

ИЗМЕНЕНИЯ СТРУКТУРЫ И ПЕРОКСИДАЗНОЙ АКТИВНОСТИ ЦИТОХРОМА *c* ПРИ ЕГО ВЗАИМОДЕЙСТВИИ С ФОСФАТИДНОЙ КИСЛОТОЙ

© 2025 г. В.В. Волков*, С.П. Конюхова*, А.В. Благова*, Г.О. Степанов*^{#,},
Ю.А. Владимиров*, А.Н. Осипов*

*Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова Минздрава России (Пироговский университет), ул. Островитянова, 1, Москва, 117997, Россия

[#]E-mail: stepanov_go@rsmu.ru

Поступила в редакцию 02.12.2024 г.

После доработки 02.12.2024 г.

Принята к публикации 18.12.2024 г.

Проведено сравнительное исследование свойств цитохрома *c* при его взаимодействии с фосфатидной кислотой и кардиолипином. Методом спектрофлуориметрии продемонстрированы сходные конформационные изменения в активном центре цитохрома *c*, которые происходят при его взаимодействии как с кардиолипином, так и с фосфатидной кислотой. С помощью люминол-зависимой хемилюминесценции подтверждено наличие близкой по величине пероксидазной активности у цитохрома *c* при его взаимодействии и с кардиолипином, и с фосфатидной кислотой, а применение метода ЭПР позволило при этом обнаружить образование феноксильного радикала этопозиды в обоих комплексах. Можно сделать вывод, что и фосфатидная кислота, и кардиолипин эффективно изменяют структуру активного центра цитохрома *c* и способствуют увеличению его пероксидазной активности. Полученные результаты могут свидетельствовать о весьма вероятном участии как кардиолипина, так и фосфатидной кислоты в развитии опосредованных цитохромом *c* проапоптотических процессов в митохондриях.

Ключевые слова: цитохром *c*, механизмы апоптоза, фосфолипиды, кардиолипин, фосфатидная кислота.

DOI: 10.31857/S0006302925020079, EDN: KZPKXM

Вопросы, связанные с опосредованной цитохромом *c* запрограммированной гибелью клеток, остаются нерешенными до сегодняшнего дня, несмотря на высокий интерес к этой проблеме. Хорошо известно, что приобретение цитохромом *c* пероксидазной активности после образования комплексов с отрицательно заряженными фосфолипидами является одним из ключевых этапов апоптотических процессов [1–3]. Механизм появления пероксидазной активности цитохрома *c* в его комплексах с кардиолипином посвящено большое количество публикаций. Хорошо известно, что такое взаимодействие приводит к образованию прочного комплекса цитохрома *c* с кардиолипином, в котором метионин-80, являющийся одним из лигандов иона железа в активном центре цитохрома *c*, смещается, превращая 6-координированный ион железа в 5-координиро-

ванный. Образовавшаяся структура активного центра в полной мере соответствует структуре активного центра пероксидазы [4–6]. Важно отметить, что величина пероксидазной активности цитохрома *c* в таком комплексе сильно зависит от количества анионных фосфолипидов и обычно наблюдается при соотношении фосфолипид : цитохром *c* 10 : 1 и выше [7]. Однако в митохондриях трудно ожидать быстрого роста количества кардиолипина для запуска пероксидазных реакций цитохрома *c*. Тем не менее, в этом случае можно рассчитывать на быстрое увеличение содержания фосфатидной кислоты, которая может образоваться в результате реакции фосфолипазы D, которая удаляет характеристическую группу у любого фосфолипида (преимущественно фосфатидилхолина) и превращает его в фосфатидную кислоту [8].

К сожалению, исследования свойств комплексов цитохрома *c* с фосфатидной кислотой представлены в научной литературе весьма небольшим количеством работ. Ранее, используя метод поверхностного плазмонного резонанса, мы

Сокращения: DOPC — 1,2-диолеоил-sn-глицеро-3-фосфохолин, DOPA — 1,2-диолеоил-sn-глицеро-3-фосфат, TOCL — 1',3'-бис[1,2-диолеоил-sn-глицеро-3-фосфо]-глицерин, ЭПР — электронный парамагнитный резонанс.

показали, что связывание цитохрома *c* с мембраной (в том числе и содержащей фосфатидную кислоту) хотя и возможно, но сильно зависит от заряда фосфолипида и степени насыщенности жирнокислотных остатков, с которыми цитохром *c* образует комплекс [9]. Настоящее исследование посвящено изучению способности фосфатидной кислоты изменять структуру и пероксидазную активность цитохрома *c* при образовании комплексов. Полученные результаты позволяют приблизиться к пониманию процессов не только развития, но и, самое главное, запуска цитохром *c*-зависимых механизмов запрограммированной гибели клеток.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Реактивы. В данной работе были использованы следующие реактивы: цитохром *c* из сердца лошади (кат. № C7752, Sigma, США); этопозид (кат. № E1383, Sigma, США); люминол (кат. № 521-31-3, Fluka, США); фосфолипиды от компании Avanti Polar Lipids (США): 1,2-диолеил-sn-глицеро-3-фосфохолин (DOPC, кат. № 850375P), 1,2-диолеил-sn-глицеро-3-фосфат (DOPA, кат. № 840875P), 1',3'-бис[1,2-диолеил-sn-глицеро-3-фосфо]-глицерин (TOCL, кат. № 710335P).

Приготовление липосом. Для приготовления липосом, содержащих смесь фосфолипидов, образец каждого фосфолипида (фосфатидилхолин, фосфатидной кислоты и кардиолипина — DOPC, DOPA и TOCL соответственно) предварительно растворяли в хлороформе. Полученные растворы смешивали в нужных молярных пропорциях, затем хлороформ полностью выпаривали под струей аргона в течение 5 минут. К полученным фосфолипидным пленкам добавляли фосфатный буфер 10 мМ (pH 7.4). Раствор интенсивно перемешивали на «вортексе» в течение 30 с при максимальных оборотах до получения фосфолипидной суспензии. Суспензию озвучивали в ультразвуковой ванне (35 кГц) в течение 10 мин при температуре 37°C до образования прозрачной, слабо опалесцирующей суспензии липосом, которую сразу же использовали для экспериментов. Фосфатидилхолин использовался в качестве обязательного компонента при приготовлении липосом, содержащих фосфатидную кислоту или кардиолипин.

Были получены следующие типы липосом:

- DOPC-содержащие: DOPC (100%);
- DOPA-содержащие: DOPA (20%) + DOPC (80%);
- TOCL-содержащие: TOCL (20%) + DOPC (80%).

Кроме того, для экспериментов с использованием спектрофотометрии были приготовлены липосомы с другими концентрациями DOPA:

- DOPA-содержащие: DOPA (10%) + DOPC (90%);
- DOPA-содержащие: DOPA (50%) + DOPC (50%).

Измерение флуоресценции триптофана-59 и тирозина-67 в комплексах с цитохромом *c*. Для исследования структурных изменений цитохрома *c*, происходящих в присутствии фосфолипидов, был применен метод спектрофлуориметрии, с помощью которого оценивали взаимное тушение флуоресценции остатков триптофана-59 и тирозина-67 ионами гемового железа.

Для исследования флуоресценции триптофана-59 в кварцевую кювету (кат. № 105.250-QS, Hellma Analytics, Германия) добавляли раствор цитохрома *c* в концентрации 16.8 мкМ и суспензию фосфолипидных липосом, содержащих 80% DOPC и 20% TOCL или 80% DOPC и 20% DOPA. Фосфолипиды добавляли в молярном соотношении цитохром *c* : фосфолипид, равном 1 : 20.

Измерения спектров флуоресценции проводили при длине волны возбуждения 280 нм. Спектры регистрировали на спектрофлуориметре P-5301 (Shimadzu, Япония) при комнатной температуре. Все растворы были приготовлены на 10 мМ фосфатном буфере (pH 7.4).

Чтобы оценить флуоресценцию тирозина-67, входящего в состав цитохрома *c*, и рассчитать соотношение флуоресценции тирозина-67 и флуоресценции триптофана-59, спектры флуоресценции цитохрома *c* регистрировали при различных длинах волн возбуждения флуоресценции — 270 и 295 нм. Известно, что только триптофан-59 возбуждается при длине волны 295 нм, но и триптофан-59, и тирозин-67 возбуждаются при длине волны 270 нм. Следовательно, чтобы рассчитать отношение интенсивностей флуоресценции тирозина-67 к интенсивности флуоресценции триптофана-59, необходимо было первоначально рассчитать только интенсивность флуоресценции тирозина-67, что было достигнуто путем вычитания спектра, зарегистрированного при длине волны возбуждения 295 нм, из спектра, зарегистрированного при длине волны возбуждения 270 нм, как это описано в [10].

Измерение пероксидазной активности комплексов «цитохром *c*—фосфолипид» методом люминол-зависимой хемилюминесценции. Определение пероксидазной активности цитохрома *c* проводили с помощью люминол-зависимого хемилюминесцентного анализа. Исследования проводили на хемилюминометре Lum-1200 (DISoft, Россия). В качестве субстрата для пероксидазной реакции использовали пероксид водорода. Указанная модельная система содержала пероксид водорода в концентрации 10 мкМ, 50 мкМ люминола, 10 мкМ цитохрома *c* и 200 мкМ фосфолипида в форме липосом. Для оценки уровня пероксидазной активности

измеряли светосумму хемилюминесценции в течение первых 100 секунд с момента добавления перекиси водорода. Все измерения проводили на 10 мМ фосфатном буфере (рН 7.4) при комнатной температуре.

Измерение пероксидазной активности комплексов «цитохром с–фосфолипид» методом ЭПР. Оценку пероксидазной активности комплексов «цитохром с–фосфолипид» проводили с помощью метода электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) путем измерения количества феноксилильных радикалов этопозида, образующихся в ходе пероксидазной реакции цитохрома с. Исследования проводили на радиоспектрометре E-4 (Varian, США). В качестве субстрата для пероксидазной реакции использовали раствор пероксида водорода. Система для измерения пероксидазной активности содержала 1.2 мМ пероксида водорода, 5 мМ этопозида, 0.1 мМ цитохрома с и 2 мМ фосфолипида в форме липосом. Объем пробы составлял 100 мкл. Измерения осуществляли при следующих значениях параметров радиоспектрометра: центр поля (H_0) – 3367 Гс, диапазон сканирования (ΔH) – 20 Гс, амплитуда модуляции (H_m) – 0.8 Гс, коэффициент усиления приемника – 5000, постоянная времени (τ) – 1 с, время сканирования – 1 мин, частота СВЧ – 9.5 ГГц, а мощность СВЧ-излучения – 10 мВт. Все образцы были приготовлены на основе 10 мМ фосфатного буфера (рН 7.4) при комнатной температуре.

Измерение восстановления комплексов цитохрома с методом спектрофотометрии. Исследование восстановления цитохрома с проводили спектрофотометрически при 550 нм после добавления аскорбата. Для проведения этих измерений в стандартную спектрофотометрическую кювету с длиной оптического пути 1 см (кат. № 105.250-QS, Hellma Analytics, Германия) добавляли 10 мкМ раствора цитохрома с и 200 мкМ фосфолипидов. Измерения выполняли на спектрофотометре Shimadzu 1800 (Shimadzu, Япония). Аналогичные спектры были получены при титровании цитохрома с аскорбатом до достижения максимальной концентрации 1.2 мМ. Для количественной оценки величины восстановления использовали полосу спектра поглощения цитохрома с при 550 нм.

Расчет окислительно-восстановительного потенциала цитохрома с. Стандартный окислительно-восстановительный потенциал цитохрома с (E_0) равен +0.254 В. Для расчета общего окислительно-восстановительного потенциала цитохрома с (E) было использовано стандартное уравнение Нернста (1):

$$E = E_0 + \frac{R \cdot T}{z \cdot F} \ln \frac{D_{\text{ox}}}{D_{\text{red}}}, \quad (1)$$

где E – общий окислительно-восстановительный потенциал, В; E_0 – стандартный окислительно-восстановительный потенциал = +0.254 В; R – универсальная газовая постоянная; T – абсолютная температура; z – количество электронов, участвующих в окислительно-восстановительной реакции; F – постоянная Фарадея; D_{ox} – оптическая плотность окисленного цитохрома с; D_{red} – оптическая плотность цитохрома с при восстановлении.

В этом уравнении соотношение концентраций окисленного и восстановленного цитохрома с было заменено отношением оптических плотностей цитохрома с при длине волны 550 нм, поскольку в этом случае оптические плотности и концентрации были пропорциональны в соответствии с законом Бугера–Ламбера–Бера. Используемые концентрации аскорбата варьировали в диапазоне от 0 до 1.2 мМ.

Для расчета соотношения концентраций окисленного и восстановленного цитохрома с значения оптической плотности были взяты из измеренных спектров поглощения экспериментальных образцов цитохрома с в присутствии или в отсутствие фосфолипидных липосом.

Анализ данных. Статистический анализ результатов был проведен с помощью программы Excel (версия 2410, сборка 16.0.18129.20158, Microsoft, США). Результаты представлены как среднее значение \pm стандартное отклонение. Статистический анализ различий в экспериментальных группах проводился с помощью t -критерия Стьюдента. Различия считали статистически значимыми при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование структуры комплексов «цитохром с–фосфолипид» путем измерения флуоресценции триптофана-59 и тирозина-67 в активном центре цитохрома с. Как было упомянуто выше, приобретение цитохромом с пероксидазной активности как результат связывания с фосфолипидами подразумевает перестройку активного центра цитохрома с и изменение числа заполненных координационных связей железа гема с 6 до 5. Такие структурные изменения активного центра являются результатом взаимодействия цитохрома с с анионными фосфолипидами, такими как кардиолипин, фосфатидилсерин и некоторыми другими. При подобной перестройке активного центра цитохрома с 4 аминокислотных остатка вблизи иона железа меняют свое пространственное положение, самое заметное из которых – это удаление остатка триптофана-59 от иона железа, что уменьшает тушение флуоресценции последнего ионом железа [4]. В настоящем исследовании была предпринята попытка

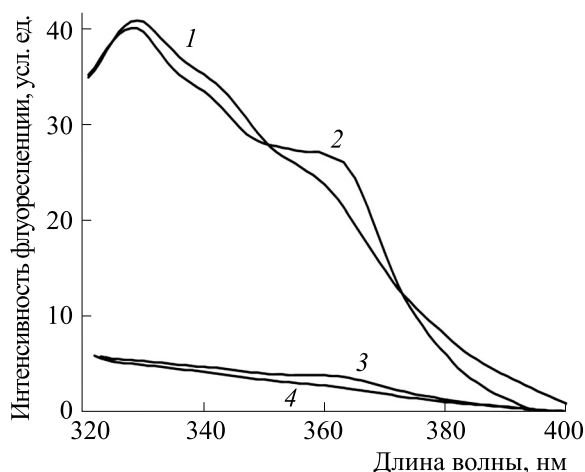


Рис. 1. Спектры флуоресценции триптофана-59 цитохрома *c* в составе различных фосфолипидных комплексов: спектр 1 — цитохром *c* (16.8 мкМ) + 50% DOPC + 50% DOPA, спектр 2 — цитохром *c* (16.8 мкМ) + 50% DOPC + 50% TOCL, спектр 3 — цитохром *c* (16.8 мкМ) + 100% DOPC, спектр 4 — цитохром *c* (16.8 мкМ) .

сравнить изменения деформации активного центра цитохрома *c* при его связывании с кардиолипином и фосфатидной кислотой методом флуоресценции. В этих экспериментах для изменения флуоресценции триптофана-59 использовали липосомы, содержащие 20% TOCL или DOPA и 80% DOPC.

Результаты этих экспериментов приведены на рис. 1 и 2. Можно видеть, что флуоресценция триптофана-59 практически отсутствует в контрольных образцах, содержащих только цитохром *c* (без фосфолипидов), либо комплекс цитохрома *c* с фосфатидилхолином (рис. 1, кривые 3 и 4), что говорит о сильном тушении флуоресценции триптофана-59 парамагнитным ионом железа гема. Однако, когда кардиолипид или фосфатидная кислота были добавлены к липосомам, можно было наблюдать интенсивную флуоресценцию (рис. 1, кривые 1 и 2). Наблюдаемое увеличение флуоресценции триптофана-59 обязано своим происхождением удалению остатка триптофана-59 от иона железа гема. Важно отметить, что эффекты, вызываемые TOCL или DOPA, были близки по своей величине.

На рис. 2 представлена гистограмма интенсивности флуоресценции триптофана-59, входящего в состав комплексов различного состава. В основу гистограммы положены измерения, представленные на рис. 1. Можно видеть, что интенсивность флуоресценции триптофана-59 возрастает в 4–5 раз в присутствии кардиолипина или фосфатидной кислоты. Как было сказано выше, такие изменения флуоресценции связаны с существенной перестройкой активного центра

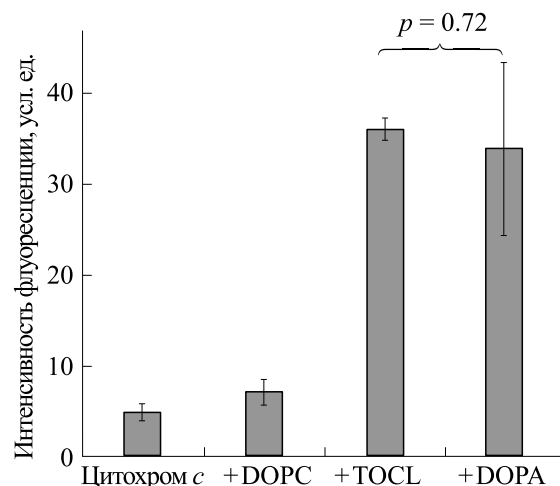


Рис. 2. Гистограмма интенсивности флуоресценции триптофана-59, входящего в состав цитохрома *c*, в фосфолипидных комплексах различного состава. Образцы имели тот же состав, что и комплексы на рис. 1. Данные представлены в виде среднего значения \pm стандартное отклонение.

цитохрома *c* при образовании цитохром *c*-фосфолипидных комплексов в случае с TOCL или DOPA и отсутствие подобных изменений в случае с DOPC.

Важно отметить, что флуоресценция комплексов цитохрома *c* может быть связана не только с триптофаном-59, но и с тирозином-67. На рис. 3 представлена гистограмма, которая отражает соотношение флуоресценции триптофана-59 и тирозина-67 в комплексах цитохрома *c* с разным липидным составом. Можно видеть, что при всех использованных концентрациях кардиолипина и фосфатидной кислоты отношение интенсивности флуоресценции тирозина-67 к интенсивности флуоресценции триптофана-59 не имеет больших отличий. Более того, из результатов, представленных на рис. 3, становится очевидным, что увеличение суммарной концентрации фосфолипидов вызывает и увеличение флуоресценции как тирозина-67, так и триптофана-59. Полученные результаты однозначно свидетельствуют также и в пользу того, что эффект фосфатидной кислоты на деформацию активного центра цитохрома *c* оказался несколько выше, чем у кардиолипина.

Изучение пероксидазной активности комплексов цитохрома *c* и фосфолипидов. Выше было отмечено, что повышенная пероксидазная активность цитохрома *c* — это результат конформационных перестроек в активном центре фермента, которые, в свою очередь, обязаны своим происхождением комплексу цитохрома *c* с анионными фосфолипидами. Как было показано раньше, эта конформационная перестройка чаще всего

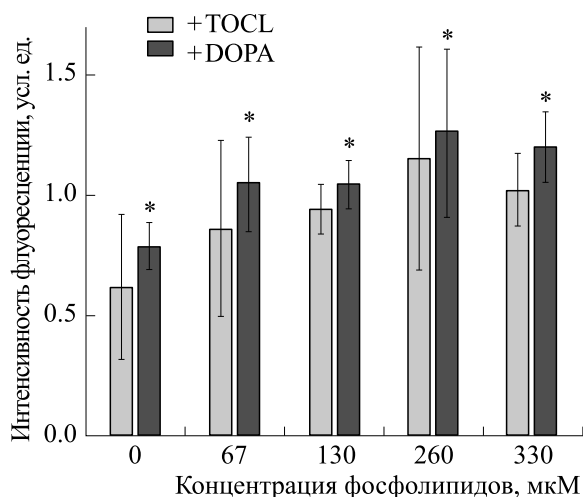


Рис. 3. Гистограмма соотношений между интенсивностью флуоресценции тирозина-67 и триптофана-59 при различных концентрациях кардиолипина (светлые колонки) и фосфатидной кислоты (темные колонки). Все образцы приготовлены на основе 10 мМ фосфатного буфера, pH 7.4, и имели следующий состав: «0» — цитохром *c* (16.8 мкМ), без липосом; «67–330» — цитохром *c* (16.8 мкМ) + липосомы, содержащие 80% DOPC + 20% TOCL (светлые колонки) или + 80% DOPC + 20% DOPA (темные колонки). Суммарная концентрация фосфолипидов составляла от 67 до 330 мкМ. Данные представлены в виде среднего значения \pm стандартное отклонение, * — достоверность различий соответствовала $p < 0.05$.

связана с взаимодействием цитохрома *c* с кардиолипином или фосфатидилсеринем [3, 5, 11]. При образовании белок-фосфолипидного комплекса ион железа гема цитохрома *c* переходит из состояния с 6 координационными связями в состояние с 5 координационными связями, что существенно облегчает доступ для пероксида водорода к каталитически активному иону железа гема. Тем не менее, несмотря на обилие исследований по взаимодействию кардиолипина с цитохромом *c*, количество работ о взаимодействии фосфатидной кислоты невелико. В настоящем разделе мы постарались сравнить пероксидазные свойства цитохрома *c* в комплексах с кардиолипином или фосфатидной кислотой. Пероксидазная активность была исследована методом люминол-зависимой хемилюминесценции (рис. 4 и 5) и методом ЭПР по обнаружению феноксильных радикалов этопозида (рис. 6).

Измерение пероксидазной активности комплексов цитохрома *c* и фосфолипидов методом хемилюминесценции. Для измерения пероксидазной активности цитохрома *c* к комплексам цитохрома, содержащим кардиолипин или фосфатидную кислоту, добавляли пероксид водорода и люминол и регистрировали хемилюминесценцию. На рис. 4 представлены кинетические кривые хемилюминесценции, а на рис. 5 — гистограммы све-

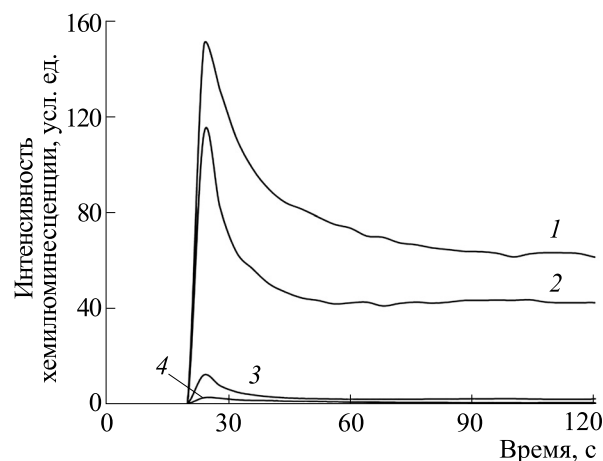


Рис. 4. Кинетические кривые хемилюминесценции комплексов цитохрома *c* и фосфолипидов. Все образцы содержали 10 мкМ цитохрома *c* и 10 мкМ пероксида водорода + 50 мкМ люминола. Образцы без добавления фосфолипидов обозначены как 4. Образцы, содержащие фосфолипиды (с общей концентрацией 200 мкМ), имели следующий состав: 100% DOPC (на графике помечен как DOPC), 20% 3 + 80% DOPC (помечен как 1), или 20% TOCL + 80% DOPC (помечен как 2). Соотношение [фосфолипид] : [цитохром *c*] составляло 20 : 1. Все измерения выполнены при 37°C, образцы были приготовлены на основе фосфатного буфера (10 мМ, pH 7.4).

тосуммы хемилюминесценции этих кинетических кривых. Можно видеть, что светосумма хемилюминесценции образцов, содержащих, кроме цитохрома *c*, только диолеил фосфатидилхолин, не превышает 100 отн. ед. Однако при добавлении липосом, содержащих 20% TOCL или 20% DOPA, возникают интенсивные вспышки хемилюминесценции со светосуммой 1500–2200 отн. ед. соответственно. Отличия интенсивности описанных вспышек статистически значимы ($p < 0.05$). Можно сделать вывод, что присутствие фосфатидной кислоты в составе липосом приводит к появлению сравнимой по интенсивности с кардиолипином вспышки и, что самое главное, — сравнимой по величине пероксидазной активности.

Измерение пероксидазной активности комплексов цитохрома *c* и фосфолипидов методом ЭПР. Измерение пероксидазной активности цитохрома *c* в присутствии липосом, содержащих только DOPC или DOPC с добавлением 20% TOCL или 20% DOPA, было проведено и с использованием метода ЭПР. В этом случае измеряли образование феноксильных радикалов этопозида, образующихся из, собственно, этопозида в пероксидазной реакции. Известно, что амплитуда сигнала ЭПР феноксильных радикалов этопозида пропорциональна пероксидазной активности цитохрома *c*. Из гистограммы, представленной на рис. 6, видно, что в присутствии TOCL или DOPA

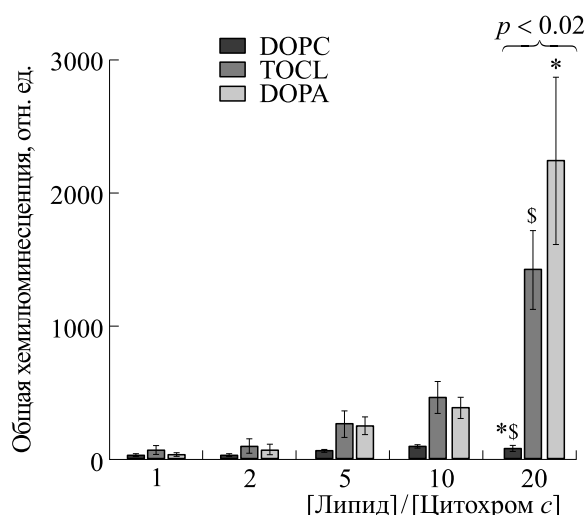


Рис. 5. Гистограмма светосуммы хемилюминесценции комплексов «цитохром *c* : фосфолипид» при их разных соотношениях. Все образцы содержали 10 мкМ цитохрома *c* и 10 мкМ пероксида водорода + 50 мкМ люминола. К образцам были добавлены фосфолипидные липосомы, содержащие 100% DOPC (на графике помечены как DOPC), 20% DOPA + 80% DOPC (помечены как DOPA), или 20% TOCL + 80% DOPC (помечены как TOCL). Соотношение [фосфолипид] : [цитохром *c*] варьировало от 1 : 1 до 20 : 1. Все измерения проводились при температуре 37°C в фосфатном буфере (10 мМ, pH 7.4). Результаты измерений представлены в виде среднего значения \pm стандартное отклонение; * – $p < 0.01$, \$ – $p < 0.01$.

цитохром *c* приобретает примерно вдвое большую пероксидазную активность, чем в случае липосом, содержащих только DOPC ($p < 0.05$). Таким образом, наличие высокой пероксидазной активности цитохрома *c* в присутствии TOCL или DOPA было подтверждено и методом ЭПР.

Исследование восстановления аскорбатом комплексов цитохрома *c* с фосфолипидами. Одним из наиболее интересных свойств цитохрома *c* является его способность к восстановлению аскорбиновой кислотой, т.к. в митохондриях основная роль цитохрома *c* как раз и заключается в переносе электронов от III к IV комплексам Грина. Эти свойства имеют и прямое отношение к индукции запрограммированной гибели клеток [13]. Изменение способности к окислению и восстановлению в присутствии липосом, содержащих TOCL, было подробно исследовано в работе [12]. К сожалению, информация о влиянии фосфатидной кислоты на восстановление и окисление цитохрома *c* в литературе практически отсутствует. В настоящем разделе мы попытались устранить этот пробел. Оценка окислительно-восстановительных свойств цитохрома *c* в присутствии DOPA была проведена с использованием метода спектрофотометрии.

Результаты этого исследования представлены на рис. 7 и 8. Приведены спектры оптического поглощения цитохрома *c* в присутствии либо DOPC (рис. 7), либо DOPA (рис. 8). Можно видеть, что полоса поглощения цитохрома *c* при 550 нм (отражающая процесс восстановления цитохрома *c*)

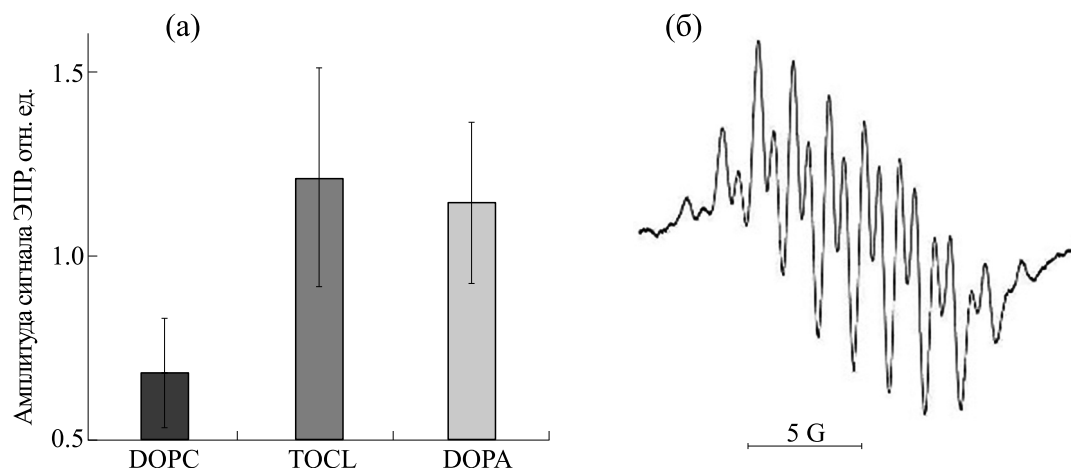


Рис. 6. (а) – Изменения концентрации феноксильных радикалов этопозиды в присутствии комплексов «цитохром *c* : фосфолипид» разного состава по данным ЭПР спектроскопии. Все образцы содержали 0.1 мМ цитохрома *c*, 1.2 мМ пероксида водорода и 5 мМ этопозиды, а также липосомы, содержащие 2 мМ фосфолипидов, из которых в образце, помеченном как DOPC, содержалось 100% DOPC; в образце, помеченном как DOPA, содержалось 20% DOPA + 80% DOPC и в образце, помеченном как TOCL, – 20% TOCL + 80% DOPC. Соотношение [фосфолипид] : [цитохром *c*] составляло 20 : 1. Все измерения проведены при температуре 37°C в фосфатном буфере (10 мМ, pH 7.4). Данные на гистограммах представлены в виде среднего значения \pm стандартное отклонение. (б) – Сигнал ЭПР феноксильного радикала этопозиды, образующегося в пероксидазной реакции.

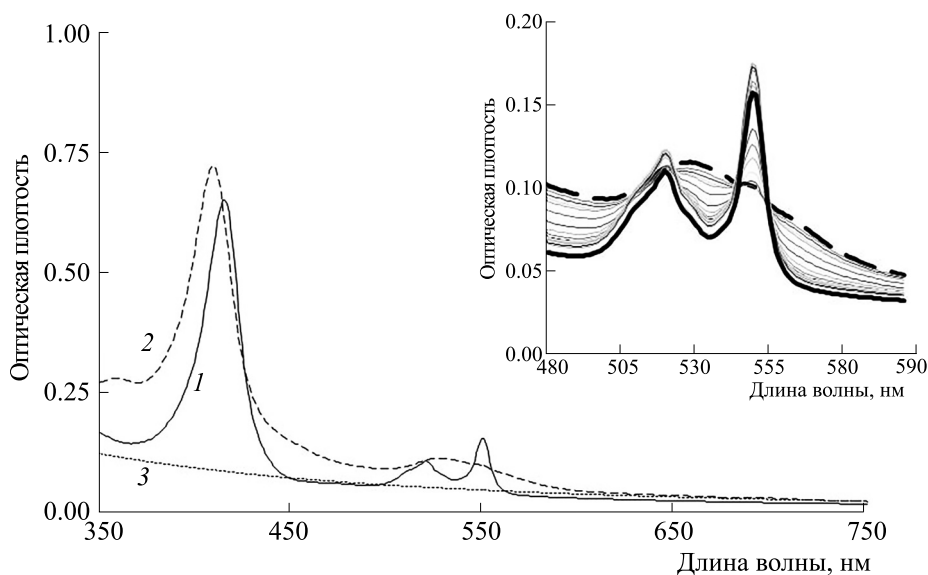


Рис. 7. Спектры оптического поглощения цитохрома *c* при его восстановлении аскорбиновой кислотой в присутствии DOPC. Образцы содержали: спектр 1 – цитохром *c* (10 мкМ) + липосомы с DOPC (0.2 мМ) + аскорбат (1.2 мМ), спектр 2 – цитохром *c* (10 мкМ) + липосомы с DOPC (0.2 мМ), спектр 3 – липосомы с DOPC (0.2 мМ). На врезке: изменение спектров поглощения цитохрома *c* при возрастающих концентрациях аскорбата (от 0 до 1.2 мМ) в присутствии липосом с DOPC. Все образцы содержали фосфатный буфер (10 мМ, pH 7.4). Измерения проводились при комнатной температуре.

при титровании комплексов аскорбиновой кислотой постепенно увеличивается при возрастании концентрации аскорбата. Это касается и комплексов цитохрома *c* с DOPC и с DOPA.

Из результатов, представленных на рис. 7 и 8, можно видеть, что присутствие липосом с DOPC практически не влияет на степень восстановления цитохрома *c* аскорбиновой кислотой ($p < 0.001$). В то же время, в присутствии 20% TOCL или 20% DOPA в липосомах наблюдается примерно 25% снижение интенсивности полосы спектра поглощения цитохрома *c* при 550 нм, что говорит о снижении способности цитохрома *c* к восстановлению аскорбатом.

На рис. 9 и 10 представлены анаморфозы концентрационных зависимостей при титровании (рис. 9) и гистограмма интенсивностей оптического поглощения цитохрома *c* (550 нм) при добавлении аскорбиновой кислоты (рис. 10). Можно видеть, что с увеличением концентрации DOPA в липосомах происходит пропорциональное снижение интенсивности полосы 550 нм спектра поглощения комплексов цитохрома *c*. Таким образом, можно утверждать, что в присутствии DOPA комплекс цитохрома *c* с липосомами теряет способность к восстановлению аскорбатом. Аналогичные изменения способности комплексов цитохрома *c* к восстановлению можно наблюдать и в присутствии TOCL-содержащих липосом.

Анализ полученных результатов позволяет сделать следующие выводы. Подобно кардиолипину, фосфатидная кислота может эффективно индуцировать появление пероксидазной активности у цитохрома *c*. Однако, в отличие от кардиолипина, фосфатидная кислота может образовываться в митохондриях в большом количестве благодаря присутствию фосфолипазы D, которая в ходе ферментативной реакции гидролизует характеристическую группу фосфолипида, образуя из него фосфатидную кислоту [8]. Фосфатидная кислота, в свою очередь, индуцирует появление пероксидазной активности у цитохрома *c*, что в конечном итоге вызывает перекисное окисление фосфолипидов мембран, образование пор в митохондриальных мембранах и запуск процессов запрограммированной гибели клеток [14, 15].

Настоящее исследование посвящено сравнению событий в молекуле цитохрома *c*, вызываемых как кардиолипином [13], так и фосфатидной кислотой. Нами показано, что и кардиолипин, и фосфатидная кислота демонстрируют близкие по величине эффекты в отношении цитохрома *c*. В некоторых случаях при сравнении флуоресценции тирозина-67 и триптофана-59 фосфатидная кислота показывает даже более высокие результаты. Кроме того, индукция пероксидазной активности цитохрома *c*, измеренная методом люминол-зависимой хемилюминесценции, фосфатидной кислотой была примерно на 45% выше, чем таковая для кардиолипина ($p < 0.007$).

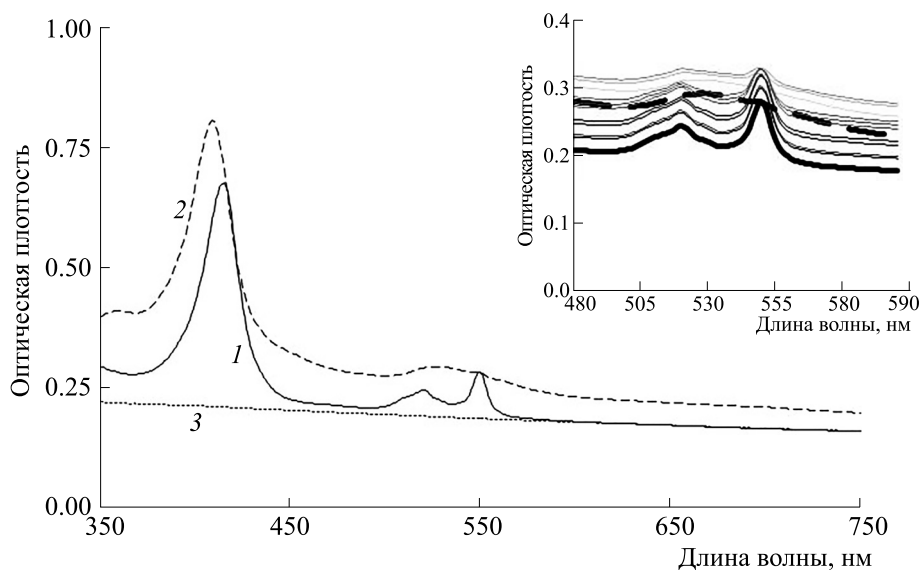


Рис. 8. Спектры оптического поглощения цитохрома *c* при его восстановлении аскорбиновой кислотой в присутствии DOPA. Образцы содержали: спектр 1 – цитохром *c* (10 мкМ) + липосомы с DOPA (0.2 мМ) + аскорбат (1.2 мМ), спектр 2 – цитохром *c* (10 мкМ) + липосомы с DOPA (0.2 мМ), спектр 3 – липосомы с DOPA (0.2 мМ). На врезке: изменение спектров поглощения цитохрома *c* при возрастающих концентрациях аскорбата (от 0 до 1.2 мМ) в присутствии липосом с DOPA. Все образцы содержали фосфатный буфер (10 мМ, pH 7.4). Измерения проводились при комнатной температуре.

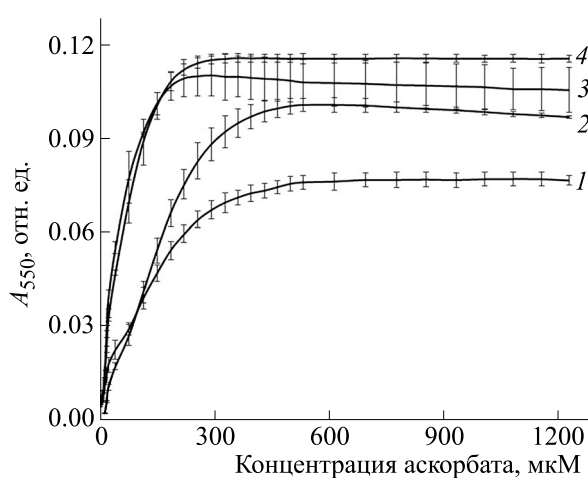


Рис. 9. Зависимость изменений полосы 550 нм спектра поглощения цитохрома *c* в присутствии липосом различного состава. Образцы содержали: 1 – цитохром *c* (10 мкМ) + липосомы, содержащие 20% DOPA + аскорбат; 2 – цитохром *c* (10 мкМ) + липосомы, содержащие 20% TOCL + аскорбат; 3 – цитохром *c* (10 мкМ) + аскорбат; 4 – цитохром *c* (10 мкМ) + липосомы, содержащие 100% DOPC + аскорбат. Суммарная концентрация фосфолипидов во всех образцах составляла 0.2 мМ. Все образцы были приготовлены на фосфатном буфере (10 мМ, pH 7.4). Измерения проводились при комнатной температуре.

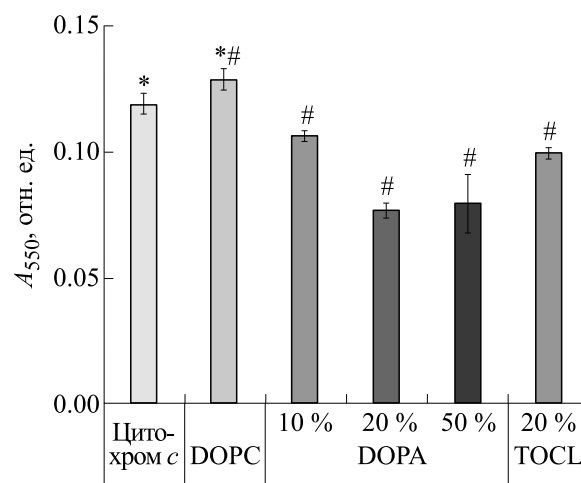


Рис. 10. Интенсивности оптического поглощения цитохрома *c* при 550 нм в присутствии аскорбата и липосом. Образцы содержали: Цитохром *c* – цитохром *c* (10 мкМ) + аскорбат (1.2 мМ); DOPC – цитохром *c* (10 мкМ) + липосомы с DOPC + аскорбат (1.2 мМ); DOPA 10% – цитохром *c* (10 мкМ) + липосомы с 10% DOPA + аскорбат (1.2 мМ); DOPA 20% – цитохром *c* (10 мкМ) + липосомы с 20% DOPA + аскорбат (1.2 мМ); DOPA 50% – цитохром *c* (10 мкМ) + липосомы с 50% DOPA + аскорбат (1.2 мМ); TOCL 20% – цитохром *c* (10 мкМ) + липосомы с 20% TOCL + аскорбат (1.2 мМ). Суммарная концентрация фосфолипидов во всех образцах (кроме образца, помеченного как Цитохром *c*) – 0.2 мМ. * – $p < 0.05$, # – $p < 0.05$.

Более того, как было продемонстрировано в работе [12], при связывании с кардиолипином редокс-потенциал цитохрома *c* снижается примерно на 350–400 мВ. В настоящей работе также показано, что аналогично кардиолипину фосфатидная кислота может также существенно снижать степень восстановления цитохрома *c* аскорбатом. Естественно, если такие процессы будут иметь место в митохондриях, то это существенно снизит скорость переноса электронов по митохондриальной электрон-транспортной цепи и может привести к увеличению образования супероксидных радикалов и других активных форм кислорода, что в конечном итоге приведет к перекисному окислению липидов мембран и разрушению митохондрий.

Важно отметить, что основным итогом настоящей работы стала демонстрация эффектов, вызываемых фосфатидной кислотой, которая не только не уступает, но иногда и превосходит эффекты, вызываемые кардиолипином. Результаты, полученные в настоящем исследовании, углубляют понимание молекулярных процессов, лежащих в основе запрограммированной гибели клеток.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Настоящее исследование было выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 24-25-00292).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, связанных с изложенными в статье данными.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания собственных исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Fiorucci L., Erba F., Santucci R., and Sinibaldi F. Cytochrome *c* interaction with cardiolipin plays a key role in cell apoptosis: Implications for human diseases. *Symmetry*, **14** (4), 767 (2022). DOI: 10.3390/sym14040767
2. Chertkova R. V., Firsov A. M., Brazhe N. A., Nikelshparg E. I., Bochkova Z. V., Bryantseva T. V., Semenova M. A., Baizhumanov A. A., Kotova E. A., Kirpichnikov M. P., Maksimov G. V., Antonenko Y. N., and Dolgikh D. A. Multiple mutations in the non-ordered red Ω -loop enhance the membrane-permeabilizing and peroxidase-like activity of cytochrome *c*. *Biomolecules*, **12**, 665 (2022). DOI: 10.3390/biom12050665
3. 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., and Borisenko G. G. Cytochrome *c* acts as a cardiolipin oxygenase required for release of proapoptotic factors. *Nat. Chem. Biol.*, **1**, 223–232 (2005). DOI: 10.1038/nchembio727
4. Kapralov A. A., Kurnikov I. V., Vlasova I. I., Belikova N. A., Tyurin V. A., Basova L. V., Zhao Q., Tyurina Y. Y., Jiang J., Bayir H., Vladimirov Y. A., and Kagan V. E. The hierarchy of structural transitions induced in cytochrome *c* by anionic phospholipids determines its peroxidase activation and selective peroxidation during apoptosis in cells. *Biochemistry*, **46**, 14232–14244 (2007). DOI: 10.1021/bi701237b
5. Jemmerson R., Liu J., Hausauer D., Lam K.-P., Mondino A., and Nelson R. D. A conformational change in cytochrome *c* of apoptotic and necrotic cells is detected by monoclonal antibody binding and mimicked by association of the native antigen with synthetic phospholipid vesicles. *Biochemistry*, **38**, 3599–3609 (1999). DOI: 10.1021/bi9809268
6. Quinn P. J. and Dawson R. M. C. Interactions of cytochrome *c* and [^{14}C]-carboxymethylated cytochrome *c* with monolayers of phosphatidylcholine, phosphatidic acid and cardiolipin. *Biochem. J.*, **115**, 65–75 (1969). DOI: 10.1042/bj1150065
7. Osipov A. N., Stepanov G. O., Vladimirov Y. A., Kozlov A. V., and Kagan V. E. Regulation of cytochrome C peroxidase activity by nitric oxide and laser irradiation. *Biochemistry (Moscow)*, **71**, 1128–1132 (2006). DOI: 10.1134/s0006297906100117
8. Barber C. N., Haganir R. L., and Raben D. M. Phosphatidic acid-producing enzymes regulating the synaptic vesicle cycle: Role for PLD? *Adv. Biol. Regul.*, **67**, 141–147 (2018). DOI: 10.1016/j.jbior.2017.09.009
9. Stepanov G., Gnedenko O., Mol'nar A., Ivanov A., Vladimirov Y., and Osipov A. Evaluation of cytochrome *c* affinity to anionic phospholipids by means of surface plasmon resonance. *FEBS Lett.*, **583**, 97–100 (2009). DOI: 10.1016/j.febslet.2008.11.029
10. Boteva R., Zlateva T., Dorovska-Taran V., Visser A. J. W. G., Tsanev R., and Salvato B. Dissociation equilibrium of human recombinant interferon γ . *Biochemistry*, **35**, 14825–14830 (1996). DOI: 10.1021/bi9527597
11. Zhan J., Zhang G., Chai X., Zhu Q., Sun P., Jiang B., Zhou X., Zhang X., and Liu M. NMR reveals the conformational changes of cytochrome C upon interaction with cardiolipin. *Life*, **11**, 1031 (2021). DOI: 10.3390/life11101031
12. Kagan V. E., Jiang J., Bayir H., and Stoyanovsky D. A. Targeting nitroxides to mitochondria: location, location, location, and ...concentration: Highlight commentary on “Mitochondria superoxide dismutase mimetic inhibits peroxide-induced oxidative damage and apoptosis: Role

- of mitochondrial superoxide" *Free Radic. Biol. Med.*, **43**, 348–350 (2007).
DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2007.03.030
13. Kagan V. E., Tyurina Y. Y., Sun W. Y., Vlasova I. I., Dar H., Tyurin V. A., Amoscato A. A., Mallampalli R., Van Der Wel P. C. A., He R. R., Shvedova A. A., Gabri-
lovich D. I., Bayir H. Redox phospholipidomics of enzymatically generated oxygenated phospholipids as specific signals of programmed cell death. *Free Radic. Biol. Med.*, **147**, 231–241 (2020).
DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2019.12.028
 14. Firsov A. M., Kotova E. A., Korepanova E. A., Osipov A. N., and Antonenko Y. N. Peroxidative permeabilization of liposomes induced by cytochrome c/cardiolipin complex. *Biochim. Biophys. Acta — Biomembranes*, **1848**, 767–774 (2015).
DOI: 10.1016/j.bbamem.2014.11.027
 15. Puchkov M. N., Vassarais R. A., Korepanova E. A., and Osipov A. N. Cytochrome c produces pores in cardiolipin-containing planar bilayer lipid membranes in the presence of hydrogen peroxide. *Biochim. Biophys. Acta — Biomembranes*, **1828**, 208–212 (2013).
DOI: 10.1016/j.bbamem.2012.10.002

Changes in the Structure and Peroxidase Activity of Cytochrome C in Its Interaction with Phosphatidic Acid

V.V. Volkov*, S.P. Konukhova*, A.V. Blagova*, G.O. Stepanov*, Yu.A. Vladimirov*, and A.N. Osipov*

*Pirogov Russian National Research Medical University, ul. Ostrovityanova 1, Moscow, 117997 Russia

A comparative molecular investigation of the action of earlier little-studied phosphatidic acid and well-studied cardiolipin in their interaction with cytochrome C was carried out. Using spectrofluorimetry, close conformational changes in the cytochrome C active center were shown to occur during its interaction not only with cardiolipin, but also with phosphatidic acid. By means of an EPR assay, a significant enhancement of cytochrome C peroxidase activity during its interaction with cardiolipin and phosphatidic acid was demonstrated by formation of etoposide phenoxyl radical and luminol-dependent chemiluminescence. The assay indicated about 30% more pronounced changes in cytochrome C peroxidase activity in the presence of phosphatidic acid as compared to a similar effect of cardiolipin. At the same time, a close to intensity overwhelming recovery of the action of cardiolipin or phosphatidic acid was shown spectrophotometrically by cytochrome C reduction, which decreases by approximately 25% as compared to control phosphatidylcholine-containing samples. Thus, phosphatidic acid can effectively change the cytochrome C conformation and peroxidase activity as well effectively, and in peroxidase activity PA even surpasses cardiolipin. The obtained results may signify a high involvement of both cardiolipin and phosphatidic acid in the development of cytochrome C-mediated proapoptotic processes in mitochondria which, in its turn, may lay become foundation for a new direction in regulatory lipidomics.

Keywords: cytochrome C, apoptotic mechanisms, phospholipids, cardiolipin, phosphatidic acid