

Изучение механизма реакций, катализируемых комплексом цитохрома С с кардиолипином

Левченко И.Н.¹, Владимиров Г.К.², Володяев И.В.³

¹Российский Национальный Исследовательский Медицинский Университет им. Н.И. Пирогова, Москва, Россия

²Первый Московский Государственный Медицинский Университет им. И.М. Сеченова, Москва, Россия

³Биологический факультет, Московский Государственный Университет, Москва, Россия

irnlevchenko@yandex.ru

Цитохром С в комплексе с мембранным кардиолипином приобретает активность пероксидазы, катализирует перекисное окисление липидов и запускает апоптоз по митохондриальному пути. Использование его природных апоптогенных свойств может быть эффективным методом химиотерапии рака. Для развития этого направления требуется детальное изучение его апоптогенной активности, что требует наиболее точного подбора кинетических параметров системы. В данной работе мы разработали алгоритм расчета этих параметров по кинетике активированной хемилюминесценции с визуализацией полученных модельных кривых и их сравнением с экспериментальными данными.

Ключевые слова: апоптоз, цитохром с, кардиолипин, наноглобула, квантовый выход, кинетические параметры, структура комплекса.

Study of the mechanism of reactions catalyzed by complexes of cytochrome C with cardiolipin

Levchenko I.N.¹, Vladimirov G.K.², Volodyaev I.V.³

¹Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

²I. M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russia

³Faculty of Biology, Moscow State University, Moscow, Russia

irnlevchenko@yandex.ru

Cytochrome C in complex with membrane cardiolipin acquires peroxidase activity, catalyzes lipid peroxidation, and triggers apoptosis along the mitochondrial pathway. The use of its natural apoptogenic properties can be an effective method in cancer chemotherapy. To develop this direction, a detailed study of its apoptogenic activity is required, which demands the most accurate selection of the system kinetic parameters. In this work, we have developed an algorithm for calculating these parameters from the kinetics of activated chemiluminescence with visualization of the obtained model curves and their comparison with experimental data.

Key words: Apoptosis, cytochrome c, cardiolipin, nanoglobula, quantum yield, kinetic parameters, complex structure.

Введение

При изучении объектов живого мира мы часто сталкиваемся с явлениями, которые хорошо описываются алгоритмами наномашин. Модели этого класса существуют уже более 50 лет и эффективно помогают человечеству в понимании многих явлений и решении практических задач. Таким образом, во многих случаях упрощенные модели наномашин позволяют достаточно хорошо понимать сложные многокомпонентные

биологические процессы. Например, комплекс цитохрома С с фосфолипидом кардиолипином, интерпретируемый как наномашина, довольно хорошо описывает один из ключевых узлов запуска апоптоза – взаимодействие цитохрома С с внутренней мембраной митохондрий, активируя его пероксидазную активность и дальнейшее высвобождение в цитоплазму [2, 9].

Цитохром С представляет собой гем-содержащий белок, который способствует переносу электронов между митохондриальными дыхательными

комплексами III и IV и участвует в запуске апоптоза [6]. Как показано [10], цитохром C образует комплекс с мембранным фосфолипидом кардиолипином, который активирует его пероксидазную активность и инициирует перекисное окисление липидов в мембранах митохондрий. Это нарушает свойства мембранного

барьера, высвобождая цитохром C в цитоплазму, где он связывается с белком Araf-1, образуя апоптосомы и вызывая апоптоз [3, 5, 8, 11]. Общая схема его пероксидазного действия представлена на рис. 1 [12].

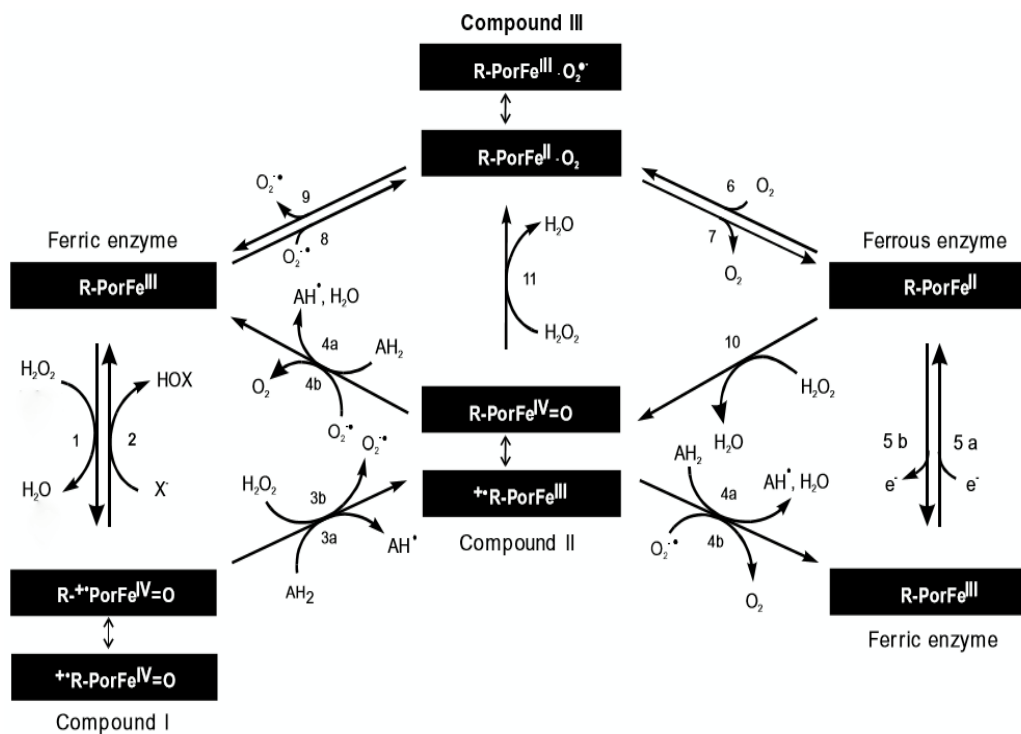


Рис. 1. Общая схема реакций пероксидаз млекопитающих.

Рассматриваемый как наномашина, комплекс цитохром C / кардиолипин особенно ценен в качестве триггера, переключающегося между нормальным функционированием клеток и апоптозом в зависимости от его активности пероксидазы [1, 5–7]. Вообще говоря, последние следует измерять по скорости образования свободных радикалов, но из-за их чрезвычайно высокой реакционной способности это невозможно сделать напрямую. Таким образом, он оценивается по интенсивности хемилюминесценции, сопровождающей дальнейшие реакции образующихся свободных радикалов, и должен быть выполнен в динамике, что требует использования так называемой кинетической хемилюминесценции [3, 4].

Физико-химические методы кинетического анализа разобраны во многих работах [12, 13] при изучении биологических мембран.

В данной работе мы описываем математическое моделирование создания автоматизированного решения прямой и обратной задачи для изучения

механизма работы цитохрома с с кардиолипином и его роль в апоптозе.

Математическое моделирование кинетики реакций, сопровождающихся свечением

Современные технологии и средства программирования позволяют создать виртуальную реальность, для удобства исследователей. Позволить им самим используя интерактивный интерфейс манипулировать объектами для получения оптимального результата и решения интересующей их исходной задачи.

Связующим звеном между математическими моделями той или иной предметной области и компьютером являются вычислительные методы. Вычислительные методы – статус вычислительного эксперимента достигают в контексте некоторой математической модели, описывающей тот или иной объект исследования.

В основе работы программы лежит закон действующих масс. Исходную систему возникающих дифференциальных уравнений скоростей реакций решали ранее методом Эйлера. Скорость реакции в данной системе была пропорциональна произведению концентрации реагентов, а коэффициент пропорциональности назывался константой скорости. При такой постановке задачи константы скорости подбирались вручную.

В 2009 Владимир Ю.А. предложил оптимизировать процесс. На первом этапе была создана программа для автоматического расчета кинетических параметров перекисного окисления липидов по кинетике активированной хемиллюминесценции и визуализации полученных модельных кривых.

На втором этапе в ходе решения обратной задачи было предложено автоматизировать подбор реагентов: рассмотрено и реализовано несколько алгоритмов решения данной задачи на языке C++, каждый из которых пошагово сравнивался с экспериментом. Эффективное решение было найдено методом наименьших квадратов.

Были подобраны параметры, учитывая метод наименьших квадратов, для моделирования кинетических кривых затухания хемиллюминесценции.

Рассчитан и промоделирован квантовый выход хемиллюминесценции [12]:

$$\eta_{eL} = \eta_T \cdot \eta_{ph},$$

где η_{eL} – квантовый выход хемиллюминесценции; η_T – квантовый выход возбуждения; η_{ph} – квантовый выход фотоллюминесценции.

Показано, что кардиолипид играет роль протонной ловушки, стабилизируя pH в межмембранном пространстве.

Задача данной работы была разбита на три части:

1. Разработка метода автоматизированного подбора констант скоростей химических реакций на основании данных химической кинетики для анализа раковых клеток, которые имеют свойства противостоять апоптозу, и мутаций, которые являются причиной появления разного рода метастазирования.

2. Разработка метода автоматизации подбора реагентов на основании данных квантовой теории и физической кинетики для анализа природных апоптогенов являющихся основой для создания лекарств и приводящие к усилению сопротивляемости организма к воздействию различных факторов.

3. Изучение механизма реакции катализируемых комплексом цитохрома C с кардиолипином.

Выводы

Разработан метод анализа для диагностики заболеваний связанных с патологическим апоптозом клеток в виде алгоритма для автоматического расчета кинетических параметров перекисного окисления липидов по кинетике активированной хемиллюминесценции и визуализации полученных модельных кривых и подбора реагентов.

Благодарности

Мы хотели бы выразить нашу благодарность руководителям за их ценный вклад в планирование исследования академику профессору Юрию Андреевичу Владимирову, факультет фундаментальной медицины Московского государственного университета и профессору Анатолию Николаевичу Осипову, медико-биологический факультет Российского национального исследовательского медицинского университета им. Н.И. Пирогова.

Список литературы:

1. Cormier M.J., Prichard P.M. An investigation of the mechanism of the luminescent peroxidation of luminol by stopped flow techniques. *J. Biol. Chem.* 1968. V. 243. No. 18. P. 4706–4714.
2. Cortese J.D., Vogliano A.L., Hackenbrock C.R. The ionic strength of the intermembrane space of intact mitochondria is not affected by the pH or volume of the intermembrane space. *Biochim. Biophys. Acta.* 1992. V. 1100. No. 2. P. 189–197.
3. Dawson J.H. Probing structure-function relations in heme-containing oxygenases and peroxidases. *Science.* 1988. V. 240. No. 4851. P. 433–439.
4. Furtmuller P.G., Jantschko W., Zederbauer M., Jakopitsch Ch., Arnhold J., Obinger Ch. Kinetics of interconversion of redox intermediates of lactoperoxidase, eosinophil peroxidase and myeloperoxidase. *Jpn. J. Infect. Dis.* 2004. V. 57. No. 5. P. S30.
5. Goupy P., Vulcain E., Caris-Veyrat C., Dangles O. Dietary antioxidants as inhibitors of the heme-induced peroxidation of linoleic acid: mechanism of action and synergism. *Free Radic. Biol. Med.* 2007. V. 43. No. 6. P. 933–946.
6. Kagan V.E., Gleiss B., Tyurina Y.Y., Tyurin V.A., Elenström-Magnusson C., Liu S.-X., Behice Serinkan F., Arroyo A., Chandra J., Orrenius S., Fadeel B. A role for oxidative stress in apoptosis: oxidation and externalization of phosphatidylserine is required for macrophage clearance of cells undergoing Fas-mediated apoptosis. *J. Immunol.* 2002. V. 169. No. 1. P. 487–499.
7. Kagan V.E., Tyurin V.A., Jiang J., Tyurina Y.Y., Ritov V.B., Amoscato A.A., Osipov A.N., Belikova N.A., Kapralov A.A., Kini V.,

- Vlasova I.I., Zhao Q., Zou M., Di P., Svistunenko D.A., Kurnikov I.V., Borisenko G.G. Cytochrome c acts as a cardiolipin oxygenase required for release of proapoptotic factors. *Nat. Chem. Biol.* 2005. V. 1. No. 4. P. 223–232. doi: [10.1038/nchembio727](https://doi.org/10.1038/nchembio727)
8. Nantes I.L., Falioni-Alario A., Nascimento O.R., Bandy B., Gatti R., Bechara E.J. Modifications in heme iron of free and vesicle bound cytochrome c by tert-butyl hydroperoxide: a magnetic circular dichroism and electron paramagnetic resonance investigation. *Free Radic. Biol. Med.* 2000. V. 28. No. 5. P. 786–796.
 9. Skulachev V.P. Cytochrome C in the apoptotic and antioxidant cascades. *FEBS Lett.* 1998. V. 423. No. 3. P. 275–280.
 10. Vladimirov Y.A., Proskurnina E.V., Izmailov D.Yu., Novikov A.A., Brusnichikin A.V., Osipov A.N., Kogan V.E. Mechanism of activation of cytochrome C peroxidase activity by cardiolipin. *Biochemistry (Mosc.)*. 2006. V. 71. No. 9. P. 989–997.
 11. Weng L.C., Baker G.M. Reaction of hydrogen peroxide with the rapid form of resting cytochrome oxidase. *Biochemistry*. 1991. V. 30. No. 23. P. 5727–5733.
 12. Владимиров Ю.А., Гутенев П.И., Кузнецов П.И. Математическое моделирование кинетики цепного окисления липидов биомембран в присутствии ионов Fe²⁺. *Биофизика*. 1973. Т. XVIII. № 6. С. 1024–1029.
 13. Осипов А.Н., Степанов Г.О., Владимиров Ю.А., Козлов А.В., Каган В.Е. Регуляция пероксидазной активности цитохрома с помощью оксида азота и лазерного излучения. *Биохимия*. 2006. Т. 71. № 10. С. 1392–1398.