

С.К.Соодаева

АКТИВАЦИЯ НАДФН-ОКСИДАЗЫ ФАГОЦИТОВ ПЫЛЕВЫМИ ЧАСТИЦАМИ

НИИ пульмонологии МЗ РФ, Москва

ACTIVATION OF PHAGOCYTE NADPH-OXYDASE BY DUST PARTICIPLES

S.K.Sohodajeva

S u m m a r y

The effects of "Bazhenov" chrysotile-asbestos, quartz DQ₁₂ (international standart) and opsonized zimosan on the main enzyme system of "respiratory burst" — NADPH-oxydase — were analyzed in this study. It was found that all these stimulators evoke direct activation of NADPH-oxydase in peritoneal phagocytes and human blood leucocytes. In spite of some diminished enzyme activity under influence of dust particules compared with zimosan influence, asbestos promotes irreversible enzyme activation leading to axcessive generation of reactive oxygen species in the organism.

Р е з ю м е

Проведено исследование влияния Баженовского хризотил-асбеста, кварца DQ₁₂ (международный стандарт) и опсонизированного зимозана на основную ферментную систему "дыхательного взрыва" — НАДФН-оксидазу. Выявлено, что все использованные стимуляторы вызывают непосредственную активацию НАДФН-оксидазы как перитонеальных фагоцитов, так и лейкоцитов крови человека. Несмотря на то, что активность ферментной системы при воздействии пылевых частиц несколько ниже, чем под влиянием зимозана, асбест способствует необратимой активации, приводящей в конечном итоге к длительной и чрезмерной генерации активных форм кислорода (АФК) в организме.

В настоящее время установлено, что развитие патологических процессов под воздействием пыли на организм обусловлено избыточной генерацией АФК фагоцитами [2,7,8]. Предполагается, что механизмы, посредством которых пылевые частицы индуцируют выделение АФК клетками, могут быть связаны с непосредственной активацией основной ферментативной системы "дыхательного взрыва" — НАДФН-оксидазы [6]. Однако до сих пор какие-либо конкретные данные об этом отсутствуют.

Исходя из этого было проведено исследование влияния различных пылей и опсонизированного зимозана на активность НАДФН-оксидазы перитонеальных макрофагов крыс, а также лейкоцитов крови человека.

Изолированные фагоциты (3×10^6 клеток) активировали 1 мг опсонизированного зимозана, кварца DQ₁₂ или хризотил-асбеста в течение 14 минут при 37°C при мягком перемешивании. Затем останавливали реакцию холодным раствором Хенкса и выделяли мембранные препараты НАДФН-оксидазы путем дифференциального центрифугирования.

На рис. приведены результаты измерения активности ферментной системы в перитонеальных макрофагах. Самая высокая активность была зарегистрирована при стимуляции клеток опсонизированным зимозаном — $2,15 \pm 0,12$ нмоль O₂⁻ в мин на мг белка. Под действием

хризотил-асбеста и кварца DQ₁₂ она была несколько ниже и составляла 1,71 и 1,57 нмоль O₂⁻ в мин на мг белка соответственно.

Измеренная активность НАДФН-оксидазы лейкоцитов крови здорового донора, индуцированная используемыми стимуляторами, была выше, чем перитонеальных макрофагов, что связано с включением вспомогательных систем стимуляции глюкозомонофосфатного шунта гранулоцитов. В препаратах, выделенных после воздействия опсонизированного зимозана на гранулоциты, она равнялась $3,1 \pm 0,2$ нмоль O₂⁻ в мин на мг белка, 1,76 и 1,96 нмоль O₂⁻ в мин на мг белка после экспозиции с кварцем и асбестом соответственно.

В специальной серии экспериментов определяли влияние флавоноида рутина на активность НАДФН-оксидазы при стимуляции фагоцитов опсонизированным зимозаном. При этом клетки подвергали воздействию активатора в течение 7 мин при 37°C, затем добавляли 10^{-3} М рутина и продолжали совместную инкубацию еще 7 мин при мягком перемешивании. Полученные данные свидетельствуют (см. рис), что при воздействии флавоноида активность фермента ингибируется практически одинаково — на 76% в перитонеальных макрофагах и на 74% в лейкоцитах крови человека.

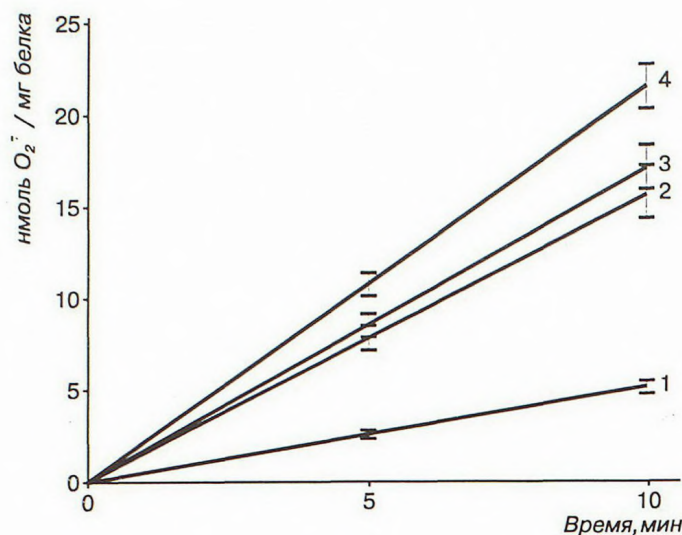


Рис. Изменение активности НАДФН-оксидазы перитонеальных макрофагов при воздействии различных пылей и опсонизированного зимозана.

1 — опсонизированный зимозан + рутин (10^{-3} М); 2 — DQ₁₂; 3 — хризотил-асбест; 4 — опсонизированный зимозан.

Таким образом, под воздействием использованных стимуляторов происходит непосредственная активация НАДФН-оксидазы как в перитонеальных макрофагах, так и лейкоцитах крови человека. Величина этой реакции сравнима для асбеста и кварца и несколько ниже вызванной опсонизированным зимозаном. Рутин в концентрации 10^{-3} М эффективно ингибирует активность ферментной системы.

Из исследованных стимуляторов наибольшей активирующей способностью в отношении НАДФН-оксидазы обладал опсонизированный зимозан, который связывается со специфическими рецепторными структурами на поверхности мембраны, что создает оптимальные условия для активации “дыхательного взрыва”. Взаимодействие хризотил-асбеста с клетками происходит за счет электростатического притяжения положительно заряженных волокон и анионных групп на мембране. Частицы кварца связываются путем образования множественных водородных связей. Соответственно в случае пылей взаимодействие менее специфично, что и отражается, по-видимому, в пониженной, в сравнении с зимозаном, активации ферментной системы. Тем не менее, воздействие пыли, в особенности асбеста, приводит к более серьезным нарушениям. Как правило, при фагоцитозе частиц активность НАДФН-оксидазы возрастает локально, то есть активируется оксидаза той части мембраны, которая инвагинируется и образует фагосому. Последняя отграничена от всего остального объема клетки местами слияния мембран с тем, чтобы избежать утечки активного кислорода и повысить его локальную концентрацию [9]. Органические объекты фагоцитоза подвергаются окислитель-

ной модификации АФК, что приводит к их фрагментации и увеличивает атакуемость гидролитическими ферментами [4]. Практически одновременно с удалением стимулятора НАДФН-оксидаза переходит в исходное неактивное состояние [5]. Однако, в отличие от опсонизированного зимозана, при воздействии пыли активация ферментной системы становится необратимым процессом, так как объект фагоцитоза не исчезает. Соответственно фагоцит продолжает продуцировать супероксидный радикал, способный участвовать в окислительно-восстановительных реакциях на поверхности пылевой частицы (особенно асбеста, обладающего развитой поверхностью с каталитически активными центрами), с образованием более агрессивных радикальных форм — гидроксильных и криптогидроксильных радикалов [3]. Причем нами установлено, что каталитические центры на поверхности волокон успешно конкурируют за донора восстановительных эквивалентов — НАДФН, способствующего усилению радикалообразования. При таком лавинообразном нарастании процесс переходит границы фагосомы и приводит к окислительной модификации структур самой клетки. Так как большая часть молекулярного кислорода расходуется не на дыхание, а на образование АФК, в клетке развивается состояние частичной гипоксии, при которой радикалообразование опосредовано взаимодействием ксантиноксидазы с продуктами распада АТФ — ксантином и гипоксантином. Гипоксия, а также непосредственное воздействие АФК приводят к повреждению митохондрий, которые становятся дополнительным источником супероксида [1]. В конечном итоге клетка не выдерживает “окислительного стресса”, погибает и разрушается. Продукты этого распада, будучи до того модифицированы АФК, являются стимуляторами НАДФН-оксидазы соседних клеток, волокна повторно фагоцитируются и процесс опять вступает в “порочный круг”.

ЛИТЕРАТУРА

1. Биленко М.В. Ишемические и реперфузионные повреждения органов. — М.: Медицина, 1989.
2. Величковский Б.Т. // Пульмонология. — 1995. — № 1. — С.6—16.
3. Соодаева С.К., Коркина Л.Г., Величковский Б.Т., Клегерис А.М. // Бюл. exper. биол. — 1991. — № 9. — С.252—254.
4. Archakov A.I., Bachamanova G.I. Cytochrome P-450 and Active Oxygen. — London, 1990.
5. Bellavite P. // Free Radical. Biol. Med. — 1988. — Vol.4. — P.225—261.
6. Kamp D.W., Graceffa Ph. et al. // Ibid. — 1992. — Vol.12. — P.293—315.
7. Mossman B.T., Bignon J., Corn M. et al. // Science. — 1990. — Vol.247. — P.294—301.
8. Rom W.N., Travis W.D., Brody A.K. // Am. Rev. Respir. Dis. — 1991. — Vol.143. — P.408—422.
9. Rossi F. // Biochim. Biophys. Acta. — 1986. — Vol.853. — P.65—69.

Поступила 11.07.96.