

УДК [577.3+547.867.6]

<https://doi.org/10.17816/MAJ19263-71>

### ЦЕЛЕСТИНОВЫЙ СИНИЙ В — ЗОНД ДЛЯ РЕГИСТРАЦИИ ПРОДУКЦИИ ХЛОРНОВАТИСТОЙ КИСЛОТЫ И HOCl-МОДИФИЦИРОВАННЫХ БЕЛКОВ

В.Е. Луценко<sup>1</sup>, Д.В. Григорьева<sup>1</sup>, И.В. Горудко<sup>1</sup>, С.Н. Черенкевич<sup>1</sup>, Н.П. Горбунов<sup>2</sup>, В.А. Костевич<sup>2,3</sup>, О.М. Панасенко<sup>3,4</sup>, А.В. Соколов<sup>2,3,5</sup>

<sup>1</sup> ГУ ВО «Белорусский государственный университет», Минск, Беларусь;

<sup>2</sup> ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург;

<sup>3</sup> ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины ФМБА», Москва;

<sup>4</sup> ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Минздрава России, Москва;

<sup>5</sup> ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург

Для цитирования: Луценко В.Е., Григорьева Д.В., Горудко И.В., и др. Целестиновый синий В — зонд для регистрации продукции хлорноватистой кислоты и HOCl-модифицированных белков // Медицинский академический журнал. — 2019. — Т. 19. — № 2. — С. 63–71. <https://doi.org/10.17816/MAJ19263-71>

Поступила: 01.04.2019

Одобрена: 20.05.2019

Принята: 30.05.2019

**Цель исследования** — изучить продукцию хлорноватистой кислоты (HOCl) и ее производных, обусловленную активностью миелопероксидазы нейтрофилов крови человека, флуоресцентным методом с использованием целестинового синего В.

**Материалы и методы.** Нейтрофилы выделяли из венозной крови здоровых доноров. В качестве агонистов использовали форбол 12-миристенат 13-ацетат, N-формил-метионил-лейцил-фенилаланин, лектины растительного происхождения, белки, модифицированные гипохлоритными кислотами. В качестве ингибиторов активности миелопероксидазы нейтрофилов и/или перехватчиков HOCl использовали N-ацетилцистеин, гидразид 4-аминобензойной кислоты, изониазид и церулоплазмин.

**Результаты.** В ходе исследований с применением широкого спектра агонистов и ингибиторов активности миелопероксидазы нейтрофилов и/или перехватчиков HOCl было доказано, что целестиновый синий В окисляется в суспензии стимулированных нейтрофилов в результате продукции ими HOCl и ее производных, обусловленной активностью миелопероксидазы. Окисление целестинового синего В наблюдалось и HOCl-модифицированным сывороточным альбумином человека (HSA-Cl). Моноклональные антитела класса IgM против HSA-Cl ингибировали окисление целестинового синего В в растворе модифицированного белка.

**Заключение.** Разработанный метод позволяет с высокой чувствительностью анализировать HOCl-модифицированные белки (хлорамины и др.), исследовать влияние различных агонистов и лекарственных препаратов на респираторный взрыв нейтрофилов, экзоцитоз и активность миелопероксидазы.

**Ключевые слова:** целестиновый синий В; хлорноватистая кислота; миелопероксидаза; нейтрофилы; флуоресценция.

### CELESTINE BLUE B AS A SENSOR FOR HYPOCHLOROUS ACID AND HOCL-MODIFIED PROTEINS REGISTRATION

V.E. Lutsenko<sup>1</sup>, D.V. Grigorieva<sup>1</sup>, I.V. Gorudko<sup>1</sup>, S.N. Cherenkevich<sup>1</sup>, N.P. Gorbunov<sup>2</sup>, V.A. Kostevich<sup>2,3</sup>, O.M. Panasencko<sup>3,4</sup>, A.V. Sokolov<sup>2,3,5</sup>

<sup>1</sup> Belarusian State University, Minsk, Belarus;

<sup>2</sup> Research Institute of Experimental Medicine, Saint Petersburg, Russia;

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

<sup>4</sup> Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia;

<sup>5</sup> Saint Petersburg State University, Saint Petersburg, Russia

For citation: Lutsenko VE, Grigorieva DV, Gorudko IV, et al. Celestine blue B as a sensor for hypochlorous acid and HOCL-modified proteins registration. *Medical Academic Journal*. 2019;19(2):63-71. <https://doi.org/10.17816/MAJ19263-71>

Received: April 1, 2019

Revised: May 20, 2019

Accepted: May 30, 2019

#### Список сокращений

4-АВАН — гидразид 4-аминобензойной кислоты; САВА — *Caragana arborescens* агглютинин; СВ — целестиновый синий В; Соп А — *Canavalia ensiformis* агглютинин; СР — церулоплазмин; cyth b — цитохалазин b; fMLP — N-формил-метионил-лейцил-фенилаланин; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> — пероксид водорода; HOCl — хлорноватистая кислота; HSA — сывороточный альбумин человека; HSA-Cl — модифицированный хлорноватистой кислотой сывороточный альбумин человека; INH — изониазид; МРО — миелопероксидаза; NAC — N-ацетилцистеин; •O<sub>2</sub><sup>-</sup> — супероксидный анион-радикал; PBS — фосфатно-солевой буфер; PHA-L — *Phaseolus vulgaris* агглютинин; PMA — форбол-12-миристенат-13-ацетат; SBA — *Glycine hispida* агглютинин; VAA — *Viscum Album* агглютинин; WGA — *Triticum vulgaris* агглютинин.

**Objective** — the study of hypochlorous acid (HOCl) and its derivatives production, which catalyzed by human neutrophil myeloperoxidase, using “turn-on” fluorescent sensor — celestine blue B.

**Materials and methods.** Neutrophils were isolated from the venous blood of healthy donors. Phorbol 12-myristate 13-acetate, N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine, plant lectins, HOCl-modified proteins were used as agonists. N-acetylcysteine, 4-aminobenzoic acid hydrazide, isoniazid and ceruloplasmin were used as regulators of neutrophil myeloperoxidase activity and/or HOCl scavengers.

**Results.** Using a wide range of agonists and inhibitors, it has been shown that celestine blue B is oxidized *in vitro* by HOCl and its derivatives as a result of neutrophil myeloperoxidase activity. The oxidation of celestine blue B by HOCl-modified human serum albumin (HSA-Cl) and inhibition of this process by monoclonal antibody against HSA-Cl (IgM class) was also found.

**Conclusion.** Based on the developed method using celestine blue B, it is possible to conduct a sensitive analysis for the presence of HOCl-modified proteins (chloramines, etc.), to investigate the effect of various agonists and drugs on myeloperoxidase activity and exocytosis from the neutrophil granules.

**Keywords:** celestine blue B; HOCl; myeloperoxidase; neutrophils; fluorescence.

## Введение

Хлорноватистая кислота (HOCl) образуется в живых организмах из пероксида водорода ( $H_2O_2$ ) и хлорид-ионов в реакции, катализируемой гем-содержащим ферментом азурофильных гранул нейтрофилов — миелопероксидазой (МРО). Критический этап активации нейтрофилов — сборка NADPH-оксидазного комплекса в ответ на провоспалительный стимул, который обеспечивает так называемый «кислородный (респираторный) взрыв». Его результатом является синтез нейтрофилами супероксидного анион-радикала ( $\cdot O_2^-$ ), который спонтанно либо с участием ферментов дисмутирует до  $H_2O_2$  (субстрата МРО) для синтеза HOCl [1].

HOCl представляет собой мощный антимикробный агент, который играет ключевую роль в иммунной системе, способствуя уничтожению патогенов [1]. Однако чрезмерная продукция HOCl сопровождается модификацией белков, липидов, нуклеиновых кислот, приводит к развитию галогенирующего стресса, который ассоциирован с возникновением многочисленных заболеваний [2]. Так, участие МРО и/или наличие HOCl-модифицированных белков, аминокислот, липидов, нуклеотидов и других производных характерно для таких заболеваний, как атеросклероз, астма, сепсис, артрит, метаболический синдром, болезни Альцгеймера и Паркинсона, некоторые виды рака и др. [2, 3].

Вследствие высокой биологической активности МРО разработка высокочувствительных и селективных зондов для регистрации продукции HOCl остается важной задачей в биологии и медицине [4]. При этом флуоресцентный метод с использованием чувствительных молекулярных зондов признан одним из самых мощных инструментов для обнаружения малых количеств HOCl и ее производных в биологических образцах благодаря сочетанию высокой чувствительности, простоты и эффективности [5].

Однако прямая регистрация продукции HOCl в биологических системах затруднена из-за ее высокой реакционной способности. По этой причине для регистрации HOCl используют перехватчик — таурин. Применяемые для регистрации хлораминов таурина ароматические тиолы не позволяют эффективно определять образование хлораминов при нейтральном pH, а также могут служить субстратом пероксидазного цикла МРО [6]. Недавно было показано, что перспективным красителем для регистрации HOCl является целестиновый синий В (СВ), который с высокой скоростью образует гликоль розовой окраски, характеризующийся максимумом флуоресценции при 590 нм в случае возбуждения светом с длиной волны 460 нм [7, 8]. В данной работе флуоресцентным методом с использованием СВ было изучено влияние стимуляторов различной природы на продукцию HOCl и HOCl-модифицированных белков нейтрофилами.

**Цель** данной работы состояла в изучении продукции HOCl и ее производных нейтрофилами крови человека с использованием СВ в качестве флуоресцентного хемосенсора (тип turn-on).

## Материалы и методы

В работе применяли: цитрат натрия, фобол-12-миристан-13-ацетат (РМА), N-формил-метионил-лейцил-фенилаланин (fMLP), целестиновый синий В (СВ), гидразид 4-аминобензойной кислоты (4-АВАН), гистопак-1077, сывороточный альбумин человека (HSA) фирмы Sigma-Aldrich (США); декстран Т70 фирмы Roth (Германия); лектины фирмы НПК Лектинотест (Украина). Остальные реактивы получены от заводов «Реахим» (Россия) и Белмедпрепараты (Беларусь).

Перечень используемых лектинов растений: WGA (*Triticum vulgaris* агглютинин) — GlcNAc

специфичный лектин зародышей пшеницы; CABA (*Caragana arborescens* агглютинин) — лектин караганы древовидной, специфичный к остаткам GalNAc; Con A (*Canavalia ensiformis* агглютинин) — маннозосвязывающий лектин семян канавалии мечевидной; галактозоспецифичный лектин сои SBA (*Glycine hispida* агглютинин); галактозоспецифичный лектин омелы белой VAA (*Viscum Album* агглютинин), а также GalNAc/галактозоспецифичный лектин семян фасоли обыкновенной PNA-L (*Phaseolus vulgaris* агглютинин).

Венозную кровь здоровых доноров, стабилизированную 109 мМ раствором цитрата натрия (9 : 1, v/v), получали из Республиканского научно-практического центра гематологии и медицинских биотехнологий (Минск, Беларусь). 20 мл крови смешивали с 6 % раствором декстрана T70 (5 : 1, v/v) и осаждали эритроциты в течение 40 мин при комнатной температуре. Слой обогащенной лейкоцитами плазмы собирали в пробирки и центрифугировали в течение 7 мин при 400 g. Далее примесь эритроцитов удаляли гипотоническим лизисом, добавляя к осадку клеток сначала 3 мл охлажденного 0,2 % NaCl, а затем восстанавливали изотоничность путем добавления 3 мл 1,6 % NaCl, содержащего 20 мг/мл D-глюкозы. Полученную суспензию центрифугировали в течение 7 мин при 400 g. Если смесь клеток содержала эритроциты, гипотонический лизис проводили повторно. Осадок клеток ресуспендировали в 6 мл фосфатно-солевого буфера (PBS), содержащего 10 мМ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 137 мМ NaCl и 2,7 мМ KCl (pH 7,35), наслаивали на 4 мл гистобака-1077 и центрифугировали в течение 10 мин при 400 g при комнатной температуре. Полученный осадок нейтрофилов отмывали PBS, содержащим 2 мг/мл D-глюкозы, и хранили при 4 °C в течение нескольких часов. Доля нейтрофилов в клеточной суспензии составляла 97–98 %, а доля жизнеспособных клеток по тесту с трипановым синим — не менее 96 %.

Производство НОСІ и ее производных оценивали флуоресцентным методом с использованием СВ. К 1 мл суспензии нейтрофилов (10<sup>6</sup> кл/мл в PBS, содержащем 1 мМ CaCl<sub>2</sub>, 0,5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 20 мМ таурина) добавляли 20 мкМ СВ, активатор и при необходимости 2,5 мкг/мл цитохалазина b (cyth b). Кинетику окисления СВ регистрировали по увеличению интенсивности флуоресценции (длина волны возбуждения — 460 нм, длина волны регистрации — 590 нм) на спектрофлуориметре CM 2203 (СОЛАР, Минск, Беларусь) при 37 °C и постоянном перемешивании. Для характеристики продукции НОСІ и образования хлорированных производных определяли скорость

окисления СВ (v) — как тангенс угла наклона начального линейного участка кривой изменения интенсивности флуоресценции и амплитуду реакции ( $h_{15}$ ) — изменение интенсивности флуоресценции по сравнению с фоновым уровнем через 15 мин после начала активации.

Препарат церулоплазмина (CP) выделяли из цитратной плазмы при помощи ионообменной хроматографии (UNOsphere™Q, Bio-Rad, США) и аффинной хроматографии (неомицин-агароза). Следы протромбина и тромбина удаляли путем фильтрации препарата через колонки с гепарин- и бензамидин-агарозой [9].

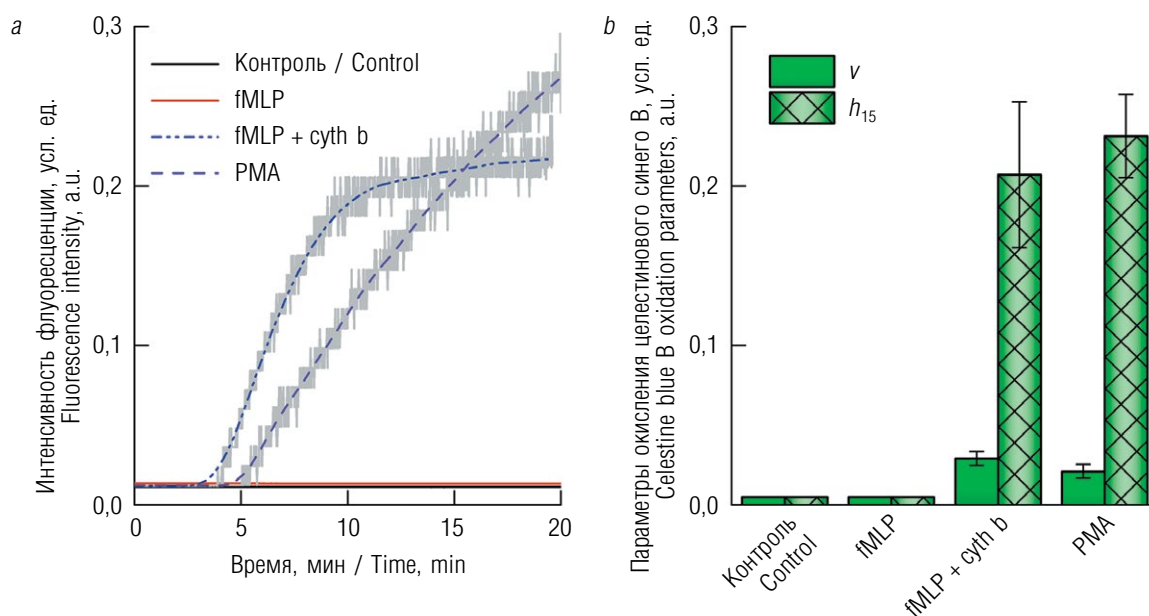
HSA модифицировали при комнатной температуре в течение 1,5–2 ч [10]. 30 мМ HOCl добавляли к раствору HSA (0,3 мМ) в PBS (на 1 молекулу белка приходится 100 молекул HOCl). Отсутствие непрореагировавшей HOCl в растворе модифицированного сывороточного альбумина человека (HSA-Cl) оценивали флуоресцентным методом с использованием скополетина [11].

Для получения моноклональных антител против HSA-Cl применяли метод Мильштейна — Келлера [12]. Для отбора гибридом выбирали клоны, продуцировавшие в культуральную среду антитела против HSA-Cl при негативной реакции с немодифицированным HSA. Отобранный клон 1H2 (класс антител IgM) инокулировали сенсibilизированным прикостом мышам (F2-гибриды BALB/c × DBA, питомник Рапполово) и через 2 нед. собирали асцитную жидкость. Грубую очистку IgM проводили при криопреципитации, а затем фракционировали антитела с помощью гelfiltrации на колонке с Sephacryl S-400 HR, уравновешенной PBS. Свойства полученных антител проверяли с помощью твердофазного иммуноферментного анализа с использованием HSA-Cl.

Статистическую и графическую обработку данных выполняли в пакете программ OriginPro 2016. Данные представлены как среднее ± стандартная ошибка среднего. Наблюдаемые эффекты считали достоверными при  $p < 0,05$ , рассчитанной по критерию Стьюдента.

## Результаты и их обсуждение

На первом этапе исследования был проведен анализ влияния таких агонистов, как фоболовый эфир РМА, а также хемотаксический пептид fMLP (в отсутствие и в присутствии cyth b) на изменение параметров флуоресцентного ответа нейтрофилов с использованием СВ. Полученные данные представлены на рис. 1. Видно, что окисление красителя происходит при активации нейтрофилов РМА и в системе



**Рис. 1.** Типичные кинетические кривые окисления целестинового синего В (а) и характеризующие данный процесс параметры (b) в суспензии нейтрофилов, активированных форболовым эфиром (PMA, 50 нМ) либо хемотаксическим пептидом (fMLP, 1 мкМ) в отсутствие и в присутствии цитохалазина b (cyth b, 2,5 мг/л)

**Fig. 1.** Typical kinetic curves of CB oxidation (a) and parameters characterizing this process (b) in suspension of neutrophils activated by phorbol ester (PMA, 50 nM) or chemotactic peptide (fMLP, 1  $\mu$ M) in the absence and presence of cytochalasin b (cyth b, 2.5 mg/L)

fMLP + cyth b, но не в случае fMLP без cyth b. Следовательно, окисление СВ происходит вследствие продукции HOCl и образования ее производных. Так, PMA напрямую активирует протеинкиназу C, что ведет к сборке и активации NADPH-оксидазы нейтрофилов [13] и дегрануляции азурофильных гранул, содержащих МРО [14]. При этом хемотаксический пептид fMLP взаимодействует с рецепторами, ассоциированными с G-белками, и, запуская каскад реакций через  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимый механизм, инициирует сборку и активацию NADPH-оксидазы [15], не влияя на дегрануляцию азурофильных гранул. Для экзоцитоза МРО при активации fMLP необходима предварительная инкубация нейтрофилов с cyth b, который препятствует полимеризации F-актина [16].

Процесс окисления СВ в суспензии нейтрофилов, активированных PMA, исследовали в присутствии ингибиторов МРО и сквенджеров HOCl: гидразида 4-аминобензойной кислоты (4-АВАН), изониазида (INH), N-ацетилцистеина (NAC) и СР (табл. 1).

Действие 4-АВАН связано с медленной необратимой ковалентной инактивацией соединения I МРО [17]. INH, структурный аналог 4-АВАН, конкурирует с  $\text{Cl}^-$  за окисление в активном центре соединения I МРО с последующим функционированием фермента по путям, включающим соединение II, гем в двухвалентном состоянии и соединение III, которые выводят фермент из цикла галогенирования [18].

СР, медь-содержащий белок плазмы крови, также ингибирует хлорирующую активность

Таблица 1 / Table 1

**Влияние ингибиторов миелопероксидазы и сквенджеров хлорноватистой кислоты на параметры окисления целестинового синего В в суспензии нейтрофилов, активированных форбол-12-миристат-13-ацетатом (50 нМ)**

**The effect of MPO inhibitors and scavengers of HOCl on parameters of CB oxidation in suspension of PMA-stimulated neutrophils (50 nM)**

Вещество	Концентрация, мкМ	$v$ , % контроля	$h_{15}$ , % контроля
4-АВАН	50	$56 \pm 7^*$	$57 \pm 8^*$
INH	500	$66 \pm 8^*$	$66 \pm 7^*$
NAC	500	$56 \pm 1^*$	$56 \pm 2^*$
СР	1,1	$0^{**}$	$0^{**}$

**Примечание.** За 100 % принимали  $v$  и  $h_{15}$  в суспензии PMA-стимулированных клеток без добавления ингибиторов; \*  $p < 0,05$ ; \*\* сигнал не превышал фонового уровня.

МРО за счет образования комплекса, блокируя активный центр фермента [7]. Более того, даже при модификации продуктами катализа МРО (НОСІ или НОВr) ингибирующая активность СР сохраняется, в том числе по отношению к подавлению активности нейтрофилов [19, 20]. Из табл. 1 видно, что 4-АВАН, ІНН и СР приводили к снижению параметров окисления СВ в суспензии РМА-активированных нейтрофилов, что свидетельствует об уменьшении продукции НОСІ.

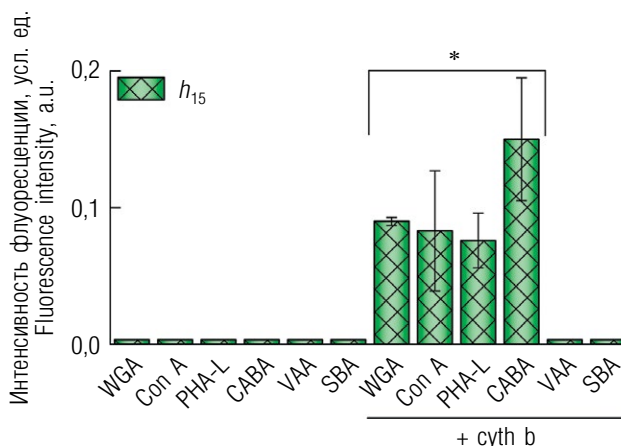
НАС, известный антиоксидант, быстро ( $k > 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) окисляется НОСІ [21], что отражается и на уменьшении параметров окисления СВ (см. табл. 1). Таким образом, окисление СВ при активации нейтрофилов РМА зависит от высвобождения и активности МРО, а также от наличия перехватчиков НОСІ.

Лектины — белки или гликопротеины, обладающие по крайней мере одним некаталитическим доменом, который обратимо и специфически связывает моно- или олигосахариды [22]. К настоящему времени лектины обнаружены во всех живых организмах, однако наибольшее применение получили лектины растительного и животного происхождения. Лектины играют важную роль в различных процессах: межклеточной адгезии, клеточной сигнализации, взаимодействии между организмом и патогеном, а потому являются потенциальными лекарственными препаратами [23].

Ранее было показано, что многие лектины растительного происхождения способны активировать продукцию  $\cdot\text{O}_2^-$  и  $\text{H}_2\text{O}_2$  нейтрофилами, а также экзоцитоз содержимого гранул нейтрофилов [24, 25]. В данной работе было исследовано влияние лектинов растительного происхождения WGA, CABA, Con A, PHA-L, SBA (100 мг/л) и VAA (50 мг/л) на продукцию НОСІ и ее производных нейтрофилами с использованием СВ. Об образовании НОСІ и, соответственно, высвобождении МРО судили по изменению интенсивности флуоресценции раствора вследствие окисления СВ ( $h_{15}$ , рис. 2).

Как видно из приведенных данных, лектины SBA и VAA в используемых концентрациях не влияли на продукцию НОСІ, в то время как WGA, CABA, Con A и PHA-L стимулировали продукцию НОСІ нейтрофилами. Следует отметить, что все исследуемые лектины вызывали активацию NADPH-оксидазы [26], однако дегрануляция нейтрофилов наблюдалась лишь в присутствии cyth b, что хорошо согласуется с данными литературы [16, 26, 27].

Галогенированные молекулы можно отнести к новому классу регуляторов воспаления, поскольку они способны активировать и/или праймировать нейтрофилы по принципу по-



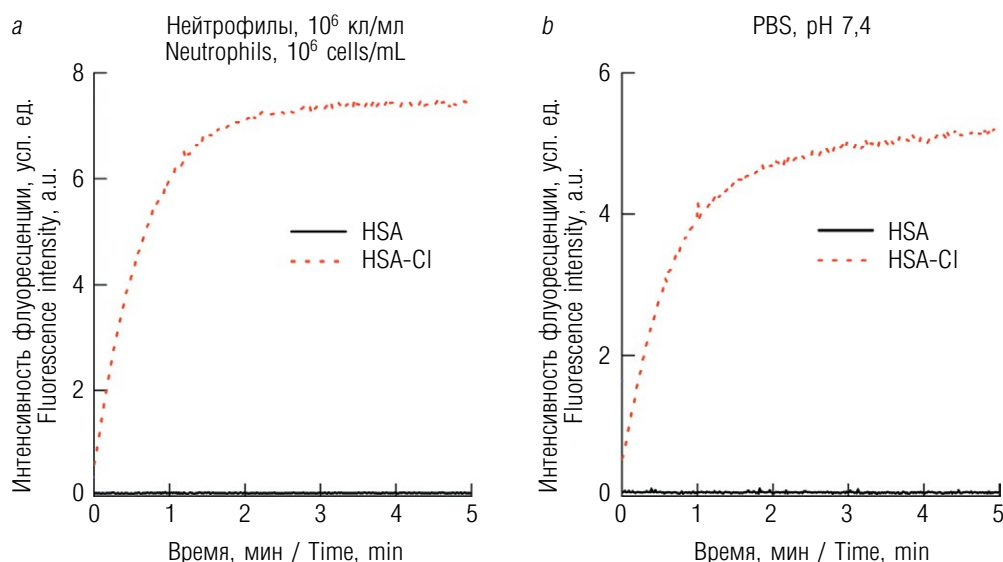
**Рис. 2.** Влияние лектинов зародышей пшеницы (WGA, 100 мг/л), семян канавалии мечевидной (Con A, 100 мг/л), семян фасоли обыкновенной (PHA-L, 100 мг/л), караганы древовидной (CABA, 100 мг/л), омелы белой (VAA, 50 мг/л), сои (SBA, 100 мг/л) в отсутствие и в присутствии цитохалазина b (cyth b, 2,5 мг/л) на окисление целестинового синего В в суспензии нейтрофилов. \* $p < 0,05$

**Fig. 2.** The effect of lectins from wheat germ (WGA, 100 mg/L), jack bean seeds (Con A, 100 mg/L), bean seeds (PHA-L, 100 mg/L), caragana tree (CABA, 100 mg/L), mistletoe (VAA, 50 mg/L), soy (SBA, 100 mg/L) in the absence and in the presence of cytochalasin b (cyth b, 2.5 mg/L) on the CB oxidation in neutrophils suspension. \* $p < 0.05$

ложительной обратной связи [10, 11, 26, 27]. Так, было показано, что HSA, один из преобладающих белков плазмы крови, при модификации гипогалоидными кислотами (НОСІ и НОВr) приобретал способность активировать NADPH-оксидазу, а также инициировать дегрануляцию нейтрофилов [10, 11]. В связи с этим было исследовано влияние HSA-Cl на продукцию НОСІ нейтрофилами с применением СВ (рис. 3).

Как видно из рис. 3, добавление модифицированного HSA (1 г/л) вызывало окисление СВ в суспензии нейтрофилов, что видно по увеличению флуоресценции раствора относительно добавки немодифицированного HSA. Чтобы исключить возможный вклад модифицированного белка в этот процесс, было исследовано влияние HSA-Cl на окисление СВ в растворе. Выяснилось, что добавление HSA-Cl к раствору СВ в отсутствие клеток также вызывало быстрое окисление красителя. Следует отметить, что присутствие непрореагировавшей с HSA НОСІ не было выявлено в предварительных экспериментах с использованием скополетина, который окисляется НОСІ (данные не представлены).

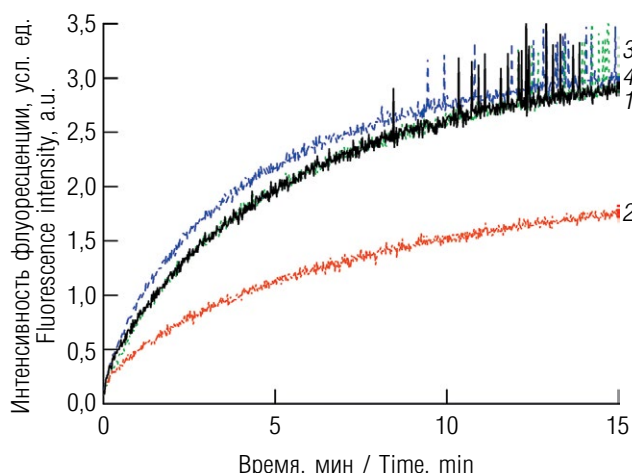
Было также показано, что моноклональные антитела класса IgM против HSA-Cl (1H2, 0,168 г/л), позволяющие анализировать накоп-



**Рис. 3.** Влияние HSA-Cl (1 г/л) на окисление целестинового синего В в суспензии нейтрофилов (а) и в фосфатно-солевом буфере (б)

**Fig. 3.** The effect of HSA-Cl (1 g/L) on CB oxidation in the neutrophils suspension (a) and in PBS (b)

ление иммунореактивных групп в HSA после модификации HOCl, ингибировали окисление СВ в растворе HSA-Cl (рис. 4). При этом действие антител 1H2 было специфичным, поскольку добавление в систему немодифицированного HSA (см. рис. 4, кривые 3, 4) не оказывало значимого эффекта на окисление СВ, следовательно, речь идет не об эффекте аминокислот антител как сквенджеров HOCl либо ее производных.



**Рис. 4.** Влияние моноклональных антител против HSA-Cl (1H2, 0,168 г/л, кривая 2) на окисление целестинового синего В в растворе HSA-Cl (0,125 г/л, кривая 1). Отрицательный контроль на фоне сывороточного альбумина человека (0,168 и 0,336 г/л, кривые 3 и 4)

**Fig. 4.** The effect of monoclonal antibodies against HSA-Cl (1H2, 0.168 g/L, curve 2) on CB oxidation in HSA-Cl solution (0.125 g/L, curve 1). Negative control on the background of HSA (0.168 g/L and 0.336 g/L, curves 3 and 4)

Среди аминокислотных остатков HSA, реагирующих с HOCl, с помощью техники хроматографии и масс-спектрометрии были идентифицированы Met147, Met353, Met572, Trp238 и др. [28]. В нашей недавней работе по HOCl-модификации HSA было зафиксировано уменьшение флуоресценции остатков триптофана [29]. При сравнении констант скорости реакции СВ и аминокислотных остатков с HOCl был сделан вывод, что только цистеин и метионин реагируют с HOCl быстрее, чем СВ [7]. Вероятно, продукты реакции лизина, триптофана и гистидина с HOCl в HSA реагируют с СВ с образованием флуоресцирующего гликоля.

Таким образом, с помощью СВ возможно проведение чувствительного анализа на наличие хлорированных продуктов, комплексное исследование влияния различных агонистов и лекарственных препаратов на выход МРО из азурофильных гранул нейтрофилов, ее активность, а также эффективность сборки и активации NADPH-оксидазного ферментного комплекса.

Флуоресцентный анализ белков с применением красителя СВ может быть использован для разработки новых методов обнаружения галогенированных функциональных групп в белковых молекулах (хлораминов и др.).

### Дополнительная информация

**Финансирование.** Работа выполнена при поддержке грантов БРФФИ № Б18Р-058 и Б19РМ-024, грантов РФФИ № 18-515-00004 и 19-54-04004.

**Соблюдение этических норм.** Исследование одобрено протоколом локального этического комитета при ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины».

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

## Литература

1. Winterbourn CC, Kettle AJ. Redox reactions and microbial killing in the neutrophil phagosome. *Antioxid Redox Signal*. 2013;18(6):642-660. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.4827>.
2. Panasenko OM, Gorudko IV, Sokolov AV. Hypochlorous acid as a precursor of free radicals in living systems. *Biochemistry (Mosc)*. 2013;78(13):1466-1489. <https://doi.org/10.1134/S0006297913130075>.
3. Aratani Y. Myeloperoxidase: its role for host defense, inflammation, and neutrophil function. *Arch Biochem Biophys*. 2018;640:47-52. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2018.01.004>.
4. Liu SR, Wu SP. Hypochlorous acid turn-on fluorescent probe based on oxidation of diphenyl selenide. *Org Lett*. 2013;15(4):878-881. <https://doi.org/10.1021/ol400011u>.
5. Zhang R, Song B, Yuan J. Bioanalytical methods for hypochlorous acid detection: recent advances and challenges. *Trends Analyt Chem*. 2018;99:1-33. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2017.11.015>.
6. Bertoza LC, Zeraik ML, Ximenes VF. Dansylglycine, a fluorescent probe for specific determination of halogenating activity of myeloperoxidase and eosinophil peroxidase. *Anal Biochem*. 2017;532:29-37. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2017.05.029>.
7. Sokolov AV, Kostevich VA, Kozlov SO, et al. Kinetic method for assaying the halogenating activity of myeloperoxidase based on reaction of celestine blue B with taurine halogenamines. *Free Radic Res*. 2015;49(6):777-789. <https://doi.org/10.3109/10715762.2015.1017478>.
8. Козлов С.О., Кудрявцев И.В., Грудина Н.А., и др. Активированные нейтрофилы, продуцирующие HOCL, выявляющиеся при проточной цитометрии и конфокальной микроскопии с помощью целестинового синего В // *Acta Biomedica Scientifica*. – 2016. – Т. 1. – № 3–2. – С. 86–91. [Kozlov SO, Kudryavtsev IV, Grudinina NA, et al. Activated producing HOCL neutrophils revealed by flow cytometry and confocal microscopy with celestine blue B. *Acta Biomedica Scientifica*. 2016;1(3-2):86-91. (In Russ.)]. [https://doi.org/10.12737/article\\_590823a4895537.04307905](https://doi.org/10.12737/article_590823a4895537.04307905).
9. Sokolov AV, Acquasaliente L, Kostevich VA, et al. Thrombin inhibits the anti-myeloperoxidase and ferroxidase functions of ceruloplasmin: relevance in rheumatoid arthritis. *Free Radic Biol Med*. 2015;86:279-294. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.05.016>.
10. Михальчик Е.В., Смолина Н.В., Астамирова Т.С., и др. Альбумин сыворотки крови, модифицированный в условиях окислительного/галогенирующего стресса, усиливает люминолзависимую хемилюминесценцию нейтрофилов человека // *Биофизика*. – 2013. – Т. 58. – № 4. – С. 681–689. [Mikhalechik EV, Smolina NV, Astamirova TC, et al. Human serum albumin modified under oxidative/halogenative stress enhances luminol-dependent chemiluminescence of human neutrophils. *Biophysics*. 2013;58(4):530-536. (In Russ.)]. <https://doi.org/10.1134/S0006350913040118>.
11. Gorudko IV, Grigorieva DV, Shamova EV, et al. Hypochlorous acid-modified human serum albumin induces neutrophil NADPH oxidase activation, degranulation, and shape change. *Free Radic Biol Med*. 2014;68:326-334. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.12.023>.
12. Freydsottir J. Production of monoclonal antibodies. *Methods Mol Med*. 2000;40:267-279. <https://doi.org/10.1385/1-59259-076-4:267>.
13. Keshari RS, Verma A, Barthwal MK, Dikshit M. Reactive oxygen species-induced activation of ERK and p38 MAPK mediates PMA-induced NETs release from human neutrophils. *J Cell Biochem*. 2013;114(3):532-540. <https://doi.org/10.1002/jcb.24391>.
14. Ganji SH, Kamanna VS, Kashyap ML. Niacin decreases leukocyte myeloperoxidase: mechanistic role of redox agents and Src/p38MAP kinase. *Atherosclerosis*. 2014;235(2):554-561. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2014.05.948>.
15. Lindemann O, Strodtz C, Horstmann M, et al. TRPC1 regulates fMLP-stimulated migration and chemotaxis of neutrophil granulocytes. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*. 2015;1853(9):2122-2130. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2014.12.037>.
16. Grigorieva DV, Gorudko IV, Kostevich VA, et al. Myeloperoxidase exocytosis from activated neutrophils in the presence of heparin. *Biochemistry (Moscow)*. Supplement Series B: Biomedical Chemistry. 2018;12(2):136-142. <https://doi.org/10.1134/S199075081802004X>.
17. Huang J, Smith F, Panizzi P. Ordered cleavage of myeloperoxidase ester bonds releases active site heme leading to inactivation of myeloperoxidase by benzoic acid hydrazide analogs. *Arch Biochem Biophys*. 2014;548:74-85. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2014.02.014>.
18. Forbes LV, Furtmüller PG, Khalilova I, et al. Isoniazid as a substrate and inhibitor of myeloperoxidase: identification of amine adducts and the influence of superoxide dismutase on their formation. *Biochem Pharmacol*. 2012;84(7):949-960. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2012.07.020>.
19. Sokolov AV, Kostevich VA, Varfolomeeva EY, et al. 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*. 2018;96(4):457-467. <https://doi.org/10.1139/bcb-2017-0277>.
20. Varfolomeeva EY, Semenova EV, Sokolov AV, et al. Ceruloplasmin decreases respiratory burst reaction during pregnancy. *Free Radic Res*. 2016;50(8):909-919. <https://doi.org/10.1080/10715762.2016.1197395>.
21. Storkey C, Davies MJ, Pattison DI. Reevaluation of the rate constants for the reaction of hypochlorous acid (HOCL) with cysteine, methionine, and peptide derivatives using a new competition kinetic approach. *Free Radic Biol Med*. 2014;73:60-66. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.04.024>.

22. Van Damme EJ. History of plant lectin research. *Methods Mol Biol.* 2014;1200:3-13. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1292-6\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1292-6_1).
23. Кобелев А.В., Сироткин А.С. Лектины: обзор свойств и перспектив использования в биотехнологии // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. — 2018. — Т. 14. — № 2. — С. 60–67. [Kobelev AV, Sirotkin AS. Lectins: a review of properties and prospects for use in biotechnology. *Yu.A. Ovchinnikov bulletin of biotechnology and physical and chemical biology.* 2018;14(2):60-67. (In Russ.)]
24. Pereira-da-Silva G, Caroline FC, Roque-Barreira MC. Neutrophil activation induced by plant lectins: modulation of inflammatory processes. *Inflamm Allergy Drug Targets.* 2012;11(6):433-441. <https://doi.org/10.2174/187152812803589985>.
25. Timoshenko AV, Gorudko IV, Gabius HJ. Lectins from medicinal plants: Bioeffectors with diverse activities. In: *Phytochemicals – Biosynthesis, Function and Application*. Ed. by R. Jetter. Vol. 44. Cham: Springer; 2014. P. 43-56. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-04045-5\\_3](https://doi.org/10.1007/978-3-319-04045-5_3).
26. Луценко В.Е., Григорьева Д.В., Черенкевич С.Н., и др. Флуоресцентный метод оценки функциональной активности нейтрофилов // Актуальные вопросы биологической физики и химии. — 2018. — Т. 3. — № 3. — С. 612–618. [Lutsenko VE, Grigorieva DV, Cherenkevich SN, et al. Fluorescent method for estimation neutrophils functional activity. *Aktual'nye voprosy biologicheskoy fiziki i khimii.* 2018;3(3):612-618. (In Russ.)]
27. Gorudko IV, Vakhrusheva TV, Mukhortova AV, et al. The priming effect of halogenated phospholipids on the functional responses of human neutrophils. *Biochemistry (Moscow)*. Supplement Series A: Membrane and Cell Biology. 2010;4(3):262-271. <https://doi.org/10.1134/S1990747810030037>.
28. Salavej P, Spalteholz H, Arnhold J. Modification of amino acid residues in human serum albumin by myeloperoxidase. *Free Radic Biol Med.* 2006;40(3):516-525. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2005.09.007>.
29. Vlasova II, Sokolov AV, Kostevich VA, et al. Myeloperoxidase-induced oxidation of albumin and ceruloplasmin: role of tyrosines. *Biochemistry (Moscow)*. 2019;84(6):652-662. <https://doi.org/10.1134/S0006297919060087>.

#### Сведения об авторах / Information about the authors

**Вероника Евгеньевна Луценко** — аспирант кафедры биофизики физического факультета Белорусского государственного университета, Минск, Беларусь. SPIN-код: 1647-2893. E-mail: nika.lutsenko@tut.by.

**Дарья Владимировна Григорьева** — канд. биол. наук, старший научный сотрудник НИЛ биофизики и биотехнологии кафедры биофизики физического факультета Белорусского государственного университета, Минск, Беларусь. <https://orcid.org/0000-0003-0210-5474>; SPIN-код: 2479-7785. E-mail: dargr@tut.by.

**Ирина Владимировна Горудко** — канд. биол. наук, доцент, доцент кафедры биофизики физического факультета Белорусского государственного университета, Минск, Беларусь. SPIN-код: 8968-3125. E-mail: irinagorudko@gmail.com.

**Сергей Николаевич Черенкевич** — д-р биол. наук, профессор, академик НАН Беларуси, профессор кафедры биофизики физического факультета Белорусского государственного университета, Минск, Беларусь. SPIN-код: 6493-9551. E-mail: cherenkevich@bsu.by.

**Николай Петрович Горбунов** — аспирант, научный сотрудник отдела молекулярной генетики ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург. <https://orcid.org/0000-0003-4636-0565>; SPIN-код: 6289-7281. E-mail: niko\_laygo@mail.ru.

**Валерия Александровна Костевич** — канд. биол. наук, старший научный сотрудник отдела молекулярной генетики ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург; научный сотрудник отдела биофизики ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины ФМБА», Москва. <https://orcid.org/0000-0002-1405-1322>; SPIN-код: 2726-2921. E-mail: hfa-2005@yandex.ru.

**Veronika E. Lutsenko** — PhD student, Department of Biophysics, Physics Faculty, Belarusian State University, Minsk, Belarus. SPIN-code: 1647-2893. E-mail: nika.lutsenko@tut.by.

**Daria V. Grigorieva** — PhD (Biology), Senior Researcher, Research Laboratory of Biophysics and Biotechnology, Department of Biophysics, Physics Faculty, Belarusian State University, Minsk, Belarus. <https://orcid.org/0000-0003-0210-5474>; SPIN-code: 2479-7785. E-mail: dargr@tut.by.

**Irina V. Gorudko** — PhD (Biology), Associate Professor, Associate Professor of the Department of Biophysics, Physics Faculty, Belarusian State University, Minsk, Belarus. SPIN-code: 8968-3125. E-mail: irinagorudko@gmail.com.

**Sergey N. Cherenkevich** — Doctor of Sciences (Biology), Professor, Academician of the NAS of Belarus, Professor of the Department of Biophysics, Physics Faculty, Belarusian State University, Minsk, Belarus. SPIN-code: 6493-9551. E-mail: cherenkevich@bsu.by.

**Nikolay N. Gorbunov** — PhD student, Research fellow of the Department of Molecular Genetics, Institute of Experimental Medicine, Saint Petersburg, Russia. <https://orcid.org/0000-0003-4636-0565>; SPIN-code: 6289-7281. E-mail: niko\_laygo@mail.ru.

**Valeria A. Kostevich** — PhD (Biology), Senior Researcher of the Department of Molecular Genetics, Institute of Experimental Medicine, Saint Petersburg, Russia; Research fellow of Department of Biophysics, Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine of Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russia. <https://orcid.org/0000-0002-1405-1322>; SPIN-code: 2726-2921. E-mail: hfa-2005@yandex.ru.

*Олег Михайлович Панасенко* — д-р биол. наук, профессор, заведующий отделом биофизики ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины ФМБА», Москва; старший научный сотрудник отдела медицинской физики ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Минздрава России, Москва. <https://orcid.org/0000-0001-5245-2285>; SPIN-код: 3035-6808. E-mail: o-panas@mail.ru.

*Алексей Викторович Соколов* — д-р биол. наук, заведующий лабораторией биохимической генетики отдела молекулярной генетики ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург; старший научный сотрудник отдела биофизики ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины ФМБА», Москва; профессор кафедры фундаментальных проблем медицины и медицинских технологий ФГБОУ ВПО «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург. <https://orcid.org/0000-0001-9033-0537>; SPIN-код: 7427-7395. E-mail: biochemsokolov@gmail.com.

*Oleg M. Panasenko* — Doctor of Sciences (Biology), Professor, Head of Department of Biophysics, Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine of Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russia; Senior Researcher of Department of Medical Physics, Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia. <https://orcid.org/0000-0001-5245-2285>; SPIN-code: 3035-6808. E-mail: o-panas@mail.ru.

*Alexey V. Sokolov* — Doctor of Biological Sciences, Head of the Laboratory of Biochemical Genetics of the Department of Molecular Genetics, Institute of Experimental Medicine; Saint Petersburg, Russia; Senior Researcher of Department of Biophysics, Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine of Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russia; Professor of Chair of Fundamental Problems of Medicine and Medical Technology at Saint Petersburg State University, Saint Petersburg, Russia. <https://orcid.org/0000-0001-9033-0537>; SPIN-code: 7427-7395. E-mail: biochemsokolov@gmail.com.

✉ Контактное лицо / Corresponding author

*Вероника Евгеньевна Луценко* / *Veronika E. Lutsenko*  
nika.lutsenko@tut.by