

ПТЕРИДИНЗАВИСИМАЯ АКТИВАЦИЯ КИСЛОРОДА В НЕЙТРОФИЛАХ

© М. Г. Петух,¹ * Г. Н. Семенкова,¹ Д. Фукс,² С. Н. Черенкевич¹¹ Кафедра биофизики Белорусского государственного университета, Минск, и² Медицинский университет, Биоцентр, Инсбрук, Австрия;* электронный адрес: margo_petuch@yahoo.com

Изучено влияние неоптерина и 7, 8-дигидронеоптерина на активность и секреторную дегрануляцию миелопероксидазы (МПО) нейтрофилов, а также на способность птеридинов взаимодействовать с основным субстратом этого фермента пероксидом водорода и промежуточным продуктом галогенирующего цикла гипохлоритом. Показано, что неоптерин и 7, 8-дигидронеоптерин, являясь редокс-парой, регулируют процессы активации кислорода в нейтрофилах, обусловленные функционированием МПО. Птеридины в зависимости от концентрации способны влиять на секрецию МПО во внеклеточную среду, снижая уровень пероксида водорода и гипохлорита, которые являются субстратом и промежуточным продуктом фермента соответственно. Выявлено, что 7, 8-дигидронеоптерин в микромолярных концентрациях является неконкурентным ингибитором МПО. Предполагается, что МПО способствует окислению 7, 8-дигидронеоптерина гипохлоритом, что приводит к увеличению концентрации неоптерина и таким образом регулирует содержание активных форм кислорода в клетке и во внеклеточном пространстве.

Ключевые слова: неоптерин, 7, 8-дигидронеоптерин, миелопероксидаза, секреторная дегрануляция, активные формы кислорода.

Принятые сокращения: АФК — активные формы кислорода; ИФН- γ — интерферон γ , ЛХЛ — люминолзависимая хемилюминесценция, МПО — миелопероксидаза.

Неоптерин [2-амино-4-гидрокси-6-(D-эритро-1', 2', 3'-тригидроксипропил)-птеридин] и его восстановленная форма 7, 8-дигидронеоптерин образуются преимущественно в моноцитах и макрофагах человека и животных из гуанозинтрифосфата при стимуляции клеток ИФН- γ (Huber et al., 1984). В сыворотке крови взрослых здоровых людей концентрация неоптерина составляет 4—9 нмоль/л (Werner et al., 1987). Однако при многих патологических состояниях, связанных с нарушениями иммунных реакций (диабет, рассеянный склероз, онкогематологические, аутоиммунные, инфекционные и другие заболевания), концентрация птеридинов существенно возрастает и достигает микромолярных значений. В то же время соотношение восстановленной и окисленной форм неоптерина в артериальной крови как у здоровых, так и у больных людей постоянно и равно 2 : 1 (Huber et al., 1984).

Биологическая роль неоптерина и 7, 8-дигидронеоптерина пока не установлена. Учитывая, что при некоторых патологических состояниях, в частности при ВИЧ-инфекции, повышение уровня неоптерина в плазме крови выявляется ранее других нарушений иммунитета (Hofmann, 1993), можно предположить, что как неоптерин, так и 7, 8-дигидронеоптерин вовлекаются в реакции метаболизма, обеспечивающие функционирование иммунных клеток.

В ряде работ показано, что птеридины могут оказывать влияние на окислительно-восстановительные процессы, протекающие в фагоцитах. Выявлено, что неоптерин ингибирует активность ксантиноксидазы и

NADPH-оксидазы макрофагов, ускоряет процесс нитрования тирозина пероксинитритом (Widner et al., 1998, 2000), индуцирует апоптоз, нарушая равновесие между АФК и антиоксидантами (Schobersberger et al., 1996). Обнаружено, что неоптерин и 7, 8-дигидронеоптерин являются перехватчиками супероксидных анион-радикалов (Kojima et al., 1992; Oetl et al., 1997), 7, 8-дигидронеоптерин может взаимодействовать с пероксинитритом (Oetl et al., 2004) и гипохлоритом (Widner et al., 2000). Кроме того, показано, что неоптерин способен индуцировать в нейтрофилах и моноцитах кратковременное образование синглетного кислорода, гидроксильных радикалов и оксида азота (II) по не зависящему от NADPH-оксидазы механизму (Razumovitch et al., 2003). Нами установлено, что неоптерин вызывает перераспределение форм активных кислородных метаболитов, образуемых в реакции окисления люминола пероксидом водорода, катализируемой миелопероксидазой (МПО), что может иметь значение для процессов внутри- и межклеточной сигнализации (Razumovitch et al., 2004). Известно, что АФК способны выполнять роль сигнальных молекул и регулировать тем самым функциональную активность фагоцитов (Гамалей, Клубин, 1996). В этой связи нами предполагается, что птеридины могут индуцировать модификацию путей трансдукции активационного сигнала, связанных с генерацией АФК, что повлечет за собой изменение процессов формирования функционального отклика фагоцитов. С другой стороны, накопление птеридинов в крови при патологиях может сопровождаться изменением активности фермен-

тов, которые участвуют в образовании активных кислородных интермедиатов.

Целью данной работы было исследование механизмов участия неоптерина и 7, 8-дигидронеоптерина в процессах генерации АФК в нейтрофилах. В работе изучено влияние птеридинов на активность и секреторную дегрануляцию МПО, способность взаимодействовать с основным субстратом этого фермента пероксидом водорода, и промежуточным продуктом галогенирующего цикла гипохлоритом.

Материал и методика

В работе использовали фиколл, верографин, пероксид водорода, люминол, неоптерин, 7, 8-дигидронеоптерин, лизоцим и бактериальные клетки *Micrococcus lysodeikticus* (Sigma, США); среду Эрла собственного приготовления, содержащую (в моль/л): NaCl — 0.116, KCl — $5.4 \cdot 10^{-3}$, CaCl₂ — $5.0 \cdot 10^{-3}$, NaH₂PO₄ · 2H₂O — $9.0 \cdot 10^{-4}$, MgSO₄ · 7H₂O — $8.0 \cdot 10^{-4}$, глюкозу — $5.6 \cdot 10^{-3}$, NaHCO₃ — $2.6 \cdot 10^{-2}$. Компоненты среды Эрла и гипохлорит натрия получены из фирмы Анализ Х (Беларусь).

Выделение нейтрофилов. Нейтрофилы выделяли из гепаринизированной периферической крови здоровых людей центрифугированием (20 мин, 400 g) в градиенте плотности фиколл-верографина (Воум, 1976). Примесь эритроцитов удаляли с помощью гемолитического шока с последующим центрифугированием в течение 10 мин. Клетки дважды отмывали физиологическим раствором, затем ресуспендировали в сбалансированном солевом растворе Эрла (рН 7.2). Содержание нейтрофилов в полученной суспензии составляло не менее 96 %.

Выделение МПО из нейтрофилов. Суспензию нейтрофилов выдерживали в среде Эрла при комнатной температуре в течение 30 мин, затем проводили ее трехкратное замораживание и размораживание с целью разрушения клеток. Полученный лизат центрифугировали 15 мин при 1500 g, супернатант хранили в холодильнике при -20°C .

Генерацию АФК в нейтрофилах изучали методом люминолзависимой хемилюминесценции (ЛХЛ) на биохемилуминометре БХЛ-1 (Минск, Беларусь) (Vetohin et al., 1986). Перед началом измерения в анализируемую пробу, содержащую 1 мл суспензии клеток в сбалансированном солевом растворе Эрла (рН 7.2), добавляли $5 \cdot 10^{-5}$ моль/л люминола. Количество нейтрофилов в пробе составляло 500 тыс. Образование АФК индуцировали адгезией клеток на дно стеклянной кюветы диаметром 40 мм. Для оценки влияния птеридинов на процессы генерации АФК при стимуляции нейтрофилов адгезией нами выбран параметр ΣI , характеризующий интегральную интенсивность свечения, рассчитанный как площадь под кинетической кривой ЛХЛ клеток, регистрируемой в течение 15 мин. Птеридины в концентрации $5 \cdot 10^{-5}$ моль/л добавляли в суспензию нейтрофилов перед началом регистрации свечения либо предварительно инкубировали с клетками в течение 10—60 мин.

Для определения влияния птеридинов на активность МПО лизат клеток, содержащий указанный фермент, помещали в термостат на 10 мин в присутствии или в отсутствие неоптерина и 7, 8-дигидронеоптерина при 37°C . Активность МПО оценивали методом хемилюминесценции (концентрация H₂O₂ — $2.5 \cdot 10^{-4}$, люминола — $5 \cdot 10^{-5}$ моль/л) (McNally, Bell, 1996).

Изучение взаимодействия птеридинов с пероксидом водорода и гипохлоритом проводили методом хемилюминесценции в реакциях окисления люминола пероксидом водорода или гипохлоритом натрия.

Дегрануляцию нейтрофилов определяли по выходу из клеток лизоцима с использованием стандартной методики (Timoshenko et al., 1995). Суспензию нейтрофилов ($3 \cdot 10^{-6}$ моль/л) предварительно инкубировали в течение 30 мин при 37°C в присутствии $2 \cdot 10^{-2}$ моль/л CaCl₂ и неоптерина или 7, 8-дигидронеоптерина. Полученный супернатант центрифугировали в течение 10 мин при 3000 об/мин. Активность лизоцима в супернатанте определяли по скорости лизиса бактериальных клеток *Micrococcus lysodeikticus*. Анализируемую пробу добавляли к 1.9 мл суспензии лиофилизированных клеток *M. lysodeikticus* (0.1 мг/мл) в 0.1 моль/л буфере Na₂HPO₄/KH₂PO₄, рН 6.2, и измеряли кинетику снижения оптической плотности при 450 нм в течение 2 мин с помощью спектрофотометра PV 1251A (СОЛАР, Беларусь). Уровень активности лизоцима определяли по тангенсу угла наклона полученных экспериментальных кривых и рассчитывали как долю (в %) от общей ферментативной активности клеток, лизированных под действием 0.1 % Тритона X-100.

Статистическая обработка результатов. При математической обработке результатов определяли среднюю величину $\langle x \rangle$ для группы измерений. Полученные результаты x в работе представлены в виде:

$$x = \langle x \rangle + t_{\alpha} \cdot \alpha \quad (\text{для } P = 0.95),$$

где α — среднее квадратичное отклонение, t_{α} — коэффициент Стьюдента.

Результаты и обсуждение

В ходе развития воспалительного процесса птеридины накапливаются в плазме крови, однако их количество в биологических жидкостях хотя и значительно возрастает, но удерживается на относительно постоянном уровне. Этот факт позволил нам предположить, что неоптерин и 7, 8-дигидронеоптерин, представляя собой пару прооксидант/антиоксидант, способны оказывать влияние на функции фагоцитов, вмешиваясь в процессы образования АФК. В связи с этим представляло интерес исследовать, каким образом эти вещества влияют на продукцию АФК в нейтрофилах при различных временах экспозиции с клетками.

На рис. 1 показана зависимость интегральной интенсивности ЛХЛ нейтрофилов, стимулированных адгезией к поверхности стекла, от времени предварительного инкубирования клеток с неоптерин или 7, 8-дигидронеоптерин. Как видно на рис. 1, направленность эффектов, вызываемых действием неоптерина и 7, 8-дигидронеоптерина, практически не зависит от времени инкубирования с клетками. Так, неоптерин в 1-е мин контакта с нейтрофилами и при инкубировании в течение 20—50 мин вызывает увеличение интегральной интенсивности ЛХЛ. Максимум воздействия неоптерина на клетки наблюдается в течение 1-х мин стимуляции клеток адгезией.

7, 8-Дигидронеоптерин вызывает уменьшение интегральной интенсивности ЛХЛ, а следовательно, и выхода АФК в этих клетках. Одной из причин такого модифицирующего влияния птеридинов может быть их взаимодей-

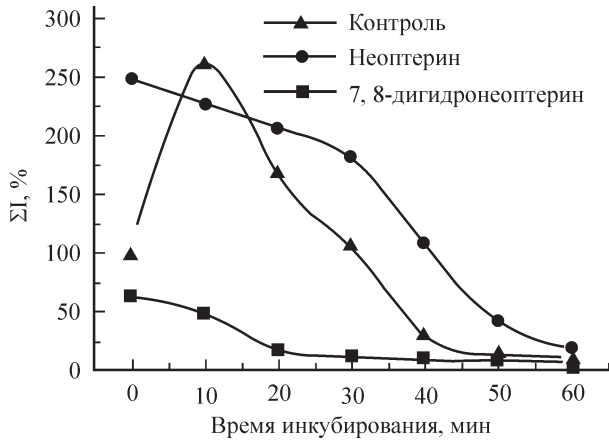


Рис. 1. Зависимость интегральной интенсивности (ΣI) ЛХЛ нейтрофилов от времени инкубирования в присутствии и в отсутствие неоптерина и 7, 8-дигидронеоптерина.

Концентрация птерицинов $5 \cdot 10^{-5}$ моль/л.

ствии с АФК, что должно приводить, с одной стороны, к изменению вклада различных радикалов и активных молекул в ЛХЛ, а с другой — к изменению в функционировании ферментов, участвующих в окислительно-восстановительных процессах в клетке.

Как установлено нами ранее, основной вклад в генерацию АФК нейтрофилами при адгезии преимущественно вносят NADPH-оксидаза, МПО и 5-липоксигеназа (Kavalenka et al., 2003). Поскольку неоптерин и 7, 8-дигидронеоптерин не оказывают влияния на образование АФК, обусловленное активацией NADPH-оксидазы в нейтрофилах, но изменяют выход супероксидных анион-радикалов (Razumovitch et al., 2003), мы предположили, что птерицины могут влиять на процессы активации кислорода, связанные с функционированием МПО.

Ранее показано, что промежуточными продуктами реакции окисления люминола пероксидом водорода, катализируемой МПО, являются супероксидные анион-радикалы, гидроксильные радикалы и синглетный кислород (Семенкова и др., 1991). Основным промежуточным продуктом этой реакции является гипохлорит-ион, образующийся в так называемом галогенирующем цикле при окислении хлорид-ионов высокоактивной формой МПО — соединением I, в которую превращается нативный фермент при взаимодействии с H_2O_2 (Hampton et al., 1998). Поскольку птерицины характеризуются как про-, так и антиоксидантным действием, следует ожидать, что неоптерин и 7, 8-дигидронеоптерин способны реагировать с H_2O_2 и гипохлоритом, оказывая тем самым влияние на выход активных продуктов в реакции с МПО.

Нами исследовано влияние неоптерина и 7, 8-дигидронеоптерина на свободнорадикальные процессы окисления люминола пероксидом водорода (рис. 2). Видно, что в присутствии неоптерина степень ингибирования хемилюминесценции зависит от концентрации пероксида водорода. В диапазоне концентраций H_2O_2 от $1 \cdot 10^{-6}$ до $1 \cdot 10^{-3}$ моль/л неоптерин практически не влияет на хемилюминесценцию, а при дальнейшем повышении концентрации пероксида до $7.5 \cdot 10^{-3}$ моль/л вызывает ее ингибирование на 45%. В присутствии 7, 8-дигидронеоптерина хемилюминесценции в этой реакции не наблюдается.

На рис. 3 показано влияние птерицинов на интегральную интенсивность хемилюминесценции при окислении

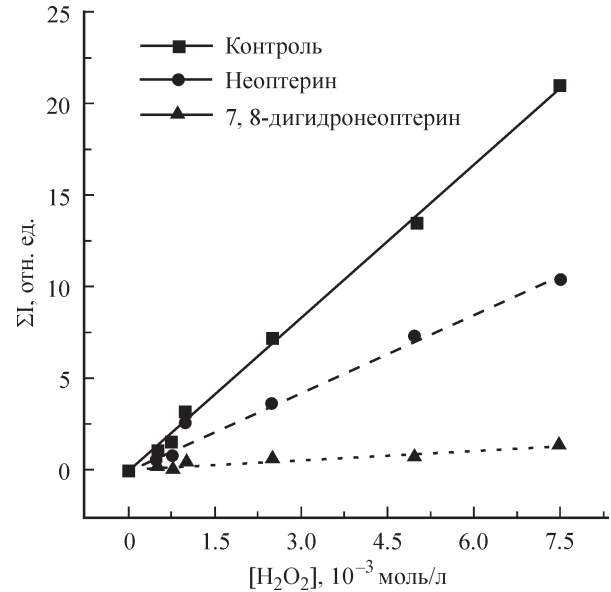


Рис. 2. Влияние неоптерина и 7, 8-дигидронеоптерина на интегральную интенсивность хемилюминесценции (ΣI) в реакции окисления люминола пероксидом водорода.

Концентрация птерицинов $5 \cdot 10^{-5}$ моль/л.

люминола гипохлоритом натрия. Как видно из рис. 3, в исследуемом диапазоне концентраций неоптерин не влияет, а 7, 8-дигидронеоптерин снижает интенсивность регистрируемого свечения. Степень ингибирования хемилюминесценции, обусловленной окислением люминола гипохлоритом, увеличивается с повышением концентрации 7, 8-дигидронеоптерина и достигает 100% в присутствии $1 \cdot 10^{-4}$ моль/л этого птерицина. Из представленных на рис. 2 и 3 данных следует, что 7, 8-дигидронеоптерин способен эффективно взаимодействовать как с пероксидом водорода, так и с гипохлоритом — промежуточным продуктом цикла МПО, что, вероятно, связано с его способ-

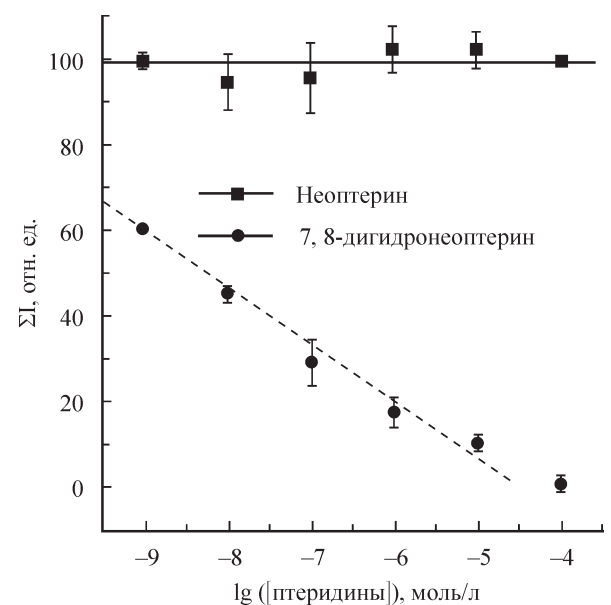


Рис. 3. Влияние неоптерина и 7, 8-дигидронеоптерина на интегральную интенсивность ЛХЛ в реакции окисления люминола гипохлоритом натрия ($6.5 \cdot 10^{-7}$ моль/л).

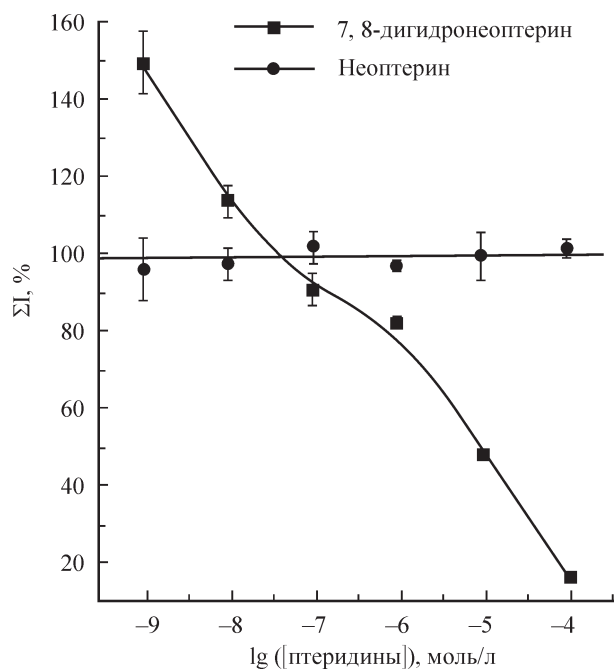


Рис. 4. Влияние неоптерина и 7, 8-дигидронеоптерина на интегральную интенсивность ЛХЛ в реакции окисления люминола пероксидом водорода, катализируемой МПО нейтрофилов.

Концентрация H_2O_2 $2.5 \cdot 10^{-4}$, люминола — $4.5 \cdot 10^{-5}$ моль/л. Время инкубирования птеридинов с МПО в отсутствие субстратов 10 мин.

ностью легко превращаться в неоптерин под действием окислителей (Widner et al., 2000). В то же время неоптерин не оказывает влияния на хемилюминесценцию при действии гипохлорита в концентрации $6.5 \cdot 10^{-7}$ моль/л и пероксида водорода в микромолярных концентрациях, соответствующих физиологическим значениям для этого окислителя ($1 \cdot 10^{-6}$ — $1 \cdot 10^{-5}$ моль/л).

На рис. 4 показано влияние неоптерина и 7, 8-дигидронеоптерина на активность МПО при добавлении птеридинов к ферменту за 10 мин до внесения субстратов — пероксида водорода и люминола. Выявлено, что неоптерин не влияет на выход АФК при активации МПО. Однако, как продемонстрировано ранее (Razumovitch et al., 2004), добавление неоптерина к активированному ферменту сопровождается резким ингибированием свободно-радикального процесса и быстрым, в течение 1 мин, его восстановлением до исходного уровня. Такое действие неоптерина связано с его способностью реагировать с $\text{O}_2^{\cdot -}$ и гидроксильными радикалами, которые генерируются в изучаемой реакции. В то же время 7, 8-дигидронеоптерин в концентрации $1 \cdot 10^{-7}$ — $1 \cdot 10^{-4}$ моль/л значительно снижает, а в концентрации $1 \cdot 10^{-9}$ — $1 \cdot 10^{-8}$ моль/л увеличивает выход свободных радикалов в системе МПО—люминол— H_2O_2 .

Нами проанализированы зависимости интегральной интенсивности хемилюминесценции от концентрации H_2O_2 для изучаемой ферментативной реакции в присутствии и в отсутствие 7, 8-дигидронеоптерина (рис. 5). Видно, что 7, 8-дигидронеоптерин проявляет свойства неконкурентного ингибитора МПО при концентрации H_2O_2 $2.5 \cdot 10^{-3}$ — $2.5 \cdot 10^{-2}$ моль/л: зависимости $1/\Sigma I$ ЛХЛ от концентрации H_2O_2 в присутствии и в отсутствие 7, 8-дигидронеоптерина имеют вид прямых, пересекающихся на оси абсцисс, что характерно для неконкурентного типа инги-

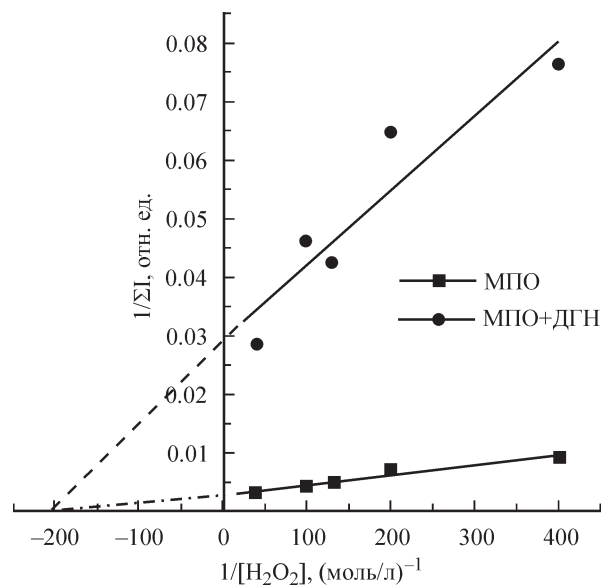


Рис. 5. Зависимость интегральной интенсивности ЛХЛ в системе МПО— H_2O_2 —люминол от концентрации H_2O_2 в двойных обратных координатах в присутствии и в отсутствие 7, 8-дигидронеоптерина ($5 \cdot 10^{-5}$ моль/л).

бирования. Следовательно, 7, 8-дигидронеоптерин, не препятствуя связыванию субстрата, способен присоединяться как к свободному ферменту, так и к фермент-субстратному комплексу, замедляя тем самым скорость ферментативного процесса. При концентрации пероксида водорода меньше $1 \cdot 10^{-3}$ моль/л 7, 8-дигидронеоптерин не оказывает влияния на активность фермента (графические данные не представлены).

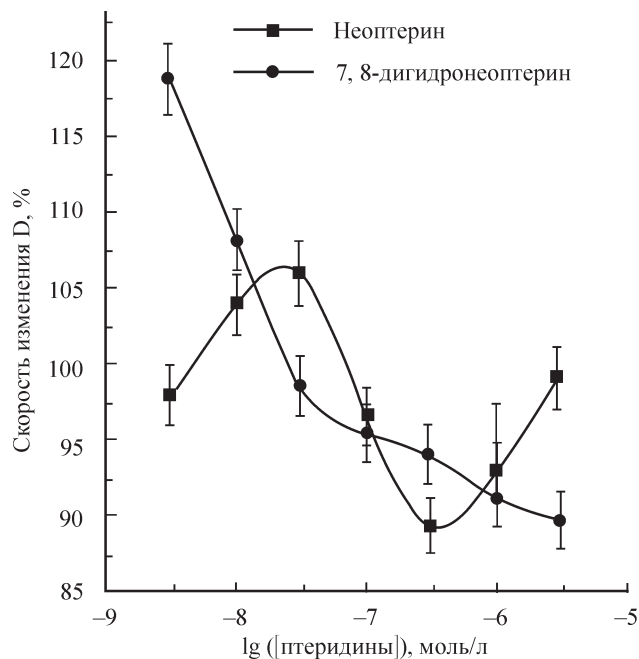


Рис. 6. Влияние неоптерина и 7, 8-дигидронеоптерина на секрецию лизоцима из нейтрофилов.

Время инкубирования клеток с птеридинами 20 мин. За 100 % принято значение скорости изменения оптической плотности (D) клеток без птеридинов.

Ранее показано, что при стимуляции нейтрофилов адгезией усиливаются процессы секреторной дегрануляции, что приводит к выходу из клеток содержимого азурофильных гранул — МПО и лизоцима (Коваленко и др., 2007). Поскольку активность МПО зависит от присутствия птеридинов, нами изучено влияние неоптерина и 7, 8-дигидронеоптерина на секрецию лизоцима из нейтрофилов. На рис. 6 показана зависимость выхода лизоцима из клеток от концентрации птеридинов, которые инкубировали с нейтрофилами в течение 20 мин. Видно, что в присутствии 7, 8-дигидронеоптерина в концентрации $1 \cdot 10^{-9}$ — $1 \cdot 10^{-8}$ моль/л уровень секретируемого лизоцима значительно выше, чем в контрольных образцах. При увеличении концентрации этого птеридина от $5 \cdot 10^{-8}$ до $5 \cdot 10^{-6}$ моль/л секреция лизоцима из клеток снижается. Влияние неоптерина на процесс дегрануляции имеет более сложный вид: $5 \cdot 10^{-8}$ моль/л птеридина вызывает небольшое увеличение, а $5 \cdot 10^{-7}$ моль/л — уменьшение секреции лизоцима, которая при дальнейшем увеличении концентрации неоптерина на порядок достигала контрольных значений. Следует отметить, что неоптерин и 7, 8-дигидронеоптерин в исследуемых концентрациях не оказывали влияния на активность лизоцима и количество используемых в методике бактерий *Micrococcus lysodeikticus* в качестве субстрата для этого фермента (графические данные не представлены).

Можно заключить, что неоптерин и 7, 8-дигидронеоптерин, являясь редокс-парой, регулируют процессы активации кислорода в нейтрофилах, обусловленные функционированием МПО. Птеридины в зависимости от концентрации способны влиять на секрецию МПО во внеклеточную среду, снижая уровень субстрата этого фермента — пероксида водорода и промежуточного продукта катализируемой МПО реакции — гипохлорита. 7, 8-Дигидронеоптерин в микромолярных концентрациях является неконкурентным ингибитором МПО. Кроме того, МПО способна изменять соотношение птеридинов в сторону увеличения концентрации неоптерина за счет образующегося в ходе ферментативной реакции гипохлорита, что способствует изменению уровня АФК в клетке и во внеклеточном пространстве.

Работа выполнена при финансовой поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (проекты Б08М-121 и Б04-293).

Список литературы

Гамалей И. А., Клюбин И. В. 1996. Перекись водорода как сигнальная молекула. Цитология. 38 (1) : 1233—1247.
 Коваленко Е. И., Семенкова, Г. Н., Черенкевич С. Н. 2007. Влияние пероксида водорода на способность нейтрофилов генерировать активные формы кислорода и хлора и секретировать миелопероксидазу *in vitro*. Цитология. 49 (10) : 839—847.
 Семенкова Г. Н., Новикова Т. М., Черенкевич С. Н., Драпеца А. И. 1991. Хемилуминесценция при пероксидазной реакции окисления люминола перекисью водорода в различных средах. Лаб. дело. 11 : 13—16.

Boyum A. 1976. Isolation of lymphocytes, granulocytes and macrophages. Scand. J. Immunol. 5 : 9—15.

Hampton M. B., Kettle A. J., Winterbourn C. C. 1998. Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. Blood. 92 (9) : 3007—3017.

Hofmann B. 1993. Neopterin and human immunodeficiency virus infection. Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 31 : 191—195.

Huber C., Bachelor J. R., Fuchs D., Hausen A., Lang A., Niederwieser D., Reibnegger G., Swetly P., Troppmair J., Wachter H. 1984. Immune response-associated production of neopterin release from macrophages primarily under control of interferon-gamma. J. Exp. Med. 160 : 310—316.

Kavalenka A. I., Semenkova 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.

Kojima S., Icho T., Kajiwara Y., Kubota K. 1992. Neopterin as an endogenous antioxidant. FEBS Lett. 304 : 163—166.

McNally J. A., Bell A. L. 1996. Myeloperoxidase-based chemiluminescence of polymorphonuclear leukocytes and monocytes. J. Bio. Chemilum. 11 : 99—106.

Oetl K., Dikalov S., Freisleben H. J., Mlekusch W., Reibnegger G. 1997. Spin trapping study of antioxidant properties of neopterin and 7, 8-dihydroneopterin. Biochem. Biophys. Res. Commun. 234 : 774—778.

Oetl K., Greilberger J., Dikalov S., Reibnegger G. 2004. Interference of 7, 8-dihydroneopterin with peroxynitrite-mediated reactions. Biochem. Biophys. Res. Commun. 321 : 379—385.

Razumovitch J. A., Fuchs D., Semenkova G. N., Cherenkevich S. N. 2004. Influence of neopterin on generation of reactive species by myeloperoxidase in human neutrophils. Biochim. biophys. acta. 1672 : 46—50.

Razumovitch J. A., Semenkova G. N., Fuchs D., Cherenkevich S. N. 2003. Influence of neopterin on the generation of reactive oxygen species in human neutrophils. FEBS Lett. 549 : 83—86.

Schobersberger W., Hoffmann G., Hobisch-Hagen P., Bock G., Volk H., Baier-Bitterlich G., Wirleitner B., Wachter H., Fuchs D. 1996. Neopterin and 7,8-dihydroneopterin induce apoptosis in the rat alveolar epithelial cell line L2. FEBS Lett. 397 : 263—268.

Timoshenko A. V., Kayser K., Drings P., Andre S., Dong X., Kaltner H., Schneller M., Gabius H.-J. 1995. Carbohydrate-binding proteins (plant/human lectins and autoantibodies from human serum) as mediators of release of lysozyme, elastase, and myeloperoxidase from human neutrophils. Res. Exp. Med. 195 : 153—162.

Vetohin C. C., Semenkova G. N., Cherenkevich, S. N. 1987. Chemiluminescent methods of analysis of the cells activation processes. In: Luminescent analysis in medicine and biological investigations. Riga: All Union Meeting. 81—85.

Werner E. R., Bichler A., Daxenbichler G., Fuchs D., Fuith L. C., Hausen A., Hetzel H., Reibnegger G., Wachter H. 1987. Determination of neopterin in serum and urine. Clin Chem. 33 : 62—66.

Widner B., Baier-Bitterlich G., Wede I., Wirleitner B., Fuchs D. 1998. Neopterin derivatives modulate the nitration of tyrosine by peroxynitrite. Biochem. Biophys. Res. Commun. 248 : 341—346.

Widner B., Mayr C., Wirleitner B., Fuchs D. 2000. Oxidation of 7, 8-dihydroneopterin by hypochlorous acid yields neopterin. Biochem. Biophys. Res. Commun. 275 : 307—311.

Widner B., Wirleitner B., Baier-Bitterlich G., Weis G., Fuchs D. 2000. Cellular immune activation, neopterin production, tryptophan degradation and the development of immunodeficiency. Arch. Immunol. Therap. Exp. 48 : 251—258.

Поступила 28 IV 2009

PTERIDINE-DEPENDENT OXYGEN ACTIVATION IN NEUTROPHILS

M. G. Petukh,^{1,} G. N. Semenkova,¹ D. Fuchs,² S. N. Cherenkevich¹*

¹ Department of Biophysics, Belarusian State University, Minsk, and ² Medical University, Biocenter, Innsbruck, Austria;
* e-mail: margo_petuch@yahoo.com

We investigated the influence of neopterin and 7, 8-dihydroneopterin on the activity and secretory degranulation of myeloperoxidase in neutrophils and the ability of pteridines to interact with the main substrate of this enzyme, hydrogen peroxide, and with the intermediate product of halogenation cycle — hypochlorous acid. It was shown that neopterin and 7, 8-dihydroneopterin while being a redox-pair regulated the process of oxygen activation in neutrophils by functioning of myeloperoxidase. Depending on concentration, pteridines can influence the secretion of myeloperoxidase into intracellular medium and decrease the level of hydrogen peroxide and hypochlorous acid that are a substrate and an intermediate product of the enzyme respectively. It was shown that 7, 8-dihydroneopterin in micromolar concentration appeared to be noncompetitive inhibitor of myeloperoxidase. We suppose that myeloperoxidase assists 7, 8-dihydroneopterin oxidation by hypochlorous acid that leads to neopterin concentration increase. These changes modify the concentration of reactive oxygen species in intracellular and extracellular media.

K e y w o r d s: neopterin, 7, 8-dihydroneopterin, myeloperoxidase, reactive oxygen species.
