

## АКТИВНЫЕ МЕТАБОЛИТЫ КИСЛОРОДА ПРИ ФАГОЦИТОЗЕ

В работе приводятся современные сведения о роли активных метаболитов кислорода при фагоцитозе. Отдельное внимание авторы уделяют последовательности активации кислородзависимых механизмов фагоцитов и сравнительной эффективности бактерицидного действия наиболее важных кислородных радикалов.

**Ключевые слова:** фагоцитоз, активные метаболиты кислорода, бактерицидность.

Важнейшая роль эффекторной защиты от патогенных бактерий отводится фагоцитирующим клеткам крови и тканей, которые обладают наиболее полным комплектом бактерицидных систем. Из известных фагоцитирующих клеток наиболее мощным бактерицидным потенциалом обладают нейтрофилы, принадлежащие к гранулоцитарной популяции лейкоцитов [7]. Эти клетки крови обладают полным набором кислородзависимых механизмов бактерицидности и литических ферментов, достаточным для лизиса и деградации едва ли не всех липидов, полисахаридов и белков мишеней [1].

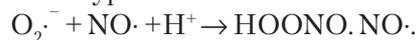
Поскольку ключевая роль в киллинге бактерий принадлежит активным метаболитам кислорода, образуемым в ходе фагоцитарных реакций [11, 26], основное внимание в обзоре клеточных бактерицидных механизмов уделено именно этому эффекторному компоненту защиты макроорганизма.

Процесс активации иммунокомпетентных клеток сопровождается усилением свободнорадикального окисления. Циркулирующие нейтрофилы содержат небольшое количество митохондрий и в фазе покоя потребляют мало кислорода. Однако стимуляция поверхности мембран фагоцитов приводит к резкому увеличению потребления кислорода, продукции активированных кислородных метаболитов ( $O_2^{\cdot-}$ ,  $H_2O_2$ ,  $OH\cdot$ ,  $O_2^*$ ,  $NO\cdot$ ,  $RO_2\cdot$  и др.), активации гексозомонофосфатного шунта [4, 5, 8, 27].

Супероксиданион. Увеличенное потребление кислорода при респираторном взрыве у профессиональных фагоцитов проявляется через секунды, длится несколько минут, а затем прекращается. Почти весь дополнительно поглощенный кислород превращается в супероксид или его анион ( $O_2H\cdot$  и  $O_2^{\cdot-}$ ). Так,  $10^4$  гранулоцитов могут синтезировать 10 нмоль/ч радикалов, или около 200 млн. молекул  $O_2^{\cdot-}$  в 1 с на 1 клетку [13]. NADPH-оксидаза (КФ 1.6.99.6)

является ферментом, ответственным за восстановление молекулярного кислорода в супероксиданион [4, 5]. Однако супероксиданион обладает не самой высокой бактерицидной активностью [24], но является инициатором каскада реакций, приводящих к образованию других более активных форм кислородных метаболитов ( $OH\cdot$ ,  $O_2^*$ ) и пероксинитрита [32].

Азотсодержащие окислители. Продукция  $O_2^{\cdot-}$  приводит к ингибированию NO-радикалов и образованию реакционного пероксинитрита [6, 14]. Синтез  $HOONO$  – это очень быстрая реакция с константой скорости  $3,7 \times 10^7 M^{-1} \cdot \text{сек}^{-1}$ , описываемая уравнением:



$NO\cdot$  является стабильным радикалом, превращение которого из регулятора в токсический агент происходит в результате взаимодействия с  $O_2^{\cdot-}$  и образования  $ONOO^-$ , который, распадаясь при диффузии на  $OH^-$  и  $NO_2$ , разрушает различные биомолекулы и биомембраны. Учитывая время полужизни  $ONOO^-$ , составляющее в фосфатном буфере при pH 7,4 и температуре 37 °C приблизительно 1 сек., можно предположить, что он успевает диффундировать от места его образования на расстояние, равное нескольким клеточным диаметрам. Пероксинитрит индуцирует процессы перекисного окисления липидов [28, 34], окисления NH- и SH- группы белков, гидроксильного и нитрования ароматических колец (в частности, тирозина), ингибирования митохондриального дыхания [33]. В концентрации 250 мкМ пероксинитрит вызывает 50%-ную гибель бактерий *E. coli* [36].

Существенный вклад в цитотоксическое действие пероксинитрита вносит образующийся из него в результате нефентоновской реакции при пониженном pH гидроксильный радикал. Так как данная реакция не требует участия металлов переменной валентности, содержание

которых в клетках в свободном виде ограничено, а константа скорости реакции СОД с супероксиданионом в 3 раза ниже, чем для  $\text{NO}\cdot$ , то некоторые исследователи считают, что это одна из основных клеточных реакций, приводящих к образованию гидроксильного радикала [12]. С использованием морфолиносиднонимина (SIN-1), способного генерировать во внеклеточной среде как  $\text{NO}\cdot$ , так и  $\text{O}_2\cdot^-$ , было доказано образование гидроксильных радикалов в реакции, отличающейся от фентоновской [18]. При повышении концентрации  $\text{NO}\cdot$  от 2–4 мкМ до 10 мкМ способность СОД конкурировать с  $\text{NO}\cdot$  за супероксиданион резко падает и синтез  $\text{ONOO}^-$  увеличивается [20].

Сами по себе  $\text{NO}\cdot$ -радикалы обладают значительным и разнообразным цитотоксическим действием. В физиологических условиях  $\text{NO}\cdot$  взаимодействует с молекулярным кислородом с образованием двуокиси азота, в водных растворах разлагающейся на анионы  $\text{NO}_2^-$  и  $\text{NO}_3^-$ . Поэтому цитотоксическое действие  $\text{NO}\cdot$  может зависеть от образования нитрита ( $\text{NO}_2^-$ ) и нитрата ( $\text{NO}_3^-$ ), которые являются сильными окислителями [23]. Токсичность  $\text{NO}_2^-$  и  $\text{NO}_3^-$  в отношении бактерий возрастает при низких рН и в присутствии перекиси водорода и МПО; вместе с тем нитрит снижает микробицидное действие в системе « $\text{H}_2\text{O}_2 = \text{МПО} = \text{Cl}^-$ » [23, 19].

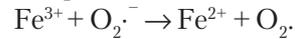
**Пероксид водорода.** Большая часть супероксиданиона превращается в  $\text{H}_2\text{O}_2$  спонтанным или ферментативным путем [29].  $\text{H}_2\text{O}_2$  – наиболее стабильный из промежуточных продуктов восстановления молекулярного кислорода и наименее реакционноспособный. Перекись водорода способна вызывать окисление SH-групп в белках, перекисное окисление ненасыщенных жирных кислот, но эти реакции протекают с измеримыми скоростями, только если концентрация  $\text{H}_2\text{O}_2$  в клетке будет на 4 порядка выше той, которая обычно достигается *in vivo*.

Помимо пероксида из супероксида может также получаться синглетный кислород в результате реакции Габера – Вейса, катализируемой металлами переменной валентности:



Но даже при высокой концентрации железа при нейтральном рН скорость восстановления перекиси водорода до гидроксильного радикала остается очень низкой –  $10^3$ – $10^4 \text{ M}^{-1} \text{ сек}^{-1}$ .

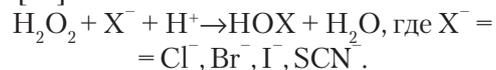
Таким образом, реакция Габера – Вейса требует наличия компонентов, концентрация которых *in vivo* очень мала [31]. Однако оксиданты, в частности  $\text{O}_2\cdot^-$ , индуцируют выход ионов железа и меди из металлопротеинов и их восстановление [16, 32]:



В свою очередь, ионы  $\text{Fe}^{2+}$  разлагают перекись водорода и органические гидроперекиси ( $\text{ROOH}$ ) с образованием реакционных  $\text{OH}\cdot$  и  $\text{RO}\cdot$  радикалов в реакциях Фентона, что играет определенную роль в лактоферриноопосредованной генерации  $\text{OH}\cdot$  из  $\text{O}_2\cdot^-$  и  $\text{H}_2\text{O}_2$  [10, 22].

**Гидроксильные радикалы и миелопероксидаза.** Участие  $\text{OH}\cdot$ -радикалов в бактерицидном и цитотоксическом действии фагоцитов твердо доказано. Гидроксильный радикал превосходит супероксиданион по окислительной активности и токсичности.  $\text{OH}\cdot$  – самый сильный из всех известных окислителей, вызывает повреждения многих типов биополимеров. Гидроксильные радикалы вызывают повреждение ДНК, белков и других молекул и клеточных структур, индуцируют образование органических радикалов и запускают процессы перекисного окисления липидов [15]. Каталаза, хелаторы металлов переменной валентности, а также ингибиторы  $\text{OH}\cdot$ -радикалов (диметилсульфоксид, диметилтиомочевина) значительно снижают цитотоксическое действие фагоцитов, что подтверждает ключевую роль  $\text{OH}\cdot$  в повреждении биологических структур [22, 35].

Образуется  $\text{OH}\cdot$  как в реакции Фентона, так и при взаимодействии ионов железа ( $\text{Fe}^{2+}$ ) с гипохлоритом. В результате реакции перекиси водорода с галоидами, катализируемой ферментом миелопероксидазой, образуются гипогалоиды [23]:



Миелопероксидаза – гемопrotein с молекулярной массой 150 тыс.Д. Гранулоциты буквально начинены этим ферментом (от 2 до 5% сухой массы клетки). Дегрануляция, которой сопровождается активация гранулоцитов, приводит к высвобождению миелопероксидазы и инициации образования гипогалоидов, являющихся важным компонентом микробицидного потенциала полиморфноядерных лейкоцитов [17]. На образование  $\text{HOCl}$  расходуется 28% потребляемого активированными нейтрофилами кис-

### Экспериментальная и клиническая медицина

лорода или 40% образующейся  $H_2O_2$  [2]. Гипогалоиды представляют собой высокорекреационные токсины (токсичны для бактерий даже в концентрации 50 мкМ).

Цитотоксичность системы миелопероксидазы –  $H_2O_2$  – галид может объясняться различными механизмами. Если окисляемым галидом является иодид, то повреждение может быть вызвано прямым иодированием, если в реакции участвует хлорид, то галогенизация в виде основного механизма исключается. В таком случае токсичность частично объясняется присутствием синглетного кислорода или окислительной способностью  $HOCl$ . При взаимодействии с гипогалоидами в первую очередь окисляются сульфгидрильные и тиоэфирные группы белков, поэтому наличие в среде молекул, содержащих данные группы (глутатион, альбумин), существенно снижает цитотоксическое и деструктивное действие как самих гипогалоидов, так и активированных гранулоцитов [9]. Система миелопероксидазы также декарбоксилирует аминокислоты, причем настолько эффективно, что чувствительные микроорганизмы погибают в течение нескольких минут. Продукты окисления системы миелопероксидазы могут вызывать высвобождение вазоактивных аминов из тромбоцитов и тучных клеток.  $HOCl$  также взаимодействует с биологическими аминами, продуцируя хлорамины. Некоторые из них обладают гораздо более мощным деструктивным потенциалом, нежели  $HOCl$  [22].

В бактериях  $HOCl$  и  $H_2O_2$  селективно ингибируют клеточное деление, синтез РНК и ДНК и продукцию белков клеточного деления [25]. Подтверждением непрямого роли гипогалоидов в цитотоксическом действии фагоцитов служит тот факт, что дефицитные по МПО состояния слабо проявляются на уровне целого

организма. Возможно, у людей с дефицитом миелопероксидазы активизируются другие бактерицидные механизмы: в частности, гранулоциты синтезируют повышенное количество супероксиданиона [30] и/или гидроксильного радикала [22].

Сочетанная кислородзависимая цитотоксичность. Рассмотренные выше механизмы цитотоксического и бактерицидного действия наиболее эффективны при сочетанном их воздействии:

NADPH-оксидаза ( $O_2^{\cdot-}$ ) – СОД ( $H_2O_2$ ) – ионы Fe или Cu ( $OH\cdot$ );

NADPH-оксидаза ( $O_2^{\cdot-}$ ) – СОД ( $H_2O_2$ ) – МПО (гипогалоиды);

NADPH-оксидаза ( $O_2^{\cdot-}$ ) – NO-синтаза ( $HOONO$ ).

При этом отметим, что процесс эволюции сопровождался разнесением указанных механизмов как в пространстве, так и во времени. Например, развитие респираторного взрыва в фагоцитах при активации NADPH-оксидазы является быстрым процессом и длится, как правило, от 10 минут до 2 часов, тогда как NO-синтаза – индуцибельный фермент, активность которого возрастает только через несколько часов и требует синтеза белка. Максимальная продукция радикалов NO-синтазой и NADPH-оксидазой наблюдается в результате совместного воздействия нескольких стимулов, например цитокина, оказывающего примиряющий эффект, и липополисахарида [3, 21]. По-видимому, такое пространственно-временное разнесение и многоуровневая система регуляции необходимы для эффективного контроля за цитотоксическим действием активных кислородных метаболитов: токсичность должна проявляться в первую очередь против чужеродных микроорганизмов и в наименьшей степени затрагивать клетки собственного организма.

#### Список использованной литературы:

1. Хэнни К.С. Клеточная цитотоксичность // Иммунология: В 3-х т., Т. 3.: Пер. с англ. / К.С. Хэнни, С. Джиллис; под ред. У. Пола. – М.: Мир, 1987. – 1989. – С. 126-151.
2. Шаронов Б. П., Чурилова И. В. Окислительные модификации и инактивация супероксиддисмутазы, вызванные гипохлоритом // Биохимия. – 1992. – Т. 57. – №5. – С.719-727.
3. Albina J.E. On the expression of nitric oxide synthase by human macrophages. Why no NO? // J. Leukocyte Biol. 1995. - V.58. - P.643.
4. Babior B. Oxygen-dependent microbial killing by phagocytes (first of two parts) // N. Engl. J. Med. - 1978a. - V.298(12). - P.659-668.
5. Babior B. Oxygen-dependent microbial killing by phagocytes (second of two parts) // N. Engl. J. Med. - 1978b. - V.298(13). - P.721-725.
6. Beckman J., Beckman T., Chen J. et al. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implication for endothelial injury from nitric oxide and superoxide // Proc. Natl. Acad. Sci USA. - 1990. - V.87. - P.1620-1622.
7. Brubaker R. R. Mechanisms of bacterial virulence // Annu Rev Microbiol. - 1985. - v.39. - P.21-50.
8. Brunk U., Cadenas E. The potential intermediate role of lysosomes in oxygen free radical pathology. Review article // APMIS. - 1988. - V.96 (1). - P.3-13.

9. Clark R.A, Szot S. The myeloperoxidase-hydrogen peroxide-halide system as effector of neutrophil-mediated tumor cell cytotoxicity// *J. Immunol.*- 1981.- V.126.- P.1295-1301.
10. Coffman T.J., Cox C.D., Edeker B.L., Britigan B.E. Possible role of bacterial siderophores in inflammation. Iron bound to the *Pseudomonas* siderophore pyochelin can function as a hydroxyl radical catalyst// *J. Clin. Invest.*- 1990.- V.86(4).- P.1030-1037.
11. Fazal N. The role of reactive oxygen species (ROS) in the effector mechanisms of human antimycobacterial immunity// *Biochem Mol Biol Int.*- 1997.- v. 43.- P.399-408.
12. Freeman B. Free radical chemistry of nitric oxide. Looking at the dark side// *Chest.*- 1994.- V.105.- P.87S-84S.
13. Fridovich I. Editorial: Superoxide radical and the bactericidal action of phagocytes// *N. Engl. J. Med.*- 1974.- V.290(11).- P.624-625.
14. Gryglewski R., Palmer R., Moncada S. Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelial-derived vascular relaxing factor// *Nature.*- 1986.- V.320.- P.454-457.
15. Halliwell B., Gutteridge J.M.C. Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts// *Arch. Biochem. Biophys.*- 1986.- V.246(2).- P.501-506.
16. Harris L.R., Cake M.H., Macey D.J. Iron release from ferritin and its sensitivity to superoxide ions differs among vertebrates// *Biochem. J.*- 1994.- V.301.- P.385.
17. Hiramatsu K., Arimori S. Increased superoxide production by mononuclear cells of patients with hypertriglyceridemia and diabetes// *Diabetes.*- 1988.- V.37(6).- P.832-837.
18. Hogg N., Darley-Usmar V.M., Wilson M.T., Moncada S. Production of hydroxyl radicals from the simultaneous generation of superoxide and nitric oxide// *Biochem. J.*- 1992.- V.281(Pt.2).- P. 419-424.
19. Hughes M.N. Relationships between nitric oxide, nitroxyl ion, nitrosonium cation and peroxynitrite// *Biochim. Biophys. Acta.*- 1999.- №5.- V.1411(2-3).- P.263-272.
20. Ischiropoulos H., Zhu L., Beckman J. Peroxynitrite formation from macrophage-derived nitric oxide// *Arch. Biochem. Biophys.*- 1992.- V.298.- P.446-451.
21. Kasai K., Hattori Y., Nakanishi N., Manaka K., Banda N., Motohashi S., Shimoda S.I. Regulation of inducible nitric oxide production by cytokines in human thyrocytes in culture// *Endocrinology.*- 1995.- V.136(10).- P.4261-4270.
22. Klebanoff S.J. Bactericidal effect of Fe<sup>2+</sup>, ceruloplasmin, and phosphate// *Arch. Biochem. Biophys.*- 1992.- V.295(2).- P.302-308.
23. Klebanoff S.J. Reactive nitrogen intermediates and antimicrobial activity: role of nitrite// *Free. Radical. Biol. and Med.*- 1993.- V.14(4).- P.351-360.
24. McCord J.M. Superoxide radical: controversies, contradictions, and paradoxes// *Proc. Soc. Exptl. Biol. and Med.*- 1995.- V.209(2).- P.112-117.
25. McKenna S.M., Davies K.J. The inhibition of bacterial growth by hypochlorous acid. Possible role in the bactericidal activity of phagocytes// *Biochem. J.*- 1988.- V.254(3).- P.685-692.
26. Miller R. A., Britigan B. E. Role of oxidants in microbial pathophysiology// *Clinical Microbiology Reviews.*- 1997.- v.10.- P.1-18.
27. Nauseef W.M. The NADPH-dependent oxidase of phagocytes// *Proc. Assoc. Am. Physicians.*- 1999.- V.111(5).- P.373-382.
28. Radi R., Beckman J.S., Bush K.M., Freeman B.A. Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide// *Arch. Biochem. and Biophys.*- 1991.- V.288(2).- P.481-487.
29. Ramasarma T. Generation of H<sub>2</sub>O in biomembranes// *Biochimia et Biophysica Acta.*- 1982.- V. 694(1).- P. 69-93.
30. Rosen G.M., Rou S., Ramos G.L., Cohen M.S., Britigan B.E. Free radicals and phagocytic cells// *FASEB J.*- 1995.- V. 9.- P. 200.
31. Rush J., Koppenol W. Reactive intermediates formed by the interaction of hydrogen peroxide and ferrous complexes// In: Beaumont, P. et al., (eds) *Free radicals, metal ions and biopolymers.* Richelieu. London.- 1989.- P. 33-44.
32. Samokyszyn V.M., Thomas C.E., Reif D.W., Saito M., Aust S.D. Release of iron from ferritin and its role in oxygen radical toxicities// *Drug. Metab. Rev.*- 1988.- V. 19.- P. 283.
33. Szado C., Salzman A.L. Endogenous peroxynitrite is involved in the inhibition of mitochondrial respiration in immunostimulated J774.2 macrophages// *Biochem. Biophys. Res. Commun.*- 1995.- V. 209(2).- P. 739-743.
34. Vazquez-Torres A., Jones-Carson J., Mastroeni P., Ischiropoulos H., Fang F. C. Antimicrobial actions of the NADPH phagocyte oxidase and inducible nitric oxide synthase in experimental salmonellosis. I. Effects on microbial killing by activated peritoneal macrophages in vitro// *Journal of Experimental Medicine.*- 2000.- v.192.- P.227-236.
35. Ward P.A. Mechanisms of endothelial cell injury// *J. Lab. and Clin. Med.*- 1991.- V. 118.- P. 421.
36. Zhu L., Gunn C., Beckman J.S. Bactericidal activity of peroxynitrite// *Arch. Biochem. and Biophys.*- 1992.- V. 298(2).- P. 452-457.