

ВЛИЯНИЕ ПЕРОКСИДА ВОДОРОДА НА СПОСОБНОСТЬ НЕЙТРОФИЛОВ ГЕНЕРИРОВАТЬ АКТИВНЫЕ ФОРМЫ КИСЛОРОДА И ХЛОРА И СЕКРЕТИРОВАТЬ МИЕЛОПЕРОКСИДАЗУ IN VITRO

© Е. И. Коваленко,¹ Г. Н. Семенкова, С. Н. Черенкевич

Кафедра биофизики физического факультета Белорусского государственного университета, Минск;
¹электронный адрес: kavalenka@bsu.by

В работе изучено влияние пероксида водорода (H_2O_2) в концентрации 10^{-8} — 10^{-2} моль/л на способность нейтрофилов образовывать активные формы кислорода и хлора (АФКХ) и секретировать миелопероксидазу (МПО), а также исследовано повреждающее действие H_2O_2 на нейтрофилы. Обнаружено, что H_2O_2 в концентрации $2 \cdot 10^{-3}$ — $2 \cdot 10^{-2}$ моль/л приводит к нарушению барьерных свойств мембран нейтрофилов и высвобождению лактатдегидрогеназы. Инкубирование нейтрофилов с добавлением 10^{-4} — 10^{-7} моль/л H_2O_2 сопровождается повышением способности клеток генерировать АФКХ при фагоцитозе и снижением способности секретировать МПО и АФКХ во внеклеточную среду в ходе адгезии. Механизмы действия H_2O_2 сопряжены с метаболизмом арахидоновой кислоты. Ингибирование 5-липоксигеназного или циклооксигеназного пути метаболизма вызывает усиление цитодеструктивного действия H_2O_2 . Блокирование 5-липоксигеназы приводит к отмене влияния H_2O_2 на секрецию МПО и усилению его влияния на способность нейтрофилов генерировать АФКХ при фагоцитозе. Полученные данные свидетельствуют о высокой устойчивости нейтрофилов крови к деструктивному действию H_2O_2 и подтверждают регуляторную роль пероксида водорода в отношении функциональных свойств нейтрофилов.

Ключевые слова: нейтрофилы, пероксид водорода, активные формы кислорода и хлора, миелопероксидаза, лактатдегидрогеназа, циклооксигеназа, 5-липоксигеназа.

Принятые сокращения: АК — арахидоновая кислота, АФКХ — активные формы кислорода и хлора, ЛДГ — лактатдегидрогеназа, ЛЗХЛ — люминолзависимая хемилюминесценция, 5-ЛЮ — 5-липоксигеназа, МПО — миелопероксидаза, ПХ — пероксидаза хрена, СБСР — сбалансированный буферный солевой раствор, отн. ед. — относительные единицы, ХЛ — хемилюминесценция, ЦО — циклооксигеназа.

Нейтрофилы принимают участие в иммунных реакциях при инфицировании организма (Aratani, 2006; Brown et al., 2006), аллергических и аутоиммунных заболеваниях (Holgate et al., 2006; Ramos et al., 2006), ишемии и атеросклерозе (Cave et al., 2006), ожоговой и механической травмах (Ravage et al., 1998; Rose et al., 2000), стрессе во время избыточных физических или психических нагрузок (Saxton et al., 2003; Wang, 2004; Kumae et al., 2006). Активированные нейтрофилы способны осуществлять внутриклеточное разрушение биологического материала, захватываемого в процессе фагоцитоза, и секретировать во внеклеточную среду высоко- и низкомолекулярные вещества, обладающие иммуномодулирующим либо токсичным действием (Кнаарен et al., 2006; Nathan, 2006). Сегментоядерные нейтрофилы обладают наибольшей из всех клеток организма способностью генерировать активные формы кислорода и хлора (АФКХ) благодаря высокому содержанию в них НАДФН-оксидазы и миелопероксидазы (МПО) (Arnhold, 2004).

Пероксид водорода (H_2O_2), образующийся при дисмутации генерируемых НАДФН-оксидазой супероксидных радикалов, диффузионным образом распространяется по

различным клеточным компартментам и во внеклеточной среде и может регулировать функционирование нейтрофилов по паракринным и аутокринным механизмам (Кнаарен et al., 2006; Nathan, 2006). В настоящее время имеются доказательства как цитолитического, так и регуляторного действия H_2O_2 на ряд типов клеток, в том числе нефагоцитарной природы (Schreck et al., 1991; Гамалей, Клюбин, 1996; Hancock et al., 2001; Droge, 2002; Кулагова и др., 2006; Кнаарен et al., 2006). Для фагоцитов показано, что экзогенный H_2O_2 дозозависимым образом индуцирует хемотаксис и гиперполяризацию мембраны (Klyubin et al., 1996; Gamaley et al., 1997), усиливает fMLP-индуцированный респираторный взрыв и фагоцитарную активность клеток (Winn et al., 1991; Gamaley et al., 1994), приводит к снижению LPS-индуцированной секреции TNF- α (Strasheim et al., 2004).

В нашей работе исследовано влияние H_2O_2 в концентрации 10^{-8} — 10^{-2} моль/л на способность нейтрофилов секретировать МПО и генерировать АФКХ при адгезии и фагоцитозе, а также на уровень внутриклеточной активности МПО. Кроме того, изучено деструктивное воздействие H_2O_2 на нейтрофилы.

Материал и методика

Реактивы: декстран-500, фиколл-400, 30%-ный раствор H_2O_2 , пероксидаза хрена (ПХ), люминол, аспирин и Тритон X-100 (Sigma, США); урографин (Schering AG, Германия); МК-886 (Calbiochem, США); гепарин и латекс (Белмедпрепараты, Беларусь); NaCl, KCl, $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, $CaCl_2$, $NaHCO_3$, глюкоза и наборы для определения лактатдегидрогеназы (ЛДГ) (Анализ-Х, Беларусь). Из фиколла-400 и урографина готовили раствор фиколл-урографина плотностью 1.077 г/см^3 . Сбалансированный буферный солевой раствор (СБСР) Эрла собственного приготовления включал в себя (в ммоль/л): $116.2 — NaCl$, $5.4 — KCl$, $0.9 — NaH_2PO_4 \cdot H_2O$, $0.8 — MgSO_4 \cdot 7H_2O$, $1.8 — CaCl_2$, $26.2 — NaHCO_3$, $5.6 —$ глюкоза.

Выделение нейтрофилов из периферической крови здоровых людей проводили по описанному методу (Бейум, 1980). Кровь, консервированную с гепарином, перемешивали из расчета $5 : 1$ с 7%-ным раствором декстрана-500 в 0.15 моль/л NaCl и инкубировали в течение 60 мин при 37°C для седиментации эритроцитов. В пробирки наливали по 3 мл фиколл-урографина, на который осторожно наслаивали по 9 мл плазмы, обогащенной лейкоцитами, и центрифугировали в течение 30 мин при 400 г для разделения лейкоцитов по плотности. После центрифугирования надосадочную жидкость и слой мононуклеаров удаляли, к осадку, содержащему фракцию гранулоцитов, добавляли 1 мл ледяной дистиллированной H_2O , перемешивали в течение 20 с для гипотонического лизиса оставшихся эритроцитов, после чего восстанавливали осмотическую концентрацию добавлением 1 мл 0.3 моль/л NaCl . Затем клетки дважды отмывали в 0.15 моль/л NaCl , центрифугируя в течение 10 мин при 400 г . Полученную фракцию клеток суспендировали в СБСР Эрла при pH 7.2. В полученной фракции клеток содержание нейтрофилов составляло не менее 96 %.

Повреждение нейтрофилов при действии H_2O_2 исследовали по высвобождению из клеток в инкубационную среду цитозольного фермента ЛДГ. Нейтрофилы ($2 \cdot 10^6$ клеток/мл), суспендированные в СБСР Эрла, помещали в стеклянные пробирки, добавляли H_2O_2 в концентрации $10^{-7}—10^{-2} \text{ моль/л}$ и инкубировали в течение 30 или 60 мин при 37°C . Затем клетки осаждали центрифугированием в течение 7 мин при 400 г , надосадочную жидкость собирали. В образцах внеклеточной жидкости определяли активность ЛДГ с помощью специального набора реактивов и спектрофотометра PV 1251C (Solar, Беларусь) кинетическим методом (Артюхов, Наквасина, 2000). Метод основан на ферментативной реакции взаимодействия пирувата и НАДН с образованием лактата и $НАД^+$. Уменьшение концентрации НАДН в образцах за 1 мин, детектируемое по изменению оптической плотности образцов при длине волны 340 нм (ΔD), пропорционально активности ЛДГ (A): $A = \Delta D \cdot 8600 \text{ [мкмоль} \cdot \text{мин}^{-1} \cdot \text{л}^{-1}]$. Полученные значения выражали в процентах от общей активности ЛДГ нейтрофилов (A_0), которую оценивали после обработки клеток 0.1%-ным раствором Тритона X-100. Высвобождение ЛДГ ($A_{\text{отн.}}$, %) определяли по формуле $A_{\text{отн.}} = A \cdot 100 \% / A_0$.

Генерация нейтрофилами АФКХ. К суспензии нейтрофилов ($2 \cdot 10^6$ клеток/мл) добавляли H_2O_2 , ингибиторы внутриклеточных сигнальных путей и инкубировали в течение 30 мин. Затем клетки осаждали центрифугированием в течение 7 мин при 400 г , освобождали от

инкубационной среды и ресуспендировали в СБСР Эрла. В полученных образцах определяли способность нейтрофилов генерировать АФКХ при стимуляции. Клетки помещали в стеклянную кювету, добавляли люминол ($5 \cdot 10^{-5} \text{ моль/л}$) и исследовали параметры люминолзависимой хемиллюминесценции (ЛЗХЛ), обусловленной генерацией АФКХ в ходе адгезии клеток на стекло. Через 10 мин в образцы также вносили латекс и определяли параметры ЛЗХЛ, обусловленной образованием АФКХ в ходе фагоцитоза латекса нейтрофилами. С помощью компьютеризированного измерительного комплекса, включающего в себя биохемиллюминетр БХЛ-1 (Белгосуниверситет, Беларусь) и систему регистрации и обработки сигналов Unichrom («Новые аналитические системы», Беларусь), регистрировали кинетические зависимости интенсивности ЛЗХЛ. Интегральную интенсивность хемиллюминесценции (ХЛ) клеток вычисляли как площадь под кинетической кривой, полученной за 10 мин измерения.

Разложение H_2O_2 в различных образцах. В образцы, содержащие нейтрофилы ($2 \cdot 10^6$ клеток/мл), или обломки нейтрофилов, разрушенных в трех циклах замораживания при -18°C и оттаивания при 37°C , или СБСР Эрла (контроль), вносили H_2O_2 и инкубировали в течение 0—30 мин. После инкубирования образцы центрифугировали при 800 г в течение 2 мин, супернатанты собирали и определяли в них остаточное количество H_2O_2 хемиллюминесцентным методом. Для этого в образцы добавляли ПХ (1.1 нг/мл) и люминол ($5 \cdot 10^{-5} \text{ моль/л}$), измеряли интегральную интенсивность ХЛ за 4 мин и оценивали концентрацию H_2O_2 в образцах с помощью калибровочного графика. Калибровочная кривая представляет собой зависимость интегральной интенсивности ХЛ, обусловленной реакцией взаимодействия люминола ($5 \cdot 10^{-5} \text{ моль/л}$) с H_2O_2 в СБСР Эрла, катализируемой ПХ (1.1 нг/мл), от концентрации H_2O_2 .

Влияние H_2O_2 на активность МПО нейтрофилов. 1. Нейтрофилы ($2 \cdot 10^6$ клеток/мл) инкубировали в течение 30 мин при 37°C , без добавления (контроль) или с добавлением H_2O_2 в концентрации $10^{-8}—10^{-3} \text{ моль/л}$, не индуцирующей деструкцию нейтрофилов. Затем клетки разрушали в трех циклах замораживания при -18°C и оттаивания при 37°C . Общую активность МПО в клетках оценивали по интегральной интенсивности ХЛ, обусловленной катализируемой МПО реакцией окисления люминола ($5 \cdot 10^{-5} \text{ моль/л}$) H_2O_2 (10^{-5} моль/л) (Dahlgren et al., 1993; Naqqani et al., 1999). Значение параметра, характеризующего активность МПО, выражали в отн. ед.

2. Нейтрофилы сначала разрушали, проводя три цикла замораживания и оттаивания. Затем полученные образцы обломков клеток инкубировали в течение 30 мин с добавлением H_2O_2 в концентрации $10^{-8}—10^{-3} \text{ моль/л}$ или без добавления H_2O_2 . По окончании инкубирования оценивали общую активность МПО образцов, как описано выше.

Секреторная дегрануляция азурофильных гранул нейтрофилов. Суспензии нейтрофилов ($2 \cdot 10^6$ клеток/мл) помещали в стеклянные цилиндрические кюветы и инкубировали с добавлением H_2O_2 и ингибиторов в течение 30 мин при 37°C . Нейтрофилы при адгезии на дно кювет активировались и секретировали содержимое гранул во внеклеточную среду. По окончании инкубирования надосадочную жидкость собирали и центрифугировали в течение 7 мин при 400 г для осаждения неприкрепившихся клеток. В полученных образцах внеклеточной жидкости определяли активность МПО, секре-

тированной клетками, по интенсивности ХЛ, индуцированной добавлением люминола ($5 \cdot 10^{-5}$ моль/л) и H_2O_2 ($1 \cdot 10^{-5}$ моль/л). Полученные значения выражали в % от общей активности МПО нейтрофилов.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием программы Statistica 6.0. На рисунках представлены средние значения величин и их стандартные отклонения, указаны уровни значимости различий (P). Различия считали достоверными при $P \leq 0.05$.

Результаты

Повреждающее действие H_2O_2 на нейтрофилы и утилизация H_2O_2 клетками. Для того чтобы определить способность H_2O_2 вызывать повреждение нейтрофилов, мы оценили выход во внеклеточную среду цитозольного белка ЛДГ при добавлении экзогенного H_2O_2 в различных концентрациях. На рис. 1 показаны значения параметра $A_{\text{отн.}}$, характеризующего высвобождение ЛДГ из нейтрофилов через 30 и 60 мин после внесения H_2O_2 в суспензию клеток. H_2O_2 вносили или однократно, или десятикратно с интервалом 1 мин. Как видно на рис. 1, H_2O_2 в концентрации 10^{-7} — 10^{-3} моль/л не приводит к деструкции клеток. В результате однократного добавления 10^{-2} моль/л H_2O_2 высвобождение ЛДГ из нейтрофилов повышается по сравнению с контролем в 2 раза спустя 30 мин инкубирования и в 3 раза спустя 60 мин инкубирования ($P < 0.01$). При десятикратном внесении H_2O_2 в концентрации 10^{-3} моль/л с интервалом 1 мин высвобождение ЛДГ не увеличивается. Это свидетельствует о том, что нейтрофилы быстро утилизируют H_2O_2 , препятствуя его накоплению до уровня конечных значений 10^{-2} моль/л, при которых наблюдается повреждение клеток.

С целью определения эффективности утилизации H_2O_2 нейтрофилами в инкубационную среду добавляли 10^{-2} моль/л H_2O_2 , инкубировали в течение 2—30 мин при 37°C , затем клетки осаждали, а надосадочную жидкость

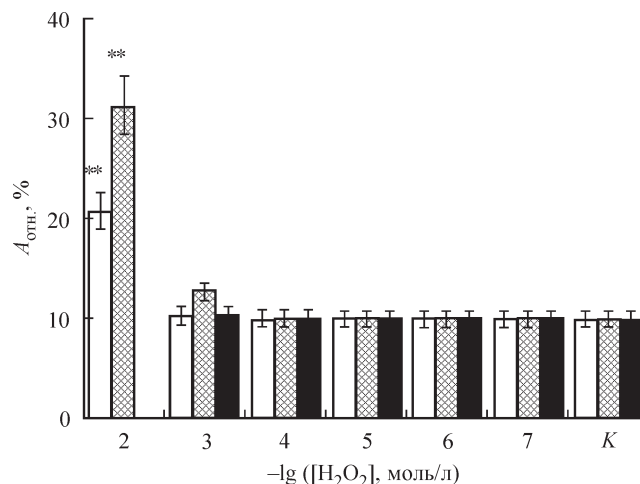


Рис. 1. Высвобождение ЛДГ из нейтрофилов, индуцированное добавлением H_2O_2 в концентрации 10^{-7} — 10^{-2} моль/л.

Белые столбики — однократное внесение H_2O_2 и инкубирование в течение 30 мин, серые — однократное внесение H_2O_2 и инкубирование в течение 60 мин, черные — десятикратное внесение H_2O_2 с интервалами 1 мин и последующее инкубирование в течение 30 мин; K — контроль (без добавления H_2O_2). Звездочки — $P < 0.01$. Здесь и на рис. 2—7 вертикальными отрезками показано стандартное отклонение средних величин.

собирали. В полученных образцах оценивали концентрацию H_2O_2 , анализируя параметры ХЛ при катализируемом ПХ окислении люминола H_2O_2 . В контрольном эксперименте оценивали изменение концентрации H_2O_2 в СБСР Эрла при инкубировании. На рис. 2 показана зависимость интегральной интенсивности ХЛ образцов внеклеточной жидкости нейтрофилов (кривая 1) и СБСР Эрла (кривая 2) от времени инкубирования, прошедшего с момента внесения H_2O_2 . На рис. 2 видно, что значения исследуемого параметра для образцов внеклеточной жидкости, соответствующие времени инкубирования 6 мин, ниже, чем в конт-

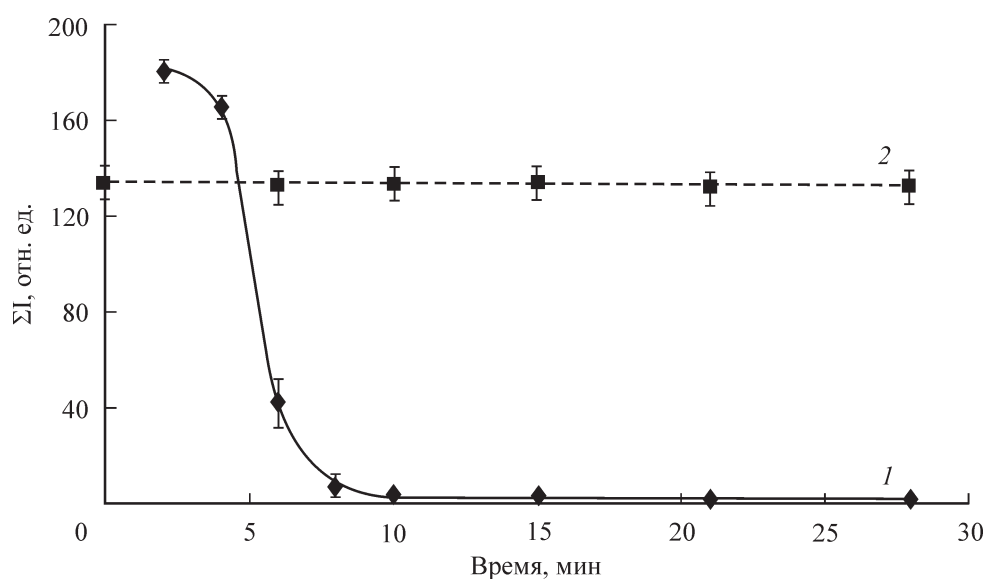


Рис. 2. Изменение интегральной интенсивности ХЛ (ΣI) внеклеточной жидкости нейтрофилов, обусловленное изменением концентрации H_2O_2 в образцах, при изменении времени инкубирования, прошедшего с момента внесения 10^{-2} моль/л H_2O_2 .

По оси ординат — ΣI образцов при добавлении в них $5 \cdot 10^{-5}$ моль/л люминола и 1.1 нг/мл пероксидазы хрена. 1 — образцы внеклеточной жидкости нейтрофилов, 2 — контроль (раствор Эрла).

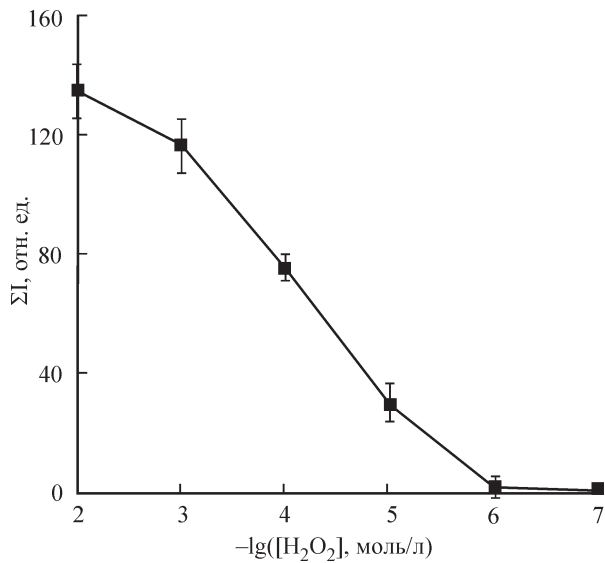


Рис. 3. Концентрационная зависимость, позволяющая определить содержание H_2O_2 в образцах.

По оси ординат — интегральная интенсивность ХЛ (ΣI) в системе «люминол ($5 \cdot 10^{-5}$ моль/л) + ПХ (1.1 нг/мл) + H_2O_2 ».

роле, на 60—75 %, а при времени инкубирования 10—30 мин ниже на 98—100 %, что свидетельствует о значительном уменьшении концентрации H_2O_2 во внеклеточной жидкости. Приведенная на рис. 3 кривая позволяет оценить концентрацию H_2O_2 и характеризует зависимость интегральной интенсивности ХЛ от концентрации H_2O_2 в системе «люминол ($5 \cdot 10^{-5}$ моль/л) + ПХ (1.1 нг/мл) + СБСР Эрла + H_2O_2 » без инкубирования. Сопоставление данных, представленных на рис. 2 и 3, позволяет заключить, что через 10 мин после добавления 10^{-2} моль/л H_2O_2 в суспензию нейтрофилов во внеклеточной среде остается не более 10^{-6} — 10^{-7} моль/л H_2O_2 (это уровень H_2O_2 , при котором повреждение клеток не инициируется). Однако, как следует из данных рис. 1, через 60 мин после внесения 10^{-2} моль/л H_2O_2 высвобождение ЛДГ из нейтрофилов значительно выше, чем через 30 мин. Следовательно, процессы H_2O_2 -индуцированного повреждения нейтрофилов продолжают развиваться и после утилизации клетками H_2O_2 .

На рис. 2 можно заметить, что интегральная интенсивность ХЛ внеклеточной жидкости нейтрофилов (кривая 1) при времени инкубирования 2—4 мин после добавления H_2O_2 выше контрольных значений (кривая 2). Причиной этого может быть повышение пероксидазной активности во внеклеточной среде за счет МПО, секретруемой нейтрофилами (Kavalenka et al., 2003).

Регуляция функционирования клеток и их гибели может осуществляться с участием ферментов метаболизма арахидоновой кислоты (АК) (Chang, Wang, 2001). На рис. 4 показано влияние МК-886 (0.5 мкмоль/л), блокирующего 5-липоксигеназный (5-ЛО) путь превращения АК, и аспирина (1 ммоль/л), ингибирующего образование циклооксигеназой (ЦО) простагландинов, на высвобождение ЛДГ из нейтрофилов. Оказалось, что ингибирование ЦО или 5-ЛО метаболизма АК приводит к усилению H_2O_2 -индуцированного повреждения нейтрофилов (рис. 4). Индуцированное H_2O_2 (2 ммоль/л , 60 мин) высвобождение ЛДГ в присутствии аспирина на $79 \pm 34 \%$, а в присутствии МК-886 — на $66 \pm 24 \%$ выше, чем в отсутствие ингибиторов. При инкубировании нейтрофилов в

течение 210 мин после добавления H_2O_2 высвобождение ЛДГ повышается на $162 \pm 55 \%$, а в присутствии МК-886 — на $112 \pm 45 \%$ по сравнению с контролем (в отсутствие ингибиторов). Таким образом, деструктивное действие H_2O_2 на нейтрофилы усиливается при ингибировании метаболизма АК по ЦО- и 5-ЛО-путям.

Влияние H_2O_2 на способность нейтрофилов генерировать АФКХ. На рис. 5 показаны значения интегральной интенсивности ЛЗХЛ, обусловленной генерацией нейтрофилами АФКХ в процессе их адгезии к стеклу и в ходе фагоцитоза латекса после преинкубирования клеток с добавлением 10^{-8} — 10^{-3} моль/л H_2O_2 . Установлено, что у нейтрофилов в результате экспозиции к H_2O_2 в концентрации 10^{-6} — 10^{-5} моль/л способность генерировать АФКХ при адгезии снижается ($P < 0.05$), а при фагоцитозе латекса повышается ($P < 0.01$) (рис. 5, а). Такого же типа эффекты, но меньшей интенсивности наблюдаются при внесении в среду инкубирования 10^{-7} или 10^{-4} моль/л H_2O_2 . С использованием МК-886 и аспирина показано, что влияние H_2O_2 на способность нейтрофилов генерировать АФКХ зависит от активности 5-ЛО, но не от ингибирования ЦО-пути метаболизма АК (рис. 5, б, в). Таким образом, H_2O_2 в концентрации 10^{-7} — 10^{-4} моль/л оказывает модулирующее влияние на способность нейтрофилов генерировать АФКХ при адгезии и фагоцитозе латекса по механизму, зависящему от 5-ЛО-пути метаболизма АК.

Влияние H_2O_2 на активность МПО нейтрофилов и секрецию МПО во внеклеточную среду. На рис. 6 приведены значения параметра, характеризующего активность МПО в образцах нейтрофилов и их обломков, проинкубированных в течение 30 мин после добавления 10^{-3} — 10^{-7} моль/л H_2O_2 . Как обсуждалось выше, H_2O_2 быстро разлагается клетками — через 30 мин после добавления 10^{-2} моль/л в инкубационной среде остается не более 10^{-7} — 10^{-6} моль/л H_2O_2 (см. рис. 2, 3); аналогичный результат получен при исследовании утилизации

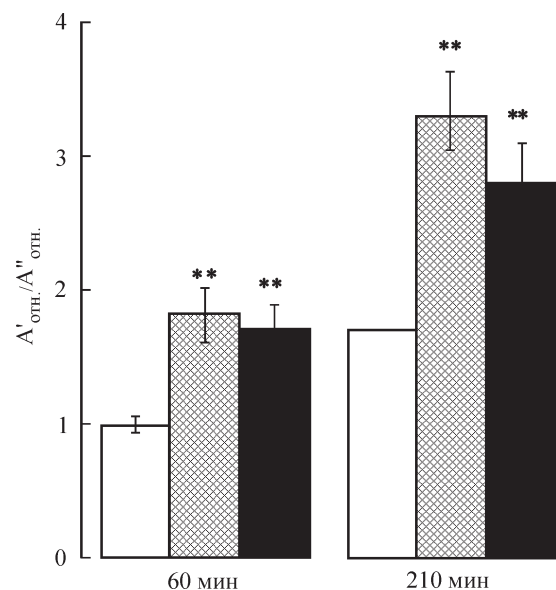


Рис. 4. Влияние ингибиторов метаболизма АК на высвобождение ЛДГ из нейтрофилов, индуцированное H_2O_2 , при инкубировании клеток в течение 60 и 210 мин после внесения H_2O_2 .

Серые столбики — аспирин (10^{-3} моль/л), черные — МК-886 ($0.5 \cdot 10^{-6}$ моль/л), белые — без ингибиторов; $A'_{\text{отн.}}$ — высвобождение ЛДГ из нейтрофилов при добавлении $2 \cdot 10^{-3}$ моль/л H_2O_2 , $A''_{\text{отн.}}$ — высвобождение ЛДГ из нейтрофилов без добавления H_2O_2 . Звездочки — $P < 0.01$.

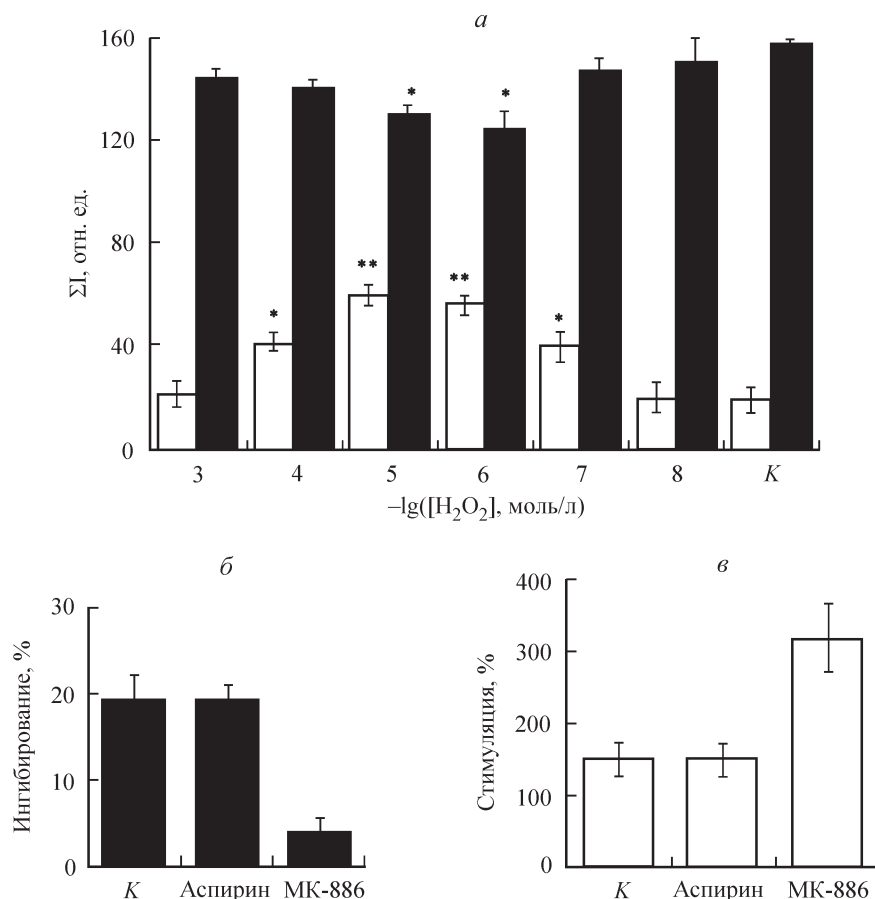


Рис. 5. Влияние H_2O_2 на способность нейтрофилов генерировать АФКХ при адгезии (черные столбики) и при действии латекса (белые столбики).

а — интегральная интенсивность ХЛ (ΣI) нейтрофилов, инкубированных в течение 30 мин с добавлением H_2O_2 в различных концентрациях; *К* — контроль (без добавления H_2O_2); одна звездочка — $P < 0.05$, две звездочки — $P < 0.01$. *б, в* — изменение способности нейтрофилов генерировать АФКХ, индуцированное добавлением 10^{-6} моль/л H_2O_2 , в отсутствие (*К*) и в присутствии ингибиторов метаболизма АК.

H_2O_2 в среде, содержащей обломки нейтрофилов (данные не показаны). Для определения активности МПО методом ХЛ в пробы вносили H_2O_2 в концентрации 10^{-5} моль/л, которая на 1—2 порядка превышает концентрацию H_2O_2 в образцах, инкубированных с ним. На рис. 6 видно, что активность МПО нейтрофилов после инкубирования с добавлением 10^{-7} — 10^{-3} моль/л H_2O_2 повышается по сравнению с контролем, причем наиболее значительно при 10^{-7} и 10^{-3} моль/л H_2O_2 . Активность МПО обломков нейтрофилов значительно увеличивается при инкубировании с добавлением H_2O_2 в концентрации 10^{-4} — 10^{-3} , но не 10^{-7} — 10^{-5} моль/л.

Изучение влияния H_2O_2 на секрецию МПО во внеклеточную среду позволило выявить, что H_2O_2 в концентрации 10^{-7} — 10^{-4} моль/л снижает секрецию МПО нейтрофилами, причем в диапазоне концентраций 10^{-7} — 10^{-5} моль/л величина эффекта возрастает с увеличением концентрации H_2O_2 (рис. 7). С использованием МК-886 и аспирина установлено, что ингибиторный эффект H_2O_2 на секрецию МПО устраняется при предотвращении метаболизма АК по 5-ЛО-пути, но не по ЦО-пути.

Обсуждение

В данной работе мы исследовали влияние экзогенного H_2O_2 на способность нейтрофилов генерировать АФКХ. Обнаружено, что инкубирование нейтрофилов с

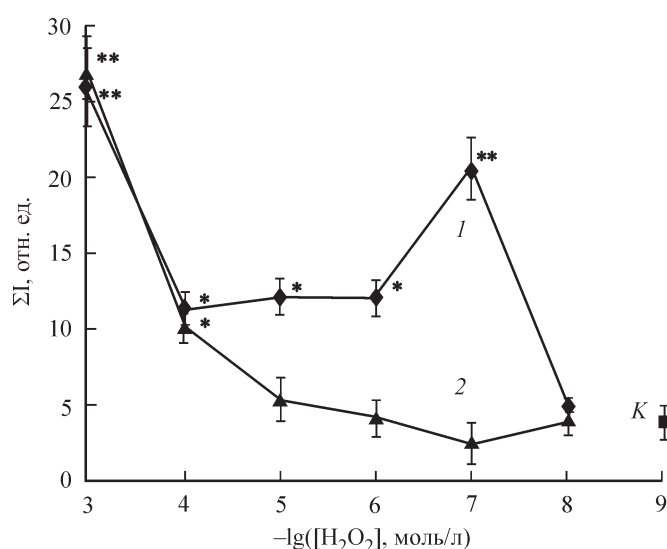


Рис. 6. Влияние H_2O_2 на активность МПО нейтрофилов и их обломков.

По оси ординат — интегральная интенсивность ХЛ (ΣI) в системе «люминол ($5 \cdot 10^{-5}$ моль/л) + H_2O_2 (10^{-5} моль/л) + МПО образцов». Образцы нейтрофилов (1) и их обломков (2) инкубировали в течение 30 мин после внесения 10^{-8} — 10^{-3} моль/л H_2O_2 ; *К* — контроль (без добавления H_2O_2 в среду); одна звездочка — $P < 0.05$, две звездочки — $P < 0.01$.

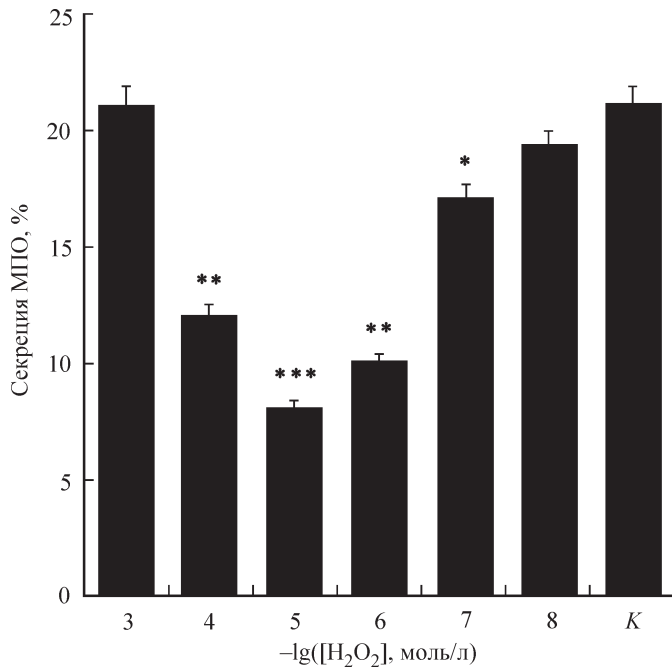


Рис. 7. Секретия нейтрофилами МПО, индуцированная в процессе адгезии клеток к стеклу добавлением 10^{-8} — 10^{-3} моль/л H_2O_2 .

Одна звездочка — $P < 0.05$, две звездочки — $P < 0.01$, три звездочки — $P < 0.001$; K — контроль.

добавлением 10^{-4} — 10^{-7} моль/л H_2O_2 сопровождается повышением способности этих клеток генерировать АФКХ при действии латекса и снижением выхода АФКХ при адгезии нейтрофилов к стеклу. Максимальные эффекты выявлены при концентрации H_2O_2 10^{-6} — 10^{-5} моль/л. Как показано в работах других авторов, при таких же концентрациях H_2O_2 индуцирует хемотаксис нейтрофилов и кратковременное повышение в них внутриклеточной концентрации Ca^{2+} (Klyubin et al., 1996), усиливает респираторный взрыв, индуцированный fMLP и опсонизированным зимозаном (Winn et al., 1991). Таким образом, наши наблюдения подтверждают выводы других исследователей о способности экзогенного H_2O_2 в концентрации 10^{-6} — 10^{-5} моль/л модулировать активность нейтрофилов и усиливать генерацию ими АФКХ при фагоцитозе.

Основные системы генерации АФКХ в нейтрофилах — это НАДФН-оксидазный комплекс, восстанавливающий O_2 до $O_2^{\cdot-}$, и МПО, окисляющая субстраты с использованием H_2O_2 и $O_2^{\cdot-}$ и генерирующая гипохлорит (Albrecht, Jungi, 1993; Arnhold, 2004; Ximenes et al., 2005; Aratani, 2006). Нейтрофилы способны генерировать АФКХ во внеклеточной среде и внутри фаголизосом, при этом локализация, продолжительность и механизм формирования АФКХ зависят от вида стимулирующего воздействия (Albrecht, Jungi, 1993; Kavalenka et al., 2003). Например, образование АФКХ при адгезии или действии растворимых стимулов происходит в основном у внешней поверхности нейтрофилов, а при фагоцитозе микроорганизмов или частиц — внутри клеток (Granfeldt, Dahlgren, 2001; Kavalenka et al., 2003). H_2O_2 , образующийся при дисмутации $O_2^{\cdot-}$, диффундирует по всей клетке и проникает во все клеточные компартменты (Ohno, Gallin, 1985), однако для активации МПО, депонированной в азурофильных гранулах, необходимо ее высвобождение из гранул в

область формирования $O_2^{\cdot-}$ и H_2O_2 , т. е. во внеклеточную среду, либо внутрь фаголизосом (Albrecht, Jungi, 1993).

Ранее мы обнаружили, что процессы генерации АФКХ при действии латекса или при адгезии могут конкурировать друг с другом, поскольку формирование фаголизосом при поглощении частиц влечет за собой подавление секреции содержимого азурофильных гранул во внеклеточную среду (Kavalenka et al., 2003). Здесь мы показали, что при адгезии нейтрофилов с добавлением в инкубационную среду H_2O_2 (10^{-4} — 10^{-7} моль/л) секретия МПО значительно снижается. Это, по-видимому, и является причиной снижения генерации АФКХ при адгезии (во внеклеточной среде) и повышения при фагоцитозе латекса (внутри клетки), тем более что экзогенный H_2O_2 в таких же концентрациях вызывал и увеличение внутриклеточной активности МПО нейтрофилов. Перемещение гранул в цитоплазму происходит с участием микрофиламентов, и агенты, разрушающие микрофиламенты, например цитохалазин В, ингибируют внутрифагосомальную дегрануляцию и усиливают секреторную дегрануляцию. Можно предположить, что H_2O_2 стимулирует сборку филаментов. Это предположение подтверждается также тем, что H_2O_2 в концентрации 10^{-6} — 10^{-5} моль/л индуцирует хемотаксис нейтрофилов (Klyubin et al., 1996), а для направленной миграции клеток активация микрофиламентов необходима.

Повышение МПО активности нейтрофилов при действии H_2O_2 в высокой концентрации (10^{-4} — 10^{-3} моль/л) выявлено не только в цельных, но и в разрушенных клетках, следовательно, не зависит от функционирования систем внутриклеточной сигнализации. Обнаруженные эффекты не могут быть связаны с непосредственным участием введенного в среду H_2O_2 в реакциях, по которым определялась активность МПО, поскольку за 30 мин инкубирования нейтрофилы (и цельные, и разрушенные) практически полностью утилизировали внесенный H_2O_2 . Реакции, катализируемые МПО, достаточно сложны, различным образом протекают при кислых и нейтральных значениях pH (Albrecht, Jungi, 1993; Vlasova et al., 2006), ингибируются каталазой, супероксиддисмутазой и другими антиоксидантами (Ximenes et al., 2005). МПО может реагировать с различными субстратами, одни из которых конкурентным образом могут ингибировать взаимодействие МПО с другими. Механизмы влияния H_2O_2 в больших концентрациях на активность МПО клеток нами не раскрыты, но в силу вышесказанного могут включать в себя: снижение активности антиоксидантных ферментов в результате их непосредственного повреждения (Мирошниченко, 1992; Gille, Sigler, 1995; Phalen, 2006); изменение величины pH, влияющей на механизм проявления активности МПО и потребление ею H_2O_2 (Kettle, Winterbourn, 1989; Zuurbier et al., 1990; Vlasova et al., 2006); изменение концентрации субстратов, связывающихся с МПО (Bolscher et al., 1984; Thannickal, Fanburg, 2000), которое может происходить и в цельных, и в разрушенных клетках.

Смещение баланса оксидантов—прооксидантов при действии 10^{-4} — 10^{-3} моль/л H_2O_2 в сторону усиления оксидантной активности следует рассматривать как окислительный стресс. Примечательно, что влияние H_2O_2 на процессы дегрануляции и генерации нейтрофилами АФКХ в ходе адгезии и фагоцитоза при концентрации H_2O_2 10^{-4} — 10^{-3} моль/л менее выражено, чем при концентрации 10^{-6} — 10^{-5} моль/л, что может отражать изменение функционирования нейтрофилов в условиях окислительного стресса. Было обнаружено ингибирующее влияние 10^{-4} — 10^{-3} моль/л

H₂O₂ на активность NF-κB и секрецию TNF-α LPS-стимулированными нейтрофилами, что связано с активацией тирозинкиназы ERK1/2, p38, JNK и PKB при этих концентрациях H₂O₂ (но не более низких) (Strassheim et al., 2004).

Представляет интерес выявление сигнальных путей, вовлеченных в трансдукцию сигнала при действии низких концентраций H₂O₂. Важную роль в регуляции генерации АФКХ, дегрануляции, адгезии, хемотаксиса и апоптоза нейтрофилов играют ферменты метаболизма арахидоновой кислоты (АК), такие как фосфолипаза A₂, 5-ЛО и ЦО (Radmark, 2000; Chang, Wang, 2001; Kavalenka et al., 2003). Показана связь регуляторного действия H₂O₂ на моноциты с метаболизмом АК (Krijukov et al., 2006). Мы определили влияние ингибиторов метаболизма АК (МК-886 и аспирина) на эффекты, вызываемые 10⁻⁶ моль/л H₂O₂. Оказалось, что блокирование 5-ЛО-пути (но не ЦО-пути) метаболизма АК приводит к снижению эффективности влияния 10⁻⁶ моль/л H₂O₂ на генерацию АФКХ и секрецию МПО при адгезии и к усилению влияния H₂O₂ на способность нейтрофилов генерировать АФКХ при фагоцитозе латекса. Следует отметить, что в отсутствие экзогенного H₂O₂ ингибитор МК-886 вызывал снижение продукции АФКХ и секреции МПО при адгезии и повышение выхода АФКХ при действии латекса (данные не показаны). Полученные результаты свидетельствуют об уменьшении влияния 5-ЛО на секрецию АФКХ и МПО при адгезии и повышении влияния 5-ЛО на генерацию АФКХ при фагоцитозе латекса в результате воздействия экзогенного H₂O₂ в концентрации 10⁻⁶—10⁻⁵ моль/л.

Активность 5-ЛО регулируется множественными путями и зависит от FLAP, ингибиторов сульфгидрильных групп и наличия пероксидов липидов. Кроме того, при активации нейтрофилов наблюдается регулируемое перемещение FLAP к плазматической мембране или ядру клетки (Rouzer, Samuelsson, 1986; Riendeau et al., 1989). 5-ЛО осуществляет трансформацию АК в лейкотриены, активирующие нейтрофилы по аутокринному и паракринному механизмам. Лейкотриен В₄ стимулирует процессы деструкции фагоцитированных микроорганизмов в нейтрофилах: при «выключении» гена 5-ЛО нейтрофилы оказываются дефектными в способности убивать захваченные патогены (Mancuso et al., 2001). Концентрация лейкотриенов контролируется с участием МПО, которая осуществляет их деградацию с использованием H₂O₂ (Henderson, Klebanoff, 1983). Таким образом, между активностью МПО и 5-ЛО имеется взаимосвязь, и экзогенный H₂O₂ в концентрации 10⁻⁶—10⁻⁵ моль/л оказывает влияние на взаимодействие 5-ЛО- и МПО-метаболических путей. При повышении активности МПО, индуцированном H₂O₂, деградация лейкотриенов может ускориться, что приведет в конечном итоге к снижению лейкотриен-зависимой активации нейтрофилов. Повышение активности МПО нейтрофилов возможно вследствие увеличения концентрации восстановителей, препятствующих накоплению неактивной формы МПО — соединения II (Bolscher et al., 1984; Thannickal, Fanburg, 2000).

H₂O₂ в высоких концентрациях индуцирует повреждение клеточных мембран и приводит к гибели клеток. Предполагается, что это действие не прямое, а опосредованное, поскольку H₂O₂ характеризуется низким окислительным потенциалом (Гамалей, Клубин, 1996). Механизмы повреждения нейтрофилов H₂O₂ среди прочих могут включать в себя неконтролируемую гиперактивацию клеток, генерацию избыточного количества АФКХ, усиление окислительных процессов, накопление липидных гидроперекисей и других токсичных продуктов (Гамалей, Клубин, 1996; Moldovan, Moldovan,

2004), в том числе с участием МПО. Полученные нами данные свидетельствуют о том, что в результате действия экзогенного H₂O₂ в концентрации 10⁻³—10⁻² моль/л происходит нарушение барьерных свойств мембран нейтрофилов и наблюдается высвобождение во внеклеточную среду цитозольных белков (ЛДГ). С увеличением времени инкубирования нейтрофилов после внесения H₂O₂ деструктивный эффект значительно возрастает. Нижняя концентрационная граница токсического действия H₂O₂, определенная по тесту с нитросиним тетразолием, составляла 10⁻⁴ моль/л (Klyubin et al., 1996), однако в этом случае клетки подвергались более длительному, чем в нашем случае, воздействию. Следует отметить, что по высвобождению ЛДГ, как и по поглощению нитросинего тетразолия, можно судить лишь о некротическом повреждении клеток, но невозможно оценить апоптотические изменения, которые, возможно, имеют место при более низких концентрациях H₂O₂ (10⁻⁴ и 10⁻³ моль/л) и менее длительном инкубировании. Ингибиторный анализ показал, что деструктивное действие H₂O₂ зависит от метаболизма липидов и усиливается при ингибировании 5-ЛО и ЦО метаболизма АК. Это свидетельствует о том, что именно АК, высвобождаемая из фосфолипидов мембран фосфолипазой A₂, а не ее метаболиты, образуемые по ЛО- или ЦО-пути, способствует деструкции мембран нейтрофилов.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о высокой степени устойчивости нейтрофилов крови к деструктивному действию H₂O₂, подтверждают регуляторную роль H₂O₂ в отношении функциональных свойств нейтрофилов, а также доказывают связь действия H₂O₂ на нейтрофилы с метаболизмом АК в этих клетках.

Работа выполнена при финансовой поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (проект Б03М-137).

Список литературы

- Артюхов В. Г., Наквасина М. А. 2000. Биологические мембраны: структурная организация, функции, модификация физико-химическими агентами. Воронеж: Изд-во ВГУ. 296 с.
- Бейум А. 1980. Выделение лимфоцитов, гранулоцитов и макрофагов. В кн.: Лимфоциты: выделение, фракционирование и характеристика. М.: Медицина. 9—36.
- Гамалей И. А., Клубин И. В. 1996. Перекись водорода как сигнальная молекула. Цитология. 38 (12): 1233—1247.
- Кулагова Т. А., Семенкова Г. Н., Квачева З. Б., Черенкович С. Н. 2006. Регуляция морфологических и функциональных свойств астроглиальных клеток пероксидом водорода. Цитология. 48 (11): 900—905.
- Мирошниченко О. С. 1992. Биогенез, физиологическая роль и свойства каталазы. Биополимеры и клетка. 8 (6): 3—25.
- Albrecht D., Jungi T. W. 1993. Luminol-enhanced chemiluminescence induced in peripheral blood-derived human phagocytes obligatory requirement of myeloperoxidase exocytosis by monocytes. J. Leukocyte Biol. 54: 300—306.
- Aratani Y. 2006. Role of myeloperoxidase in the host defense against fungal infection. Nippon. Ishinkin. Gakkai Zasshi. 47: 195—199.
- Arnhold J. 2004. Review: properties, functions, and secretion of human myeloperoxidase. Biochemistry. (Moscow). 69: 4—9.
- Bolscher B. G. J. M., Zoutberg G. R., Cuperus R. A., Wever R. 1984. Vitamin C stimulates the chlorinating activity of human myeloperoxidase. Biochim. Biophys. acta. 784: 189—191.
- Brown K. A., Brain S. D., Pearson J. D., Edgeworth J. D., Lewis S. M., Treacher D. F. 2006. Neutrophils in development of multiple organ failure in sepsis. Lancet. 368: 157—169.

- Cave A. C., Brewer A. C., Narayanapanicker A., Ray R., Griev D. J., Walker S., Shah A. M. 2006. NADPH oxidases in cardiovascular health and disease. *Antioxid. Redox. Signal.* 8 : 691—728.
- Chang L. C., Wang J. P. 2001. Signal transduction pathways for activation of extracellular signal-regulated kinase by arachidonic acid in rat neutrophils. *J. Leukocyte Biol.* 69 : 659—665.
- Dahlgren C., Follin P., Lundqvist H., Sjolín C. 1993. Quantitative slot-blot chemiluminescence assay for determination of myeloperoxidase from human granulocytes. *Anal. Biochem.* 214 : 284—288.
- Droge W. 2002. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev.* 82 : 47—95.
- Gamaley I. A., Kirpichnikova K. M., Klyubin I. V. 1994. Activation of murine macrophages by hydrogen peroxide. *Cell Signal.* 6 : 949—957.
- Gamaley I. A., Kirpichnikova K. M., Klyubin I. V. 1997. Superoxide release is involved in membrane potential changes in mouse peritoneal macrophages. *Free Rad. Biol. Med.* 24 : 168—174.
- Gille G., Sigler K. 1995. Oxidative stress and living cells. *Folia Microbiol.* 40 : 131—152.
- Granfeldt D., Dahlgren C. 2001. An intact cytoskeleton is required for prolonged respiratory burst activity during neutrophil phagocytosis. *Inflammation.* 25 : 165—169.
- Hancock J. T., Desikan R., Neill S. J. 2001. Role of reactive oxygen species in cell signalling pathways. *Biochem. Soc. Trans.* 29 : 345—350.
- Haqqani A. S., Sandhu J. K., Birnboim H. C. 1999. A myeloperoxidase-specific assay based upon bromide-dependent chemiluminescence of luminol. *Anal. Biochem.* 273 : 126—132.
- Henderson W. R., Klebanoff S. J. 1983. Leukotriene production and inactivation by normal, chronic granulomatous disease and myeloperoxidase-deficient neutrophils. *J. Biol. Chem.* 258 : 13 522—13 527.
- Holgate S. T., Holloway J., Wilson S., Howarth P. H., Haitchi H. M., Babu S., Davies D. E. 2006. Understanding the pathophysiology of severe asthma to generate new therapeutic opportunities. *J. Allergy Clin. Immunol.* 117 : 496—506.
- Kavalenka A. I., Semenova G. N., Cherenkevich S. N., Smirnova E. N., Gerein V. 2003. Systems of reactive oxygen species generation in human neutrophils: chemiluminescent analysis. *Clin. Lab.* 49 : 566.
- Kettle A. J., Winterbourn C. C. 1989. Influence of superoxide on myeloperoxidase kinetics measured with a hydrogen peroxide electrode. *Biochem. J.* 263 : 823—828.
- Klyubin I. V., Kirpichnikova K. M., Gamaley I. A. 1996. Hydrogen peroxide-induced chemotaxis of mouse peritoneal neutrophils. *Eur. J. Cell Biol.* 70 : 347—351.
- Knaapen A. M., Gungor N., Schins R. P., Borm P. J., van Schooten F. J. 2006. Neutrophils and respiratory tract DNA damage and mutagenesis: a review. *Mutagenesis.* 21 : 225—236.
- Krjukov A. A., Semenova G. N., Cherenkevich S. N., Gerein V. 2006. Activation of redox-systems of monocytes by hydrogen peroxide. *Biofactors.* 26 : 283—292.
- Kumae T., Kogure H., Nishimuta M., Kodama N., Yoshitake Y. 2006. Effects of a 21 day metabolic study on serum opsonic activity in female college students, assessed by a chemiluminescence technique. *Luminescence.* 21 : 256—261.
- Mancuso P., Nana-Sinkam P., Peters-Golden M. 2001. Leukotriene B₄ augments neutrophil phagocytosis of klebsiella pneumoniae. *Infection. Immunity.* 69 : 2011—2016.
- Moldovan N., Moldovan N. I. 2004. Oxygen free radicals and redox biology of organelles. *Histochem. Cell Biol.* 122 : 395—412.
- Nathan C. 2006. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat. Rev. Immunol.* 6 : 173—182.
- Ohno Y., Gallin J. I. 1985. Diffusion of extracellular hydrogen peroxide into intracellular compartments of human neutrophils. Studies utilizing the inactivation of myeloperoxidase by hydrogen peroxide and azide. *J. Biol. Chem.* 260 : 8438—8446.
- Phalen T. J., Weirather K., Deming P. B., Anathy V., Howe A. K., van der Vliet A., Jonsson T. J., Poole L. B., Heintz N. H. 2006. Oxidation state governs structural transitions in peroxiredoxin II that correlate with cell cycle arrest and recovery. *J. Cell Biol.* 175 : 779—789.
- Radmark O. 2000. The molecular biology and regulation of 5-lipoxygenase. *Amer. J. Respir. Crit. Care Med.* 161 : S11—S15.
- Ramos C. D., Fernandes K. S., Canetti C., Teixeira M. M., Silva J. S., Cunha F. Q. 2006. Neutrophil recruitment in immunized mice depends on MIP-2 inducing the sequential release of MIP-alpha, TNF-alpha and LTB(4). *Eur. J. Immunol.* 36 : 2025—2034.
- Ravage Z. B., Gomez H. F., Czermak B. J., Watkins S. A., Till G. O. 1998. Mediators of microvascular injury in dermal burn wounds. *Inflammation.* 22 : 619—629.
- Riendeau D., Denis D., Choo L. Y., Nathaniel D. J. 1989. Stimulation of 5-lipoxygenase activity under conditions which promote lipid peroxidation. *Biochem. J.* 263 : 565—572.
- Rose S., Illerhaus M., Wiercinski A., Mutschler W., Marzi I. 2000. Altered calcium regulation and function of human neutrophils during multiple trauma. *Shock.* 13 : 92—99.
- Rouzer C. A., Samuelsson B. 1986. The importance of hydroperoxide activation for the detection and assay of mammalian 5-lipoxygenase. *FEBS Lett.* 204 : 293—296.
- Saxton J. M., Claxton D., Winter E., Pockley A. G. 2003. Peripheral blood leucocyte functional responses to acute eccentric exercise in humans are influenced by systemic stress, but not by exercise-induced muscle damage. *Clin. Sci.* 104 : 69—77.
- Schreck R., Rieber P., Baeuerle P. A. 1991. Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF-cappaB transcription factor and HIV-1. *EMBO J.* 10 : 2247—2258.
- Strassheim D., Asehnoune K., Park J.-S., Kim J.-Y., He Q., Richter D., Mitra S., Arcaroli J., Kuhn K., Abraham E. 2004. Modulation of bone marrow-derived neutrophil signaling by H₂O₂: disparate effects on kinases, NF-κB, and cytokine expression. *Amer. J. Physiol. Cell. Physiol.* 286 : C683—C692.
- Thannickal V. J., Fanburg B. L. 2000. Reactive oxygen species in cell signaling. *Amer. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 279 : L1005—L1028.
- Vlasova I. I., Arnhold J., Osipov A. N., Panasenko O. M. 2006. pH-dependent regulation of myeloperoxidase activity. *Biokhimiya.* 71 : 825—837.
- Wang J. S. 2004. Strenuous, acute exercise suppresses polymorphonuclear leukocyte respiratory burst under adherence to surface-adherent platelets in men. *Thromb. Haemost.* 92 : 1076—1085.
- Winn J. S., Guille J., Gebicki J. M., Day R. O. 1991. Hydrogen peroxide modulation of the respiratory burst of human neutrophils. *Biochem. Pharmacol.* 41 : 31—36.
- Ximenes V. F., Silva S. O., Rodrigues M. R., Catalani L. H., Maghzal G. J., Kettle A. J., Campa A. 2005. Superoxide-dependent oxidation of melatonin by myeloperoxidase. *J. Biol. Chem.* 280 : 38 160—38 169.
- Zuurbier K. W. M., Bakkenist A. R. J., Wever R., Muijsers A. O. 1990. The chlorinating activity of human myeloperoxidase: high initial activity at neutral pH value and activation by electron donors. *Biochim. biophys. acta.* 1037 : 140—146.

THE INFLUENCE OF HYDROGEN PEROXIDE ON ABILITY OF NEUTROPHILS
TO GENERATE THE REACTIVE OXYGEN AND CHLORINE SPECIES
AND SECRETE MYELOPEROXIDASE *IN VITRO*

E. I. Kovalenko,¹ G. N. Semenkova, S. N. Cherenkevich

Biophysics Department of Physical Faculty of Belarusian State University, Minsk;
¹e-mail: kavalenka@bsu.by

The influence of H_2O_2 at concentrations of 10^{-8} — 10^{-2} mol/l on neutrophil ability to generate the reactive oxygen and chlorine species (ROCS) and secrete myeloperoxidase (MPO) was studied, and H_2O_2 injurious effect on neutrophils was also investigated in this work. It was revealed that H_2O_2 at concentrations of $2 \cdot 10^{-3}$ — $2 \cdot 10^{-2}$ mol/l induced disturbance of the neutrophil membrane barrier properties and lactate dehydrogenase release. The incubation of the neutrophils with the addition of 10^{-4} — 10^{-7} mol/l H_2O_2 led to an increase in the cell ability to generate ROCS during phagocytosis and decreased neutrophil ability to secrete MPO and ROCS in extracellular medium during adhesion. The mechanisms of H_2O_2 effect are coupled with arachidonic acid metabolism. Inhibition of metabolic pathways of 5-lipoxygenase or cyclooxygenase increased the destructive effect of H_2O_2 on the cells. Five-lipoxygenase way prohibition led to cancellation of H_2O_2 influence on MPO and ROCS secretion and to enhancement of H_2O_2 effect on neutrophil ability to generate ROCS during phagocytosis. The data obtained testify to the high neutrophil resistance to destructive effect of H_2O_2 and confirm the regulatory role of H_2O_2 with respect to the neutrophil functions.

Key words: neutrophils, hydrogen peroxide, reactive oxygen and chlorine species, myeloperoxidase, 5-lipoxygenase, cyclooxygenase, lactate dehydrogenase.