

УДК 577.151; 577.322; 577.325

АНТИОКСИДАНТНОЕ ДЕЙСТВИЕ ДИГИДРОКВЕРЦЕТИНА И РУТИНА В ПЕРОКСИДАЗНЫХ РЕАКЦИЯХ, КАТАЛИЗИРУЕМЫХ ЦИТОХРОМОМ С

Е.М. Демин, Е.В. Проскурнина, Ю.А. Владимиров

(факультет фундаментальной медицины; e-mail: yuvlad@mail.ru)

Известно, что цитохром с (Цит с), находящийся в комплексе с кардиолипином, катализирует свободно-радикальное окисление мембранных липидов, тем самым запуская каскад реакций, приводящих к смерти клеток (апоптозу). Представляло интерес выяснить возможность управления этой реакцией с помощью ингибиторов свободно-радикальных реакций, т.е. антиоксидантов. Изучено влияние кардиолипина из сердца быка (БКЛ) и синтетического 1,1',2,2'-тетраолеилкардиолипина (ТОКЛ) на пероксидазную активность цитохрома с, регистрируемую по хемилюминесценции в присутствии люминола. Показано, что величина амплитуды хемилюминесценции (ХЛ) существенно возрастает в диапазоне молярных соотношений кардиолипин / Цит с приблизительно от 0 до 30 и от 0 до 50 для ТОКЛ и БКЛ, соответственно и незначительно увеличивается при дальнейшем увеличении этого соотношения до 640:1 и 320:1 моль/моль. Такой характер зависимости амплитуды ХЛ от соотношения кардиолипин / белок можно, вероятно, объяснить наступлением насыщения поверхности белка молекулами кардиолипина. При соотношении БКЛ / Цит с 32:1 моль/моль исследовано влияние антиоксидантов рутина и дигидрокверцетина на пероксидазную активность Цит С с БКЛ в присутствии активатора ХЛ кумарина С-525. В обоих случаях наблюдалось снижение пероксидазной активности по мере увеличения содержания антиоксиданта в системе. Половинное ингибирование реакции наблюдалось при концентрациях ДГК и рутина 10 мкМ и 3 мкМ соответственно. Предполагается, что использование антиоксидантов позволит контролировать ключевую стадию апоптоза - образование липидных радикалов на мембранно-связанном цитохроме с.

Исследования апоптоза (запрограммированной смерти клетки) представляют большой интерес как для биологов, так и для врачей [1, 2]. Различают внешний и внутренний (митохондриальный) пути апоптоза, которые проходят через стадию выхода цитохрома с (Цит с) из митохондрий в цитозоль [3, 4]. В результате инициируется каспазный каскад, приводящий к гибели клетки [5, 6]. Исследование причин и механизмов выхода цитохрома с из митохондрии является одним из ключевых вопросов биохимии апоптоза.

Большая часть цитохрома с в составе митондрий содержится в виде комплекса с кардиолипином на наружной поверхности внутренней мембраны митондрий [7, 8]. Показано, что природный кардиолипин является активатором пероксидазной активности цитохрома с, а также служит субстратом пероксидазной реакции, в результате которой образуются продукты, типичные для липидной пероксидации [8–10]. В работе [11] был исследован механизм индукции пероксидазной активности цитохрома с кардиолипином. Взаимодействие кардиолипина с цитохромом с приводит к разрыву связи Fe²⁺-S (Met80) гемового железа цитохрома с, обеспечивая доступность железа

гема для реакции с H₂O₂. Кроме того, специфическое действие кардиолипина заключается в изменении конформации цитохрома с при образовании комплекса [12].

Таким образом, пероксидазная активность цитохрома с, находящегося в комплексе с кардиолипином и катализирующего переокисление мембранных липидов, играет решающую роль в развитии апоптоза. Представляет интерес исследовать возможность управления этой стадией для контроля апоптоза в целом.

Реакции свободнорадикального окисления ингибируются антиоксидантами. Все антиоксиданты можно разделить на две большие группы: водорастворимые и гидрофобные. К гидрофобным антиоксидантам принадлежат β-токоферол, каротины и флавоноиды. Сравнительное изучение действия флавоноидов на апоптоз было проведено в работе [13]. В работе [14] хемилюминесцентным методом изучали действие антиоксидантов на кинетику Fe-индуцированного окисления фосфолипидов липосом в присутствии активатора С-525. Рутин и β-токоферол уменьшали амплитуду быстрой вспышки ХЛ и при этом увеличива-

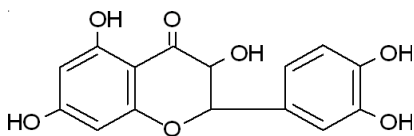
ли латентный период развития хемилюминесценции (ХЛ). β -Каротин давал тот же эффект при гораздо больших концентрациях.

Несмотря на большое число работ, посвященных действию антиоксидантов на организм человека и на реакции с образованием свободных радикалов *in vitro*, до сих пор не была предпринята попытка изучения их действия на свободнорадикальные процессы, лежащие в основе развития апоптоза. В настоящей работе методами хемилюминесценции изучалось влияние антиоксидантов на пероксидазную активность комплекса цитохрома *c* с кардиолипином.

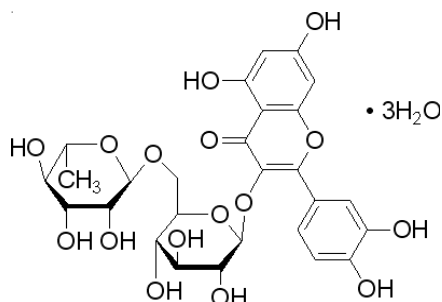
Материалы и методы

В работе использовали растворы цитохрома *c* из сердца лошади (99%, “Sigma”, США, кат. № С7752), кардиолипина из бычьего сердца (БКЛ, Na-соль, 98%, “Sigma”, ТСХ) в фосфатном 20 мМ буферном растворе, рН 7,4, синтетического препарата 1,1',2,2'-тетраолеилкардиолипина (ТОКЛ, Na-соль) в метаноле (“ос.ч.”). Концентрацию цитохрома *c* определяли спектрофотометрически после восстановления аскорбиновой кислотой (99%, “Aldrich”, Германия) с использованием молярного коэффициента поглощения в максимуме полосы 550 нм (ϵ_{550} 29 400 л/моль·см). Для приготовления фосфатного буферного раствора, рН 7,4, использовали $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (“ч.д.а.”, “Химмед”, Россия).

Дигидрокверцетин (ДГК, “Химдревесина”, Россия) растворяли в фосфатном буферном растворе, а рутин (95%, “Sigma-Aldrich”) – в метаноле (“Aldrich”, для хроматографии). Формулы этих соединений представлены ниже



Дигидрокверцетин (ДГК)



Рутин (кверцетин-3-рутинозид)

В качестве хемилюминесцентного реагента использовали люминол (“Sigma”, 97%), раствор в бидистиллированной воде (рН 7,4), а также раствор кумарина С-525 (ООО НПФ “Альфа-Аконис”, Россия) в метаноле. Для исследования пероксидазной активности в случае люминол-зависимой ХЛ использовали раствор пероксида водорода, приготовленный разбавлением из 30%-го раствора H_2O_2 (“Aldrich”) бидистиллированной водой. Концентрацию пероксида водорода определяли спектрофотометрически при 230 нм (ϵ_{230} = 72,1 л/моль·см.) [15].

Исследование влияния антиоксидантов на пероксидазную активность цитохрома *c* проводили на хемилюминометре “Smartlum 5773” (“ИнтерОптика-С”, Россия). Методика измерения пероксидазного окисления люминола в присутствии комплекса цитохром *c*–кардиолипин приведена в [11]. Там же дано описание хемилюминометра. Интенсивности хемилюминесценции везде даны в показаниях прибора (вольтах). В определении абсолютной интенсивности излучаемой хемилюминесценции в данной работе не было необходимости, так как действие антиоксиданта оценивалось по степени его влияния на хемилюминесценцию, а все сравнения контрольных (без антиоксиданта) и опытных кривых хемилюминесценции проводились в один день и в одинаковых условиях. Повторные измерения одинаковых проб давали практически совпадающие кривые свечения.

Измерение кумарин-зависимой ХЛ проводили следующим образом. К раствору БКЛ (0,48 мМ, здесь и далее в скобках конечные концентрации вещества в кювете) добавляли антиоксиданты (ДГК 0–0,030 мМ, рутин 0–0,012 мМ), фосфатный буферный раствор, кумарин С-525 (0,12 мМ). После регистрации фонового сигнала в течение 1–2 мин добавляли цитохром *c* (0,015 мМ) и регистрировали кинетику ХЛ. Конечный объем пробы в кювете 200 мкл.

Результаты и обсуждение

Сам по себе цитохром *c* обладает очень слабой пероксидазной активностью, которая тем не менее регистрируется методом измерения хемилюминесценции в присутствии люминола (рис. 1а). При добавлении растворов кардиолипина (БКЛ и ТОКЛ) наблюдали резкое увеличение пероксидазной активности цитохрома *c*, что проявлялось в ускорении развития ХЛ, увеличении амплитуды ХЛ-ответа и сокращении времени до наступления максимума ХЛ (рис. 1а). При высоких соотношениях кардиолипин/Цит *c*, а именно 640:1 и 320:1 моль/моль для

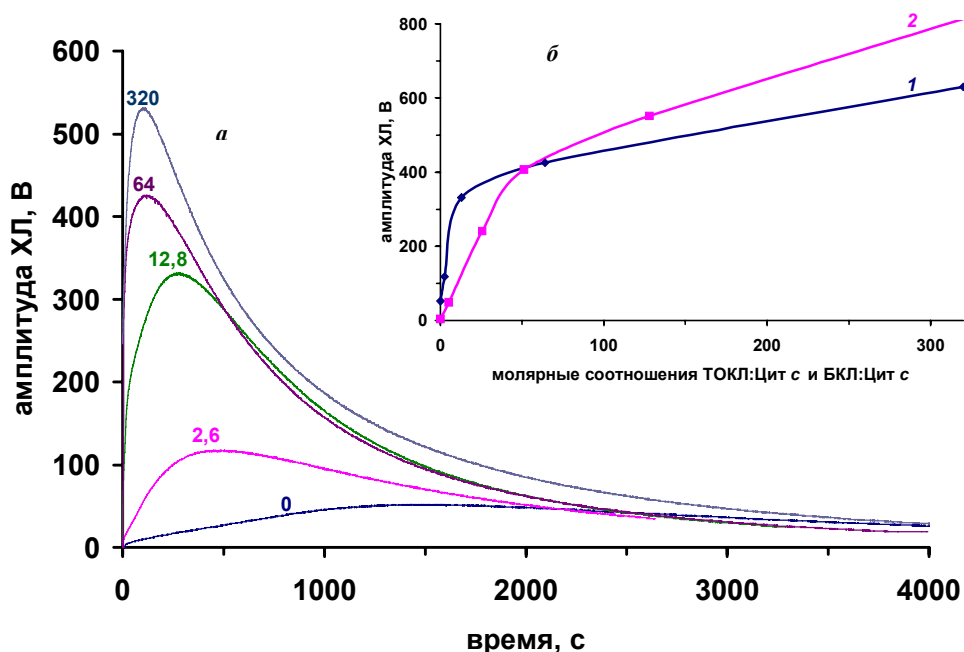


Рис. 1. *а* – Кривые развития ХЛ при комнатной температуре в системе люминол–пероксид водорода в присутствии Цит *с* и различных количеств ТОКЛ. Числа у кривых показывают молярное отношение ТОКЛ к Цит *с*. Концентрация цитохрома *с* 0,015 мМ, люминола – 0,05 мМ, ТОКЛ – до 0,48 мМ, H_2O_2 – 0,04 мМ, фосфатный буферный раствор (рН 7,4). За начало отсчета времени принят момент добавления в кювету цитохрома *с*. *б* – Зависимость амплитуды ХЛ при комнатной температуре в системе люминол–пероксид водорода в присутствии Цит *с* от молярного соотношения: 1 – ТОКЛ:Цит *с*, 2 – БКЛ:Цит *с*. Концентрация цитохрома *с* 0,015 мМ, люминола – 0,05 мМ, ТОКЛ – до 0,48 мМ, H_2O_2 – 0,04 мМ, фосфатный буферный раствор (рН 7,4)

БКЛ и ТОКЛ соответственно пероксидазная активность возрастала в 312 и 11 раз по отношению к чистому Цит *с*. Видно, что заметный рост активации ХЛ наблюдается до определенного избытка кардиолипина по отношению к цитохрому (рис. 1*б*). Этот предел соответствует молярному соотношению липид/Цит *с* примерно 50:1 моль/моль для БКЛ и 30:1 для ТОКЛ. Такой характер кривых можно объяснить тем, что при низких соотношениях липид/белок каждая новая молекула кардиолипина, связываясь с поверхностью белковой глобулы, увеличивает пероксидазную активность цитохрома *с*, но когда вся поверхность белка уже занята, новые молекулы, добавляемые к раствору, лишь незначительно (и неясно почему) дополнительно усиливают пероксидазную активность цитохрома *с*. В пользу такого предположения отчасти говорит тот факт, что в тех исследованиях, когда цитохром *с* вносили в суспензию липосом, предварительно сформированных из фосфатидилхолина с добавлением кардиолипина, кривые зависимости пероксидазной активности Цит *с* от соотношения липид/белок были плавными и не имели переломов [16].

Это предположение подтверждается и численными расчетами. Гидродинамический диаметр глобулы цитохрома *с* составляет 3,4 нм [17]. Глобула цитохрома *с* примерно сферической формы, площадь ее поверхности составляет $4\pi R^2$, т.е. около 36 нм^2 .

Площадь полярной головки кардиолипина на поверхности белковой глобулы оценить труднее, поскольку по данным рентгеноструктурного анализа белковых кристаллов молекулы частично проникают вглубь глобулы, а полярная головка молекулы обладает значительной гибкостью. Оценки площади полярной части дают для разных белков цифры, варьирующие в пределах от 0,5 до $1,1 \text{ нм}^2$ (для примера были взяты белки с индексами белковой базы данных PDB 1k6l, 1kb9, 1nek, 1okc, 1p84 и 2c3e). С другой стороны, поперечное сечение прижатых друг к другу четырех углеводородных цепей (столько жирнокислотных цепей в кардиолипине) составляет около $0,8 \text{ нм}^2$ [18–20]. Это значит, что на поверхности цитохрома *с* могут разместиться примерно от 30 до 50 молекул кардиолипина, что согласуется с нашими экспериментами. Естественно, что фосфолипиды с разными по структуре жирнокислотными хвостами

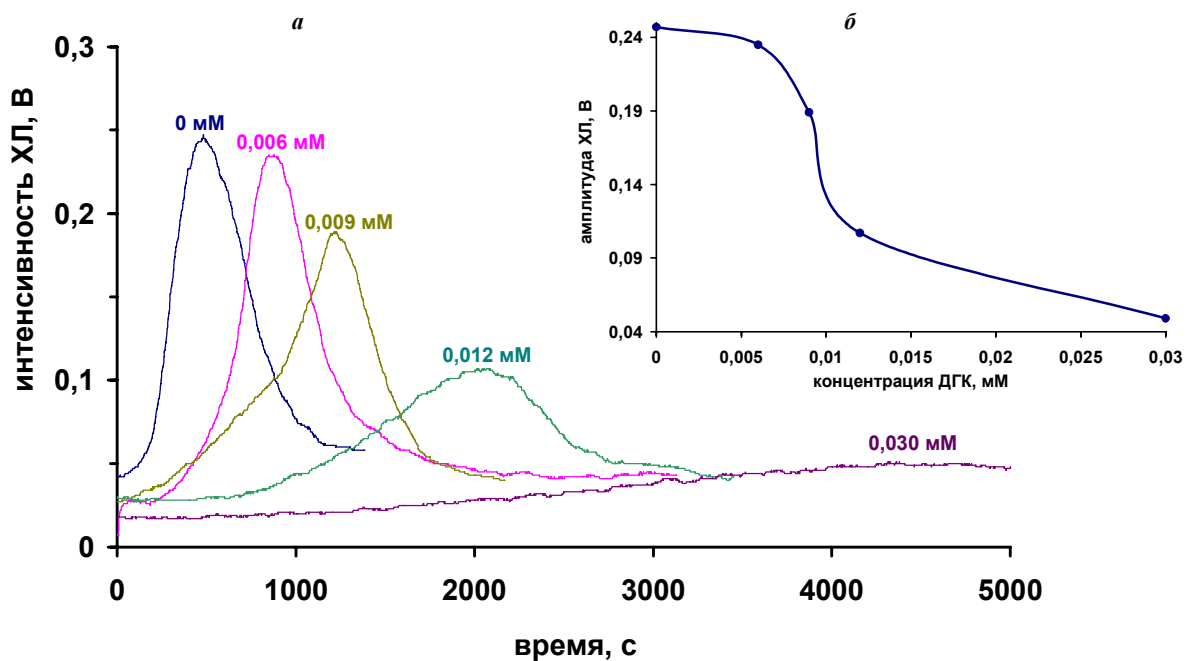


Рис. 2. *a* – Кривые развития ХЛ при комнатной температуре в системе с кумарином и БКЛ в присутствии Цит *c* и различных количеств ДГК. Числа у кривых показывают содержание ДГК в системе. Концентрация цитохрома *c* 0,015 мМ, С-525 – 0,12 мМ, БКЛ – 0,48 мМ, фосфатный буферный раствор (рН 7,4); *б* – зависимость величин максимумов амплитуды ХЛ при комнатной температуре в системе с С-525 в присутствии Цит *c* от содержания ДГК. Концентрация цитохрома *c* 0,015 мМ, С-525 – 0,12 мМ, БКЛ – 0,48 мМ, фосфатный буферный раствор (рН 7,4)

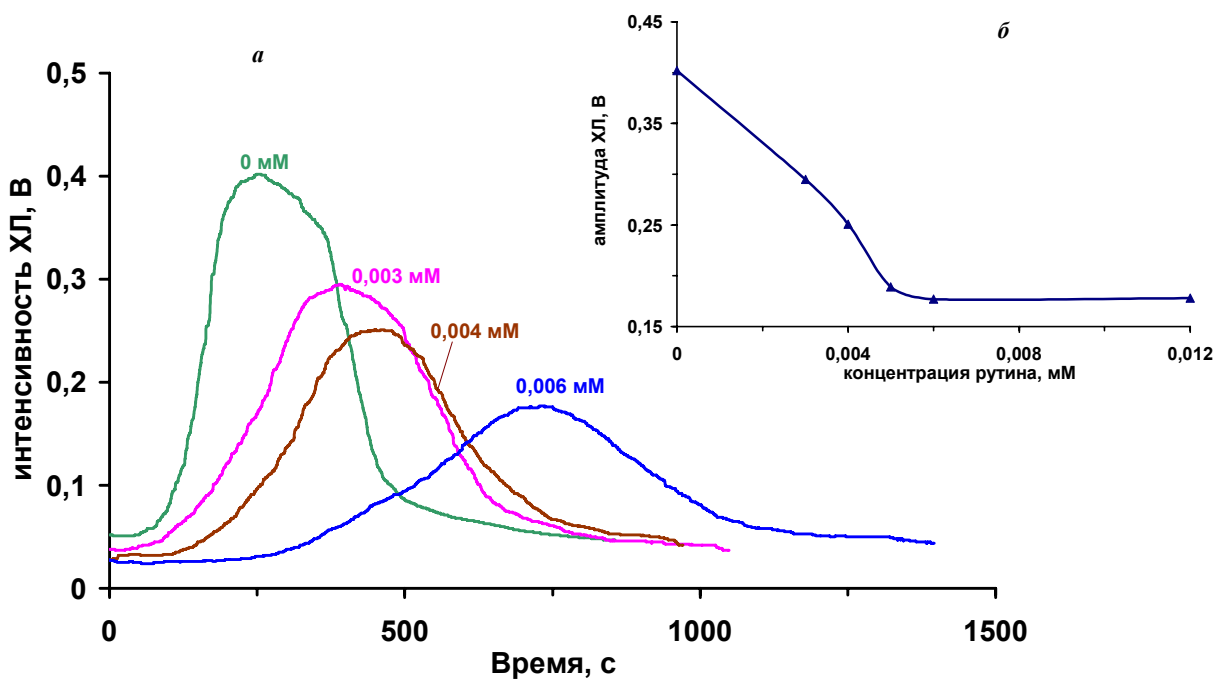


Рис. 3. *a* – Кривые развития ХЛ при комнатной температуре в системе с кумарином и БКЛ в присутствии Цит *c* и различных количеств рутина. Числа у кривых показывают содержание рутина в системе. Концентрация Цит *c* 0,015 мМ, С-525 – 0,12 мМ, БКЛ – 0,48 мМ, фосфатный буферный раствор (рН 7,4); *б* – зависимость величин максимумов амплитуды ХЛ при комнатной температуре в системе с С-525 в присутствии Цит *c* от содержания рутина. Концентрация Цит *c* 0,015 мМ, С-525 – 0,12 мМ, БКЛ – 0,48 мМ, фосфатный буферный раствор (рН 7,4)

тами будут занимать несколько различную площадь поверхности белка. Полученные данные позволяют выбрать оптимальное соотношение липид/белок для изучения действия антиоксидантов – близко к точке перелома. Далее мы использовали соотношение кардиолипина/Цит *c*, равное 32:1 моль/моль.

В описанных выше экспериментах субстратом пероксидазного окисления являлся люминол. В другой серии экспериментов мы изучали пероксидазное окисление природного кардиолипина, катализируемое комплексом цитохром *c* – кардиолипин. Собственное свечение этой системы чрезвычайно мало. Для селективной активации перекисного окисления липидов используют специальные активаторы — хинолизиновые кумарины, особенно эффективен кумарин С-525. Эти соединения усиливают интенсивность хемилюминесцентного свечения, которым сопровождается липидная пероксидация, на стадиях как быстрой, так и медленной вспышки и практически не изменяют форму хемилюминесцентной кривой (в том числе не влияют на длительность латентной фазы), они также не влияют на накопление продуктов липидной пероксидации [21, 22].

В данной работе изучали действие дигидрокверцетина (ДГК) и рутина на липопероксидазную активность цитохрома *c*. Ранее в наших исследованиях было показано, что антиоксиданты β-токоферол, рутин и дигидрокверцетин (таксифолин) угнетали пероксидазную активность связанного с кардиолипном цитохрома *c*; снижение активности на 50% наблюдалось при концентрациях этих антиоксидантов соответственно 80; 19 и 1,3 мкМ [23]. Результаты

по действию ДГК показаны на рис. 2. Видно, что ДГК снижает пероксидазную активность цитохрома *c*: наблюдается замедление развития свечения, снижение амплитуды ХЛ-ответа, увеличение времени до наступления максимума (рис. 2а). Наибольший эффект достигался в средней области исследованного диапазона концентраций ДГК; при добавлении же свыше 0,012 мМ ДГК наблюдалось лишь незначительное дополнительное снижение пероксидазной активности комплекса (рис. 2б). Рутин также оказывал ингибирующее действие на образование радикалов липидов в системе цитохром *c* – кардиолипин. Кинетические кривые хемилюминесценции в присутствии кумарина С-525 приведены на рис. 3а, а зависимость амплитуды ХЛ от концентрации рутина – на рис. 3б. Как и в случае ДГК, наблюдается снижение липопероксидазной активности цитохрома *c* при увеличении концентрации антиоксиданта. Сравнивая данные на рис. 2б и рис. 3б, можно видеть, что ДГК и рутин работают в разных диапазонах концентраций: половинное ингибирование реакции наблюдалось при 10 мкМ ДГК и 3 мкМ рутина. Результаты, полученные в настоящей работе, а также в работе [23], можно объяснить схемой, представленной на рис. 4.

На поверхности липидного бислоя внутренней мембраны митохондрий цитохром *c* связывается электростатически с кардиолипином (1), приобретая в результате свойства пероксидазы (2) [16, 24]. В присутствии пероксида водорода (или гидропероксидов липида) образуется “Соединение I” (3). При наличии органических субстратов окисления, например

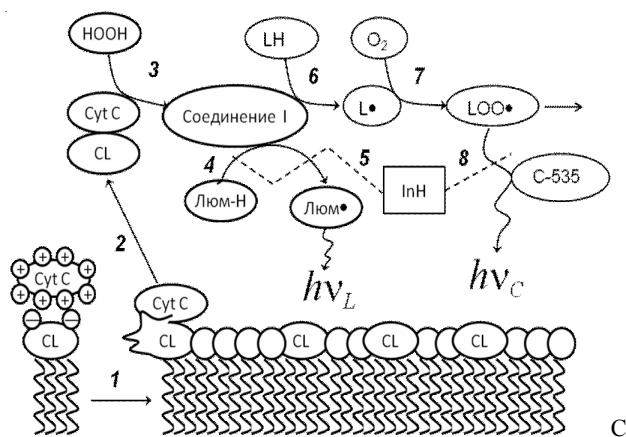


Рис. 4. Механизм действия антиоксидантов на образование радикалов в мембранном комплексе цитохрома *c* с кардиолипином. (объяснения в тексте)

люминола (люм-Н), образуются радикалы (4), в результате чего получается продукт в электронновозбужденном состоянии и наблюдается хемилюминесценция ($h\nu_L$) [16, 11]. Антиоксиданты (InH) конкурируют с люминолом и другими субстратами за реакцию с “Соединением I”, тем самым замедляя пероксидазную реакцию и развитие хемилюминесцентного ответа. Не исключено, что последнее обусловлено реакцией антиоксидантов непосредственно с радикалами люминола.

В мембранах митохондрий фосфолипиды, в том числе кардиолипиды, содержат полиненасыщенные остатки жирных кислот, которые тоже служат субстратом пероксидазной реакции [8]. Образующиеся липидные радикалы дают начало цепной реакции окисления липидов. Как известно, диспропорционирование перокси-радикалов $LOO\bullet$ сопровождается слабой хемилюминесценцией [25], которая многократно усиливается в присутствии изохинолизиновых кумаринов (С-525) [21]. Антиоксиданты обрывают цепи окисления, тормозя тем самым развитие

цепной реакции окисления и сопровождающей ее хемилюминесценции [25].

Приведенная схема объясняет различную активность антиоксидантов в действии на кинетику хемилюминесценции с люминолом и с кумарином С-525, вызванную пероксидазной активностью комплекса цитохрома *c* с кардиолипином. В первом случае половинное снижение амплитуды ХЛ-ответа достигалось при концентрациях ДГК и рутин 1,3 и 19 мкМ соответственно [23], а во втором – при концентрациях 10 и 3 мкМ (рис. 2, 3). Антиоксиданты – не единственное средство регуляции пероксидазной активности кардиолипид-связанного цитохрома *c*; ранее показано, что монооксид азота угнетает эту активность, но она может быть частично восстановлена облучением интенсивным светом (лазером) [26]. Поскольку реакция образования липидных радикалов на мембранно-связанном цитохроме *c* – ключевое событие в развитии апоптоза [8], можно рассчитывать, что при помощи антиоксидантов удастся контролировать эту стадию и, следовательно, апоптоз в целом.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (проекты № 06-04-81052-Бел_а и № 06-04-08278-офи, № 08-04-01074-а).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Lopez-Beltran A., MacLennan G. T., de la Haba-Rodriguez J., Montironi R., Cheng L. // *Anal. Quant. Cytol. Histol.* 2007. **29**. P. 71.
- Fulda S., Debatin K. M. // *Oncogene*. 2006. **25**. P. 4798.
- Skulachev V. P. // *FEBS Lett.* 1998. **423**. P. 275.
- Владимиров Ю. А. // *Биол. Мембраны*. 2002. **19**. P. 356.
- Jiang X., Wang X. // *Annu. Rev. Biochem.* 2004. **73**. P. 87.
- Martinou J. C., Desagher S., Antonsson B. // *Nat. Cell Biol.* 2000. **2**. P. E41.
- Iverson S. L., Orrenius S. // *Arch. Biochem. Biophys.* 2004. **423**. P. 37.
- Kagan V. E., Tyurin V. A., Jiang J. et al. // *Nat. Chem. Biol.* 2005. **1**. P. 223.
- Iwase H., Takatori T., Nagao M., Iwadate K., Nakajima M. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1996. **222**. P. 83.
- Shidoji Y., Hayashi K., Komura S., Ohishi N., Yagi K. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1999. **264**. P. 343.
- Владимиров Ю. А., Проскурнина Е. В., Измайлов Д. Ю., Новиков А. А., Брусничкин А., Осипов А. Н., Кэган В. Е. // *Биохимия*. 2006. **91**. С. 1215.
- Владимиров Ю. А., Проскурнина Е. В., Измайлов Д. Ю., Новиков А. А., Брусничкин А., Осипов А. Н., Кэган В. Е. // *Биохимия*. 2006. **71**. С. 1225.
- Hsu C. L., Yen G. C. // *Mol. Nutr. Food Res.* 2006. **50**. P. 1072.
- Васильева О. В., Любичкий О. Б., Клебанов Г. И., Владимиров Ю. А. // *Биол. мембраны*. 1998. **15**. № 2. С. 177.
- Никольский Б. П. *Справочник химика*. Т. 4. Л., 1967.
- 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. // *Biochemistry*. 2006. **45**. P. 4998.
- Коликов В. М., Мчедlishvili Б. В. *Хроматография биополимеров на макропористых кремнеземах*. Л., 1986.
- Ивков, В. Г., Берестовский Г. Н. *Динамическая структура липидного бислоя*. М., 1981. С. 44.
- Dorset D. L. // *Biochim. Biophys. Acta*. 1976. **424**. P. 396.
- Dorset D. L., Hui S. W., Storzewski C. M. // *J. Supramol. Struct.* 1976. **5**. P. 1.
- Vladimirov Y. A., Sharov V. S., Driomina E. S., Reznichenko A. V., Gashev S. B. // *Free Rad. Biol. Med.* 1995. **18**. P. 739.
- Vladimirov Y. A., Arroyo A., Taylor J. M., Tyurina Y. Y., Matura T., Tyurin V. A., Kagan V. E. // *Arch. Biochem. Biophys.* 2000. **384**. P. 154.
- Владимиров Ю. А., Проскурнина Е. В., Матвеева Н. С., Любичкий О. Б., Новиков А. А., Измайлов Д. Ю., Осипов А. Н., Тихонов В. П., Кэган В. Е. // *Биохимия*. 2008, в печати.
- 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., Kagan V. E. // *Biochemistry*. 2007. **46**. P. 14232.
- Владимиров Ю. А., Арчаков А. И. *Перекисное окисление липидов в биологических мембранах*. М., 1972.
- Osipov A. N., Stepanov G. O., Vladimirov Y. A., Kozlov A. V., Kagan V. E. // *Biochemistry (Москва)*. 2006. **71**. P. 1128.

ANTIOXIDANT EFFECTS OF DIHYDROQUERCETIN AND RUTIN IN PEROXIDASE REACTIONS CATALYZED BY CYTOCHROME *c*

E.M. Demin, E.V. Proskurnina, Yu.A. Vladimirov

(Faculty of Basic Medicine; e-mail: yuvlad@mail.ru)

Lipid peroxidation catalyzed by the complex of cytochrome *c* and cardiolipin is a key event of apoptosis. Native peroxidase activity of cytochrome *c* is weak, but it increases manifold when cytochrome *c* bounds with cardiolipin. In this work, we studied the effect of cardiolipin from bovine heart (BCL) and synthetic 1,1',2,2'-tetraoleyl cardiolipin (TOCL) on cytochrome *c* peroxidase activity detected by luminol-enhanced chemiluminescence. It is shown that chemiluminescence amplitude increases significantly in the range of molar ratios of cardiolipin and cytochrome *c* approximately of 0 to 30 and 0 to 50 for TOCL and BCL, respectively. It increases insignificantly upon a further increase in these ratios to 640 : 1 and 320 : 1 mol : mol. Such a character of the dependence of the chemiluminescence amplitude on the ratio of cardiolipin and protein may be accounted for by attaining the saturation of the protein surface with cardiolipin molecules. For a ratio of BCL to cytochrome *c* of 32 : 1 mol : mol, the effect of antioxidants, rutin and dihydroquercetin, on peroxidase activity of cytochrome *c* in the presence of coumarine C-525 as a chemiluminescence activator was studied. For both antioxidants, a decrease in peroxidase activity was observed on an increase in antioxidant concentration in the system. A 50% inhibition of the reactions was observed for antioxidant concentrations of 10 μM for dihydroquercetin and 3 μM for rutin. It is supposed that the use of antioxidants would provide the control of the key stage of apoptosis, the formation of lipid radicals at membrane-bonded cytochrome *c*.