

## **СВЯЗЬ МЕЖДУ АКТИВНОЙ МИЕЛОПЕРОКСИДАЗОЙ И ХЛОРИРОВАННЫМ ЦЕРУЛОПЛАЗМИНОМ В ПЛАЗМЕ КРОВИ ПАЦИЕНТОВ С СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ**

**Соколов А.В.<sup>1,2,3,4</sup>, Костевич В.А.<sup>1,2</sup>, Горбунов Н.П.<sup>1</sup>, Григорьева Д.В.<sup>5</sup>,  
Горудко И.В.<sup>5</sup>, Васильев В.Б.<sup>1,3</sup>, Панасенко О.М.<sup>2,6</sup>**

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

<sup>2</sup> ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства» России, Москва, Россия

<sup>3</sup> ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург, Россия

<sup>4</sup> Центр доклинических трансляционных исследований, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

<sup>5</sup> Белорусский государственный университет, г. Минск, Республика Беларусь

<sup>6</sup> ГБОУ ВПО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

**Резюме.** Миелопероксидаза является ключевым фактором, отвечающим за развитие окислительного/галогенирующего стресса при воспалении. Ранее в плазме пациентов с воспалительными заболеваниями различной этиологии, в том числе при атеросклерозе, нами были обнаружены комплексы, образованные миелопероксидазой и ее физиологическим ингибитором, церулоплазмином. Анализ регуляции активности миелопероксидазы церулоплазмином показал, что при воспалении могут возникать условия, при которых церулоплазмин будет модифицирован хлорноватистой кислотой, НОСІ – специфическим продуктом катализа миелопероксидазы. Целью данного исследования был анализ связи между активностью миелопероксидазы и концентрацией церулоплазмينا, модифицированного НОСІ (хлорированного церулоплазмينا), в образцах плазмы крови пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями.

Были получены специфические антитела против миелопероксидазы, церулоплазмينا, в том числе модифицированного НОСІ, отработаны условия твердофазного иммуноферментного анализа. С помощью комбинации сорбции антигенов на твердой фазе и последующего выявления их собственной активности либо пероксидазной активности меченых антител были разработаны высокочувствительные методы определения миелопероксидазы (концентрация, пероксидазная и галогенирующая активность), концентрации церулоплазмينا, в том числе модифицированного НОСІ. Обнаружена положительная корреляция между концентрацией миелопероксидазы, ее активностью и концентрацией церулоплазмينا, модифицированного НОСІ. Выводы: впервые в плазме крови пациентов с сер-

### **Адрес для переписки:**

Соколов Алексей Викторович  
ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»  
197376, Россия, Санкт-Петербург, ул. Академика  
Павлова, 12.  
Тел.: 8 (812) 234-56-06, 234-94-89.  
E-mail: biochemsokolov@gmail.com

### **Address for correspondence:**

Sokolov Alexey V.  
Institute of Experimental Medicine  
197376, Russian Federation, St. Petersburg,  
Acad. Pavlov str., 12.  
Phone: 7 (812) 234-56-06, 234-94-89.  
E-mail: biochemsokolov@gmail.com

### **Образец цитирования:**

А.В. Соколов, В.А. Костевич, Н.П. Горбунов,  
Д.В. Григорьева, И.В. Горудко, В.Б. Васильев,  
О.М. Панасенко «Связь между активной  
миелопероксидазой и хлорированным церулоплазмином  
в плазме крови пациентов с сердечно-сосудистыми  
заболеваниями» // Медицинская иммунология, 2018. Т. 20,  
№ 5. С. 699–710.  
doi: 10.15789/1563-0625-2018-5-699-710

© Соколов А.В. и соавт., 2018

### **For citation:**

A.V. Sokolov, V.A. Kostevich, N.P. Gorbunov, D.V. Grigorieva,  
I.V. Gorudko, V.B. Vasilyev, O.M. Panasenkov. "A link between  
active myeloperoxidase and chlorinated ceruloplasmin in blood  
plasma of patients with cardiovascular diseases", *Medical  
Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2018,  
Vol. 20, no. 5, pp. 699–710.  
doi: 10.15789/1563-0625-2018-5-699-710

DOI: 10.15789/1563-0625-2018-5-699-710

дечно-сосудистыми заболеваниями обнаружен церулоплазмин, модифицированный HOCl. Получена достоверная положительная корреляционная зависимость между концентрацией хлорированного церулоплазмина и активностью миелопероксидазы. Предполагается, что физиологический ингибитор миелопероксидазы, церулоплазмин, претендует на роль мишени для продукта ее катализа — HOCl.

*Ключевые слова:* миелопероксидаза, галогенирующий стресс, церулоплазмин, пероксидазная активность, сердечно-сосудистые заболевания, биомаркер

## A LINK BETWEEN ACTIVE MYELOPEROXIDASE AND CHLORINATED CERULOPLASMIN IN BLOOD PLASMA OF PATIENTS WITH CARDIOVASCULAR DISEASES

Sokolov A.V.<sup>a, b, c, d</sup>, Kostevich V.A.<sup>a, b</sup>, Gorbunov N.P.<sup>a</sup>, Grigorieva D.V.<sup>e</sup>, Gorudko I.V.<sup>e</sup>, Vasilyev V.B.<sup>a, c</sup>, Panasenکو O.M.<sup>b, f</sup>

<sup>a</sup> Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

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

<sup>c</sup> St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russian Federation

<sup>d</sup> Centre of Preclinical Translational Research, V. Almazov National Medical Research Centre, St. Petersburg, Russian Federation

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

<sup>f</sup> Russian National N. Pirogov Research Medical University, Moscow, Russian Federation

**Abstract.** Myeloperoxidase is a key factor promoting development of halogenative/oxidative stress under inflammatory conditions. Previously, we have discovered complexes including myeloperoxidase and its physiological inhibitor, ceruloplasmin in blood plasma of patients with inflammatory diseases of different etiology, e.g., atherosclerosis. Studies on regulation of myeloperoxidase activity by ceruloplasmin have shown that hypochlorous acid, a specific product of myeloperoxidase action, is likely to modify ceruloplasmin during inflammation. The present study was aimed for analysis of relationships between the myeloperoxidase activity, native, and HOCl-modified ceruloplasmin levels in blood plasma samples of the patients with cardiovascular diseases.

Specific antibodies against myeloperoxidase, ceruloplasmin, and HOCl-modified ceruloplasmin were obtained and specific enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) were developed. A combination of highly sensitive methods of myeloperoxidase assay i.e., solid-phase adsorption of antigens with subsequent testing of either their activity, or peroxidase-labeled antibody activity allowed elaborating the highly sensitive assays for ceruloplasmin and its HOCl-modified molecules, and for myeloperoxidase (concentration, peroxidase and halogenating activity). Positive correlation was proven between the myeloperoxidase concentration and activities. HOCl-modified ceruloplasmin content also correlated with myeloperoxidase activity.

The HOCl-modified ceruloplasmin was first discovered in blood plasma samples from patients with cardiovascular diseases. In view of correlation between myeloperoxidase activity and HOCl-modified ceruloplasmin content in plasma, we suggest that HOCl production is aimed for suppression of myeloperoxidase-inhibitory function of ceruloplasmin.

**Keywords:** myeloperoxidase, halogenative stress, ceruloplasmin, peroxidase activity, cardiovascular diseases, biomarker

Исследование поддержано грантом РФ 17-75-30064 (выделение и очистка СР и МРО, получение антител против белков), грантами РФФИ 15-04-03620 (получение антител против СР-HOCl, измерение концентрации СР, СР-HOCl), 17-04-00530, БРФФИ (Б16Р-015) (измерение концентрации и активности МРО).

Сокращения: СР — церулоплазмин, СР-HOCl — модифицированный HOCl церулоплазмин, НА —

галогенирующая активность, МРО — миелопероксидаза, РА — пероксидазная активность, Σ (РА) — общая пероксидазная активность.

### Введение

Развитие сердечно-сосудистых заболеваний ассоциировано с хроническим воспалением и активацией лейкоцитов. Активированные нейтрофилы секретируют миелопероксидазу (МРО, К.Ф. 1.7.1.11, донор: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-оксидоредуктаза), по-

вышенная концентрация которой в плазме пациентов является предиктором инфаркта миокарда [2,15]. МРО содержится главным образом в азурофильных гранулах нейтрофилов и в моноцитах, составляя около 5 и 0,9% от общего белка этих клеток соответственно [25]. При взаимодействии с  $H_2O_2$  происходит превращение МРО в высокореакционное Соединение I, которое, наряду с классическим одноэлектронным окислением пероксидазных субстратов (например, *o*-дианизида, тирозина [3, 35]), обладает уникальной способностью катализировать двухэлектронное окисление хлорид-иона с образованием хлорноватистой кислоты (НОСІ). Образование НОСІ в описанном выше галогенирующем цикле функционирования МРО считается важным фактором врожденного иммунитета. Однако при хроническом воспалении НОСІ, продуцируемая МРО, может модифицировать молекулы организма-хозяина и приводить к развитию окислительного/галогенирующего стресса, сопровождающего многие заболевания [6, 7].

МРО формирует в плазме крови комплексы с церулоплазмином (СР), в составе которых могут оказываться липопротеины низкой плотности [27, 31]. СР претендует на роль эндогенного ингибитора хлорирующей активности МРО и окислительной модификации липопротеинов низкой плотности [9, 24, 28]. Однако в наших опытах было показано, что СР эффективно ингибирует только хлорирующую, но не бромлирующую активность МРО, что, вероятно, связано с большим сродством бромид-иона к активному центру МРО [32]. Кроме того, ингибирование активности МРО возможно только в случае интактности полипептидной цепи СР, которая может расщепляться провоспалительными протеиназами, например, тромбином [26, 30]. Недавно нами было показано, что альбумин сыворотки крови и липопротеины низкой плотности, модифицированные НОСІ, активируют респираторный взрыв нейтрофилов и секрецию ими МРО [6, 8, 21, 31].

Маркеры галогенирующего стресса — молекулы, модифицированные НОСІ, были обнаружены в атеросклеротических бляшках [7, 17]. Известно о наличии аутоантител против модифицированных НОСІ липопротеинов низкой плотности у пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями [1]. Учитывая, что МРО в плазме крови взаимодействует с СР и при определенных условиях может проявлять ферментативную активность, актуальным явилось определение концентрации СР, модифицированного НОСІ (СР-НОСІ), а также оценка корреляционных

связей СР-НОСІ с активностью и концентрацией МРО в плазме крови пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями.

## Материалы и методы

### Реактивы

В работе были использованы следующие реактивы: конъюгат антител против IgG кролика с пероксидазой из корней хрена, UNOsphere Q, агароза Bio-Gel A-1.5m fine (Bio-Rad, США);  $Br_2$ , KCN, NaCl, NaBr, триэтиламин, цитрат натрия, этилендиаминтетраацетат натрия (ЭДТА) (Merck, Германия);  $NaN_3$ , глицерин, Кумаси R-250, меркаптоэтанол, персульфат аммония, Tris (Serva, Германия); NaOCl (1,79 M), 6-аминокапроновая кислота, 10-ацетил-3,7-дигидроксифеноксазин, гепарин, глицин, конъюгат антител против IgG крыс с пероксидазой из корней хрена, неомицина трисульфат, *o*-дианизидин, *p*-фенилендиамин, 3,3',5,5'-тетраметилбензидин, фенил-агароза, SDS, Sephacryl S-200 HR, Sephadex G-75 Superfine, триэтаноламин, фенилметилсульфонилфторид (Sigma, США); акриламид, N,N'-метилен-бис-акриламид, N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин («Медиген», Россия). Растворы для хроматографии были приготовлены с использованием апиrogenной деионизованной воды с удельным сопротивлением 18,2 МОм × см. BrCN синтезирован при бромировании KCN в двухфазной системе: вода-дихлорэтан. Лиганды для аффинной хроматографии (гепарин, неомицин, СР) иммобилизовали на BrCN-активированной агарозе [13].

### Общая характеристика пациентов, включенных в исследование

Проведенное исследование одобрено комитетом по этике Республиканского научно-практического центра «Кардиология» Министерства здравоохранения Республики Беларусь (г. Минск, Беларусь) (протокол заседания № 2, п. 6 от 13.02.2009 г., заключение этической экспертизы № 15/02/09 от 18.02.2009 г., приказ № 66 от 13.02.2008 г.). Перед проведением всех процедур бралось письменное информированное согласие пациентов. Всего в исследование включено 69 пациентов: 19 — с хронической ишемической болезнью сердца (стабильная стенокардия) и 50 — с острым коронарным синдромом (нестабильная стенокардия и острый инфаркт миокарда). В исследовании приняли участие 51 мужчина и 18 женщин (средний возраст всех пациентов составил  $55,7 \pm 1,3$  лет). Все лица, включенные в исследование, прошли тщательное клинико-инструментальное и лабораторное обследование, включающее эхокардиографию,

ультразвуковое исследование брахиоцефальных артерий, суточное мониторирование ЭКГ и артериального давления, при наличии показаний — коронароангиографию.

#### **Пробоподготовка образцов плазмы и сыворотки крови**

Анализ данных литературы и собственные предварительные эксперименты [2, 3, 4, 20] свидетельствовали о том, что для адекватного измерения активности и концентрации МРО в плазме кровь должна быть стабилизирована ЭДТА либо цитратом натрия. Использование гепарина в качестве антикоагулянта либо образцов сыворотки крови приводит к результатам, искаженным секрецией МРО из нейтрофилов. Для измерения концентрации СР, напротив, адекватные результаты были получены только при анализе сыворотки крови, что обусловлено ингибирующим действием хелаторов ионов кальция на оксидазную активность СР. В данном исследовании образцы венозной крови, стабилизированной цитратом натрия, получали у пациентов в Республиканском научно-практическом центре «Кардиология» и в течение 2 часов с момента взятия крови ее центрифугировали при 600 g в течение 15 минут. Отобранную плазму повторно центрифугировали в таком же режиме для удаления следов тромбоцитов. Параллельно для анализа концентрации СР забирали вторую пробу венозной крови без антикоагулянтов, которую через 30 минут после свертывания центрифугировали при 600 g в течение 15 минут и отбирали сыворотку. Образцы плазмы и сыворотки делили на 5-6 аликвот по 0,2 мл и хранили при -70 °С до выполнения измерений.

#### **Получение белков**

МРО была очищена из экстракта лейкоцитов здоровых доноров с помощью хроматографий на гепарин-агарозе, фенил-агарозе и Sephacryl S-200 HR. Препарат характеризовался  $A_{430}/A_{280}$  (RZ) около 0,85, что соответствует гомогенному ферменту [29]. Для получения препарата мономерного СР, содержащего более 95% нефрагментированных 132 кДа-молекул с  $A_{610}/A_{280} > 0,049$ , плазму крови с добавлением 1 мМ ЭДТА и 0,1 мМ фенилметилсульфонилфторида подвергали хроматографии на UNOsphere Q и неомицин-агарозе [13].

#### **Спектрофотометрическое определение концентрации веществ**

Спектры поглощения препаратов были измерены с помощью спектрофотометра СФ-2000-02 («ОКБ-Спектр», Россия). Концентрацию реагентов определяли, используя коэффициенты экстинкции: димер МРО -  $\epsilon_{430} = 178\,000\text{ М}^{-1} \times \text{см}^{-1}$  [14],

СР -  $\epsilon_{610} = 10\,000\text{ М}^{-1} \times \text{см}^{-1}$  [23],  $\text{H}_2\text{O}_2$  -  $\epsilon_{240} = 43,6\text{ М}^{-1} \times \text{см}^{-1}$  [16],  $\text{ClO}^-$  -  $\epsilon_{292} = 350\text{ М}^{-1} \times \text{см}^{-1}$  [22].

#### **Получение антител против СР и СР-НОСІ, а также выявление СР-НОСІ**

Антитела против СР от крыс получали после 3-х иммунизаций крыс препаратом интактного СР, из сыворотки животных выделяли фракцию IgG и проводили их аффинную очистку на агарозе с иммобилизованным СР.

С помощью иммунизации кроликов СР-НОСІ были получены специфические поликлональные антитела кроликов против СР-НОСІ, использованные для сорбции модифицированного СР на твердой фазе и его последующей детекции с помощью антител крысы против СР. Для получения антигена СР инкубировали с НОСІ при мольном соотношении окислитель:СР = 20:1 в течение 30 минут при 37 °С. Модифицированный СР отделяли от неокисленного белка с помощью диск-электрофореза в ПААГ [18], вырезали из геля зону окисленного СР. Далее СР-НОСІ подвергали препаративному электрофорезу с SDS [19], вырезали белок из геля и использовали для иммунизации кроликов. После 4-х иммунизаций с интервалом в 2 недели была получена антисыворотка против СР-НОСІ. Из сыворотки выделяли фракцию IgG с помощью осаждения сульфатом аммония. Для очистки антител от фракции, реагирующей с интактным СР-проводили негативную аффинную хроматографию на агарозе с иммобилизованным СР.

Измерение концентрации СР-НОСІ в плазме крови осуществляли по следующему протоколу: антитела кроликов против СР-НОСІ (5 мкг/мл), растворенные в 40 мМ  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 80 мМ  $\text{NaHCO}_3$ , pH 9,4, адсорбировали в 96-луночных полистирольных планшетах в течение ночи при 4 °С. После 3-х отмывок фосфатно-солевым буфером (PBS: 8,7 мМ  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 1,5 мМ  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 137 мМ NaCl и 2,7 мМ KCl; pH 7,4), содержащим 0,05%-ый Tween 20, в лунки помещали препараты СР, модифицированного 20-молярным избытком НОСІ, в концентрациях 0; 0,625; 1,25; 2,5; 5; 10; 20; 40 нг/мл и образцы плазмы, разбавленные от 10 до 80 раз PBS, содержащим 0,05%-ый Tween 20. После 60 минут инкубации в термошейкере при 37 °С и 270 об/мин лунки планшета отмывали 3 раза PBS, содержащим 0,05%-ый Tween 20. В лунки помещали аффинные антитела крыс против СР (50 мкг/мл), через 60 минут планшет отмывали 3 раза PBS, содержащим 0,05%-ый Tween 20. В лунки помещали конъюгат антител против IgG крыс с пероксидазой из корней хрена (1:5000), через 60 минут планшет отмывали 3 раза PBS, содержащим 0,05%-ый Tween

20. В планшет помещали раствор, содержащий 2 мг 3,3',5,5'-тетраметилбензидина, 1 мМ  $H_2O_2$  в 12 мл 50 мМ Na-ацетатного буфера, pH 5,5. Через 5 минут инкубации реакцию останавливали 2 М серной кислотой и измеряли поглощение при 405 нм с помощью планшетного монохроматорного флуориметр-люминометр-спектрофотометра (CLARIOstar, BMG LABTECH, Германия). Калибровочный график зависимости  $A_{405}$  от [CP-HOCl] обрабатывали в программе MS Excel 2002 как линейную функцию (коэффициент детерминированности  $R^2$ , нормированный от 0 до 1, составлял не менее 0,98). Концентрацию CP-HOCl в образце плазмы крови выражали в нг/мл после сравнения поглощения образца плазмы (с учетом его разбавления) с калибровочной прямой для модифицированного CP.

#### Определение концентрации CP

Для количественного определения концентрации CP в плазме крови сравнивали *p*-фенилендиамин-оксидазную активность образца сыворотки крови с активностью серии калибровочных растворов CP в модифицированном для микроформата варианте [35]. В лунки 96-луночного планшета вносили по 10 мкл проб сыворотки крови либо калибровочных растворов, содержащих 100-1300 мкг/мл очищенного CP [13], во все лунки добавляли по 200 мкл 0,2% *p*-фенилендиамина в 0,4 М Na-ацетатном буфере, pH 5,5. Через 60 минут реакцию останавливали, внося в лунки по 40 мкл 0,5%  $NaN_3$  (ингибитор активности CP). Измеряли поглощение проб при 530 нм с помощью планшетного монохроматорного флуориметр-люминометр-спектрофотометра (CLARIOstar, BMG LABTECH, Германия). В программном обеспечении прибора (Mars) строили калибровочную прямую, по которой прибор автоматически рассчитывает содержание CP в образцах — в мкг/мл.

#### Определение пероксидазной активности МРО и общей пероксидазной активности в плазме крови

Для спектрофотометрического определения общей пероксидазной активности плазмы крови ( $\Sigma$  (РА)) в буферный раствор, содержащий 0,2 М  $Na_2HPO_4$ /0,1 М лимонной кислоты (pH 4,5), добавляли субстрат *o*-дианизидин (380 мкМ) и 1/13,3 объема плазмы крови (например, 60 мкл плазмы до объема образца 800 мкл). Реакцию запускали добавлением 100 мкМ  $H_2O_2$  и в кинетическом режиме в течение 6-8 минут определяли скорость окисления *o*-дианизидина —  $A_{460}/мин$  [4, 5]. Измерения проводили при 20 °С на спектрофотометре СОЛАР РВ 2201 (г. Минск, Беларусь).  $A_{460}/мин$  рассчитывали как тангенс угла наклона начального линейного участка кинетической кривой, содержащей минимум шесть экспериментальных точек, по линейной экстраполяции с использованием статистической программы графического редактора Origin 7.0.  $\Sigma$  (РА) рассчитывали с учетом разбавления образца плазмы крови:

$$\Sigma (РА) = \Delta A / мин \times 13,3.$$

Пероксидазную активность МРО в плазме крови (МРО (РА)) оценивали разностным методом. Для этого готовили дополнительную пробу, содержащую, помимо всех вышеперечисленных компонент, специфический ингибитор ферментативной активности МРО — гидразид 4-аминобензойной кислоты (50 мкМ). МРО (РА) вычисляли согласно соотношению:

$$МРО (РА) = (\Delta A / мин - \Delta A_{инг} / мин) \times 13,3.$$

где  $\Delta A / мин$  и  $\Delta A_{инг} / мин$  — скорость окисления *o*-дианизидина в отсутствие и в присутствии ингибитора соответственно.

#### Определение концентрации МРО и ее галогенирующей активности

Измерение концентрации МРО в плазме крови осуществляли с помощью разработанного ранее [3] оригинального метода иммуноферментного анализа с использованием антител против МРО, полученных иммунизацией крыс и кроликов.

Галогенирующую активность МРО (НА) в плазме крови оценивали по флуоресценции резорфина, который образовывался при окислении 10-ацетил-3,7-дигидроксифеноксазина в присутствии  $HOBr$ , продуцируемой активной МРО, которая связывалась при инкубации образцов в планшетах с адсорбированными на поверхности лунок аффинными антителами против МРО, полученными от крыс [3]. Антитела (5 мкг/мл), растворенные в 40 мМ  $Na_2CO_3$ , 80 мМ  $NaHCO_3$ , pH 9,4, адсорбировали в 96-луночных полистирольных планшетах в течение ночи при 4 °С. После 3-х отмывок PBS, содержащим 0,05%-ый Tween 20, в лунки помещали очищенную МРО в концентрациях 0; 0,625; 1,25; 2,5; 5; 10; 20; 40 нг/мл и образцы плазмы, разбавленные от 10 до 80 раз PBS, содержащим 0,05%-ый Tween 20. После 60 минут инкубации в термошейкере при 37 °С и 270 об/мин лунки планшета отмывали 3 раза PBS, содержащим 0,05%-ый Tween 20. В лунки помещали раствор, содержащий 1 мкМ 10-ацетил-3,7-дигидроксифеноксазина, 10 мкМ  $H_2O_2$ , 20 мМ NaBr, 200 мМ  $(NH_4)_2SO_4$ , 24 мМ Na-цитратный буфер, pH 6,0. Через 30 минут инкубации в термошейкере при 37 °С и 270 об/мин измеряли флуоресценцию резору-

фина при 580-620 нм (возбуждение 535-555 нм) с помощью планшетного монохроматорного флуориметр-люминометр-спектрофотометра (CLARIOstar, BMG LABTECH, Германия). Калибровочный график зависимости интенсивности флуоресценции I от [МРО] обрабатывали в программе MS Excel 2002 как биномиальную функцию  $I = a[\text{МРО}]^2 + b[\text{МРО}] + c$  (коэффициент детерминированности  $R^2$ , нормированный от 0 до 1, составлял не менее 0,97). Вычисляли активность МРО в плазме с учетом разбавления образца и выражали ее как нг/мл очищенной МРО.

#### Статистическая обработка результатов

Эксперименты повторяли три раза ( $n = 3$ ), среднее значение рассчитывали по формуле:

$$X_m = (1 / n) \sum X_i,$$

где  $X_i$  — значение для каждого измерения. Стандартную ошибку выражали как  $S^*/n$ , где

$$S^* = \sqrt{\frac{\sum (X_i - X_m)^2}{(n-1)}}.$$

Для определения параметров корреляции использовали коэффициент корреляции Пирсона ( $r$ ).

## Результаты

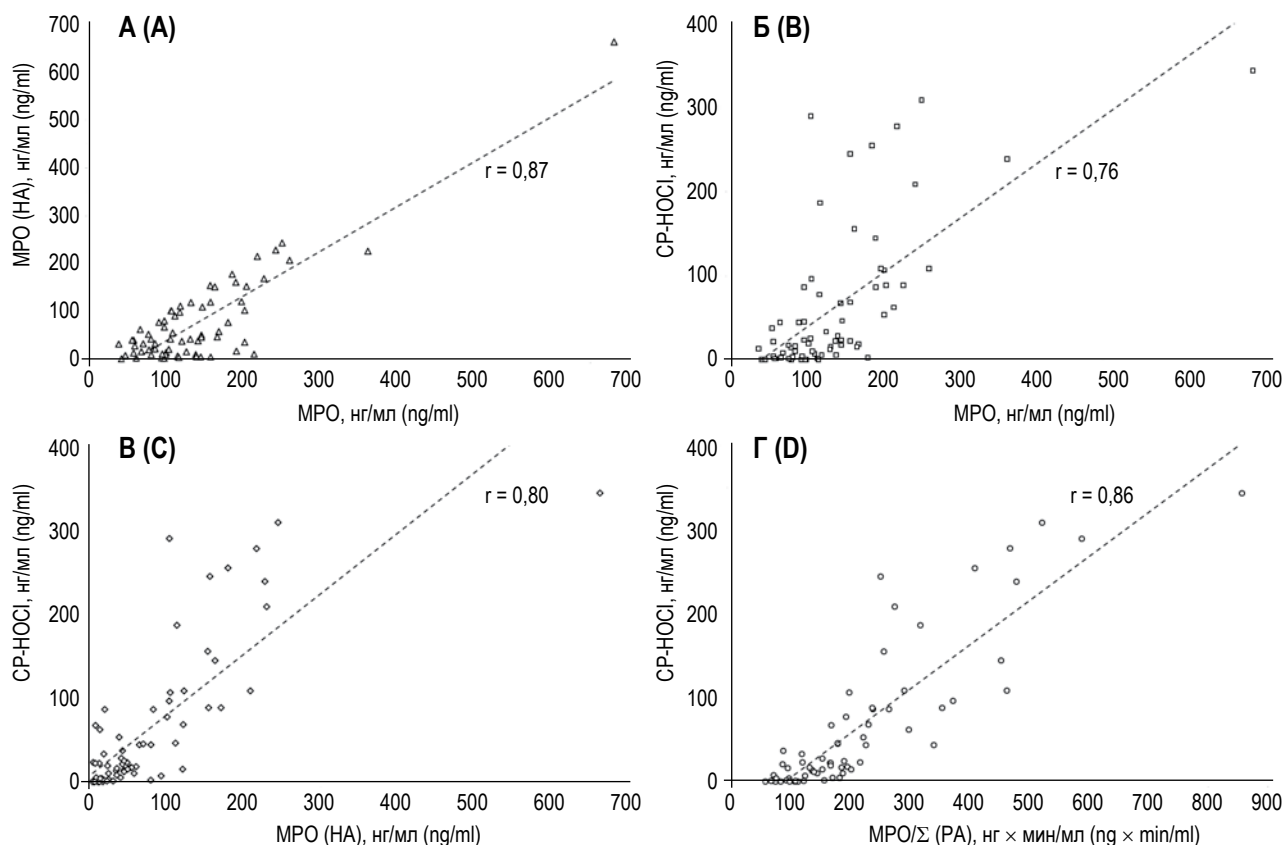
Были исследованы: содержание СР и СР-НОСІ, МРО (РА) и МРО (НА), концентрация МРО и  $\Sigma$  (РА) в 69 образцах плазмы крови доноров с различной степенью тяжести сердечно-сосудистых заболеваний (табл. 1).

Был проведен анализ корреляционных связей измеренных показателей (табл. 2). Концентрация МРО была связана положительной корреляционной связью с МРО (НА) ( $r = 0,87$ ,  $p < 0,0001$ , рис. 1А) и МРО (РА) ( $r = 0,51$ ,  $p < 0,0001$ ). Концентрация СР-НОСІ была связана положительной корреляционной связью с концентрацией МРО ( $r = 0,76$ ,  $p < 0,0001$ , рис. 1Б) и с МРО (НА) ( $r = 0,80$ ,  $p < 0,0001$ , рис. 1В). В качестве показателя удельной активности МРО было использовано отношение концентрации МРО к  $\Sigma$  (РА), оцененной по окислению *o*-дианизидина. Продемонстрирована положительная корреляционная связь данного показателя с концентрацией СР-НОСІ ( $r = 0,86$ ,  $p < 0,0001$ , рис. 1Г). Интересно, что концентрация СР и  $\Sigma$  (РА) не коррелировала ни с одним из перечисленных показателей.

ТАБЛИЦА 1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПОКАЗАТЕЛЕЙ, ИЗМЕРЕННЫХ В ОБРАЗЦАХ КРОВИ ПАЦИЕНТОВ

TABLE 1. GENERAL CHARACTERISTICS OF THE MARKERS MEASURED IN BLOOD SAMPLES OF PATIENTS

Показатель – обозначение, единицы измерения Marker: abbreviations, units	Среднее $\pm$ стандартная ошибка Mean $\pm$ standard error	Медиана (минимальное – максимальное значение) Median (minimum – maximum value)
Концентрация МРО – МРО, нг/мл MPO concentration: MPO, ng/ml	137,3 $\pm$ 56,9	116,4 (37,1-680,4)
Галогенирующая активность МРО – МРО (НА), нг/мл Halogenating activity of MPO: MPO (NA), ng/ml	71,2 $\pm$ 62,7	44,3 (3,2-662,1)
Пероксидазная активность МРО – МРО (РА), 1/мин Peroxidase activity of MPO: MPO (PA), 1/min	0,0776 $\pm$ 0,0575	0,0559 (0-0,364)
Общая пероксидазная активность – $\Sigma$ (РА), 1/мин Total Peroxidase activity: $\Sigma$ (PA), 1/min	0,715 $\pm$ 0,181	0,713 (0,178-1,215)
Концентрация СР – СР, мкг/мл CP concentration: CP, $\mu$ g/ml	312 $\pm$ 93	305 (65-613)
Концентрация СР, модифицированного НОСІ – СР-НОСІ, нг/мл Concentration of HOCl-modified CP: CP-HOCl, ng/ml	65 $\pm$ 63	23 (1-344)
Отношение концентрации МРО к общей пероксидазной активности – МРО/ $\Sigma$ (РА), нг $\times$ мин/мл Ratio of MPO concentration and total peroxidase activity: MPO/ $\Sigma$ (PA), ng $\times$ min/mL	212 $\pm$ 103	171 (59-857)



**Рисунок 1.** Графики зависимости галогенирующей активности МРО от концентрации МРО (А); СР, модифицированного HOCl, от концентрации МРО (Б); СР, модифицированного HOCl, от галогенирующей активности МРО (В); СР, модифицированного HOCl, от отношения концентрации МРО к общей пероксидазной активности плазмы крови (Г)

Figure 1. Dependence plots between halogenating activity of MPO and its concentration (A); concentration of HOCl-modified CP and concentration of MPO (B); concentration of HOCl-modified CP and halogenating MPO activity (C); concentration of HOCl-modified CP, and a ratio between MPO concentration and total peroxidase activity (D)

**ТАБЛИЦА 2. КОРРЕЛЯЦИОННАЯ МАТРИЦА ИЗМЕРЕННЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ**

TABLE 2. CORRELATION MATRIX OF THE MEASURED MARKERS

	МРО	МРО (НА)	МРО (РА)	Σ (РА)	СР	СР-НОСІ
МРО (НА)	$r = 0,87$ ; $p < 0,0001$	—				
МРО (РА)	$r = 0,51$ ; $p < 0,001$	$r = 0,47$ ; $p < 0,0001$	—			
Σ (РА)	$r = 0,00$ ; $p = 0,61$	$r = -0,19$ ; $p = 0,11$	$r = 0,32$ ; $p = 0,05$	—		
СР	$r = 0,42$ ; $p = 0,01$	$r = 0,20$ ; $p = 0,09$	$r = 0,04$ ; $p = 0,83$	$r = 0,07$ ; $p = 0,69$	—	
СР-НОСІ	$r = 0,76$ ; $p < 0,0001$	$r = 0,80$ ; $p < 0,0001$	$r = 0,26$ ; $p = 0,1119$	$r = -0,26$ ; $p = 0,11$	$r = 0,31$ ; $p = 0,05$	—
МРО/Σ (РА)	$r = 0,89$ ; $p < 0,0001$	$r = 0,84$ ; $p < 0,0001$	$r = 0,29$ ; $p = 0,07$	$r = -0,31$ ; $p = 0,06$	$r = 0,40$ ; $p = 0,01$	$r = 0,86$ ; $p < 0,0001$

**Примечание.** Обозначения столбцов и строк см. в таблице 1, в ячейках представлены значения коэффициента корреляции Пирсона.

Note. For abbreviated names of columns and rows, see Table 1. The cells represent values of Pearson correlation quotient.

## Обсуждение

Ранее нами было показано, что концентрация МРО повышена у пациентов с острым коронарным синдромом по сравнению со здоровыми донорами, а прогрессивное снижение МРО (РА) в процессе тромболитической терапии коррелирует с благоприятным исходом заболевания [4]. Нами были разработаны оригинальные методы оценки МРО (РА) и МРО (НА), а также содержания МРО, иммуноферментный анализ для оценки концентрации СР-НОСІ. Наличие специфической МРО (НА) позволило разработать упрощенный вариант иммуноферментного анализа, в котором после сорбции МРО на твердой фазе возможно выявление активности МРО [8]. Этот подход существенно сокращает время анализа. В прототипе метода с помощью 10-ацетил-3,7-дигидроксифеноксазина выявлялась МРО (РА), адсорбированной на антителах [20], однако, как показали наши эксперименты, бромлирующая активность МРО практически не подавляется СР [32] и, следовательно, окисление ацетил-3,7-дигидроксифеноксазина под действием НОВr, продуцируемой МРО, более адекватно отражает концентрацию МРО. Это подтверждается достоверной корреляционной связью между концентрацией МРО и МРО (НА) (рис. 1А). Обнаружение комплексов, включающих СР и МРО, в плазме пациентов с атеросклерозом [27] предполагало возможность образования при сердечно-сосудистых заболеваниях СР, модифицированного НОСІ — основным продуктом катализа МРО, однако только в данном исследовании впервые удалось обнаружить хлорированный СР в плазме крови больных с сердечно-сосудистой недостаточностью.

При сопоставлении измеренных показателей на репрезентативном количестве образцов плазмы крови ( $n = 69$ ) от пациентов с различной степенью тяжести сердечно-сосудистых заболеваний нам удалось проследить ряд корреляционных связей, хорошо согласующихся с данными, полученными на экспериментальных моделях исследования ферментативных свойств МРО. Во-первых, МРО (РА) в плазме крови положительно коррелирует с концентрацией МРО и МРО (НА). Во-вторых, получена положительная корреляционная зависимость между концентрацией МРО и показателем галогенирующего стресса (концентрация СР, модифицированного НОСІ) и отношением концентрации МРО к  $\Sigma$  (РА). Ранее нами было показано, что по мере иммунопреципитации СР из плазмы крови снижается эффективность ингибирования плазмой МРО (РА) [33]. Обращает на себя внимание факт, что концентрации МРО и СР-НОСІ довольно близки, такой результат можно объяснить тем,

что комплекс между МРО и СР в плазме крови относительно стабилен [27], и, вероятнее всего, при окислительном/галогенирующем стрессе у пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями модификации подвергается СР, находящийся в непосредственном контакте с МРО.

Важно отметить, что концентрация СР, измеренная по степени окисления его синтетического субстрата *p*-фенилендиамина, не коррелирует ни с одним из перечисленных показателей. Данный факт подтверждает важность определения целостности полипептидной цепи СР, а не его концентрации, поскольку именно интактность СР определяет эффективное ингибирование активности МРО [9, 28, 32]. Например, степень протеолиза СР в синовиальной жидкости коррелирует с тяжестью симптомов ревматоидного артрита [26]. Нами было показано, что СР взаимодействует с протеиназами нейтрофилов и матриксными металлопротеиназами 2 и 12, что также способствует расщеплению его полипептидной цепи [10, 11, 12]. Разработка методов количественной оценки непротеолизованного СР представляется перспективной и может быть реализована при получении моноклональных антител против участков СР, подвергающихся протеолитической деградации при воспалении. Учитывая, что при физиологических условиях МРО также способна катализировать образование бромноватистой кислоты (НОВr) [34], представляется перспективным получение антител против СР, модифицированного НОВr, с целью анализа модификации белка этим оксидантом.

На роль регуляторов активности МРО, кроме СР, претендуют низкомолекулярные соединения (тиоцианат, тирозин, глутатион и урат) [36], в будущем определение их концентрации в плазме крови больных сердечно-сосудистыми заболеваниями может дополнить картину регуляции развития галогенирующего стресса, опосредованного активностью МРО и других гемсодержащих пероксидаз человека.

## Благодарности

Авторы выражают благодарность профессору В.Н. Кокрякову (ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины») за любезно предоставленную лейкоцитарную массу здоровых доноров, благодарность за предоставленные образцы плазмы и сыворотки крови пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями — профессору Л.З. Полонецкому (РНПЦ «Кардиология»). Планшетный монохроматорный флуориметр-люминометр-спектрофотометр (CLARIOstar, BMG LABTECH, Германия) получен при поддержке программы РАМН Human Proteome.



## Список литературы / References

1. Белик И.В., Иванцова А.А., Мамедова З.Э., Денисенко А.Д. Содержание антител к модифицированным липопротеинами низкой плотности и их комплексов в крови пациентов с различными проявлениями атеросклероза // Биомедицинская химия, 2016. Т. 62. С. 471-475. [Belik I.V., Ivantsova A.A., Mamedova Z.E., Denisenko A.D. Antibodies against modified low-density lipoproteins and their complexes in blood of patients with various manifestations of atherosclerosis. *Biomeditsinskaya khimiya = Biomedical Chemistry*, 2016, Vol. 62, pp. 471-475. (In Russ.)]
2. Буненков Н.С., Комок В.В., Соколов А.В., Немков А.С. Новые возможности оценки интраоперационного ишемически-реперфузионного повреждения миокарда при операциях реваскуляризации в условиях искусственного кровообращения и на работающем сердце // Клиническая и экспериментальная хирургия. Журнал имени академика Б.В. Петровского, 2017. Т. 16, № 2. С. 40-48. [Bunenko N.S., Komok V.V., Sokolov A.V., Nemkov A.S. New methods of intraoperative evaluation of myocardial ischemic-reperfusion injury during on- and off-pump coronary artery bypass grafting. *Klinicheskaya i eksperimental'naya khirurgiya. Zhurnal imeni Akademika B.V. Petrovskogo = Clinical and Experimental. Surgery Petrovsky Journal*, 2017, Vol. 16, no. 2, pp. 40-48. (In Russ.)]
3. Горудко И.В., Черкалина О.С., Соколов А.В., Пулина М.О., Захарова Е.Т., Васильев В.Б., Черенкевич С.Н., Панасенко О.М. Новые подходы к определению концентрации и пероксидазной активности миелопероксидазы в плазме крови человека // Биоорганическая химия, 2009. Т. 35. С. 629-639. [Gorudko I.V., Cherkalina O.S., Sokolov A.V., Pulina M.O., Zakharova E.T., Vasilyev V.B., Cherenkevich S.N., Panasenکو O.M. New approaches to the measurement of the concentration and peroxidase activity of myeloperoxidase in human blood plasma. *Bioorganicheskaya khimiya = Bioorganic Chemistry*, 2009, Vol. 35, pp. 629-639. (In Russ.)]
4. Григорьева Д.В., Горудко И.В., Костевич В.А., Соколов А.В., Буко И.В., Васильев В.Б., Полонецкий Л.З., Панасенко О.М., Черенкевич С.Н. Активность миелопероксидазы в плазме крови как критерий эффективности лечения пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями // Биомедицинская химия, 2016. Т. 62. С. 318-324. [Grigorieva D.V., Gorudko I.V., Kostevich V.A., Sokolov A.V., Buko I.V., Vasilyev V.B., Polonetsky L.Z., Panasenکو O.M., Cherenkevich S.N. Myeloperoxidase activity in blood plasma as a criterion of therapy for patients with cardiovascular disease. *Biomeditsinskaya khimiya = Biomedical Chemistry*, 2016, Vol. 62, pp. 318-324. (In Russ.)]
5. Григорьева Д.В., Горудко И.В., Соколов А.В., Космачевская О.В., Топунов А.Ф., Буко И.В., Константинова Е.Э., Черенкевич С.Н., Панасенко О.М. Определение пероксидазной активности гемоглобина в плазме крови // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, 2013. Т. 155, № 9. С. 129-132. [Grigorieva D.V., Gorudko I.V., Sokolov A.V., Kosmachevskaya O.V., Topunov A.F., Buko I.V., Konstantinova E.E., Cherenkevich S.N., Panasenکو O.M. Measurement of plasma hemoglobin peroxidase activity. *Byulleten eksperimental'noy biologii i meditsiny = Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 2013, Vol. 155, no. 9, pp. 129-132. (In Russ.)]
6. Михальчик Е.В., Смолина Н.В., Астамирова Т.С., Горудко И.В., Григорьева Д.В., Иванов В.А., Соколов А.В., Костевич В.А., Черенкевич С.Н., Панасенко О.М. Альбумин сыворотки крови, модифицированный в условиях окислительного/галогенирующего стресса, усиливает люминол-зависимую хемилюминесценцию нейтрофилов человека // Биофизика, 2013. Т. 58. С. 681-689. [Mikhalkhik E.V., Smolina N.V., Astamirova T.S., Gorudko I.V., Grigoryeva D.V., Ivanov V.A., Sokolov A.V., Kostevich V.A., Cherenkevich S.N., Panasenکو O.M. Human serum albumin modified under oxidative/halogenative stress enhances luminol-dependent chemiluminescence of human neutrophils. *Biofizika = Biophysics*, 2013, Vol. 58, pp. 681-689. (In Russ.)]
7. Панасенко О.М., Горудко И.В., Соколов А.В. Хлорноватистая кислота как предшественник свободных радикалов в живых системах // Успехи биологической химии, 2013. Т. 53. С. 195-244. [Panasenکو O.M., Gorudko I.V., Sokolov A.V. Hypochlorous acid as a precursor of free radicals in living systems. *Uspekhi biologicheskoy khimii = Advances in Biological Chemistry*, 2013, Vol. 53, pp. 195-244. (In Russ.)]
8. Панасенко О.М., Михальчик Е.В., Горудко И.В., Григорьева Д.В., Соколов А.В., Костевич В.А., Васильев В.Б., Черенкевич С.Н. Влияние антиоксидантов и сквенджеров гипохлоридных кислот на активацию нейтрофилов липопротеинами низкой плотности, модифицированными гипохлоритом // Биофизика, 2016. Т. 61. С. 500-509. [Panasenکو O.M., Mikhalkhik E.V., Gorudko I.V., Grigorieva D.V., Sokolov A.V., Kostevich V.A., Vasilyev V.B., Cherenkevich S.N. The effects of antioxidants and hypochlorous acid scavengers on neutrophil activation by hypochlorous acid-modified low-density lipoproteins. *Biofizika = Biophysics*, 2016, Vol. 61, pp. 500-509. (In Russ.)]
9. Панасенко О.М., Чеканов А.В., Власова И.И., Соколов А.В., Агеева К.В., Пулина М.О., Черкалина О.С., Васильев В.Б. Влияние церулоплазмينا и лактоферрина на хлорирующую активность лейкоцитарной миелопероксидазы. Изучение методом хемилюминесценции // Биофизика, 2008. Т. 53. С. 573-581. [Panasenکو O.M., Chekanov A.V., Vlasova I.I., Sokolov A.V., Ageeva K.V., Pulina M.O., Cherkalina O.S., Vasilyev V.B. A study of the effect of ceruloplasmin and lactoferrin on the chlorination activity of leukocytic myeloperoxidase using the chemiluminescence method. *Biofizika = Biophysics*, 2008, Vol. 53, pp. 573-581. (In Russ.)]

10. Соколов А.В., Агеева К.В., Костевич В.А., Берлов М.Н., Рунова О.Л., Захарова Е.Т., Васильев В.Б. Исследование взаимодействия церулоплазмينا с серпроцидинами // Биохимия, 2010. Т. 75. С. 1544-1552. [Sokolov A.V., Ageeva K.V., Kostevich V.A., Berlov M.N., Runova O.L., Zakharova E.T., Vasilyev V.B. Study of interaction of ceruloplasmin with serprocidins. *Biokhimiya = Biochemistry (Moscow)*, 2010, Vol. 75, pp. 1544-1552. (In Russ.)]
11. Соколов А.В., Пулина М.О., Агеева К.В., Рунова О.Л., Захарова Е.Т., Васильев В.Б. Идентификация катионных белков лейкоцитов, взаимодействующих с церулоплазмином // Биохимия, 2007. Т. 72. С. 1072-1077. [Sokolov A.V., Pulina M.O., Ageeva K.V., Runova O.L., Zakharova E.T., Vasilyev V.B. Identification of leukocyte cationic proteins that interact with ceruloplasmin. *Biokhimiya = Biochemistry (Moscow)*, 2007, Vol. 72, pp. 1072-1077. (In Russ.)]
12. Соколов А.В., Пулина М.О., Агеева К.В., Черкалина О.С., Захарова Е.Т., Васильев В.Б. Идентификация комплексов церулоплазмينا с матриксными металлопротеиназами 2 и 12 // Биохимия, 2009. Т. 74. С. 1703-1708. [Sokolov A.V., Pulina M.O., Ageeva K.V., Cherkalina O.S., Zakharova E.T., Vasilyev V.B. Identification of complexes formed by ceruloplasmin with matrix metalloproteinases 2 and 12. *Biokhimiya = Biochemistry (Moscow)*, 2009, Vol. 74, pp. 1703-1708. (In Russ.)]
13. Соколов А.В., Костевич В.А., Романико Д.Н., Захарова Е.Т., Васильев В.Б. Двухстадийный метод получения церулоплазмينا на основе его взаимодействия с неомицином // Биохимия, 2012. Т. 77. С. 775-784. [Sokolov A.V., Kostevich V.A., Romanico D.N., Zakharova E.T., Vasilyev V.B. Two-stage method for purification of ceruloplasmin based on its interaction with neomycin. *Biokhimiya = Biochemistry (Moscow)*, 2012, Vol. 77, pp. 775-784. (In Russ.)]
14. Bakkenist A.R., Wever R., Vulsma T., Plat H., van Gelder B.F. Isolation procedure and some properties of myeloperoxidase from human leucocytes. *Biochim. Biophys. Acta*, 1978, Vol. 524, pp. 45-54.
15. Baldus S., Heeschen C., Meinertz T., Zeiher A.M., Eiserich J.P., Münzel T., Simoons M.L., Hamm C.W. Myeloperoxidase serum levels predict risk in patients with acute coronary syndromes. *Circulation*, 2003, Vol. 108, pp. 1440-1445.
16. Beers R.F.Jr., Sizer I.W. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *J. Biol. Chem.*, 1952, Vol. 195, pp. 133-140.
17. Daugherty A., Dunn J.L., Rateri D.L., Heinecke J.W. Myeloperoxidase, a catalyst for lipoprotein oxidation, is expressed in human atherosclerotic lesions. *J. Clin. Invest.*, 1994, Vol. 94, pp. 437-444.
18. Davis B.J. Disc electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1964, Vol. 121, pp. 404-427.
19. Fling S.P., Gregerson D.S. Peptide and protein molecular weight determination by electrophoresis using a high-molarity tris buffer system without urea. *Anal. Biochem.*, 1986, Vol. 155, pp. 83-88.
20. Franck T., Minguet G., Delporte C., Derochette S., Zouaoui Boudjeltia K., van Antwerpen P., Gach O., Deby-Dupont G., Mouithys-Mickalad A., Serteyn D. An immunological method to combine the measurement of active and total myeloperoxidase on the same biological fluid, and its application in finding inhibitors which interact directly with the enzyme. *Free Radic. Res.*, 2015, Vol. 49, pp. 790-799.
21. Gorudko I.V., Grigorieva D.V., Shamova E.V., Kostevich V.A., Sokolov A.V., Mikhalechik E.V., Cherenkevich S.N., Arnhold J., Panasenکو O.M. Hypohalous acid-modified human serum albumin induces neutrophil NADPH-oxidase activation, degranulation and shape change. *Free Radic. Biol. Med.*, 2014, Vol. 68, pp. 326-334.
22. Morris J.C. The acid ionization constant of HOCl from 5° to 35°. *J. Phys. Chem.*, 1966, Vol. 70, pp. 3798-3805.
23. Noyer M., Dwulet F.E., Hao Y.L., Putnam F.W. Purification and characterization of undegraded human ceruloplasmin. *Anal. Biochem.*, 1980, Vol. 102, pp. 450-458.
24. Samygina V.R., Sokolov A.V., Bourenkov G., Petoukhov M.V., Pulina M.O., Zakharova E.T., Vasilyev V.B., Bartunik H., Svergun D.I. Ceruloplasmin: macromolecular assemblies with iron-containing acute phase proteins. *PLoS ONE*, 2013. Vol. 8, e67145. doi: 10.1371/journal.pone.0067145.
25. Schultz J., Kaminker K. Myeloperoxidase of the leukocyte of normal human blood. I. Content and localization. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1962, Vol. 96, pp. 465-467.
26. Sokolov A.V., Acquasaliente L., Kostevich V.A., Frasson R., Zakharova E.T., Pontarollo G., Vasilyev V.B., de Filippis V. Thrombin inhibits the anti-myeloperoxidase and ferroxidase functions of ceruloplasmin: relevance in rheumatoid arthritis. *Free Radic. Biol. Med.*, 2015, Vol. 86, pp. 279-294.
27. Sokolov A.V., Ageeva K.V., Cherkalina O.S., Pulina M.O., Zakharova E.T., Prozorovskii V.N., Aksenov D.V., Vasilyev V.B., Panasenکو O.M. Identification and properties of complexes formed by myeloperoxidase with lipoproteins and ceruloplasmin. *Chem. Phys. Lipids*, 2010, Vol. 163, pp. 347-355.
28. Sokolov A.V., Ageeva K.V., Pulina M.O., Cherkalina O.S., Samygina V.R., Vlasova I.I., Panasenکو O.M., Zakharova E.T., Vasilyev V.B. Ceruloplasmin and myeloperoxidase in complex affect the enzymatic properties of each other. *Free Radic. Res.*, 2008, Vol. 42, pp. 989-998.

29. Sokolov A.V., Chekanov A.V., Kostevich V.A., Aksenov D.V., Vasilyev V.B., Panasenکو O.M. Revealing binding sites for myeloperoxidase on the surface of human low density lipoproteins. *Chem. Phys. Lipids*, 2011, Vol. 164, pp. 49-53.
30. Sokolov A.V., Kostevich V.A., Kozlov S.O., Donskyi I.S., Vlasova I.I., Rudenko A.O., Zakharova E.T., Vasilyev V.B., Panasenکو O.M. Kinetic method for assaying the halogenating activity of myeloperoxidase based on reaction of celestine blue B with taurine halogenamines. *Free Radic. Res.*, 2015, Vol. 49, pp. 777-789.
31. Sokolov A.V., Kostevich V.A., Runova O.L., Gorudko I.V., Vasilyev V.B., Cherenkevich S.N., Panasenکو O.M. Proatherogenic modification of LDL by surface-bound myeloperoxidase. *Chem. Phys. Lipids*, 2014, Vol. 180, pp. 72-80.
32. Sokolov A.V., Kostevich V.A., Zakharova E.T., Samygina V.R., Panasenکو O.M., Vasilyev V.B. Interaction of ceruloplasmin with eosinophil peroxidase as compared to its interplay with myeloperoxidase: Reciprocal effect on enzymatic properties. *Free Radic. Res.*, 2015, Vol. 49, pp. 800-811.
33. Sokolov A.V., Zakharova E.T., Kostevich V.A., Samygina V.R., Vasilyev V.B. Lactoferrin, myeloperoxidase, and ceruloplasmin: complementary gearwheels cranking physiological and pathological processes. *Biomaterials*, 2014, Vol. 27, pp. 815-828.
34. van Dalen C.J., Whitehouse M.W., Winterbourn C.C., Kettle A.J. Thiocyanate and chloride as competing substrates for myeloperoxidase. *Biochem. J.*, 1997, Vol. 327, pp. 487-492.
35. Varfolomeeva E.Y., Semenova E.V., Sokolov A.V., Aplin K.D., Timofeeva K.E., Vasilyev V.B., Filatov M.V. Ceruloplasmin decreases respiratory burst reaction during pregnancy. *Free Radic. Res.*, 2016, Vol. 50, pp. 909-919.
36. Vlasova I.I., Sokolov A.V., Arnhold J. The free amino acid tyrosine enhances the chlorinating activity of human myeloperoxidase. *J. Inorg. Biochem.*, 2012, Vol. 106, pp. 76-83.

---

**Авторы:**

**Соколов А.В.** — д.б.н., профессор, заведующий лабораторией биохимической генетики ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург; отдел биофизики ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства» России, Москва; кафедра фундаментальных проблем медицины и медицинских технологий ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет»; отдел биохимических исследований, Центр доклинических трансляционных исследований ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

**Костевич В.А.** — к.б.н., научный сотрудник отдела молекулярной генетики ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург; отдел биофизики ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства» России, Москва, Россия

---

**Authors:**

**Sokolov A.V.**, PhD, MD (Biology), Professor, Head, Laboratory of Biochemical Genetics, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg; Department of Biophysics, Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine of Federal Medical Biological Agency, Moscow; Department of Fundamental Problems of Medicine, St. Petersburg State University; Department of Biochemical Research, Centre of Preclinical Translational Research, V. Almazov National Medical Research Centre, St. Petersburg, Russian Federation

**Kostevich V.A.**, PhD (Biology), Research Associate, Department of Molecular Genetics, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg; Department of Biophysics Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine of Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russian Federation

**Горбунов Н.П.** — аспирант, младший научный сотрудник отдела молекулярной генетики ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

**Григорьева Д.В.** — к.б.н., старший научный сотрудник кафедры биофизики, Белорусский государственный университет, г. Минск, Республика Беларусь

**Горудко И.В.** — к.б.н., доцент, ведущий научный сотрудник кафедры биофизики, Белорусский государственный университет, г. Минск, Республика Беларусь

**Васильев В.Б.** — д.м.н., профессор, заведующий отделом молекулярной генетики ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»; кафедра фундаментальных проблем медицины и медицинских технологий ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург, Россия

**Панасенко О.М.** — д.б.н., профессор, заведующий отделом биофизики ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства» России; отдел медицинской биофизики ГБОУ ВПО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

**Gorbunov N.P.**, Postgraduate Student, Junior Research Associate, Department of Molecular Genetics, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

**Grigorieva D.V.**, PhD (Biology), Senior Research Associate, Department of Biophysics, Belarusian State University, Minsk, Republic of Belarus

**Gorudko I.V.**, PhD (Biology), Associate Professor, Leading Research Associate, Department of Biophysics, Belarusian State University, Minsk, Republic of Belarus

**Vasilyev V.B.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Department of Molecular Genetics, Institute of Experimental Medicine; Department of Fundamental Problems of Medicine, St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russian Federation

**Panasenko O.M.**, PhD, MD (Biology), Professor, Head, Department of Biophysics, Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine of Federal Medical Biological Agency; Department of Medical Biophysics, Russian National N. Pirogov Research Medical University, Moscow, Russian Federation

Поступила 12.10.2017  
Отправлена на доработку 16.10.2017  
Принята к печати 23.10.2017

Received 12.10.2017  
Revision received 16.10.2017  
Accepted 23.10.2017