

**Измерение проницаемости модельных мембран по восстановлению
нитроксильного радикала ТЕМПО при действии цитохрома С**

Научный руководитель – Степанов Герман Олегович

Кузнецова А.Л.¹, Макарова Н.В.², Сидорова К.О.³

1 - Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова, Москва, Россия, *E-mail: ton_kuz@mail.ru*; 2 - Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова, Москва, Россия, *E-mail: natalia3517257@mail.ru*; 3 - Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова, Москва, Россия, *E-mail: ksenyasidorova@inbox.ru*

Сегодня никем не оспаривается роль цитохрома С как одного из основных инициаторов апоптотических процессов [1]. Основу работы цитохрома С составляет изменение его конформации в результате взаимодействия со специфическими анионными фосфолипидами.

В наших экспериментах мы экспериментально подтверждаем появление высокой пероксидазной активности цитохрома С не в результате работы кардиолипина (ТОСЛ), а после взаимодействия с фосфатидной кислотой (DOPA). Данный путь инициации апоптоза представляется нам очень высоковероятным, так как один из специфических видов фосфолипазы D присутствует на мембране митохондрии и может преобразовывать фосфатидилхолины биологической мембраны в проапоптотическую фосфатидную кислоту.

Данная работа выполнена на модельной системе, состоящей из липосом с разным количественным и качественным составом фосфолипидов. Для подтверждения сравнимого действия ТОСЛ и DOPA на увеличение пероксидазной активности цитохрома С применен метод люминол-зависимой хемилюминесценции. Показано, что действие DOPA и ТОСЛ может увеличивать пероксидазную активность цитохрома С в 30 раз (рис. 1).

В следующих опытах было изучено влияние пероксида водорода и цитохрома С на падение амплитуды ЭПР-сигнала ТЕМПО при действии аскорбиновой кислоты. Предполагалось, что увеличение пероксидазной активности цитохрома С в результате его взаимодействия с фосфатидной кислотой ТЕМПО-содержащих липосом будет приводить к увеличению их проницаемости. Данное увеличение проницаемости будет облегчать доступ аскорбиновой кислоты к ТЕМПО расположенному внутри липосом и его восстановлению [2]. Кинетика изменения сигнала ЭПР замерялась в течение 10 минут после добавления пероксида водорода. Оказалось, что скорость восстановления ТЕМПО была пропорциональна количеству как пероксида водорода, так и цитохрома С. Показано значительное уменьшение (более чем на 20%) интенсивности сигнала ТЕМПО при добавлении липосом, содержащих 40% DOPA (рис. 2).

Анализ полученных данных позволил сделать вывод, что взаимодействие цитохрома С с липосомами, содержащими фосфатидную кислоту, приводит к резкому увеличению сначала его пероксидазной активности (примерно в 30 раз), а впоследствии изменению проницаемости DOPA содержащих мембран. Данный результат объясняет механизм действия фосфатидной кислоты, которое в дальнейшем может приводить к развитию апоптоза.

Источники и литература

- 1) Marion MacFarlane, Ann C. Williams. Apoptosis and disease: a life or death decision // EMBO reports 2004 Jul;5(7):674-8
- 2) Ivana Sajenko, Viktor Pilepic ´, Cvijeta Jakobus´ic ´ Brala, and Stanko Urs´ic ´. Solvent Dependence of the Kinetic Isotope Effect in the Reaction of Ascorbate with the 2,2,6,6-Tetramethylpiperidine-1-oxyl Radical: Tunnelling in a Small Molecule Reaction // J. Phys. Chem. A 2010, 114, 3423–3430

Иллюстрации

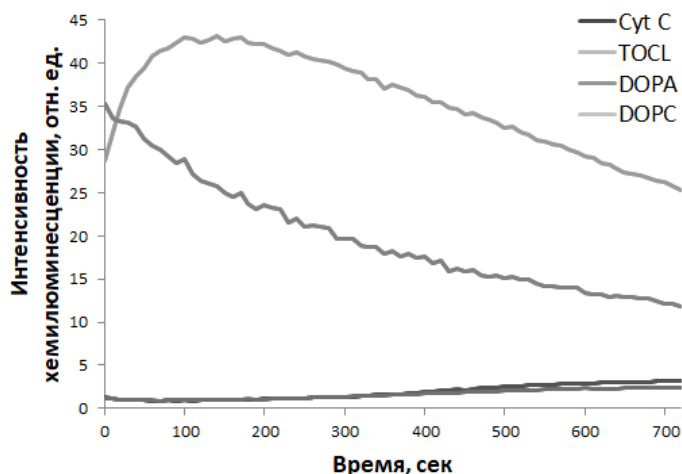


Рис. 1. Изменение люминол-зависимой хемилюминесценции комплексов фосфолипидов с цитохромом с в присутствии H₂O₂.

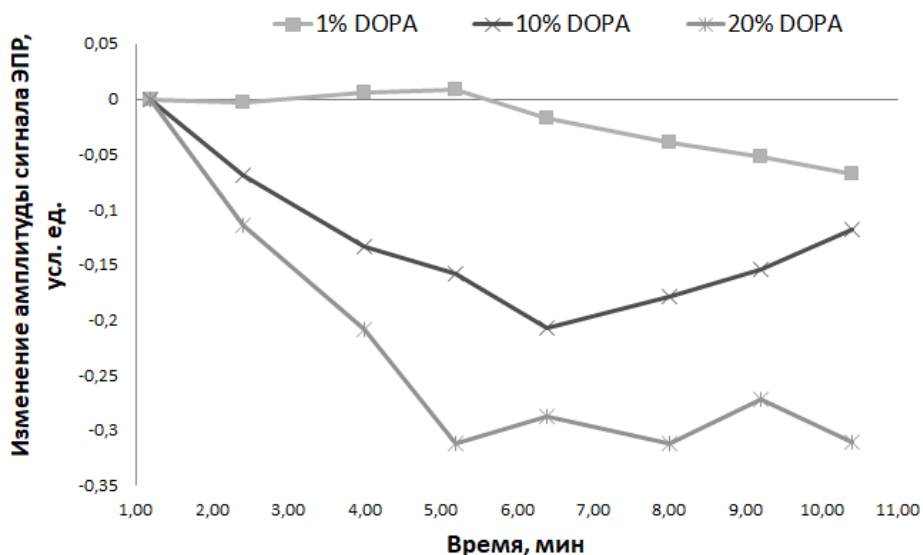


Рис. 2. Кинетика восстановления нитроксильного радикала ТЕМПО аскорбатом в присутствии цитохром С / фосфолипидных комплексов и H₂O₂. Все результаты представлены после нормировки на аналогичные контрольные образцы, измеренные в отсутствие пероксида водорода.