

ИЗОХИНОЛИЗИНОВЫЕ ПРОИЗВОДНЫЕ КУМАРИНА В КАЧЕСТВЕ АКТИВАТОРОВ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ В РЕАКЦИЯХ ЛИПИДНОЙ ПЕРОКСИДАЦИИ

© 2020 г. Л.А. Ромодин*, Ю.А. Владимиров**, ***, ****, ******, С.В. Шангин*,
Г.К. Владимиров**, *****, Н.П. Лысенко*, Е.И. Демихов*****

*Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии имени К.И. Скрябина,
109472, Москва, ул. Академика Скрябина, 23

E-mail: rla2904@mail.ru

**Институт регенеративной медицины Первого Московского государственного медицинского университета имени
И.М. Сеченова МЗ РФ, 119991, Москва, ул. Трубецкая, 8/2

***Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы, 1

****Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова МЗ РФ,
117997, Москва, ул. Островитянова, 1

*****Институт кристаллографии им. А.В. Шубникова Федерального научно-исследовательского центра
«Кристаллография и фотоника» РАН, 119333, Москва, Ленинский просп., 59

*****Физический институт имени П.Н. Лебедева РАН. 119991, Москва, Ленинский просп., 53

Поступила в редакцию 16.03.2020 г.

После доработки 23.03.2020 г.

Принята к публикации 24.03.2020 г.

Изучено участие изохинолизиновых производных кумарина в пероксидазной реакции, катализируемой комплексом цитохрома *c* с кардиолипином. Исследованы производные кумарина, известные как С-314 (coumarin-314), С-334 (coumarin-334) и С-525 (coumarin-525) и считающиеся специфическими физическими активаторами хемилюминесценции, сопровождающей реакции липидной пероксидации. Спектрофотометрически исследовано действие метанола на структуру цитохрома *c*, изучены оптические свойства указанных веществ в среде фосфатного буфера. Также проведено спектрофотометрическое исследование с параллельной регистрацией хемилюминесценции смеси, в которой протекает липопероксидазная реакция, катализируемая комплексом цитохрома *c* с кардиолипином в присутствии изохинолизиновых производных кумарина. Установлена обратимость действия метанола на структуру цитохрома *c*, что доказывает возможность использования данного спирта при исследовании этого белка, определены положения максимумов поглощения и соответствующие им значения коэффициентов молярного поглощения в среде 20 мМ фосфатного буфера (рН 7.4) для С-314 ($\lambda_{\max} = 447.5$ нм; $\epsilon = 32360.4$ л/моль·см), С-334 ($\lambda_{\max} = 460$ нм; $\epsilon = 44012$ л/моль·см) и С-525 ($\lambda_{\max} = 460$ нм; $\epsilon = 32703.6$ л/моль·см). Показано, что изохинолизиновые производные кумарина являются субстратами пероксидазной реакции, катализируемой комплексом цитохрома *c* с кардиолипином, расход этих веществ за время среднестатистического опыта по измерению хемилюминесценции (322 с) для С-314, С-334 и С-525 составляет 32, 38 и 26% соответственно.

Ключевые слова: апоптоз, хемилюминесценция, комплекс цитохрома *c* с кардиолипином, пероксидаза, изохинолизиновые кумарины, спектрофотометрия.

DOI: 10.31857/S0006302920040080

Апоптоз, или запрограммированная гибель клеток организма, является причиной многих патологий [1–6]. Ключевую роль при запуске апоптоза по митохондриальному пути играет ком-

плекс цитохрома *c* с кардиолипином (ЦитС-КЛ), обладающий липопероксидазной активностью, обуславливающей разрушение мембран митохондрий [7–23], что приводит к выходу различных проапоптотических факторов в цитозоль [24–28].

Собственная и активированная хемилюминесценция. Хемилюминесценция – это свечение, которое является результатом перехода различных метаболитов из электронно-возбужденного со-

Сокращения: ЦитС-КЛ – комплекс цитохрома *c* с кардиолипином, ТОКЛ – тетраолеилкардиолипин, С-314 – изохинолизиновое производное кумарина, coumarin-314, С-334 – изохинолизиновое производное кумарина, coumarin-334, С-525 – изохинолизиновое производное кумарина, coumarin-525.

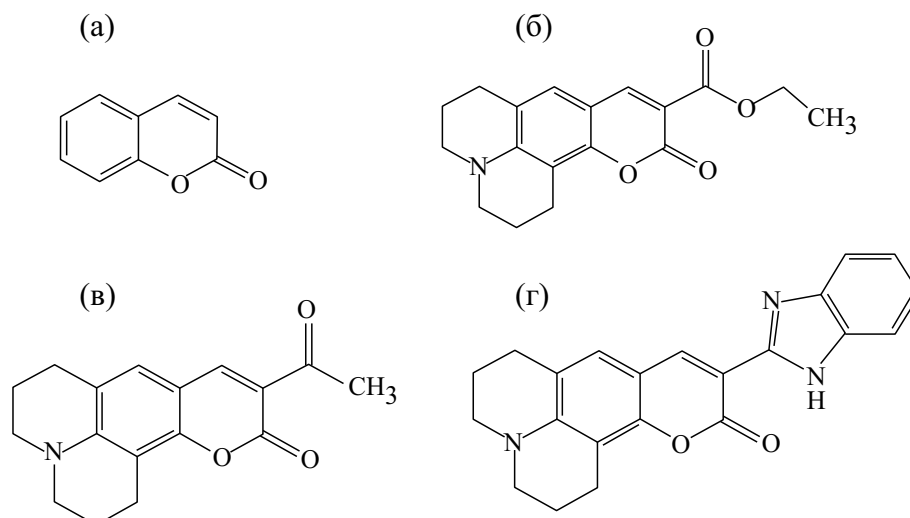


Рис. 1. Формулы кумарина и изучаемых изохинолизиновых его производных [47]: (а) – кумарин, базовое вещество группы кумаринов, к которому присоединяются различные заместители и/или циклические группы; (б) – Coumarin-314; (в) – Coumarin-334; (г) – Coumarin-525.

стояния в основное, причем далеко не каждый акт подобного перехода сопровождается высвечиванием фотона [29, 30].

Впервые испускание биообъектами светового излучения очень слабой интенсивности было обнаружено в конце первой трети прошлого века В.В. Лепешкиным [31, 32] и А.Г. Гурвичем [33]. Впоследствии было показано, что хемилюминесценция обусловлена протеканием свободнорадикальных реакций, главным образом – взаимодействием жирнокислотных пероксил-радикалов [34, 35].

Благодаря образованию большого количества энергии в элементарном акте радикальной реакции, часть которой выделяется в виде фотонов, хемилюминесцентная методика изучения свободнорадикальных процессов дает адекватное представление об их протекании в исследуемой системе [30, 37], позволяя оценить скорость реакции образования свободных радикалов [29, 36], на что не способен метод электронного парамагнитного резонанса [30, 36].

С тех пор, как собственная хемилюминесценция была показана на объектах растительного [38] и животного [39] происхождения, при помощи ее регистрации исследуют различные биологические системы [30, 35, 40–42]. Однако интенсивность собственной хемилюминесценции крайне мала, к тому же зачастую перед исследователями стоит задача изучить не свободнорадикальные процессы в исследуемом образце в целом и целом, а исследовать вполне конкретные радикалы, к примеру, оценить наличие в исследуемой системе радикалов липидов, но данный метод регистрации абсолютно неспецифичен [30].

В силу этого приходится применять так называемые активаторы, обуславливающие гораздо более высокий квантовый выход, нежели при собственной хемилюминесценции. Их можно разделить на две группы: 1) хемилюминесцентные зонды, или химические активаторы, – вещества, химически реагирующие с участниками или продуктами свободнорадикальной реакции и переходящие при этом в электронно-возбужденное состояние [30]; 2) физические активаторы – вещества, которые усиливают свечение за счет физического процесса миграции (перехвата) электронно-возбужденного состояния от участников и/или продуктов свободнорадикальной реакции без непосредственного химического взаимодействия с ними [30, 35, 36, 41, 43].

Изохинолизиновые производные кумарина. В настоящей работе мы исследовали изохинолизиновые производные кумарина, известные в англоязычных источниках как coumarin-314, coumarin-334 и coumarin-525 (сокращенно С-314, С-334 и С-525 соответственно, структурные формулы приведены на рис. 1), которые до настоящего исследования практически общепринято считались специфичными для липидных радикалов физическими активаторами хемилюминесценции, не реагирующими с участниками реакции [12, 41, 44–46].

Кумарины – группа ненасыщенных ароматических лактонов, в основе которых лежит лактон *цис-орто*-оксикоричной кислоты – 5,6-бензо- α -пирон (кумарин) [50]; многие из этих веществ используются в качестве лазерных красителей [51].

Из трех изучаемых нами производных кумарина в литературе уделяется наибольшее внимание кумарину С-525, показанному в качестве актива-

тора хемилюминесценции в 1995 г. [46]. Он использовался как физический активатор хемилюминесценции во многих работах с целью определения гидропероксидов липидов в системе «липидный субстрат – Fe^{2+} » [41, 44–46, 49, 53]. В данной системе механизм этого усиления хемилюминесценции – это, по-видимому, перенос энергии от молекулы кетона в электронно-возбужденном состоянии (первичного продукта рекомбинации пероксил-радикалов) на флуоресцентный уровень С-525 [44]. Однако стоит заметить, что С-525 за счет наличия в своей структуре пуриновой группировки в определенных условиях проявляет антиоксидантные свойства, т.е. взаимодействует со свободными радикалами [48]. В работе [12] методом индуцированной С-525 хемилюминесценции изучалось радикальное окисление кардиолипина, находящегося в комплексе с цитохромом *c*, т.е., по сути, эту работу можно в определенной степени считать предтечей нашего исследования. Авторами работы [51] в качестве механизма действия С-525 был назван перенос энергии из триплетных состояний карбониллов, образующихся в самореакции перекисного радикала через механизм Рассела или разложением 1,2-диоксетана. Исходя из вывода авторов [51], что С-525 не подходит для изучения перекисного окисления липидов, катализируемого пероксидазой хрена, в силу его нестабильности в этой системе, можно предположить, что в системе, где в роли пероксидазы выступает цитохром *c* в комплексе с кардиолипином [7, 12, 14, 18, 19, 48, 54–57], С-525 может быть сам субстратом этой реакции.

Настоящее исследование проводилось нами с целью выяснения того, справедливо ли считать изохинолизиновые производные кумарина С-314, С-334 и С-525 физическими активаторами хемилюминесценции, не реагирующими с компонентами изучаемой системы. Достижение указанной цели предполагает выполнение задач:

1). Отработка процедуры исследования: вычисление коэффициентов молярного поглощения изучаемых изохинолизиновых производных кумарина, подтверждение допустимости наличия метанола в экспериментальных пробах.

2). Спектрофотометрический анализ течения пероксидазной реакции, катализируемой ЦитС-КЛ в присутствии изохинолизинового производного кумарина.

3). Изучение хемилюминесценции, сопровождающей катализируемую ЦитС-КЛ пероксидазную реакцию, без активатора и в присутствии изохинолизинового производного кумарина.

4). Выдвижение гипотезы относительно того, как именно изохинолизиновые производные кумарина участвуют в катализируемой ЦитС-КЛ реакции.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе были использованы следующие реактивы: KH_2PO_4 , 20 мМ буферный раствор (рН 7.4); пероксид водорода, 8.6 М водный раствор (Sigma-Aldrich, США); кумарин С-314, 500 мкМ метанольный раствор, приготовленный из навески необходимой массы (Sigma-Aldrich, США); кумарин С-334, 1 мМ метанольный раствор, приготовленный из навески необходимой массы (Sigma-Aldrich, США); кумарин С-525, 250 мкМ метанольный раствор, приготовленный из навески необходимой массы (Sigma-Aldrich, США); цитохром *c*, 1 мМ раствор, приготовленный из навески необходимой массы (Sigma-Aldrich, США); 1,1',2,2'-тетраолеилкардиолипид (ТОКЛ), 6 мМ метанольный раствор, приготовленный из навески необходимой массы (Avanti Polar Lipids, США).

Растворы вышеуказанных веществ в более низких концентрациях приготавливали методом последовательных разведений, кратность разбавлений не превышала десяти.

Спектрофотометрический анализ изменения конформации (развертывания) цитохрома *c* в метаноле и в комплексе с кардиолипином. Измерения проводили на спектрофотометре Specord 200 (Analytik Jena, Германия) с использованием кювет из кварцевого стекла с длиной оптического пути 1 см. Спектры регистрировали в пробе объемом 3 мл в диапазоне 650–750 нм, в качестве растворителя использовали 100 мМ фосфатный буфер с рН 7.4. Опытная проба, содержащая 50 мкМ раствор цитохрома *c* и 50% (по объему) метанола, для установления факта обратимости или необратимости действия метанола на структуру цитохрома *c* была разбавлена в пять раз растворителем. В качестве контролей выступали растворы цитохрома *c* с концентрацией 50 и 10 мкМ.

Спектрофотометрические измерения для выведения концентрационной зависимости оптической плотности кумаринов С-314, С-334 и С-525. Из метанольного 1 мМ раствора кумарина С-334, 500 мкМ раствора кумарина С-314 или 250 мкМ раствора кумарина С-525 нами был приготовлен 25 мкМ раствор, который использовали в спектрофотометрических измерениях, проводимых по следующей схеме: после измерения раствора изначальной концентрации методом последовательных разведений готовили растворы меньших концентраций.

Регистрация серии спектров поглощения смеси, в которой протекает липопероксидазная реакция. В кювету спектрофотометра добавляли 300 мкл 100 мкМ раствора цитохрома *c*, 150 мкл 6 мМ раствора ТОКЛ, 75 мкл 1 мМ раствора С-334, или 150 мкл 500 мкМ раствора С-314, или 300 мкл 250 мкМ раствора С-525, а также – 300 мкл 2150 мкМ раствора перекиси водорода (в кон-

трольных измерениях H_2O_2 заменяли фосфатным буфером), общий объем пробы составлял 3 мл, данный объем доводили добавлением необходимого количества 20 мМ фосфатного буфера. Перекись водорода добавляли в последнюю очередь. Далее в течение двух часов регистрировали спектры поглощения при следующих параметрах: диапазон измерения 300–600 нм, скорость измерения 5 нм/с, шаг (дискретность) 0.5 нм, ширина щели 5 нм, время регистрации спектра – примерно одна минута.

Объемы растворов и данные концентрации реактивов были подобраны нами по результатам подготовительных экспериментов, а концентрации цитохрома *c* и ТОКЛ взяты с расчетом на оптимальное их соотношение, равное 1:30, как было показано в работе [15].

Регистрация хемилюминесценции во время липопероксидазной реакции. Исследования по изменению хемилюминесценции проводили на хемилюминометре «Lum-5773» (ООО «ДИСофт», Россия), подключенном к компьютеру с программным обеспечением «PowerGraph». Перед началом каждой серии измерений хемилюминометр калибровали по ураниловому стеклу.

Кювету, содержащую: 300 мкл 100 мкМ цитохрома *c*, 150 мкл 6 мМ метанольного раствора ТОКЛ, 75 мкл 1 мМ метанольного раствора С-334, или 300 мкл 250 мкМ метанольного раствора С-525, или 150 мкл 500 мкМ раствора С-314, растворенных в 20 мМ фосфатном буфере объемом 2175 мкл и 2100 мкл соответственно, помещали в кюветное отделение хемилюминометра и запускали регистрацию, через 550 с извлекали кювету и добавляли в нее 300 мкл 2150 мкМ перекиси водорода с дальнейшей регистрацией свечения до выхода его к фоновым значениям.

В итоге система имела следующий количественный состав на момент начала липопероксидазной реакции: 10 мкМ цитохрома *c*, 300 мкл ТОКЛ, 215 мкМ H_2O_2 .

Вычисление концентраций на основании серий спектров поглощения. Концентрации цитохрома *c* и кумариновых производных, изменяющиеся в процессе течения липопероксидазной реакции, катализируемой ЦитС-КЛ, вычисляли для каждого зарегистрированного спектра. Вычисление проводили на основании закона Бугера–Ламберта–Бера для смеси веществ посредством решения системы уравнений, характеризующих значение оптической плотности смеси на длинах волн, соответствующих пикам поглощения цитохрома *c* и производного кумарина [52], по следующей формуле:

$$\begin{cases} C_C = \frac{A_1}{\varepsilon_{1,C}l} - \frac{C_P \varepsilon_{1,P}}{\varepsilon_{1,C}} \\ C_P = \frac{\frac{A_2}{\varepsilon_{2,C}l} - \frac{A_1}{\varepsilon_{1,C}l}}{\frac{\varepsilon_{2,P}}{\varepsilon_{2,C}} - \frac{\varepsilon_{1,P}}{\varepsilon_{1,C}}} \end{cases},$$

где C_C – концентрация производного кумарина, моль/л; A_1 – значение оптической плотности (поглощения) на длине волны, равной 409 нм (полоса C_{ore} – пик поглощения порфириновой группы цитохрома *c*); A_2 – значение оптической плотности (поглощения) на длине волны, соответствующей максимуму поглощения производных кумарина (447,5 нм для С-314 и 460 нм для С-334 и С-525); $\varepsilon_{1,P}$ – коэффициент молярного поглощения цитохрома *c* на длине волны 409 нм; $\varepsilon_{2,P}$ – коэффициент молярного поглощения цитохрома *c* на длине волны, соответствующей максимуму поглощения производных кумарина; $\varepsilon_{1,C}$ – коэффициент молярного поглощения исследуемого производного кумарина на длине волны 409 нм; $\varepsilon_{2,C}$ – коэффициент молярного поглощения производного кумарина на длине волны, соответствующей максимуму поглощения производных кумарина; l – толщина кюветы (длина оптического пути), см, в нашем случае она равнялась 1 см; C_P – концентрация цитохрома *c*, моль/л.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Отработка процедуры исследования. *Спектрофотометрический анализ изменения конформации (развертывания) цитохрома *c* в метаноле и в комплексе с кардиолипином.* При изучении ЦитС-КЛ зачастую используются растворы, растворителем в которых является метанол: это и стоковый раствор кардиолипина, и стоковые растворы исследуемых в настоящей работе активаторы хемилюминесценции – производных кумарина. При этом на определенных этапах эксперимента концентрация спирта в образце может быть весьма существенной. Однако низкомолекулярные спирты вызывают изменение структуры белков, заключающееся в частичном развертывании глобул вследствие дегидратации белков [58], очевидно, что цитохром *c* в вышеупомянутых случаях меняет свою конформацию, что может повлиять на адекватность полученных экспериментальных данных. Поэтому нами была поставлена задача проверить, обратимо ли действие метанола на структуру цитохрома *c*. Для этого в среде 100 мМ фосфатного буфера при pH 7.4 было зарегистрировано значение оптической плотности в пике поглощения в области 700 нм, соответствующем

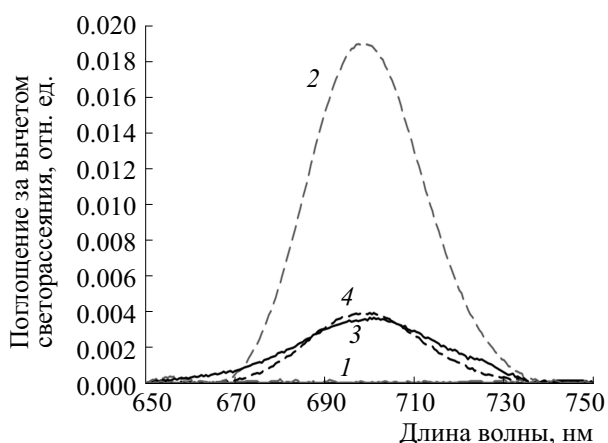


Рис. 2. Обратимость действия метанола на состояние связей Fe–S в молекуле цитохрома *c*. Кривая 1 — 50 мкМ цитохром *c* в 50%-м метаноле, кривая 2 — 50 мкМ цитохром *c*, кривая 3 — 10 мкМ цитохром *c* в 10%-м метаноле (разбавленная в 5 раз предыдущая проба 1), кривая 4 — 10 мкМ цитохром *c*.

железосерным связям в молекуле цитохрома *c*. В качестве опытной пробы мы использовали 50 мкМ раствор цитохрома *c* в 50% метаноле, далее разбавленный в пять раз, в качестве контролей использовали 50 мкМ и 10 мкМ растворы цитохрома *c*; результаты эксперимента представлены на рис. 2.

По данным из спектров на рис. 2 50% метанол вызывает полное разрушение железо-серных связей в молекуле цитохрома *c* (кривая 1, контроль без метанола — кривая 2), однако разбавление этого раствора в пять раз фосфатным буфером приводит к их восстановлению (кривая 3, контроль без метанола — кривая 4).

По данным проведенной нами с помощью пакета «MS Excel 2016» обработки, при разбавлении в пять раз раствора цитохрома *c* с объемной долей метанола 50% восстановилось, судя по значению поглощения, $(93.69 \pm 1.04)\%_{n=5; p=0.95}$ железо-серных связей в растворе цитохрома *c*, причем необходимо указать, что за 100% нами было взято значение поглощения 10 мкМ раствора цитохрома *c*, в котором полностью отсутствует метанол, а в опытной пробе его объемная концентрация составляет 10%. Вышесказанное указывает на допустимость использования метанольных растворов без риска искажения результатов вследствие нарушения метанолом молекулярной структуры цитохрома *c*.

Спектрофотометрические свойства кумаринов С-314, С-334 и С-525 в среде с 20 мМ фосфатного буфера. При использовании математического выражения закона Бугера–Ламберта–Бера нами были показаны следующие значения коэффициентов молярного поглощения (ϵ) исследуемых производных кумарина и цитохрома *c* в среде

20 мМ фосфатного буфера (рН 7.4). Пик поглощения С-314 приходится на длину волны 447.5 нм ($\epsilon = 32360.4$ л/моль·см), С-334 — на 460 нм ($\epsilon = 44012.0$ л/моль·см), С-525 — на 460 нм ($\epsilon = 32703.56$ л/моль·см). Значение ϵ С-314, С-334 и С-525 на длине волны 409 нм составляет 12562.4, 9240.0 и 14987.26 л/моль·см соответственно. Значение ϵ для цитохрома *c* на длинах волн 409, 447,5 и 460 нм составляет 90740, 13890 и 8620 л/моль·см соответственно.

Также необходимо сказать несколько слов о растворимости изучаемых производных кумарина. С-334 в сравнении с двумя другими кумариновыми красителями показал более высокую растворимость и в метаноле (получалось приготовить даже 4 мМ растворы), и в среде фосфатного буфера (видимых признаков коллоидного раствора не наблюдалось вплоть до концентраций 40 мМ).

Спектрофотометрический анализ течения пероксидазной реакции, катализируемой ЦитС-КЛ, в присутствии изохинолизинового производного кумарина. Для оценки участия или неучастия изохинолизиновых производных кумарина в липопероксидазной реакции нами при параллельной регистрации хемилюминесцентного сигнала была зарегистрирована серия спектров поглощения смеси, в которой протекала липопероксидазная реакция, катализируемая комплексом цитохрома *c* с тетраолеилкардиолипином.

Результаты экспериментов по регистрации серии спектров поглощения и общего хемилюминесцентного сигнала показаны на рис. 3–5. На основании значения оптической плотности в пике поглощения изохинолизинового производного кумарина нами была вычислена его концентрация, также мы вычисляли концентрацию цитохрома *c*, вычисление концентраций проводили на основании закона Бугера–Ламберта–Бера [52] с упрощением, заключающемся в том, что изучаемая реакционная смесь в математической модели представлена как смесь не реагирующих друг с другом двух веществ — цитохрома *c* и изохинолизинового производного кумарина (С-314, С-334 или С-525), так как на рассматриваемых длинах волн кардиолипид и перекись водорода имеют низкие значения оптической плотности и практически весь вклад в общее поглощение смеси в диапазоне длин волн 405–465 нм вносят цитохром *c* и изохинолизинового производное кумарина.

На рис. 3 представлены результаты этого эксперимента с присутствием в реакционной смеси кумарина С-314. Как видно из графиков, в первые 30 мин липопероксидазной реакции происходит резкое уменьшение концентрации изохинолизинового производного кумарина, С-314.

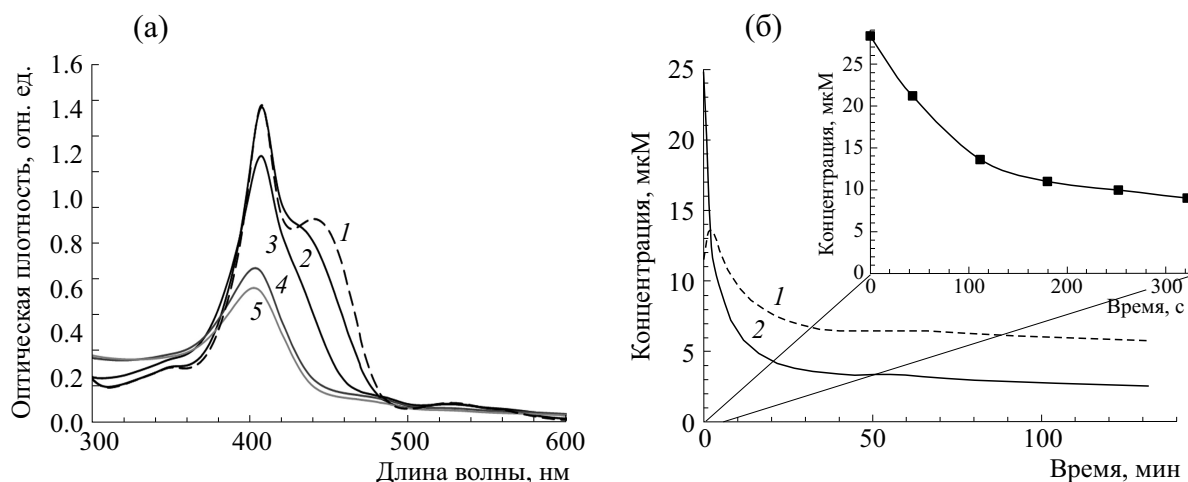


Рис. 3. Peroxidазная реакция в системе начального состава: 10 мкМ цитохрома *c*, 300 мкМ ТОКЛ, 25 мкМ С-314, 215 мкМ H_2O_2 . (а) – Серия спектров поглощения смеси: 1 – спектр поглощения смеси без H_2O_2 , 2 – спектр поглощения через 15 с после начала реакции, 3 – через 5 мин, 4 – через 59 мин, 5 – через 120 мин. (б) – Уменьшение концентрации цитохрома *c* (кривая 1) и С-314 (кривая 2) в процессе реакции, на врезке – уменьшение концентрации С-314 в первые минуты реакции.

На рис. 4 представлены результаты аналогичного эксперимента с присутствием в реакционной смеси С-334, он также расходуется в процессе реакции.

Рис. 5 представляет эксперимент с С-525, концентрация которого тоже резко снижается в течение первых 10 мин реакции.

Хемилюминесценция, сопровождающая катализируемую ЦитС-КЛ реакцию. Была проведена регистрация хемилюминесценции, сопровождающей катализируемую ЦитС-КЛ реакцию при до-

бавлении каждого из изучаемых производных кумарина, а также – без их добавления. В силу того, что хемилюминесценция системы в присутствии различных производных кумарина была примерно одинакова как по кинетике, так и по амплитуде вспышек, но отличалась от таковой для системы без добавления кумариновых красителей, на график мы решили вывести результат измерения только с одним производным кумарина, сравнив его с хемилюминесценцией системы без красителя.

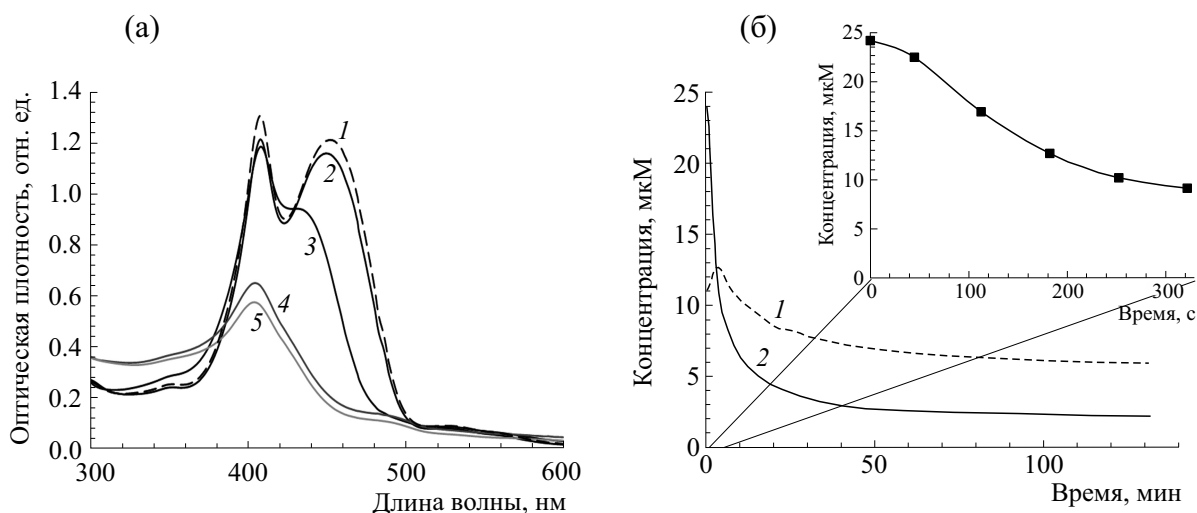


Рис. 4. Peroxidазная реакция в системе начального состава: 10 мкМ цитохрома *c*, 300 мкМ ТОКЛ, 25 мкМ С-334, 215 мкМ H_2O_2 . (а) – Серия спектров поглощения смеси: 1 – спектр поглощения смеси без H_2O_2 , 2 – спектр поглощения через 15 с после начала реакции, 3 – через 5 мин, 4 – через 59 мин, 5 – через 120 мин. (б) – Уменьшение концентрации цитохрома *c* (кривая 1) и С-334 (кривая 2) в процессе реакции, на врезке – уменьшение концентрации С-334 в первые минуты реакции.

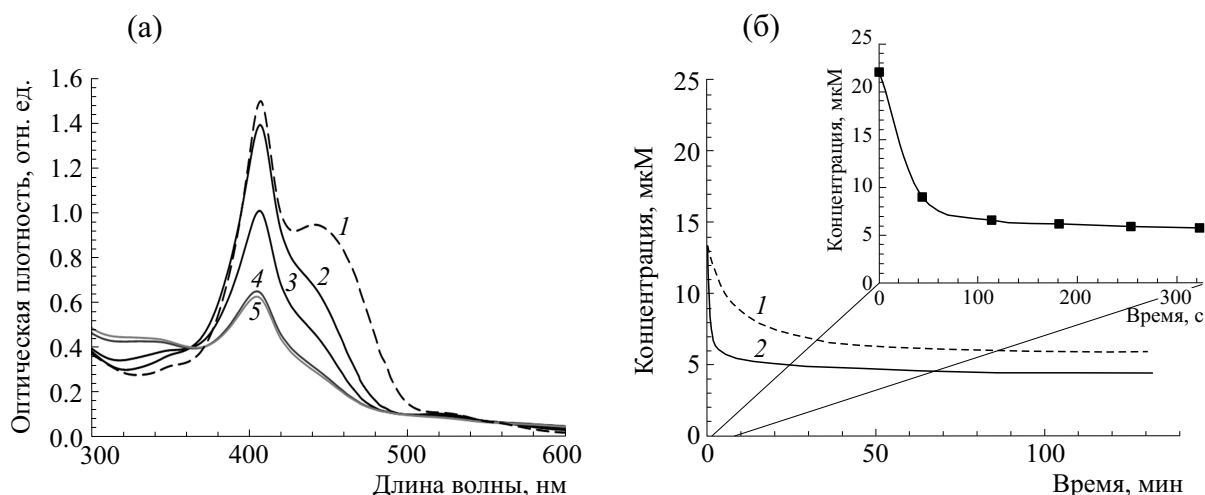


Рис. 5. Пероксидазная реакция в системе начального состава: 10 мкМ цитохрома *c*, 300 мкМ ТОКЛ, 25 мкМ С-525, 215 мкМ Н₂О₂. (а) – Серия спектров поглощения смеси: 1 – спектр поглощения смеси без Н₂О₂, 2 – спектр поглощения через 15 с после начала реакции, 3 – через 5 мин, 4 – через 59 мин, 5 – через 120 мин. (б) – Уменьшение концентрации цитохрома *c* (кривая 1) и С-525 (кривая 2) в процессе реакции, на врезке – уменьшение концентрации С-525 в первые минуты реакции.

Как видно из приведенных на рис. 6 хемилюминесцентных кривых, свечение, сопровождающее пероксидазную реакцию, катализируемую ЦитС-КЛ, в присутствии изохинолизинового производного кумарина ниже, чем наблюдаемое в его отсутствие. Этот, на первый взгляд, странный результат объяснен ниже при обсуждении.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Из рис. 3–5 следует, что изохинолизиновые производные кумарина, С-314, С-334 и С-525, являются субстратами липопероксидазной реак-

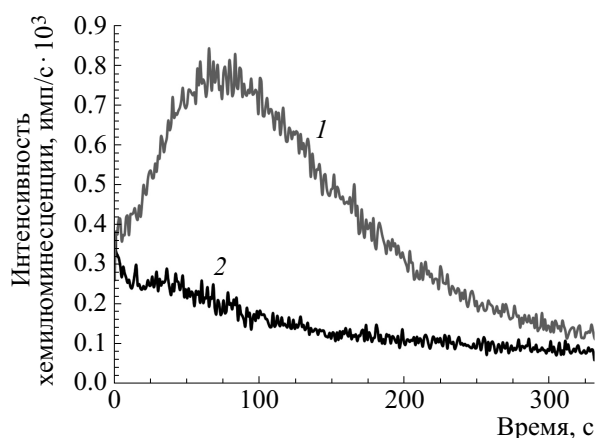


Рис. 6. Суммарная интенсивность хемилюминесценции в диапазоне длин волн 300–650 нм смеси начального состава: 10 мкМ цитохрома *c*, 300 мкМ ТОКЛ, 215 мкМ Н₂О₂ без добавления производного кумарина (кривая 1) и в присутствии 25 мкМ С-334 (кривая 2).

ции, катализируемой ЦитС-КЛ. График на врезках на рис. 3–5 характеризует снижение концентрации изохинолизиновых производных кумарина в течение первых ≈5.4 мин пероксидазной реакции. В подавляющем количестве работ по измерению хемилюминесценции продолжительность этого измерения не превышает 5 мин. Поэтому для использования изохинолизиновых производных кумарина в качестве активаторов хемилюминесценции при изучении пероксидазной реакции, катализируемой ЦитС-КЛ, целесообразно определить степень расхода активаторов за это время. Таким образом, в первые 322 с расходуется 32% С-314, 38% С-334 и 26% С-525. Указанные данные позволяют в будущих работах вычислять поправочные коэффициенты для их использования в интерпретировании данных кумарин-активированной хемилюминесценции, сопровождающей катализируемую ЦитС-КЛ пероксидазную реакцию.

Появляется весьма логичный и закономерный вопрос: как же быть с результатами авторов работ [44–46, 51], показавших изохинолизиновые производные кумарина как физические активаторы хемилюминесценции, не расходующиеся в ходе пероксидазной реакции. Ответ на этот вопрос достаточно прост: в перечисленных исследованиях происходила пероксидазная реакция, катализируемая свободными ионами Fe²⁺ в водной фазе, в случае же пероксидазной реакции, катализируемой ЦитС-КЛ, взаимодействие с субстратом протекает скорее в липидной фазе, каковой является кардиолипиновая оболочка, образующаяся вокруг молекулы цитохрома *c* [15, 17]. В липидной фазе производные кумарина, в отличие от водной

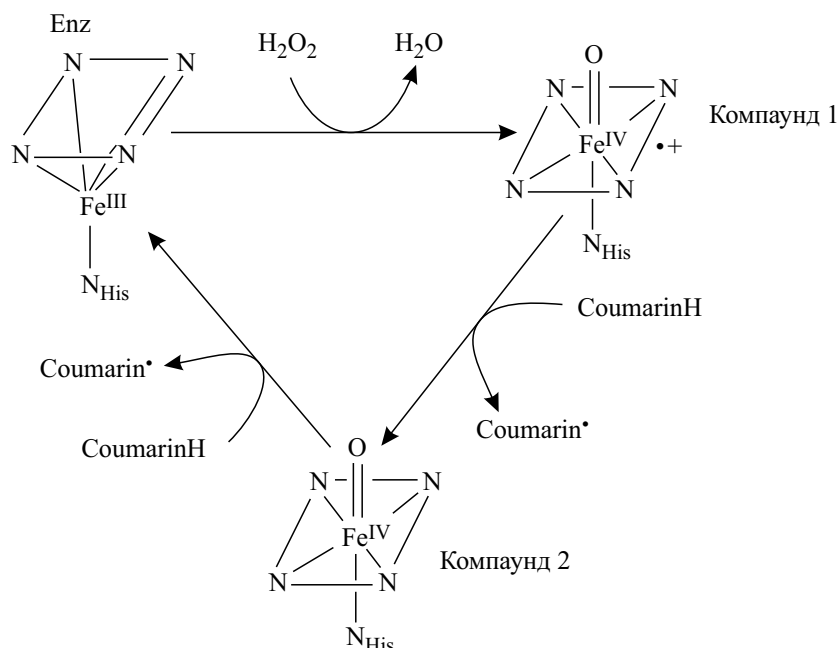


Рис. 7. Предполагаемое участие изохинолизиновых производных кумарина в липопероксидазной реакции. Условные обозначения: Enz – пероксидаза, содержащая трехвалентное железо, компаунд 1 – окисленная пероксидаза, содержащая четырехвалентное железо и радикал), компаунд 2 – пероксидаза, содержащая четырехвалентное железо или радикал), CoumarinH – исходное изохинолизиновое производное кумарина, Coumarin* – радикал изохинолизинового производного кумарина.

фазы, по нашим соображениям, являются непосредственными субстратами липопероксидазной реакции, занимая место липидного субстрата в пероксидазном цикле, подробно описанном в работах [59, 60]. Также необходимо упомянуть, что авторами работы [51] была замечена нестабильность концентрации С-525 в системе, в которой протекала ферментативная липопероксидазная реакция, катализируемая пероксидазой хрена.

Место изохинолизиновых производных кумарина в пероксидазном цикле. Напомним о процессах, являющихся составляющими пероксидазного ферментативного цикла – замкнутой последовательности превращений, происходящих с ферментом-пероксидазой, которым является и цитохром *c* в комплексе с кардиолипином [15]. Так называемый «исходный фермент-пероксидаза» содержит гем с трехвалентным железом. После взаимодействия исходного фермента с H_2O_2 в результате его двуэлектронного окисления образуется так называемый компаунд 1 – это соединение со степенью окисления на 2 большей, чем та, что была у исходного фермента (т.е. исходный фермент с двумя окисленными эквивалентами): соединение, в котором есть два «дополнительных» неспаренных электрона [60], представленное двумя переходящими друг в друга формами, подробно описанными в работе [59] для пероксидазы хрена. В большинстве случаев компаунд 1 берет себе один электрон от субстрата окисления,

которым является липид, восстанавливаясь до компаунда 2, который может вернуться к состоянию исходного фермента путем окисления еще одной молекулы липида [60], а образовавшиеся липидные радикалы запускают каскад реакций перекисного окисления липидов [61]. Необходимо также заметить, что авторы работы [60] приводят на схеме пероксидазного цикла способ восстановления компаунда 1, альтернативный радикальному окислению липида: окисление перекиси водорода с образованием супероксидного радикала $\cdot O_2^-$ и его восстановление до молекулярного кислорода компаундом 2.

На основании полученных выводов нами была составлена схема участия изохинолизиновых производных кумарина в пероксидазном цикле, представленная на рис. 7.

В предполагаемом нами механизме изохинолизиновое производное кумарина претерпевает радикальное окисление компаундом 1 при его превращении в компаунд 2 и компаундом 2 при его восстановлении до исходного фермента.

Далее нам необходимо ответить на вопрос, являются ли кумариновые красители химическими активаторами хемилюминесценции, индуцированной пероксидазной реакцией. В работе [62] предложен утвердительный ответ на этот вопрос на основании предположения об уменьшении их концентрации на основании снижения оптиче-

ской плотности реакционной смеси (непосредственные значения концентраций в той работе не вычислялись). Однако тот факт, что С-314, С-334 и С-525 – субстраты реакции, еще не говорит о том, что они подобно люминолу являются химическими активаторами хемилюминесценции [63], так как, в отличие от последнего, продукты окисления кумариновых красителей комплексом ЦитС-КЛ не испускают фотонов. Доказательством этого служат хемилюминесцентные кривые на рис. 6. Так как мы использовали ТОКЛ, практически не подвергаемый окислению в ходе пероксидазной реакции, липидные радикалы почти не образовывались, поэтому кумарины не активировали хемилюминесценцию. Однако при этом сами кумариновые красители активно вступали в реакцию (графики снижения концентраций – на рис. 3–5). Следовательно, активно образовывались и их окисленные продукты, но никакого сильного свечения они не давали. Кривая *I* на рис. 6 характеризует хемилюминесценцию от изучаемой системы без кумаринов, собственную хемилюминесценцию, индуцированную данной реакцией.

ВЫВОДЫ

В работе показана допустимость применения метанольных растворов в исследованиях функций цитохрома *c* при условии, что в момент непосредственного исследования объемная доля метанола не превышает 10% и что на предварительных стадиях выполнения метода приготовления экспериментальной пробы она не превышает 50%.

Определены длины волн положения максимумов поглощения изохинолизиновых производных кумарина и соответствующие им значения коэффициентов молярного поглощения в среде 20 мМ фосфатного буфера (рН 7.4): 32360.4 л/моль·см на 447.5 нм для С-314, 44012.0 л/моль·см на 460 нм для С-334 и 32703.6 л/моль·см на 460 нм для С-525. Концентрация изохинолизиновых производных кумарина, равная 25 мкМ, признана нами оптимальной для исследования ферментативных реакций липидной пероксидации в среде фосфатного буфера.

Показано, что изохинолизиновые производные кумарина расходуются в процессе катализируемой комплексом цитохрома *c* с кардиолипином пероксидазной реакции. Методом спектрофотометрии определено, что в первые 322 с этой реакции расходуются примерно: 32% С-314, 38% С-334, 26% С-525. Это время равно продолжительности среднестатистического опыта по измерению хемилюминесценции.

Показано, что хемилюминесценция, индуцированная катализируемой комплексом цитохрома *c* с кардиолипином пероксидазной реакцией, при наличии в смеси кумаринового активатора

слабее, чем в его отсутствии. Это объясняется различиями в механизме течения реакции.

Нами была выдвинута гипотеза, согласно которой изохинолизиновые производные кумарина – субстрат катализируемой комплексом цитохрома *c* с кардиолипином пероксидазной реакции, окисляющийся при восстановлении окисленных форм пероксидазы.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа была выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 18-015-00491 «Изучение механизма реакций образования свободных радикалов в мембранах клеток и митохондрий, катализируемых комплексом цитохрома *c* с анионными липидами (Cyt-AL)»).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Все авторы настоящей работы заявляют, что не имеют конфликта интересов касательно материалов, представленных в работе.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

Настоящая статья не содержит описания выполненных авторами исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. T. Nishikido, J. Oyama, A. Shiraki, et al., *J. Am. Heart Assoc.* **5** (4), e002863 (2016). DOI: 10.1161/JAHA.115.002863
2. G. L. Caldeira, I. L. Ferreira, and A. C. Rego, *J. Alzheimers Dis.* **34**, 115 (2013). DOI: 10.3233/JAD-121444
3. H. H. Gaballah, S. S. Zakaria, M. M. Elbatsh, and N. M. Tahooun, *Chem. Biol. Interact.* **251**, 10 (2016). DOI: 10.1016/j.cbi.2016.03.023
4. L. Fan, L. Jiang, and Z. Du, *Metab. Brain Dis.* **30**, 1269 (2015). DOI: 10.1007/s11011-015-9703-z
5. N. Yalcinkaya, H. Haytural, B. Bilgic, et al., *Neurosci. Lett.* **615**, 72 (2016). DOI: 10.1016/j.neulet.2016.01.029
6. Е. В. Проскурнина, Ю. А. Владимиров и А. М. Полимова, в сб. *Материалы 11 Междунар. междисциплинар. конгр. «Нейронаука для медицины и психологии»* (Судак, 2015), с. 309.
7. Ю. А. Владимиров, Е. В. Проскурнина, Е. М. Дёмин и др., *Биохимия* **74**, 372 (2009).
8. Ю. А. Владимиров, Е. В. Проскурнина, Д. Ю. Измайлов и др., *Биохимия* **71**, 1225 (2006).
9. Ю. А. Владимиров, Е. В. Проскурнина, Д. Ю. Измайлов и др., *Биохимия* **91**, 1215 (2006).
10. А. Н. Осипов, Г. О. Степанов, Ю. А. Владимиров и др., *Биохимия* **71**, 1392 (2006).

11. Е. М. Дёмин, Е. В. Проскурнина и Ю. А. Владимиров, Вестн. МГУ. Сер. 2: Химия **49**, 354 (2008).
12. Ю. А. Владимиров, Е. М. Дёмин, Е. В. Проскурнина и А. Н. Осипов, Биол. мембраны **26**, 493 (2009).
13. Е. М. Дёмин, Д. Ю. Измайлов, Е. В. Проскурнина и Ю. А. Владимиров, *Регуляция радикал-зависимой стадии апоптоза с помощью антиоксидантов* (ООО «МАКС Пресс», М., 2012).
14. Ю. А. Владимиров, в сб. *Материалы XXXX Международной научно-практической конференции «Применение лазеров в медицине и биологии»* (Ялта, 2013), с. 174.
15. Ю. А. Владимиров, Е. В. Проскурнина и А. В. Алексеев, Биохимия **78**, 1391 (2013).
16. Е. М. Демин, Е. В. Проскурнина и Ю. А. Владимиров, в сб. *Материалы II съезда аналитиков России* (Москва, 2013), с. 275.
17. А. С. Викулина, А. В. Алексеев, Е. В. Проскурнина и Ю. А. Владимиров, Биохимия **80**, 1573 (2015).
18. V. E. Kagan, V. A. Tyurin, J. Jiang, et al., Nature Chem. Biol. **1**, 223 (2005).
19. N. A. Belikova, Y. A. Vladimirov, A. N. Osipov, et al., Biochemistry **45**, 4998 (2006).
20. L. Milazzo, L. Tognaccini, B. D. Howes, et al., Biochemistry **56**, 1887 (2017). DOI: 10.1021/acs.biochem.6b01281
21. Y. A. Vladimirov, C. Sarisozen, G. K. Vladimirov, et al., Pharm. Res. **34**, 1264 (2017). DOI: 10.1007/s11095-017-2143-1
22. D. A. Capdevila, S. Oviedo Rouco, F. Tomasina, et al., Biochemistry **54**, 7491 (2015). DOI: 10.1021/acs.biochem.5b00922
23. H. Kobayashi, S. Nagao, and S. Hirota, Angew Chem. Int. Ed. Engl. **55**, 14019 (2016). DOI: 10.1002/anie.201607419
24. A. Bhujade, G. Gupta, S. Talmale, et al., Food Funct. **4**, 338 (2013). DOI: 10.1039/c2fo30167a
25. D. A. Vasina, D. D. Zhdanov, E. V. Orlova, et al., Biochemistry (Moscow) **82**, 24 (2017). DOI: 10.1134/S0006297917010035
26. S. Li, T. Wang, L. Zhai, et al., J. Mol. Neurosci. **64**, 144 (2018). DOI: 10.1007/s12031-017-1012-z
27. P. Bemani, M. Mohammadi, and A. Hakakian, Asian Pac. J. Cancer Prev. **19**, 97 (2018). DOI: 10.22034/APJCP.2018.19.1.97
28. S. A. Susin, E. Daugas, L. Ravagnan, et al., J. Exp. Med. **192**, 571 (2000).
29. Ю. А. Владимиров и А. И. Арчаков, *Перекисное окисление липидов в биологических мембранах* (Наука, М., 1972).
30. Ю. А. Владимиров и Е. В. Проскурнина, Успехи биол. химии **49**, 341 (2009).
31. W. Lepeschkin, Science **76**, 409 (1932). DOI: 10.1126/science.76.1975.409
32. W. W. Lepeschkin, Science **76**, 168 (1932). DOI: 10.1126/science.76.1964.168
33. А. Г. Гурвич, *Митогенетическое излучение* (Госмедиздат, М., 1934).
34. Ю. А. Владимиров, О. А. Азизова, А. И. Деев и др. *Свободные радикалы в главных системах. (Итоги науки и техники. Биофизика. Т. 29)* (ВИНИТИ АН СССР, М., 1991).
35. Ю. А. Владимиров, Е. В. Проскурнина и Д. Ю. Измайлов, Бюл. эксперим. биологии и медицины **144**, 390 (2007).
36. А. И. Журавлёв и С. М. Зубкова, *Антиоксиданты. Свободнорадикальная патология, старение. Второе издание, исправленное и дополненное* (Белые альвы, М., 2014).
37. А. М. Полимова, М. М. Созарукова, Е. В. Проскурнина и Ю. А. Владимиров, в сб. *Материалы II съезда аналитиков России* (Москва, 2013), с. 276.
38. Ю. А. Владимиров и Ф. Ф. Литвин, Биофизика **4**, 601 (1959).
39. Б. Н. Тарусов, А. И. Поливода и А. И. Журавлёв, Биофизика **6**, 490 (1961).
40. Л. А. Ромодин, Ю. А. Владимиров, Н. П. Лысенко и Е. Н. Зарудная, Изв. междунар. акад. аграрного образования, № 42-1, 112 (2018).
41. П. О. Волкова, А. В. Алексеев, А. А. Джатдоева и др., Вестн. МГУ. Сер. Химия **57**, 34 (2016).
42. Г. К. Владимиров, М. М. Созарукова и Д. Ю. Измайлов, в сб. *Proc. of the int. conf. «Science and practice: new discoveries»*, под ред. И. М. Швеца, Л. А. Исмагиловой, В. А. Гурьевой и В. И. Седенко (Международный центр научно-исследовательских проектов, Киров, 2015), сс. 717–726.
43. Ю. А. Владимиров и А. Я. Потапенко, *Физико-химические основы фотобиологических процессов: учебное пособие для медицинских и биологических спец. вузов* (Высш. шк., М., 1989).
44. V. S. Sharov, E. S. Dremina, and Yu. A. Vladimirov, Biofizika **40**, 428 (1995).
45. Yu. A. Vladimirov, M. P. Sherstnev, and T. K. Azimbaev, Biofizika **40**, 323 (1995).
46. Y. A. Vladimirov, V. S. Sharov, E. S. Driomina, et al., Free Radic Biol Med. **18**, 739 (1995).
47. *База низкомолекулярных веществ PubChem*: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>.
48. J. Jiang, A. Bakan, A. A. Kapralov, et al., Free Radic. Biol. Med. **71**, 221 (2014). DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2014.02.029
49. А. С. Викулина, А. А. Джатдоева, Е. Н. Лобиченко и др., Журн. аналит. химии **72**, 639 (1987).
50. *Выделение и анализ природных биологически активных веществ* (Изд-во Томского университета, Томск, 2017).
51. V. S. Sharov, K. Briviba, and H. Sies, Free Radic. Biol. Med. **21**, 833 (1996).
52. Ю. А. Владимиров и Е. В. Проскурнина, *Лекции медицинской биофизике: Учебное пособие* (Изд-во МГУ; ИКЦ «Академкнига», М., 2007).
53. O. V. Vasiljeva, O. B. Lyubitsky, G. I. Klebanov, and Yu. A. Vladimirov, Membr. Cell Biol. **12**, 223 (1998).

54. A. Mandal, C. L. Hoop, M. DeLucia, et al., *Biophys. J.* **109**, 1873 (2015). DOI: 10.1016/j.bpj.2015.09.016
55. V. E. Kagan, A. Bayir, H. Bayir, et al., *Mol. Nutr. Food Res.* **53**, 104 (2009). DOI: 10.1002/mnfr.200700402
56. V. E. Kagan, G. G. Borisenko, Y. Y. Tyurina, et al., *Free Radic. Biol. Med.* **37**, 1963 (2004). DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2004.08.016
57. Л. А. Ромодин, Е. Н. Зарудная и Ю. А. Владимиров, *Комплекс цитохрома с с кардиолипином: биологическая роль и ингибирование антиоксидантами* (Изд-во «Перо», М., 2017).
58. A. Deshpande, S. Nimsadkar, and S. C. Mande, *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **61**, 1005 (2005). DOI: 10.1107/S0907444905009364
59. J. N. Rodriguez-Lopez, D. J. Lowe, J. Hernandez-Ruiz, et al., *J. Am. Chem. Soc.* **123**, 11838 (2001).
60. P. G. Furtmuller, W. Jantschko, M. Zederbauer, et al., *Jpn. J. Infect. Dis.* **57**, S30 (2004).
61. F. Ito, Y. Sono, and T. Ito, *Antioxidants (Basel)* **8** (3), 72 (2019). DOI: 10.3390/antiox8030072
62. Л. А. Ромодин, С. В. Шангин, Ю. А. Владимиров и др., *Изв. междунар. акад. аграрного образования*, № 42-1, 118 (2018).
63. M. J. Cormier and P. M. Prichard, *J. Biol. Chem.* **243**, 4706 (1968).

Isoquinoline Coumarin Derivatives as Chemiluminescence Activators in Reactions of Lipid Peroxidation

L.A. Romodin*, Yu.A. Vladimirov, ***, ****, ******, S.V. Shangin*, G.K. Vladimirov**, *****,
N.P. Lysenko*, and E.I. Demikhov*******

**Skryabin Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology,
ul. Akademika Skryabina 23, Moscow, 109472 Russia*

***Institute of Regenerative Medicine of Sechenov First Moscow State Medical University, Ministry of Health of the Russian
Federation, Trubetskaya ul. 8/2, Moscow, 119991 Russia*

****Lomonosov Moscow State University, Leninskiye Gory 1, Moscow, 119991 Russia*

*****Pirogov Russian National Research Medical University, Ministry of Health of the Russian Federation,
ul. Ostrovityanova 1, Moscow, 117997 Russia*

******Shubnikov Institute of Crystallography, Federal Research Center "Crystallography and Photonics" of the Russian
Academy of Sciences, Leninskii prosp. 59, Moscow, 119333 Russia*

******Lebedev Physical Institute, Russian Academy of Sciences, Leninskii prosp. 53, Moscow, 119991 Russia*

The objective of this study was to focus on participation of isoquinoline derivatives of coumarin in peroxidase reaction catalyzed by the cytochrome c–cardiolipin complex. We have studied coumarin derivatives called coumarin-314 (C-314), coumarin-334 (C-334) and coumarin-525 (C-525). These substances are known as specific physical activators of the chemiluminescence accompanying lipid peroxidation reaction. The effect of methanol on the structure of cytochrome c has been investigated employing spectrophotometry, phosphate buffer has been used to explore the optical properties of these substances. A spectrophotometric study and the measurements of the chemiluminescence intensity of a mixture in which lipoperoxidase reaction is catalyzed by the complex of cytochrome c with cardiolipin in the presence of isoquinoline derivatives of coumarin have been conducted simultaneously. Our findings show that the effect of methanol on the structure of cytochrome c is reversible indicating possible use of this alcohol in the study of this protein. Positions of absorption maxima and corresponding values of molar absorption coefficients in 20 mM phosphate buffer (pH 7.4) are determined for C-314 ($\lambda_{\max} = 447.5$ nm, $\varepsilon = 32360.4$ l/mol·cm), C-334 ($\lambda_{\max} = 460$ nm, $\varepsilon = 44012$ l/mol·cm), and C-525 ($\lambda_{\max} = 460$ nm, $\varepsilon = 32703.56$ l/mol·cm). We also demonstrated that isoquinoline derivatives of coumarin are substrates of peroxidase reaction catalyzed by the complex of cytochrome c with cardiolipin. Mass flow of these substances during an average statistical experiment in measurement of chemiluminescence (322 s) for C-314, C-334 and C-525 amounted to 32, 38 and 26%, respectively.

Keywords: apoptosis, chemiluminescence, cytochrome c/cardiolipin complex, peroxidase, isoquinoline coumarin, spectrophotometry