

ПРОДУКЦИЯ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА И ГАЛОГЕНОВ НЕЙТРОФИЛАМИ ПРИ ДЕЙСТВИИ МОНОМЕРНЫХ ФОРМ МИЕЛОПЕРОКСИДАЗЫ

© 2017 г. И.В. Горудко*, Е.В. Михальчик**, А.В. Соколов** *** **** ***,
Д.В. Григорьева*, В.А. Костевич** ***, В.Б. Васильев**** ***,
С.Н. Черенкевич*, О.М. Панасенко**

*Белорусский государственный университет, 220030, Минск, пр. Независимости, 4, Беларусь

E-mail: irinagorudko@rambler.ru

**Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины ФМБА России,
119435, Москва, Малая Пироговская ул., 1а

E-mail: o-panas@mail.ru

***Институт экспериментальной медицины, 197376, Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, 12

****Санкт-Петербургский государственный университет,
199034, Санкт-Петербург, Университетская наб., 7/9

*****Центр доклинических трансляционных исследований, НМИЦ им. В. А. Алмазова Минздрава России,
197371, Санкт-Петербург, Долгоозерная ул., 43

Поступила в редакцию 06.10.17 г.

Впервые показано, что фермент миелопероксидаза, представляющий собой гомодимер, состоящий из двух соединенных дисульфидной связью идентичных протомеров и катализирующий образование хлорноватистой кислоты (НОСl), распадается под действием НОСl на мономеры МПО-Сl. Димерная миелопероксидаза также может быть трансформирована в мономеры (геми-миелопероксидаза) путем восстановления дисульфидной связи. Проведено сравнительное исследование влияния двух мономерных форм миелопероксидазы: МПО-Сl и геми-миелопероксидазы, а также нативной димерной миелопероксидазы на продукцию нейтрофилами активных форм кислорода ($\bullet\text{O}_2^-$ и H_2O_2) и галогенов (НОСl). Продукцию нейтрофилами НОСl оценивали методом хемилюминесценции в присутствии люминола, $\bullet\text{O}_2^-$ – методом хемилюминесценции в присутствии люцигенина и спектрофотометрическим методом по восстановлению цитохрома *c*, H_2O_2 – флуоресцентным методом с использованием скополетина после добавления к клеткам геми-миелопероксидазы, МПО-Сl или димерной миелопероксидазы, а также в ответ на последующее добавление активаторов, форбол-12-миристан-13-ацетата или N-формил-Met-Leu-Phe. Полученные результаты свидетельствуют о том, что МПО-Сl и геми-миелопероксидаза, которые могут появляться в крови при развитии галогенирующего стресса, не способны праймировать НАДФН-оксидазу нейтрофилов и усиливать продукцию ими активных форм кислорода ($\bullet\text{O}_2^-$ и H_2O_2) и галогенов (НОСl).

Ключевые слова: миелопероксидаза, геми-миелопероксидаза, галогенирующий стресс, активные формы галогенов, активные формы кислорода, нейтрофилы.

Нейтрофилы представляют собой важное клеточное звено врожденного иммунитета – первой линии защиты от патогенов. В азуروفильных гранулах нейтрофилов содержится

фермент миелопероксидаза (МПО), который катализирует двухэлектронное окисление галогенидов до соответствующих гипогалоидных кислот, главным образом, хлорноватистой (НОСl) и бромноватистой (НОBr). НОСl и НОBr – сильные окислители и галогенирующие агенты. Их принято называть активными формами галогенов (АФГ) [1]. Активируясь в ответ на патоген, нейтрофилы секретируют во внеклеточное пространство различные бактерицидные агенты и их предшественники, в том числе и

Сокращения: МПО – миелопероксидаза, геми-МПО – геми-форма миелопероксидазы, МПО-Сl – мономер миелопероксидазы, полученный при распаде димера под действием НОСl, АФГ – активные формы галогенов, АФК – активные формы кислорода, ФМА – форбол-12-миристан-13-ацетат, fMLP – N-формил-Met-Leu-Phe, PBS – фосфатно-солевой буфер, ХЛ – хемилюминесценция.

МПО. Последняя, катализируя образование АФГ, проявляет антимикробную активность. Однако в том случае, когда продукция АФГ значительно возрастает и организм не справляется с повышенной реакционной способностью этих соединений, возникает галогенирующий стресс, характеризующийся галогенированием и окислением биологически важных молекул (белков, ферментов, нуклеиновых кислот, липидов и др.), провоцируя повреждение клеток и тканей организма [1,2]. Следует учитывать, что, находясь в очаге воспаления, МПО сама является мишенью для АФГ, которые могут модифицировать фермент, в частности, ингибировать его каталитическую активность [3].

Зрелые гранулоциты крови содержат димерную форму МПО [4,5], состоящую из двух соединенных дисульфидной связью идентичных протомеров, каждый из которых состоит из легкой цепи, тяжелой цепи и гема [6]. Недавно в крови больных с острым воспалением нами была обнаружена мономерная форма МПО (неопубликованные данные), однако механизмы распада димерной МПО на мономеры *in vivo* не ясны. Единственная дисульфидная связь, соединяющая два протомера в нативной МПО, может быть разрушена в результате ее восстановления с образованием геми-формы миелопероксидазы (геми-МПО) [7]. В очаге воспаления при активации лейкоцитов продуцируются различные активные формы кислорода (АФК): $\cdot\text{O}_2^-$, H_2O_2 , $\cdot\text{OH}$, $^1\text{O}_2$ и галогенов: HOCl , HOBr и др. Учитывая тот факт, что константы скорости реакций окисления дисульфидной связи некоторыми из указанных соединений весьма высоки, например, для HOCl и HOBr они превышают значение $10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ [8,9], мы предположили, что МПО распадается на два мономера в результате окисления дисульфидной связи, соединяющей их в димер.

МПО, являясь поликатионным гликопротеином ($\text{pI} > 10$), способна за счет электростатических, рецепторных и других типов взаимодействий связываться с клетками крови (эритроцитами [10], тромбоцитами [11], нейтрофилами [12,13]) и модулировать их функции. Было показано, что МПО проявляет свойства аутокринного модулятора функций нейтрофилов. Секретированная клетками при их активации и дегрануляции МПО связывалась с CD11b/CD18 на поверхности нейтрофилов. Это вызывало активацию p38 митоген-активируемой протеинкиназы и фосфорилирование тирозинов ряда белков, что стимулировало экзоцитоз содержимого гранул нейтрофилов, активацию НАДФН-оксидазы [11], а также вызывало за-

держку апоптоза этих клеток [13]. В то же время было показано, что восстановительное алкилирование, которое приводит к распаду МПО на мономеры, лишало фермент способности усиливать адгезию лейкоцитов [14].

Целью данной работы было выяснить, во-первых, возможен ли распад димерной формы МПО на мономеры под действием HOCl , во-вторых, будет ли отличаться влияние на продукцию АФГ и АФК нейтрофилами крови человека мономеров МПО, полученных в результате восстановления или окисления дисульфидной связи (геми-МПО или МПО-Cl, соответственно), от действия нативной димерной МПО.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Реактивы. Соли, использованные для приготовления буферных растворов, а также среда Кребса–Рингера (продукт № K4002), NaOCl , гистопак, форбол-12-миристан-13-ацетат (ФМА), N-формил-Met-Leu-Phe (fMLP), люминол, люцигенин, скополетин, фенил-агароза, Сефакрил S-200 HR, D-глюкоза, пероксидаза из корней хрена, NaN_3 , лиофилизированные бактериальные клетки *Micrococcus lysodeikticus*, супероксиддисмутаза, цитохром c, иодацетамид, 2-меркаптоэтанол, додецилсульфат натрия, 4-хлор-1-нафтол были получены от фирмы Sigma-Aldrich (США); среда для культивирования клеток RPMI-1640, HEPES-буфер, эмбриональная телячья сыворотка, глутамин – от фирмы БиолоТ (Россия); лимфопреп – от фирмы Nycomed (Норвегия).

Концентрацию коммерческого раствора гипохлорита натрия (NaOCl) определяли спектрофотометрически по поглощению гипохлорит-аниона (OCl^-) при 290 нм и pH 12, используя молярный коэффициент экстинкции $\epsilon_{290} = 350 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [15]. Принимая во внимание, что pK_a HOCl составляет 7,5 [15] и при физиологических значениях pH примерно половина кислоты находится в молекулярной форме, а остальная – в диссоциированной форме, далее под HOCl мы будем понимать присутствующую в исследуемой среде смесь HOCl/OCl^- .

Получение МПО, геми-МПО и МПО-Cl. В качестве источника МПО использовали клетки линии HL-60 (промиелоцитарная лейкемия), которые культивировали при 37°C и 100% увлажнении воздуха в роллерных бутылках для суспензионных культур на среде RPMI-1640 с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки, глутамин и 25 мМ HEPES-буфера (pH 7,4). Раз в неделю клетки из среды осаждали центрифугированием при 1500 g, осадок ресуспензировали в минимальном объеме све-

жей среды и 1/5 объема этой среды переносили в роллерную бутылку со свежей средой, а остальные клетки трижды отмывали от среды фосфатно-солевым буфером (PBS) (10 мМ $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$, 137 мМ NaCl , 2,7 мМ KCl , рН 7,4) и после ресуспензирования в двух объемах 100 мМ натрий-ацетатного буфера (рН 4,7) замораживали и хранили до выделения из них МПО. Препарат МПО очищали с помощью аффинной хроматографии на гепарин-сефарозе, гидрофобной хроматографии на фенол-сефарозе и гель-фильтрации на сефакриле S-200 HR. Этот метод позволяет выделять гомогенный препарат МПО с высокой удельной активностью и характеристикой чистоты $A_{430}/A_{280} > 0,85$ [16].

Геми-МПО получали путем обработки фермента в течение 30 мин при 37°C 2-меркаптоэтанолом (мольное соотношение МПО : 2-меркаптоэтанол – 1 : 4), SH-группы блокировали иодацетамидом в течение 30 мин при 4°C (мольное соотношение МПО : иодацетамид – 1 : 20) и подвергали гель-фильтрации на сефакриле S-200 HR для отделения следов димерной МПО от мономерной.

Модификацию МПО под действием НОС1 проводили в PBS, как описано ранее [10]. Для этого смешивали равные объемы растворов МПО и НОС1 так, чтобы в итоге мольное соотношение МПО : НОС1 было равным 1 : 100, и инкубировали в течение 60 мин при комнатной температуре. С использованием Вестерн-блоттинга было показано, что при указанных условиях в образце выявлялась преимущественно мономерная форма МПО (МПО-С1, $M \sim 75$ кДа), свидетельствуя о практически полной трансформации димера в МПО-С1.

Вестерн-блоттинг. Пробы димера МПО (1 мкг белка на дорожке) до и после модификации НОС1 (соотношение МПО : НОС1 = 1 : 8, 1 : 16, 1 : 25, 1 : 32, 1 : 50, 1 : 64, 1 : 100 моль/моль) подвергали электрофорезу в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия без кипячения проб и обработки 2-меркаптоэтанолом, проводили полусухой перенос на нитроцеллюлозную мембрану, а затем Вестерн-блоттинг с антителами против МПО (разведение антител кролика против МПО 1 : 1000, конъюгата пероксидазы хрена с антителами козла против IgG кролика 1 : 5000). Окрашивание зон на мембране проводили с помощью 4-хлор-нафтола и пероксида водорода [10].

Выделение нейтрофилов осуществляли из донорской крови, стабилизированной добавлением 1 объема 3,8%-го цитрата натрия на девять объемов крови, путем центрифугирования в те-

чение 35 мин при 400 g в градиенте плотности лимфопрепа, как описано ранее [17], или с использованием двойного градиента плотности (1,119 и 1,078 г/мл) гистобака. Клетки отмывали от супернатанта в PBS, содержащем 5 мМ D-глюкозы (рН 7,4), и использовали в эксперименте в течение 4–6 ч, выдерживая при температуре 4°C. Содержание нейтрофилов в клеточной суспензии составляло 97–98%, доля жизнеспособных клеток по тесту с трипановым синим – не менее 96%.

Измерение хемилюминесценции нейтрофилов проводили на люминометре LKB Wallac Lumipometer 1251 (Финляндия) при постоянном перемешивании и температуре 37°C. В пробу объемом 1 мл, содержащую среду Кребса-Рингера (рН 7,4), люминол или люцигенин (0,2 мМ), вносили нейтрофилы (конечная концентрация $0,4 \times 10^6$ кл/мл), измеряли уровень спонтанной хемилюминесценции (ХЛ), после чего добавляли МПО, геми-МПО или МПО-С1 до конечной концентрации 50 нМ (по гемю) и измеряли величину интенсивности ХЛ (ХЛ ответ на миелопероксидазу). Затем через ~3 мин клетки стимулировали раствором ФМА или fMLP (конечные концентрации 0,16 и 10 мкМ, соответственно) и продолжали регистрировать ХЛ в ответ на активатор. Интенсивность ХЛ оценивали по высоте пика и выражали в вольтах (В).

Продукция H_2O_2 нейтрофилами оценивалась флуоресцентным методом на компьютеризированном спектрофлуориметре СМ 2203 («СОЛАР», Минск, Беларусь) с использованием скополетина в качестве субстрата пероксидазной реакции, как описано ранее [17]. Суспензию нейтрофилов (10^6 кл/мл в PBS с 1 мМ CaCl_2 и 0,5 мМ MgCl_2 , рН 7,35), содержащую 1 мкМ скополетина, 20 мкг/мл пероксидазы из корней хрена и 1 мМ NaN_3 , термостатировали при 37°C и непрерывно перемешивали в течение 3 мин. Затем добавляли МПО, геми-МПО или МПО-С1 (конечная концентрация 50 нМ по гемю) и регистрировали кинетику окисления скополетина по уменьшению интенсивности флуоресценции при 460 нм (возбуждение при 350 нм). Скорость продукции H_2O_2 клетками определяли как тангенс угла наклона линейного участка кинетической кривой, отражающего уменьшение интенсивности флуоресценции скополетина в результате его окисления H_2O_2 .

Продукция $\cdot\text{O}_2$ нейтрофилами измерялась спектрофотометрическим методом по восстановлению цитохрома c [18]. Реакцию проводили в пластиковых пробирках, содержащих 500 мкл реакционной смеси в PBS с 1 мМ CaCl_2 и 0,5 мМ MgCl_2 (рН 7,35) следующего состава:

10^6 кл/мл, 75 мкМ цитохрома *c* и МПО, геми-МПО или МПО-С1 в концентрации 50 нМ. Образцы инкубировали в течение 15 мин при 37°C и останавливали реакцию путем помещения пробирок на лед с их последующим центрифугированием при 2500 *g*. Количество восстановленного цитохрома *c* определяли по величине оптической плотности супернатантов при 550 нм, которую измеряли относительно контрольной пробы, содержащей 75 мкМ исходного раствора цитохрома *c*. Специфичность реакции контролировали по степени подавления восстановления цитохрома *c* в присутствии 25 мкг/мл супероксиддисмутазы. Количество образующегося $\cdot\text{O}_2^-$ (в нМ) рассчитывали по формуле, учитывающей величину коэффициента молярной экстинкции восстановленного и окисленного цитохрома *c*:

$$[\cdot\text{O}_2^-] = 47,7 \times (D_1 - D_2),$$

где D_1 – оптическая плотность образца на длине волны 550 нм без супероксиддисмутазы, D_2 – оптическая плотность образца на длине волны 550 нм в присутствии супероксиддисмутазы.

Дегрануляция нейтрофилов была оценена по выходу из клеток лизоцима [19]. К суспензии нейтрофилов в PBS, содержащем 1 мМ CaCl_2 и 0,5 мМ MgCl_2 (рН 7,35), добавляли МПО, геми-МПО или МПО-С1 (100 нМ) и инкубировали образцы в течение 20 мин при 37°C. Конечная концентрация клеток в пробах составляла 3×10^6 кл/мл. Реакцию дегрануляции останавливали путем помещения образцов на лед с последующим центрифугированием в течение 8 мин при 2500 *g*. Полученные супернатанты помещали на лед или хранили при -20°C в течение нескольких дней, а затем использовали для определения лизоцима. Активность лизоцима в супернатантах определяли по скорости лизиса бактериальных клеток *Micrococcus lysodeikticus*. Анализируемую пробу (100 мкл) добавляли к 900 мкл суспензии лиофилизированных клеток *Micrococcus lysodeikticus* (0,2 мг/мл) в 0,1 М $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ буфере (рН 6,2) и измеряли оптическую плотность на длине волны 450 нм в течение 5 мин при 25°C с помощью компьютеризированного спектрофотометра РВ 2201 («СОЛАР», Минск, Беларусь). Активность лизоцима определяли как тангенс угла наклона линейного участка полученных экспериментальных кривых, отражающего уменьшение оптической плотности.

Статистическая обработка результатов. Результаты представлены как средние значения \pm стандартные отклонения. Достоверность различий средних величин рассчитывали с исполь-

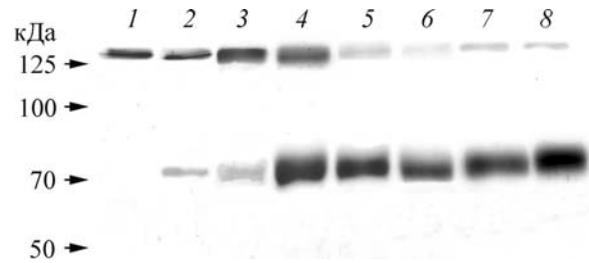


Рис. 1. Вестерн-блоттинг с антителами против МПО (разведение антител кролика против МПО 1 : 1000, конъюгата пероксидазы хрена с антителами козла против IgG кролика – 1 : 5000) после электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия без кипячения и обработки 2-меркаптоэтанолом: 1 – димер МПО (1 мкг), 2–8 – димер МПО:НОС1 = 1 : 8, 1 : 16, 1 : 25, 1 : 32, 1 : 50, 1 : 64, 1 : 100 моль/моль. Стрелками указано положение маркеров молекулярной массы.

зованием *t*-критерия Стьюдента, считая различия достоверными при уровне значимости $p < 0,05$. Для обработки результатов использовали пакет программ Statistica 6.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Образование МПО-С1 при окислении димерной МПО под действием НОС1. В работе [7] была показана возможность образования геми-МПО *in vitro* из нативной димерной МПО при восстановлении дисульфидной связи. Мы предположили, что мономерная форма МПО может образовываться в результате окислительной деструкции дисульфидной связи под действием АФГ. С целью проверки этого предположения нативный фермент инкубировали в растворе с НОС1 при различных концентрациях, после чего, проводя Вестерн-блоттинг образцов, определяли содержание в них димера и мономера МПО. На рис. 1 представлены данные Вестерн-блоттинга после модификации димерной МПО под действием НОС1 в различных молярных соотношениях. Видно, что в нативной МПО, не обработанной НОС1, мономерная форма отсутствует. По мере увеличения концентрации НОС1 в среде с димерной МПО обнаруживается мономерная форма МПО (МПО-С1, $M \sim 75$ кДа) так, что при мольном соотношении МПО:НОС1, равном 1 : 25, количество образовавшейся МПО-С1 примерно равно количеству оставшейся в образце димерной МПО ($M \sim 145$ кДа). Это значит, что содержимое образца представляет собой смесь димера и мономера МПО. При мольном соотношении МПО : НОС1, равном 1 : 100, в образце выявляется преимущественно мономерная форма МПО, свидетельствуя о практически полном распаде

Таблица 1. Влияние МПО, геми-МПО и МПО-С1 на ХЛ нейтрофилов в ответ на добавление ФМА или fMLP в присутствии люминола

Добавка к клеткам	Интенсивность ХЛ (в % к контролю)	
	ФМА	fMLP
Контроль (без МПО)	100	100
МПО	580 ± 178*	607 ± 141*
Геми-МПО	532 ± 245*	612 ± 143*
МПО-С1	212 ± 26*.**	97 ± 10**

Примечание. * – $p < 0,05$ относительно контроля (без добавок); ** – $p < 0,05$ относительно пробы с МПО.

димера на МПО-С1, вероятнее всего, в результате окисления дисульфидной связи под действием НОС1. Такой ход событий кажется очевидным, если учесть, что константа скорости реакции окисления дисульфидной связи под действием НОС1 весьма высока и равна $1,6 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{c}^{-1}$ [8]. В дальнейших экспериментах в качестве МПО-С1 мы использовали мономер, полученный при действии НОС1 на нативную димерную МПО в мольном соотношении МПО:НОС1, равном 1 : 100.

Влияние геми-МПО и МПО-С1 на люминол-зависимую ХЛ нейтрофилов. Метод ХЛ является удобным и общепринятым инструментом для исследования продукции клетками АФК и АФГ [20]. Используя этот метод, определяли интенсивность ХЛ нейтрофилов в присутствии люминола в ответ на добавление к ним МПО, геми-МПО или МПО-С1. Было показано, что ни одна из исследованных форм МПО не приводила к достоверному увеличению ХЛ нейтрофилов, свидетельствуя об отсутствии активации клеток (данные не приведены).

Результаты влияния МПО, геми-МПО и МПО-С1 на ХЛ нейтрофилов в ответ на добавление активаторов (ФМА или fMLP) в присутствии люминола суммированы в табл. 1. Типичные кинетические кривые люминол-зависимой ХЛ нейтрофилов в присутствии всех трех форм МПО в ответ на ФМА или fMLP приведены на рис. 2а и б. Видно, что при добавлении к нейтрофилам, инкубированным с различными формами МПО, ФМА в присутствии люминола увеличивается интенсивность ХЛ, которая в случае МПО и геми-МПО возрастала по сравнению с контролем в среднем в ~5,8 и 5,3 раза соответственно. В присутствии МПО-С1 интенсивность люминол-зависимой ХЛ в ответ на ФМА была также достоверно выше по сравнению с контролем, но ниже, чем в случае МПО или геми-МПО.

Когда в качестве активатора нейтрофилов использовали fMLP, интенсивность люминол-зависимой ХЛ также достоверно возрастала в

случае инкубации нейтрофилов с МПО и геми-МПО (в ~6,1 раза). В присутствии МПО-С1 люминол-зависимая ХЛ в ответ на fMLP достоверно не отличалась от контрольных значений (см. табл. 1 и рис. 2б).

Следует иметь в виду, что ХЛ нейтрофилов в присутствии люминола сопряжена, главным образом, с его окислением под действием НОС1 [20,21,22], которая образуется при функционировании цикла галогенирования МПО. Учитывая это обстоятельство, обнаруженное нами в ответ на активаторы увеличение интенсивности ХЛ нейтрофилов, инкубированных в присутствии МПО (любой из трех форм), можно объяснить, по крайней мере, одной из двух причин. Во-первых, это может быть результатом функционирования цикла галогенирования добавленной к нейтрофилам МПО. После добавления к клеткам ФМА или fMLP активируется НАДФН-оксидаза, что влечет за собой продукцию $\cdot\text{O}_2^-$ с последующей его дисмутацией до H_2O_2 . В среде инкубации нейтрофилов присутствует и второй субстрат цикла галогенирования МПО – хлорид. Следовательно, создаются все условия для образования НОС1, которая окисляет люминол, что и влечет за собой увеличение интенсивности ХЛ [20]. Вторая причина может заключаться частично в экзоцитозе МПО в результате дегрануляции клеток. Для выяснения этих вопросов исследовали продукцию нейтрофилами $\cdot\text{O}_2^-$ (метод ХЛ с использованием люцигенина и спектрофотометрический метод с использованием цитохрома *c*) и H_2O_2 (флуоресцентный метод с использованием скополетина), а также экзоцитоз лизоцима в ответ на активаторы (ФМА или fMLP) после добавления к клеткам геми-МПО или МПО-С1.

Влияние геми-МПО и МПО-С1 на продукцию нейтрофилами $\cdot\text{O}_2^-$ и H_2O_2 . Известно, что ХЛ нейтрофилов в присутствии люцигенина обусловлена, главным образом, его окислением под действием $\cdot\text{O}_2^-$, образование которого катализирует мембраносвязанная НАДФН-окси-

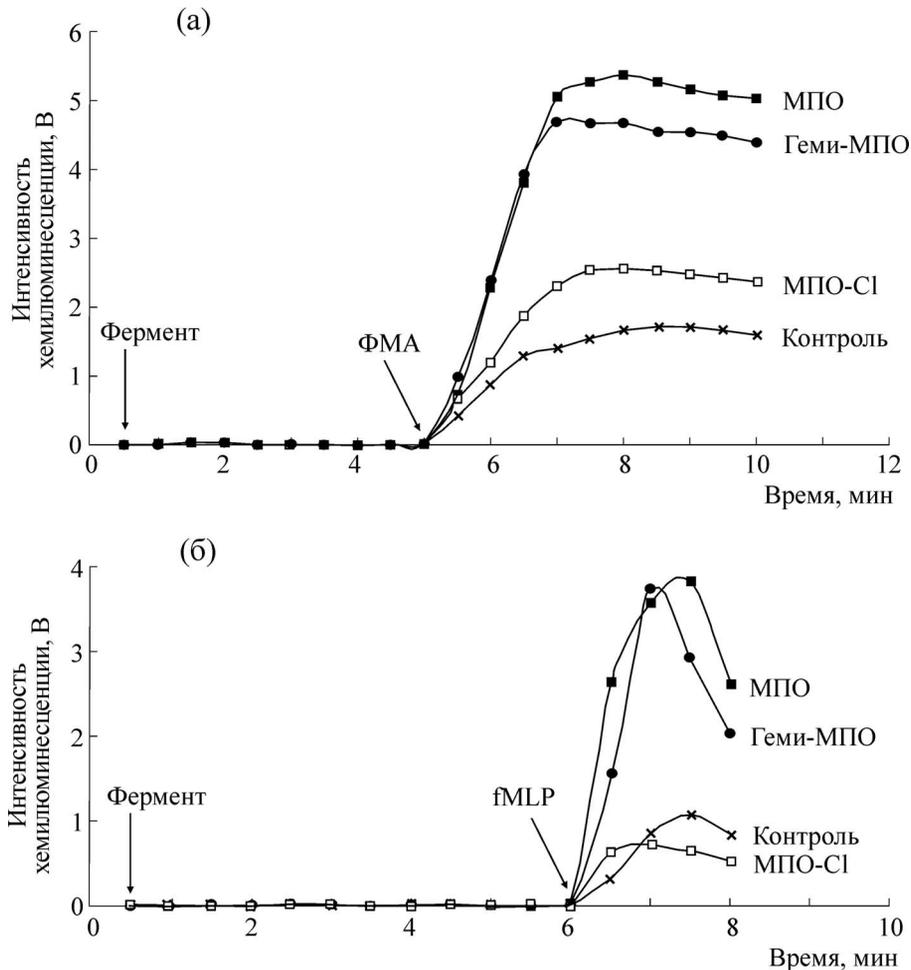


Рис. 2. Типичные кривые люминол-зависимой ХЛ нейтрофилов в присутствии МПО, геми-МПО или МПО-С1 в ответ на добавление активаторов ФМА (а) или fMLP (б). Концентрация МПО составляла 50 нМ (по гемю). Стрелками указаны моменты добавления к клеткам различных форм фермента и активаторов. В контроле к нейтрофилам вместо фермента добавляли аликвоту PBS.

даза [20,23]. Это значит, что интенсивность ХЛ в присутствии люцигенина может быть мерой активности НАДФН-оксидазы нейтрофилов и продукции ими АФК [24]. При измерении интенсивности ХЛ нейтрофилов после добавления к ним МПО, геми-МПО или МПО-С1 в присутствии люцигенина было показано, что ни одна из исследованных форм МПО достоверно не увеличивала интенсивность ХЛ нейтрофилов, свидетельствуя об отсутствии их влияния на активность НАДФН-оксидазы (данные не приведены).

Результаты влияния МПО, геми-МПО и МПО-С1 на ХЛ нейтрофилов, индуцированную добавлением ФМА или fMLP в присутствии люцигенина, суммированы в табл. 2. Видно, что при инкубации нейтрофилов с различными формами МПО не происходит увеличения интенсивности ХЛ в присутствии люцигенина в

ответ на добавление ФМА. Более того, в случае МПО-С1 и геми-МПО было отмечено снижение интенсивности ХЛ нейтрофилов в ответ на ФМА (на 31 и 17%, соответственно, табл. 2). При использовании в качестве активатора fMLP была обнаружена тенденция к увеличению ХЛ нейтрофилов в случае их инкубации как с нативной МПО, так и с геми-МПО (табл. 2). Однако эти различия не были статистически достоверными. Полученные результаты свидетельствуют об отсутствии праймирующего влияния всех трех исследованных форм МПО на НАДФН-оксидазу нейтрофилов.

При изучении влияния геми-МПО и МПО-С1 на продукцию нейтрофилами АФК было выявлено, что ни геми-МПО, ни МПО-С1, ни нативный фермент (гомодимер) не влияли на продукцию H_2O_2 или $\bullet O_2^-$ клетками (данные не приведены).

Таблица 2. Влияние МПО, геми-МПО и МПО-С1 на ХЛ нейтрофилов в ответ на добавление ФМА или fMLP в присутствии люцигенина

Добавка к клеткам	Интенсивность ХЛ (в % к контролю)	
	ФМА	fMLP
Контроль (без МПО)	100	100
МПО	116 ± 20	154 ± 57
Геми-МПО	83 ± 3*	151 ± 40
МПО-С1	69 ± 13*	—**

Примечание. * – $p < 0,05$ относительно контроля (без МПО); ** – измерения не проводились.

Таблица 3. Влияние МПО, геми-МПО и МПО-С1 на продукцию пероксида водорода и супероксидного анион-радикала нейтрофилами в ответ на добавление ФМА или fMLP

Добавка к клеткам	Продукция H_2O_2 , % от контроля		Продукция $\bullet O_2^-$, % от контроля	
	Активатор fMLP	Активатор ФМА	Активатор ФМА	Активатор fMLP
Контроль (без МПО)	100	100	100	100
МПО	110 ± 26	105 ± 6	97 ± 13	97 ± 13
Геми-МПО	73 ± 19	92 ± 2	90 ± 10	90 ± 10
МПО-С1	106 ± 44	96 ± 4	91 ± 14	91 ± 14

В табл. 3 суммированы результаты влияния геми-МПО и МПО-С1 в сравнении с нативной МПО на продукцию АФК нейтрофилами в ответ на добавление к клеткам активаторов, ФМА или fMLP. Видно, что как нативная МПО, так и ее мономерные формы (геми-МПО и МПО-С1) не стимулировали нейтрофилы к дополнительной продукции ни H_2O_2 в ответ на добавление ФМА, ни $\bullet O_2^-$ – в ответ на добавление ФМА или fMLP.

Дегрануляция нейтрофилов под действием геми-МПО и МПО-С1. Дегрануляцию нейтрофилов оценивали по экзоцитозу лизоцима, который локализован в азурофильных и специфических гранулах этих клеток. Оказалось, что МПО стимулирует дегрануляцию нейтрофилов, увеличивая выход лизоцима более чем в 1,5 раза ($156 \pm 15\%$) по сравнению с контролем. Если предположить, что экзоцитоз лизоцима положительно коррелирует с выходом из клетки МПО, то можно заключить, что МПО по аутокринному механизму активирует дегрануляцию азурофильных гранул нейтрофилов, а значит, и собственную дополнительную секрецию из клеток. Это хорошо согласуется с результатами работы [12], в которой было показано, что адгезия полиморфноядерных нейтрофилов к подложке, покрытой фибронектином и МПО, сопровождается секрецией клетками маркеров азурофильных гранул – МПО и эластазы. Однако геми-МПО и МПО-С1 не стимулировали

дегрануляцию нейтрофилов (112 ± 8 и $110 \pm 17\%$ по сравнению с контролем). Добавление к нейтрофилам активаторов (ФМА или fMLP) вслед за МПО, геми-МПО или МПО-С1 не приводило к достоверному увеличению выхода лизоцима из клеток (данные не приведены).

Такой результат дает основание предположить, что обнаруженное нами увеличение интенсивности люминол-зависимой ХЛ нейтрофилов в ответ на активаторы (ФМА или fMLP) в присутствии геми-МПО (рис. 1, табл. 1) не связано с дополнительным экзоцитозом МПО в результате дегрануляции нейтрофилов. По всей вероятности, увеличение интенсивности ХЛ обусловлено функционированием цикла галогенирования добавленной к нейтрофилам геми-МПО, в результате чего образуется НОС1, которая окисляет люминол, что влечет за собой увеличение интенсивности ХЛ. С таким объяснением согласуется и обнаруженное нами достоверное снижение в присутствии МПО-С1 интенсивности люминол-зависимой ХЛ нейтрофилов в ответ на активаторы, поскольку модификация МПО под действием НОС1 инактивирует фермент [3,25,26], а значит, снижает образование НОС1 и, как следствие, интенсивность ХЛ.

Следует отметить, что наши результаты не подтверждают полученные ранее данные о том, что МПО, активируя НАДФН-оксидазу, стимулирует продукцию нейтрофилами $\bullet O_2^-$ [12].

Такое несоответствие может быть обусловлено различиями между препаратами МПО, использованными нами и авторами работы [12], вследствие особенностей очистки использованного в указанной работе коммерческого препарата МПО, который, как правило, содержит остаточные примеси катионного поверхностно-активного вещества, цетилтриметиламмоний бромида. Последний увеличивает положительный заряд такого препарата МПО и может содействовать ее связыванию с отрицательно заряженными поверхностями клеток, как это было продемонстрировано ранее в случае связывания МПО с липопротеинами высокой плотности [27].

Полученные результаты дают основание предполагать, что в условиях галогенирующего стресса, сопровождающего воспаление, одновременно повышение концентрации МПО и АФГ в крови в результате активации и дегрануляции нейтрофилов может способствовать окислительной/галогенирующей модификации фермента, который, по крайней мере, частично должен представлять собой мономерную форму МПО. Важно отметить, что, как было показано в контрольных экспериментах, реакция с антителами против МПО сохранялась у МПО, обработанной НОС1, т.е. большинство антигенных детерминант МПО оставались неповрежденными даже после воздействия на МПО 100-кратного мольного избытка НОС1.

Таким образом, полученные нами результаты свидетельствуют о том, что мономерная форма МПО, которая может появляться в крови при развитии галогенирующего стресса, не способна праймировать НАДФН-оксидазу и усиливать продукцию нейтрофилами АФК и АФГ.

Оптимизация метода выделения димерной МПО и исследование ее влияния на нейтрофилы выполнены при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 17-75-30064). Исследование мономерных форм МПО поддержано Российским фондом фундаментальных исследований (гранты №№ 16-54-00038 и 17-04-00530) и Белорусским фондом фундаментальных исследований (грант Б16Р-015).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. О. М. Панасенко, И. В. Горудко и А. В. Соколов, *Успехи биол. химии* **53**, 195 (2013).
2. О. М. Панасенко и В. И. Сергиенко, *Вестн. РАМН* № 1, 27 (2010).
3. N. R. Matheson and J. Travis, *Biochemistry* **24**, 1941 (1985).
4. M. Yamada, M. Mori, and T. Sugimura, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **98**, 219 (1981).
5. M. Yamada, M. Mori, and T. Sugimura, *J. Biochem.* **93**, 1661 (1983).
6. M. Blair-Johnson, T. Fiedler, and R. Fenna, *Biochemistry* **40**, 13990 (2001).
7. P. C. Andrews and N. I. Krinsky, *J. Biol. Chem.* **256**, 4211 (1981).
8. D. I. Pattison and M. J. Davies, *Chem. Res. Toxicol.* **14**, 1453 (2001).
9. D. I. Pattison and M. J. Davies, *Biochemistry* **43**, 4799 (2004).
10. I. V. Gorudko, A. V. Sokolov, E. V. Shamova, et al., *Arch. Biochem. Biophys.* **591**, 87 (2016).
11. I. V. Gorudko, A. V. Sokolov, E. V. Shamova, et al., *Biol. Open* **2**, 916 (2013).
12. D. Lau, H. Mollnau, J. P. Eiserich, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 431 (2005).
13. D. E. Kebir, L. József, W. Pan, et al., *Circ Res.* **103**, 352 (2008).
14. M. W. Johansson, M. Patarroyo, F. Öberg, et al., *J. Cell Science* **110**, 1133 (1997).
15. J. C. Morris, *J. Phys. Chem.* **70**, 3798 (1966).
16. И. В. Горудко, О. С. Черкалина, А. В. Соколов и др., *Биоорг. химия* **35**, 629 (2009).
17. A. V. Timoshenko, K. Kayser, and H. J. Gabius, *Methods Mol. Med.* **9**, 441 (1998).
18. I. V. Gorudko, D. V. Grigorieva, E. V. Shamova, et al., *Free Radic. Biol. Med.* **68**, 326 (2014).
19. И. В. Горудко, Т. В. Вахрушева, А. В. Мухортова и др., *Биол. мембраны* **27**, 314 (2010).
20. Ю. А. Владимиров и Е. В. Проскурнина, *Успехи биол. химии* **49**, 341 (2009).
21. E. P. Brestel, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **126**, 482 (1985).
22. О. М. Панасенко, А. В. Чеканов, И. И. Власова и др., *Биофизика* **53**, 573 (2008).
23. Y. Li, H. Zhu, P. Kuppusamy, et al., *J. Biol. Chem.* **273**, 2015 (1998).
24. I. B. Afanas'ev, E. A. Ostrakhovitch, E. V. Mikhal'chik, et al., *Luminescence* **16**, 305 (2001).
25. M. C. Vissers and C. C. Winterbourn, *Biochem. J.* **245**, 277 (1987).
26. R. Floris and R. Wever, *Eur. J. Biochem.* **207**, 697 (1992).
27. A. V. Sokolov, K. V. Ageeva, O. S. Cherkalina, et al., *Chem. Phys. Lipids* **163**, 347 (2010).

Production of Reactive Oxygen and Halogen Species by Neutrophils in Response to Monomeric Forms of Myeloperoxidase

I.V. Gorudko*, **E.V. Mikhailchik****, **A.V. Sokolov**** *** **** *****, **D.V. Grigorieva***,
V.A. Kostevich** ***, **V.B. Vasilyev***** *****, **S.N. Cherenkevich***, and **O.M. Panasenko****

**Belarusian State University, prosp. Nezavisimosti 4, Minsk, 220030 Belarus*

***Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine, Federal Medical Biological Agency,
ul. Malaya Pirogovskaya 1a, Moscow, 119435 Russia*

****Institute of Experimental Medicine, ul. Akademika Pavlova 12, St.-Petersburg, 197376 Russia*

*****Saint-Petersburg State University, Universitetskaya nab. 7/9, St.-Petersburg, 199034 Russia*

******Centre of Preclinical Translational Research, Almazov National Medical Research Centre,
Dolgoozernaya ul. 43, St.-Petersburg, 197371 Russia*

It was shown for the first time that myeloperoxidase, a homodimer consisting of two disulfide-bonded identical protomers, which catalyzes the formation of hypochlorous acid (HOCl), decomposes under the action of HOCl into monomers (MPO-Cl). Dimeric myeloperoxidase can also be converted into monomers (hemi-myeloperoxidase) by reduction of the disulfide bond. We carried out a comparative study of the effects of two monomeric forms of myeloperoxidase, MPO-Cl and hemi-myeloperoxidase, and native dimeric myeloperoxidase in respect of their effect on the production of reactive oxygen ($\bullet\text{O}_2^-$ and H_2O_2) and halogen species (HOCl) by neutrophils. Neutrophil production of these species was monitored after addition of hemi-myeloperoxidase, MPO-Cl or dimeric myeloperoxidase and also after the subsequent addition of the activators, phorbol-12-myristate-13-acetate or N-formyl-Met-Leu-Phe. The production of HOCl was evaluated by chemiluminescence in the presence of luminol, of $\bullet\text{O}_2^-$ – by chemiluminescence in the presence of lucigenin and spectrophotometrically by the reduction of cytochrome *c*, of H_2O_2 – by a fluorimetric method using scopoletin. The results obtained indicate that MPO-Cl and hemi-myeloperoxidase, which can appear in the blood under the development of halogenative stress, do not prime neutrophil NADPH-oxidase and do not enhance the production of reactive oxygen ($\bullet\text{O}_2^-$ and H_2O_2) and halogen (HOCl) species.

Keywords: myeloperoxidase, hemi-myeloperoxidase, halogenative stress, reactive oxygen species, reactive halogen species, neutrophils