

Таким образом, взаимодействие ЦП с комплексом ЛФ и олеиновой кислоты может модулировать его цитотоксическую активность.

Исследование поддержано грантом Президента РФ МК-5074.2016.4.

### Литература

1. Sokolov, A.V. et al. // *Biometals*. – 2014. – Vol. 27. – P. 815-828.
2. Rath, E.M. et al. // *J. Pharm. Pharm. Sci.* – 2015. – Vol. 18. – P. 773-824.
3. Fang, B. et al. // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2014. – Vol. 1841. – P. 535-543.

## ИССЛЕДОВАНИЕ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ГАЛОГЕНИРУЮЩЕГО СТРЕССА У ПАЦИЕНТОВ С СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ С ПОМОЩЬЮ МЕТОДОВ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА

Соколов А.В.<sup>1,2,3</sup>, Костевич В.А.<sup>1,2</sup>, Григорьева Д.В.<sup>4</sup>, Горудко И.В.<sup>4</sup>, Черенкевич С.Н.<sup>4</sup>, Васильев В.Б.<sup>1,3</sup>, Панасенко О.М.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»,  
Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup>ФГБУ ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА России,  
Москва, Россия

<sup>3</sup>Санкт-Петербургский государственный университет,  
Санкт-Петербург, Россия

<sup>4</sup>Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь

Сердечно-сосудистые заболевания сопровождаются развитием галогенирующего/окислительного стресса, опосредованного галогенирующей активностью фермента нейтрофилов, миелопероксидазы (МПО) [1]. Продукты катализа МПО,  $\text{HOCl}$  и  $\text{NOBr}$ , модифицируют практически все типы биомолекул, в том числе белки и липиды в составе липопротеинов низкой плотности (ЛНП) крови. Для модификации ЛНП с участием МПО важны как связывание фермента с их поверхностью, так и уровень активности МПО [2], регулируемый рядом факторов плазмы, в том числе ее физиологическим ингибитором, церулоплазмином (ЦП) [3]. Проведенные нами исследования показали, что ЛНП, модифицированные продуктами катализа МПО ( $\text{HOCl}$  и  $\text{NOBr}$ ) и карбонильными соединениями (малоновым диальдегидом, МДА и метилглиоксалем, МГ), являются

провоспалительными факторами, индуцирующими секрецию МПО активированными нейтрофилами и моноцитами-макрофагами.

Целью данной работы было получение специфических антител против ЛНП и ЦП, модифицированных НОС1 и НОВг (далее ЛНП/ЦП-С1 и ЛНП/ЦП-Вг); разработка методов иммуноферментного анализа (ИФА) для измерения концентрации ЛНП-С1, ЛНП-Вг, ЦП-С1 и ЦП-Вг; анализ корреляционных связей между показателями, измеренными в плазме пациентов с различной степенью тяжести сердечно-сосудистых заболеваний.

Нами были разработаны оригинальные методы оценки содержания МПО (ИФА) и ее активности (пероксидазная активность с использованием субстрата *o*-дианизидина), концентрации ЛНП-С1, ЛНП-Вг, ЦП-С1 и ЦП-Вг (ИФА), а также методы оценки соотношения прооксидантной и антиоксидантной систем плазмы крови (пероксидазная активность плазмы с использованием субстрата *o*-дианизидина и доля непротеолизованного ЦП, обладающего антимиелопероксидазной активностью).

Для получения антигенов ЛНП либо ЦП инкубировали с НОС1 либо НОВг при мольном соотношении окислитель:апоВ-100=50:1, окислитель:ЦП=20:1 в течение 30 мин при 37 °С. Модифицированные ЛНП отделяли от нативных с помощью электрофореза в 1 % геле агарозы, вырезали из геля зону модифицированных ЛНП. Далее подвергали препаративному электрофорезу с SDS содержащийся в них апоВ-100, вырезали его зону из геля и использовали для иммунизации кроликов. Модифицированный ЦП отделяли от не окисленного белка с помощью диск-электрофореза в ПААГ, вырезали из геля зону модифицированного ЦП. Далее ЦП подвергали препаративному электрофорезу с SDS, вырезали белок из геля и использовали для иммунизации кроликов. Контролем служили препараты ЦП и апоВ-100 из нативных ЛНП, которыми иммунизировали крыс. После 4 иммунизаций с интервалом в 2 недели были получены антисыворотки против апоВ-100 из ЛНП-С1, ЛНП-Вг, а также ЦП-С1 и ЦП-Вг от кроликов. От крыс получали антисыворотку против нативных ЛНП и ЦП. Из сывороток выделили фракцию IgG. Для очистки антител от реакции с ЛНП либо ЦП, модифицированными МДА, проводили негативную аффинную хроматографию на агарозе с МДА-ЛНП либо МДА-ЦП. В качестве стандарта использовали препараты ЛНП и ЦП, модифицированные 20-молярным избытком НОС1 либо НОВг. Концентрацию модифицированных ЛНП и ЦП в образце плазмы крови выражали в нг/мл после сравнения оптической плотности образцов с калибровочными прямыми для модифицированных ЛНП и ЦП. Петля ЦП, соединяющая 5 и 6 домены (882-894, RRPYLKVFNPRRKL), содержит

связь лизин887-валин888, которая в первую очередь атакуется сериновыми протеиназами, лишаящими ЦП способности ингибировать МПО. В качестве антигена использовали пептид ЦП, CRRPYLKVFNPRRKL (881-894), конъюгированный по N-концевому остатку цистеина с аминокетонами гомоцианина виноградной улитки за счет малеимидного агента (сульфо-SMCC кросслинкер). Кроликов иммунизировали конъюгатом и после 4-ой иммунизации собирали антисыворотку, из которой выделяли фракцию IgG. Антитела очищали от примесей антител против гомоцианина улитки с помощью негативной хроматографии на колонке, содержащей агарозу с иммобилизованным гомоцианином улитки. Полученные антитела по данным Вестерн-блоттинга реагировали исключительно с 132 кДа зоной непротеолизованного ЦП и не реагировали ни с одним из протеолитических фрагментов ЦП.

При сопоставлении измеренных показателей на репрезентативном количестве образцов плазмы крови (n=69) от пациентов с различной степенью тяжести сердечно-сосудистых заболеваний нам удалось проследить ряд корреляционных связей, хорошо согласующихся с данными, полученными на экспериментальных моделях исследования проатерогенных свойств МПО. Во-первых, пероксидазная активность МПО в плазме крови положительно коррелировала с концентрацией МПО и отрицательно – с долей непротеолизованного ЦП, являющегося эффективным ингибитором МПО. Во-вторых, концентрация МПО положительно коррелировала с показателями галогенирующего стресса (концентрации ЛНП-С1, ЛНП-Вг, ЦП-С1 и ЦП-Вг) и отношением концентрации МПО к общей пероксидазной активности плазмы. В-третьих, показатели галогенирующего стресса демонстрировали высокий уровень корреляционных связей между собой (коэффициенты корреляции от 0,89 до 0,96). Наконец, соотношение концентрации МПО к пероксидазной активности МПО положительно коррелировало со всеми показателями галогенирующего стресса и отрицательным образом зависело от доли непротеолизованного ЦП в плазме. Пероксидазная активность гемоглобина, измеренная в образцах плазмы больных, не коррелировала ни с одним из показателей галогенирующего стресса и антиоксидантной защиты, что подкрепляет гипотезу об участии МПО в проатерогенной модификации ЛНП. Полученные результаты свидетельствуют о важной роли галогенирующего стресса в атерогенной модификации ЛНП. ЦП, выполняя функцию природного ингибитора МПО, препятствует такой модификации, а значит и развитию атеросклероза.

Работа поддержана РФФИ (14-04-00807, 15-04-03620, 16-54-00038).

## Литература

1. Панасенко, О.М. Хлорноватистая кислота как предшественник свободных радикалов в живых системах / О.М. Панасенко, И.В. Горудко, А.В. Соколов // Успехи биологической химии. – 2013. – Т. 53. – С. 195-244.
2. Proatherogenic modification of LDL by surface-bound myeloperoxidase / A.V. Sokolov [et al.] // Chem. Phys. Lipids. – 2014. – Vol. 180. – P. 72-80.
3. Ceruloplasmin and myeloperoxidase in complex affect the enzymatic properties of each other / A.V. Sokolov [et al.] // Free Rad. Res. – 2008. – Vol. 42. – P. 989-998.

## КОМПЛЕКСЫ БЕЛКОВ НЕЙТРОФИЛОВ И МЕДИАТОРОВ ВОСПАЛЕНИЯ С ЦЕРУЛОПЛАЗМИНОМ

Соколов А.В., Костевич В.А., Козлов С.О., Захарова Е.Т.,  
Васильев В.Б.

*ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»,  
Санкт-Петербург, Россия*

Введение. Первым ответом на появление чужеродных микроорганизмов является стимуляция нейтрофилов, что сопровождается изменением их формы, адгезией, направленным движением в очаг повреждения, усиленным потреблением кислорода («кислородным взрывом»), дегрануляцией. Дегрануляция характеризуется слиянием цитоплазматических гранул с фагосомой, поступлением содержащихся в гранулах ферментов в фагосому и частичной секрецией этих ферментов во внеклеточное пространство. Примером патологической активности нейтрофилов является отторжение донорских органов при неэффективном удалении нейтрофилов из кровеносных сосудов во время перфузии. Логично предположить, что активация нейтрофилов непосредственно в кровяном русле должна сдерживаться в норме и при воспалении. Белки острой фазы, концентрация которых повышается при воспалении, могут выступать регуляторами функций иммунных клеток. Увеличение молярной концентрации церулоплазмينا (СР, ферро:O<sub>2</sub>-оксидоредуктаза) во время острой фазы воспаления (с 3 до 10 мкМ) уступает только увеличению концентрации таких мажорных белков плазмы, как фибриноген и гаптоглобин. Вместе с тем, в литературе нет однозначной точки зрения на функции СР