

В. А. КРАСНОВ, Н. К. ЗЕНКОВ, А. Р. КОЛПАКОВ, Е. Б. МЕНЬШИКОВА

**АКТИВИРОВАННЫЕ КИСЛОРОДНЫЕ МЕТАБОЛИТЫ ПРИ ТУБЕРКУЛЕЗЕ**НИИ туберкулеза МЗ и СР РФ, ГУ Научный центр клинической и экспериментальной медицины ГУ СО РАМН,  
Новосибирская государственная медицинская академия, Новосибирск

Кислород — один из самых распространенных (наряду с водородом, углеродом) химических элементов биосферы, его соединения входят в состав всех живых организмов. Около 90% потребляемого человеком молекулярного кислорода вовлекается в реакции окислительного фосфорилирования, вместе с тем во всех живых организмах постоянно протекают реакции с образованием активированных кислородных метаболитов (АКМ) —  $O_2^-$ ,  $^1O_2$ ,  $H_2O_2$ ,  $HO^{\cdot}$ ,  $OCl^{\cdot}$ ,  $RO_2^{\cdot}$ ,  $NO^{\cdot}$  - и др. Многие из этих соединений являются радикалами, т. е. имеют неспаренный электрон, поэтому их называют свободными радикалами. Связанные радикалы, такие как компоненты цепи транспорта электронов в митохондриях, также широко представлены в клетках, однако их локализация в определенных структурах ограничивает "свободное" взаимодействие с другими молекулами. Применительно к биологическим системам понятия "свободные радикалы" и "АКМ" не совпадают — неспаренный электрон может быть расположен на атомах углерода, серы, азота. С одной стороны, для живых организмов большое значение имеют тиольные радикалы глутатиона (GS) или радикалы мочевой кислоты с локализацией электрона на атомах S и N. С другой стороны, такие кислородсодержащие молекулы, как перекись водорода, синглетный кислород, гипогалоиды, не являются радикалами, хотя и взаимодействуют с органическими молекулами через радикальные механизмы. Чтобы объединить данные соединения в одну группу с радикалами, вводят понятие "активные формы кислорода", которым обозначают ферментативные продукты активации кислорода. По аналогии с активными формами кислорода иногда говорят об "активных метаболитах азота", подразумевая NO-радикал и продукты его преобразования ( $NO_2^{\cdot}$ ,  $ONO^{\cdot}$ ,  $ONOOH$  и др.).

Окислительные процессы с участием АКМ крайне важны для защиты от патогенных микроорганизмов, внутри- и межклеточной коммуникации и соответственно поддержания гомеостаза [3, 10, 56]. Однако сегодня роль данных процессов в установлении специфических взаимоотношений между макро- и микроорганизмами изучена недостаточно. Одним из интересных примеров таких взаимоотношений является внутриклеточная персистенция *Mycobacterium tuberculosis*, которая лежит в основе развития туберкулеза. Проблема персистенции патогенных микроорганизмов в последние годы приобретает особое значение в связи с появлением высоковирулентных и лекарственно-устойчивых штаммов бактерий. По данным американских и российских фтизиатров, у 10—14% больных наблюдается полирезистентность микобактерий туберкулеза (МБТ) к противотуберкулезным препаратам 1-й и 2-й групп [14]. В качестве одной из главных причин формирования лекарственной устойчивости сегодня называют неправильное и недостаточно законченное проведение лечебных мероприятий, в результате чего происходит отбор резистентных штаммов микобактерий [9]. По-видимому, проблема несколько сложнее и затрагивает процессы взаимодействия легочных макрофагов с МБТ, в том числе с участием АКМ, которые во многом определяют микробицидную функцию этих клеток [56, 75].

**Микробицидное действие АКМ *in vitro* и *in vivo***

Течение туберкулезной инфекции определяется в основном состоянием иммунитета — как врожденного, так и приобретенного. Первым и главным препятствием на пути проникновения и распространения в организме человека многих инфекционных микроорганизмов, в том числе и МБТ, становятся фагоциты: моноциты, макрофаги, гранулоциты [7, 16, 24]. Для борьбы с микробами фагоциты имеют в своем арсенале более 60 различных цитотоксических соединений: активированные метаболиты кислорода и азота, лизосомальные ферменты, катионные белки и т. д. [5, 15]. Создается впечатление, что перед столь вооруженной клеткой не устоит ни один микроб-паразит. На самом деле огромный цитотоксический потенциал фагоцита во многом является мифом, порожденным исследованиями *in vitro* на культурах клеток и микроорганизмов. В таких исследованиях проводится анализ цитотоксического эффекта соединений, добавляемых в увеличиваю-

щихся концентрациях в среду культивирования, при этом ясно, что любое, даже самое безобидное, соединение, начиная с какой-то концентрации, будет повреждать клетки. Хотя *in vitro* выявляется высокая цитотоксичность многих лизосомальных ферментов, данных об их деструктивном действии *in vivo*, как правило, нет; более того, часто даже не проводится анализ возможности их появления в токсических концентрациях в каких-либо физиологических или патологических ситуациях [5]. Поэтому, по мнению многих исследователей, микробицидное действие фагоцитирующих клеток на 40—90% обусловлено продукцией АКМ [3, 56]. Д. Н. Маянский и И. Г. Урсов в "Лекциях по клинической патологии" приводят цифру 90% [7], и на сегодняшний день нет оснований не согласиться с этой оценкой.

Гранулоциты и мононуклеарные фагоциты имеют 3 специализированные ферментативные системы наработки АКМ: НАДФН-оксидазу, индуцибельную NO-синтазу и пероксидазы (миелопероксидаза (МПО) в нейтрофилах и эозинофильная пероксидаза (ЭПО) в эозинофилах). В организме человека только для гранулоцитов характерно одновременное наличие двух эффективных ферментативных систем синтеза АКМ (НАДФН-оксидазы и МПО/ЭПО); моноциты имеют невысокое содержание МПО, от которой они избавляются в процессе трансформации в макрофаги [3,5]. Таким образом, если согласиться с приведенными выше оценками, то можно сделать вывод, что в отличие от гранулоцитов цитотоксическое действие макрофагов человека на 90% определяется продукцией всего лишь двух достаточно "безобидных" молекул —  $O_2^-$  и  $NO^*$ , которые могут трансформироваться в токсичные радикалы  $OH^*$  и  $NO_2^*$  (рис. 1). Такой парадоксальный вывод более чем оправдан в отношении *Mycobacterium tuberculosis*, если учесть тот факт, что фагоцитоз данных бактерий сопровождается включением механизмов, препятствующих слиянию фагосом с лизосомами [16, 51].

*Mycobacterium tuberculosis in vitro* характеризуются высокой устойчивостью к действию  $O_2$ ,  $H_2O_2$  и гипогалоидов. Некоторые штаммы микобактерий сохраняли более 90% своей жизнеспособности после 6 ч инкубирования в среде с 10 мМ  $H_2O_2$  [52]. Анализ устойчивости разных штаммов *M. tuberculosis* к  $O_2^-$ , и  $H_2O_2$  выявил большую устойчивость к  $H_2O_2$  у штаммов, проявляющих высокую вирулентность при инфицировании морских свинок, при этом чувствительность бактерий к  $H_2O_2$  не зависела от содержания в них каталазы [40]. Не удалось установить

взаимосвязь между вирулентностью штаммов *M. tuberculosis* и устойчивостью бактерий в системах  $H_2O_2$ -пероксидаза— $Br^- Cl^-$  [41]; цитотоксическое действие гранулоцитов в отношении микобактерий также не зависело от наличия МПО [42]. Микробицидность альвеолярных макрофагов морских свинок для разных штаммов *M. tuberculosis* и *M. bovis* не зависела от активности метаболического взрыва и продукции  $H_2O_2$ , хотя эффективность фагоцитоза бактерий разных штаммов обратно коррелировала с их вирулентностью [58]. Введение в культуральную среду экзогенных супероксиддисмутазы, каталазы и маннитола (ингибитор  $OH^*$ -радикалов) не влияло на цитотоксическое действие макрофагов в отношении *M. tuberculosis* [86], в аналогичных условиях каталаза усиливала развитие *Listeria monocytogenes* [59]. Функциональная активность альвеолярных макрофагов и продукция реактивных форм кислорода у больных с острым туберкулезом были снижены по сравнению с таковыми у здоровых людей [54]. Если учесть, что фагоцитоз МВТ проходит преимущественно через рецепторы для белков системы комплемента и не сопровождается значительной активацией НАДФН-оксидазы фа-

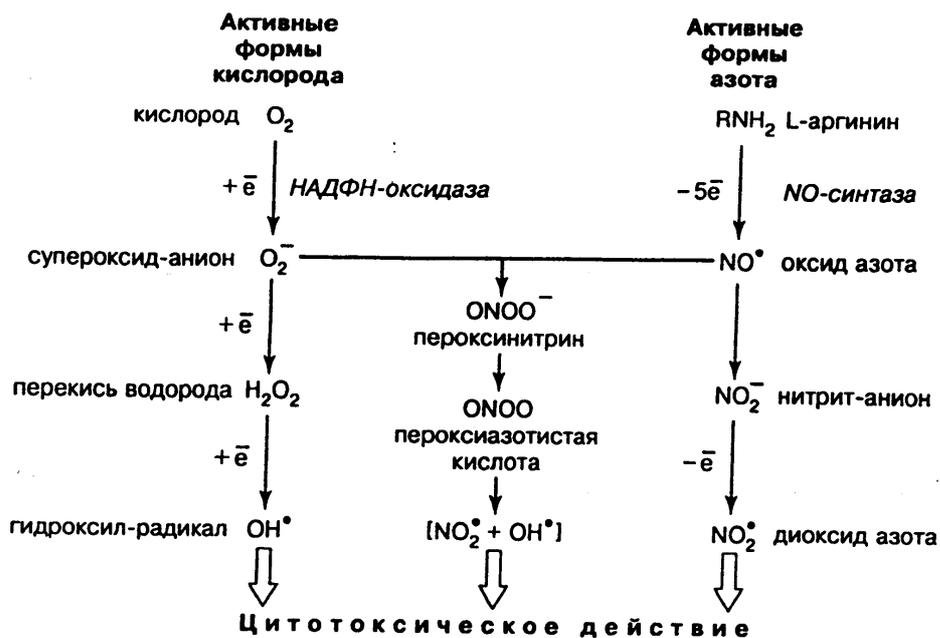


Рис. 1. Пути трансформации  $O_2^-$  и  $NO^*$  в цитотоксические радикалы [56].

гоцитов, то становится понятным мнение многих исследователей о незначительной роли активных форм кислорода ( $O_2^-$ ,  $H_2O_2$ ,  $HOCl$ ,  $HOBr$  и, возможно,  $OH^\cdot$ ) в цитотоксическом действии против *M. tuberculosis* [16, 42, 58, 59].

Исследования *in vitro* и *in vivo* показывают, что активные формы азота более эффективно угнетают жизнеспособность микобактерий, чем активные формы кислорода ( $O_2^-$ ,  $H_2O_2$ ) [23, 86]. Инкубация чувствительного лабораторного штамма H37Rv и дикого резистентного к изониазиду и рифампицину штамма *M. tuberculosis* в атмосфере с  $NO^\cdot$  (90 частей на  $10^6$  объемных частей) в течение 24 ч приводила к гибели 80% бактерий, в течение 48 ч — 100% [49], при этом эффект экзогенного  $NO^\cdot$  одинаково проявлялся в отношении как чувствительных, так и устойчивых к лекарствам микобактерий.

Как правило,  $NO$ -радикалы токсичны не сами по себе, а действуют через образование других более реакционных форм АКМ, таких как перокси-нитрит ( $ONOO^-$ ) или радикалы диоксида азота ( $NO_2^\cdot$ ) (см. рис. 1). Сравнительное исследование устойчивости 8 разных штаммов *M. tuberculosis*, а также *M. bovis* к действию нитрита ( $NO_2^-$ ) в кислой среде (pH 5,0) выявило взаимосвязь резистентности и вирулентности данных штаммов у морских свинок [60]. Анализ влияния  $NO^\cdot$ ,  $NO_2^\cdot$ , и  $ONOO^-$  на рост микобактерий показал, что в отличие от авирулентных БЦЖ и *M. smegmatis* вирулентные штаммы *M. tuberculosis* и *M. bovis* высокоустойчивы к активным метаболитам азота [85]. Такая специфичность взаимодействия *M. tuberculosis* с активными формами азота может дополняться индукцией определенных генов в микобактериях. В частности, химически разные доноры  $NO^\cdot$  индуцировали экспрессию 53 генов в *M. tuberculosis*, часть из которых, как предполагается, отвечает за внутриклеточное выживание бактерий, многие из этих генов индуцировались также в ответ на гипоксию [62]. При изучении действия активных форм азота на культуры микобактерий также отмечался бактериостатический эффект, который на начальном этапе культивирования (первый 21-й день) сопровождался снижением размножения и роста численности бактерий, хотя в последующем рост микобактерий усиливался [32]. Такое бактериостатическое действие может быть важно для выживания *M. tuberculosis* на стадии латентного развития инфекции.

Как правило,  $NO^\cdot$  нестабилен в физиологических средах, однако он может взаимодействовать с глутатионом (GSH) с образованием нитрозоглутатиона (GSNO), который значительно более устойчив. GSNO может транспортироваться из клетки в клетку, сохраняться в клетках и выступать в качестве донора  $NO$ -радикалов. Так как в клетках млекопитающих концентрации GSH могут достигать 10 мМ, то GSNO может служить одним из главных либераторов  $NO^\cdot$  в организме и вносить определенный вклад в цитотоксическое действие  $NO^\cdot$  в отношении внутриклеточных микроорганизмов, в том числе *M. tuberculosis* [86]. В концентрациях выше 1 мМ GSNO вызывал гибель *M. bovis* и мутантных по генам пептидных транспортеров штаммов бактерий [36]. В культурах мышиных макрофагов (клетки J774.1) и моноцитов человека, инфицированных БЦЖ, введение буптионинсульфоксимида — ингибитора  $\gamma$ -глутамилцистеинсинтетазы, ключевого фермента синтеза глутатиона, — повышало выживаемость бактерий, в то же время N-ацетил-цистеин (5 мМ) увеличивал внутриклеточное содержание глутатиона в макрофагах и усиливал их цитотоксическое действие [78].

К результатам экспериментальных работ по изучению прямого действия АКМ на бактерии необходимо относиться достаточно осторожно. Дело в том, что МБТ характеризуются медленной скоростью роста (время удвоения около 20 ч), а время жизни большинства реакционных форм АКМ в физиологических средах ограничено и составляет от  $10^{-9}$  с (СН-радикал) до 2—3 с (пероксинитрит) [3]. Поэтому приходится либо подробно с каким-то интервалом времени вводить короткоживущие АКМ в среду инкубирования [54], либо, как в случае с  $NO^\cdot$ , создавать определенную концентрацию этого радикала в атмосфере культивирования [49]. В исследованиях часто применяются химические доноры  $NO^\cdot$  или  $O_2^-$ , но не учитывается тот факт, что образование одного радикала требует появления другого радикала (закон сохранения спина в электромагнитных взаимодействиях). Поэтому в зависимости от условий один и тот же донор может выступать источником совершенно разных форм АКМ. В частности, при разложении 3-морфолино-зидномина, который широко применяется в биологических исследованиях в качестве химического донора  $NO^\cdot$ , в равных пропорциях обра-

зуются  $\text{NO}^\cdot$  и  $\text{O}_2^\cdot$ , большая часть которых в нормальных условиях взаимодействует между собой с образованием  $\text{ONOO}^-$ , однако при наличии в среде супероксиддисмутазы  $\text{NO}^\cdot$  превалирует [15].

Гипогалоиды и органические гидроперекиси достаточно стабильны, однако биологическое действие  $\text{H}_2\text{O}_2$  и других перекисей прямо зависит от наличия в среде и клетках ионов металлов переменной валентности как в свободном виде, так и в составе металлопротеинов. МБТ являются облигатными аэробами и содержат гемовые цитохромы а, б, с, осуществляющие перенос водорода от окисляемого субстрата на  $\text{O}_2$ . Атомы железа, входящие в состав гема, окисляясь и восстанавливаясь ( $\text{Fe}^{2+} \leftrightarrow \text{Fe}^{3+}$ ), осуществляют передачу электронов, однако они также могут участвовать в разложении перекисей ( $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{OH}^\cdot + \text{OH}^- + \text{Fe}^{3+}$ ) с образованием реакционных  $\text{OH}^\cdot$ -радикалов [3]. Необходимо также учитывать тот факт, что при введении в среду экзогенных соединений, в том числе и перекисей, на клеточных мембранах возникают высокие концентрационные градиенты. Можно привести пример, известный из работ по изучению влияния перекисей на метаболические процессы в клетках: при культивировании клеток млекопитающих в среде, содержащей  $\text{H}_2\text{O}_2$  в близких к физиологическим концентрациях, уровень перекиси водорода в них на порядок ниже, чем в среде культивирования [15].

Получение методами генной инженерии трансгенных экспериментальных животных, несущих мутации в генах НАДФН-оксидазы или индуцибельной  $\text{NO}$ -синтазы, позволило создавать новые модели для изучения вклада данных ферментативных систем в защиту организма от патогенных микроорганизмов. Эксперименты, выполненные на нокаутированных по НАДФН-оксидазе и индуцибельной  $\text{NO}$ -синтазе мышах, выявили у таких животных повышенную распространенность очагов поражения и смертность при инфицировании *M. tuberculosis* [18, 50]. У мышей с "выключенной"  $\text{gp91}^{\text{phox}}$ -субъединицей НАДФН-оксидазы внутривенное введение *M. tuberculosis* вызывало быстрое размножение бактерий в легких, в то время как в селезенке и печени развитие инфекции было аналогичным таковому у животных контрольной линии B6 [18]. При воздушно-капельном инфицировании *M. tuberculosis* (штамм Erdman) с помощью аэрозольного генератора у мышей, нокаутированных по субъединице  $\text{p47}^{\text{phox}}$  НАДФН-оксидазы, в период с 14-го по 30-й день наблюдалось более высокое (приблизительно в 10 раз) содержание бактерий в легких по сравнению с контрольной группой животных с активной НАДФН-оксидазой, на 40-й день после инфицирования различия нивелировались [27]. Внутривенное инфицирование *M. tuberculosis* (штамм Erdman) "нокаутов" по индуцибельной  $\text{NO}$ -синтазе приводило к быстрому развитию инфекции в селезенке, в печени и легких, продолжительность жизни животных снижалась со 160 дней у дикого типа до 38 дней у "нокаутов"; снижение продукции  $\text{NO}^\cdot$  на 30—40% у гетерозиготных по  $\text{NO}$ -синтазе мышей не сказывалось на развитии инфекционных гранулем и выживании животных [50]. Несмотря на кажущуюся простоту интерпретации результатов, эксперименты на нокаутированных животных не позволяют получить однозначных данных о вкладе той или иной ферментативной системы генерации АКМ в защиту организма от бактериальных инфекций. Это связано с тем, что  $\text{O}_2^\cdot$  и  $\text{NO}^\cdot$  не только выполняют антибиотические функции, но и являются важными внутри- и внеклеточными регуляторами, они контролируют синтез цитокинов, клеточную пролиферацию и апоптоз, а соответственно в значительной степени определяют развитие воспалительного процесса [1,3]. Так, после инфицирования *M. tuberculosis* у нокаутированных как по  $\text{NO}$ -синтазе, так и по НАДФН-оксидазе животных выявляется более высокий уровень интерферона у в сыворотке и лимфатических узлах [27, 50]. Повышенный уровень синтеза интерферона у является одной из причин более высокой скорости клиренса *M. avium* мышей с "выключенной"  $\text{NO}$ -синтазой [35].

В исследованиях цитотоксического действия активных форм азота, выполненных на клетках животных и человека, наблюдаются значительные различия. Дело в том, что в отличие от фагоцитов мышей и крыс гранулоциты и моноциты крови человека характеризуются низким уровнем продукции  $\text{NO}^\cdot$  [3, 72], в то же время в макрофагах человека, в том числе альвеолярных из воспалительных очагов, наблюдается достаточно высокая индукция экспрессии  $\text{NO}$ -синтазы и оксидов азота в ответ на цитокины и бактериальные липополисахариды [81]. Анализ продукции  $\text{NO}_2^-$  в культурах альвеолярных макрофагов, полученных от 17 здоровых людей, при инфицировании *M. tuberculosis* выявил высокую гетерогенность экспрессии  $\text{NO}$ -синтазы и генерации нитрита [69]: на 7-й день эксперимента концентрация  $\text{NO}_2^-$  в культуральной среде макрофагов от 7 доноров составляла  $4 \pm 0,2$  мкМ, тогда как в культурах клеток 4 доноров она достигала значения  $502 \pm 167$  мкМ. Внутри-

клеточный рост микобактерий в культурах альвеолярных макрофагов с низкой продукцией  $\text{NO}^-$  был достоверно выше по сравнению с клетками, продуцирующими средние и высокие концентрации нитрита. Анализ экспрессии индуцибельной  $\text{NO}$ -синтазы в клетках альвеолярного лаважа у 11 больных туберкулезом показал, что в среднем 65% клеток взаимодействовали со специфическими антителами к индуцибельной  $\text{NO}$ -синтазе, в то время как в лаваже 5 здоровых людей было только 10% позитивных клеток [57]. У больных с остро прогрессирующей формой туберкулеза легких показано 2,5-кратное увеличение содержания  $\text{NO}^-$  в выдыхаемом воздухе, при этом наблюдалась прямая корреляция между наличием газообразного  $\text{NO}^-$  и экспрессией индуцибельной  $\text{NO}$ -синтазы в альвеолярных макрофагах, а также спонтанной продукцией  $\text{NO}_2^-$  выделенными клетками [79].

Анализ заболеваемости туберкулезом у жителей Гонконга с верифицированным диагнозом хронического гранулематоза, при котором фагоцитирующие клетки не способны продуцировать  $\text{O}_2^-$ , показал, что в популяции таких людей заболеваемость в десятки раз выше, чем в среднем по региону [47]. В литературе также имеются эпидемиологические данные, косвенно указывающие на важность противотуберкулезного действия активных форм азота и кислорода у людей. Так, в 1991—1994 гг. в Нью-Йорке было отмечено увеличение числа больных туберкулезом; полученные от этих людей микобактерии (штамм СВ3.3) *in vitro* обладали высокой устойчивостью к действию активных форм азота [34]. В сельскохозяйственном районе США на границе штатов Кентукки и Теннесси в 1994—1996 гг. была зарегистрирована вспышка весьма агрессивной формы туберкулеза. Выявленный возбудитель — штамм *M. tuberculosis* CDC1551 — при культивировании *in vitro* в течение 3 нед был более устойчив к действию  $\text{H}_2\text{O}_2$  (2,5 мМ) и нитрита натрия (3,6 мМ), чем ряд других штаммов *M. tuberculosis* (H37Rv, H37Ra, Erdman, RJ2E, C.C.13, C. .22), а также *M. bovis* Ravenel и *M. bovis* BCU [31].

Имеющиеся на сегодняшний день данные о цитотоксическом действии АКМ на MBT как *in vitro*, так и *in vivo* очень противоречивы. Поэтому трудно говорить о каких-то конкретных механизмах цитотоксичности. Все классы биомолекул (белки, липиды, нуклеиновые кислоты) могут повреждаться под действием реакционных форм АКМ [3], в то же время в каждом конкретном случае выявляется свой критический элемент повреждения. Возможно, что в отношении *M. tuberculosis*, так же как и других внутриклеточных бактерий, цитотоксический эффект  $\text{NO}^-$  связан с нитрозилированием железосерных групп в активных центрах жизненно важных ферментов, включая Fe-СОД. Однако в настоящее время данный вопрос остается абсолютно не исследованным.

### **Защита микобактерий от токсического действия АКМ**

В процессе эволюции с увеличением содержания в окружающей среде молекулярного кислорода, и как следствие АКМ, в аэробных организмах развиваются и совершенствуются системы антиоксидантной защиты, особое место среди которых принадлежит ферментативным антиоксидантам, к которым относятся супероксидредуктаза (СОР), восстанавливающая  $\text{O}_2^-$  в перекись водорода, СОД, катализирующая реакцию дисмутации  $\text{O}_2^-$  с образованием перекиси водорода и молекулярного кислорода ( $2\text{O}_2^- + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$ ), каталаза, восстанавливающая  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$ ), глутатионзависимые пероксидазы и трансферазы, удаляющие органические перекиси. Как правило, ферментативные антиоксиданты, специализированы в отношении определенных форм АКМ; экзотермичность реакций, катализируемых СОД, каталазой, некоторыми редуктазами, делает работу ферментов автономной, не зависящей от функционирования других клеточных структур. При этом такие реакции не сопровождаются расходом антиоксидантов, в результате чего одна молекула СОД или каталазы может инактивировать несколько тысяч молекул  $\text{O}_2^-$  или  $\text{H}_2\text{O}_2$  [3]. Важность защитного действия ферментативных антиоксидантов для аэробных организмов подчеркивается фактом токсического действия молекулярного кислорода на облигатные анаэробы, у которых выявляется отсутствие отдельных антиоксидантных ферментов.

Уровень внутриклеточных ферментативных антиоксидантов находится под генетическим контролем. Принцип данной регуляции наиболее хорошо изучен у бактерий *E. coli*, для которых показано, что повышение

внутриклеточной концентрации  $O_2^-$  или  $H_2O_2$  сопровождается активацией транскрипции генов *soxR-soxS*- или *oxyR-oxyS*-областей ДНК соответственно, которые контролируются факторами реляции *SoxR*, *SoxS* и *OxyR* [3, 86].

МБТ синтезируют две изоформы СОД: Fe-СОД (белок массой 23 кДа, кодируется геном *sodA*) и Си, Zn-СОД (ген *sodC*), которые служат для защиты от токсического действия фагоцитов [65]. Выделяемая из *M. tuberculosis* активная Fe-СОД является тетрамером, анализ аминокислотной последовательности ее субъединиц показал высокое сходство с Мп-СОД из других микроорганизмов; однако в активный центр фермента входили ионы железа [87]. В культурах МБТ значительная часть Fe-СОД выявляется вне клеток в среде культивирования [19]. Си, Zn-СОД *M. tuberculosis* — мономерный пептид, содержащий 240 аминокислотных остатков, и только на 25% сходный с супероксиддисмутазами, кодируемыми геном *sodC*, из других видов бактерий [84]. Электронная микроскопия препаратов *M. tuberculosis* после обработки антителами к Си, Zn-СОД, связанными с атомами золота, показывает, что основная часть фермента локализована на периферии бактериальных клеток [84].

На разных этапах своего роста *M. tuberculosis* выделяют во внешнюю среду целый ряд белков (идентифицируется более 30 белков с молекулярной массой от 5 до 200 кД [19]), которые необходимы для их роста и защиты. Многие из данных белков являются ферментами (глутаминсинтетаза, супероксиддисмутаза, фосфолипаза С и др.) и служат для защиты от токсического действия фагоцитов [68]. В частности, глутаминсинтетаза необходима для синтеза L-глутамат/глутамин-полипептидов, входящих в состав оболочки бактерий, фермент также отвечает за синтез аммиака ( $NH_3$ ), который предотвращает закисление среды в фагосоме и ингибирует слияние фагосом с лизосомами. На стадии экспоненциального роста Fe-СОД и Си, Zn-СОД в значительных количествах выявляются в культуральной среде и на поверхности *M. tuberculosis*. Так, после 16-дневной инкубации бактерий штамма *M. tuberculosis* H37Rv активность СОД в культуральной среде составляла 1580 ЕД, в то время как в клетках — только 282 ЕД, или всего лишь 15% от общей активности [68]. Причины и механизмы внеклеточного экспорта СОД на сегодняшний день неясны. Посредством внедрения в *M. tuberculosis* генов СОД из других видов бактерий было показано, что Fe-СОД (*M. smegmatis*) и Мп-СОД (*E. coli*), несмотря на их значительное структурное различие, в аналогичной для Fe-СОД *M. tuberculosis* пропорции выявляются во внутри- и внеклеточной среде [77]. Проведенный исследователями анализ показал, что ни один из известных для бактерий механизмов активного транспорта белков через мембраны не подходит для описания внеклеточного экспорта СОД МБТ, из чего было сделано предположение, что внеклеточная СОД появляется в результате аутолиза микобактерий. Значительные различия в количественных оценках содержания внеклеточной СОД (20% [77], 76% [37], 92% [68]) объясняются разной устойчивостью фермента в культуральных средах.

На сегодняшний день роль отдельных изоформ СОД в защите МБТ в достаточной степени не выяснена. Методами генной инженерии были получены мутантные по гену *sodC* штаммы *M. tuberculosis* H37Rv и *M. bovis* BCG; при культивировании *in vitro* устойчивость мутантных штаммов к действию экзогенных  $O_2^-$  и  $H_2O_2$  была выше, чем исходных штаммов, однако выживаемость в культурах мышинных макрофагов из костного мозга и вирулентность на модели морских свинок мутантных и исходных штаммов были одинаковыми [30].

Одним из токсичных элементов фагоцитирующих клеток, и не только фагоцитов, является пероксинитрит. Естественно, возникает вопрос: существуют ли специфичные механизмы защиты от данной формы активного азота у прокариот? Было показано, что пероксидазы, кодируемые геном *catG*, а также пероксиредоксиналкилгидропероксидредуктазы С (ген *ahpC*) *in vitro* проявляют пероксинитритазную и пероксинитритредуктазную активности [21, 82]. Экспрессия генов *catG* и *ahpC* в определенной степени коррелировала со скоростью размножения разных штаммов микобактерий, их способностью размножаться в моноцитах человека, а также вирулентностью на моделях внутривенного введения мышам и морским свинкам [48, 52]. Сравнительное исследование устойчивости к пероксинитриту диких штаммов *M. tuberculosis* H37Rv и *M. smegmatis* mc2 155, а также мутантных по гену *ahpC* штаммов выявило прямую взаимосвязь между экспрессией *ahpC* и устойчивостью к  $ONOO^-$ , в условиях воздействия  $NO$  (образовывался при разложении DETA-ноноата)

достоверных различий в выживаемости данных штаммов не наблюдалось [54]. В макрофагальных клетках линии J774A после 7 дней инкубирования выживаемость штаммов, экспрессирующих ген *ahpC*, также была выше. У большинства микобактерий ген *ahpC*, кодирующий семейство алкилгидропероксидредуктаз, связан с геном *oxyR*, формируя единую систему ответа на окислительный стресс, возможно, через *oxyR*-регулон [20].

Интерес исследователей к регуляции транскрипции *oxyR* у *M. tuberculosis* связан с проблемой развития лекарственной устойчивости к изониазиду. Действительно, попадая в бактерии, изониазид (пролекарственная форма) должен пройти стадию окисления с участием молекулярного кислорода, эта реакция катализируется пероксидазами [22](рис.2).

В активном окисленном состоянии изониазид ингибирует активность ферментов (енол-кислая фосфатредуктаза), отвечающих за синтез главного компонента клеточной стенки бактерий — миколовой кислоты. Кроме того, недавно показано, что окисление изониазида сопровождается образованием NO-радикалов, которые могут также участвовать в микробицидном действии [75]. Мутации гена *catG*, приводящие к снижению каталазной активности, повышают устойчивость микобактерий к изониазиду [14].

Поэтому каталаза-пероксидаза играет двойственную роль в развитии туберкулеза: с одной стороны, она защищает микобактерий от токсического действия  $H_2O_2$ , гидроперекиси и пероксинитрита, с другой — активность фермента прямо связана с чувствительностью к изониазиду [71, 83]. Действительно, мутации в гене *catG* повышали устойчивость микобактерий к изониазиду [38], а у 50% изониазидрезистентных клинических изолятов *M. tuberculosis* выявлялась точечная мутация S315T в гене *catG* [83]. У микобактерий (*M. tuberculosis*, *M. smegmatis*, *M. marinum*, *M. leprae*) ген *catG* связан с геном *furA*, при этом оба гена содержат свои промоторы. Анализ экспрессии *catG* под действием  $H_2O_2$  и гидроперекиси кумола в культуре *M. tuberculosis* H37Rv показал, что как первый, так и второй промоторы запускают синтез каталазы-пероксидазы; вместе с тем попавшие в макрофаги (клетки J774A) микобактерий на начальном этапе (2 ч) экспрессируют гены *furA* и *catG* через промотор *furA*, а на более поздних стадиях (3 и 7 сут) начинают работать оба промотора [53].

Алкилгидропероксидредуктаза С относится к классу пероксиредоксинов с дисульфидредуктазной активностью, которые восстанавливают  $H_2O_2$  до  $H_2O$  и алкильные пероксиды до соответствующих спиртов. Образующиеся в реакции внутримолекулярные дисульфидные связи требуют своего восстановления, поэтому, как правило, тиоредоксины работают в комплексе с флавиновыми партнерами, такими как алкилгидропероксидаза F (*AhpF*), тиоредоксинредуктаза, глутатионредуктаза, НАДН-оксидаза:

В отличие от каталазы-пероксидазы, алкилгидропероксидредуктаза не активирует изониазид, более того, в устойчивых к этому препарату штаммах бактерий ее экспрессия повышена [71], по-видимому, компенсируя недостаточную активность каталазы-пероксидазы. В активном центре алкилгидропероксидредуктазы из *M. tuberculosis* содержатся 2 основных цистеиновых остатка (Cys-174, Cys-176) и 1 дополнительный (Cys-61), что существенно отличает ее от ферментов из других видов бактерий (*S. typhimurium*, *E. coli*), имеющих только по 2 цистеиновых остатка [39]. Посредством проведения ряда направленных мутаций были синтезированы аналоги алкилгидропероксидредуктазы С, в которых цистеиновые остатки поочередно или парами были заменены на аланин [25]. Исследование ферментативной активности таких аналогов в разных системах окисления позволило предложить схему работы микобактериальной алкилгидропероксидредуктазы С, представленную на рис. 3.

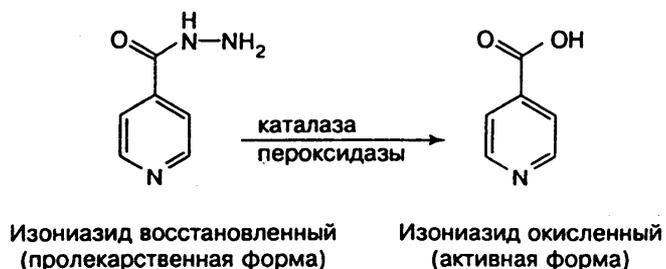
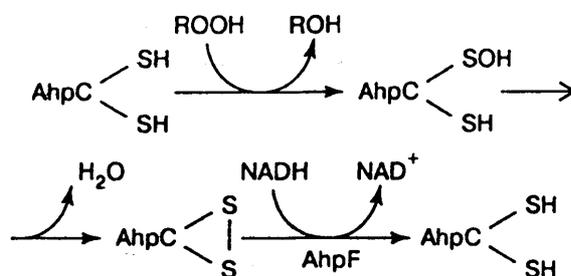


Рис. 2. Образование терапевтически активной формы изониазида [22].



Таким образом, МВТ имеют достаточно уникальную систему ферментативной антиоксидантной защиты. Следует также добавить особенности строения клеточных мембран *M. tuberculosis*, содержащих большое число SH-групп, что делает их устойчивыми к процессам перекисного окисления липидов [16], поэтому преодолеть столь изощренную систему защиты с помощью АКМ макрофагам часто не удается.

### Апоптоз и туберкулезное воспаление

С позиций сегодняшних знаний принято различать две формы клеточной гибели: апоптоз и некроз. Апоптоз (от греческого "apoptosis" — опадание лепестков цветка или листьев деревьев) представляет собой запрограммированную форму клеточной гибели в отличие от некроза [13]. Посредством апоптоза в многоклеточных организмах происходит удаление определенных клонов дифференцирующихся клеток или "излишков" биологического материала, что определяет его важную физиологическую роль. Морфологически апоптоз характеризуется сморщиванием клетки, вакуолизацией цитоплазмы, агрегацией хроматина и заканчивается распадом клетки на отдельные апоптотические тельца, содержащие остатки ядер и интактные органеллы. Некроз же проявляется набуханием клеток и клеточных органелл, разрушением цитоплазматических мембран и выходом компонентов цитоплазмы в среду. Апоптотические тельца быстро фагоцитируются и поглощаются соседними клетками, при этом в отличие от некроза апоптоз не сопровождается развитием воспаления и не вызывает повреждения соседних клеток и тканей организма [2]. Таким образом, наличие или отсутствие воспалительного процесса у животных может служить признаком гибели клеток посредством апоптоза или некроза [6].

Важность апоптоза для формирования и сохранения структуры многоклеточного организма не вызывает сомнений, однако он играет существенную роль и в защите от бактериальных и вирусных инфекций: инфицированные клетки, совершая самоубийство, уменьшают общую популяцию патогенных микроорганизмов. При этом необходимо отметить, что апоптоз - достаточно быстрый процесс, весь цикл изменений клетка может пройти всего за 30 мин. Впервые важность запрограммированной гибели клеток для защиты от микобактерий была показана в 1994 г. на культурах моноцитов/макрофагов, инфицированных БЦЖ (1 бактерия на клетку), усиление апоптоза добавлением АТФ снижало количество жизнеспособных бактерий в культуре, усиление некроза не давало такого эффекта [55]. Последующие исследования способствовали возникновению общепринятой на сегодняшний день точки зрения: апоптоз инфицированных микобактериями макрофагов приводит к гибели внутриклеточных бактерий, в то время как в результате некроза в среду выбрасываются живые бактерии, способные заражать окружающие клетки, что приводит к диссеминации инфекции [21, 33, 45]. Снижение или усиление некроза инфицированных *M. tuberculosis* H37Ra (5 бактерий на клетку) макрофагов человека (семидневная культура моноцитов) приводило к соответствующему уменьшению или увеличению количества живых бактерий в оставшихся (около 50%) клетках [28]. Активация апоптоза макрофагов в результате действия рекомбинантного Fas-лиганда или фактора некроза опухоли  $\alpha$  (ФНО $\alpha$ ) снижала количество персистирующих в культуре бактерий *M. tuberculosis* штаммов H37Ra и H37Rv [61]. Цитотоксический эффект апоптоза на микобактерий достаточно специфичен. Так, некроз инфицированных макрофагов под действием активированных компонентов комплемента или Т-лимфоцитов (типы CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>) не только не сопровождался гибелью персистировавших в них бактерий, но и приводил к диссеминации последних [61, 74].

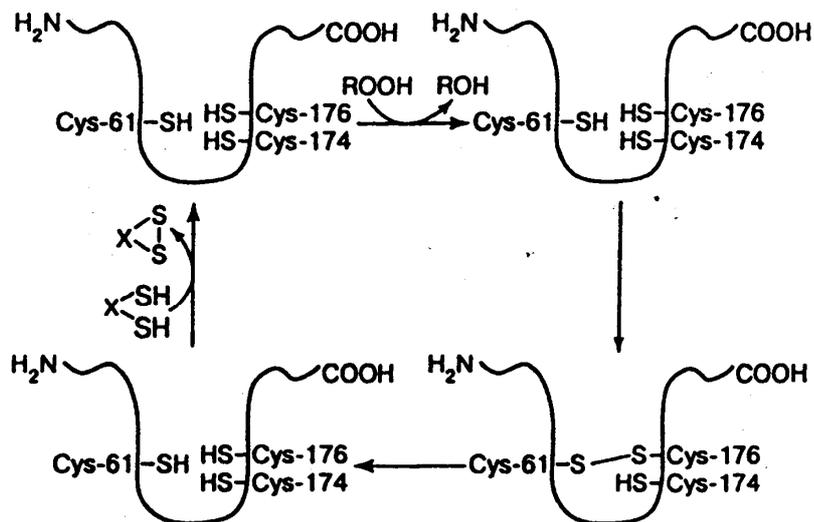


Рис. 3. Схема работы микобактериальной алкилгидропероксидредуктазы [25].

Основная часть исследований взаимодействия микобактерий с клетками выполнена на макрофагах, полученных культивированием в течение 4—8 дней моноцитов крови. Вместе с тем особого внимания заслуживают альвеолярные макрофаги, которые являются главным убежищем для сокрытия и развития *M. tuberculosis*, поэтому естественно, что их функциональное состояние и жизнеспособность влияют на развитие туберкулеза [45]. Апоптоз альвеолярных макрофагов прерывает внутриклеточный рост микобактерий, а также предотвращает распространение инфекции в результате заточения и разрушения патогена в апоптотических тельцах [33]. Исследование действия микобактерий в культуре альвеолярных макрофагов от здоровых людей показало, что слабовирулентные штаммы (*M. tuberculosis* H37Ra, *M. bovis* BCG, *M. kansasii*) индуцировали апоптоз, в то время как вирулентные штаммы (*M. tuberculosis* H37Rv, Erdman, выделенные из клинического материала *M. tuberculosis* BMC96Д и *M. bovis*) не влияли на жизнеспособность клеток или незначительно снижали ее [33, 44]. Сравнение мышинных макрофагов разных линий показало, что устойчивые к действию микобактерий (*M. tuberculosis*) клетки более склонны к апоптозу [70]. Апоптоз макрофагов и внутриклеточный рост бактерий подавлялись при добавлении в среду ингибитора NO-синтазы аминогуанидина [70]. Содержание апоптотических клеток в бронхо-альвеолярном лаваже больных активным туберкулезом было в 3 раза выше, чем в лаважной жидкости здоровых людей [66]. Морфологические изменения в клетках, сопровождающие апоптоз, выявляются также на гистологических срезах туберкулезных гранул [45].

В развитии апоптоза и микробицидном действии фагоцитирующих клеток важную роль играют цитокины. В ответ на инфицирование *M. tuberculosis* альвеолярные макрофаги продуцируют ФНО $\alpha$ , ространсформирующий фактор  $\beta$ , интерлейкины (ИЛ) ИЛ-1, ИЛ-6, ИЛ-10 и ряд других цитокинов. Провоспалительные ФНО $\alpha$ , ИЛ-10 и синтезируемый Т-лимфоцитами интерферон  $\gamma$  индуцируют экспрессию индуцибельной NO-синтазы и усиливают продукцию NO [3, 46]. Существует обратная взаимосвязь: NO-радикалы в альвеолярных макрофагах повышают экспрессию синтеза ИЛ-1 $\beta$  и ФНО $\alpha$ , возможно, через активацию фактора транскрипции NF- $\kappa$ B [80]. У больных туберкулезом по сравнению со здоровыми людьми значительно увеличено содержание провоспалительных цитокинов: в бронхоальвеолярной жидкости — ФНО $\alpha$  (в 33 раза), ИЛ-1 $\beta$  (в 18 раз), ИЛ-6 (в 11 раз); в сыворотке — ФНО $\alpha$  (в 26 раз), ИЛ-6 (в 7 раз) [76]. Подъем содержания в сыворотке ФНО $\alpha$  и ИЛ-6 при туберкулезе был неспецифичным и наблюдался при других хронических бактериальных инфекциях, в то время как увеличение уровня интерферона  $\gamma$  было более специфичным [67]. Экзогенный ФНО $\alpha$  в концентрации 100 ЕД/мл не влиял на жизнеспособность альвеолярных макрофагов в культуре, но усиливал апоптоз инфицированных *M. tuberculosis* H37Ra и *M. tuberculosis* H37Rv [43]. При низких соотношениях бактерии/фагоцит микобактерий индуцировали синтез ФНО $\alpha$ , который ингибировал апоптоз моноцитов человека [29], в то время как высокие концентрации бактерий усиливали апоптоз [66]. Ингибиторы каспаз 3 и 4 не влияли на апоптоз моноцитов/макрофагов, индуцированный большими дозами (20 бактерий на клетку) *M. tuberculosis* H37Rv, в то же время ингибирование каспазы-1 уменьшало как продукцию ИЛ-1 $\beta$  и ФНО $\alpha$ , так и число погибших при апоптозе клеток [26].

Поскольку в настоящее время АКМ рассматриваются в качестве одного из главных внутриклеточных регуляторов пролиферации и апоптоза [1], это означает, что либо вирулентные микобактерий имеют эффективные механизмы ингибирования АКМ, либо они влияют на ключевые процессы развития апоптоза.

В альвеолярных макрофагах митохондрии являются главными внутриклеточными источниками АКМ и участвуют в индукции апоптоза [13]. Анализ влияния вирулентных *M. tuberculosis* H37Rv и слабовирулентных *M. tuberculosis* H37Ra на функциональное состояние и морфологию митохондрий мышинных макрофагов показал, что в первые 24 ч после инфицирования в клетках повышался уровень АТФ, снижался трансмембранный потенциал митохондрий, одновременно на электронных фотографиях наблюдалось набухание митохондрий, уменьшение содержания в них крист и плотности матрикса [17]. Одновременно с этими изменениями под действием вирулентных *M. tuberculosis* H37Rv отмечался выход из митохондрий цитохрома с. Белки семейства Bcl-2 защищают митохондрии от токсического действия АКМ и регулируют открытие мембранных пор. Инфицирование промоноцитарных клеток человека линии THP-1 и моноцитов человека *M. tuberculosis* H37Rv повышало синтез белка Mcl-1 из семейства Bcl-2., при этом максимальные значения (около 500%) достигались при соотношениях бактерия/клетка от 0,4 до 4,0 и времени инкубации 24 ч [73]. Инфицирование кле-

ток слабовирулентным штаммом бактерий *M. tuberculosis* H37Ra, убитыми нагреванием бактериями *M. tuberculosis* H37Rv или частицами латекса не сопровождалось увеличением экспрессии гена *mcl-1* и синтеза белка *Mcl-1*. Ингибирование антисенсом транскрипции мРНК белка *Mcl-1* значительно усиливало апоптоз клеток в ответ на инфицирование *M. tuberculosis* H37Rv и снижало внутриклеточное размножение микобактерий.

Нейтрофилы играют важную роль в развитии острой туберкулезной инфекции, они первыми мигрируют в очаг инфекции, фагоцитируют и убивают микобактерий, синтезируют цитокины и хемокины, привлекающие и активирующие другие клетки иммунной системы. В отличие от макрофагов спонтанный апоптоз нейтрофилов человека в равной степени усиливался как вирулентными (штамм H37Rv), так и ослабленными (штамм H37Ra) *M. tuberculosis* [64]. Индуцированный микобактериями апоптоз нейтрофилов сопровождался активацией каспазы-3 и увеличением соотношения про- и антиапоптогенных белков семейства Bcl-2 (*Bax/Bcl-x<sub>1</sub>*), ингибирование дифенилениодонием НАДФН-оксидазы и введение в среду низкомолекулярных антиоксидантов (глутатион, N-ацетилцистеин) подавляло апоптоз. Интересной особенностью индуцированного *M. tuberculosis* апоптоза нейтрофилов являлось то, что фагоцитоз макрофагами апоптотических телец значительно повышал продукцию ФНО $\alpha$ , чего не наблюдалось при поглощении телец после УФ-индуцированного апоптоза [64]. В нейтрофилах больных активным туберкулезом легких по сравнению с группой здоровых лиц в 2 раза была снижена активность глутатионпероксидазы и на 45% — глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназы, в то же время активности глутатионредуктазы и супероксиддисмутазы изменялись незначительно [8]. Падение активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы может служить причиной изменения спонтанной и стимулированной продукции АКМ. Так, спонтанная хемилюминесценция с люминолом нейтрофилов в группе больных туберкулезом составляла  $31,5 \pm 5,6$  мВ, в то время как в группе здоровых людей —  $79 \pm 11,3$  мВ, стимулированная зимозаном хемилюминесценция у больных была снижена на 40% [9].

#### Заключение

Расшифровка генома *M. tuberculosis*, завершенная в 1998 г., выявила ряд его уникальных особенностей. Так, у клинических изолятов обнаружено большое количество мутаций, способных блокировать активность кодируемых белков и переводить метаболические процессы на альтернативные пути, что может служить одной из причин появления лекарственной устойчивости [10]. В то же время выявлено многократное дублирование генов, отвечающих за функционирование ключевых ферментных систем, таких как ацил-СоА-синтаза и ацил-СоА-дегидрогеназа. Эти успехи, несомненно, открывают новые перспективы в разработке методов генной терапии.

При рассмотрении роли АКМ в патогенезе туберкулеза явно видно некоторое упрощение проблемы: все процессы с участием АКМ рассматриваются преимущественно с позиции их цитотоксического действия. На самом деле АКМ и окислительные процессы с их участием являются важнейшими элементами внутри- и внеклеточной коммуникации. Действие многих цитокинов реализуется посредством активации или ингибирования внутриклеточной продукции АКМ [3], поэтому положительные эффекты применения рекомбинантных цитокинов в терапии туберкулеза могут быть прямо связаны с усилением микробицидного действия АКМ [12]. На наш взгляд, сегодня необходимо провести критический анализ данных литературы на предмет адекватности выбранных моделей исследования с учетом регуляторной роли АКМ. Возможности применения антиоксидантов в комплексной терапии туберкулеза также необходимо рассмотреть с позиций их действия как биологически активных регуляторных соединений.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Ванин А. Ф. // Соросовский образоват. журн. — 2001. — Т. 7. - С. 7-12.
2. Зенков Н. К, Меньшикова Е. Б., Вольский Н. Н, Козлов В. А. // Успехи соврем, биол. —1999. — Т. 117, вып. 5 — С. 439— 449.

3. Зенков Н. К, Ланкин В. З., Меньщикова Е. Б. Окислительный стресс. Биохимический и патофизиологический аспекты. — М., 2001.
4. Макарова О. П., Шишкина Л. Н., Огиренко А. П. и др. // Пробл. туб. - 2003. — № 11. — С. 29-32.
5. Маянский А. Н, Маянский Д. Н. Очерки о нейтрофиле и макрофаге. — Новосибирск, 1989.
6. Маянский А. Н., Маянский Н. А., Абаджиди М. А., Заславская М.И. //Журн. микробиол. — 1997. — № 2. — С. 88— 94.
7. Маянский Д. Н, Урсов И. Г. Лекции по клинической патологии. — Новосибирск, 1997.
8. Муминов Т. А. // Тер. арх. - 1990. — № 11. — С. 57-59.
9. Нечаева О. Б., Скачкова Е. И. // Пробл. туб. - 2003. — № 9. - С. 6-9.
10. Пальцев М. А. // Пробл. туб. - 2004. — № 2. — С. 3-7.
11. Реутов В. П. // Успехи биол. химии. — 1995. — Т. 35. — С. 189-228.
12. Скворцова Л. А., Павлова М. В., Виноградова Т. И., Арчакова Л. И. //Пробл. туб. - 2003. - № 10. - С. 9-12.
13. Скулачев В. П. // Соросовский образоват. журн. — 2001.— Т. 7. - Р. 4-10.
14. Степаншин Ю. Г., Степаншина В. Н, Шемякин И. Г. // Антибиотики и химиотер. — 1999. — № 4. — С. 39—43.
15. Фенольные биоантиоксиданты / Зенков Н. К., Кандалинцева Н. В., Ланкин В. З. и др. — Новосибирск, 2003.
16. Чан Дж., Кауфман С. Х. Е.//Туберкулез. Патогенез, защита, контроль. — М., 2002. — С. 415—448.
17. Abarca-Rojano E., Rosas-Medina P., Zamudio-Cortez Г et al. // Scand. J. Immunol. - 2003. - Vol. 58. - P. 419-427.
18. Adams L. B., Dinauer M. C, Morgenstem D. E., Krahenbuhl J. L. // Tuberc. Lung Dis. - 1997. - Vol. 78. - P. 237-246.
19. Andersen P., Askgaard D., Ljungqvist L. et al. // Infect, and Immun. - 1991. - Vol. 59. - P. 1905-1910.
20. Aslund F., Zheng M., Beckwith J., Storz G // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. - 1999. - Vol. 96. - P. 6161-6165.
21. Bryk R., Griffin P., Nathan C. // Nature. - 2000. - Vol. 407. -P. 211-215.
22. Bulatovic V. M., WengenackN. L., UhlJ. R. etal. //Antimicrob. Agents Chemother. - 2002. - Vol. 46. - P. 2765-2771.
23. Chan E. D., Chan /., SchlugerN. W. // Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. - 2001. - Vol. 25. - P. 606-612.
24. Chan /., Ffynn J. // Clin. Immunol. - 2004. - Vol. 110. -P. 2-12.
25. Chauhan R., Monde S. C. // Biochem. J. - 2002. - Vol. 367.- P. 255-261.
26. Ciaramella A., CavoneA., Santucci M. B. et al. // J. Infect. Dis.- 2002. - Vol. 186. -' P. 1277-1282.
27. Cooper A. M., Segal B. H., Frank A. A. et al. // Infect, and Im-mun. - 2000. - Vci. 68. - P. 1231-1234.
28. Duan L., Gan H., Golan D. K, Remold H. G// J. Immunol. -2002. - Vol. 169. - P. 5181-5187.
29. Durrbaum-Laudmann J., Gercken J., FladH. D., Ernst M. // Infect, and Immun. - 1996. - Vol. 64. - P. 5384-5389.
30. Dussurget O., Stewart G, Neyrolles O. et al. // Infect, and Immun. - 2001. - Vol. 69. - P. 529-533.
31. Fumani M. A., Riley L.W. // Infect, and Immun. - 2002. -Vol. 70. - P. 3965-3968.

32. Fumani M. A., Riley L. W. // J. Clin. Microbiol. - 2002. -Vol. 40. - P. 3162-3166.
33. Fratazzi C, Arbeit R. D., Carini C et al. // J. Leukocyte Biol.- 1999. - Vol. 66. - P. 763-764.
34. Friedman C. R., Quinn G. C, Kreiswirth B. N et al. // J. Infect. Dis. - 1997. - Vol. 176. - P. 478-484.16
35. Gomes M. S., Florido M., Pais T. F., Appelberg R. //J. Immunol. -1999. - Vol. 162. - P. 6734-6739.
36. Green R. M., Seth A., Connell N. D. // Infect, and Immun. — 2000. - Vol. 68. - P. 429-436.
37. Harth G., Horwitz M. A. // J. Biol. Chem. - 1999. - Vol. 274.- P. 4281-4292.
38. Heym B., Alzari P. M., Honor N, Cole S. T. // Mol. Microbiol.- 1995. - Vol. 15. - P. 235-245.
39. Hillas P. J., del Alba F. S., Oyarzaba J. et al. // J. Biol. Chem.- 2000. - Vol. 275. - P. 18801-18809.
40. Jackett P. S., Aber V. R., Lowrie D. B. // J. Gen. Microbiol. — 1978. - Vol. 104. - P. 37-45.
41. Jackett P. S., Aber V. R., Lowrie D. B. // J. Gen. Microbiol. -1978. - Vol. 107. - P. 273-278.
42. Jones G. S., Amirault H. J., Andersen B. R. // J. Infect. Dis. — 1990. - Vol. 162. - P. 700-704.
43. Keane J., Balcewicz-Sablinska M. K, Remold H. G. et al. // Infect, and Immun. - 1997. - Vol. 65. - P. 298-304.
44. Keane J., Remold H. G., Kornfeld H. // J. Immunol. - 2000. -Vol. 164. - P. 2016-2020.
45. Kornfeld H., Mancino G., Colizzi V. // Cell Death Differ. - 1999.- Vol. 6. - P. 71-78.
46. Kwon O. J. И J. Korean Med. Sci. - 1997. - Vol. 12. -P. 481-487.
47. Lau Y. L., Chan G. C. F., Ha S. Y. et al. // Clin. Infect. Dis. -1998. - Vol. 26. - P. 226-227.
48. Li Z, Kelley C, Collins F. et al. // J. Infect. Dis. - 1998. -Vol. 177. - P. 1030-1035.
49. Long R., Light B., Talbot J. A. // Antimicrob. Agents-Chemother.- 1999. - Vol. 43. - P. 403-405.
50. MacMicking J. D., North R. J, LaCourse K. et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. - 1997. - Vol. 94. - P. 5243-5248.
51. Malik Z. A., Iyer S. S., Kusner D. J. // J. Immunol. - 2001. -Vol. 166. - P. 3392-3401.
52. Manca C, Paul S., Barry C. E. et al. // Infect, and Immun. —1999. - Vol. 67. - P. 74-79.
53. Master S., Zahrt T. C, Song J., Deretic V. //J. Bacteriol. — 2001.- Vol. 183. - P. 4033-4039.
54. Master S. S., Springer B., Sander P. et al. // Microbiology. — 2002x- Vol. 148. - P. 3139-3144.
55. Molloy A., Laochumroonvorapong P., Kaplan G. // J. Exp. Med.- 1994. - Vol. 180. - P. 1499-1509.
56. Nathan C, Shiloh M. U. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. - 2000.- Vol. 97. - P. 8841-8848.
57. Nicholson S., Bonecini-Almeida M. G., Lapa e Silva J. R. et al. // J. Exp. Med. - 1996. - Vol. 183. - P. 2293-2302.
58. O'Brien S., Jackett P. S., Lowrie D. B., Andrew P. W. // Microb. Pathog. - 1991. - Vol. 10. - P. 199-207.
59. O'Brien S., Andrew P. W. // Microb. Pathog. - 1991. - Vol. 11.- P. 229-236.
60. O'Brien L., Carmichael J., Lowrie D. B., Andrew P. W. // Infect, and Immun. - 1994. - Vol. 62. - P. 5187-5190.
61. Oddo M., Renno T., Attinger A. et al. // J. Immunol. — 1998. — Vol. 160. - P. 5448-5454.

62. Ohno H., Zhu G., Mohan V. P. et al. // Cell Microbiol. - 2003.- Vol. 5. - P. 637-648.
63. Pais T. F, Appelberg R. // J. Immunol. - 2000. - Vol. 164. -P. 389-397.
64. Perskvist N., Long M., Stendahl O., Zheng L. // J. Immunol. — 2002. - Vol. 168. - P. 6358-6365.
65. Piddington D. L., Fang F. C, Laessig T. et al. // Infect, and. Immun. - 2001. - Vol. 69. - P. 4980-4989.
66. Placido R., Mancino G., Arnendola A. et al. // J. Pathol. — 1997.- Vol. 181. - P. 31-38.
67. Poveda F, Camacho J., Arnalich F. et al. // Infection. — 1999.- Vol. 27. - P. 272-274.
68. Raynaud C, Etienne G., Peyron P. et al. // Microbiology. —1998. - Vol. 144. - P. 577-587.
69. Rich E. A., Torres M., Sada E. et al. // Tuberc. Lung Dis. — 1997. - Vol. 78. - P. 247-255.
70. Rq/as M., Barrera L. F, Garcia L. F. ¼ Biochem. Biophys. Res. Commun. - 1998. - Vol. 247. - P. 436-442.
71. Sherman D. R., Mdluli K, Hickey M. J. et al. // Science. - 1996.- Vol. 272. - P. 1641-1643.
72. Shiloh M. U., Nathan C F. // Curr. Opin. Microbiol. — 2000.- Vol. 3. - P. 35-42.
73. Sly L. M., Hingley-Wilson S. M., Reiner N. E., McMaster W. R. II J. Immunol. - 2003. - Vol. 170. - P. 430-437.
74. Stenger S., Mazzaccaro R. J., Uyemura K. et al. // Science. —1997. - Vol. 276. - P. 1684-1687.
75. Ttmmins G. S., Master S., Rusnak F, Deretic V. // J. Bacteriol.- 2004. - Vol. 186. - P. 5427-5431.
76. Tsao T. C, Hong J., Huang C. et al. // Tuberc. Lung Dis.—1999. - Vol. 79. - P. 279-285.
77. Tullius M. V., Harth G., Horwitz M. A. // Infect, and Immun. -2001. - Vol. 69. - P. 6348-6363.
78. Venketaraman V., Dayaram Y. K., Amin A. G. et al. // Infect, and Immun. - 2003. - Vol. 71. - P. 1864-1871.
79. Wang C. H., Liu C. Y., Lin H. C et al. // Eur. Respir. J. - 1998. -Vol. 11. - P. 809-815.
80. Wang C. H., Kuo H. P. I// Respirology. - 2001. - Vol. 6. -P. 79-84.
81. Weinberg J. B. //Mol. Med. - 1998. - Vol. 4. - P. 557-591.
82. Wengenack N. L, Jensen M. P., Rusnak F, Stern M. K. // Biochem. Biophys. Res. Commun. — 1999. — Vol. 256. — P. 485— 487.
83. Wengenack N. L., Lopes H., Kennedy M. J. et al. // Biochemistry. - 2000. - Vol. 39. - P. 11508-11513.
84. Wu C. H., Tsai-Wu J. J., Huang Y. T. et al. // FEBS Lett. -1998. - Vol. 439. - P. 192-196.
85. Yu K., Mitchell C, Xing Y. et al. // Tuberc. Lung Dis. - 1999.- Vol. 79. - P. 191-198.
86. Zhrht T. C, Deretic V. // Antioxid. Redox Signal. — 2002. -Vol. 4. - P. 141-159.
87. Zhang Y, Lathigra R., Garbe T. et al. // Mol. Microbiol. — 1991.- Vol. 5. - P. 381-391.