

УДК 535.8.225:543.432

ТЕРМОЛИНЗОВОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЦИТОХРОМА *c* И ЕГО КОМПЛЕКСА С NO

А.В. Брусничкин, А.В. Марикуца, М.А. Проскурнин, Е.В. Проскурнина*,
А.Н. Осипов**, Ю.А. Владимиров*

(кафедра аналитической химии; e-mail: Michael@analyt.chem.msu.ru)

Спектрофотометрические и термолинзовые измерения показали, что непрерывное лазерное излучение (450–530 нм, до 100 мВт) не оказывает воздействия на характеристики поглощения цитохрома *c* и термолинзовая спектрометрия использована для определения как цитохрома *c* (III) ($c_{\text{мин}} = 1 \cdot 10^{-7}$ М при $\lambda = 488,0$ нм; $c_{\text{мин}} = 3 \cdot 10^{-8}$ М при $\lambda = 514,5$ нм), так и его активной формы, цитохрома *c* (II) ($c_{\text{мин}} = 1 \cdot 10^{-8}$ М при $\lambda = 514,5$ нм). Выигрыш в чувствительности по сравнению со спектрофотометрическим определением этих форм цитохрома *c* составляет более двух порядков. Подобраны оптимальные условия получения комплекса цитохрома *c* с NO для его фотометрического определения: молярное соотношение додецилсульфат (модифицирующий агент): цитохром *c* составляет 1:30, полоса поглощения при 560 нм. Воздействие лазерного излучения на нитрозильный комплекс цитохрома *c* показало, что он диссоциирует с образованием цитохрома *c* (III), при этом возможно проводить мониторинг разрушения этого комплекса при помощи термолинзовой спектрометрии (514,5 нм) до уровня $1 \cdot 10^{-7}$ М.

В последнее десятилетие активно исследуется проблема апоптоза — запрограммированной смерти клетки, который является одной из главных причин гибели клеток при самых различных заболеваниях [1]. Центральную роль в индукции апоптоза играет цитохром *c* [2–8]. Известно, что при запуске апоптоза цитохром *c* выходит из митохондрий во внутриклеточное пространство, но механизм этого выхода остается неясным. Сейчас предполагается, что ключевую роль в этом играет пероксидазная активность цитохрома *c* [1, 2]. Исследование процесса выхода цитохрома *c* из митохондрий является важным для выяснения механизма развития апоптоза и изучения действия соответствующих лекарственных средств. В результате простое и экспрессное определение цитохрома *c* (как его общего количества, так и активных форм) является практически важным для медицинских и биологических целей.

К важнейшим физиологическим регуляторам относится монооксид азота (NO). Особый интерес представляет взаимодействие NO с геминовыми белками, в частности и с цитохромом *c* [9] с образованием нитрозильных комплексов. Вследствие такого взаимо-

действия происходит изменение пероксидазной активности цитохрома *c* [10], что можно использовать для регуляции апоптоза.

Цель настоящей работы — подбор условий определения форм цитохрома *c* и его нитрозильного комплекса методами молекулярной спектроскопии, в качестве которых выбраны спектрофотометрия как базовый метод и термолинзовая спектрометрия как лазерный метод молекулярной абсорбционной спектроскопии, обеспечивающий высокую чувствительность определения различных веществ [11, 12].

Экспериментальная часть

Аппаратура. На базе ранее существующей установки термолинзового спектрометра [13] создана установка для термолинзовых измерений биологических образцов. Термолинза индуцировалась в кювете (длина оптического пути 1 см) излучением аргонового ионного лазера “Innova 90–6” (“Coherent”, США, TEM₀₀-мода, с $\lambda_e = 488,0$ и 514,5 нм). В качестве зондирующего лазера использовали He–Ne-лазер “SP–106–1” (“Spectra Physics”, США) с $\lambda_p = 632,8$ нм (TEM₀₀-мода, 10 мВт). Параметры прибора представ-

* Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, факультет фундаментальной медицины, Ломоносовский просп., д. 31, корп. 5, ГСП-1 119991 Москва.

** Российский государственный медицинский университет, ул. Островитянова 1, 117513 Москва,

Т а б л и ц а 1

Параметры конфигурации двулучевого термолинзового спектрометра с одноканальной системой регистрации сигнала

Индуктирующий лазер	Длина волны λ_e , нм	514,5	488,0
	Конфокальное расстояние z_{ce} (мм)	6,4	6,7
	Диапазон мощности в ячейке (мВт)	1–50	1–50
	Радиус поперечного сечения луча лазера в перетяжке ω_{0e} (мкм)	55±5	
	Фокусное расстояние фокусирующей линзы f_e (мм)	300	
Зондирующий лазер	Длина волны λ_p (нм)	632,8	
	Фокусное расстояние фокусирующей линзы f_p (мм)	185	
	Конфокальное расстояние z_{cp} (мм)	3,1	
	Мощность лазера в ячейке P_p (мВт)	3	
	Радиус поперечного сечения луча лазера в перетяжке ω_{0p} (мкм)	25,0	
Параметры оптической схемы	Длина оптического пути l (мм)	10,0	
	Расстояние между ячейкой и детектором, см	180	
	Геометрический параметр, B	0,72	
	Частота прерывателя ϕ , Гц	0,5–4	

лены в табл. 1. Установка позволяет перестраивать геометрию оптической схемы и изменять мощность индуцирующего излучения в интервале 1–200 мВт, а времени облучения – от 0,01 до 10 с. Для спектрофотометрических измерений использовали сканирующий спектрофотометр “Shimadzu” UV1240-mini (Япония) с кварцевыми кюветами (длина оптического пути 1 см).

Обработка результатов. Термолинзовые измерения представляют собой последовательность циклов включения-выключения индуцирующего лазера (формирования-диссипации термолинзы). В результате можно получить серию сигналов θ [12]:

$$\theta = \frac{1}{B} \left(1 - \sqrt{\frac{I_{\text{выкл}} - I_{\text{вкл}}}{I_{\text{вкл}}} + 1} \right), \quad (1)$$

где $I_{\text{выкл}}$ и $I_{\text{вкл}}$ – интенсивность в центре зондирующего луча в отсутствие термолинзы и при полностью развившейся термолинзе соответственно, а B – геометрический параметр.

Пересчет сигнала θ в оптическую плотность проводят по уравнению

$$A = \frac{\theta}{2,303E_0P_e}, \quad (2)$$

где P_e – мощность лазерного излучения с длиной волны λ_e , индуцирующего термолинзу [12], E_0 – фактор чувствительности термолинзовых измерений (увеличение чувствительности по сравнению со спектрофотометрией для мощности индуцирующего излучения 1 мВт),

$$E_0 = -\frac{dn/dT}{k\lambda_p}, \quad (3)$$

где dn/dT – температурный градиент показателя преломления, k – коэффициент теплопроводности среды, λ_p – длина волны излучения, зондирующего термолинзу.

Реагенты и растворители. В работе использовали цитохром *c* из сердца лошади 99% (“Sigma”, США, M = 12383) для биохимических исследований;

додецилсульфат натрия (ДДС) (99%, “Fluka”, $M = 288,4$); $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (“ч.д.а.”, “Химмед”); NaOH (водный раствор, “ч.д.а.”); 1 М KCl (“ч.д.а.”, “Химмед”); аскорбиновая кислота (“х.ч.”);

Растворы цитохрома *c* (1 ммоль/л) и додecilсульфата натрия готовили растворением навески препарата в дистиллированной воде. Фосфатный буферный раствор pH 7,4 с концентрацией 20 ммоль/л готовили растворением навески $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ в дистиллированной воде. Необходимое значение pH 7,4 доводили при помощи NaOH , контролируя кислотность при помощи pH-метра. Для создания ионной силы использовали 1 М раствор KCl . Все готовые растворы хранили в темном месте при 4°C. Аскорбиновую кислоту использовали для приготовления аскорбата, необходимого для восстановления цитохрома *c*. В 100 мл воды растворяли 5 мг аскорбиновой кислоты и проводили титрование раствором NaOH (pH 12) до значения pH 7. Полученный раствор аскорбата разбавляли водой (1:5) и использовали для восстановления цитохрома *c*.

Получение газообразного монооксида азота. Газообразный NO получали сухим путем, используя KNO_2 , KNO_3 , Cr_2O_3 и Fe_2O_3 [14, 15]: $3\text{KNO}_2 + \text{KNO}_3 + \text{Cr}_2\text{O}_3 \rightarrow 2\text{K}_2\text{CrO}_4 + 4\text{NO}$ (оксид железа(III) необходим для спекания образующегося хромата). Полученный NO пропускали через четыре ловушки с NaOH (20%) для удаления высших оксидов азота, а затем через ловушку-поглотитель (два его отделения содержали 10 М NaOH , а третье – дистиллированную воду) [16]. Кварцевую трубку, заполненную смесью реагентов и аргоном, прокачивали при температуре 300°C до прекращения выделения газа. Полученным газом насыщали дегазированную воду, которую получали путем пропускания тока аргона через дистиллированную воду в течение 15 мин.

Получение нитрозильных комплексов цитохрома *c*. Насыщенную NO воду прибавляли к смеси цитохрома *c* (III) ($7 \cdot 10^{-6}$ М) с ДДС (0,22 мМ) в присутствии $4 \cdot 10^{-6}$ М аскорбата в фосфатном буферном растворе (20 мМ, pH 7,4), общий объем смеси 2 мл. Концентрация полученного раствора NO неизвестна, поэтому выбор соотношения цитохрома *c* и NO проводили перед каждым экспериментом.

Восстановление цитохрома *c* аскорбатом. В 100 мл воды растворяли 9 мг цитохрома *c*. Отбирали 1,25 мл полученного раствора. В 24 мл воды растворяли 5 мг ДДС. Отбирали 0,4 мл этого раствора. Добавляли 1,25 мл 100 нмоль/л фосфатного буферного раствора. К полученному раствору добавляли

0,2 мл приготовленного раствора аскорбата. Спектры полученных веществ регистрировали на спектрофотометре сразу после приготовления раствора.

Определение нитрозильного комплекса цитохрома *c*. Полученные растворы нитрозильного комплекса цитохрома *c* облучали лазерным излучением (514,5 нм, 40 мВт) в течение 10, 70 или 370 с. В случае термолинзовых измерений непосредственно в эти периоды регистрировали термолинзовый сигнал, в случае спектрофотометрических измерений после указанных промежутков времени регистрировали спектры поглощения облученной смеси.

Результаты и их обсуждение

Изучение действия лазерного излучения на цитохром *c*. Сравнение оптической плотности растворов цитохрома *c* из спектрофотометрических измерений и рассчитанных из термолинзового сигнала при длинах волн генерации термолинзового сигнала показало, что лазерное излучение не оказывает ощутимого влияния на цитохром *c* (рис. 1). Следовательно, возможно применение более чувствительного, чем спектрофотометрия, метода термолинзовой спектрометрии для исследования как цитохрома *c*, так и его активных форм.

Метрологические характеристики определения цитохрома *c*. Построены градуировочные зависимости по цитохрому *c* (III) и цитохрому *c* (II) для спектрофотометрических измерений (в максимумах полос поглощения) и для термолинзовых измерений. Градуировочные зависимости для цитохрома *c* (III)

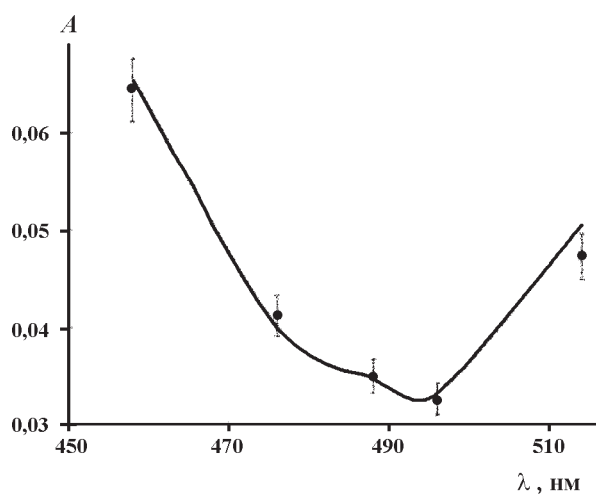


Рис. 1. Сравнение спектров поглощения цитохрома *c* (III) 5,7 мкМ, полученных при помощи спектрофотометрии и термолинзовой спектрометрии. Непрерывная линия – оптическая плотность, полученная при спектрофотометрических измерениях, точки – оптическая плотность, пересчитанная из термолинзового сигнала

Т а б л и ц а 2

Уравнения градуировочных зависимостей и характеристики чувствительности спектрофотометрического и термолинзового определения цитохрома *c*

Метод	Цитохром <i>c</i> (III)	Цитохром <i>c</i> (II)
Спектрофотометрия	$A_{530} = (1,1 \pm 0,1)c + 1,1 \times 10^{-2}$ ($n = 12, P = 0,95; r = 0,9989$) $c_{\text{мин}} = 7 \times 10^{-6}$ М $s_r (10^{-5} - 10^{-4} \text{ М}) = 0,02 \pm 0,05$	$A_{550} = (1,7 \pm 0,2)c + 1,1 \times 10^{-2}$ ($n = 12, P = 0,95; r = 0,9979$) $c_{\text{мин}} = 2 \times 10^{-6}$ М $s_r (10^{-5} - 10^{-4} \text{ М}) = 0,03 - 0,05$
Термолинзовая спектрометрия (40 мВт)	$\mathcal{D}_{488} = (0,220 \pm 0,002)c + 1,1 \times 10^{-2}$ ($n = 12, P = 0,95; r = 0,9994$) $c_{\text{мин}} = 1 \times 10^{-7}$ М $s_r (10^{-7} - 10^{-6} \text{ М}) = 0,01 - 0,04$	$\mathcal{D}_{514,5} = (0,558 \pm 0,003)c + 3,9 \times 10^{-2}$ ($n = 12, P = 0,95; r = 0,9994$) $c_{\text{мин}} = 1 \times 10^{-8}$ М $s_r (10^{-8} - 10^{-6} \text{ М}) = 0,02 - 0,06$
	$\mathcal{D}_{514,5} = (0,396 \pm 0,004)c + 2,2 \times 10^{-2}$ ($n = 12, P = 0,95; r = 0,9997$) $c_{\text{мин}} = 3 \times 10^{-8}$ М $s_r (10^{-8} - 10^{-6} \text{ М}) = 0,02 - 0,05$	

Примечание. Для градуировочных зависимостей концентрации приведены в ммоль/л (спектрофотометрия) и мкмоль/л (термолинзовая спектрометрия).

строили при двух значениях длин волн 488,0 и 514,5 нм, а для цитохрома *c* (II) — только при 514,5 нм (при 488,0 нм молярный коэффициент поглощения цитохрома *c* (II) мал). Результаты сведены в табл. 2. Полученные значения пределов обнаружения коррелируют с существующими данными [17]. Воспроизводимость определения цитохрома *c* на уровне 10^{-7} М не ниже, чем воспроизводимость спектрофотометрического определения. Рост чувствительности для обеих форм цитохрома превышает 200 раз, что находится в хорошем согласии с ожидаемым ростом чувствительности термолинзовых измерений.

Получение нитрозильного комплекса цитохрома *c* (III). Подбор условий получения нитрозильных комплексов цитохрома *c* включал выбор соотношений ДДС и цитохрома *c*, а также цитохрома *c* и NO. ДДС играет роль агента, облегчающего доступ лиганда к гему [10], найдено, что оптимальное соотношение его и белка лежит в диапазоне 1:30–1:50. Однако поскольку ДДС является ПАВ и склонен к образованию коллоидных растворов, мы выбрали минимальное значение этого соотношения (1:30).

Поскольку белки денатурируют на границе раздела фаз, образование границы фаз, которая возникает при пропускании газа через раствор, нежелательно. Поэтому для получения нитрозильного комплекса цитохрома *c* газообразный NO не пропускали через раствор белка с ДДС, а проводили взаимодействие в

водных растворах, предварительно насыщенных NO. Растворы NO добавляли спустя 5 мин после остальных компонентов. Продукты взаимодействия цитохрома *c* и NO идентифицировали по изменениям в спектре поглощения по сравнению с тем же количеством раствора всех компонентов, кроме NO. Рост интенсивности поглощения при 560 нм (рис. 2), который свидетельствует о присутствии в растворе NO комплекса цитохрома *c* [10], наблюдался в диапазоне объемов 100–300 мкл раствора NO, увеличение же объема NO не вызывало дальнейших изменений в спектре поглощения цитохрома *c*.

Изучение действия лазерного излучения на комплекс цитохрома *c* с NO. Полученный комплекс подвергали воздействию лазерного излучения. В результате наблюдали достаточно быстрое разложение комплекса цитохрома *c* с NO под действием лазерного излучения (рис. 3). В течение 10 с наблюдали разложение комплекса (уменьшение пика при 560 нм) и восстановление спектра поглощения цитохрома *c*. В отсутствие облучения комплекс сам по себе устойчив и не разлагается с течением времени, поэтому разложение комплекса обусловлено только воздействием на него лазерного излучения. Из рис. 3 видно, что комплекс разлагается до цитохрома *c* (III), но часть образовавшегося цитохрома *c* вновь взаимодействует с NO, присутствующим в системе. Термолинзовое определение нитрозильного комплекса

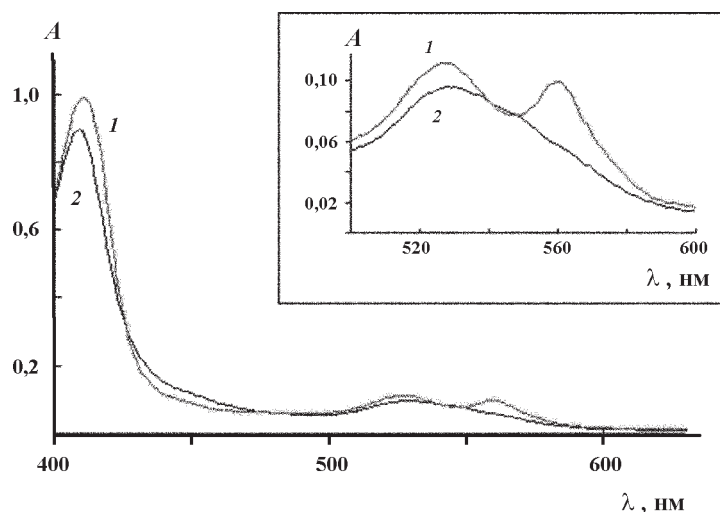


Рис. 2. Общий вид спектра поглощения цитохрома *c* (III) с NO (1), для сравнения приведен спектр поглощения цитохрома *c* (III) (2)

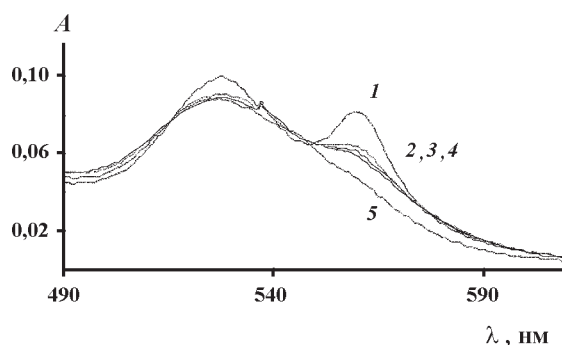


Рис. 3. Разложение комплекса цитохрома *c* с NO под действием лазерного излучения: 1 – спектр поглощения комплекса цитохрома *c* – NO; 2 – спектр поглощения комплекса после воздействия лазерного излучения в течение 10 с; 3 – спектр поглощения нитрозильного комплекса после воздействия лазерного излучения в течение 70 с; 4 – спектр поглощения нитрозильного комплекса после воздействия лазерного излучения в течение 370 с; 5 – спектр поглощения цитохрома *c* (III) (приведен для сравнения). Комплекс получен путем смешения 20 мкл 0,89 мМ раствора цитохрома *c*, 110 мкл 5,5 мМ раствора ДДС, 1470 мкл 20 мМ фосфатного буферного раствора (рН 7,4) и 400 мкл дегазированной воды, насыщенной NO

цитохрома *c* возможно на уровне концентраций, достигнутом для цитохрома *c* (II, III), т.е. 10^{-7} М, и дает тот же выигрыш в чувствительности по сравнению со спектрофотометрией, что и в случае определения цитохрома *c* (III), т.е. около 200 раз.

В целом подобраны условия спектрофотометрического и термолинзового определения цитохрома *c*, его активной формы и его нитрозильного комплекса. Показано, что под действием лазерного излучения изменений в спектре поглощения цитохрома *c* не наблюдается, что позволяет использовать высокочувствительный

метод термолинзовой спектрометрии для определения цитохрома *c* (II) и цитохрома *c* (III) на уровне 10^{-8} моль/л, что недоступно большинству других методов определения цитохрома *c*. Найденные условия могут быть использованы для изучения ингибирования и реактивации пероксидазной активности цитохрома *c* под действием NO [10] при помощи термолинзовой спектрометрии, что выходило за рамки данной работы. Кроме того, регулируемая и контролируемая лазером фотодиссоциация комплекса цитохрома *c* с NO может найти применение в лазерной терапии.

Работа осуществлена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 06-04-81052-Бел-а).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Владимиров Ю.А. // Биологические мембраны. 2002. **19**. № 5. С. 356.
2. Iverson S.L., Orrenius S. // Arch. Biochem. Biophys. 2004. **423**. P. 37.
3. Tuominen E.K.J., Wallace C.J.A., Kinnunen P.K.J. // J. Biol. Chem. 2002. **277**. N 11. P. 8822.
4. Nishimura G., Proske R.J., Doyama H., Higuchi M. // FEBS Lett. 2001. **505**. P. 399.
5. Ott M., Robertson J.D., Gogvadze V., Zhivotovsky B., Orrenius S. // PNAS. 2002. **99**. N 3. P. 1259.
6. Skulachev V.P. // Free Radic. Biol. Med. 2000. **29**. N 15. P. 1056.
7. Chandra J., Samali A., Orrenius S. // Free Radic. Biol. Med. 2000. **29**. N 3/4. P. 323.
8. Ramachandran A., Levonen A.-L., Brookes P.S., Ceaser E., Shiva S., Barone M.C., Darley-Usmar V. // Free Radic. Biol. Med. 2002. **33**. N 11. P. 1465.
9. Stone J.R., Sands R.H., Dunham W.R., Marletta M.A. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1995. **207**. P. 572.
10. Осипов А.Н., Степанов Г.О., Владимиров Ю.А., Козлов А.В., Каган В.Е. // Биохимия. 2006. **71**. № 10. С. 1392.
11. Жаров В.П., Летохов В.С. Лазерная оптико-акустическая спектроскопия. М., 1984.
12. Bialkowski S.E. Photothermal spectroscopy methods for chemical analysis. N. Y.; Wiley, 1996.
13. Проскурнин М.А., Аброскин А.Г., Радушкевич Д.Ю. // ЖАХ. 1999. **54**. № 1. С. 101.
14. Руководство по неорганическому синтезу / Под ред. Г. Брауэра Т. 2. М., 1985.
15. Ray J.D., Ogg R.A. // J. Am. Chem. Soc. 1956. **78**. P. 5993.
16. Moir J.W.B. // Biochim. Biophys. Acta. 1999. **1430**. P. 65.
17. Tamaki E., Sato K., Tokeshi M., Sato K., Aihara M., Kitamori T. // Anal. Chem. 2002. **74**. N 7. P. 1560.

Поступила в редакцию 14.04.08

THERMAL-LENS DETERMINATION OF CYTOCHROME C AND ITS NO COMPLEX

A.V. Brusnichkin, A.V. Marikutsa, M.A. Proskurnin, E.V. Proskurnina, A.N. Osipov, Yu.A. Vladimirov

(Division of Analytical Chemistry)

Spectrophotometric and thermal-lens measurements showed that cw laser irradiation (450–530 nm, up to 100 mW) does not affect the absorption band of cytochrome *c*, and thermal lensing is used for determining cytochrome *c* (III) ($c_{\min} = 1 \cdot 10^{-7}$ M at $\lambda = 488.0$ nm; $c_{\min} = 3 \cdot 10^{-8}$ M at $\lambda = 514.5$ nm) and its active form, cytochrome *c* (II) ($c_{\min} = 1 \cdot 10^{-8}$ M at $\lambda = 514.5$ nm). The enhancement in the sensitivity of determination of these species compared to conventional spectrophotometry is more than two orders. The optimum conditions for the formation of NO complex of cytochrome *c* for its photometric determination are selected: the molar ratio of dodecylsulfate (a modifying agent) to cytochrome *c* is 1: 30, the working wavelength of 560 nm. The study of the effect of laser radiation on nitroso-complex of cytochrome *c* showed that it dissociates forming cytochrome *c* (III), and the monitoring of the decomposition of this complex with thermal-lensing (514.5 nm) is possible at a level down to $1 \cdot 10^{-7}$ M.