნმ-ს

აღწევს, ზოლო სტანდარტული რედოქს-პოტენციალი -310 mV -ის ტოლია. ფერმენტის ამინომჟავური შემადგენლობის ანალიზმა აჩვენა, რომ იგი $\sim 31\%$ -მდე ჰიდროფობულ ამინომჟავურ ნაშთებს, აგრეთვე ცისტეინის 6 და ტრიფტოფანის 1 ნაშთს შეიცავს. თიოლურ ჯგუფებს, როგორც ჩანს, გარკვეული როლი უნდა გააჩნდეთ რედუქტაზისა და NADPH-ის ურთიერთქმედებაში. დაჟანგულ მდგომარეობაში ფლავოპროტეინის შთანთქმის სპექტრი ხასიათდება შთანთქმის სამი მაქსიმუმით 277, 380 და 455 ნმ-ზე და ერთი მზარით 485 ნმ-ზე. განსაზღვრულია მაღალი სისუფთავის ფერმენტის ექსტინქციის კოეფიციენტი 455 ნმ-ზე და იგი $10.7 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ -ის ტოლია.

ციტოქრომ P450-ისაგან განსხვავებით, რედუქტაზა ფორმატა მრავლობითობას არ ამჟღავნებს. იგი მკაცრად სპეციფიკურია NADPH-ის მიმართ და თანაბარი სიჩქარით აღადგენს ერთ- და ორელექტრონიან აქცეპტორებს: ციტოქრომ C-ს, $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ -ს, დიქლორფენოლინდოფენოლს და ზოგიერთ საღებავს. ნეოტეტრაზოლიუმის აღდგენის უნარი იზოლირებულ ფერმენტს მხოლოდ ფოსფატიდილქოლინის დამატების შემდეგ უჩნდება. სხვა ფოსფოლიპიდები, კერძოდ, ლეციტინის უახლოესი ანალოგი ფოსფატიდილეთანოლამინი ამ შემთხვევაში არაეფექტურია. NADPH-რედუქტაზა მნიშვნელოვან თვისობას ამჟღავნებს ციტოქრომ C-ს მიმართ, ამიტომ ფერმენტთა ნომენკლატურაში იგი ხანგრძლივი პერიოდის განმავლობაში მოიხსენიებოდა, როგორც NADPH-ციტოქრომ C-რედუქტაზა. აქვე უნდა შევნიშნოთ, რომ მიკროსომებში ციტოქრომ C-ს შემცველობა მიზეზურია. ელექტრონთა ბუნებრივი აქცეპტორი სადღეისოდ ჯერაც არაა დადგენილი. საყურადღებოა ის ფაქტი, რომ ფლავოპროტეინის თვისობა ციტოქრომ b_5 -ის მიმართ იზრდება და გარემოს იონური ძალის გაორმაგებისას ციტოქრომ C-ს მიმართ თვისობას უტოლდება.

აერობულ პირობებში NADPH-სპეციფიკურ რედოქს-ჯაჭვში ელექტრონთა გადატანისას ფლავინის ორივე ფორმის (FADH -ისა და FADH_2 -ის) ერთდროული აღდგენა ხდება და მათ შორის დინამიკური წონასწორობა მყარდება (ნახ. 16).

აქ ცენტრალური პრობლემა NADPH-დან ციტოქრომ P450-ზე ელექტრონების გადატანაში მდგომარეობს. პირიდინნუკლეოტიდები ორი ელექტრონის დონორებს წარმოადგენენ, მაგრამ ერთი ჰემის შემცველ ციტოქრომ P450-ს მხოლოდ ერთი ელექტრონის მიღება შეუძლია. ამდენად, ცილა, რომელიც NADPH-დან ციტოქრომ P450-ზე ელექტრონთა გადატანას ემსახურება, ერთდროულად უნდა ფლობდეს ორი ელექტრონის



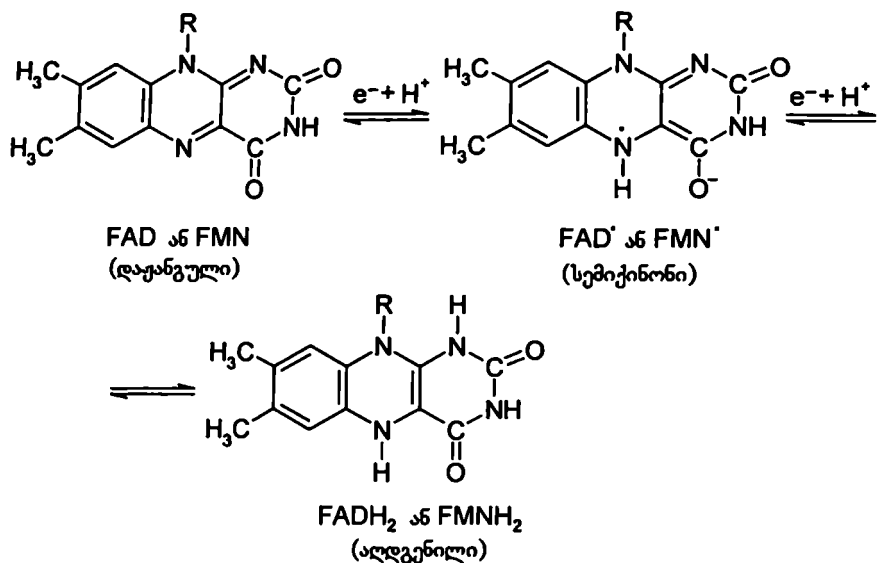
ნახ. 16. FAD-ის აღდგენის რეაქციის მექანიზმი.

აქცეპტორისა და ერთი ელექტრონის დონორის თვისებებს. ეს პრობლემა გადაჭრილია NADPH-ფლავოპროტეინული რედუქტაზით. იგი ერთადერთი ცნობილი ფერმენტი, რომელიც კოფაქტორებად ერთდროულად შეიცავს როგორც FAD-ს, ასევე FMN-ს. რედუქტაზა NADPH-იდან მყისიერად ორ ელექტრონს ღებულობს, მაგრამ მათ ინდივიდუალურად გადასცემს ან რკინა-გოგირდოვან ცილას (მიტოქონდრიაში), ან პირდაპირ ციტოქრომ P450-ს (მიკროსომაში), რადგან ამ შემთხვევაში ელექტრონთა ტრანსპორტში რკინა-გოგირდოვანი ცილების მონაწილეობა აზრს კარგავს.

FAD და FMN კოფერმენტები ვიტამინ რიბოფლავინის წარმოებულებია და იზოალოქსაზინის ბირთვს შეიცავენ. მათი ქიმიური ბუნება ზუსტად შეესატყვისება ზევით განხილული პროცესის სპეციფიკას. როცა სრულად დაჟანგული ფლავინნუკლეოტიდი მხოლოდ ერთ ელექტრონს (წყალბადის ერთ ატომს) იერთებს, წარმოიქმნება იზოალოქსაზინის ბირთვის ნახევრად აღდგენილი (სემიქინონური) ფორმა. მაშასადამე, იგი შეიძლება იმყოფებოდეს დაჟანგულ, ერთი ან ორი ელექტრონით აღდგენილ მდგომარეობებში (ნახ. 17).

აღნიშნული გარემოება იმას განაპირობებს, რომ ფლავოპროტეინების ეს კლასი უფრო მრავალფეროვან რეაქციებს აკატალიზებს, ვიდრე პირინუკლეოტიდური დეჰიდროგენაზები.

რედუქტაზის მოლეკულაში FAD მუშაობს, როგორც ელექტრონების „შესასვლელი“ კარი, რომელთაც იგი NADPH-იდან იღებს. FMN „გამოსასვლელია“, საიდანაც ელექტრონები ინდივიდუალურად (თანმიმდევრულად, მაგრამ არა ერთდროულად) გადაიცემა ციტოქრომ P450-ზე. ამგვარ-



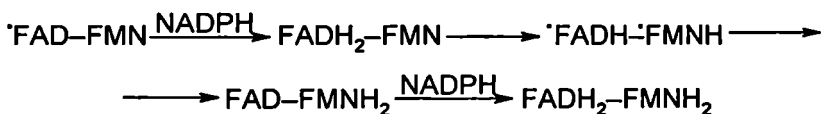
ნახ. 17. FMN-ისა და FAD-ის იზოალოქსაზინის ბირთვი დაჟანგულ, სემიკინონურ (1 ელექტრონით აღდგენილ) ან სრულად (2 ელექტრონით) აღდგენილ მდგომარეობებში.

აღ, ფერმენტს შეუძლია მიიღოს ელექტრონები NADPH-იდან და ისინი „შეინახოს“ ფლავინის ორ კოფაქტორს შორის, ვიდრე მათ ჰემოპროტეინს არ გადასცემს.

ციტოქრომ P450-ზე მეორე ელექტრონი შეიძლება გადატანილ იქნას არამარტო NADPH-რედუქტაზით, არამედ ციტოქრომ b_5 -ითაც, რომელიც, თავის მხრივ, აღნიშნული რედუქტაზით ან მიკროსომასთან დაკავშირებული სხვა ფლავოპროტეინით – NADPH-ციტოქრომ b_5 -რედუქტაზით აღდგება. ციტოქრომ P450-ის გარდა, NADPH-რედუქტაზას შეუძლია ციტოქრომ b_5 -ის დაკავშირება და მისი აღდგენა. დაკავშირება შეიძლება განხორციელდეს ელექტროსტატიკური და ჰიდროფობული ურთიერთქმედებით. NADPH-რედუქტაზისა და ციტოქრომ b_5 -ის მონაწილეობა მონოოქსიგენაზურ რეაქციებში სადღეისოდ აღიარებული ფაქტია. ამ შემთხვევაში კვლავ განსჯის საგნად რჩება საკითხი იმის შესახებ, თუ რატომ საჭიროებენ ციტოქრომ b_5 -ს სპეციფიკური ციტოქრომ P450-ების მიერ კატალიზებული რეაქციები.

ფლავინის ნახევრად აღდგენილ ფორმას ციტოქრომ c-სა და ელექტრონ-თა სხვა აქცეპტორების აღდგენის უნარი არ გააჩნია. ამ რეაქციაში აქტიურ აღმდგენელს მხოლოდ FADH_2 წარმოადგენს. მექანიზმი, რომლითაც ფლავინებს შორის ელექტრონთა შიდამოლეკულური გაცვლა ხდება, სადღეისოდ საკმაოდ დეტალურადაა შესწავლილი. სამაგიეროდ, კვლავ ბუნდოვანია რედუქტაზით ციტოქრომ P450-ის აღდგენის მექანიზმის ბუნება.

რეაქციის სტექიომეტრიის შესწავლამ გამოავლინა, რომ 1 მოლი NADPH აღადგენს 2 მოლ ციტოქრომ c-ს. რეაქციის პროდუქტს NADP-ს გარდა, FAD-იც წარმოადგენს. ამდენად, სუბსტრატის დაჟანგვისა და აქცეპტორის აღდგენის პროცესში ფლავინი ნახევრად აღდგენილიდან სრულად აღდგენილ ფორმაში ციკლურ გადასვლებს განიცდის. რედუქტაზის სრული აღდგენის რეაქციის თანმიმდევრობა ასეთია:



ციტოქრომ P450-ზე ელექტრონების გადატანა $\text{FMNH}_2 \rightarrow \text{'FMNH}$ -ის კატალიზური ციკლით მიმდინარეობს.

რედუქტაზის ფუნქციონირების შესახებ არსებობს განსხვავებული მონაცემებიც, რომელთა თანახმადაც ფერმენტის მოლეკულა ერთ პოლიპეპტიდურ ჯაჭვზე (69 kD მოლეკულური მასით) 2 მოლ ფლავინს შეიცავს. აერობულ პირობებში NADPH-ით აღდგენისას ფლავინის ერთი მოლეკულა სემიქინონის სტაბილურ ნეიტრალურ ფორმაში გადადის და ერთ რადიკალს შეიცავს. სემიქინონი ელექტრონულ-პარამაგნიტური რეზონანსის სპექტრში ($g = 2.00$ ოლქში) დამახასიათებელ სიგნალს იძლევა. ამ შემთხვევაში არ ვლინდება ფერმენტისათვის დამახასიათებელი ციკლის (ნახევრად ან მთლიანად აღდგენილ მდგომარეობათა) არსებობა. ამის გამო გაკეთებულ იქნა დასკვნა, რომ ფლავოპროტეინის აღდგენა ოთხ ერთელექტრონიან სტადიას მოიცავს და სრულად აღდგენილ ფერმენტს ციტოქრომ P450-თან უშუალო ურთიერთქმედება შეუძლია.

მიუხედავად იმისა, რომ გასუფთავებული ფლავოპროტეინი ჟანგბადთან ძალიან ნელა რეაგირებს, მეზბრანაში იგი მნიშვნელოვანი თვითდაჟანგვის უნარით გამოირჩევა და ამიტომ სრული მონოოქსიგენაზური სისტემის მუშაობისას მასზე ადგილი აქვს H_2O_2 -ის გენერირებას. მაღალი იონური ძალის მქონე გარემოში NADPH-სპეციფიკური ფლავოპროტეინის, ციტოქრომ b_5 -ისა და Fe^{2+} -EDTA-ს კომპლექსისაგან ადვილად რეკონსტრუ-

ირდება NADPH-ოქსიდაზური სისტემა. ნაჩვენებია ამ სისტემის მონაწილეობის შესაძლებლობა აზორედუქტაზულ რეაქციებში. გარდა ამისა, გასუფთავებულ ფერმენტს შეუძლია აზოსაღებავების, კერძოდ, დიმეთილ-ამინოაზობენზოლის აღდგენა. რეაქციის კინეტიკა და ინჰიბიტორებისადმი მგრძნობიარობა NADPH-ციტოქრომ P450-რედუქტაზული რეაქციის აღეჭრატურა.

ფლავოპროტეინი უშუალო მონაწილეობას უნდა ღებულობდეს ცხიმოვან მჟავათა ფერმენტულ ზეჟანგურ ჟანგვასა და მეთილჩანაცვლებული მესამეული იმინების აზოტის ატომთა ჟანგვაში. არსებული ფაქტების ანალიზის შედეგად ჩამოყალიბებულია შეხედულება, რომლის თანახმადაც NADPH-რედუქტაზა მაჰიდროქსილირებელ სისტემაში თავისი ძირითადი ფუნქციის – ელექტრონთა გადატანის გარდა, ზოგიერთ სხვა ოქსიგენაზურ და რედუქტაზულ რეაქციებსაც აკატალიზებს.

NADPH-იდან ციტოქრომ P450-ზე ელექტრონების ტრანსპორტისას ორი ცილის ფუნქციურ ურთიერთქმედებას განსაზღვრავს არამხოლოდ ერთმანეთთან დაკავშირებული პროსტეთული ჯგუფების ფიზიკურ-ქიმიური თვისებები, არამედ მაკრომოლეკულების კონფორმაციული მდგომარეობა და თვით დაკავშირების ტიპიც. როგორც დადგინდა, ეს პარამეტრები თავის მხრივ მესამე კომპონენტს – მემბრანულ ფოსფოლიპიდებს საჭიროებენ, რომელთაც ფლავოპროტეინი და ჰემოპროტეინი ფუნქციურ კლასტერს ქმნიან.

2.2.2 NADH-ციტოქრომ b_5 -რედუქტაზა (EC 1.6.2.2)

ენდოპლაზმური მემბრანის ელექტრონის სატრანსპორტო მეორე სისტემა წარმოდგენილია NADH-დამოკიდებული ციტოქრომ b_5 -რედუქტაზითა და ციტოქრომ b_5 -ით. ორივე ცილა ამფიფილური ბუნებისაა. აქვე შევნიშნავთ, რომ ელექტრონთა გადატანის ეს გზა უჯრედის ყველაზე ნაკლებად შესწავლილ ფერმენტულ სისტემას წარმოადგენს. არსებული მრავალი ჰიპოთეზისა და ვარაუდების მიუხედავად, მისი ჭეშმარიტი ფუნქციური როლი ბოლომდე კვლავაც შეუცნობელია.

რედუქტაზა (ხშირად აღნიშნავენ როგორც FP_2 -ს) სუფთა სახით პირველად გამოყოფილ იქნა სტრიტმატერიისა და ველიკის მიერ 1957 წელს. იგი 1 მოლ აპოფერმენტზე 1 მოლ FAD-ს შეიცავს. მოლეკულური მასა დამოკიდებულია სოლუბილიზაციის პირობებზე და 38–41 kD-ს

შეადგენს. მასში არაა გამოვლენილი რკინის ან სხვა რომელიმე ცვალებად ვალენტიანი მეტალის იონის არსებობა. კოფერმენტ-ცილის ურთიერთქმედებას, როგორც ირკვევა, განაპირობებს თიროზინის ნაშთი, რამდენადაც ერთი ფენილის ჯგუფის იოდირება ამ ურთიერთქმედებას აბსოლუტურად აბლოკირებს. საფიქრებელია, რომ აპოფერმენტთან FAD-ის შეკავშირებაში სულფჰიდრილური ჯგუფები არ მონაწილეობენ. *p*-ქლორმერკურიბენზოატით (სულფჰიდრილური შხამით) ან მერსალილით მათი ბლოკირება ფლავინის მიერთებაზე არ მოქმედებს. ამავე დროს, სამიდან ერთ-ერთი თავისუფალი SH-ჯგუფი განსაზღვრავს ცილასთან NADH-ის დაკავშირებას. NADH-ფლავოპროტეინის კომპლექსი აპოფერმენტის SH-ჯგუფს იცავს *p*-ქლორმერკურიბენზოატისა და N-ეთილმალეიმიდის მოქმედებისაგან. ნიკოტინამიდური კოფერმენტის აღდგენილი ფორმა აპორედუქტაზას გაცილებით მტკიცედ უკავშირდება, ვიდრე დაჟანგული ფორმა. კომპლექსის წარმოქმნაში მონაწილეობს NADH-ის ფოსფორიბოზული ნაშთი. სტეკიომეტრია ითვალისწინებს ფერმენტის 1 მოლზე NADH-ის 1 მოლს.

FAD-ის აღდგენა სტერეოსპეციფიკურად ხორციელდება წყალბადის პირდაპირი გადატანით პირიდინული ბირთვის 4A-მდგომარეობიდან ფლავინზე. ელექტრონულ აქცეპტორად ფერიცინინიდის გამოყენებისას სწორედ C-H ბმის გახლეჩა წარმოადგენს რეაქციის სიჩქარის მაღიმიტირებელ სტადიას.

მეტუტთანებისას ფერმენტის ინაქტივაციას თან ახლავს პოლიპეპტიდური ჯაჭვის გაფაშარება და ტრიფტოფანის ნაშთისა და ფლავინის გადასვლა მემბრანის პოლარულ ფაზაში. ცვლილებებს განიცდიან ცისტეინისა და თიროზინის ნაშთებიც, მაგრამ დაშლას მხოლოდ NADH-ის დამკავშირებელი ცენტრი განიცდის.

ფერმენტს უადრესად დაბალი მოლეკულური აქტივობა გააჩნია ჟანგბადისა და ციტოქრომ C-ს, როგორც ელექტრონული აქცეპტორების, და NADPH-ის, როგორც ელექტრონული დონორის მიმართ. სამაგიეროდ, ციტოქრომ b_5 -ისა და $K_3[Fe(CN)_6]$ -ის მიმართ მისი მოლეკულური აქტივობა ძლიერ მაღალია.

გასუფთავებულ ფერმენტს ნეოტეტრაზოლიუმის აღდგენა არ შეუძლია, მაგრამ ციტოქრომ b_5 -ის დამატებისას ჩნდება NADH-ნეოტეტრაზოლიუმ-რედუქტაზული აქტივობა. ციტოქრომ b_5 -ის გავლენით დიქლორფენოლინდოფენოლის აღდგენის სიჩქარე ორმაგდება, ამიტომ მიკროსომებში NADH-დიქლორფენოლინდოფენოლ-რედუქტაზული აქტივობის მხოლოდ

50%-ს აკუთვნებენ ფლავოპროტეინს.

ელექტრონების აქცეპტორად O_2 -ის გამოყენებისას ფლავოპროტეინით NADH-ის დაჟანგვის სიჩქარე ძლიერ დაბალია და ფერიცინილის თანამყოფობისას ჟანგვის სიჩქარის 0.01%-ს უტოლდება. ძლიერ უმნიშვნელოა ფერმენტით NADPH-ის დაჟანგვის სიჩქარეც ფერიცინილისა და ჟანგბადის თანამყოფობისას (0.03%). არსებული მონაცემების საფუძველზე შეიძლება გაკეთდეს დასკვნა, რომ ციტოქრომ b_5 -თან და ფერიცინილთან ფლავოპროტეინის ურთიერთქმედების სიჩქარე მაღალია, ჟანგბადთან კი ძლიერ სუსტი, ანუ ფერმენტს არ აქვს თვითდაჟანგვის უნარი. ელექტრონული დონორების – NADPH-ისა და NADH-ის მიმართ ფლავოპროტეინის თვისობა იმდენად განსხვავებულია (მოლეკულურ აქტივობათა შორის სხვაობა 3–4 რიგისა), რომ ფერმენტი NADH-ისადმი აბსოლუტურად სპეციფიკურად შეიძლება ჩაითვალოს.

NADH-ციტოქრომ b_5 -რედუქტაზული რეაქციის მექანიზმზე შეგვიძლია შემდეგი ვთქვათ: ციტოქრომ b_5 -ის აღდგენა ერთელექტრონიანი გადატანით ხორციელდება. თავდაპირველად ხდება ფერმენტისა და NADH-ის კომპლექსის ფორმირება. რედუქტაზის პირიდინული ბირთვი ურთიერთქმედებს აჟოფერმენტის SH-ჯგუფთან, ხოლო ადენოზინდიფოსფორიბოზის ფოსფატი გარკვეულ ელექტროფილურ ჯგუფს უკავშირდება. პროცესი ძალიან სწრაფია და მთლიანი რეაქციის სიჩქარის ლიმიტირება არ შეუძლია. მომდევნო სტადიაზე ხდება C–H ბმის დაშლა და პირიდინული ბირთვიდან ფლავინზე წყალბადატომის გადატანა. ეს რეაქცია გაცილებით ნელა მიმდინარეობს და მთელი პროცესის სიჩქარის ლიმიტირება შეუძლია. ამ მოსაზრებას ისიც ადასტურებს, რომ NADH-ის სუბსტრატად გამოყენებისას რეაქციის სიჩქარის კონსტანტა (68 მმოლიწმ^{-1}) კორელაციაშია ამ პირიდინუკლეოტიდის დაჟანგვის ჯამური რეაქციის სიჩქარესთან ($68.6 \text{ მმოლიწმ}^{-1}$). ყველაზე სუსტადაა შესწავლილი ფლავოპროტეინიდან ციტოქრომ b_5 -ზე ელექტრონის გადატანის სტადია, მაშინ როდესაც სწორედ მას თვლიან NADH-ციტოქრომ b_5 -რედუქტაზული რეაქციის სიჩქარემალიმიტირებელ სტადიად. მემბრანის ფოსფოლიპიდი ურთიერთქმედებას აადვილებს და რეაქციის სწრაფ მსვლელობას უზრუნველყოფს. NADH-ფერიცინილ-რედუქტაზულ აქტივობაზე ფოსფოლიპიდი გავლენას არ ახდენს.

ტრიტონ X-100-ით დამუშავებული ღვიძლის მიკროსომებიდან გამოყოფილი რედუქტაზა ტიპური ამფიფილური ცილაა (მოლეკულური მასით 43 kD) და 381 ამინომჟავურ ნაშთს (დეტერგენტულ ფრაგმენტს) შეი-

ცავს. პროტეაზული (კატეფსინაზური) დამუშავების შემდეგ ფერმენტს 33 kD მოლეკულური მასა აქვს და 292 ამინომჟაური ნაშთითაა წარმოდგენილი. დეტერგენტულ ფერმენტში არაპოლარული ამინომჟაეების შემცველობა გაცილებით მეტია, ვიდრე პროტეაზულში. დეტერგენტული ფერმენტის ქიმოტრიფსინით დამუშავება 10 kD მოლეკულური მასის მქონე პოლიპეპტიდის მოცილებას იწვევს, რომელიც უპირატესად ჰიდროფობულ ამინომჟაეებს შეიცავს. დეტერგენტული ფერმენტი წყალხსნარში წარმოქმნის 600 kD მოლეკულური მასის აგრეგატებს. NADH-ისა და ციტოქრომ b_5 -ისადმი ორივე ფერმენტის თვისობა ერთნაირია (დეტერგენტული და პროტეაზული ფერმენტისადმი NADH-ის შემთხვევაში K_M შესაბამისად არის 6.0 μM და 2.5 μM , ხოლო ციტოქრომ b_5 -ისათვის – K_M შესაბამისად 45 μM -ს და 10 μM -ს შეადგენს). მიღებული მონაცემების საფუძველზე შეიძლება იმის მტკიცება, რომ კატალიზურად აქტიურ ცენტრს მოლეკულის ჰიდროფობული ნაწილი შეიცავს. სწორედ ასეთი სახით იყო ფერმენტი გამოყოფილი მიკროსომიდან პროტეაზული სოლუბილიზებით. ფერმენტის მთლიანი მოლეკულა ამფიფილური ცილაა, რომლის არაპოლარული ნაწილი მხოლოდ 25%-ია. ამ მდგომარეობაში ფერმენტი ამჟღავნებს მემბრანაში ჩაშენების გასაოცარ უნარს, კერძოდ, იგი 100-ჯერ აღემატება მის ენდოგენურ შემცველობას. მემბრანაში ჩაშენებული რედუქტაზა ფუნქციურად აქტიურია და მტკიცედ უკავშირდება მას ჰიდროფობული ურთიერთქმედების ძალებით. ამავე დროს ფერმენტს მემბრანის სიბრტყეში ადვილად დიფუნდირებისა და ციტოქრომ b_5 -ის რამდენიმე მოლეკულასთან დაკავშირების უნარი აქვს. ხსნარსა და მემბრანაში რედუქტაზისა და ციტოქრომ b_5 -ის ურთიერთქმედების ერთნაირი კინეტიკა საშუალებას გვაძლევს გავაკეთოთ დასკვნა, რომ მემბრანაში არ არსებობს ფლავოპროტეინისა და ციტოქრომ b_5 -ის სპეციალური კომპლექსი. NADH-დამოკიდებული რედოქს-ჯაჭვის მუშაობა მიკროსომის თხევად ფაზაში გადამტანთა შემთხვევით შეჯახებებს უნდა ემყარებოდეს.

დასასრულს აღვნიშნავთ, რომ გამოყოფილია მოცემული ფლავოპროტეინის პოლიმერული ფორმა მოლეკულური მასით 200–400 kD. დოდეცილსულფატის მოქმედებით ეს პოლიმერი 35–39 kD მოლეკულური მასის მქონე სუბერთეულებად იშლება. რედუქტაზის მონომერული ფორმისაგან განსხვავებით, პოლიმერი ციტოქრომ b_5 -ის მიმართ უფრო მოჭარბებულ თვისობას ამჟღავნებს, ვიდრე ფერიცინიდიის მიმართ, ანუ მონომერთან შედარებით რედუქტაზის პოლიმერული ფორმა უფრო „ფიზიოლოგიურია“.

2.3 ციტოქრომ b₅

მიკროსომულ მემბრანებში არსებული b-ტიპის ციტოქრომული ცილები სადღეისოდ საფუძვლიანადაა შესწავლილი. ისინი ფართოდ არიან გავრცელებული სრულიად განსხვავებულ ობიექტებში. ამ ჯგუფის წარმომადგენელი ციტოქრომ b₅ იდენტიფიცირებულია ღვიძლისა და ტვინის ქსოვილებში, ცხიმოვან ქსოვილებში, უმაღლეს და უმაღლეს მცენარეთა ორგანოებში, მიკროორგანიზმებში, ანაერობულად მზარდ საფუერებში და სხვ. იგი ნაპოვნია ღვიძლის უჯრედების ყველა მემბრანაში, მიტოქონდრიის შიდა მემბრანის გარდა. ციტოქრომ b₅ მტკიცედ უკავშირდება უჯრედის ორგანოებს და ამიტომ ხსნადი ფორმით მისი მიღება მხოლოდ ფერმენტული ჰიდროლიზის შედეგადაა შესაძლებელი. ამ შემთხვევაში მიღებული ჰემოპროტეინი კი ცხადია, სრულიადაც არ შეესაბამება ნატიური ცილის სტრუქტურას.

მოცემული ციტოქრომი გამოყოფილია მონომერის სახით, რომელსაც 11–13 kD მოლეკულური მასა გააჩნია. მისი მოლეკულა 1 მოლ აპოფერმენტზე 1 მოლ რკინა-პროტოპოროფერინ IX-ს შეიცავს. ციტოქრომ b₅ ამფიფატური ცილაა, რომელშიც ჰიდროფობული უბნის სიდიდე უფრო მეტია (მთელი მოლეკულის 25%), ვიდრე ფლავოპროტეინში. ჰიდროფობული ნაწილი, რომელიც მთლიანი ჰემოპროტეინის ~35%-ს შეადგენს, მემბრანაშია ჩაძირული და გარეთ მყოფი ცილის დიდი ნაწილისათვის, NADPH-ციტოქრომ P450-რედუქტაზის მსგავსად, დამჭერი „ლუზის“ როლს ასრულებს. დაჟანგული ფორმით ჰემოპროტეინი კარგად გამოსახულ შთანთქმის მაქსიმუმს 413 ნმ-ზე ავლენს, ხოლო აღდგენილი ფორმა ასევე კარგად გამოსახულ შთანთქმის მაქსიმუმს 424, 525 და 556 ნმ-ებზე აძლავნებს.

გასუფთავებული ჰემოპროტეინი აღდგება დითიონიტით, ცისტეინით, ასკორბატით და ფერმენტულად, NADH-ციტოქრომ b₅-რედუქტაზით. იგი იჟანგება ციტოქრომ c-თი, FeCl₂-ით და სათანადო რედოქს-პოტენციალის მქონე საღებავებით. ჟანგბადით იგი ძალიან ნელა იჟანგება. ნახშირბადის მონოოქსიდთან, აზიდთან და ციანიდთან ეს ჰემოპროტეინი არ რეაგირებს, ხოლო მჟავებისა და ტუტეების ზემოქმედებისაღმი საკმაოდ მდგრადია. ნახშირბადის მონოოქსიდი და ციანიდი, როგორც ლიგანდები, ცილა-ჰემატოპეიმის კომპლექსში რკინას კოორდინაციულად უკავშირდებიან. მიუხედავად იმისა, რომ ეს პროცესი რკინასთან კოორდინირებული ცილის ჯგუფების ჩანაცვლებით მთავრდება, ციანიდშემცველ სისტემას NADH-ციტოქრომ b₅-რედუქტაზასთან რეაგირების უნარი მაინც შენარჩუნებული აქვს.

მემბრანაში ციტოქრომ b_5 -ის აღდგენის პირობების შესწავლამ აჩვენა ელექტრონთა გადატანის NADH-სპეციფიკური სისტემის კომპონენტთა არაკლასტერული ორგანიზაცია. როგორც ირკვევა, ამ რედოქს-ჯაჭვში კომპონენტების ურთიერთქმედება მემბრანაში მათი დიფუზიური ძვრადობითაა განპირობებული.

ციტოქრომ b_5 -ის გასუფთავებული პრეპარატები pH 7.0-ზე და 20°C-ზე, უპირატესად დაბალსაინური კომპლექსების სახით არსებობენ. ელექტრონულ-პარამაგნიტური რეზონანსის მეთოდით პრეპარატში ნაპოვნია მაღალსაინური კომპლექსის მინარევიც, ხოლო pH 11.0-ზე შთანთქმის სპექტრები ძირითადად მაღალსაინური კომპლექსების შემცველობას აჩვენებენ.

საბოლოოდ დაზუსტებულია ციტოქრომ b_5 -ის რედოქს-პოტენციალი. ზანგრძლივი დროის მანძილზე ითვლებოდა, რომ ეს სიდიდე იზოლირებული ციტოქრომისათვის pH 7.0-ზე და 25°C-ზე +20 mV-ს შეესაბამებოდა. მემბრანაში ჩაშენების შემდეგ კი ეს მნიშვნელობა -30 mV-მდე შეიძლებოდა დაქვეითებულიყო. შემდგომში ჩატარებულმა გაზომვებმა სარწმუნოდ აჩვენეს, რომ ორივე შემთხვევაში ჰემოპროტეინის რედოქს-პოტენციალი ერთნაირია და +25 mV-ის ტოლია. მაშასადამე, ციტოქრომ b_5 -ის მემბრანაში ჩაშენებას მისი მოლეკულური თვისებების ისეთი ძლიერი ცვლილებები არ ახლავს, რასაც მისი რედოქს-პოტენციალისა და თვითუანგვის სიჩქარის შეცვლა შეუძლია. მემბრანაში ციტოქრომ b_5 -ის აღდგენის რეაქციის ლიმიტირებას ფლავოპროტეინთან მისი ურთიერთქმედების სიჩქარე უნდა ახდენდეს.

ციტოქრომ b_5 -ის მოლეკულაში ერთი პემის ჯგუფია, ხოლო პროსტეტულ ჯგუფს პროტოპემი წარმოადგენს, რომელიც პორფირინის გვერდითი ჯაჭვით არაა ცილასთან კოვალენტურად დაკავშირებული. შემავებული წყლიანი აცეტონით დამუშავების შემდეგ ცილიდან პროტოპემის მოცილებით დარჩენილ აპოციტოქრომ b_5 -ს სხვა მეტალოპორფირინებთან დაკავშირება შეუძლია. მეორე მხრივ, პორფირინები (მეტალის გარეშე), ან მეტალოპორფირინები, რომლებშიც მეტალის კოორდინაციული რიცხვი ექვსზე ნაკლებია, აპოციტოქრომ b_5 -ს სუსტად უკავშირდებიან. ყველა რეკონსტრუირებული ცილა-რკინაპორფირინის კომპლექსი აღდგენას განიცდის NADH-ციტოქრომ b_5 -რედუქტაზული სისტემით. კობალტ- და მანგანუმპორფირინის კომპლექსები ელექტრონთა გადატანის რეაქციების კონკურენტული ინჰიბიტორები აღმოჩნდნენ.

პროსტეტულ ჯგუფთან ცილის ურთიერთქმედება ციტოქრომ b_5 -ის მთლიანი სტრუქტურის სტაბილიზებას იწვევს. ამასთან, დადგინდა, რომ

შარდოვანას, pH-ის დაბალი მნიშვნელობებისა და ტრიფსინის ზემოქმედების მიმართ მეტალოპოროფირინის ცილური კომპლექსები აპოციტოქრომთან შედარებით ნაკლებ მგრძნობიარენი არიან.

დეტალურადაა შესწავლილი ციტოქრომ b_5 -ის მეორეული და მესამეული სტრუქტურები. პროტეაზული დამუშავების შედეგად გამოყოფილი ციტოქრომ b_5 ერთ პოლიპეპტიდურ ჯაჭვზე თიოზინის სამ და ტრიფტოფანის ერთ ნაშთს შეიცავს. გოგირდშემცველი ამინომჟავები მის შემადგენლობაში ნაპოვნი არაა. ცნობილია, რომ ჰემის რკინა აპოფერმენტთან დაკავშირებულია ჰისტიდინის ორი იმიდაზოლური ჯგუფით. აპოფერმენტის ნუკლეოფილური ჯგუფები და ლიზინის E-ამინოჯგუფი ჰემის აპოფერმენტთან დაკავშირებაში არ მონაწილეობენ. ჰემის რკინის ლიგანდური ურთიერთქმედება აპოფერმენტთან ძლიერ წააგავს მთავლობინის მოლეკულაში ამგვარ ურთიერთქმედებას, თუმცა ამ ცილათა ფუნქციები ერთმანეთისაგან მკვეთრად განსხვავდება. სხვადასხვა ფიზიკური მეთოდების (კრისტალოგრაფიული რენტგენოსტრუქტურული ანალიზის, ცირკულარული დიქროიზმისა და ოპტიკური ბრუნვის დისპერსიის) გამოყენებამ შესაძლებელი გახადა მოცემული ჰემოპროტეინის სივრცობრივი კონფორმაციის სრული რეკონსტრუქცია 0.28 ნმ-ის სიზუსტით. ნაჩვენები იქნა, რომ მოლეკულაში არსებობს პოლიპეპტიდური ჯაჭვების მეორეული სტრუქტურისათვის დამახასიათებელი ყველა ტიპი: ~18% სპირალური, 42% β -მწკობრი სტრუქტურა და 40% მოუწესრიგებელი პოლიპეპტიდური ჯაჭვები. ციტოქრომ b_5 -ის მოლეკულა ელიფსოიდურია $2.5 \times 2.5 \times 3.2$ ნმ ზომებით. ჰემი მთლიანად მოლეკულის ჰიდროფობული სივრცის შიგნით იმყოფება და მხოლოდ პროპიონმჟავას ნაშთი გამოდის აპოფერმენტის ზედაპირზე. პროტოჰემის ცილასთან pH-დამოკიდებული ურთიერთქმედების გამოკვლევით შესაძლებელი გახდა დადგენილიყო, რომ ჰისტიდინის სულ მცირე, ერთი ნაშთი მაინც რკინასთანაა კოორდინირებული. ეს მოსაზრება მიღებულ იქნა ცილის დამუშავებით დიაზოტირებული სულფანილის მჟავათი. ამ დროს იმიდაზოლის ერთი ჯგუფი მოდიფიკაციას განიცდის და ამის შედეგად აპოციტოქრომ b_5 ჰემთან დაკავშირების უნარს კარგავს. გარდა ამისა, დადგენილ იქნა, რომ:

1. არც თიოეთერული და არც თიოლური ჯგუფები რკინასთან ურთიერთქმედებაში არ შედიან იმ უბრალო მიზეზის გამო, რომ ციტოქრომ b_5 -ის შემადგენლობაში არაა ნაპოვნი მეთიონინი და ცისტეინი;
2. კოორდინირებაში არ მონაწილეობენ ლიზინის E-ამინოჯგუფებიც, რამდენადაც აცეტილირება გავლენას არ ახდენს რკინასთან ცილის დაკავ-

შირების უნარზე;

3. შესაძლებელია თიროზინის ყველა ნაშთის იოდიზირება. მიუხედავად ამისა, ეს გავლენას არ ახდენს ცილასთან პროსტეული ჯგუფის დაკავშირების უნარზე.

ლიზინის რვა ნაშთისა და ცილის α -ამინოჯგუფების სუქცინილირება, ისევე როგორც ამ ჯგუფების აცეტილირება, მოლეკულის სპექტრულ და ფერმენტულ თვისებებზე გავლენას არ ახდენს. იმისაგან დამოუკიდებლად, რომ ასეთი დამუშავების შემდეგ pH 7-ზე დადებითი მუხტი უარყოფითით იცვლება, მოდიფიცირებული აპოციტოქრომ b_5 პროტოპეპტიდან მაინც რეკომბინირდება და ჰემოპროტეინის თვისებების მქონე პროდუქტი წარმოიქმნება. განსხვავებული შედეგები იქნა მიღებული აპოციტოქრომ b_5 -ის ჰიკინის მჟავითი დამუშავებისას. ყველა ამინოჯგუფის ტრინიტროფენილირებით მიიღება პრეპარატი, რომელიც პროტოპეპს სუსტად უკავშირდება და ასეთ მოდიფიცირებულ კომპლექსს NADH-ციტოქრომ b_5 -რედუქტაზასთან რეაქციაში შესვლა აღარ შეუძლია. საინტერესოა ის განსხვავებები, რომელსაც ციტოქრომ b_5 ამჟღავნებს ქიმიური და ფერმენტული ზემოქმედების მიმართ. მაგ., მიუხედავად იმისა, რომ შედარებით მსუბუქად მიმდინარეობს ლიზინის ამინოჯგუფის მოდიფიკაცია, ცილა საკმაოდ მდგრადია ტრიფსინის ზემოქმედების მიმართ.

ღვიძლიდან გამოყოფილი ჰემოპროტეინის პრეპარატის კვლევამ ორი ციტოქრომ b_5 -ის შემცველობა აჩვენა, რომლებიც ერთმანეთისაგან ელექტროფორეზული და DEAE-ცელულოზაზე ქრომატოგრაფიული ძერადობით განსხვავდებიან. მესამე ციტოქრომ b_5 , რომელიც პირველი ორისაგან გამოირჩევა, მიტოქონდრიის გარე მემბრანიდანაა გამოყოფილი. სადღეისოდ მიტოქონდრიაში იდენტიფიცირებულია ციტოქრომ b_5 -ის სამი ფორმა, რომლებიც ერთმანეთისაგან მემბრანულ სტრუქტურებთან კავშირის სიმტკიცითა და იმუნოლოგიური თვისებებით განსხვავდებიან. წარმოადგენენ თუ არა გამოყოფილი ციტოქრომ b_5 -ის პრეპარატები პროტეაზული ჰიდროლიზის პროდუქტებს, ან მჟღავნდება თუ არა მათი ჰეტეროგენურობა, ჯერჯერობით კვლავაც დაუდგენელია. ამ მიმართულებით საყურადღებო კვლევა ჩაატარეს იაპონელმა სპეციალისტებმა იტომ და სატომ. მათ პირველებმა აჩვენეს, რომ ციტოქრომ b_5 -ს თუ დეტერგენტული სოლუბილიზებით გამოვყოფთ და არა პროტეაზულად, მაშინ მიიღება მონომერი, რომელსაც ჩვეულებრივ ჰემოპროტეინზე ორჯერ მეტი (24–26 kD) მოლეკულური მასა ექნება. ეს მონომერი ძლიერ ჰიდროფობულია და პოლიმერიზაციის მიმართ მაღალი სწრაფვა აქვს, რისი თავიდან აცილებაც 4.5 მოლარობის

შარდოვანათი შეიძლება. აღნიშნულ ავტორთა თანახმად, პროტეაზული დამუშავებით სოლუბილიზებას განიცდის ციტოქრომ b_5 -ის მხოლოდ ფერმენტულად აქტიური ნაწილი. მოლეკულის მეორე, ჰიდროფობული ნაწილი კი მემბრანაში რჩება და ცილა-ლიპიდურ კომპლექსთან მთლიანი მოლეკულის დაკავშირებაზე პასუხისმგებელი. ამის საპირისპიროდ, დეტერგენტს მემბრანიდან ჰემოპროტეინი სრულად გამოაქვს.

საკითხი ამჟამად იმ წარმოდგენების სასარგებლოდ წყდება, რომლის თანახმადაც პროტეაზულად ან ლიპაზურად მიღებული 11–13 kD მოლეკულური მასის მქონე ციტოქრომი მთლიანი მოლეკულის ფერმენტულად აქტიურ ფრაგმენტს წარმოადგენს. ამდენად, ლიპიდის მიკროსომებში ორგვარი ციტოქრომ b_5 -ის არსებობა და მისი ჰეტეროგენულობა ნაკლებ სარწმუნო ხდება.

მემბრანაში ციტოქრომ b_5 -ის დამატებითი რაოდენობით ჩაშენებისას მისი აღდგენის სირქარე კი არ მცირდება, არამედ იზრდება. ამ ფაქტის ახსნა შეიძლება, თუ დავუშვებთ, რომ ჩაშენების შედეგად ციტოქრომის მოლეკულებს შორის მანძილი იმაზე უფრო მოკლდება, რაც ურთიერთშეჯახებებისა და ელექტრონების გადასაცემად აუცილებელი. პრონაზით დამუშავების შემდეგ ციტოქრომ b_5 სრულად სცილდება მემბრანას და ამის შედეგად მისი აღდგენის სირქარე მკვეთრად ქვეითდება. როგორც ჩანს, ეს იმის მიზეზია, რომ ფლავოპროტეინის „განზავება“ და მოლეკულათაშორისი მანძილების გაზრდა ხდება. NADH-რედოქს-ჯაჭვს თუ მემბრანაში გადამტანთა შემთხვევითი დაჯახებების პრინციპით მომუშავე სისტემა გაწვიხილავთ, ეს მიდგომა ექსპერიმენტულად დამაჯერებლად დასაბუთდება.

2.4 ფოსფოლიპიდი – მიკროსომული მემბრანის ელექტრონის სატრანსპორტო სისტემის აუცილებელი კომპონენტი

კატალიზური ფუნქციის განსაზოციელებლად მიკროსომული ჟანგვის სისტემა აუცილებლად საჭიროებს ფოსფოლიპიდებს. ეს აუცილებლობა უფრო თვალსაჩინო ხდება იმ ფაქტითაც, რომ ამ სისტემაში ფოსფატიდილქოლინი წარმატებით შეიძლება შეცვალონ მისმა სინთეზურმა ანალოგებმა – დილაუროილ-გლიცეროლ-3-ფოსფორილქოლინმა და დიოლეილ-3-ფოსფორილქოლინმა. ეს ანალოგები ეფექტურებია იმავე დონით, როგორითაც ლეციტინი. სწრაფი კინეტიკის მეთოდის გამოყენებით ნაჩვენებია

იქნა NADPH-რედუქტაზით ციტოქრომ P450-ის ფერმენტული აღდგენის რეაქციაში ფოსფოლიპიდთა აუცილებელი თანამყოფობა. ფოსფოლიპიდთა მონაწილეობისა და როლის საფუძვლიანი ანალიზი გვჩვენებს, რომ ისინი მიკროსომული ჰიდროქსილირების ყველა სტადიაში არიან ჩართულნი და NAD(P)H-დამოკიდებული ელექტრონთა სატრანსპორტო სისტემის შეუცვლელ კომპონენტებს წარმოადგენენ.

ინდივიდუალურ ციტოქრომ P450-ზე ფოსფოლიპიდების ზემოქმედების ერთ-ერთი გზა ამ ჰემოპროტეინის α -სპირალური კონფორმაციის შემცველობისა და სტაბილურობის ზრდაში მდგომარეობს. ამ დროს ადგილი აქვს ცილის სპინური მდგომარეობის ცვლილებებსაც.

ჰიდროქსილირების პროცესზე ლიპიდების გავლენის მეორე გზა გულისხმობს მემბრანაში მათი ფიზიკური მდგომარეობის ცვლილებებს ტემპერატურის ზრდის ან სხვა რაიმე ზემოქმედების პირობებში. გელიდან თხევადრისტალურ მდგომარეობაში ფაზური გადასვლისას შეიძლება დაქვეითდეს ფერმენტულ რეაქციათა აქტივაციის ენერგია, რაც უეჭველად პროცესის მაღლიმიტირებელ სტადიაზე ფოსფოლიპიდ-ცილის ურთიერთქმედების გავლენით აიხსნება. ფოსფოლიპიდების ფაზურ გადასვლათა მიმართ განსაკუთრებული მგრძნობიარე ციტოქრომ P450-ის რედუქტაზით აღდგენის სტადიაა. თვით რედუქტაზის მდგომარეობის ცვლილება, როგორც ჩანს, მიკროსომული ჟანგვის პროცესზე უშუალოდ არ მოქმედებს, რამდენადაც მისი ჟანგვის აქტივაციის ენერგია (50–58 კჯ/მოლი) ტემპერატურის ფართო ინტერვალში არ იცვლება და ამდენად, ლიპიდთა ფაზური გადასვლის ცვლილებებს არ ემორჩილება.

დასასრულს აღვნიშნავთ, რომ მიკროსომულ მემბრანათა ფოსფოლიპიდების სტრუქტურა თვითონ გამორიცხავს ელექტრონულ-სატრანსპორტო ჯაჭვში მათი, როგორც უშუალო კომპონენტების შესაძლო როლს. მიკროსომულ ჟანგვაში ფოსფოლიპიდების გავლენა, უპირველეს ყოვლისა, უნდა აიხსნას მაჰიდროქსილირებელი სისტემის ინდივიდუალურ კომპონენტებზე მათი ფიზიკური, და არა ქიმიური ზემოქმედებით.

2.5 ციტოქრომ P450

2.5.1 აღნაგობა და თვისებები

ციტოქრომ P450 ჰემშემცველი პროტეინების ოჯახს მიეკუთვნება. მას ბუბმწოვართა ყველა ტიპის უჯრედი შეიცავს მომწიფებული ერითროციტე-

ბისა და ჩონჩხის კუნთების გარდა. იგი ფართოდაა გავრცელებული მცენარეულ და მიკრობულ სამყაროში; გვხვდება პროკარიოტებშიც. ფერმენტი აკატალ-იზებს სხვადასხვა სტრუქტურის მქონე კომპონენტების ჟანგვას. სუბსტრატებს წარმოადგენენ როგორც ენდოგენურად სინთეზირებული ნაერთები (სტეროლები, ცხიმოვანი მჟავები, პროსტაგლანდინები, ლეიკოტრიენები და სხვ.), ასევე ქსენობიოტიკები. მცენარისა და მიკროორგანიზმების ციტოქრომ P450-ის მიერ ორგანულ ქსენობიოტიკთა ჟანგვის უნარს სულ უფრო ხშირად იყენებენ გარემოს რემედიაციული მიზნებისათვის.

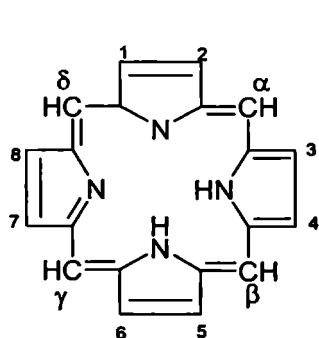
მემბრანიდან ნატიური ფორმით ციტოქრომ P450-ის სოლუბილიზება ხანგრძლივი პერიოდის განმავლობაში ვერ ხერხდებოდა. ამის მიზეზი მისი უაღრესად მაღალი ლაბილურობაა, რის გამოც იგი ადვილად გარდაიქმნება (განიცდის კონვერსიას) არააქტიურ ციტოქრომ P420-ად. კონვერსია მარტო სოლუბილიზებისას არ შეინიშნება. მას ადგილი აქვს მემბრანაზე ნეიტრალურ მარილთა მაღალი კონცენტრაციებით, ტრიფსინით, ლიპოლეკტინით, *p*-ქლორმერკურიბენზოატი, ორგანულ გამხსნელებითა და სხვა ნაერთებით ზემოქმედებისას. არც ერთი მათგანი მემბრანიდან ფერმენტის სოლუბილიზებას არ იწვევს. ფერმენტის მონომერის მოლეკულური მასა pH 9.5-ზე ~150 kD-ს შეადგენს.

აერობულ პირობებში ორივე ციტოქრომი დითიონიტით სრულად აღდგება. გაცილებით ნაკლები ხარისხით აღდგენა შეინიშნება NADPH-ით და თითქმის არ აღადგენს NADH. როგორც აერობულ, ასევე ანაერობულ პირობებში ასევე არაეფექტურია ასკორბატი.

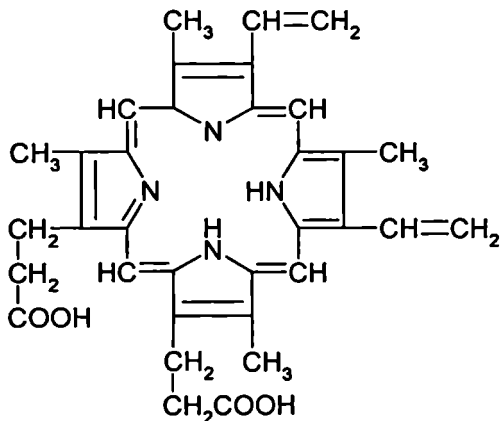
დითიონიტით აღდგენის შემდეგ ციტოქრომ P450-ს ორი ელექტრონის მიღება შეუძლია, რაც იმაზე მიუთითებს, რომ ჰემოპროტეინში ჰემური რკინის გარდა, ელექტრონის კიდევ ერთი აქცეპტორი არსებობს.

ელექტრონის სატრანსპორტო სისტემებში ციტოქრომ P450-ის ფორმები ტერმინალური აქცეპტორის როლს ასრულებენ. ეს სისტემები ძირითადად ენდოპლაზმურ და მიტოქონდრიულ მემბრანებშია. ისევე, როგორც ყველა სხვა ციტოქრომი, P450-იც რკინა-პორფირინის პროსტეტულ ჯგუფს შეიცავს და ამით იგი ჰემოგლობინისა და მيوგლობინის მსგავსია. პორფირინის ბირთვს შეიცავენ არამარტო ჰემშემცველი ფერმენტები, არამედ მწვანე მცენარეთა ქლოროფილებიც. იგი ტეტრაპიროლური ნაერთის — პორფირინის საწყისი წარმოებულა. განსაკუთრებით ფართოდ არიან გავრცელებული პროტოპორფირინები. მათი მოლეკულები შედგება ოთხი მეთილის, ორი ვინილის ჯგუფებისაგან და პროპიონმჟავას ნაშთისაგან. რამდენადაც პროტოპორფირინები სამი განსხვავებული სახის ჩამნაცვლებელს

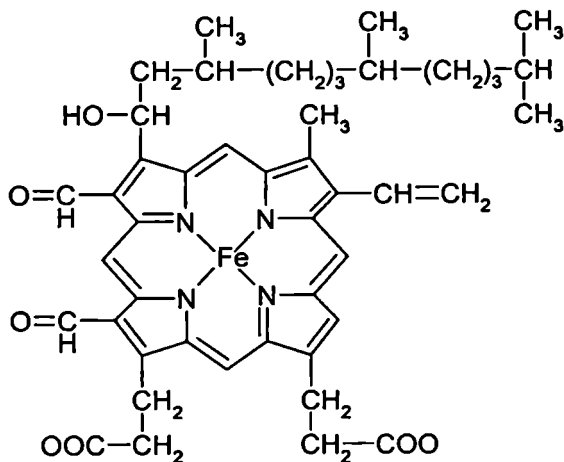
შეიცავს, მათ შუგლიათ თხუთმეტი იზომერული ფორმით არსებობა, გვერდითი ჯაჭვის რვა შესაძლო მდგომარეობაში ჩანაცვლებულების განლაგების რიგისაგან დამოკიდებულებით. ამ იზომერებიდან საყურადღებოა პროტოპორფირინ IX, რომელსაც ციტოქრომ P450 შეიცავს. მოგვყავს პორფირინის, პროტოპორფირინ IX-ისა და პროსტეული ჯგუფის სტრუქტურული ფორმულები.



პორფირინი



პროტოპორფირინ IX



ციტოქრომების პროსტეული ჯგუფი (პეზი-A)

პროტოპორფირინი „ოთხბირთვიან“ კომპლექსებს წარმოქმნის რკინის, მაგნიუმის, თუთიის, კობალტისა და სპილენძის იონებთან. პროტოპორფირინის ხელატურ კომპლექსს Fe(II) -თან პროტოპეში, ანუ უბრალოდ პეში ეწოდება. ანალოგიური კომპლექსი Fe(III) -თან პეშინის, ანუ პემატინის სახელწოდებას ატარებს. პეშში პორფირინის ოთხი ლიგანდური ჯგუფი რკინასთან წარმოქმნის კომპლექსს, რომელსაც ბრტყელი აღნაგობა აქვს, ხოლო რკინის მეხუთე და მეექვსე კოორდინაციული კავშირი პორფირინის ბირთვის სიბრტყის პერპენდიკულარულია. მიოგლობინში და ჰემოგლობინში მეხუთე მდგომარეობა დაკავებულია ჰისტიდინის იმიდაზოლური ჯგუფით, ხოლო მეექვსე ჩაუნაცვლებელი რჩება ან ჟანგბადითაა დაკავებული. ყველა ცნობილი ციტოქრომის პეშის რკინა დაკავშირებულია პორფირინის ბირთვის პიროლის აზოტის ოთხ ატომთან. მეხუთე აქსიალური (პერპენდიკულარულ მდგომარეობაში მყოფი) ლიგანდი მასთან ცისტეინის ნაშთის მერკაპტიდული ჯგუფით კავშირდება, ხოლო მეექვსე შეიძლება სხვა ლიგანდით (მაგ. ჟანგბადით, ნახშირბადის მონოოქსიდით, ციანიდით და ა.შ.) იყოს ჩანაცვლებული. ბუნებრივია, ჰემოპროტეინების კოორდინაციული კომპლექსის ფიზიკური მახასიათებლები დამოკიდებული უნდა იყოს მეხუთე და მეექვსე ლიგანდებზე, რომლებიც პეშის პროსტეტულ ჯგუფს უკავშირდებიან.

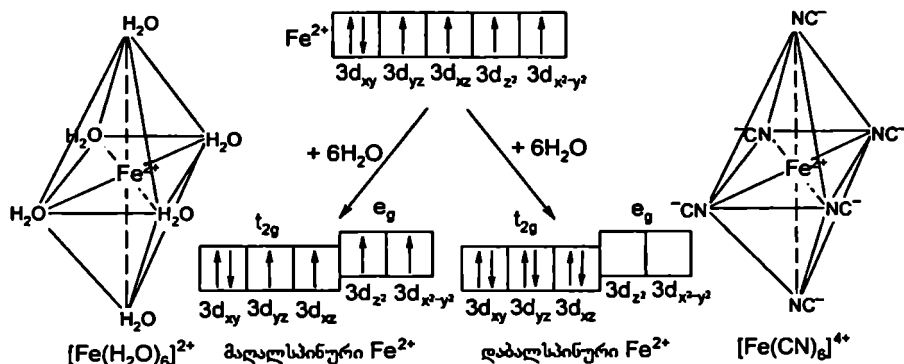
ციტოქრომ P450-ში მეხუთე და მეექვსე ლიგანდების ბუნება საბოლოოდ არაა დადგენილი. ცნობილია, რომ სისტემები, სადაც მეხუთე ლიგანდს გოგირდის ატომი, ხოლო მეექვსეს – იმიდაზოლის აზოტი წარმოადგენენ, ყველაზე ოპტიმალურად მოდელირებენ ჰემოპროტეინის სპექტრულ თვისებებს. სწორედ ეს ლიგანდები ინაცვლებიან სულფჰიდრილური შხამებითა და ციტოქრომ P450-ის სპეციფიკური ინჰიბიტორით – მეთირაპონით.

ციტოქრომ P450-ის მიერ კატალიზური ციკლის განხორციელებისას NAD(P)H -ის აღმდგენელი ექვივალენტებით ფერმენტის აღდგენის სიჩქარეს მნიშვნელოვნად განსაზღვრავს ჰემოპროტეინის აქტიურ ცენტრში მყოფი რკინის იონის სპინური მდგომარეობა. არჩევენ მის მაღალ- და დაბალსპინურ მდგომარეობებს.

როგორც ცნობილია, Fe^{2+} -ს 5 სხვადასხვა სივრცული ორიენტაციის მქონე 3d ორბიტალზე 6 ელექტრონი გააჩნია. 3d-ორბიტალი ურთიერთსაპირისპირო სპინის მქონე ორ ელექტრონს შეიცავს, ხოლო დანარჩენი ორბიტალები ერთნაირი სპინის მქონე თითო ელექტრონითაა დაკავებული. როდესაც ოქტაედრულ სტრუქტურაში Fe^{2+} 6 ლიგანდითაა გარემოცული, მაშინ ლიგანდების ოქტაედრული ველის გავლენით 3d ორბიტალები

განსხვავებულ ენერგიის მქონე e_g და t_{2g} ქვედონეზად იზლირება. ამ დროს ელექტრონების გადანაწილება აღნიშნულ ქვედონეზებზე დამოკიდებულია ლიგანდების ოქტაედრული ველის სიძლიერეზე. განვიხილოთ ორი ზღვრული შემთხვევა (ნახ. 18):

1. სუსტი ოქტაედრული ველის შემთხვევაში, რომელსაც, მაგ., $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ კომპლექსში Fe^{2+} -ის გარშემო განლაგებულ წყლის მოლეკულები ქმნიან, მაღალი ენერგიის e_g -ქვედონეზე განლაგდებიან $3d_{x^2-y^2}$ და $3d_{z^2}$ ორბიტალების ელექტრონები, რომლებიც ლიგანდებთან σ -ბმებს წარმოქმნიან, ხოლო $3d_{xy}$, $3d_{yz}$ და $3d_{zx}$ ორბიტალებიდან დაბალი ენერგიის t_{2g} -ქვედონეზე გადასული ელექტრონები π -ბმების დამყარებაში იღებენ მონაწილეობას. ამასთან, ორივე ქვედონეზე ელექტრონები ისეა ორიენტირებული, რომ მათი სპინური ქვანტური რიცხვების ჯამი მაქსიმალურია და +2-ს აღწევს. ასეთი გარემოცვის დროს Fe^{2+} მაღალსპინურ მდგომარეობაშია.
2. ძლიერი ოქტაედრული ველის შემთხვევაში, მაგ., $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ კომპლექსში ექვსივე ელექტრონი დაბალი ენერგიის t_{2g} -ქვედონეზეა გადასული. ისინი ურთიერთსაპირისპირო მიმართულებით განლაგდებიან. შესაბამისად, ამ ელექტრონების სპინური ქვანტური რიცხვების ჯამი მინიმალური, ნულის ტოლი იქნება. ამ კომპლექსში Fe^{2+} დაბალსპინურ მდგომარეობაში იმყოფება.



ნახ. 18. რკინის (II) იონის სპინური მდგომარეობები (განმარტება იხ. ტექსტში).

დადგენილია, რომ ციტოქრომ P450-ის დაჟანგული ფორმა სხვადასხვა ობიექტებში ორივე სპინური ფორმის ნარევის სახითაა. ენერგეტიკულად ეს მდგომარეობები ძლიერ არ განსხვავდებიან და გარე ფაქტორთა გავლენით ერთმანეთში გადასვლა შეუძლიათ.

რკინის იონთა ვალენტობის შექცევადი ცვლილება $[Fe(II) \rightleftharpoons Fe(III)]$ ციტოქრომს საშუალებას აძლევს შეასრულოს თავისი ჭეშმარიტი, ელექტრონთა გადატანის ფუნქცია. სუბსტრატის მიერთება ციტოქრომ P450-ის ჰემის რკინის ელექტრონული ღრუბლის შემფოთებას იწვევს. ამის გამო მისი რედოქს-პოტენციალი (-170 mV) უფრო დადებითი ხდება, ვიდრე სუბსტრატის გარეშეა (-270 mV). ეს გარემოება, თავის მხრივ, შესაძლებელს ხდის, რომ ციტოქრომ P450 აღდგეს NADPH-ის ელექტრონებით, რომელსაც მას ფლავოროპოტეინი – NADPH-ციტოქრომ P450-რედუქტაზა აწვდის.

ჰიდროქსილირებისათვის ჰემის რკინა $+2$ -მდე უნდა იყოს აღდგენილი, რათა მან ჟანგბადის მიერთება შეძლოს. მონოოქსიგენირებისათვის ორი ელექტრონი საჭირო და მათ ციტოქრომ P450 ერთმანეთისაგან დამოუკიდებლად ლებულობს. პირველი ელექტრონი ჰემთან ჟანგბადის შეკავშირებას ხმარდება, ხოლო მეორე – ჟანგბადის გააქტიურებას.

ციტოქრომ P450-ის სპინურ მდგომარეობებს კარგად ასახავს ოპტიკური სპექტრები და ელექტრონ-პარამაგნიტური რეზონანსის (მპრ) ანიზოტროპული სიგნალი. ნაჩვენებია, რომ 390 ნმ-ზე ჰემოპროტეინის შთანთქმას მაღალსპინური, ხოლო 420 ნმ-ზე – დაბალსპინური მდგომარეობები განაპირობებენ. დაბალსპინური ფორმისათვის დამახასიათებელ მპრ-სპექტრს შედარებით ვიწრო ზოლები აქვს და გ-ფაქტორი 1.81 -ის, 2.24 -ისა და 2.42 -ის ტოლია. მაღალსპინურ ფორმას გ-ფაქტორის 1.7 -ის, 3.7 -ისა და 8 -ის ტოლი მნიშვნელობები შეესაბამება.

ციტოქრომ P450-ისათვის დასახელებულ მაჩვენებელთა დადგენა საფუძველს ქმნის ჰემოპროტეინის ჟანგბადთან, აღმდგენელ აგენტებთან, სუბსტრატთან და ინჰიბიტორებთან ურთიერთქმედების მექანიზმის ასახსნელად. დაბალ- და მაღალსპინურ ციტოქრომ P450-ის ნარევზე ზოგიერთი სუბსტრატის დამატებისას შეინიშნება ჰემოპროტეინის მაღალსპინურ მდგომარეობაში გადასვლა.

ციტოქრომ P450-ის არააქტიურ P420-ად კონვერსიას თან ახლავს მაღალსპინური სიგნალის აღძვრა 6.0 -ის ტოლი გ-ფაქტორით. დადგენილია, რომ ციტოქრომ P420 შეიძლება არსებობდეს სამ მდგომარეობაში შთანთქმის ერთნაირი სპექტრებით, მაგრამ განსხვავებული სპინური მდგო-

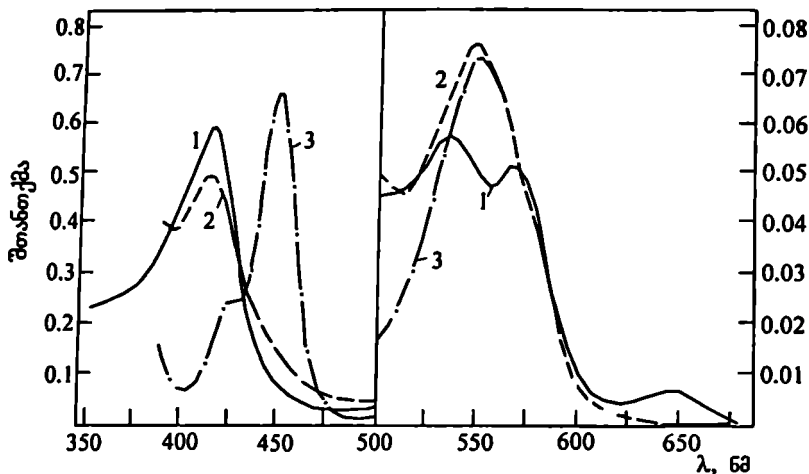
მარეობებით. ციტოქრომ P450-ის P420-ად კონვერსია სხვადასხვა აგენტებით ზემოქმედებისას ხდება. არსებობს ნივთიერებები, რომელთაც ციტოქრომ P420-ის P450-ად რეკონვერსია შეუძლიათ. მათ მიეკუთვნებიან, მაგ., ეთილენგლიკოლი და პოლიეთილენგლიკოლი, მათი მონოეთილეთერთა ხსნარები და სხვ. ანალოგიური გარდაქმნის მნიშვნელოვანი ეფექტებით ხასიათდებიან პროპილენგლიკოლი, რიბოტოლი, გლუკოზა, საქაროზა, სორბიტალი და დიმეთილსულფოქსიდი.

ციტოქრომ P420-ისაგან განსხვავებით, დაჟანგულ ციტოქრომ P450-ს რამდენადმე ატიპიური აბსოლუტური სპექტრი გააჩნია. 415, 535 და 570 ნმ-ზე შთანთქმის ჩვეულებრივი ზოლების გარდა, რაც რკინის დაბალსპინური მდგომარეობისთვისაა დამახასიათებელი, ჩნდება აგრეთვე ახალი ფართო ზოლი 650-ნმ-ის ოლქში.

ციტოქრომ P450-ის ანომალური ოპტიკური თვისებები მემბრანაში მისი ლოკალიზაციის თავისებურებებითაა განპირობებული. ამ ჰემოპროტეინის სოლუბილიზება და ციტოქრომ P420-ად მის გარდაქმნას პროტოპეიმის ნორმალური სპექტრული ცვლილებები ახასიათებს. D(+)-ქაფურის შემცველ არეზე გაზრდილი *Pseudomonas putida*-ს კულტურიდან შესაძლებელი გახდა ციტოქრომ P450-ის კრისტალური სახით მიღება. როგორც ჩანს, მიკროსომულ მემბრანაში ციტოქრომის მოლეკულები ისეა განლაგებული, რომ ჰემური დაჯგუფებები ერთმანეთის გვერდითაა და მათ ურთიერთქმედება შეუძლიათ.

ციტოქრომ P450-ს CO-ს დაკავშირება მხოლოდ აღდგენილ ფორმაში შეუძლია. ამასთან, ჩნდება შთანთქმის ერთი მაქსიმუმი 450 ნმ-ზე. ნახშირბადის მონოოქსიდთან მისი თვისობა ძლიერ მაღალია ($K_{CO}=1.3 \mu M$). სპექტრს გააჩნია მხარიც 424 ნმ-ზე. ზილულ ოლქში CO-ს გარეშე აღდგენილი ჰემოპროტეინის შთანთქმის უნარი იმის დადასტურებაა, რომ ოთახის ტემპერატურაზე იგი მაღალსპინურ მდგომარეობაში იმყოფება. დაჟანგულ ფორმაში ცილა არსებობს როგორც მაღალ-, ასევე დაბალსპინურ მდგომარეობებში (ნახ. 19).

ალკილიზოციანიდები ციტოქრომ P450-ის როგორც დაჟანგულ, ასევე აღდგენილ ფორმას უერთდებიან. ამ დროს დაჟანგული ჰემოპროტეინი მხოლოდ ერთ შთანთქმის მაქსიმუმს იძლევა 434 ნმ-ზე, ზოლო აღდგენილს შთანთქმის ორი მაქსიმუმი ახასიათებს 430 და 455 ნმ-ზე. ზოლების ინტენსივობის თანაფარდობა ბუფერის იონურ ძალაზე და pH-ზეა დამოკიდებული. ამ უკანასკნელის გაზრდისას 430 ნმ-ზე შთანთქმის პიკი იზრდება. კომპლექსის დისოციაციის კონსტანტა განისაზღვრება ალკილი-



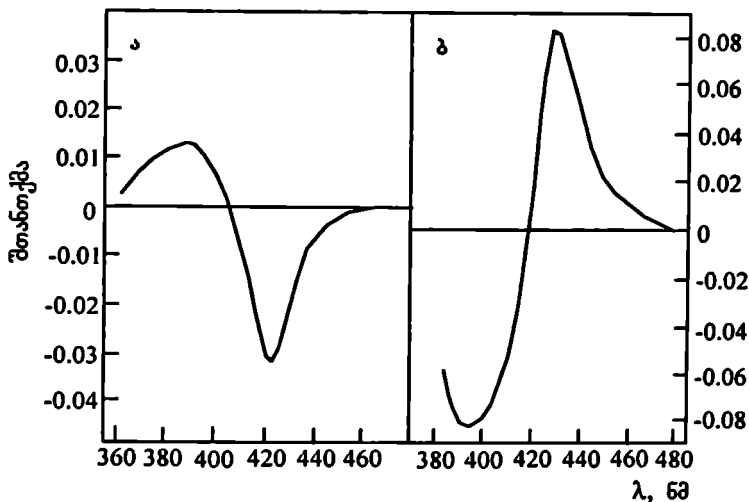
ნახ. 19. ღვიძლის მიკროსომების ციტოქრომ P450-ის შთანთქმის სპექტრები.

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

ზოციანიდში ჩანაცვლებული ჯგუფის ლიპოფილურობის შესაბამისად: რაც მეტად ჰიდროფობულია ალკილის ჯგუფი, მით უფრო მტკიცედ უკავშირდება ალკილიზოციანიდი ციტოქრომ P450-ს.

ჰემოპროტეინის ერთ-ერთ საინტერესო თვისებას ის წარმოადგენს, რომ იგი თავის სუბსტრატებთან და ინჰიბიტორებთან სპექტროფოტომეტრულად ადვილად რეგისტრირებად კომპლექსებს წარმოქმნის. მიკროსომულ მემბრანებში ასეთ კომპლექსთა წარმოქმნის გამოსავლენად საზღვრავენ შთანთქმის დიფერენციულ სპექტრებს, ანუ ერთმანეთს უდარებენ კომპლექსისა და თავისუფალი ჰემოპროტეინის შთანთქმის სპექტრებს. სპექტრულ ცვლილებებს სამ – I, II და მოდიფიცირებულ-II ტიპებად ყოფენ (სუბსტრატებიც, რომლებიც ამ ცვლილებებს იწვევენ, შესაბამისად იგივე სამ ტიპად იყოფა).

ჰექსობარბიტალი, 3-მეთილქოლანტრენი და მრავალი სხვა სუბსტრატი „I-ტიპის“ ცვლილებებს იწვევენ. ამ დროს 390 ნმ-ზე შთანთქმა იზრდება, ხოლო 420 ნმ-ზე – ქვეითდება (ნახ. 20). I-ტიპის სპექტრული ცვლილებები მიიღება სუბსტრატის მოლეკულის ჰიდროფობული ნაწილის ურთიერთქმედებით ჰემოპროტეინის დაბალსპინურ რკინასთან, რომელიც მაღალ-



ნახ. 20. შთანთქმის დიფერენციული სპექტრები ღვიბლის მიკროსოპებზე სუბსტრატთა დამატებისას.

- ა. პექსაბარბიტალით ინდუცირებული „I-ტიპის“ ცვლილება;
 ბ. ანილინით გამოწვეული „II-ტიპის“ ცვლილება.

სპინურ მდგომარეობაში გადადის. თვლიან, რომ ამ ტიპის გადასვლა რეალურად ასახავს ჰემოპროტეინსა და მეტაბოლიზებად ქსენობიოტიკს შორის კატალიზურად აქტიური კომპლექსის ფორმირებას. მნიშვნელოვანია ზაზი გაესვას იმ გარემოებას, რომ ფერმენტ-სუბსტრატის პიდროფობული ურთიერთქმედება ციტოქრომ P450-ის მოლეკულაში სუბსტრატის დამკავშირებელი უბნის არაპოლარულ ბუნებას მოწმობს და ვარაუდობენ, რომ ეს უბანი ჰემოპროტეინის აპოფერმენტის ლიპოპროტეინულ ნაწილს წარმოადგენს. I-ტიპის სუბსტრატებთან დაკავშირებისას ჰემოპროტეინის რედოქს-პოტენციალი -300 -დან -230 mV-მდე იზრდება და ამის გამო ელექტრონის სატრანსპორტო ჯაჭვში მისი აღდგენა ადვილდება.

„II-ტიპის“ სპექტრული ცვლილება ხასიათდება შთანთქმის მაქსიმუმით $425-435$ ნმ-ზე. სრული ეფექტის მისაღწევად იმაზე მეტი სუბსტრატის დამატება ხდება საჭირო, რაც მისი სტეკიომეტრიითაა ნაჩვენები. I-ტიპის სუბსტრატებისათვის 390 ნმ-ზე არსებული ზოლის წანაცვლებას თან სდევს სპექტრის ხილულ ნაწილში ცვლილებების აღძვრა, რაც სისტემის მაღალსპინური თვისებების გაძლიერებაზე მიუთითებს. შთანთქმის ზოლის

გრძელტალღიანი ოლქისაკენ გადანაცვლება, რაც II-ტიპის სუბსტრატე-
ბითაა გამოწვეული, სისტემის დაბალსპინურ ბუნებას ადასტურებს. სპექტრუ-
ლი ცვლილებების მეორე ტიპი ფერიპმოქრომის ფორმირებასთან უნდა
იყოს დაკავშირებული. II-ტიპის სპექტრული ცვლილებების აღძვრა ხდე-
ბა სუბსტრატის ამინოჯგუფის ურთიერთქმედებისას ჰემის რკინასთან,
რომელიც მაღალ- და დაბალსპინურ მდგომარეობაში იმყოფება. ამ დროს
ადგილი აქვს მაღალსპინური ფორმის დაბალსპინურში გადასვლას და
420 ნმ-ის ოლქში შთანთქმის ზოლის წარმოქმნას.

არსებობს სპექტრული ცვლილებების ტიპი შთანთქმის მაქსიმუმით
390 და 420 ნმ-ზე. ფაქტიურად იგი I-ტიპის სპექტრულ ცვლილებათა
სარკისებრ გამოსახულებას წარმოადგენს და ამიტომ მას „მოდულირე-
ბულ II-ტიპს“ აკუთვნებენ (ლიტერატურაში იგი ინვერსიული ან რევერ-
სიული სპექტრის სახელწოდებითაცაა ცნობილი). ასეთი ცვლილება სუბ-
სტრატის ჰიდროქსილის ჯგუფისა და მაღალსპინური რკინის ურთ-
იერთქმედების შედეგია. ამ დროს შთანთქმის მაქსიმუმის 394 ნმ-დან 416
ნმ-ზე გადაწევა ხდება.

ქსენობიოტიკებთან და ენდოგენურ სუბსტრატებთან ციტოქრომ P450-
ის თვისობას ჰემოპროტეინ-სუბსტრატის კომპლექსის დისოციაციის კონს-
ტანტა (K_d) ახასიათებს. ეს სუბსტრატის ის კონცენტრაციაა, რომელიც
სპექტრული ცვლილებების ნახევრად მაქსიმალური ამპლიტუდის მისაღე-
ბადაა აუცილებელი. არსებობს მკაცრი შესაბამისობა ციტოქრომ P450-ის
თვისობის ხარისხსა და სუბსტრატთა (აღილური ჯგუფების შემცველი
ბარბიტურიტების გამოკლებით) ლიპოფილურ თვისებებს შორის. ამას
მოწმობენ ექსპერიმენტები, რომლებმაც ქლორწარმოებული და არომატუ-
ლი ნახშირწყალბადებისადმი ციტოქრომ P450-ის თვისობის ზრდასა და
მათი მოლეკულების ჰიდროფილურობის შემცირებას შორის პირდაპირი
კავშირის არსებობა გამოავლინეს. სარწმუნოდაა ნაჩვენები ფოსფატიდილ-
ქოლინის გავლენით ჰიდროფობული ქსენობიოტიკისადმი მაღალი
სისუფთავის მქონე ციტოქრომ P450-ის თვისობის ზრდა. ფერმენტის
მიერ II-ტიპის სუბსტრატთა დაკავშირება მიკროსომული მემბრანის ჰიდრო-
ფობულ უბანში ხორციელდება, რომელიც ფოსფოლიპიდთა ნახშირწყალ-
ბადოვანი ჯაჭვებითაა ნაშენები. II-ტიპის სუბსტრატთა დაკავშირებაც
ფოსფოლიპიდებზე დამოკიდებულ ციტოქრომ P450-ის ჰიდროფობული
გარემოცვის ნაწილში ხდება.

მემბრანის ფოსფოლიპიდური კომპონენტის დაზიანება განსხვავებუ-
ლად ცვლის I- და II-ტიპის სუბსტრატთა როგორც დაკავშირებას, ასევე

მეტაბოლიზმს, რადგან ცნობილია, რომ ფოსფოლიპიდები, კერძოდ, ფოსფატიდილქოლინი, აუცილებელია ორივე ტიპის სუბსტრატთა მიკროსომული ჰიდროქსილირებისათვის. საფიქრებელია, რომ ორივე ტიპის სუბსტრატებისათვის მონოოქსიგენაზაში სიერცობრივად გამოიჯნული აქტიური ცენტრები მემბრანის სხვადასხვა ჰიდროფობულ ზონებთან კავშირში იმყოფებიან.

დეზოქსიქოლათის მზარდი კონცენტრაციები ლიპოპროტეინული მემბრანების ჰიდროფობულ კავშირებზე მოქმედებს და ფოსფოლიპიდთა იმ ჰიდროფობული ჯგუფების „დეეკრანიზაციას“ იწვევს, რომლებიც ჰემოპროტეინის სპექტრულ თვისებებს განაპირობებენ. ამასთან დაკავშირებით გასაკვირი არ უნდა იყოს მონაცემები დეზოქსიქოლათით II-ტიპის სუბსტრატის – ანილინის დაკავშირებისა და მეტაბოლიზმის ინჰიბირების შესახებ. როგორც ცნობილია, ამ სუბსტრატის მიერთება ციტოქრომ P450-ის ჰემის შემცველ ლიპოფილურ ნაწილში ხდება, ხოლო კონსტრუირებულ მონოოქსიგენაზურ სისტემაში მისი *p*-ჰიდროქსილირება მოითხოვს „ლიპიდური ფაქტორის“ თანამყოფობას, რომელიც იდენტიფიცირებულია, როგორც ფოსფატიდილქოლინი. დეზოქსიქოლათით ჰემური ჯგუფის ჰიდროფობული სიერცის დაზიანებას მოწმობენ ეთილიზოციაინიდური დიფერენციალური სპექტრები, რომლებიც მიკროსომულ სუსპენზიაში აღნიშნული დეტერგენტის შეყვანის შემდეგაა მიღებული.

არ შეიძლება არ აღინიშნოს ერთი, მეტად საყურადღებო ფაქტი: 0.01% კონცენტრაციით დეზოქსიქოლათი თვითონ წარმოადგენს I-ტიპის სუბსტრატს და ციტოქრომ P450-ისადმი მაღალი სწრაფვა გააჩნია. ამიტომ იგი კონკურენტული მექანიზმით ეფექტურად აინჰიბირებს I-ტიპის სხვა სუბსტრატის – ამინოპირინის დაკავშირებას და ზრდის NADPH-ციტოქრომ P450-რედუქტაზის საწყის სიჩქარეს. 0.03%-ზე მაღალი კონცენტრაციისას დეზოქსიქოლათი უკვე ამინოპირინის დაკავშირებისა და მეტაბოლიზმის არაკონკურენტულ ინჰიბიტორად გვევლინება. პარალელურად იგი თრგუნავს ციტოქრომ P450-ისა და ამინოპირინთან მისი კომპლექსის NADPH-დამოკიდებულ ფერმენტულ აღდგენას.

შეიძლება დავასკვნათ, რომ I-ტიპის სუბსტრატებისათვის „დამაკავშირებელი ცილა“ – NADPH-ციტოქრომ P450-რედუქტაზა მკაცრ დამოკიდებულებას ამჟღავნებს გარემომცველი ფოსფოლიპიდებისა და მათ მიერ წარმოქმნილი ჰიდროფობული ზონის მიმართ. დეზოქსიქოლათის უნარი – შეასუსტოს მემბრანაში ცილა-ლიპიდური ჰიდროფობული ურთიერთქმედება, ამ დეტერგენტის მაინჰიბირებელ ეფექტს განსაზღვრავს, რაც I-ტიპის სუბსტრატებისა და NADPH-ციტოქრომ P450-რედუქტაზის დაკავშირებ-

ის უზნებთან ჰიდროფობული ზონების დაზიანებით ვლინდება.

სხვადასხვა რეაგენტები, როგორებიცაა შარდოვანა, ქლორჰიდრატი, გუანიდინი, ლეტერგენტები და ფოსფოლიპიდები, ციტოქრომ P450-ის P420-ად კონვერსიას იწვევენ. გარდაქმნა მიმდინარეობს მარილთა კონცენტრირებულ ხსნარებშიც და აგრეთვე pH-ის გადაწევისას მჟავა ან ფუძე მხარეს. ციტოქრომ P420-საც გააჩნია დაბალსპინური კომპლექსის ისეთივე სპექტრი, როგორიც საერთოდ ხ-ტიპის ციტოქრომებისთვისაა დამახასიათებელი.

ციტოქრომ P450-ის კონვერსიისას აღძრული სპექტრული ცვლილებებიც იმ ნივთიერებათა ბუნებითაა განპირობებული, რომლებიც ამ გადასვლას იწვევენ. ჩატარებულმა გამოკვლევებმა აჩვენა, რომ ციტოქრომ P450-ში ჰემი არსებითად ცილის ჰიდროფობულ უბანთანაა დაკავშირებული. შედარებით ნაკლებადაა ცნობილი იმ ნივთიერებათა ბუნება, რომლებიც რკინის ატომთანაა კოორდინირებული. დაჟანგული ციტოქრომ P450 იძლევა მკრ-სპექტრს, რომელსაც ფერიპემის დაბალსპინური სისტემის სპეციფიკური ნიშნები გააჩნია. გ-ფაქტორი (1.91, 2.25, 2.40) ახლოს დგას ფერიპემის, ფერიპემოგლობინისა და ფერიმოგლობინის კომპლექსთა გ-ფაქტორებთან. მიუხედავად ამისა, იმ ჯგუფების ჭეშმარიტი ბუნება, რომლებიც ჰემს უკავშირდებიან, მაინც უცნობი რჩება.

აღდგენილ მდგომარეობაში ციტოქრომ P450 მაღალსპინურ კომპლექსს წარმოქმნის და, როგორც ჩანს, მისი მეხუთე და მეექვსე კოორდინაციული მდებარეობა ვაკანტურია, ან დაკავებულია რკინასთან სუსტად ბმული ჯგუფებით. ასეთი სტრუქტურა ძლიერ განსხვავდება აღდგენილი ციტოქრომ P420-ისაგან. ისევე როგორც დაჟანგულში, აღდგენილ ფორმაშიც იგი დაბალსპინურ კომპლექსს წარმოადგენს, რომელიც, საგარაუდოდ, ძლიერი ველის მქონე ორ ლიგანდს შეიცავს.

I-ტიპის სუბსტრატების დამატებისას დაჟანგული ციტოქრომ P450-ის მაღალსპინურ მდგომარეობაში გადასვლა რკინის იონსა და მერკაპტიდულ ჯგუფთან ტრანს-მდგომარეობაში მყოფ ლიგანდს შორის მანძილის ზრდას იწვევს კონფორმაციული ცვლილებების გამო. ამასთან, რკინა გამოდის პორფირინის ბირთვის სიბრტყიდან გოგირდის ატომის მიმართულებით. II-ტიპის სუბსტრატები – პირიქით, აძევენ რა რკინასთან კოორდინირებულ ცილის ჯგუფებს, პირდაპირ უკავშირდებიან ცისტეინის ნაშთის მიმართ ტრანს-მდგომარეობაში მყოფ ცენტრალურ ატომს და დაბალსპინურ კომპლექსებს წარმოქმნიან.

არსებობს განსხვავებული ინტერპრეტაცია ციტოქრომ P450-ის და-

ჟანგული ფორმის სპექტრებზე I-ტიპის ნივთიერებათა გავლენის შესახებ: თვლიან, რომ ამ ნივთიერებათა დამატება ისეთ კონფორმაციულ ცვლილებებს იწვევს, რომლებიც კოორდინაციული კომპლექსის ბუნებასაც ცვლიან. ამ ტიპის ნივთიერებათა თანამყოფობისას მეტალსა და გოგირდის ატომებს შორის მანძილი იზრდება. ამ თეორიის მომხრეები მიიჩნევენ, რომ ნახშირბადის მონოოქსიდი კოორდინაციული ადგილიდან აძევებს მერკაპტიდულ ჯგუფს. ამის შედეგად მიიღება კომპლექსი, სადაც მეტალი გამო-სულია პორფირინის სიბრტყიდან CO-ს მიმართულებით, ხოლო ტრანს-მდგომარეობა ან სრულებით არაა დაკავებული რაიმე ჯგუფით, ან დაკა-ვებულია მეტალთან სუსტად ბმული ლიგანდით. იმისათვის, რომ ფერმენტულმა სისტემამ ნორმალური (კატალიზური) ფუნქციონირება შეძლოს, აუცილე-ბელია ჰემთან ჟანგბადის ასეთივე დაკავშირება მოხდეს.

უაღრესად მნიშვნელოვანია ის, რომ განსხვავებული სპექტრული ცვლილებების მქონე კომპლექსების წარმოქმნა ერთნაირი ინტენსივობით მიმდინარეობს როგორც დაჟანგულ, ასევე აღდგენილ ჰემოპროტეინთან და ის ელექტრონულ-დონორულ და ელექტრონულ-აქცეპტორულ თვისებებს ცვლის. ამასთან, ნივთიერებები, რომლებიც პირველი ტიპის სპექტრულ ცვლილებებს იწვევენ, ელექტრონთა გადამტან ჯაჭვში ციტოქრომ P450-ისა და სუბსტრატის კომპლექსის აღდგენას აჩქარებენ, მაშინ როდესაც სპექტრული ცვლილებების მეორე ტიპის გამომწვევი ნაერთები საწი-ნააღმდეგოდ მოქმედებენ. კომპლექსის წარმოქმნისას არამართო ციტო-ქრომ P450-ის, არამედ თვით სუბსტრატის ელექტრონული სტრუქტურაც იცვლება. ციტოქრომ P450-ის აღდგენის რეაქცია მაპიდროქსილირებელ ჯაჭვში „ვიწრო ადგილად“, ანუ სიჩქარემაღლიმიტირებელ სტადიად ითვ-ლება, რომელიც ქსენობიოტიკების მთლიანი ბიოდეგრადაციის მარეგუ-ლირებელ უბანს წარმოადგენს.

ჟანგბადისადმი მაღალი სწრაფვა ($K_M=0.1-2 \text{ mM}$) და თვითჟანგვის მაღა-ლი უნარი (მეორე რიგის რეაქციის სიჩქარის კონსტანტა $2-4 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, ნახევარდაჟანგვის სიჩქარე 300 წმ^{-1}) განაპირობებს აერობულ მდგომარე-ობაში აღდგენისას ციტოქრომ P450-ის სტაციონარული მდგომარეობის დაბალ დონეს.

თავისი პარამეტრებით ჰემოპროტეინი ციტოქრომოქსიდაზას წააგავს. მისგან განსხვავებით ამ ფერმენტს CO-სადმი გაცილებით მაღალი თვისო-ბა აქვს. ციტოქრომოქსიდაზის 50%-ით ინჰიბირებისათვის საჭიროა, რომ ფარდობა $\text{CO}:\text{O}_2$ 10-ის ტოლი იყოს, მაშინ როდესაც ციტოქრომ P450-ისათვის ეს კოეფიციენტი 1-ის ტოლია.

ჰემოპროტეინის სხვა თავისებურებებიდან შეიძლება აღინიშნოს მკრ-ის ანიზოტროპიული უნარი. აღრეულ გამოკვლევებში დაბალსპინური სიგნალის გაჩენას მიკროსომებში Fe_x -კომპონენტის არსებობით ხსნიდნენ. შემდგომმა ექსპერიმენტებმა აჩვენა, რომ სიგნალი ციტოქრომ P450-ს ეკუთვნის. სოლუბილიზაციისას ჰემოპროტეინის ციტოქრომ P420-ის ფორმაში გადასვლას ხშირად თან ახლავს 6.0 გ-ფაქტორის მქონე მაღალსპინური მდგომარეობის შექმნა. ამ დროს 2.25 გ-ფაქტორიანი სიგნალი ციტოქრომ P420-ს შენარჩუნებული აქვს, ამიტომ Fe_x -ის შემცველობის დასადგენად ჩატარებული გაზომვები ორივე ჰემოპროტეინის ჯამურ ოდენობას ასახავდა. ციტოქრომ P420-ს შეუძლია სამი: β , γ და σ მდგომარეობით არსებობა. ისინი შთანთქმის ერთნაირი სპექტრებით, მაგრამ განსხვავებული სპინური მდგომარეობებით ხასიათდებიან. ციტოქრომ P450-ის ინაქტივაციას თან ახლავს ნატიური ფორმიდან (α -მდგომარეობიდან) β - და γ -ფორმების გავლით σ -მაღალსპინურ მდგომარეობაში გადასვლა. განსაკუთრებით ადვილად ეს გადასვლა სულფჰიდრილური შხამების მოქმედებისას ხორციელდება. ამჟამად სხვადასხვა ობიექტებში ციტოქრომ P450-ის მაღალ- და დაბალსპინური ფორმების ნარევის სახით არსებობა ექვს აღარ იწვევს. ჩვეულებრივ პირობებში მეორე ფორმა, როგორც უფრო მდგრადი, უპირატესადაა წარმოდგენილი. მეთილქოლანტრენი ღვიძლში მხოლოდ მაღალსპინური ფორმის ციტოქრომ P450-ის შემცველობას ზრდის, ფენობარბიტალი კი ორივე ფორმას, მაგრამ განსაკუთრებით დაბალსპინურ ფორმას აინდუცირებს.

უაღრესად მნიშვნელოვანია მემბრანული ფოსფოლიპიდების როლი ციტოქრომ P450-ის ფუნქციონირებაში, კერძოდ, ჰემოპროტეინის სუბსტრატთან დაკავშირებისა და ელექტრონთა აქცეპტირების პროცესებში. მრავალრიცხოვანი გამოკვლევები ადასტურებენ იმ ფაქტს, რომ ციტოქრომ P450-ის მემბრანაში ჩაშენებით რეალურად იზრდება მისი ჰიდროქსილაზური აქტივობა. მემბრანის ფოსფოლიპიდებზე ჰემოპროტეინის თვისებების დამოკიდებულება თვალსაჩინოდ გამოიხატება ციტოქრომ P450-ის სპექტრული ანალიზით.

ჰემოპროტეინის უნიკალური თვისება — აღდგენილ მდგომარეობაში CO-ს დაკავშირება და 450 ნმ-ზე შთანთქმის უნარის მქონე კომპლექსის წარმოქმნა, მის ნატიურ ფორმას ახასიათებს. მემბრანის სხვადასხვა რეაგენტებით დამუშავებისას, როდესაც b -ტიპის სხვა ჰემოპროტეინები თავის ნატიურ სპექტრებს მაინც ინარჩუნებენ, ციტოქრომ P450-ს კატალიზური აქტივობა სრულიად ეკარგება. ფერმენტის არააქტიურ ციტოქრომ P420-

ად კონვერსია, რასაც ფოსფოლიპიდების შემტევი აგენტები იწვევენ, იმის ნათელი დადასტურებაა, რომ ციტოქრომ P450-ის სპექტრული თვისებები მიკროსომული ფოსფოლიპიდებითაა სრულად განპირობებული.

მიჩნეულია, რომ ციტოქრომ P450-ის გამოკვეთილ ლაბილურობას მიკროსომულ მემბრანაში ჰემის ჰიდროფობული გარემოცვა განსაზღვრავს, რომელიც თვით ჰემოპროტეინის გარკვეული კონფორმაციითა და მემბრანის ლიპიდური კომპონენტითაა უზრუნველყოფილი. დადგენილ იქნა აგრეთვე ისიც, რომ P420-ის წარმოქმნა პირდაპირ კავშირში არაა ციტოქრომ P450-ის სოლუბილიზაციასთან, რამდენადაც გამოვლინდა, რომ ციტოქრომ P420, რომელიც მიკროსომული ფრაქციის ფოსფოლიპაზა C-სთან ინკუბირების შედეგად წარმოიქმნება, მიკროსომასთან ბმული რჩება.

ციტოქრომ P450-ის P420-ად კონვერსიაზე მონაცემების კრიტიკულ-მა ანალიზმა შესაძლებელი გახადა დადგენილიყო, რომ ყველა შემთხვევაში იგი წარმოადგენს გარემომცველ ფოსფოლიპიდებთან ჰემის ჰიდროფობული ურთიერთქმედების დარღვევის შედეგს. ეფექტურ რეაგენტთა მრავალფეროვნება უაღრესად ართულებს კონვერსიის ჭეშმარიტი მექანიზმის დაზუსტებას. როგორც ჩანს, კონკრეტული რეაგენტისაგან დამოკიდებულებით შეტევის წერტილს წარმოადგენს ან ლიპიდი, ან ლიპიდთან ასოცირებული ცილა. 3 M კონცენტრაციის გუანიდინი ფოსფოლიპიდზე ზემოქმედების გარეშე ეფექტურად აზიანებს ცილოვან სტრუქტურას. ამ დროს ადგილი აქვს 450 ნმ-ზე შთანთქმის პიკის თანდათანობით შემცირებას. პარალელურად 420 ნმ-ზე ჩნდება ახალი მზარდი პიკი, ანუ ხდება ციტოქრომ P450-ის „ფოსფოლიპიდურ-დამოკიდებული“ კონვერსია და P450-ის შემცველობის კლებასა და P420-ის ზრდას შორის განსაზღვრული სტექიომეტრული დამოკიდებულება მყარდება.

ექსპერიმენტებში C და D-ფოსფოლიპაზების გამოყენებით მიღებული შედეგები იმაზე მიუთითებენ, რომ ფოსფოლიპიდთა პოლარული ჯგუფები ციტოქრომ P450-ის ნატიური მდგომარეობის შენარჩუნებაში მონაწილეობას არ ღებულობენ. ამ ფუნქციას უპირატესად მათი არაპოლარული ნახშირწყალბადური ჯგუფები ფლობენ, რამდენადაც მიკროსომულ მემბრანაში თხევად ჰიდროფობულ უბნებს ქმნიან და ინტეგრალურ ცილებთან, მათ შორის ციტოქრომ P450-თან ჰიდროფობულად ურთიერთქმედებენ. აღნიშნულთან დაკავშირებით გარკვეულ ინტერესს იწვევს ციტოქრომ P450-ის სპექტრული თვისებების სტაბილიზებაში მიკროსომების ფოსფოლიპიდური მატრიქსის ცხიმოვანი მჟავას კომპონენტის როლის გარკვევა.

სამწუხაროდ, ფოსფოლიპაზების გამოყენების, როგორც სპეციფიკური

მეთოდის მნიშვნელობა საგრძნობლად შემცირდა მას შემდეგ, რაც A და C ფოსფოლიპაზებისათვის დადგინდა, რომ მათ მიერ გამოწვეული ჰიდროლიზის პროდუქტები (ლიპოფოსფოლიპიდები და ცხიმოვანი მჟავები) თვითონ არიან მკვეთრად გამოხატული დეტერგენტული თვისებების მატარებელი ნაერთები. მეორე მხრივ, გაცილებით სრულფასოვანი აღმოჩნდა ტესტად ლიპიდთა ზეჟანგური ჟანგვის რეაქციების გამოყენება, რადგან ცნობილი გახდა, რომ ამ რეაქციათა სუბსტრატებს წარმოადგენენ ფოსფატიდილეთანოლამინსა და ფოსფატიდილქოლინში β -პოზიციაში მყოფი პოლიუჯერი ცხიმოვანი მჟავები.

აღნიშნულთან დაკავშირებით ყურადღებას იმსახურებს ის გამოკვლევები, რომლებიც მიზნად ისახავდნენ მიკროსომების სხვადასხვა პრეპარატებში ციტოქრომ P450-ის სპექტრულ მახასიათებლებზე ლიპიდთა ზეჟანგური ჟანგვის გავლენის დადგენას. აღმოჩნდა, რომ ინტაქტურ მიკროსომებში სისტემების — $\text{NADPH} + \text{ADP-Fe}^{3+}$ -ისა და ასკორბატი + ADP-Fe^{3+} -ის საშუალებით ლიპიდთა ზეჟანგური ჟანგვის გაძლიერებას თან ახლავს 450 ნმ-ზე შთანთქმის პიკის კლება და ძლიერი ექსტინქციის აღძვრა 420 ნმ-ზე. საინკუბაციო არეში აღვილი აქვს ლიპიდური პეროქსიდაციის პროდუქტის — მალონის დიჰიდროქსიდის დაგროვებას, ხოლო რეაქციის მსვლელობა ხასიათდებოდა ჟანგბადის მოხმარების მაღალი სიჩქარით. ამ დროს მიკროსომული სუსპენზიის შთანთქმის მაქსიმუმი 520 ნმ-ზე გადაინაცვლებს, რაც ზეჟანგური ჟანგვის გააქტიურების ფონზე, ფოსფოლიპიდური კომპონენტის დაზიანების გამო მემბრანული სტრუქტურის ნაწილობრივ დეზინტეგრაციაზე მიუთითებს. ლიპიდური პეროქსიდაციის პირობებში ჰემოპროტეინის აქტივობის დაქვეითება მიკროსომული მემბრანის ჰიდროფობული უბნების სტრუქტურათა რღვევის შედეგია. საყურადღებოა ის გარემოება, რომ მემბრანაში უჯერ ცხიმოვან მჟავათა ჰიდროზეჟანგების (ლიპიდთა პეროქსიდაციის შუალედი პროდუქტების) წარმოქმნა მემბრანათა განვლადობას ზრდის და ამის მიზეზი მემბრანის გარე, ჰიდროფილური შრისაკენ აღნიშნულ ნივთიერებათა მაღალპოლარული ჯგუფების ორიენტაციაა. წყლოვანი ფაზისაკენ მიკროსომული მემბრანის განვლადობის გაძლიერება, განსაკუთრებით იმ ზონისაკენ, რომელიც ციტოქრომ P450-ის გარემოცვას ქმნის, P420-ად მისი კონვერსიის მიზეზს წარმოადგენს. უნდა აღინიშნოს ერთი ფაქტიც: ლიპიდურ პეროქსიდაციას განიცდის ორმაგი ბმების მაღალი შემცველობის მქონე ცხიმოვანი მჟავების (არაქიდონისა და დოკოზოჰექსენის) მხოლოდ 15%. ეს იმას ნიშნავს, რომ ფოსფოლიპიდური მატრიქსის პოლიუჯერ მჟავათა ძლიერ მცირე

ნაწილია „პასუხისმგებელი“ მემბრანადაკავშირებული ციტოქრომ P450-ის ნატიური სპექტრული თვისებების შენარჩუნებაზე.

ალიფატური სპირტებითა და დეტერგენტებით მიკროსომების დამუშავება მნიშვნელოვნად აქვეითებს ციტოქრომ P450-ის ჰემის გარემომცველი სიერცის ჰიდროფობულობას. ნატრიუმის დეზოქსიქოლატის თანამყოფობისას 455 ნმ-ზე შთანთქმის პიკი მცირდება, რაც იმას მოწმობს, რომ დეტერგენტი ციტოქრომის ჰემის შემცველი ჰიდროფობული სილრუის „დეჰერმეტიზაციას“ იწვევს, რის შედეგადაც ეს ჯგუფი წყლოვანი ფაზისათვის ხელმისაწვდომი ხდება.

ნატრიუმის ქოლატით ციტოქრომ P450-ის კონვერსია შეიძლება აცილებულ იქნას სარეაქციო არეში გლიცერინის ან სხვა მრავალატომიანი სპირტის დამატებით. ამ მონაცემებზე დაყრდნობით პოსტულირებულ იქნა, რომ მოცემული ციტოქრომი ტიპურ ლიპოპროტეინს წარმოადგენს. უფრო მეტიც: ელექტრონულ-სპინური რეზონანსის მეთოდით მიღებული შედეგები იმაზე მიუთითებენ, რომ ფოსფოლიპიდი ფუნქციონირებს, როგორც ციტოქრომ P450-ის ჰემური ჯგუფის ლიგანდი.

ციტოქრომ P450-ის ფიზიკურ-ქიმიური თვისებების კვლევაში ერთერთ საინტერესო პრობლემას ციტოქრომ P420-დან მისი რეკონვერსიის უნარი წარმოადგენს. ეს გადასვლა დამოკიდებულია ტემპერატურაზე, pH-ზე, ნატრიუმის ქოლატის კონცენტრაციაზე, ინკუბაციის დროზე, მაგრამ არა გარემოს იონურ ძალაზე. გარდა ამისა, ნაწილობრივი (30%-მდე) რეკონვერსია შეინიშნება ხანგრძლივი დიალიზისას ისეთი ხსნარის მიმართ, რომელიც დეტერგენტს არ შეიცავს. ციტოქრომ P420-ის ერთ-ერთი თავისებურება იმაში მდგომარეობს, რომ მის (და არა ციტოქრომ P450-ის) ჰემს შეუძლია დაიკავშიროს ალბუმინი, რის შედეგადაც იგი აღარ იძლევა სპექტრის 420 ნმ-ზე დამახასიათებელ შთანთქმის პიკს.

სადღეისოდ საბოლოო პასუხი არ გაგვაჩნია კითხვაზე, თუ რა ფაქტორები განსაზღვრავენ ციტოქრომ P450-ის ნატიურ სპექტრულ თვისებებს სოლუბილიზებული ფერმენტის გასუფთავების პროცესში ლიპიდისაგან მისი განცალკევების შემდეგ. ამ შემთხვევაში საკამათოა თვით „განცალკევების“ („გამიჯვნის“) ფაქტი, რადგან ცნობილია, რომ ფოსფატიდილქოლინისა და ფოსფატიდილეთანოლამინის 90%-ით მოცილება ჰემოპროტეინის სპექტრული მახასიათებლების ცვლილებებს არ იწვევს. არსებობს მონაცემები იმის შესახებ, რომ ფოსფოლიპიდები, რომლებიც ციტოქრომ P450-ის ჰემური ჯგუფისათვის ჰიდროფობულ გარემოცვას უზრუნველყოფენ, თავისი ფიზიკურ-ქიმიური თვისებებით განსხვავდებიან მემბრანის

ფოსფოლიპიდური მატრიქსის დარჩენილი ნაწილისაგან და მათი რაოდენობა მიკროსომებში ფოსფოლიპიდთა საერთო შემცველობის 15–20%-ს არ აღემატება.

მონოოქსიგენაზური სისტემით სუბსტრატთა ჟანგვით მეტაბოლიზმს აუცილებლად წინ უსწრებს მიკროსომული მემბრანის ლიპიდურ მატრიქსში მათი შეღწევა. ფოსფოლიპიდურ ან ცილურ კომპონენტებთან ქსენობიოტიკის დაკავშირება კორელაციაშია მემბრანაზე ამ უკანასკნელის ზემოქმედების ხანგრძლივობასთან. მაგ., თუ ახლად მიღებულ მიკროსომას მაშინვე დაემატებთ $[^{14}\text{C}][^{36}\text{Cl}]$ -ჰალოტანს (1,1,1-ტრიქლორ-2-ბრომ-2-ქლორეთანს), ეს ჰალოგენნაწარმი ცილის არც ერთ ფრაქციას არ დაუკავშირდება. სამაგიეროდ, რადიოაქტიური ნიშანი ჩაერთვება ფოსფატიდილქოლინისა და ფოსფატიდილეთანოლამინის ფრაქციაში. საპიროსპირო შედეგი მიიღება, თუ აღნიშნულ ქსენობიოტიკს ცხოველს მიკროსომების მიღებამდე 12 სთ-ით ადრე შეუვყვანთ – ამ დროს რადიოაქტიური ნიშანი დაკავშირებული აღმოჩნდება ცილებთან, მაგრამ არა ფოსფოლიპიდებთან.

ციტოქრომ P450-თან მთელი რიგი ციკლური და ალიფატური ნახშირწყალბადების მიერ კატალიზურად აქტიური კომპლექსის წარმოქმნას განსაზღვრავს სუბსტრატთა უნარი, დატოვონ მემბრანის პოლარული ფაზა და ფოსფოლიპიდთა ნახშირწყალბადოვანი ჯაჭვებით წარმოქმნილ არაპოლარულ ფაზაში გადაადგილდნენ, სადაც ჰემოპროტეინი – ციტოქრომ P450 იმყოფება.

ფერმენტ-სუბსტრატის კომპლექსის წარმოქმნისათვის არსებული განაწილების მოდელი თავის საფუძველშივე ითვალისწინებს ციტოქრომ P450-თან ქსენობიოტიკის ჰიდროფობულ ურთიერთქმედებას. ასეთი ურთიერთქმედების არსებობით შეიძლება აიხსნას კომპლექსში ალკანების დაკავშირების სიმტკიცე დაბალ ტემპერატურაზე, ან, ნახშირწყალბადების შემთხვევაში კომპლექსის სიმტკიცე მათი ჯაჭვის სიგრძესთან დაკავშირებით. აღმოჩნდა, რომ ნახშირწყალბადური რადიკალის სიგრძე განსაზღვრავს ცხიმოვანი მჟავას დაკავშირების ხარისხსა და მისი ა-ჰიდროქსილირების ინტენსივობას. ამ მხრივ ოპტიმალური მნიშვნელობები მიღებულია მირისტინის (C_{14}) მჟავასათვის, მაშინ როდესაც 10 ან უფრო ნაკლები ნახშირბადატომის შემცველი მჟავები პრაქტიკულად ა-ჰიდროქსილირების გზით არ მეტაბოლიზდებიან, რადგან ისინი „სიმოკლის“ გამო მემბრანის ჰიდროფობულ უბნამდე (ციტოქრომ P450-მდე) ვერ აღწევენ.

2.5.2 ციტოქრომ P450-ის მრავლობითი ფორმები და თანამედროვე ნომენკლატურა

ციტოქრომ P450-შემცველი მონოოქსიგენაზური სისტემები ორ მთავარ ტიპად იყოფა: ბაქტერიულ/მიტოქონდრიულად (I ტიპი) და მიკროსომულად (II ტიპი). მონოოქსიგენაზური სისტემების კლასიფიცირება შესაძლებელია მათი ცილური კომპონენტების რაოდენობის მიხედვითაც. ამ ნიშნით სისტემა შეიძლება იყოს სამ-, ორ- ან ერთკომპონენტიანი. მიტოქონდრიული და ბაქტერიული ციტოქრომ P450-შემცველი მონოოქსიგენაზური სისტემა სამკომპონენტია და შეიცავს: NADH- ან NADPH- დამოკიდებულ FAD-შემცველ ფლავოპროტეინს, რკინა-გოგირდოვან ცილას და ციტოქრომ P450-ს. ეუკარიოტების მიკროსომული ციტოქრომ P450-შემცველი მონოოქსიგენაზური სისტემა ორკომპონენტია და იგი FMN-შემცველი NADPH-ციტოქრომ P450-რედუქტაზისა და ციტოქრომ P450-ისაგან შედგება. *Bacillus megaterium*-ში გვხვდება უნიკალური ერთკომპონენტია *Bacillus megaterium*-ში გვხვდება უნიკალური ერთკომპონენტია ხსნადი მონოოქსიგენაზა ციტოქრომ P450BM-3-ის სახით, რომლის პოლიპეპტიდური ჯაჭვი ფლავინისა და ჰემის ორ, ფუნქციურად განსხვავებულ დომენს შეიცავს. უნდა აღინიშნოს, რომ ეს დომენები სტრუქტურითა და ფუნქციით მიკროსომული ტიპის მონოოქსიგენაზებთან უფრო ახლოა, ვიდრე ბაქტერიულ/მიტოქონდრიულ ტიპთან.

ციტოქრომ P450-ის თანამედროვე ნომენკლატურის საფუძველს წარმოადგენს მისი ერთ-ერთი მნიშვნელოვანი თავისებურება – ფერმენტი ორგანიზმებში მრავლობითი ფორმებითაა წარმოდგენილი. პეოპროტეინის მრავლობით ფორმებზე მსჯელობისას აუცილებლად უნდა გავითვალისწინოთ ფერმენტთა კლასიფიკაციაში საყოველთაოდ მიღებული ორი ტერმინი: „მრავლობითი ფორმები“ და „იზოფერმენტები“. ბიოქიმიური ნომენკლატურის შემუშავებული კომისიის მიერ შემოთავაზებულია, რომ „იზოფერმენტებად“ იწოდებოდნენ ფერმენტთა მხოლოდ ის მრავლობითი ფორმები, რომელთა გამოვლენა დაკავშირებულია სტრუქტურაში გენეტიკურად დეტერმინირებულ განსხვავებასთან. მათ არ აკუთვნებენ ფორმებს, რომლებიც ამინომჟავური ნაშთების ერთი და იგივე თანმიმდევრობის მოდიფიკაციით მიიღებიან. ფართო გაგებით, ტერმინი „იზოფერმენტი“ ხშირად გამოიყენება, როდესაც ფერმენტის მრავლობითი ფორმების არსებობა ვლინდება. მაშასადამე, იზოფერმენტები ერთი და იგივე ფერმენტის მრავლობით ფორმებს წარმოადგენენ. ციტოქრომ P450-ის იზოფორმებს საერთო ის გააჩნიათ, რომ მიეკუთვნებიან ხ-ჯგუფის პიგმენტებს, იკავშირებენ CO-ს

და აკატალიზებენ მონოოქსიგენაზურ რეაქციებს. ძირითადი თვისებით, რაც გარდასაქმნელი სუბსტრატის მიმართ სპეციფიკურობაში მდგომარეობს, ისინი მკვეთრად განსხვავდებიან ერთმანეთისაგან. ამიტომ სრული საფუძველი არ გაგვაჩნია, რათა ციტოქრომ P450-ის მრავლობით ფორმებს იზოფერმენტები ეუწოდოთ. მიუხედავად ამისა, არ შეიძლება ანგარიში არ გავუწიოთ იმ გარემოებას, რომ ციტოქრომ P450-ის განსხვავებულ ფორმებს მსგავსი სუბსტრატული სპეციფიკურობა გააჩნიათ. ცხადია, ასეთ შემთხვევაში „იზოფერმენტი“ შეიძლება „იზოფორმის“ სინონიმად ჩაითვალოს. არსებობს რეკომენდაცია, რომ იზოფერმენტი ეუწოდოთ ციტოქრომ P450-ის იმ ფორმებს, რომელთაც შედარებით ერთნაირი სუბსტრატული სპეციფიკურობა გააჩნიათ, მაგრამ სხვადასხვა გენის ფუნქციონირების პროდუქტებს წარმოადგენენ.

ციტოქრომ P450-ის მრავლობითი ფორმების რეალურად არსებობა სხვადასხვა მეთოდური მიდგომათა დადასტურებული. მათგან მნიშვნელოვანია:

1. SDS-ელექტროფორეზი. ნატრიუმის დოდეცილსულფატის (SDS-ის) შემცველ პოლიაკრილამიდის გელში ელექტროფორეზული ძვრადობა ჰემოპროტეინის ფორმათა იდენტიფიკაციისა და შეფასების ერთ-ერთ ძირითად და მოხერხებულ მეთოდს წარმოადგენს. ეს მეთოდი საშუალებას იძლევა 1 kD-ის სიზუსტით განისაზღვროს ინდივიდუალური ცილების მოლეკულური მასები. პოლიაკრილამიდის გელი ხელმისაწვდომია სპექტროფოტომეტრული სკანირებისათვის, რომლის შედეგები (დენსიტოგრამები) რაოდენობრივ ანალიზს ექვემდებარება. ელექტროფორეზულად გამოყოფილი ციტოქრომ P450 წარმოდგენილია აგრეგატებად, რომელთა მოლეკულური მასები 300–500 kD-ის ფარგლებშია. აგრეგაციის ხარისხი დეტერგენტისა და ლიპიდების თანამყოფობაზე დამოკიდებული აღმოჩნდა. ჰემოპროტეინის გასუფთავებული ფრაქცია წყალხსნარში 6-დან 9 მოლეკულამდე ცილის შემცველ აგრეგატებს შეიცავს. როგორც ირკვევა, აგრეგაცია მოქმედებს კონფორმაციაზე და სტერიულად აბრკოლებს დაბალმოლეკულური ლიგანდის მოლეკულების მიღწევას ფერმენტის პროსტეტულ ჯგუფთან. დადგენილ იქნა აგრეთვე, რომ ციტოქრომ P450-ის ელექტროფორეზულად გასუფთავებული ფრაქცია კატალიზური აქტივობით განსხვავებულ, სულ მცირე, სამ კონფორმერს შეიცავს. ლიპიდური გარემოცვა და I-ტიპის სუბსტრატები მნიშვნელოვნ გავლენას ახდენენ ამ კონფორმერებს შორის წონასწორობაზე და მათ სტრუქტურაზე.

SDS-ელექტროფორეზით ნაჩვენებია, რომ ფენობარბიტალური და მეთილქოლანტრენული ტიპის ინდუქციისას ყველაზე დიდ ცვლილებებს ის

ცილები განიცდიან, რომელთაც 47-დან 53 kD-მდე მოლეკულური მასები გააჩნიათ. ეს ცილები იდენტიფიცირებულია, როგორც ციტოქრომ P450-ის ფორმები.

ელექტროფორეზულად პომოგენური ციტოქრომ P450-ის პრეპარატის სახით მიღება რთული და შრომატევადი პროცედურაა. უნდა აღინიშნოს ისიც, რომ ელექტროფორეზულად მიღებულ შედეგებს ზშირად არასწორ ინტერპრეტაციასაც უკეთებენ, რამდენადაც ყველა იმ ცილას, რომლის ზოლიც SDS-გელის 45-დან 60 kD-მდე მოლეკულური მასების უბანში იღებება, ციტოქრომ P450-ის ინდივიდუალურ ფორმასთან აიგივებენ, ან ციტოქრომ P450-ის აპოფერმენტად თვლიან. თუ გავითვალისწინებთ, რომ ციტოქრომ P450 მთელი მიკროსომული ცილის 5–15%-ს შეადგენს, ცხადი გახდება, რომ 45-დან 60 kD-მდე მოლეკულური მასის მქონე ყველა ცილა არ შეიძლება ჩაითვალოს აპოციტოქრომ P450-ად. ამის გამო SDS-ელექტროფორეზი შეიძლება გამოყენებულ იქნას ციტოქრომ P450-ის ფორმათა ინდუქციურობის წინასწარი თვისობრივი შეფასებისათვის.

2. **სპექტრული ანალიზი.** უმრავლეს შემთხვევაში იზოლირებული ჰემოპროტეინები დაჟანგულ და დაბალსპინურ მდგომარეობაში არიან. გამონაკლისია ციტოქრომ P450, რომელიც ბოცერის ლეიძლიდანაა გამოყოფილი. ინდუქტორად ამ შემთხვევაში პოლიციკლური არომატული ნაერთი – 3-მეთილქოლანტრენი გამოიყენება. ამ დროს ჰემოპროტეინი მაღალსპინურ მდგომარეობაშია. ყველა ცნობილი ციტოქრომ P450-ის კარბონილური კომპლექსების შთანთქმის მაქსიმუმი 447–452 ნმ-ის (± 0.5 ნმ-ის სიზუსტით) საზღვრებშია.

3. **სუბსტრატული ანალიზი.** სუბსტრატული სპეციფიკურობა ის პარამეტრია, რომლითაც ციტოქრომ P450-ის ფორმები ძლიერ განსხვავდებიან ერთმანეთისაგან. არსებითია ის ფაქტი, რომ ზოგიერთი სუბსტრატი ჰემოპროტეინის განსხვავებული ფორმებით დაახლოებით ერთნაირი ინტენსივობით იჟანგება. ციტოქრომ P450-ის ზოგიერთი ფორმა კი მთელი რიგი სუბსტრატების ჟანგვის მიმართ სავსებით ინერტულია, მაგ., 3-მეთილქოლანტრენით ან β -ნაფტოფლავონით ინდუცირებული ციტოქრომ P450 არც ერთ განსხვავებულ სისტემაში (მიკროსომებში ან რეკონსტრუირებულ ლიპოსომებში) არ ჟანგავს ნაფტალინს, ანილინს და დიმეთილანილინს.

4. **ამინომჟავური სეკვენაცია.** ციტოქრომ P450-ის განსხვავებულ ფორმებს მეტნაკლებად ერთნაირი ამინომჟავური შემადგენლობა აქვთ; თუმცა არსებობს ისეთი ძირეული განსხვავებაც, რომელიც ამ ცილების იდენტურად მიჩნევის საშუალებას არ იძლევა. შემადგენლობით განსხ-

ვაგდებიან ერთნაირ პირობებში გამოყოფილი ჰემოპეპტიდებიც. ციტოქრომ P450-ის ფორმები ერთმანეთისაგან შეიძლება პისტიდინის რაოდენობრივი შემცველობით განსხვავდებოდნენ.

5. იმუნოქიმიური ანალიზი. იმუნოქიმიური თვისებებით ციტოქრომ P450-ის ფორმები, როგორც წესი, ერთმანეთისაგან ძლიერ განსხვავდებიან. უმრავლეს შემთხვევაში არ შეინიშნება ჰემოპროტეინის განსხვავებულ ფორმათა გადამკვეთი იმუნოპრეციპიტაცია თითოეული მათგანის ანტისხეულებთან. მაგალითად, ანტი-P450LM₂ პრეციპიტაციას არ განიცდის ციტოქრომ P450LM₄-თან, ან პირიქით. იმუნოპისტოქიმიურმა გამოკვლევებმა აჩვენა, რომ ციტოქრომ P450-ის სხვადასხვა ფორმები ღვიძლის განსხვავებულ უბნებში შეიძლება იყვნენ ლოკალიზებული.

6. პეპტიდური რუქების შეთადი. ამ მიდგომამ აჩვენა, რომ ვირთაგვისა და ბოცერის ღვიძლის მიკროსომებიდან იზოლირებული ციტოქრომ P450-ის ფორმების უმეტესობა პეპტიდური ფრაგმენტებით ერთმანეთისაგან ძლიერ განსხვავდება, მაშინ როდესაც NADPH-ციტოქრომ P450-რედუქტაზის პეპტიდური რუქები პრაქტიკულად ერთნაირია.

ფერმენტთა უმრავლესობისათვის დამახასიათებელია მაღალი სპეციფიკურობა. ჩვეულებრივ ისინი ურთიერთქმედებენ მხოლოდ ერთ სუბსტრატთან და ერთ რეაქციას აკატალიზებენ. არსებობენ ფერმენტები, რომლებიც მკაცრად განსაზღვრული ქიმიური ჯგუფების შემცველ ნივთიერებებთან ურთიერთქმედებენ. ამ თვალსაზრისით ციტოქრომ P450-ის მრავლობითი ფორმები, როგორც ფერმენტები, ბიოქიმიაში უპრეცედენტო მოვლენას წარმოადგენენ. ძნელია დავასახელოთ იმ ნივთიერებების საერთო რიცხვი, რომლებიც ციტოქრომ P450-ის იზოფორმების საშუალებით მეტაბოლიზდებიან. იგივე შეიძლება ითქვას მათ მიერ კატალიზებულ რეაქციათა ბუნებაზე. ციტოქრომ P450-ის მრავლობითი ფორმების ბიოსინთეზისა და მათი მოქმედების მექანიზმების კვლევა თანამედროვე მემბრანული ქსენობიოქიმიის ერთ-ერთ ფუნდამენტურ მიმართულებას წარმოადგენს.

მონოოქსიგენაზური სისტემის მოლეკულური ორგანიზაციის ზოგადი პრინციპების განხილვისას უსათუოდ წინა პლანზე გამოდის საკითხი იმის შესახებ, თუ რა სიმრავლით არსებობენ და რით განსხვავდებიან ან ემსგავსებიან ერთმანეთს ციტოქრომ P450-ის იზოფორმები. კვლევის საწყის სტადიაზე დომინირებდა შეხედულება, რომ ქსენობიოტიკთა ჟანგვის ყველა რეაქციაში მონაწილეობს ძლიერ ფართო სუბსტრატული სპეციფიკურობის მქონე ერთი ჰემოპროტეინი. შემდგომში ეს შეხედულება იმის სასარგებლოდ შეიცვალა, რომ არსებობს გამოკვეთილი სპეციფიკურობის მქონე

ციტოქრომ P450-ის მრავლობითი ფორმები. მაგ., თირკმელზედა ჯირკვლის მიტოქონდრიებისა და მიკროსომების ფრაქციები შეიცავენ ჰემოპროტეინებს, რომლებიც სტეროლებს სხვადასხვა მდგომარეობაში ჟანგავენ. მიკროსომული ციტოქრომ P450 სტეროლის გვერდითი ჯაჭვის C-21 მდგომარეობას ჟანგავს; მიტოქონდრიები 2 ჰემოპროტეინს შეიცავენ, რომელთაგან ერთი ქოლესტეროლს გვერდით ჯაჭვს აცილებს C-20 და C-22 მდგომარეობებში, ხოლო მეორე — დეზოქსიკორტიკოსტეროლს ჟანგავს 11β- და 18-ე მდგომარეობებში. შედარებით დეტალურადაა შესწავლილი ლეიძლის მიკროსომული ციტოქრომ P450-ის იზოფორმები, რომლებიც ცხოველზე სხვადასხვა ქსენობიოტიკების ზემოქმედების შედეგად ინდუცირდებიან. ცნობილია განსხვავებული კლასების ასეთ ინდუქტორთა საკმაოდ მოზრდილი რიგი. მოგვყავს მათი ჩამონათვალი:

1. ფენობარბიტალი, ბარბიტალი, თიოპენტალი, ალდრინი, დიელდრინი, პოლიქლორირებული ბიფენილები, რეპტაქლორი და სხვ.;
2. 3-მეთილქოლანტრენი, ბენზპირენი, ბენზანტრაცენი, 2,3,7,8-ტეტრაქლორდიბენზო-*p*-დიოქსინი, ტეტრაქლორბენზოლი, β-ნაფტოფლავონი და სხვ.;
3. საფროლი, იზოსაფროლი, პრეგნენოლონი, 16α-კარბონიტრილი, აროქლორი, ჰექსაქლორბენზოლი და სხვ.

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

მიკროსომული მონოოქსიგენაზური სისტემის მძლავრი სტიმულატორია 3-მეთილქოლანტრენი. *In vivo* პირობებში გამოყენებისას ციტოლოგიური

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

იზოსაფროლით ინდუცირდება ინდივიდუალური ჰემოპროტეინი, რომელსაც ელექტროფორული ძვრადობით შუალედური მდგომარეობა უკავია ფენობარბიტალითა და მეთილქოლანტრენით ინდუცირებულ ჰემოპროტეინებს შორის. მას ციტოქრომ P450_d ეწოდა. ამ ჰემოპროტეინის განმასხვავებელ თვისებად ის ითვლება, რომ გამოიყოფა იზოსაფროლის მეტაბოლიზმის პროდუქტებთან კომპლექსში. იგი აკატალიზებს ციკლოპქსანის, ეთილბენზოლისა და *p*-ნიტროანიზოლის ჟანგვით გარდაქმნებს.

ზოგიერთი სინთეზური სტეროლი *in vivo* ზემოქმედებისას ასტიმულირებს მიკროსომულ რეაქციებს და ზრდის ციტოქრომ P450-ის რაოდენობას. პრეგნენოლონ-16α-კარბონიტრილით ინდუქცია არ მიეკუთვნება არც ფენობარბიტალურ და არც მეთილქოლანტრენულ ტიპს. სპექტრუ-

ლად განსაზღვრული ჰემოპროტეინი ფენობარბიტალით ინდუცირებულის იდენტური აღმოჩნდა, მაგრამ მისგან განსხვავებულად აქტიურება ბენზოპირენის ჰიდროქსილირებისა და ეთილმორფინის N-დემეთილირების რეაქციებს.

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

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

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

1. კონსტიტუციური ქვეფრაქცია – ციტოქრომ P450_{LM₁};
2. ფენობარბიტალით ინდუცირებული ქვეფრაქცია – ციტოქრომ P450_{LM₂};
3. კონსტიტუციური ქვეფრაქცია – ციტოქრომ P450_{LM₃};
4. 3-მეთილქოლანტრენით ან β-ნაფტოფლავონით ინდუცირებული ქვეფრაქცია – ციტოქრომ P450_{LM₄};
5. 2,3,7,8-ტეტრაქლორდიბენზო-p-დიოქსინით ინდუცირებული ქვეფრაქცია – ციტოქრომ P450_{LM₆}.

ჰემოპროტეინის ჩამოთვლილი იზოფორმები სპექტრული და სხვა მახასიათებლებით ძლიერ განსხვავდებიან ერთმანეთისაგან. მაგ., ციტოქრომ P450_{LM₂}-ისაგან P450_{LM₄} იმით განსხვავდება, რომ იგი არ იკავშირებს მიკროსომული ჟანგვის ისეთ ტიპურ სუბსტრატებს, როგორებიც ბენზოლი, ციკლოპექსანი ან ანტიპირინია. ზოგიერთი ქსენობიოტიკი (ანილინი, ნაფტალინი, დიმეთილანილინი) ციტოქრომ P450_{LM₄}-ს ადვილად უკავშირდება, მაგრამ ამ იზოფორმით პრაქტიკულად არ იჟანგება. ამ ფაქტს ხსნიან ციტოქრომ P450_{LM₄}-ის კომპლექსთა ორი დაბალსპინური ფორმის არსებობით, რომლებითაც ლიგანდების (ქსენობიოტიკების) ინტენსიური დაკავშირება მიმდინარეობს, მაგრამ ჟანგვის პროცესის თვალსაზრისით ეს

ლიგანდები სუბსტრატებს არ წარმოადგენენ. ანილინი, პირიდინი, იმიდაზოლი და, შესაძლოა, სხვა ორგანული აზოტშემცველი ფუძეები წარმოქმნიან დაბალსპინურ კომპლექსებს, რომლებთანაც უკვე შესაძლებელია მოლეკულური ჟანგბადის, ან ორგანული ჰიდროზეჟანგის დაკავშირება, რათა ჩამოთვლილი სუბსტრატების (ლიგანდების) ჟანგვა განხორციელდეს. ნაფტალინს და დიმეთილანილინს შეუძლიათ ციტოქრომ P450_{LM₄}-თან ურთიერთქმედება და მაღალსპინური კომპლექსის წარმოქმნა, რომელშიც ლიგანდები პორფირინული ბირთვის სიბრტყის გასწვრივია განლაგებული. მიუხედავად ამისა, მათი ჟანგვა არ ხდება, რადგან I-ტიპის სუბსტრატთა დამაკავშირებელი უბნები ინდუქტორით ან მისი მეტაბოლიტებითაა დაკავებული. ციტოქრომების – P450_{LM₂}-ისა და P450_{LM₄}-ის კონფორმაციული განსხვავებები წრიული დიქროიზმის მეთოდითაა დადგენილი. აღმოჩნდა, რომ P450_{LM₄}-ის ფორმის ჰემი უფრო მჭიდრო ჰიდროფობული „ჯიბითაა“ გარემოცული. ჰემოპროტეინით აღნიშნულ ფორმათა სტრუქტურული განსხვავებები შესაბამისად დიდ სხვაობებს იწვევენ მათ სუბსტრატულ სპეციფიკურობაში, კატალიზურ აქტივობასა და იმუნოქიმიურ თვისებებში.

ციტოქრომ P450-ის ფორმათა მრავალფეროვნება ორგანიზმთა ნორმალური ევოლუციური განვითარების შედეგია. როგორც წესი, მკაცრად განსაზღვრული დანამატებით შემცველ საკვებ არეებზე გამოზრდილი ყოველი ბაქტერიული და სოკოვანი კულტურა მხოლოდ ერთ ციტოქრომ P450-ს შეიცავს. გამონაკლისს წარმოადგენენ მცენარეების – იონჯისა და ხანჭკოლას თანამცხოვრები ბაქტერიოიდები, რომლებიც ჰემოპროტეინის რამდენიმე ქვეფრაქციას შეიცავენ.

ამჟამად ჰემოპროტეინის სხვადასხვა იზოფერმენტების მაკოდირებული 150-ზე მეტი გენია იდენტიფიცირებული. ეს რიცხვი მომავალში შეიძლება მნიშვნელოვნად გაიზარდოს. ერთი თვალსაზრისის თანახმად, უნდა არსებობდეს ჰემოპროტეინის კონსტიტუციური და ინდუცირებადი ფორმების განსაზღვრული რიცხვი, ხოლო მეორე თვალსაზრისი თვლის, რომ არსებობს ციტოქრომ P450-ის ასობით და ათასობით ფორმა. წარმოადგენს რა თავისებურ „მემბრანულ იმუნოგლობულინს“, პოლიპეპტიდურ ჯგუფში ციტოქრომ P450 მუდმივ და ცვლად უბნებს შეიცავს; ამიტომ ქსენობიოტიკების ცალკეული კლასის წარმომადგენლის უჯრედში მოხვედრის საპასუხოდ ჰემოპროტეინის გარკვეული ქვეფრაქცია შეიძლება დასინთეზდეს ზუსტად ისევე, როგორც ანტისხეულები სინთეზდებიან ორგანიზმში მაკრომოლეკულური ანტიგენების შეყვანისას. ციტოქრომ P450-ის ქვეფრაქციათა მიმართ მომზადებული ანტისხეულები

მაღალსპეციფიკურობით გამოირჩევიან.

მთელი რიგი ანალოგიების მონახვა შეიძლება მონოოქსიგენაზურ და იმუნურ სისტემებს შორის, რამდენადაც ორივე ორგანიზმის დამცველ სისტემებს განეკუთვნებიან: იმუნური – ორგანიზმს იცავს უცხო მაკრომოლეკულების, ზოლო მონოოქსიგენაზური – არაპოლარული, დაბალმოლეკულური უცხო ნაერთების ზემოქმედებისაგან. ბოლო ორი ათეული წლის განმავლობაში ამ მიმართულებით ჩატარებულმა გამოკვლევებმა გამოამჟღავნა, რომ იმუნურ და ოქსიგენაზურ სისტემებს შორის ასეთ ფუნქციურ ურთიერთკავშირს ნამდვილად აქვს ადგილი, კერძოდ, ნაჩვენებია იქნა, რომ როდესაც მონოოქსიგენაზური სისტემის კლასიკური ინდუქტორი – ფენობარბიტალი კოვალენტურად უკავშირდება ალბუმინის მოლეკულას, მაშინ იგი სრულად დაკარგავს ციტოქრომ P450-ის ინდუცირების უნარს, მაგრამ ანტისხეულების წარმოქმნის სტიმულირებას დაიწყებს. აღმოჩნდა, რომ შესაბამისი მაკრომოლეკულა-მატარებლის გარეშე ორგანიზმში დაბალმოლეკულური ქსენობიოტიკის შეყვანა ანტისხეულების ბიოსინთეზის დაწყებას იწვევს. ბუნებრივად იბადება კითხვა: როგორ წარმოიქმნებიან ორგანიზმში მაკრომოლეკულებთან დაბალმოლეკულური ნივთიერების კონიუგატები, რომელთაც ანტიგენური აქტივობები გააჩნიათ? ამ კითხვაზე პასუხის გაცემის მიზნით ჩატარებულმა ცდებმა ცხადყო, რომ NADPH-ის თანამყოფობისას წარმოიქმნება კონიუგატი, რომელიც ალბუმინთან კოვალენტურად დაკავშირებულ კოდეინის (მეთილმორფინის) ჟანგვის პროდუქტს შეიცავს. NADPH-ის გარეშე კონიუგატის წარმოქმნა არ ხდება. აღნიშნული კონიუგატით შემდგომ ბოცერის იმუნიზება ჩატარდა. ინექციის საპასუხოდ აღინიშნა ანტისხეულების ისეთივე ბიოსინთეზი, როგორც ქიმიური გზით მიღებული მორფინისა და ალბუმინის კონიუგატის გამოყენებისას ხდებოდა.

მაშასადამე, ლვიძლის ციტოქრომ P450 ასრულებს „კონიუგაზის“ ფუნქციას, რომლის საშუალებითაც ქსენობიოტიკების ჟანგვის შუალედურ, რეაქტივისუნარიან პროდუქტებს ალბუმინთან დაკავშირება შეუძლიათ. ამ შემთხვევაში ლვიძლში მოხვედრილი ქსენობიოტიკი ერთდროულად რთავს ჟანგვის რეაქციებს და ანტისხეულების ბიოსინთეზს.

წარმოდგენილი ექსპერიმენტული მასალა რამდენიმე ზოგადი ხასიათის დასკვნის გამოტანის საშუალებას იძლევა:

1. ციტოქრომ P450 წარმოადგენს ხ-ტიპის CO-დამკავშირებელ ჰემოპროტეინს, რომელიც ბუნებაში მრავლობითი ფორმით არსებობს;
2. ციტოქრომ P450-ის მრავლობითი ფორმები პოლიპეპტიდურ ჯაჭვში

ამინომჟავათა განსაზღვრული თანმიმდევრობით ხასიათდებიან, რაც იმაზე მიუთითებს, რომ მათი ბიოსინთეზი სხვადასხვა გენებით კონტროლდება;

3. არსებობს ისეთი ეგზოგენური (ეთოქსირეზორუფინი, ალდრინი) და ენდოგენური (ტესტოსტერონი) სუბსტრატები, რომელთა სპეციფიკური მეტაბოლიზმი ციტოქრომ P450-ის განსაზღვრული ფორმებით კატალიზდება. ამის პარალელურად, სუბსტრატთა უმრავლესობისათვის ფერმენტთა მკაცრად დადგენილი სპეციფიკურობა არ არსებობს, თუმცა ჰემოპროტეინის სხვადასხვა ფორმებით მათი გარდაქმნის სიჩქარეები ხშირად განსხვავებულია;

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

თანამედროვე ნომენკლატურული სისტემა, რომელიც პირველად 1987 წელს ნებერტისა და მისი თანამშრომლების მიერ იქნა შემოთავაზებული, სწორედ იზოფორმების გენეტიკურ განსხვავებებზეა დაფუძნებული. ეს სისტემა ზოგჯერ არც კი გამოხატავს ინდივიდუალური იზოფორმების თვისებებსა და ფუნქციებს. გასული საუკუნის 90-იანი წლებიდან ახალი ნომენკლატურა საყოველთაოდ დამკვიდრდა და გამოიყენება ყველა – ცხოველური, მცენარეული და მიკრობული ციტოქრომ P450-ის მრავლობითი ფორმების სისტემიზაციაში.

ნომენკლატურულ სისტემაში ციტოქრომ P450-ის მრავლობითი ფორმები გაერთიანებულია გენების ერთ სუპერ-ოჯახში, რომელიც CYP აბრევიატურით აღინიშნება. სუპეროჯახში კოდირებულია 200-მდე ფერმენტი, რომლებიც ოჯახებად და ქვეოჯახებად იყოფა. თითოეული ოჯახი, რომელსაც თავისი ნომერი აქვს მინიჭებული, აერთიანებს 40%-ით იდენტური ამინომჟავური თანმიმდევრობის მქონე ციტოქრომ P450-ის იზოფორმებს. ცალკეული ქვეოჯახი, რომელიც ლათინური ასოთი მოიხსენიება, 55% ჰომოლოგიურობის ხარისხის მქონე იზოფორმებს შეიცავს. ამის მაგალითად შეიძლება მოვიყვანოთ მცენარეული CYP76B1, რომელიც ყველაზე აქტიურად ინდუცირდება ქსენობიოტიკებით: ფენილეთილბარბიტურის მჟავათი, ქლოფიბრატი, ამინოპირინით, 2,4-D-თი, პროპანილით, ქლორაცეტამიდი, თიოკარბამატი, ქლორტოლურონით, ბენტაზონით და სხვ. მიწავაშლადან გამოყოფილი ეს ციტოქრომ P450 კლასიკური ფერმენტთა კლასიფიკაციის მიხედვით დარიჩინმჟავა-4-ჰიდროქსილაზას (EC 1.14.14.1) წარმოადგენს. აღნიშვნაში CYP76B1 „CYP76“ მიუთითებს გენების ოჯახზე, „B“ –

ქვეოჯახზე, ხოლო „1“ – სპეციფიკურ ინდივიდუალურ გენზე.

ამჟამად არსებობს ციტოქრომ P450-ების გენების 28 ოჯახი, რომელთაგან 11-ს ყველა ბუბუმწოვრის ღვმ-ში ვხვდებით. მაგ., „ოჯახი 1“ – პოლიციკლური არომატული ნაერთებით, მათ შორის 3-მეთილქოლანტრენით ინდუცირებად ციტოქრომ P450-ებს მოიცავს, ხოლო „ოჯახი 3“-ის წარმომადგენლები სტეროიდებით ინდუცირდება. „ოჯახი 2“ აერთიანებს რამდენიმე ქვეოჯახს, მაგ., „ქვეოჯახ 2B“-ში ფენობარბიტალით ინდუცირებული ჰემოპროტეინებია, ხოლო „ქვეოჯახ 2E“-ს იზოფორმებისათვის ინდუქტორი ეთანოლია. ზოგჯერ, მოხერხებულობისათვის, ოჯახისთვის ისეთი ნომერია შერჩეული, რომ იგი ფერმენტის სპეციფიკურ აქტივობას უკავშირდება. მაგ., „ოჯახი 11“ შეიცავს ციტოქრომ P450-ებს, რომლებსაც სტეროიდ-11-β-ჰიდროქსილაზური აქტივობა გააჩნიათ. ასევეა დანომრილი „ოჯახი 17“ (სტეროიდ-17-α-ჰიდროქსილაზა), „ოჯახი 21“ (სტეროიდ-21-ჰიდროქსილაზა) და სხვ. თუმცა, როგორც აღვნიშნეთ, ოჯახებსა და ქვეოჯახებში იზოფორმები ერთიანდება არა სუბსტრატული სპეციფიკურობის, არამედ გენეტიკური ჰომოლოგიურობის ხარისხის მიხედვით.

ციტოქრომ P450-ის იზოფორმების მრავლობითობა ინჰიბიტორების მრავალფეროვნებას განაპირობებს. ამჟამად ციტოქრომ P450-ის ინჰიბიტორები, მოქმედების მექანიზმის მიხედვით, 4 ჯგუფად იყოფა:

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

ბ ჯგუფის ინჰიბიტორები SKF-525A, პიპერონილ ბუთოქსიდი, მეთირაპონი და სხვ. მოქმედებენ რეაქციის მექანიზმის დონეზე – ისინი სუბსტრატის მსგავსად უკავშირდებიან აქტიურ ცენტრს, მაგრამ არ გარდაიქმნებიან. ამ ჯგუფის ინჰიბიტორების მოქმედების ეფექტი ზანმოკლეა;

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

დ ჯგუფის ინჰიბიტორები წარმოადგენენ აგენტებს, რომლებიც ჰემის დესტ-

რუქციის დონეზე მოქმედებენ. მაგ., ალილიზოპროპილაცეტამიდი რეაგირებს ციტოქრომ P450-თან და წარმოქმნის ეპოქსიდს, რომელიც ჰემის დესტრუქციას იწვევს, ასეთივე ეფექტი გააჩნია ოთხქლორიან ნახშირბადასაც, რომელიც ციტოქრომ P450-ისათვის „გამანადგურებელი“ სუბსტრატია, რადგან ჰემისათვის „საშიშ“ ტრიქლორმეთილის თავისუფალი რადიკალს გენერირებს. ჰემის დესტრუქტორია აგრეთვე ზოგიერთი მძიმე მეტალის იონიც, კერძოდ, Cd^{2+} .

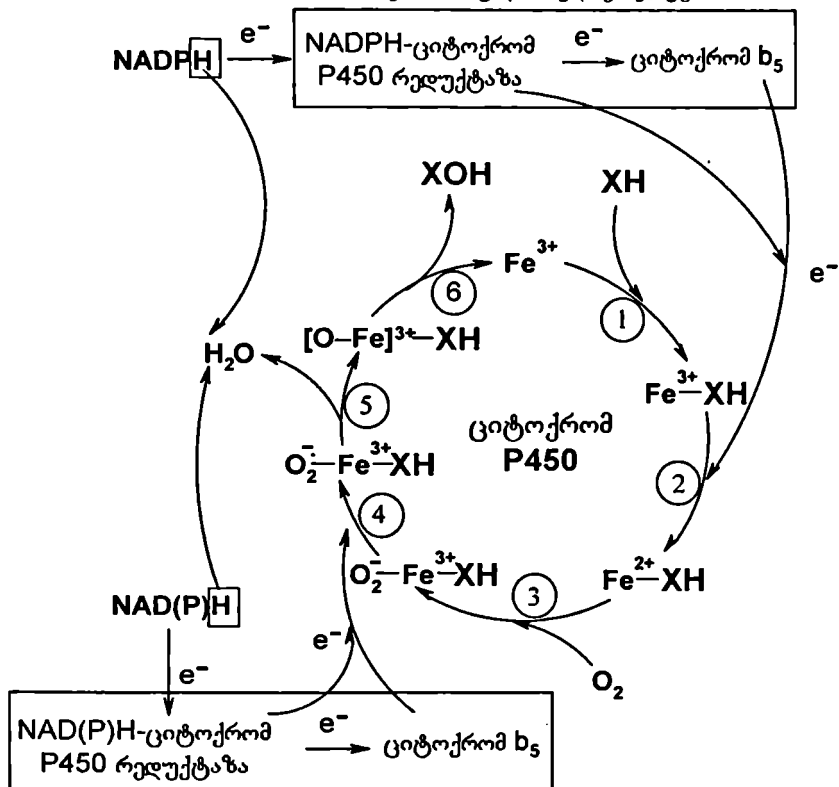
2.5.3 ციტოქრომ P450-ის მოქმედების მექანიზმი

ციტოქრომ P450-ით კატალიზებული მონოოქსიგენირების რეაქცია ციკლური მექანიზმით ხორციელდება, რომელიც მონოოქსიგენაზური ციკლის სახელწოდებითაა ცნობილი (ნახ. 21). განვიხილოთ მისი ცალკეული სტადიები.

პირველ სტადიაზე ციტოქრომ P450-ის ჰემი, რომელიც დაჟანგულ (Fe^{+3}) მდგომარეობაშია, სუბსტრატის მოლეკულას იკავშირებს და წარმოიქმნება ფერმენტ-სუბსტრატის კომპლექსი (სქემაზე $Fe^{+3}-XH$), რომელსაც ფერიციტოქრომ P450-ს უწოდებენ. ფერიციტოქრომ-სუბსტრატის კომპლექსის წარმოქმნას თან სდევს ჰემოპროტეინის შთანთქმის დიფერენციული სპექტრის და სპინური მდგომარეობის ცვლილებები, რაც, როგორც აღვნიშნეთ, სუბსტრატის თვისებებითაა გამოწვეული. სპინური მდგომარეობა, თავის მხრივ, ფერმენტის რედოქს-პოტენციალის მნიშვნელობას განსაზღვრავს, კერძოდ, ჰემინური რკინა დაბალსპინურიდან (ჯამური სპინი $+1/2$) მაღალსპინურში (ჯამური სპინი $+5/2$) გადადის, ფერიციტოქრომ P450-ის რედოქს-პოტენციალი კი -300 mV-დან $+170$ mV-მდე იზრდება. პოტენციალის ასეთი მნიშვნელობის გამო თერმოდინამიკურად ხელსაყრელი ხდება NAD(P)H-ის აღმდგენელი ექვივალენტების ფერიციტოქრომზე გადასვლა.

მეორე სტადიაზე ფერმენტ-სუბსტრატის კომპლექსი პირველი ელექტრონით აღდგება და მიიღება ფეროციტოქრომ P450 (სქემაზე $Fe^{+2}-XH$). პირველი ელექტრონის აქცეპტირება არ წარმოადგენს ჰიდროქსილირების მთლიანი პროცესის სირქარემალიმიტირებელ სტადიას. ნაჩვენებია, რომ სისტემა, სადაც ჰემი I-ტიპის სუბსტრატთანაა დაკავშირებული, მაღალსპინურ მდგომარეობაში იმყოფება, და შესაბამისად, მაღალი რედოქს-პოტენციალი გააჩნია, რედოქს-პარტნიორად NADPH-ციტოქრომ P450-რედუ-

მიკროსომული რედოქს-ჯაჭვი



მიკროსომული ან მიტოქონდრიული რედოქს-ჯაჭვი

ნახ. 21. ციტოქრომ P450-ის მოქმედების მექანიზმი (მონოოქსიგენაზური ციკლი).

ქტაზას ირჩევს. აქვე უნდა აღინიშნოს, რომ აღდგენილ მდგომარეობაში პეში ადვილად იკავშირებს ნახშირბადის მონოოქსიდს, რომელთანაც ფოტოლისოციერებად კომპლექსს წარმოქმნის. აღნიშნული თვისების გამო CO ციტოქრომ P450-ის სპეციფიკურ ინჰიბიტორად ითვლება.

მესამე სტადიაზე ფეროციტოქრომ-სუბსტრატის კომპლექსი მოლეკულურ ჟანგბადს იკავშირებს და წარმოიქმნება ოქსიციტოქრომ P450 (სქემაზე $O_2^-Fe^{3+}-XH$). ეს პროცესი ციკლის ყველაზე სწრაფი ეტაპია.

მიღებული სამმაგი კომპლექსი სტაბილურობით გამოირჩევა და გამოყოფილია იზოლირებული სახით. ოქსიციტოქრომის სამმაგი კომპლექსის შესწავლამ ცხადყო, რომ ოქსიჰემოგლობინის ანალოგიურად, ელექტრონული სიმკვრივე ჟანგბადის ატომებზეა გადანაცვლებული. ამის გამო ჰემის რკინა დაჟანგულ მდგომარეობაში იმყოფება. სამმაგმა კომპლექსმა შეიძლება განიცადოს დისპროპორციონირება სუპეროქსიდული ანიონ-რადიკალის წარმოქმნით. არაა გამორიცხული, რომ ფერმენტ-სუბსტრატულმა კომპლექსმა ჟანგბადის მოლეკულის ნაცვლად წყალბადის ზეჟანგიდან ან ორგანული ჰიდროზეჟანგებიდან აღდგენილი ჟანგბადატომები დაიკავშიროს.

მეოთხე სტადიაზე ადგილი აქვს სამმაგი კომპლექსის აღდგენას NADPH-ან NADH-სპეციფიკური რედოქს-ჯაჭვიდან მიღებული მეორე ელექტრონით და ოქსიციტოქრომიდან წარმოიქმნება პეროქსიციტოქრომ P450 (სქემაზე $O_2^- - Fe^{1+} - XH$). რეკონსტრუირებული სისტემების კვლევისას დადგენილია, რომ ციტოქრომ P450-ის ფუნქციონირებისათვის საკმარისია მხოლოდ NADPH-დამოკიდებული ფლავოპროტეინი. ეს მიუთითებს NADPH-ციტოქრომ P450-რედუქტაზის უნარზე, უზრუნველყოს ციტოქრომ P450 ორივე აუცილებელი ელექტრონით. სამმაგი კომპლექსის აღდგენაში NADPH-ის და ციტოქრომ b_5 -ის მონაწილეობაზე არსებული მრავალრიცხოვანი ექსპერიმენტული მონაცემებიდან გამომდინარე, NADH-სპეციფიკური რედუქტაზის როლის მთლიანად გამორიცხვა არ შეიძლება. უნდა აღინიშნოს, რომ ზოგიერთი მკვლევარი მეორე აღმდგენელი ელექტრონის მიწოდებაში NADH-ციტოქრომ P450-რედუქტაზას უპირატესობასაც კი ანიჭებს. მონო-ოქსიგენირების რეაქციაში ორივე რედოქს-ჯაჭვის მონაწილეობას ადასტურებს ე.წ. სინერგიზმის მოვლენაც, როდესაც NADPH : NADH-ის გარკვეული თანაფარდობისას ჟანგვის სიჩქარე გაცილებით ჭარბობს ცალკე აღებული ნიკოტინამიდიური კოფერმენტების მოქმედების შემთხვევაში მიღებული სიჩქარეების არითმეტიკულ ჯამს. მაგ., ჩვენს ლაბორატორიაში ჩატარებული ექსპერიმენტებით ნაჩვენებია, რომ დიმეთილანილინის შემთხვევაში სინერგიზმის მაქსიმალური ეფექტი NADPH-ისა და NADH-ის 4 : 1 თანაფარდობისას მიიღება. როგორც ჩანს, ნიკოტინამიდიური კოფერმენტების ასეთი მოლური შეფარდებისას NADPH- და NADH-დამოკიდებულ მიკროსომულ რედოქს-სისტემებს შორის ოპტიმალური შეთანაწყობა მყარდება.

მეხუთე სტადიაზე პეროქსიციტოქრომ P450-ის სამმაგი კომპლექსი იშლება. ამ დროს ორი ელექტრონით აღდგენილი ჟანგბადის მოლეკულიდან გენერირებული სუპეროქსიდული ანიონ-რადიკალის ერთი ატომი იერთებს NAD(P)H-ის ჟანგვისას მიღებულ ორ პროტონს და წყლის

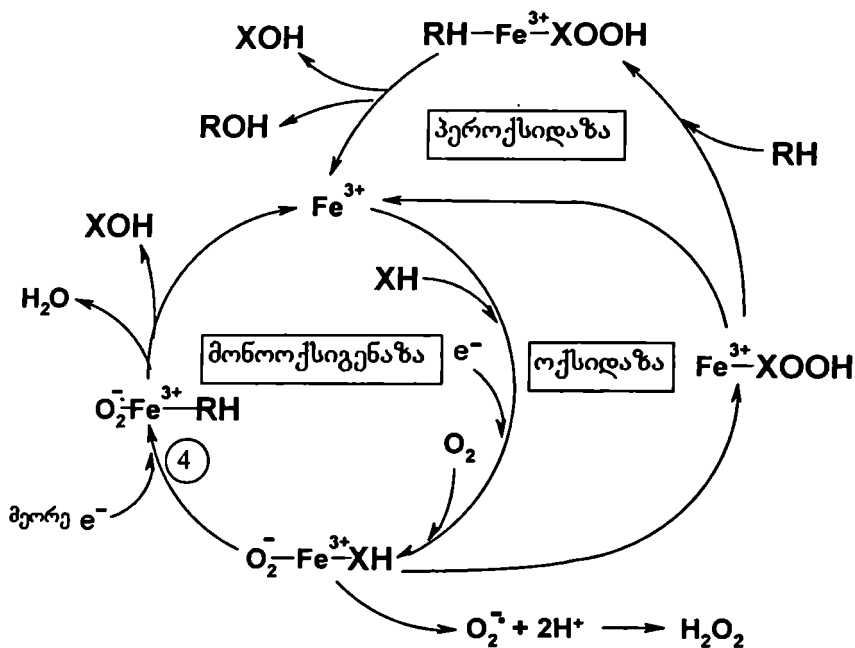
მოლეკულას წარმოქმნის. ჟანგბადის მეორე ატომი ე.წ. მაჰიდროქსილ-ირებელი ნაწილაკის სახით ურთიერთქმედებს სუბსტრატთან, ინერგება მის მოლეკულაში და ჰიდროქსილირებულ პროდუქტს წარმოქმნის.

მექვე სტადიაზე ხდება ჰიდროქსილირებული პროდუქტის მოცილება ფერმენტის აქტიური ცენტრიდან. ამ დროს ციტოქრომ P450-ის ჰემი კვლავ დაჟანგულ მდგომარეობას უბრუნდება და მას სუბსტრატის ახალი მოლეკულის მიერთება შეუძლია.

სადღეისოდ ცნობილია, რომ მონოოქსიგენაზური რეაქცია არცთუ ისე სწრაფია – ციკლის სრული განხორციელებისათვის 1-დან 10 წმ-მდეა საჭირო. სწორედ ამიტომ ქსენობიოტიკებისა და ენდოგენურ ნაერთთა მეტაბოლიზმში ციტოქრომ P450-დამოკიდებული ეტაპი თითქმის ყველთვის სინქარის მაღლიმიტირებელ რგოლს წარმოადგენს. თვით ციკლში ყველაზე ნელია მეოთხე სტადია, როდესაც ოქსიციტოქრომ P450 მეორე ელექტრონით უნდა აღდგეს. რეაქციის განხორციელებისათვის ამ დროს ყველა პირობაა შექმნილი: აქტიურ ცენტრში იმყოფება სუბსტრატიც და ჟანგბადიც. საჭიროა მხოლოდ ენერგიის დამატებითი ულუფა მეორე ელექტრონის სახით, რათა აქტივაციის ენერგიამ იმ ზღვარს მიაღწიოს, რომელიც აუცილებელია ჟანგბადის ატომის სუბსტრატის მოლეკულაში ჩასანერგად.

მონოოქსიგენაზური ციკლის მეოთხე სტადია სხვა მხრივაც შეიძლება ჩათვალოს მთავარ, საკვანძო უბნად ციტოქრომ P450-ის ფუნქციონირებისას, თუ გავითვალისწინებთ, რომ ეს ჰემოპროტეინი მონოოქსიგენირების ძირითადი პროცესის გარდა, ოქსიდაზურ და პეროქსიდაზურ რეაქციებსაც აკატალიზებს (ნახ. 22).

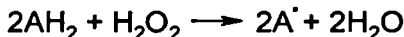
სქემიდან ვხედავთ, რომ მონოოქსიგენაზური, ოქსიდაზური და პეროქსიდაზური ფუნქციების შესრულებისათვის „გზათა გასაყარი“ სწორედ ოქსიციტოქრომის სამმაგი კომპლექსია. როგორც ზევით აღინიშნა, მეორე ელექტრონით აღდგენის შემთხვევაში ოქსიციტოქრომ P450 მონოოქსიგენაზურ ციკლში განაგრძობს ფუნქციონირებას. ეს კომპლექსი შეიძლება დაიშალოს და მისი დისპროპორციონირებით მიიღება სუპეროქსიდული ნაწილაკი, რომელსაც უნარი შესწევს იმოქმედოს პროტონებთან და წყალბადის ზეჟანგი წარმოქმნას, ან ენდოგენური სუბსტრატები (მაგ., ლიპიდები) ორგანულ ჰიდროზეჟანგებად დაჟანგოს. ამ შემთხვევაში ციტოქრომ P450 მოქმედებს, როგორც ოქსიდაზა. გარდა ამისა, ოქსიციტოქრომის დაშლისას გამოთავისუფლებულ ჰემს შეუძლია წყალბადის ზეჟანგის ან ორგანული ჰიდროზეჟანგების დაკავშირება და მათი აქტიური ჟანგბადის წყაროდ გამოყენება გარკვეული RH-ის ტიპის სუბსტრატების დასაჟან-



ნახ. 22. ციტოქრომ P450-ით კატალიზებული მონოოქსიგენაზური, ოქსიდაზური და პეროქსიდაზური ციკლები.

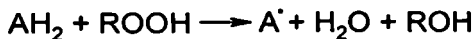
გად. ცხადია, ამ შემთხვევაში ციტოქრომ P450 პეროქსიდაზულ აქტივობას გამოამჟღავნებს.

პეროქსიდაზები ფართოდ არიან გავრცელებული ცხოველურ, მცენარეულ და აერობულ მიკროორგანიზმებში. მათ მიერ კატალიზებულ რეაქციებში წყალბადის დონორის (AH_2 -ის) თანაობისას წყალბადის ზეჟანგის აღდგენა ხდება დამახასიათებელი სტექიომეტრიით:



1972 წ. ობრაიენის ლაბორატორიაში ნაჩვენები იქნა, რომ ციტოქრომ P450-ს შეუძლია სტეროლთა ჰიდროზეჟანგების (ROOH) აღდგენა წყალბადის ისეთი დონორის თანამყოფობისას, როგორიც N,N,N',N' -ტეტრაამეთილ-

p-ფენილენდიამინია (TMPPD). ამ შემთხვევაში სტეკიომეტრია ასეთია:



მაშასადამე, მოცემულ ჰემოპროტეინს პეროქსიდაზის თვისებები გააჩნია. წყალბადის სათანადო დონორის არსებობისას იგი სტეროლთა ჰიდროზე-
ჟანგებს სპირტებამდე აღადგენს.

ეს მონაცემები დაედო საფუძვლად ჰიპოთეზას, რომლის თანახმადაც ორგანულ ჰიდროზეჟანგებს შეუძლიათ ციტოქრომ P450-ის აქტიურ ცენტრს თავისი მოლეკულებიდან გადასცენ უკვე ორი ელექტრონით აღდგენილი ჟანგბადი, რომელსაც ანაერობულ პირობებში სუბსტრატის მოლეკულაში ჩანერგვა შეუძლია; ე.ი. პრაქტიკულად შესაძლებელია მონოოქსიგენირე-
ბის მთლიანი ციკლის შუნტირების (დამოკლების) განხორციელება.

არსებული ექსპერიმენტული მონაცემების თანახმად, რეაქციების უმ-
რავლესობა, რომლებიც მთლიან მიკროსომულ სისტემაში მიმდინარეობენ, შეიძლება მხოლოდ დაჟანგული ციტოქრომ P450-ის ორგანულ ჰიდროზე-
ჟანგებთან შეთანაწყობით განხორციელდნენ. ამ შემთხვევაში მაჰიდროქსი-
ლირებელ აგენტს წარმოადგენს მოცემული ჰემოპროტეინის ფერილწარ-
მოებული, რომელსაც ელექტროფილური მექანიზმით გადააქვს ჟანგბადი
სუბსტრატზე. ნაჩვენებია აგრეთვე სპილენძ-თიროზინის კომპლექსის
($\text{Tyr}_2\text{-Cu}^{2+}$), როგორც სუპეროქსიდდისმუტაზის (EC 1.15.1.1) დაბალმოლე-
კულური ანალოგის ინჰიბიტორული მოქმედება NADPH- და კუმოლის
ჰიდროზეჟანგით სტიმულირებულ ჰიდროქსილირებაზე.

მიკროსომების პეროქსიდაზულ აქტივობაზე გავლენას არ ახდენენ CO,
N₂ და EDTA. მცირე ინჰიბიტორულ მოქმედებას (~20%-მდე) ავლენს
ნატრიუმის აზიდი. პეროქსიდაზული აქტივობა 95%-ით ქვეითდება მიკ-
როსომების 80°C-მდე გაცხელებით. პეროქსიდაზულ რეაქციებზე ეფექ-
ტურ დამთრგუნველ გავლენას ახდენენ მიკროსომების ფერმენტულ სისტე-
მათა სუბსტრატები. პეროქსიდაზული რეაქციების მნიშვნელოვან ინჰიბი-
რებას იწვევენ I-ტიპის სუბსტრატები: ანდროსტენდიოლი, ტესტოსტეროლი,
17β-ესტრადიოლი, ამინოპირინი, ჰექსობარბიტალი და ლინოლმჟავა. უფრო
მძლავრი ინჰიბიტორული მოქმედებით ხასიათდებიან II-ტიპის სუბსტრატები:
ანილინი, იმიდაზოლი, პირიდინი, ციანიდი, კორტიკოსტეროლი და *n*-ოქტი-
ლამინი. ეს მონაცემები პეროქსიდაზულ რეაქციებში ციტოქრომ P450-ის
დაჟანგული ფორმის მონაწილეობაზე მეტყველებენ. ამაზევე მიუთითებს
CO-ს არაეფექტურობა, რომელიც კომპლექსს მხოლოდ აღდგენილ ჰემო-

პროტეინთან წარმოქმნის. გამოთქმული ვარაუდი, რომ ჰიდროზეჟანგებთან ურთიერთქმედებისას ციტოქრომ P450 პეროქსიდაზის I კომპლექსის ანალოგიურ კომპლექსს წარმოქმნის, რომელშიც ჰემური რკინა ჟანგვის მაღალ ხარისხში იმყოფება:



როგორც სქემიდან ვხედავთ, ციტოქრომ P450-ით განხორციელებულ რეაქციებში დასაშვებია წყალბადის დონორად NADH-ისა და NADPH-ის გამოყენება.

არასასურველი დამატებითი პროცესი, რომელიც სუბსტრატთა უმეტესობის ჰიდროზეჟანგულ ჟანგვას ახლავს, ციტოქრომ P450-ზე კუმოლის ჰიდროზეჟანგის დესტრუქციული მოქმედებაა. მესამეული ბუთილის ჰიდროზეჟანგთან ერთად იგი არამარტო ამ ჰემოპროტეინის, არამედ ციტოქრომ b_5 -ის დაშლასაც იწვევს. დესტრუქციის დეტალურმა კინეტიკურმა კვლევამ აჩვენა, რომ ეს პროცესი საკმაოდ რთულია და სამფაზიანობით ხასიათდება. კუმოლის ჰიდროზეჟანგის სიჭარბისას ციტოქრომ P450-ის დესტრუქციის პროცესი შეიძლება შეფასდეს ყოველი ფაზისათვის სიჩქარის ბიომოლეკულური კონსტანტებით. მიკროსომული სისტემის სუბსტრატები, მაგ., ანილინი, ძლიერ ამუხრუჭებენ ჰიდროზეჟანგებით ციტოქრომ P450-ის დესტრუქციას. საინკუბაციო ნარევიში რადიკალური პროცესების ინჰიბიტორის – ნაფტოლის შეტანისას მის ზარჯვას თან ახლავს დესტრუქციის პროცესის ძლიერი დამუხრუჭება. ამ ანტიოქსიდანტის ასეთი ეფექტი ციტოქრომ P450-ის დესტრუქციის რადიკალურ ბუნებაზე მიუთითებს. წარმოქმნილი $\text{RO}\cdot$ და $\text{RO}_2\cdot$ ტიპის რადიკალები უტყევენ ციტოქრომ P450-ის ჰემის პორფირინის როგორც ბირთვს, ასევე აპოფერმენტს და შლიან მათ.

კოსუბსტრატად NADPH-ის გამოყენებისას $\text{Tyr}_2\text{-Cu}^{2+}$ -ის კომპლექსის სხვადასხვა კონცენტრაციებისადმი განსაკუთრებით მგრძნობიარე დიმეთილანილინის N-დემეთილირება და ანილინის *p*-ჰიდროქსილირებაა. $50 \mu\text{M Tyr}_2\text{-Cu}^{2+}$ ამ რეაქციების სიჩქარეებს თითქმის ნულამდე აგდებს. კუმოლის ჰიდროზეჟანგზე დამოკიდებულ სისტემაში კომპლექსის ინჰიბიტორული ეფექტი (50 და 70%) მხოლოდ აღნიშნულ სუბსტრატთა მიმართაა შენარჩუნებული.

NADPH- და კუმოლის ჰიდროზეჟანგ-დამოკიდებულ ქსენობიოტიკთა მიკროსომული ჰიდროქსილირების რეაქციებზე სპილენძ-თიროზინის კომპლექსის მოქმედების შედარებისას შეიძლება გაკეთდეს დასკვნა, რომ კოსუბსტრატად NADPH-ის გამოყენებისას რეაქცია ინჰიბიტორის მიმართ გაცილებით მგრძნობიარეა. ეს კი თავისთავად გულისხმობს, რომ NADPH-ითა და ჰიდროზეჟანგებით სტიმულირებული რეაქციები განსხვავებული მექანიზმებით იმართებიან. შესაძლოა, ამ რეაქციებში სუპეროქსიდულ რადიკალს განსხვავებული როლი აკისრია. სპილენძ-თიროზინის კომპლექსის მაინჰიბირებელი ეფექტურობა დამოკიდებულია დასაჟანგი სუბსტრატის ტიპზე, ჰიდროქსილირების კოსუბსტრატზე (NADPH-ზე და ჰიდროზეჟანგზე) და ციტოქრომ P450-ის მდგომარეობაზე (მიკროსომულზე, ხსნადზე, ლიპოსომების შემადგენლობაში მყოფზე და ა.შ.).

მცენარეული მიკროსომული მონოოქსიგენაზის შუნტირების პიპოთეზა მოწმდებოდა ჩვენს ლაბორატორიაში. კვლევის მიზანს შეადგენდა დაგვედგინა N-დემეთილირებისა და p-ჰიდროქსილირების რეაქციათა მსვლელობები კოსუბსტრატებად NADPH-ისა და კუმოლის ჰიდროზეჟანგის გამოყენებისას, აგრეთვე ამ რეაქციებში $\text{Tyr}_2\text{-Cu}^{2+}$ -ის ინჰიბიტორული ეფექტურობა. ცდები ტარდებოდა სიმინდისა და სოიის გაჯირჯეველ ლეზნებზე, რომელთაც მიკროსომული სისტემის ადექვატურად განვიხილავდით. აღმოჩნდა, რომ ორივე მცენარის თესლებში ინტენსიურად ხორციელდებოდა პირველი და მეორე ტიპის სუბსტრატთა NADPH-დამოკიდებული, ზოლო სოიის ლეზნებში პირველი ტიპის სუბსტრატთა ჰიდროზეჟანგ-დამოკიდებული ჟანგვითი გარდაქმნები.

ჰიდროზეჟანგ-სტიმულირებული ამინოპირინისა და დიმეთილანლინის N-დემეთილირება მნიშვნელოვნად ითრგუნება სპილენძ-თიროზინის კომპლექსით და საერთო ინჰიბიტორული ეფექტი 50–65%-ს აღემატება. გაცილებით ნაკლები ინტენსივობით დაითრგუნა ორივე ტიპის სუბსტრატთა NADPH-დამოკიდებული ჟანგვის რეაქცია.

უაღრესად საყურადღებოა, რომ NADPH- და ჰიდროზეჟანგ-დამოკიდებული რეაქციების სპილენძ-თიროზინის კომპლექსით ინჰიბირება ფოსფატიდილქოლინით სრულად იხსნება და შემდგომ სტიმულირდება კიდევ. ამ ფოსფოლიპიდით გამოწვეული მაქსიმალური სტიმულაცია (~200%) გამოვლენილია სოიის ლეზნებში ჰიდროზეჟანგ-დამოკიდებულ პირველი ტიპის სუბსტრატთა N-დემეთილირებისას. შესაძლოა, ფოსფოლიპიდი იცავს მემბრანებს და ჰემოპროტეინს იმ თავისუფალი რადიკალების დამანგრეველი მოქმედებისაგან, რომლებიც შეიძლება წარმოიქმნან სპილენძ-თიროზინის

კომპლექსის ურთიერთქმედებისას კუმოლის ჰიდროზეფანგთან, ან ენდოგენურ ჰიდროზეფანგებთან (სარეაქციო არეში NADPH-ის თანამყოფობის დროს). გამოირიცხული არც ისაა, რომ ფოსფატიდილქოლინის გავლენით ციტოქრომ P450-ის აქტიური ცენტრი თავისუფლდებოდეს ინჰიბიტორისაგან, თუ კომპლექსის ფერმენტთან დაკავშირება მაინც მოხდა.

დასასრულს, არ შეიძლება არ აღვნიშნოთ, რომ მონოოქსიგენაზური ციკლის შუნტირების პრობლემით გატაცება, რასაც გარკვეული პერიოდის განმავლობაში ჰქონდა ადგილი, შეცვალა მასთან შედარებით ფრთხილი დამოკიდებულების ტენდენციამ. ასე მაგალითად, კუნისა და მის თანამშრომლების (1981 წ.), აგრეთვე ესტაბრუკისა და მისი თანამშრომლების (1980 წ.) მიერ ჩატარებული კვლევების შედეგად აღმოჩნდა, რომ არსებობს ძირეული განსხვავება ასეთი შუნტირებული რეაქციებისა და სრული ციკლის მქონე მონოოქსიგენაზური რეაქციების მექანიზმებს შორის. განსხვავებები მუდამედება ჰიდროქსილირების შუალედურ და საბოლოო პროდუქტების ანაკრებში, ინჰიბიტორებისადმი დამოკიდებულებაში, წარმოქმნილი სამმაგი კომპლექსის სპექტრულ თვისებებში, მონოოქსიგენაზებთან შედარებით ჰიდროზეფანგურ სისტემაში ციტოქრომ P450-ის უფრო სწრაფ ინაქტივაციაში და სხვ. ყოველივე ეს იმ თვალსაზრისის სასარგებლოდ მეტყველებს, რომელიც თვლის, რომ შუნტირებული ციკლები ჭეშმარიტი მონოოქსიგენაზური ციკლის არასრული მოდელებია, ანუ პეროქსიდაზული და მონოოქსიგენაზური მექანიზმები ერთმანეთისაგან არსებითად განსხვავდებიან.

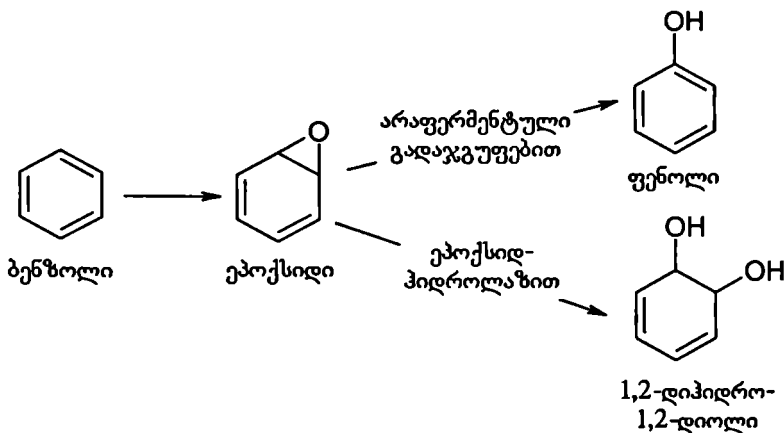
2.5.4 ციტოქრომ P450-ით კატალიზებული რეაქციები

მცენარეში ციტოქრომ P450-შემცველი მონოოქსიგენაზა ერთ-ერთ საკვანძო ფერმენტს წარმოადგენს მთელი რიგი მეორეული ნაერთების ბიოსინთეზებში, კერძოდ, მისი მონაწილეობით სინთეზდება: ლიგნინის მონომერები, ანთოცინინები, ფურანოკუმარინები, იზოფლავონოიდები, სტეროლები, ჰიბერელინები, ალკალოიდები, ციანოგენური გლიკოზიდები, ფიტოალექსინები, ლიმონენი, გერანიოლი, ცხიმოვანი მჟავების ჰიდროქსი-წარმოებულები და სხვ. ასევე ღიძია ფერმენტის მნიშვნელობა სხვადასხვა ქიმიური სტრუქტურის, ლიპოფილური ბუნების მქონე ორგანული ქსენობიოტიკების მეტაბოლიზმში. ციტოქრომ P450-ის დანიშნულებაა რთული, რეგო- და სტერეოსპეციფიკური რეაქციების კატალიზება, რომლის დროსაც ხდება ალიფატური და არომატული ნაერთების C- და N-ჰიდროქსილირება, N-, O- და S-დეალკი-

ლირება, დეამინირება, N- და S-ჟანგვა, დეჰალოგენირება და სხვ.

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

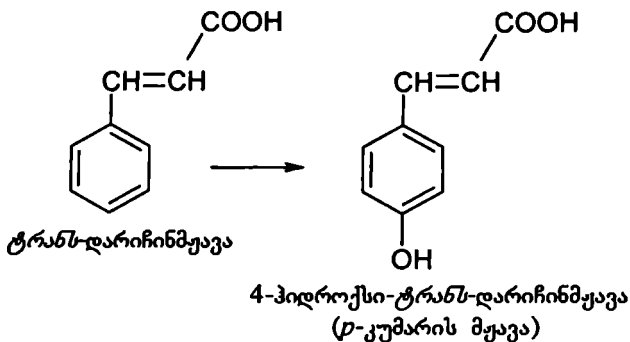
არომატული ბირთვის ჰიდროქსილირება ორ სტადიას მოიცავს. სავარაუდოდ, შუალედური პროდუქტია ეპოქსიდი, რომლისგანაც შემდგომში არაფერმენტული ან ფერმენტული გზით შესაბამისად მონოფენოლი ან 1,2-დიჰიდრო-1,2-დიოლი უნდა წარმოიქმნას (ნახ. 23).



ნახ. 23. არომატული ბირთვის ჰიდროქსილირება ბენზოლის მაგალითზე.

ამ ტიპის რეაქციებს ადგილი აქვს ფენოლური ნაერთების ბიოსინთეზში, კერძოდ, ლიგნინის, ფლავონოიდებისა და დარიჩინის ეთერების ფორმირების ფენილპროპანოიდულ გზაზე. მათგან ძირითადია ტრანს-დარიჩინმჟავას გარდაქმნა *p*-კუმარმჟავად (ნახ. 24), რომლის განხორციელებაშიც მონაწილეობს პროცესის ერთ-ერთი საკვანძო ფერმენტი – ციტოქრომ P450-დამოკიდებული დარიჩინმჟავა-4-ჰიდროქსილაზა.

დარიჩინმჟავა ციტოქრომ P450-ის პირველი ტიპის სუბსტრატს წარ-

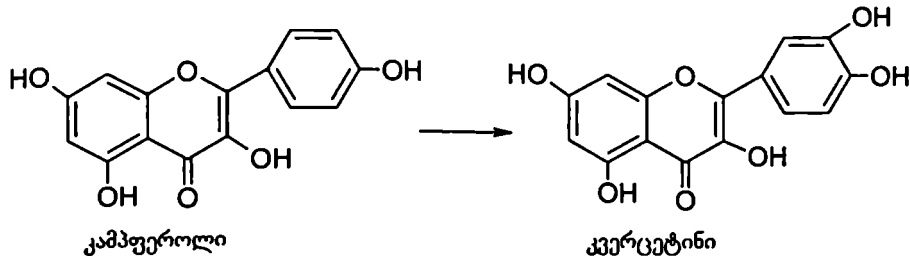


ნახ. 24. ტრანს-დარიჩინმჟავას გარდაქმნა არომატული ბირთვის ჰიდროქსილირებით.

მოადგენს. პროდუქტით (p-კუმარის მჟავათი) ინჰიბირების გამო დარიჩინ-მჟავა-4-ჰიდროქსილაზა ფენილალანინ-ამიაკ-ლიაზასთან ერთად ფენილ-პროპანოიდური გზის ერთ-ერთი მარეგულირებელი ფერმენტი. დარიჩინ-მჟავა-4-ჰიდროქსილაზა ყველა შესწავლილ მცენარეშია აღმოჩენილი და მას მცენარეული ენდოპლაზმური რეტიკულუმის მემბრანების მარკერულ ფერმენტათაც მიიჩნევენ, თუმცა უნდა აღინიშნოს, რომ ეს ფერმენტი არამიკროსომულ სისტემებშიცაა რეგისტრირებული, კერძოდ, ქერის ეთიოლირებულ ნაზარდებში იგი არამხოლოდ მიკროსომებში, არამედ ციტოზოლშიც ფუნქციონირებს. აღნიშნული ფერმენტული აქტივობა ნაჩვენებია აგრეთვე კარტოფილის ციტოპლაზმასა და გველის სუროს პროვაკუოლურ სისტემაში. ლიგნინის ბიოსინთეზში ციტოქრომ P450-დამოკიდებული რეაქციებია აგრეთვე ეთოქსიკუმარინის O-დემეთილირება, ფერულის მჟავასა და შიკიმის მჟავას წარმოებულის არომატული ბირთვის ჰიდროქსილირება. დარიჩინმჟავას მონოოქსიგენირებისაგან განსხვავებით, ეს რეაქციები არც სუბსტრატებით და არც საკუთარი პროდუქტებით არ ინჰიბირდებიან, ამიტომ ნაკლებად მნიშვნელოვანია.

ციტოქრომ P450 იზოფლავონების არომატული ბირთვის ჰიდროქსილირებასაც აწარმოებს, რისი მაგალითიც კამპფეროლის კვერცხტინად გარდაქმნაა (ნახ. 25).

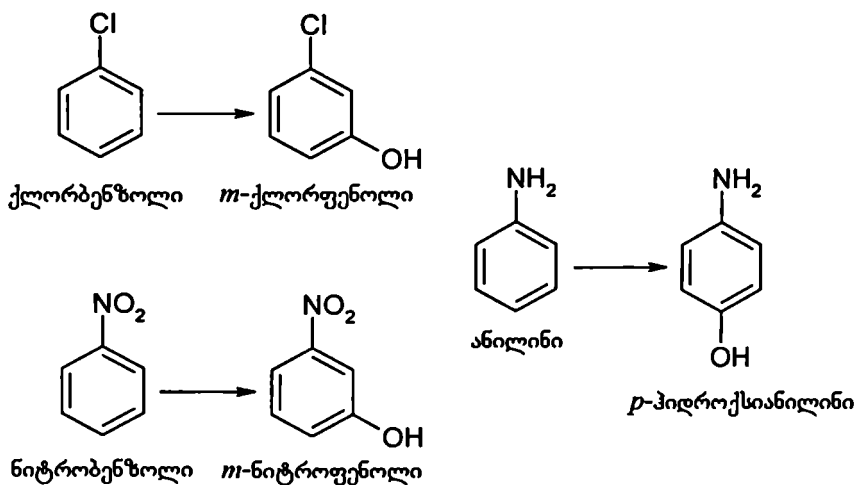
ორგანული ქსენობიოტიკების დიდი ნაწილი მცენარის უჯრედში ციტოქრომ P450-დამოკიდებული არომატული ჰიდროქსილირების გზით გარდაიქმნება. ასეთ ტრანსფორმაციას განიცდიან არამარტო მოდელური ქსე-



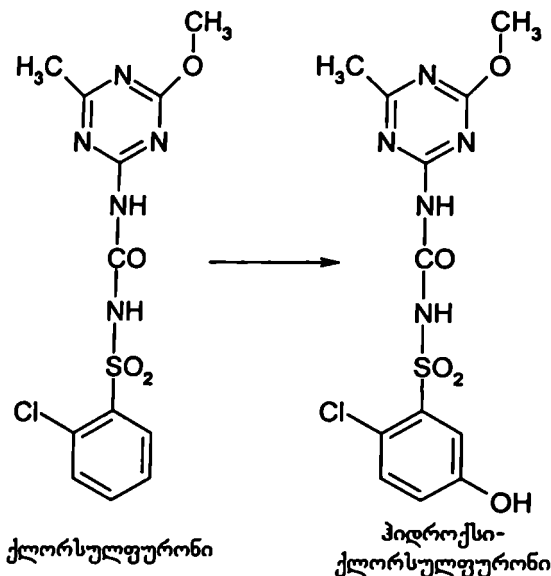
ნახ. 25. კვერცეტინის ბიოსინთეზი არომატული ბირთვის ჰიდროქსილირებით.

ნობიოტიკები (მაგ., ქლორბენზოლი, ნიტრობენზოლი, ანილინი და სხვ.) (ნახ. 26), არამედ ბენზოლის ბირთვის შემცველი მრავალი პესტიციდიც (მაგ., ქლოსულფურონი, ბენტაზინი, დიქლოფოპი და სხვ.) (ნახ. 27–29).

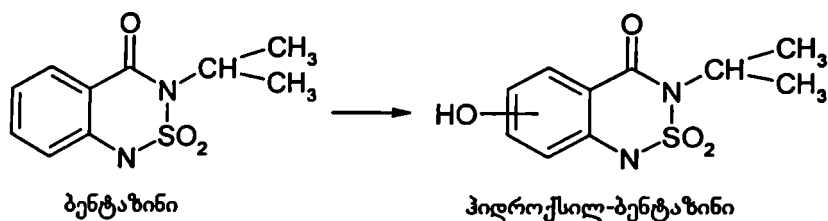
ციტოქრომ P450-დამოკიდებული მონოოქსიგენაზა პოლიციკლური არომატული ნაერთების ჰიდროქსილირებასაც აკატალიზებს. ამის მაგალითია ნაფტალინისა და 3,4-ბეზპირენის ტრანსფორმაცია მცენარეულ უჯრედში. ნაფტალინის არომატული ბირთვი 1 და 2 პოზიციებში ჰიდროქსილირდება, რასაც საბოლოო ჯამში 1,2-დიჰიდროქსინაფტალინის წარმოქმნამდე მიყვავართ (ნახ. 30).



ნახ. 26. მოდელური ქსენობიოტიკების არომატული ბირთვის ჰიდროქსილირება.

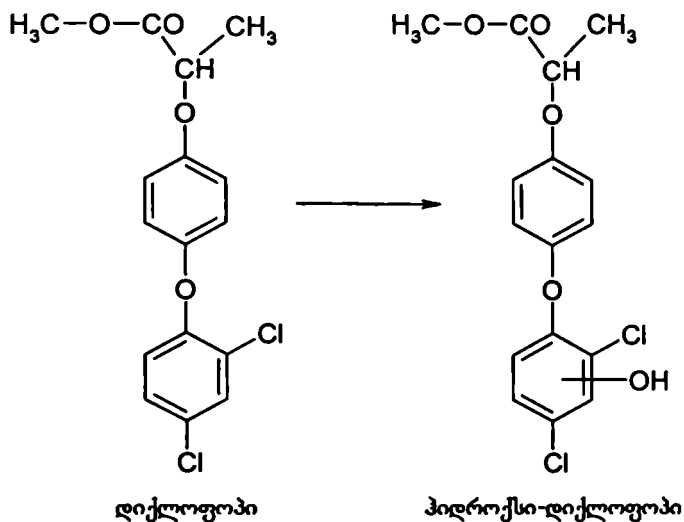


ნახ. 27. პესტიციდ ქლორსულფურონის არომატული ბირთვის ჰიდროქსილირება.

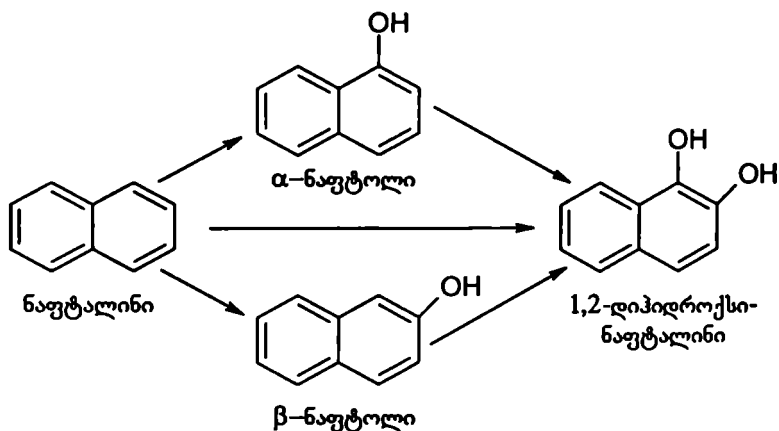


ნახ. 28. პესტიციდ ბენტაზინის არომატული ბირთვის ჰიდროქსილირება.

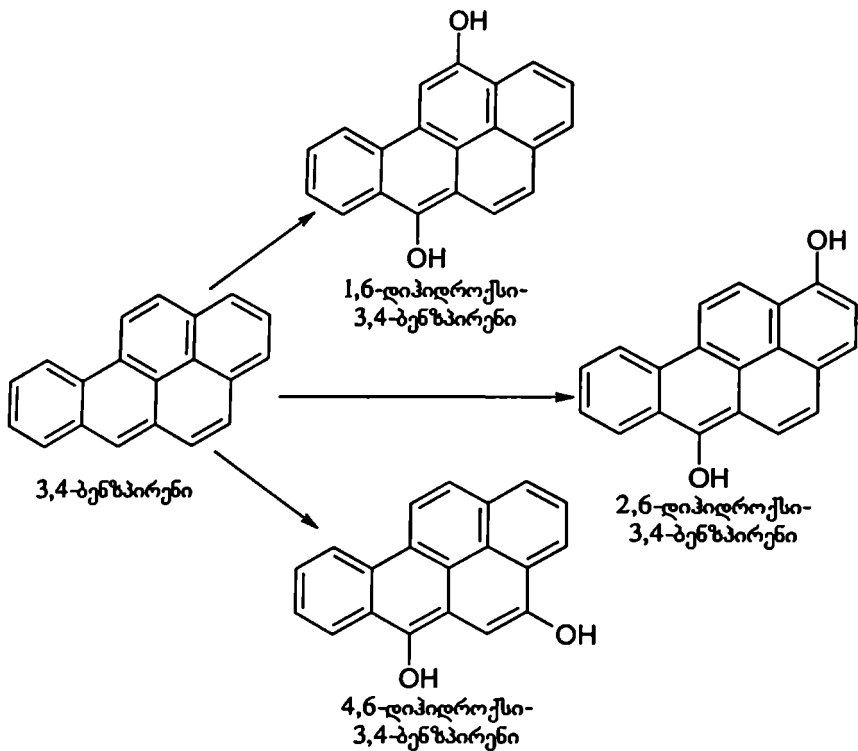
პოლიარომატულ ნაერთთა ჟანგვის შემდგომი ეტაპია ქინონების წარმოქმნა, რაც ხშირად არომატული ბირთვის გახლეჩას იწვევს. უნდა აღინიშნოს, რომ არაჩანაცვლებულ პოლიარომატულ ბირთვში ყოველთვის არსებობს აქტიური, ე.წ. L-უბანი, რომელიც ციტოქრომ P450-დამოკიდებული ჰიდროქსილირების საბიზნეა. მაგ., 3,4-ბენზპირენში ასეთი უბანია 6-მდგომარეობა, რომელიც ყველა შემთხვევაში ჰიდროქსილირდება (ნახ. 31).



ნახ. 29. პესტიციდ დიქლოფოზის არომატული ბირთვის ჰიდროქსილირება.



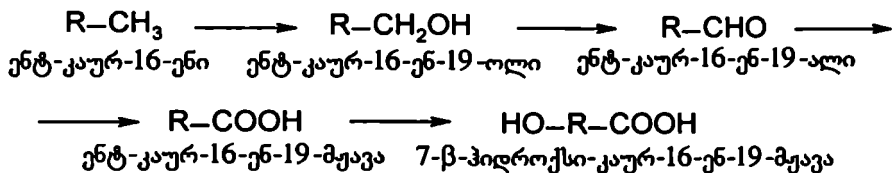
ნახ. 30. არომატული ბირთვის ჰიდროქსილირებით მიმდინარე ნაფტალინის გარდაქმნის რეაქციები.



ნახ. 31. არომატული ბირთვის ჰიდროქსილირებით მიმდინარე 3,4-ბენზაპირენის გარდაქმნის რეაქციები.

ციკლოპარაფინების ჰიდროქსილირებისას ციტოქრომ P450 მონაწილეობს ჰიდროჟენატების წარმოქმნაში, რომელთა შემდგომი გარდაქმნა არაფერმენტული პროცესია.

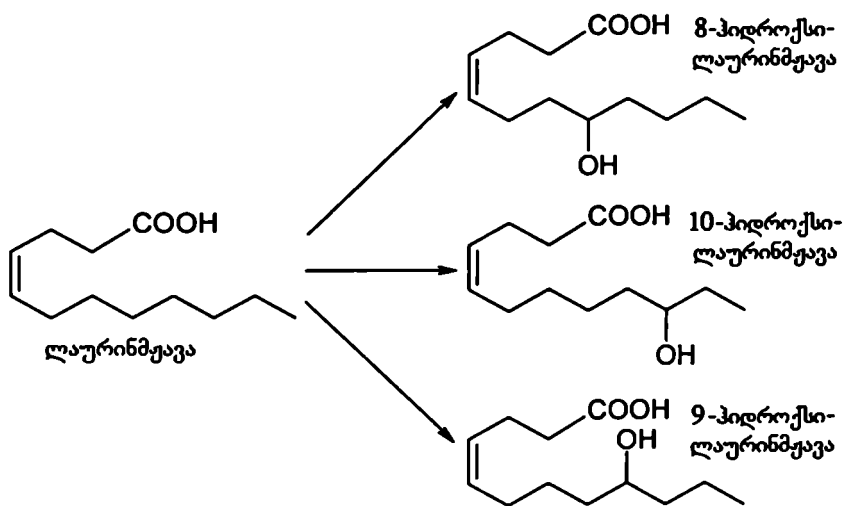
ალიფატური ჰიდროქსილირება ციტოქრომ P450-დამოკიდებული პროცესია, რომელიც ზოგიერთი მეორეული წარმოშობის ნაერთის ბიოსინთეზის საწყის სტადიას აკატალიზებს. მაგ., უმწიფარი თესლების მიკროსომებში ამ გზით მიმდინარეობს პიბერელინების წინამორბედი ტერპენოიდის – ენტ-კაურ-16-ენის დაჟანგვა 7-β-ჰიდროქსი-კაურ-16-ენ-19-მჟავამდე (ნახ. 32). ჟანგვის შუალედურ პროდუქტებს სპირტი, ალდეჰიდი და მჟავა წარმოადგენენ.



ნახ. 32. ციტოქრომ P450-დამოკიდებული ჰიდროქსილირებით მიმდინარე რეაქციები ჰიბერულინების ბიოსინთეზში.

ალიფატური ჰიდროქსილირებით მიმდინარეობს აგრეთვე ციტოქრომ P450-ის მიერ კატალიზებული ცხიმოვანი მჟავების ჟანგვის რეაქციები. ჰიდროქსილირება შეიძლება განიცადოს როგორც ტერმინალური მეთილის ჯგუფის, ისე ალიფატური ჯაჭვის შიდა ნახშირბადატომებმა. გაირკვა, რომ შიდაჯაჭვური მონოოქსიგენირებისას ერთი და იგივე მჟავა შეიძლება სხვადასხვა მდგომარეობაშიც დაიჟანგოს, რაც მკაფიოდ ჩანს მიწავაშლას მიკროსომების მიერ ლაურიმჟავას 8-, 9- და 10-პოზიციებში ჰიდროქსილირების მაგალითზე (ნახ. 33).

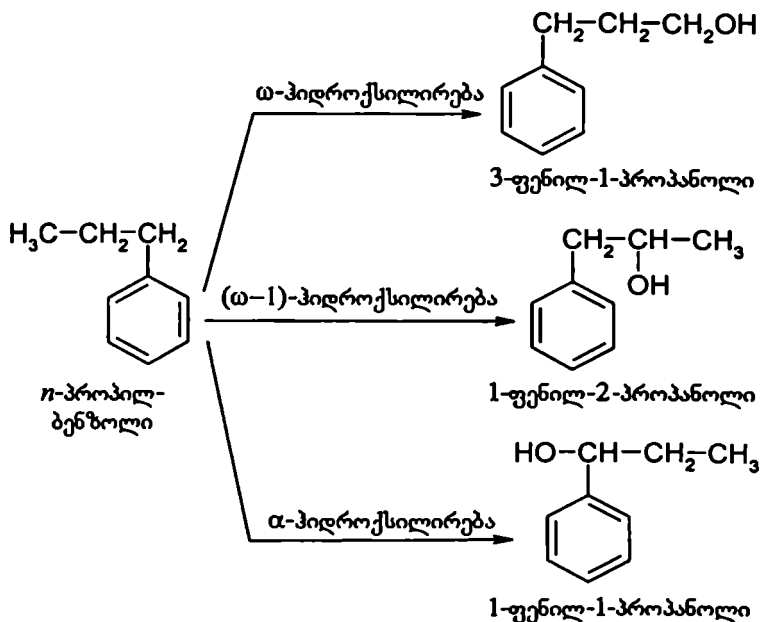
ამავე გზით გარდაიქმნება მრავალი ქსენობიოტიკი, რაც, პირველ რიგში, ალკანებს ეხება. *n*-ალკანების ჰიდროქსილირებისას ციტოქრომ P450-თან



ნახ. 33. ლაურიმჟავას შიდაჯაჭვური ჰიდროქსილირება.

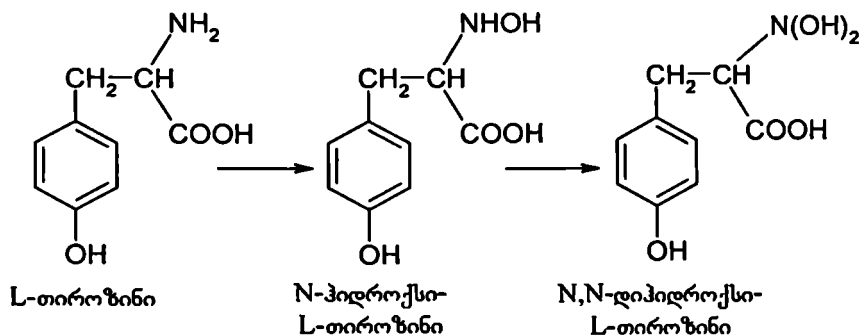
სუბსტრატის დაკავშირება ჰიდროფობული ურთიერთქმედების ძალით ხდება, ამიტომ ალიფატური ჯაჭვის სიგრძის ზრდასთან ერთად სუბსტრატისადმი ფერმენტის სწრაფეც იზრდება. ნაჩვენებია, რომ მონოოქსიგენირებისას ყველაზე ინტენსიური შეტევა მიმდინარეობს მესამეულ C—H ბმაზე, უფრო ნაკლებად ხდება ჟანგბადის ჩართვა მეორეულ ნახშირბადთან და კიდევ უფრო ნაკლებად — პირველადთან.

ზოგიერთი არომატული ბირთვის შემცველი ქსენობიოტიკი, რომელიც ალიფატურ გვერდით ჯაჭვს შეიცავს, მცენარის უჯრედში სწორედ ალკილის ჯგუფში ჰიდროქსილირდება. ამ დროს უპირატესად იმ ნახშირბადატომების ჰიდროქსილირება ხდება, რომლებიც ბირთვიდან დაშორებულია. მაგ., *n*-პროპილბენზოლის ციტოქრომ P450-დამოკიდებული ჰიდროქსილირების ძირითადი მეტაბოლიტებია 3-ფენილ-1-პროპანოლი და 1-ფენილ-2-პროპანოლი, ხოლო 1-ფენილ-1-პროპანოლი მცირე რაოდენობით წარმოიქმნება (ნახ. 34).



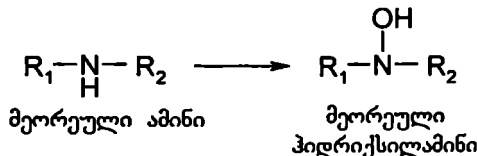
ნახ. 34. ციტოქრომ P450-დამოკიდებული *n*-პროპილბენზოლის ალიფატური უბნის ჰიდროქსილირების რეაქციები.

N-ჰიდროქსილირება, რომელსაც ციტოქრომ P450 აკატალიზებს, L-თიროზინის გარდაქმნის ორ თანმიმდევრულ რეაქციაში გვხვდება (ნახ. 35). წარმოქმნილი N,N-დიჰიდროქსითიროზინი შემდგომში არაფერმენტულ დეჰიდრირებას და დეკარბოქსილირებას განიცდის, რის შედეგადაც ციანოგენური გლიკოზიდის – დარინის მეტაბოლიტი მიიღება. რეაქცია ზორციელდება რეკონსტრუირებულ სისტემაშიც, რომელიც ლიპიდურ მიცელებზე იმობილიზებული NADPH-ციტოქრომ P450-რელუქტაზისა და ციტოქრომ P450-ისაგან შედგება.



ნახ. 35. L-თიროზინის ციტოქრომ P450-დამოკიდებული N-ჰიდროქსილირება ციანოგენური გლიკოზიდების ბიოსინთეზის პროცესში.

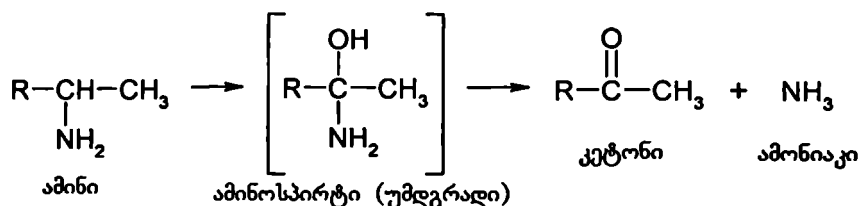
ქსენობიოტიკები, რომლებიც მეორეულ ამინებს წარმოადგენენ, დეგრადაციის პირველ ეტაპზე ციტოქრომ P450-დამოკიდებული N-ჰიდროქსილირების გზით გარდაიქმნებიან (ნახ. 36). მათი შემდგომი ტრანსფორმაცია სხვადასხვა გზით მიმდინარეობს.



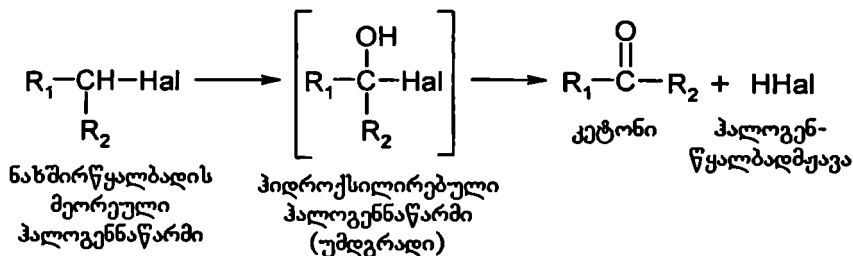
ნახ. 36. მეორეული ამინების ციტოქრომ P450-დამოკიდებული N-ჰიდროქსილირება.

C-ჰიდროქსილირება, რომელსაც ამინებისა და ჰალოგენიდების მეორეული ნახშირბადატომი განიცდის, ასევე ციტოქრომ P450-დამოკიდებული პროცესია. ამ რეაქციების შედეგად უმდგრადი ინტერმედიატები, შესაბამის-

სად – ამინოსპირტი და ჰიდროქსილირებული ჰალოგენნაწარმი წარმოიქმნებიან, რომელთა დაშლის საბოლოო პროდუქტი კეტონია (ნახ. 37 და 38). ამ გზით აზოტისა და ჰალოგენის ატომები წყალბადნერთის სახით სცილდება ტოქსიკანტის მოლეკულას, რაც შემდგომ გარდაქმნებს ბევრად აადვილებს.



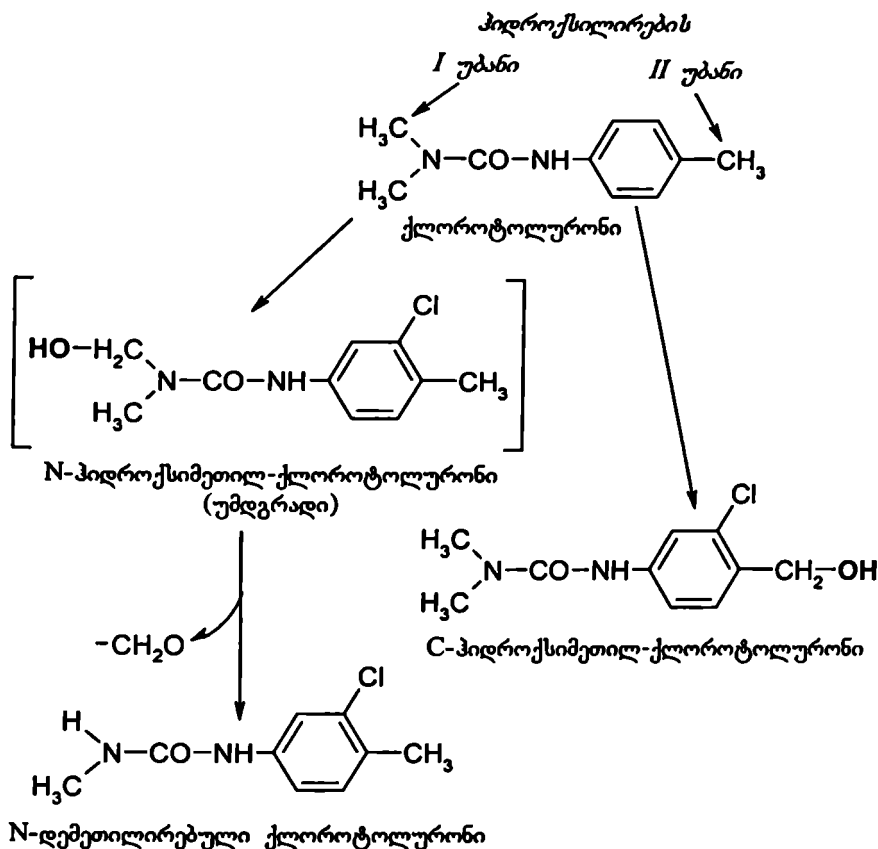
ნახ. 37. ამინების ციტოქრომ P450-დამოკიდებული C-ჰიდროქსილირება.



ნახ. 38. ჰალოგენალკანების ციტოქრომ P450-დამოკიდებული C-ჰიდროქსილირება.

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

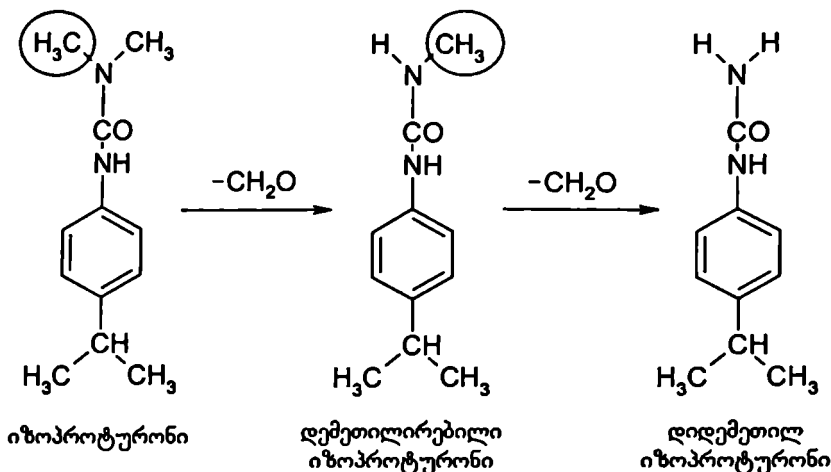
N-დემეთილირების თვალსაჩინო მაგალითია შარდოვანას წარმოებულის ჰერბიციდის – ქლოროტოლურონის გარდაქმნა (ნახ. 39). ეს ჰერბიციდი N- და C-მეთილის ჯგუფებს შეიცავს. ჰიდროქსილირებას განიცდის ორივე ტიპის მეთილის ჯგუფი, მაგრამ N-ჰიდროქსიმეთილის ჯგუფი უმდგრადია და იგი ფორმალდეჰიდის სახით ეხლინება აზოტის ატომს (ხდება N-დემეთილირება). ამიტომ მეტაბოლიტებს შორის იდენტიფიცირდება



ნახ. 39. N- და C-მეთილის ჯგუფების ჰიდროქსილირება პერბიციდ ქლოროტოლურონის მაგალითზე.

არა უშუალოდ N-ჰიდროქსიმეთილქლოროტოლურონი, არამედ N-დემეთილირებული ქლოროტოლურონი. არომატულ ბირთვთან მიერთებული C-ჰიდროქსიმეთილის ჯგუფი გაცილებით მდგრადია და იგი დემეთილირებას არ განიცდის.

N-დემეთილირებას ექვემდებარება პერბიციდი იზოპროტურონიც (ნახ. 40). საინტერესოა აღინიშნოს, რომ ეს ნაერთი ფიტოტოქსიკურია, N-დემეთილირების პირველი სტადიის შედეგად მისი ფიტოტოქსიკურობა საგრძნობლად მცირდება, ხოლო ორივე N-მეთილის მოცილების შემდეგ



ნახ. 40. პერბიციდ იზოპროტურონის ორჯერადი N-დემეთილირების რეაქციები.

მთლიანად ქრება.

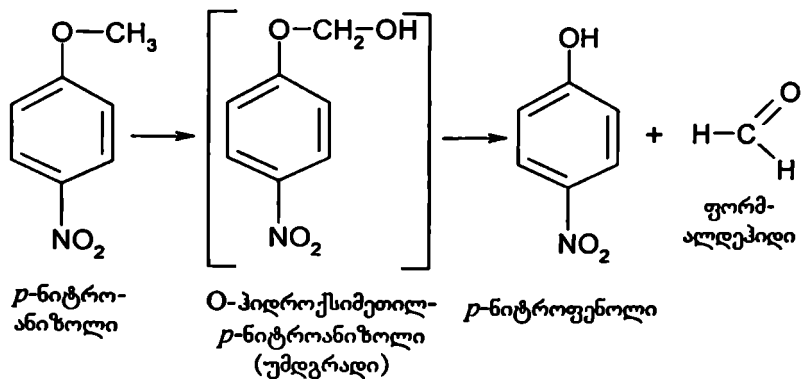
O-დემეთილირება ეთერების ტიპის სუბსტრატებიდან მეთოქსიჯგუფების მოცილების ფართოდ გავრცელებულ რეაქციას წარმოადგენს. რეაქციის მექანიზმი N-დემეთილირების ანალოგიურია და პროდუქტებს შესაბამისი პიდროქსიწარმოებული და ფორმალდეჰიდი წარმოადგენენ, რაც მკაფიოდ ჩანს *p*-ნიტროანიზოლის გარდაქმნის მაგალითით (ნახ. 41).

O-დემეთილირების გზით მნიშვნელოვნად კარგავს თავის ტოქსიკურობას გარემოს დამაბინძურებელი ნაერთი – მესამეული ბუთილ-მეთილ ეთერი ანუ მეთილ-ტერტ-ბუთილ ეთერი (MTBE) (ნახ. 42), რომელიც ტეტრამეთილ-ტყვიის ნაცვლად გამოიყენება, როგორც საწვავის ანტიდეტონატორული დანამატი.

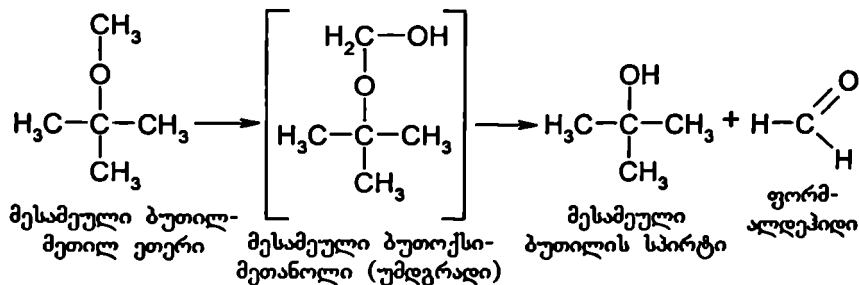
ციტოქრომ P450-ის მიერ კატალიზებულ ბიოსინთეზურ პროცესებს რაც შეეხება, აქ O-დემეთილირების რეაქციაა ეთოქსიკუმარინის O-დემეთილირება ლიგნინის ბიოსინთეზში.

S-დემეთილირებას, როგორც უკვე აღვნიშნეთ, წინ უძღვის ციტოქრომ P450-ის მიერ კატალიზებული S-მეთილის ჯგუფის პიდროქსილირება, რომლის პროდუქტი – S-პიდროქსიმეთილის ჯგუფი არასტაბილურობის გამო შიდამოლეკულურ გადაჯგუფებას განიცდის და ფორმალდეჰიდის გენერირებით იმლება (ნახ. 43).

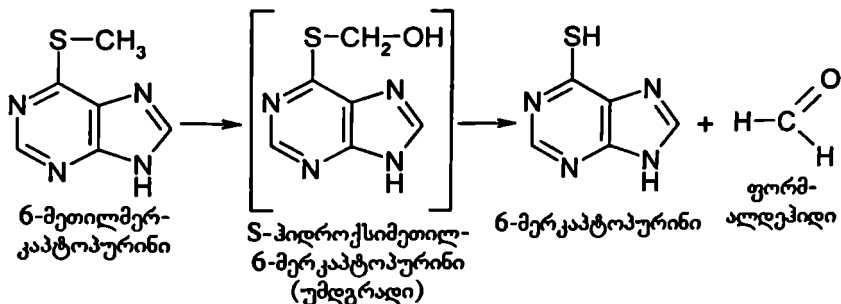
N-ფანგვა, რომლის დროსაც ციტოქრომ P450 აზოტის ატომის უშუ-



ნახ. 41. *p*-ნიტროანიზოლის O-დემეთილირების რეაქცია.



ნახ. 42. MTBE-ს O-დემეთილირების რეაქცია.

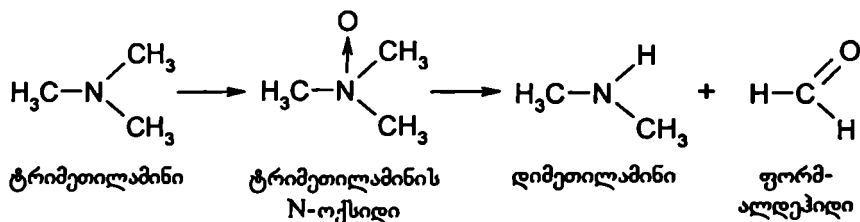


ნახ. 43. 6-მეთილმერკაპტოპურიინის S-დემეთილირების რეაქცია.

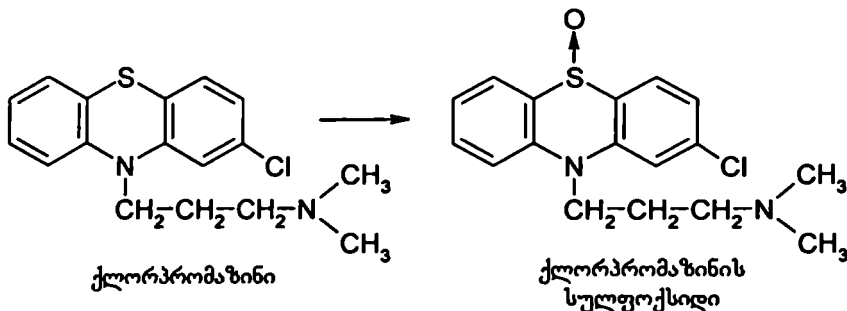
ალო მონოოქსიგენირებას ახდენს, არასტაბილურ პროდუქტს – N-ოქსიდს წარმოქმნის. წინასწარ N-ჟანგვას ამინების ჰიდროქსილირების შესაძლო გზად მიიჩნევენ. ციტოქრომ P450 მხოლოდ პირველადი ამინების N-ჟანგვაში მონაწილეობს, მეორეული და მესამეული ამინები კი მიკროსომული NADPH-საცეფიკური ფლავოპროტეინით იჟანგებიან. N-ოქსიდი ხშირად საწყის ქსენობიოტიკზე უფრო ტოქსიკურია. ციტოქრომ P450-ს შეუძლია N-ოქსიდებთან შემდგომი ურთიერთქმედებაც და საბოლოოდ N-დემეთილირებული პროდუქტი მიიღება (ნახ. 44).

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

მცენარეული ციტოქრომ P450-დამოკიდებული S-ჟანგვის მაგალითებია ქლორპრომაზინისა (ნახ. 45) და მეთიოკარბის გარდაქმნა შესაბამის სულფოქსიდებში.

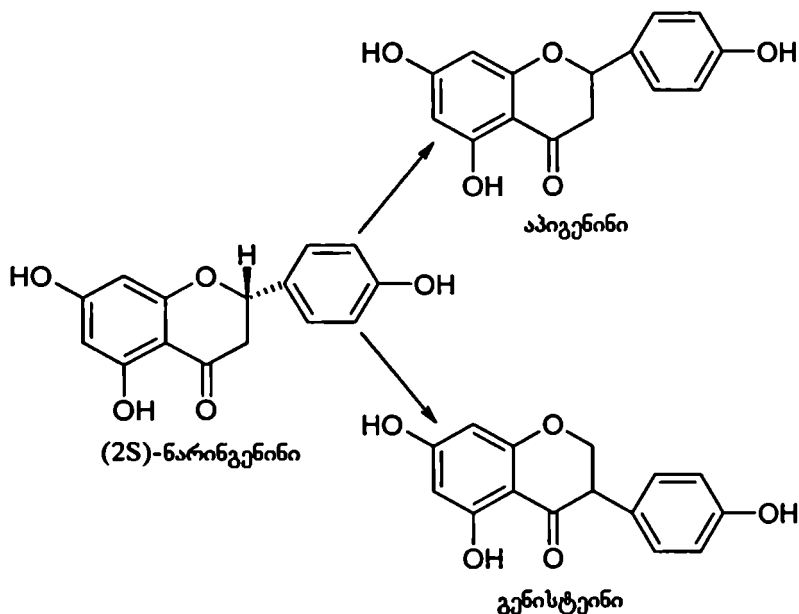


ნახ. 44. ტრიმეთილამინის N-ჟანგვის და შემდგომი N-დემეთილირების რეაქცია.



ნახ. 45. ქლორპრომაზინის S-ჟანგვა.

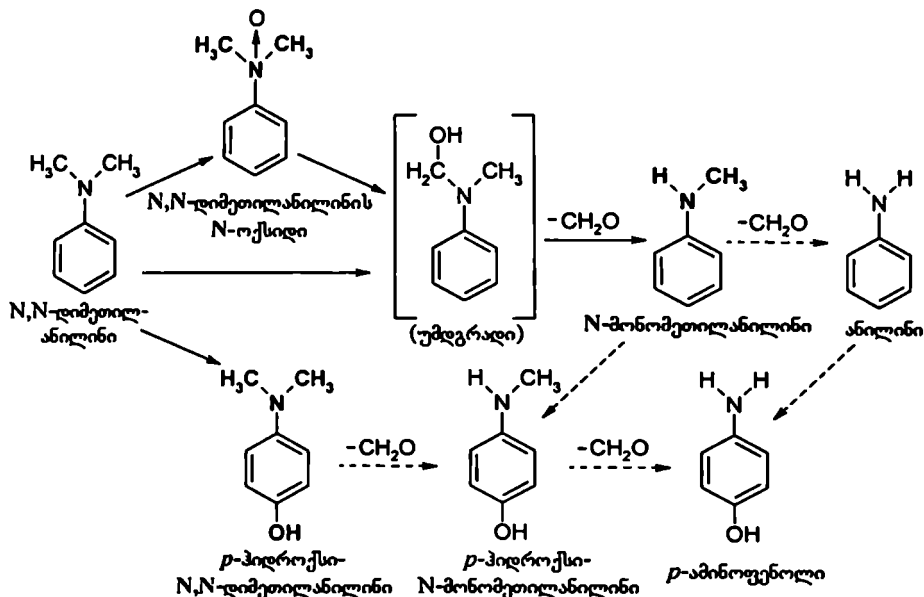
დეჰიდრირება ციტოქრომ P450-დამოკიდებულ პროცესებს შორის ყველაზე იშვიათად ხდება. ციტოქრომ P450-შემცველი მონოოქსიგენაზა ასეთი ტიპის აქტივობას ამჟღავნებს ფლავონოიდების ბიოსინთეზში, როდესაც იგი $C_6-C_3-C_6$ ნახშირბადოვანი ჩონჩხის მქონე ნაერთებიდან ფლავონოიდების სინთეზს აკატალიზებს. ამ დროს ციტოქრომ P450 ფუნქციონირებს, როგორც იზოფლავონსინთაზა, რომელიც აწარმოებს (2S)-ნარინგენინიდან იზოფლავონების – აპიგენინის და გენისტეინის წარმოქმნას (ნახ. 46).



ნახ. 46. ციტოქრომ P450-დამოკიდებული დეჰიდრირების რეაქციები იზოფლავონების ბიოსინთეზში.

ერთი და იგივე ქსენობიოტიკი რამდენიმე გზით შეიძლება დაიჟანგოს. ეს, როგორც წესი, თვით ნაერთის ქიმიურ აღნაგობაზე, კერძოდ, არაპოლარული ჯგუფების განლაგებაზეა დამოკიდებული. მაგალითისათვის შეიძლება განვიხილოთ ცხოველურ მიკროსომებში N,N-დიმეთილანილინის ციტოქრომ P450-დამოკიდებული ჟანგვის გზები. დიმეთილანილინის მოლეკულა ორ ჰიდროფობულ უბანს შეიცავს: ცალ მხარეს მეთილის ჯგუფებს, მეორე მხარეს კი ფენილის რადიკალს. ამის გამო მიკროსომული NADPH-დამოკი-

დებული მონოოქსიგენაზა დიმეთილანილინის სამი ალტერნატიული გზით: N-ჟანგვით, N-დემეთილირებით ან *p*-ჰიდროქსილირებით ჟანგავს (ნახ. 47).



ნახ. 47. N,N-დიმეთილანილინის ციტოქრომ P450-დამოკიდებული ჟანგვის გზები. მსხვილი შრიფტით მოცემულია ჟანგვის ძირითადი იდენტიფიცირებული პროდუქტები, ხოლო წვეტილი ისრებით ნაჩვენებია თეორიულად შესაძლებელი რეაქციები.

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

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

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

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

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

თავი 3. ქსენობიოტიკთა ციტოქრომ P450-დამოკიდებულ ჯანგვის პროცესთა რეგულაცია

ციტოქრომ P450-შემცველი მონოოქსიგენაზური სისტემის ფუქციონირების თავისებურებათა გათვალისწინებით შეიძლება გამოიყოს მისი რეგულაციის შემდეგი ღონეები:

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

3.1 რეგულაცია მემბრანულ დონეზე

3.1.1 მემბრანული ფოსფოლიპიდების გავლენა ციტოქრომ P450-ის მეორეულ სტრუქტურაზე და აქტივობაზე

ციტოქრომ P450-შემცველი მონოოქსიგენაზური სისტემის მნიშვნელოვანი თავისებურება პიდროფობული თვისებების ფლობაა, რაც მემბრანაში მისი ჩაშენების საშუალებას იძლევა. ამასთან დაკავშირებით ბუნებრივად იბადება კითხვები: როგორია მემბრანის როლი ჰემოპროტეინის ფუნქციონირებაში და რაში მდგომარეობს ამ ევოლუციური გამოგონების ბიოლოგიური აზრი? რა დონით შეიძლება ამ ფერმენტს მიეუსადაგოთ სხვა ფერმენტებისადმი (მაგ., ATP-აზებისადმი ან დეჰიდროგენაზებისადმი) საყოველთაოდ აღიარებული წარმოდგენები, რომელთა თანახმადაც მემბრანის ფოსფოლიპიდებს წყლოვან ფაზაში არააქტიური ფორმით მყოფი ფერმენტები კონფორმაციულად აქტიურ მდგომარეობაში გადაჰყავთ?

მოცემულ კითხვებზე საპასუხოდ შესწავლილ იქნა α -სპირალის შემცველობა მაღალი სისუფთავის იზოლირებულ და ფოსფოლიპიდურ ბიშრეში ჩაშენებულ ჰემოპროტეინში. პარალელურად ისაზღვრებოდა ციტოქრომ P450-ის პიდროქსილაზური აქტივობა რეაქციებში, რომლებშიც აქტიური ჟანგბადის დონორად კუმოლის პიდროჰეჟანი გამოიყენებოდა. აღმოჩნდა, რომ იზოლირებულ ციტოქრომ P450-ს ხსნარში გაცილებით ნაკლები პიდროქსილაზური აქტივობა გააჩნია, ვიდრე გასუფთავების შემდეგ ხელოვნურ ლიპოსომურ მემბრანაში ჩაშენებულ მიკროსომულ ჰემოპროტეინს. ამ დროს ფერმენტის რეაქტივირება და საწყისი პიდროქსილაზური აქტივობის სრული აღდგენა ხდება. ამასთან, მისი კონფორმაციის არსებით ცვლილებებს ადგილი არ აქვს. კორელაცია არ ვლინდება ცილის მოლეკულაში α -სპირალის შემცველობის ცვლილებასა და ლიპოსომურ მემბრანაში ჩაშენებისას მისი აქტივობის ზრდას შორის. ეს მონაცემები იმ წარმოდგენის საწინააღმდეგოდ მეტყველებენ, რომლის თანახმადაც ამ მემბრანული ცილის კონფორმაციაში უნდა არსებობდეს მნიშვნელოვანი განსხვავებები სოლუბილიზებულ და მემბრანადაკავშირებულ მდგომარეობაში. აქედან გამომდინარე, ფოსფოლიპიდის რეაქტივაციულ უნარს შესაბამისად სხვა ახსნა უნდა მისცემოდ.

ჰემოპროტეინის თვისებებზე ფოსფოლიპიდური ბიშრის გავლენის სისტემატურმა კვლევამ აჩვენა, რომ მემბრანაში ციტოქრომ P450-ის ჩაშენებისას ცილის მოლეკულის სიხისტე იზრდება. ხსნართან შედარებით ხელოვნურ მემბრანაში ჩაშენებული ჰემოპროტეინი აღდგენისას, ან II-ტიპის

სუბსტრატთან დაკავშირებისას თავის კონფორმაციულ მდგომარეობას გაცილებით ნაკლებად იცვლის.

მკვეთრად იზრდება ლიპიდურ ბიშრეში ჩაშენებული ჰემოპროტეინის თერმოსტაბილურობაც. პროტეოლიპოსომებში თითქმის სრულადაა გამქრალი ხსნარში არსებული, ფერმენტისათვის დამახასიათებელი ფაზური დენატურაციული გადასვლა; ე.ი. მემბრანაში ფერმენტის ჩაშენებას თან ახლავს ჰემოპროტეინის მოლეკულის სტაბილიზაცია და მისი კონფორმაციული ძვრადობის შემცირება.

ჰემოპროტეინზე ფოსფოლიპიდური ბიშრის მასტაბილიზებული მოქმედების ეფექტი ნათლად უჩვენებს ფერმენტის ხსნადი ფორმიდან მემბრანულზე გადასვლის უაღრესად დიდ მნიშვნელობას.

ციტოქრომ P450 ლაბილურ, სწრაფად ინაქტივირებად ფერმენტებს განეკუთვნება. იზოლირებულ ჰემოპროტეინის ხსნარში აღდგენილ მდგომარეობაში ინაქტივაციის უმაღლესი სიჩქარე გააჩნია. სუბსტრატის დამატებით ინაქტივაციის სიჩქარე უმნიშვნელოდ მცირდება. მემბრანის შემადგენლობაში ჰემოპროტეინი ძლიერ სტაბილურია როგორც აღდგენილ, ასევე დაჟანგულ მდგომარეობაში. მასტაბილიზებული მოქმედების მოდულირება ადვილად შეიძლება იზოლირებულ ჰემოპროტეინზე ფოსფოლიპიდების დამატებით. ამასთან, ნათლად ჩნდება მათი სპეციფიკურობა. დამცველი ეფექტი გააჩნია მიკროსომული ფოსფოლიპიდების ნარეკს და ფოსფატიდილეთანოლამინს. ასეთ ცდებში ფოსფატიდილქოლინის დამცველი უნარი არ გააჩნია, მაგრამ თუ ჰემოპროტეინი წინასწარაა ჩაშენებული ფოსფატიდილქოლინურ ლიპოსომაში, მაშინ ამ ფოსფოლიპიდსაც ექნება გამოსახული დამცველი მოქმედება. ამ შედეგების ახსნა შეიძლება, თუ დაეუშვებთ, რომ ფოსფოლიპიდის მუხტი მოქმედებს მხოლოდ ციტოქრომთან მისი ურთიერთქმედების სიჩქარეზე. უარყოფითად დამუხტული ფოსფოლიპიდები ცილასთან უფრო სწრაფად ურთიერთქმედებენ. ფოსფატიდილეთანოლამინ-ციტოქრომ P450-ის კომპლექსის წარმოქმნა სწრაფად ხდება და ამიტომ ამ ფოსფოლიპიდის მასტაბილიზებული მოქმედებაც უცხად, ციტოქრომ P450-ის შემცველ ხსნარში მისი ჩამატებისთანავე ელინდება. ფოსფატიდილქოლინის შემთხვევაში აუცილებელია წინასწარი ინკუბაცია, რომლის დროსაც ცილა უნდა ჩაშენდეს ფოსფოლიპიდურ ბიშრეში და მხოლოდ ამის შემდეგ ლეციტინიც გამოამჟღავნებს თავის დამცველ მოქმედებას.

ეუკარიოტულ უჯრედებში ჰემოპროტეინის მემბრანული ფორმა შეიძლება არსებობდეს სუბსტრატის გარეშე. პროკარიოტებში ხსნადი ციტო-

ქრომ P450 სუბსტრატის გარეშე სწრაფ ინაქტივაციას განიცდის, და შესაბამისად, სუბსტრატის კონცენტრაციის შემცირებისას იშლება. ეუკარიოტებში არსებობს ამ სისტემის აქტივობის რეგულირების სხვა შესაძლებლობებიც. უჯრედში ჰემოპროტეინის შემცველობა არ შემცირდება მასში ჰიდროქსილირების სუბსტრატის კონცენტრაციის დაქვეითებისას, ანუ ფოსფოლიპიდის დაზმარებით ციტოქრომი „გამოდის“ სუბსტრატის მხრიდან კონტროლიდან.

3.1.2 მემბრანული ფოსფოლიპიდების როლი NADPH-ციტოქრომ P450-რედუქტაზისა და ციტოქრომ P450-ის ურთიერთქმედებაში

ენდოპლაზმურ მემბრანებში არსებული ძირითადი რედოქს-ჯაჭვი, რომელიც NADPH-ის მიმართ მკაცრ სპეციფიკურობას ამჟღავნებს, ფოსფოლიპიდურ მატრიქსთანაა დაკავშირებული. ჯაჭვის საწყისი კომპონენტის – NADPH-დამოკიდებული ფლავოპროტეინის აქტივობას ჩვეულებრივ აფასებენ ან ეგზოგენურად დამატებული ელექტრონთა აქცეპტორების, ან ენდოგენური აქცეპტორის – ციტოქრომ P450-ის აღდგენის სიჩქარეების მიხედვით. მეორე კრიტერიუმი ყველაზე სარწმუნოდ ასახავს მონოოქსიგენაზური ტიპის რეაქციებში ფლავოპროტეინის მონაწილეობას.

ანაერობულ პირობებში ციტოქრომ P450-ის აღდგენის სიჩქარის გაზომვა იმ ფაქტს ემყარება, რომლის თანახმადაც ჰემოპროტეინის მიერ ელექტრონთა აქცეპტორების სიჩქარე (კონსტანტა – $10-20 \text{ წთ}^{-1}$) გაცილებით ნაკლებია აღდგენილი ციტოქრომის CO-სთან ურთიერთქმედების სიჩქარეზე (კონსტანტა – $1.7 \cdot 10^4 \text{ წთ}^{-1}$). ერთი კატალიზური ციკლის შესასრულებლად მონოოქსიგენაზა ორ ელექტრონს საჭიროებს და პირველი ელექტრონის აქცეპტირება მოწმდება ანაერობულ პირობებში ციტოქრომ P450-ის CO-სთან კომპლექსის წარმოქმნით.

მიკროსომულ სუსპენზიაში NADPH-ის დამატება ციტოქრომ P450-ის სრულ აღდგენას იწვევს. ამასთან, რედუქტაზული რეაქცია ორფაზიანობით ხასიათდება. პირველი (სწრაფი) ფაზა $1-2 \text{ წმ}$ -ს იკავებს და ანაერობიზის სიღრმეზე დამოკიდებული არაა. ამ სტადიაზე ციტოქრომ P450-ის აღდგენის სიჩქარე ოთახის ტემპერატურაზე $2-8 \text{ ნმოლიწმ}^{-1}$ მგ ცილაზე ფარგლებშია.

მეორე სტადიაზე ციტოქრომ P450-ის აღდგენის სიჩქარე ძლიერ დაბალია. მისი დაფიქსირება რამდენიმე წუთის განმავლობაში შეიძლება.

ეს სტადია მიკროსომულ სუსპენზიაში ჟანგბადის შემცველობაზეა დამოკიდებული, რომელსაც ჰემოპროტეინის კვლავ დაჟანგვა და რეაქციაში მონაწილე ციტოქრომ P450-ის მოლეკულათა რაოდენობის შემცირება შეუძლია. NADPH-ციტოქრომ P450-რედუქტაზული რეაქციის ორფაზიანობა შეიძლება აიხსნას ორი მიზეზით:

1. სუბსტრატთან დაკავშირებული და თავისუფალი ციტოქრომ P450-ის აღდგენის განსხვავებული სიჩქარეებით;
2. მიკროსომულ ფრაქციაში ჰემოპროტეინის სხვადასხვა ფორმების არსებობით, რომელთაც სუბსტრატისა და რედუქტაზის მიმართ განსხვავებული თვისობა გააჩნიათ.

I-ტიპის სუბსტრატების დაკავშირება რედუქტაზული რეაქციის საწყისი ფაზის სიჩქარის მნიშვნელოვან ზრდას იწვევს. ამასთან, რეაქციის სწრაფ ფაზაში აღდგენილი ციტოქრომ P450-ის რაოდენობა კორელაციაშია ჰემოპროტეინ-სუბსტრატის კომპლექსის შემცველობასთან. ვარაუდობენ, რომ ციტოქრომთან I-ტიპის სუბსტრატთა დაკავშირების შედეგად ჰემოპროტეინის ელექტრონული სტრუქტურა ისეთ ცვლილებებს განიცდის, რომელიც აუმჯობესებს მის მიერ ელექტრონის აქცეპტორების უნარს და აჩქარებს რედუქტაზული რეაქციის მსვლელობას.

სუბსტრატის თანამყოფობისას NADPH-რედუქტაზული რეაქციის აჩქარება შეიძლება აიხსნას ციტოქრომ P450-ის რედოქს-პოტენციალის მატებით, ან რედუქტაზის აქტივაციის ენერგიის დაქვეითებით. ეს იმით უნდა იყოს გამოწვეული, რომ ჰემოპროტეინი და მისი რედუქტაზა „კომპარტმენტალიზებულია“ მემბრანის ფოსფოლიპიდური მატრიქსის იზოლირებულ ზონაში, რომლისთვისაც დამახასიათებელია ტემპერატურული ფაზური გადასვლები. ამიტომ ამ ზონას რედუქტაზის აქტივაციის ენერგიის შემცირების უნარი უნდა გააჩნდეს. თავის მხრივ, I-ტიპის სუბსტრატებიც მემბრანული ფოსფოლიპიდების ტემპერატურული ფაზური გადასვლების შემცირების უნარს ფლობენ. ამიტომ რედუქტაზული რეაქციის საწყის სიჩქარეზე სუბსტრატთა მასტიმულირებელი მოქმედება ეჭვს არ უნდა იწვევდეს. ამის სასარგებლოდ მოწმობს მონაცემები ფოსფოლიპიდურ მატრიქსში სუბსტრატების მიერ ინდუცირებული კონფორმაციული ცვლილებების შესახებ, რომელთა შედეგადაც იზრდება ციტოქრომისა და მისი რედუქტაზის ეფექტურ შეჯახებათა რიცხვი.

I-ტიპის სუბსტრატებით NADPH-რედუქტაზული რეაქციის სტაბილიზაციის ფენომენის გადაუჭარბებლად შეფასება ძალიან ძნელია, რადგან მონოოქსიგენაზური სისტემით მრავალი ქსენობიოტიკის (პირველ რიგში

ბარბიტურატებისა და პირაზოლინების წარმოებულების) ჰიდროქსილირების ინტენსივობა არსებითად დამოკიდებულია ციტოქრომ P450-სუბსტრატის კომპლექსის NADPH-რედუქტაზით აღდგენაზე.

ჰიდროქსილირების რეაქციებზე მასტიმულირებელ გავლენას ახდენს Mg^{2+} . აღმოჩნდა, რომ ამ ეფექტის არსი NADPH-რედუქტაზის გააქტიურებაში მდგომარეობს. გარდა ამისა, შენიშნულია D_2O -ს მაინჰიბირებელი მოქმედება რედუქტაზული რეაქციის სიჩქარეზე და ეთილმორფინის N-დემეთილირებაზე.

ხანმოკლე მოქმედების ბარბიტურატების შემთხვევაში, რომელთა კონცენტრაციებიც მკურნალობის დროს $5 \cdot 10^{-3}$ M-ს არ აღემატება, რედუქტაზული რეაქციის აქტივობა მნიშვნელოვან ფაქტორს წარმოადგენს მათი მეტაბოლიზმის რეგულაციაში. ღვიძლში წამლების მეტაბოლიზმის შესწავლით დადგინდა, რომ ამინოპირინის N-დემეთილირება მჭიდრო კორელაციაშია NADPH-ციტოქრომ P450-რედუქტაზული რეაქციის აქტივობასთან და არა თვით ციტოქრომ P450-ის რაოდენობასთან. კორელაციის გამოვლენის მიზნით ჩატარებულია შედარებითი ანალიზი NADPH-რედუქტაზული რეაქციის სიჩქარეს, სხვადასხვა სუბსტრატთა ჰიდროქსილირებასა და ამ პროცესთა აქტივაციის ენერგიებს შორის. აღმოჩნდა, რომ ამინოპირინის N-დემეთილირების მაქსიმალური სიჩქარე (7 ნმოლიწთ $^{-1}$ მგ ცილაზე $37^\circ C$ -ზე) და ამ პროცესის აქტივაციის ენერგია (53.6 კჯ/მოლი), NADPH-რედუქტაზული რეაქციის იმავე მაჩვენებლებს უტოლდება ($V_{max} = 7.26$ ნმოლიწთ $^{-1}$ მგ ცილაზე, აქტივაციის ენერგია – 53.3 კჯ/მოლი). ეს მონაცემები სარწმუნო მტკიცებულებაა იმის შესახებ, რომ რედუქტაზული რეაქცია ამინოპირინის მეტაბოლიზმის სიჩქარემაღლიმითირებელი რგოლია.

განხილული ფაქტები განსაკუთრებულ აზრს შეიძენენ, თუ რედუქტაზის ფუნქციონირებაში ფოსფოლიპიდური კომპონენტის როლს გავითვალისწინებთ. ფერმენტი მაღალ მგრძნობიარობას ამჟღავნებს მიკროსომების ფოსფოლიპიდური ბიშრის და მათ მიერ წარმოქმნილი ჰიდროფობული ზონების ყოველგვარი დაზიანების მიმართ. შენიშნულია რედუქტაზული აქტივობის მკვეთრი დათრგუნვა ფოსფოლიპაზების C-სა და D-ს, ტრიტონ X-100-ის და დიმეთილსულფოქსიდის დაბალი კონცენტრაციების გამოყენებისას. ცნობილია რედუქტაზაზე საწინააღმდეგო ეფექტის მაგალითებიც, რომლებიც გამოწვეულია მიკროსომის ფოსფოლიპიდური კომპონენტის ჰიდროფობულობის ზრდით Mg^{2+} -ის თანამყოფობისას.

რეკონსტრუირებული მონოოქსიგენაზური სისტემის ფუნქციონირება-

ში ფოსფატიდილქოლინის როლის შესწავლამ აჩვენა მისი აბსოლუტური აუცილებლობა ციტოქრომ P450—CO კომპლექსზე ელექტრონების გადატანაში. ლეციტინზე დამოკიდებული აღმოჩნდა NADPH-რედუქტაზული რეაქციის სწრაფი (საწყისი) ფაზა, რომელიც იზოლირებული ციტოქრომ P450-ის მაქსიმალურ აქტივობასთანაა შეუღლებული. საფიქრებელია, რომ ეს დამოკიდებულება დაკავშირებულია ციტოქრომის მიერ ელექტრონთა აქცეპტირების უნართან, რადგან აღწერილია ციტოქრომ P450-ის აღდგენის შესაძლებლობა ქსანტინ/ქსანტინოქსიდაზური სისტემით, მხოლოდ ფოსფოტიდილქოლინის თანამყოფობისას. თავისთავად სუბსტრატის მისაერთებლად ციტოქრომ P450 ფოსფოლიპიდს უშუალოდ ნამდვილად არ საჭიროებს, მაგრამ მისი გავლენით იზრდება ფერმენტის სუბსტრატთან თვისობა. ფერმენტის კონფორმაციული ცვლილება ინდუცირდება ფოსფოლიპიდის ან სუბსტრატის განაწილებით არაწყლოვან ფაზაში. წამლების მეტაბოლიზმის კვლევისას ნაჩვენებია იქნა ლიპიდების მონაწილეობა სუბსტრატის განაწილებაზე მიკროსომებსა და წყალხსნარებს შორის. დადგენილ იქნა აგრეთვე, რომ ბუფერისა და ჰეპატანის ხსნარში N,N-დიმეთილამინის უმუხტო წარმოებულები უმთავრესად ჰიდროფობულ, მუხტიანები კი წყლოვან ფაზაში ნაწილდებიან.

სუბსტრატის განაწილების კოეფიციენტის განსაზღვრისას აღმოჩნდა, რომ იგი დამოკიდებულია ლიპიდის კონცენტრაციაზე; გარდა ამისა, ციტოქრომ P450-ის აღდგენის ხარისხიც კორელაციაშია ლიპიდის კონცენტრაციასთან, რაც იმაზე მიუთითებს, რომ ეს უკანასკნელი გავლენას ახდენს ციტოქრომ P450-სუბსტრატის კომპლექსის წარმოქმნაზე. დასაშვებადია მიჩნეული ლეციტინის არასპეციფიკური როლიც, რომელიც ხსნადი მონოოქსიგენაზური სისტემის კომპონენტთა ეფექტური ურთიერთქმედებისათვის აუცილებელი ჰიდროფობული ზონის შექმნაში მდგომარეობს. ეს ვარაუდი, უპირველეს ყოვლისა, გამომდინარეობს იმ უფრო ჰიდროფობულ დიოლილ- და დილაუროილ-ფოსფატიდილქოლინების შემცველ სისტემათა უმაღლესი აქტივობებიდან, რომლებიც ლვიძლის ლეციტინების შემადგენლობაში არ შედიან. დადგენილია, რომ ზოგიერთ დეტერგენტს, რომლებიც წყლოვან ფაზაში მაღალჰიდროფობული შიდა ზედაპირის მქონე მიცელებს წარმოქმნიან, უნარი აქვთ რეკონსტრუირებულ სისტემაში შეცვალონ ფოსფოლიპიდები. ამასთან დაკავშირებით გასათვალისწინებელია, რომ ხსნად რეკონსტრუირებულ სისტემაში, სადაც ლეციტინის თანამყოფობისა მემბრანისმაგვარი სტრუქტურები არ წარმოიქმნებიან, მონოოქსიგენაზისა და ფოსფოლიპიდებისაგან შემდგარი, ადვილად დისოცირებადი კომპ-

ლექსების არსებობა მაინც სავსებით მოსალოდნელია.

საყურადღებოა, რომ რეკონსტრუირებული მონოოქსიგენაზური სისტემის ამოქმედება მხოლოდ დეტერგენტების საშუალებით გამოყოფილ რედუქტაზას შეუძლია. იზოლირებული ფერმენტის ტრიფსინით დამუშავება რედუქტაზას ამ თვისებას უკარგავს, მაგრამ ციტოქრომ c-ს აღდგენის უნარს უნარჩუნებს. ნაჩვენებია, რომ პროტეოლიზი ფერმენტს პოლიპეპტიდური ჯაჭვის ნაწილს აცილებს. თელიან, რომ რედუქტაზის მოლეკულის ეს ნაწილი ფოსფოლიპიდურ მატრიქსში თავისებური „ღუზის“ როლს ასრულებს და NADPH-რედუქტაზას მემბრანაში ლატერალური გადამოძრავების საშუალებას აძლევს. გამოვლენილია ერთი, მეტად საყურადღებო ფაქტიც: მიკროსომულ მემბრანაში შესაძლებელია დეტერგენტული რედუქტაზის დამატებითი ჩაშენება. ამის შედეგად მონოოქსიგენაზის კატალიზური აქტივობა მნიშვნელოვნად იზრდება. ამასთან დაკავშირებით ჩამოყალიბებულია რედუქტაზისა და ციტოქრომ P450-ის კომპლექსის ე.წ. „ხისტი“ ორგანიზაციისა და ურთიერთქმედების ალტერნატიული სქემა, რომელშიც ფლავოპროტეინის ერთ მოლეკულაზე ჰემოპროტეინის 12–20 მოლეკულა მოდის.

მოცემული ფერმენტები მემბრანაში თუ მართლაც იძლევიან სტეკიომეტრულ კომპლექსს, მაშინ მათი თანაფარდობა ყველა შემთხვევაში მუდმივი უნდა იყოს. მიუხედავად ამისა, მონოოქსიგენაზური სისტემის კომპონენტებზე ამის თქმა არ შეიძლება. მაგ., ახალდაბადებულ ვირთაგვებში NADPH-ციტოქრომ P450-რედუქტაზა უფრო ადრე ჩნდება, ვიდრე ციტოქრომ P450. ცხოველში ფენობარბიტალის მეფენის შემდეგ რედუქტაზის შემცველობა ღვიძლში დაუყოვნებლივ მატულობს, მაშინ როდესაც ციტოქრომ P450-ის რაოდენობის ზრდა მხოლოდ ინექციიდან 5 სთ-ის შემდეგ იწყება. ეს ფაქტები არ გამორიცხავენ კომპლექსების არსებობის შესაძლებლობას. კომპლექსის ცალკეულ კომპონენტებს შეუძლიათ ერთმანეთისაგან დამოუკიდებლად სინთეზირება, ხოლო კომპლექსებად მათი „შეგროვება“ შეიძლება მოგვიანებით მოხდეს.

ჩატარებულ ექსპერიმენტულ მონაცემებზე დაყრდნობით სტიერი, საკმენი და ესტაბრუკი მივიდნენ დასკვნამდე, რომლის თანახმადაც ციტოქრომ P450 რედუქტაზიანად ლოკალიზებულია მიკროსომული ფოსფოლიპიდების „სპეციალიზებულ“ ზონაში, რომელიც ფოსფოლიპიდური მატრიქსის ძირითადი მასისაგან განსხვავდება თავისი დაბალი აქტივობით და თხევადკრისტალურიდან თხევად მდგომარეობაში ფაზურ გადასვლას განიცდის. ნაგარაუდებია, რომ ამ ზონაში იმყოფება მიკროსომული ფოსფოლი-

პილდის არაუმეტეს 20%-ისა, რომლებიც მონოოქსიგენაზის კომპონენტებს შორის კონტაქტის დამყარების გარდა, ციტოქრომ P450-ისაკენ ლიპოფილური სუბსტრატების ლატერალურ დიფუზიასაც უზრუნველყოფენ.

იგივე ავტორთა მიერ მიღებული მონაცემების საფუძველზე წარმოდგენილ იქნა მიკროსომულ მემბრანაში მონოოქსიგენაზური კომპლექსის ორგანიზაციის მოდელი. ციტოქრომ P450-ისა და NADPH-ციტოქრომ P450-რედუქტაზის ცნობილი მოლეკულური მასებიდან გამომდინარე, კომპლექსში ამ კომპონენტთა მოლეკულური თანაფარდობა 20 : 1-ის ტოლია. გამოთვლილია, რომ სწრაფ ფაზაში ციტოქრომ P450-ის 50%-ით აღსადგენად დაბალ ტემპერატურაზე აუცილებელია რედუქტაზის ყოველი მოლეკულის 8–12 მოლეკულა ციტოქრომით გარემოცვა. ფოსფოლიპიდურ მატრიქსში მონოოქსიგენაზური სისტემის კომპონენტთა ამ კომპლექსს მოგვიანებით, როგორც აღნიშნული იყო, „კლასტერი“ ეწოდა. ვარაუდობენ, რომ ტემპერატურის ცვლილებისას „კლასტერის“ ზომა ვარიირებს კომპლექსის შიგნით და გარეთ ციტოქრომ P450-ის მოლეკულათა ცვლის განსხვავებული სიჩქარის გამო.

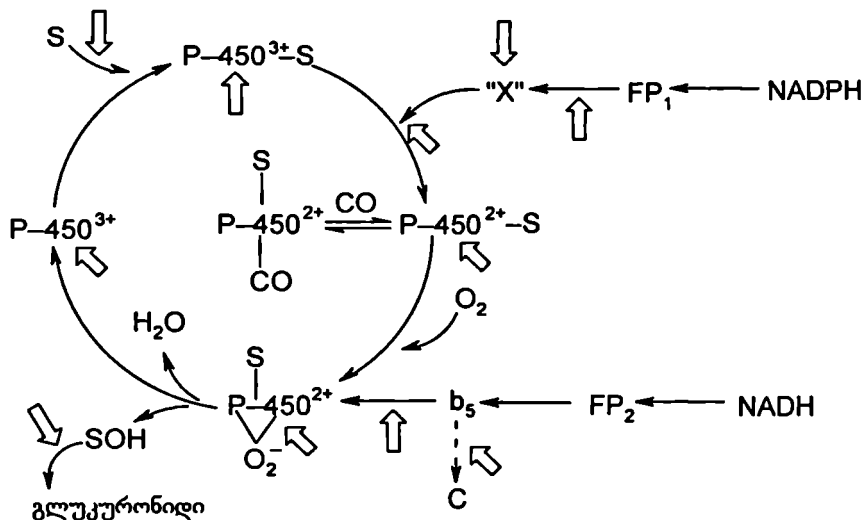
რედუქტაზული რეაქციის ნელი ფაზის შეფასებისას იმ გარემოებას ითვალისწინებენ, რომ იგი ახასიათებს რედუქტაზისაგან მოცილებული (ე.ი. „კლასტერის“ გარეთ მყოფი) ციტოქრომ P450-ის აღდგენას და თვლიან, რომ ჰემოპროტეინის მოცემული მოლეკულებისათვის შესაძლებელია მიკროსომულ ფოსფოლიპიდებში ლატერალური დიფუზია. ნელი ფაზის მაღალი აქტივაციის ენერგია (ფაზური გადასვლის ზევით ტემპერატურაზე), როგორც ჩანს, უნდა აიხსნას „კლასტერის“ შიგნით და გარეთ ციტოქრომ P450-ის მოლეკულების ცვლით.

საჭიროდ მიგვაჩნია მოკლედ შევეხოთ ფოსფოლიპიდების მონაწილეობას ესტაბრუკისა და პილდენბრანდტის სქემის შემდგომ რეაქციებში. მონოოქსიგენაზურ რეაქციებში NADH-ისა და NADPH-ის ცალკეულად ან ერთდროულად გამოყენებისას ციტოქრომ b_5 -ის ჟანგვა-აღდგენის კინეტიკის ანალიზმა შესაძლებელი გახადა გაკეთებულიყო დასკვნა, რომ ამ ციტოქრომის აღდგენილი ფორმა არის სამმაგი კომპლექსისათვის მეორე ელექტრონის აუცილებელი დონორი. ამასთან, რეკონსტრუირებულ სისტემაზე და მიკროსომულ მემბრანებში რედოქს-ჯაჭვების განლაგების სქემებზე პირდაპირი მონაცემების თანახმად მიღებულია, რომ ფოსფოლიპიდური კომპონენტი საჭიროა b_5 -სა და P450-ს შორის ურთიერთქმედებისათვის.

რეკონსტრუირებულ მონოოქსიგენაზურ სისტემაში ნაჩვენებია, რომ მაჰიდროქსილირებელ აგენტს სუპეროქსიდული ანიონ-რადიკალი ($O_2^{\cdot-}$)

წარმოადგენს. მისი მონაწილეობა ასეთ სისტემაში მოწმდება დისმუტაზის (ერითროკუპრინის) და ტაირონის (სუპეროქსიდული რადიკალების დამჭერის) გამოყენებით. NADPH-ითა და ციტოქრომ P450-რედუქტაზით, აგრეთვე ქსანტინ/ქსანთიოქსიდაზური სისტემით ან არაფერმენტული ფოტოქიმიური სისტემის (რიბოფლავინისა და მეთიონინის შემცველი) სუპეროქსიდის გენერაცია ერთნაირად მოითხოვს ფოსფოლიპიდის აუცილებელ თანამყოფობას. გარდა ამისა, არსებობს მონაცემები, რომლებიც უჩვენებენ ფოსფოლიპიდების მნიშვნელოვან როლს გლუკურონილტრანსფერაზული ფერმენტით მონოოქსიგენაზური რეაქციის პროდუქტთა გამოყოფაში.

განხილული ფაქტების დაჯამებით შეიძლება სქემატურად წარმოვადგინოთ მემბრანული ფოსფოლიპიდების მონაწილეობა ლიპოფილური ქსენობიოტიკების ჟანგვით ჰიდროქსილირებაში (ნახ. 48).



ნახ. 48. მემბრანული ფოსფოლიპიდების მონაწილეობა მონოოქსიგენაზური სისტემის ფუნქციონირებაში. ისრებით ნაჩვენებია ფოსფოლიპიდ-დამოკიდებული მონოოქსიგენაზის კომპონენტები და რეაქციები.

მემბრანის მონოოქსიგენაზური სისტემისათვის ფოსფოლიპიდების აუცილებლობას რამდენიმე ზოგადი პრინციპი არსებობს:

1. ფერმენტული აქტივობის დაქვეითება ფოსფოლიპიდის მოცილებისას;
2. ფერმენტის რეაქტივაცია ფოსფოლიპიდის დამატებისას;
3. ფერმენტის აქტიური ასოციაცია მემბრანის ფოსფოლიპიდებთან;
4. ციტოქრომ P450-ის ფუნქციურად აქტიური კონფორმაციის შენარჩუნება;
5. ელექტრონების ტრანსპორტის მოდულაციის უზრუნველყოფა.

მონოოქსიგენაზური სისტემისათვის ჩამოთვლილი კანონზომიერებები ბიოლოგიურად განმტკიცებულ ნიშან-თვისებას წარმოადგენს, რადგან ბაქტერიებისა და თირკმელზედა ჯირკვლის მიტოქონდრიების მაჰიდროქსილირებელი სისტემაც თავისი აქტივობებისათვის ასევე ამჟღავნებენ ფოსფოლიპიდებისადმი მკაცრ დამოკიდებულებას.

ამგვარად, დაბეჯითებით შეიძლება ითქვას, რომ მიკროსომული მემბრანის ფოსფოლიპიდური კომპონენტი აბსოლუტურად აუცილებელია მთელი რიგი სიჩქარემაღლიმიტირებელი რეაქციების მსვლელობისა და მონოოქსიგენაზური სისტემის ფუნქციონირების რეგულირებისათვის. ორგანულ ქსენობიოტიკთა ბიოტრანსფორმაციაში სუბსტრატის მემბრანაში შეღწევის, ციტოქრომ P450-ის მოლეკულის ჰიდროფობულ უბნებთან მისი დაკავშირების, მიკროსომული გადამტანების ცილა-ლიპიდურ კომპლექსებთან მიმაგრებისა და ელექტრონთა გადატანის ჯაჭვში რედუქტაზული რეაქციების ყველა სტადია მემბრანული ლიპიდებისადმი უშუალო დამოკიდებულებაში იმყოფება. ცხადია, უაღრესად მნიშვნელოვანია ფოსფოლიპიდური კომპონენტის იმ ყველაზე „პერსპექტიული“ ფუნქციის გამოვლენა, რომელიც განსაზღვრავს მის როლსა და ადგილს „თავისუფალი ჟანგვის“ მთლიან სისტემაში.

3.1.3 NADH-ციტოქრომ b_5 -რედუქტაზისა და ციტოქრომ b_5 -ის ფოსფოლიპიდდამოკიდებულება

NADH-სპეციფიკური ფლავოპროტეინის აქტივობა ჩვეულებრივ ფასდება ფერიციანიდის ან ციტოქრომ C-ს აღდგენის სიჩქარით. ეს რეაქციები განსხვავებულ მგრძნობიარობას ამჟღავნებენ იმ აგენტების მიმართ, რომლებიც მიკროსომებში ჰიდროფობული ურთიერთქმედების დაზიანებას იწვევენ. მაგ., მიკროსომული ფრაქციის აცეტონით დამუშავება NADH-ციტოქრომ C-რედუქტაზულ აქტივობას 80–85%-ით თრგუნავს. ასეთ ფრაქციაზე ულტრაბერით დამუშავებული ფოსფოლიპიდური მიცელების დამ-

ატება, რომელიც 70%-მდე ფოსფატიდილქოლინის შეიცავს, რედუქტაზის არამართო სრულ აღდგენას, არამედ საწყისთან შედარებით გაოთხმაგებულ სტიმულაციას იწვევს.

ფერიციანიდთან მიმართებაში ფერმენტის აქტივობა 10–15%-ით ქვეითდება ტრიფსინით დამუშავებისას და პრაქტიკულად არ იცვლება C და D ტიპის ფოსფოლიპაზების თანამყოფობისას. აქტივობის ~30%-იანი ვარდნა შეინიშნება ნატრიუმის დეზოქსიქოლატით, ბუთანოლითა და ტრიტონ X-100-ით ზემოქმედებისას. მხოლოდ ფოსფოლიპაზა A იწვევს ფერიციანიდის NADH-დამოკიდებული აღდგენის რეაქციის სიჩქარის ორჯერ დაქვეითებას. აღნიშნული ფერმენტული აქტივობის გაძლიერება არ ხდება საინკუბაციო ხსნარში ფოსფოლიპიდების დამატებით. ეს ფაქტები მემბრანაში NADH-დამუხანგველი რედოქს-ჯაჭვის განივ განლაგებაზე (ანუ ფოსფოლიპიდური მატრიქსის გადაკვეთაზე) მიუთითებენ.

დეზოქსიქოლატის შემცველ გელზე ქრომატოგრაფიის საშუალებით მიღებულ ფოსფოლიპიდებისაგან თავისუფალ მიკროსომულ ფრაქციაში ციტოქრომ b_5 -ის აღდგენის სიჩქარე 80%-ითაა ინჰიბირებული. მიკროსომების საერთო ფრაქციიდან მიღებული ფოსფოლიპიდებისაგან მომზადებული ლიპოსომების დამატება კი ფერმენტის სრულ რეაქტივაციას იწვევს.

რედუქტაზის ქემოტრიფსინით ან კატეფსინით დამუშავებისას ფერმენტს სცილდება პოლიპეპტიდური ფრაგმენტები, რომლებიც 65%-ზე მეტ პიდროფობული ამინომჟავების ნაშთებს შეიცავენ. საყურადღებოა ერთი გარემოება: ე.წ. P-რედუქტაზა (მოლეკულური მასა 28 kD), რომელიც მემბრანიდან სოლუბილიზებულია კობრას შხამში არსებული ფოსფოლიპაზების ნარევით, მიკროსომაში ჩაშენების უნარს არ ამჟღავნებს და ციტოქრომ b_5 -ის მიმართ სუსტ რედუქტაზულ აქტივობას ფლობს. მეორე მხრივ, ნებისმიერი სხვა საშუალებით სოლუბილიზებული ფერმენტი NADH-ისა და ციტოქრომ b_5 -ის მიმართ ერთნაირი თვისობით ხასიათდება. მიღებული შედეგები იმაზე მეტყველებენ, რომ NADH-ციტოქრომ b_5 -რედუქტაზის ამფიპატური მოლეკულის კატალიზურად აქტიური ცენტრი მემბრანის პიდროფილურ ნაწილში იმყოფება.

მოყვანილი ფაქტები და აგრეთვე D-რედუქტაზის (ტრიტონ X-1000-ისა და დეზოქსიქოლატის ნარევით სოლუბილიზებული ფერმენტი, მოლეკულური მასით 45 kD) უნარი, ერთნაირად ეფექტურად იმოქმედოს გამოყოფილ და მემბრანასთან ბმულ ციტოქრომ b_5 -თან, საშუალებას იძლევიან გაკეთდეს დასკვნა, რომ ფერმენტის ეს ფორმა ნატიურია. მისი არაპოლარული ნაწილი მოლეკულის 25%-ს შეადგენს და უნარი აქვს მიკრო-

სომულ მემბრანაში იმ რაოდენობით ჩაშენდეს, რაც ორი რიგით აღემატება მის ენდოგენურ შემცველობას. ნაჩვენებია, რომ მიკროსომული მემბრანის ფოსფოლიპიდები წარმოადგენენ ადგილს, რომელსაც უკავშირდებიან როგორც ენდოგენური, ასევე დამატებით ჩაშენებული რედუქტაზები. უფრო მეტიც, ფოსფოლიპიდები განსაზღვრავენ ფერმენტის მაქსიმალურად დაკავშირების დონეს, მის ფუნქციურ იდენტურობას ენდოგენურ რედუქტაზასთან და ციტოქრომ b_5 -ის დაკავშირების საერთო წერტილებისათვის კონკურენციას.

მიკროსომული მემბრანიდან კატეფსინით რედუქტაზის მოცილებისას სუპერნატანტში ციტოქრომ b_5 -ის 6%-ზე მეტი არ გადმოდის. 50%-ზე ნაკლები რედუქტაზის მოცილებისას NADH-ით ციტოქრომ b_5 -ის აღდგენით საწყისი (სწრაფი) სიჩქარე არ იცვლება, მაგრამ მნიშვნელოვნად ქვეითდება ხსნარში რედუქტაზის გადასვლის ზრდასთან ერთად. მაშასადამე, NADH-ციტოქრომ b_5 -რედუქტაზა და ციტოქრომ b_5 მემბრანაში უნდა ქმნიდნენ „მტკიცე კომპლექსებს“, რომელთაგან თითოეული 5 მოლეკულა რედუქტაზას და 50 მოლეკულა ციტოქრომს შეიცავს. N-ეთილმალეიმიდით რედუქტაზის 90%-იანი ინაქტივაციის დროსაც კი ციტოქრომ b_5 დაბალი სიჩქარით, მაგრამ მაინც სრულ აღდგენას განიცდის. უფრო მეტიც, ენდოგენურ რედუქტაზას შეუძლია ელექტრონების მაღალი სიჩქარით გადაცემა მიკროსომულ მემბრანაში მაქსიმალურად ჩაშენებული ეგზოგენური ციტოქრომ b_5 -ის არაუმეტეს 60%-ზე. ეს მონაცემები კი თავისთავად უარყოფენ რაიმე „კომპლექსის“ არსებობას და პირდაპირ მიუთითებენ, რომ რედუქტაზას „ტივტივას“ მსგავსად მემბრანის გასწვრივ ლატერალური მოძრაობა შეუძლია და ციტოქრომ b_5 -თან მისი ურთიერთქმედება შემთხვევით დაჯახებებზეა დამოკიდებული.

ლიტერატურაში გვხვდება მონაცემები მემბრანაში ციტოქრომ b_5 -ის ლატერალური დიფუზიის შესაძლებლობის შესახებ. ეს ვარაუდი მტკიცდება ჰემოპროტეინის აღდგენის სიჩქარის გაზრდით მიკროსომაში მისი დამატებითი ჩაშენების შემდეგ. ამ დროს მრუდზე, რომელიც გვიჩვენებს აღდგენის სიჩქარის კონსტანტის დამოკიდებულებას ტემპერატურის შეზღუდულ მნიშვნელობასთან, ტეხილი ჩნდება. ამასთან, რედუქტაზული რეაქციის აქტივაციის ენერგიის უაღრესად დაბალი მნიშვნელობა (28 კჯ/მოლი), ციტოქრომ b_5 -ის აღდგენის დიფუზიურ ბუნებაზე მიუთითებს. არსებობს იმის მცდელობაც, რომ ციტოქრომ b_5 -ისათვის განისაზღვროს ლატერალური დიფუზიის კოეფიციენტი. ამასთან დაკავშირებით პირობითად მიღებულ იქნა მიკროსომული ბუშტის საშუალო ფართობი — $12.6 \cdot 10^{-10}$ სმ^2 -ის, ბუშტის მოცულობა — $1.26 \cdot 10^{-15}$ სმ^3 -ის, ციტოქრომ b_5 -ისა და მისი

რედუქტაზის ჯამური რაოდენობა $3 \cdot 10^{-7}$ სმ-ის ტოლად და ამ მონაცემებზე დაყრდნობით გამოანგარიშებულია აღნიშნული სიდიდე, რომელიც 10°C -ზე $0.92 \cdot 10^{-12}$ სმ²/წმ-ს უდრის. ციტოქრომ b_5 -ისა და რედუქტაზის მოლეკულათა ეფექტური დაჯახებების წილის გათვალისწინებით ლატერალური დიფუზიის კოეფიციენტის ჭეშმარიტი მნიშვნელობა $3 \cdot 10^{-9}$ სმ²/წმ-ის ტოლი აღმოჩნდა. საჭიროა ხაზი გაესვას იმ გარემოებას, რომ ციტოქრომ b_5 -ის ლატერალური დიფუზია ფოსფოლიპიდური მატრიქსის დენადობის კიდევ ერთი გამოვლენაა, რამდენადაც ამ ჰემოპროტეინისათვის ლატერალური დიფუზიის კოეფიციენტი მიკროსომულ ფოსფოლიპიდებთან შედარებით 100-ჯერ ნაკლებია. გარკვეული აზრით შეიძლება ითქვას, რომ ჰემოპროტეინის მოლეკულების ლატერალური დიფუზიის სიჩქარე სრულადაა უზრუნველყოფილი „გამხსნელის“, ანუ ფოსფოლიპიდის მოლეკულების ლატერალური დიფუზიის სიჩქარით.

სადღეისოდ შეუძლებელია ამომწურავად ვუპასუხოთ კითხვას, თუ რა ფუნქციური დატვირთვა აქვს ენდოპლაზმურ მემბრანაში ციტოქრომ b_5 -ს და საერთოდ, NADH-სპეციფიკურ რედოქს-ჯაჭვს. არსებობს მონაცემები იმის შესახებ, რომ ციტოქრომ b_5 მონაწილეობს ცხიმოვან მჟავათა დესატურაციის რეაქციებში და რომ ამ ციტოქრომს სხვა ხსნადი გადამტანების დაუხმარებლად შეუძლია განახორციელოს ელექტრონთა მემბრანათაშორისი გადატანა. მონოოქსიგენაზური სისტემის ფუნქციონირების სქემაში (ნახ. 21) ციტოქრომ b_5 -ს დათმობილი აქვს სამმაგ კომპლექსში – ციტოქრომ P450–სუბსტრატი–ჟანგბადი მეორე ელექტრონის „შემოშტანის“ როლი. არჩაკოვს და მის თანამშრომლებს მიღებული აქვთ სარწმუნო მონაცემები ციტოქრომ b_5 -ის მონაწილეობის შესახებ NADPH-ის ჟანგვასთან ქსენობიოტიკთა ჰიდროქსილირების შეუღლებულ რეაქციებში.

ცნობილია, რომ ციტოქრომ b_5 გაცილებით ადვილად სოლუბილიზდება პროტეაზული დამუშავებით, ვიდრე ორგანული გამხსნელებით, ტრიტონ X-1000-ით ან A ტიპის ფოსფოლიპაზით. ფოსფოლიპაზა C საერთოდ არ მოქმედებს მიკროსომებში ციტოქრომ b_5 -ის შემცველობაზე.

P-რედუქტაზასთან დაკავშირებული ციტოქრომ b_5 (P- b_5) 11 kD მოლეკულური მასის მქონე მონომერი აღმოჩნდა, რომელსაც მიკროსომულ მემბრანაში ჩაშენების უნარი არ გააჩნია. ნაჩვენები იქნა, რომ იგი ციტოქრომ b_5 -ის მოლეკულის ნაწილს წარმოადგენს, შეიცავს ჰემს და პასუხისმგებელია დონორულ-აქცეპტორულ ურთიერთქმედებაზე. ნატიური სახით D- b_5 გამოყოფილია დეტერგენტების გამოყენებით. იგი 141 ამინომჟავურ ნაშთს შეიცავს და 16.7 kD მოლეკულური მასა გააჩნია; წყალხსნარებში

აგრეგაციას განიცდის და ოქტამერის ფორმას იღებს, რომლის მოლეკულური მასა ~120 kD-ია. სპეციალურად ჩატარებული გამოკვლევებით შესაძლებელი გახდა დადგენილიყო, რომ ტრიტონ X-100-თან ციტოქრომ b_5 -ის „დელიპიდიზებული“ ხსნადი კომპლექსების წარმოქმნისას დეტერგენტი ციტოქრომის ჰიდროფობულ და არა ჰიდროფილურ გლობულურ ნაწილს უკავშირდება. ტრიფსინით დამუშავებისას ციტოქრომ b_5 -ს სცილდება კატალიზურად აქტიური პოლიპეპტიდური კომპონენტი, რომელიც 97 ამინომჟავურ ნაშთს შეიცავს. დამატებითი კომპონენტი 44 ამინომჟავური ნაშთის შემცველია, რომელთაგან 60% არაპოლარულია.

ციტოქრომ b_5 -ისა და ფოსფოლიპიდების ურთიერთქმედებაზე განსაკუთრებით საინტერესო მონაცემები იქნა მოპოვებული ჰემოპროტეინის ჰიდროფობული კომპონენტის აღმოჩენის შემდეგ. სწორედ ეს კომპონენტი, რომელსაც ~4 kD მოლეკულური მასა აქვს, წარმოადგენს ჰიდროფობულ „კუდს“, რომლითაც D- b_5 მემბრანას ემაგრება. ამასთან, მიკროსომული სუსპენზიის ულტრაბერით და ჰომოგენიზებით შემდგომი დამუშავებისას ეს კომპონენტი სუპერნატანტში არ გადადის.

ციტოქრომ b_5 -ისათვის დამახასიათებელია უნარი, ჩაშენდეს მიკროსომაში ჰემოპროტეინის ენდოგენურ შემცველობასთან შედარებით 5–20-ჯერადი სიჭარბით. დამატებით ჩაშენებული ციტოქრომის დაკავშირების უბნები ფოსფოლიპიდები აღმოჩნდნენ. ამფიპათური ცილის დამატებითი დაკავშირების ფენომენი შეიძლება ბიომემბრანების შენების „მოზაიკური“ მოდელით აიხსნას. მისი თეორია ითვალისწინებს ფოსფოლიპიდური მატრიქსის განსხვავებული უბნების (ზონების) შესაძლებლობას, სხვადასხვა ტემპერატურაზე ფაზური გადასვლები განახორციელონ. როგორც ირკვევა, კონკრეტულ პირობებში ბიომემბრანებში ფოსფოლიპიდები შეიძლება იმყოფებოდნენ „ლატერალური გამყოფი ფაზის“ მდგომარეობაში, როდესაც თხევადკრისტალური და თხევადი ზონების თანაფარდობა მატრიქსის გარკვეული უბნების ლატერალურ „კუმშვას“ განსაზღვრავს. თვლიან, რომ ლატერალური გამყოფი ფაზა და ლატერალური კუმშვა განაპირობებენ ცილის მოლეკულის არამარტო კონფორმაციულ ცვლილებებს, არამედ ბიომემბრანებში მათ დამატებით ჩაშენებას.

ჰიდროფობულ პოლიპეპტიდურ ფრაგმენტში არსებული ტრიფტოფანის ფლუორესცენციის უნარის გამოყენებით დადგენილ იქნა, რომ ერთი მოლეკულა ციტოქრომ b_5 -ის დაკავშირებისათვის ფოსფატიდილქოლინის არაუმცირეს 35 მოლეკულაა საჭირო. ეს ცილა/ლიპიდის წონითი თანაფარდობის 0.5 კოეფიციენტს შეესაბამება. გარემოს ტემპერატურის ცვლი-

ლებსას ციტოქრომ b₅-ლუციტინის კომპლექსის ფლუორესცენციის ცვლილებამ შესაძლებელი გახდა გამოთქმულიყო მოსაზრება, რომ პემოპროტეინის ჰიდროფობული ნაწილი აქტიურად ასოცირდება მიკროსომული ლუციტინების ცხიმოვანი მჟავების ნაშთებთან.

3.1.4 ენდოპლაზმურ მემბრანებში ქსენობიოტიკთა მჟანგველი ფერმენტები და ლიპიდები ერთიან დინამიკურ სისტემას ქმნიან

ენდოპლაზმურ მემბრანებში არსებული ქსენობიოტიკთა მჟანგველი ფერმენტები თავის აქტივობას არ კარგავენ მარილთა მაღალი კონცენტრაციებით ან ხელატორებით დამუშავებისას. რეაგენტები, რომლებიც ცილის მოლეკულის კონფიგურაციას არღვევენ (შარდოვანა, გუანიდინი), ან მათ ჰიდროლიზს იწვევენ (ტრიფსინი), ფერმენტთა სოლუბილიზაციას ვერ ახდენენ. მხოლოდ ისეთი დეტერგენტები, რომლებსაც მემბრანის ლიპიდურ მატრიქსთან უაღრესად მტკიცედ დაკავშირებული ცილები ხსნად მდგომარეობაში გადაჰყავთ (Na-ის ქოლატი და დეზოქსიქოლატი, ტრიტონ X-100 და ტეინ-80), ახდენენ ამ ფერმენტულ სისტემათა ცალკეული კომპონენტების სოლუბილიზაციას. აქედან ცხადი ხდება, რომ ენდოპლაზმური მემბრანების სუნთქვითი ჯაჭვის კომპონენტები გარეგან, პერიფერულ ცილებს არ მიეკუთვნება. ისინი ძირითადი, ინტეგრალური ცილა-ფერმენტებია, რომლებიც მემბრანის სიღრმეში იჭრებიან და მტკიცე კონტაქტს ამყარებენ მის ფოსფოლიპიდურ მატრიქსთან.

მიკროსომულ რედოქს-სისტემათა ცხოველყოფელობაში ფოსფოლიპიდების გადამწყვეტ მნიშვნელობაზე მიუთითებს მათი გავლენით სხვადასხვა ქსენობიოტიკების მეტაბოლიზმის რეაქტივაცია. რეაგენტები, რომლებიც უარყოფითად მოქმედებენ მემბრანათა ჰიდროფობულ თვისებებზე, როგორც წესი, აქვეითებენ მასში მყოფ მჟანგველ ფერმენტთა აქტივობებსაც. ამ ვითარებაში ეგზოგენურად დამატებულ ფოსფატიდილქოლინს უნარი აქვს საკონტრაქტო დონეზე აღადგინოს ზოგიერთი პროცესის სიჩქარე, მაგალითად, Na-ის დეზოქსიქოლატით დაქვეითებული ამინოპირინის N-დემეთილირების რეაქცია, ან ბუთანოლითა და აცეტონით დათრგუნული 3,4-ბენზპირენის დაქვეითებული ჰიდროქსილირება.

ჩვენს ლაბორატორიაში ნაჩვენებია მცენარეში ტრიტონ X-100-ის დამთრგუნველი (65-85%-ით) მოქმედება ამინოპირინის, დიმეთილანლინის N-დემეთილირებაზე და ანილინის *p*-ჰიდროქსილირებაზე. ეს შედეგი

იმაზე მიუთითებს, რომ სოლუბილიზებულ მდგომარეობაში მცენარეული ენდოპლაზმური მემბრანების მონოოქსიგენაზურ სისტემას აღნიშნულ ქსენობიოტიკთა ჟანგვის უნარი დაკარგული აქვს. N-დემეთილაზური აქტივობის სრული და ჰიდროქსილაზური აქტივობის ~60%-ით აღდგენა ხდება „ნედლი“ ლეციტინის (კვერცხიდან მიღებული ქოლესტეროლშემცველი ფოსფატიდილქოლინის) დამატებით. ამ შემთხვევაში მეტად მნიშვნელოვანია ერთი ფაქტი: ფოსფოლიპიდის ეფექტი აბსოლუტურად ერთნაირია საინკუბაციო ხსნარში დეტერგენტთან ერთად მისი შეტანისას და დეტერგენტული ინჰიბირების მიღების შემდეგაც. აქედან გამომდინარე, ფოსფატიდილქოლინის მოქმედებას ორმაგი ახსნა მიეცით: 1) დეტერგენტთან ერთად თანამყოფობისას ეს ფოსფოლიპიდი მჟანგველი ფერმენტის ირგვლივ ლიპიდდამოკიდებულ ჰიდროფობულ გარემოცვას ქმნის და მის აქტიურ ცენტრს დეტერგენტისადმი შეუვალს ხდის; 2) ინჰიბირების შემდეგად ფოსფოლიპიდი, როგორც ჩანს, ფერმენტის აქტიურ, ჰიდროფობულ უბნებს ათავისუფლებს დაკავშირებული დეტერგენტისაგან და კვლავ ქმნის მის ირგვლივ ლიპიდურ გარემოცვას. ამ მოსაზრებას ადასტურებს მონაცემები ცილა-ლიპიდური ურთიერთქმედებისას მემბრანულ ჰემოპროტეინთან მტკიცედ დაკავშირებული დეტერგენტის მოცილების შესახებ.

მთელ რიგ ლაბორატორიებში ნაჩვენებია, რომ რეკონსტრუირებულ პროტეოლიპოსომებში (სინთეზურ მიკროსომებში) სამკურნალო პრეპარატების, ჰორმონების, ცხიმოვანი მჟავების, ნაჯერი ნახშირწყალბადებისა და კანცეროგენების მეტაბოლიზება მხოლოდ ლიპიდური ბუნების მქონე თერმოსტაბილური ფაქტორის თანამყოფობისას ხორციელდება და იგი იდენტიფიცირებულია როგორც ფოსფატიდილქოლინი. გამოსახულ რეაქტივაციულ უნარს ფლობს როგორც „ნედლი“, ასევე სინთეზური ლეციტინი.

მიკროსომების დამუშავებისას ულტრაბერით, მაღალი კონცენტრაციის მარილების ხსნარებით ან გაყინვა-გათბობით NADPH-ციტოქრომ P450-რედუქტაზის მემბრანიდან სოლუბილიზება არ ხდება. მხოლოდ პროტეოლიზური ფერმენტებით, ლიპაზით ან დეტერგენტებით ზემოქმედებისას ხდება მემბრანათა სხვა კომპონენტებისაგან მისი იზოლირება. ითვლება, რომ ინტაქტურსა და ფენობარბიტალით ან ქოლანტრენით ინდუცირებულ და შემდეგ იზოლირებულ NADPH-სპეციფიკურ ფლავოპროტეინს შორის არსებითი განსხვავება არაა.

პროტეოლიზით და დეტერგენტით გამოყოფილი ფლავოპროტეინები ერთმანეთისაგან მოლეკულური მასებით განსხვავდებიან. დეტერგენტით მიღებული ფერმენტის მოლეკულური მასა ~8 kD-ით მეტია. ამასთან

დაკავშირებით გამოთქმულია მოსაზრება, რომ ფლავოპროტეინი მიკროსომულ მემბრანას უკავშირდება თავისი ჰიდროფობული ნაწილით, რომელიც 50–100 ამინომჟავურ (უპირატესად არაპოლარულ) ნაშთს შეიცავს და მიკროსომების პროტეოლიზურად დამუშავებისას ფერმენტს მხოლოდ ჰიდროფილური ნაწილი წყდება, ჰიდროფობული კი მემბრანის სიღრმეში რჩება. პროტეოლიზისაგან განსხვავებით დეტერგენტი საშუალებას იძლევა ფერმენტი გამოყოფილ იქნას თავის „ჰიდროფობულ კუდათს“ ერთად.

შემდგომმა გამოკვლევებმა აჩვენეს, რომ ფლავოპროტეინის ჰიდროფობული „კუდი“ არსებით როლს არ ასრულებს ფლავინების ჟანგვისას აღძრულ სპექტრულ ცვლილებებში, ელექტრონის აქცეპტორთა აღდგენასა და ფერმენტ-ინჰიბიტორის ურთიერთქმედებაში. ყველა ეს თვისება ფერმენტის ჰიდროფილური ნაწილის ფუნქცია აღმოჩნდა. დადგინდა ისიც, რომ ფერმენტი, რომელიც პროტეოლიზურადაა მიღებული, რეკონსტრუირებულ მემბრანაში შემდგომი „ჩაშენებისას“ ქსენობიოტიკთა გარდაქმნის უნარს ვეღარ ამჟღავნებს. სამაგიეროდ, რეკონსტრუირებულ სისტემაში „ჩაშენებული“ დეტერგენტული ფლავოპროტეინი აქტიურად მონაწილეობს ქსენობიოტიკთა ჟანგვით კატაბოლიზმში და ამ თვისებას კარგავს ტრიფსინით დამუშავებისას, თუმცა ლიპიდების ჟანგვის უნარი შენარჩუნებული აქვს.

რაც შეეხება მიკროსომული სუნთქვითი ჯაჭვის ტერმინალურ კომპონენტს – ციტოქრომ P450-ს, იგი გამოყოფის მანიპულაციების მიმართ საკმაოდ მდგრადია. ელექტროფორეზულად ჰომოგენურ მდგომარეობაში გამოყოფილი ფერმენტის მონომერი, რომლის მოლეკულური მასა 49 kD-ის ტოლია, 409 ამინომჟავურ ნაშთს შეიცავს და მათგან 50% არაპოლარულია. მაშასადამე, ფერმენტი ერთ-ერთ ყველაზე ჰიდროფობულ მემბრანულ ცილას წარმოადგენს. სოლუბილიზებული ფერმენტის მიკროსომულ მემბრანაში „ჩამონტაჟებისას“ მისი მჟანგველი უნარი მკვეთრად იზრდება. ამჟამად დადგენილია, რომ ფერმენტი თავისი სუბსტრატებისაგან ლიპიდური „ბარიერითაა“ განმხოლოებული. ამიტომ ჟანგვას წინ უძღვის ლიპიდურ მატრიქსში სუბსტრატთა შეღწევის აქტი. მთელი რიგი ციკლური და ალიფატური ნახშირწყალბადების უნარი, წარმოქმნან ციტოქრომ P450-თან კატალიზურად აქტიური კომპლექსი, დამოკიდებულია იმ სიჩქარეზე, რომლითაც ეს ქსენობიოტიკები ტოვებენ მემბრანის პოლარულ ფაზას და გადაადგილდებიან არაპოლარულისაკენ, რომელიც ფოსფოლიპიდების ნახშირწყალბადოვანი ჯაჭვებითაა წარმოდგენილი და რომელშიც ციტოქრომ P450 იმყოფება.

მაშასადამე, როდესაც ორგანულ ნაერთთა ბიოტრანსფორმაციაზე ვმსჯელობთ, ამ პროცესში ვგულისხმობთ სუბსტრატის მემბრანაში შეღწევის, ციტოქრომ P450-ის მოლეკულის პიდროფობულ უბნებთან მისი დაკავშირების, მემბრანის ლიპიდ-ცილოვან კომპლექსთან მიკროსომული გადატანების მიმავრების და ელექტრონთა ტრანსპორტის რედუქტაზული რეაქციების მთლიან თანმიმდევრობას.

მონოოქსიგენაზურ რეაქციათა სუბსტრატები გაცილებით ინტენსიურად უკავშირდებიან უჯერ ფოსფოლიპიდებს (მაგ., ნედლ ლეციტინს), ვიდრე ნაჯერს (მაგ., დიპალმიტოილლეციტინს). ციტოქრომ P450 და მისი რედუქტაზა ლოკალიზებულია ფოსფოლიპიდების „სპეციალიზებულ“ ზონაში, რომელიც შედარებით არააქტიურ მდგომარეობაში იმყოფება, ვიდრე ფოსფოლიპიდური მატრიქსის ძირითადი მასა. ამ ზონისათვის დამახასიათებელია ფაზური გადასვლა თხევად-კრისტალურიდან თხევად მდგომარეობაში. ვარაუდობენ, რომ ამ ზონაში 20%-მდე მიკროსომული ფოსფოლიპიდი იმყოფება. ისინი არამარტო მონოოქსიგენაზური სისტემის ცალკეულ კომპონენტთა ურთიერთკონტაქტს ამყარებენ, არამედ ციტოქრომ P450-ისავე ლიპიდური სუბსტრატების ლატერალურ დიფუზიასაც უზრუნველყოფენ.

მოლეკულური ორგანიზაციის რა უპირატესობას იძლევა წყალში ხსნად ფორმებთან შედარებით მონოოქსიგენაზური სისტემის მემბრანაში ევოლუციური ჩამონტაჟება? პრინციპში შესაძლებელია ამ ფერმენტულ სისტემათა ორგანიზაციის ორი ტიპის არსებობა. პირველია გარკვეული სტეიომეტრიის მქონე, მტკიცე, მრავალკომპონენტიანი ფერმენტული სისტემების მემბრანაში ფუნქციონირება. ელექტრონთა გადატანა შესაძლებელია მხოლოდ ასეთი „კლასტერის“ შიგნით. მოდელი, რომელსაც „კლასტერულ ორგანიზაციას“ უწოდებენ, რედუქტაზისა და ციტოქრომ P450-ის მოლეკულებს შორის ზისტ კავშირს ითვალისწინებს. მიკროსომულ მემბრანასთან მაქსიმალურად მიახლოებულ სისტემებზე ჩატარებულმა ცდებმა საჭირო გახადა მონოოქსიგენაზური სისტემის ფუნქციური ინტეგრაციის არსებობის აღიარება. ნაჩვენები იქნა, რომ ციტოქრომ P450 მიკროსომულ მემბრანაში წარმოქმნის არა უმცირეს ორი მოლეკულისაგან შემდგარ კომპლექსს. ნანახია კომპლექსის წარმოქმნის შესაძლებლობა ჰემოპროტეინსა და შესაბამის რედუქტაზას შორის თანაფარდობით 2 : 1. ასეთი ბინარული კომპლექსის არსებობა მართლაც გამოვლენილია ინტეგრირებულ მიკროსომებში. აღმოჩნდა, რომ მისი წარმოქმნა 0°C-ზეც კი ხდება, როდესაც მოლეკულათა მოძრაობის სიჩქარე მნიშვნელოვნადაა დაქვეითებული. აქედან შეიძლება გაკეთდეს დასკვნა, რომ ჰემოპროტეინი და მისი რედუქტაზა

მემბრანაში უშუალო სიახლოვეში იმყოფებიან. ითვლება, რომ ქსენობიოტიკთა დეგრადაციაში ოქსიგენაზათა კლასტერული ორგანიზაცია ამ ფერმენტულ სისტემას უმაღლეს კატალიზურ აქტივობას ანიჭებს. არსებობს მონაცემები, რომ ფოსფატიდილქოლინი კლასტერული კომპლექსის აუცილებელი შემადგენელი კომპონენტია.

მონოოქსიგენაზების მოლეკულური ორგანიზაციის მეორე ტიპი ფერმენტ-სუბსტრატის ურთიერთქმედებაში გულისხმობს ენდოპლაზმურ მემბრანებში გადამტანების შემთხვევით შეჯახებებს (ლატერალურ დიფუზიას). რეკონსტრუირებულ არამემბრანულ სისტემებზე და აგრეთვე გადამტანებით „აღჭურვილ“ ლიპოსომებზე ჩატარებული ცდებით შესაძლებელი გახდა ამ ტიპის რეალურად არსებობის დადგენა. ცხადი გახდა, რომ გადამტანები მეტად ძვრადია, ადვილად დიფუნდირებენ მემბრანის სიბრტყეში და შემთხვევითი დაჯახებისას ადგილი აქვს ელექტრონის გადატანას. ამასთან, ბუნებრივია, წარმოიქმნება მუხტის გადამტანი შესაბამისი ბინარული კომპლექსები. იმის გამო, რომ ენდოპლაზმური მემბრანები თხევადკრისტალური სტრუქტურისაა, რომელშიც ცილის მოლეკულებს ლატერალური მოძრაობა შეუძლია, სწორედ ამიტომ გადამტანების ერთმანეთთან თვისობის მახასიათებელი კონსტანტა უნდა იყოს ის სიდიდე, რომელიც მემბრანაში ფერმენტულ სისტემათა მოლეკულურ ორგანიზაციას განსაზღვრავს. სადღეისოდ, რამდენადაც ჩვენთვის ცნობილია, ენდოპლაზმურ მემბრანებში ელექტრონთა გადამტანებისათვის ამ სიდიდის რაოდენობრივი შეფასება არ მომხდარა. ამიტომ მონოოქსიგენაზური სისტემის მოლეკულური ორგანიზაციის პრობლემა ისევ გადაუჭრელია. ამასთან დაკავშირებით ინტენსიური კვლევა ჩატარდა ლიპიდური ბიშრის მიკროსიბლანტეზე ელექტრონთა გადატანის სიჩქარის დამოკიდებულების გამოსავლენად. საწყის კრიტერიუმად იქცა ის ვარაუდი, რომ მემბრანის ფოსფოლიპიდური კომპონენტის მიკროსიბლანტის დაქვეითებისას (რაც მიკროსომიდან ქოლესტეროლის მოცილებით მიიღწევა), შესაძლებელი გახდებოდა დადგენილიყო დიფუზიაზე დამოკიდებული ელექტრონთა გადატანის რეაქციები და ამ გზით გამოვლენილიყო ელექტრონის გადამტანი თავისუფალი დიფუზიის უნარის მქონე ცილა.

აღნიშნული მიდგომით ცნობილი გახდა, რომ $\text{NAD(P)H-ციტოქრომ } b_5\text{-რედუქტაზული რეაქცია დამოკიდებულია დიფუზიის სიჩქარეზე, NAD(P)H-ციტოქრომ } P450\text{-რედუქტაზული კი არა. ეს შედეგები შეიძლება განხილულ იქნას, როგორც NADH-დამოკიდებული ჟანგვითი ჯაჭვის ორი საწყისი კომპონენტის – ფლავოპროტეინის და ციტოქრომ } b_5\text{-ის ლატერალური}$

ძერადობის პირდაპირი ექსპერიმენტული დადასტურება. ისინი სარწმუნოდ გვიჩვენებს მემბრანაში ამ გადამტანთა უწესრიგო განაწილებას.

მაშასადამე, ციტოქრომ P450-ისა და NADPH-სპეციფიკური ფლავოპროტეინის შემთხვევაში ადგილი უნდა ჰქონდეს შედარებით მტკიცე კომპლექსის წარმოქმნას, ვიდრე ამ ფლავოპროტეინისა და ციტოქრომ b₅-ის შემთხვევაშია. განხილული შედეგები გვაფიქრებინებს, რომ მემბრანული და წყალში ხსნადი მონოოქსიგენაზური სისტემების მოლეკულურ ორგანიზაციაში პრინციპული განსხვავება არ არსებობს.

3.1.5 ლიპიდების ფერმენტული პეროქსიდაცია და ქსენობიოტიკების ჟანგვა ენდოპლაზმურ მემბრანებში ერთი და იგივე ელექტრონის სატრანსპორტო სისტემით კატალიზდება

ფოსფოლიპიდთა უჯერი რიგის ცხიმოვანი მჟავების ფერმენტული ზეჟანგური ჟანგვა რეაქციათა იმ ერთ განსაკუთრებულ კლასს წარმოადგენს, რომელიც ენდოპლაზმურ მემბრანებში ლოკალიზებული ფერმენტული კომპლექსებით ხორციელდება. განსაკუთრებულ მნიშვნელობას იძენს ამ პროცესში მიკროსომული NADPH-სპეციფიკური ფლავოპროტეინისა და ციტოქრომ P450-ის მონაწილეობის საკითხი.

პირველი მონაცემები იმის შესახებ, რომ ლიპიდთა პეროქსიდაცია და ქსენობიოტიკთა ჟანგვა ერთიდაიმავე ფერმენტებით კატალიზდება, ერნსტერსა და მის თანამშრომლებს ეკუთვნის. ამ დასკვნამდე ავტორები შემდეგ ფაქტებზე დაყრდნობით მივიდნენ:

1. ქსენობიოტიკთა ჟანგვის პროდუქტები აინჰიბირებენ ლიპიდთა ზეჟანგურ ჟანგვას;
2. მიკროსომული პრეპარატების „დაბერებისას“, როდესაც ქსენობიოტიკთა ჟანგვის მკვეთრი დაქვეითება ხდება, იხსნება ამ პროდუქტთა მიერ NADPH-დამოკიდებული ზეჟანგური ჟანგვის ინჰიბირება.

აღნიშნული ფაქტების ასახსნელად ავტორთა მიერ წამოყენებულ იქნა ჰიპოთეზა, რომლის თანახმადაც ორივე პროცესში მონაწილეობს NADPH-ის დამჟანგავი ელექტრონის ტრანსპორტის საერთო ფერმენტული სისტემა. ახლად გამოყოფილ მიკროსომებში ქსენობიოტიკები ამ სისტემაზე „ბატონდებიან“, რის გამოც NADPH-ის ძირითადი ფონდი მათ დევრადაციაშია ჩართული, ხოლო ლიპიდთა ზეჟანგური ჟანგვა დათრგუნულია. „მონოპოლირების“ ეფექტი არ შეინიშნება „ასაკოვან“ მიკროსომებში და NADPH-

ის მეანგავი სისტემა აქტიურად მონაწილეობს ლიპიდურ პეროქსიდაციაში. სადღეისოდ მოპოვებული ექსპერიმენტული მონაცემები ადასტურებენ NADPH-სპეციფიკური ფლავოპროტეინის გადამწყვეტ როლს მემბრანული ლიპიდების ზეჟანგურ ჟანგვაში. იგი წარმატებით აკატალიზებს ამ პროცესს $ADP-Fe^{2+}$ -ისა და $EDTA-Fe^{2+}$ -ის კომპლექსებთან თანამყოფობისას. ორივე შემთხვევაში ადგილი აქვს რეაქციის საბოლოო პროდუქტის – მალონის დიალდეჰიდის ერთნაირი რაოდენობით დაგროვებას. როგორც ირკვევა, მიკროსომებში ლოკალიზებულია ლიპიდთა პეროქსიდაციის, სულ მცირე, სამი ფერმენტული სისტემა, რომლებიც დაახლოებით ერთნაირი სიჩქარით, მაგრამ განსხვავებული სტეკიომეტრიით ახორციელებენ ზეჟანგურ ჟანგვას, რადგან თითოეულ მათგანს ფარდობის $[O_2]$: [მალონის დიალდეჰიდი] სხვადასხვა მნიშვნელობა გააჩნია. სამიდან ორი სისტემა დაკავშირებულია NADPH-სპეციფიკურ, ხოლო ერთი – NADH-სპეციფიკურ ფლავოპროტეინის ფუნქციონირებასთან. პირველის თავისებურებას ის წარმოადგენს, რომ მას გააჩნია ძლიერ სტაბილური აღდგენილი მდგომარეობა, რის გამოც ფუნქციონირებს როგორც ერთელექტრონიანი გადამტანი და ადვილად გადადის მთლიანად აღდგენილ მდგომარეობაში.

უნდა აღინიშნოს, რომ ფლავოპროტეინის კატალიზური აქტივობა ერთნაირია ხსნარსა და ფოსფოლიპიდურ ბიშრეში. ეს ამფიფილური ცილებისათვის დამახასიათებელი თვისებაა, რაც იმაში მდგომარეობს, რომ ისინი კონფორმაციული ცვლილებების მიმართ მდგრადობას ამჟღავნებენ წყლიდან ლიპიდურ ფაზაში გადასვლისას. იგივე ზდება ციტოქრომების b_5 -ისა და P450-ის შემთხვევაში. ამ უკანასკნელს მემბრანაში ფუნქციონირებისას კონფორმაციული ცვლილებები არ სჭირდება, რადგან მის აქტიურ ცენტრს ორგანიზებული მდგრადი სისტემა აქვს, რაც აგრეთვე მისი მოქმედების საფუძველსაც წარმოადგენს.

დეტერგენტით სოლუბილიზებული NADPH-სპეციფიკური ფლავოპროტეინი რეკონსტრუირებულ სისტემებში ჩაშენებისას ფუნქციურად აქტიურია როგორც ქსენობიოტიკების მეტაბოლიზმში, ასევე ლიპიდთა პეროქსიდაციაში. ამ ფაქტს წინა პლანზე გამოყავს აღნიშნულ რეაქციებში ფერმენტის ჰიდროფობული ფრაგმენტის როლი. ეჭვგარეშეა, რომ ამ კომპონენტს არსებითი მნიშვნელობა აქვს ფლავოპროტეინის ფუნქციის რეალიზაციაში. უცნობი რჩება მხოლოდ ის, მონაწილეობს თუ არა იგი ფერმენტის მემბრანასთან დაკავშირებისა და მისი განსაზღვრული სივრცობრივი ორიენტაციის ჩამოყალიბებაში, თუ კატალიზური თვისებებიც გააჩნია.

ღვიძლის მიკროსომებიდან გამოყოფილი ფლავოპროტეინის ზელოვნურ

ლიპოსომაში ჩაშენების შემდეგ ლიპიდთა ზეჟანგური ჟანგვის იგივე დონე რეგისტრირდება. ეს შედეგი თავისთავად იმაზე მეტყველებს, რომ ეს ფერმენტი არაა ზეჟანგური ჟანგვის მალიმიტირებელი ფაქტორი.

დეტერგენტი, რომელიც ენდოპლაზმური მემბრანებში ლიპიდ-ცილურ და ლიპიდ-ლიპიდურ ურთიერთქმედებათა ცვლილებებს იწვევს, რკინის იონებისათვის დაკავშირების უბანთა რიცხვსაც ცვლის. როგორც აღნიშნული იყო, მემბრანასთან დაკავშირებული რკინის იონები რადიკალწარმოქმნის ცენტრებს ქმნიან და ლიპიდურ ფაზაში ჯაჭვური რეაქციების განვითარებას იწყებენ. საფიქრებელია, რომ ანიონური დეტერგენტები ზრდიან რკინის იონთა დაკავშირების ცენტრთა რიცხვს და ამ გზით ლიპიდთა პეროქსიდაციას აძლიერებენ. კატიონური დეტერგენტი – აცეტილტრიმეთილამონიუმბრომიდი საპირისპირო ეფექტს ავლენს, ხოლო არაიონური დეტერგენტი – ტრიტონ X-100 – პეროქსიდაციის სიჩქარეზე პრაქტიკულად არ მოქმედებს. ეს შედეგები მემბრანულ სტრუქტურებში ლიპიდთა ზეჟანგურ ჟანგვაზე ჰიდროფობული ურთიერთქმედების ცვლილებების მარეგულირებელი გავლენის საუკეთესო მაგალითს წარმოადგენს.

არსებობენ მონაცემები, რომლებიც ლიპიდთა ფერმენტულ ზეჟანგურ ჟანგვაში და ქსენობიოტიკთა ჰიდროქსილირებაში NADPH-სპეციფიკური ფლავოპროტეინის უდავო მონაწილეობაზე მიუთითებენ. მათი ანალიზი საშუალებას იძლევა გაკეთდეს შემდეგი დასკვნები:

1. ორივე პროცესი მაღალსპეციფიკურია NADPH-ის მიმართ;
2. NADPH-ციტოქრომ P450-რედუქტაზის კონკურენტული ინჰიბიტორი – დაჟანგული NADP ეფექტურად თრგუნავს ლიპიდთა ფერმენტულ ზეჟანგურ ჟანგვას და ქსენობიოტიკთა ჰიდროქსილირებას;
3. არსებობს სრული შესაბამისობა სხვადასხვა ტიპის მემბრანებში NADPH-ციტოქრომ P450 რედუქტაზულ აქტივობასა და ლიპიდთა ფერმენტულ ზეჟანგურ ჟანგვას შორის;
4. ფერმენტული რეაქციის სამივე ტიპი – NADPH-ციტოქრომ P450-ის ჟანგვა-აღდგენა, NADPH-დამოკიდებული ჰიდროქსილირება და NADPH-დამოკიდებული ლიპიდთა ფერმენტული ზეჟანგური ჟანგვა სუბსტრატის მიმართ ერთნაირად სტერეოსპეციფიკურია;
5. NADPH-სპეციფიკური ფლავოპროტეინისადმი ძლიერ მაღალი თვისობის მქონე ზელოვნური აქცეპტორი მენადიონი (ვიტამინი K_3) ერთნაირად ეფექტურად თრგუნავს NADPH-დამოკიდებულ პროცესებს – დიმეთილანილინის ჟანგვასა და ლიპიდთა პეროქსიდაციას;
6. NADPH-ის ოქსიდორედუქცია, ქსენობიოტიკთა ჟანგვა და ლიპიდთა

ფერმენტული ზეჟანგური ჟანგვა უაღრესად მგრძნობიარეა პროტეაზების მოქმედების მიმართ. ფლავოპროტეინის სოლუბილიზაცია მიკროსომული მემბრანების ტრიფსინითა და პრონაზით ხანმოკლე დამუშავებისას ჰიდროქსილირებისა და ლიპიდთა პეროქსიდაციის მკვეთრ ინჰიბირებას ახდენს;

7. ელექტრონთა გადატანის NADPH-სპეციფიკური სისტემა და ლიპიდთა ფერმენტული ზეჟანგური ჟანგვა მიკროსომული მემბრანის იმ საერთო ფრაგმენტებშია ლოკალიზებული, რომლებიც ფრაქციის ულტრაბერით ან იზოამილის სპირტით დამუშავებისას მიიღება.

ჩამოთვლილი არგუმენტების მიუხედავად, არსებობს ფაქტები, რომელთა თანახმადაც ორივე პროცესის განსაზოროციელებლად ფლავოპროტეინის გარდა, საჭიროა ელექტრონის გამამტანი სხვა კომპონენტების არსებობაც. საკმარისია აღინიშნოს, რომ ეს ფერმენტი მემბრანის ზედაპირზეა განლაგებული და მასთან დასაკავშირებლად გამოიყენება არა ლიპიდები, არამედ მემბრანული ცილების ამინომჟავური ნაშთები (ამის მიზეზია პროტეაზების მაღალი მასოლუბილიზებული აქტივობა). მემბრანულ ცილებთან სუსტი კონტაქტი გვაფიქრებინებს, რომ ზეჟანგური ჟანგვის ინიციატიაში ფლავოპროტეინი უშუალოდ არ მონაწილეობს. ამისათვის საჭიროა რადიკალების წარმოქმნელ ცენტრებსა და ფერმენტულ ზეჟანგურ ჟანგვას შორის სიერცობრივი სიახლოვე. ამიტომ თელიან, რომ ლიპიდთა ფერმენტულ პეროქსიდაცის წარმატებით განზოროციელებისათვის NADPH-სპეციფიკური ფლავოპროტეინი აუცილებელია, მაგრამ პროცესის ინიციატია მაინც არა ამ პირველ კომპონენტთან, არამედ უფრო მოშორებით, სადღაც შუალედ ან საბოლოო უბანზე ხდება.

ენდოპლაზმურ მემბრანებში NADPH-სპეციფიკური ელექტრონის სატრანსპორტო ჯაჭვის მომდევნო კომპონენტი საბოლოოდ ცნობილი არაა. ვარაუდობენ, რომ ფლავოპროტეინსა და ციტოქრომ P450-ს შორის აქცეპტორის ყველაზე შეუცვლელ კომპონენტს არამჟავური, ფერედოქსინის მსგავსი რკინის შემცველი ცილა უნდა წარმოადგენდეს, რომელიც ზოგიერთ რეკონსტრუირებულ სისტემაში მართლაც ფვექტურად ფუნქციონირებს. ამ ცილის არსებობა დადგენილია თირკმელზედა ჯირკვლის მიტოქონდრიულ მემბრანაში (იხ. § 1.2.5.2). ლეიძლის მიკროსომულ ფრაქციაში ასეთი ცილის იდენტიფიკაციის ყველა მცდელობა უშედეგო აღმოჩნდა. ამიტომ, სადღეისოდ ითვლება, რომ მჟანგველი სისტემის ამ უბანზე ციტოქრომ b_5 ფუნქციონირებს.

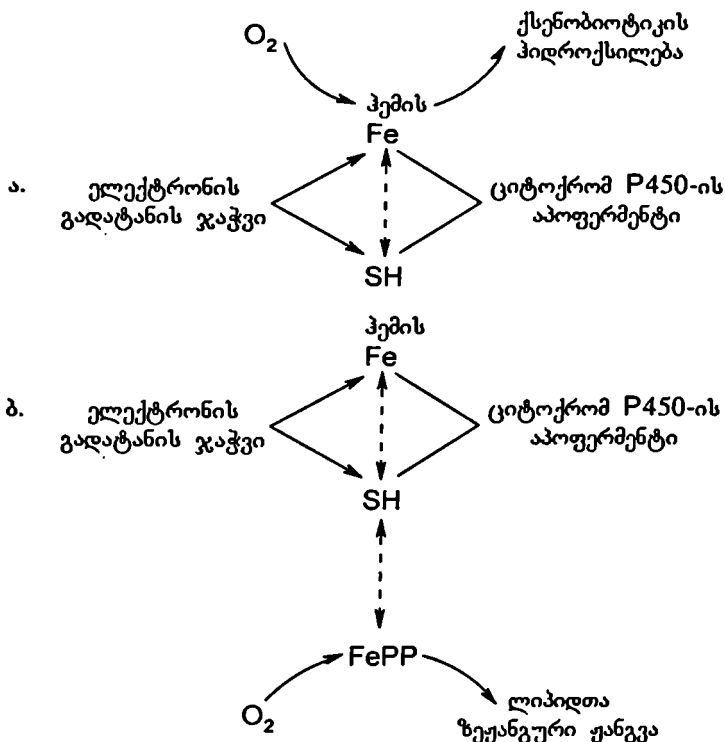
ენდოპლაზმური მემბრანების NADPH-სპეციფიკური რედოქს-სისტე-

მის ცალკეული კომპონენტის თვისებათა განხილვა არ იძლევა რომელიმე მათგანზე ლიპიდთა პეროქსიდაციის ზუსტი ლოკალიზაციის დადგენის საშუალებას, რადგან თავისუფალი რადიკალები, რომლებიც ზეჟანგურ ჟანგვას ინიცირებენ, შეიძლება წარმოიქმნან როგორც საწყის (თვითჟანგვადი ფლავინის), ასევე ტერმინალურ (ციტოქრომ P450-ის) უბნებზე. მითუმეტეს, ძნელია ამ პროცესში ელექტრონის სატრანსპორტო ჯაჭვის შუალედური უბნის როლზე მსჯელობა.

ახლა განვიხილოთ NADPH-სპეციფიკური რედოქს-სისტემის საბოლოო ელექტრონული აქცეპტორის, ციტოქრომ P450-ის შესაძლო მონაწილეობა ლიპიდთა ფერმენტულ ზეჟანგურ ჟანგვაში. ამთავითვე უნდა ითქვას, რომ მთელი რიგი მკვლევარებისა უარყოფს ამ ფაქტს და ამის საფუძველად ასახელებენ საკმაოდ დამაჯერებელ არგუმენტს: აღნიშნული ჰემოპროტეინის კლასიკური ინჰიბიტორი — ნახშირბადის მონოოქსიდი ფერმენტულ ზეჟანგურ ჟანგვაზე არაერთგვარადაა გავლენას არ ახდენს. რა თქმა უნდა, ეს არგუმენტი სამართლიანი იქნებოდა იმ შემთხვევაში, თუ ჩავთვლით, რომ ზეჟანგური ჟანგვისათვის აუცილებელია ელექტრონის გადატანა ჰემოპროტეინის ჰემურ უბანზე. ამასთან, გასათვალისწინებელია ციტოქრომ P450-ის სამი მეტად საყურადღებო თავისებურება:

1. აზოფერმენტის SH-ჯგუფები, როგორც ლიგანდები, მონაწილეობენ ჰემური რკინის დაკავშირებაში;
2. ფერმენტი ლოკალიზებულია მემბრანის ჰიდროფობულ ზონაში, ანუ ზეჟანგური ჟანგვის სუბსტრატთა უშუალო სიახლოვეში;
3. ციტოქრომ P450 წარმოადგენს რედოქს-სისტემის იმ კომპონენტს, რომელზეც ყველაზე მეტადაა მოსალოდნელი თავისუფალი რადიკალების წარმოქმნა. ჰიდროქსილის რადიკალებთან ერთად გამოირიცხული არაა ორგანული რადიკალების, კერძოდ, ამინომჟავათა რადიკალების გენერირებაც. ყოველივე ზემოთქმულის გათვალისწინებით არჩაკევმა წარმოადგინა ლიპიდთა ფერმენტულ ზეჟანგურ ჟანგვაში ციტოქრომ P450-ის მონაწილეობის რამდენადმე უჩვეულო მექანიზმის სქემა (ნახ. 49).

ამ მკვლევარის თანახმად, ჰემოპროტეინის აქტიურ ცენტრში მყოფ აზოფერმენტის SH-ჯგუფთან რკინის პიროფოსფატის დაკავშირებისას ხდება თავისუფალი რადიკალების გენერირებადი ახალი ცენტრის ჩამოყალიბება (სქემაზე FePP), რომლის აქტივობაც ნახშირბადის მონოოქსიდით არ ინჰიბირდება. ამ შემთხვევაში ციტოქრომ P450 ფუნქციონირებს არა როგორც ჰემოპროტეინი, არამედ როგორც არაჰემური გოგირდშემცველი რკინაპროტეინი. მიკროსომების ელექტრონების სატრანსპორტო სისტემაში ციტო-



ნახ. 49. ციტოქრომ P450-ის მონაწილეობა ქსენობიოტიკთა ჰიდროქსილირებისა (ა) და ლიპიდთა ფერმენტული ზეფანგური ჟანგვის (ბ) რეაქციებში (განმარტება იხ. ტექსტში).

ქრომ P450 წარმოადგენს იმ ერთადერთ გადამტანს, რომელსაც აქტიურ ცენტრში SH-ჯგუფი გააჩნია და ელექტრონის გადატანაში მონაწილეობის მიღება შეუძლია. ზეფანგური ჟანგვის ფერმენტული სისტემა კი მგრძნობიარეა SH-ჯგუფების ისეთი შხამების მიმართ, როგორც *p*-ქლორ-მერკურიბენზოატი, $HgCl_2$ და მერსალილია. როგორც ჩანს, SH-ჯგუფი ლიპიდურ პეროქსიდაციაში მხოლოდ ენდოგენურ რკინასთან კომპლექსირებისას ერთვება. არაფერმენტულ, ასკორბატდამოკიდებულ ზეფანგურ ჟანგვაში SH-ჯგუფების რაიმე როლი გამოირიცხულია, რადგან ეს პროცესი სულფჰიდრილური ჯგუფების შხამების მიმართ არამგრძნობიარეა.

სოიის ნახარდებიდან მიღებულ მიკროსომულ ფრაქციაზე ჩვენს ლაბორატორიაში ჩატარებული გამოკვლევებით დადგენილია, რომ ლიპოპეროქსიდაციის როგორც ფერმენტული, ასევე არაფერმენტული პროცესი ქსენობიოტიკის (დიმეთილანლინის) ჟანგვის გაძლიერებას იწვევს. Fe^{2+} -ისა და NADPH-ის თანამყოფობისას ლიპიდთა ზეჟანგური ჟანგვის ორივე რეაქცია თითქმის სინერგულად ჯამდება. პარალელურად აღგილი აქვს ფრაქციის N-დემეთილაზური აქტივობის ზრდას. ფოსფატიდილქოლინი, რომელსაც ანტიოქსიდანტური თვისებები გააჩნია, ლიპიდთა ზეჟანგური ჟანგვის ინჰიბირებასთან ერთად აღნიშნული ქსენობიოტიკის N-დემეთილირებას ასტიმულირებს. ფოსფატიდილეთანოლამინს ასეთი გამოკვეთილი მოქმედება არ გააჩნია. როგორც ჩანს, მისი ნახშირწყალბადოვანი ნაშთის უჯერი ბმები თვითონ წარმოადგენს თავისუფალი რადიკალებისათვის მოზერხებულ სამიზნეს, რაზეც მიუთითებს ლიპოპეროქსიდაციის ერთ-ერთი საბოლოო პროდუქტის – მალონის დილდექიდის დაგროვება სარეაქციო არეში. მიღებული მონაცემების საფუძველზე დასაშვებად მივიჩნიეთ მოსაზრება, რომ ქსენობიოტიკის ჟანგვის პროცესი რადიკალურ სტადიას შეიცავს, თუმცა იგი ლიპიდური პეროქსიდაციისადმი დამოუკიდებლობით ხასიათდება.

არსებითია მემბრანის ჰიდროფობულ ზონაში ციტოქრომ P450-ის ლოკალიზაციის ფაქტორიც: დანარჩენი გადამტანებისაგან განსხვავებით, მისი სოლუბილიზაცია მხოლოდ ლიპაზებითა და დეტერგენტებით ხერხდება. ჰემოპროტეინი მემბრანასთან მტკიცედ ბმული ფერმენტია და მისთვის დაცულია თავისუფალი რადიკალების ინიციაციის ცენტრებისა და ზეჟანგური ჟანგვის სუბსტრატთა სივრცობრივი სიახლოვის პირობა. ფერმენტულ ზეჟანგურ ჟანგვაში ციტოქრომ P450-ის მონაწილეობაზე მიუთითებს ამ პროცესის დათრგუნვა ჰემოპროტეინის ისეთი სპეციფიკური ინჰიბიტორებით, როგორებიც SKF-S25A (β,β-დიეთილამინოეთილდიფენილ-პროპილაცეტატი) და ნიკოტინამიდი.

ამგვარად, არსებულ მონაცემებზე დაყრდნობით შეგვიძლია მივიღოთ, რომ:

1. ენდოპლაზმურ მემბრანებში არსებობს ლიპიდთა ზეჟანგური ჟანგვის ორი სისტემა, რომელიც ერთმანეთისაგან პრინციპულად განსხვავდება ინიციაციის სტადიით. NADPH-სპეციფიკური სისტემის შემთხვევაში რადიკალწარმოქმნელი ცენტრები – რკინის (II) იონები ელექტრონის გადამტანი ჯაჭვით ფერმენტულად აღდგება, ხოლო არაფერმენტულ სისტემაში რკინის აღდგენა ასკორბატით ან შესაფერისი რე-

- დოქს-პოტენციალის მქონე სხვა აღმდგენელით ზდება;
2. ორივე პროცესის კინეტიკა და სტექიომეტრია იმის სასარგებლოდ მეტყველებს, რომ ამ რეაქციათა განვითარებას ერთიანი, რადიკალურ-ჯაჭვური მექანიზმი უდევს საფუძვლად;
 3. Fe^{2+} ან Fe^{3+} უკავშირდება ცილის გარკვეულ ფუნქციურ ჯგუფს, რის შედეგადაც ეს უკანასკნელი რადიკალების წარმოქმნის (რეაქციის ინიციაციის) ცენტრი ზდება. ლიპიდთა ფერმენტული ზეჟანგური ჟანგვის შემთხვევაში ასეთი ჯგუფი შეიძლება იყოს ციტოქრომ P450-ის აქტიურ ცენტრში არსებული სულფჰიდრილური ჯგუფი, ხოლო არა-ფერმენტულ ზეჟანგურ ჟანგვაში ეს როლი შეიძლება შეასრულოს იმ მემბრანული ცილების ფუნქციურმა ჯგუფებმა, რომლებიც ჰიდროფობული ფაზიდან არ სოლუბილიზდება.

3.2 რეგულაცია აღმდგენელი ექვივალენტების დონეზე

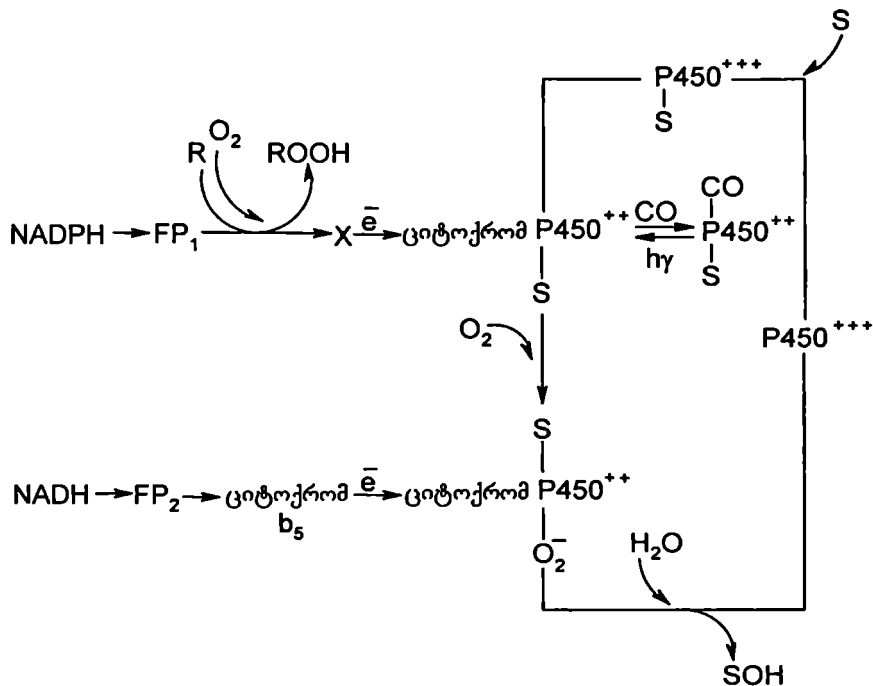
3.2.1 მიკროსომულ მემბრანებში ელექტრონთა სატრანსპორტო გზებს შორის ურთიერთქმედება

მიკროსომულ NADH- და NADPH-სპეციფიკურ რედოქს-ჯაჭვების ურთიერთქმედებაში ძირითადად მათ შორის აღმდგენელი ექვივალენტების ცვლა და ჰიდროქსილირების აქტის განხორციელებაში თითოეული მათგანის თანამონაწილეობის დონის განსაზღვრა იგულისხმება. განსაკუთრებით მნიშვნელოვანია ელექტრონთა გადატანის მექანიზმისა და ამ პროცესში ციტოქრომ b_5 -ის როლის გარკვევა. ამთავითვე აღვნიშნავთ, რომ უამრავი გამოკვლევების შედეგად დაგროვილი ფაქტები იმის სასარგებლოდ მეტყველებენ, რომ:

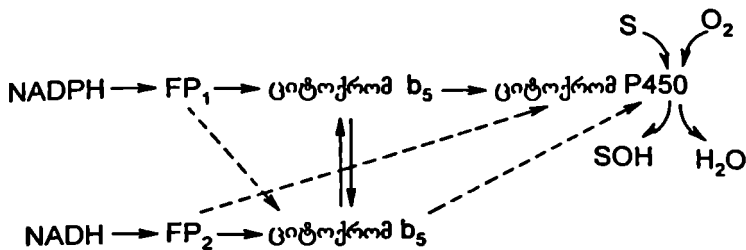
1. NADH-ის ჟანგვის ჯაჭვიდან NADPH-ის ჟანგვის ჯაჭვზე ადგილი აქვს აღმდგენელი ექვივალენტების გადატანას;
2. NADH-ციტოქრომ b_5 -რედუქტაზა უშუალოდ მონაწილეობს ქსენობიოტიკთა ჰიდროქსილირებაში.

პირველი არგუმენტის ექსპერიმენტული დადასტურება აღდგენილი NADH-ით დიმეთილანილინის NADPH-დამოკიდებული ჰიდროქსილირების (N-დემეთილირების) სტიმულაციაა. საინკუბაციო ხსნარში NADPH-ის დაბალი (K_M -ის რიგის) კონცენტრაციებისას, NADH-ის დამატება მნიშვნელოვნად აჩქარებს დიმეთილანილინისა და ეთილმორფინის N-დემეთილირების რეაქციებს. ეს შედეგი საშუალებას იძლევა მიღებულ იქნას, რომ

NADH-ის ჟანგვის პროცესში მისი რედუცირებადი ექვივალენტები შეიძლება მოხვდნენ NADPH-ის რედოქს-ჯაჭვში და როდესაც ეს უკანასკნელი სრულადაა გაჯერებული თავისი სუბსტრატით, მასტიმულირებელი გავლენა მოახდინოს ჰიდროქსილირების რეაქციაზე. შემდგომ დადგენილ იქნა, რომ NADH-ის მასტიმულირებელი ეფექტი ვლინდება NADPH-ის როგორც დაბალი, ასევე მაღალი კონცენტრაციებისას და აგრეთვე NADPH-გენერირებადი სისტემის (გლუკოზისა და გლუკოზო-6-ფოსფატდეჰიდროგენაზის ნარევის) დამატებისას. ამ ფაქტებზე დაყრდნობით ესტაბრუკმა და თანამშრომლებმა (1971 წ.), ზოლო ცოტა მოგვიანებით არჩაკოვმა და თანამშრომლებმა (1974 წ.) წარმოადგინეს NAD(P)H-სისტემათა მონაწილეობის სქემები ციტოქრომ P450-ის მიერ განხორციელებულ ჰიდროქსილირების რეაქციებში. საჭიროდ ვთვლით თვალსაჩინოებისათვის მოვიყვანოთ ორივე სქემა (ნახ. 50 და 51).



ნახ. 50. ელექტრონების გადატანა ენდოპლაზმური რეტიკულუმის მემბრანებში (ესტაბრუკის მიხედვით). R – უჯერი ცხიმოვანი მჟავა, S – ჰიდროქსილირების სუბსტრატი.



ნახ. 51. რედოქს-ჯაჭვების შორის რედუცირებადი ექვივალენტების ცვლის შესაძლო გზები (არჩაკოვის მიხედვით). სრული ისრებით აღნიშნულია ელექტრონთა ყველაზე სავარაუდო ცვლის გზები.

როგორც ვხედავთ, ამ ორ სქემას შორის პრინციპული განსხვავებაა. ნახ. 50-ზე მოცემულ სქემაზე არაა დაკონკრეტებული ფლავოპროტეინისა და ციტოქრომ P450-ს შორის არსებული შუალედური გადატანი და იგი დაუდგენელ X-კომპონენტად ითვლება. ნახ. 51-ზე წარმოდგენილი სქემის თანახმად კი ამ უბანზე ფუნქციონირებს ციტოქრომ b_5 -ის ქვეფრაქცია, რომელიც მიკროსომებში ამ კომპროტეინის საერთო შემცველობის 20–30%-ს არ აღემატება.

ესტაბრუკის სქემის მიხედვით ელექტრონთა გადატანის NADPH-ისა და NADH-ის რედოქს-ჯაჭვები დამოუკიდებლად ფუნქციონირებენ. NADPH-ის ჟანგვის სისტემა ციტოქრომ P450-ის აღდგენისათვის საჭირო პირველ ელექტრონს, ხოლო NADH-ის ჟანგვის გზა ციტოქრომ b_5 -ის გავლით ჟანგბადის გააქტივებისათვის საჭირო მეორე ელექტრონს იძლევა. არჩაკოვის სქემის მიხედვით კი ელექტრონთა გადატანის ორივე გზას საერთო უბანი გააჩნია და ყოველ ჯაჭვს ჰიდროქსილირებისათვის აუცილებელი ორივე ელექტრონით უზრუნველყოფს.

არსებული ფაქტები ჯერჯერობით არ იძლევიან რომელიმე სქემის უტყუარობის სრულ გარანტიას.

ნიკოტინამიდიური კოფერმენტების თანამყოფობისას კომპროტეინის აღდგენის სიჩქარის გაზომვა საშუალებას იძლევა, დადგინდეს რედოქს-ჯაჭვების შიგნით ელექტრონთა გადატანის სიჩქარეების კონსტანტები, აგრეთვე NADH-ის ჟანგვის ჯაჭვიდან NADPH-ის ჟანგვის ჯაჭვზე ელექტრონთა გადატანის რეაქციის სიჩქარეთა კონსტანტები. ამ შემთხვევაში შეუძლებელია გაიზომოს მხოლოდ NADPH-სპეციფიკური რედოქს-ჯაჭვიდან NADH-ის ჟანგვის ჯაჭვზე ელექტრონის გადატანის

სიჩქარე. მიუხედავად ამისა, NADPH-ით ციტოქრომ b_5 -ის აღდგენის მრუდი გვიჩვენებს, რომ ეს სიჩქარე საკმაოდ მაღალია და NADPH-ის ჟანგვის ჯაჭვში ციტოქრომ b_5 -ის აღდგენის სიჩქარესთან სავსებით შესადარებელი სიდიდეა. ამ მრუდზე არ ჩნდება „გადატეხის წერტილები“, რომელთაც შეიძლებოდა NADPH-სადმი სპეციფიკური ფლავოპროტეინ-რედუქტაზით ციტოქრომ b_5 -ის ორი ქვეფრაქციის განსხვავებული სიჩქარით აღდგენა ეჩვენებინათ. საფიქრებელია, რომ NADPH-სპეციფიკური ფლავოპროტეინით ორივე ციტოქრომი ერთნაირი სიჩქარით აღდგება, ანუ NADPH-ის ჟანგვის ჯაჭვიდან NADH-ის ჟანგვის ჯაჭვზე ელექტრონთა გადატანა მიმდინარეობს იმავე, ან უფრო მეტი სიჩქარით, რაც თვით NADPH-ის ჟანგვის ჯაჭვში ციტოქრომ b_5 -ის აღდგენას გააჩნია. ვინაიდან NADH-ის ჟანგვის ჯაჭვში ციტოქრომ b_5 -ის შემცველობა NADPH-ის ჟანგვის ჯაჭვთან შედარებით გაცილებით მაღალია, ამიტომ NADPH-ის ჟანგვის ჯაჭვიდან NADH-ის ჟანგვის ჯაჭვზე ელექტრონთა გადატანის რეაქციის სიჩქარის კონსტანტა არ შეიძლება NADPH-ციტოქრომ b_5 -რედუქტაზული რეაქციის სიჩქარის კონსტანტაზე ნაკლები იყოს.

რედოქს-ჯაჭვებს შორის ელექტრონთა გადანაწილების ზუსტი უბნების დასადგენად შესწავლილ იქნა ფერმენტ პრონაზის ეფექტურობა: დაბალი კონცენტრაციებისას მას NADPH-სპეციფიკური ფლავოპროტეინის შერჩევითი სოლუბილიზებისა და ამდენად, ციტოქრომების b_5 -ისა და P450-ის აღდგენის სიჩქარეზე ზემოქმედების უნარი გააჩნია. საინკუბაციო ნარევი პრონაზის დამატებისას მნიშვნელოვნად ქვეითდება NADPH-ით ციტოქრომ b_5 -ის აღდგენის რეაქციის სიჩქარე, მაგრამ პრაქტიკულად არ იცვლება NADH-ით მისი აღდგენა. ამგვარად, თუ NADH-ის თანამყოფობისას ციტოქრომ P450-ის აღდგენა NADH-რედოქს-ჯაჭვიდან NADPH-ის ჟანგვის ჯაჭვზე ელექტრონების გადასვლის შედეგია, მაშინ მიკროსომების პრონაზით დამუშავებას ამ რეაქციის ისეთივე ინჰიბირება უნდა გამოეწვია, როგორსაც ელექტრონთა NADPH-სპეციფიკური გადატანის სხვა რეაქციები განიცდიან. ამის საპირისპიროდ აღმოჩნდა, რომ მიკროსომების პროტეაზული დამუშავება NADH-ციტოქრომ P450-რედუქტაზულ რეაქციაზე არ მოქმედებს. ეს შედეგი თავისთავად გამორიცხავს NADPH-სპეციფიკური ფლავოპროტეინის მონაწილეობას ელექტრონთა საბოლოო გადატანაში NADH-ის ჟანგვის ჯაჭვიდან NADPH-ის ჟანგვის ჯაჭვზე. სხვაგვარად რომ ითქვას, რედოქს-ჯაჭვებს შორის ელექტრონთა გადანაწილება წარმოებს არა საწყის – ფლავოპროტეინულ უბანზე, არამედ მომდევნო – ციტოქრომების დონეზე. ამის სასარგებლოდ მეტყველებს ის ფაქტიც, რომ

მიკროსომებში არაა იდენტიფიცირებული $\text{NADH} + \text{NADP} \rightarrow \text{NAD} + \text{NADPH}$ რეაქციის მაკატალიზებელი ფერმენტი – ტრანსდეჰიდროგენაზა.

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

მიკროსომების ორ სუნთქვით ჯაჭვს შორის ელექტრონთა ცვლის შესაძლო პუნქტი, როგორც ჩანს, ციტოქრომ b_5 -ის ღონეა. ამასთან, ყოველთვის არ ხდება ელექტრონთა გადატანა FP_2 -დან ციტოქრომ P450-ზე. მძლავრი NADH-ციტოქრომ b_5 -რედუქტაზული სისტემის არსებობისას NADH-ის ჟანგვის ჯაჭვში ციტოქრომ b_5 მთლიანად აღდგენილ მდგომარეობაშია და მხოლოდ NADH-ის სიჭარბისას შეიძლება ელექტრონის გადატანის ეს გზა ჩაირთოს: $\text{NADH} \rightarrow \text{FP}_2 \rightarrow \text{ციტოქრომ P450}$.

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

განხილული ფაქტებიდან გამომდინარე, უნდა აღინიშნოს, რომ NADPH-ის ჟანგვის ჯაჭვიდან NADH-ის ჟანგვის ჯაჭვზე რედუცირებადი ექვივალენტების გადატანა შეიძლება ხდებოდეს ან ამ უკანასკნელში მყოფი ციტოქრომ b_5 -ის NADPH-სპეციფიკური ფლავოპროტეინით უშუალო აღდგენის გზით, ან ამ ციტოქრომზე ელექტრონთა გადატანით NADPH-დამოკიდებული გზის ციტოქრომ b_5 -დან. ამ რეაქციის სიჩქარე NADPH-ის ჟანგვის ჯაჭვში ციტოქრომ b_5 -ის აღდგენის სიჩქარის ტოლია.

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

1. უშუალოდ NADH-სპეციფიკური ფლავოპროტეინიდან ციტოქრომ P450-ზე;
2. უშუალოდ NADH-დამოკიდებული გზის ციტოქრომ b_5 -დან ციტოქრომ

P450-ზე;

3. NADH-ის ჟანგვის ჯაჭვის ციტოქრომ b_5 -დან NADPH-ის ჟანგვის გზით ციტოქრომ b_5 -ზე.

ამ რეაქციათა სიჩქარეები ძლიერ მცირეა.

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

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

3.2.2 მიკროსომის NADPH-სპეციფიკურ რედოქს-ჯაჭვსა და მიტოქონდრიის ციტოქრომოქსილაზურ სისტემას შორის ელექტრონთა ტრანსმემბრანული ცვლა

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

1. მიტოქონდრიიდან მიკროსომაზე, კერძოდ, NADPH-სპეციფიკურ რედოქს-ჯაჭვზე ელექტრონთა გადასვლას თან ახლავს ამ უკანასკნელის ჟანგვითი უნარის გაძლიერება და შესაბამისად, ქსენობიოტიკთა მთლიანი ბიოდეგრადაციის პროცესის საწყისი, სიჩქარემაღლიმიტირებელი სტადიის — ჰიდროქსილირების რეაქციის სიჩქარის მნიშვნელოვანი ზრდა. მაშასადამე, ამ შემთხვევაში ადგილი აქვს მიტოქონდრიის მხრიდან

- ქსენობიოტიკთა ჟანგვითი გარდაქმნების რეგულაციას აღმდგენელი ექვივალენტების დონეზე. ლიტერატურაში ეს ფენომენი „მიტოქონდრიული კონტროლის“ სახელწოდებით მოიხსენიება. ამ რეგულატორული მექანიზმის კიდევ ერთი ბიოლოგიური მნიშვნელობა იმაში მდგომარეობს, რომ ენდოპლაზმურ მემბრანებში ქსენობიოტიკთა ჟანგვის გაძლიერებით, მიტოქონდრია თავს იზღვევს მაღალი კონცენტრაციებით მასში უცხო ნივთიერებების მოხვედრისაგან, რომლებიც სუნთქვითი ჯაჭვის (ციტოქრომოქსიდაზური სისტემის, განსაკუთრებით პირველი კომპლექსის – NADH-CoQ -რედუქტაზის) ძლიერ ინჰიბირებასა და ენერგეტიკული ცვლიდან მიტოქონდრიის გამოთიშვას იწვევს.
2. მიკროსომული NADPH -საპეციფიკური ჟანგვის ჯაჭვიდან მიტოქონდრიაზე რედოქს-ექვივალენტების გადატანით აქტიურდება ციტოქრომოქსიდაზური სისტემა, რაც ენერგეტიკული შეუღლებისა და მიტოქონდრიის (მთლიანად უჯრედის) ენერგეტიკული სტატუსის ზრდაში მდგომარეობს. ასეთი ფუნქციის შეძენით მიკროსომული ჟანგვის სისტემა, სხვა მეტაბოლური გზების ანალოგიურად, „სრულ უფლებებშია აღდგენილი“ ენერგეტიკული და პლასტიური ცვლის თვალსაზრისით. აქ მნიშვნელოვანია მეორე გარემოებაც: მიტოქონდრიის შიდა მემბრანა ექსტრამიტოქონდრიული NADPH -ისათვის განუვლადია; ამიტომ ენერგეტიკული საჭიროებებისათვის მისი აღდგენილი ექვივალენტების ასეთი უშუალო და პირდაპირი გამოყენება შეუძლებელია. იმ შემთხვევაში, როდესაც მიკროსომული NADPH -საპეციფიკური ჯაჭვი ქსენობიოტიკის ჰიდროქსილირებით არაა დაკავებული (მისი ციტოქრომ b_5 , „მოცლილია“), მას ამ ნიკოტინამიდური კოფერმენტის თავისუფალი, ჰიდროქსილირებასთან არაშეუღლებული ჟანგვა და მისი აღმდგენელი ექვივალენტების მიტოქონდრიაზე გადაცემა ძალუძს. მაშასადამე, NADPH -ის თავისუფალმა ჟანგვამ შეიძლება მიკროსომისა და მიტოქონდრიის ენერგეტიკული შეუღლება განახორციელოს. ცხადია, ამ შემთხვევაში სახეზე გვექნება NADPH -ის ელექტრონების მიტოქონდრიული რეალიზაციის კიდევ ერთი ალტერნატიული გზა.

3.2.2.1 მიტოქონდრიული კონტროლი

პირველად იგი ლვიძლის ჰეპატოციტებში იქნა გამოვლენილი (სინტი, შენკმანი და სხვ., 1972–1973 წწ.) და მისი არსი მიტოქონდრიული ჟანგვის

სუბსტრატებით ციტოქრომ P450-ის I-ტიპის ქსენობიოტიკთა ჰიდროქსილირების სტიმულაციაში მდგომარეობს. სხვაგვარად რომ ვთქვათ, მიტოქონდრიები ენდოპლაზმურ მემბრანებში უცხო ნაერთთა ბიოტრანსფორმაციის უჯრედული კონტროლის ადგილს წარმოადგენენ. მიტოქონდრიებისა და მიკროსომების კომბინირებულ სისტემაში ამ კონტროლის განსახორციელებლად ორი ყველაზე შესაძლო მექანიზმი იკვეთება:

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

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

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

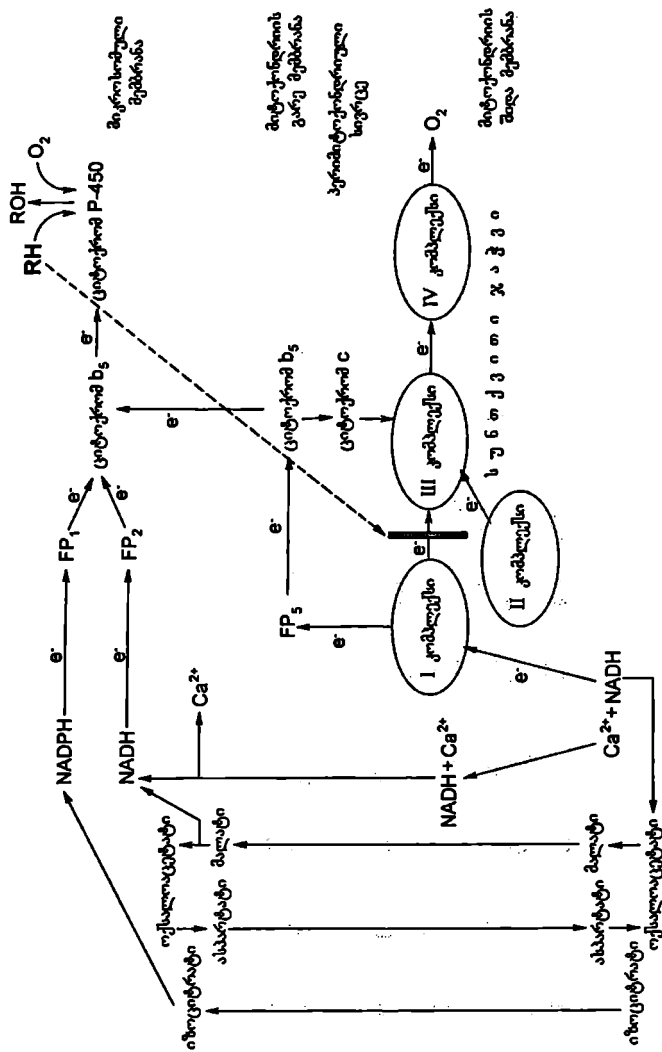
ცხოველურ ქსოვილში მიტოქონდრიული კონტროლის რეალური არსებობა მომდევნო წლებში სხვა ავტორთა მიერაც იქნა დადასტურებული.

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

ყოველივე ზემოთქმული შეგვიძლია წარმოვიდგინოთ სქემატურად (ნახ. 52), რომელშიც გათვალისწინებულია მიტოქონდრიულ კონტროლში იზოციტრატული და მალატ-ასპარტატული მაქოსებური მექანიზმების მონაწილეობაც.

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

მცენარის მიკროსომებისა და მიტოქონდრიების კომბინირებულ სისტემაში დიმეთილანლინის N-დემეთილირება ძლიერდება მალატის, იზოციტრატ-



ნახ. 52. ქსენობიოტიკების პიდროქსილირების „მიტოქონდრიული კონტროლის“ სავარაუდო სქემა. პუნქტირით მოცემული ქსენობიოტიკის მაინიბიტორული მოქმედება სუნთქვით ჯაჭვზე.

ის და სუქცინატიის დამატებით, ე.ი. დიმეთილანლინის მიკროსომული ჟანგვა მიტოქონდრიული კონტროლის ქვეშ იმყოფება. საყურადღებოა, რომ ეს ეფექტი ელინდება კომბინირებულ სისტემაში, მაგრამ არა მთლიან ქსოვილში.

ლიმონმჟავას ციკლის ინტერმედიატების მასტიმულირებელი მოქმედება ჩამორჩება NADPH-ის ეფექტს. ამასთან, NADPH-ით მიღწეული ქსენობიოტიკის ჟანგვის სტიმულაცია მიტოქონდრიის სუბსტრატთა დამატებისას აღარ იზრდება, ე.ი. საინკუბაციო სუსპენზიაში ეგზოგენურად დამატებული NADPH-ის თანამყოფობისას, მიტოქონდრიული კონტროლი აზრს კარგავს და იხსნება. მნიშვნელოვანია ისიც, რომ ქსენობიოტიკის დასაჟანგად საჭირო ელექტრონები ციტოქრომ P450-მა შეიძლება ცალკეულად მიიღოს ან მხოლოდ NADPH-დან, ან მხოლოდ მიტოქონდრიიდან, მაგრამ უპირატესობა პირველს ენიჭება.

ცდების ცალკე სერიაში კომბინირებულ სისტემას ციტოქრომოქსიდაზის დასაბლოკირებლად ნატრიუმის აზიდს ვამატებდით. ამ დროს მიტოქონდრიიდან მიკროსომაზე ელექტრონთა მიგრაციისათვის ოპტიმალური პირობები იქმნება. პროცესის ინტენსივობას ამჯერად ციტოქრომების P450-ისა და b_5 -ის აღდგენის კინეტიკით ვაფასებდით. მიტოქონდრიულ ჟანგვის სუბსტრატებთან შედარებით, NADPH-ის მოქმედების ეფექტი ამ შემთხვევაშიც უფრო მაღალი აღმოჩნდა. უნდა აღინიშნოს, რომ ორივე ციტოქრომის აღდგენის დონეები ყველა ვარიანტში ერთმანეთთან კორელაციაშია, რაც მიტოქონდრიულ კონტროლში ციტოქრომ b_5 -ის უშუალო მონაწილეობაზე მიუთითებს.

მიღებული შედეგებიდან ყურადღებას იმსახურებს N-დემეთილირებაზე სუქცინატიის მასტიმულირებელი მოქმედება, რაც პროცესში სუნთქვითი ჯაჭვის II კომპლექსის (სუქცინატდეჰიდროგენაზის) მონაწილეობის მაჩვენებელია. როგორც ჩანს, ამ კომპლექსიდან ელექტრონები პირდაპირ ხვდებიან მიკროსომების NADPH-სპეციფიკურ ჟანგვით ჯაჭვზე. ამ ფაქტს ადასტურებს სუქცინატდეჰიდროგენაზის ინჰიბიტორების — მალონატისა და ოქსალოაცეტატის დამთრგუნველი მოქმედება მიკროსომული ციტოქრომების აღდგენაზე. გარდა ამისა, სუქცინატიის ეფექტი არამგრძნობიარე აღმოჩნდა როტენონის მოქმედების მიმართ, რაც იმის მაჩვენებელია, რომ ამ დროს მიგრაციაში სუნთქვითი ჯაჭვის I კომპლექსი არ მონაწილეობს.

მიტოქონდრიებიდან მიკროსომებზე ელექტრონების გადატანის ინტენსივობა დამოკიდებულია ჟანგვისა და ფოსფორილების შეუღლების ხარისხზე. ჩვენ შევძელით გვეჩვენებინა, რომ ციტოქრომ P450-ის აღდგენის მაღალი

სიჩქარე დაბალი ენერგეტიკული შეუღლების, ან ჟანგვისა და ფოსფორილების 2,4-დინიტროფენოლით გათიშვისას მიიღება. ADP-ს დამატებით შეუღლების გაზრდისას პირიქით, ჰემოპროტინის აღდგენის სიჩქარე მუხრუჭდება. მაშასადამე, მიტოქონდრიდან მიკროსომაზე ელექტრონების მიგრაციის ერთ-ერთ აუცილებელ პირობას სუნთქვით ჯგუფში ელექტრონების თავისუფალი ნაკადის არსებობა წარმოადგენს.

სავსებით მისაღებია, რომ მიტოქონდრიდან მიკროსომაზე ელექტრონების გადატანაში ერთდროულად სუნთქვითი ჯგუფის I, II და III კომპლექსები მონაწილეობენ, მაგრამ ენერგეტიკული თვალსაზრისით უფრო ხელსაყრელია, რომ ელექტრონთა მიგრაცია II და III კომპლექსიდან ხდებოდეს, რადგან აქ ელექტრონს შედარებით დაბალი ენერგია აქვს. რაც შეეხება I კომპლექსიდან მიკროსომებზე ელექტრონთა პირდაპირ გადატანას, იგი იძულებითი გზა უნდა იყოს, რომელიც III კომპლექსის ბლოკირებისას იწყებს ფუნქციონირებას. მიტოქონდრიული კონტროლის განხორციელებაში ციანიდ-რეზისტენტული სუნთქვის სისტემებიც შეიძლება მონაწილეობდნენ, რადგან მათ bc_1 -კომპლექსზე ელექტრონთა უშუალო შემოტანის უნარი აქვთ.

3.2.2.2 NADPH-ის თავისუფალი ჟანგვა მიკროსომებში

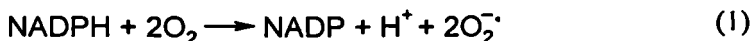
ცხოველური ქსოვილისა და ბაქტერიების მონოოქსიგენაზებისაგან განსხვავებით, ღვიძლის ციტოქრომ P450 არც ერთ სუბსტრატს არ ჟანგავს სრული შეუღლებით და NADPH-ის რედოქს-ექვივალენტების ხარჯვა ყოველთვის არაა დაკავშირებული ქსენობიოტიკის პიდროქსილირებასთან. მისი გარკვეული ნაწილი სხვა ოქსიდაზურ რეაქციებს ხმარდება. ნიკოტინამიდიური კოფერმენტის ასეთ ჟანგვას თავისუფალი ეწოდება.

მთელ რიგ კვლევით ცენტრებში, და მათ შორის ჩვენს ლაბორატორიაშიც, ნაჩვენები იქნა, რომ რეაქციაში $\text{SH}_2 + \text{NADPH} + \text{H}^+ + \text{O}_2 \rightarrow \text{SHOH} + \text{NADP} + \text{H}_2\text{O}$, ექსპერიმენტულად მიღებული მონაცემები არასოდეს პასუხობენ სტექიომეტრიას: $\text{NADPH} : \text{SH}_2 : \text{O}_2 = 1 : 1 : 1$. აღმოჩნდა, რომ ელექტრონული დონორის მოლეკულათა ნაწილი იმ ჟანგბადის აღდგენას ხმარდება, რომლის სუბსტრატში ჩანერგვაც არ ხდება. ამ მოვლენას გათიშვას, ხოლო სუბსტრატებს, რომელთა თანამყოფობის დროსაც ეს მოვლენა შეინიშნება, გამთიშველებს უწოდებენ.

გათიშვის ეფექტს ჩვეულებრივ უკავშირებენ სხვადასხვა სუბსტრატული

სპეციფიკურობის მქონე ციტოქრომ P450-ის მრავლობითი ფორმების არსებობას, რადგან მრავალ ოქსიდაზურ რეაქციაში, რომლებიც თავისუფალი ჟანგვის სისტემებს მიეკუთვნებიან, O_2 -ის აღდგენა ამ ჰემოპროტეინით კატალიზდება. ამ დროს NADPH-ის რედოქს-ექვივალენტები სხვადასხვა ოქსიდაზურ რეაქციებზე ნაწილდება, სადაც ელექტრონულ დონორს O_2 წარმოადგენს. ამ უკანასკნელის ნაწილი აქტიურ ფორმებად (სუპეროქსიდად და პეროქსიდად) აღდგება, ნაწილი კი ენდოგენური სუბსტრატის ჟანგვას ხმარდება.

ეგზოგენური სუბსტრატის გარეშე მიკროსომებში NADPH-ის თავისუფალი ჟანგვა ოთხი სხვადასხვა გზით შეიძლება წარიმართოს:



პირველი სამი – ოქსიდაზური რეაქციაა, მეოთხე – მონოოქსიგენაზური მექანიზმით ენდოგენური სუბსტრატის (XH) ჟანგვაა. პირველ რეაქციაში 2 მოლი O_2 -ის წარმოქმნაზე 1 მოლი NADPH იხარჯება. H_2O_2 -ის წარმოქმნისას NADPH ექვიმოლურად იჟანგება, ხოლო მისი სიჭარბე, რომელიც O_2 -ისა და H_2O_2 -ის წარმოქმნაზე არ იხარჯება, წყლის წარმოქმნას ხმარდება. ეგზოგენური სუბსტრატების თანამყოფობისას ციტოქრომ P450-ს სამი ტიპის ოქსიდაზური რეაქციის კატალიზება შეუძლია. ამოცანა აქ იმაში მდგომარეობს, რომ გაირკვეს ამ რეაქციებიდან რომელი მიმდინარეობს ნამდვილად მიკროსომებში და როგორია თითოეული მათგანის წილი ჟანგბადის აქტივაციის საერთო რეაქციაში.

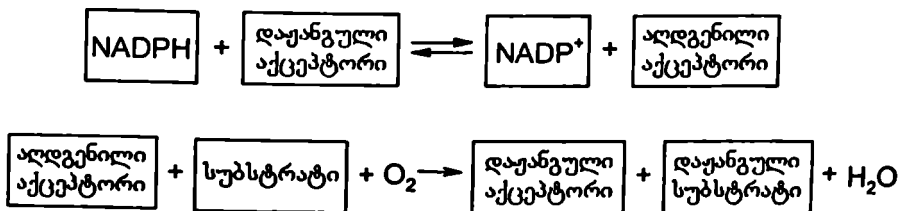
ჩვენს ლაბორატორიაში ინჰიბიტორული ანალიზით სარწმუნოდ იქნა ნაჩვენები, რომ მცენარის მიკროსომებში NADPH-ის თავისუფალი ჟანგვა რამდენიმე ოქსიდაზური რეაქციით ხორციელდება. მათი დათრგუნვა მხოლოდ ნახშირბადის მონოოქსიდის, ნატრიუმის აზიდის და *p*-ქლორმერკურიბენზოატის ერთობლივი მოქმედებით მიიღება. მამასადამე, მიკროსომებში NADPH სპეციფიკური (ციტოქრომ P450-დამოკიდებული) და არასპეციფიკური (Fe^{3+} -ისა და SH-ჯგუფების შემცველ ფერმენტებზე დამოკიდებული) გზებით იჟანგება. აზიდით არასპეციფიკური გზის ინჰი-

ბირება NADPH-ციტოქრომ P450-რედუქტაზის აქტივობის ზრდას იწვევს. ამასთან, ქსენობიოტიკის მონოოქსიგენირებასთან შეუღლებული NADPH-ის ჟანგვა ყოველთვის თავისუფალ ჟანგვაზე უფრო მაღალი სიჩქარით მიმდინარეობს. ეს შედეგები იმაზე მიუთითებენ, რომ NADPH-ის მომხმარებელ სპეციფიკურ და არასპეციფიკურ ოქსიდაზებს შორის მარტივი კონკურენცია არსებობს, რაც ელექტრონული აქცეპტორების განსხვავებული რედოქს-პოტენციალებით უნდა იყოს განპირობებული. ქსენობიოტიკის თანამყოფობისას NADPH-ის მოხმარების სიჩქარის ზრდა იმის მაჩვენებელია, რომ ციტოქრომ P450-ის სუბსტრატთან დაკავშირება სპეციფიკური ჟანგვის გზის გაძლიერებას იწვევს, სადაც ნიკოტინამიდური კოფერმენტის მთელი აღმდგენელი პოტენციალი ქსენობიოტიკის ჟანგვას ხმარდება.

მცენარის მიკროსომულ ფრაქციაში NADPH-ის მზარდი კონცენტრაციების შეტანისას ჯერ გაჯერების მომენტი, შემდეგ კი ჟანგვის სიჩქარის დაქვეითება დავაფიქსირეთ. განსაზღვრულ კონცენტრაციამდე NADPH-ის თავისუფალი ჟანგვა მიხაელის-მენტენის განტოლებას ემორჩილება ($K_M = 0.2 \text{ mM}$), ანუ კლასიკურ ფერმენტულ რეაქციას წარმოადგენს. NADPH-ის გამჯერებელი კონცენტრაციებისას თვით კოფერმენტით მიღებული ინჰიბირება მისი დაჟანგული ფორმით ან თავისუფალი ჟანგვის რომელიმე პროდუქტით უნდა იყოს გამოწვეული. ეს მოვლენა ციტოქრომ P450-ის ინაქტივაციის შედეგი არაა, რადგან შექმნილ სიტუაციაში ჰემოპროტეინი მონოოქსიგენაზურ აქტივობას ინარჩუნებს (ფრაქცია მაღალი სიჩქარით ჟანგავს დიმეთილანილინს). საფიქრებელია, რომ NADPH-ის სიჭარბისას მოქმედებაში მოდის გარკვეული რეგულატორული მექანიზმი, რომლის საშუალებითაც NADPH-ის აღმდგენელი ექვივალენტების უფრო რაციონალური რეალიზაცია ხდება. ასეთი მექანიზმის არსებობას სხვა მონაცემებიც ადასტურებენ: ანაერობულ პირობებში NADPH-ის თავისუფალი ჟანგვის შეწყვეტისას, ჟანგბადის დეფიციტის დადგომისთანავე, ნიკოტინამიდური კოფერმენტის დაჟანგული ფორმის აღდგენა შეინიშნება. NADPH-ის ამგვარი „უკუაღდგენა“ განსაკუთრებით მკაფიოდ სარეაქციო არეში NADP^+ -ის დამატებისას შეინიშნება. ასეთ სურათს ადგილი არ აქვს ციტოქრომ c-ს ან $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ -ის საშუალებით მიკროსომული რედოქს-ჯაჭვის შუნტირებისას და ნახშირბადის მონოოქსიდით ან მეთირაპონით ციტოქრომ P450-ის ბლოკირებისას. ეს შედეგები თავის მხრივ იმაზე მიუთითებენ, რომ რეგულირების აღნიშნული მექანიზმის ამოქმედებაში მონოოქსიგენაზური სისტემის ყველა კომპონენტი მონაწილეობს.

გამორიცხული არაა, რომ NADPH-ის რაციონალურ ხარჯვას

ელექტრონების უცნობი, ლიპიდის ან ქინონის ტიპის აქცეპტორი წარმოადგენდეს, რომლის ფუნქციაც NADPH-ის ელექტრონების დასაჟანგ სუბსტრატზე გადატანაში მდგომარეობს. ეს პიპოთეზა სქემატურად შეიძლება შემდეგნაირად წარმოვიდგინოთ (ნახ. 53).



ნახ. 53. NADPH-ის აღმდგენელი ექვივალენტების ზარჯვის რეგულაციის სავარაუდო მექანიზმი.

სქემაზე შექცევადი რეაქციის წონასწორობის ერთ რომელიმე მხარეს გადახრას აქცეპტორის, სუბსტრატის ან ჟანგბადის კონცენტრაციული ცვლილებები უნდა განაპირობებდეს. მაგ., ჟანგბადის დეფიციტისას კოფერმენტსა და აქცეპტორს შორის რეაქცია NADPH-ის აღდგენის მხარეს (მარჯვნიდან მარცხნივ) უნდა მიმდინარეობდეს. სუბსტრატის დაბალი კონცენტრაციისას აქცეპტორის აღდგენის შემდეგ წონასწორობა მყარდება, რაც სუბსტრატით ინჰიბირების მსგავს კინეტიკურ სურათს იძლევა.

ამგვარად, მცენარეულ მიკროსომებში უნდა მოქმედებდეს რეგულატორული მექანიზმი, რომელიც NADPH-ის თავისუფალი ჟანგვისას მისი აღმდგენელი ექვივალენტების განსაზღვრული ფონდის შენარჩუნებას უზრუნველყოფს. ამ შემთხვევაში ქსენობიოტიკის უჯრედში შეღწევა იმ რეგულატორულ სიგნალს წარმოადგენს, რომლის საშუალებითაც NADPH-ის აღდგენითი პოტენციალი მონოოქსიგენაზური სისტემის მიერ ქსენობიოტიკების შეუღლებულ ჟანგვაში მოიხმარება.

3.3 რეგულაცია სუბსტრატულ დონეზე

უაღრესად ფართო სუბსტრატული სპეციფიკურობის მქონე ციტოქრომ P450-ის კატალიზური აქტივობის „სამიზნეს“ ლიპოფილური (პიდროფობული) ბუნების მქონე ნაერთები წარმოადგენენ, რომლებიც შესაძლოა

იყვნენ როგორც შიდაუჯრედული წარმოშობის, ასევე ქსენობიოტიკები. აქედან გამომდინარე, ციტოქრომ P450-ის საერთო ფონდი შეიძლება გაიყოს „ენდოგენურ“ (ფიზიოლოგიურ) და „ეგზოგენურ“ (დეტოქსიკაციურ) რეაქციებში მონაწილეობის მიხედვით. ადრე არსებობდა შეხედულება, რომლის მიხედვითაც უჯრედში ფუნქციონირებს ციტოქრომ P450-ის სხვადასხვა – სპეციფიკური (მაგ., ფენოლური ნაერთების ბიოსინთეზში მონაწილე) და არასპეციფიკური (ქსენობიოტიკების დეტოქსიკაციაში მონაწილე) ფორმები. აქვე უნდა შევნიშნოთ, რომ ამ მოსაზრების ავტორთა მცდელობას, გამოეყენებინათ და ამგვარად ერთმანეთისაგან გაემიჯნათ ციტოქრომ P450-ის ფორმები, რომლებიც ცალკეული პროცესების მიმართ სპეციფიკურობას გამოამჟღავნებდნენ, სასურველი შედეგი არ მოჰყოლია.

ჩვენი თვალსაზრისით, პრინციპულად წარმოდგენილია, რომ უჯრედში წინასწარ, ცალ-ცალკე არსებობდეს სპეციალურად ქსენობიოტიკის ჟანგვისათვის და „ენდოგენური“ ცვლისათვის განკუთვნილი ჰემოპროტეინის ფორმები. ეს, უპირველეს ყოვლისა, ეწინააღმდეგება ცოცხალი უჯრედისათვის დამახასიათებელ ფუნდამენტურ, ეკონომიურობის პრინციპს. ამასთან დაკავშირებით, საჭიროდ ჩავთვალეთ დაგვედგინა, ფიზიოლოგიურ და დეტოქსიკაციურ პროცესებში ციტოქრომ P450-ის განსხვავებული ფორმები მონაწილეობენ, თუ არსებობს ჰემოპროტეინის საერთო ფონდი, რომელსაც ორივე რეჟიმში ფუნქციონირების უნარი გააჩნია.

საკითხის გადასაწყვეტად, „ენდოგენური“ ცვლის მოდელად შერჩეულ იქნა ფენოლური ნაერთების ბიოსინთეზი. ამ პროცესში საკვანძო და სიჩქარემაღლიმიტირებელი სტადიაა დარიჩინმჟავას *p*-კუმარმჟავად გარდაქმნა, რომელიც ციტოქრომ P450-შემცველი მონოოქსიგენაზით – დარიჩინმჟავა-4-ჰიდროქსილაზით კატალიზდება (იხ. § 2.5.4, ნახ. 24). „ეგზოგენური“ ცვლა ექსპერიმენტებში წარმოდგენილი იყო მოდელური ქსენობიოტიკის – დემეთილანილინის N-დემეთილირების რეაქციით. მიკროსომულ სუსპენზიაში ამ ორი რეაქციის ერთდროული მსვლელობისას შეისწავლებოდა სარეაქციო არეში მომხდარი თვისობრივი და რაოდენობრივი ცვლილებები. ხაზგასმით უნდა აღვნიშნოთ, რომ იზოლირებული მიკროსომების სუსპენზიაში თავისთავად გამოირიცხულია რაიმე ახალი, ქსენობიოტიკის მიმართ სპეციფიკური ციტოქრომ P450-ის იზოფორმის ინდუქცია, ამიტომ მასში ჰემოპროტეინი ლიმიტირებული რაოდენობითაა წარმოდგენილი. ამ ექსპერიმენტების შედეგი უშუალოდ გვიჩვენებდა უჯრედის მყისიერ საპასუხო რეაქციას ქსენობიოტიკის შეღწევაზე: შესაძლებელია თუ არა უჯრედში არსებული ციტოქრომ P450-ის საერთო ფონდის გადანაწილება „ენ-

დოგენურ” და „ეგზოგენურ” პროცესებზე.

აღმოჩნდა, რომ NADPH-ის, დარიჩინმჟავას (ან ფენილალანინის) და დიმეთილანილინის ერთდროული ინკუბირებისას ენდოგენური სუბსტრატის გარდაქმნის რეაქცია 75–80%-ით, ხოლო ქსენობიოტიკის N-დემეთილირება 15–25%-ით ინჰიბირდება. ეს შედეგები იმის მაჩვენებელია, რომ ფენოლური ნაერთების ბიოსინთეზში მონაწილე ციტოქრომ P450 ქსენობიოტიკის ჟანგვაზე გადაირთ. ანალოგიური შედეგები იქნა მიღებული ფენილალანინისა და დარიჩინმჟავას რადიოაქტიური პრეპარატების გამოყენებით. დიმეთილანილინი ერთნაირი ინტენსივობით თრგუნავს როგორც ბიოსინთეზის საწყისი სუბსტრატების გარდაქმნას, ისე ფენოლურ ნაერთთა ჯამურ ფრაქციაში $[4\text{-}^3\text{H}]$ ფენილალანინისა და $[4\text{-}^{14}\text{C}]$ დარიჩინმჟავას რადიოაქტიური ნიშნის ჩართვას.

დარიჩინმჟავას და დიმეთილანილინის NADPH-დამოკიდებული ჟანგვის შესწავლისას მიღებული K_M -ის სიდიდეების შედარება გვიჩვენებს, რომ ციტოქრომ P450-ს ქსენობიოტიკის მიმართ გაცილებით მაღალი (3.5-ჯერ მეტი) თვისობა გააჩნია. გარდა ამისა, ლანუივერ-ბერკის კოორდინატებში გამოსახული გრაფიკებიდან ჩანს, რომ დიმეთილანილინი დარიჩინმჟავა-4-ჰიდროქსილაზას კონკურენტულად აინჰიბირებს.

დიმეთილანილინის გარდა, ციტოქრომ P450-ის ბიოსინთეზურ (დარიჩინმჟავა-4-ჰიდროქსილაზურ) აქტივობაზე გავლენას სხვა ქსენობიოტიკებიც ახდენენ (ნახ. 54). საყურადღებოა, რომ ქსენობიოტიკების მაინჰიბირებელი ეფექტი კორელაციაშია ფერმენტის სუბსტრატისადმი თვისობის და ამ უკანასკნელთა ჰიდროფობულობის ხარისხის სიდიდეებთან.

ამგვარად, სარწმუნოდ უნდა ჩათვალოს ჩვენი ვარაუდი იმის შესახებ, რომ ქსენობიოტიკის ჟანგვა ორგანულადაა დაკავშირებული ციტოქრომ P450-დამოკიდებული შიდაუჯრედული პროცესების მსვლელობასთან. ამ დამოკიდებულების არსი იმაში მდგომარეობს, რომ შიდაუჯრედული ნაერთის გარდაქმნაში მონაწილე ციტოქრომ P450-ს უცხო ნაერთის ტრანსფორმაციაც შეუძლია. ქსენობიოტიკის უჯრედში მოხვედრა იმ რეგულატორულ სიგნალს უნდა წარმოადგენდეს, რომელიც მონოოქსიგენაზის „ენდოგენურიდან” „ეგზოგენურ” ცვლაზე გადართვას იწვევს. მაგრამ რა ბუნებისაა ეს სიგნალი? როგორ ზდება ქსენობიოტიკის „შეცნობა”? ცხადია, ამ კითხვებზე პასუხები თვით ქსენობიოტიკების კონკრეტულ ფიზიკურ-ქიმიურ თვისებებში უნდა მოვიძიოთ.

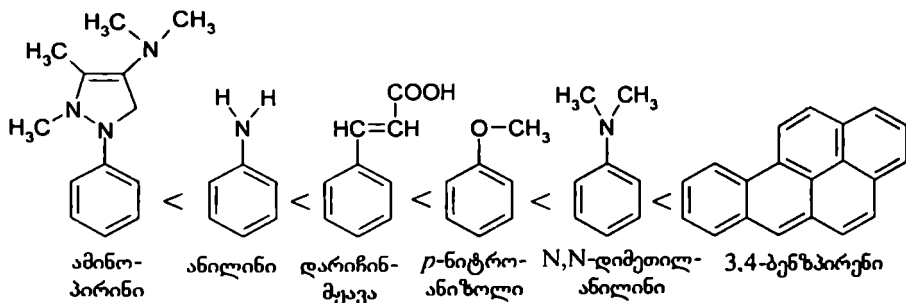
ამ მიზნით შევისწავლეთ ციტოქრომ P450-ის განსხვავებული ქიმიური ბუნების სუბსტრატების NADPH-დამოკიდებული ფერმენტული ჟანგვის

© 2004 Blackwell Publishing Ltd *Journal of Internal Medicine* 255: 103–110

236

კონდენსირებულბირთვიანი (3,4-ბენზპირენი) არომატული ნაერთები. მიღებული შედეგებიდან ყურადღებას იმსახურებს ის, რომ თითოეული სუბსტრატი ჟანგვის მაქსიმალურ სიჩქარეს მხოლოდ მისთვის დამახასიათებელ კონცენტრაციაზე აღწევს. ამაში შელანდება სუბსტრატების ინდივიდუალობა. $V_{\max}$ -ის მნიშვნელობების მიხედვით კი სუბსტრატებს შორის დიდი სხვაობა არაა. ჟანგვითი პროცესების გრაფიკების ლაინუივერ-ბერკის კოორდინატებში გამოსახვისას კონკურენტული ინჰიბირების კლასიკური სურათი მიიღება. ეს კი იმას ნიშნავს, რომ ქიმიურ თვისებებსა და ჟანგვითი რეაქციის ტიპის განსხვავების მიუხედავად, სუბსტრატებს შორის ფერმენტის აქტიური ცენტრისათვის მარტივი კონკურენცია არსებობს. ეს კონკურენცია, თავის მხრივ, სუბსტრატების ფიზიკურ თვისებებზე, კერძოდ, მათ ჰიდროფობულობის ხარისხზე აღმოჩნდა დამოკიდებული.

ჰიდროფობულობის ხარისხისა და ფერმენტისადმი თვისობის ზრდის მიხედვით ჩვენს მიერ გამოკვლეული ციტოქრომ P450-დამოკიდებული ჟანგვის სუბსტრატები შემდეგი თანმიმდევრობით განლაგდებიან:



საყურადღებოა, რომ ამ ორ სიდიდეს შორის მხოლოდ მარტივი კორელაცია კი არ ვლინდება, არამედ ფერმენტის სუბსტრატისადმი თვისობის სიდიდე წრფივ დამოკიდებულებაშია სუბსტრატის ჰიდროფობულობის ხარისხიდან კუბური ფესვის მნიშვნელობასთან. ეს კი იმაზე მიუთითებს, რომ მოლეკულის პოლარობა წარმოადგენს ერთ-ერთ (და არა ერთადერთ) ძირითად პარამეტრს იმ თვისებებიდან, რომლებიც ციტოქრომ P450-შემცველი მონოოქსიგენაზის მიერ ნივთიერების ჟანგვას განაპირობებენ. სხვა მალმიტირებელ ფაქტორებს უნდა მიეკუთვნებოდნენ: სუბსტრატში იმ ქიმიური ბმის ენერგია, რომელიც ჰიდროქსილირების რეაქციის დროს იხლიჩება; ლიპიდებთან და ფერმენტის აქტიურ ცენტრთან განლაგებულ ამინომჟავურ ნაშთებთან სუბსტრატის მოლეკულის ურთიერთქმედება და ა.შ.

ანგარიშგასაწევია ის ფაქტიც, რომ ზემოთმოყვანილ კანონზომიერებას ერთნაირად ემორჩილებიან როგორც ქსენობიოტიკები, ასევე მცენარეული ციტოქრომ P450-ის ბუნებრივი ენდოგენური სუბსტრატი დარიჩინმჟავაც. როგორც ჩანს, ციტოქრომ P450-ის მიერ ნაერთის „სუბსტრატად შეცნობა“ ხდება მისი ფიზიკურ-ქიმიური თვისებების, და არა ნივთიერების ენდოგენური ან ეგზოგენური წარმოშობის მიხედვით.

ციტოქრომ P450-ის სუბსტრატული სპეციფიურობის ფენომენი მნიშვნელოვნად განისაზღვრება თვით ფერმენტის აქტიური ცენტრის თავისებური აღნაგობით. სადღეისოდ დადგენილია, რომ ციტოქრომ P450-ის ჰემიკრატერის მაგვარი სტრუქტურის მქონე აპოფერმენტის სიღრმეში მდებარეობს და აქტიური ცენტრის Fe^{2+} -დან წყლის ფაზამდე მანძილი 1.4 ნმ-ს აღწევს. ჰემი წყლის ფაზისაგან დაშორებულია ჰიდროფობული ჯიბით, რომელიც დავიწროებასთან ერთად ჰიდროფობულობის მზარდ გრადიენტს ქმნის. ასეთი გრადიენტი შეიძლება წარმოქმნას ფოსფოლიპიდებმა, ან აპოციტოქრომის შემადგენლობაში მყოფმა ჰიდროფობული ამინომჟავების ნაშთებმა. გრადიენტის დანიშნულებაა სუბსტრატის გადატანა წყლიდან ფერმენტის აქტიური ცენტრის მიმართულებით. ლიპოფილური სუბსტრატი, ციტოქრომ P450-თან მიახლოებისთანავე, მაგნიტივით მიიზიდება ამ გრადიენტის მიერ, ადვილად მოსწყდება წყლის ფაზას და ჰემოპროტეინის აქტიური ცენტრისაკენ გადაიტანება. ამასთან, რაც მეტად ჰიდროფობულია სუბსტრატი, მით უფრო სწრაფად მიაღწევს იგი აქტიურ ცენტრს და შესაბამისად, მაღალი იქნება მისი თვისობა ფერმენტის მიმართ. მონოოქსიგენაზური ციკლის განხორციელების შემდეგ ჟანგვის პროდუქტი, საწყის სუბსტრატთან შედარებით, უკვე პოლარულ მოლეკულას წარმოადგენს, ამიტომ მისი მოლეკულა იგივე გრადიენტის არსებობის გამო გამოიდევნება ციტოქრომ P450-ის აქტიური ცენტრიდან. ხატოვანი შედარება რომ ვინმე, პოლარული პროდუქტი თითებშუა მოქცეული ალუბლის კურკის მსგავსად დასხლტება აქტიური ცენტრიდან და წყლოვან ფაზაში გადაინაცვლებს.

3.4 რეგულაცია ინდუქციის დონეზე

ციტოქრომ P450-ის რაოდენობის რეგულაცია შესაძლებელია მისი ინდუქციით. მცენარეულ უჯრედში ამ ჰემოპროტეინის მაინდუცირებელი ფაქტორებია თვით მონოოქსიგენაზის ჟანგვის სუბსტრატები, პათოგენები,

დაზიანება, განათება, მეტალთა იონები და სხვ.

ქსენობიოტიკები მცენარეული ციტოქრომ P450-ის ძლიერ ინდუქტორებს წარმოადგენენ. ნაჩვენებია თიანოლის, ფენობარბიტალის, სხვადასხვა პერბიციდების მოქმედებით გამოწვეული ციტოქრომ P450-ის შემცველობის ზრდა. უნდა აღინიშნოს, რომ ფენობარბიტალი, როგორც ინდუქტორი, განსხვავებულად მოქმედებს ციტოქრომ P450-ის სუბსტრატულ საეციფიკურობაზე. მაგ., დარიჩინმჟავა-4-ჰიდროქსილაზური აქტივობა 1.5-ჯერ იზრდება, ხოლო ლაურიმჟავას შიდაჯაჭვური ჰიდროქსილირების ინტენსივობა 26-ჯერ მატულობს. საინტერესოა აგრეთვე, რომ ბუძემწოვრების ლაურიმჟავა-ω-ჰიდროქსილაზის საეციფიკური ინდუქტორი — ქლოფიბრატი მცენარეებში იგივე მჟავას შიდაჯაჭვურ ჰიდროქსილაზას აინდუცირებს. ქსენობიოტიკით ინდუქცია ინდუქტორის ქიმიური ბუნებისა და კონცენტრაციის გარდა, დამოკიდებულია პრეინკუბაციის პერიოდზე, მცენარის სახეობაზე, მის ორგანოზე, ასაკზე, განათებაზე და სხვა ფაქტორებზე.

მცენარეული ციტოქრომ P450-ის ინდუქტორებია მისი ენდოგენური სუბსტრატებიც, რასაც მოწმობს მაშა-ლობიოს აღმონაცენებში ინდუქციის პირობების გამოკვლევა. ნაჩვენებია, რომ დარიჩინმჟავა 1.8-ჯერ, ხოლო გერანიოლი 2.7-ჯერ იწვევს ციტოქრომ P450-ის მატებას. ინდუქციის ეფექტი ძლიერ ბლოკირდება ციკლოპექსიმიდის ან ლევულინატის თანაობისა ცილის და ჰემის სინთეზის დათრგუნვის გამო.

ჩვენს ლაბორატორიაში მიღებული ექსპერიმენტული შედეგების მიხედვით, ციტოქრომ P450-ის ინდუქტორებს წარმოადგენენ როგორც ენდოგენური (დარიჩინმჟავა), ისე ეგზოგენური (დიმეთილანილინი, 3,4-ბენზპირენი) სუბსტრატები. ქსენობიოტიკების ინდუქციური ეფექტი გაცილებით აღემატება დარიჩინმჟავათი მიღებულ შედეგს. ეს ენდოგენური სუბსტრატი 72-სთიანი პრეინკუბაციის შემდეგ ციტოქრომების P450-ის და P420-ის მატებას მხოლოდ 1.3—1.4-ჯერ იწვევს. დროის იგივე მონაკვეთში დიმეთილანილინის მოქმედებით ციტოქრომ P450-ის შემცველობა საკონტროლო ვარიანტთან შედარებით 3—4-ჯერ იზრდება.

განსხვავებულ ეფექტს ამჟღავნებს 3,4-ბენზპირენი. მისი მოქმედებით ციტოქრომ P450-ის ზრდა თითქმის არ შეინიშნება, მაშინ როდესაც ციტოქრომ P420-ის მკვეთრ მატებას აქვს ადგილი. მიუხედავად ამისა, ინდუქტორზე გაზრდილ მცენარეებში ციტოქრომების P450-ის და P420-ის ჯამური შემცველობა ერთნაირად იზრდება. საფიქრებელია, რომ თავდაპირველად ადგილი აქვს ქსენობიოტიკის მოქმედებით ციტოქრომ P450-ის ინდუქციას, ხოლო შემდეგ ინდუცირებული ჰემოპროტეინის P420-ად კონ-

ვერსია ზდება. აღნიშნული მოსაზრების სასარგებლოდ მეტყველებს დიმე-თილანილინისა და 3,4-ბენზპირენის ინდუქციური ეფექტებისა და მათი ჟანგვის შედეგად წარმოქმნილი მეტაბოლიტების რეაქციისუნარიანობის შედარება. აღმოჩნდა, რომ 3,4-ბენზპირენის NADPH-დამოკიდებული მიკ-როსომული ჟანგვის შედეგად ფორმირდება შესაბამისი დიოლები და ქი-ნონები. თავის მხრივ, ცნობილია, რომ ქინონებს ნაირგვარი ჟანგბადოვანი რადიკალების გენერირების უნარი აქვთ. დიმეთილანილინის ჟანგვის არც ერთი შესაძლო პროდუქტი (მონომეთილანილინი, ანილინი, *p*-ჰიდროქსი-დიმეთილანილინი და სხვ.) არ იძლევა ასეთ „აგრესიულ“ პროდუქტებს. იგივეს ადასტურებს 3,4-ბენზპირენისა და დიმეთილანილინის ჰიდროქსი-ლირების პარალელურად მიმდინარე ლიპიდთა ზეჟანგური ჟანგვის ინ-ტენსივობა, რომელიც 3,4-ბენზპირენის ჟანგვისას 3-ჯერ უფრო მეტად სტიმულირდება, ვიდრე დიმეთილანილინის შემთხვევაში.

ამრიგად, 3,4-ბენზპირენის ჟანგვის დროს წარმოქმნილი რეაქციისუნა-რიანი ინტერმედიატები ინდუცირებული ციტოქრომ P450-ის P420-ად გარდაქმნას იწვევენ და ციტოქრომ P450-ის მიმართ 3,4-ბენზპირენის ინდუქციური აქტივობა მკაფიოდ იმიტომ არ ვლინდება, რომ ეფექტი ფერმენტის ინაქტივაციითაა ეკრანირებული.

სხვაგვარად რომ ითქვას, ქსენობიოტიკების ინდუქციური ეფექტი მნიშე-ნელოვნადაა დამოკიდებული მათი ჟანგვის პროდუქტების ქიმიურ ბუნება-ზე. რაც უფრო ნაკლებია რადიკალწარმოქმნის უნარი, მით მეტად გამოიწ-ვევენ ისინი ციტოქრომ P450-ის შემცველობის ზრდას.

ქსენობიოტიკიან არეზე მცენარის გამოზრდა, ციტოქრომ P450-ის რაოდენობრივ მატებასთან ერთად, მონოოქსიგენაზური აქტივობის საერთო ზრდასაც იწვევს. ინდუქციის შემდეგ NADPH-დამოკიდებული ჟანგვითი აქტივობის შესწავლა გეიჩვენებს, რომ ფერმენტული სისტემა უფრო მა-ღალი ინტენსივობით ჟანგავს არამხოლოდ ინდუქტორ-ქსენობიოტიკს, არამედ განსხვავებული ქიმიური ბუნების ტოქსიკანტსაც. ამ მონაცემების მიხედ-ვით, მცენარეულ ციტოქრომ P450-ს, ცხოველურთან შედარებით, უფრო დაბალი სუბსტრატული სპეციფიკურობა ახასიათებს, რაც ქსენობიოტიკთა ჟანგვაში მცენარეული მონოოქსიგენაზური სისტემის უნივერსალობაზე მეტყველებს. ამდენად, ჰემოპროტეინის მრავლობით ფორმათა რიცხვი მცენარეში მნიშვნელოვნად უნდა იყოს შეზღუდული.

ინდუქტორის როლის შესრულება შეუძლია ზოგიერთი ლითონის იონსაც, მაგ., ნაჩვენებია ციტოქრომ P450-ის ინდუქცია Mn^{2+} , Fe^{3+} , Cd^{2+} და Hg^{2+} -ის საშუალებით.

პათოგენური სოკოები ან ელიციტორები (პათოგენური ან არაპათოგენური სოკოებიდან მიღებული სხვადასხვა ფრაქციები) დასნებოვნებულ მცენარეში ციტოქრომ P450-ის მატებას იწვევენ. ციტოქრომ P450-შემცველი მონოოქსიგენაზები აკატალიზებენ ფლავონოიდური და ტერპენოიდული ფიტოალექსინების ბიოსინთეზს. ამდენად, ციტოქრომ P450-ის ინდუქცია მოცემულ შემთხვევაში პათოგენების ტოქსინების მოქმედებაზე მცენარის საპასუხო რეაქციას წარმოადგენს. პათოგენებით ან ელიციტორებით ინდუქცია სპეციფიკურია. მაგ., *Phytophthora megaspermas*-ის ელიციტორი განსხვავებულად მოქმედებს ოხრახუშის უჯრედულ კულტურაში ფენილპროპანოიდური გზის ციტოქრომ P450-დამოკიდებულ აქტივობებზე. მიღებულია, რომ ინდუცირებადია ამ ბიოსინთეზის მთავარი ფერმენტი – ღარიჩინმჟავა 4-ჰიდროქსილაზა, აგრეთვე შიკიმატ-3'-ჰიდროქსილაზა, ხოლო ფლავონოიდ-3'-ჰიდროქსილაზა არ ინდუცირდება.

მცენარეული ქსოვილების ანათლების ინკუბაცია ტენიან ატმოსფეროში ან კარგად აერირებულ ხსნარებში, მრავალრიცხოვანი პროცესების, კერძოდ, ჟანგვითი ფერმენტების და მათ შორის ციტოქრომ P450-ის ბიოსინთეზსაც ააქტიურებს.

ციტოქრომ P450-ის სინათლით ინდუქცია პირველად ნაჩვენები იქნა ბარდის ეთიოლირებული ნაზარდების მოკლეტალღიანი თეთრი სინათლით დასხივების შედეგად, ღარიჩინმჟავა-4-ჰიდროქსილაზის აქტივობა ამ დროს 5-ჯერ მატულობდა. შემდგომში იგივე ეფექტი აღმოაჩინდა წითელი და გრძელტალღიანი წითელი სინათლის სხივებსაც, მაგრამ ამასთანავე დადგინდა, რომ ღარიჩინმჟავა-4-ჰიდროქსილაზის რაოდენობის ზრდის ფონზე ციტოქრომ P450-ის ჯამური შემცველობა მხოლოდ უმნიშვნელო მატებას განიცდის. ანალოგიური ეფექტი შეინიშნება ცხიმოვან მჟავათა ჰიდროქსილაზების მიმართაც: მიკროსომული ჰიდროქსილაზების მთლიანი რაოდენობა განათებისას მცირდება კიდევაც, თუმცა ამ დროს ცალკეული იზოფორმის, მაგ., ω-ჰიდროქსილაზის აქტივობა გაზრდილია.

უნდა აღინიშნოს, რომ ჰემოპროტეინის სინათლით ინდუქციასთან დაკავშირებით ერთმანეთისაგან რადიკალურად განსხვავებული ექსპერიმენტული მონაცემები არსებობს. მაგ., სიბნელეში გაზრდილი ოხრახუშის უჯრედულ კულტურაში ციტოქრომ P450-ის რაოდენობა არარეგისტრირებადია, ხოლო 24 სთ-იანი დასხივების შემდეგ მაქსიმუმს აღწევს. ამის საპირისპიროდ ნაჩვენებია, რომ მაშ-ლობიოს სამღლიანი ნაზარდების სინათლეზე გადატანისას ციტოქრომ P450-ის რაოდენობა სწრაფად კლებულობს, რაც სინათლეზე ჰემის დესტრუქციითაა გამოწვეული. ნათესების

სიბნელეში დაბრუნება კიდევ ერთხელ იწვევს ციტოქრომ P450-ის დაგროვებას. ასეთი ურთიერთგამომრიცხავი მონაცემების არსებობა იმით აიხსნება, რომ ციტოქრომ P450-ის ყველა იზოფორმა არაა სინათლით ინდუცირებადი. ჩვენი მონაცემების მიხედვით, სინათლეზე გაზრდილი მცენარის მიკროსომების შთანთქმის სპექტრში, 434–438 ნმ-ის უბანში, ინტენსიური შთანთქმის მაქსიმუმი ჩნდება. ეს პიკი იწვევს 420 და 450 ნმ-ებზე მაქსიმუმების გადაფარვას, რაც ციტოქრომების რაოდენობრივ განსაზღვრას აძნელებს. სავარაუდოა, რომ ასეთი ექსტინქცია სწორედ იმ ნაწილაკებს ახასიათებთ, რომლებიც სინათლეზე ციტოქრომ P450-ის ჰემის დაშლის შედეგად წარმოიქმნიან. ეთიოლირებულ მცენარეებში, რომელთა ფესვები ბუნებრივთან უფრო მიახლოებულ პირობებში ვითარდებიან, ციტოქრომული კომპონენტების შემცველობა ყოველთვის მეტია, ვიდრე სინათლეზე გაზრდილ იმავე ასაკის მცენარეებში.

3.5 რეგულაცია ციტოქრომ P450-ის ქიმიური მოდიფიკაციის დონეზე

დაახლოებით 10–15 წლის წინ მკვლევართა გაცხოველებული ყურადღება ციტოქრომ P450-ის კიდევ ერთმა თავისებურებამ მიიქცია. აღმოჩნდა, რომ ჰემოპროტეინი არღევს ტრადიციულ შეხედულებას იმის შესახებ, რომ რეაქციის დასასრულს ფერმენტები ცელილებებს არ განიცდიან. როგორც ირკვევა, კატალიზური ციკლის განხორციელების შედეგად ციტოქრომ P450 და ზოგიერთი სხვა ფერმენტი (მაგ., სუპეროქსიდლისმუტაზა, გლუკოზოქსიდაზა, ქსანთინოქსიდაზა, ქლოროპეროქსიდაზა, გლუტათიონ-პეროქსიდაზა და სხვ.) ქიმიურ მოდიფიკაციას განიცდიან, რაც მათი ინაქტივაციით გამოიხატება. ეს მოვლენა „თვითინაქტივაციის“ სახელწოდებითაა ცნობილი და იმ ფერმენტებს ახასიათებთ, რომლებიც კატალიზური აქტივობის შედეგად სხვადასხვა თავისუფალ რადიკალებს – ჟანგბადის აქტიურ ფორმებს ან რეაქციისუნარიან ინტერმედიატებს გენერირებენ. ამ რადიკალების დაგროვება უჯრედისათვის განსაკუთრებით საშიშაა, რადგან ისინი მრავალი პათოლოგიური პროცესის განვითარებას იწვევენ. როდესაც თავისუფალი რადიკალების რაოდენობა საშიშ ზღვარს გადააჭარბებს და მათი მოცილება შეუძლებელი ხდება, უჯრედი აპოპტოზს, ანუ წინასწარ დაპროგრამებულ „თვითმკვლელობას“ მიმართავს. აპოპტოზი ბერძნულად ფოთოლცვენას ნიშნავს და ეს ტერმინი კარგად გამოხატავს პროცესის

არსს: ჩაირთვება მთელი რიგი პროცესები, რის შედეგადაც დაზიანებული უჯრედი კი არ ნეკროზდება, არამედ განილევა — მისი ორგანოები იშლება, მაკრომოლეკულები ჰიდროლიზდება და ისინი სხვა უჯრედებისათვის საკვებ და სამშენებლო მასალად გამოიყენება.

ფერმენტთა თვითინაქტივაციის მოვლენა შეიძლება განვიხილოთ, როგორც „აპოპტოზი ფერმენტულ დონეზე“, რამდენადაც ამ დროს თავისუფალი რადიკალების გენერატორი ფერმენტი თვითონ გამოდის მწყობრიდან და უჯრედისათვის არასასურველი ინტერმედიატების წარმოქმნა საფუძველშივე ისპობა.

კატალიზური ციკლის პროცესში ციტოქრომ P450-ის ინაქტივაცია შეიძლება მოხდეს აპოფერმენტის ან ჰემის დონეზე. ორივე შემთხვევაში ინაქტივაციის გამომწვევეი აგენტი ან სუბსტრატის ჟანგვის რეაქციისუნარიანი ინტერმედიატია, ან ჟანგბადის რომელიმე აქტიური ფორმა. მათი ზემოქმედებით ჰემი ან აპოფერმენტი ქიმიურ მოდიფიკაციას, მაგ., აცილირებას განიცდის, რის შედეგადაც ფერმენტი სპეციფიკურ აქტივობას კარგავს. სრულ ინაქტივაციას შემდგომში ჰემის დეგრადაცია და აპოფერმენტის დესტრუქცია მოსდევს.

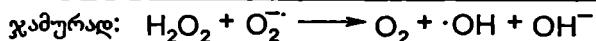
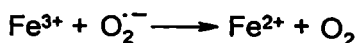
გარკვეული ქიმიური ბუნების სუბსტრატების ჟანგვისას ციტოქრომ P450-ის პეროქსი-კომპლექსის დაშლის შედეგად ისეთი რეაქციისუნარიანი ინტერმედიატები წარმოიქმნიებიან, როგორებიცაა: თავისუფალი ორგანული რადიკალები, ეპოქსიდები, N-ოქსიდები, S-ოქსიდები, ალდეჰიდები, კეტონები და სხვ. ისინი თავის მხრივ კოვალენტურად უკავშირებიან აპოციტოქრომ P450-ს და მის მოდიფიკაციას იწვევენ, რის შედეგადაც ფერმენტი შეუქცევადად, ან თითქმის შეუქცევადად ინაქტივირდება. ასეთი „გამანადგურებელი“ სუბსტრატებია ქლორამფენიკოლი (უკავშირდება აპოფერმენტის ლიზინის ნაშთს), პარათიონი, ქლოროფორმი (ცისტეინს) და სხვ.

ციტოქრომ P50-ის ინაქტივაციის მეორე გზა კატალიზურ ციკლში ფერმენტის აქტიურ ცენტრზე ჟანგბადის აქტიური ფორმების (სუპეროქსიდული ანიონ-რადიკალის — O_2^- -ის, ჰიდროქსილის რადიკალის — OH -ის, წყალბადის ზეჟანგის — H_2O_2 -ის და სხვ.) გენერაციის შედეგია. ეს შეიძლება არაშეუღლებელი მონოოქსიგენაზური რეაქციების შედეგად იყოს, როდესაც NADPH-ის აღმდგენელი ექვივალენტები სრულად არ ხმარდება ქსენობიოტიკთა ჰიდროქსილირებას. სუპეროქსიდული ანიონის ფორმირება ძირითადად ციტოქრომ P450-ის პრეროგატივაა, რადგან ამ პროცესში სხვა მიკროსომული ელექტრონთა გადამტანების წვლილი ძლიერ მცირეა. ამ რადიკალის შემდგომი ტრანსფორმაცია შეიძლება ორი გზით

წარმართოს: პირველი მოიცავს $O_2^{\cdot-}$ -ის დისმუტაციას H_2O_2 -ად, რომელიც შემდგომ კატალაზის მიერ იშლება მოლეკულურ ჟანგბადად და წყლად; მეორე გზით სუპეროქსიდული ანიონი და წყალბადის ზეჟანგი მონაწილეობენ მეტალშემცველი ფერმენტებით წარმართულ რეაქციებში, სადაც $\cdot OH$ -რადიკალები წარმოიქმნებიან.

ჟანგბადის აქტივაციის პროდუქტები თავისი რეაქციისუნარიანობით ერთმანეთისაგან განსხვავდებიან. H_2O_2 და $O_2^{\cdot-}$ თავისთავად ძლიერი დამჟანგველები არ არიან. $O_2^{\cdot-}$ -ს დაბალი რედოქს-პოტენციალი გააჩნია, ხოლო H_2O_2 უფრო სტაბილურია. საფიქრებელია, რომ მაკრომოლეკულებს ისინი პირდაპირ ვერ უტევნ ფექტურად. ამავე დროს ცნობილია $O_2^{\cdot-}$ -ის პირდაპირი მაინაქტივირებელი უნარი ისეთ ფერმენტებთან ურთიერთქმედებისას, როგორებიცაა კატალაზა, პეროქსიდაზა, ტრანსკეტოლაზა, ლაქტატდეჰიდროგენაზა და სხვა. აშკარაა აგრეთვე მაკრომოლეკულებზე $O_2^{\cdot-}$ -ის პირდაპირი დესტრუქციული მოქმედება.

საგარაუდოა, რომ ინაქტივაციის პროცესში ძირითადი დამჟანგველი $\cdot OH$ -რადიკალია, რომელიც H_2O_2 -დან ჰაბერ-ვეისისა და ფენტონის რეაქციების შედეგად წარმოიქმნება:



ჰიდროქსილ-რადიკალებმა, რომელთაც მეტად ხანმოკლე სიცოცხლისუნარიანობა ახასიათებთ, შეიძლება იმოქმედონ როგორც ძლიერმა დამჟანგველებმა უშუალოდ მათი გენერირების ადგილას; მაშინ როდესაც H_2O_2 და $O_2^{\cdot-}$ დიფუზიის გზით ფორმირების ადგილიდან დიდ მანძილზე გადაადგილდებიან. H_2O_2 -მა შეიძლება გაიაროს უჯრედულ და შიდაუჯრედულ მემბრანებში, ხოლო $O_2^{\cdot-}$ დიფუზიას მხოლოდ სპეციფიკური ანიონ-გამტარი არხების გავლით ახერხებს. სუპეროქსიდული ანიონი მეტად რეაქციისუნარიანი ზდება ჰიდროფობულ ან მეტალთან კოორდინირებულ უბნებში. სუპეროქსიდული ანიონის თანამყოფობისას ჰიდროქსილის რადიკალები ცილების ფრაგმენტაციას იწვევენ. $O_2^{\cdot-}$ -ს შეუძლია $\cdot OH$ -დამოკიდებული ჟანგვის პირველად პროდუქტებთან ურთიერთქმედება, რაც მაკრომოლეკულების დესტრუქციის შესაძლებლობას განაპირობებს.

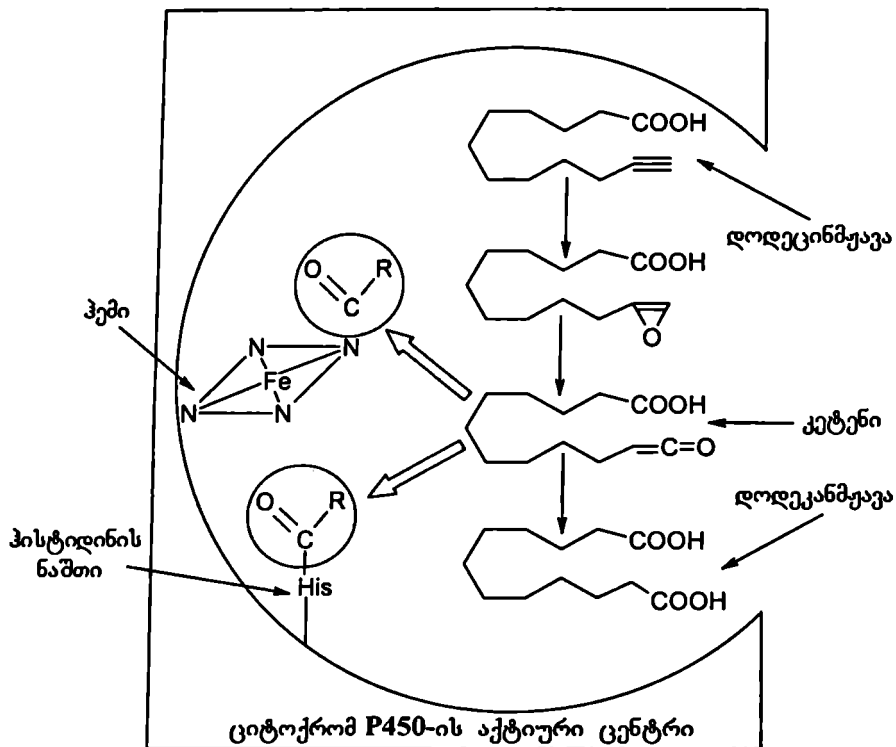
ციტოქრომ P450-ის ინაქტივაციას საგრძნობლად ამცირებენ ფოსფო-

ლიპიდები და მათი ეს ეფექტი დამოკიდებული არაა ლიპოსომებში ფოსფოლიპიდების შემადგენლობაზე. ინაქტივაცია სუსტდება ანაერობულ პირობებში და ასევე ნახშირბადის მონოოქსიდის ან ციტოქრომ b₅-ის თანამყოფობისას.

ციტოქრომ P450-ის ინაქტივაცია უფრო ხშირად ჰემის მოდიფიკაციის ან დეგრადაციის შედეგია, თუმცა შესაძლებელია, რომ ქიმიური მოდიფიკაცია უშუალოდ არ შეეხოს ჰემს, მაგრამ ფერმენტის აქტიური ცენტრის ახლოს მომხდარმა სტრუქტურულმა ცვლილებამ ჰემის კონფორმაციის შეცვლა გამოიწვიოს, რასაც საბოლოოდ ციტოქრომ P450-ის ინაქტივაცია მოსდევს.

ჰემის ალკილირებით განხორციელებული ინაქტივაციის ერთ-ერთი თვალსაჩინო მაგალითია ბოცერის ღვიძლის მიკროსომებში ღოდეცინმჟავას ციტოქრომ P450-დამოკიდებული ჟანგვა. ამ დროს წარმოქმნილი აქტიური ინტერმედიატი – კეტენი ჰემის აცილირებას იწვევს, რაც ციტოქრომ P450-ის ინაქტივაციის მიზეზი ხდება. უაღრესად საინტერესო შედეგი მიიღო ჰელვიგმა თანამშრომლებთან ერთად, როდესაც მან ანალოგიური ექსპერიმენტები ცერცვის ციტოქრომ P450-ზე ჩაატარა და დაადგინა, რომ ცხოველურისაგან განსხვავებით, ინაქტივაციის მთავარი მიზეზია ფერმენტის აქტიურ ცენტრში, ჰემთან ახლოს მყოფი ერთ-ერთი ამინომჟავას (სავარაუდოდ, ცისტეინის ან ჰისტიდინის) ნუკლეოფილური ნაშთის აცილირება (ნახ. 55).

ამრიგად, ცხოველური და მცენარეული ციტოქრომ P450-ის ღოდეცინმჟავითი თვითინაქტივაციის პროცესში ერთი არსებითი განსხვავება ვლინდება: ცხოველურ ჰემოპროტეინში ქიმიურ მოდიფიკაციას განიცდის ჰემი, ხოლო მცენარეულში – აპოფერმენტი. ცხოველური ციტოქრომ P450 ამ დროს სრულ დესტრუქციას განიცდის. ფერმენტი მთლიანად გამოდის მწყობრიდან, ანუ ერთდროულად კარგავს როგორც მონოოქსიგენაზურ, ასევე პეროქსიდაზულ აქტივობებს. სხვა ვითარებაა მცენარეული ციტოქრომ P450-ის შემთხვევაში: ჩვენს ლაბორატორიაში ჩატარებულმა კვლევებმა სარწმუნოდ გვიჩვენეს, რომ გარკვეულ პირობებში ჰემოპროტეინი ინაქტივაციას განიცდის როგორც მონოოქსიგენაზა, მაგრამ გააჩნია მაღალი პეროქსიდაზული აქტივობა. სხვაგვარად რომ ითქვას, ქიმიური მოდიფიკაციის გზით ხორციელდება მონოოქსიგენაზის სრული ტრანსფორმაცია პეროქსიდაზად. ჩვენს მიერ გამოვლენილ იქნა, რომ ასეთ გარდაქმნას ადგილი აქვს როგორც იზოლირებულ მიკროსომულ ფრაქციაში (*in vitro* პირობებში), ისე მთლიან მცენარეში (ე.ი. *in vivo* პირობებში). დეტალურად განვიხილოთ თითოეული მათგანი:



ნახ. 55. ციტოქრომ P450-ის ინაქტივაციის საყარადო სქემა პელევის და თანავეტორების მიხედვით. ვერტიკალური შტრიხით ნაჩვენებია მცენარეული ციტოქრომ P450-ის ქიმიური მოდიფიკაციის შედეგად ამინომეჟას ნაშთთან წარმოქმნილი აცილის ჯგუფი, ხოლო ჰორიზონტალური შტრიხით – ცხოველური ციტოქრომ P450-ის პეპთან წარმოქმნილი აცილის ჯგუფი.

ტრანსფორმაცია *in vitro* პირობებში. პრაქტიკულად ყველა ის ჟანგვითი პროცესი, რომელიც მიკროსომებში მიმდინარეობს, მეტ-ნაკლები ხარისხით იწვევს ციტოქრომ P450-ის P420-ად კონვერსიას, რასაც თან სდევს პეროქსიდაზული აქტივობის ზრდა. მაგ., მიკროსომული ფრაქციის აერაციისას 120 წთ-ის განმავლობაში ციტოქრომების P420/P450 თანაფარდობის 5-ჯერ ზრდას თან ახლავს პეროქსიდაზული აქტივობის 1.5-ჯერ

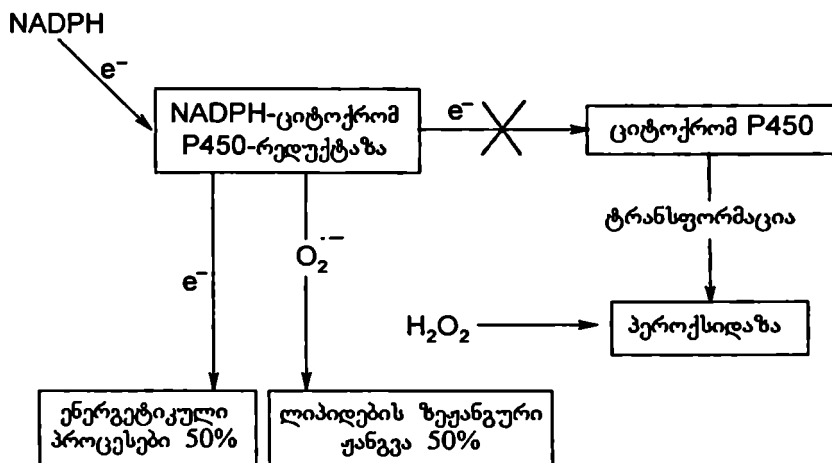
მატება. ეს სურათი გაცილებით მაჯიოდ შეინიშნება მიკროსომებში NADPH-ის თავისუფალი ჟანგვისას, როდესაც P420/P450 თანაფარდობის 10-ჯერ ზრდას პეროქსიდაზული აქტივობის – 1.8-ჯერ ზრდა შეესაბამება. ინტენსიური ლიპოპეროქსიდაციის შედეგად პეროქსიდაზული აქტივობა ორმაგდება. მაქსიმალური ტრანსფორმაცია მიიღება სუბსტრატების ჟანგვისას, განსაკუთრებით კი 3,4-ბენზპირენის შემთხვევაში, როდესაც P420/P450 თანაფარდობა 25-ჯერ იზრდება, ხოლო პეროქსიდაზული აქტივობა – სამმაგდება. ციტოქრომ P450-ის სხვა სუბსტრატები – დარიჩინმჟავა, ნიტრობენზოლი, დიმეთილანთილინი, ნობილეტინი და 5-OH-ნობილეტინი შედარებით დაბალი ხარისხით იწვევენ ტრანსფორმაციას. როგორც აღმოჩნდა, 3,4-ბენზპირენის მიკროსომული ჟანგვისას ადგილი აქვს სუპეროქსიდული რადიკალების გენერაციას, რაც ციტოქრომ P450-ის ქიმიური მოდიფიკაციის, და ამ გზით მისი პეროქსიდაზად ტრანსფორმაციის ძირითადი მიზეზი უნდა იყოს. ცნობილია, რომ ჟანგბადის აქტიური ფორმების ან თავისუფალი რადიკალების წარმოქმნა ხდება სხვა დანარჩენ პირობებშიც, მაგ., NADPH-ის თავისუფალი ჟანგვისას (იხ. § 3.2.2.2) და ლიპოპეროქსიდაციის დროს (იხ. § 1.2.4.1). რაც შეეხება მიკროსომული ფრაქციის აერაციას, ამ დროს ჟანგბადის მუდმივი მიწოდება აჩქარებს სარეაქციო არეში ენდოგენური NADPH-ისა და სუბსტრატების ჟანგვას, და რადგან ამ უკანასკნელთა რაოდენობა ლიმიტირებულია, შესაბამისად ეფექტიც დაბალია.

ტრანსფორმაცია *in vivo* პირობებში. ციტოქრომ P450-ის პეროქსიდაზად მოდიფიკაცია თვალსაჩინოა მცენარის ასაკში შესვლისას: 7-დღიანი ეთიოლირებული ნაზარდების მიკროსომებში ციტოქრომ P450-ის რაოდენობა და შესაბამისად მიკროსომული მონოოქსიგენაზის აქტივობა მაქსიმალურია. მომდევნო დღეების განმავლობაში ციტოქრომ P450 კონცენტრაციის განიცდის ციტოქრომ P420-ად. პარალელურად მონოოქსიგენაზური აქტივობა კლებულობს და პეროქსიდაზული აქტივობა მატულობს. რაოდენობრივად თუ გამოვსახავთ, 7-დღიანთან შედარებით 14-დღიანი ნაზარდების მიკროსომებში პეროქსიდაზული აქტივობა 5–6-ჯერ, ხოლო ციტოქრომების P420/P450 თანაფარდობა 30–32-ჯერ გაზრდილი. როდესაც მცენარის ასაკში შესვლას ინდუქტორის ზემოქმედება ემატება, ტრანსფორმაციის სურათი კიდევ უფრო მკვეთრად გამოიხატება. ამ მხრივ კვლავ „თავს იჩენს“ 3,4-ბენზპირენი, რომლის ინდუქციური ეფექტი დეტალურად ზევით იყო განხილული (იხ. § 3.4).

ქიმიური მოდიფიკაციის გზით ციტოქრომ P450-ის ტრანსფორმაციას

თან ახლავს მასზე დამოკიდებული ბიოსინთეზური პროცესების ინტენსივობის ცვლილებებიც. როგორც აღინიშნა (იხ. § 2.5.4), ლიგნინის ბიოსინთეზის ფენილპროპანოიდული გზა მოიცავს რამდენიმე ციტოქრომ P450-შემცველ მონოოქსიგენაზას. მათგან უმთავრესია დარიჩინმჟავა-4-ჰიდროქსილაზა, რომელიც ფენილალანინ-ამიაკ-ლიაზასთან ერთად ფენოლური ნაერთების ბიოსინთეზის საკვანძო ფერმენტს წარმოადგენს. ციტოქრომ P450-ის ტრანსფორმაციის პირობებში მიკროსომულ ფრაქციაში წყდება დარიჩინმჟავას ჰიდროქსილირებით მიმდინარე მეტაბოლური გზა, რასაც თან ახლავს წინამორბედი ფერმენტული რეაქციის ბლოკირება და ლიგნინიფიკაციის პროცესის ინტენსივობის დაქვეითება.

ცხადია, ციტოქრომ P450-ის ტრანსფორმაციის პირობებში მონოოქსიგენაზური სისტემის კომპონენტებს შორის ახალი ფუნქციური კავშირი უნდა მყარდებოდეს და ცალკეულმა კომპონენტებმა ახალი ფუნქციები უნდა შეიძინონ. ჩვენს მიერ დადგენილ იქნა, რომ ამ პირობებში NADPH-ციტოქრომ P450-რედუქტაზა აქტივობის მაღალ დონეს ინარჩუნებს, მაგრამ მოდიფიცირებული ციტოქრომ P450-ის პეროქსიდაზული აქტივობის გამოვლენაში რედუქტაზა და სუპეროქსიდული რადიკალები არ მონაწილეობენ (ნახ. 56).



ნახ. 56. NADPH-ციტოქრომ P450-რედუქტაზის შესაძლო ფუნქციები ციტოქრომ P450-ის ტრანსფორმაციის პირობებში. ელექტრონის ტრანსპორტის ის გზა, რომელიც ციტოქრომ P450-ის ტრანსფორმაციის შემდეგ აღარ ხორციელდება, გადახაზულია.

ბუნებრივად იბადება კითხვა: რა ფუნქციურ როლს კისრულობს შექმნილ ვითარებაში NADPH-ციტოქრომ P450-რედუქტაზა?

აღმოჩნდა, რომ რედუქტაზაზე გენერირებული O_2^- უპირატესად ლიპიდურ პეროქსიდაციაში მონაწილეობს. როგორც ჩანს, ლიპიდთა ზეფანგურ ჟანგვას ციტოქრომ P450 სუპეროქსიდული რადიკალების გენერატორად სჭირდება და ჰემოპროტეინის ტრანსფორმაციის შემთხვევაში ამ ფუნქციას მთლიანად რედუქტაზა ითავსებს. ჩვენ შევძელით გვეჩვენებინა, რომ ლიპიდურ პეროქსიდაციას ამ დროს NADPH-ციტოქრომ P450-რედუქტაზის აქტივობის მხოლოდ 50% ხმარდება და ეს სრულიად საკმარისია აღნიშნული პროცესის ნორმალური მსვლელობისათვის. საფიქრებელია, რომ რედუქტაზის დარჩენილი ფერმენტული სიმძლავრის საშუალებით მიკროსომული რედოქს-ჯაჭვი უჯრედის ენერგეტიკულ პროცესებში ერთვება. ასეთი კავშირის განხორციელება მიკროსომიდან მიტოქონდრიაზე ელექტრონთა ტრანსმემბრანული მიგრაციის გზითაა შესაძლებელი.

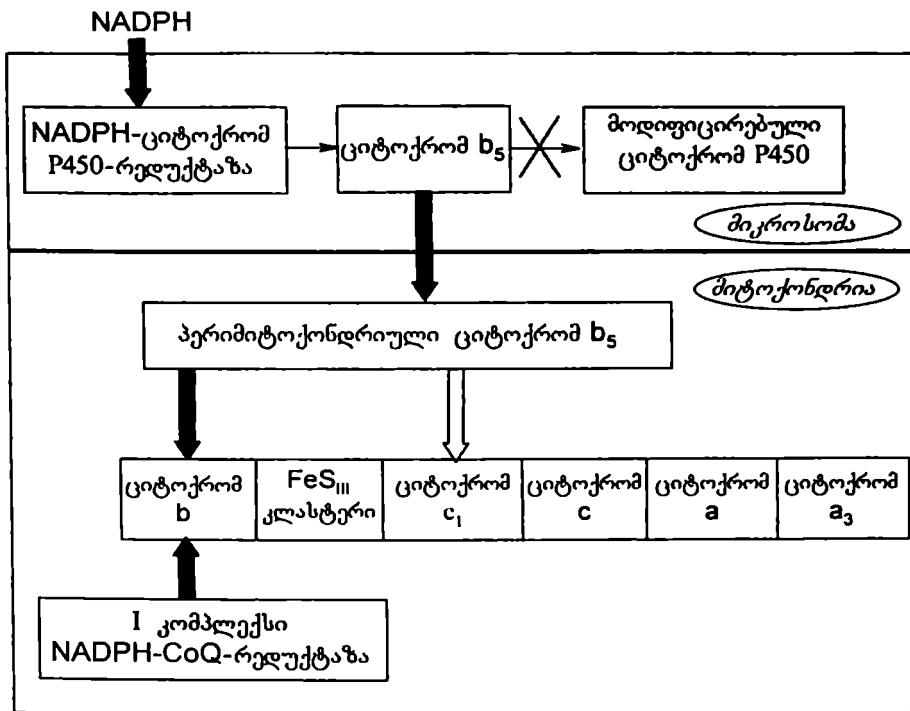
მცენარის უჯრედში მიკროსომებიდან მიტოქონდრიაზე ელექტრონების გადატანის შესაძლო გზების არსებობისა და მექანიზმის დასადგენად ფართო ექსპერიმენტული კვლევა ჩაებატარეთ. ცდების ერთ სერიაში ვახდენდით მიკროსომული ფრაქციის NADPH-თან ინკუბირებას, რათა რედოქს-ჯაჭვის კომპონენტები წინასწარ აღდგენილიყვნენ და ნიკოტინამიდიური 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 C_{12} და aa_3 -ციტოქრომების აღდგენა. მაშასადამე, უჯრედის ამ ორგანელათა ფრაქციების კომბინირებისას ხორციელდება აღმდგენელი ექვივალენტების მიგრაცია მიკროსომიდან მიტოქონდრიაზე და ამ პროცესში უშუალო მონაწილეობას ღებულობენ მიკროსომული NADPH-ციტოქრომ P450-რედუქტაზა და ციტოქრომ b_5 . ეს შედეგები თავის მხრივ იმაზეც მიუთითებენ, რომ ციტოქრომ P450 არ უნდა წარმოადგენდეს მიკროსომული რედოქს-ჯაჭვის მუდმივ ტერმინალურ კომპონენტს. რედუქტაზასთან და ციტოქრომ b_5 -თან დაკავშირება და მთლიან მონოოქსიგენაზურ სისტემაში ჩართვა მხოლოდ სუბსტრატთან მისი დაკავშირების შემდეგ უნდა ხდებოდეს, როდესაც ფერმენტ-სუბსტრატის კომპლექსის აღსადგენად ელექტრონზე მოთხოვნილება ჩნდება. სხვა შემთხვევაში, როდესაც ამის საჭიროება არაა (ციტოქრომ P450 სუბსტრატს არ ჟანგავს, ან ქიმიური მოდიფიკაციის შედეგად პეროქსიდაზადაა ტრანსფორმირებული), მიკროსომის

NADPH-დამოკიდებული ჯაჭვისათვის ელექტრონის აქცეპტორის ფუნქცია შეიძლება ციტოქრომობიდაზურმა სისტემამ შეასრულოს. ელექტრონთა გადატანის სავარაუდო გზას უნდა წარმოადგენდეს მიკროსომული ციტოქრომ $b_5 \rightarrow$ მიტოქონდრიული ციტოქრომ b , რადგან b_5 -ის რედოქს-პოტენციალი (+24 mV) ყველაზე ახლოს დგას ციტოქრომ b -ს რედოქს-პოტენციალთან, და ამ გადატანას თან არ ახლავს ელექტრონის მიერ ენერგიის მნიშვნელოვანი რაოდენობით კარგვა.

ცნობილია, რომ 10^{-6} M კონცენტრაციის Zn^{2+} სუნთქვითი ჯაჭვის III კომპლექსში b და c_1 ციტოქრომებს შორის არსებული FeS_{III} -კლასტერის ბლოკირებას იწვევს (იხ. § 1.2.5.2), ამიტომ მცენარიდან მიღებულ მიკროსომებისა და მიტოქონდრიების შერეულ სისტემაზე დაყენებულ ჩვენს ცდებში მოველოდით, რომ ციტოქრომ b -ზე ელექტრონების მიგრაციისას Zn^{2+} დააქვეითებდა c_1c და aa_3 -ციტოქრომების აღდგენის სიჩქარეს. სინამდვილეში მივიღეთ საპირისპირო შედეგი: Zn^{2+} -ის მოქმედების შედეგად ადგილი ჰქონდა მიტოქონდრიულ ციტოქრომებზე ელექტრონთა გადატანის სიჩქარის შესამჩნევ ზრდას. ამასთან დაკავშირებით გამოვთქვით ვარაუდი, რომ FeS_{III} -კლასტერის ბლოკირებისას შეიძლება ელექტრონის სატრანსპორტო გზის შენტირება მოხდეს და ელექტრონები მიტოქონდრიული ციტოქრომ b -ს გვერდის ავლით მიკროსომულ ციტოქრომ b_5 -დან უშუალოდ c_1c და aa_3 ციტოქრომებზე მოხვდნენ (ნახ. 57). თუმცა, მიტოქონდრიული კონტროლის ანალოგიურად, აქაც შუალედ გადამტანად პერიმიტოქონდრიული ციტოქრომ b_5 უნდა ფუნქციონირებდეს.

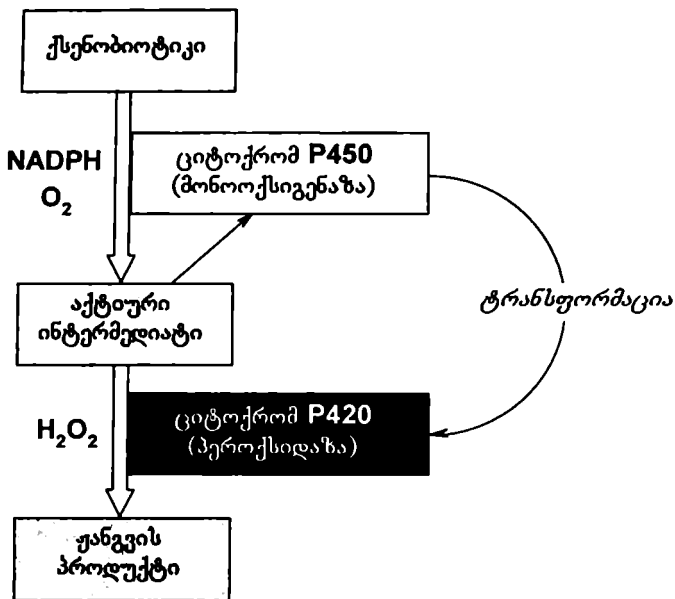
მამასადამე, მიკროსომებიდან მიტოქონდრიაზე ელექტრონების მიგრაცია იმ შემთხვევაში შეიძლება განხორციელდეს, როდესაც ციტოქრომ P450 ქსენობიოტიკის ჰიდროქსილირებით არაა დაკავებული, ანუ სხვაგვარად რომ ითქვას, როდესაც ადგილი აქვს მიკროსომაში NADPH-ის თავისუფალ (ჰიდროქსილირებასთან არაშეუღლებულ) ჟანგვას. ამ დროს NADPH-ციტოქრომ P450-რედუქტაზას და ციტოქრომ b_5 -ს სხვა, ენერგეტიკული ფუნქცია აკისრიათ, რაც მიტოქონდრიული სუნთქვის ჯაჭვის აღმდგენელი ექვივალენტებით დამატებით მომარაგებაში მდგომარეობს. ქსენობიოტიკის უჯრედში მოხვედრისას NADPH-ჟანგვის სისტემა ენერგეტიკულიდან კვლავ ბიოდევრადაციულ რეჟიმზე გადადის.

ქიმიური მოდიფიკაციის გზით ციტოქრომ P450-ის პეროქსიდაზად ტრანსფორმაცია უჯრედის საერთო დეტოქსიკაციურ პოტენციალს კი არ ამცირებს, არამედ გარკვეულწილად აძლიერებს კიდევ. ამ დროს მონოოქსიგენაზას პეროქსიდაზა ენაცვლება, რომელიც, ზოგიერთი მკვლევარის



ნახ. 57. მიკროსომული რედოქს-ჯაჭვიდან მიტოქონდრიაზე ელექტრონების მიგრაციის შესაძლო გზები. დაშტრიხული ისრით აღნიშნულია Zn^{2+} -ით შუნტირებული პუნქტი.

აზრით, ქსენობიოტიკების ჟანგვით დეგრადაციაში ციტოქრომ P450-ზე უფრო მნიშვნელოვან როლს ასრულებს. საქმე იმაშია, რომ მრავალი ქსენობიოტიკის ჟანგვის დასაწყისში ციტოქრომ P450-ს შეუძლია იფუნქციონიროს, როგორც მონოოქსიგენაზამ, შემდგომში კი ჟანგვა გააგრძელოს პეროქსიდაზად ტრანსფორმირებულმა პემოპროტეინმა (ნახ. 58). ამ შემთხვევაში ქსენობიოტიკის დეგრადაცია ჟანგვით ფერმენტთა ურთიერთშეწველების პრინციპით განხორციელდება. ჩვენს ლაბორატორიაში ნაჩვენები იქნა, რომ ქსენობიოტიკის ჟანგვის პროცესში ერთმანეთს შეიძლება შენაცვლონ არამხოლოდ მონოოქსიგენაზა და პეროქსიდაზა, არამედ ფენოლოქსიდაზაც. ამ ფერმენტების კოორდინირებული მოქმედება ქსენობიოტიკის ჟანგვითი დეგრადაციის პროცესის მთავარ რეგულატორულ მექანიზმს



ნახ. 58. ქსენობიოტიკის ჟანგვის პროცესში ციტოქრომ P450-ის პეროქსიდაზად ტრანსფორმაცია. ჰემოპროტეინი ქსენობიოტიკის გარდაქმნას იწყებს, როგორც NADPH-დამოკიდებული მონოოქსიგენაზა, მაგრამ ჟანგვისას ფორმირებული აქტიური ინტერმედიატი მის ქიმიურ მოდიფიკაციას იწყებს, ამის გამო ფერმენტი H₂O₂-დამოკიდებული პეროქსიდაზული მექანიზმით აგრძელებს ფუნქციონირებას.

უნდა წარმოადგენდეს.

ამრიგად, განხილული ფაქტების შეჯერებას ერთ მნიშვნელოვან დასკვნამდე მივყავართ:

ცხოველური უჯრედისაგან 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 პეროქსიდაზის სახით ინარჩუნებს. ე.ი. მცენარეული ფერმენტი მხოლოდ თვისობრივ გარდაქმნას – ტრანსფორმაციას განიცდის. ამ დროს ციტოქრომ P450-დამოკიდებული შიდაუჯრედული მეტაბოლური პროცესების ინტენსივობა ქვეითდება. ციტო-

ქრომ 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, ცხოველურისგან განსხვავებით, ამავე ფერმენტს პეროქსიდაზის 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 მოვლენის ბიოლოგიური აზრი.

4.1 კვლევის ობიექტები

4.1.1 მიკროსომული ფრაქციის მიღება ცხოველის ღვიძლიდან

მიკროსომული ფრაქციის მისაღებად ყველაზე ხშირად ღვიძლის ქსოვილს იყენებენ. იგი შედარებით ჰომოგენურია და მხოლოდ ორი ტიპის უჯრედებს (პარენქიმატოზურს – ჰეპატოციტებს და რეტიკულო-ენდოთელიალურს – ე.წ. კუჭფერის) შეიცავს. ენდოპლაზმური მემბრანების მიღება ძირითადად ჰეპატოციტიდან ხდება, რადგან კუჭფერის უჯრედები გაცილებით მცირე ზომის არიან, და შესაბამისად, მცირე რაოდენობით მემბრანებს შეიცავენ. გარდა ამისა, სიმცირის გამო ისინი მექანიკური ზემოქმედების მიმართ მდგრადები არიან და ჰომოგენიზაციისას არ იშლებიან.

სირთულეს ქმნის ჰეპატოციტურ ქსოვილში სისხლის დიდი რაოდენობით შემცველობა. საჭირო ხდება ჰომოგენიზაციამდე ღვიძლის წინასწარი პერფუზია. ამისათვის ცხოველის დეკაპიტაციის შემდეგ ღვიძლი ქვედა ღრუ ვენიდან ირეცხება 1.15%-იანი KCl-ის ან 0.25 M-ის საქაროზის (pH 7.4) გაცივებული ხსნარით, ღია მოყვითალო შეფერილობამდე. საქაროზა მოქმედებს „წეოს“ მაგვარად და მიკროსომების ზედაპირზე არამიკროსომული ცილების სორბციას იწვევს. ამიტომ მიკროსომების საერთო ნალექს ამ რეაგენტით პრაქტიკულად არ რეცხავენ. იგი იმ შემთხვევაში გამოიყენება, როდესაც მიკროსომული პრეპარატების შემდგომ ფრაქციონირებას აგრძელებენ. KCl-ის გამოყენება კი საშუალებას იძლევა ფრაქცია მიღებული იქნას ბალასტური სორბირებული ცილების მინიმალური შემცველობით. გარდა ამისა, დეკაპიტაციამდე 20 სთ-ის განმავლობაში ცხოველს აშიშმილებენ, რათა ღვიძლში გლიკოგენის შემცველობა მკვეთრად დაქვეითდეს. ციტოქრომ P450-ის ინდუქციისათვის ცხოველს 7 დღის განმავლობაში ორალურად ან მუცლის ღრუში ინექციით ყოველდღიურად ეძლევა 0.1%-იანი ფენობარბიტალის ხსნარი.

გამოყოფის პროცედურა: პერფუზირებული ღვიძლი დოლბანდში იწურება, კარგად მშრალდება ფილტრის ქაღალდით, იწონება და მაკრატლით ქუცმაცდება. ყველა ეს პროცედურა ტარდება 0–4°C-ზე. ფრაქციონირებისას ძლიერ არასასურველია ცილის აგრეგაცია, ამიტომ მიკროსომების გამოყოფისას ბუფერული ან ორგანოფოსფორული მეთალის იონთა შემცველი სხვა ხსნარები, როგორც წესი, არ გამოიყენება.

ჰომოგენიზაცია ტარდება ტეფლონის ღვუშიან ჰომოგენიზატორში. აუცილებელი პირობაა, რომ ღვუში ჭურჭლის კედელს ძლიერ მჭიდროდ არ ეკვროდეს.

ქსოვილის მასისა და ხსნარის მოცულობის ფარდობა უნდა იყოს 1 : 3-თან (KCl-ის შემთხვევაში) ან 1 : 9-თან (საქაროზის შემთხვევაში). პომოგენიზაცია ტარდება 1 წთ-ის განმავლობაში და პროცედურის ხელით შესრულებისას ღვუშის ზევით-ქვევით მოძრაობა 20–30-ს არ უნდა აღემატებოდეს. დაღწერისა და დე-პიერის მიერ რეკომენდირებულია, რომ ღვუშის ბრუნთა რიცხვი 400-ის, ხოლო პომოგენიზატორში მისი სვლათა რიცხვი 4-ის ტოლი იყოს. წინააღმდეგ შემთხვევაში ფრაქცია საგრძნობლად დაბინძურდება მიტოქონდრიული და ლიზოსომური მემბრანებით.

დაუშლელი უჯრედები და მსხვილი ნაწილაკები (ბირთვები, მიტოქონდრიები, ლიზოსომები, პეროქსისომები და გოლჯის ცისტერნები) პომოგენატს სცილდება დიფერენციური ცენტრიფუგირებით 9 000 გ-ზე 15 წთ-ის განმავლობაში KCl-ის შემთხვევაში (10%-იანი პომოგენატი), ან 10 000 გ-ზე 20 წთ-ით საქაროზის შემთხვევაში (20%-იანი პომოგენატი).

საერთო მიკროსომული ფრაქციის დასალექად სუპერნატანტს აცენტრიფუგირებენ 105 000 გ-ზე 60 წთ-ის (KCl-ის შემთხვევაში) ან 90 წთ-ის განმავლობაში (საქაროზის შემთხვევაში). ციტოპლაზმური მემბრანების ნალექი სუს-პენზირდება შესაბამის არეში იმ გაანგარიშებით, რომ თუ სუსპენზირების არეს ავიღებთ იმავე მოცულობით (მლ-ებში), რამდენიც იყო ლეიძლის ნედლი მასა (გ-ში), მაშინ მიღებული მიკროსომული სუსპენზია შეიცავს ~10 მკ ცილას 1 მლ-ზე.

4.1.2 მიკროსომების მიღება მცენარეული ობიექტებიდან

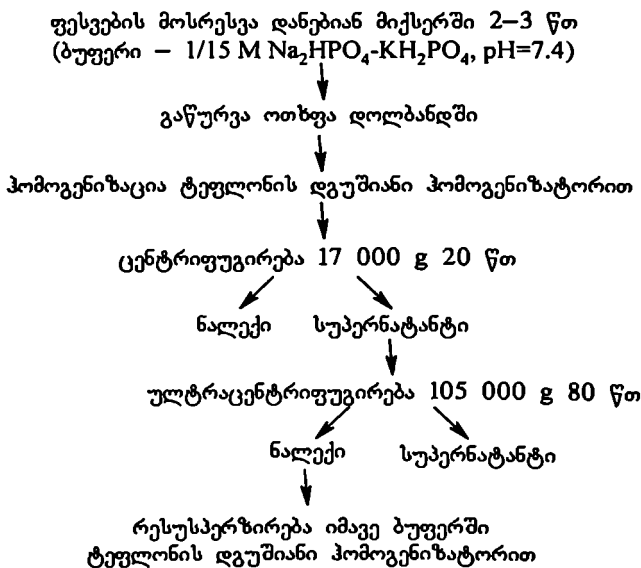
კვლევისათვის ყველაზე ხელსაყრელ ობიექტებს წარმოადგენენ ისეთი ერთწლიანი მცენარეების ეთიოლირებული ნაზარდების ფესვები, როგორებიცაა სოია, სიმინდი, ბარდა, ლობიო, ცერცვი, კონდარი და სხვ. სინათლეზე გაზრდილი მცენარის ფესვებსა და ფოთლებში გაზომვებს ართულებენ პიგმენტები, რომლებიც 420–450 ნმ-ის უბანში სპექტრის გადაფარვას იწვევენ და აძნელებენ ციტოქრომული კომპონენტების იდენტიფიკაციას. დიდი მნიშვნელობა აქვს მცენარის ასაკსაც, რამდენადაც ციტოქრომ P450-ის მაქსიმალური აქტივობა ვლინდება 4–7-დღიან ნაზარდებში, რის შემდეგაც მიმდინარეობს ჰემოპროტეინის შეუქცევადი კონვერსია არააქტიურ ციტოქრომ P420-ად.

100–200 გ თესლი წინასწარ ღებება ონკანის წყალში 12–24 სთ-ის განმავლობაში და გადაიტანება კიუვეტში; ზევიდან ეფარება სველი ფილტრის ქაღალდი და თავსდება თერმოსტატში 25–28°C-ზე. მონოოქსიგენაზების ინდუქციისათვის ონკანის წყლის ნაცვლად გამოიყენება ინდუქტორების მილიმოლური ხსნარები. მცენარის მიმართ ყველაზე კარგ ინდუქტორ ეფექტს

იძლევა N,N-დიმეთილანილინი. განსაკუთრებული ყურადღება ექცევა ისეთი ქსენობიოტიკის ხსნარის მომზადებას, რომელიც ძლიერ დაბალი ხსნადლობით ხასიათდება (3,4-ბენზპირენი და სხვა პოლიციკლური არომატული ნახშირ-წყალბადები). ამისათვის მათი წონაკი იხსნება მინიმალური მოცულობის მდულარე ეთანოლში და იგი წვეთ-წვეთობით ემატება შერჩეულ არეს მუდმივი მორევის პირობებში (მაგნიტურ სარეველავზე). სასურველია, წვეთ-ები ჩაემატოს მორევისაგან წარმოქმნილ ხსნარის ძაბრში. მიღებული მიკ-როსუსპენზია მდგრადია და 3-4 დღის განმავლობაში ინარჩუნებს სტაბილუ-რობას. ინდუქტორად 3,4-ბენზპირენის გამოყენებისას მიიღება ციტოქრომ P420-ის აქტიური ინდუქტია ციტოქრომ P450-ის შემცველობის უცვლელობის ფონზე. გარდა ამისა, ცხოველურისაგან განსხვავებით, მცენარეული მონო-ოქსიგენაზის ინდუქციისას არ შეინიშნება ქსენობიოტიკ-ინდუქტორის მი-მართ ფერმენტული სისტემის სპეციფიკურობის ზრდა, ე.ი. ინდუცირებული მონოოქსიგენაზა მაღალი ინტენსივობით ჟანგავს ინდუქტორისაგან ქიმიუ-რად განსხვავებულ ქსენობიოტიკსაც (იხ. § 3.4).

გამოყოფის პროცედურა: მიკროსომული ფრაქცია მიიღება გარეცხილი, გამშ-რალეული და წინასწარ 2-4°C-ზე გაცივებული (30 წთ) ფესვებიდან, რადგან მცენარეული ციტოქრომ P450 მეტად ლაბილურია და გამოყოფისას მისი აქტი-ური ფორმის შესანარჩუნებლად აუცილებელია ამ პირობის დაცვა.

ფრაქციის გამოყოფა ხორციელდება შემდეგი თანმიმდევრობით:



4.2 მონოოქსიგენაზური სისტემის ცალკეული კომპონენტების განსაზღვრა

4.2.1 ციტოქრომული კომპონენტების რაოდენობრივი განსაზღვრა

ციტოქრომების b_5 -ის, P420-ისა და P450-ის რაოდენობა ისაზღვრება ომურასა და სატოს მიერ შემოთავაზებული მეთოდით. კელევისათვის ჩვეულებრივ გამოიყენება ორსხივიანი მასკანირებული სპექტროფოტომეტრები, რომელთაც გააჩნიათ დამატებითი კიუვეტების სადგამი უშუალოდ ფოტოელემენტების წინ (CΦ-10, CΦ-14, Speecord UV-VIS. Speecord M-40, Speecord M-400, Hitachi 356 და სხვ.). მეთოდის პრინციპია ღიფერენციული სპექტრების რეგისტრირება ღითიონიტით აღდგენილ (ამ დროს „ჩანს“ ციტოქრომ b_5) და CO-სთან კომპლექსირების მდგომარეობებში (ამ პირობებში შთანთქვენ ციტოქრომის P450-იანი და P420-იანი ფორმები).

განსაზღვრის მსვლელობა: ციტოქრომების რაოდენობის გაზომვა უშუალოდ მიკროსომულ სუსპენზიაში ხდება. ახლადმოზადებული მიკროსომული ფრაქცია შეიტანება სპექტროფოტომეტრულ კიუვეტებში და 400–500 ნმ-ის დიაპაზონში რეგისტრირდება ნულოვანი ხაზი, რომელიც შემდგომ გამოთვლებში უნდა გათვალისწინდეს.

ციტოქრომ b_5 : საცდელ კიუვეტში შეიტანება ნატრიუმის ღითიონიტის რამდენიმე კრისტალი და მორევის შემდეგ რეგისტრირდება ციტოქრომ b_5 -ის სპექტრი შთანთქმის მინიმუმით 408 ნმ-ზე და მაქსიმუმით 428 ნმ-ზე. ციტოქრომ b_5 -ის შემცველობა იანგარიშება მაქსიმუმსა და მინიმუმს შორის ექსტინქციების სხვაობითა და ექსტინქციის კოეფიციენტით, რომელიც ციტოქრომ b_5 -თვის 160 სმ²·მმ⁻¹-ს შეადგენს.

ციტოქრომები P450 და P420: საცდელ კიუვეტში მიკროსომული სუსპენზია 1 წთ-ის განმავლობაში ჯერდება CO-თი, რის შემდეგაც ორივე კიუვეტში ემატება ღითიონიტი და რაც შეიძლება სწრაფად ხდება სპექტრის გადღება. ციტოქრომ P450-ის რაოდენობა ისაზღვრება 450 და 490 ნმ-ებზე ექსტინქციებს შორის სხვაობით, ხოლო ციტოქრომ P420-ის რაოდენობა – 420 და 490 ნმ-ებზე ექსტინქციებს შორის სხვაობით. ექსტინქციის კოეფიციენტები შესაბამისად 91 სმ²·მმ⁻¹ და 110 სმ²·მმ⁻¹-ს შეადგენს.

4.2.2 NADPH-ციტოქრომ P450-რედუქტაზის აქტივობის განსაზღვრა

NADPH-ციტოქრომ P450-რედუქტაზის ფერმენტული აქტივობის დასადგენად გამოიყენება ერთ- ან ორელექტრონიანი ხელოვნური აქცეპ-

ტორები: ციტოქრომი c, $K_3[Fe(CN)_6]$, 2,6-დიქლორფენოლინდოფენოლი და სხვ. მეთოდის პრინციპი ემყარება ამ ნივთიერებათა დაჟანგულიდან აღდგენილ ფორმაში გადასვლისას აღძვრული სპექტრული ცვლილებების გაზომვას. აღნიშნული აქცეპტორები მაღალი სწრაფვის გამო იღებენ რელექტაზიდან ელექტრონებს და ამდენად მონოოქსიგენაზურ სისტემაში მათი სატრანსპორტო გზის შუნტირებას ახდენენ.

განსაზღვრის მსვლელობა: საინკუბაციო არის (3 მლ) შემადგენლობა: ბუფერი – $1/15$ M Na_2HPO_4 - KH_2PO_4 , pH 7.4; $100 \mu M$ NADPH; $330 \mu M$ NaN_3 ; $50 \mu M$ ციტოქრომი c; ან $330 \mu M$ $K_3[Fe(CN)_6]$; ან $40 \mu M$ 2,6-დიქლორფენოლინდოფენოლი. რეაქცია იწყება სარეაქციო არეში NADPH-ის შეტანით. საკონტროლო კიუვეტში NADPH-ის ნაცვლად შეიტანება იმავე მოცულობის ბუფერი.

გამოყენებული ელექტრონული აქცეპტორებისთვის შთანთქმის მაქსიმუმები და ექსტინქციის კოეფიციენტებია: ციტოქრომ c-სთვის 550 ნმ და $18.5 \cdot 10^3$ $cm^{-1} \cdot M^{-1}$; ფერიციანიდისთვის 420 ნმ და $10.2 \cdot 10^3$ $cm^{-1} \cdot M^{-1}$; 2,6-დიქლორფენოლინდოფენოლისთვის 600 ნმ და $21 \cdot 10^3$ $cm^{-1} \cdot M^{-1}$.

4.3 მონოოქსიგენაზური აქტეფობის განსაზღვრის მეთოდები

4.3.1 პოლაროგრაფიული მეთოდი

ქსენობიოტიკთა მონოოქსიგენირების რეაქციათა შესწავლისას პოლაროგრაფიული მეთოდის გამოყენება საშუალებას იძლევა შემოწმდეს პროცესთა NADPH- და O_2 -დამოკიდებულება. იგი შეიძლება ჩატარდეს როგორც დახურულ, ასევე ღია ტიპის პოლაროგრაფიულ ბუდეში. მიკროსომული ჟანგვის კვლევისას მეტი უპირატესობა ენიჭება ღია პოლაროგრაფულ ბუდეს, რადგან აქ არ მოქმედებს ჟანგბადით ლიმიტირების ფაქტორი, რაც ხშირად თანმდევ პროცესებთანაა დაკავშირებული. გარდა ამისა, ღია ბუდით სარგებლობისას ანალიზის მსვლელობის დრო ფაქტიურად შეუზღუდავია, თუმცა მის გამოყენებასაც გააჩნია თავისი უარყოფითი მხარე, რამდენადაც ჟანგბადის მუდმივი დიფუზიის გამო საჭიროა ხელსაწყოს სპეციალური დაკალიბრება მაგნიტური სარეველას ბრუნთა რიცხვის (ე.ი. მორევის სიჩქარის) შესაბამისად.

ყველა ზემოაღნიშნული მომენტი გათვალისწინებულია ბიოენერგომეტრ „დილომში“, რომელიც შექმნილია საქართველოს მეცნიერებათა აკადემიის სამეცნიერო ხელსაწყოთმშემნლობის სპეციალური საკონსტრუქტორო ბიუროს მიერ ჩვენს ლაბორატორიასთან თანამშრომლობით.

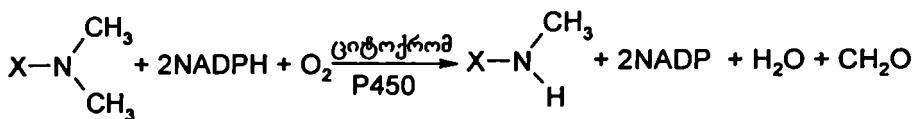
„დიდომის” პოლაროგრაფიული ბუდე აღჭურვილია ჟანგბადის, pH-ის და იონსელექტური ელექტროდებით. ჟანგბადის ელექტროდი დახურულია სამმაგფენიანი გაზგამტარი მემბრანით. მისი მუშაობის პრინციპი ემყარება ელექტროლიტში გახსნილი ჟანგბადის ელექტროქიმიურ აღდგენას 0.65 V პოლარიზაციის ძაბვის დროს.

განსაზღვრის მსვლელობა: პოლაროგრაფიულ ბუდეში შეიტანება 3–5 მლ მიკროსომული სუსპენზია $0.75\text{--}1.25\text{ მგ/მლ}$ ცილის შემცველობით. ცილის ეს რაოდენობა ყველაზე მაღალი იძლევა ჟანგვის სურათს. მიკროსომების მონოოქსიგენაზური აქტივობის გამოსავლენად გამოიყენება სინჯების შეტანის შემდეგი თანმიმდევრობა: სარეაქციო არეს ჯერ ემატება 2 მიკრომოლი/მგ ცილაზე NADPH. ჟანგბადის მოხმარების სურათის მიღება (სიჩქარე $2\text{--}3 \cdot 10^{-7}\text{ M/წთ}$) ადასტურებს, რომ მიკროსომებში აქტიურად ფუნქციონირებს NADPH-ის დამჟანგველი სისტემა. წონასწორული მდგომარეობის მიღწევის შემდეგ ბუდეში შეიტანება დიმეთილანილინის სუსპენზია და NADPH შესაბამისად 1.5 და 2 მკმოლი/მგ ცილაზე. საინკუბაციო არეში 200 მკლ CO-ს ნაჯერი ხსნარის შეტანა სიჩქარის მკვეთრ დაცემას იწვევს. ეს სურათი მიკროსომებში ციტოქრომ P450 შემცველი მონოოქსიგენაზას ფუნქციონირებას ადასტურებს. სისტემის აქტივობაზე შეიძლება ვიმსჯელოთ დიმეთილანილინის ჟანგვის სიჩქარის მიხედვით.

დიმეთილანილინის გარდა, შეიძლება გამოყენებულ იქნას მონოოქსიგენირების სხვა სუბსტრატებიც, კერძოდ: ანილინი, დარიჩინმჟავა, ეთილმორფინი, *p*-ნიტროანიზოლი, ამინოპირინი და სხვ. NADPH-თან ერთად მათი თანამყოფობა პოლაროგრაფიულად რეგისტრირებადი ჟანგბადის მოხმარების გაზრდას იწვევს. უნდა აღინიშნოს, რომ ჰიდროქსილირების ერთ-ერთი სუბსტრატი – 3,4-ბენზპირენი მონოოქსიგენირების შემდეგ წარმოქმნის ჟანგბადის აქტიურ რადიკალებს, რომლებიც ჟანგბადის ელექტროდის მიერ აღირიცხებიან და ამას ხელსაწყო ჟანგბადის გამოყოფის პროცესად აფიქსირებს.

4.3.2 სპექტროფოტომეტრული მეთოდი

მონოოქსიგენაზური აქტივობის დასადგენად, პოლაროგრაფიული მეთოდის გარდა, გამოიყენება სპექტროფოტომეტრული მეთოდიც, რომელიც მონოოქსიგენირების რეაქციის პროდუქტის კოლორიმეტრულ განსაზღვრაზეა დაფუძნებული. მთელი რიგი სუბსტრატებისა, კერძოდ, დიმეთილანილინი, ეთილმორფინი, ამინოპირინი მონოოქსიგენაზური სისტემით N-დემეთილირებას განიცდიან, რის შედეგადაც ფორმალდეჰიდი გამოიყოფა. რეაქცია ციტოქრომ P450-ით ხორციელდება მოლეკულური ჟანგბადისა და NADPH-ის თანაობისას:



ფორმალდეჰიდი გამოიყოფა აგრეთვე *p*-ნიტროანიზოლის *O*-დემეთილირების შედეგად. ეს რეაქციაჲ ჰიდროქსილირების ანალოგიური მექანიზმით მიმდინარეობს (იხ. § 2.5.4, ნახ. 41). რეაქციის მსვლელობისას გამოყოფილი ფორმალდეჰიდის განსაზღვრა ხდება ნაშის (Nash) რეაქტივის საშუალებით.

განსაზღვრის მსვლელობა: საინკუბაციო არის (3 მლ) შემადგენლობა: ბუფერი – 1/15 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$, pH=7.4; 2 მგ/მლ მიკროსომული ცილა; 6 mM NADPH; 6 mM დიმეთილანილინი (ან ზემოთ ჩამოთვლილი სუბსტრატები იმავე კონცენტრაციით). საკონტროლო ვარიანტი არ შეიცავს NADPH-ს. სინჯები თავსდება თერმოსტატში 37°C-ზე 20–30 წთ-ის განმავლობაში. რეაქცია ჩერდება 1 მლ 30%-იანი ტრიქლორმმარმჟავას დამატებით, ცენტრიფუგირდება 3 500 გ-ზე 10 წთ. 0.5 მლ სუპერნატანტს ემატება 2 მლ ნაშის რეაქტივი (2 M ამონიუმის აცეტატი, 0.05 M ყინულოვანი მმარმჟავა, 0.02 M აცეტილაცეტონის ხსნარი) და თავსდება თერმოსტატში 37°C-ზე 45 წთ, რის შემდეგაც იზომება შთანთქმის ინტენსივობა 412 ნმ-ზე. მონოქსიგენაზური აქტივობის გასაანგარიშებლად იყენებენ ფორმალდეჰიდით წინასწარ დაკალიბრებულ მრუდს.

მონოქსიგენაზური სისტემა აკატალიზებს ანილინის 4-ჰიდროქსილირების რეაქციასაც (იხ. § 2.5.4, ნახ. 26). გამოყოფილი *p*-ამინოფენოლი Na_2CO_3 -ის თანაობისას უკავშირდება ფენოლის მოლეკულას და წარმოქმნის შეფერილ ნაერთს.

განსაზღვრის მსვლელობა: საინკუბაციო არის (3 მლ) შემადგენლობა: ბუფერი – 1/15 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$, pH=7.4; 2 მგ/მლ მიკროსომული ცილა; 6 mM ანილინი. საკონტროლო ვარიანტი არ შეიცავს NADPH-ს. სინჯები თავსდება თერმოსტატში 37°C-ზე 20–30 წთ-ის განმავლობაში. რეაქცია ჩერდება 1 მლ 30%-იანი ტრიქლორმმარმჟავას დამატებით, ცენტრიფუგირდება 3 500 გ-ზე 10 წთ. 1 მლ სუპერნატანტს ემატება 0.5 10%-იანი Na_2CO_3 და 1.5 მლ 2%-იანი ფენოლი 0.2 N NaOH-ის ხსნარში. შეფერილობის გასავეითარებლად სინჯები თავსდება თერმოსტატში 37°C-ზე 30 წთ, რის შემდეგაც იზომება შთანთქმის ინტენსივობა 630 ნმ-ზე. 4-ჰიდროქსილაზური აქტივობის გასაანგარიშებლად გამოიყენება *p*-ამინოფენოლით წინასწარ დაკალიბრებული მრუდი.

მონოქსიგენაზური სისტემის N-ოქსიგენაზური აქტივობა ფასდება დიმეთილანილინის N-ჟანგვის ინტენსივობით. მეთოდის პრინციპი შემდეგში მდგომარეობს: სარეაქციო არეს შეატუტიანებენ pH 9.4-მდე და

მისგან აცილებენ რეაქციაში შეუსვლელ დიმეთილანლინს, რის შემდეგაც ხდება არის შემჟავება pH 2.5-მდე. ამ დროს N-ოქსიდიდან აღდგება დიმეთილანლინი, რომელიც NaNO_2 -ის დამატებით გადაჰყავთ შეფერილ p-ნიტროზოდიმეთილანლინში. ამ უკანასკნელს ახასიათებს შთანთქმის მაქსიმუმი 420 ნმ-ზე.

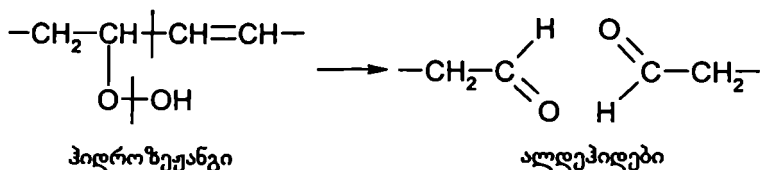
განსაზღვრის მსვლელობა: საინკუბაციო არის (3 მლ) შემადგენლობა: ბუფერი – $1/15 \text{ M Na}_2\text{HPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$, pH=7.4; 2 მგ/მლ მიკროსოპული ცილა; 6 mM NADPH; 6 mM დიმეთილანლინი. საკონტროლო ვარიანტი არ შეიცავს NADPH-ს. სინჯები თავსდება თერმოსტატში 37°C -ზე 20–30 წთ-ის განმავლობაში. რეაქცია ჩერდება 1 მლ 30%-იანი ტრიქლორმმარმჟავას დამატებით, ცენტრიფუგირდება 3 500 გ-ზე 10 წთ. 1 მლ სუპერნატანტს ემატება 0.33 მლ NaOH-ის 1 M ხსნარი, შემდეგ კი წვეთ-წვეთობით NaOH-ის 0.05 M ხსნარი pH 9.4-მდე. ამის შემდეგ სამჯერ 5–5 მლ დიეთილეთერით ხდება რეაქციაში შეუსვლელი დიმეთილანლინის ექსტრაქცია. ეთერის სრული მოცილების შემდეგ სარეაქციო არეს თანმიმდევრულად ემატება 5%-იანი ტრიქლორმმარმჟავა pH 2.5-მდე, 0.2 მლ 0.1 M NaNO_2 , 3 მლ ციტრატის ბუფერი (pH 2.4). შეფერვის გასავითარებლად ნიშუშები 5 წთ-ის განმავლობაში თავსდება 60°C -იან წყლის აბაზანაზე, რის შემდეგაც იზომება შთანთქმის ინტენსივობა 420 ნმ-ზე. p-ნიტროზოდიმეთილანლინის რაოდენობის გადაანგარიშება ხდება ექსტინქციის კოეფიციენტის მიხედვით, რომელიც $8.2 \cdot 10^3 \text{ სმ}^{-1}\text{M}^{-1}$ -ს შეადგენს.

4.4 ლიპიდების ზეჟანგური ჟანგვის შეფასება (მალონის დიალდეჰიდის განსაზღვრა)

მემბრანებში ცხიზოვან მჟავათა ზეჟანგური ჟანგვის კვლევაში სამგვარი მეთოდური მიდგომა გამოიყენება. ისინი საშუალებას იძლევიან 1) განისაზღვროს ლიპიდური პეროქსიდაციის პროდუქტები; 2) გამოვლინდეს პროცესში თავისუფალი რადიკალების გენერაცია; 3) განისაზღვროს ქსოვილთა ანტიოქსიდანტური აქტივობა.

ბიოლოგიურ სისტემებში ლიპიდთა ზეჟანგური ჟანგვის შესასწავლად დღემდე ერთ-ერთ ძირითად მეთოდად რჩება პროცესის საბოლოო პროდუქტის – მალონის დიალდეჰიდის რაოდენობრივი განსაზღვრა. ცხიზოვან მჟავათა ზეჟანგური ჟანგვისას ჰიდროზეჟანგებთან ერთად წარმოიქმნებიან სპირტები, კეტონები, ალდეჰიდები, დიალდეჰიდები, ეპოქსიდები და სხვ. ამ პროდუქტთა წარმოქმნის მექანიზმები ჯერჯერობით არასათანადოთაა შესწავლილი. ეს ვითარება დაკავშირებულია ჰიდროზეჟანგების გარდაქმნათა შედეგად მიღებული ლაბილური ინტერმედიატების იდენტიფიკაციის

სირთულეებთან. ითვლება, რომ ჭეშმარიტებასთან ყველაზე ახლოსაა ნახშირწყალბადოვანი ჯაჭვის დაშლის შედეგად კარბონილური ნაერთების წარმოქმნა შემდეგი სქემით:



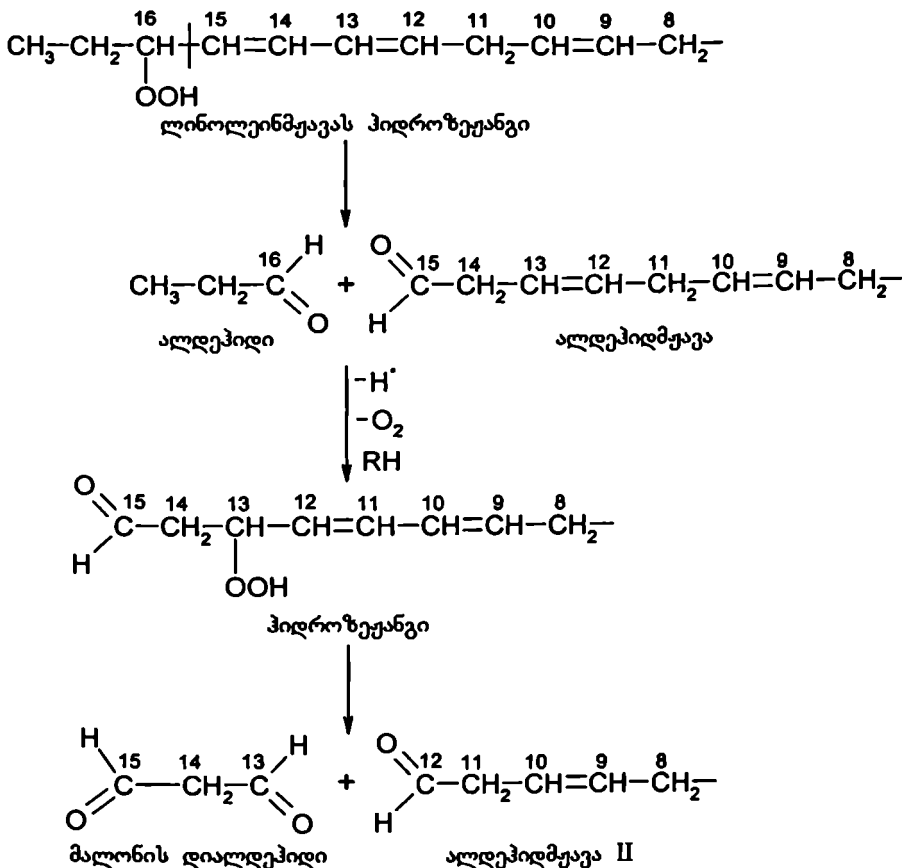
წარმოქმნილი პროდუქტების მომდევნო გარდაქმნა მეორე რადიკალურ შეტევას ითხოვს და ამის შედეგად დიალდეჰიდი წარმოიქმნება. მაგალითად, ლინოლენმჟავას შემთხვევაში პროცესის თანმიმდევრობა შეიძლება შემდეგი სქემით წარმოვიდგინოთ (ნახ. 59).

ბოლო რეაქცია საინტერესოა იმდენად, რამდენადაც ამოსავალ კრიტერიუმს წარმოადგენს ბიოლოგიურ სისტემებში ცხიმოვან მჟავათა ზეჟანგური ჟანგვის მსვლელობის შესაფასებლად.

მეთოდს საფუძვლად უდევს მაღალ ტემპერატურაზე და მჟავა pH-ზე მალონის დიალდეჰიდსა და თიობარბიტურმჟავას შორის რეაქცია. წარმოიქმნება ჟოლოსფრად შეფერილი ტრიმეთინური კომპლექსი (შთანთქმის მაქსიმუმით 532 ნმ-ზე), რომელიც ერთ მოლეკულა მალონის დიალდეჰიდს და ორ მოლეკულა თიობარბიტურმჟავას შეიცავს (ნახ. 60).

აქვე უნდა განვიხილოთ აღნიშნული მეთოდის ნაკლიც: მალონის დიალდეჰიდი არ წარმოადგენს თიობარბიტურმჟავასთან ურთიერთქმედებაში შემსვლელ ერთადერთ აქტიურ პროდუქტს. ამასთან, ასეთი პროდუქტის წარმოქმნა ხდება არამხოლოდ ზეჟანგური ჟანგვის შედეგად, არამედ იმ ფილტრატების დამუშავების დროსაც, რომლებიც ბარბიტურმჟავასთან ფერადი რეაქციის ჩატარების პროცედურაში შედის. დაჟანგულ ცხიმოვან მჟავათა წყლიან ექსტრაქტებში მალონის დიალდეჰიდის არსებობა, მისი წყალში ხსნადობის მიუხედავად, არ ვლინდება. გარდა ამისა, თხელფენოვანი ქრომატოგრაფიის მეთოდით ნაჩვენები იქნა, რომ ლინოლენისა და არაქიდონმჟავას ჟანგვისას წარმოიქმნება მალონის დიალდეჰიდისაგან განსხვავებული ორი პროდუქტი, რომლებიც თიობარბიტურმჟავასთან ანალოგიურ შეფერილ კომპლექსებს იძლევიან და შთანთქმის სპექტრით მალონის დიალდეჰიდის კომპლექსთან ახლოს იმყოფებიან.

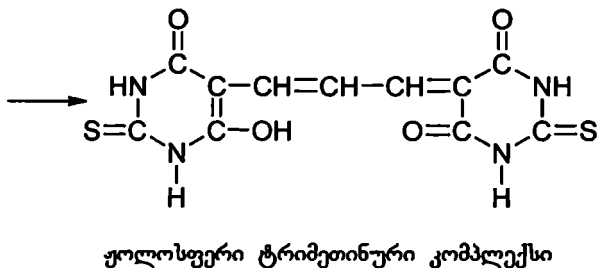
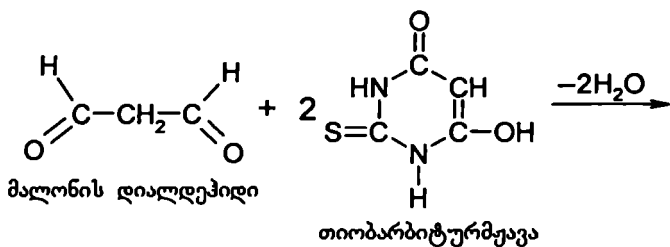
ცოცხალ ქსოვილში ლიპიდთა არაფერმენტული ზეჟანგური ჟანგვის სიჩქარისა და ღონის შესაფასებლად მალონის დიალდეჰიდით განსაზღვრის



ნახ. 59. ლინოლენმჟავადან მალონის დიალდეჰიდის წარმოქმნა.

მეთოდი რეკომენდირებული არაა კიდევ იმის გამო, რომ რეაქციის შედეგად მისი გამოსავალი ძლიერ მცირეა და ამასთან, როგორც ირკვევა, შემდგომი მეტაბოლიზება შეუძლია.

ჩამოთვლილი ნაკლოვანი მხარეების მიუხედავად, თიობარბიტურმჟაური ტესტი მალონის დიალდეჰიდს ზეჟანგური ჟანგვის მოხერხებულ და მარტივ მაჩვენებლად ხდის.



ნაზ. 60. ტრიმეთინური კომპლექსის წარმოქმნა მალონის დიალდეჰიდის და თიობარბიტურმჟავას ურთიერთქმედებით.

განსაზღვრის მსვლელობა: 3 მლ მოცულობის სარეაქციო არე ინკუბირდება თერმოსტატში 37°C-ზე. 1 სთ-იანი ინკუბაციის შემდეგ რეაქცია ჩერდება 1 მლ 30%-იანი ტრიქლორმმარმჟავას დამატებით. 3 500 გ-ზე 10 წთ ცენტრიფუგირების შემდეგ 2 მლ სუპერნატანტს ემატება 1 მლ 2-თიობარბიტურის მჟავას 0.8%-იანი ხსნარი და შეფერილობის განვითარებისთვის თავსდება მდულარე წყლის აბაზანაზე 10 წთ. შემდეგ სინჯები ცივდება ოთახის ტემპერატურამდე და იზომება შთანთქმის ინტენსივობა 532 ნმ-ზე. თითოეული სინჯისათვის კონტროლად გამოიყენება ინკუბაციის დაწყებამდე ტრიქლორმმარმჟავათი დამუშავებული იმავე შემადგენლობის სინჯი. მალონის დიალდეჰიდის რაოდენობა იანგარიშება მისი ექსტინქციის კოეფიციენტის მიხედვით, რომელიც $1.56 \cdot 10^5 \text{ სმ}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$ -ის ტოლია.

Монография посвящена процессам окислительной деградации ксенобиотиков и функциональной роли мембранных компонентов (ферментных систем и липидов) в этих процессах. Материал рассмотрен с точки зрения общего принципа современной биохимии об единстве структуры и функции.

Книга состоит из трех глав. Первая глава полностью посвящена рассмотрению морфологической и молекулярной организации мембран эндоплазматического ретикулума, в которых локализованы множество ферментных систем, осуществляющих синтез разных белков (гликопротеинов, липопротеинов), а также фосфолипидов и триглицеридов. В эндоплазматических мембранах содержание сорбированных и немембранных белков варьирует в широких пределах. Количественный показатель фосфолипидов и жирных кислот в любых условиях остается сравнительно постоянной величиной.

При дифференциальном центрифугировании эндоплазматические мембраны преобразуются в полупроницаемые протеолипосомы – микросомы. По химическому составу эти микротельца полностью отражают мембраны и являются их биохимическими эквивалентами.

Важными компонентами эндоплазматических мембран являются липиды. В монографии детально рассмотрены их строение, классификация, амфифильные свойства и внутримембранная ориентация. Геометрическая ориентация липидных молекул в мембранах, в основном, обусловлена амфифильными силами.

В книге отдельно рассмотрены биodeградация ацилглицеридов и протекающее в эндоплазматических мембранах перекисное окисление липидов (жирных кислот). Показана тесная связь данного процесса с окислением ксенобиотиков, так как они осуществляются одним и тем же набором ферментов.

В двухслойной мембране фосфолипиды представлены в виде жидких кристаллов, что и обеспечивает их подвижность внутри упорядоченного каркаса. Переход фосфолипидов с твердого положения обусловлен фазовым переходом и связан с тепловым эффектом. На фазовый переход влияет второй важный компонент мембраны – холестерол. Являясь регулятором текучести мембраны, холестерол вызывает изменение вязкости и понижает температуру фазового перехода. Под влиянием холестерола повышается подвижность цепей жирных кислот при температуре ниже

фазового перехода и снижается их подвижность при температуре выше фазового перехода. Понятие текучести подразумевает вязкость мембраны. С другой стороны, вязкость обусловлена подвижностью, что в случае с фосфолипидами проявляется в двух видах движения: межмолекулярном и внутримолекулярном. Для большинства мембран характерна динамичная и подвижная структура, а не жесткая и статическая. В связи с этим представлена гипотеза “кластерного” строения ферментных систем (монооксигеназ) окисляющих ксенобиотики, согласно которой монооксигеназы с мембранами образуют прочный комплекс.

В состав “кластера” входят фосфолипиды, которые отличаются от их основной массы своими физико-химическими параметрами. В микросомах не выявлено наличие типичных “кластеров”. Считается, что в этих органеллах функционируют так называемые кластеры “незаконченного” строения, в которые дополнительно могут встраиваться переносчики электронов.

Биодеградацию ксенобиотиков осуществляют оксидоредуктазы, связанные с мембраной, в частности, цитохром P450-содержащие монооксигеназы. Они превосходно находят и атакуют “уязвимые” места молекул чужеродных для клетки соединений.

Во второй главе рассмотрены отдельные компоненты тех ферментных систем, которые образуют свободную транспортную цепь электронов в эндоплазматической мембране и катализируемые ими реакции называются “микросомальным окислением”. К этим процессам относятся: гидроксилазные и редуктазные реакции, перекисное окисление липидов, образование H_2O_2 , парциальные реакции переноса электронов в редокс-цепях, реакции десатурации и др.

Монооксигеназы внедряют только один атом молекулярного кислорода в окисляемом субстрате, а второй восстанавливают до образования воды, т.е. одновременно обладают оксидазными и редуктазными свойствами.

Основными компонентами монооксигеназной системы являются NADPH-цитохром P450-редуктаза (EC 1.6.2.4), NADH-цитохром b_5 -редуктаза (EC 1.6.2.2), цитохром b_5 и цитохром P450. В монографии представлены строение этих компонентов и механизмы их действия, которые служат для обеспечения цитохрома P450 восстановительными эквивалентами никотинимидных коферментов. Детально рассмотрен цитохром P450, выполняющий несколько значительных функций. Одна из них – активация молекулярного кислорода – неспецифическая и характерна для всех форм данного фермента. Другая функция фермента – присоединение субстрата –

является вполне специфической. Этот гемопротейн выполняет функцию своеобразного “рецепторного” белка и специфичен не для одного субстрата, а для определенного класса токсикантов. Практически микросомальный цитохром P450 способен присоединять и осуществлять окисление или восстановление почти всех неполярных, гидрофобных соединений.

В третьей главе представлены аспекты регуляции цитохром P450-зависимого окислительного процесса ксенобиотиков. Учитывая особенности функционирования монооксигеназной системы, авторы аргументировано обосновывают существование не менее пяти уровней регуляции, опираясь как на собственные, так и данные других авторов:

1. Регуляция на мембранном уровне. В результате биохимической эволюции внутриклеточные мембраны и ферментные барьеры связаны между собой. Монооксигеназы свою каталитическую активность проявляют только после присоединения к мембране (приобретение пятеричной структуры). Для этих ферментов мембрана выполняет не только функцию “цементирующего” агента, но и является необходимым кофактором для их активации. Основательный анализ функции мембранных фосфолипидов показывает, что они включены во все стадии микросомального гидроксирования. Кроме этого, они являются незаменимыми компонентами системы NADPH-зависимого транспорта электронов.

Регуляторное воздействие мембранных липидов на гидроксирование ксенобиотиков проявляется изменением их физического состояния под влиянием температуры или других факторов. Фазовый переход от геля в жидкокристаллическое состояние подавляет энергию активации ферментативной реакции, что проявляется в снижении фосфолипид-белкового взаимодействия.

В монографии отдельно рассмотрены: влияние фосфолипидов на структуру и активность цитохрома P450; их роль в липофильном связывании ксенобиотиков с гемопротейном; взаимодействия – NADPH-цитохром P450-редуктазы с цитохромом P450; NADH-цитохром b_5 -редуктазы с цитохромом b_5 и т.д. Отчетливо доказано, что регуляторное влияние фосфолипидов на компоненты монооксигеназной системы обусловлено физическим, а не химическим воздействием.

2. Регуляция на уровне восстановительных эквивалентов. Для активации молекулярного кислорода, внедряемого в ксенобиотик, цитохром P450 использует восстановительные эквиваленты. Поэтому гидроксирование ксенобиотиков со своей стороны зависит от всех тех электронно-транспортных систем, которые могут обеспечить гемопротейн нужными

электронами.

Участие цитохромоксидазной системы в процесс миграции электронов с митохондрии на микросомы впервые выявлено на гепатоцитах печени. Суть его состоит в том, что происходит стимуляция микросомального гидроксилирования ксенобиотиков субстратами митохондриального окисления. Таким образом, митохондрии осуществляют клеточный контроль биотрансформации чужеродных соединений в эндоплазматических мембранах. Для такого контроля приемлемо существование двух механизмов:

1. Переход редуцирующих эквивалентов с митохондрии на микросомы посредством митохондриального и микросомального цитохромов b_5 . Для осуществления этого процесса необходим непосредственный контакт двух мембранных структур. В комбинированных системах митохондрий и микросом показано, что при добавлении пирувата мембраны эндоплазматического ретикулума превращаются в везикулы и ориентируются вокруг митохондрий. В это время необходимым является использование большого количества “холостого” цитохрома b_5 , который обеспечивает контакт мембранных структур и быстрое уравнивание редокс-потенциала.
2. Опосредованный перенос малат-аспартатным и изоцитратным шунтированием (челночным механизмом), когда внутримитохондриальный NADH может участвовать в микросомальном гидроксилировании путем передачи электрона на комплекс цитохром P450-субстрат. Таким образом, микросомальная электронно-транспортная система нужную для окисления ксенобиотиков энергию получает с митохондрий не в виде химической энергии АТФ, а в виде электронов с соответствующей энергией.

Несмотря на существование такого утонченного механизма регуляции, считается, что для процесса гидроксилирования митохондриальный источник электронов все же является дополнительным по сравнению с тем тем источником, который представлен в виде микросомальной NADPH-зависимой электронно-транспортной системы.

3. Регуляция на субстратном уровне. Окисление ксенобиотиков органически связано с течением цитохром P450-зависимых внутриклеточных процессов. Суть такой зависимости состоит в том, что участвующий в превращении внутриклеточных соединений цитохром P450 способен также трансформировать чужеродные вещества. Проникновение ксенобиотиков в клетку является регуляторным сигналом, который вызывает

переключение монооксигеназной системы от внутриклеточных процессах на детоксикацию ксенобиотиков. “Опознавание субстрата” цитохромом P450 происходит не по эндогенному и экзогенному происхождению веществ, а по их физико-химическим свойствам. В частности, чем гидрофобнее субстрат и выше его сродство к ферменту, тем больше количество цитохрома P450 переключается из общего внутриклеточного фонда на гидроксилирование ксенобиотиков. Таким образом, специфичность цитохрома P450 к гидрофобным соединениям обуславливает существование его регуляции на субстратном уровне.

4. Регуляция на уровне индукции. Цитохром P450 индуцибельный белок и его содержание в клетке резко меняется под воздействием различных факторов (ксенобиотиков, патогенов, освещения и др.). Эффект индукции ксенобиотиков в большей степени зависит от химической природы продуктов окисления. Чем меньше радикал образующая способность, тем больше вызывают они повышение содержания цитохрома P450. Ферментная система более интенсивно окисляет не только индукторы-ксенобиотики, но и токсиканты различной химической природы. Таким образом, регуляция цитохрома P450 осуществляется на уровне индукции фермента.

5. Регуляция цитохрома P450 на уровне его химической модификации. Заслуживает внимания еще один уровень регуляции активности цитохрома P450, который осуществляется путем химической модификации фермента. Цитохром P450, как и другие оксидазы, в результате проявления каталитической активности генерирует множество разных, ненужных клетке радикалов – активных форм кислорода или реакционноспособных интермедиатов. В это время гемопротейн претерпевает химическую модификацию (например, происходит ацилирование гема или апофермента), вследствие чего происходит самоинактивация цитохрома P450 и образование опасных для клетки промежуточных соединений пресекается в основе же. В отличие от животной клетки, где свободные радикалы путем модификации гема и последующей деструкции вызывают полную инактивацию цитохрома P450, в растительной клетке химическая модификация гемопroteина происходит таким образом, что цитохром P450 сохраняет свою каталитическую активность в виде пероксидазы. Путем такой трансформации растительная клетка, как и животная, освобождается от генератора агрессивных интермедиатов (цитохрома P450), а в отличие от животной – придает этому же ферменту функцию пероксидазы. Таким образом, клетка приобретает фермент, который способен одновременно окислять ксенобиотики и ликвидировать агрессивные молекулы H_2O_2 .

Summary

Monograph is dedicated to the processes of xenobiotic oxidative degradation and the functional role of membrane components (enzymatic systems and lipids) in these processes. The scientific material is discussed from the point of the main principle of contemporary biochemistry – unity of structure and function.

The book consists of the three chapters. The first chapter is completely devoted to the morphological and molecular organization of endoplasmic reticulum membranes in which many enzymatic systems are localized, synthesizing different enzymes (glycoproteins, lipoproteins), phospholipids and triglycerides. Content of absorbed and not membrane proteins in endoplasmic membranes varies in wider limits. Quantitative amount of phospholipids and fatty acids remains comparatively constant in any conditions.

At differential centrifugation endoplasmic membranes are transformed into microsomes (semipermeable proteoliposomes). Due to the chemical content these microbodies reflect totally membranes and appear to be their biochemical equivalents.

The important components of endoplasmic reticulum are lipids. In the monograph precisely are discussed their composition, classification, amphiphilic characteristics and intermembrane orientation. Geometric orientation of lipid molecules in membranes is basically stipulated by the amphiphilic forces.

In the book separately is discussed the biodegradation of acylglycerides and proceeding in the endoplasmic reticulum peroxidation of lipids (fatty acids). It is shown the tight link between the given process and xenobiotic oxidation, as they are accomplished by the same set of enzymes.

In bilayer membrane the phospholipids have forms of liquid crystals, providing their mobility within the structure of regulated frame. Transmition of phospholipids from solid state is conditioned by the phase transformation at thermal effect. The phase transformation is effected by second important membrane component cholesterol. Being the regulator of membrane fluidity, cholesterol induces changes in viscosity and decreases temperature of phase transmition. Under cholesterol action is enhanced the mobility of fatty acid chains at temperature lower the phase transmition and their mobility is reduced at temperature higher the phase transmition. The concept fluidity implies viscosity of membrane. On the other hand, viscosity depends on mobility, which in

case of phospholipids is revealed in two types of mobility: intermolecular and intramolecular. Most membranes are characterized by dynamic and mobile structure but not hard and static. In this connection the hypothesis of „cluster” construction of xenobiotic oxidizing enzymatic systems (monooxygenases) is introduced, due to which the monooxygenases form stable complex with membranes.

In „cluster” composition are phospholipids distinguished from their basic mass by their physico-chemical parameters. In microsomes the presence of typical „clusters” is not observed. It's considered that in these organelles are functioning the so-called „clusters of unfinished structure”, in which electron transferers can be inserted additionally.

Xenobiotics biodegradation is accomplished by membrane bound oxidoreductases, in particular, by cytochrome P450-containing monooxygenases. Their detect perfectly and attack the vulnerable sites of xenobiotic molecules.

The second chapter is devoted to the separate components of the enzyme systems forming the free electron-transfer chain of in endoplasmic reticulum, and catalyzing reactions of „microsomal oxidation”. To these processes belong: hydroxylase and reductase reactions, lipoperoxidation, formation of H_2O_2 , partial reactions of electron transfer in redox-chain, desaturation reactions etc.

Monooxygenases insert only one atom of molecular oxygen into the oxidizing substrate, and the second atom is reduced to water, i.e. simultaneously posses oxidase and reductase properties.

The basic components of monooxygenase system are NADPH-cytochrome P450 reductase (EC 1.6.2.4), NADH-cytochrome b_5 -reductase (EC 1.6.2.2), cytochrome b_5 and cytochrome P450. In the monograph are presented the structure of these components and the mechanisms of their effect providing cytochrome P450 by reducing equivalents of nicotinamid coenzymes. Precisely is discussed cytochrome P450, having several important functions. One of them, activation of molecular oxygen is nonspecific and characteristic of all the forms of the given enzyme. Substrate bounding is very specific function of the enzyme. This hemoprotein has the function of „receptor” protein and is specific not for one substrate, but for a definite class of toxicants. Practically, microsomal cytochrome P450 can join and oxidize or reduce almost all nonpolar, hydrophobic compounds.

In the third chapter are given the aspects of regulation of cytochrome P450-dependent oxidation of xenobiotics. Taking into consideration the peculiarities of functioning of monooxygenase system, the authors substantiate the existance

of not less the levels of regulation, supported by the current data and the data of other authors:

1. Regulation on a membrane level. In the result of biochemical evolution intracellular membranes and enzymatic barriers are bound to each other. Monooxygenases reveal their catalytic activity only after joining with membrane (acquiring the quinary structure). For these enzymes the membrane has to play not only the function of fixator („cement”) but also is the necessary cofactor of their activation. The comprehensive analysis of membrane phospholipid function shows, that they participate in all stages of hydroxylation and are indispensable components of NAD(P)H-dependent electron-transfer system.

Regulatory action of membrane lipids on xenobiotics hydroxylation is revealed the change of their physical state due to the effect temperature or other factors. Phase transformation from gel to liquid crystal state suppresses the energy for activation the enzymatic reaction which is revealed in reduction of phospholipid/protein interaction.

In the monograph separately are discussed: the effect of phospholipids on the structure and activity of cytochrome P450; their role in lipophylic binding of xenobiotics with hemoprotein; interaction of NADPH-cytochrome P450-reductase with cytochrome P450; NADH-cytochrome b_5 -reductase with cytochrome b_5 etc. It is distinctly proved that regulatory effect of phospholipides on the components of monooxygenase system is determined by physical and not chemical action.

2. Regulation on the level of reducing equivalents. For activation of molecular oxygen inserting in xenobiotic, cytochrome P450 uses reducing equivalents. Therefore, xenobiotics hydroxylation is depended on all the electron-transfer systems, providing hemoprotein with the needed electrons. Participation of cytochrome oxidase system in electron migration from mitochondria to microsomes was firstly revealed on liver hepatocytes. The concept of it is the stimulation of xenobiotics microsomal hydroxylation by the substrates of mitochondrial oxidation. Thus, the mitochondria accomplish cell control of biotransformation of xenobiotic compounds in endoplasmic reticulum. For such control extent of two mechanisms are acceptable:

1. Transfer of reducing equivalents from mitochondria to microsomes via mitochondrial and microsomal cytochrome b_5 . For accomplishment of this process the immediate contact of the two membrane structures is necessary. In combined systems of mitochondria and microsomes is shown, that at addition of pyruvate the membranes of endoplasmic reticulum transform

into vesicles and are oriented around the mitochondria. At this time it's necessary to use, the large amount of „free” cytochrome b_5 , which provides the contact of membrane structures and fast balancing of redox potential.

2. Mediatary transfer by malat-aspartate and isocitrate shunting (shuttle mechanism) when intermitochondrial NADH can participate in microsomal hydroxylation via electron transfer to the complex cytochrome P450–substrate. Thus, microsomal electron-transfer system receives energy needed for xenobiotic oxidation from mitochondria not as a chemical energy ATP, but as electrons with the corresponding energy.

Despite such subtle mechanism of regulation, it's considered that for hydroxylation the mitochondrial electron source is supplementary as compared with the source which is microsomal NADPH-dependent electron-transfer system.

3. **Regulation on the substrate level.** Xenobiotic oxidation is linked organically with cytochrome P450-dependent intracellular processes. The concept of such dependence is stated in the fact that participating in transformation of intracellular compounds – cytochrome P450 is capable to transform foreign substrates. Penetration of xenobiotics into the cell is the regulatory signal causing switch of monooxygenase system from intercellular processes to xenobiotic detoxification. Substrate „identification” by cytochrome P450 occurs not due to endogenous or exogenous origin of substrates, but due to their physico-chemical characteristics. In particular, the more hydrophobic is the substrate and higher its affinity to enzyme, the more amount of cytochrome P450 is switched from the total intercellular fund to xenobiotic hydroxylation. Hence, specificity of cytochrome P450 to hydrophobic compounds stipulates of its regulation on the substrate level.

4. **Regulation on the induction level.** Cytochrome P450 is inducible protein and its content in cell is sharply changed under the effect of different factors (xenobiotics, pathogens, light, etc). The effect of xenobiotic induction is mostly depended on the chemical nature of the oxidation products. The less is the radical forming ability, the more they increase the cytochrome P450 content. Enzyme system oxidizes more intensively not only inductor-xenobiotics, but also toxicants of different chemical nature. Hence, regulation of cytochrome P450 is realized on the level of enzyme induction.

5. **Regulation of cytochrome P450 on the level of its chemical modification.** Great attention must be paid to one more level of regulation of cytochrome P450 activity, which is realized via chemical modification of enzyme. Cytochrome P450, like other oxidases, as a result of catalytic activity, generate

many different useless for the cell radicals-active forms of oxygen or reactive intermediates. At this time hemoprotein undergoes chemical modification (e.g. occurs acylation of heme or apoenzyme), leading to self-inactivation of cytochrome P450 and the formation of dangerous for cell intermediates is suppressed in the basis. Unlike the animal cell, in which free radicals via modification of heme and further destruction induce full inactivation of cytochrome P450, in plant cell chemical modification of hemoprotein occurs so that cytochrome P450 maintains its catalytic activity as peroxidase. Via such transformation the plant cell similar to animal avoids aggressive intermediate generator – cytochrome P450; unlike the animal, attach to this enzyme function of peroxidase. Thus, cell acquires enzyme, capable to simultaneously oxidize xenobiotics and liquidate aggressive molecules of H_2O_2 .

- Хокин Л., Хокин М. *Химия клеточных мембран*. В сб.: „Молекулы и клетки“. вып. 2. М., Мир, 1967
- Ахрем А.А., Титов Ю.А. *Стероиды и микроорганизмы*. М., Наука, 1970
- Владимиров Ю.А., Арчаков А.И. *Перекисное окисление липидов в биологических мембранах*. М., Наука, 1972
- Хефтман Э. *Биохимия стероидов*. М., Мир, 1972
- Парк Д.В. *Биохимия чужеродных соединений*. М., Медицина, 1973
- Арчаков А.И. *Микросамальное окисление*. М., Наука, 1975
- Угрехелидзе Д.Ш. *Метаболизм экзогенных алканов и ароматических углеводов в растениях*. Тбилиси, Мецниереба, 1976
- Капальди Р. *Динамическая модель клеточных мембран*. В сб.: “Молекулы и клетки”. вып. 6. М., Мир, 1977
- Неорганическая биохимия*. Под ред. Г. Эйхгорна. т. 2. М., Мир, 1978
- Ляхович В.В., Цырлов И.Б. *Структурные аспекты биохимии монооксигеназ*. Новосибирск, Наука, 1978
- Головенко Н.Я. *Механизмы реакций метаболизма ксенобиотиков в биологических мембранах*. Киев, Наукова думка, 1981
- Ляхович В.В., Цырлов И.Б. *Индукция ферментов метаболизма ксенобиотиков*. Новосибирск, Наука, 1981
- Метелица Д.И. *Активация кислорода ферментными системами*. М., Наука, 1982
- Metabolic Basis of Detoxification. Metabolism of Functional Groups*. W.B. Jakob, J.R. Bend, J Caldwell (Eds.) NY, Acad. Press, 1982
- Арчаков А.И. *Оксигеназы биологических мембран*. М., Наука, 1983
- Метелица Д.И. *Моделирование окислительно-восстановительных ферментов*. Минск, Наука и техника, 1984
- Угрехелидзе Д.Ш., Дурмишидзе С.В. *Поступление и детоксикация органических ксенобиотиков в растениях*. Тбилиси, Мецниереба, 1984
- Cytochrome P-450*. K. Ruckpaul, H. Rein (Eds.) Berlin, Akademik-Verlag, 1984
- Сим Э. *Биохимия мембран*. М., Мир, 1985
- Ленинджер А. *Основы биохимии*. т.2. М., Мир, 1985
- Ковалев И.Е., Полевая О.Ю. *Биохимические основы иммунитета к низкомолекулярным химическим соединениям*. М., Наука, 1985
- Мишин В.М., Ляхович В.В. *Множественные формы цитохрома P-450*. Новосибирск, Наука, 1985
- Овчинников Ю.А. *Биоорганическая химия*. М., Просвещение, 1987
- Дурмишидзе С.В. *Биохимия растений и охрана окружающей среды*. В кн.: “Биотрансформация ксенобиотиков в растениях”. Тбилиси, Мецниереба, 1988

- Скулачев В.П. *Энергетика биологических мембран*. М., Наука, 1989
- Archakov A.I., Bachmanova G.I. *Cytochrome P-450 and Active Oxygen*. NY, Taylor & Francis, 1990
- Murray R.K., Granner D.K., Mayes P.A. Rodwell W.W. *Harper's Biochemistry*. Prentice-Hall International Inc, 1993
- Textbook of Biochemistry with clinical correlations*. T.M. Devlin (Ed.) NY, Willey-Less, 1997
- Nelson D.L., Cox M.M. *Lehninger Principles of Biochemistry*. NY, Worth Publishers, 2000
- მ. გორდუზიანი, გ. კვესიტაძე. *ეკოლოგიის ქიმიური საფუძვლები*. თბილისი, 2000
- Hodgson E., Goldstein J.A. *Metabolism of toxicants: phase I reactions and pharmacogenetics*. In: Hodgson E, Smart RC (Eds) *Introduction to biochemical toxicology*. 3rd edn, Wiley, 2001
- მ. გორდუზიანი, გ. ხატისაშვილი, ე. კირთაძე. *ბიოენერგეტიკა და ჟანგვითი პროცესების რეგულაცია*. თბილისი, 2004

მიმოხილვითი სტატიები

- Russel D.W. The metabolism of aromatic compounds in higher plants. *J. Biol. Chem.*, 1971, 246, 3870–3878.
- Rich P.R., Bendall D.S. Cytochrome components of plant microsomes. *Eur. J. Biochem.*, 1975, 55, 333–341.
- West Ch.A. Hydroxylases, monooxygenases and cytochrome P-450. In: *The Biochemistry of Plants. 2. Metabolism and Respiration*. 1980, N.-Y., Acad. Press, 317–364.
- Hendry G.A.F. Why do plants cytochrome P-450? Detoxification versus defence. *New Phytol.*, 1986, 102, 239–247.
- Durst F. Physiology and biochemistry of plant cytochrome P-450. In *Frontiers in Biotransformation*, Berlin, Akademy Verlag, 1991, vol. 4, 191–232.
- Salaün J.-P. Metabolization de xenobiotiques par des monooxygenases a cytochrome P-450 chez les plantes. *Oceanis*, 1991, 17, 459–474.
- Sandermann H. Higher plant metabolism of xenobiotics: the “green liver” concept. *Pharmacogenetics*, 1994, 4, 225–241.
- Karuzina I.I., Archakov A.I. Hydrogen peroxide-mediated inactivation of microsomal cytochrome P-450 during monooxygenase reactions. *Free Radic. Biol. Med.*, 1994, 17, 557–567.
- Salaün J.-P., Helvig C. Cytochrome P450-dependent oxidation of fatty acids. In: Durts F., O’Keef D.P. (Eds.) *Drug metabolism and drug interactions*. Freund Publishing House, England, 1995, pp 12–49.

- Hanukoglu I. Electron transfer proteins of cytochrome P450 systems. *Adv. Mol. Cell. Biol.*, 1996, 14, 29–55.
- Schuler M.A. Plant cytochrome P450 monooxygenases. *Crit. Rev. Plant Sci.* 1996, 15, 235–284.
- Durst F., Benveniste I., Lesot A.A., Saladin J.-P., Werck-Reichhart D. Induction of plant cytochrome P-450. In: *Regulation of Enzymatic Systems Detoxifying Xenobiotics in Plants*, Dordrecht/Boston/London, Kluwer Academic Publishers, 1997, 19–34.
- Robineau T., Batard Y., Nedelkina S., Cabello-Hurtado F., LeRet M., Sorokine O., Didierjean L., Werck-Reichhart D. The chemically inducible plant cytochrome P450 CYP76B1 actively metabolizes phenylureas and other xenobiotics. *Plant Physiol.* 1998, 118, 1049–1056.
- Chapple C. Molecular-genetic analysis of plant cytochrome P450-dependent monooxygenases. *Annual Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 1998, 49, 311–343
- Morant M., Bak S., Moller B.L., Werck-Reichhart D. Plant cytochromes P450: tools for pharmacology, plant protection and phytoremediation. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2003, 2, 151–162.

საქართველოს მეცნიერებათა აკადემიის ს. ღურმეზიძის სახ. ბიოქიმიისა და ბიოტექნოლოგიის ინსტიტუტის ბიოლოგიური ჟანგვის ლაბორატორიის ძირითადი პუბლიკაციები მცენარეთა მემბრანულ ქსენობიოქიმიამო

1. Дурмишидзе С.В., Гордезиани М.Ш., Бобохидзе Е.А. Влияние холестерина на некоторые ферментные системы растительной клетки. *Известия АН ГССР, сер. биол.* 1978, 4, 4, 327–334.
2. Гордезиани М.Ш., Бобохидзе Е.А. Изменение количественного соотношения процессов этерификации и окислительных превращении холестерина в листьях растений Влияние холестерина на некоторые ферментные системы растительной клетки. *Сообщ. АН ГССР*, 1978, 92, 2, 449–452.
3. Дурмишидзе С.В., Гордезиани М.Ш., Бобохидзе Е.А. Об окислении холестерина в растительной клетке. *Известия АН ГССР, сер. биол.* 1979, 5, 1, 149–155.
4. Гордезиани М.Ш., Дурмишидзе С.В., Курашвили Л.К. N-Деметилазная и p-гидроксилазная активность семядолей сои и кукурузы. *Сообщ. АН ГССР*, 1979, 96, 3, 717–720.
5. Гордезиани М.Ш., Дурмишидзе С.В., Курашвили Л.К. Восстановление фосфатидилхолином ингибированных детергентом реакции гидроксирования в целой растительной ткани. *Сообщ. АН ГССР*, 1981, 104, 2, 465–468.
6. Гордезиани М.Ш., Дурмишидзе С.В., Курашвили Л.К. Ингибирующий эффект медь-тирозинового комплекса на NADPH- и гидроперекись-кумил стимулированное гидроксирование некоторых ксенобиотиков в растительной ткани. *Сообщ. АН ГССР*, 1981, 104, 3, 725–728.
7. 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, 29, 5, 978–984.
8. Гордезиани М.Ш., Дурмишидзе С.В., Бобохидзе Е.А., Ломидзе Э.П. Микросомальное деметилирование диметиланилина и p-нитроанизола в смешанной системе растительные микросомы–митохондрий. *Известия АН ГССР, сер. биол.* 1986, 12, 1, 42–46.
9. Хатисашвили Г.А., Адамия Г.С., Гордезиани М.Ш., Ломидзе Э.П., Брискер В.Л. Полярографическое исследование гидроксимирующей способности растительных микросом. *Сообщ. АН ГССР*, 1986, 123, 3, 621–623.
10. Гордезиани М.Ш. Цитохром Р-450 в растениях. *ДАН СССР. Известия АН ГССР, сер. биол.* 1987, 13, 3, 177–186.
11. Гордезиани М.Ш., Дурмишидзе С.В., Хатисашвили Г.А., Адамия Г.С., Ломидзе Э.П. Исследование биосинтетической и детоксикационной способности растительного цитохрома Р-450. *ДАН СССР*, 1987, 295, 6, 1491–1493.

12. Гордезиани М.Ш., Хатисашвили Г.А., Адамия Г.С., Ломидзе Э.П. Возможность переключения цитохрома Р-450 с „эндогенного” на „экзогенный” режим обмена. *Сообщ. АН ГССР*. 1987, 126, 1, 161–164.
13. Гордезиани М.Ш., Хатисашвили Г.А., Адамия Г.С., Курашвили Л.К. Исследование некоторых функций цитохрома Р-450 растительных микросом. *Тез. докл. IV Всесоюз. конф. „Цитохром Р-450 и охрана окружающей среды”*, Новосибирск, 1987, 51–52.
14. Гордезиани М.Ш., Хатисашвили Г.А., Адамия Г.С. Цитохром Р-450-содержащая монооксигеназная система растительных мембран. *Труды VIII междуниверситетской конф. „Биологические мембраны в норме и патологии”* Тбилиси, 1989, 41–43.
15. Хатисашвили Г.А., Гордезиани М.Ш., Ломидзе Э.П., Адамия Г.С. Редокс-цикл НАДФН при недостатке кислорода в бесклеточной системе растений. *Тез. докл. V Всесоюз. конф. „Цитохром Р-450 и модификация макромолекул”*. Ялта, 1989, 155.
16. Курашвили Л.К., Гордезиани М.Ш. Перекисное окисление мембранных липидов и реакция N-деметилирования диметиланилина в растительных микросомах. *Сообщ. АН ГССР*. 1990, 137, 2, 397–400.
17. Тогонидзе Л.Ш., Хатисашвили Г.А., Гордезиани М.Ш., Кобахидзе М.Ж. NADPH-зависимое фракционное окисление диметиланилина в листьях растений. *Сообщ. АН ГССР*. 1990, 140, 1, 125–128.
18. Гордезиани М.Ш., Хатисашвили Г.А., Квеситадзе Г.И. Свободное и сопряженное с гидроксилированием ксенобиотиков окисление NADPH. *ДАН СССР*. 1991, 320, 2, 417–420.
19. Хатисашвили Г.А., Гордезиани М.Ш., Курашвили М.В. Цитохромные компоненты растительных микросом и возможность их индукции. *Сообщ. АН Грузии*. 1991, 143, 2, 189–192.
20. Гордезиани М.Ш., Хатисашвили Г.А., Курашвили М.В. Распределение NADPH-цитохром Р-450-редуктазы в растительной клетке. *Сообщ. АН Грузии*. 1991, 143, 3, 321–324.
21. Khatishashvili, G., Gordeziani, M. Hydroxylation of xenobiotics by plant cytochrom P-450. *Proceed. 7-th Intern. conference „Biochemistry and Biophysics of Cytochrome P-450; Structure and Function, Biotechnological and Ecological Aspects”*. Held in Moscow, Russia, 1991. INCO-TNC Joint Stock Company, 1991, 546–548.
22. 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, сер. биол.* 1993, 19, 318–323.

23. Khatisashvili, G., Kurashvili, M., Gordeziani, M., Kvesitadze, G. Monooxygenase and peroxidase pathways of xenobiotics detoxication in higher plants. *Fresenius Environmental Bulletin*, 1993, 2, 103–108.
24. Khatisashvili, G., Kurashvili, M., Gordeziani, M., Kvesitadze, G. Functional evolution of separate components of plant monooxygenase system involved in xenobiotic detoxication. *Fresenius Environmental Bulletin*, 1994, 3, 621–626.
25. გ. ხატისაშვილი, მ. ყურაშვილი, მ. გორდეზიანი. მცენარეული მიკროსომული ფრაქციის გამოყოფა და მისი მჟანგველი სისტემების დაზიანება. *საქართველოს მეცნიერებათა აკადემიის მოამბე*, 1995, 152, 818–824.
26. Khatisashvili, G., Gordeziani, M., Kvesitadze, G., Korte, F. Plant monooxygenases: participation in xenobiotic oxidation. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 1997, 36, 118–122.
27. Gordeziani, M., Khatisashvili, G., Ananiashvili, T., Varazashvili, T., Kurashvili, M., Kvesitadze, G. Tkheldidze P. Energetic significance of plant monooxygenase individual components participating in xenobiotic degradation. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 1999, 44, 49–54.
28. Zaalishvili, G., Khatisashvili, G., Ugrekheldidze D., Gordeziani, M., Kvesitadze G. Plant potential for detoxification (Review). *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2000, 36, 5, 443–451.
29. Korte, F., Kvesitadze G., Ugrekheldidze D., Gordeziani, M., Khatisashvili, G. Buadze, O. Zaalishvili, G., Coulston, F. Review: Organic toxicants and plants. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2000, 47, 1, p.1–26.
30. თ. ვარაზაშვილი, მ. ყურაშვილი, მ. ფრუიძე, მ. გორდეზიანი. მცენარის ადაპტაციურ პროცესებში მონოოქსიგენაზური სისტემის მონაწილეობის შესახებ. *აგრარული მეცნიერების პრობლემები*. სამეცნიერო შრომათა კრებული. 2000, 110–111.
31. Zaalishvili G., Ebelashvili M., Varazashvili T., Pruidze M., Sadunishvili T. Influence of nitrobenzene different concentrations on maize root tip cells ultrastructure results. Biotechnology 2000. *Health care Agriculture and Food Environmental Biotechnology*. ICC-Berlin, 2000, 3–8 september.
32. ე. კისკიძე, გ. ხატისაშვილი, მ. გორდეზიანი. მცენარის მონოოქსიგენაზური სისტემის ცვლილებები ქსენობიოტიკების ჟანგვისას. *აგრარული მეცნიერების პრობლემები*. სამეცნიერო შრომათა კრებული. IX, 2000, 115–118.
33. თ. ანანიაშვილი, გ. ხატისაშვილი, მ. გორდეზიანი. მცენარეული მონოოქსიგენაზური სისტემის საწყისი კომპონენტების ენერგეტიკული მნიშვნელობის შესახებ. *აგრარული მეცნიერების პრობლემები*. სამეცნიერო შრომათა კრებული. IX, 2000, 119–123.
34. Kiskeidze, E., Khatisashvili, G., Kurashvili, M., Shavgulidze, G. Action of lipid peroxidation on monooxygenase System participating in xenobiotic detoxifica-

- tion. *Bulletin of the Georgian Academy of Sciences*, 2000, 162, '1, 156–158.
35. Заалишвили Г.В., Хатисашвили Г.А., Угрехелидзе Д.Ш., Гордзениани М.Ш., Квеситадзе Г.И. Детоксикационный потенциал растений. Прикладная биохимия и микробиология, 2000. Т. 36, № 5. С. 515–524.
 36. Gogoberidze M., Zaalishvili G., Khatishashvili G., Ugrekheldidze D., Gordeziani M., Kvesitadze G. *Bioremediation – contemporary strategy of xenobiotics' detoxification*. Contaminated Soil 2000 (Proceedings of the 7th International FZK/TNO Conference), 2000, vol. 1, 397–404.
 37. Kvesitadze, G., Gordeziani, M., Khatishashvili, G., Sadunishvili, T., Ramsden, J.J. Some aspects of the enzymatic basis of phytoremediation. *Journal of Biological Physics and Chemistry* 2001, 1, 49–57.
 38. Варазашвили, М.В. Курашвили, М.В. Пруидзе, М.Ш. Гордзениани. Об участии монооксигеназной системы в процессах адаптации растений. *Известия Академии Наук Грузии. Биологическая серия*. 2001, 27, 33–37.
 39. Varazashvili T., Zaalishvili G., Kurashvili M., Pruidze M., Gordeziani M. Participation of the plant monooxygenase system in adaptation to environmental stress. *Journal of Biological Physics and Chemistry*. 2001, 1, 38–42.
 40. Varazashvili, T., Khatishashvili, 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.
 41. Adamia, G., Khatishashvili, G., Varazashvili, T., Ananiashvili, T., Gvakharia, V., Adamia, T., M. Gordeziani. Determination of the Type and Rate of Soil Contamination with Heavy Metals and Organic Toxicants on the Territories of Military Proving Grounds in Georgia. *Bulletin of the Georgian Academy of Sciences*, 167, '1, 2003, 155–158.
 42. Kurashvili M., Pruidze M., Kiskeidze E., Varazashvili T., Ananiashvili T., Khatishashvili G., Gordeziani M. Influence of different factors on nitrobenzene oxidation in the plant cell. *J. Biological Physics and Chemistry*. 2003, 3, 45–49.
 43. Kiskeidze, E., Zaalishvili, G., Ebelashvili, M., Khatishashvili, G., Kurashvili, M., Gordeziani, M. Changes of plant monooxygenase system during xenobiotic oxidation. *Proc. Georgian Acad. Sci., Biol. Ser.A*, 2003, 29, '5–6, 639–644.
 44. Khatishashvili, G., Adamia, G., Pruidze, M., Kurashvili, M., Varazashvili, T., Ananiashvili, T. TNT uptake and nitroreductase activity of plants. *8th International FZK/TNO Conference on Contaminated Soil. ConSoil 2003*, Gent, Belgium, 12–16 May 2003, 2482–2485.
 45. Khatishashvili, G., Kvesitadze, G., Adamia, G., N. Gagelidze, L. Sulamanidze, D. Ugrekheldidze D, Zaalishvili G, Ghoghoberidze M, Ramishvili M (2004) Bioremediation of contaminated soils on the former military locations and proving grounds in Georgia. *Journal of Biological Physics and Chemistry*. 2004, 4, 162–168.

შპს „აგროარქოსი“ შეკვეთა №7 ტირაჟი 100