

УДК 577.152.1

РАЗРУШЕНИЕ ЦИТОХРОМА *c*, НАХОДЯЩЕГОСЯ В КОМПЛЕКСЕ С КАРДИОЛИПИНОМ, ПРИ ОСУЩЕСТВЛЕНИИ КАТАЛИЗА ЛИПОПЕРОКСИДАЗНОЙ РЕАКЦИИ

© 2021 г. Л.А. Ромодин*, Ю.А. Владимиров**, ***, ****, ***** , Н.П. Лысенко*

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

**Институт регенеративной медицины Первого Московского государственного медицинского университета имени И.М. Сеченова (Сеченовского университета) 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 имени Н.И. Пирогова МЗ РФ, 117997, Москва, ул. Островитянова, 1

*****Институт кристаллографии им. А.В. Шубникова ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН, 119333, Москва, Ленинский просп., 59

E-mail: rla2904@mail.ru

Поступила в редакцию 15.06.2020 г.

После доработки 23.06.2020 г.

Принята к публикации 26.06.2020 г.

Изучено разрушения цитохрома *c* во время катализа им липопероксидазной реакции, обуславливающей в живых клетках разрушение митохондриальных мембран и выход в цитозоль различных проапоптотических факторов. С помощью спектрофотометрического анализа показано гораздо более интенсивное разрушение цитохрома *c* при добавлении перекиси водорода в присутствии тетраолеилкардиолипина при соотношениях белок : кардиолипин, равных 1 : 30 и 1 : 60 и являющихся оптимальными для образования комплекса цитохрома *c* с кардиолипином, в сравнении с пробой, в которой присутствовали только перекись водорода и цитохром *c*. Во втором случае разрушение порфириновой группировки гема принимало вид линейной функции, в то время как в присутствии кардиолипина зависимость носила явно экспоненциальный характер, причем при внесении дополнительного липидного субстрата, в роли которого выступала фосфатидная кислота, значение константы скорости первого порядка разрушения цитохрома *c* возрастало. Предположено, что быстрое разрушение цитохрома *c* при осуществлении им катализа липопероксидазной реакции является эволюционно развившимся механизмом, направленным на предотвращение самопроизвольного запуска апоптоза.

Ключевые слова: апоптоз, комплекс цитохрома *c* с кардиолипином, пероксидаза, спектрофотометрия, липопероксидазная реакция.

DOI: 10.31857/S0006302921010075

Ключевым фактором запуска программы апоптоза (запрограммированной гибели клеток) по внутреннему, или митохондриальному, пути является разрушение митохондриальных мембран, происходящее вследствие липопероксидазной активности цитохрома *c* (ЦитС) [1]. Пероксидазная активность у ЦитС появляется благодаря разрыву координационной связи между гемовым железом и остатком метионина в положении 80 апопротеина и специфическому изменению конформации белка (переходу в состояние «расплав-

ленной глобулы», *англ.* «molten globule») при его связывании с кардиолипином [1, 2]. В силу того что ЦитС проявляет пероксидазную активность только в определенных условиях (в клетках таковым является его связывание с кардиолипином), называть его классической пероксидазой нельзя. В обзоре [3] по отношению к нему наряду с гемоглобином, цитоглобином, миоглобином и другим белкам со схожими свойствами применяется термин «псевдопероксидаза». Однако, на наш взгляд, данный термин не совсем уместен, так как механизм пероксидазной активности указанных выше белков в целом схож с таковым для классических ферментов-пероксидаз, а образующиеся продукты реакции взаимодействия фермента с

Сокращения: ЦитС – цитохром *c*, ФК – фосфатидная кислота, ТОКЛ – тетраолеилкардиолипин, ЦитС-ТОКЛ – комплекс цитохрома *c* с тетраолеилкардиолипином.

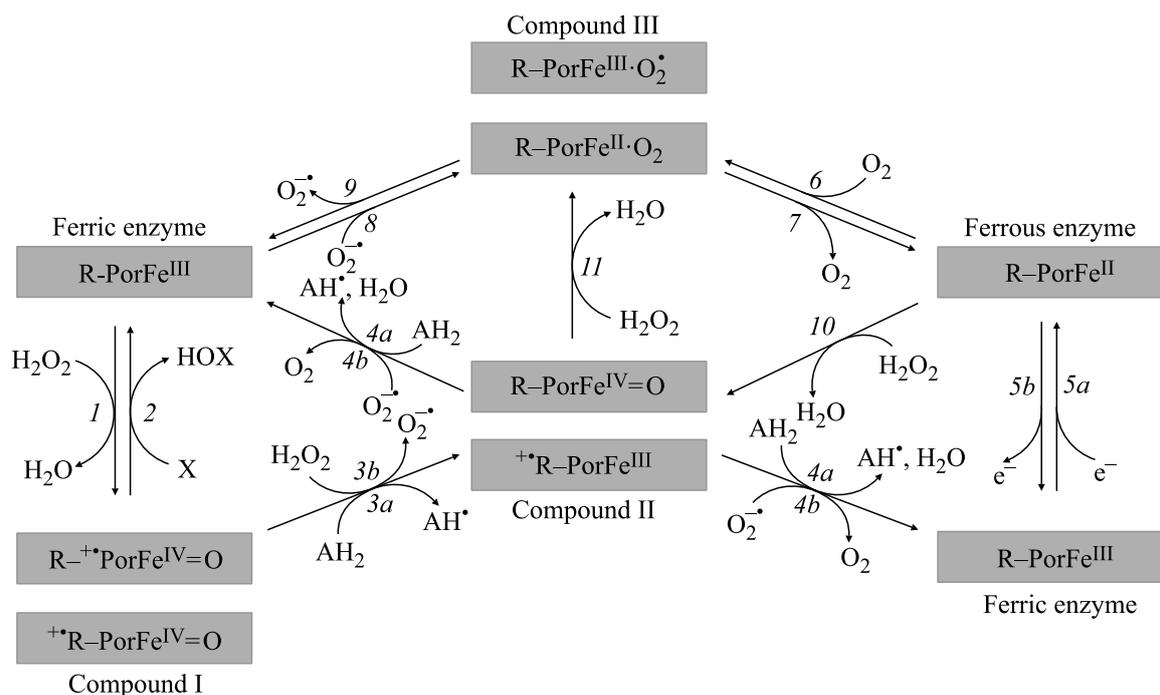


Рис. 1. Общая схема реакций ферментов-пероксидаз. AH_2 – липидный субстрат, X – атом галогена [6]. Основными реакциями считаются реакции 1, 3a и 4a, осуществляющие запуск перекисного окисления липидов [3].

пероксидазой идентичны как для этих белков, так и для классических пероксидаз [4, 5]. А приставка «псевдо-» скорее означает что-то внешне похожее, лишь кажущееся, но не являющееся таковым. Поэтому по отношению к цитохрому *c* и другим похожим белкам, на наш взгляд, больше подходит термин «факультативная пероксидаза». На рис. 1 приведена схема механизма проявления белком пероксидазной активности, целиком и полностью заимствованная из статьи [6]; приведенные на ней реакции справедливы как для классических, так и для факультативных пероксидаз, в том числе и для комплекса цитохрома *c* с кардиолипином.

Основными реакциями, способствующими последующему разрушению мембран митохондрий и, следовательно, ведущими к апоптозу, являются реакция 1 и реакции 3a и 4a, приводящие к образованию липидных радикалов, запускающих каскад реакций перекисного окисления липидов. Механизмы этих реакций подробно изложены в работах [3, 6, 7], поэтому не будем здесь на них останавливаться; а в обзоре [3] приводятся частные отличия между реакциями классических и факультативных пероксидаз, называемых автором работы [3] псевдопероксидазами. В частности, приводятся сведения касательно того, что факультативные пероксидазы разрушаются в ходе проявления пероксидазной активности. Кроме того, в работе [8] непосредственно показано разрушение ЦитС, находящегося в комплексе с кар-

диолипином и катализирующего пероксидазную реакцию. Однако в работе [8] указывается лишь на качественный факт разрушения ЦитС без анализа кинетики этого процесса. Разрушение ЦитС при катализе пероксидазной реакции внимательным образом исследовалось в работе [9], однако в указанном исследовании соотношение ЦитС : кардиолипин при максимальном количестве кардиолипина составило 1:10, в то время как, согласно данным работы [1], чтобы ЦитС в полной мере начал проявлять пероксидазную активность, необходимо, чтобы на одну его молекулу приходилось более 20 молекул кардиолипина. В одном из экспериментов, результаты которого представлены в работе [9], количество молекул фосфолипидов на одну молекулу ЦитС все-таки равно 20, однако половина из них – это молекулы 1,2-диолеил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина, которые, по данным самих авторов работы [9], сами по себе даже в соотношении 20 на 1 молекулу ЦитС не вызывали никакого увеличения скорости окисления белка в сравнении с пробой, содержащей только ЦитС и H_2O_2 . А это в свете данных касательно факультативных пероксидаз, представленных в обзоре [3], означает, что в том случае активация пероксидазных свойств ЦитС не происходила вовсе.

Поэтому в настоящей работе мы поставили цель изучить разрушение ЦитС, находящегося в комплексе с тетраолеилкардиолипином при со-

отношениях белок : липид, равных 1 : 60 и 1 : 30, во время катализа им липопероксидазной реакции при внесении в качестве дополнительного липидного субстрата в некоторые пробы со вторым соотношением фосфатидной кислоты (ФК).

На наш взгляд, также необходимо обратить внимание читателя на то, что пероксидазный цикл может проходить и без участия липидного субстрата, посредством взаимодействия с другими молекулами H_2O_2 . К примеру, Compound I способен окислить не только молекулу липида, но и H_2O_2 с образованием супероксидного анионного радикала (реакция *3b* на рис. 1), который Compound II окисляет до кислорода (реакция *4b* на рис. 1). Также Compound II может окислить еще одну молекулу H_2O_2 (реакция *11* на рис. 1) с образованием еще одной формы фермента – пероксидазы, называемой Compound III (его не нужно путать с «промежуточным соединением III» из работы [10], так как в ней не установлен его состав, и под ним может крыться лишь одна из других форм пероксидазы с окисленным апопротеином), который, выделяя супероксидный анионный радикал, превращается в исходную форму пероксидазы, содержащую трехвалентное железо (реакция *9* на рис. 1), или же, выделяя кислород, – в форму, содержащую двухвалентное железо (реакция *7* на рис. 1). Эта форма по реакции *10*, идентичной реакции *1* для Ferric-формы, превращается в Compound II [6]. Все эти реакции нужно иметь в виду при анализе данных экспериментов по изучению свойств комплекса цитохрома *c* с кардиолипином, особенно когда липидный субстрат в системе трудноокисляем, а перекись водорода находится в высокой концентрации.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В настоящей 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); цитохром *c*, 1 мМ раствор, приготовленный из навески необходимой массы (Sigma-Aldrich, США); 1,1',2,2'-тетраолеилкардиолипин (ТОКЛ), 6 мМ метанольный раствор, приготовленный из навески необходимой массы (Avanti Polar Lipids, США); фосфатидная кислота, 12 мМ метанольный раствор, приготовленный из навески необходимой массы (Avanti Polar Lipids, США).

Растворы указанных выше веществ более низких концентраций готовили методом последовательных разведений растворов, указанных в списке, кратность последовательных разбавлений не превышала 10.

Методика эксперимента. Спектрофотометрические измерения проводили на спектрофотометре Specord 200 (Analytik Jena, Германия) с ис-

пользованием кювет из кварцевого стекла с длиной оптического пути 1 см. Спектры поглощения регистрировали в пробе объемом 3 мл в диапазоне 300–600 нм, в качестве растворителя использовали 20 мМ фосфатный буфер с рН 7.4. Концентрацию ЦитС вычисляли, используя уравнение Бугера–Ламберта–Бера, на основании серии спектров поглощения, зарегистрированных по алгоритму, подробно изложенному в патенте [11]. В опытную пробу мы вносили 100 мкл 100 мкМ ЦитС, в пробу для формирования комплекса цитохрома *c* с тетраолеилкардиолипином (ЦитС-ТОКЛ) при соотношении ЦитС : ТОКЛ = 1 : 30 вносили 150 мкл 6 мМ метанольного раствора ТОКЛ, при соотношении 1 : 60 – 300 мкл, в некоторые пробы, содержащие ЦитС-ТОКЛ при соотношении ЦитС : ТОКЛ = 1 : 30, также вносили 150 мкл 12 мМ метанольного раствора ФК. Липопероксидажную реакцию мы запускали внесением в пробы 300 мкл 2150 мкМ раствора H_2O_2 .

РЕЗУЛЬТАТЫ

Нами были зарегистрированы серии спектров оптической плотности реакционных смесей следующего состава: 1) 10 мкМ ЦитС, 215 мкМ H_2O_2 – эта проба позволяет оценить непосредственное разрушение ЦитС под действием перекиси водорода, другие три пробы отражают разрушение этого белка, являющееся следствием проявления им пероксидазной активности; 2) ЦитС-ТОКЛ при соотношении ЦитС : ТОКЛ = 1 : 30 в присутствии 215 мкМ H_2O_2 ; 3) ЦитС-ТОКЛ при соотношении ЦитС : ТОКЛ = 1 : 60 в присутствии 215 мкМ H_2O_2 ; 4) ЦитС-ТОКЛ при соотношении ЦитС : ТОКЛ = 1 : 30 в присутствии 600 мкМ ФК и 215 мкМ H_2O_2 . Некоторые из зарегистрированных спектров представлены на рис. 2 и 3. На рис. 2 показаны спектры поглощения в диапазоне длин волн 300–600 нм.

На рис. 3 показана область спектра в диапазоне длин волн 500–580 нм, содержащая второй пик поглощения ЦитС, значение оптической плотности в котором значительно меньше, чем в полосе Core. Но тем не менее по этому пику тоже можно судить о разрушении ЦитС в процессе реакции.

Из данных, представленных на рис. 2 и 3, следует, что ЦитС разрушается при действии перекиси водорода, о чем свидетельствует уменьшение оптической плотности в пиках поглощения, причем это разрушение сильнее в том случае, когда в смеси присутствует кардиолипин, связывание с которым придает ЦитС пероксидазную активность. Сам по себе этот факт был установлен ранее, хотя в том исследовании соотношение ЦитС : кардиолипин и отличалось от оптимального, способствующего максимальной пероксидазной активности данного белка [9].

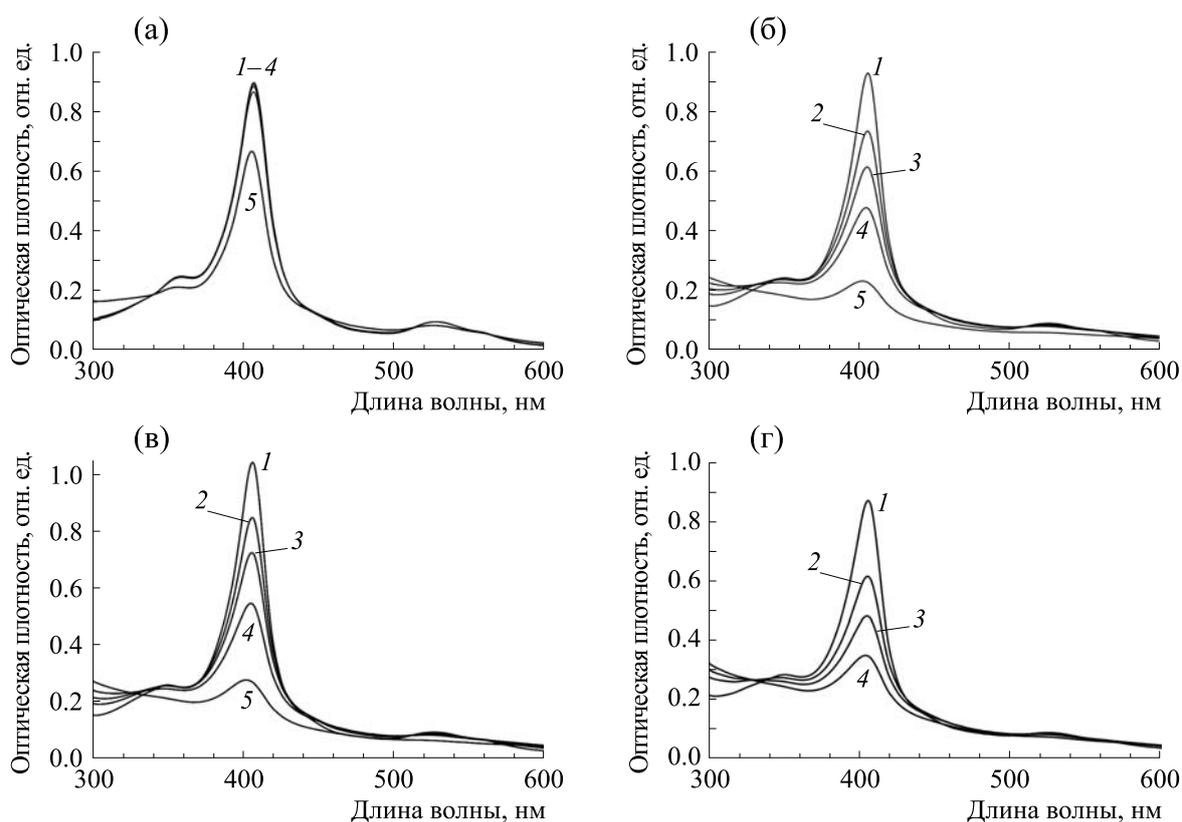


Рис. 2. Спектры поглощения в диапазоне 300–600 нм реакционных смесей: (а) – 10 мкМ ЦитС, 215 мкМ H_2O_2 ; (б) – ЦитС-ТОКЛ при соотношении ЦитС : ТОКЛ = 1 : 30 в присутствии 215 мкМ H_2O_2 ; (в) – ЦитС-ТОКЛ при соотношении ЦитС : ТОКЛ = 1 : 60 в присутствии 215 мкМ H_2O_2 ; (г) – ЦитС-ТОКЛ при соотношении ЦитС : ТОКЛ = 1 : 30 в присутствии 600 мкМ ФК и 215 мкМ H_2O_2 . Спектры зарегистрированы в определенные моменты с начала реакции: 1 – через 1 мин; 2 – через 3.5 мин; 3 – через 6 мин; 4 – через 12 мин для (а), (б), (г) и через 13 мин для (в); 5 – через 86 мин.

Далее нами с использованием уравнения Бугера–Ламберта–Бера были определены концентрации ЦитС в различные моменты времени от начала реакции. Так как в изучаемом диапазоне длин волн (300–600 нм) вкладом в общую оптическую плотность смеси, вносимом ТОКЛ, ФК и H_2O_2 , можно пренебречь, то при вычислении концентрации ЦитС можно использовать непосредственно значения оптической плотности смеси. При определении концентрации ЦитС мы использовали значение оптической плотности на длине волны, равной 409 нм. Поглощение на этой длине волны обусловлено содержанием в молекуле ЦитС порфириновой группировки гема [10].

Вычисленные значения концентрации ЦитС для указанных выше проб представлены на рис. 4.

Как видно из графиков, представленных на рис. 4, разрушение ЦитС, находящегося в составе комплекса ЦитС-ТОКЛ и, следовательно, проявляющего пероксидазную активность, носит характер экспоненциальной функции (рис. 4б–г), в то время как функция разрушения ЦитС в при-

сутствии H_2O_2 и в отсутствие липида в целом носит линейный характер.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Используя данные об уменьшении концентраций ЦитС, мы определили константы скорости реакции первого порядка для его разрушения. Рассматривать разрушение ЦитС в качестве реакции первого порядка в данном случае уместно, так как его концентрация более чем на порядок ниже концентрации перекиси водорода. Разрушение ЦитС в системе, где к нему добавлена только перекись водорода (рис. 2а, 3а, 4а), является результатом просто действия H_2O_2 на белок, вернее – на содержащуюся в нем порфириновую группировку гема. Разрушение же ЦитС в других рассматриваемых случаях – следствие проявления им пероксидазной активности. Мы предполагаем, что быстрое разрушение ЦитС в этом случае, в сравнении с классическими пероксидазами [3], – это механизм защиты клеток от запуска программы апоптоза.

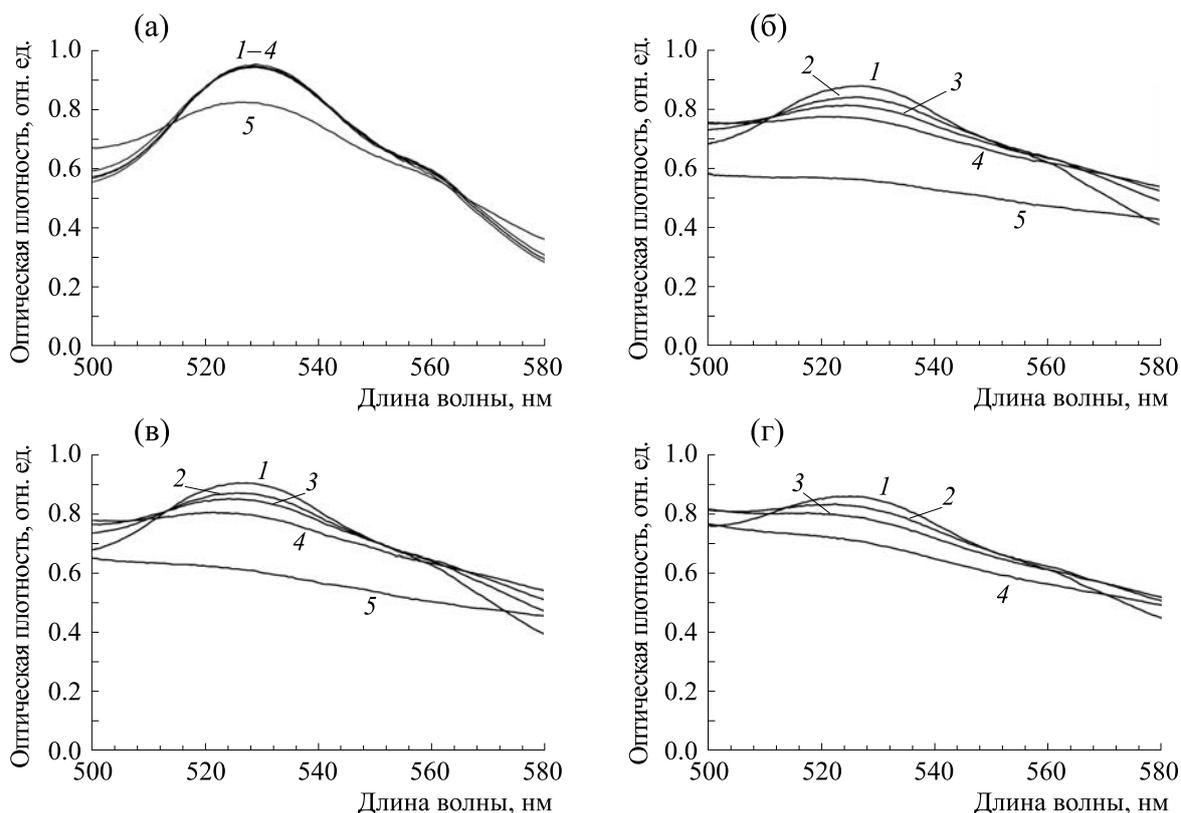


Рис. 3. Спектры поглощения в диапазоне 500–580 нм реакционных смесей: (а) – 10 мкМ ЦитС, 215 мкМ Н₂О₂; (б) – ЦитС-ТОКЛ при соотношении ЦитС : ТОКЛ = 1 : 30 в присутствии 215 мкМ Н₂О₂; (в) – ЦитС-ТОКЛ при соотношении ЦитС : ТОКЛ = 1 : 60 в присутствии 215 мкМ Н₂О₂; (г) – ЦитС-ТОКЛ при соотношении ЦитС : ТОКЛ = 1 : 30 в присутствии 600 мкМ ФК и 215 мкМ Н₂О₂. Спектры зарегистрированы в определенные моменты с начала реакции: 1 – через 1 мин; 2 – через 3.5 мин; 3 – через 6 мин; 4 – через 12 мин для (а), (б), (г) и через 13 мин для (в); 5 – через 86 мин.

Однако перед вычислением констант скорости разрушения ЦитС, находящегося в составе комплекса с ТОКЛ, мы определили ее для разрушения свободного ЦитС под действием перекиси водорода. Эту реакцию мы рассмотрели двумя способами: 1) как реакцию первого порядка; 2) как реакцию нулевого порядка – в пользу этого свидетельствует визуальная близость функции уменьшения концентрации (рис. 4а) к линейной, а также то, что применение дифференциального метода Вант-Гоффа дало такое значение: результат округления до единиц углового коэффициента прямой, построенной в координатной плоскости зависимости натурального логарифма скорости реакции от натурального логарифма концентрации ЦитС для соответствующих моментов времени, равен нулю. Таким образом, мы получили значение константы скорости реакции первого порядка для разрушения свободного ЦитС при действии 215 мкМ Н₂О₂, равное $(0.000057 \pm 0.000001) \text{ с}^{-1}$, и значение константы скорости реакции нулевого порядка, которое яв-

ляется применительно к данной реакции наиболее верным, равное $(52.3 \pm 0.4) \cdot 10^{-11} \text{ моль/л}\cdot\text{с}$. Относительная ошибка аппроксимации функции уменьшения концентрации ЦитС в ходе реакции, определенной как реакция нулевого порядка, составляет всего 0.3%.

Далее мы определили константы скорости разрушения ЦитС, находящегося в составе комплекса с ТОКЛ. Константы скорости реакции разрушения ЦитС, определенные нами для первых минут реакции, составляют: для системы ЦитС-ТОКЛ при соотношении белок : липид = 1 : 30 при внесении 215 мкМ Н₂О₂ $(0.00159 \pm 0.00007) \text{ с}^{-1}$, при соотношении 1:60 – $(0.00139 \pm 0.00007) \text{ с}^{-1}$; для системы ЦитС-ТОКЛ при соотношении ЦитС : ТОКЛ = 1:30 при внесении 600 мкМ легкоокисляемой ФК и 215 мкМ Н₂О₂ $(0.00262 \pm 0.00162) \text{ с}^{-1}$.

Схожесть значений констант скорости первого порядка разрушения ЦитС при соотношениях

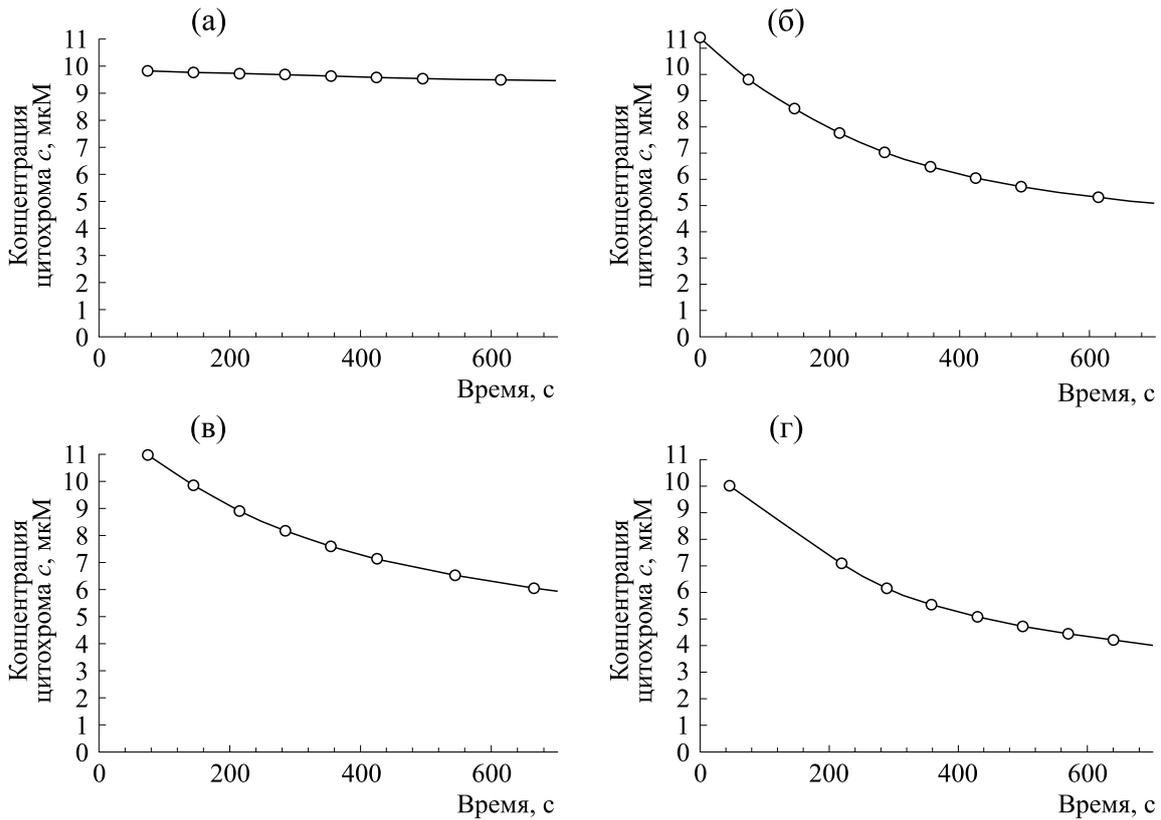


Рис. 4. Уменьшение концентрации ЦитС за первые 700 с реакции в смесях: (а) – 10 мкМ ЦитС, 215 мкМ H₂O₂; (б) – ЦитС-ТОКЛ при соотношении ЦитС : ТОКЛ = 1 : 30 в присутствии 215 мкМ H₂O₂; (в) – ЦитС-ТОКЛ при соотношении ЦитС : ТОКЛ = 1 : 60 в присутствии 215 мкМ H₂O₂; (г) – ЦитС-ТОКЛ при соотношении ЦитС : ТОКЛ = 1 : 30 в присутствии 600 мкМ ФК и 215 мкМ H₂O₂.

ЦитС : ТОКЛ 1 : 30 и 1 : 60 позволяет сделать вывод о том, что, достигнув оптимальных значений для активации пероксидазных свойств у ЦитС, соотношение ЦитС : кардиолипиды внутри этих значений не особо влияет на скорость катализируемой ЦитС пероксидазной реакции, о чем можно судить по скорости разрушения самого ЦитС в ходе реакции для первых двух систем. Отметим, что в случае, когда в систему не добавлена фосфатидная кислота, по нашему мнению, скорее всего пероксидазный цикл протекает через реакции *3b*, *11*, *10*, *4b* (рис. 1), а не через реакции *3a* и *4a*, так как остатки олеиновой кислоты, имеющие место в ТОКЛ, должны давать липидные радикалы с большим трудом. Значение же константы скорости реакции первого порядка в присутствии ФК для разрушения ЦитС, находящегося в комплексе с ТОКЛ, выше (хотя тут необходимо указать на большие пределы погрешностей, поэтому для данной системы целесообразно в будущем провести более детальное исследование). В данном случае как раз происходит липопероксидазная реакция, имеющая место в живых митохондриях.

ВЫВОДЫ

В ходе изучения процесса разрушения цитохрома с, находящегося в комплексе с ТОКЛ в соотношении, свойственном таковому для наблюдаемого в природе, в ходе катализируемой им липопероксидазной реакции определены константы скорости реакции первого порядка этого процесса. Путем сравнения динамики уменьшения концентрации цитохрома с в ходе катализа им пероксидазной реакции с динамикой уменьшения концентрации свободного цитохрома с, подвергнутого воздействию H₂O₂, показано, что разрушение этого белка в первом случае гораздо выше и носит выраженный экспоненциальный характер. По нашему предположению, быстрое разрушение цитохрома с в ходе катализа им липопероксидазной реакции является эволюционным механизмом защиты клеток от разрушения мембран митохондрий и дальнейшего запуска апоптоза.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Выполнение экспериментов, результаты которых представлены в работе, было поддержано

грантом Российского фонда фундаментальных исследований № 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 статьи 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 экспериментальных объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ю. А. Владимиров, Е. В. Проскурнина и А. В. Алексеев, *Биохимия* **78**, 1391 (2013).
2. M. Li, A. Mandal, V. A. Tyurin, et al., *Structure* **27**, 806 (2019). DOI: 10.1016/j.str.2019.02.007
3. I. I. Vlasova, *Molecules* **23** (10), 2561 (2018). DOI: 10.3390/molecules23102561
4. A. Mandal, C. L. Hoop, M. DeLucia, et al., *Biophys. J.* **109**, 1873 (2015). DOI: 10.1016/j.bpj.2015.09.016
5. N. A. Belikova, Y. A. Vladimirov, A. N. Osipov, et al., *Biochemistry* **45**, 4998 (2006).
6. P. G. Furtmuller, W. Jantschko, M. Zederbauer, et al., *Jpn. J. Infect. Dis.* **57**, 830 (2004).
7. J. N. Rodriguez-Lopez, D. J. Lowe, J. Hernandez-Ruiz, et al., *J. Am. Chem. Soc.* **123**, 11838 (2001).
8. Л. А. Ромодин, С. В. Шангин, Ю. А. Владимиров и др., *Изв. Международной академии аграрного образования*, № 42-1, 118 (2018).
9. Ю. А. Владимиров, Е. В. Проскурнина, Д. Ю. Измайлов и др., *Биохимия* **71**, 1225 (2006).
10. C. Dallacosta, E. Monzani, and L. Casella, *J. Biol. Inorg. Chem.* **8**, 770 (2003). DOI: 10.1007/s00775-003-0478-z
11. Л. А. Ромодин, М. Ф. Трифонова, Н. П. Лысенко и С. А. Бекузарова, Патент РФ № 2720807 (заявл. 04.06.2019, опубл. 13.05.2020).

Destruction of Cytochrome *c* in Cardiolipin Complex during Catalysis of Lipid Peroxidation

L.A. Romodin*, Yu.A. Vladimirov**, ***, ****, *****, and N.P. Lysenko*

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

**Institute for Regenerative Medicine, Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov 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",
Russian Academy of Sciences, Leninsky prosp. 59, Moscow, 119333 Russia

This study explores the changes in cytochrome *c* catalyzing the lipoperoxidase reaction, thereby causing the destruction of mitochondrial membranes in living cells and the release of various pro-apoptotic molecules into the cytosol. Spectrophotometric analysis revealed that cytochrome *c* destroyed much more intensively when hydrogen peroxide was added in the presence of tetraoleilcardiolipin at the protein/cardiolipin ratios of 1 : 30 and 1 : 60. These ratios are optimum for the formation of the cytochrome *c*–cardiolipin complex rather than the sample, which contained only hydrogen peroxide and cytochrome *c*. At a ratio of 1 : 60, the shape of the destruction of heme porphyrin group was linear, while data looked exactly exponential after addition of cardiolipin. Besides, the value of a first order rate constant of destruction of cytochrome *c* was increased after applying the lipid substrate. It was a phosphatidic acid. These results suggest that a rapid destruction of cytochrome *c* during catalysis of lipid peroxidation is the mechanism designed by evolution to prevent the spontaneous initiation of apoptosis.

Keywords: apoptosis, cytochrome c–cardiolipin complex, peroxidase, spectrophotometry, lipid peroxidation