

УДК 547.915.5-547.458.2-577.15

©Коллектив авторов

ИНГИБИРОВАНИЕ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЭФФЕКТОВ ЛИПОПОЛИСАХАРИДА БАКТЕРИЙ ПРОДУКТАМИ ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ

А.А. Коротаева^{1}, Л.М. Самоходская², В.Н. Бочков²*

¹ФГУ Российский кардиологический научно-производственный комплекс
Росздрава, 121552, Москва, 3-я Черепковская, 15А; тел.: (495) 414-67-14;
эл.почта: A.Korot@cardio.ru

²Факультет фундаментальной медицины МГУ им. М.В. Ломоносова, г. Москва

Ранее было показано, что окисленный пальмитоил-арахидоноил-фосфатидилхолин (ПАФХ) подавляет воспалительные эффекты эндотоксина бактерий - липополисахарида (ЛПС). В настоящей работе была исследована анти-эндотоксиновая активность других классов окисленных фосфолипидов, несущих различные полярные группы и жирные кислоты. Обнаружено, что способностью подавлять ЛПС-индуцированную экспрессию Е-селектина на поверхности эндотелиальных клеток человека обладают продукты окисления фосфатидилхолина, фосфатидилсерина, фосфатидилэтаноламина и фосфатидной кислоты. Тип эстерифицированной полиненасыщенной жирной кислоты не играл существенной роли в ингибировании действия ЛПС. Нативные неокисленные фосфолипиды не влияли на эффекты ЛПС. Таким образом, определяющим для проявления анти-эндотоксиновых свойств фосфолипидов является наличие модифицированного окислением жирнокислотного остатка.

Ключевые слова: фосфолипиды, жирные кислоты, окисление, липополисахарид, воспаление

ВВЕДЕНИЕ. Окисление липидов сопровождает многие патологические процессы, включая острое и хроническое воспаление. При остром воспалении лейкоциты с помощью ферментов NADPH-оксидазы и миелопероксидазы производят активные формы кислорода, которые убивают микроорганизмы, но также могут повреждать и ткани макроорганизма [1, 2]. Хронический окислительный стресс приводит к накоплению разнообразных продуктов окисления липидов, что особенно ярко наблюдается при атерогенезе. Фосфолипиды, содержащие в своем составе полиненасыщенные жирные кислоты, особенно подвержены окислению [3]. Было показано, что фосфолипиды, содержащие фрагментированные или оксигенированные продукты арахидоновой кислоты в *sn*-2 положении, обладают целым рядом активностей, имеющих отношение к воспалению. Окисленные фосфолипиды (ОкФЛ) стимулируют взаимодействие эндотелиальных клеток с лейкоцитами, а также стимулируют экспрессию цитокинов клетками сосудистой стенки [4-6]. В атеросклеротических сосудах, а также в клетках, стимулированных воспалительными цитокинами, было идентифицировано несколько молекулярных

Принятые сокращения: ОкФЛ – окисленные фосфолипиды, ЛПС – липополисахарид, ПАФХ – окисленный пальмитоил-арахидоноил-фосфатидилхолин, ПАФЭ – пальмитоил-арахидоноил-фосфатидилэтаноламин, ПАФС – пальмитоил-арахидоноил-фосфатидилсерин, ПАФК – пальмитоил-арахидоноил-фосфатидная кислота, ПЛФХ – пальмитоил-линолеоил-фосфатидилхолин, ПОВФХ – пальмитоил-оксвалероил-фосфатидилхолин, ПГФХ – пальмитоил-глутароил-фосфатидилхолин.

*Адресат для переписки

типов ОкФЛ, включая 1-пальмитоил-2-(5-оксоалероил)-*sn*-глицеро-3-фосфохолин (ПОВФХ), 1-пальмитоил-2-глутароил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин (ПГФХ), а также фосфатидилхолин, содержащий эстерифицированный эпоксиизопростан, эпоксициклопентенон или гидроксикапелланаль [4, 6]. Эти данные свидетельствуют, что ОкФЛ могут быть одним из факторов, способствующих развитию хронического воспаления, характерного для атеросклероза [7].

В последние годы появились доказательства того, что ОкФЛ в определенных ситуациях могут также оказывать противовоспалительные эффекты, например, подавлять экспрессию молекул клеточной адгезии, вызванную эндотоксином бактерий - липополисахаридом (ЛПС). Ранее было показано, что окисленный фосфатидилхолин селективно ингибирует эффекты ЛПС, не влияя на действие других воспалительных агонистов, таких как TNF- α и IL-1 [8]. Было высказано предположение, что ОкФЛ блокируют рецептор ЛПС, но не ингибируют внутриклеточные сигнальные механизмы. На основании этих данных можно предположить, что ОкФЛ, накапливающиеся в местах воспаления, могут действовать в качестве сигнала отрицательной обратной связи, подавляя избыточную активацию иммунных реакций бактериальными продуктами. Имеются данные, демонстрирующие анти-эндотоксиновую активность окисленного фосфатидилхолина, содержащего пальмитиновую и арахидоновую кислоты (ПАФХ) [8]. Кроме того, была описана анти-эндотоксиновая активность стеароил-арахидоноил-фосфатидилэтаноламина [9]. Поскольку неизвестно, появляется ли подобная активность при окислении других классов фосфолипидов, невозможно оценить количество неокисленных предшественников, доступных для образования антагонистов ЛПС *in vivo*. Целью настоящей работы был анализ анти-эндотоксиновой активности ОкФЛ, несущих различные полярные группы и жирные кислоты.

МЕТОДИКА. Фосфолипиды были получены от Avanti Polar Lipids, Inc. В работе использовали липополисахарид из *E. coli* серотип 055:B5, а также реагенты производства фирмы Sigma-Aldrich.

Окисление фосфолипидов производили кислородом воздуха по описанному ранее методу [4]. Такая процедура позволяет получить окисленные фосфолипиды, идентичные обнаруженным в атеросклеротических сосудах и в клетках, обработанных воспалительными цитокинами [4, 6]. В ходе процедуры окисления липиды периодически растворяли в хлороформе и отбирали аликвоты для проведения ТСХ и масс-спектрометрии по ранее описанным методам [4]. При недостаточной степени окисления раствор высушивали и продолжали инкубацию на воздухе. Процесс останавливали в тот момент, когда количество исходного неокисленного фосфолипида снижалось приблизительно до 20% от общего количества присутствующих в растворе фосфолипидов. ПОВФХ и ПГФХ синтезировали из ПАФХ и лизофосфатидилхолина соответственно [4, 10].

Эндотелиальные клетки из вены пуповины человека (human umbilical vein endothelial cells, HUVEC) получали и культивировали, как описано ранее [11]. Обработку HUVEC фосфолипидами и ЛПС проводили в среде 199, содержащей 10% фетальной сыворотки. Экспрессию Е-селектина на поверхности клеток измеряли после фиксации HUVEC глутаральдегидом с помощью моноклональных антител (R&D Systems) и вторых антител, конъюгированных с пероксидазой по ранее описанной методике [12]. В качестве субстрата использовали *орто*-фенилендиамин.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Ранее было показано, что окисленный фосфатидилхолин способен ингибировать воспалительные реакции, вызванные ЛПС [8]. Мы изучили влияние различных классов ОкФЛ на ЛПС-индуцированное воспаление. С этой целью измеряли повышение экспрессии Е-селектина на поверхности эндотелиальных клеток под действием ЛПС. Данный эффект опосредуется клеточным рецептором ЛПС – Toll-like 4 и классическим транскрипционным NF κ B-механизмом воспаления. В работе были использованы только высокочистые фосфолипиды, полученные синтетическим путём. Для сравнения роли полярных групп все исходные фосфолипиды содержали одинаковые жирные кислоты: пальмитиновую кислоту в *sn*-1 положении и

арахионовую кислоту в *sn*-2 положении. Было обнаружено, что все исследуемые ОкФЛ подавляли ЛПС-индуцированную экспрессию Е-селектина на эндотелиальных клетках. Активность ОкФЛ изменялась в следующем порядке: ОкПАФС > ОкПАФЭ > ОкПАФХ > ОкПАФК (рис. 1, а-г, таблица). ОкПАФС ингибировал действие ЛПС в более низких концентрациях, чем ОкПАФХ (таблица). Нативные фосфолипиды не ингибировали действие ЛПС. Способность подавлять действие ЛПС фосфолипиды приобретали только после окисления (рис. 2). Это свидетельствует о том, что ингибирование воспалительной реакции не является результатом простой адсорбции ЛПС на липидах, снижающей количество ЛПС, доступного для взаимодействия с клеточными рецепторами.

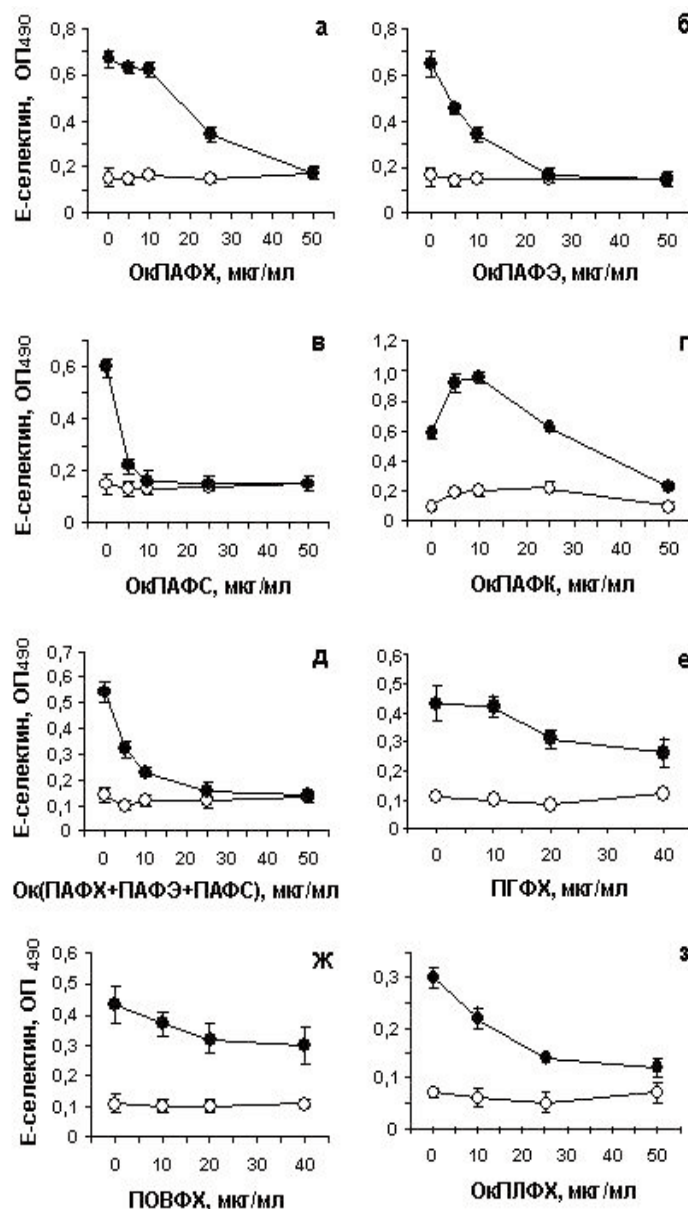


Рисунок 1.

Влияние окисленных фосфолипидов на базальную и ЛПС-индуцированную экспрессию Е-селектина на поверхности HUVEC. HUVEC прединкубировали 20 мин с указанными концентрациями липидов в среде 199 с 10% сыворотки, после чего добавляли ЛПС до 300 нг/мл. Через 4 часа клетки промывали, фиксировали и окрашивали антителами на Е-селектин. Светлые кружки соответствуют эффектам окисленных фосфолипидов. Тёмные кружки соответствуют эффектам окисленных фосфолипидов в сочетании с ЛПС. Приведены средние значения \pm стандартное отклонение трех измерений, проведенных в одном эксперименте. Аналогичные результаты были получены в трех независимых экспериментах.

ОКИСЛЕННЫЕ ЛИПИДЫ ИНГИБИРУЮТ ЭФФЕКТЫ ЛПС

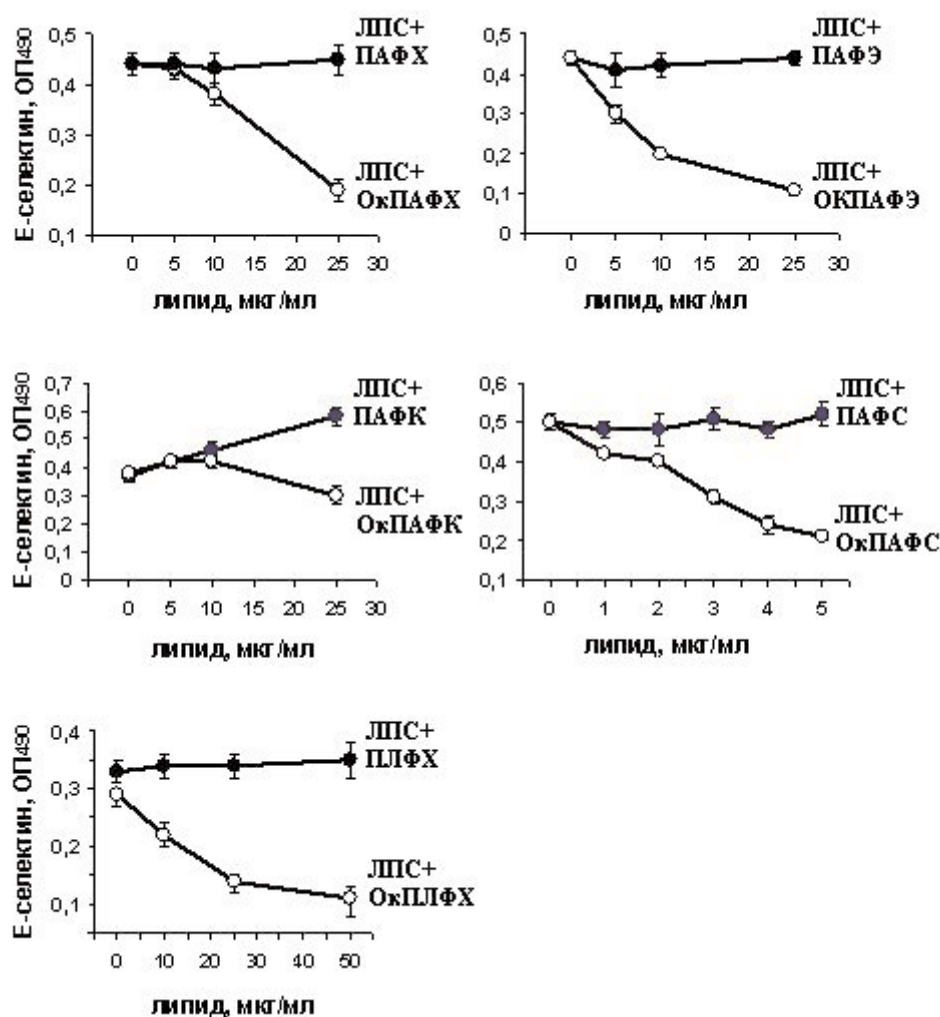


Рисунок 2.

Анти-эндотоксиновая активность окисленных фосфолипидов. Условия приведены в подписи к рисунку 1. Светлые кружки соответствуют эффектам окисленных фосфолипидов в сочетании с ЛПС. Тёмные кружки соответствуют эффектам нативных фосфолипидов в сочетании с ЛПС. Приведены средние значения \pm стандартное отклонение трех измерений, проведенных в одном эксперименте. Аналогичные результаты были получены в двух дополнительных экспериментах.

Таблица. Концентрации, вызывающие полумаксимальное ингибирование ЛПС-индуцированной экспрессии Е-селектина.

ОкПАФХ	ОкПАФЭ	ОкПАФС	Ок (ФХ+ФЭ+ФС)	ОкПАФК	ОкПЛФХ	ПОВФХ	ПГФХ
19,0-21,0	6,5-7,1	3,1-3,2	5,0	40,0	15,0-18,0	19,0-50,0	30,0

Обработку клеток и анализ проводили как описано в подписи к рис. 1. Концентрации липидов выражены в мкг/мл.

Проанализированные в наших экспериментах ОкФЛ сами не усиливали экспрессию Е-селектина, за исключением ОкПАФК (рис. 1, г). ОкПАФК при концентрациях ниже 10 мкг/мл слегка повышала базальный уровень экспрессии Е-селектина и усиливала эффекты ЛПС, однако при более высоких концентрациях ОкПАФК полностью подавляла вызванную ЛПС экспрессию Е-селектина (рис. 1, г). Мы полагаем, что потенцирующий эффект ОкПАФК связан с образованием лизофосфатидной кислоты, которая повышает экспрессию Е-селектина на эндотелиальных клетках, действуя через рецептор Edg-1 [13].

Продукты окисления фосфолипидов потенциально способны реагировать друг с другом. Например, ОкФЛ, содержащие альдегидные группы, такие как пальмитоил-оксвалероил-фосфатидилхолин (ПОВФХ), образуют аддукты с фосфатидилэтаноламином [14]. Мы проверили, не приводит ли окисление смеси полиненасыщенных фосфолипидов к образованию дополнительных продуктов окисления, не образующихся при окислении индивидуальных фосфолипидов. Такой подход имитирует ситуацию *in vivo*, когда окислению подвергается сложная смесь фосфолипидов, входящих в состав клеточных мембран и липопротеинов. Оказалось, что ингибирующий эффект смеси ОкПАФХ, ОкПАФЭ и ОкПАФС приблизительно равнялся ингибирующему действию индивидуально окисленных фосфолипидов (рис. 1, д). Таким образом, окисление смеси фосфолипидов не приводило к образованию дополнительных веществ, ингибирующих действие ЛПС.

При окислении ПАФХ образуется несколько продуктов, два из которых были структурно идентифицированы как ПОВФХ и пальмитоил-глутароил-фосфатидилхолин (ПГФХ) [4]. ПОВФХ в *sn*-2 положении содержит ω -альдегидную группу, а ПГФХ - ω -карбоксильную. ПОВФХ и ПГФХ не содержат двойных связей и таким образом являются инертными в отношении реакций перекисного окисления липидов. Мы синтезировали ПОВФХ и ПГФХ и проанализировали их анти-эндотоксиновую активность. Оба вещества подавляли ЛПС-индуцированную экспрессию Е-селектина эндотелиальными клетками в сходных концентрациях (рис. 1, е, ж). Эти результаты свидетельствуют о том, что способность ОкФЛ подавлять действие ЛПС не зависит от типа ω -терминальной группы в *sn*-2 положении и не является результатом действия липидных радикалов или других высокорекреационных продуктов перекисного окисления.

Наиболее распространенная полиненасыщенная жирная кислота у млекопитающих – линолевая (18:2), из которой в результате перекисного окисления образуются 9-углеродные фрагменты, содержащие ω -терминальную гидроксильную, карбоксильную или альдегидную группы. При окислении арахидоновой кислоты, отличающейся иным расположением двойных связей, преимущественно образуются аналогичные продукты, но длиной 5 углеродных остатков [15]. Мы обнаружили, что окисление фосфатидилхолина, содержащего линолевую кислоту (ПЛФХ), приводит к образованию соединений с анти-эндотоксиновой активностью (рис. 1, з). Таким образом, фосфолипиды, различающиеся не только по полярным группам, но и по типу ненасыщенных жирных кислот, также способны вносить вклад в образование ОкФЛ, являющихся антагонистами ЛПС.

Основной задачей настоящего исследования было изучение связи между способностью ОкФЛ подавлять ЛПС-индуцированные воспалительные реакции и их структурными характеристиками, в первую очередь, с типом полярной группы в *sn*-3 положении. Ранее было показано, что способностью ингибировать действие ЛПС обладают ОкФЛ, содержащие положительно заряженные полярные группы (фосфатидилхолин и фосфатидилэтаноламин) [9, 16]. В данной работе мы впервые показали, что сходной активностью обладают также отрицательно заряженные фосфатидилсерин и фосфатидная кислота. Таким образом, структура и заряд полярной группы ОкФЛ не являются определяющими для проявления их анти-эндотоксиновой активности. Вместе с тем, наши данные показывают, что окисление эстерифицированных полиненасыщенных жирных кислот является

абсолютно необходимым для появления у фосфолипидов анти-эндотоксина активности. Таким образом, способность ингибировать действие эндотоксина, главным образом, связана с наличием окислительно модифицированных жирнокислотных остатков, а не с типом полярной группы. Ранее аналогичная структурно-функциональная закономерность была описана для способности ОкФЛ индуцировать связывание эндотелиальных клеток с моноцитами [9]. Для выяснения вопроса о причинах сходства структурных характеристик, ответственных за проявление этих, на первый взгляд, не связанных друг с другом видов биологической активности ОкФЛ необходимы дальнейшие исследования.

Ранее высказывалась гипотеза о том, что накопление ОкФЛ в очагах острого бактериального воспаления может приводить к блокированию воспалительной реакции, вызванной бактериальными продуктами типа ЛПС [8]. Другими словами, ОкФЛ могут служить химическим сигналом отрицательной обратной связи, выключающей воспаление в тех случаях, когда производство лейкоцитами бактерицидных форм кислорода становится чрезмерным и приводит к повреждению собственных молекул макроорганизма. Полученные в настоящей работе данные свидетельствуют в пользу этой гипотезы. Мы показали, что несколько наиболее распространенных классов фосфолипидов, составляющих основную массу фосфолипидов клеточных мембран и липопротеинов, являются предшественниками для образования антагонистов эндотоксина. Более того, тип окисляемой полиненасыщенной жирной кислоты не оказывает существенного влияния на способность ОкФЛ подавлять действие ЛПС. Таким образом, присутствие в тканях высоких концентраций предшественников антагонистов ЛПС позволяет предположить, что эти вещества могут накапливаться в очагах воспаления в количествах, достаточных для проявления их противовоспалительного действия.

Несмотря на то, что все исследованные нами классы ОкФЛ обладают принципиально сходной способностью ингибировать действие ЛПС, количественные характеристики этого антагонизма зависят от типа полярной группы. Мы обнаружили, что окисленный фосфатидилсерин ингибирует действие ЛПС в существенно более низких концентрациях, чем положительно заряженные ОкФЛ. Фосфатидилсерин преимущественно окисляется в ходе мембранных перестроек при апоптозе [17]. Это позволяет предположить, что анти-эндотоксиновый эффект окисленного фосфатидилсерина может играть особую роль в тканях с повышенным уровнем апоптоза. Кроме того, концентрационные различия между классами фосфолипидов по способности подавлять эффекты ЛПС доказывают принципиальную возможность синтеза антагонистов эндотоксина, обладающих более высокой афинностью.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что окисление фосфолипидов приводит к образованию антагонистов эндотоксина, что может служить одним из механизмов торможения воспалительных реакций по механизму отрицательной обратной связи.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (гранты 04-04-49427 и 04-04-49203).

ЛИТЕРАТУРА

1. Babior B.M. (2000) *Am. J. Med.*, **109**, 33-44.
2. Zhang R., Brennan M.L., Shen Z., MacPherson J.C., Schmitt D., Molenda C.E., Hazen S.L. (2002) *J. Biol. Chem.*, **277**, 46116-46122.
3. Reaven P., Parthasarathy S., Grasse B.J., Miller E., Steinberg D., Witztum J.L. (1993) *J. Clin. Invest.*, **91**, 668-676.
4. Watson A.D., Leitinger N., Navab M., Faull K.F., Horkko S., Witztum J.L., Palinski W., Schwenke D., Salomon R.G., Sha W., Subbanagounder G., Fogelman A.M., Berliner J.A. (1997) *J. Biol. Chem.*, **272**, 13597-13607.

5. Watson A.D., Subbanagounder G., Welsbie D.S., Faull K.F., Navab M., Jung M.E., Fogelman A.M., Berliner J.A. (1999) *J. Biol. Chem.*, **274**, 24787-24798.
6. Subbanagounder G., Wong J.W., Lee H., Faull K.F., Miller E., Witztum J.L., Berliner J.A. (2002) *J. Biol. Chem.*, **277**, 7271-7281.
7. Leitinger N. (2003) *Curr. Opin. Lipidol.*, **14**, 421-430.
8. Bochkov V.N., Kadl A., Huber J., Gruber F., Binder B.R., Leitinger N. (2002) *Nature*, **419**, 77-81.
9. Subbanagounder G., Leitinger N., Schwenke D.C., Wong J.W., Lee H., Rizza C., Watson A.D., Faull K.F., Fogelman A.M., Berliner J.A. (2000) *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **20**, 2248-2254.
10. Ravandi A., Kuksis A., Myher J.J., Marai L. (1995) *J. Biochem. Biophys. Methods*, **30**, 271-285.
11. Zhang J.C., Fabry A., Paucz L., Wojta J., Binder B.R. (1996) *Blood*, **88**, 3880-3886.
12. Bochkov V.N., Mechtcheriakova D., Lucerna M., Huber J., Malli R., Graier W.F., Hofer E., Binder B.R., Leitinger N. (2002) *Blood*, **99**, 199-206.
13. Rizza C., Leitinger N., Yue J., Fischer D.J., Wang D.A., Shih P.T., Lee H., Tigyi G., Berliner J.A. (1999) *Lab. Invest.*, **79**, 1227-1235.
14. Friedman P., Horkko S., Steinberg D., Witztum J.L., Dennis E.A. (2002) *J. Biol. Chem.*, **277**, 7010-7020.
15. McIntyre T.M., Zimmerman G.A., Prescott S.M. (1999) *J. Biol. Chem.*, **274**, 25189-25192.
16. Leitinger N., Tyner T.R., Oslund L., Rizza C., Subbanagounder G., Lee H., Shih P.T., Mackman N., Tigyi G., Territo M.C., Berliner J.A., Vora D.K. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 12010-12015.
17. Kagan V.E., Gleiss B., Tyurina Y.Y., Tyurin V.A., Elenstrom-Magnusson C., Liu S.X., Serinkan F.B., Arroyo A., Chandra J., Orrenius S., Fadeel B. (2002) *J. Immunol.*, **169**, 487-499.

Поступила: 27. 01. 2006.

INHIBITION OF LYPOPOLYSACCHARIDE-INDUCED INFLAMMATION BY OXIDIZED PHOSPHOLIPIDS

A.A. Korotaeva¹, L.M. Samokhodskaya², V.N. Bochkov²

¹Russian Cardiology Scientific Research Center, 3-ya Cherepkovskaya ul, 15A, Moscow, 121552 Russia; tel./fax: (095)414-67-19; e-mail: A.Korot@cardio.ru

²Faculty of Basic Medicine, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

Previous studies demonstrated that oxidized 1-palmitoyl-2-arachidonoyl-*sn*-glycero-3-phosphorylcholine inhibits inflammatory effects of the bacterial lipopolysaccharide (LPS, endotoxin). In this work we have characterized the anti-endotoxin activity of other classes of oxidized phospholipids with different polar head groups and fatty acid residues. LPS-induced expression of E-selectin on human endothelial cells was inhibited by oxidized phosphatidylcholine, phosphatidylserine, phosphatidylethanolamine, and phosphatidic acids. The anti-endotoxin effect insignificantly depended on the type of polyunsaturated fatty acids. Unoxidized phospholipids did not suppress effects of LPS. Thus, the anti-endotoxin activity of oxidized phospholipids crucially depends on the presence of oxidatively modified fatty acid residue.

Key words: phospholipids, fatty acids, oxidation, lipopolysaccharide, inflammation.