

Российская академия медицинских наук
Сибирское отделение
ГУ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
КЛИНИЧЕСКОЙ ИММУНОЛОГИИ

**ИММУНОПАТОГЕНЕЗ И ИММУНОТЕРАПИЯ
ОСНОВНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ ЧЕЛОВЕКА:
ОТ ЭКСПЕРИМЕНТА К КЛИНИКЕ**

Материалы 7-й отчетной конференции
ГУ НИИКИ СО РАМН

Под редакцией:
Директора ГУ НИИКИ СО РАМН
академика РАМН, профессора В. А. Козлова

Scientific report 2006
Institute of Clinical Immunology
Siberian Branch of Russian Academy of Medical Sciences

Новосибирск
2006 г.

ВОЗМОЖНАЯ РОЛЬ СУПЕРОКСИДНОГО РАДИКАЛА В ЭНЕРГЕТИКЕ КЛЕТКИ: ГИПОТЕЗА

Вольский Н.Н.

ГУ НИИ клинической иммунологии СО РАМН, Новосибирск

Предлагаемая гипотеза основывается на трех твердо установленных эмпирических фактах:

1. Растворимость молекулы кислорода в липидах в несколько раз превышает его растворимость в воде (при насыщении кислородом двухфазной системы «липид/вода» концентрация O_2 в липидах в 4–5 раз превышает его концентрацию в водной фазе).

2. Стандартный редокс-потенциал пары O_2/O_2^- равен $-0,34$ mV, что точно соответствует стандартному редокс-потенциалу пиридиннуклеотидов (пары $NAD^+/NADH$ и $NADP^+/NADPH$).

3. Супероксидный радикал (O_2^-), который в водных растворах с большой скоростью дисмутирует, так что в этих условиях время его жизни исчисляется в долях секунды, в беспротонных средах обладает высокой стабильностью, и его растворы в таких средах могут сохраняться без изменений концентрации на протяжении многих часов и суток.

Если не считать одновременное сосуществование этих явлений простым совпадением, то приходится признать, что O_2^- выполняет в клетке роль низкомолекулярного внутримембранного переносчика электронов.

В водной фазе (в цитоплазме и во внутреннем пространстве оргanelл) перенос электронов осуществляется специализированными молекулами пиридиннуклеотидов, которые были эволюционно подобраны таким образом, чтобы их редокс-потенциал был равен редокс-потенциалу пары O_2/O_2^- . Этим обеспечивается эквипотенциальный перенос зарядов из водной фазы (где в реакциях гликолиза, ГМФШ, цикла Кребса, β -окисления жирных кислот образуется основное количество восстановленных эквивалентов) во внутреннюю фазу клеточных мембран и, следовательно, минимальные потери энергии при таком перемещении зарядов. Основные источники генерации O_2^- (и других, производных от него АКМ), обнаруженные в животных клетках, связаны с деятельностью мембраносвязанных ферментов, таких как НАД(Ф)Н-оксидаза цитоплазматической мембраны, НАДФН-цитохром

P-450-редуктаза, локализованная в мембранах цитоплазматического ретикулума, и НАДН-КоQ-редуктаза, входящая в состав I комплекса митохондриальной электронпереносящей цепочки. Все они – гомологичные белки, принадлежащие к одному семейству флавопротеидов и имеющие общего эволюционного предшественника. К этому же семейству относят и NO-синтетазу, также способную восстанавливать O_2 до O_2^- . Известно, что ферменты этого типа имеют обращенный в водную фазу участок связывания пиридиннуклеотидов, в то время как акцепторы электронов находятся либо внутри мембран (в микросомах и митохондриях), либо на противоположной стороне мембраны, что предполагает перенос электронов из водной в липидную фазу как неизбежный результат функционирования этих ферментов. Учитывая высокую концентрацию O_2 в липидной фазе, мы приходим к выводу, что основным местом генерации O_2^- в клетках должно быть внутримембранное пространство.

Рациональность подобного механизма объясняется тем, что только в гидрофобной фазе O_2^- может эффективно выполнять приписываемую ему роль переносчика электронов. В водной среде основная реакция, в которой участвует O_2^- и которая происходит с огромной скоростью, описывается уравнением:



и называется реакцией дисмутации. Вследствие этого любая реакция восстановления, опосредуемая O_2^- в водной фазе, идет с параллельно происходящей дисмутацией O_2^- , так что большая часть энергии, запасенной в виде химического потенциала O_2^- , рассеивается в окружающей среде и не может быть использована клеткой. В липидной же фазе, где отсутствуют свободные протоны, реакция дисмутации невозможна, и, следовательно, O_2^- может накапливаться в значительных концентрациях, перенося электроны на свои физиологические акцепторы.

Учитывая возможность диффузии O_2^- в мембранах и связанность внутриклеточных мембранных структур с плазматической мембраной, можно предположить существование общего внутримембранного пула O_2^- и, соответственно, внутримембранного отрицательного потенциала с локальными максимумами отрицательных зарядов в участках генерации O_2^- . Величина отрицательного потенциала липидной фазы клеток должна зависеть как от активности супероксид-генерирующих ферментов, так и от скорости «стока» электронов, который определяется,

главным образом, степенью протонирования мембран и уровнем восстановленности митохондриальной электронпереносящей цепи. Такое представление связывает стационарные клеточные концентрации активных кислородных метаболитов (АКМ: O_2^- и H_2O_2) с общим энергетическим состоянием клеток, выражающимся в актуальной величине фосфатного потенциала. Из данной гипотезы следует, что эффективность АКМ-зависимых сигнальных путей, обеспечивающих регуляцию различных видов клеточной активности, таких, в частности, как пролиферативный ответ и апоптоз, должна быть тесно сопряжена с актуальным состоянием энергетического метаболизма клеток и существенно зависеть от уровня обеспеченности клеток энергетическими субстратами, скорости поступления O_2 в ткани и от степени активности энергопотребляющих систем в клетках. Таким образом, контролируя метаболические параметры функционирования клеток, мы можем направленно изменять интенсивность АКМ-зависимых клеточных реакций, возникающих в ответ на специфические стимулы.

Предлагаемая гипотеза может служить базисом для создания разветвленной теоретической модели, в рамках которой становится возможным рациональное обсуждение, объяснение и прогнозирование многочисленных экспериментальных данных, указывающих на существование в клетках разнообразных и запутанных связей между активностью АКМ-генерирующих систем и клеточными реакциями в ответ на внешние воздействия.

POTENTIAL ROLE OF SUPEROXIDE ANION IN THE CELL ENERGETICS: A HYPOTHESIS

Volsky N.N.

**State Research Institute of Clinical Immunology SB RAMS,
Novosibirsk, Russia**

Proposed hypothesis is based on three well-established empirical facts:

1. Solubility of molecular oxygen in lipids is several times higher than its solubility in the water (in biphasic systems «lipid/water» the concentration of O_2 in lipid phase is 4–5 times its concentration in aqueous phase).

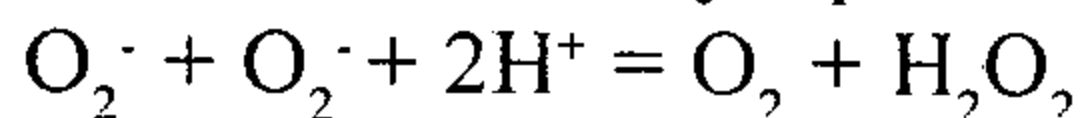
2. Standard redox potential of pair O_2/O_2^- is equal to -0,34 mV that exactly corresponds to standard redox potentials of pyridine nucleotides (pairs $NAD^+/NADH$ and $NADP^+/NADPH$).

3. Superoxide anion (O_2^-) dismutates in aqueous solutes at a high rate and its lifetime is measured in fractions of a second under these conditions. But O_2^- offers high stability in aprotic milieu and its solutes in aprotic solvents retain constant concentrations during hours and days.

If simultaneous occurrence of these facts is not accidental we must accept that O_2^- plays a role of the low-molecular intramembrane electron carrier in cell.

In aqueous phase (in cytoplasm and in the inner space of cell organelles) the electrons are transferred by pyridine nucleotides. These specialized molecules were evolutionary selected in such a way that their redox potential is equal to one of pair O_2/O_2^- . This provides an equipotential charge transfer from aqueous phase (from reduced pyridine nucleotides that are generated in quantity by reactions of glycolysis, Krebs cycle, fatty acid β -oxidation, and pentose cycle) to inner phase of cell membranes, and as a result affords minimal energy loss by this charge transfer. The main sources of O_2^- (and other reactive oxygen species derived from it) revealed in animal cells are the membrane coupled enzymes. Among these are NAD(P)H oxidase located in plasma membrane, microsomal NADPH-cytochrome P-450 reductase, and NADH-CoQ reductase that forms a part of Complex I of mitochondrial electron-transporting chain. All these enzymes are homologous proteins assigned to one and the same flavoproteid family and descended from the common evolutionary precursor. The NO synthetase which equally can reduce O_2 to O_2^- is also assigned to this protein family. It is well known that enzymes of this kind possess the pyridine nucleotide binding sites which are faced to aqueous phase. At the same time the electron sinks are located either in the bulk of the membrane (in mitochondria and microsomes) or on the opposite side of membrane. From this it follows that functioning of these enzymes must be inevitably accompanied by the electron transfer from aqueous to lipid phase. Taking into account the high O_2 concentration in lipid phase we get the conclusion that the greater part of O_2^- in cells must be generated in the intramembrane space.

The occurrence of related mechanism seems to be quite reasonable because O_2^- can perform the ascribed function of electron carrier only in hydrophobic phase. In aqueous medium the main reaction in which O_2^- is involved and which proceeds at a high rate is described by equation:



and is known as reaction of dismutation. Hence any reductive process carried out by O_2^- in aqueous phase proceeds in parallel with dismutation of O_2^- . As a

result the main part of energy stored up in chemical potential of O_2^- dissipate in medium and cannot be used by cell. The dismutation of O_2^- is impossible in the lipid phase not bearing free protons. Consequently, O_2^- can be accumulated in high concentrations and transfer electrons on the appropriate physiological acceptors.

Taking into account the possibility of O_2^- diffusion in membranes and coupling of internal membrane structures with a plasma membrane it is believed that a common pool of O_2^- exists in cell membranes and thus an intramembrane potential exists with local maxima of negative charges at the points of O_2^- generation. The magnitude of cell lipid phase potential would depend on the activity of superoxide generating enzymes as well as on the rate of electron «drainage» which is controlled mainly by the intramembrane level of free protons and by the reduction degree of mitochondrial electron transporting chain. This concept links the cell steady-state concentrations of reactive oxygen species (ROS: O_2^- and H_2O_2) and cell energetic state manifested as the magnitude of phosphate potential. It follows from this hypothesis that the function of ROS-depending signalling pathways which regulate various kinds of cell activity (in particular, cell proliferation and apoptosis) would be closely connected with the current state of cell energetic metabolism and would essentially depend on the cell providing with energetic substrates, on the rate of O_2 transportation in tissues, and on the activity of energy consumed systems in the cell. Thus, controlling the functional metabolic parameters of cells we can purposefully modify the vigour of the ROS-dependent cell reactions developing in response to specific stimuli.

Advanced hypothesis can form the basis for creation of broad theoretic model that will make possible to discuss, explain, and predict many experimental data suggesting existence of diverse and complicated relations between the activity of cellular ROS generating systems and cell reactions to external influences.