

Роль фосфолипаз А2 в патологии легких



О.А. Головач



А.Д. Таганович, доктор медицинских наук, профессор, БГМУ

В статье представлены современные сведения о фосфолипазах А2 – ферментах, гидролизующих эфирную связь во втором положении глицерофосфолипидов. Рассмотрено участие различных изоформ фермента в патологии легких. Секреторная фосфолипаза А2 участвует в процессе деградации сурфактанта легких во время острого респираторного дистресс синдрома. Обсуждается роль цитозольной изоформы в патогенезе астмы и легочного фиброза.

Ключевые слова: фосфолипаза А2, острый респираторный дистресс синдром, сурфактант, астма, фиброз.

O.A. Golovach, A.D. Tahanovich
The role of phospholipases A2 in lung pathology
The article presents the current data about phospholipases A2 – enzymes, which hydrolyze ester bond at the sn-2 position of glycerophospholipids. The participation of different isoforms of enzyme in lung pathology is described. Secretory phospholipase A2 plays a major role in alteration of pulmonary surfactant during acute respiratory distress syndrome. Recent data, which show the role of cytosolic isoform in pathogenesis of asthma and pulmonary fibrosis are discussed.
Key words: phospholipase A2, acute respiratory distress syndrome, surfactant, asthma, fibrosis.

Фосфолипаза А2 (К.Ф.3.1.1.4.) – фермент, катализирующий гидролиз сложноэфирной связи во втором положении глицерофосфолипидов. Впервые фосфолипаза была обнаружена и изучена как пищеварительный фермент в 1900 году. Позже была описана фосфолипазная активность ядов змей и пчел. Сейчас очевидно, что фосфолипаза А2 (ФЛА2) – больше чем пищеварительный фермент. Она широко распространена и присутствует в большинстве клеток и тканей млекопитающих, выполняя функции регулятора метаболизма, поддержания мембранного гомеостаза, образования предшественников эйкозаноидов.

В зависимости от молекулярной массы, клеточной локализации и присутствия ионов Ca^{2+} различают цитозольные ФЛА2, секреторные и Ca -независимые ФЛА2.

1. Секреторная ФЛА2.

Секреторные ФЛА2 (сФЛА2) имеют молекулярную массу около 14 кДа, характеризуются абсолютной необходимостью ионов Ca^{2+} в миллимолярных концентрациях для каталитической активности, рН оптимум находится в интервале 7-9. В настоящее время описано десять типов сФЛА2 (IВ, IА, IС, IД, IЕ, IФ, IГ, V, X, XII), которые различаются первичной структурой и расположением дисульфидных мостиков [5,8]. Все типы секреторных фосфолипаз представляют собой глобулярные белки, богатые цистеином (5-8 дисульфидных мостиков), что обеспечивает стабильность фермента, в том числе устойчивость к протеолизу и денатурации. Фермент не проявляет избирательности в отношении жирнокислотного состава фосфолипидов, не

предпочтительно гидролизует отрицательно заряженные фосфолипиды (фосфатидную кислоту и фосфатидилглицерол) [4].

сФЛА2 рассматривают как один из патогенетических факторов формирования ряда заболеваний: ревматоидного артрита, атеросклероза. В последние годы появились сведения о причастности этого фермента к патологии легких. Особый интерес представляет патогенетическая цепь "сФЛА2 –острый респираторный дистресс синдром (ОРДС) – сурфактант легких" [16,17].

Острый респираторный дистресс синдром взрослых возникает в результате как прямых воздействий на легкие (аспирация, ингаляция токсических веществ, 100% кислород, недостаточно квалифицированное проведение ИВЛ), так и не прямых (сепсис, шок любой этиологии, политравма, кровопотеря). Несмотря на годы интенсивных исследований, механизм развития ОРДС остается до конца не ясен, а смертность от него высокой (?50%). Считают, что в основе происхождения этого состояния легких лежит снижение продукции и активности сурфактанта.

Сурфактант легких – липогликопротеиновый комплекс, который синтезируется альвеолоцитами II типа. Он состоит на 80-90% из фосфолипидов, 5-10% нейтральных липидов и 5-10% белков. Кроме поверхностно-активных свойств, необходимых для нормального дыхания, он обладает противовоспалительным и иммунорегуляторным действием. Нарушение его целостности приводит к увеличению сил поверхностного натяжения не только в альвеолах, но и в бронхиолах и мелких бронхах. Альвеолы стремятся к спадению, возникают необратимые множественные ателектазы, которые не поддаются расправлению. За счет повышения проницаемости альвеолокапиллярной мембраны возникает интерстициальный отек [12,13].

Самым вероятным механизмом снижения количества сурфактанта во время ОРДС является гидролиз фосфолипидов под действием сФЛА2. Инкубация легочного сурфактанта телят с сФЛА2 из яда кобры (*Naja naja*) в опытах *in vitro* приводила к значительному снижению относительных количеств фосфатидилхолина и увеличению уровня лизолецитина. Интратрахеальное же введение этого фермента морским свинкам индуцировало острое легочное повреждение [16]. Необходимо отметить, что сами по себе, эти сведения еще не являются бесспорным доказательством, поскольку известно, что сФЛА2 ядов змей гораздо эффективнее, чем фермент млекопитающих гидролизует фосфолипиды, упакованные в монослойные структуры. Он имеет более высокое сродство к субстрату.

Touqui L. и Arbibe L. [16] вводили в трахею морским свинкам эндотоксин (липополисахаридный компонент клеточной стенки грамотрицательных бактерий). Последующий масс-спектрофотометрический анализ бронхоальвеолярной лаважной жидкости показал присутствие в ней пальмитиновой кислоты и 1-пальмитоил 2-лизофосфатидилхолина – основных компонентов, которые высвобождаются во время гидролиза сурфактанта. Добавление LY311727, специфического ингибитора сФЛА2, снижало содержание этих производных дипальмитоилфосфатидилхолина (ДПФХ). Была проанализирована способность различных типов секреторных ФЛА2 гидролизовать сурфактант. Изотипы секреторных ФЛА2 IIА, V, X, экспрессируемые в легких, эффективно гидролизуют фосфолипиды сурфактанта, в то время как другие (IIС, IID, IIE, IIF) были неактивны [15].

Основным источником сФЛА2 в просвете бронхов являются альвеолярные макрофаги (АМ) [7,10]. Эндотоксины вызывают активацию АМ, которые высвобождают провоспалительные цитокины, такие как ФНО- α , IL-1, IL-6, IL-8. Опыты с

использованием антител к ФНО- γ доказывают, что именно он опосредует липополисахарид-индуцированный синтез сФЛА2. Стимуляция происходит на уровне транскрипции с участием фактора транскрипции NF- κ B. Нельзя также исключить активирующее действие IL-1 [1].

Идентификация фосфолипазной активности, как основной причины ОРДС позволяет предложить новую стратегию лечения – использование ингибиторов фермента. Белок сурфактанта А (SP-A), основной сурфактант-ассоциированный белок, эффективно ингибирует *in vitro* активность сФЛА2. Клинические исследования пациентов с ОРДС показали деструкцию SP-A, связанную с заметным увеличением содержания лизопродуктов [17]. SP-A выполняет защитные функции, являясь эндогенным ингибитором энзиматической активности ФЛА2 посредством белок-белкового взаимодействия. Он принадлежит к суперсемейству лектинов С-типа и содержит углеводный фрагмент, узнающий и связывающий COOH-терминальные группы белков (в т.ч. и ФЛА2). Кроме того, SP-A связывает эндотоксины, снижает продукцию ФНО- γ и оксида азота.

Среди синтетических соединений, глюкокортикоиды, на данный момент, – самые эффективные ингибиторы ФЛА2. Hidi R.[10] доказал, что дексаметазон – синтетический аналог глюкокортикоидов эффективно снижает синтез ФЛА2 альвеолярными макрофагами. Тем не менее, механизм ингибиторного действия стероидных препаратов *in vivo* остается невыясненным. Некоторые авторы полагают, что это действие обусловлено синтезом белка липокортин, который связывает фосфолипидные субстраты фермента. Другие предполагают, что такое действие глюкокортикоидов происходит из супрессии ими продукции IL-1 и ФНО- γ [5]. Еще одна точка зрения объясняет эффект дексаметазона селективным блокированием экспрессии гена сФЛА2 [10].

2. Цитозольная ФЛА2.

В цитозольной фракции клеток была найдена ФЛА2 (группа IV) с молекулярной массой 85 кДа. Эта изоформа ФЛА2 присутствует во многих клетках и тканях: мозге, почках, селезенке, легких, макрофагах, нейтрофилах, альвеолярных эпителиальных клетках и др. Фермент становится активным в результате фосфорилирования митоген-активируемыми протеинкиназами и протеинкиназой С. Различные внеклеточные цитокины, митогены, гормоны, нейромедиаторы, факторы роста, антигены, эндотоксины, а так же определенные физические и стрессовые воздействия, включая ультрафиолетовый свет и оксидативный стресс, индуцируют активацию и синтез цФЛА2. Ферменту абсолютно необходим Ca^{2+} для выполнения своей функции, причем в отличие от секреторной ФЛА2 концентрация его должна быть на три порядка ниже (0,3 – 2 μ M). Ca^{2+} используется не для реализации каталитического механизма, а для гидрофобного взаимодействия фермента с мембранами или фосфолипидными мицеллами [8,11].

Основной особенностью этого изотипа фермента является то, что он наиболее активно гидролизует фосфолипидные субстраты, содержащие во втором положении арахидоновую кислоту (C20, ω 5,8,11,14) (AA). Такая субстратная селективность и определяет основную функцию фермента в клетке [2,8].

Увеличение внутриклеточной концентрации Ca^{2+} индуцирует быструю транслокацию цФЛА2 в перинуклеарную область клетки с последующим высвобождением AA из мембранных фосфолипидов. AA подвергается дальнейшим метаболическим превращениям под действием трех различных ферментных систем: циклооксигеназной, липоксигеназной, цитохром р 450-зависимой эпоксигеназной, локализованных так же у ядерной мембраны. Таким образом, активация цФЛА2 является

ключевым этапом энзиматического каскада, приводящего к продукции эйкозаноидов [2,4,11].

Субстратная специфичность цФЛА2 к арахидоноил-содержащим субстратам предполагает, что именно эта изоформа играет основную роль в патогенезе астмы [3]. Известно, что лейкотриены В4, С4, D4, Е4 – основная группа медиаторов, вовлеченная в комплексный воспалительный процесс и приводящая к клиническим проявлениям астмы. Действие лейкотриенов заключается в сокращении гладкой бронхиальной мускулатуры, увеличении количества вырабатываемой слизи, стимулировании сосудистой проницаемости и образовании отека. Все эти признаки свойственны астме.

Лейкотриены синтезируются в ответ на воздействие аллергена или неспецифической реакции, приводящей к активации цФЛА2. Об этом свидетельствуют данные, полученные Uozumi N. с соавт. [18] на мышах с разрушенным геном цФЛА2. У таких животных было снижено образование эйкозаноидов в макрофагах, одновременно заметно ослаблялась анафилактическая реакция на введение овальбумина.

Chilton F. H. с соавт. [6] изучали присутствие продуктов фосфолипидной активности в бронхоальвеолярной лаважной жидкости больных астмой спустя 5-30 мин, 6, 20 ч. после антигенной провокации. Концентрация лизопродуктов была в 7 раз выше по сравнению с контрольной группой. Отсюда было сделано предположение о том, что гидролиз фосфолипидов сурфактанта приводит к генерации цитотоксического лизофосфатидилохолина, который может оказывать прямое детергентное действие на мембрану и влиять на активность мембранных каналов и белков. Кроме того, трансформируясь в фактор активации тромбоцитов, он вызывает нарушение проницаемости альвеолярно-капиллярного барьера, бронхоспазм, агрегацию тромбоцитов [6].

Предполагается также участие цФЛА2 в возникновении и развитии легочного фиброза – малопонятного, на сегодняшний день, интерстициального поражения паренхимы легких. Патогенез этого состояния включает чрезмерную продукцию провоспалительных медиаторов, воспаление альвеол, пролиферацию фибробластов и накопление коллагена. Классической экспериментальной моделью этого состояния является фиброз легких, вызванный интратрахеальным или внутрибрюшинным введением блеомицина. У мышей с разрушенным геном, отвечающим за синтез цФЛА2, блеомицин инициировал гиперпродукцию тромбоксанов и лейкотриенов в легких, значительно менее выраженную по сравнению с контрольной группой. Таким образом, ингибирование цФЛА2 и индуцируемых ею путей метаболизма может быть новым подходом к лечению легочного фиброза [14].

Са-независимые ФЛА2 (iФЛА2) относятся к VI группе и условно подразделены, в зависимости от локализации и биохимических характеристик, на лизосомные и внутриклеточные (цитозольные). Активность iФЛА2 была обнаружена в макрофагах крыс и альвеолоцитах II типа кроликов. Этот фермент имеет оптимум рН 4, ингибируется высокими концентрациями Са и локализован в ламеллярных тельцах, лизосомной фракции. Молекулярная масса его была определена электрофоретически и составила около 15 кДа. Несмотря на сходство молекулярной массы с таковой у сФЛА2, сравнение аминокислотной последовательности показало отсутствие гомологии между этими ферментами. Кроме того iФЛА2 не давала перекрестных реакций с антителами к ФЛА2 из поджелудочной железы свиньи (сФЛА2 IIА). Исследования, проведенные в лаборатории профессора Фишера А.Б. (США) [9], позволили прийти к заключению, что

именно iФЛА2 играет главную роль в кругообороте легочного сурфактанта, так же как и в утилизации экзогенного сурфактанта, вводимого в терапевтических целях.

Как известно, "отработанный" сурфактант, основным фосфолипидным компонентом которого является дипальмитоилфосфатидилхолин (ДПФХ) подвергается эндоцитозу альвеолоцитами II типа и альвеолярными макрофагами. После попадания в цитозоль альвеолоцитов II типа ДПФХ перемещается в ламеллярные тельца для ресекреции, либо в лизосомы, где подвергается деградации. Анализ продуктов деградации позволил выяснить, что основной путь расщепления ДПФХ - фосфолипазный гидролиз. Селективный ингибитор iФЛА2 MJ33 (1-гексадецил-3-трифлуороэтилглицеро-sn-2-фосфометанола) заметно (на 50%) ингибировал этот процесс [9].

Кроме того, считается, что именно iФЛА2 играет основную роль в деацилировании/реацилировании мембранных фосфолипидов, высвобождении арахидоновой кислоты и определяет скорость биосинтеза эйкозаноидов в отсутствие активации клетки. Последнее было доказано экспериментами, в ходе которых установили, что эти процессы не зависят от присутствия ионов Ca^{2+} и ингибируются бромоенол лактоном (BEL) - селективным ковалентным ингибитором iФЛА2 [9].

Таким образом, в последние годы были идентифицированы и охарактеризованы множественные изоформы ФЛА2, значительно отличающиеся по способности связывать и гидролизовать различные фосфолипидные субстраты, по клеточной локализации и механизмам реализации ферментативного действия. Несмотря на то, что эти ферменты катализируют одну и ту же реакцию - гидролиз эфирной связи во втором положении глицерофосфолипидов, большинство клеток и тканей содержат более чем один изотип фермента. В связи с этим остается неясным вопрос разделения функций различных ФЛА2, выяснение механизмов регуляции их активности, а так же их взаимосвязи и взаимодействия.

Полученные в последние годы сведения о причастности цитозольной и секреторной фосфолипаз А2 к формированию патологии легких открывают перспективу поиска новых подходов к лечению таких заболеваний. Однако прежде необходимо четко определить место этих ферментов в патогенетической цепи молекулярных событий. И здесь важное значение может принадлежать "синдромальному" подходу. К примеру, еще нет сведений о состоянии фосфолипаз А2 при гипертермии и гипоксии, при активации клеток продуцентов. Между тем, большинству заболеваний легких присущи эти состояния, которые во многом определяют клиническую картину, течение и исход патологического процесса.

Литература:

1. Anthonsen M. et al. Functional coupling between secretory and cytosolic phospholipase A2 modulates tumor necrosis factor- α - and interleukin-1 β -induced NF- κ B activation//J. Biol. Chem.-2001-Vol.276(32)-p.30527-30536.
2. Balsinde Jesús, Balboa M. Functional coupling between secretory phospholipase A2 and cyclooxygenase-2 and its regulation by cytosolic group IV phospholipase A2 // Biochemistry -1998-Vol. 95, Issue 14-p. 7951-7956.
3. Bowton D et al. Phospholipase A2 and arachidonate increase in bronchoalveolar lavage fluid after inhaled antigen challenge in asthmatics// Am.J.Respir.Crit.Care Med.-1997-vol.155-p.421-425
4. Capper A.E., Marshall L.A. Mammalian phospholipases A2: mediators of inflammation, proliferation and apoptosis//Progress in lipid research 40-2001-p.167-197.

5. Chakraborti S. Phospholipase A2 isoforms: a perspective//Cellular signaling 15-2003-p.637-665.
6. Chilton F. H., F. J. Averill, W. C. Hubbard, A. N. Fonteh, M. Triggiani, M. C. Liu. Antigen-induced generation of lyso-phospholipids in human airways// J. Exp. Med.-1996-183:2235
7. Daniel V. , Mario Seorale-Pose. Expression of the Type-II Phospholipase A in Alveolar Macrophages Down-regulation by inflammatory signal//The American Society for Biochemistry and Molecular Biology-1995-Vol. 270 Number 29-p. 17327-17332.
8. Dennis, E. A. Diversity of group types, regulation, and function of phospholipase A2// J. Biol. Chem. -1994- 269: 13057-13060
9. Fisher A.B., Deodia C. Lysosomal-type PLA2 and turnover of alveolar DPPC//Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol – 2001-280-L748-L754.
10. Hidi R., Vargaftig B., Touqui L. Increased synthesis and secretion of 14-kDa phospholipase A2 by guinea pig alveolar macrophages //The Journal of immunology – 1993.-vol.151, 5613-5623.
11. Hirabayashi T., Shimizu T. Localization and regulation of cytosolic phospholipase A2//Biochimica et Biophysica Acta 1488- 2000-p.124-138
12. Hite R.D. et al. Hydrolysis of surfactant-associated phosphatidylcholine by mammalian secretory phospholipases A2// Am. J. Physiol. 275-1998-p.L740-L747.
13. Kim, D. K., Fukuda T. Bronchoalveolar lavage fluid phospholipase A2 activities are increased in human adult respiratory distress syndrome// Am. J. Physiol.- 1995-269-L109.
14. Nagase, T., Uozumi, N. A pivotal role of cytosolic phospholipase A2 in bleomycin-induced pulmonary fibrosis// Nature Med.- 2002- 8(5)-p.480
15. Seeds et al Cell-specific expression of group X and group V secretory phospholipases A2 in human lung airway epithelial cells//Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.-2000-vol.23-p.37-44.
16. Touqui L., Arbibe L. A role for phospholipase A2 in ARDS pathogenesis//Molecular medicine today-1999-vol.5. - p.244-249.
17. Touqui L., Wu Y. et al Interaction of secreted phospholipase A2 and pulmonary surfactant and its pathophysiological relevance in acute respiratory distress syndrome//Acta Pharmacol. Sin.- 2003-24(12)-p.1292-1296.
18. Uozumi N., Role of cytosolic phospholipase A2 in allergic response and parturition// Nature -1997-p.618 – 622