

## КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

УДК 577.152

©Александров, Судьина

### ПОДАВЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ 5-ЛИПОКСИГЕНАЗЫ АНИОННЫМИ ПРОИЗВОДНЫМИ ХОЛЕСТЕРИНА

*Д.А. Александров<sup>1</sup>, Г.Ф. Судьина<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>Химический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, 119992, Москва, тел.: (495) 9393174; факс: (495) 939318, эл. почта: alex-1-a-rus@yandex.ru

<sup>2</sup>Институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, эл. почта: sudina@genebee.msu.ru.

5-липоксигеназа (5-LO) является ключевым ферментом в биосинтезе лейкотриенов (LTs), медиаторов системы защиты организма и, одновременно, агентов воспалительных процессов. В данной работе исследовали влияние анионных эфиров холестерина на активность 5-липоксигеназы. Показано, что сульфат холестерина (CX) активирует нейтрофилы человека (PMNL), стимулирует их адгезию к коллагену и эндотелию. Обнаружено, что CX и фосфат холестерина (ФХ) эффективно подавляют синтез LTs как в PMNL и линии базофильных клеток крысы (RBL-1), так и в гомогенатах этих клеток. Представлены кинетические аспекты влияния анионных производных холестерина на синтез лейкотриенов. Во всех экспериментах ФХ (заряд -2) проявил более сильное ингибирующее воздействие, чем CX (заряд -1). Мы считаем, что это говорит в пользу существенного электростатического вклада отрицательно заряженных групп эфиров холестерина в подавление 5-LO активности.

**Ключевые слова:** атеросклероз, воспаление, нейтрофил, 5-липоксигеназа, сульфат холестерина, фосфат холестерина.

**ВВЕДЕНИЕ.** Известно, что основной причиной атеросклероза является накопление и отложение на стенках сосудов окисленных липопротеинов низкой плотности. В этом процессе решающую роль играет дисфункция эндотелия [1-4]. Она возникает при отложении холестерина, инвазии и активации макрофагов, активации тромбоцитов и адгезии полиморфноядерных лейкоцитов (PMNL, нейтрофилов), самой многочисленной лейкоцитарной фракции крови человека. В процессе адгезии и активации нейтрофилы секретируют лейкотриены (LTs) - важные хемоаттрактанты, медиаторы межклеточных взаимодействий. В нейтрофилах ключевым ферментом синтеза LTs является 5-липоксигеназа (5-LO), метаболизирующая арахидоновую кислоту (AA) сначала в 5S-гидроперокси-эйкозатетраеновую кислоту (5-HpETE), а затем в лейкотриен A<sub>4</sub> (LTA<sub>4</sub>) [5]. Неустойчивый промежуточный метаболит LTA<sub>4</sub> превращается в 5S,12R-дигидрокси-6,14-цис-8,10-транс-эйкозатетраеновую кислоту (лейкотриен B<sub>4</sub>, LTB<sub>4</sub>) и неферментативно в его изомеры либо выводится в межклеточную среду и трансформируется ферментами других клеток в лейкотриен C<sub>4</sub>. Выход LTB<sub>4</sub> в межклеточное пространство приводит к миграции все новых лейкоцитов к очагу поражения. Таким образом, процесс приобретает каскадный характер.

Поиск эффективных супрессоров продукции LTs является в настоящее время одним из многообещающих путей в терапии атеросклероза [6], некоторых видов

рака [7], остеопороза [8], астмы и других воспалительных процессов [9]. Ранее нами была выдвинута гипотеза о важной роли отрицательного заряда сульфатной группы сульфата холестерина (СХ) в подавлении синтеза LTs [10]. Для проверки этой гипотезы в данной работе мы изучили влияние СХ (заряд -1) и фосфата холестерина (заряд -2) (ФХ) на продукцию LTs в различных условиях. Полученные результаты подтвердили, что введение отрицательно заряженных групп в молекулу холестерина делает его мощным супрессором синтеза LTs.

**МЕТОДИКА.** В работе использовали эфиры холестерина (СХ - "Sigma-Aldrich", США; ФХ был любезно предоставлен Волковым Е.М.) в виде растворов в смеси EtOH/DMSO=1/3.

Нейтрофилы выделяли из свежесобранной донорской крови [11], культивирование первичных эндотелиальных клеток из пуповинных вен проводили как описано нами ранее [11].

*Адгезию нейтрофилов* к эндотелию определяли тестом на миелопероксидазную активность [12]. Нейтрофилы инкубировали во флаконах, покрытых коллагеном или монослоем эндотелиальных клеток, в отсутствие и в присутствии 25 мкг/мл СХ. После 30 мин. инкубации при 37°C отмывали неприкрепившиеся лейкоциты и проводили миелопероксидазный тест [13]. Применяли также прямой подсчет адгезировавших клеток под инверсионным микроскопом.

*Электронная микроскопия.* Для получения фотографий нейтрофилов на монослое эндотелия использовали сканирующий электронный микроскоп Hitachi-405A.

*Синтез LTs в клетках* проводили в CO<sub>2</sub> инкубаторе при 37°C. Клетки инкубировали 10 мин. в присутствии указанных концентраций СХ или ФХ. Синтез инициировали добавлением в среду 2 мкМ кальциевого ионофора А 23187. Через 10 минут (в случае с суспензионными клетками PMNL или RBL-1) или 20 мин. (при инкубации PMNL на коллагене или эндотелии) инкубацию останавливали добавлением равного объема охлажденного MeOH с внутренним стандартом для ВЭЖХ, простагландином В<sub>2</sub>.

*Синтез LTs в клеточных гомогенатах.* Для получения клеточного гомогената использовали PMNL (8·10<sup>6</sup>) и RBL-1 (1·10<sup>7</sup>). Клетки ресуспендировали в 1 мл PBS-буфера, содержащем 1мМ EDTA, обрабатывали ультразвуком (6Ч6 сек) на льду, после чего к клеточному гомогенату добавляли 1 мМ АТР. Пробы инкубировали в присутствии указанных концентраций СХ или ФХ в течение 10 мин при 37°C, реакцию инициировали введением 2 мМ CaCl<sub>2</sub> и соответствующего количества АА. Реакцию останавливали через 10 мин добавлением 1 мл охлажденного метанола, содержащего простагландин В<sub>2</sub>.

*Анализ продуктов метаболизма АА.* Количественный анализ 5S-гидроксизайкотетраеновой кислоты (5-НЕТЕ), лейкотриена В<sub>4</sub> и его изомеров проводили методом ВЭЖХ. Водно-метанольные экстракты центрифугировали, наносили на колонку с 500 мг C18-Sep-Pak для предварительной очистки и концентрирования (промывка водой и 25% MeOH, элюция 100% MeOH). Анализ проводили обращенно-фазовой ВЭЖХ на колонке C18 5 мкм (4,6x25см) при скорости элюции 0,8 мл/мин в градиенте 20%-70% элюента В (метанол/ацетонитрил/вода/уксусная кислота/триэтиламин : 50/50/0/0,05/0,04). Для элюента А соотношение компонентов соответственно 25/25/50/0,05/0,08. Детекцию проводили на УФ-детекторе при 238 нм (5-НрЕТЕ) и 280 нм (простагландин В<sub>2</sub>, лейкотриен В<sub>4</sub> и его изомеры).

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.** *СХ стимулирует адгезию PMNL к коллагену и эндотелию и ингибирует синтез LTs.*

Эффект СХ на адгезионные свойства нейтрофилов изучался на поверхностях, покрытых коллагеном, и на монослое эндотелиальных клеток, полученных из пуповинных вен человека. Таким образом, были смоделированы условия неповрежденного сосуда (эндотелий) и поврежденного, когда открывается свободный доступ к экстраклеточному матриксу (коллаген). СХ увеличивал адгезию нейтрофилов к коллагену в 3 раза по сравнению с контрольными клетками (рис. 1а). На монослое эндотелия СХ действовал еще эффективнее (увеличение

адгезии в 5 раз). В процессе адгезии нейтрофилов к эндотелию в присутствии CX происходило нарушение целостности монослоя эндотелия (рис. 1б, нижнее фото). Нейтрофилы локализовались в области межклеточных контактов, стремясь "раздвинуть" отдельные клетки. Для того чтобы понять, как CX влияет на синтез LTs при взаимодействии PMNL с коллагеном и эндотелием, мы стимулировали клетки кальциевым ионофором A23187 в тех же условиях, при которых исследовали адгезию к коллагену и эндотелию. В отсутствие ионофора CX не стимулирует синтез LTs. При инкубации на коллагене CX подавлял синтез LTs на 82-88%, а в инкубациях с эндотелием - на 75% (рис.1в).

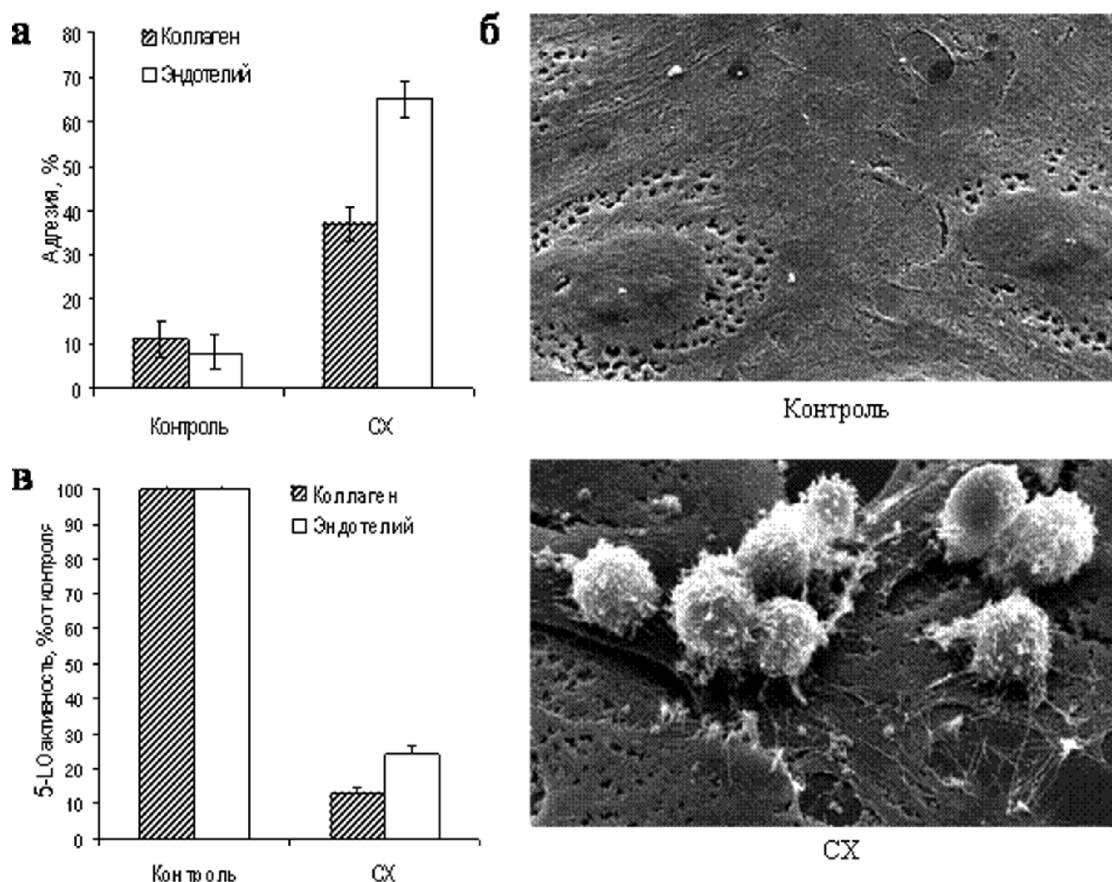


Рисунок 1.

Влияние CX (25 мкг/мл) на адгезию PMNL к эндотелию и коллагену и синтез LTs. **а** - Степень адгезии нейтрофилов к коллагену и эндотелию в присутствии CX. Приведены средние значения по 3 независимым экспериментам  $\pm$  стандартное отклонение. **б** - Электронная микроскопия слоя эндотелия в присутствии нейтрофилов в отсутствие CX (верхнее фото) и в присутствии CX (нижнее фото). **в** - CX подавляет синтез LTs при адгезии нейтрофилов к коллагену и эндотелию. Результаты представлены в виде % от суммы 5-LO продуктов, синтезированных контрольными PMNL ( $1 \cdot 10^7$ ). Приведены средние значения по 3 независимым экспериментам  $\pm$  стандартное отклонение.

*CX и ФХ подавляют синтез LTs в суспензионных клетках и клеточных гомогенатах.*

Мы сравнили ингибирующее действие CX (заряд -1) и ФХ (заряд -2). В экспериментах с нейтрофилами ФХ был существенно эффективнее, чем его сульфатный аналог (рис.2а). Так, ФХ в концентрации 50 мкМ снижал количество продуктов 5-LO активности на 56%, а CX - на 23%. В клетках RBL-1 оба производных оказали соизмеримое воздействие: ингибирование на 77% и 74% с 50 мкМ ФХ и CX соответственно.

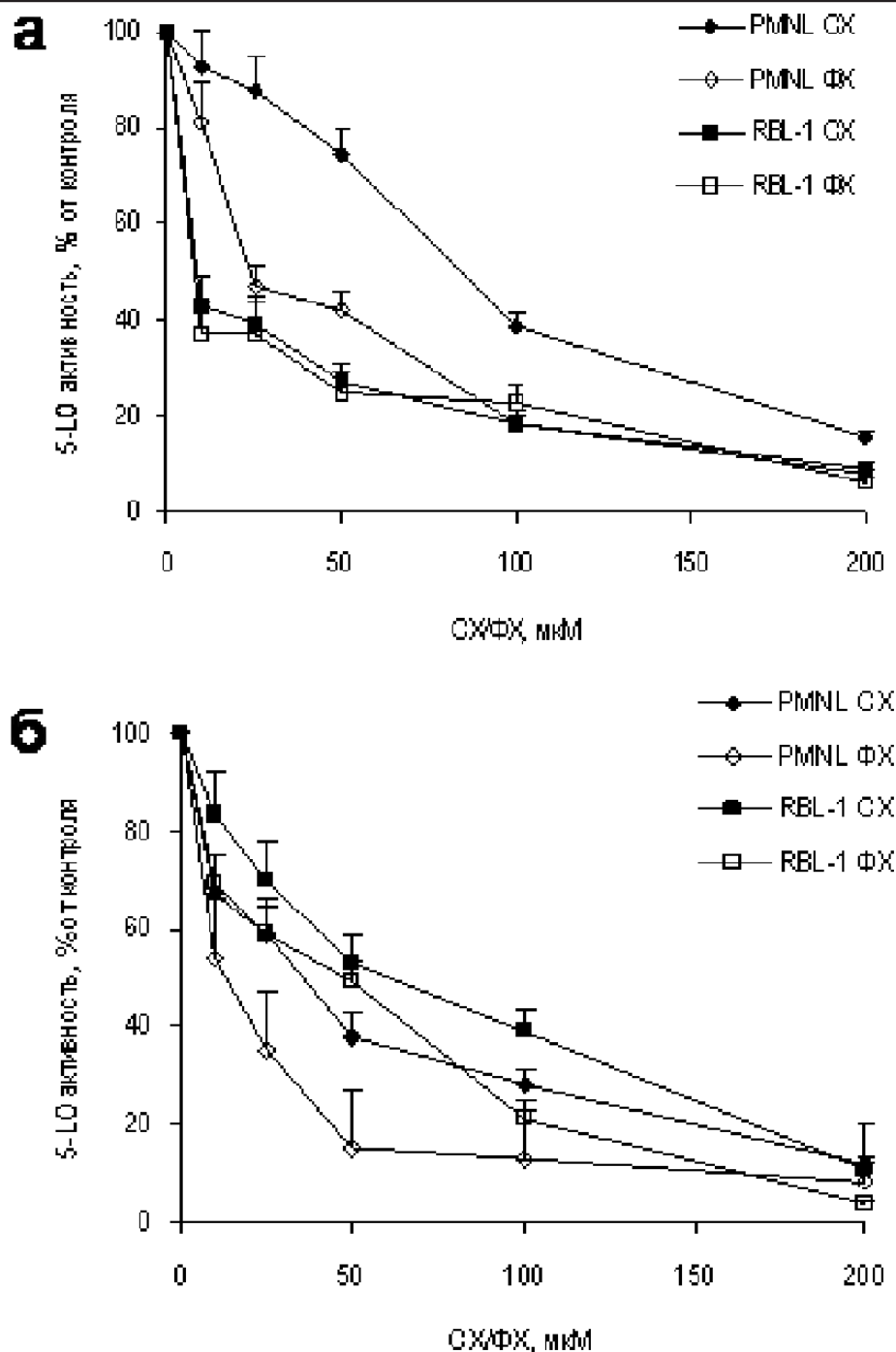


Рисунок 2.

Ингибирование синтеза 5-LO продуктов (5-HETE + LTs) в PMNL, RBL-1 и их гомогенатах. **а** - CX и FX подавляют липоксигеназную активность в суспензионных клетках (в присутствии 20 мкМ АА). **б** - CX и FX подавляют липоксигеназную активность в клеточных гомогенатах (в присутствии 20 мкМ АА). Приведены средние значения по 3 независимым экспериментам  $\pm$  стандартное отклонение.

Для того чтобы исключить влияние системы внутриклеточной регуляции и изучить прямое воздействие CX и FX на активность 5-LO, были проведены эксперименты на клеточных гомогенатах PMNL и RBL-1. На рисунке 2б представлена зависимость активности 5-LO от концентрации ингибиторов при концентрации АА 20 мкМ. Оба производных холестерина проявили ингибирующее действие и на разрушенных клетках. Специфичность в действии ингибиторов отчетливо наблюдалась на препаратах из нейтрофилов: FX был

значительно активнее, чем СХ. Проявились достоверные различия между двумя производными холестерина и в экспериментах на гомогенатах RBL-1, чего не наблюдалось на целых клетках. В клеточных гомогенатах ФХ во всех случаях оказался более эффективным ингибитором, чем СХ.

*Кинетические закономерности действия ФХ.*

Для определения механизма действия анионных производных холестерина были проведены кинетические исследования 5-липоксигеназного окисления АА на гомогенате клеток RBL-1, с использованием ФХ. Время инкубации составило 1 мин (синтез продукта за первую минуту аппроксимировали как начальную скорость), в остальном эксперимент проводился, как описано выше для клеточных гомогенатов. Результаты, линеаризованные в координатах Лайнуивера-Берка, позволяют сделать вывод, что ФХ является неконкурентным ингибитором активности 5-ЛО (рис. 3а). Из данного графика была определена  $K_M = 34$  мкМ. Пересечение прямых с осью ординат позволило определить эффективные значения  $V_{max}$ . Построение в координатах  $1/V_{max}$  от концентрации ингибитора даёт величину константы ингибирования  $K_i = 110$  мкМ для ФХ в гомогенате RBL-1 (рис. 3б).

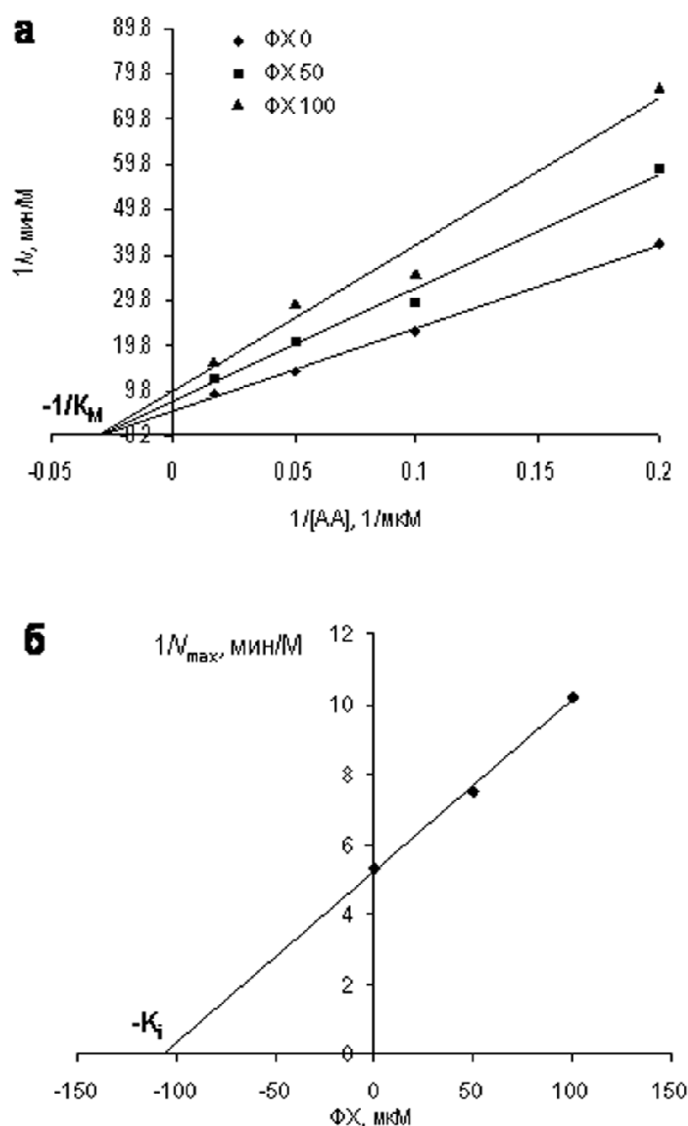


Рисунок 3.

Характеристика действия ФХ на активность 5-ЛО в гомогенате клеток RBL-1. **а** - результаты, представленные в координатах Лайнуивера-Берка. Использовались концентрации АА 5, 10, 20 мкМ. **б** - определение  $K_i$  для ФХ. Приведены средние значения по 3 независимым экспериментам.



## ИНГИБИРОВАНИЕ 5-ЛИПОКСИГЕНАЗЫ ПРОИЗВОДНЫМИ ХОЛЕСТЕРИНА

Ингибирование синтеза LTs в нейтрофилах человека анионными липидами было впервые описано для сульфатированных галактоцереброзидов - сульфатидов [13]. В данной работе мы исследовали, есть ли корреляция с зарядом анионной группы, и на примере эфиров холестерина обнаружили усиление ингибирующего действия с ростом величины заряда и неконкурентный механизм ингибирования 5-LO под действием ФХ. Во всех экспериментах ФХ (заряд -2) проявил более сильное ингибирующее воздействие, чем СХ (заряд -1). Мы считаем, что это говорит в пользу существенного электростатического вклада отрицательно заряженных групп эфиров холестерина в подавление 5-LO активности.

В животной клетке активность 5-LO находится под контролем концентрации внутриклеточного кальция, доступности свободной АА и регулируется внутриклеточным уровнем АТФ [14]. Дополнительная регуляция происходит под действием факторов, влияющих на состав и структуру клеточных мембран [15]. Из экспериментов с модельными мембранами известно, что флюидизация мембран стимулирует 5-LO [16]. Природное вещество СХ в клеточных мембранах играет стабилизирующую роль и повышает устойчивость мембран к лизису [17]. СХ и ФХ способны проникать внутрь клетки и оказывать прямое или опосредованное мембранными эффектами влияние на 5-LO. Модификация клеточной мембраны отрицательно заряженными эфирами холестерина может приводить к ингибированию транслокации 5-LO, что нами ранее было установлено для СХ [10]. На клеточных гомогенатах в данной работе нами впервые показано прямое неконкурентное ингибирование 5-LO фосфатом холестерина, с константой ингибирования 110 мкМ. Нельзя исключить комплексного влияния анионных липидов также на связывание ионов кальция и АТФ, необходимых для активации фермента. Мы предполагаем, что сульфатированные липиды являются специфическими эндогенными регуляторами синтеза LTs в нейтрофилах, и адгезия играет важнейшую роль в такой регуляции.

Работа была выполнена при поддержке РФФИ (грант № 04-04-48495).

Выражаем глубокую признательность М.А. Пушкаревой и С.И. Галкиной за содействие в выделении PMNL и получении электронных микрофотографий, а также Е.М. Волкову за любезную помощь в синтезе ФХ.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Ross R., Glomset J., Harker L. (1977) *Am. J. Pathol.*, **86**, 675-684.
2. Munro J.M., Cotran R.S. (1988) *Lab. Invest.*, **58**, 249-261.
3. Heitzer T., Schlinzig T., Krohn K., Meinertz T. (2001) *Circulation*, **104**, 2673-2678.
4. Cullen P., Rauterberg J., Lorkowski S. (2005) *Handb. Exp. Pharmacol.*, **170**, 3-70.
5. Samuelsson B. (1983). *Science*, **220**, 568-575.
6. Mehrabian M., Allayee H. (2003) *Curr. Opin. Lipidol.*, **14**, 447-457.
7. Ghosh J., Myers C.E. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 13182-13187.
8. Alanko J., Sievi E., Lahteenmaki T., Mucha I., Vapaatalo H., Parantainen J. (1998) *Biochem. Pharmacol.*, **55**, 101-104.
9. Steinhilber D. (1999) *Curr. Med. Chem.*, **6**, 69-83.
10. Aleksandrov D.A., Zagryagskaya A.N., Pushkareva M.A., Bachschmid M., Peters-Golden M., Werz O., Steinhilber D., Sud'ina G.F. (2006) *FEBS J.*, **273**, 548-557.
11. Galkina S.I., Dormeneva E.V., Bachschmid M., Pushkareva M.A., Sud'ina G.F., Ullrich V. (2004) *Med. Sci. Monit.*, **10**, BR307-316.
12. Sud'ina G.F., Mirzoeva O.K., Galkina S.I., Pushkareva M.A., Ullrich V. (1998) *FEBS Lett.*, **423**, 243-248.

13. *Sud'ina G.F., Brock T.G., Pushkareva M.A. Galkina S.I., Turutin D.V., Peters-Golden M., Ullrich V. (2001) Biochem. J., 359, 621-629.*
14. *Rouzer C.A., Matsumoto T., Samuelsson B. (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83, 857-861.*
15. *Rouzer C.A., Samuelsson B. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7393-7397.*
16. *Pande A.H., Qin S., Tatulian S.A. (2005) Biophys. J., 88, 4084-4094.*
17. *Bleau G., Lahumiure G., Chapdelaine A., Roberts K. (1975) Biochim. Biophys. Acta., 375, 220-223.*

Поступила: 01. 08. 2006.

#### SUPPRESSION OF 5-LIPOXYGENASE ACTIVITY BY ANIONIC CHOLESTEROL DERIVATIVES

*D.A. Aleksandrov<sup>1</sup>, G.F. Sud'ina<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>School of Chemistry, Moscow State University, 119992, Russia, tel.: +7 495 9393174;  
fax: +7 495 9393181; e-mail: alex-1-a-rus@yandex.ru

<sup>2</sup>A.N. Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Leninskie Gory, Moscow;  
e-mail: sudina@genebee.msu.ru.

5-Lipoxygenase (5-LO) is a key enzyme involved in leukotriene (LTs) biosynthesis which act as host defense mediators, and inflammatory agents as well. In this work the influence of anionic cholesterol derivatives on 5-LO activity has been investigated. Cholesterol sulfate activated human polymorphonuclear leukocytes (PMNL) and stimulated their adhesion to endothelium and collagen. Cholesterol sulfate and cholesterol phosphate suppressed leukotriene production in PMNL and in rat RBL-1 cells. Kinetic characteristics of this process are presented. Cholesterol phosphate (charge -2) was shown to be more potent inhibitor than cholesterol sulfate (charge -1) in all experiments. We suppose that this fact highlights the importance of negatively charged ester groups to suppress 5-LO activity.

**Key words:** atherosclerosis, inflammation, neutrophil, 5-lipoxygenase, cholesterol sulfate, cholesterol phosphate.