

ISSN 1561-8323 (Print)

ISSN 2524-2431 (Online)

УДК 577.3+538.958

<https://doi.org/10.29235/1561-8323-2019-63-2-189-197>

Поступило в редакцию 10.10.2018

Received 10.10.2018

М. С. Терехова<sup>1</sup>, Д. В. Григорьева<sup>1</sup>, И. В. Горудко<sup>1</sup>, И. В. Семак<sup>1</sup>,  
А. В. Соколов<sup>2</sup>, О. М. Панасенко<sup>3</sup>, академик С. Н. Черенкевич<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь

<sup>2</sup>Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Российская Федерация

<sup>3</sup>Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины  
Федерального медико-биологического агентства, Москва, Российская Федерация

## ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ЛАКТОФЕРРИНА В УСЛОВИЯХ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО/ГАЛОГЕНИРУЮЩЕГО СТРЕССА

**Аннотация.** Лактоферрин (Лф) является перспективным объектом для использования в качестве лекарственного средства благодаря ряду полезных свойств (антибактериальное, противовирусное, про- и противовоспалительное и др.). Он содержится в секрете экзокринных желез, во вторичных гранулах нейтрофилов, в молоке человека и некоторых животных. Концентрация Лф быстро увеличивается в очагах воспаления за счет дегрануляции нейтрофилов. Там же за счет активации нейтрофилов идет наработка высокорекреационных активных форм кислорода и галогенов, что приводит к развитию окислительного/галогенирующего стресса. В данной работе с помощью флуоресцентных методов впервые показано изменение структуры и свойств Лф (выделенного из женского грудного молока и рекомбинантного Лф человека, выделенного из молока трансгенных коз), находящегося в условиях воспаления (окислительный/галогенирующий стресс). Установлено, что HOCl вызывает модификацию аминокислотного состава Лф (изменение числа триптофанов и первичных аминов), а также перестройку глобулы. В то же время при действии H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> вышеперечисленные изменения не наблюдаются. Произшедшие с молекулой изменения при действии HOCl проявляются в уменьшении способности Лф связывать ионы железа.

**Ключевые слова:** лактоферрин, окислительный/галогенирующий стресс, конформация белка, железосвязывающая способность

**Для цитирования.** Физико-химические свойства лактоферрина в условиях окислительного/галогенирующего стресса / М. С. Терехова [и др.] // Докл. Нац. акад. наук Беларуси. – 2019. – Т. 63, № 2. – С. 189–197. <https://doi.org/10.29235/1561-8323-2019-63-2-189-197>

Maria S. Terekhova<sup>1</sup>, Daria V. Grigorieva<sup>1</sup>, Irina V. Gorudko<sup>1</sup>, Igor V. Semak<sup>1</sup>,  
Aleksey V. Sokolov<sup>2</sup>, Oleg M. Panasenکو<sup>3</sup>, Academician Sergey N. Cherenkevich<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Belarusian State University, Minsk, Republic of Belarus

<sup>2</sup>Institute of Experimental Medicine, Saint-Petersburg, Russian Federation

<sup>3</sup>Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine of the Federal Medical Biological Agency,  
Moscow, Russian Federation

## PHYSICOCHEMICAL PROPERTIES OF LACTOFERRIN UNDER OXIDATIVE/HALOGENATIVE STRESS

**Abstract.** Lactoferrin (Lf) was discovered in the thirties of the twentieth century. Since that time a number of useful properties of Lf (antibacterial, antiviral, pro- and anti-inflammatory, etc.) have been found. That's why Lf became a promising candidate for pharmaceuticals use. The concentration of Lf strikingly increases in inflammatory focuses due to neutrophil degranulation. At the same time, activated neutrophils starts to generate reactive oxygen and halogen species (ROS and RHS), which leads to the development of oxidative/halogenative stress. In this work, using the fluorescence analysis we found the change of the Lf structure and properties in the inflammation conditions (under oxidatives/halogenative stress). We use two forms of Lf – human Lf, excreted from human milk, and recombinant Lf, excreted from milk of transgenic goats. It was established that the amino acids of Lf (decreasing the number of tryptophanils and primary amines) and protein restructuring undergo modification under the HOCl action, while H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> has no influence. These changes in the molecule under the HOCl treatment result in decreasing the iron-binding capacity of Lf.

**Keywords:** lactoferrin, oxidative/halogenative stress, protein conformation, iron-binding capacity

**For citation:** Terekhova M. S., Grigorieva D. V., Gorudko I. V., Semak I. V., Sokolov A. V., Panasenکو O. M., Cherenkevich S. N. Physicochemical properties of lactoferrin under oxidative/halogenative stress. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi = Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus*, 2019, vol. 63, no. 2, pp. 189–197 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1561-8323-2019-63-2-189-197>

**Введение.** Лактоферрин (Лф) представляет собой железосвязывающий гликопротеин с молекулярной массой ~80 кДа, относящийся к семейству трансферринов [1]. В молекуле Лф выделяются две глобулярные доли (N и C), соединенные коротким  $\alpha$ -спиральным участком. Доли имеют схожую пространственную структуру и аминокислотную последовательность [1–3]. В каждой доле находится по одному железосвязывающему сайту, состоящему из двух атомов кислорода фенолят-ионов Tyr-92 и Tyr-192, карбоксильного кислорода Asp-60 и атома азота имидазола His-253 для N-доли [1]. Ионы железа  $Fe^{3+}$  связываются прочно ( $K_d \sim 10^{-20} M^{-1}$ ), но обратимо. Лф может существовать как в апо- (свободной от железа), так и в холо-форме [1; 2]. В нативном состоянии (апо-форма) железосвязывающая полость N-доли полностью открыта, в то время как C-доля остается закрытой. Связывание иона железа N-долей сопровождается конформационными изменениями C-доли, после чего она открывается и происходит связывание второго иона железа [1; 2].

В настоящее время интерес к Лф продиктован рядом его полезных свойств, которые стали причиной использования Лф в качестве лекарственного средства. Так, Лф проявляет антибактериальное действие, обладает противовоспалительной, противовирусной активностью, способен ингибировать развитие раковых заболеваний и поддерживать рост пробиотической микрофлоры [2]. Кроме того, Лф является маркером воспалительного процесса, поскольку его концентрация в очагах воспаления и местах инфекции быстро возрастает (и достигает 200 мкг/мл) за счет дегрануляции нейтрофилов, во вторичных гранулах которых и содержится белок [2]. Лф также был найден в секрете экзокринных желез, молоке человека и других млекопитающих.

Известно, что Лф способен связываться со специфическими рецепторами иммунных, эпителиальных и эндотелиальных клеток [2]. Ранее нами было установлено, что Лф из разных источников (из молока человека – чЛф, из молока трансгенных коз – рЛф) в различной степени стимулирует дегрануляцию и увеличение внутриклеточной концентрации ионов кальция в нейтрофилах [3].

Нейтрофилы являются клетками врожденного звена иммунной системы, обеспечивающими защиту организма за счет проявления различных видов функциональной активности, таких как дегрануляция, респираторный взрыв, фагоцитоз, образование внеклеточных ловушек (NETs). Образующийся в результате активации НАДФН-оксидазного комплекса супероксид анион-радикал может спонтанно или в присутствии катализатора дисмутировать в  $H_2O_2$ .  $H_2O_2$  является слабореакционной молекулой, проявляющей себя как мягкий окислитель или восстановитель [4]. Также он является вторичным мессенджером, передача сигнала происходит за счет модификации тиольных остатков в белке и аминокислотных остатков Tyr, Trp, His [5]. Концентрация  $H_2O_2$  в организме варьируется. Концентрация  $H_2O_2$  в крови может достигать 35 мкМ [4], а в очагах воспаления – 100–500 мкМ [6].

Взаимодействие  $H_2O_2$  с миелопероксидазой (МПО) необходимо для образования соединения I ( $MPO^{++}-Fe^{4+}=O$ ), которое катализирует реакции пероксидазного либо галогенирующего цикла. МПО представляет собой гем-содержащий фермент азурофильных гранул нейтрофилов, высвобождающийся в результате дегрануляции. Соединение I может вступать в цикл галогенирования, катализируя двухэлектронное окисление галогенидов  $X^-$  ( $I^-$ ,  $Br^-$ ,  $Cl^-$ ) до соответствующих гипогалоидных кислот, которые принято называть активными формами галогенов (АФГ) [7; 8]. Так как в результате активации нейтрофилы *in vitro* способны наработать вплоть до 100 мкМ HOCl, то локальная концентрация HOCl около активированных нейтрофилов *in vivo* может быть значительно больше [7; 8].

HOCl является высокореакционным соединением и участвует в реакциях окисления и галогенирования [9]. Основными мишенями для HOCl в белках являются серосодержащие аминокислотные остатки (Cys и Met), а также остатки His, Trp, Lys, Arg, дисульфидные связи и свободные  $NH_2$ -группы [10]. В результате действия HOCl в белковой молекуле может происходить образование хлораминов и хлораминов, дополнительных дисульфидных сшивок, деструкция пептидной связи, что ведет к фрагментации или агрегации белка и нарушению его свойств [8].

Обобщив вышесказанное, можно заключить, что в очагах воспаления идет наработка высокореакционных АФГ ( $O_2^{\cdot-}$ ,  $HO^{\cdot}$ ,  $H_2O_2$ ) за счет активации НАДФН-оксидазы нейтрофилов и АФГ

(НОСl, НОВr и др.) за счет функционирования галогенирующего цикла МПО. В случае изменения функционального состояния антиоксидантной системы происходит накопление АФК и АФГ, что индуцирует развитие окислительного/галогенирующего стресса [8], в ходе которого идет модификация структуры и свойств различных биомолекул, в том числе молекул Лф, оказавшихся в очаге воспаления.

Цель работы – выявление механизмов модификации структуры (аминокислотного состава, конформации) и биологических свойств (железосвязывающей способности) Лф (чЛф и рЛф), опосредованных увеличением активности нейтрофилов (в условиях окислительного и галогенирующего стресса).

**Материалы и методы исследования. Реактивы.** В работе использовался фосфатно-солевой буферный раствор (ФСБ), содержащий 10 мМ  $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 137 мМ  $\text{NaCl}$ , 2,7 мМ  $\text{KCl}$  (рН 7,4). Флуоресцентные зонды (1-анилино-8-нафталин сульфонат (АНС), флуорескамин, скополетин) и белки (сывороточный альбумин человека (ЧСА), лизоцим) были получены от фирмы Reanal (Венгрия).

чЛф был получен из грудного молока здоровых доноров (Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург), рЛф был выделен из молока трансгенных коз на кафедре биохимии Белорусского государственного университета (Минск).

Рабочие растворы  $\text{NaOCl}$  (Sigma, США) и  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Белмедпрепараты, Беларусь) готовили непосредственно перед экспериментом. Концентрация раствора  $\text{NaOCl}$  оценивалась спектрофотометрическим методом по поглощению  $\text{OCl}^-$  при 290 нм и рН 12, молярный коэффициент экстинкции  $\epsilon_{290} = 350 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ . Поскольку рК  $\text{HOCl}$  равняется 7,59, то при физиологических рН в растворе присутствуют одновременно примерно в равных концентрациях молекулярная ( $\text{HOCl}$ ) и анионная ( $\text{OCl}^-$ ) формы, следовательно, здесь и далее под  $\text{HOCl}$  понимается смесь  $\text{HOCl}/\text{OCl}^-$ .

Концентрация  $\text{H}_2\text{O}_2$  оценивалась также спектрофотометрическим методом при длине волны 240 нм и рН 7,35, молярный коэффициент экстинкции  $\epsilon_{240} = 43,6 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ .

**Исследование модификации белков при действии  $\text{HOCl}$  и  $\text{H}_2\text{O}_2$ .** Условия окислительного/галогенирующего стресса моделировали путем инкубации Лф с  $\text{H}_2\text{O}_2$  (в 62-кратном мольном избытке) и  $\text{HOCl}$  (в 10–100-кратном мольном избытке). Модификация белка проводилась при комнатной температуре (23 °С) в течение 1,5–2 ч при умеренном перемешивании – один раз в начале и один раз в конце модификации. Флуоресцентные исследования проводились с использованием компьютеризированного спектрофлуориметра SM2203 (Солар, Беларусь) при 23 °С и постоянном перемешивании раствора.

Степень модификации функциональных групп белка после его обработки  $\text{HOCl}$  или  $\text{H}_2\text{O}_2$  оценивалась путем анализа изменений интенсивности собственной флуоресценции белка, обусловленной флуоресценцией остатков триптофана ( $\lambda_{\text{возб}} = 285 \text{ нм}$ ,  $\lambda_{\text{регистр}} = 340 \text{ нм}$ ). Характер конформационных изменений оценивался с помощью зонда АНС ( $\lambda_{\text{возб}} = 350 \text{ нм}$ ,  $\lambda_{\text{регистр}} = 510 \text{ нм}$ ) [11]. Параметры флуоресценции зонда чувствительны к изменению полярности окружения, поэтому АНС используется для исследования агрегации, фрагментации и разворачивания белков. Изменения содержания свободных первичных аминов детектировались с помощью зонда флуорескамин ( $\lambda_{\text{возб}} = 390 \text{ нм}$ ,  $\lambda_{\text{регистр}} = 490 \text{ нм}$ ). Отсутствие непрореагировавших молекул  $\text{HOCl}$  и  $\text{H}_2\text{O}_2$  в растворе Лф оценивалось флуоресцентным методом с использованием скополетина ( $\lambda_{\text{возб}} = 350 \text{ нм}$ ,  $\lambda_{\text{регистр}} = 460 \text{ нм}$ ).

**Исследование железосвязывающей способности Лф.** Лф может находиться в апо- (ненасыщенная железом) или холо-форме. Обе формы обладают максимумом спектра поглощения около 295 нм, однако в холо-форме появляется дополнительный максимум поглощения между 400 и 500 нм. Поэтому железосвязывающая способность Лф изучалась с использованием спектрофотометра РВ2201 (Солар, Беларусь) спектрофотометрическим методом по изменению поглощения раствора при длине волны  $\lambda = 465 \text{ нм}$ , которое соответствует оптической плотности раствора при последовательных добавках соли  $\text{Fe}^{3+}$  ( $\text{NH}_4\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$ ), при 23 °С и постоянном перемешивании раствора.

Статистическая обработка данных проводилась с использованием программного пакета Origin 9.0. Данные представлены как среднее  $\pm$  стандартная ошибка среднего. Статистическая

значимость различий между значениями среднего рассчитывалась по критерию Стьюдента. Различия считались статистически достоверными при уровне значимости  $p < 0,05$ . Для определения параметров корреляции использовался критерий Пирсона. Представленные кинетические кривые являлись типичными для серии из 5–7 независимых экспериментов.

**Результаты и их обсуждение.** Изменение локальной структуры и внутримолекулярной динамики молекулы белка может быть определено при изучении собственной триптофановой флуоресценции. Молекула Лф содержит 10 остатков триптофана [1], кроме того, известно, что Тгр является одной из мишеней для HOCl в белке (константа скорости реакции  $- 1,1 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) [10], поэтому представляется важным исследование изменения триптофановой флуоресценции Лф при действии HOCl.

На рис. 1 представлены типичные спектры триптофановой флуоресценции нативного рЛф и белка, модифицированного HOCl в различных мольных соотношениях. Из рисунка следует, что длина волны максимума спектра флуоресценции рЛф составляла  $\lambda_{\text{max}} = 328 \pm 1 \text{ нм}$  и не изменялась при модификации белка, а интенсивность флуоресценции значительно уменьшалась. Исходя из литературных данных [12], положение максимума флуоресценции говорит о том, что остатки триптофана находятся на границе белковой глобулы. В ходе модификации рЛф HOCl происходит разрушение триптофановых колец, что приводит к уменьшению интенсивности флуоресценции.

Установлено, что снижение интенсивности собственной триптофановой флуоресценции при добавлении 100-кратного мольного избытка HOCl к раствору рЛф составило  $91,4 \pm 2,5 \%$ , а к раствору чЛф –  $88,5 \pm 1,9 \%$ .

Инкубация рЛф с  $\text{H}_2\text{O}_2$  в мольном соотношении 1 : 62 сопровождалась уменьшением интенсивности триптофановой флуоресценции белка на  $4,6 \pm 0,2 \%$ , сдвига длины волны максимума спектра не происходило (данные не приведены). Модификация чЛф  $\text{H}_2\text{O}_2$  также не приводила к изменениям параметров триптофановой флуоресценции белка. Таким образом, чЛф и рЛф проявляют схожую тенденцию при модификации остатков триптофана при действии HOCl и относительную толерантность к  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

Главными мишенями для HOCl в белке помимо триптофана являются Met, Cys, Lys, His и Arg [11]. Флуорескамин представляет собой флуоресцентную метку, способную флуоресцировать при реакции с первичными аминами белков (например, с лизином), находящимися преимущественно на поверхности белковой глобулы.

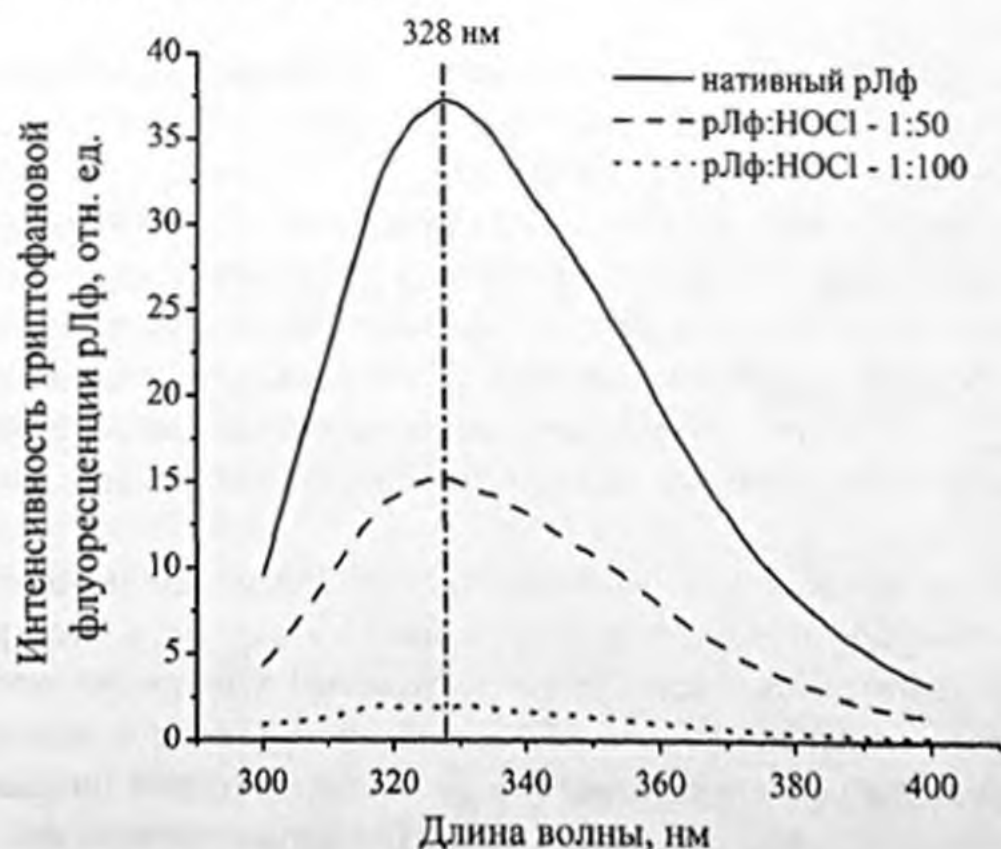


Рис. 1. Спектры собственной триптофановой флуоресценции ( $\lambda_{\text{возб}} = 285 \text{ нм}$ ,  $\lambda_{\text{регистр}} = 340 \text{ нм}$ ) рЛф в нативном состоянии и после модификации HOCl в различном мольном соотношении рЛф : HOCl

Fig. 1. Tryptophan emission spectrum ( $\lambda_{\text{ex}} = 285 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 340 \text{ nm}$ ) of recombinant Lf in native state and after HOCl modification in different mole ratio recombinant Lf : HOCl

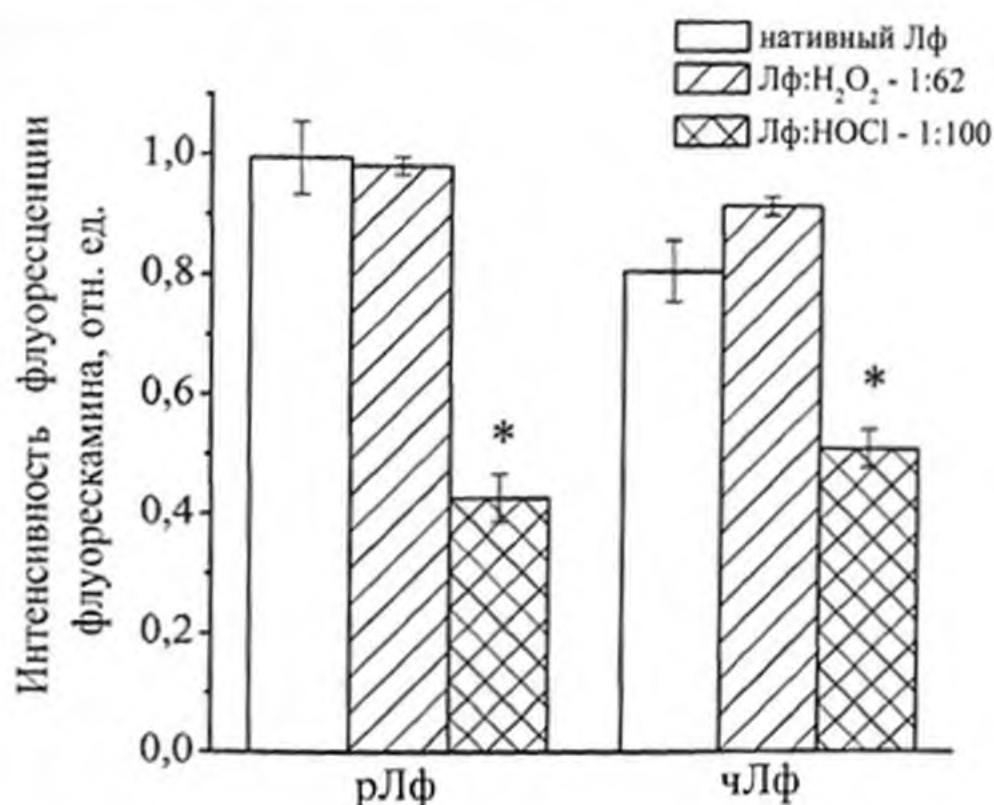


Рис. 2. Изменение интенсивности флуоресценции флуорескамина ( $\lambda_{\text{возб}} = 390$  нм,  $\lambda_{\text{регистр}} = 490$  нм) при связывании с нативными рЛф и чЛф и белками после их модификации HOCl или H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

\* – достоверно отличается от интенсивности флуоресценции флуорескамина в растворе нативного Лф ( $p < 0,05$ )

Fig. 2. Change of fluorescence intensity ( $\lambda_{\text{ex}} = 390$  nm,  $\lambda_{\text{em}} = 490$  nm)

of fluorescamine binding to native and HOCl or H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> modified recombinant Lf and human Lf.

\* – significantly differ from fluorescence intensity of fluorescamine binding to native Lf ( $p < 0,05$ )

Как показано на рис. 2, интенсивность флуоресценции флуорескамина, связанного с рЛф, модифицированным HOCl, значительно снижается по сравнению с интенсивностью флуоресценции зонда, связанного с нативным белком, но не изменяется при связывании с рЛф, модифицированным H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Было установлено, что обработка Лф HOCl в мольном соотношении 1 : 100 приводит к снижению интенсивности флуоресценции флуорескамина при связывании с рЛф на  $50,6 \pm 5,4$  %, с чЛф – на  $35,2 \pm 4,5$  %, т. е. происходит уменьшение числа первичных аминов за счет образования хлораминов. При этом первичные аминокислоты рЛф оказались более доступными для HOCl по сравнению с таковыми у чЛф. Обработка белков H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> не вызывала изменений в интенсивности флуоресценции флуорескамина, связанного с модифицированными белками. Наблюдаемый эффект вызван тем, что основной мишенью действия H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> являются сульфгидрильные группы [6], а не первичные амины, с которыми связывается флуорескамин.

Модификация аминокислотных остатков белков под действием HOCl, как правило, сопровождается их фрагментацией или агрегацией, что приводит к нарушению биологических свойств [9; 13]. Для установления конформационных изменений Лф был использован зонд АНС, локализующийся в белке в области неполярных аминокислотных остатков. Параметры флуоресценции АНС высокочувствительны к микроокружению флуорофора, поэтому этот зонд используется в качестве индикатора доступности гидрофобных областей белка и его конформационных изменений.

Установлено, что интенсивность флуоресценции зонда АНС, связанного с модифицированными HOCl рЛф и чЛф (в мольном соотношении белок : HOCl, равном 1 : 100), уменьшается соответственно на  $66,8 \pm 2,1$  и  $69,8 \pm 1,3$  % по сравнению с нативным белком (рис. 3).

Длина волны максимума спектра флуоресценции связанного с белком зонда АНС ( $\lambda_{\text{max}} = 506 \pm 1$  нм) претерпевает коротковолновый сдвиг на  $\Delta\lambda = 60$  нм по отношению к зонду, не связанному с АНС (данные не представлены), что свидетельствует об уменьшении полярности окружения зонда при связывании с белком. Длина волны максимума спектра флуоресценции зонда АНС, связанного с модифицированным Лф, оставалась такой же как и с нативным белком, что свидетельствует об отсутствии изменения полярности окружения связанного с белком зонда.

Для выяснения характера изменений в молекуле Лф под действием HOCl было проведено сравнительное исследование интенсивности флуоресценции АНС при связывании с нативными

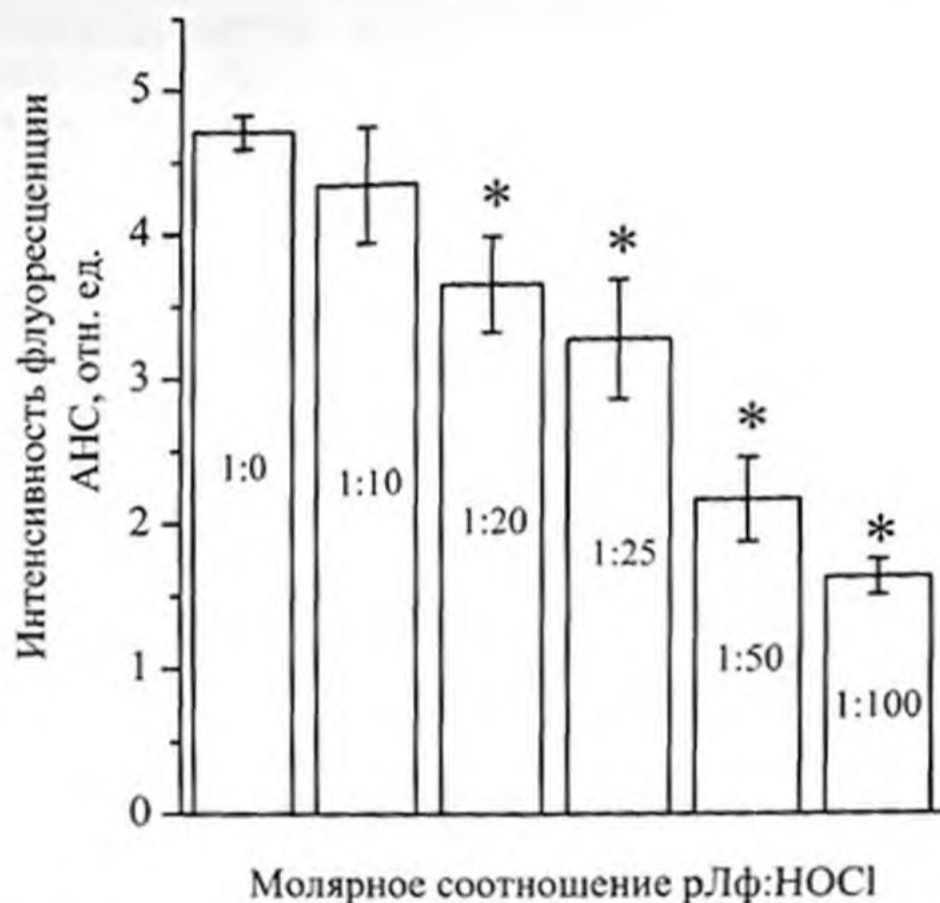


Рис. 3. Изменение интенсивности флуоресценции зонда АНС ( $\lambda_{\text{возб}} = 350$  нм,  $\lambda_{\text{регистр}} = 510$  нм) при связывании с нативным рЛф и модифицированным НОСІ в различном молярном соотношении белок : НОСІ.  
\* – достоверно отличается от интенсивности флуоресценции АНС в растворе нативного Лф ( $p < 0,05$ )

Fig. 3. Change of fluorescence intensity ( $\lambda_{\text{ex}} = 350$  nm,  $\lambda_{\text{em}} = 510$  nm) of ANS binding to native and HOCl modified recombinant Lf in different mole ratio protein : HOCl.  
\* – significantly differ from ANS fluorescence intensity binding to native Lf ( $p < 0,05$ )

и модифицированными НОСІ ЧСА и лизоцимом. Обнаружено, что в растворе ЧСА, модифицированного НОСІ, происходит снижение интенсивности флуоресценции АНС на  $84,8 \pm 0,9$  %. Добавление АНС к раствору лизоцима, модифицированного НОСІ, сопровождалось увеличением интенсивности флуоресценции АНС на  $22,2 \pm 4,6$  %. Из литературных данных [14] известно, что при действии НОСІ на ЧСА наблюдается разворачивание белковой глобулы, в то же время лизоцим при действии НОСІ агрегирует [15]. Принимая во внимание обнаруженное нами, с одной стороны, снижение интенсивности флуоресценции, а с другой – отсутствие изменения положения максимума флуоресценции АНС (т. е. гидрофобности микроокружения зонда) после его связывания с модифицированной НОСІ молекулой Лф, можно предположить, что модификация приводит к уменьшению объема гидрофобных участков в молекуле Лф, где локализуется АНС. Вероятнее всего, это обусловлено образованием дополнительных гидрофильных групп в результате взаимодействия НОСІ с остатками гидрофобных аминокислот (например, Тгр, Туг, Мет и др.), что в конечном итоге может приводить к разворачиванию белковой глобулы аналогично тому, как это показано для ЧСА. Характер конформационных изменений обоих белков (рЛф и чЛф) при модификации их НОСІ оказался сходным.

При действии на Лф  $\text{H}_2\text{O}_2$  в 62-кратном молярном избытке не наблюдалось уменьшения интенсивности флуоресценции АНС в растворе белка. Полученные результаты свидетельствуют о том, что при добавлении  $\text{H}_2\text{O}_2$  к Лф не происходит изменения содержания свободных аминогрупп в белке и конформации белковой глобулы Лф.

Модификация состава и структуры белков может отразиться на проявляемых ими специфических свойствах. Главная биологическая функция Лф – способность связывать ионы железа ( $\text{Fe}^{3+}$ ), которая обуславливает наличие бактериостатической, противовоспалительной и антиоксидантной активности белка. Антимикробная активность Лф может проявляться в бактерицидном либо бактериостатическом действии. Первое действие заключается в непосредственном связывании Лф с поверхностью бактерий, что ведет к дестабилизации мембраны и гибели бактерий. Второе действие обусловлено способностью Лф связывать ионы железа из среды, что приводит к ингибированию роста микроорганизмов. Противовоспалительное и антиоксидантное действие Лф

также определяет железосвязывающая способность, поскольку свободные ионы  $\text{Fe}^{3+}$  будучи восстановленными до  $\text{Fe}^{2+}$  являются причиной образования токсичных гидроксильных радикалов.

Спектрофотометрическим методом было исследовано изменение железосвязывающей способности Лф после модификации  $\text{HOCl}$  или  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

Как видно из данных, приведенных на рис. 4, зависимость доза–эффект связывания  $\text{Fe}^{3+}$  с рЛф имеет вид кривой с насыщением сигмоидного типа (коэффициент корреляции  $R^2 = 0,99$ ), что свидетельствует о кооперативности связывания ионов железа.

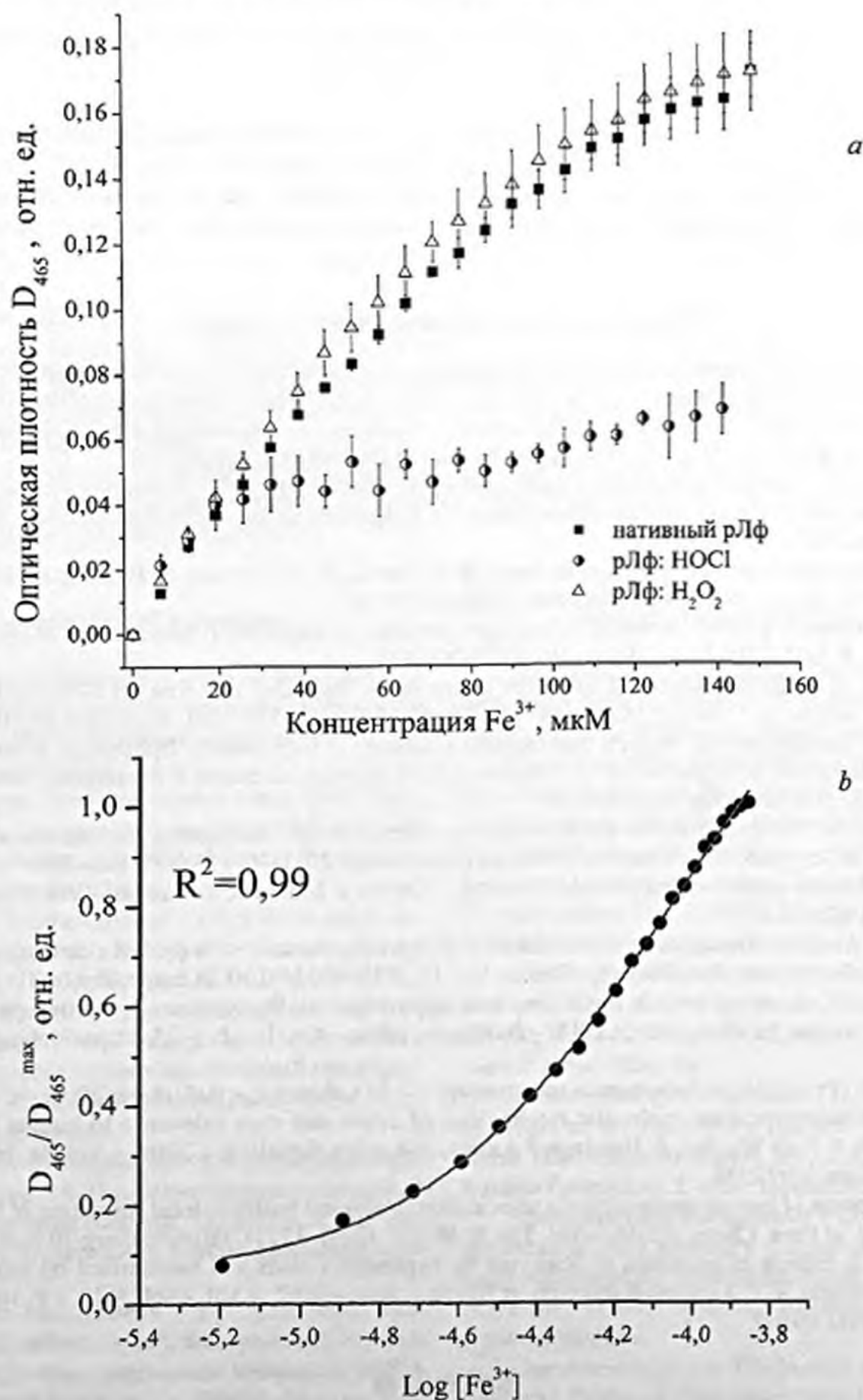


Рис. 4. *a* – кривая доза–эффект, отражающая зависимость оптической плотности раствора рЛф (20 мг/мл) от концентрации связанных ионов железа в случае нативного и модифицированного  $\text{HOCl}$  или  $\text{H}_2\text{O}_2$  белка; *b* – аппроксимация кривой доза–эффект функцией «dose-response fit», нормировка проведена на значение оптической плотности при насыщении ( $D_{465}^{\text{max}}$ )

Fig. 4. *a* – dose–effect curve reflecting dependence optical density of recombinant Lf solution (20 mg/ml) on binding iron ions concentration in case of native and  $\text{HOCl}$  or  $\text{H}_2\text{O}_2$  modified protein; *b* – approximation of dose–effect curve by function «dose-response fit», normalization was done to optical density value at saturation ( $D_{465}^{\text{max}}$ )

В результате действия НОСІ в 100-кратном мольном избытке происходит уменьшение железосвязывающей способности Лф на  $61,9 \pm 3,5$  % в случае рЛф и на  $70,6 \pm 2,7$  % в случае чЛф, а также потеря кооперативности связывания. Модификация избытком  $H_2O_2$  не приводила к изменениям железосвязывающей способности и кооперативности связывания ионов железа Лф. Оба белка (рЛф и чЛф) продемонстрировали схожую способность связывать ионы железа.

**Заключение.** Установлено, что физико-химические свойства Лф изменяются при действии НОСІ. При этом в молекуле Лф модифицируется аминокислотный состав (разрушение остатков Trp, модификация остатков Lys) и наблюдаются конформационные перестройки, а также происходит частичная утрата способности белка связывать ионы железа.  $H_2O_2$  не влияет на эти свойства Лф.

**Благодарности.** Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант 18-515-00004) и Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (грант Б18Р-058).

**Acknowledgements.** This work was financially supported by Russian Foundation for Fundamental Research (grant 18-515-00004) and Belarusian Republican Foundation for Fundamental Research (grant Б18Р-058).

### Список использованных источников

1. Baker, E. N. Lactoferrin: Molecular structure, binding properties and dynamics of lactoferrin / E. N. Baker, H. M. Baker // *Cellular and Molecular Life Sciences*. – 2005. – Vol. 62, N 22. – P. 2531–2539. <https://doi.org/10.1007/s00018-005-5368-9>
2. Lactoferrin: a modulator of immune and inflammatory responses / D. Legrand [et al.] // *Cellular and Molecular Life Sciences*. – 2005. – Vol. 62, N 22. – P. 2549–2559. <https://doi.org/10.1007/s00018-005-5370-2>
3. Recombinant human lactoferrin modulates neutrophil degranulation and  $H_2O_2$  production via increase of intracellular free calcium ion concentration and tyrosine phosphorylation / D. Grigorieva [et al.] // *XIII Intern. Conf. on Lactoferrin Struct., Func. & Appl.* – Rome, 2017. – P. 49.
4. Halliwell, B. Hydrogen peroxide in the human body / B. Halliwell, M. V. Clement, L. H. Long // *FEBS Letters*. – 2000. – Vol. 486, N 1. – P. 10–13. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(00\)02197-9](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(00)02197-9)
5. Doing the unexpected: proteins involved in hydrogen peroxide perception / J. Hancock [et al.] // *J. of Exp. Botany*. – 2006. – Vol. 57, N 8. – P. 1711–1718. <https://doi.org/10.1093/jxb/erj180>
6. Watson, A. J. M. Characterisation of oxidative injury to an intestinal cell line (HT-29) by hydrogen peroxide / A. J. M. Watson, J. N. Askew, G. I. Sandle // *Gut*. – 1994. – Vol. 35, N 11. – P. 1575–1581. <https://doi.org/10.1136/gut.35.11.1575>
7. Gugliucci, A. Chlorogenic acid protects paraoxonase 1 activity in high density lipoprotein from inactivation caused by physiological concentrations of hypochlorite / A. Gugliucci, D. H. Markowicz Bastos // *Fitoterapia*. – 2009. – Vol. 80, N 2. – P. 138–142. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2009.01.001>
8. Панасенко, О. М. Хлорноватистая кислота как предшественник свободных радикалов в живых системах / О. М. Панасенко, И. В. Горудко, А. В. Соколов // *Успехи биол. хим.* – 2013. – № 53. – С. 195–244.
9. Davies, M. J. Protein oxidation and peroxidation / M. J. Davies // *Biochem. J.* – 2016. – Vol. 473, N 7. – P. 805–825. <https://doi.org/10.1042/bj20151227>
10. Pattison, D. I. Absolute rate constants for the reaction of hypochlorous acid with protein side chains and peptide bonds / D. I. Pattison, M. J. Davies // *Chem. Res. Toxicol.* – 2001. – Vol. 14, N 10. – P. 1453–1464. <https://doi.org/10.1021/tx0155451>
11. Bhattacharya, M. Studying protein misfolding and aggregation by fluorescence spectroscopy / M. Bhattacharya, S. Mukhopadhyay // *Reviews in Fluorescence 2015*. – Baltimore, 2016. – Ch. 1. – P. 1–28. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-24609-3\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-319-24609-3_1)
12. Lakowicz, J. R. Principles of fluorescence spectroscopy / J. R. Lakowicz. – Baltimore, 2006. – Ch. 16. – P. 530–578.
13. Veen, B. S. Myeloperoxidase: molecular mechanisms of action and their relevance to human health and disease / B. S. van der Veen, M. P. J. de Winther, P. Heeringa // *Antiox. and redox signaling*. – 2009. – Vol. 11, N 11. – P. 2899–2937. <https://doi.org/10.1089/ars.2009.2538>
14. Structural response of human serum albumin to oxidation: biological buffer to local formation of hypochlorite / A. Del Giudice [et al.] // *The J. of Phys. Chem.* – 2016. – Vol. 120, N 48. – P. 12261–12271. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.6b08601>
15. Petrônio, M. S. Effects of oxidation of lysozyme by hypohalous acids and haloamines on enzymatic activity and aggregation / M. S. Petrônio, V. F. Ximenes // *Biochim. et Biophys. acta*. – 2012. – Vol. 1824, N 10. – P. 1090–1096. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2012.06.013>

### References

1. Baker E. N., Baker H. M. Lactoferrin: Molecular structure, binding properties and dynamics of lactoferrin. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2005, vol. 62, no. 22, pp. 2531–2539. <https://doi.org/10.1007/s00018-005-5368-9>
2. Legrand D., Ellass E., Carpentier M., Mazurier J. Lactoferrin: a modulator of immune and inflammatory responses. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2005, vol. 62, no. 22, pp. 2549–2559. <https://doi.org/10.1007/s00018-005-5370-2>
3. Grigorieva D., Gorudko I., Terekhova M., Cherenkevich S., Semak I., Budevich A., Sokolov A., Vasilyev V. Recombinant human lactoferrin modulates neutrophil degranulation and  $H_2O_2$  production via increase of intracellular free calcium ion concentration and tyrosine phosphorylation. *XIII International Conference on Lactoferrin Structure, Functions & Applications*. Rome, 2017, pp. 49.



4. Halliwell B., Clement M. V., Long L. H. Hydrogen peroxide in the human body. *FEBS Letters*, 2000, vol. 486, no. 1, pp. 10–13. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(00\)02197-9](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(00)02197-9)
5. Hancock J., Desikan R., Harrison J., Bright J., Hooley R., Neill S. Doing the unexpected: proteins involved in hydrogen peroxide perception. *Journal of Experimental Botany*, 2006, vol. 57, no. 8, pp. 1711–1718. <https://doi.org/10.1093/jxb/erj180>
6. Watson A. J. M., Askew J. N., Sandle G. I. Characterisation of oxidative injury to an intestinal cell line (HT-29) by hydrogen peroxide. *Gut*, 1994, vol. 35, no. 11, pp. 1575–1581. <https://doi.org/10.1136/gut.35.11.1575>
7. Gugliucci A., Markowicz Bastos D. H. Chlorogenic acid protects paraoxonase 1 activity in high density lipoprotein from inactivation caused by physiological concentrations of hypochlorite. *Fitoterapia*, 2009, vol. 80, no. 2, pp. 138–142. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2009.01.001>
8. Panasenko O. M., Gorudko I. V., Sokolov A. V. Hypochlorous acid as a precursor of free radicals in living systems. *Biochemistry (Moscow)*, 2013, vol. 78, no. 13, pp. 1466–1489. <https://doi.org/10.1134/s0006297913130075>
9. Davies M. J. Protein oxidation and peroxidation. *Biochemistry Journal*, 2016, vol. 473, no. 7, pp. 805–825. <https://doi.org/10.1042/bj20151227>
10. Pattison D. I., Davies M. J. Absolute rate constants for the reaction of hypochlorous acid with protein side chains and peptide bonds. *Chemical Research in Toxicology*, 2001, vol. 14, no. 10, pp. 1453–1464. <https://doi.org/10.1021/tx0155451>
11. Bhattacharya M., Mukhopadhyay S. Studying protein misfolding and aggregation by fluorescence spectroscopy. *Reviews in Fluorescence 2015*. Baltimore, 2016, ch. 1, pp. 1–28. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-24609-3\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-319-24609-3_1)
12. Lakowicz J. R. *Principles of fluorescence spectroscopy*. Baltimore, 2006, ch. 16, pp. 530–578. [https://doi.org/10.1007/978-1-4757-3061-6\\_16](https://doi.org/10.1007/978-1-4757-3061-6_16)
13. Veen B. S., Winther M. P. J., Heeringa P. Myeloperoxidase: molecular mechanisms of action and their relevance to human health and disease. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2009, vol. 11, no. 11, pp. 2899–2937. <https://doi.org/10.1089/ars.2009.2538>
14. Giudice A. del, Dicko C., Galantini L., Pavel N. V. Structural response of human serum albumin to oxidation: biological buffer to local formation of hypochlorite. *Journal of Physical Chemistry*, 2016, vol. 120, no. 48, pp. 12261–12271. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.6b08601>
15. Petrônio M. S., Ximenes V. F. Effects of oxidation of lysozyme by hypohalous acids and haloamines on enzymatic activity and aggregation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Proteins and Proteomics*, 2012, vol. 1824, no. 10, pp. 1090–1096. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2012.06.013>

### Информация об авторах

*Терехова Мария Сергеевна* – стажер мл. науч. сотрудника. Белорусский государственный университет (ул. Бобруйская, 5, 220030, Минск, Республика Беларусь). E-mail: autumn\_frost@mail.ru.

*Григорьева Дарья Владимировна* – канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник. Белорусский государственный университет (ул. Бобруйская, 5, 220030, Минск, Республика Беларусь). E-mail: dargr@tut.by.

*Горудко Ирина Владимировна* – канд. биол. наук, доцент, вед. науч. сотрудник. Белорусский государственный университет (ул. Бобруйская, 5, 220030, Минск, Республика Беларусь). E-mail: irinagorudko@gmail.com.

*Семак Игорь Викторович* – канд. биол. наук, доцент, зав. кафедрой. Белорусский государственный университет (ул. Курчатова, 10, 220045, Минск, Республика Беларусь). E-mail: semak@bsu.by.

*Соколов Алексей Викторович* – д-р биол. наук, профессор, зав. лабораторией. Институт экспериментальной медицины (ул. Академика Павлова, 12, 197376, Санкт-Петербург, Российская Федерация). E-mail: biochemsokolov@gmail.com.

*Панасенко Олег Михайлович* – д-р биол. наук, профессор, заведующий лабораторией. Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины ФМБА России (Малая Пироговская ул., 1а, 119435, Москва, Российская Федерация). E-mail: o-panas@mail.ru.

*Черенкевич Сергей Николаевич* – академик, д-р биол. наук, профессор. Белорусский государственный университет (ул. Бобруйская, 5, 220030, Минск, Республика Беларусь). E-mail: cherenkevich@bsu.by.

### Information about the authors

*Terekhova Maria Sergeevna* – Trainee of Junior researcher. Belarusian State University (5, Bobruiskaya Str., 220030, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: autumn\_frost@mail.ru.

*Grigorieva Daria Vladimirovna* – Ph. D. (Biology), Senior researcher. Belarusian State University (5, Bobruiskaya Str., 220030, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: dargr@tut.by.

*Gorudko Irina Vladimirovna* – Ph. D. (Biology), Assistant professor, Leading researcher. Belarusian State University (5, Bobruiskaya Str., 220030, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: irinagorudko@gmail.com.

*Semak Igor Victorovich* – Ph. D. (Biology), Assistant professor, Head of the Department. Belarusian State University (10, Kurchatov Str., 220045, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: semak@bsu.by.

*Sokolov Aleksey Victorovich* – D. Sc. (Biology), Professor, Head of the Laboratory. Institute of Experimental Medicine (12, Academic Pavlov Str., 197376, Saint-Petersburg, Russian Federation). E-mail: biochemsokolov@gmail.com.

*Panasenko Oleg Mikhailovich* – D. Sc. (Biology), Professor, Head of the Laboratory. Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine (1a, Malaya Pirogovskaya Str., 119435, Moscow, Russian Federation). E-mail: o-panas@mail.ru.

*Cherenkevich Sergey Nikolaevich* – Academician, D. Sc. (Biology), Professor. Belarusian State University (5, Bobruiskaya Str., 220030, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: cherenkevich@bsu.by.