

© Н.В. ВОРОБЬЕВА, 2013
 УДК 616.155.34-092:577.152.1
 Н.В. Воробьева

NADPH-ОКСИДАЗА НЕЙТРОФИЛОВ И ЗАБОЛЕВАНИЯ, СВЯЗАННЫЕ С ЕЕ ДИСФУНКЦИЕЙ

Кафедра иммунологии биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова (119992, г. Москва, Ленинские горы, 1/12)

В обзоре рассмотрены вопросы, касающиеся современного представления о структуре и функции NOX2-содержащей NADPH-оксидазы нейтрофилов, локализации синтезированных активных форм кислорода (АФК) при активации различными стимулами, ассоциации уровня АФК с воспалительными и аутоиммунными заболеваниями в организме, а также последствий измененного синтеза АФК.

Ключевые слова: *нейтрофилы, NADPH-оксидаза, активные формы кислорода, хроническая гранулематозная болезнь, сигнальные пути*

N.V. Vorobjeva

NADPH OXIDASE OF NEUTROPHILS AND DISEASES ASSOCIATED WITH ITS DISFUNCTION

Immunology Department, Biology faculty, Lomonosov Moscow State University, Lenin Hills 1/12, 119992, Moscow, Russia

Here we discuss the accumulating knowledge of modern imagination of structure and functions of NOX2-associated NADPH oxidase of neutrophils, a reactive oxygen species (ROS) localization after the induction with various stimuli, the connection of ROS level with the inflammatory and autoimmune diseases, as well as consequences of the impaired ROS synthesis.

Keywords: *neutrophils, NADPH oxidase, reactive oxygen species, chronic granulomatous disease (CGD), signalling*

Нейтрофилы представляют собой основные клетки врожденного иммунитета, осуществляющие защиту хозяина от патогенов. Являясь профессиональными фагоцитами, они обладают рядом антимикробных систем, включающих NOX2-содержащий NADPH-оксидазный комплекс, который восстанавливает молекулярный кислород до микробицидных активных форм кислорода (АФК) [1]. Иногда весь комплекс некорректно называют NOX2, тогда как это название относится только к субъединице gp91^{phox}, входящей в состав комплекса. Ферментный комплекс еще называют оксидазой фагоцитов, и он образует значительно более высокий уровень АФК, чем другие клеточные оксидазы. И хотя в фагоцитах есть и другие АФК-образующие системы (например, NADPH-оксидазы, включающие другие члены NOX-семейства [2], NO-синтазы [3], а также митохондрии [4]), в этом обзоре будет рассмотрено образование АФК именно NOX2-содержащей NADPH-оксидазой.

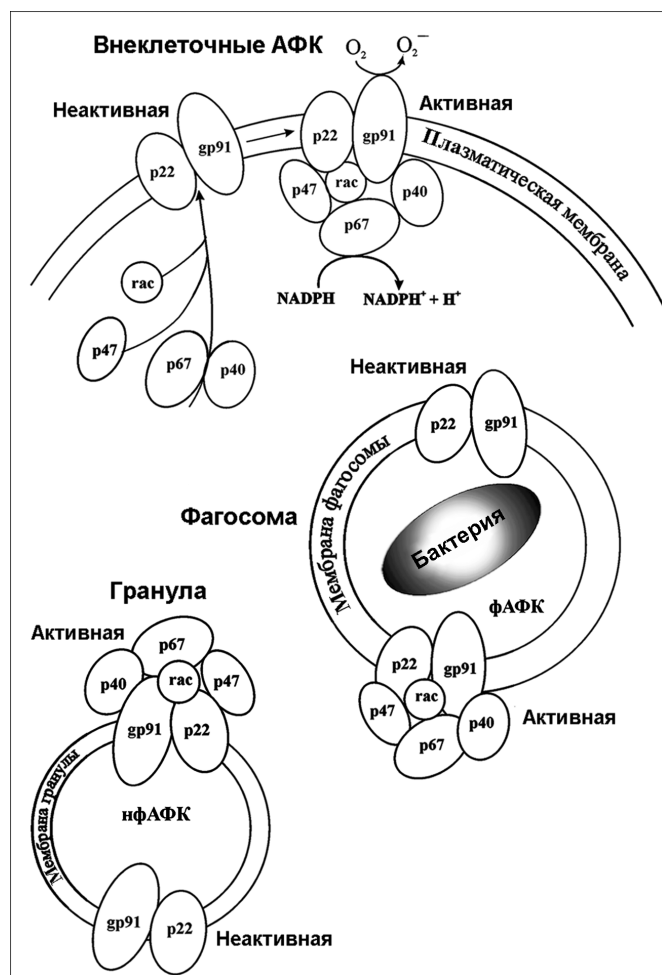
Структура NADPH-оксидазы и синтез АФК. Структура NADPH-оксидазы. Оксидаза фагоцитов представляет собой многокомпонентный электронтранспортный комплекс (см. рисунок), две субъединицы которого p22^{phox} (phox происходит от phagocyte oxidase) и gp91^{phox} образуют мембранный гетеродимерный флавогемопротейн, известный как цитохромом b (цитохромом b₅₅₈). Цитохром b составляет каталитическую электронтранспортную часть оксидазы, gp91^{phox}-субъединица которого содержит сайты связывания для флавинадениндинуклеотида (FAD), никотинамидадениндинуклеотидфосфата (NADPH) и двух гемов. В отсутствие клеточной активации цитозольные компоненты NADPH-оксидазы, p40^{phox}, p47^{phox} и p67^{phox}, не ассоциированы с цитохромом b, и оксидаза находится в неактивном состоянии. После клеточной активации цитозольные компоненты переносятся на мембрану и ассоциируют с цитохромом b, в результате чего образуется функциональная NADPH-оксидаза. В образовании комплекса принимают участие несколько кофакторов; в нейтрофилах человека доминирующим кофактором является Rac2-ГТФаза [5].

Синтез АФК. NADPH-оксидаза в активном состоянии переносит электроны от расположенного в цитоплазме NADPH через мембрану на молекулярный кислород. Кислород далее подвергается одноэлектронному восстановлению, ведущему к образованию супероксид-анион радикала (O₂⁻). O₂⁻, в свою очередь, спонтанно дисмутирует с образованием пероксида водорода (H₂O₂). Эти первичные АФК (O₂⁻ и H₂O₂) могут подвергаться дальнейшему процессингу, в результате которого образуются более активные метаболиты, например гидроксильный радикал (OH[•]) и гипохлорная кислота (HOCl). HOCl обладает сильными микробицидными свойствами и образуется при участии миелопероксидазы (МПО), фермента азурофильных гранул [6].

Считалось общепринятым, что сборка NADPH-оксидазы нейтрофилов осуществляется исключительно на мембранах, происходящих из плазмалеммы (цитоплазматическая мембрана). Вместе с тем известно, что нейтрофилы содержат по крайней мере четыре типа внутриклеточных мембранных везикул: азурофильные, специфические и желатиновые гранулы, а также секреторные везикулы [7]. Поскольку показано, что цитохром b локализован как в плазматической мембране (5%), так и в мембранах гранул (95%) [8], то предположили, что и в гранулах тоже могут происходить сборка и активация NADPH-оксидазы [9]. Сборка оксидазы на цитоплазматической мембране ведет к выходу АФК во внеклеточное окружение (внеклеточные АФК; см. рис. 1), а сборка оксидазы на внутриклеточных мембранах приводит к синтезу АФК, остающихся внутри мембранных органелл (внутриклеточные АФК). Общепринятыми сайтами образования внутриклеточных АФК, безусловно, являются фагосомы, однако, как недавно показано, АФК могут синтезироваться и вне фагосом, в цитохром b-содержащих гранулах [10, 11].

Мутации NADPH-оксидазы. Точковые мутации и делеции в генах, кодирующих компоненты NADPH-оксидазы, приводят к редкому иммунодефициту, известному как хроническая гранулематозная болезнь (ХГБ) (первоначальное название – "фатальное гранулематозное заболевание детей" [12]). В 1960-е годы было показано, что ХГБ ассоциирована со сниженным поглощением кислорода фагоцитами [13], а также с нарушением киллинга микроорганизмов [14], чем

Воробьева Нина Викторовна, тел. 8-916-820-88-37; e-mail: nvorobjeva@mail.ru.



Структура и сборка NADPH-оксидазы.

Цитохром b, состоящий из субъединиц gp91^{phox} (NOX2; ген CYBB) и p22^{phox} (ген CYBA), расположен в цитоплазматической мембране и мембранах внутриклеточных гранул. После активации цитозольные компоненты p47^{phox} (NOXO2; NCF1), p67^{phox} (NOXA2; NCF2), p40^{phox} (NCF4) и Rac2 (Rac2) транслоцируются к цитохрому b с образованием функциональной NADPH-оксидазы. При активации NADPH-оксидазы на плазматической мембране происходит образование внеклеточных АФК, а при активации ферментного комплекса на внутренних мембранах образуются внутриклеточные фагосомальные (фАФК) и нефагосомальные АФК (нфАФК), остающиеся внутри клетки.

объяснялась предрасположенность пациентов с ХГБ к инфекциям. Также установлено, что такие больные страдают от ряда воспалительных осложнений.

Сходный иммунодефицит, не являющийся, строго говоря, ХГБ, был описан у пациента с мутацией в гене Rac2. Нейтрофилы этого пациента помимо сниженного уровня АФК имеют ряд функциональных дефектов, напоминающих нарушение миграции и адгезии лейкоцитов [15, 16].

Классическая форма ХГБ. Преобладающая форма ХГБ (около 70% случаев) связана с мутациями в гене CYBB, кодирующем субъединицу gp91^{phox} (см. таблицу) [17]. Этот ген наследуется как рецессивный, сцепленный с полом (XLR, X-linked, recessive), поэтому поражает главным образом мальчиков. Незначительная группа (около 2%) пациентов с ХГБ имеет мутации в гене CYBA, кодирующим субъединицу p22^{phox}. Этот тип ХГБ наследуется по аутосомно-рецессивному принципу (AR, autosomal recessive) и поражает представителей обоих полов в равной степени. Остальные случаи классической ХГБ обусловлены мутациями в субъ-

диницах p47^{phox} (ген NCF1, нейтрофильный цитозольный фактор 1) и p67^{phox} (NCF2) и составляют 12 и 3% соответственно. Оставшиеся 13% случаев нарушения образования АФК, предположительно относящиеся к ХГБ, имеют неизвестные или неохарактеризованные мутации [87].

Сцепленная с полом форма ХГБ (XLR) является более тяжелой по сравнению с аутосомно-рецессивной в отношении чувствительности к инфекциям и воспалительным симптомам [17]. Такое отличие может быть связано с тем, что субъединица gp91^{phox} абсолютно необходима для синтеза АФК, в то время как утрата субъединицы p47^{phox} может быть частично компенсирована за счет субъединицы p67^{phox} [18]. Следует также заметить, что у пациентов с идентичными мутациями сила проявления ХГБ может сильно различаться [19], поскольку как генетические (полиморфизм по другим генам), так и факторы внешней среды могут оказывать влияние на течение и тяжесть клинических проявлений этой болезни.

ХГБ, обусловленная мутациями в субъединице p40^{phox}. Результаты недавно проведенных экспериментов на p40^{phox}-дефицитных клеточных линиях и нокаутных мышах показали, что субъединица p40^{phox} активирует NADPH-оксидазу при фагоцитозе через phox-гомологичный (PX) домен на N-конце, связывающем фосфатидилинозитол-3-фосфат (PtdIns(3)P). Этот фосфоинозитид накапливается в фагосомах при действии PtdIns(3)P-киназы III класса [20–31]. Нейтрофилы мышей, экспрессирующие мутантный белок p40^{phox}R58A, PX-домен которого не способен связывать PtdIns(3)P, обладали сниженной способностью к киллингу *St. aureus* в системе *in vitro*, а элиминация *St. aureus* после их внутрибрюшинного введения таким мутантам была полностью подавлена из-за неспособности их нейтрофилов синтезировать АФК [24, 25]. Напротив, связывание PtdIns(3)P с p40^{phox} не играло никакой роли в регуляции синтеза супероксида, если индукцию проводили с помощью хемоаттрактанта N-формил-метионил-лейцил-фенилаланина (ФМЛФ) или форболового эфира [20, 21, 24, 25, 30, 32].

Мутации в субъединице p40^{phox} долгое время не были известны у пациентов с ХГБ, хотя был описан широкий интронный полиморфизм в гене NCF4, ассоциированный с заболеванием Крона [27, 28] и ревматоидным артритом [27]. Первый случай аутосомно-рецессивной ХГБ, обусловленной мутацией в гене NCF4, был описан в 2009 г. J. Matute и соавт. [33] у 3-летнего мальчика, исходно страдающего от гранулематозного колита. Генетический анализ позволил установить, что пациент является гетерозиготным носителем двух мутаций в гене NCF4, унаследованных от родителей. Отцовская аллель имела внутреннюю дупликацию, приводящую к сдвигу рамки считывания и образованию преждевременного стоп-кодона, а материнская аллель имела точковую мутацию в гене NCF4, приводящую к синтезу нефункционального белка p40^{phox}, неспособного связывать PtdIns(3)P.

Фагоциты этого пациента синтезировали значительно меньшее количество внутриклеточных АФК по сравнению с клетками доноров во время фагоцитоза опсонизированных *St. aureus*. Удивительно, однако, что фагоциты этого больного могли синтезировать нормальное количество внеклеточных АФК сравнительно с фагоцитами пациентов с классической формой ХГБ, у которых отсутствовал (или был сильно снижен) синтез обоих типов АФК. Кроме того, у этого больного был также нарушен синтез внутриклеточных АФК при стимуляции нейтрофилов форбол-миристан-ацетатом (ФМА), активатором протеинкиназы C. Известно, что такая же стимуляция нейтрофилов доноров приводила к синтезу внутриклеточных АФК без образования фагосом. Исходя из этого, авторы сделали заключение о том, что нейтрофилы, мутантные по субъединице p40^{phox}, сохраняют способность синтезировать внеклеточные АФК на плазматической мембране, но лишены способности синтезировать внутриклеточные АФК как в присутствии, так и в отсутствие фагосом.

Долгое время считалось, что механизмы, контролиру-

Мутации, затрагивающие субъединицы NOX2-NADPH-оксидазы и приводящие к развитию ХГБ у человека

Ген	Субъединица	Мутации, % [87]	Наследование
СУВВ (Xp21.1)	gp91 ^{phox}	70	Х-сцепленное, рецессивное
СУВА (16q24)	p22 ^{phox}	2	Аутосомно-рецессивное
NCF1 (7q11.23)	p47 ^{phox}	12	Аутосомно-рецессивное
NCF2 (1q25)	p67 ^{phox}	3	Аутосомно-рецессивное
Не известен	Не известна	13	Не известно
NCF4 (22q13)	p40 ^{phox}		Аутосомно-рецессивное
Rac2 (22q13)	Rac2		?

щие сборку NADPH-оксидазы и синтез АФК, не зависят от мембран, в которых действует ферментный комплекс. А единственным различием является только расположение образованных АФК, внеклеточное или внутрифагосомальное. Однако в результате исследования, проведенного J. Matute и соавт. [33], было сделано заключение о том, что субъединица p40^{phox} специфически ассоциирует с цитохромом b только внутриклеточных мембран, а не с цитохромом b плазматической мембраны. Вместе с тем результаты, полученные J. Matute и соавт. [33], можно интерпретировать по-другому. Субъединица p40^{phox} может ассоциировать одинаково с оксидазным комплексом всех мембран, но подвергаться дифференциальной регуляции через РХ-домен при активации различными стимулами. На этом вопросе автор остановится в разделе, посвященном активации NADPH-оксидазы.

Результаты J. Matute и соавт. указывают также на важную регуляторную роль внутриклеточных АФК в процессе воспаления, поскольку исследуемый ими пациент страдал гранулематозным колитом (болезнь Крона), хроническим воспалительным заболеванием, без признаков предшествующей инфекции [33].

Места синтеза внутриклеточных АФК. Синтез фаголизосомальных АФК. Защитная функция нейтрофилов от патогенов сильно зависит от процесса фагоцитоза, начинающегося с инвагинации плазматической мембраны и заканчивающегося образованием замкнутой в мембрану фагосомы. Далее фагосома подвергается гетеротипическому слиянию с гранулами (желатинозными, специфическими и азурофильными), в результате чего образуется зрелая фаголизосома [34]. При этом компоненты матрикса, хранящиеся в гранулах, выбрасываются внутрь фаголизосомы, а все мембраны сливаются. Цитохром b, локализованный в цитоплазматической мембране, оказывается в фагоцитарной чаше и интернализуется вместе с патогеном. Однако он составляет лишь малую долю от общего цитохрома b фаголизосомной мембраны, приобретаемого при слиянии фагосом с обогащенными цитохромом b специфическими гранулами [35].

Как отмечалось ранее, АФК, образованные NADPH-оксидазой фаголизосомы, подвергаются дальнейшему процессингу при участии миелопероксидазы азурофильных гранул. В результате молекулы-мишени фаголизосомы йодируются при участии МПО-H₂O₂-галоидной системы [6]. Таким образом, АФК, образованные во время фагоцитоза, находятся главным образом внутри фаголизосомы (фАФК) и являются внутриклеточными [36, 37].

Синтез внутриклеточных нефагосомальных АФК. Несмотря на то что фагосома является типичным местом образования внутриклеточных АФК, существуют стимулы (как корпускулярные, так и растворимые), активирующие сборку NADPH-оксидазы и образование АФК во внутриклеточных

компартаментах без образования фагосом [10]. A. Karlson и С. Dahlgren [10] предложили называть внутриклеточные АФК, синтезированные нейтрофилами без образования фагосом, "нефагосомальными внутриклеточными АФК" (нфАФК). Закономерно возник вопрос, в каких внутриклеточных компартаментах образуются нфАФК у нейтрофилов? Результаты микроскопического анализа показали, что существуют специальные структуры (компарменты), в которых происходит образование нфАФК одновременно с фАФК при фагоцитозе [38]. Стимуляция нейтрофилов ФМА приводила к синтезу нфАФК [9]. Обнаружено, что внутриклеточные компарменты, производящие нфАФК, участвуют в движении и варьируют по количеству, размеру и составу [39]. H. Seguchi и соавт. [40] предположили, что такими местами образования нфАФК у нейтрофилов являются желатинозные и специфические гранулы, содержащие до 90% всего цитохрома b клетки [8]. Эта гипотеза подтверждена в экспериментах по субклеточному фракционированию, а также на клеточных линиях, лишенных гранул, и цитопластах [11]. Показано, что клетки нейтрофильной линии HL-60 и цитопласты, не содержащие специфических и желатинозных гранул (а цитопласты не содержат также и азурофильные гранулы), но сохранившие интактный рецепторный аппарат, могли синтезировать только внеклеточные АФК, но были лишены способности образовывать внутриклеточные нефагосомные АФК [41, 42].

Активация NADPH-оксидазы и сигналы для синтеза внутри- и внеклеточных АФК. Как уже было сказано ранее, после активации нейтрофила происходит транслокация цитозольных компонентов (p67^{phox}, p47^{phox}, p40^{phox}, gac2) к цитохрому b₅₅₈, расположенному в мембране. Роль таких компонентов как p67^{phox} и p47^{phox} в активации комплекса относительно установлена. Показано, что функция белка p67^{phox} заключается в инициации транспорта электронов [43], и он связывается с мембраной после активации и транслокации белка gac2, формирующего для него сайт для прикрепления [44, 45]. Белки p67^{phox} и p40^{phox} можно выделить из покоящихся нейтрофилов в виде комплекса, используя метод гель-фильтрации [46]. Однако при таком методе выделения белок p47^{phox} не обнаруживается в составе комплекса, даже несмотря на то, что его рекомбинантный аналог легко образует триаду с белками p40^{phox} и p67^{phox} [47, 48]. Высказано предположение о том, что формированию тройного комплекса мешает базовое фосфорилирование p47^{phox} в покоящихся нейтрофилах и что необходимо его дефосфорилирование, с тем чтобы это взаимодействие произошло [49, 50]. При стимуляции нейтрофила происходит рефосфорилирование p47^{phox} по девяти возможным сайтам при участии нескольких типов протеинкиназ. Это приводит к таким конформационным изменениям, которые способствуют молекулярному взаимодействию p47^{phox} с комплексом p40^{phox}/p67^{phox}, а также с мембан-связанным белком p22^{phox}, что приводит, в конечном счете, к сборке активного ферментного комплекса [51, 54].

Дальнейшая стабилизация мембраны и активация оксидазы происходит при связывании фосфолипидов с рхгомологичными (РХ) доменами белков p47^{phox} и p40^{phox} (их называют p40РХ и p47РХ) [23, 26, 32, 53, 55, 56]. Эти РХ-домены обладают различной специфичностью к липидам, т. е. p40РХ распознает фосфатидилинозитол-3-фосфат (PI(3)P), а p47РХ – фосфатидилинозитол-3,4-дифосфат (PI(3)P₂) [26]. Это связывание с липидами необходимо для активации ферментного комплекса как в системе *in vitro*, так и *in vivo* [24]. В покоящемся состоянии РХ-домены обоих белков находятся в закрытом состоянии [53, 57, 58]. При этом в белке p47^{phox} происходит взаимодействие между SH3- и аутоингибиторным доменами, а также с остатками аминокислот 341–360, которое прекращается при фосфорилировании p47^{phox} [53, 58]. В белке p40^{phox} РВ1-домен взаимодействует с p40РХ, но точный механизм ослабления этого контакта неизвестен [57].

Показано, что белок p47^{phox} активируется на ранних стадиях образования фагосом, а p40^{phox} – на более поздних, види-

мо, из-за различной доступности соответствующих фосфоинозитидов [58, 59]. Этот факт может указывать на различные функции двух белков в процессе активации оксидазы.

S. Bissonnette и соавт. [21] предложили модель двухэтапной активации мембранного комплекса с участием белка $p40^{phox}$, в соответствии с которой на первом этапе происходит липиднезависимое связывание $p40^{phox}$ с мембраной, приводящее к примированию оксидазы. А на втором этапе связывание с PI(3)P индуцирует молекулярные изменения и активацию NADPH-оксидазы. Авторы предположили, что связывание белка с мембраной индуцирует взаимодействие с цитоскелетом, хотя точная природа этого процесса, а также молекулярные сайты этих контактов неизвестны [21]. Эта идея подтверждена в экспериментах, где было показано, что для завершающей транслокации цитозольных $phox$ -белков к мембране необходимо участие актиновых филаментов [60, 61]. Кроме того, J. El Venha и соавт. [62] обнаружили, что $p40^{phox}$ экстрагируется совместно с тритон-нерастворимой фракцией, выделенной из покоящихся нейтрофилов, что указывало на его конститутивную ассоциацию с актиновым цитоскелетом [63]. Сайт связывания F-актина в белке $p40^{phox}$ не обнаружен. Однако было показано, что белками, связывающимися с актиновыми филаментами с ферментным комплексом, являются мезин и коронин [64, 65]. Для мезина обнаружено несколько сайтов связывания в белке $p40^{phox}$, в том числе в области PX- и SH3-доменов [65].

Как было сказано ранее [33], белок $p40^{phox}$ необходим для синтеза внутриклеточных АФК и не требуется для образования внеклеточных радикалов. Это может быть обусловлено различной специфичностью PX-домена белка $p40^{phox}$ к фосфоинозитидам, образующимся в цитоплазматической мембране и мембранах гранул и фагосом. Действительно было продемонстрировано, что вортманнин, специфический ингибитор PI(3)-киназ, подавлял синтез нфАФК, но внеклеточных АФК при ФМА-индуцированной активации оксидазы [66]. Этот факт указывал на дифференциальное участие PI(3)-киназ в активации двух пулов оксидазы. Известно, что $p40^{phox}$ специфически связывает фосфоинозитид PI(3)P, который синтезируется PI(3)-киназой III класса (Vsp34) [20] и накапливается в большом количестве в фагосомальных и эндосомальных мембранах [22, 26]. Это связывание влечет образование внутриклеточных фАФК и нфАФК.

Синтез внеклеточных АФК, индуцированный взаимодействием G-белок-ассоциированных рецепторов (GPCR) с лигандом, также происходит при участии фосфоинозитидов, но PI(3,4,5)P₃ и PI(3,4)P₂, локализованных в цитоплазматической мембране и синтезируемых при участии PI(3)-киназы I класса [59].

Таким образом, специфичность мембран по отношению к определенному типу липида и соответствующей изоформе PI(3)K, возможно, определяет сигнальный путь, ведущий к образованию внутри- и внеклеточных АФК.

Биологические последствия измененного синтеза АФК. На сегодняшний день у человека не описано ни одного случая, где бы фагоциты синтезировали больше АФК по сравнению с нейтрофилами здоровых лиц благодаря неправильной сборке или функционированию NADPH-оксидазы. Напротив, функции АФК в основном были расшифрованы при изучении пациентов, фагоциты которых лишены функциональной NADPH-оксидазы и не синтезировали АФК или образовывали сниженное количество АФК. Как сказано выше, наиболее значимым заболеванием для изучения NADPH-оксидазы является ХГБ, первичный иммунодефицит, при котором пациенты часто страдают от тяжелых рецидивирующих инфекций бактериального и грибкового происхождения [67]. Однако повышенная чувствительность к инфекциям является отнюдь не единственным клиническим проявлением ХГБ, поскольку такие больные часто страдают от разнообразных воспалительных нарушений, например образования гранулем, воспалительного заболевания кишечника

(inflammatory bowel disease), СКВ-подобных синдромов [68]. Это указывает на склонность таких больных к гипервоспалительным реакциям. Принято считать, что воспалительные реакции у пациентов с ХГБ являются вторичными по отношению к персистирующим инфекциям, но уже накапливаются данные, свидетельствующие о том, что очаги воспаления у таких больных часто бывают стерильными. Эти факты наводят на мысль о том, что АФК, синтезированные NADPH-оксидазой, могут участвовать в контроле воспалительных реакций.

Далее автору хотелось бы остановиться на вопросе о корреляции недостаточного синтеза АФК и различных воспалительных нарушений в отсутствие инфекции, поскольку роль АФК как антимикробных эффекторов описана довольно подробно в ряде обзоров [34, 69, 70].

Общие последствия снижения синтеза АФК. Как уже было сказано, фагоциты пациентов с классической формой ХГБ (XLR-ХГБ, $gp91^{phox}$ -дефицитные) полностью лишены способности синтезировать АФК, как вне-, так и внутриклеточные. У таких пациентов заболевание довольно сильно ассоциировано с рядом воспалительных осложнений [17, 19], и сходные гипервоспалительные реакции также обнаружены у мышей, мутантных по $gp91^{phox}$ [63, 71–73].

Показано, что гипервоспалительные реакции проявляют также фагоциты больных ХГБ непосредственно в системе *in vitro*. Так, в ряде работ обнаружено, что первичные XLR-ХГБ лейкоциты синтезируют значительно более высокий уровень провоспалительных цитокинов после стерильной стимуляции по сравнению с контрольными клетками [74, 75]. Даже в отсутствие стимуляции фагоциты XLR-ХГБ обладают повышенной транскрипцией провоспалительных генов [76, 77], сопровождаемой высоким уровнем синтеза соответствующих белков (цитокинов) [76]. Таким образом, на основании вышеперечисленных фактов можно сделать вывод о том, что АФК, спонтанно синтезированные нормальными фагоцитами, могут супрессировать транскрипцию провоспалительных генов и тем самым поддерживать гомеостаз.

Ранее считали, что гипервоспаление у пациентов с ХГБ обусловлено повышенным уровнем циркулирующих микробных компонентов, вызванным дефектным киллингом. Однако показано, что моноцитоподобные ХГБ-клетки, не способные синтезировать АФК [78], обнаруживают повышенную экспрессию цитокинов при культивировании с антибиотиками в системе *in vitro* [76]. Это еще раз подчеркивает предположение о том, что фагоциты, лишенные функциональной NADPH-оксидазы, гиперактивны.

Фагоциты больных XLR-ХГБ полностью лишены активности NADPH-оксидазы, однако существуют случаи заболевания, когда сниженный уровень АФК все же образуется. Такая ситуация встречается у больных ХГБ, имеющих мутации в субъединице $p47^{phox}$. Их фагоциты синтезируют выявляемый, но сильно пониженный уровень АФК по сравнению с таковым нормальных клеток. Высказано предположение о том, что субъединица $p67^{phox}$ может частично компенсировать отсутствие $p47^{phox}$ [18]. Удивительно, что пациенты с мутациями в $p47^{phox}$ так же, как и больные XLR-ХГБ, были склонны к гипервоспалению [17, 19, 79]. Замечено, что тяжесть клинических проявлений ХГБ при аутосомно-рецессивном наследовании выражена гораздо слабее, чем при X-сцепленном, в отношении как чувствительности к инфекциям, так и воспалительным реакциям [17], что подчеркивает клиническую важность даже низкого уровня фагоцитарных АФК.

Интересно, что и в других группах людей со сниженным уровнем синтеза фагоцитарных АФК обнаружены признаки гипервоспаления. Одна такая группа представляет собой гетерозиготных носителей XLR-ХГБ (матери пациентов с XLR-ХГБ), обычно имеющих две популяции фагоцитов – нормальную и XLR-ХГБ-ассоциированную. У таких носителей обнаруживают пониженный уровень АФК во всем организме, и они часто страдают от гипервоспалений, осо-

бенно СКВ-подобного заболевания [80]. Эти факты снова подтверждают предположение о том, что АФК, синтезируемые NADPH-оксидазой, держат воспалительные реакции под контролем, а в случае полного или частичного нарушения АФК-синтезирующего механизма развиваются гипертрофические нарушения [17].

Роль АФК в развитии аутоиммунных заболеваний. Замечено, что пациенты с ХГБ и носители имеют повышенный риск развития аутоиммунных заболеваний [81]. Так, обнаружен пациент с ХГБ, страдающий от полиартрита, напоминающего ювенильный ревматоидный артрит [82], а члены семьи пациентов с ХГБ часто имеют СКВ [17]. Кроме того, 37% матерей больных ХГБ, являющихся носителями X-сцепленной мутации, страдают от болей в суставах, проходящих после лечения, которое сходно с лечением волчанки [80]. Недавно получено прямое доказательство участия АФК в аутоиммунитете. При тестировании синтеза АФК в ответ на различные стимулы в лейкоцитах крови пациентов с синдромом Гийена–Барре (синдром Гийена–Барре характеризуется демиелинизацией и инфильтрацией мононуклеаров в периферические нервы и нервные корешки) обнаружена четкая корреляция тяжести заболевания с уровнем синтеза АФК [85].

Таким образом, в результате анализа перечисленных выше данных можно сделать заключение о том, что АФК могут участвовать в регуляции аутоиммунных реакций, а также регуляции и ограничении воспалительных ответов в целом.

Особые случаи отсутствия внутриклеточных АФК. В вышеупомянутом сообщении J. Matute и соавт. [33] показано, что нейтрофилы пациента с ХГБ, обусловленной мутацией в субъединице p40^{phox}, обнаруживают нормальный выход внеклеточных АФК и существенное снижение синтеза внутриклеточных АФК (фАФК и нфАФК). И, несмотря на снижение уровня внутриклеточных АФК, у этого пациента и членов его семьи не выявлены рецидивирующие инфекции. Однако данный больной страдал от гранулематозного колита, что указывало на его неспособность к ограничению воспалительных реакций. Все эти факты снова подтверждают предположение об участии внутриклеточных АФК в супрессии воспаления в норме.

Другим заболеванием, при котором сильно снижен синтез внутриклеточных АФК, является синдром SAPHO (synovitis, acne, pustulosis, hyperostosis, osteitis; синовит, акне, пустулез, гиперостоз, остит), аутоиммунное воспалительное заболевание костей, кожи и суставов [84]. Так же, как и при p40^{phox}-дефицитной ХГБ, у пациентов с синдромом SAPHO отсутствовал синтез нфАФК, что сопровождалось разнообразными воспалительными нарушениями. У таких больных тяжесть заболевания не ассоциирована с повышенной чувствительностью к инфекциям аналогично с p40^{phox}-дефицитной ХГБ. Показано, что при синдроме SAPHO активность нейтрофильной МПО была в норме. Кроме того, у таких больных была в норме также экспрессия генов, кодирующих белки p47^{phox}, p67^{phox}, gp91^{phox} и p22^{phox}, что исключало наличие классической ХГБ. А при секвенировании гена NCF4 не обнаружено мутаций, что указывало на различное происхождение синдрома SAPHO и p40^{phox}-дефицитной ХГБ. Однако специфическое снижение синтеза нфАФК и тяжелые гипервоспаления делают заболевание SAPHO удивительно сходным с p40^{phox}-ХГБ.

АФК и модуляция воспаления. Недавно сделанные сообщения об асептических гипервоспалениях, сопровождающих специфическое снижение синтеза нфАФК у пациентов с синдромом SAPHO [84] и p40^{phox}-ХГБ [33], позволили предположить, что внутриклеточные нфАФК являются ключевыми супрессорами воспаления. Каким образом нфАФК подавляют воспалительные реакции, неясно, однако известно, что клеточные оксиданты оказывают влияние на ряд сигнальных путей, в том числе воспалительных, модулируя окислительно-восстановительный баланс клетки. Этот баланс определяется относительным соотношением оксидантов (АФК) и антиоксидантов. К клеточным оксидантам относятся такие ферменты,

как СОД, каталаза, глутатионпероксидаза, глутатионредуктаза, тиоредоксин, а также низкомолекулярные вещества (называемые небелковыми тиолами), например глутатион. Так, если синтез АФК в клетке сильно превышает ее антиоксидантные возможности, развивается окислительный стресс, приводящий к серьезным клеточным повреждениям и патологии. А умеренные сдвиги окислительно-восстановительного баланса могут выполнять регуляторную роль во многих клеточных процессах, действуя в качестве вторичных мессенджеров при передаче сигналов, а также генных регуляторов, влияющих на синтез цитокинов, факторов роста и гормонов [85–88].

Заключение. В обзоре рассмотрены вопросы, касающиеся современного представления о структуре и функции NOX2-содержащей NADPH-оксидазы нейтрофилов, локализации синтезируемых АФК в ответ на различные стимулы, связи уровня АФК с воспалительными процессами в организме в целом и последствий измененного синтеза АФК. Существование нфАФК, т. е. внутримолекулярных образующихся независимо от фагосом радикалов, становится вполне очевидным фактом. А ассоциация уровня АФК с тяжестью воспалительных нарушений представляет собой новую область исследований, которая, несомненно, займет в ближайшее время свою нишу и вызовет значительный интерес ученых.

REFERENCES

1. Segal A.W. How neutrophils kill microbes. *Annu. Rev. Immunol.* 2005; 23: 197–223.
2. Brown D.I., Griendling K.K. Nox proteins in signal transduction. *Free Radic. Biol. Med.* 2009; 47: 1239–53.
3. Korhonen R., Lahti A., Kankaanranta H. et al. Nitric oxide production and signaling in inflammation. *Curr. Drug Targets Inflamm. Allergy.* 2005; 4: 471–9.
4. Fossati G., Moulding D.A., Spiller D.G. et al. The mitochondrial network of human neutrophils: role in chemotaxis, phagocytosis, respiratory burst activation, and commitment to apoptosis. *J. Immunol.* 2003; 170: 1964–72.
5. Bokoch G.M., Zhao T. Regulation of the phagocyte NADPH oxidase by Rac GTPase. *Antioxid. Redox Signal.* 2006; 8: 1533–48.
6. Klebanoff S.J. Myeloperoxidase friend and foe. *J. Leukoc. Biol.* 2005; 77: 598–625.
7. Faurischou M., Borregaard N. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Microbes Infect.* 2003; 5: 1317–27.
8. Borregaard N., Heiple J.M., Simons E.R. et al. Subcellular localization of the b-cytochrome component of the human neutrophil microbicidal oxidase: translocation during activation. *J. Cell Biol.* 1983; 97: 52–61.
9. Kobayashi T., Robinson J.M., Seguchi H. Identification of intracellular sites of superoxide production in stimulated neutrophils. *J. Cell Sci.* 1998; 11: 81–91.
10. Karlsson A., Dahlgren C. Assembly and activation of the neutrophil NADPH oxidase in granule membranes. *Antioxid. Redox Signal.* 2002; 4: 49–60.
11. Vaissiere C., Le Cabec V., Maridonneau-Parini I. NADPH oxidase is functionally assembled in specific granules during activation of human neutrophils. *J. Leukoc. Biol.* 1999; 65: 629–34.
12. Berendes H., Bridges R.A., Good R.A. A fatal granulomatous of childhood: the clinical study of a new syndrome. *Minn. Med.* 1957; 8: 309–12.
13. Holmes B., Page A.R., Good R.A. Studies of the metabolic activity of leukocytes from patients with a genetic abnormality of phagocytic function. *J. Clin. Invest.* 1967; 46: 1422–32.
14. Quie P.G., White J.G., Holmes B. et al. In vitro bactericidal capacity of human polymorphonuclear leukocytes: diminished activity in chronic granulomatous disease of childhood. *J. Clin. Invest.* 1967; 46: 668–79.
15. Ambruso D.R., Knall C., Abell A.N. et al. Human neutrophil immunodeficiency syndrome is associated with an inhibitory Rac2 mutation. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2000; 97: 4654–9.
16. Kurkchubasche A.G., Panepinto J.A., Tracy Jr T.F. et al. Clinical features of a human Rac2 mutation: a complex neutrophil dysfunction disease. *J. Pediatr.* 2001; 139: 141–7.

17. Winkelstein J.A., Marino M.C., Johnston Jr. R.B. et al. Chronic granulomatous disease: report on a national registry of 368 patients. *Medicine (Baltimore)*. 2000; 79: 155–69.
18. Cross A.R., Yarchover J.L., Curnutte J.T. The superoxide-generating system of human neutrophils possesses a novel diaphorase activity: evidence for distinct regulation of electron flow within NADPH oxidase by p67-phox and p47-phox. *J. Biol. Chem.* 1994; 269: 21448–54.
19. Segal B.H., Leto T.L., Gallin J.I. et al. Genetic, biochemical, and clinical features of chronic granulomatous disease. *Medicine (Baltimore)*. 2000; 79: 170–200.
20. Anderson K.E., Boyle K.B., Davidson K. et al. CD18-dependent activation of the neutrophil NADPH oxidase during phagocytosis of *Escherichia coli* or *Staphylococcus aureus* is regulated by class III but not class I or II PI3Ks. *Blood*. 2008; 112: 5202–11.
21. Bissonnette S.A., Glazier C.M., Stewart M.Q. et al. Phosphatidylinositol 3-phosphate-dependent and -independent functions of p40phox in activation of the neutrophil NADPH oxidase. *J. Biol. Chem.* 2008; 283: 2108–19.
22. Ellson C.D., Anderson K.E., Morgan G. et al. Phosphatidylinositol 3-phosphate is generated in phagosomal membranes. *Curr. Biol.* 2001; 1: 1631–5.
23. Ellson C.D., Gobert-Gosse S., Anderson K.E. et al. PtdIns(3)P regulates the neutrophil oxidase complex by binding to the PX domain of p40(phox). *Nature Cell Biol.* 2001; 3(7): 679–82.
24. Ellson C.D., Davidson K., Anderson K. et al. PtdIns3P binding to the PX domain of p40phox is a physiological signal in NADPH oxidase activation. *EMBO J.* 2006; 25: 4468–78.
25. Ellson C.D., Davidson K., Ferguson G.J. et al. Neutrophils from p40phox^{-/-} mice exhibit severe defects in NADPH oxidase regulation and oxidant-dependent bacterial killing. *J. Exp. Med.* 2006; 203(8): 1927–37.
26. Kanai F., Liu H., Field S.J. et al. The PX domains of p47phox and p40phox bind to lipid products of PI(3)K. *Nature Cell Biol.* 2001; 3: 675–8.
27. Olsson L.M., Lindqvist A.K., Kallberg H. et al. A case-control study of rheumatoid arthritis identifies an associated single nucleotide polymorphism in the NCF4 gene, supporting a role for the NADPH-oxidase complex in autoimmunity. *Arthritis Res. Ther.* 2007; 9(5): 1–11.
28. Rioux J.D., Xavier R.J., Taylor K.D. et al. Genome-wide association study identifies new susceptibility loci for Crohn disease and implicates autophagy in disease pathogenesis. *Nature Genet.* 2007; 39: 596–604.
29. Roberts R.L., Hollis-Moffatt J.E., Geary R.B. et al. Confirmation of association of IRGM and NCF4 with ileal Crohn's disease in a population-based cohort. *Genes Immun.* 2008; 9: 561–5.
30. Tian W., Li X.J., Stull N.D. et al. FcγR-stimulated activation of the NADPH oxidase: phosphoinositide-binding protein p40phox regulates NADPH oxidase activity after enzyme assembly on the phagosome. *Blood*. 2008; 112(9): 3867–77.
31. Vieira O.V., Botelho R.J., Rameh L. et al. Distinct roles of class I and class III phosphatidylinositol 3-kinases in phagosome formation and maturation. *J. Cell Biol.* 2001; 155(1): 19–25.
32. Suh C.I., Stull N.D., Li X.J. et al. The phosphoinositide-binding protein p40phox activates the NADPH oxidase during FcγIIA receptor-induced phagocytosis. *J. Exp. Med.* 2006; 203: 1915–25.
33. Matute J.D., Arias A.A., Wright N.A. et al. A new genetic subgroup of chronic granulomatous disease with autosomal recessive mutations in p40 phox and selective defects in neutrophil NADPH oxidase activity. *Blood*. 2009; 114: 3309–15.
34. Nauseef W.M. How human neutrophils kill and degrade microbes: an integrated view. *Immunol. Rev.* 2007; 219: 88–102.
35. Jesaitis A.J., Buescher E.S., Harrison D. et al. Ultrastructural localization of cytochrome b in the membranes of resting and phagocytosing human granulocytes. *J. Clin. Invest.* 1990; 85: 821–35.
36. Granfeldt D., Dahlgren C. An intact cytoskeleton is required for prolonged respiratory burst activity during neutrophil phagocytosis. *Inflammation*. 2001; 25: 165–9.
37. Lock R., Dahlgren C., Linden M. et al. Neutrophil killing of two type 1 fimbria-bearing *Escherichia coli* strains: dependence on respiratory burst activation. *Infect. and Immun.* 1990; 58: 37–42.
38. Robinson J.M. Reactive oxygen species in phagocytic leukocytes // *Histochem. Cell Biol.* 2008; 130: 281–97.
39. Robinson J.M. Phagocytic leukocytes and reactive oxygen species. *Histochem. Cell Biol.* 2009; 131: 465–9.
40. Seguchi H., Kobayashi T. Study of NADPH oxidase-activated sites in human neutrophils. *J. Electron Microsc. (Tokyo)*. 2002; 51: 87–91.
41. Dahlgren C. Difference in extracellular radical release after chemotactic factor and calcium ionophore activation of the oxygen radical-generating system in human neutrophils. *Biochim. Biophys. Acta.* 1987; 930: 33–8.
42. Foyouzi Youssefi R., Petersson F., Lew D.P. et al. Chemoattractant-induced respiratory burst: increases in cytosolic Ca²⁺ concentrations are essential and synergize with a kinetically distinct second signal. *Biochem. J.* 1997; 322: 709–18.
43. Nisimoto Y., Motalebi S., Han C.H. et al. The p67(phox) activation domain regulates electron flow from NADPH to flavin in flavocytochrome b(558). *J. Biol. Chem.* 1999; 274: 22999–3005.
44. Diekmann D., Abo A., Johnston C. et al. Interaction of Rac with p67phox and regulation of phagocytic NADPH oxidase activity. *Science*. 1994; 265: 531–3.
45. Lapouge K., Smith S.J., Walker P.A. et al. Structure of the TPR domain of p67phox in complex with Rac-GTP. *Mol. Cell.* 2000; 6: 899–907.
46. Brown G.E., Stewart M.Q., Liu H. et al. A novel assay system implicates PtdIns(3,4)P(2), PtdIns(3)P, and PKC delta in intracellular production of reactive oxygen species by the NADPH oxidase. *Mol. Cell.* 2003; 11: 35–47.
47. Wientjes F.B., Hsuan J.J., Totty N.F. et al. p40phox, a third cytosolic component of the activation complex of the NADPH oxidase to contain src homology 3 domains. *Biochem. J.* 1993; 296 (Pt 3): 557–61.
48. Wientjes F.B., Panayotou G., Reeves E. et al. Interactions between cytosolic components of the NADPH oxidase: p40phox interacts with both p67phox and p47phox. *Biochem. J.* 1996; 317 (Pt 3): 919–24.
49. Groemping Y., Rittinger K. Activation and assembly of the NADPH oxidase: a structural perspective. *Biochem. J.* 2005; 386: 401–16.
50. Groemping Y., Lapouge K., Smerdon S.J. et al. Molecular basis of phosphorylation-induced activation of the NADPH oxidase. *Cell.* 2003; 113: 343–55.
51. de Mendez I., Homayounpour N., Leto T.L. Specificity of p47phox SH3 domain interactions in NADPH oxidase assembly and activation. *Mol. Cell. Biol.* 1997; 17: 2177–85.
52. Kami K., Takeya R., Sumimoto H. et al. Diverse recognition of non-PxxP peptide ligands by the SH3 domains from p67(phox), Grb2 and Pex13p. *EMBO J.* 2002; 21: 4268–76.
53. Karathanassis D., Stahelin R.V., Bravo J. et al. Binding of the PX domain of p47(phox) to phosphatidylinositol 3,4-bisphosphate and phosphatidic acid is masked by an intramolecular interaction. *EMBO J.* 2002; 21: 5057–68.
54. Sumimoto H., Hata K., Mizuki K. et al. Assembly and activation of the phagocyte NADPH oxidase. Specific interaction of the N-terminal Src homology 3 domain of p47phox with p22phox is required for activation of the NADPH oxidase. *J. Biol. Chem.* 1996; 271: 22152–8.
55. Bravo J., Karathanassis D., Pacold C.M. et al. The crystal structure of the PX domain from p40(phox) bound to phosphatidylinositol 3-phosphate. *Mol. Cell.* 2001; 8: 829–39.
56. Kuribayashi F., Nunoi H., Wakamatsu K. et al. The adaptor protein p40(phox) as a positive regulator of the superoxide-producing phagocyte oxidase. *EMBO J.* 2002; 21: 6312–20.
57. Honbou K., Minakami R., Yuzawa S. et al. Full-length p40phox structure suggests a basis for regulation mechanism of its membrane binding. *EMBO J.* 2007; 26: 1176–86.
58. Ueyama T., Kusakabe T., Karasawa S. et al. Sequential binding of cytosolic phox complex to phagosomes through regulated adaptor proteins: evaluation using the novel monomeric Kusabira-Green system and live imaging of phagocytosis. *J. Immunol.* 2008; 181: 629–40.
59. Condliffe A.M., Davidson K., Anderson K.E. et al. Sequential activation of class IB and class IA PI3K is important for the primed respiratory burst of human but not murine neutrophils. *Blood*. 2005; 106: 1432–40.
60. Allen L.A., DeLeo F.R., Gallois A. et al. Transient association of