

УДК 577.3+538.958

## ЖЕЛЕЗОСВЯЗЫВАЮЩАЯ СПОСОБНОСТЬ ЛАКТОФЕРРИНА ПРИ ВОСПАЛЕНИИ

М.С. ТЕРЕХОВА<sup>1</sup>, И.В. ГОРУДКО<sup>1</sup>, Д.В. ГРИГОРЬЕВА<sup>1</sup>, И.В. СЕМАК<sup>1</sup>,  
А.В. СОКОЛОВ<sup>2</sup>, О.М. ПАНАСЕНКО<sup>3</sup>, С.Н. ЧЕРЕНКЕВИЧ<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup>ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Российская Федерация

<sup>3</sup>Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины ФМБА России,  
Российская Федерация

Поступила в редакцию 12 ноября 2018

**Аннотация.** Лактоферрин (Лф), выполняющий ряд полезных функций в организме, может находиться в условиях, ассоциированных с накоплением активных форм галогенов (астма, инфекционные заболевания, болезни сердца и т.д.). В работе с применением спектрофотометрического и флуоресцентного методов показано, что HOCl и особенно HOBr вызывают значительные разрушения остатков Trp и нарушение железосвязывающей способности Лф.

**Ключевые слова:** лактоферрин, триптофан, железосвязывающая активность, HOCl, HOBr.

**Abstract.** Lactoferrin (Lf) is a biologically important molecule, that accomplishes a number of useful functions in an organism. Lf can be situated in conditions associated with enrichment of reactive halogen species (asthma, infectious disease, heart-disease etc.). It was shown using spectrophotometric and fluorescence methods that HOCl and particularly HOBr lead to significant destruction of Trp residues and iron-binding capacity of Lf.

**Keywords:** lactoferrin, tryptophan, iron binding property, HOCl, HOBr.

**Doklady BGUIR. 2018, Vol. 117, No. 7, pp. 80-84**

**Iron-binding property of lactoferrin in the case of inflammation**

**M.S. Terekhova, I.V. Gorudko, D.V. Grigorieva, I.V. Semak,  
A.V. Sokolov, O.M. Panasenko, S.N. Cherenkevich**

### Введение

Лф представляет собой мономерный белок, в полипептидной цепи которого выделяют две гомологичные половины – глобулярные доли N и C, в каждой из которых находится по одному железосвязывающему сайту размером ~ 42 Å. Молекула Лф прочно, но обратимо связывает два иона железа ( $K_d \sim 10^{-20} \text{ M}^{-1}$ ) и может существовать в насыщенной (холо-) и ненасыщенной железом (апо-) форме [1]. Атом железа скоординирован четырьмя белковыми лигандами: двумя атомами кислорода фенолят-ионов Tug-92 и Tug-192, карбоксильным кислородом Asp-60 и атомом азота имидазола His-253.

В организме Лф проявляет антибактериальную, противовирусную, антиоксидантную, противовоспалительную и фунгицидную активность, способен ингибировать развитие раковых заболеваний, регулирует гомеостаз ионов железа и поддерживает рост пробиотической микрофлоры кишечника. Концентрация Лф быстро возрастает и достигает 200 мкг/мл в очагах воспаления, что позволяет рассматривать данный белок в качестве маркера воспалительного процесса. Антибактериальная активность Лф представлена бактериостатическим и бактерицидным

действием. Первое заключается в связывании ионов железа. Переход Лф в холо-форму создает дефицитную по катионам металлов среду и тем самым ослабляет экспрессию фактора вирулентности и ингибирует рост и развитие бактерий [2]. Бактерицидное действие обусловлено непосредственным связыванием молекулы Лф в апо-форме с поверхностью микроорганизмов (с липополисахаридами в случае грамотрицательных и с анионными молекулами в случае грамположительных бактерий), в результате чего происходит дестабилизация их мембраны и гибель [1, 3].

В условиях воспаления основным источником Лф в крови являются нейтрофилы, активация которых сопровождается сборкой НАДФН-оксидазы и образованием супероксид анион-радикала, который может спонтанно или в присутствии катализатора дисмутировать в пероксид водорода ( $H_2O_2$ ). В результате дегрануляции нейтрофилов наряду с Лф во внеклеточное пространство высвобождается миелопероксидаза (МПО), которая в присутствии  $H_2O_2$  катализирует двухэлектронное окисление  $X^-$  (галогенидов ( $I^-$ ,  $Br^-$ ,  $Cl^-$ ) и псевдогалогенидов ( $SCN^-$ )) до соответствующих гипогалоидных кислот (НОХ), которые принято называть активными формами галогенов (АФГ). Вблизи активированных нейтрофилов и моноцитов главным продуктом функционирования МПО является  $HOCl$  [4]. В то же время развитие аллергических реакций и паразитарной болезни сопровождается инфильтрацией эозинофилов. Активированные эозинофилы содержат пероксидазу эозинофилов, функционирующую по тому же принципу, что МПО. Однако главным продуктом пероксидазы эозинофилов является  $HOBr$  [5].  $HOCl$  и  $HOBr$  могут взаимодействовать с биологическими молекулами, включая аминокислоты, белки, антиоксиданты (в том числе тиолы), углеводы, липиды и ДНК [5, 7]. Было показано, что основными мишенями для  $HOBr$  являются свободные аминогруппы, в то время как  $HOCl$  в первую очередь взаимодействует с серосодержащими аминокислотными остатками (Cys и Met) и дисульфидными связями в белках [4, 7]. Модификация белков гипогалоидными кислотами может приводить к изменению их аминокислотного состава, нарушениям третичной структуры и утрате выполняемых функций [8]. Поскольку Лф оказывается в очагах воспаления, то в случае изменения функционального состояния антиоксидантной системы и накопления АФГ он может быть подвержен воздействию  $HOCl$  и  $HOBr$ . Целью настоящей работы является выяснение характера модификации молекулы Лф (изменение аминокислотного состава и антибактериальных свойств) при действии АФГ.

### Материалы и методы

В работе использованы следующие растворы: фосфатно-солевой буфер (ФСБ), содержащий 10 мМ  $Na_2HPO_4/KH_2PO_4$ , 137 мМ  $NaCl$ , 2,7 мМ  $KCl$  (рН 7,4);  $NaBr$  (0,1 М),  $NaOCl$  (0,97 М). Рабочие растворы  $NaOCl$  (Sigma, США) и  $NaOBr$  готовили непосредственно перед экспериментом. В работе использовали рекомбинантный Лф, полученный из молока трансгенных коз, по своим свойствам и структуре сходный с Лф человека [9].

Модификацию белка проводили при комнатной температуре (23 °С) в течение 2–3 ч при умеренном перемешивании – один раз в начале и один раз в конце модификации. Степень модификации функциональных групп белка после его обработки АФГ оценивали путем анализа изменений интенсивности собственной флуоресценции белка, обусловленной флуоресценцией остатков триптофана ( $\lambda_{возб.} = 285$  нм,  $\lambda_{регистр.} = 340$  нм). Флуоресцентные исследования проводили с использованием компьютеризованного спектрофлуориметра SM2203 («СОЛАР», Минск, Беларусь) при 23 °С и постоянном перемешивании раствора.

Лф может существовать в апо- и холо-форме. Спектр поглощения обеих форм обладает максимумом около 295 нм, однако в холо-форме наблюдается дополнительный максимум между 400 и 500 нм. Учитывая данный факт, железосвязывающую способность Лф определяли спектрофотометрически по изменению поглощения раствора при длине волны  $\lambda = 465$  нм при последовательных добавках  $Fe^{3+}$  ( $NH_4Fe(SO_4)_2$ ) с использованием спектрофотометра РВ2201 («СОЛАР», Минск, Беларусь) при 23 °С и постоянном перемешивании раствора.

Статистическую обработку данных проводили с использованием программного пакета Origin 9.1. Данные представлены как среднее плюс / минус стандартная ошибка среднего. Различия считали статистически достоверными при уровне значимости  $p < 0,05$ .

## Результаты и обсуждение

Изучение изменения локальной структуры и внутримолекулярной динамики белка удобно проводить путем исследования. Молекула Лф содержит 10 остатков Trp [10]. Известно, что Trp является одной из мишеней в белке для HOCl (константа скорости реакции –  $1,1 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$  [8]) и NOBr (константа скорости реакции –  $3,7 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$  [4]), поэтому важным является исследование изменения интенсивности флуоресценции Trp в Лф при действии на него HOCl и NOBr.

Установлено, что максимум спектра флуоресценции Trp в Лф составляет  $\lambda_{\text{max}} = 328 \pm 1 \text{ нм}$ . В результате модификации Лф при избытке как HOCl, так и NOBr в мольном соотношении вплоть до 200:1 (НОХ: Лф) не происходило сдвига спектра флуоресценции Trp. Это свидетельствует в пользу того, что остатки Trp, доступные HOCl и NOBr, находятся на границе раздела белок-вода [11]. На рис. 1 представлены типичные кинетики изменения интенсивности флуоресценции Trp в Лф при действии HOCl и NOBr. Полученные результаты свидетельствуют о том, что в ходе модификации Лф HOCl и NOBr происходит прямое разрушение ароматических колец Trp. При молярных соотношениях НОХ:Лф от 10:1 до 50:1 модификация под действием NOBr больше, чем при действии HOCl. Но при соотношении 100:1 (НОХ:Лф) степень модификации остатков Trp обеими гипогалоидными кислотами одинакова и составляет  $94 \pm 3 \%$ .

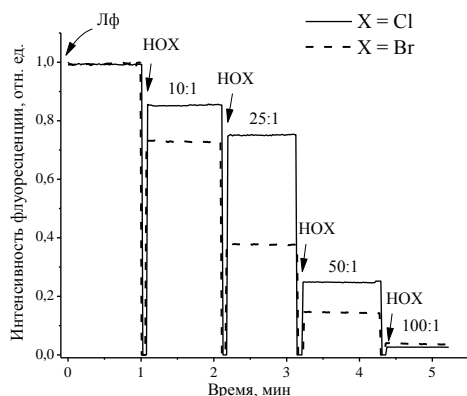


Рис. 1. Изменение интенсивности флуоресценции Trp при последовательных добавках АФГ (НОCl или NOBr). Показано соотношение конечных концентраций НОХ:Лф (моль/моль)

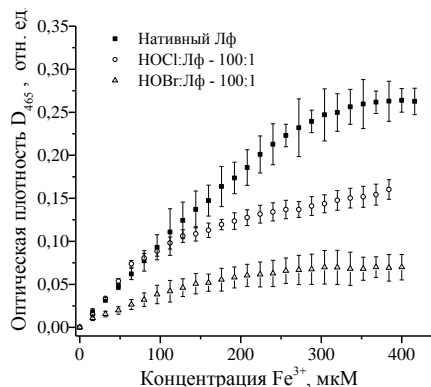


Рис. 2. Кривая доза-эффект, отражающая зависимость оптической плотности раствора Лф от концентрации связанных ионов железа в случае нативного и модифицированного HOCl или NOBr белка

Модификация структуры молекулы может отражаться на ее свойствах. Одно из наиболее важных свойств Лф – железосвязывающая способность, необходимая для выполнения антибактериальной, противовоспалительной, антиоксидантной, пробиотической функций. С использованием спектрофотометрического метода исследовано изменение железосвязывающей способности Лф при его модификации HOCl и NOBr. Известно, что один моль нативного Лф связывает 2 моля ионов железа. Как видно из рис. 2, Лф после действия 100-кратного молярного избытка HOCl утрачивает железосвязывающую способность на  $43 \pm 2 \%$ : один моль Лф связывает  $1,12 \pm 0,23$  моля ионов железа. В случае действия 100-кратного молярного избытка NOBr железосвязывающая способность уменьшается на  $74 \pm 5 \%$ : из 10 молей Лф  $5 \pm 2$  свяжут один моль ионов Fe<sup>3+</sup>.

Таким образом, нарушение железосвязывающего свойства Лф более выражено при действии NOBr, чем HOCl. Данный факт, по всей видимости, обусловлен тем, что железосвязывающий Лф состоит из аминокислотных остатков His, Tyr и Asp, с которыми скорость реакции NOBr на несколько порядков выше, чем HOCl.

## Заключение

Установлено, что в условиях воспаления, ассоциированного с накоплением АФГ, изменение структуры и железосвязывающей способности Лф при действии NOBr более значительны, чем при действии HOCl. Нарушение железосвязывающей способности может

сказаться на основных функциях Лф: антибактериальной, противовоспалительной, антиоксидантной, пробиотической. Данная работа позволяет углубить знания о реакциях, происходящих с молекулой Лф в условиях, связанных с развитием воспалительного процесса.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (гранты 17-04-00530 и 18-515-00004) и Белорусского фонда фундаментальных исследований (грант Б18Р-058).

### Список литературы

1. Lactoferrin: a modulator of immune and inflammatory responses/ D. Legrand [et al.] // Cellular and Molecular Life Sciences. 2005. Vol. 62 (22). P.2549–2559.
2. Ochoa T.J., Cleary T.G. Effect of lactoferrin on enteric pathogens // Biochemie. 2009. Vol. 91(1). P. 30–34.
3. Lactoferrin is a lipid A-binding protein/ B. J. Appelmek [et al.] // Inf. And Immun. 1994. Vol. 62 (6). P. 2628–2632.
4. Pattison D.I., Davies M.J. Kinetic analysis of the reactions of hypobromous acid with protein components: implications for cellular damage and use of 3-bromotyrosine as a marker of oxidative stress // Biochem. 2014. Vol. 43. P. 4799–4809.
5. Eosinophils generate brominating oxidants in allergen-induced asthma / W. Wu [et al.] // The J. of Clinic. Investig. 2000. Vol. 105 (10). P. 1455–1463.
6. Panasenko O.M., Gorudko I.V., Sokolov A.V. Hypochlorous acid as a precursor of free radicals in living systems // Biochemistry (Moscow). 2013. Vol. 78 (13). P. 1466–1489.
7. Pattison D.I., Davies M.J. Absolute rate constants for the reaction of hypochlorous acid with protein side chains and peptide bonds // Chem. Res. Toxicol. 2001. Vol. 14. P.1453–1464.
8. Petrônio M.S., Ximenes V.F. Effects of oxidation of lysozyme by hypohalous acids and haloamines on enzymatic activity and aggregation // Biochim. etBiophys. acta. 2012. Vol. 1824(10). P. 1090–1096.
9. Получение рекомбинантного лактоферрина человека из молока коз-производителей и его физиологические эффекты / В.С. Лукашевич [и др.] // Докл. Нац. акад. наук Беларуси. 2016. Т. 60, № 1. С. 72–81.
10. Baker E.N., Baker H.M. Molecular structure, binding properties and dynamics of lactoferrin // Cellular and Molecular Life Sciences. 2005. Vol. 62. P. 2531–2539.
11. Lakowicz J.R. Protein fluorescence // Principles of fluorescence spectroscopy. Ch. 16. Baltimore, 2006. P. 530–578.

### References

1. Lactoferrin: a modulator of immune and inflammatory responses/ D. Legrand [et al.] // Cellular and Molecular Life Sciences. 2005. Vol. 62 (22). P.2549–2559.
2. Ochoa T.J., Cleary T.G. Effect of lactoferrin on enteric pathogens // Biochemie. 2009. Vol. 91(1). P. 30–34.
3. Lactoferrin is a lipid A-binding protein/ B. J. Appelmek [et al.] // Inf. And Immun. 1994. Vol. 62 (6). P. 2628–2632.
4. Pattison D.I., Davies M.J. Kinetic analysis of the reactions of hypobromous acid with protein components: implications for cellular damage and use of 3-bromotyrosine as a marker of oxidative stress // Biochem. 2014. Vol. 43. P. 4799–4809.
5. Eosinophils generate brominating oxidants in allergen-induced asthma / W. Wu [et al.] // The J. of Clinic. Investig. 2000. Vol. 105 (10). P. 1455–1463.
6. Panasenko O.M., Gorudko I.V., Sokolov A.V. Hypochlorous acid as a precursor of free radicals in living systems // Biochemistry (Moscow). 2013. Vol. 78 (13). P. 1466–1489.
7. Pattison D.I., Davies M.J. Absolute rate constants for the reaction of hypochlorous acid with protein side chains and peptide bonds // Chem. Res. Toxicol. 2001. Vol. 14. P.1453–1464.
8. Petrônio M.S., Ximenes V.F. Effects of oxidation of lysozyme by hypohalous acids and haloamines on enzymatic activity and aggregation // Biochim. etBiophys. acta. 2012. Vol. 1824(10). P. 1090–1096.
9. Poluchenie rekombinantnogo laktoferrina cheloveka iz moloka koz-producentov i ego fiziologicheskie jeffekty / V.S. Lukashevich [i dr.] // Dokl. Nac. akad. nauk Belarusi. 2016. T. 60, № 1. S. 72–81. (in Russ.)
10. Baker E.N., Baker H.M. Molecular structure, binding properties and dynamics of lactoferrin // Cellular and Molecular Life Sciences. 2005. Vol. 62. P. 2531–2539.
11. Lakowicz J.R. Protein fluorescence // Principles of fluorescence spectroscopy. Ch. 16. Baltimore, 2006. P. 530–578.

### Сведения об авторах

Терехова М.С., стажер м.н.с. НИЛ биофизики и биотехнологии Белорусского государственного университета.

### Information about the authors

Terekhova M.S., trainee of junior researcher of SRL of biophysics and biotechnology of Belarusian state university.

Горудко И.В., к.б.н., доцент, в.н.с. НИЛ биофизики и биотехнологии Белорусского государственного университета.

Григорьева Д.В., к.б.н., с.н.с. НИЛ биофизики и биотехнологии Белорусского государственного университета.

Семак И.В., к.б.н., доцент, заведующий кафедрой биохимии Белорусского государственного университета.

Соколов А.В., д.б.н., профессор, заведующий лабораторией биохимической генетики отдела молекулярной генетики ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины».

Панасенко О.М., д.б.н., профессор, заведующий лабораторией физико-химических методов исследования и анализа отдела биофизики Федерального научно-клинического центра физико-химической медицины ФМБА России.

Черенкевич С.Н., д.б.н., профессор, академик НАН Беларуси, профессор кафедры биофизики Белорусского государственного университета.

#### **Адрес для корреспонденции**

220030, Республика Беларусь,  
г. Минск, пр. Независимости, 4  
Белорусский государственный университет  
тел. +375-17-209-54-37;  
e-mail: autumn\_frost@mail.ru  
Терехова Мария Сергеевна

Gorudko I.V., PhD, associate professor, leading researcher of SRL of biophysics and biotechnology of Belarusian state university.

Grigorieva D.V., PhD, senior researcher of SRL of biophysics and biotechnology of Belarusian state university.

Semak I.V., PhD, associate professor, head of department of biochemistry of Belarusian state university.

Sokolov A.V., D.Sci, head of laboratory of biochemical genetics, molecular genetics section of Institute of experimental medicine.

Panasenko O.M., D.Sci, professor, head of laboratory of physical and chemical methods of investigation and analysis, biophysics department of Federal research and clinical center of physical-chemical medicine.

Cherenkevich S.N., D.Sci, professor, academician of NAS of Belarus, professor of department of biophysics of Belarusian state university.

#### **Address for correspondence**

220030, Republic of Belarus,  
Minsk, Nezavisimosti ave., 4  
Belarusian state university  
tel. +375-17-209-54-37;  
e-mail: autumn\_frost@mail.ru  
Terekhova Maryia Sergeevna