

©Коллектив авторов

ЭКЗОЦИТОЗ МИЕЛОПЕРОКСИДАЗЫ ПРИ АКТИВАЦИИ НЕЙТРОФИЛОВ В ПРИСУТСТВИИ ГЕПАРИНА

Д.В. Григорьева¹, И.В. Горудко¹, В.А. Костевич^{2,3}, В.Б. Васильев^{2,4},
С.Н. Черенкевич¹, О.М. Панасенко^{3,5*}, А.В. Соколов^{2,3,4,6}

¹Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь

²Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург

³Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины,
119435 Москва, ул. Малая Пироговская, 1а; эл. почта: o-panas@mail.ru

⁴Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург

⁵Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова, Москва

⁶Центр доклинических трансляционных исследований "НМИЦ имени В.А. Алмазова", Санкт-Петербург

Проведено исследование экзоцитоза миелопероксидазы (МПО) из активированных нейтрофилов в присутствии анионного полисахарида гепарина. Определена оптимальная концентрация гепарина (0,1 ед/мл), при которой не происходит дополнительной активации клеток (отсутствие усиления экзоцитоза лизоцима, содержащегося в специфических и азурофильных гранулах). Установлено, что после предварительной инкубации клеток с гепарином (0,1 ед/мл) выход МПО из нейтрофилов, активированных различными стимуляторами (fMLP, РМА, растительными лектинами САВА и РНА-Л), увеличивался по сравнению с экзоцитозом МПО при действии только активаторов. В экспериментах, проведенных с изолированной из лейкоцитов МПО, гепарин в диапазоне концентраций 0,1-50 ед/мл не влиял на пероксидазную активность фермента. Таким образом, использование гепарина в концентрации 0,1 ед/мл позволяет избежать артефакта, обусловленного "потерей" МПО в результате её связывания с нейтрофилами, и повысить точность метода регистрации дегрануляции азурофильных гранул нейтрофилов, основанного на определении концентрации либо пероксидазной активности МПО в супернатантах клеток.

Ключевые слова: миелопероксидаза, дегрануляция, нейтрофилы, гепарин, эластаза, лизоцим

DOI: 10.18097/PBMC20186401016

ВВЕДЕНИЕ

Миелопероксидаза (МПО) – гемсодержащий фермент азурофильных гранул нейтрофилов, составляющий около 5% от общего белка этих клеток. При взаимодействии с пероксидом водорода МПО катализирует одноэлектронное окисление пероксидазных субстратов с образованием радикалов либо двухэлектронное окисление галогенидов и тиоцианата (псевдогалогенида) с образованием высокореакционных гипогалоидных кислот, которые и выполняют основную антимикробную функцию нейтрофилов [1]. Образующиеся в результате функционирования МПО сильные окислители инициируют в очаге воспаления перекисидацию липидов, модификацию белков и нуклеиновых кислот (окисление, галогенирование, образование сшивок и пр.), тем самым способствуя развитию окислительного/галогенирующего стресса и воспаления [2]. Кроме того, МПО усугубляет ряд патологических процессов, модулируя функции клеток [3-6] независимо от своей ферментативной активности.

При активации и дегрануляции нейтрофилов антимикробные белки (МПО, лактоферрин, лизоцим, эластаза и др.) высвобождаются в значительном количестве во внеклеточное пространство, что может

отражать степень развития различных патологий [7]. Очевидно, что количественная оценка дегрануляции нейтрофилов может послужить основой для создания дополнительных диагностических и прогностических критериев тяжести воспалительных заболеваний.

В условиях *in vitro* дегрануляцию нейтрофилов можно определять по количеству высвобождаемых из клеток белков, содержащихся во внутриклеточных гранулах. При этом определение ферментативной активности лизоцима, эластазы и МПО увеличивает точность анализа. Однако наличие в плазме физиологических ингибиторов МПО и эластазы требует выбора условий, обеспечивающих адекватное выявление их активности. В частности, *in vitro* экзоцитоз МПО можно оценивать по количеству/активности фермента в супернатанте нейтрофилов после инкубации клеток со стимулятором [8]. Однако при исследовании влияния антиоксидантов на активацию нейтрофилов было обнаружено, что некоторые из них значительно снижают уровень выявляемой активной МПО [9].

Концентрация МПО может быть определена методом иммуноферментного анализа с использованием антител против МПО. Однако данный способ требует длительных временных затрат. Активность фермента может быть оценена с использованием хромогенных субстратов [8]. Интерес представляет использование

Принятые сокращения: МПО - миелопероксидаза; o-DA - o-дианизидин; cyth b - цитохалазин b; fMLP - N-формил-метионил-лейцил-фенилаланин; РМА - форбол-12-миристан-13-ацетат; ФСБ - фосфатно-солевой буфер; ПА_{МПО} - пероксидазная активность МПО.

комбинации этих методов, сокращающей время анализа: сорбция МПО на антителах и выявление её активности с помощью флуорогенных субстратов [9, 10]. Однако следует иметь в виду, что МПО, являясь катионным белком ($pI \sim 10$), связывается с отрицательно-заряженными фосфолипидами и рецепторами на мембране нейтрофилов [11-13]. Это значит, что секретируемая при дегрануляции МПО может частично осаждаться в процессе пробоподготовки при центрифугировании активированных клеток *in vitro*. В этом случае результат определения фермента в надосадочной жидкости будет занижен по сравнению с количеством МПО, реально высвобождаемой из клеток. Можно ожидать, что в присутствии веществ, препятствующих электростатическому связыванию катионной МПО с поверхностью клеток, данный артефакт удастся нивелировать, и количество МПО, доступной для регистрации, не будет заметно отличаться от её количества, секретируемого нейтрофилами. Представляется, что наиболее подходящим соединением для предотвращения связывания МПО с клетками является анионный полисахарид – гепарин.

В последние годы многочисленные исследования показали, что разнообразные фармакологические свойства гепарина обусловлены его электростатическим взаимодействием с белками и другими биополимерами, вовлечёнными в развитие воспалительных процессов, среди которых цитокины, факторы роста, адгезионные молекулы, цитотоксические пептиды и гидролазы, разрушающие ткани [14]. Предполагается, что гепарин играет регуляторную роль в ограничении воспаления частично за счёт его способности связывать перечисленные выше молекулы, то есть локализовать активацию клеток и последующее тканевое повреждение [14]. Все упомянутые ранее антимикробные белки нейтрофилов (МПО, лактоферрин, лизоцим, эластаза) могут быть очищены методом хроматографии с использованием смол с ковалентно иммобилизованным гепарином [15-17].

Baldus и соавт. показали [18], что гепарин (20 ед/мл) препятствует связыванию МПО с эндотелием в клеточных культурах, а также способствует отсоединению уже иммобилизованной на компонентах эндотелия МПО. В этой же работе было показано увеличение содержания МПО в плазме крови больных с острым коронарным синдромом после введения гепарина. Однако уровень циркулирующей эластазы (запасённой в тех же гранулах нейтрофилов, что и МПО) в плазме крови данных больных не был увеличен. Этот факт свидетельствует о том, что увеличенный уровень МПО, циркулирующей после введения гепарина, не обусловлен усилением дегрануляции лейкоцитов, а, скорее всего, связан с высвобождением ассоциированной с сосудистой стенкой МПО.

Цель работы – исследовать особенности экзоцитоза МПО из нейтрофилов в присутствии гепарина для разработки адекватного метода оценки дегрануляции азурофильных гранул нейтрофилов.

МЕТОДИКА

Реактивы

Цитрат натрия, *o*-дианизидин (*o*-DA), цитохалазин b (cyth b), N-формил-метионил-лейцил-фенилаланин (fMLP), форбол-12-миристат-13-ацетат (PMA), лиофилизированные бактериальные клетки *Micrococcus lysodeikticus*, трипановый синий, сорбенты для хроматографии были получены от фирмы “Sigma-Aldrich” (США); гистопак-1077 – от фирмы “Nycomed” (Норвегия); декстран Т70 – от фирмы “Roth” (Германия); 3% раствор H_2O_2 – от фирмы “Sagmel” (США); субстрат эластазы MeO-Suc-Ala-Ala-Pro-Val-MCA – от компании “Bachem Holding AG” (Швейцария); растительные лектины: WGA, CABA, PHA-L – от фирмы “Лектинотест” (Украина); гепарин – от фирмы “Белмедпрепараты” (Беларусь); соли, используемые для приготовления буферных растворов, были получены от фирм “Белмедпрепараты” (Беларусь) и “Реахим” (Россия).

Выделение нейтрофилов

Нейтрофилы выделяли из 20 мл донорской крови, стабилизированной раствором цитрата натрия (109 мМ) в объемном соотношении 9:1, полученной на Республиканской станции переливания крови (Минск, Беларусь). Кровь смешивали с 6%-ным раствором декстрана Т70, содержащего 155 мМ NaCl, в соотношении 5:1 (по объёму), выдерживали в течение 30-40 мин при комнатной температуре, осаждая клеточную массу. Слой плазмы, обогащённой лейкоцитами, собирали в пробирки и центрифугировали в течение 7 мин при 350 g, затем примесь эритроцитов удаляли осмотическим лизисом. Для этого к осадку клеток добавляли 3 мл охлажденного водного раствора NaCl (0,2%), затем восстанавливали изотоничность добавлением ещё 3 мл NaCl (1,6%), содержащего 20 мг/мл D-глюкозы, и аккуратно перемешивали. Полученную суспензию центрифугировали в течение 7 мин при 350 g. Осадок клеток ресуспендировали в 6 мл фосфатно-солевого буфера (ФСБ), содержащего 8,7 мМ Na_2HPO_4 , 1,5 мМ KH_2PO_4 , 137 мМ NaCl и 2,7 мМ KCl (pH 7,4), и наслаивали на 3 мл гистопак-1077. Полученную суспензию центрифугировали в течение 10 мин при 350 g и комнатной температуре. Осадок нейтрофилов отмывали в ФСБ центрифугированием в течение 7 мин при 350 g. Отмытые нейтрофилы ресуспендировали в ФСБ с глюкозой (2 мг/мл) и сразу использовали в эксперименте. Содержание нейтрофилов в клеточной суспензии составляло 97-98%, число жизнеспособных клеток (по тесту с трипановым синим) – не менее 96%.

Выделение МПО и эластазы из лейкоцитов

МПО и эластазу выделяли из замороженных лейкоцитов здоровых доноров с помощью аффинной хроматографии с использованием гепарин-сефарозы и апротинин-агарозы, гидрофобной хроматографии (фенил-сефароза) и гель-фильтрации (сефакрил S-200 HR) [16, 17]. Соотношение величин поглощения препарата МПО на длине

волны 430 нм и 280 нм (A_{430}/A_{280}) служило характеристикой чистоты и гомогенности выделенной МПО и обычно составляло не менее 0,85. Препарат эластазы был гомогенен по данным электрофореза и масс-спектрометрии, не содержал примесей катепсина G и протеиназы 3.

Экзоцитоз содержимого гранул нейтрофилов оценивали по выходу из клеток МПО, лизоцима и эластазы. К суспензии нейтрофилов (3×10^6 кл/мл) в ФСБ, содержащем 1 мМ CaCl_2 и 0,5 мМ MgCl_2 , добавляли гепарин (0-50 ед/мл) и инкубировали 3 мин при 37°C, затем, при необходимости, к суспензии клеток добавляли cyth b (5 мкМ), вызывающий диссоциацию фибриллярного актина и способствующий устранению барьеров в виде кортикального цитоскелета для экзоцитоза азурофильных гранул [19], инкубировали 3 мин при 37°C, а затем к серии проб добавляли fMLP (1 мкМ) либо растительные лектины (WGA, CABA, PHA-L) в концентрации 25 мкг/мл и инкубировали 15 мин при 37°C. В серии экспериментов нейтрофилы (без предварительной инкубации с cyth b) активировали РМА (30 нг/мл) в течение 20 мин при 37°C. Реакцию дегрануляции останавливали путём помещения образцов на лёд и последующим центрифугированием в течение 8 мин при 1200 g. Полученные супернатанты помещали на лёд или хранили при -20°C в течение нескольких дней, а затем использовали для определения МПО и лизоцима.

Активность МПО

Пероксидазную активность ($\text{PA}_{\text{МПО}}$) изолированной из лейкоцитов МПО либо МПО в надосадочной жидкости суспензии нейтрофилов оценивали по скорости окисления *o*-DA. Анализируемую пробу (10 мкл изолированной МПО либо 60 мкл надосадочной жидкости суспензии нейтрофилов) добавляли к 800 мкл 0,1 М Na-фосфатного буфера (pH 6,2), содержащего *o*-DA в конечной концентрации 380 мкМ. После добавления к смеси H_2O_2 (50 мкМ) измеряли скорость снижения оптической плотности суспензии при 460 нм и 23°C на спектрофотометре PB 2201 ("СОЛАР", Беларусь).

Концентрация МПО

Концентрацию МПО в супернатантах нейтрофилов определяли разработанным ранее [8, 9] методом иммуноферментного анализа на мультимодальном ридере для планшетов CLARIOstar ("BMG LABTECH", Германия).

Активность лизоцима в супернатантах нейтрофилов определяли по скорости лизиса бактериальных клеток *M. lysodeikticus*. Анализируемую пробу (100 мкл) добавляли к 900 мкл суспензии бактериальных клеток *M. lysodeikticus* в 0,1 М $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ буфере (pH 6,2) и при 37°C регистрировали изменение оптической плотности полученной суспензии на длине волны 450 нм. Уровень активности лизоцима определяли по тангенсу угла наклона линейного участка экспериментальных кривых.

Активность эластазы в суспензии активированных нейтрофилов оценивали флуоресцентным методом на компьютеризированном спектрофлуориметре CM 2203 ("СОЛАР") с использованием специфического субстрата MeO-Suc-Ala-Ala-Pro-Val-MCA. 1 мл суспензии нейтрофилов (2×10^6 кл/мл в ФСБ с 1 мМ CaCl_2 , 0,5 мМ MgCl_2), содержащей 20 мкМ MeO-Suc-Ala-Ala-Pro-Val-MCA, инкубировали 3 мин при 37°C с различными концентрациями гепарина, после чего добавляли cyth b (5 мкМ) и fMLP (1 мкМ). Кинетику расщепления эластазой специфического субстрата и высвобождения флуорофора – аминотилкумарина – регистрировали по увеличению интенсивности флуоресценции на длине волны 460 нм (возбуждение флуоресценции – 380 нм) [12]. Активность эластазы определяли как тангенс угла наклона линейного участка кинетической кривой, отражающей увеличение интенсивности флуоресценции в результате образования флуоресцирующего реагента.

Статистическая обработка данных выполнена с использованием пакета программ Origin 7.0. Данные представлены как среднее \pm стандартная ошибка среднего. Статистическую значимость различий между значениями среднего рассчитывали по критерию Стьюдента. Различия считали статистически достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На первом этапе нами была определена оптимальная концентрация гепарина, при которой не наблюдается активация нейтрофилов, но которой достаточно для предотвращения связывания высвобожденной в результате экзоцитоза МПО с плазматической мембраной клеток. Как видно из данных, представленных на рисунке 1, при действии fMLP в отсутствие гепарина регистрировалось достоверное высвобождение МПО из нейтрофилов (в 1,8-3,2 раза по сравнению с соответствующими образцами в отсутствие гепарина и fMLP). Для интактных и обработанных cyth b клеток с увеличением концентрации гепарина в среде инкубации активность и содержание МПО в супернатантах нейтрофилов увеличивались незначительно (до $\sim 0,03 \Delta D_{460}/\text{мин}$ и $\sim 0,65$ мкг/мл, соответственно). После преинкубации нейтрофилов с гепарином и последующей активации клеток fMLP было выявлено существенное концентрационно-зависимое увеличение высвобождения МПО, регистрируемое как по активности (рис. 1А), так и по содержанию (рис. 1Б) фермента в супернатантах после удаления нейтрофилов (до $0,08 \Delta D_{460}/\text{мин}$ и 1,6 мкг/мл, соответственно), с выходом на плато при концентрации гепарина 0,1 и 1,0 ед/мл, соответственно.

Полученные нами результаты согласуются с литературными данными [20] о том, что спонтанный выход МПО из интактных не стимулированных клеток, а также клеток, обработанных cyth b, достоверно увеличивался в присутствии 2,1-8,3 ед/мл гепарина с высоким молекулярным весом,

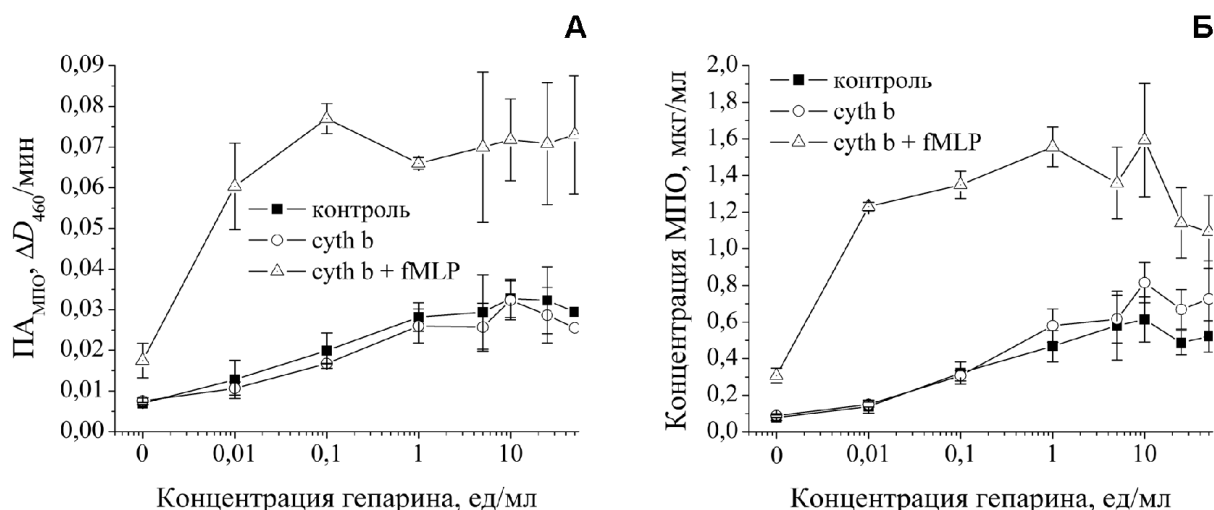


Рисунок 1. Peroxidase активность ($\Delta D_{460}/\text{мин}$) (А) и концентрация МПО (Б) в супернатантах, полученных после удаления интактных нейтрофилов; нейтрофилов, обработанных cyth b (5 мкМ); а также нейтрофилов, стимулированных fMLP (1 мкМ), предварительно инкубированных с гепарином в различных концентрациях (ед/мл).

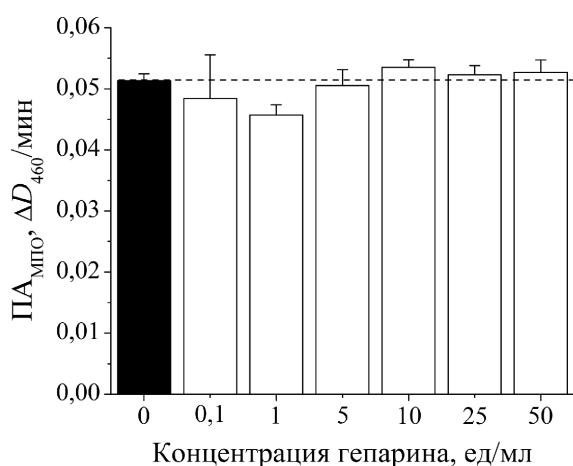


Рисунок 2. Peroxidase активность очищенной МПО (2 нМ) ($\Delta D_{460}/\text{мин}$) в присутствии гепарина в различных концентрациях (ед/мл).

а также 0,5-3,8 ед/мл низкомолекулярного гепарина. В работе [21] было показано достоверное увеличение высвобождения МПО из fMLP-стимулированных нейтрофилов после предварительной инкубации клеток с гепарином в концентрации 3 ед/мл и более.

Учитывая тот факт, что гепарин способен связываться со многими белками плазмы крови [22], тем самым регулируя их функциональную активность, было целесообразно исследовать влияние гепарина на активность МПО. В экспериментах, проведенных с очищенной МПО, гепарин в диапазоне концентраций 0,1-50 ед/мл не влиял на пероксидазную активность фермента (рис. 2).

Нами также было исследовано влияние гепарина на экзоцитоз МПО нейтрофилами, активированными различными стимуляторами, в качестве которых были выбраны хорошо известные активаторы деградации азурофильных гранул нейтрофилов, а именно, РМА [23] и растительные лектины различной углеводной специфичности [24]: WGA (*Triticum*

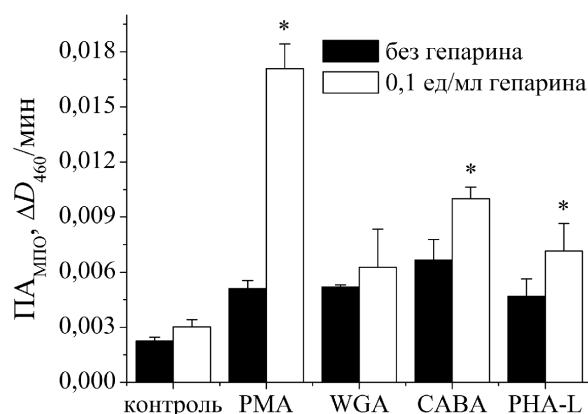


Рисунок 3. Peroxidase активность МПО в супернатантах после удаления нейтрофилов, предварительно инкубированных с гепарином (0,1 ед/мл) и активированных различными агонистами: РМА (30 нг/мл), WGA (25 мкг/мл), CABA (25 мкг/мл) и PHA-L (25 мкг/мл). * $p < 0,05$ по сравнению с эффектом стимуляторов в отсутствие гепарина.

vulgaris агглютинин) – GlcNAc-специфичный лектин зародышей пшеницы, CABA (*Caragana arborescens* агглютинин) – лектин караганы древовидной, специфичный к остаткам GalNAc, а также GalNAc/галактозо-специфичный лектин семян фасоли обыкновенной PHA-L (*Phaseolus vulgaris* агглютинин). Как видно из данных, представленных на рисунке 3, используемые агонисты индуцировали секрецию МПО из азурофильных гранул нейтрофилов. Однако после предварительной инкубации клеток с гепарином (0,1 ед/мл) выход МПО из нейтрофилов, активированных стимуляторами (особенно РМА), увеличивался по сравнению с выходом МПО при действии только активаторов.

Регистрируемое нами увеличение активности и содержания МПО в супернатантах нейтрофилов в присутствии гепарина может быть обусловлено активацией клеток гепарином и, как следствие,

секрецией дополнительного количества МПО из азурофильных гранул. Для выяснения этого вопроса в полученных супернатантах нейтрофилов измеряли активность лизоцима, содержащегося в азурофильных и специфических гранулах нейтрофилов, а также эластазы – маркера только азурофильных гранул нейтрофилов.

Активность лизоцима в супернатантах оценивали по скорости лизиса бактериальных клеток *M. lysodeikticus*. Так, при добавлении к суспензии лиофилизированных бактерий супернатанта активированных fMLP нейтрофилов наблюдалось достоверное увеличение активности лизоцима по сравнению как с супернатантами интактных клеток, так и клеток, преинкубированных с cyth b (рис. 4). Однако последующая обработка клеток гепарином в используемом диапазоне концентраций

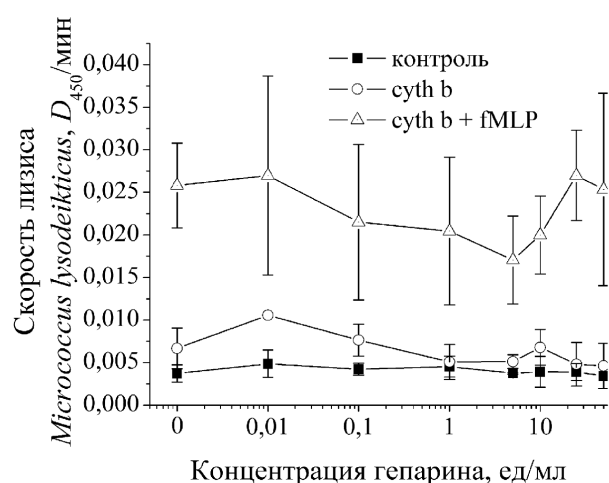


Рисунок 4. Скорость лизиса *Micrococcus lysodeikticus*, определяемая активностью лизоцима в супернатантах интактных нейтрофилов; нейтрофилов, обработанных cyth b (5 мкМ); а также активированных fMLP (1 мкМ) нейтрофилов, после предварительной инкубации клеток с гепарином в различных концентрациях (ед/мл).

не влияла на активность лизоцима в супернатантах fMLP-активированных нейтрофилов. Кроме того, в контрольных экспериментах с лизоцимом в отсутствие клеток нами было показано, что предварительная инкубация лизоцима с гепарином (0,1-50 ед/мл) не влияла на способность лизоцима лизировать бактериальные клетки (данные не приведены). Полученные результаты согласуются с данными работы [21], авторы которой не смогли зарегистрировать экзоцитоз лактоферрина и лизоцима из нейтрофилов в присутствии как высоко- так и низкомолекулярного гепарина. Таким образом, гепарин в концентрациях 0,01-50 ед/мл не способен инициировать секреторную дегрануляцию азурофильных и специфических гранул нейтрофилов.

Влияние различных концентраций гепарина на секрецию эластазы из fMLP-стимулированных нейтрофилов представлено на рисунке 5А. Видно, что гепарин в концентрациях 0,1-50 ед/мл достоверно снижал выход эластазы из fMLP-активированных нейтрофилов. Кроме того, было показано, что способность эластазы (в отсутствие клеток), предварительно обработанной гепарином, расщеплять субстрат – MeO-Suc-Ala-Ala-Pro-Val-MCA – также снижалась по мере увеличения концентрации гепарина (рис. 5Б). Полученные результаты согласуются с данными работы Brown и соавт., которые показали, что гепарин (1-100 ед/мл) ингибирует как ферментативную активность эластазы, так и высвобождение эластазы из активированных TNF-α нейтрофилов. Максимальный эффект наблюдался при использовании гепарина в концентрации 10 ед/мл [25].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ

На основании полученных экспериментальных данных можно сделать вывод о том, что при оценке дегрануляции азурофильных гранул нейтрофилов, регистрируемой по выходу МПО из клеток, инкубация

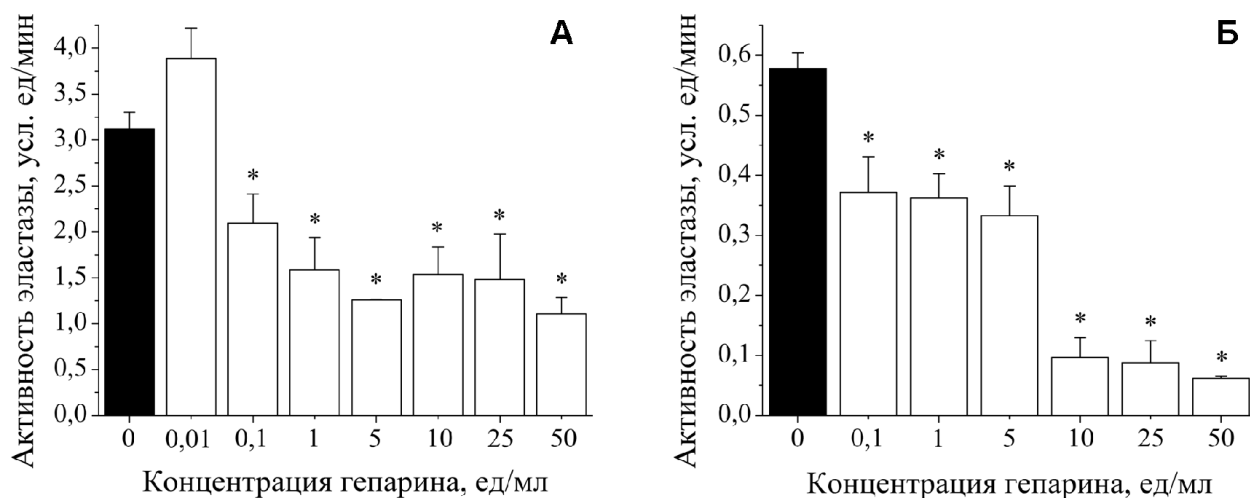


Рисунок 5. А - активность эластазы, высвобождающейся из fMLP-активированных нейтрофилов, преинкубированных с гепарином в различных концентрациях. Б - активность очищенной эластазы (в отсутствие клеток), преинкубированной с гепарином в различных концентрациях, оцененная по способности эластазы расщеплять субстрат в бесклеточной среде. * - $p < 0,05$ по сравнению с эффектом в отсутствие гепарина.

нейтрофилов с гепарином в концентрации 0,1 ед/мл будет оптимальной, поскольку при таких условиях не происходит дополнительной активации клеток, в то же время данной концентрации гепарина достаточно для того, чтобы препятствовать связыванию высвобождаемой МПО с поверхностью нейтрофилов. Этот эффект, по всей вероятности, обусловлен конкурентным ингибированием гепарином связывания МПО с анионными сайтами плазматической мембраны нейтрофилов. Таким образом, использование гепарина в концентрации 0,1 ед/мл позволяет избежать артефакта, обусловленного “потерей” МПО в результате её связывания с нейтрофилами, и повысить точность метода регистрации дегрануляции азурофильных гранул нейтрофилов, основанного на определении во внеклеточной среде активности и/или концентрации МПО.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (гранты 16-54-00038 и 17-04-00530) и Белорусского фонда фундаментальных исследований (грант Б16Р-015).

ЛИТЕРАТУРА

1. Klebanoff S.J. (2005) *J. Leukoc. Biol.*, **77**(5), 598-625.
2. Панасенко О.М., Горудко И.В., Соколов А.В. (2013) *Усп. биол. химии*, **53**, 195-244.
3. Lefkowitz D.L., Mills K., Morgan D., Lefkowitz S.S. (1992) *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **199**(2), 204-210.
4. Gorudko I.V., Sokolov A.V., Shamova E.V., Grudinina N.A., Drozd E.S., Shishlo L.M., Grigorieva D.V., Bushuk S.B., Bushuk B.A., Chizhik S.A., Cherenkevich S.N., Vasilyev V.B., Panasenکو O.M. (2013) *Biol. Open*, **2**(9), 916-923.
5. Lau D., Mollnau H., Eiserich J.P., Freeman B.A., Daiber A., Gehling U.M., Brümmer J., Rudolph V., Münzel T., Heitzer T., Meinertz T., Baldus S. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**(2), 431-436.
6. Gorudko I.V., Sokolov A.V., Shamova E.V., Grigorieva D.V., Mironova E.V., Kudryavtsev I.V., Gusev S.A., Gusev A.A., Chekanov A.V., Vasilyev V.B., Cherenkevich S.N., Panasenکو O.M., Timoshenko A.V. (2016) *Arch. Biochem. Biophys.*, **591**, 87-97.
7. Van der Veen B.S., de Winther M.P., Heeringa P. (2009) *Antioxid. Redox Signal.*, **11**(11), 2899-2937.
8. Горудко И.В., Черкалина О.С., Соколов А.В., Пулина М.О., Захарова Е.Т., Васильев В.Б., Черенкевич С.Н., Панасенко О.М. (2009) *Биоорг. химия*, **35**(5), 629-639.
9. Панасенко О.М., Михальчик Е.В., Горудко И.В., Григорьева Д.В., Соколов А.В., Костевич В.А., Васильев В.Б., Черенкевич С.Н. (2016) *Биофизика*, **61**(3), 500-509.
10. Franck T., Minguet G., Delporte C., Derocette S., Zouaoui Boudjeltia K., Van Antwerpen P., Gach O., Deby-Dupont G., Mouithys-Mickalad A., Serteyn D. (2015) *Free Radic. Res.*, **49**(6), 790-799.
11. Klink A., Nussbaum C., Kubala L., Friedrichs K., Rudolph T.K., Rudolph V., Paust H.J., Schröder C., Benten D., Lau D. et al. (2011) *Blood*, **117**(4), 1350-1358.
12. Григорьева Д.В., Горудко И.В., Соколов А.В., Костевич В.А., Васильев В.Б., Черенкевич С.Н., Панасенко О.М. (2016) *Бюлл. экспер. биол. мед.*, **161**(4), 483-488.
13. El Kebir D., Jyzsef L., Pan W., Filep J.G. (2008) *Circ. Res.*, **103**(4), 352-359.
14. Tyrrell D.J., Horne A.P., Holme K.R., Preuss J.M., Page C.P. (1999) *Adv. Pharmacol.*, **46**, 151-208.
15. Boesman-Finkelstein M., Finkelstein R.A. (1982) *FEBS Letts.*, **144**(1), 1-5.
16. Соколов А.В., Агеева К.В., Костевич В.А., Берлов М.Н., Рунова О.Л., Захарова Е.Т., Васильев В.Б. (2010) *Биохимия*, **75**(11), 1544-1552.
17. Sokolov A.V., Kostevich V.A., Zakharova E.T., Samygina V.R., Panasenکو O.M., Vasilyev V.B. (2015) *Free Radic. Res.*, **46**(6), 800-811.
18. Baldus S., Rudolph V., Roiss M., Ito W.D., Rudolph T.K., Eiserich J.P., Sydow K., Lau D., Szöcs K., Klink A. et al (2006) *Circulation*, **113**(15), 1871-1878.
19. Jog N.R., Rane M.J., Lominadze G., Luerman G.C., Ward R.A., McLeish K.R. (2007) *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **292**(5), 1690-1700.
20. Videm V. (1996) *Scand. J. Immunol.*, **43**(3), 385-390.
21. Léculier C., Couprie N., Adeleine P., Leitiene P., Francina A., Richard M. (1993) *Thromb. Res.*, **69**(6), 519-531.
22. Killeen R., Wait R., Begum S., Gray E., Mulloy B. (2004) *Int. J. Exp. Pathol.*, **85**(4), 69.
23. Abdel-Latif D., Steward M., Macdonald D.L., Francis G.A., Dinanuer M.C., Lacy P. (2004) *Blood*, **104**(3), 832-839.
24. Timoshenko A.V., Kayser K., Gabius H.J. (1998) *Methods Mol. Med.*, **9**, 441-445.
25. Brown R.A., Lever R., Jones N.A., Page C.P. (2003) *Br. J. Pharmacol.*, **139**(4), 845-853.

Поступила: 04. 10. 2017.
Принята к печати: 10. 10. 2017.

EXOCYTOSIS OF MYELOPEROXIDASE FROM ACTIVATED NEUTROPHILS
IN THE PRESENCE OF HEPARIN

*D.V. Grigorieva¹, I.V. Gorudko¹, V.A. Kostevich^{2,3}, V.B. Vasilyev^{2,4}, S.N. Cherenkevich¹,
O.M. Panasenko^{3,5}, A.V. Sokolov^{2,3,4,6}*

¹Belarusian State University, Minsk, Belarus

²Institute for Experimental Medicine, Saint-Petersburg, Russia

³Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine,
1a Malaya Pirogovskaya str., Moscow, 119435 Russia; e-mail: o-panas@mail.ru

⁴Saint Petersburg University, Saint-Petersburg, Russia

⁵Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

⁶Centre of Preclinical Translational Research, Almazov National Medical Research Centre, Saint-Petersburg, Russia

Exocytosis of myeloperoxidase (MPO) from activated neutrophils in the presence of the anionic polysaccharide heparin was studied. It was determined that the optimal concentration of heparin (0.1 u/ml), at which there is no additional activation of cells (absence of amplification of exocytosis of lysozyme contained in specific and azurophilic granules). It was found that after preincubation of cells with heparin (0.1 u/ml) the exocytosis of MPO from neutrophils activated by various stimulants (fMLP, PMA, plant lectins CABA and PHA-L) increased compared to that under the action of activators alone. In addition, it was shown that heparin in the range of concentrations 0.1-50 u/ml did not affect on the peroxidase activity of the MPO isolated from leukocytes. Thus, the use of heparin at a concentration of 0.1 u/ml avoids the artifact caused by the "loss" of MPO in a result of its binding to neutrophils, and increases the accuracy of the method of registration the degranulation of azurophilic granules of neutrophils based on determination of the concentration or peroxidase activity of MPO in cell supernatants.

Key words: myeloperoxidase, degranulation, neutrophils, heparin, elastase, lysozyme