

Е. И. Кременецкий¹, М. Н. Ходосовский²

ВЛИЯНИЕ ЛИПОПОЛИСАХАРИДА И АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА НА МЕХАНИЗМ АКТИВАЦИИ ТРОМБОЦИТОВ И СОСУДИСТЫЕ РЕАКЦИИ

*ГУ «432 ордена Красной Звезды главный военный клинический медицинский центр
Вооруженных Сил Республики Беларусь»¹
УО «Гродненский государственный медицинский университет»²*

В статье рассматривается роль липополисахарида (ЛПС) грамотрицательных бактерий, в активации тромбоцитов и сосудистых реакциях. ЛПС взаимодействует с рецептором TLR4 на тромбоцитах, усиливая их агрегацию и продукцию активных форм кислорода (АФК), что способствует высвобождению факторов, участвующих в воспалении и коагуляции. Механизм действия включает фосфорилирование ключевых сигнальных белков (Akt, ERK1/2, PLA2) через путь TLR4-PI3K-Akt-ERK1/2, зависимый от АФК и тромбоксана А₂. Влияние ЛПС проявляется также в снижении сосудистой релаксации и увеличении проницаемости сосудов, а реакции на его концентрацию варьируют от усиления продукции АФК до повышения уровней воспалительных медиаторов. АФК играют важную роль в передаче сигналов, активируя каскады MAPK и NF-κB, что способствует экспрессии ферментов и цитокинов, регулирующих воспаление и сосудистую функцию. АФК играет важную роль как посредник в механизмах воспаления и активации тромбоцитов под действием ЛПС, а также их влияние на синтез простаноидов и сосудистые реакции.

Большинство НПВП активны против PGHS-1. В цельной крови, стимулированной ЛПС, S-ибупрофен заметно снижает уровни TXB(2) в диапазоне концентраций от 10 до 200 мкг/мл и агрегацию тромбоцитов при лихорадочных состояниях.

Ключевые слова: *липополисахарид, активные формы кислорода, тромбоксан.*

E. I. Kremenetsky¹, M. N. Khodosovsky²

EFFECT OF LIPOPOLYSACCHARIDE AND REACTIVE OXYGEN SPECIES ON THE MECHANISM OF PLATELET ACTIVATION AND VASCULAR REACTIONS

*State Institution «432 Orders of the Red Star Main Military Clinical Medical Center
of the Armed Forces of the Republic of Belarus»¹
Educational institution «Grodno State Medical University»²*

The article discusses the role of lipopolysaccharide (LPS) of gram-negative bacteria in platelet activation and vascular reactions. LPS interacts with the TLR4 receptor on platelets, enhancing their aggregation and production of reactive oxygen species (ROS), which promotes the release of factors involved in inflammation and coagulation. The mechanism of action involves phosphorylation of key signaling proteins (Akt, ERK1/2, PLA2) through the TLR4-PI3K-Akt-ERK1/2 pathway, dependent on ROS and thromboxane A₂. The effect of LPS is also manifested in a decrease in vascular relaxation and an increase in vascular permeability, and reactions to its concentration range from increased ROS production to increased levels of inflammatory mediators. ROS play an important role in signaling by activating the MAPK and NF-κB cascades, which promotes the expression of enzymes and cytokines that regulate inflammation and vascular function. ROS plays an important role as an intermediary in the mechanisms of inflammation and platelet activation under the action of LPS, as well as their effect on prostanoid synthesis and vascular reactions.

Most NSAIDs are active against PGHS-1. In LPS-stimulated whole blood, S-ibuprofen markedly reduces TXB(2) levels in the concentration range of 10 to 200 μg/ml and platelet aggregation in non-inflammatory and inflammatory fever.

Key words: *lipopolysaccharide, reactive oxygen species, thromboxane.*

Липополисахарид (ЛПС) является важным структурным компонентом мембраны грамотрицательных бактерий с широким спектром биологического действия, является основной причиной симптомов сепсиса. Он может активировать тромбоциты, модулирует их функцию, хотя основные механизмы действия ЛПС в этих клетках остаются неясными. Также липополисахарид генерирует высвобождение супероксидных радикалов и образование веществ, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой в тромбоцитах [1, 2, 10, 11, 17]. Тромбоциты экспрессируют Toll-подобный рецептор 4 (TLR4), который служит рецептором для ЛПС, что увеличивает их агрегацию, стимулированную тромбоксаном (U46619) или агонистами коллагенового рецептора GPVI, эффекты, которые предотвращались антагонистом TLR4. В связи с этим ЛПС усиливает связывание фибриногена, воздействие Р-селектина и высвобождение активных форм кислорода (АФК). Увеличение АФК является важным механизмом действия липополисахарида на тромбоциты, поскольку их активация ингибировалась в присутствии супероксиддисмутазы или каталазы. Эффекты ЛПС связаны с фосфорилированием Akt, ERK1/2 и PLA2 в стимулированных тромбоцитах, а ингибиторы PI3-киназы, Akt и ERK1/2 значительно снижают индуцированную ЛПС активацию тромбоцитов и связанную с этим продукцию АФК. Липополисахарид усиливает активацию тромбоцитов человека через путь, зависящий от TLR4-PI3K-Akt-ERK1/2-PLA2, который зависит от образования АФК и тромбоксана A_2 (TxA2) [2, 9, 11, 12, 17].

Также воздействие ЛПС (10 мкг/мл в течение 1–5 ч) снижает высвобождение брадикинина, а также оксида азота (NO) из донора NO – диэтиламина (ДЭА); однако не изменяет концентрацию брадикинина после ингибирования синтеза NO N(G)-монометил-L-аргинином (0,1 мМ), ни экспрессию эндотелиальной NO-синтазы (eNOS) [3, 4, 17]. Внутривенное введение ЛПС увеличивало проницаемость сосудов, продукцию лейкотриена B_4 , лейкотриена C_4/D_4 , тромбоксана B_2 (TxB2) и простагландина E_2 , а также повышало активность миелопероксидазы – маркерного фермента нейтрофилов [5, 6].

Обработка моноцитов периферической крови человека ЛПС стимулирует раннее высвобождение TxB2 и отсроченное высвобождение простагландина E. Иммунореактивное высвобождение TxB2 максимально через 2–8 ч, тогда как высвобождение простагландина E максимально через 16–24 ч после стимуляции моноцитов в культуре этих клеток. Временной ход высвобождения простагландина E_2 практически идентичен высвобождению простагландина E_1 во всех супернатантных культурах независимо от условий мечения. Высвобождение меченых простагландинов E_1 и E_2 из культур с пульсовой меткой совпадало с высвобождением тромбоксана B_2 , но не иммунореактивного простагландина. Напротив, меченый и иммунореактивный TxB2, количественно измеренные в тех же супернатантных культурах,

демонстрировали схожие паттерны высвобождения независимо от условий метки. Эти результаты указывают на то, что дифференциальный паттерн высвобождения простагландина E и TxB2 из человеческих моноцитов не связан с зависящим от времени сдвигом высвобождения простагландина E_1 относительно простагландина E_2 . Поскольку TxB2 и простагландин E_2 вырабатываются посредством преобразования арахидоновой кислоты, опосредованного циклооксигеназой, эти результаты дополнительно предполагают, что простагландин E_2 и TxB2 метаболизируются независимо в популяциях моноцитов человека [15, 16]

Наблюдали зависящие от концентрации ЛПС реакции: от 0,01 до 10 мкг/мл ЛПС индуцирует PGHS-2, и уровни TxB2 становятся обнаруживаемыми через 3 ч и продолжают расти в течение 24 ч [18]; в концентрации от 0,1 до 100 нг/мл ЛПС усиливал выработку АФК с ограниченной выработкой провоспалительных медиаторов; от 1,0 до 10 мкг/мл ЛПС вызывал высвобождение TxB2 [7, 13, 14], матриксной металлопротеиназы-9 и макрофагального воспалительного белка-2 (MIP-2/CXCL2) одновременно с максимальной выработкой АФК; 100 мкг/мл ЛПС дезактивировал их выработку, но поддерживал повышенные уровни TxB2, MMP-9, фактора некроза опухоли- α (TNF- α), интерлейкина 1- α (IL-1 α) и интерлейкина-6 (IL-6), макрофагального воспалительного белка 1 α (MIP-1 α /CCL3) и MIP-2/CXCL2 с сопутствующим высвобождением лактатдегидрогеназы [7, 10].

Используя 5-часовую инкубацию цельной крови человека с 10 мкг/мл ЛПС, аспирина (10 мкМ), который быстро метаболизируется в салициловую кислоту, не оказывал влияния на ЛПС-индуцированную продукцию TxB2, но ингибировал продукцию TxB2 ионофором A23187, добавленным через 4,5 ч, посредством ацетилирования уже существующего простагландина G/H-синтазы-1 (PGHS-1). В 5-часовом анализе нестероидные противовоспалительные препараты (НПВП), добавленные в 0 ч к цельной крови человека, сравнивались на предмет ингибирования продукции TxB2, стимулированной добавлением ионофора A23187 в 4,5 ч (PGHS-1) или добавлением ЛПС в 0 ч (PGHS-2). Большинство НПВП были более активны против PGHS-1, чем PGHS-2 [18]. В цельной крови без стимуляции и стимулированной ЛПС S-ибупрофен заметно снижал уровни TxB2 в диапазоне концентраций от 10 до 200 мкг/мл. R-ибупрофен проявлял свой ингибирующий эффект при концентрациях >100 мкг/мл. При воспалительных и невоспалительных состояниях коллаген-аденозин 5'-дифосфат (CEPI-CT) продлевался при концентрациях 12,5 и 75 мкг/мл для S-ибупрофена и при концентрации 150 мкг/мл комбинированного R- и S-ибупрофена. S-ибупрофен был значительно эффективнее R-ибупрофена ($p < 0,05$). Совместное применение S- и R-ибупрофена не приводило к аддитивному или синергетическому пролонгированию CEPI-CT. CADP-CT оставались неизменными под воздействием обоих

энантиомеров. S-ибупрофен оказался более эффективным, чем R-ибупрофена, в ингибировании уровня TxB2 в плазме и агрегации тромбоцитов при невоспалительных и воспалительных состояниях [18, 19].

Показано влияние АФК на синтез простаноидов из арахидоновой кислоты [8, 9, 10, 12]. АФК, такие как перекись водорода, супероксидный анион-радикал или гидроксильный радикал, играют важную роль в процессах воспаления, а также в передаче сигналов от рецепторов к интерлейкину-1 β (ИЛ-1 β), TNF- α или ЛПС. НАДФН-оксидаза повышает уровень АФК, что приводит к инактивации протеинфосфатазы 1 (PP1), протеинфосфатазы 2A (PP2A) и протеинтирозинфосфатазы: МАРК-фосфатазы 1 (МКР-1). Инактивация фосфатаз приводит к активации каскадов митоген-активируемых протеинкиназ (МАРК): N-концевой киназы c-Jun (JNK), p38 и внеклеточной сигнально-регулируемой киназы (Erk), которые, в свою очередь, активируют цитозольную фосфолипазу A₂ (сPLA₂). АФК вызывают приток цитоплазматического кальция путем активации фосфолипазы C (PLC) и фосфорилирования IP₃-чувствительных кальциевых каналов. АФК активируют ядерный фактор κ B (NF- κ B) через киназу I κ B (IKK) через фосфоинозитид 3-киназу (PI3K), фосфатазу-супрессор опухоли и гомолог тензина (PTEN) и протеинкиназу B (Akt/PKB) или NF- κ B-индуцирующую киназу (NIK). IKK фосфорилирует α -субъединицу NF- κ B (I κ B α) по Ser³². Окислительный стресс инактивирует NIK и γ -субъединицу киназы I κ B/важнейший модулятор NF- κ B (IKK γ /NEMO), что может вызывать активацию NF- κ B, независимую от IKK и являющуюся ингибитором деградации I κ B α , включая фосфорилирование Tyr⁴² по I κ B α c-Src и тирозинкиназой селезенки (Syk), фосфорилирование последовательности домена, богатого пролином, глутаминовой кислотой, серином и треонином (PEST), казеинкиназой II и инактивацию тирозинфосфатазы протеинтирозин 1B (PTP1B). Активация белка-активатора 1 фактора транскрипции (AP-1) и белка, связывающего CREB (CBP/p300), активируемых каскадами NF- κ B и МАРК, приводит к экспрессии цитозольной фосфолипазы A₂ (сPLA₂), циклооксигеназы-2 (COX-2) и мембраносвязанной простагландин Е-синтазы 1 (mPGES-1), что приводит к усилению высвобождения арахидоновой кислоты и продукции простагландинов, в частности простагландина E₂ (PGE₂). АФК повышают активность PGD-синтазы гемопозитического типа (H-PGDS) и, как следствие, продукцию простагландина D₂ (PGD₂). Однако супероксидный радикал реагирует с оксидом азота, образуя пероксинитрит, который инактивирует простагландин-синтазу I (PGIS), подавляя продукцию простагландина I₂ (PGI₂). АФК не влияют на синтез тромбксана напрямую; это достигается за счёт повышения активности сPLA₂ и экспрессии COX-2.

Генерация АФК достигала пика через 17 ч после стимуляции ЛПС в концентрации 0,3 нг/мл. В дозе 0,1–1,0 нг/мл ЛПС не индуцировал генерацию медиаторов воспаления, но мощно усиливал продукцию АФК;

в дозе 3,0–10,0 нг/мл ЛПС вызывал высвобождение оксида азота, TNF- α , TxB2 и матричной металлопротеиназы-9, хотя частично ингибировал последующую генерацию АФК; при дозе 30,0–100,0 нг/мл ЛПС максимально усиливал генерацию оксида азота, TNF- α , TxB2 и матричной металлопротеиназы-9 с сопутствующим высвобождением лактатдегидрогеназы, хотя сильно дезактивировал генерацию АФК [20]. Таким образом, под влиянием ЛПС происходит усиленное высвобождение этих четырёх медиаторов (оксида азота, TNF- α , TxB2 и матричной металлопротеиназы-9).

Заключение

Липополисахарид играет ключевую роль в активации тромбоцитов и сосудистых реакциях через взаимодействие с рецептором TLR4, что приводит к усилению продукции активных форм кислорода, воспалительных медиаторов и простаноидов. Эти процессы способствуют развитию воспаления, повышению сосудистой проницаемости и агрегации тромбоцитов, что имеет важное значение для понимания механизмов связанных с ним сосудистых нарушений. АФК выступают важными посредниками в этих механизмах, активируя сигнальные каскады МАРК и NF- κ B, регулирующие экспрессию ферментов и цитокинов. Таким образом, регуляция активности АФК и их взаимодействие с сигнальными путями представляют потенциальные мишени для терапевтического воздействия при воспалительных и тромботических состояниях. Большинство НПВП активны против PGHS-1. В цельной крови стимулированной ЛПС S-ибупрофен заметно снижает уровни TxB2 в диапазоне концентраций от 10 до 200 мкг/мл и агрегацию тромбоцитов.

Литературы

1. Saluk-Juszczak, J. Endotoxins stimulate generation of superoxide radicals and lipid peroxidation in blood / J. Saluk-Juszczak, B. Wachowicz, W. Kaca // *Microbios*. 2000; 103(404): 17–25.
2. Maria, E. Lopes Pires, Lipopolysaccharide potentiates platelet responses via toll-like receptor 4-stimulated Akt-Erk-PLA2 signalling / E. Maria Lopes Pires, R. Simon-Clarke, Sisi Marcondes, Jonathan M Gibbins // *PLoS One*; 11.
3. Raquel, Hernanz, Hypertension alters role of iNOS, COX-2, and oxidative stress in bradykinin relaxation impairment after LPS in rat cerebral arteries / Raquel Hernanz, Ana M Briones, María J Alonso, Elisabet Vila, Mercedes Salaiques // *Am J Physiol Heart Circ Physiol* . 2004 Jul;287(1)
4. Alejandro, M. S. Mayer, *Vibrio vulnificus* MO6-24 / O lipopolysaccharide stimulates superoxide anion, thromboxane B₂, matrix metalloproteinase-9, cytokine and chemokine release by rat brain microglia in vitro / Alejandro M. S. Mayer, Mary L. Hall, Michael Holland, Cristina De Castro, Antonio Molinaro, Monica Aldulescu, Jeffrey Frenkel, Lauren Ottenhoff, David Rowley, Jan Powell // *Mar Drugs*. 2014 Mar 26;12(4).
5. Oketani, K. Effect of E3040, an inhibitor of 5-lipoxygenase and thromboxane synthase, on rat bowel damage induced by lipopolysaccharide / K. Oketani, T. Inoue, M. Murakami // *Eur J Pharmacol*. 2001 Sep 14;427(2).

6. *Feuerstein, N.* Leukotrienes C4 and D4 induce prostaglandin and thromboxane release from rat peritoneal macrophages / N. Feuerstein, M. Foegh, P W Ramwell // *Br J Pharmacol.* 1981 Mar;72(3):389–91.

7. *Alejandro, M. S.* Mayer, Cyanobacterial *Microcystis aeruginosa* lipopolysaccharide elicits release of superoxide anion, thromboxane B₂, cytokines, chemokines, and matrix metalloproteinase-9 by rat microglia / Alejandro M S Mayer, Jonathan A Clifford, Monica Aldulescu, Jeffrey A Frenkel, Michael A Holland, Mary L Hall, Keith B Glaser, John Berry // *Toxicol Sci.* 2011 May;121(1):63–72

8. *Korbecki, J.* The effect of reactive oxygen species on the synthesis of prostanoids from arachidonic acid / J. Korbecki, I. Baranowska-Bosiacka, I. Gutowska, D Chlubek // *J Physiol Pharmacol.* 2013 Aug;64(4):409–21.

9. *Винокуров, М. Г.* Исследование механизмов действия липополисахарида *Rhodobacter capsulatus* на функциональные ответы и апоптоз фагоцитов крови человека при активации эндотоксинами / М. Г. Винокуров. – Москва, 2007. – 49 с. – Автореферат диссертации на соискание ученой степени доктора биологических наук.

10. *Seethanathan, P.* Characterization of release of tumor necrosis factor, interleukin-1, and superoxide anion from equine white blood cells in response to endotoxin / P. Seethanathan, G. D. Bottoms, K. Schafer // *Am J Vet Res.* 1990 Aug;51(8):1221–5.

11. *Carlos Jiménez-Romero* Dactyloditerpenol acetate, a new prenylbisabolane-type diterpene from *Aplysia dactylomela* with significant in vitro anti-neuroinflammatory activity / Carlos Jiménez-Romero, Alejandro M S Mayer, Abimael D Rodríguez // *Bioorg Med Chem Lett.* 2014 Jan 1;24(1):344–8.

12. *Aepfelbacher, M.* Bacterial lipopolysaccharide up-regulates platelet-activating factor-stimulated Ca²⁺ mobilization and eicosanoid release in human Mono Mac 6 cells / M. Aepfelbacher, H. W. Ziegler-Heitbrock, I. Lux, P. C. Weber // *J Immunol.* 1992 Apr 1;148(7):2186–93.

13. *Wachowicz, B.* Response of blood platelets to *Proteus mirabilis* lipopolysaccharide / B. Wachowicz, J. Saluk, W. Kaca // *Microbiol Immunol.* 1998;42(1):47–9.

14. *Tuominen, O.-M.* Effects of bisphosphonates on prostaglandin E₂ and thromboxane B₂ production in human whole

blood and monocytes stimulated by lipopolysaccharide and A23187 / O.-M. Tuominen, R. Ylitalo-Heikkala, T. I. Vehmas, I. Mucha, P Ylitalo, A Riutta // *Methods Find Exp Clin Pharmacol.* 2006 Jul-Aug;28(6):361–7

15. *Nichols, F. C.* Prostaglandin E₂, prostaglandin E₁ and thromboxane B₂ release from human monocytes treated with C3b or bacterial lipopolysaccharide / F. C. Nichols, H. A. Schenkein, R. B. Rutherford // *Biochim Biophys Acta.* 1987 Feb 18; 927(2):149–57.

16. *Markus Bachschmid* Endothelial cell activation by endotoxin involves superoxide/NO-mediated nitration of prostacyclin synthase and thromboxane receptor stimulation / Markus Bachschmid, Svenja Thurau, Ming-Hui Zou, Volker Ullrich // *FASEB J.* 2003 May;17(8):914–6.

17. *Christine Vayssettes-Courchay* Role of thromboxane TP and angiotensin AT1 receptors in lipopolysaccharide-induced arterial dysfunction in the rabbit: an in vivo study / Christine Vayssettes-Courchay, Christophe Ragonnet, Gwénoélé Camenen, Michel Félétou, Alex A Cordi, Gilbert Lavielle, Tony J Verbeuren // *Eur J Pharmacol.* 2010 May 25;634(1–3): 113–20.

18. *Young, J. M.* Human whole blood assays for inhibition of prostaglandin G/H synthases-1 and -2 using A23187 and lipopolysaccharide stimulation of thromboxane B₂ production / J. M. Young, S. Panah, C. Satchawatcharaphong, P. S. Cheung // *Inflamm Res.* 1996 May;45(5):246–53.

19. *Stefan Kaehler* S-ibuprofen effectively inhibits thromboxane B₂ levels and platelet function in an experimental model of lipopolysaccharide-stimulated and non-stimulated whole blood / Stefan Kaehler, Claudia Marsik, Birgit Heinisch, Christiane Thallinger, Robert Sauermann, Lili Kazemi-Shirazi, Oswald Wagner, Christian Joukhadar // *Pharmacology.* 2008;81(2):181–6.

20. *Mayer, A. M.* *Escherichia coli* lipopolysaccharide potentiation and inhibition of rat neonatal microglia superoxide anion generation: correlation with prior lactic dehydrogenase, nitric oxide, tumor necrosis factor-alpha, thromboxane B₂, and metalloprotease release / A. M. Mayer, S. Oh, K. H. Ramsey, P. B. Jacobson, K. B. Glaser, A. M. Romanic // *Shock.* 1999 Mar;11(3):180–6.

Поступила 21.08.2025 г.