

Секция «Фундаментальная медицина»

Инициация пероксидазной активности цитохрома С при действии мембранных фосфолипидов, его участие во внутреннем пути апоптоза.

Кирилина Ирина Валерьевна

Студент

Российский национальный исследовательский университет им.Н.И.Пирогова,

Медико-биологический факультет, Москва, Россия

E-mail: kirilina-irina@bk.ru

Большое количество лабораторий по всему миру изучают молекулярные механизмы апоптоза и, в частности, роль цитохрома С в этом процессе. Цитохром С играет ведущую роль в запуске митохондриального пути апоптоза. Пероксидазную реакцию активно изучают в присутствии кардиолипина - фосфолипида, входящего в состав мембран митохондрий, но мы решили посмотреть как же влияют другие мембранные фосфолипиды на данную реакцию.

Цель данной работы: изучить структурные и функциональные изменения в цитохроме с при действии мембранных фосфолипидов.

Для реализации поставленной цели использовались следующие методы: основным методом исследования пероксидазной активности цитохрома с был люминол-зависимая хемилюминесценция (ХЛ), метод ЭПР-спектроскопии феноксильного радикала этопозида и флуоресценция триптофана-59 (как подтверждение структурных изменений в цитохроме с). Работа проводилась на однослойных липосомах, состоящих из смеси фосфолипидов: ди-олеил-фосфатидилхолин + ди-олеил-фосфатидная кислота (DOPC+DOPA), полученных с помощью ультразвуковой обработки в течение 10 минут.

Результаты :

эмпирическим путем найдено соотношение фосфолипидов-DOPC/DOPA, при котором наблюдалась самая высокая хемилюминесценция, что соответствует максимуму пероксидазной активности CytC, при исследовании следующих соотношений фосфолипидов, где в преимуществе DOPA ХЛ достигает стабильного значения, что возможно связано только с электростатическими взаимодействиями, а в момент пика вспышка обусловлена суммой электростатических и гидрофобных взаимодействий. Были использованы такие соотношения фосфолипидов: от 15:1 до 1:15, причем общая концентрация липидов в образцах была постоянной, менялся только процентный вклад каждого из них;

в отличие от хемилюминесценции, центральную роль в котором играет деформация связи гемового железа с метионином -80 при действии суммы: электростатических и гидрофобных взаимодействий, во флуоресценции главную роль играет триптофан-59, расположенный дальше и отдаляется постепенно до некоторого стабильного уровня, по всей видимости, только за счет электростатических взаимодействий;

при соотношении фосфолипидов 1:1 амплитуда ЭПР-сигнала является максимальной, как и при хемилюминесценции;

при увеличении времени инкубации происходит постепенное увеличение фосфатидной кислоты результатом чего явилось увеличение амплитуды хемилюминесценции, но затем пероксидазная активность начинает затухать несмотря на достаточно большое количество активатора (т.е. DOPA) данной реакции, а дело в том что образующиеся

однослойные липосомы практически полностью состоят из DOPC, что вызывает дестабилизацию мембраны и как следствие снижение вспышки хемилюминесценции.

Слова благодарности

Особую благодарность выражаю кафедре общей и медицинской биофизике РНИМУ им.Н.И.Пирогова за предоставленную возможность реализации проделанной работы и конечно же научному руководителю к.б.н. Степанову Герману Олеговичу