

## СВОБОДНЫЕ РАДИКАЛЫ. ОСОБЕННОСТИ ХЕМИЛЮМИЕСЦЕНТНОЙ АКТИВНОСТИ КАТАЛИЗАТОРА ЦИТОХРОМА C В КОМПЛЕКСЕ С КАРДИОЛИПИНОМ.

Левченко И.Н.<sup>1,3</sup>, Владимиров Г.К.<sup>2</sup>, Володяев И.В.<sup>3</sup>, Владимиров Ю.А.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова  
ул. Островитянова, 1, г. Москва, 117997, РФ

<sup>2</sup> Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова  
ул. Трубецкая, 8, г. Москва, 119991, РФ

<sup>3</sup> Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова  
ул. Колмогорова, 1, г. Москва, 119991, РФ; e-mail: irnlevchenko@yandex.ru

Поступила в редакцию 20.07.2023. DOI: 10.29039/rusjbpс.2023.0621

**Аннотация.** При помощи метода хемилюминесценции люминола для липидно-мембранной среды, которая является конденсированной, проанализированы процессы перекисного окисления липидов, точки ферментативной активности, квантовые выходы, структура, функции активированной природными красителями флуоресцентными зондами кумарином C-334 или кумарином C-525 хемилюминесценции под действием гетерогенного катализатора комплекса цитохрома C с кардиолипином в водной среде и в неполярном окружении. Показано, точки ферментативной активности и квантовые выходы значительно выше в присутствии физического активатора флуоресцентного зонда природного красителя кумарина C-525, чем в случае собственного не активированного свечения или в случае природного красителя физического активатора флуоресцентного зонда кумарина C-334. Ферментативная активность зависит не только от концентрации цитохрома C в составе гетерогенного катализатора комплекса цитохрома C с кардиолипином, но и от количественного соотношения определяемого прямо пропорциональной зависимостью в процентах между его нативной и частично денатурированной формами.

**Ключевые слова:** Флуоресцентные зонды, цитохром C, кардиолипин, ферментативная активность.

### ВВЕДЕНИЕ

Цитохром C – элемент дыхательной цепи митохондрий, переносящий электроны с комплекса 3 на комплекс 4, хороший антиоксидант и один из главных биорегуляторов апоптоза по митохондриальному пути [1,2], участвующий в ниже перечисленной системе процессов: (1) образование комплекса цитохрома C с кардиолипином внутренних мембран митохондрий; приобретение им ферментативной активности [3,4]; (2) активация процессов перекисного окисления липидов мембран за счет ферментативной активности цитохрома C и кардиолипина; (3) эволюция состояния и проницаемости митохондриальных мембран за счет процессов перекисного окисления липидов; образование крупных пор; набухание матрикса митохондрий [1,5]; (4) выходы комплекса цитохрома C и кардиолипина в цитоплазму, что приводит к активации каскада ферментативных реакций, которая заканчивается апоптозом [6,7].

Образование комплекса цитохрома C с кардиолипином и приобретение им ферментативной активности рассмотрены в работах [6,8]. Этот комплекс образует наночастицы диаметром 8-11 нм, которые освобождаются центрифугированием и имеют стандартный размер и структуру. Таким образом, комплекс цитохром C с кардиолипином подходит под описание гетерогенного катализатора.

В нашей работе рассмотрено: (1) образование гидрофобных нанокристаллов определенного размера с установленным соотношением количества молекул цитохрома C с кардиолипином, показывающее образование данного комплекса со строго определенной структурой [1,9]; (2) изменение конформации цитохрома C по отношению к нативному состоянию, т.е. увеличение размера его глобулы внутри комплекса цитохрома C с кардиолипином, отдаление тирозиновых и триптофановых остатков от гема, разрыв связи Fe(heme)···S(Met80); повышение досягаемости гема для малых молекул, необходимое для протекания исследуемых липопероксидазной и липоксигеназной реакций [6,10].

Исследование посвящено моделированию процессов перекисного окисления липидов, точек ферментативной активности, квантовых выходов, структуры, функций цитохрома C с кардиолипином и сопровождающей их хемилюминесценции, запускаемых данным комплексом в мембране. Создание точной, оптимальной модели этих процессов позволит использовать методы хемилюминесценции, как инструмент строгой оценки структуры, ферментативной активности комплекса цитохрома C с кардиолипином и, таким образом детальнее исследовать его функции в различных условиях.

Процессы перекисного окисления липидов включают в себя десятки различных реакций, группирующиеся в стадии инициирования, продолжения, разветвления цепи и ее обрыва. Спонтанная хемилюминесценция сопровождает реакции рекомбинации перекисных радикалов и некоторые другие, более специфические процессы с их участием. Использование физических активаторов, таких как флуоресцентные зонды кумарины

C-334 и C-525 позволяет усилить это свечение на 2–3 порядка без изменения химических процессов, протекающих в системе.

Кумарины перехватывают возбуждение у триплетно-возбужденных кетонов, образующихся при рекомбинации перекисных радикалов по механизму Рассела и, при этом, имеют квантовые выходы хемилюминесценции на 3–4 порядка выше, чем сами возбужденные кетоны [3,9]. Таким образом, хемилюминесценция, активированная любым из природных красителей кумаринов C-334 и C-525 имеет интенсивность на порядки выше, чем спонтанная хемилюминесценция липидов, но при этом не отличается от нее по кинетическим кривым, константам скорости и, соответственно, может быть использована при составлении модели активированной флуоресцентными зондами C-334 и C-525 хемилюминесценции под действием комплекса цитохрома С и кардиолипина. Надежность решения определялась наличием кардиолипина для стабилизации рН [11], гашением  $Fe^{2+}$  [4,12] и наличием физического активатора кумарина C-334 и C-525. Среди факторов, которые могут исказить значение, можно выделить недостаточное добавление пероксида водорода [3,12], избыточное количество азота (II) [1,14], метанола, денатурация белка [1,15], изменение конформации цитохрома С в комплексе цитохрома С с кардиолипином [8,16].

На основании анализа полученных нами параметров цитохрома С с кардиолипином, физического активатора C-334, физического активатора C-525, пероксидазы хрена и люминола, проведены исследования сравнения сенсibiliзирующей способности люминола, природных красителей: кумарина C-334 и кумарина C-525 [1,15], с целью уточнения, структуры, функций, точек ферментативной активности и квантовых выходов комплекса. Полученные результаты представляют практический интерес для изучения сенсibiliзирующей активности природных красителей кумаринов, структуры, функций ферментативной активности комплекса, как катализатора.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Использованные реактивы:  $KH_2PO_4$ , 20 мМ буферный раствор (рН 7,4); пероксид водорода (Sigma-Aldrich, США); кумарин C-334 (Sigma-Aldrich, США); кумарин C-525 (Sigma-Aldrich, США); цитохром с (Sigma-Aldrich, США); кардиолипин из сердца быка (Avanti Polar Lipids, США) [1];

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 флуоресцентный зонд кумарин C-334, флуоресцентный зонд кумарин C-525, пероксидаза хрена, люминол и комплекс цитохрома С с кардиолипином. Работа проводилась на кафедре медицинской биофизики Факультета фундаментальной медицины МГУ.

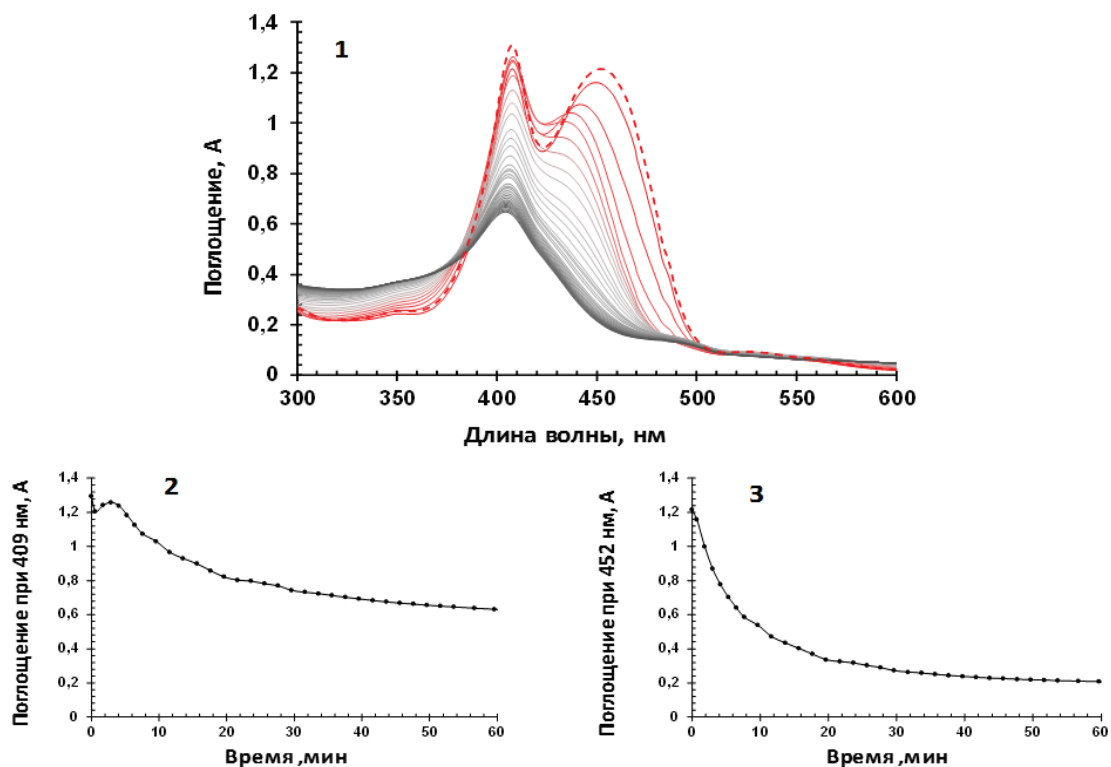
### РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При изучении ферментативной активности, структуры и функций активированной природными красителями C-334 и C-525 хемилюминесценции под действием комплекса цитохрома С с кардиолипином были детализированы результаты, полученные в экспериментах по запуску апоптоза [1,9]. Учитывая, что: (1) природные соединения имеют стандартную полосу поглощения интенсивностей с максимумом 699 нм [2]; (2) в кинетических экспериментах свет является распространенным источником возбуждения [12].

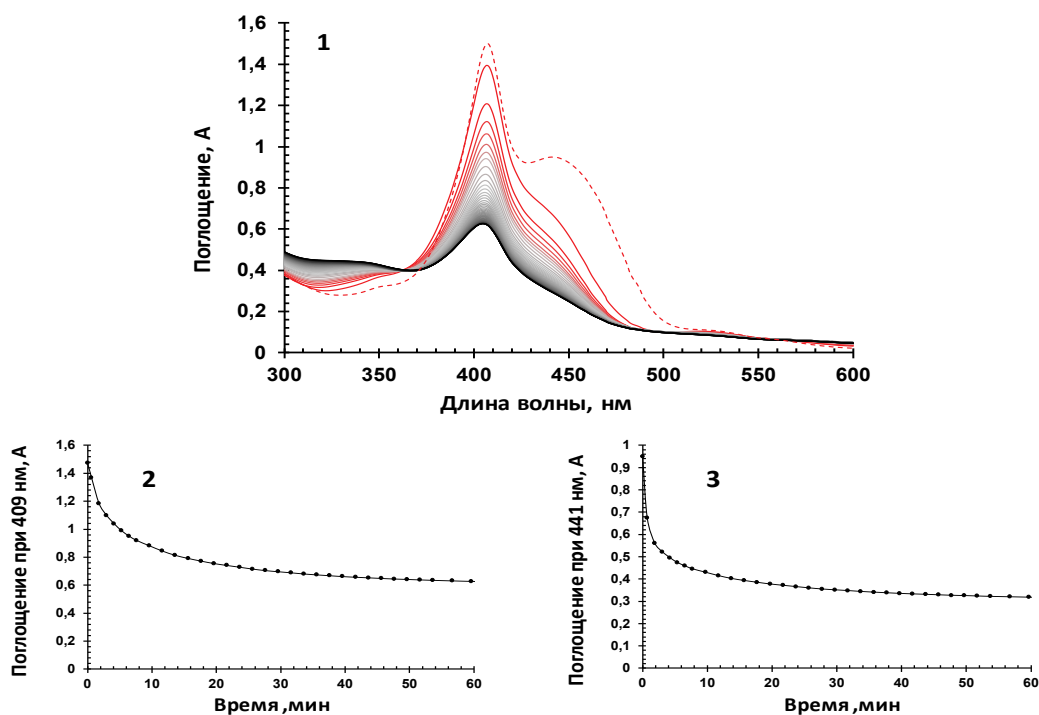
Проанализирована серия спектров поглощения реакционной смеси для более полной оценки происходящих процессов (рис. 1, 2).

Данные по разрушению цитохрома с и флуоресцентного зонда C-334 в ферментативной реакции, катализируемой комплексом цитохром С с кардиолипином, приведены на рисунке 1.

Данные по разрушению цитохрома с и флуоресцентного зонда C-525 в ферментативной реакции, катализируемой комплексом цитохром С с кардиолипином, приведены на рисунке 2. «Классический» активатор C-525, так же как C-334, очень активно окисляется комплексом цитохром С с кардиолипином, при этом скорость этого окисления ограничивается лишь концентрацией самого цитохрома С, который тоже разрушается в составе комплекса цитохрома С с кардиолипином под действием пероксида водорода (рис. 2, кривые 1, 2 и 3) [5,14,16]. Для оценки расчетов точек ферментативной активности выбран способ, основанный на хемилюминесценции люминола в конденсированной среде, интенсивность которой зависит от концентрации фермента. Количество точек определялась светосуммой. Величина амплитуды зависела от степени полноты фермента в хемилюминесцентной реакции. Для нахождения констант скорости строилась калибровочная кривая зависимости интенсивности. В каждой пробе оценивали квантовый выход хемилюминесценции учитывая скорость реакции. Использовались данные проведенных пяти последовательных измерений степени разрушения



**Рисунок 1.** Результаты измерения серии спектров поглощения реакционной смеси, в которой протекает катализируемая комплексом ферментативная реакция в присутствии С-334. Красная кривая – первое измерение, чёрная – последнее, промежуточные цвета (через серый) – промежуточные измерения. 1. Серия спектров поглощения смеси: 10 мкМ цитохром С, 300 мкМ 1,1',2,2'-тетраолеилкардиолипид; 25 мкМ С-334, 215 мкМ  $H_2O_2$ , пунктирная красная кривая – спектр смеси без  $H_2O_2$ . 2. Изменения значения оптической плотности в полосе Соре. 3. Изменения значения оптической плотности в примерном пике поглощения С-334



**Рисунок 2.** Результаты измерения серии спектров поглощения смеси, в которой протекает катализируемая комплексом ферментативная реакция в присутствии С-525. Красная кривая – первое измерение, чёрная – последнее, промежуточные цвета (через серый) – промежуточные измерения. 1. Серия спектров поглощения смеси: 10 мкМ цитохром С, 300 мкМ 1,1',2,2'-тетраолеилкардиолипид; 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 Соре. 3. Изменения значения оптической плотности в примерном пике поглощения С-525

кумаринов в течение 8 мин. Опыты подтверждают, что в случае применения флуоресцентных зондов, физических активаторов кумаринов С-334 и С-525, наблюдается максимальный спектр поглощения флуоресценции при максимальном значении квантового выхода, и природные красители устойчивы к прямому окислению [1,10,13].

Кроме того, при частичной денатурации цитохрома С происходит разрыв связи Fe(heme)···S(Met80) и цитохром С приобретает ферментативную активность. Она выражена в комплексе цитохром С и кардиолипина. «Классический» активатор хемилюминесценции флуоресцентный зонд кумарин С-525, так же как С-334, активно окисляется комплексом цитохром С с кардиолипином, при этом скорость этого окисления ограничивается лишь концентрацией самого цитохрома с, который тоже разрушается в составе комплекса цитохром С с кардиолипином под действием пероксида водорода (рис. 2, кривые 1,2 и 3).

Для того чтобы сделать правильный анализ квантовых выходов нужно учесть, что: (1) ферментативная активность зависит не только от концентрации цитохрома С, но и от соотношения, определяющего процент абсолютного количества денатурированной формы; (2) механизм этого усиления хемилюминесценции – перенос энергии от молекулы кетона в электронно-возбужденном состоянии (первичного продукта рекомбинации пероксил-радикалов) на флуоресцентный уровень кумарина С-525, или кумарина С-334;

## ВЫВОДЫ

Комплекс цитохрома С с кардиолипином отличается от нативного цитохрома С по следующим свойствам: (1) обладает флуоресценцией тирозиновых и триптофановых остатков; (2) теряет поглощение в полосе Core (405–410 нм), отражающей существование связи Fe(heme)···S(Met80); (3) обладает ферментативной активностью и, таким образом, катализирует образование липидных радикалов в мембране. Природный краситель флуоресцентный зонд С-525 – физический активатор хемилюминесценции окисляется цитохромом С с кардиолипином, так же как природный краситель флуоресцентный зонд С-334. Скорость этого окисления ограничивается лишь концентрацией самого цитохрома С, который тоже разрушается в составе комплекса цитохрома С с кардиолипином под действием пероксида водорода.

*Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.*

### Список литературы / References:

1. Владимиров Г.К. *Структура и пероксидазная функция комплекса цитохрома с с кардиолипином в водной среде и в неполярном окружении*. Диссертация кандидата биологических наук, Москва: Московский Государственный Университет им. М.В. Ломоносова, 2018 [Vladimirov G.K. *Structure and peroxidase function of the cytochrome c complex with cardiolipin in a water environment and in a non-polar environment*. Dissertation of Candidate of Biological Sciences, Moscow: Lomonosov Moscow State University, 2018 (In Russ.)].
2. Sharov V.S., Dremina E.S., Vladimirov Iu.A. Activation of Fe<sup>2+</sup>-induced chemiluminescence in human blood low density lipoproteins by the fluorescent dye C-525. *Biofizika*, 1995, vol. 40, no. 2, pp. 428-433.
3. Владимиров Ю.А., Прокурнина Е.В., Измайлов Д.Ю., Новиков А.А., Брусничкин А.А., Осипов А.Н., Каган В.Е. Механизм активации пероксидазной активности цитохрома с кардиолипином. *Биохимия*, 2006, т. 71, № 9, с. 1215-1224 [Vladimirov Yu.A., Proskurnina E.V., Izmailov D.Yu., Novikov A.A., Brusnichkin A.A., Osipov A.N., Kagan V.E. Mechanism of activation of cytochrome peroxidase activity with cardiolipin. *Biochemistry*, 2006, vol. 71, no. 9, pp. 1215-1224 (In Russ.)].
4. Kapralov A.A., Yanamala N., Tyurina Y.Y. et al. Topography of tyrosine residues and their involvement in peroxidation of polyunsaturated cardiolipin in cytochrome c/cardiolipin peroxidase complexes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2011, vol. 1808, no. 9, pp. 2147-2155.
5. 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, vol. 71, pp. 221-230.
6. Владимиров Ю.А., Прокурнина Е.В., Измайлов Д.Ю., Новиков А.А., Брусничкин А.В., Осипов А.Н., Каган В.Е. Кардиолипин активировывает пероксидазную активность цитохрома с, потому что увеличивает доступность железа гема для H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Биохимия*, 2006, т. 71, № 9, с. 1225-1233 [Vladimirov Yu.A., Proskurnina E.V., Izmailov D.Yu., Novikov A.A., Brusnichkin A.V., Osipov A.N., Kagan V.E. Cardiolipin activates cytochrome c peroxidase activity because it increases the availability of heme iron for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Biochemistry*, 2006, vol. 71, no. 9, p. 1225-1233 (In Russ.)].
7. 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, vol. 397, no. 1, pp. 7-10.
8. Владимиров Ю.А., Прокурнина Е.В., Измайлов Д.Ю. Хемилюминесценция как метод обнаружения и исследования свободных радикалов в биологических системах. *БЭБиМ*, 2007, т. 144, № 3, с. 390-396 [Vladimirov Yu.A., Proskurnina E.V., Izmailov D.Yu. Chemiluminescence as a method of detection and investigation of free radicals in biological systems. *BABiM*, 2007, vol. 144, No. 3, p. 390-396 (In Russ.)].
9. 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, vol. 40, no. 2, pp. 323-327.

10. 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, vol. 18, no. 4, pp. 739-745.
11. Vasiljeva O.V., Lyubitsky O.B., Klebanov G.I., Vladimirov Yu.A. Effect of antioxidants on the kinetics of chain lipid peroxidation in liposomes. *Membrane & cell biology*, 1998, vol. 12, no. 2, pp. 223-231.
12. 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 [Vladimirov Yu.A., Gutenev P.I., Kuznetsov P.I. Mathematical modeling of the kinetics of chain oxidation of biomembrane lipids in the presence of  $Fe^{2+}$  ions. *Biophysics*, 1973, vol. XVIII, no. 6, pp. 1024-1029 (In Russ.)].
13. Осипов А.Н., Степанов Г.О., Владимиров Ю.А., Козлов А.В., Каган В.Е. Регуляция пероксидазной активности цитохрома с с помощью оксида азота и лазерного излучения. *Биохимия*, 2006, т. 71, № 10, с. 1392-1398 [Osipov A.N., Stepanov G.O., Vladimirov Yu.A., Kozlov A.V., Kagan V.E. Regulation of cytochrome c peroxidase activity using nitric oxide and laser radiation. *Biochemistry*, 2006, vol. 71, no. 10, pp. 1392-1398 (In Russ.)].
14. Владимиров Ю.А., Демин Е.М., Проскурнина Е.В., Осипов А.Н. Образование липо-пероксидных радикалов при окислении кардиопипина в комплексе с цитохромом С. *Биологические Мембраны*, 2009, т. 26, № 6, с. 493-504 [Vladimirov Yu.A., Demin E.M., Proskurnina E.V., Osipov A.N. Formation of lipid-peroxide radicals during oxidation of cardiopipin in complex with cytochrome C. *Biological Membranes*, 2009, vol. 26, no. 6, pp. 493-504 (In Russ.)].
15. 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, vol. 45, no. 15, pp. 4998-5009.
16. Skulachev V.P. Cytochrome c in the apoptotic and antioxidant cascades. *FEBS Lett*, 1998, vol. 423, no. 3, pp. 275-280.

#### FREE RADICALS. FEATURES OF CHEMILUMINESCENT ACTIVITY OF CYTOCHROME C CATALYST IN COMPLEX WITH CARDIOLIPIN

Levchenko I.N.<sup>1,3</sup>, Vladimirov G.K.<sup>2</sup>, Volodyaev I.V.<sup>3</sup>, Vladimirov Yu.A.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Russian National Research Medical University  
*Ostrovityanova St.1, Moscow, 117997, Russia*

<sup>2</sup>First Moscow State Medical University  
*Trubetskaya str.8, Moscow, 119991, Russia*

<sup>3</sup>Moscow State University

*Kolmogorova str. 1, Moscow, 119991, Russia; e-mail: irnlevchenko@yandex.ru*

Received 20.07.2023. DOI: 10.29039/rusjbp.2023.0621

**Abstract.** Using the luminol chemiluminescence method for the lipid-membrane environment, which is condensed. Both lipid peroxidation processes, points of enzymatic activity, quantum yields, structure, and functions of the natural dye-activated fluorescent probe coumarin C-334 chemiluminescence under the action of a heterogeneous catalyst complex of cytochrome C with cardiolipin in aqueous medium and in a nonpolar environment were analyzed, and processes of lipid peroxidation, points of enzymatic activity, quantum yields, structure, functions of chemiluminescence activated by natural dye fluorescent probe coumarin C-525 under the action of heterogeneous catalyst of cytochrome C complex with cardiolipin in aqueous medium and in nonpolar environment. It is shown that: 1) the enzymatic activity points and quantum yields were significantly higher in the presence of the physical activator fluorescent probe natural dye coumarin C-525 than in the case of its own non-activated luminescence or in the case of the natural dye physical activator fluorescent probe coumarin C-334; 2) an important indicator was that the enzymatic activity depends not only on the concentration of cytochrome C in the heterogeneous catalyst of the complex of cytochrome C with cardiolipin, but also on the quantitative ratio determined by a directly proportional relationship in percent between its native form and partially denatured forms.

**Key words:** *Fluorescent probes, cytochrome C, cardiolipin, enzymatic activity.*