

Математическое моделирование квантовых выходов активированной кумарином C-525 хемилюминесценции под действием комплекса цитохрома C с кардиолипином

Левченко И.Н.¹, Володяев И.В.², Владимиров Г.К.³, Боярченков А.С.⁴

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

²Биологический факультет, Московский Государственный Университет, Москва, Россия

³Первый Московский Государственный Медицинский Университет им. И.М. Сеченова, Москва, Россия

⁴Уральский Федеральный Университет им. Первого президента России Б.Н. Ельцина, Екатеринбург, Россия

irnlevchenko@yandex.ru

Определены квантовые выходы активированной кумарином C-525 хемилюминесценции липидов под действием комплекса цитохрома с с кардиолипином в водной среде и в неполярном окружении. Показано, что: 1) квантовый выход значительно выше в присутствии активатора, чем в случае собственного не активированного свечения, сопровождающего рекомбинацию перекисных радикалов жирных кислот; 2) ферментативная (пероксидазная) активность зависит не только от концентрации цитохрома с, но и от соотношения между его нативной и частично денатурированной формами; 3) квантовый выход интенсивности хемилюминесценции пропорционален пероксидазной активности цитохрома с.

Ключевые слова: квантовые выходы, кумарины, хемилюминесценция, цитохром с кардиолипином, пероксидазная активность.

Mathematical modeling of quantum yields of chemiluminescence activated by coumarin C-525 under the action of a complex of cytochrome C with cardiolipin

Levchenko I.N.¹, Volodyaev I.V.², Vladimirov G.K.³, Boyarchenkov A.S.⁴

¹N.I. Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

²Faculty of Biology, Moscow State University, Moscow, Russia

³I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russia

⁴Ural Federal University named after The First President of Russia B.N. Yeltsin, Yekaterinburg, Russia

Quantum yields of lipid chemiluminescence activated by coumarin C-525 under the action of cytochrome c complex with cardiolipin in an aqueous medium and in a nonpolar environment have been determined. It is shown that: 1) the quantum yield is significantly higher in the presence of an activator than in the case of its own non-activated glow accompanying the recombination of fatty acid peroxide radicals; 2) enzymatic (peroxidase) activity depends not only on the concentration of cytochrome c, but also on the ratio between its native and partially denatured forms; 3) the quantum yield of chemiluminescence intensity is proportional to the peroxidase activity of cytochrome C.

Key words: quantum yields, coumarins, chemiluminescence, cytochrome with cardiolipin, peroxidase activity.

Введение

Как известно, цитохром с – это не только важный компонент дыхательной цепи митохондрий, переносящий электроны с комплекса 3 на комплекс 4, но и эффективный антиоксидант [4, 6, 9]

и один из ключевых регуляторов апоптоза по митохондриальному пути [1, 15], участвующий в следующем каскаде процессов:

- Образование комплекса цитохрома с с кардиолипином внутренних мембран митохондрий

(CytC-CL); приобретение им пероксидазной активности;

- Иницирование перекисного окисления липидов мембран за счет пероксидазной активности CytC-CL;

- Изменение состояния и проницаемости митохондриальных мембран за счет перекисного окисления липидов; образование мегапор; набухание матрикса митохондрий[11];

- Выход комплекса CytC-CL в цитоплазму, формирование апоптосом.

- Образованию комплекса CytC-CL и приобретению им пероксидазной активности посвящены работы [7, 9] и др.

Показано:

- Образование гидрофобных нанокристаллов стандартного размера со стандартным соотношением количества молекул цитохрома с и кардиолипина, говорящее об образовании комплекса со строго определенной структурой (в отличие от ранее предполагавшегося поверхностного электростатического «слипания» цитохрома с с мембраной[3, 13]);

- Изменение конформации цитохрома с по сравнению с нативным состоянием: увеличение размера его глобулы внутри комплекса CytC-CL, отдаление тирозиновых и триптофановых остатков от гема, разрыв связи $Fe(heme)\cdots S(Met80)$ [10, 14]; повышение досягаемости гема для малых молекул, необходимое для протекания пероксидазной или липооксигеназной реакции.

Тем не менее, детальная структура комплекса CytC-CL, а также точные характеристики его ферментативной активности остаются невыясненными.

Настоящая работа посвящена моделированию процессов перекисного окисления липидов и сопровождающей его хемилюминесценции, запускаемых комплексом CytC-CL в мембране. Создание точной модели этого процесса позволяет использовать хемилюминесценцию липидов, как инструмент строгой оценки пероксидазной активности CytC-CL и, таким образом детальнее исследовать его функционирование в зависимости от различных условий.

Собственно процесс перекисного окисления включает в себя десятки различных реакций, группирующиеся в стадии иницирования, продолжения, разветвления цепи и ее обрыва. Спонтанная хемилюминесценция (ХЛ) сопровождает реакции рекомбинации перекисных радикалов и некоторые другие, более специфические процессы с их участием, однако, квантовый выход спонтанной ХЛ весьма низок, за счет преимущественно безызлучательной релаксации возбужденного продукта P^* . Использование физических активаторов позволяет усилить это свечение на 2–3 порядка без изменения химических процессов, протекающих в системе.

Наилучшие известные на данный момент физические активаторы ХЛ липидов – это

кумариновые производные (С-525, С-314, С-334). Так, С-525 перехватывает возбуждение у триплетно-возбужденных кетонов, образующихся при рекомбинации перекисных радикалов по механизму Рассела и, при этом, имеет квантовый выход люминесценции на 3–4 порядка выше, чем сами возбужденные кетоны [4, 6]. Таким образом, ХЛ, активированная С-525 имеет интенсивность в ~1500 раз выше, чем спонтанная ХЛ липидов, но при этом не отличается от нее по кинетическим кривым и, соответственно, может быть использована для решения поставленных выше задач. Надежность решения определялась наличием кардиолипина для стабилизации рН, гашением Fe^{2+} и наличием физического активатора С-525. Среди факторов, которые могут исказить значение, можно выделить не достаточное добавление пероксида водорода [2], избыточное количество азота (II) [5, 6], метанола, денатурация белка [5–8], изменение конформации ЦитС в комплексе Цит-КЛ.

В данной работе на основании анализа параметров цитохрома с с кардиолипином, физического активатора С-525, пероксидазы хрена и люминола, проведены исследования сенсibiliзирующей способности природного красителя кумарина С-525, как физического активатора [1, 3] с целью уточнения величины квантового выхода С-525*. Полученные результаты представляют практический интерес для изучения сенсibiliзирующей активности природных красителей кумаринов.

Материал и методика

Использованные реактивы: KH_2PO_4 , 20 мМ буферный раствор (рН 7.4); пероксид водорода (Sigma-Aldrich, США); кумарин С-314 (Sigma-Aldrich, США); кумарин С-334 (Sigma-Aldrich, США); кумарин С-525 (Sigma-Aldrich, США); цитохром с (Sigma-Aldrich, США); кардиолипин из сердца быка (Avanti Polar Lipids, США) [8, 9].

Хемилюминесценцию измеряли на хемилюминометрах Lum-100 (Россия). Спектры поглощения регистрировали с использованием двухлучевого спектрофотометра Analytic Jena SPECORD 200 (Германия). Флуоресценцию измеряли на спектрофлуориметре RF-5301 (Shimadzu Corporation, Япония). Измерения динамического светорассеяния проводились на приборе Zetasizer Nano ZS (Malvern, Великобритания). Данные, полученные хемилюминесцентными и спектроскопическими методами, обрабатывали в Microsoft Office Excel. Данные по динамическому светорассеянию обрабатывали с помощью официального программного обеспечения Malvern «Zetasizer Software».

Объектами исследования выступили известный природный краситель кумарин С-525 и комплекс цитохрома с с кардиолипином. Работа проводилась

на кафедре Медицинской Биофизики Факультета Фундаментальной медицины МГУ.

Квантовый выход образования синглетного С-525* η_{CL} определяли относительным методом путем расчета параметров кинетики реакций его фосфоресценции по формуле:

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

где η_{CL} – квантовый выход хемилюминесценции; η_T – квантовый выход возбуждения; η_{ph} – квантовый выход фотолюминесценции; $I_{люм}$ и I_0 – интенсивности определялись, учитывая метод наименьших квадратов, к полученным кинетическим кривым затухания фосфоресценции кумарина.

Результаты

Природные соединения имеют стандартную полосу поглощения интенсивностей с максимумом 699 нм. В кинетических экспериментах свет является распространенным источником возбуждения. При длине волны 268 и 275 нм наблюдается флуоресценция как тирозиновых остатков с максимальной амплитудой поглощения в интервале длин волн 307–310 нм, так и триптофановых остатков с максимальной амплитудой поглощения на длине волны 330 нм. [9, 11, 14]. Для исследуемых соединений поглощение на указанной длине волны было мало. В поисках оптимальных условий возбуждения были проанализированы системы липопероксидазной и квази-пероксидазной реакций активированные физическим активатором кумарином С-525.

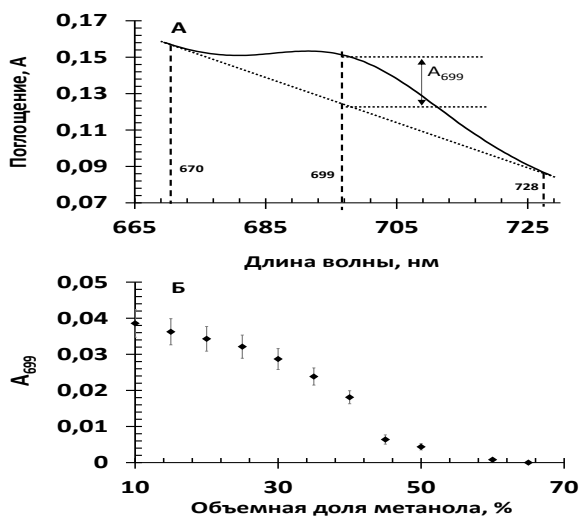


Рис. 1. Изменение поглощения связи > при 699 нм, как зависимость (A_{699}) от объемной доли метанола в растворе $Fe(heme) \cdots S(Met80)$ в цитохроме с в присутствии метанола. (А) – Спектр поглощения водного раствора ЦитС.; (Б) – Поглощение 200 мкМ растворов ЦитС.

В ходе анализа установлено, что флуоресценция тирозина и триптофана в молекуле цитохрома с зависит от концентрации и конформации молекул цитохрома с в растворе. При частичной денатурации

цитохрома с происходит отдаление остатков тирозина и триптофана от атома Fe идет миграция энергии на сопряженные связи гема.[10, 11, 14] В нативной форме цитохрома с тирозиновые и триптофановые остатки расположены достаточно близко к гему, создавая, таким образом, условия для индуктивно-резонансного переноса энергии. Поэтому, при облучении УФ, нативный цитохром с практически не флуоресцирует. Частичная или полная денатурация молекулы (как за счет экспериментальных воздействий, так и в природном комплексе с кардиолипином) нарушает условия миграции энергии с тирозинов и триптофанов на гем и приводит к появлению флуоресцентных свойств. Из этих данных можно сделать вывод, что квантовый выход в денатурированной форме выше чем в нативной.

Вероятность того, что синглетный кумарин перейдет в основное состояние с испусканием кванта света, очень мала. Для оценки расчетов квантового выхода использовались данные проведенных пяти последовательных измерений степени разрушения кумарина в течение 8 мин. Опыты подтверждают, что в случае применения сенсibilизатора кумарина С-525 наблюдается максимальный спектр поглощения при максимальном значении квантового выхода.

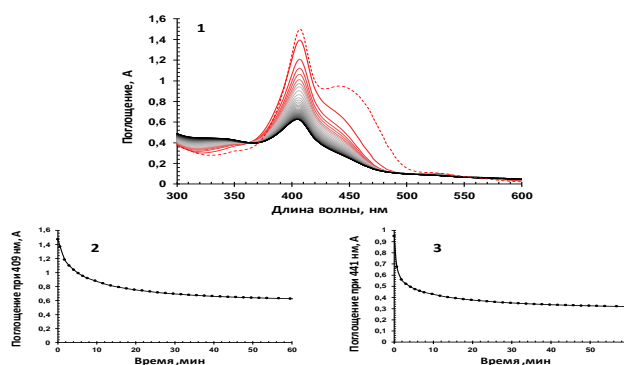


Рис. 2. Измерения спектров поглощения смеси, в которой протекает катализируемая комплексом ЦитС-ТОКЛ пероксидазная реакция в присутствии С-525. Красная кривая – первое измерение, чёрная – последнее, промежуточные цвета (через серый) – промежуточные измерения. 1. Серия спектров поглощения смеси: 10 мкМ ЦитС, 300 мкМ ТОКЛ, 25 мкМ С-525, 215 мкМ H_2O_2 , пунктирная красная кривая – спектр смеси без H_2O_2 . 2. Изменения значения оптической плотности в полосе Soret. 3. Изменения значения оптической плотности в примерном пике поглощения С-525.

Кроме того, при частичной денатурации цитохрома с происходит разрыв связи $Fe(heme) \cdots S(Met80)$ и цитохром с приобретает пероксидазную активность (которой не обладает в нативной форме). Эта пероксидазная активность особенно выражена в комплексе цитохром с – кардиолипин.

Таким образом, комплекс цитохром с – кардиолипин отличается от нативного цитохрома с

по следующим свойствам: (1) обладает флуоресценцией тирозиновых и триптофановых остатков; (2) теряет поглощение в полосе Soret (405–410 нм, отражающей существование связи $Fe(heme) \cdots S(Met80)$); (3) обладает пероксидазной активностью и, таким образом, катализирует образование липидных радикалов в мембране. Эти образующиеся липидные радикалы запускают цепной процесс перекисного окисления липидов, который можно наблюдать по хемиллюминесценции, как нативной (при рекомбинации перекисных радикалов), так и активированной (при добавлении активаторов хемиллюминесценции липидов, типа кумаринов).

Для того чтобы сделать правильный анализ квантовых выходов нужно учесть, что: (1) ферментативная активность зависит не только от концентрации цитохрома c, но и от соотношения определяющего процент абсолютного количества денатурированной формы; (2) наибольшее значение квантового выхода наблюдалась при усилении ХЛ и была достигнута с кумарином C-525 (2,3,5,6-1Н, 4Н-тетрагидро-9- (2'-бензимидазоллил)-хинолизин-(9,9а, 1-ГН)), который увеличивал интенсивность свечения ХЛ с коэффициентом более 2000 при концентрации 4 мкМ без какого-либо влияния на кинетику ХЛ [9, 11]; (3) механизм этого усиления ХЛ – перенос энергии от молекулы кетона в электронно-возбужденном состоянии (первичного продукта рекомбинации пероксил-радикалов) на флуоресцентный уровень кумарина C-525 [12].

Выводы

Доказано, что: 1) квантовый выход значительно выше в присутствии активатора, чем в случае собственного не активированного свечения, сопровождающего рекомбинацию перекисных радикалов жирных кислот; 2) пероксидазная активность зависит не только от концентрации цитохрома c, но и от соотношения между его нативной и частично денатурированной формами; 3) квантовый выход интенсивности хемиллюминесценции пропорционален пероксидазной активности цитохрома c.

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 цитируемой литературы

1. Владимиров Ю.А., Демин Е.М., Проскурнина Е.В., Осипов А.Н. Образование липо-пероксидных радикалов при окислении кардиопипина в комплексе с цитохромом c. *Биологические Мембраны*. 2009. Т. 26. № 6. С. 493–504.
2. Владимиров Ю.А., Проскурнина Е.В., Измайлов Д.Ю., Новиков А.А., Брусничкин А.А., Осипов А.Н., Каган В.Е. Механизм активации пероксидазной активности цитохрома c кардиолипном. *Биохимия*. 2006. Т. 71. № 9. С. 1215–1224.
3. Владимиров Г.К., Владимиров Ю.А. *Структура и пероксидазная функция комплекса цитохрома c с кардиолипном в водной среде и в неполярном окружении*. 2018.
4. Владимиров Ю.А., Гутенев П.И., Кузнецов П.И. Математическое моделирование кинетики цепного окисления липидов биомембран в присутствии ионов Fe^{2+} . *Биофизика*. 1973. Т. XVIII. № 6. С. 1024–1029.
5. Осипов А.Н., Степанов Г.О., Владимиров Ю.А., Козлов А.В., Каган В.Е. Регуляция пероксидазной активности цитохрома c с помощью оксида азота и лазерного излучения. *Биохимия*. 2006. Т. 71. № 10. С. 1392–1398.
6. Belikova N.A., Vladimirov Y.A., Osipov A.N., Kapralov A.A., Tyurin V.A., Potapovich M.V., Basova L.V., Peterson J., Kurnikov I.V., Kagan V.E. Peroxidase activity and structural transitions of cytochrome c bound to cardiolipin-containing membranes. *Biochemistry*. 2006. V. 45. № 15. P. 4998–5009.
7. Jiang J., Bakan A., Kapralov A.A., Silva K.I., Huang Z., Amoscato A.A., Peterson J., Garapati V.K., Saxena S., Bayir H., Atkinson J., Bahar I., Kagan V.E. Designing inhibitors of cytochrome c/cardiolipin peroxidase complexes: mitochondria-targeted imidazole-substituted fatty acids. *Free radical biology & medicine*. 2014. V. 71. P. 221–230.
8. Kapralov A.A., Yanamala N., Tyurina Y.Y., Castro L., Samhan-Arias A., Vladimirov Y.A., Maeda A., Weitz A.A., Peterson J., Mylnikov D., Demicheli V., Tortora V., Klein-Seetharaman J., Radi R., Kagan V.E. Topography of tyrosine residues and their involvement in peroxidation of polyunsaturated cardiolipin in cytochrome c/cardiolipin peroxidase complexes. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2011. V. 1808. № 9. P. 2147–2155.
9. 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)
10. Sharov V.S., Dremina E.S., Vladimirov Iu.A. Activation of Fe²⁺-induced chemiluminescence in human blood low density lipoproteins by the fluorescent dye C-525. *Biofizika*. 1995. V. 40. № 2. P. 428–433
 11. Skulachev V.P. Why are mitochondria involved in apoptosis? Permeability transition pores and apoptosis as selective mechanisms to eliminate superoxide-producing mitochondria and cell. *FEBS Lett.* 1996. V. 397. № 1. P. 7–10.
 12. Skulachev V.P. Cytochrome c in the apoptotic and antioxidant cascades. *FEBS Lett.* 1998. V. 423. № 3. P. 275–280.
 13. Vasiljeva O.V., Lyubitsky O.B., Klebanov G.I., Vladimirov YuA. Effect of antioxidants on the kinetics of chain lipid peroxidation in liposomes. *Membrane & Cell Biology*. 1998. V. 12. № 2. P. 223–231.
 14. Vladimirov Y.A., Sharov V.S., Driomina E.S., Reznitchenko A.V., Gashev S.B. Coumarin derivatives enhance the chemiluminescence accompanying lipid peroxidation. *Free Radical Biology & Medicine*. 1995. V. 18. № 4. P. 739–745.
 15. Vladimirov I.A., Sherstnev M.P., Azimbaev T.K. Chemiluminescence of low density lipoproteins activated by coumarin in the presence of divalent iron ions. *Biofizika*. 1995. V. 40. № 2. P. 323–327. [10.1038/nchembio727](https://doi.org/10.1038/nchembio727)