

**ИНСТИТУТ КЛИНИЧЕСКОЙ ИММУНОЛОГИИ
СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ РАМН**

НАУЧНЫЙ ОТЧЕТ 1996

ANNUAL REPORT 1996

**INSTITUTE OF CLINICAL IMMUNOLOGY
SIBERIAN BRANCH OF RUSSIAN ACADEMY
OF MEDICAL SCIENCES**

NOVOSIBIRSK 1997

МЕХАНИЗМ ЦИТОХРОМ Р-450-ЗАВИСИМОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПОФИЛЬНЫХ СУБСТРАТОВ, ПРЕДПОЛАГАЮЩИЙ ОБРАЗОВАНИЕ КАРБАНИОНОВ

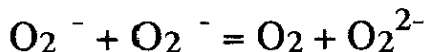
Вольский Н. Н.

Важнейшим моментом в понимании механизма окисления разнообразных липофильных субстратов, метаболизируемых микросомальной монооксигеназной системой, является определение активированного кислородного интермедиата, непосредственно атакующего субстрат. Сделано предположение о том, что основным механизмом "активации" молекулярного кислорода может быть следующая цепь реакций, происходящих в гидрофобной области микросомальной мембраны:

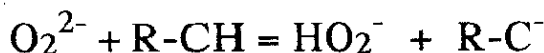
1) восстановление кислорода до супероксидного радикала, катализируемое НАДФН: цитохром Р-450-редуктазой



2) реакция дисмутации O_2^- с образованием пероксидного аниона



В апротонной среде (внутри мембраны) эта реакция должна быть резко сдвинута влево, поскольку анион O_2^{2-} нестабилен и для его стабилизации требуется присоединение протона. Энергия, выделяемая при присоединении H^+ к O_2^{2-} , сравнима с энергией, необходимой для отрыва протона от окисляемого субстрата, и поэтому в присутствии липофильных субстратов ($\text{R}-\text{CH}$) становится возможной реакция, приводящая к образованию соответствующих карбанионов ($\text{R}-\text{C}^-$)



Таким образом, предполагаемая цепь реакций через стадию "активации" O_2 приводит к образованию "активированного субстрата". Возникающие карбанионы высокореакционноспособны и могут окисляться O_2 с образованием интермедиатов вида $\text{R}-\text{COO}^-$, которые подвергаются дальнейшим превращениям, причем цитохром Р-450 выполняет в этом процессе функцию пероксидазы.

Предлагаемая гипотеза позволяет объяснить ряд экспериментальных фактов (необходимость липидного компонента для реконструкции гидроксилирующей системы, ее ингибирование протонофорами, феномен соокисления типичных субстратов в простагландинсинтетазной и других ферментативных реакциях, сопровождающихся генерацией O_2^- , и т. д.) и прогнозировать окисление различных субстратов микросомальными монооксигеназами. Обсуждаются следствия данного предположения для понимания иммунорегуляторных механизмов, опосредуемых генерацией активных форм кислорода в клеточных мембранах.

MECHANISM OF CYTOCHROME P-450-DEPENDENT OXIDATIONS OF LIPOPHILIC SUBSTRATES: A CARBANION HYPOTHESIS

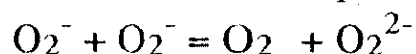
Volsky N. N.

The identification of an activated oxygen intermediate action on substrates is the key to understand the mechanism of lipophilic substance oxidative metabolism by microsomal monooxygenases. It is supposed that the main mechanism of molecular oxygen activation may be the chain of the following reactions which take place in the hydrofobic region of microsomal membranes:

1) reduction of oxygen to superoxide anion catalysed by NADPH cytochrome P-450 reductase



2) reaction of dismutation O_2^- with the peroxide anion formation



In aprotic medium (within the membrane) anion O_2^{2-} is unstable (for its stabilization is required a proton binding) and hence an equilibrium of this reaction is profoundly shifted to the left. The energy release by H^+ binding to O_2^{2-} is comparable to the amounts of energy required for proton abstraction from oxidizing substrate. As a consequence, in the presence of lipophilic substances (R-CH) has been made possible a reaction leading to the formation of corresponding carbanions (R-C⁻)



Thus, the supposed chain of reactions leads via stage of oxygen activation to the formation of "activated substrate". The extremely reactive carbanions can interact with molecular O_2 to produce intermediates of the type R-COO⁻ which undergo the following transformation. The cytochrome P-450 is acting as peroxidase in this process.

The advanced hypothesis provides an explanation for a variety of experimental data (requirements for lipid component by hydroxylase reconstruction, inhibiting activity of protonofores, co-oxygenation of typical substrates by action of prostaglandinsynthase and other enzymes producing O_2^- , and so on) and allows to predict an oxidation of various substances by microsomal monooxygenases. The consequences of this hypothesis for understanding of immunoregulatory mechanisms involving the generation of active oxygen metabolites within cell membranes is discussed.

Вольский Н.Н.

Механизм цитохром Р-450-зависимого окисления липофильных субстратов, предполагающий образование карбанионов

(Доклад на конференции 1997 года)

Окислительный метаболизм липофильных субстратов, происходящий в мембранах животных клеток (эндоплазматическом ретикулуме, митохондриях и других мембранах), играет ключевую роль во многих метаболических и регуляторных процессах и является биохимической основой многих клеточных функций: среди них такие, как синтез холестерина, десатурация жирных кислот, перекисное окисление мембранных липидов, синтез стероидных гормонов, витамина D₃, метаболизм простагландинов, тироксина, метаболизм огромного числа ксенобиотиков, включая лекарства и химические канцерогены.

Многочисленными исследованиями установлено, что окислительные реакции этого типа осуществляются мультиферментной системой, главными компонентами которой считаются содержащая флаavin НАДФН-цитохром Р-450 редуктаза и обширное семейство гомологичных гем-содержащих белков, объединяемых под именем цитохрома Р-450.

Классическая схема, объясняющая механизм гидроксирования - типичного для данной системы окислительного превращения липофильных субстратов, - была предложена Эстабруком с соавторами почти 30 лет назад и, несмотря на некоторые вносимые в нее изменения, принимается в качестве основополагающей до настоящего времени. На слайде [слайд 1] представлен один из вариантов этой схемы. Характерными особенностями данной схемы являются следующие моменты:

1) центральное место на схеме занимает цитохром Р-450, который специфически связывает субстрат и на гемовое железо которого переносятся электроны с НАДФН-цитохром Р-450 редуктазы;

2) механизм катализа заключается в уникальной способности этого цитохрома активировать молекулу O₂ с разрывом связи O-O и внедрением одного из атомов кислорода в молекулу субстрата (другой атом O₂ оказывается при этом в воде; что обусловило название этого типа ферментов монооксигеназами).

Суммарная реакция: $SH + 2e + O_2 + 2H^+ = SOH + H_2O$

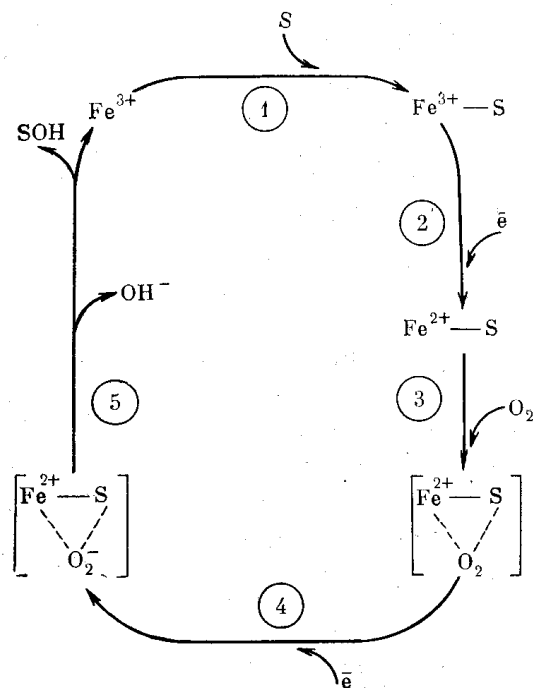


Схема 1. Механизм реакций гидроксилирования (по данным Эстабрука и соавт.)

S — гидроксилируемый субстрат; Fe — железо гема цитохрома P-450

В рамках этой схемы удалось описать основные (регистрируемые, главным образом, спектрофотометрически) этапы постулированной последовательности реакций и, хотя многие экспериментальные факты этой схемой не объясняются и хотя во многих работах, в которых исследовались конкретные окислительные реакции, для объяснения полученных данных предполагаются механизмы реакций, не укладывающиеся в эту общую схему (в частности, свободнорадикальные механизмы), в целом, предложенный 30 лет назад механизм гидроксилирования (и аналогичных окислительных реакций) не подвергается серьезной критике.

С моей точки зрения, главным недостатком классической схемы является ее малая теоретическая продуктивность: несмотря на бурный рост числа исследований, связанных с цитохром P-450-зависимыми монооксигеназами, за 30 лет существования данная схема ни сама не развивалась, оставаясь практически неизменной, ни дала ключей к решению ни одной из существующих в данной области проблем.

Целью настоящего доклада является изложение гипотезы, предполагающей механизм гидроксилирования типичных липофильных субстратов, который существенно отличается от вышеприведенной схемы.

Гипотеза базируется на двух экспериментально установленных и в настоящее время никем не оспариваемых фактах:

1) НАДФН-цитохром P-450 редуктаза (как и другие флавиновые ферменты) способна восстанавливать молекулярный O_2 до супероксидного радикала (O_2^-) и этот процесс запускается в микросомах одновременно с инициацией реакций гидроксилирования; однако, как известно, сам O_2^- не обладает достаточной реакционной способностью, чтобы разорвать С-Н связь и гидроксилировать типичные субстраты.

2) Гидроксилирование, катализируемое микросомальной монооксигеназной системой, возможно только в мембране или в замещающей ее липидной фазе, и не происходит в водных растворах, что было давно установлено при попытках реконструирования гидроксилирующих систем из очищенных микросомальных ферментов.

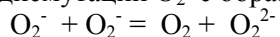
Учитывая эти - на мой взгляд, принципиальные - факты, которые не играют существенной роли в схеме Эстабрука, предполагается, что ключевым процессом, без

которого невозможно окисление типичных субстратов, является реакция дисмутации O_2^- , происходящая в гидрофобной области микросомальной мембраны (т.е. в беспротонной, в отличие от воды, среде) и приводящая к образованию активированного кислородного интермедиата, непосредственно атакующего субстрат. Схема, представляющая соответствующую цепь реакций, показана на слайде 2 и состоит из:

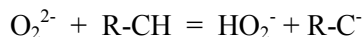
1) восстановления кислорода до супероксидного радикала, катализируемое НАДФН:цитохром Р-450-редуктазой внутри мембраны, где концентрация O_2 в 4-5 раз больше, чем в окружающей мембрану водной фазе



2) реакция дисмутации O_2^- с образованием пероксидного аниона



В водных растворах (где достаточно высока концентрация протонов и где обычно изучаются реакции с участием радикалов кислорода) эта реакция высокоэкзотермична и идет с огромной скоростью, но в апротонной среде (внутри мембраны) эта реакция должна быть резко сдвинута влево, поскольку анион перекиси водорода O_2^{2-} нестабилен и для его стабилизации требуется присоединение протона. Энергия, выделяемая при присоединении H^+ к O_2^{2-} , сравнима с энергией, необходимой для отрыва протона от окисляемого субстрата и поэтому в присутствии липофильных субстратов (R-CH) становится возможной реакция, приводящая к образованию соответствующих карбанионов (R-C-)



Таким образом, предполагаемая цепь реакций через стадию «активации» O_2 приводит к образованию «активированного субстрата». Возникающие карбанионы высокореакционноспособны и могут окисляться O_2 с образованием интермедиатов вида R-COO-, которые подвергаются дальнейшим превращениям, причем цитохром Р-450 выполняет в этом процессе функцию пероксидазы (при этом роль восстановителя играет анион перекиси водорода, а окислителя - анион гидроперекиси субстрата, распадающийся на окисленный субстрат и гидроксильный ион).

Суммарная реакция: $R-CH + 2e + O_2 + 2H^+ = R-COH + H_2O$

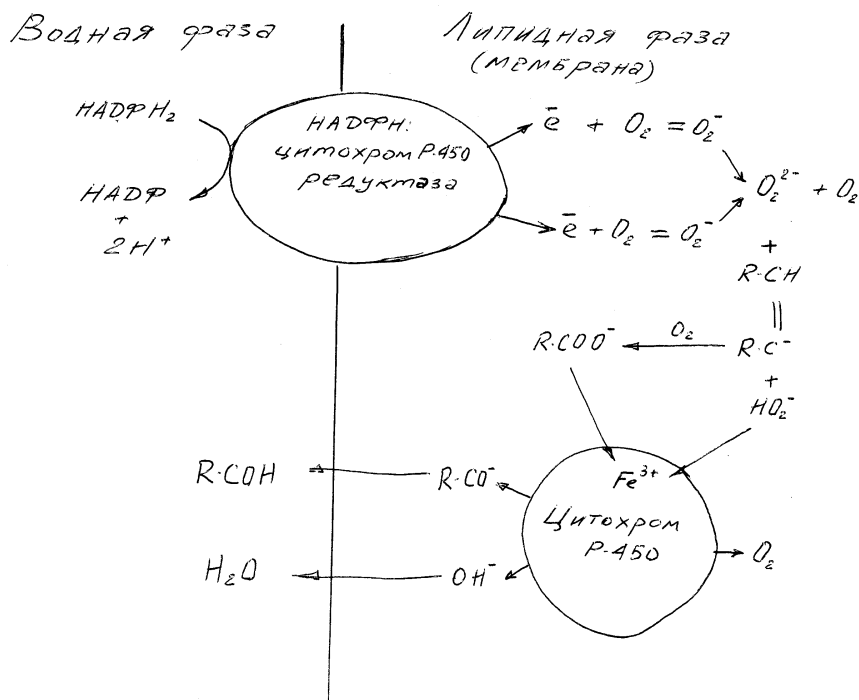


Схема 2. Карбанионный механизм гидроксирования

Из слайда видно, что суммарная реакция, протекающая по данному механизму, идентична суммарной реакции в схеме Эстабука и, следовательно, так же хорошо совпадает с имеющимися экспериментальными данными.

Предлагаемая гипотеза позволяет объяснить ряд экспериментальных фактов, не находящихся своего объяснения в классической схеме гидроксилирования.

1) Из нее вытекает необходимость мембраны или липидного компонента в реконструированных гидроксилирующих системах.

2) Она предсказывает ингибирование окислительного метаболизма субстратов липофильными соединениями, реагирующими с O_2^- (экспериментально установлено ингибирование метаболизма некоторых субстратов хелатами меди с супероксиддисмутазной активностью $Cu(Lys)_2$ и $Cu(Tyr)_2$).

3) Из нее следует, что глюкокортикоидные гормоны, стимулирующие продукцию O_2^- , могут ускорять метаболизм типичных субстратов. И этот факт много лет назад был установлен экспериментально.

4) Из гипотезы следует также, что появление в мембране доноров протонов должно ингибировать процессы гидроксилирования - предсказание, никак не укладывающееся в механизм, постулируемый существующей схемой. Факт ингибирования метаболизма классическим протонофором СССР был установлен в лаборатории Ляховича в 1975 году; позднее другими исследователями было показано аналогичное действие другого - известного в митохондриологии - протонофора - динитрофенола.

5) Предполагаемое гипотезой образование карбанионов было обнаружено экспериментально в процессе метаболизма некоторых субстратов.

6) Из гипотезы следует, что при метаболизме ряда гомологичных субстратов скорость окисления должна (при прочих равных условиях) увеличиваться с уменьшением величины pK_a (т.е. при уменьшении энергии, необходимой для отрыва протона). Это подтверждается данными, полученными в 60-70 годы и говорящими о том, что микросомальный метаболизм третичных метилзамещенных аминов существенно зависит от двух факторов: скорость метаболизма увеличивается с увеличением липофильности гомологичных аминов (что очевидно) и с уменьшением величины pK_a (что хорошо согласуется с предлагаемым механизмом, но вовсе не следует из схемы Эстабука).

Если предлагаемый механизм верно отражает суть окислительных реакций, происходящих в клеточных мембранах, из него следует несколько принципиальных выводов:

1. Окислительный метаболизм липофильных субстратов не требует обязательного участия цитохрома P-450 (хотя он и играет очень важную роль в этих процессах) и может происходить в любых мембранах, где генерируется O_2^- (в том числе, в плазматической мембране).

2. Если наличие цитохрома P-450 не является обязательным для метаболизма типичных субстратов, то этот метаболизм может быть смоделирован без участия белковых катализаторов, что может иметь большое практическое значение.

3. Регистрируемые в водной фазе O_2^- и продукты его дисмутации представляют собой побочное явление, лишь косвенно свидетельствующее о происходящих в мембране процессах. Главной же целью генерации O_2^- в мембранах (особенно в плазматической мембране) является окисление неких естественно присутствующих в мембране эндогенных субстратов с образованием продуктов, обладающих регуляторными свойствами и являющихся внутриклеточными и межклеточными медиаторами. Мембраны в таком случае могут играть роль естественных «проводов», по которым транспортируются как электроны (в виде O_2^-), так и уже окисленные регуляторные молекулы.

Поскольку в конце доклада надо ответить на дежурный вопрос: «И где же здесь иммунология?» - я хочу сказать, что этот третий вывод имеет, на мой взгляд, непосредственное отношение к иммунорегуляторной роли супероксид-продуцирующих ферментов - главным образом, роли НАДФН-оксидазы, обнаруживаемой в мембранах фагоцитирующих клеток. Если, в соответствии с вышеизложенным, считать, что основная функция собственно НАДФН-оксидазы (флаavin-содержащего фермента,

гомологичного микросомальной НАДФН-цитохром Р-450 редуктазе) заключается в окислении мембранных компонентов, опосредующих ее регуляторные эффекты, то приходится признать, что предпринимаемые до сегодняшнего дня попытки (в том числе, и наши) выяснить ее функцию путем «перехвата» активированных кислородных метаболитов в водной фазе могут давать (и дают) только косвенные и весьма запутанные свидетельства. Чтобы понять ее реальную иммунорегуляторную роль, необходимо изучать процессы окисления в гидрофобной области мембраны. Идентифицировав образующиеся здесь липофильные медиаторы и выяснив механизмы их влияния на клеточные функции, можно будет действительно разобраться в механизмах супероксид-зависимой регуляции апоптоза иммунокомпетентных клеток, их пролиферации, возможно, их дифференцировки, в частности, механизмов, определяющих развитие иммунного ответа по Th1- или Th2-зависимому типу, а также модулирование этих процессов со стороны гормонов, цитокинов, других внутри- и межклеточных регуляторов.