

УДК 577.21

## ИНДУЦИРОВАННОЕ МИЕЛОПЕРОКСИДАЗОЙ ОКИСЛЕНИЕ АЛЬБУМИНА И ЦЕРУЛОПЛАЗМИНА: РОЛЬ ТИРОЗИНА\*

© 2019 И.И. Власова<sup>1,2\*\*</sup>, А.В. Соколов<sup>1,3,4</sup>, В.А. Костевич<sup>1,3</sup>,  
Е.В. Михальчик<sup>1</sup>, В.Б. Васильев<sup>3,4</sup>

<sup>1</sup> ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА России, 119435 Москва, Россия;  
электронная почта: [iivlasova08@gmail.com](mailto:iivlasova08@gmail.com)

<sup>2</sup> Первый МГМУ им. Сеченова, Институт регенеративной медицины,  
119998 Москва, Россия

<sup>3</sup> ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», 197376 Санкт-Петербург, Россия

<sup>4</sup> Санкт-Петербургский государственный университет,  
199034 Санкт-Петербург, Россия

Поступила в редакцию 22.02.2019

После доработки 14.03.2019

Принята к публикации 14.03.2019

Миелопероксидаза нейтрофилов (МПО) играет важную роль в защите организма от инфекций. Продукты МПО – гипогалоидные кислоты и феноксильные радикалы – являются сильными окислителями, которые могут повреждать не только чужеродные организмы, но и ткани хозяина, в том числе белки плазмы крови. В данной работе было проведено сравнение МПО-индуцированного окисления двух белков плазмы, обладающих антиоксидантными свойствами, – сывороточного альбумина человека (ЧСА) и церулоплазмина (ЦП). Инкубация обоих белков с гипохлоритом (NaOCl) или с каталитически активной МПО (МПО + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), которая в присутствии ионов хлора синтезирует хлорноватистую кислоту (НОСl), приводила к тушению флуоресценции триптофанов белков. Изменения структуры ЧСА и ЦП были различными: высокая антиоксидантная емкость альбумина способствует нейтрализации окислителей, генерируемых МПО, без образования агрегатов белка, тогда как окисление ЦП приводит к образованию крупных агрегатов, формируемых за счет прочных ковалентных связей между ароматическими аминокислотными остатками. Тирозин присутствует в плазме крови в свободной форме или в составе аминокислотных последовательностей белков. Количество аминокислотных остатков тирозина в белке не является определяющим фактором для образования агрегатов. В случае окисления белков НОСl как экзогенной, так и продуцируемой МПО, образование агрегатов только в случае ЦП обусловлено в первую очередь высоким содержанием триптофанов в его полипептидной цепи. МПО-зависимое окисление свободной аминокислоты тирозина приводит к образованию тирозильных радикалов, которые не окисляли остатки ароматических аминокислот в белках благодаря высокой скорости рекомбинации с образованием дитирозинов. Показано, что свободный тирозин может модулировать МПО-индуцированное окисление белков благодаря своей способности влиять на синтез НОСl в активном центре МПО.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** хлорноватистая кислота, феноксильные радикалы, окисление белков, флуоресценция триптофанов, агрегация белков.

**DOI:** 10.1134/S0320972519060095

МПО – основной белок нейтрофилов, обладающий уникальной способностью генерировать НОСl, сильный окислитель, необходимый для защиты организма от инфекций (редокс потенциал (E<sub>o</sub>) пары НОСl/Cl<sup>-</sup> ~1,3 V) [1, 2]. Взаи-

модействие Н<sub>2</sub>O<sub>2</sub> с ферри-формой гема МПО приводит к образованию высокорекреационного состояния активного центра – соединения I [3]. Эта форма МПО способна окислять галогениды (Cl<sup>-</sup>, Br<sup>-</sup>) с образованием гипогалоидных кислот (НОСl, НОВr), после чего активный центр фермента возвращается в нативную форму, замыкая хлорирующий цикл. В то же время, как и любая пероксидаза, МПО может окислять в пероксидазном цикле ряд веществ (пероксидазных субстратов) с образованием свободных радикалов. При этом после окисления первой молекулы субстрата соединение I превращается в сое-

Принятые сокращения: МПО – миелопероксидаза, ЦП – церулоплазмин, ЧСА – сывороточный альбумин человека.

\* Первоначально английский вариант рукописи опубликован на сайте «Biochemistry» (Moscow) <http://protein.bio.msu.ru/biokhimiya>, в рубрике «Papers in Press», ВМ 19-048, 13.05.2019.

\*\* Адресат для корреспонденции.

динение II, а окисление следующей молекулы пероксидазного субстрата переводит фермент в нативное состояние.

Соединение II может быть получено простым добавлением избытка  $H_2O_2$  ( $>100$  мкМ) к нативному ферменту [4]. Эта форма гема неактивна в отношении окисления галогенидов. Фенольные соединения могут влиять на синтез НОСІ в активном центре МПО — ускорять образование НОСІ при высоких концентрациях  $H_2O_2$  благодаря высокому сродству пероксидазного субстрата к соединению II и ингибировать при низких концентрациях пероксида водорода за счет конкуренции с ионами хлора за соединение I [5–7].

В очаге воспаления, для которого характерно закисление среды, МПО катализирует преимущественно образование НОСІ. Из очага воспаления фермент может попадать в плазму, так что концентрация МПО в плазме при ряде заболеваний может достигать до нескольких нМ [8, 9]. При нейтральных значениях рН, характерных для плазмы, хлорирующая активность фермента снижена, в то же время возрастает скорость окисления пероксидазных субстратов [10]. Эндогенными пероксидажными субстратами, присутствующими в плазме в микромолярных концентрациях, являются: антиоксиданты (аскорбат, урат), фенольные соединения (тирозин и ксенобиотики фенольной природы), а также нитрит, триптофан, серотонин,  $\beta$ -кетоны, катехоламины и др. [7].

Высокий окислительный потенциал соединения I МПО мог бы приводить к тотальным повреждениям макромолекул в плазме. Однако уникальное строение активного центра фермента, в котором гем расположен на дне узкого кармана, ограничивает его доступность для молекул, размер которых существенно больше дипептида [11, 12]. Для окисления макромолекул нужны субстраты-посредники, окисленные формы которых являются сильными окислителями [13, 14]. Наряду с НОСІ, макромолекулы могут взаимодействовать с феноксильными радикалами, образующимися при окислении в активном центре МПО некоторых фенольных соединений, например, аминокислоты тирозина ( $E_o(\text{Tyr}\cdot/\text{Tyr}) = 0,93$  V) [15]. Свободный тирозин присутствует в плазме в концентрации 80–200 мкМ.

Модификация белков и липидов гипогалоидными кислотами изучена подробно [16, 17]. Много внимания было уделено окислению апоВ-100, апоА-I и липидов липопротеинов продуктами реакции, катализируемой МПО. Показана значимость МПО-индуцированной модификации липопротеинов в патогенезе атеросклероза [18, 19]. Изучено окисление ряда белков в модельных системах, получены кон-

станты скорости реакции НОСІ с отдельными аминокислотами. Показано, что в белках НОСІ окисляет цистеины, метионины, триптофаны, но хлорирует азот-содержащие аминокислоты, тирозины, гистидины и концевые аминокислоты [16, 20]. Окисление амидов полипептидной цепи может приводить к фрагментации белковой молекулы, тогда как окисление тиоловых групп и тирозинов приводит к образованию агрегатов белков за счет формирования дисульфидных связей и дитирозиновых сшивок между белковыми глобулами. Агрегаты белков, включающие комплемент С3, аполипопротеин А-1, фибриноген и альбумин, были обнаружены в плазме, обработанной высокими концентрациями гипохлорита (0,5–5 мМ) [21]. Концентрация агрегатов белков, обладающих характерной флуоресценцией дитирозинов, выше в плазме больных с тяжелыми формами урологических заболеваний по сравнению со здоровыми донорами [22].

С другой стороны, роль субстратов пероксидазного цикла МПО в модификации макромолекул в этих исследованиях обсуждается крайне редко [15, 23]. Ранее было показано, что окисление нитрита МПО приводит к образованию диоксида азота, способного нитрировать или нитрозировать аминокислотные остатки белков [24, 25].

Для изучения МПО-индуцированного окисления белков плазмы мы выбрали два анионных белка — церулоплазмин (ЦП, рI ~4,4) и сывороточный альбумин человека (ЧСА, рI ~4,7), которые известны как белки, обладающие антиоксидантными свойствами, следовательно, их модификации в условиях окислительного стресса можно ожидать в первую очередь. Кроме того, эти белки представлены в плазме в высоких концентрациях (~600 мкМ альбумина и 0,5–4 мкМ ЦП), и они могут связываться с положительно заряженной МПО (рI ~10,7).

Альбумин — самый распространенный белок плазмы, для которого показана модификация при ряде патологий [26–28]. Единственный свободный цистеин ЧСА (Cys-34) обеспечивает ~50% всех восстановленных тиолов плазмы [29]. Тем не менее лишь несколько работ посвящены изучению связывания ЧСА с МПО и его окислению генерируемыми МПО окислителями. Показано связывание альбумина с «тяжелой» цепью МПО, и измерена константа диссоциации комплекса, которая составила  $(20 \pm 1,5)$  мкМ [30]. Salavej et al. (2006) изучали модификацию аминокислотных остатков альбумина гипогалоидными кислотами и активными формами азота, продуцируемыми МПО [24]. Авторы наблюдали окисление Met147, Met353 и Met572, а также Trp214.

ЦП, как и альбумин, является эффективным перехватчиком свободных радикалов [31]. ЦП связывается вблизи активного центра МПО, образуя очень прочный комплекс со стехиометрией 2 : 1 (Кд ~0,13 мкМ) [32–34]. Связывание ЦП с МПО имеет важное физиологическое значение, так как приводит к ингибированию как хлорирующей, так и пероксидазной активности МПО, но в то же время не влияет на ферроксидазную и оксидазную активность ЦП в отношении большинства субстратов [33, 35–37].

В настоящей работе проведено сравнительное исследование модификации ЦП и ЧСА под действием НОСІ и феноксильных радикалов в условиях, моделирующих локальный окислительный стресс.

## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Все реактивы, использованные для приготовления буферов, а также тирозин, альбумин, каталаза, метионин, пероксид водорода, гипохлорит были получены у фирмы «Sigma Aldrich» (США). Реактивы для проведения электрофореза были производства «VWR Life Science Amresco» (США).

МПО была выделена из лейкоцитарной массы здоровых доноров с использованием аффинной хроматографии на гепарин-сефарозе, гидрофобной хроматографии на фенил-сефарозе и гель-фильтрации. Индекс чистоты МПО ( $A_{430}/A_{280}$ ) составил 0,85, активность при 22 °С в 50 мМ Na-фосфатном буфере, рН 7,4, в отношении гваякола была ~1100 ед/мг (ед. Sigma) [38]. Гомогенный непротеолизированный ЦП был получен из плазмы крови здоровых доноров с помощью ионообменной хроматографии на UNOsphere Q и аффинной хроматографии на неомидин-агарозе [39]. Очищенный ЦП характеризовался  $A_{610}/A_{280} = 0,049$  и ~50% препарата составлял нефрагментированный белок. Вследствие этого при электрофорезе в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия (SDS-ПААГ-электрофорез) с восстановлением 2-меркаптоэтанолом белок представлял собой зоны, соответствующие 132 и 116 кДа и имеющие примерно равную интенсивность.

Окисление белков проводили в 50 мМ Na-фосфатном буфере при рН 7,4 или 6,8 в присутствии МПО и  $H_2O_2$  или NaOCl. В качестве субстратов МПО к раствору добавляли 140 мМ NaCl, фенол или тирозин, или одновременно тирозин и NaCl. После добавления  $H_2O_2$  (в пробах с МПО) или NaOCl регистрировали спектры флуоресценции растворов или инкубировали пробы в течение какого-то времени с последующим приготовлением образцов для электрофореза. Кон-

центрации реагентов указаны в подписях к рисункам.

Флуоресценцию измеряли в области 300–500 нм при длине волны возбуждения 290 нм. Интенсивность белковой флуоресценции измеряли при 340 нм, интенсивность флуоресценции ди-тирозинов определяли при 410 нм. Флуоресценцию измеряли с помощью спектрофлуориметра «Hitachi F-4000» (Япония).

SDS-ПААГ-электрофорез проводили в присутствии 2-меркаптоэтанолола, используя 5%-ный концентрирующий гель, 7,5%-ный разделяющий гель. Гели окрашивали Кумасси R-250 Brilliant Blue. Интенсивность окраски гелей измеряли в определенных участках с помощью программы Paint.NET. Область измерений составляла 51 × 51 пикс в средней части верхней области разделяющего геля для каждой дорожки.

Все экспериментальные данные представлены как среднее для трех повторных измерений ( $\pm$  SD). Различия измеряемых параметров для разных проб анализировали с помощью *t*-критерия Стьюдента и считали достоверными, если  $p < 0,05$ . Приведенные в работе рисунки, представляющие результаты измерения флуоресценции белков или SDS-ПААГ-электрофореза, являются результатами одного типичного эксперимента из серии не менее чем трех аналогичных экспериментов.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

**Характеристика МПО-индуцированного окисления белков с помощью метода флуоресценции.** Известно, что уменьшение флуоресценции белков вызвано в первую очередь окислением остатков триптофанов, входящих в полипептидную цепь. С помощью метода флуоресценции проведено сравнительное исследование окисления триптофанов ЧСА и ЦП под действием НОСІ и феноксильных радикалов, образующихся в катализируемых МПО реакциях.

Флуоресценция альбумина обусловлена в большей степени единственным триптофаном (Trp214). Характерный спектр белковой флуоресценции с максимумом в области 340 нм (Ex 290 нм) приведен на рис. 1, а. Инкубация ЧСА с системой МПО/Cl<sup>-</sup>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> привела к тушению белковой флуоресценции, и через 2 мин амплитуда спектра уменьшилась более чем в два раза при выбранных условия эксперимента.

В состав ЦП входит 18 триптофанов, концентрация этого белка в наших экспериментах была в 16–18 раз ниже, чем концентрация альбумина. На рис. 1, б приведена кинетика тушения белковой флуоресценции ЦП и альбумина НОСІ,

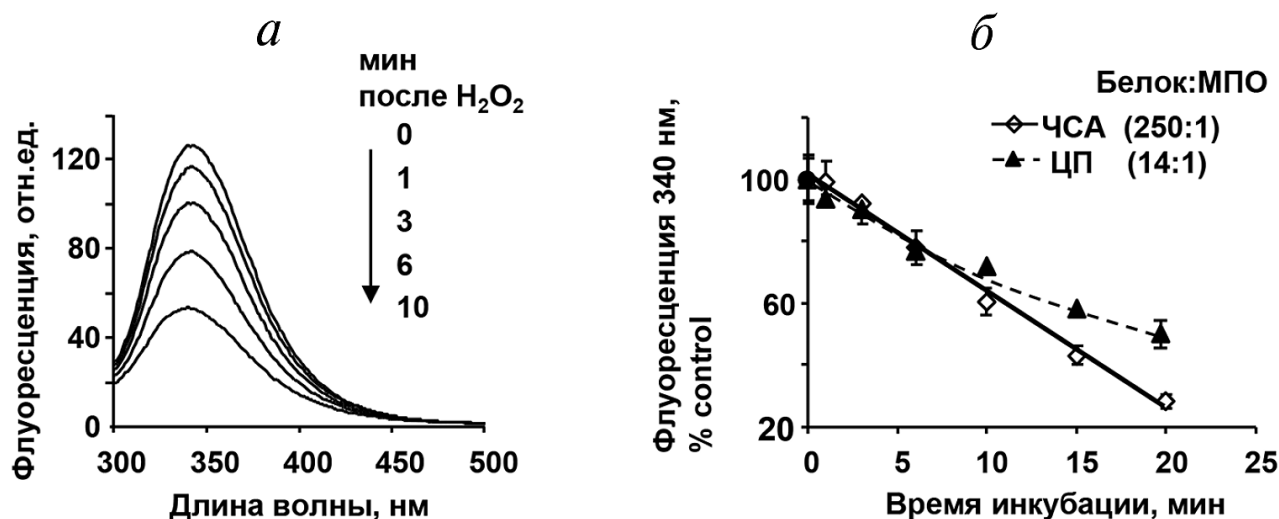


Рис. 1. Уменьшение белковой флуоресценции при МПО-индуцированном окислении белков в присутствии ионов хлора. *а* – 20 нМ МПО и 100 мкМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> были добавлены к раствору 4 мкМ альбумина в 50 мМ Na-фосфатном буфере (pH 7,4), содержащем 140 мМ NaCl. Спектры были записаны в разные промежутки времени после добавления H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; *б* – зависимость от времени МПО-индуцированного окисления ЧСА и ЦП. Экспериментальные условия такие же, как для *а*), но концентрация альбумина была 5 мкМ, концентрация ЦП 280 нМ

продуцируемой МПО. Кинетика окисления триптофанов ЦП нелинейная. В первую очередь окисляются триптофаны, экспонированные на поверхности белка, тогда как аминокислотные остатки внутри белковой глобулы менее доступны для окислителей. Поскольку концентрация ЧСА и ЦП в экспериментах различалась, а концентрация МПО и H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> была одинаковая, количество синтезируемого окислителя на одну молекулу ЧСА было меньше. Тем не менее кинетика изменения флуоресценции триптофанов белков была одинаковой в течение 10 мин инкубации, и это свидетельствует о высокой окисляемости единственного триптофана альбумина.

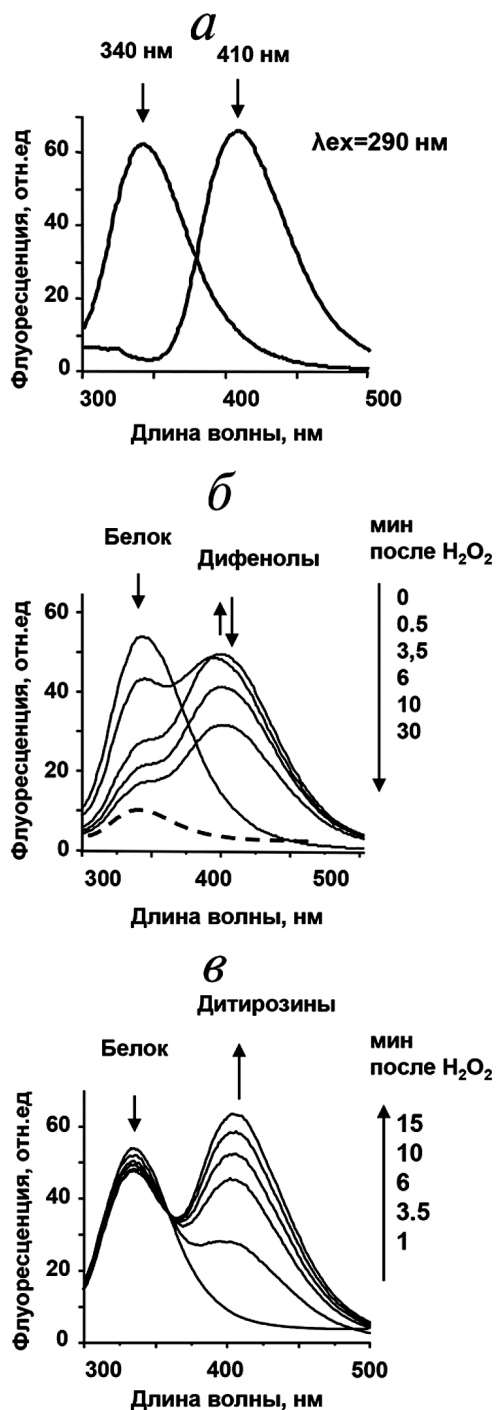
Образующиеся в пероксидазном цикле МПО феноксильные радикалы являются сильными окислителями, они могут модифицировать аминокислотные остатки белков. Кроме того, феноксильные радикалы способны рекомбинировать с образованием дифенолов, обладающих характерной флуоресценцией с максимумом 410 нм. Обычно для возбуждения флуоресценции дифенолов используют длину волны 325 нм [40], но мы регистрировали спектры дифенолов при длине волны возбуждения 290 нм. При этом интенсивность регистрируемого излучения уменьшается на 10–15%, однако такой подход дает возможность одновременно характеризовать изменения флуоресценции белков и следить за образованием дифенолов в растворе (рис. 2, *а*).

Изменения спектров, наблюдаемые при инкубации ЦП или ЧСА с каталитически активной МПО в присутствии фенольных соединений,

были похожи. Феноксильные радикалы, образующиеся при катализируемом МПО окислении фенола, вызвали тушение флуоресценции триптофанов в белках, а появление спектра в области 410 нм свидетельствовало об образовании дифенолов в растворе (рис. 2, *б*). Быстрое формирование дифенолов (увеличение флуоресценции 410 нм в течение 0,5 мин) сопровождалось по-следующим их исчезновением одновременно с уменьшением амплитуды белковой флуоресценции. Следовательно, свободные радикалы фенола могут окислять белки, а также образовывать дифенолы, которые окисляются в активном центре МПО. Напротив, инкубация ЦП или ЧСА с МПО/Тур/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> сопровождалась незначительными изменениями белковой флуоресценции, что может быть вызвано изменениями конформации белка в результате окисления тирозильными радикалами ряда аминокислот, и в первую очередь метионинов и цистеинов (таблица). В то же время в растворе наблюдалось быстрое и интенсивное формирование дитирозинов, что хорошо видно по появлению нарастающей флуоресценции при 410 нм (рис. 2, *в*).

Эти эксперименты показали, что тирозильные радикалы не способны окислять ароматические аминокислоты белков. В частности, это можно объяснить высокой скоростью образования дитирозинов ( $k \sim 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) [41].

**Электрофорез белков, инкубированных с каталитически активной МПО.** Окисление белков может приводить к образованию белковых агрегатов или фрагментированию полипептидных



**Рис. 2.** Окисление белков продуцируемыми МПО фенок- сильными радикалами, зарегистрированное с помощью флуоресценции. *а* – Спектры флуоресценции белков (максимум эмиссии 340 нм) и спектры дитиозинов (максимум эмиссии 410 нм), зарегистрированные при длине возбуждения 290 нм; *б* – 100 мкМ фенола было добавлено в раствор 4 мкМ альбумина в 50 мМ Na-фосфатном буфере, pH 7,4, после чего добавили 25 нМ МПО. Спектры записывали после добавления к раствору 100 мкМ  $H_2O_2$ ; *в* – 100 мкМ тирозина было добавлено к раствору 270 нМ ЦП 50 мМ Na-фосфатном буфере, pH 7,4, после чего добавили 25 нМ МПО. Спектры записывали после добавления к раствору 100 мкМ  $H_2O_2$

цепей. Такие изменения мол. массы белковых глобул могут быть зарегистрированы с помощью электрофореза. Результаты SDS-ПААГ-электрофореза в присутствии 2-меркаптоэтанола для ЧСА (мол. масса ~67 кДа с учетом лигандов) и ЦП (мол. масса ~132 кДа с учетом углеводных цепей и ионов меди) представлены на рис. 3 и 4 соответственно. Мы сравнивали изменения белков, вызванные добавлением  $NaOCl$ , с изменениями, наблюдаемыми в результате их инкубации в системе МПО/ $Cl^-/H_2O_2$ . Результаты SDS-ПААГ-электрофореза показали, что первичная структура альбумина остается интактной после его инкубации с каталитически активной МПО при pH 6,8 или pH 7,0 или с экзогенным гипохлоритом – не наблюдалось формирования агрегатов и низкомолекулярных фрагментов белка (рис. 3, дорожки 1, 2, 4, 7–9).

Индукционное МПО окисление ЦП не наблюдалось при pH 7,4, что может быть обусловлено формированием прочного комплекса белков и ингибированием активности МПО (сравнивать дорожки 5 и 6, рис. 4, *а*) [33]. ЦП может быть окислен каталитически активной МПО при pH 6,8 или при добавлении экзогенного гипохлорита (сравнить дорожки 1 и 2, 9, 10, рис. 4, *а*) [42]. Результаты SDS-ПААГ-электрофореза демонстрируют появление агрегатов ЦП, в том числе и крупных агломератов, не входящих в концентрирующий гель (указаны вертикальными стрелками, рис. 4, *а*, дорожки 2 и 10). Поскольку электрофорез проводили в присутствии 2-меркаптоэтанола, можно сделать вывод, что наблюдаемые агрегаты формировались за счет образования прочных сшивок между белковыми молекулами. Модификация белковой глобулы ЦП происходила одинаково, как в случае инкубации белка с (МПО/ $Cl^-/H_2O_2$ ), так и при обработке ЦП гипохлоритом, но в последнем случае окисление ЦП было выражено сильнее при равных концентрациях окислителей (рис. 4, *б*). При добавлении экзогенного гипохлорита также более ярко выражены молекулярные фрагменты с массой ~100 кДа, что говорит об окислении амидов полипептидной цепи.

Ни для ЦП, ни для ЧСА не было зарегистрировано появление фрагментов полипептидной цепи в результате их инкубации с системой МПО/Тур/ $H_2O_2$  в отсутствие ионов хлора (данные не представлены).

**Влияние тирозина на МПО-индуцированное окисление ЧСА.** Исследовано влияние тирозина на флуоресценцию альбумина, инкубированного с системой МПО/ $Cl^-/H_2O_2$ , для разных экспериментальных условий: 1) однократная добавка высоких концентрации пероксида водо-

Характеристики аминокислотного состава ЧСА и ЦП и константы скорости реакции второго порядка  $\text{HOCl}$  с некоторыми аминокислотами [50]

	Мол. масса, кДа	AA	Cys	Met	Trp	Tyr	Lys	His
ЧСА	66,5	585	35 (1 свободный)	6	1	18	59	16
ЦП	132	1046	14 (6 свободных)	24	18	64	65	41
$k, \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$			$3,0 \times 10^7$	$3,8 \times 10^7$	$1,1 \times 10^4$	44	$5,0 \times 10^3$	$1,0 \times 10^5$

Примечание. AA – общее число аминокислотных остатков.

рода ( $100 \text{ мкМ H}_2\text{O}_2$ ), как модель «окислительного взрыва» при активации фагоцитов в очаге воспаления (рис. 5, а, в); 2) многократные добавки малых концентраций  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $10 \text{ мкМ}$  добавляли 10 раз с интервалом 3 мин), как модель окислительного стресса в плазме крови (рис. 5, б, г).

Скорость изменений флуоресценции альбумина при однократной добавке  $100 \text{ мкМ H}_2\text{O}_2$  медленная, что может быть обусловлено медленной наработкой  $\text{HOCl}$  при этих условиях, так как активный центр МПО переходит в соединение II, которое неактивно в отношении синтеза  $\text{HOCl}$  (рис. 5, а, кривая 1). В случае, если раствор содержал тирозин, добавление пероксида водорода приводило к быстрому падению флуоресценции ЧСА (кривая 2), что можно объяснить ускорением синтеза  $\text{HOCl}$  [7]. Как было показано ранее, в этих условиях тирозин взаимодействует с соединением II и увеличивает скорость оборота фермента. Соответственно, одновременно синтезируется больше  $\text{HOCl}$ , что привело к быстрому окислению аминокислот альбумина, включая триптофан (первые две минуты инкубации), пока не заканчивается  $\text{H}_2\text{O}_2$  в растворе (линейный участок кривой 2). В случае более длительной инкубации присутствие тирозина в растворе все же снизило модификацию альбумина – после 15 мин инкубации флуоресценция ЧСА была выше в растворе, содержащем тирозин (рис. 5, а). Похожий эффект ускорения МПО-индуцированного тушения флуоресценции в присутствии тирозина и  $100 \text{ мкМ H}_2\text{O}_2$  был обнаружен для ЦП, IgG и фибриногена (данные не представлены). Однако в случае этих белков эффект был менее выражен, так как не все остатки триптофанов в белках доступны для окисления  $\text{HOCl}$ , продуцируемой МПО (максимальная разница в амплитуде спектров без тирозина и с добавлением тирозина не превышала 17%).

В случае титрования раствора, содержащего ЧСА и МПО, малыми концентрациями  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $(10 \text{ мкМ}) \times 10$  раз) кинетика тушения флуоресценции альбумина мало отличается от кинетики

при однократной добавке  $100 \text{ мкМ H}_2\text{O}_2$  (кривые 1 на рис. 5, а, б). При выбранных нами условиях эксперимента скорость синтеза  $\text{HOCl}$  была одинакова в двух системах: при высоких концентрациях  $\text{H}_2\text{O}_2$  большинство молекул фермента находится в состоянии соединения II, которое неактивно в отношении синтеза  $\text{HOCl}$ , поэтому скорость синтеза  $\text{HOCl}$  в растворе не велика, тогда как при дискретных добавках малых доз  $\text{H}_2\text{O}_2$  скорость окисления альбумина определяется частотой добавок. В последнем случае добавление тирозина в раствор инкубации ингибирует окисление белка (рис. 5, б).

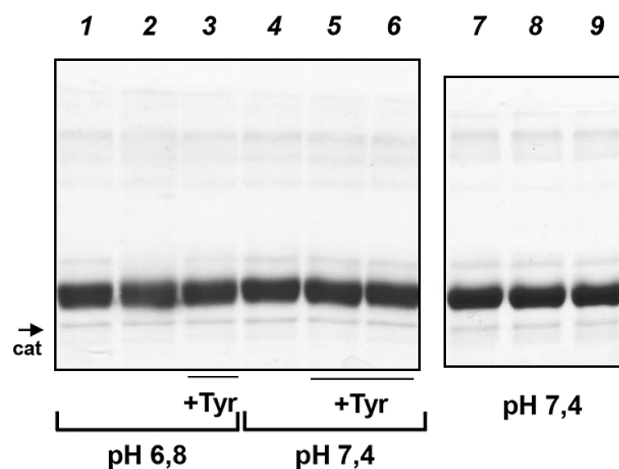
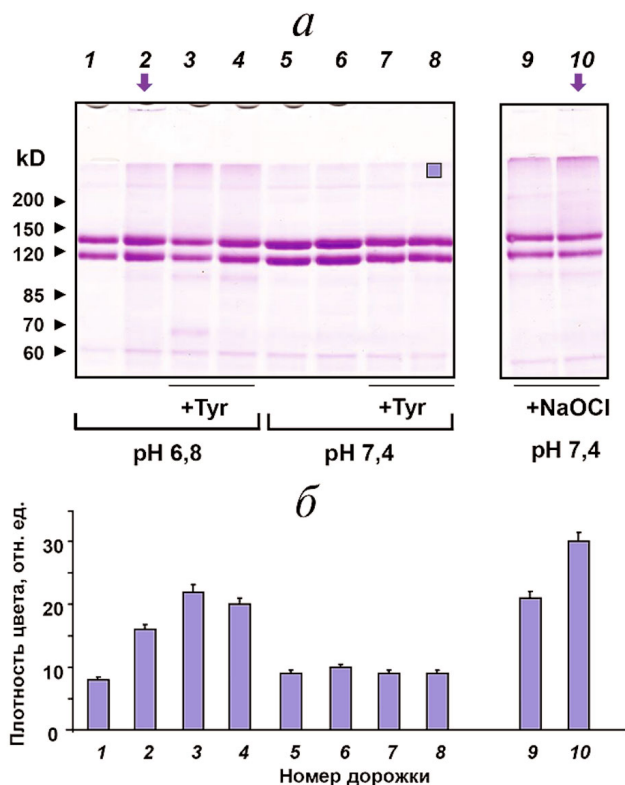


Рис. 3. SDS-ПААГ-электрофорез альбумина, окисленного синтезированными МПО окислителями или  $\text{NaOCl}$ . МПО ( $25 \text{ нМ}$ ) была добавлена к раствору  $4 \text{ мкМ}$  альбумина в  $50 \text{ мМ}$   $\text{Na}$ -фосфатном буфере, содержащем  $140 \text{ мМ}$   $\text{NaCl}$ ,  $\text{pH}$  7,4 или 6,8. Тирозин был добавлен в некоторые пробы, как указано.  $\text{H}_2\text{O}_2$  или  $\text{NaOCl}$  были добавлены дважды с интервалом 12 мин. Через 12 мин после второй добавки реакцию останавливали добавлением каталазы ( $25 \text{ мкг/мл}$ ), после чего добавляли  $2,5 \text{ мМ}$  метионин. Образцы при  $\text{pH}$  6,8: (1) + МПО, (2) + МПО +  $(100 \text{ мкМ}) \times 2 \text{ H}_2\text{O}_2$ , (3) + МПО +  $100 \text{ мкМ}$  тирозин +  $(100 \text{ мкМ}) \times 2 \text{ H}_2\text{O}_2$ ; образцы при  $\text{pH}$  7,4: (4) + МПО +  $(100 \text{ мкМ}) \times 2 \text{ H}_2\text{O}_2$ , (5) + МПО +  $100 \text{ мкМ}$  тирозин +  $(100 \text{ мкМ}) \times 2 \text{ H}_2\text{O}_2$ , (6) + МПО +  $200 \text{ мкМ}$  тирозин +  $(100 \text{ мкМ}) \times 2 \text{ H}_2\text{O}_2$ , (7) Контроль (без МПО), (8) +  $100 \text{ мкМ}$   $\text{NaOCl}$ , (9) +  $(100 \text{ мкМ}) \times 2 \text{ NaOCl}$ . Указана полоса, соответствующая субъединице каталазы (cat)

В то же время никаких изменений мол. массы ЧСА после инкубации с системой МПО/СГ<sup>-</sup>/Тур/ $H_2O_2$  зарегистрировать не удалось (рис. 3, а, дорожки 3, 5 и б).

**Влияние тирозина на МПО-индуцированное окисление ЦП.** Окисление ЦП каталитически активной МПО сравнивали в отсутствие тирозина и при его концентрациях 100 и 200 мкМ



**Рис. 4.** SDS-ПААГ-электрофорез церулоплазмينا, окисленного синтезированными МПО окислителями или NaOCl. МПО (25 нМ) была добавлена к раствору 2 мкМ ЦП в 50 мМ Na-фосфатном буфере, содержащем 140 мМ NaCl, pH 7,4 или 6,8. Тирозин был добавлен в некоторые пробы, как указано.  $H_2O_2$  или NaOCl были добавлены дважды с интервалом 12 мин. Через 12 мин после второй добавки реакцию останавливали добавлением каталазы (25 мкг/мл), после чего добавляли 2,5 мМ метионин. а — ПААГ-электрофорез нативного и окисленного ЦП. Образцы при pH 6,8: (1) + МПО, (2) + МПО + (100 мкМ)  $\times$  2  $H_2O_2$ , (3) + МПО + 100 мкМ тирозин + (100 мкМ)  $\times$  2  $H_2O_2$ , (4) + МПО + 200 мкМ тирозин + (100 мкМ)  $\times$  2  $H_2O_2$ ; образцы при pH 7,4: (5) + МПО, (6) + МПО + (100 мкМ)  $\times$  2  $H_2O_2$ , (7) + МПО + 100 мкМ тирозин + (100 мкМ)  $\times$  2  $H_2O_2$ , (8) + МПО + 200 мкМ тирозин + (100 мкМ)  $\times$  2  $H_2O_2$ , (9) + 100 мкМ NaOCl, (10) + (100 мкМ)  $\times$  2 NaOCl. Стрелки указывают на агрегаты белков на верхнем уровне концентрирующего геля. Линия белка в области 60 кДа соответствует субъединице каталазы (cat). Синий квадрат (дорожка 8) обозначает область, в которой измеряли плотность цвета; б — плотность цвета в верхней области разделяющего геля для каждой дорожки.

С цветным вариантом рис. 4 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте <http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/>

(рис. 4, а). Поскольку тирозин является небольшой молекулой, связывание ЦП с МПО не препятствует окислению этого пероксидазного субстрата в активном центре МПО [43]. При выбранных нами условиях эксперимента 100 мкМ тирозина усиливали исчезновение полосы нативного ЦП и формирование высокомолекулярных агрегатов белка при pH 6,8, в то же время добавление тирозина полностью устраняло формирование крупных агрегатов белка, не входящих в разделяющий гель (рис. 4, а, дорожка 3). Добавление тирозина к инкубационной смеси усилило фрагментацию ЦП: усилилась интенсивность полосы низкомолекулярного ЦП в области 100 кДа (аналогично тому, как это наблюдалось для случая NaOCl, дорожки 9, 10), и появилась дополнительная полоса низкомолекулярных фрагментов белка в области 65 кДа. В присутствии 200 мкМ тирозина (дорожка 4) ЦП окислялся интенсивнее по сравнению с реакционной смесью без тирозина (дорожка 2), и количество высокомолекулярных агрегатов было сравнимо с тем, что наблюдали при 100 мкМ тирозина (рис. 4, б). Дальнейшее увеличение концентрации тирозина не имеет смысла, так как в этом случае его концентрация будет превышать физиологически значимые величины.

Тирозин не повлиял значительно на стабильность ЦП при МПО-индуцированном окислении при pH 7,4 (рис. 4, дорожки 7, 8).

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

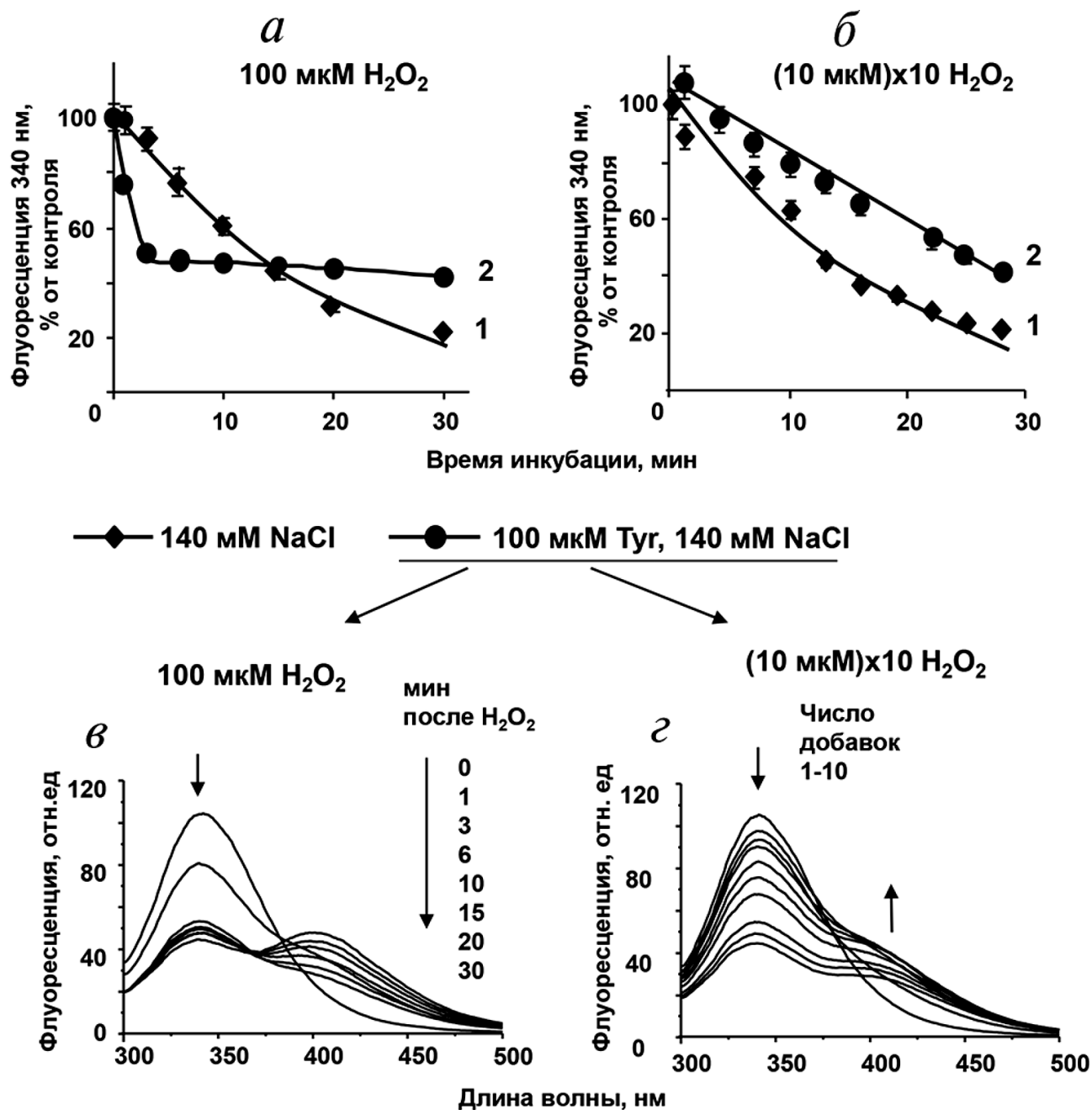
Окисление белков сопровождается изменениями их структуры и физико-химических свойств, в том числе и спектральных характеристик. Окисление цистеинов и тирозинов, входящих в состав полипептидных цепей, приводит к образованию дисульфидных связей и дитиризиновых мостиков между молекулами, что вызывает агрегацию белков. Формирование агрегатов окисленных белков лежит в основе инициации и развития некоторых патологий. Участие МПО в формировании белковых агрегатов показано для заболеваний сердечно-сосудистой системы [2, 18], болезни Альцгеймера [44], заболеваний почек [45] и других социально-значимых патологий.

В настоящей работе было проведено сравнительное исследование индуцированного МПО окисления двух белков, обладающих антиоксидантными свойствами: ЦП и ЧСА. Как было обнаружено ранее, эти белки могут образовывать комплексы с МПО *in vivo* [30, 33, 36]. Исследования показали, что оба белка подвергаются окис-

лительной модификации при инкубации с гипохлоритом или с каталитически активной МПО в присутствии ионов  $\text{Cl}^-$ , но последствия модификации различны для двух белков.

Связывание ЦП вблизи активного центра МПО приводит к уменьшению хлорирующей активности фермента [33, 35]. Нам не удалось

зарегистрировать МПО-индуцированную модификации ЦП в нейтральной среде. При pH 7,4 белок может быть окислен в результате его инкубации с экзогенным  $\text{NaOCl}$ , в то время как в системе (МПО/ $\text{Cl}^-/\text{H}_2\text{O}_2$ ) белок может быть модифицирован только при понижении pH ( $\text{pH} \leq 7,0$ ) [42]. Это может быть вызвано деста-



**Рис. 5.** Влияние тирозина на вызванную МПО окислительную модификацию альбумина. Состав реакционной среды: 5 мкМ альбумина и 20 нМ МПО в 50 мМ Na-фосфатном буфере (pH 7,4), содержащем 140 мМ NaCl (черный ромб) или (140 мМ NaCl + 100 мкМ тирозина) (черный кружок). Спектры флуоресценции ЧСА регистрировали перед добавлением  $\text{H}_2\text{O}_2$  и далее каждые 5 мин после однократной добавки 100 мкМ  $\text{H}_2\text{O}_2$  (а, в) или после каждой добавки 10 мкМ  $\text{H}_2\text{O}_2$ , которые делали каждые 3 мин (б, г); (а, б) – амплитуда флуоресценции, измеренная при 340 нм; (в, г) – спектры флуоресценции раствора альбумина



билизацией комплекса ЦП-МПО в связи с изменением заряда белков при понижении pH.

Как и в случае большинства белков, окисление ЦП приводит к образованию высокомолекулярных продуктов — агрегатов белка и/или при определенных условиях к фрагментации белковой глобулы. В обоих случаях такие изменения сопровождаются уменьшением количества нативного белка. Наши эксперименты показали, что образование агрегатов ЦП в случае инкубации белка с каталитически активной МПО (100 + 100 мкМ  $H_2O_2$ ) сопоставимо с изменениями белка после его обработки экзогенным гипохлоритом (100 мкМ NaOCl) (дорожки 3 и 9, рис. 4, а). В растворе образуются крупные агрегаты с  $M \sim 200\text{--}300$  кДа, а также агломераты белка, не входящие в концентрирующий гель. Образование агрегатов ЦП происходит благодаря большому количеству SH-групп и тирозиновых остатков в молекуле белка (таблица). Дитиризиновые сшивки, в отличие от дисульфидных связей, не восстанавливаются и могут служить основой образования больших сшитых ковалентно агрегатов белков *in vivo*. Aouffen et al. показали образование агрегатов окисленного ЦП после обработки белка высокими концентрациями  $H_2O_2$  [46].

Ранее нами было показано, что зона контакта ЦП и МПО включает петли между 4 и 5 доменами (699–710 а.о.), 5 и 6 доменами (883–892 а.о.) ЦП [47]. Можно предположить, что появление низкомолекулярных фрагментов ЦП после его инкубации с функционирующей МПО (рис. 4, а, дорожки 2, 3, 4) связано с разрывом пептидных связей именно в этих участках ЦП, экспонированных на поверхности глобулы белка.

Окисление ЦП приводит к образованию агрегатов белка, с которыми может быть связана и МПО. Аналогичное взаимодействие белков было показано ранее в случае формирования агрегатов гемоглобина и гаптоглобина, причем эти агрегаты лучше поглощались макрофагами, чем комплексы (гемоглобин + гаптоглобин) [48]. Можно предположить, что формирование агрегатов ЦП, содержащих МПО, может способствовать удалению этой потенциально опасной пероксидазы из плазмы крови.

Напротив, инкубация альбумина с NaOCl или с каталитически активной МПО не приводила к формированию агрегатов ЧСА (рис. 3). Альбумин — основной антиоксидантный белок плазмы, который может нейтрализовать окислители — продукты реакции МПО. Ранее была показана высокая окислительная емкость альбумина при сохранении им глобулярной формы и функций некоторых активных центров [49]. У ЧСА только одна свободная SH-группа (Cys 34), поэтому

вероятность образования межмолекулярных дисульфидных связей невелика с учетом существования стерических препятствий для таких взаимодействий [29]. С другой стороны, белок имеет 18 остатков тирозина, но тем не менее не образовывал агрегаты при окислении. Дело в том, что тирозины при реакции с HOCl хлорируются с образованием хлортиризинов, которые являются стабильными маркерами активной МПО. Вклад хлорирования тирозина в общую картину окисления белков в наших экспериментах не был существенным, так как константа скорости реакции HOCl с тирозином на несколько порядков меньше, чем для большинства других аминокислот ( $k \sim 44 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) [50] (таблица).

В то же время окисление триптофана хлорноватистой кислотой характеризуется относительно высокой скоростью реакции ( $k \sim 1,1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) [50]. Среди продуктов реакции зарегистрированы как производные триптофана, полученные в результате ионного окисления аминокислоты, так и радикалы триптофана, образующиеся в результате свободно-радикального окисления его индольного кольца [51, 52]. В результате окисления триптофана могут образовываться продукты, обладающие антиоксидантными свойствами [53]. Радикалы триптофана долгоживущие (время жизни до нескольких минут), и могут рекомбинировать с образованием ковалентных сшивок между белками ( $k \sim 6 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) [54]. Кроме того, редокс-потенциал триптофанильного радикала относительно высок и зависит от pH и от окружения аминокислотного остатка в составе белков ( $E_0$  может достигать 1,0 V) [15]. Миграция «свободнорадикального состояния» с триптофана на другие окисляемые аминокислотные остатки полипептидной цепи внутри белковой глобулы может приводить к окислению тирозинов и, соответственно, к образованию дитиризиновых сшивок между белками.

Единственный триптофан альбумина быстро окисляется генерируемыми МПО оксидантами (рис. 1, рис. 2, б), в то же время полипептидная цепь белка стабильна при окислении — ЧСА сохранял первичную структуру при его инкубации с каталитически активной МПО (рис. 3). Относительно высокое содержание лизинов и гистидинов в ЧСА также может способствовать уменьшению HOCl-индуцированного повреждения белка (таблица).

Результаты исследований формирования агрегатов ЧСА при окислении противоречивы. Формирование дисульфидных связей между молекулами альбумина было обнаружено в плазме крови после ее обработки гидропероксидами и в плазме пациентов после гемодиализа [55]. Образование дитиризиновых связей между глобула-

ми белка показано для делипидированного альбумина при его окислении в буфере в присутствии 10-кратного (и выше) избытка  $\text{HOCl}$  [56]. Colombo et al. не обнаружили существенного формирования дитиозинов при обработке ЧСА гипохлоритом (в отличие от фибриногена) [57].

Ранее мы показали, что фенольные вещества являются предпочтительными пероксидазными субстратами МПО при нейтральных значениях pH как в модельной системе, так и в суспензии лизированных нейтрофилов [10]. Активный центр МПО недоступен для крупных молекул, но при окислении небольших фенольных соединений могут образоваться высокорекреационные свободные радикалы, которые служат посредниками для окисления макромолекул. Тирозин — важная эндогенная молекула, специфический пероксидазный субстрат МПО. Его окисление приводит к образованию тирозильных радикалов ( $E_0 = 0,93\text{V}$ ) [15], которые могут окислять белки и липиды, а также образовывать дитиозины, обладающие характерной флуоресценцией с максимумом 410 нм. Благодаря высокой скорости образования дитиозинов ( $k \sim 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) окисление свободного тирозина миелопероксидазой не привело к окислению аминокислотных остатков триптофанов в белках (рис. 2, в), тогда как свободные радикалы фенола реагировали с триптофанами (рис. 1, в). Это может быть связано с более высоким редокс-потенциалом последних и с их меньшей способностью к рекомбинации по сравнению с тирозильными радикалами (рис. 2). Возможность окисления белков феноксильными радикалами указывает на опасность попадания в организм ксенобиотиков фенольной природы, которые могут быть окислены МПО в условиях воспаления.

Наше предыдущее исследование влияния тирозина на катализируемое МПО-окисление хлорида при нейтральных значениях pH выявило следующие закономерности [7]: 1) тирозин кон-

курирует с ионами хлора за соединение I фермента даже при том, что его концентрация в плазме на три порядка ниже, чем концентрация  $\text{NaCl}$ ; 2) при высоких концентрациях  $\text{H}_2\text{O}_2$ , которые могут переводить МПО в соединение II, тирозин, взаимодействуя с этой стабильной формой фермента, может увеличивать оборот фермента и таким образом ускорять синтез  $\text{HOCl}$ .

В данной работе показано, что тирозин может влиять на индуцированное МПО окисление белков за счет модуляции хлорирующей активности фермента: ускорять при высоких концентрациях  $\text{H}_2\text{O}_2$ , благодаря ускорению синтеза  $\text{HOCl}$  ферментом, но ингибировать при низких концентрациях пероксида водорода или высоких концентрациях тирозина за счет прямой конкуренции пероксидазного субстрата с хлоридом за соединение I (рис. 5). Кроме того, свободный тирозин ингибирует формирование больших агрегатов ЦП (рис. 4). В отличие от действия антиоксидантов, такие эффекты тирозина высокоспецифичны и касаются только регулирования активности МПО. Можно предположить, что тирозин или другие фенольные соединения могут быть использованы для регуляции индуцированного МПО окисления белков, и, в первую очередь, для уменьшения формирования агрегатов сшитых ковалентно белков в плазме в условиях воспаления.

**Финансирование.** Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований в рамках научного проекта 16-14-00873 и программы 5-100.

**Соблюдение этических норм.** Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с использованием людей или животных в качестве объектов.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Arnhold, J. (2004) Free radicals — friends or foes? Properties, functions, and secretion of human myeloperoxidase, *Biochemistry (Moscow)*, **69**, 4–9, doi: 10.1023/B:BIRY.0000016344.59411.ee.
2. Davies, M.J., Hawkins, C.L., Pattison, D.I., and Rees, M.D. (2008) Mammalian heme peroxidases: from molecular mechanisms to health implications, *Antioxid. Redox Signal.*, **10**, 1199–1234, doi: 10.1089/ars.2007.1927.
3. Arnhold, J., Furtmuller, P.G., and Obinger, C. (2003) Redox properties of myeloperoxidase, *Redox Rep.*, **8**, 179–186, doi: 10.1179/135100003225002664.
4. Furtmuller, P.G., Burner, U., Jantschko, W., Regelsberger, G., and Obinger, C. (2000) Two-electron reduction and one-electron oxidation of organic hydroperoxides by human myeloperoxidase, *FEBS Lett.*, **484**, 139–143, doi: 10.1016/S0014-5793(00)02143-8.
5. Kirchner, T., Flemmig, J., Furtmuller, P.G., Obinger, C., and Arnhold, J. (2010) (–)-Epicatechin enhances the chlorinating activity of human myeloperoxidase, *Arch. Biochem. Biophys.*, **495**, 21–27, doi: 10.1016/j.abb.2009.12.013.
6. Flemmig, J., Remmler, J., Rohring, F., and Arnhold, J. (2014) (–)-Epicatechin regenerates the chlorinating activity of myeloperoxidase *in vitro* and in neutrophil granulocytes, *J. Inorg. Biochem.*, **130**, 84–91, doi: 10.1016/j.jinorgbio.2013.10.002.
7. Vlasova, I.I., Sokolov, A.V., and Arnhold, J. (2012) The free amino acid tyrosine enhances the chlorinating activity

- of human myeloperoxidase, *J. Inorg. Biochem.*, **106**, 76–83, doi: 10.1016/j.jinorgbio.2011.09.018.
8. Tzikas, S., Schlak, D., Sopova, K., Gatsiou, A., Stakos, D., Stamatelopoulos, K., Stellos, K., and Laske, C. (2014) Increased myeloperoxidase plasma levels in patients with Alzheimer's disease, *J. Alzheimer's Dis.*, **39**, 557–564, doi: 10.3233/JAD-131469.
  9. Baldus, S., Heeschen, C., Meinertz, T., Zeiher, A.M., Eiserich, J.P., Munzel, T., Simoons, M.L., and Hamm, C.W. (2003) Myeloperoxidase serum levels predict risk in patients with acute coronary syndromes, *Circulation*, **108**, 1440–1445, doi: 10.1161/01.CIR.0000090690.67322.51.
  10. Vlasova, I.I., Arnhold, J., Osipov, A.N., and Panasenko, O.M. (2006) pH-Dependent regulation of myeloperoxidase activity, *Biochemistry (Moscow)*, **71**, 667–677, doi: 10.1134/S0006297906060113.
  11. Furtmuller, P.G., Zederbauer, M., Jantschko, W., Helm, J., Bogner, M., Jakopitsch, C., and Obinger, C. (2006) Active site structure and catalytic mechanisms of human peroxidases, *Arch. Biochem. Biophys.*, **445**, 199–213, doi: 10.1016/j.abb.2005.09.017.
  12. Ramos, D.R., Garcia, M.V., Canle L.M., Santaballa, J.A., Furtmuller, P.G., and Obinger, C. (2008) Myeloperoxidase-catalyzed chlorination: the quest for the active species, *J. Inorg. Biochem.*, **102**, 1300–1311, doi: 10.1016/j.jinorgbio.2008.01.003.
  13. Zhang, R., Brennan, M.L., Shen, Z., MacPherson, J.C., Schmitt, D., Molenda, C.E., and Hazen, S.L. (2002) Myeloperoxidase functions as a major enzymatic catalyst for initiation of lipid peroxidation at sites of inflammation, *J. Biol. Chem.*, **277**, 46116–46122, doi: 10.1074/jbc.M209124200.
  14. Vlasova, I.I., Feng, W.-H., Goff, J.P., Giorgianni, A., Do, D., Gollin, S.M., Lewis, D.W., Kagan, V.E., and Yalowich, J.C. (2011) Myeloperoxidase-dependent oxidation of etoposide in human myeloid progenitor CD34<sup>+</sup> cells, *Mol. Pharmacol.*, **79**, 479–487, doi: 10.1124/mol.110.068718.
  15. Jantschko, W., Furtmuller, P.G., Zederbauer, M., Neugschwandtner, K., Lehner, I., Jakopitsch, C., Arnhold, J., and Obinger, C. (2005) Exploitation of the unusual thermodynamic properties of human myeloperoxidase in inhibitor design, *Biochem. Pharmacol.*, **69**, 1149–1157, doi: 10.1016/j.bcp.2005.02.006.
  16. Pattison, D.I., and Davies, M.J. (2006) Reactions of myeloperoxidase-derived oxidants with biological substrates: gaining chemical insight into human inflammatory diseases, *Curr. Med. Chem.*, **13**, 3271–3290, doi: 10.2174/092986706778773095.
  17. Senthilmohan, R., and Kettle, A.J. (2006) Bromination and chlorination reactions of myeloperoxidase at physiological concentrations of bromide and chloride, *Arch. Biochem. Biophys.*, **445**, 235–244, doi: 10.1016/j.abb.2005.07.005.
  18. Brennan, M.L., and Hazen, S.L. (2003) Amino acid and protein oxidation in cardiovascular disease, *Amino Acids*, **25**, 365–374, doi: 10.1007/s00726-003-0023-y.
  19. Shao, B., Tang, C., Sinha, A., Mayer, P.S., Davenport, G.D., Brot, N., Oda, M.N., Zhao, X.Q., and Heinecke, J.W. (2014) Humans with atherosclerosis have impaired ABCA1 cholesterol efflux and enhanced high-density lipoprotein oxidation by myeloperoxidase, *Circ. Res.*, **114**, 1733–1742, doi: 10.1161/circresaha.114.303454.
  20. Arnhold, J., Hammerschmidt, S., Wagner, M., Mueller, S., Arnold, K., and Grimm, E. (1990) On the action of hypochlorite on human serum albumin, *Biomed. Biochim. Acta*, **49**, 991–997.
  21. Colombo, G., Clerici, M., Altomare, A., Rusconi, F., Giustarini, D., Portinaro, N., Garavaglia, M.L., Rossi, R., Dalle-Donne, I., and Milzani, A. (2017) Thiol oxidation and di-tyrosine formation in human plasma proteins induced by inflammatory concentrations of hypochlorous acid, *J. Proteomics*, **152**, 22–32, doi: 10.1016/j.jprot.2016.10.008.
  22. Colombo, G., Reggiani, F., Cucchiari, D., Portinaro, N.M., Giustarini, D., Rossi, R., Garavaglia, M.L., Saino, N., Milzani, A., Badalamenti, S., and Dalle-Donne, I. (2017) Plasma protein-bound di-tyrosines as biomarkers of oxidative stress in end stage renal disease patients on maintenance haemodialysis, *BBA Clin.*, **7**, 55–63, doi: 10.1016/j.bbaci.2016.12.004.
  23. Meotti, F.C., Jameson, G.N.L., Turner, R., Harwood, D.T., Stockwell, S., Rees, M.D., Thomas, S.R., and Kettle, A.J. (2011) Urate as a physiological substrate for myeloperoxidase: Implications for hyperuricemia and inflammation, *J. Biol. Chem.*, **286**, 12901–12911 doi: 10.1074/jbc.M110.172460.
  24. Salavej, P., Spalteholz, H., and Arnhold, J. (2006) Modification of amino acid residues in human serum albumin by myeloperoxidase, *Free Radic. Biol. Med.*, **40**, 516–525, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2005.09.007.
  25. Carr, A.C., McCall, M.R., and Frei, B. (2000) Oxidation of LDL by myeloperoxidase and reactive nitrogen species: reaction pathways and antioxidant protection, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **20**, 1716–1723, doi: 10.1161/01.ATV.20.7.1716.
  26. Dobretsov, G.E., Syrejschchikova, T.I., Smolina, N.V., and Uzbekov M.V. (2015) CAPIDAN, a fluorescent reporter for detection of albumin drug-binding site changes, in *Human serum albumin (HSA)* (Stokes, T., ed.), Nova Science Publisher Inc., 129–171.
  27. Colombo, G., Clerici, M., Giustarini, D., Rossi, R., Milzani, A., and Dalle-Donne, I. (2012) Redox albuminomics: oxidized albumin in human diseases, *Antioxid. Redox Signal.*, **17**, 1515–1527, doi: 10.1089/ars.2012.4702.
  28. Созарукова М.М., Проскурнина Е.В., Владимиров Ю.А. (2016) Сывороточный альбумин как источник и мишень свободных радикалов в патологии 56–61, *Бюллетень РГМУ*, **1**, 56–60.
  29. Torres, M.J., Turell, L., Botti, H., Antmann, L., and Carballal, S. (2012) Modulation of the reactivity of the thiol of human serum albumin and its sulfenic derivative by fatty acids, *Arch. Biochem. Biophys.*, **521**, 102–110, doi: 10.1016/j.abb.2012.03.011.
  30. Tirupathi, C., Naqvi, T., Wu, Y., Vogel, S.M., Minshall, R.D., and Malik, A.B. (2004) Albumin mediates the transcytosis of myeloperoxidase by means of caveolae in endothelial cells, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **101**, 7699–7704, doi: 10.1073/pnas.0401712101.
  31. Atanasiu, R.L., Stea, D., Mateescu, M.A., Vergely, C., Dalloz, F., Briot, F., Maupoil, V., Nadeau, R., and Rochette, L. (1998) Direct evidence of caeruloplasmin antioxidant properties, *Mol. Cell. Biochem.*, **189**, 127–135, doi: 10.1023/A:1006945713860.
  32. Barinov, N.A., Vlasova, I.I., Sokolov, A.V., Kostevich, V.A., Dubrovin, E.V., and Klinov, D.V. (2018) High-resolution atomic force microscopy visualization of metalloproteins and their complexes, *Biochim. Biophys. Acta*, **1862**, 2862–2868, doi: 10.1016/j.bbagen.2018.09.008.
  33. Sokolov, A., Ageeva, K., Pulina, M., Cherkalina, O., Samygina, V., Vlasova, I.I., Panasenko, O., Zakharova, E., and Vasilyev, V. (2008) Ceruloplasmin and myeloperoxidase in complex affect the enzymatic properties of each other, *Free Radic. Res.*, **42**, 989–998, doi: 10.1080/10715760802566574.
  34. Griffin, S.V., Chapman, P.T., Lianos, E.A., and Lockwood, C.M. (1999) The inhibition of myeloperoxidase by ceruloplasmin can be reversed by anti-myeloperoxidase

- antibodies, *Kidney Int.*, **55**, 917–925, doi: 10.1046/j.1523-1755.1999.055003917.x.
35. Park, Y.S., Suzuki, K., Mumby, S., Taniguchi, N., and Gutteridge, J.M. (2000) Antioxidant binding of caeruloplasmin to myeloperoxidase: myeloperoxidase is inhibited, but oxidase, peroxidase and immunoreactive properties of caeruloplasmin remain intact, *Free Radic. Res.*, **33**, 261–265, doi: <https://doi.org/10.1080/10715760000301421>.
  36. Chapman, A.L.P., Mocatta, T.J., Shiva, S., Seidel, A., Chen, B., Khalilova, I., Paumann-Page, M.E., Jameson, G.N.L., Winterbourn, C.C., and Kettle, A.J. (2013) Ceruloplasmin is an endogenous inhibitor of myeloperoxidase, *J. Biol. Chem.*, **288**, 6465–6477, doi: 10.1074/jbc.M112.418970.
  37. Segelmark, M., Persson, B., Hellmark, T., and Wieslander, J. (1997) Binding and inhibition of myeloperoxidase (MPO): a major function of ceruloplasmin? *Clin. Exp. Immunol.*, **108**, 167–174, doi: 10.1046/j.1365-2249.1997.d01-992.x.
  38. Sokolov, A.V., Pulina, M.O., Ageeva, K.V., Ayrapetov, M.I., Berlov, M.N., Volgin, G.N., Markov, A.G., Yablonsky, P.K., Kolodkin, N.I., Zakharova, E.T., and Vasilyev, V.B. (2007) Interaction of ceruloplasmin, lactoferrin, and myeloperoxidase, *Biochemistry (Moscow)*, **72**, 409–415, doi: 10.1134/S0006297907040074.
  39. Sokolov, A.V., Kostevich, V.A., Romanico, D.N., Zakharova, E.T., and Vasilyev, V.B. (2012) Two-stage method for purification of ceruloplasmin based on its interaction with neomycin, *Biochemistry (Moscow)*, **77**, 631–638, doi: 10.1134/S0006297912060107.
  40. Marquez, L.A., and Dunford, H.B. (1995) Kinetics of oxidation of tyrosine and dityrosine by myeloperoxidase compounds I and II, *J. Biol. Chem.*, **270**, 30434–30440, doi: 10.1074/jbc.270.51.30434.
  41. Pfeiffer, S., Schmidt, K., and Mayer, B. (2000) Dityrosine formation outcompetes tyrosine nitration at low steady-state concentrations of peroxynitrite: implications for tyrosine modification by nitric oxide/superoxide *in vivo*, *J. Biol. Chem.*, **275**, 6346–6352, doi: 10.1074/jbc.275.9.6346.
  42. Sokolov, A.V., Kostevich, V.A., Varfolomeeva, E.Y., Grigorieva, D.V., Gorudko, I.V., Kozlov, S.O., Kudryavtsev, I.V., Mikhalechik, E.V., Filatov, M.V., Cherenkevich, S.N., Panasenko, O.M., Arnhold, J., and Vasilyev, V.B. (2018) Capacity of ceruloplasmin to scavenge products of the respiratory burst of neutrophils is not altered by the products of reactions catalyzed by myeloperoxidase, *Biochem. Cell Biol.*, **96**, 457–467, doi: 10.1139/bcb-2017-0277.
  43. Panasenko, O.M., Chekanov, A.V., Vlasova, I.I., Sokolov, A.V., Ageeva, K.V., Pulina, M.O., Cherkalina, O.S., and Vasil'ev, V.B. (2008) Influence of ceruloplasmin and lactoferrin on the chlorination activity of leukocyte myeloperoxidase assayed by chemiluminescence, *Biophysics*, **53**, 268–272, doi: 10.1134/S0006350908040052.
  44. Green, P.S., Mendez, A.J., Jacob, J.S., Crowley, J.R., Growdon, W., Hyman, B.T., and Heinecke, J.W. (2004) Neuronal expression of myeloperoxidase is increased in Alzheimer's disease, *J. Neurochem.*, **90**, 724–733, doi: 10.1111/j.1471-4159.2004.02527.x.
  45. Malle, E., Buch, T., and Grone, H.-J. (2003) Myeloperoxidase in kidney disease, *Kidney Int.*, **64**, 1956–67, doi: 10.1046/j.1523-1755.2003.00336.x.
  46. Aouffen, M., Paquin, J., Furtos, A., Waldron, K.C., and Mateescu, M.-A. (2004) Oxidative aggregation of ceruloplasmin induced by hydrogen peroxide is prevented by pyruvate, *Free Radic. Res.*, **38**, 19–26, doi: 10.1080/10715760310001624079.
  47. Samygina, V.R., Sokolov, A.V., Bourenkov, G., Petoukhov, M.V., Pulina, M.O., Zakharova, E.T., Vasilyev, V.B., Bartunik, H., and Svergun, D.I. (2013) Ceruloplasmin: macromolecular assemblies with iron-containing acute phase proteins, *PLoS One*, **8**, e67145, doi: 10.1371/journal.pone.0067145.
  48. Kapralov, A., Vlasova, I.I., Feng, W., Maeda, A., Walsen, K., Tyurin, V.A., Huang, Z., Aneja, R.K., Carcillo, J., Bayir, H., and Kagan, V.E. (2009) Peroxidase activity of hemoglobin–haptoglobin complexes. Covalent aggregation and oxidative stress in plasma and macrophages, *J. Biol. Chem.*, **284**, 30395–30407, doi: 10.1074/jbc.M109.045567.
  49. Anraku, M., Yamasaki, K., Maruyama, T., Kragh-Hansen, U., and Otagiri, M. (2001) Effect of oxidative stress on the structure and function of human serum albumin, *Pharm. Res.*, **18**, 632–639, doi: 10.1023/A:1011029226072.
  50. Hawkins, C.L., Pattison, D.I., and Davies, M.J. (2003) Hypochlorite-induced oxidation of amino acids, peptides and proteins, *Amino Acids*, **25**, 259–274, doi: 10.1007/s00726-003-0016-x.
  51. Potsch, S., Lenzian, F., Ingemarson, R., Hornberg, A., Thelander, L., Lubitz, W., Lassmann, G., and Graslund, A. (1999) The iron-oxygen reconstitution reaction in protein R2-Tyr-177 mutants of mouse ribonucleotide reductase: EPR and electron nuclear double resonance studies on a new transient tryptophan radical, *J. Biol. Chem.*, **274**, 17696–17704, doi: 10.1074/jbc.274.25.17696.
  52. Carvalho, L.C., Estevao, M.S., Ferreira, L.M., Fernandes, E., and Marques, M.M.B. (2010) A new insight on the hypochlorous acid scavenging mechanism of tryptamine and tryptophan derivatives, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **20**, 6475–6478, doi: 10.1016/j.bmcl.2010.09.067.
  53. Polimova, A.M., Vladimirova, G.A., Proskurnina, E.V., and Vladimirov, Y.A. (2011) Aromatic amino acid oxidation products as antioxidants, *Biophysics*, **56**, 585–589, doi: 10.1134/S000635091104021X.
  54. Carroll, L., Pattison, D.I., Davies, J.B., Anderson, R.F., Lopez-Alarcon, C., and Davies, M.J. (2018) Superoxide radicals react with peptide-derived tryptophan radicals with very high rate constants to give hydroperoxides as major products, *Free Radic. Biol. Med.*, **118**, 126–136, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2018.02.033.
  55. Ogasawara, Y., Namai, T., Togawa, T., and Ishii, K. (2006) Formation of albumin dimers induced by exposure to peroxides in human plasma: a possible biomarker for oxidative stress, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **340**, 353–358, doi: 10.1016/j.bbrc.2005.11.183.
  56. Annibal, A., Colombo, G., Milzani, A., Dalle-Donne, I., Fedorova, M., and Hoffmann, R. (2016) Identification of dityrosine cross-linked sites in oxidized human serum albumin, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, **1019**, 147–155, doi: 10.1016/j.jchromb.2015.12.022.
  57. Colombo, G., Clerici, M., Giustarini, D., Portinaro, N., Badalamenti, S., Rossi, R., Milzani, A., and Dalle-Donne, I. (2015) A central role for intermolecular dityrosine cross-linking of fibrinogen in high molecular weight advanced oxidation protein product (AOPP) formation, *Biochim. Biophys. Acta*, **1850**, 1–12, doi: 10.1016/j.bbagen.2014.09.024.

## MYELOPEROXIDASE-INDUCED OXIDATION OF ALBUMIN AND CERULOPLASMIN: ROLE OF TYROSINES

I. I. Vlasova<sup>1,2\*</sup>, A. V. Sokolov<sup>1,3,4</sup>, V. A. Kostevich<sup>1,3</sup>,  
E. V. Mikhailchik<sup>1</sup>, and V. B. Vasilyev<sup>3,4</sup>

<sup>1</sup> *Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine,  
119435 Moscow, Russia; E-mail: iivlasova08@gmail.com*

<sup>2</sup> *Sechenov First Moscow State Medical University, Institute  
for Regenerative Medicine, 119991 Moscow, Russia*

<sup>3</sup> *Institute of Experimental Medicine, 197376 St. Petersburg, Russia*

<sup>4</sup> *St. Petersburg State University, 199034 St. Petersburg, Russia*

Received February 22, 2019

Revised March 14, 2019

Accepted March 14, 2019

Neutrophil myeloperoxidase (MPO) plays an important role in protecting the body against infections. MPO products – hypohalous acids and phenoxy radicals – are strong oxidants, which can damage not only foreign intruders but also host tissues including blood plasma proteins. Here, we compared the MPO-induced oxidation of two plasma proteins with antioxidant properties – human serum albumin (HSA) and ceruloplasmin (CP). Incubation of both proteins with hypochlorite (NaOCl) or with catalytically active MPO (MPO + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), which in the presence of chloride ions synthesizes hypochlorous acid (HOCl), resulted in quenching of tryptophan fluorescence of the proteins. Oxidation-induced changes in the structures of HSA and CP were different: HSA due to its high antioxidant capacity efficiently neutralized the MPO-generated oxidants without formation of protein aggregates, while oxidation of CP resulted in formation of large aggregates stabilized by strong covalent bonds between aromatic amino acid residues of tyrosine (which is present in plasma as free amino acid and also as an amino acid residue of polypeptide chains) and tryptophan. The number of tyrosine residues in a protein is not a determining factor for the formation of aggregates. In the case of CP only, the formation of aggregates is primarily due to the high content of tryptophan residues in its polypeptide chain. MPO-dependent oxidation of free amino acid tyrosine results in formation of tyrosyl radicals, which do not oxidize aromatic amino acid residues in proteins because of their high propensity to recombine with formation of dityrosines. At the same time, free tyrosine can modulate MPO-induced protein oxidation due to its ability to modulate the HOCl synthesis in the active center of MPO.

**Keywords:** hypochlorous acid, phenoxy radicals, protein oxidation, tryptophan fluorescence, protein aggregation