©Коллектив авторов

ФОСФОЛИПАЗА D: ЕЁ РОЛЬ В ПРОЦЕССАХ МЕТАБОЛИЗМА И РАЗВИТИИ ПАТОЛОГИЧЕСКИХ СОСТОЯНИЙ

Г.В. Раменская[1], Е.В. Мельник[1], А.Е. Петухов[1,2]*

[1]Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова (Сеченовский Университет), Москва
[2]Московский научно-практический центр наркологии,
109390, Москва, ул. Люблинская, 37/1; эл. почта: a-l-e-x4@yandex.ru

Фосфолипаза D (PLD, классификационный номер - EC 3.1.4.4) является одним из ключевых ферментов, осуществляющих гидролиз фосфолипидов клеточных мембран. В статье рассмотрены и обобщены данные, накопленные об известных на сегодняшний день 6-ти изоформах PLD, обнаруженных в организме человека, относящиеся к их строению, роли в физиологических и патологических процессах. Приводится сравнительный анализ строения изоформ PLD. Описан механизм реакций гидролиза и трансфосфатидилирования, катализируемых PLD. Анализируется роль PLD1 и PLD2 в патогенезе некоторых онкологических и инфекционных заболеваний, тромботических состояний и нейродегенеративных расстройств. Показана перспективность поиска селективных ингибиторов для изоформ PLD с целью возможного их включения в схему лечения различных заболеваний, а также охарактеризованы уже созданные ингибиторы PLD. Приведена характеристика биомаркера злоупотребления алкоголем фосфатидилэтанола (PEth), образующегося в результате реакции трансфосфатидилирования фосфолипидов в организме человека.

Ключевые слова: фосфолипаза D (PLD), изоформы фосфолипазы D, ингибиторы фосфолипазы D, фосфатидилэтанол (PEth), биомаркеры злоупотребления алкоголем

DOI: 10.18097/PBMC20186401084

1. ФОСФОЛИПАЗА D (PLD) И ЕЁ ФЕРМЕНТАТИВНАЯ АКТИВНОСТЬ

Современное состояние медицины характеризуется повышенным интересом к детальному изучению роли различных ферментов в физиологических и патологических процессах. Одним из таких ферментов является фосфолипаза D (PLD, классификационный номер – EC 3.1.4.4), мишенью действия которой являются фосфолипиды клеточных мембран. В результате гидролиза фосфодиэфирной связи фосфолипидов под действием PLD образуется фосфатидная кислота (PA), являющаяся вторичным мессенджером в различных сигнальных путях и участвующая во многих клеточных процессах [1].

Впервые PLD была обнаружена в моркови и листьях капусты в конце 1940-х годов [2, 3]. В дальнейшем было установлено, что PLD представлена различными изоформами, относящимися к одному суперсемейству фосфолипаз D, которые были найдены у вирусов, прокариотов и эукариотов – дрожжей, слизевиков, растений, млекопитающих [4]. Изоформы PLD обладают отличительными высококонсервативными каталитическими последовательностями аминокислот H-x-K-x-x-x-x-D(6x)GSxN (HKD, где H – гистидин, K – лизин, D – аспарагиновая кислота, G – глицин, S – серин, N – аспарагин, x – любая аминокислота), расположенными во II и IV мотивах активного центра фермента и необходимыми для осуществления ферментативной активности (рис. 1) [5, 6].

Существуют также ферменты, не имеющие HKD последовательности, но способные гидролизовать фосфолипиды, поэтому исторически некоторые из них были названы PLD, хотя они не принадлежат к суперсемейству фосфолипаз D. К ним относятся PLD, продуцируемые *Streptomyces chromofuscius, Corynebacterium*, *Arcanobacterium,* и даже изоформы цитохрома P-450 CYP1A2 и CYP2E1, гидролизующие фосфатидилхолин в гепатоцитах [4, 7].

Помимо гидролитической активности PLD катализирует реакции трансфосфатидилирования в присутствии таких нуклеофилов, как различные первичные спирты (этанол, *н*-бутанол), в результате чего образуются фосфатидилспирты [4]. Предполагается, что благодаря схожему строению активного центра различные изоформы PLD осуществляют ферментативную активность по одинаковому двухступенчатому S_N2 пинг-понг-механизму без обращения конфигурации субстрата. При сближении двух HKD последовательностей формируется каталитический центр PLD, и происходит нуклеофильная атака атома фосфора субстрата имидазольным остатком гистидина, расположенного с N-конца, с образованием ковалентносвязанного фосфатидил-гистидинового интермедиата (стадия 1, рис. 2). С-концевой остаток гистидина служит донором протона для уходящей группы (стадия 2, рис. 2). Так как из фосфолипидов клеточных мембран наиболее распространён фосфатидилхолин, чаще всего уходящей группой является холин. Последующая нуклеофильная атака водой или первичным спиртом разрушает интермедиат с высвобождением фосфатидной кислоты или фосфатидилспирта (стадии 3 и 4, рис. 2) [4, 8-10].

* - адресат для переписки

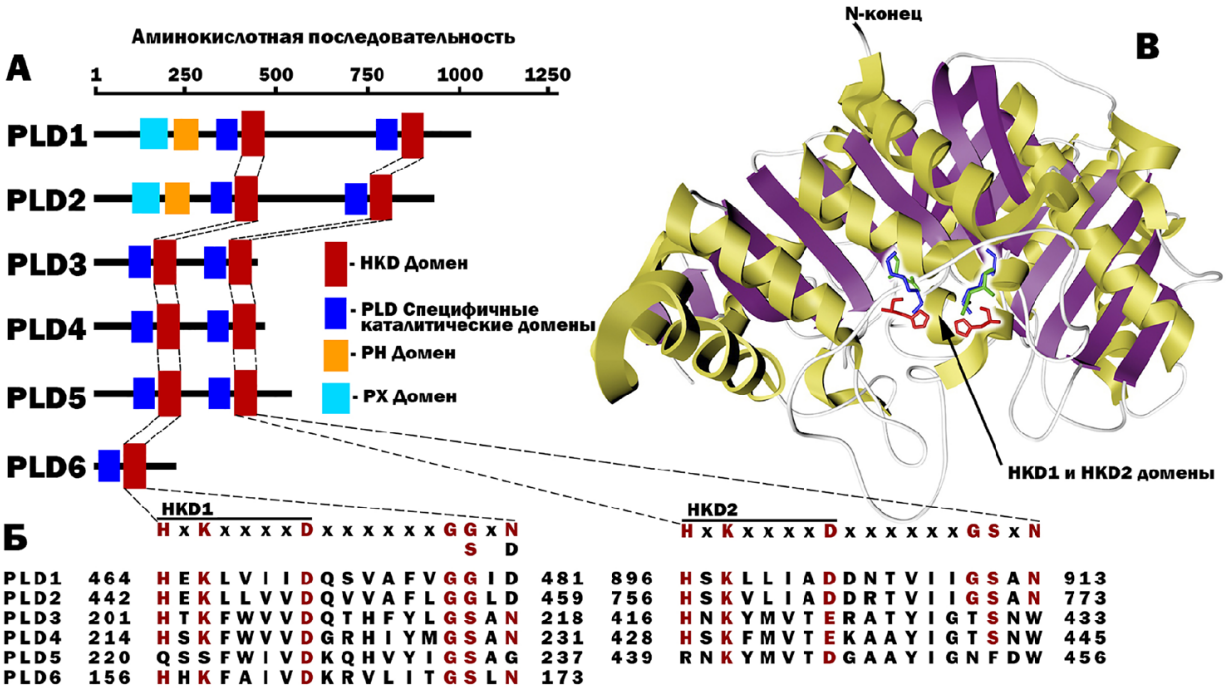

Рисунок 1. Структура PLD. А. Сравнение структуры доменов 6-ти изоформ PLD; Б. Сравнение консервативных HKD доменов 6-ти изоформ PLD; В. Трёхмерная структура PLD и её активного центра.

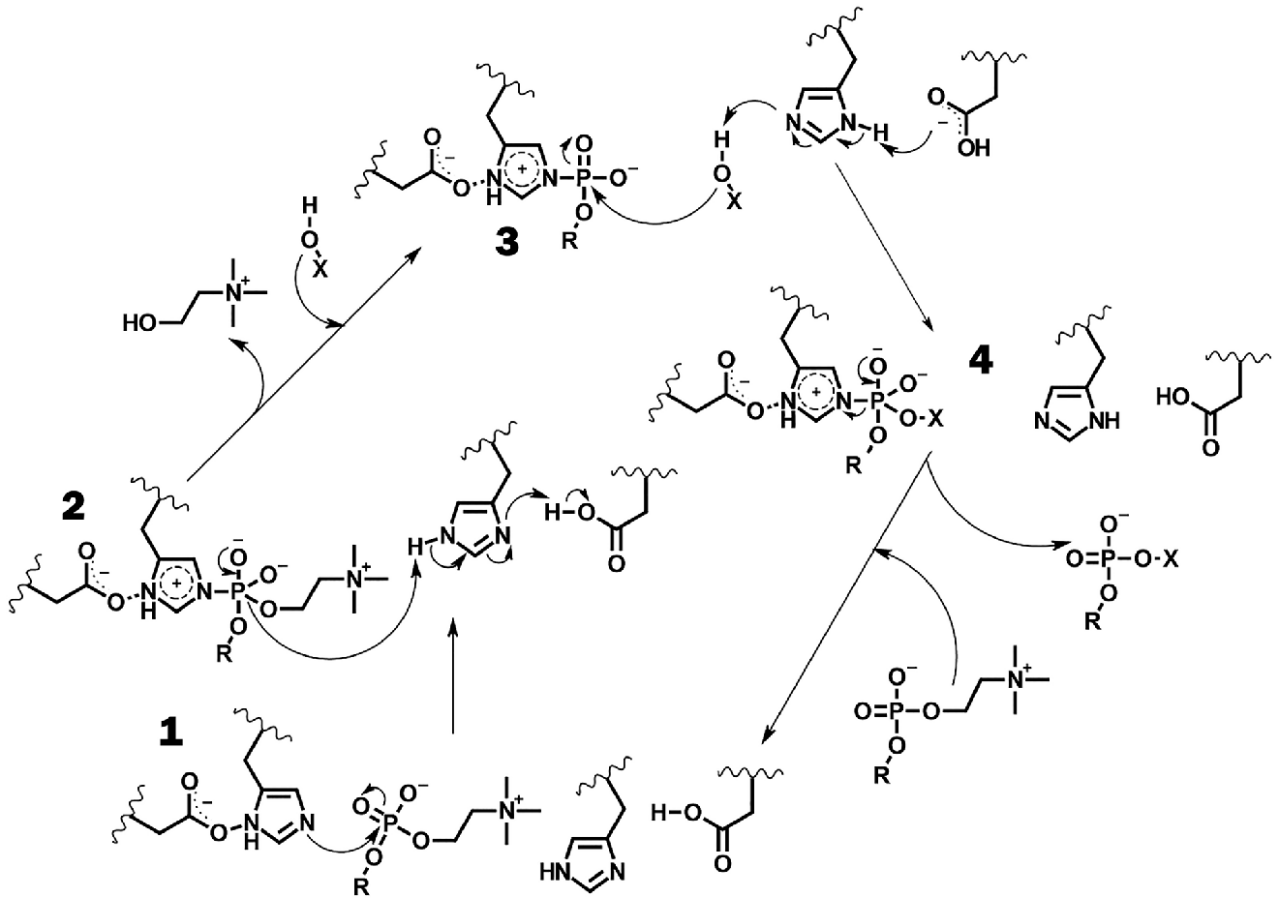

Рисунок 2. Механизм SN2-реакции, катализируемой PLD. R - диацилглицериновый остаток, X - $(CH_2)_nCH_3$ или H. В зависимости от нуклеофила, молекулы первичного спирта или воды, атакующего атом фосфора субстрата на 3 этапе, происходит реакция трансфосфатидилирования или гидролиза (модифицировано из [4]).

2. ИЗОФОРМЫ PLD

2.1. PLD1 и PLD2

На сегодняшний день у млекопитающих известно 6 изоформ фермента, однако, наиболее изученными являются PLD1 и PLD2 [11]. Доменная структура у PLD1 [12] и PLD2 [13] практически одинаковая: помимо HKD последовательности в их состав входят высококонсервативные плекстрингомологичный (PH) и phox-гомологичный (PX) домены, а также сайт связывания фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфата ($PtdIns(4,5)P_2$) [6, 14]. Наличие в составе PLD1 loop-последовательности, возможно, объясняет более низкую базовую активность PLD1 в сравнении с PLD2, так как данный домен обладает аутоингибиторным действием [15]. PLD1 и PLD2 локализованы практически во всех тканях млекопитающих, причём PLD2 расположена непосредственно на плазматической мембране, а PLD1 транспортируется к ней под влиянием внеклеточных стимулов от эндомембран клетки [6]. Механизм взаимодействия PLD1 и PLD2 с мембранами до конца не выяснен, предполагается, что в нём могут принимать участие PX и PH домены, а также последовательность каталитического центра, обогащенная основными остатками аминокислот [16]. PX-домен содержит высокоспецифичный сайт для связывания полифосфоинозитидов мембраны, а также сайт для связывания PA, фосфатидилсерина и других отрицательно заряженных липидов [6]. Консервативные остатки цистеина (Cys240 и Cys241), содержащиеся в PH-домене, способны пальмитилироваться, что также обеспечивает связывание фермента с мембраной [6]. PLD1 и PLD2 осуществляют гидролиз фосфолипидов и реакции трансфосфатидилирования. Данные изоформы играют важную роль в реорганизации цитоскелета, процессах экзоцитоза и эндоцитоза, пролиферации и миграции клеток, аутофагии и апоптозе, а также во внутриклеточном транспорте между аппаратом Гольджи и эндоплазматическим ретикулумом [4, 11].

2.2. PLD3, PLD4 и PLD5

PLD3 [17] и PLD4 [18] являются трансмембранными белками, расположенными на эндоплазматическом ретикулуме, не имеющими в своём строении PH и PX доменов. PLD3 локализована во многих тканях млекопитающих, причём повышение уровня экспрессии данной изоформы наблюдается в нейронах и мышечных клетках во время их дифференциации [17]. PLD3 широко экспрессируется в клетках головного мозга. Редкие генетические варианты PLD3 увеличивают риски возникновения болезни Альцгеймера [19]. В то же время PLD3 играет важную роль в процессах образования мышечных трубочек в ходе миогенеза [17]. PLD4 наиболее широко экспрессируется в клетках селезенки [18]. Также показано, что PLD4 участвует в процессах фагоцитоза в микроглии [20]. Хотя PLD3 и PLD4 обладают HKD последовательностями, для них не была выявлена каталитическая активность. К настоящему времени PLD5 является наименее изученной изоформой, однако, существует предположение, что PLD5 также не обладает каталитической активностью [11].

2.3. PLD6

В отличие от упомянутых выше изоформ PLD6 (MitoPLD) расположена на наружной поверхности митохондриальной мембраны и имеет в своём составе только одну HKD последовательность [21]. PLD6 гидролизует кардиолипин, митохондриальный липид, а также расщепляет длинноцепочечные РНК с образованием piРНК (от англ. *piwi-interacting RNA*) во время сперматогенеза, осуществляя при этом эндонуклеазную активность [22-26]. Образующаяся в результате гидролиза кардиолипина фосфатидная кислота влияет на процессы слияния и деления митохондрий [25], в то время как piРНК участвуют в сайленсинге транспозонов для поддержания стабильности генома [27] (таблица).

Активность PLD1 и PLD2 контролируется множеством внутриклеточных и внеклеточных факторов, поскольку образующаяся в результате гидролиза фосфолипидов фосфатидная кислота является вторичным посредником в ряде сигнальных путей и может сама метаболизироваться до диациглицерола (DAG) и лизофосфатидной кислоты, которые также являются сигнальными молекулами [4, 28, 29]. Было показано, что полифосфоинозитиды, в особенности $PtdIns(4,5)P_2$, являясь кофактором PLD, повышают каталитическую активность фермента [6]. Прямыми аллостерическими активаторами PLD являются малые мономерные G-белки, GTPазы, относящиеся к семействам Rho и ARF суперсемейства Ras [4]. PLD подвергается фосфорилированию киназами, преимущественно протеинкиназой C, а также серин-треониновыми, тирозиновыми протеинкиназами, кальций/кальмодулинзависимыми киназами [30]. PLD1 и PLD2 могут также активироваться опосредованно через рецепторы, сопряжённые с G-белками, и рецепторы с тирозинкиназной активностью под действием таких агонистов рецепторов, как гормоны, хемотаксические пептиды, цитокины, факторы роста и др. [11, 31]. Механизмы регуляции активности PLD1 и PLD2 рассмотрены более подробно в обзоре Колесникова с соавт. [6].

3. ИНГИБИТОРЫ АКТИВНОСТИ PLD

Для более детального изучения физиологических и возможных патологических функций изоформ PLD в животных организмах и для выявления терапевтической эффективности ингибиторов данного фермента используются различные подходы к подавлению активности PLD. С 1980-х по 2000-е гг для блокирования сигнальных путей клетки, в которых принимает участие PLD, применяли первичные спирты, чаще всего *н*-бутанол, затем стали внедрять новые методики на основе механизма РНК-интерференции, нокдауна и/или нокаута генов, кодирующих PLD [4, 11, 32].

Таблица. Сравнительный анализ изоформ PLD

Изоформы фосфолипазы D	Локус	Субстратная специфичность	Метаболиты	Ингибиторы	Внутриклеточная локализация
PLD1	NP_002653	фосфатидилхолин, фосфатидилсерин, другие фосфолипиды	фосфатидная кислота, фосфатидил-спирты	FIPI VU0359595 ML 299	эндомембраны клетки, транспортируется к плазматической мембране под влиянием внеклеточных стимулов
PLD2	NP_002654	фосфатидилхолин, фосфатидилсерин, другие фосфолипиды	фосфатидная кислота, фосфатидил-спирты	FIPI VU0364739 ML298 ML395 ML 299	плазматическая мембрана
PLD3	NP_001278240	не выявлена каталитическая активность	–	–	трансмембранный белок, расположенный на эндоплазматическом ретикулуме
PLD4	NP_620145	не выявлена каталитическая активность	–	–	трансмембранный белок, расположенный на эндоплазматическом ретикулуме
PLD5	NP_689879	не выявлена каталитическая активность	–	–	данных нет
PLD 6	NP_849158	кардиолипин; длинноцепочечные РНК	фосфатидная кислота; piРНК	–	наружная поверхность внешней митохондриальной мембраны

В проведённых экспериментах на культурах клеток и животных моделях было выяснено, что ингибирование PLD может быть перспективным для лечения некоторых онкологических, инфекционных и аутоиммунных заболеваний, тромботических состояний, нейродегенеративных расстройств, что послужило стимулом для создания фармакологических игнибиторов PLD [11, 33, 34]. Разработка прямых ингибиторов PLD1 и PLD2 на основе галопемида, антагониста дофаминовых рецепторов, который вначале исследовался как атипичный антипсихотик, началась с 2007 года [35-37]. В настоящее время в исследованиях на животных и культурах клеток наиболее широко используется производное галопемида – FIPI (5-флуоро-2-индолил дез-хлорогалопемид) [38, 39]. Несмотря на то, что FIPI ингибирует PLD1 в большей степени (IC_{50}=1 нМ), чем PLD2 (IC_{50}=44 нМ), он относится к неселективным ингибиторам PLD и характеризуется отсутствием избирательности фармакологического действия (рис. 3).

Необходимость селективного ингибирования PLD1 и PLD2 привела к созданию ингибиторов PLD второго поколения [33, 40, 41]. Так, введение (S)-метильной группы в этильный мостик молекулы галопемида, а также атома брома и фенилциклопропановой группы позволило более чем в 1700 раз повысить селективность ингибитора VU0359595 к PLD1 (IC_{50}=3,7 нМ) в сравнении с PLD2 (IC_{50}=6,400 нМ). Также был синтезирован селективный ингибитор PLD2 на основе триазаспиронового скелета – VU0364739 (JWJ) (PLD1 IC_{50}=1,500 нМ, PLD2 IC_{50}=20 нМ). Было показано, что VU0359595 и VU0364739 являются аллостерическими ингибиторами PLD, причём плекстрингомологичный домен является ключевым для связывания этих молекул. Следующим этапом в создании ингибиторов PLD, обусловленным потребностью в молекулах, которые воздействовали бы исключительно на PLD2, стала разработка третьего поколения ингибиторов PLD. На сегодняшний день к ним относятся три молекулы: ML298 (PLD1 IC_{50}=20,000 нМ, PLD2 IC_{50}=355 нМ) и ML395 (PLD1 IC_{50}>30,000 нМ, PLD2 IC_{50}=380 нМ), являющиеся селективными ингибиторами PLD2, а также ML 299, которая, однако, ингибирует как PLD1 (IC_{50}= 6 нМ), так и PLD2 (IC_{50}=320 нМ) (рис. 4).

Помимо этого, ведётся разработка нового класса ингибиторов PLD на основе 1,3-дизамещённого-4-амино-пиразолпиримидина [42]. Было показано, что наибольшей эффективностью в отношении PLD1 характеризуется молекула с 1-нафтильной группой в 3-ем положении и 4-метоксифенильной группой в 1-ом положении. Самой высокой селективностью к PLD2 обладает производное 4-амино-пиразолпиримидина с фенильным радикалом в 3-ем положении и 4-метоксифенильной группой в 1-ом положении.

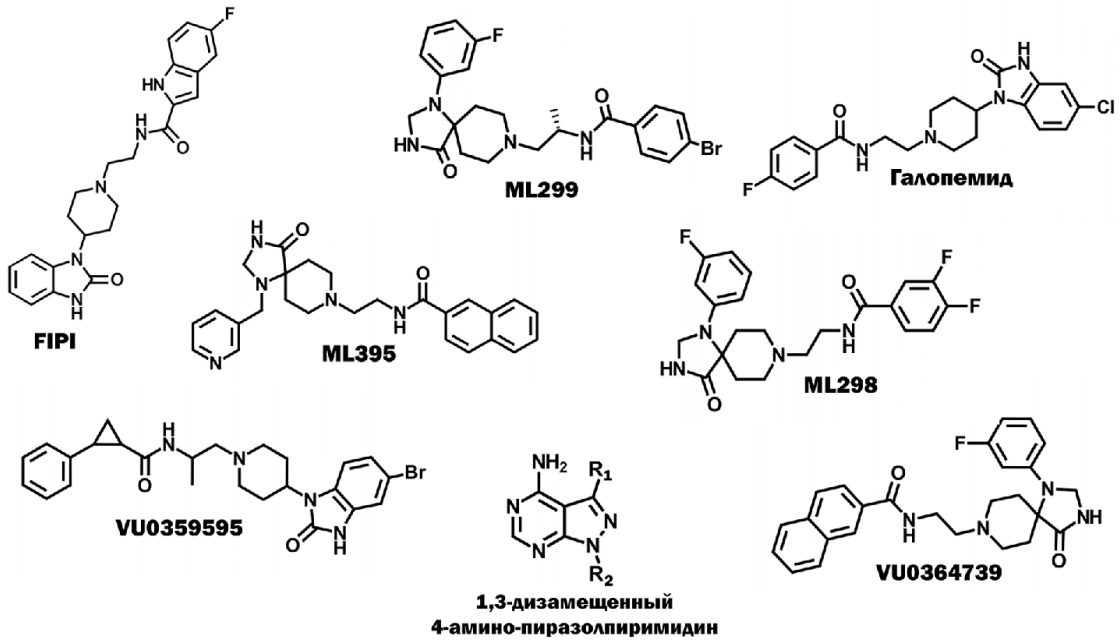

Рисунок 3. Фармакологические ингибиторы активности PLD.

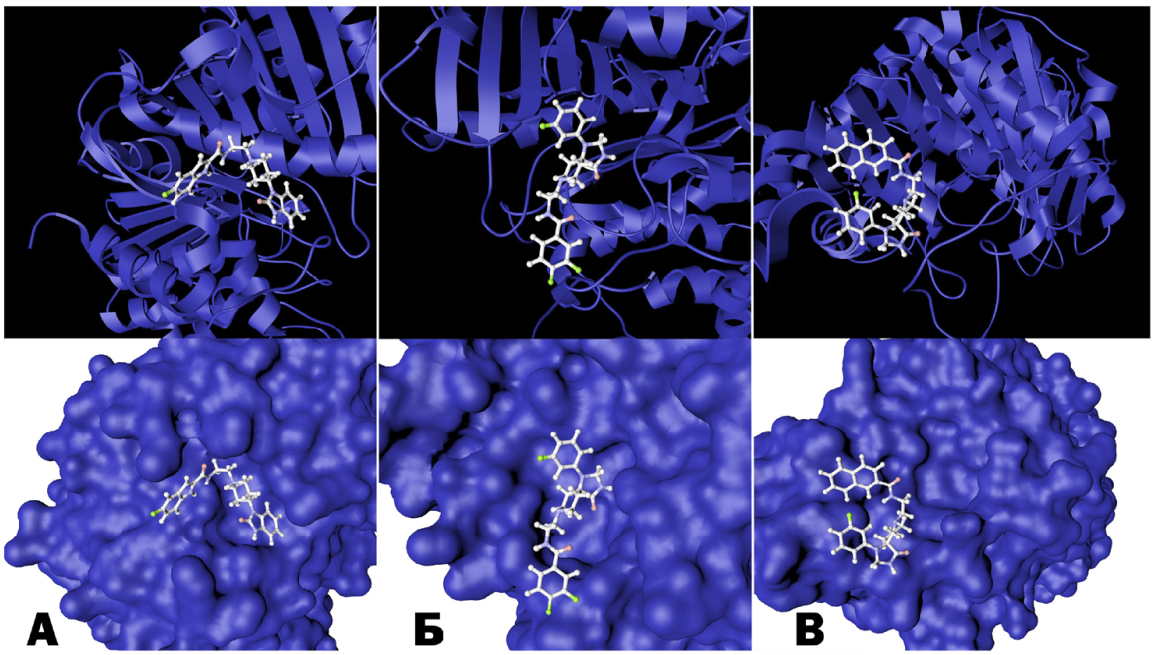

Рисунок 4. Взаимодействие PLD2 с: А. FIPI; Б. ML298; В. VU0364739. ML298 и VU0364739 являются аллостерическими ингибиторами PLD2, в то время как FIPI взаимодействует непосредственно с каталитическим центром.

4. РОЛЬ PLD В РАЗВИТИИ ПАТОЛОГИЧЕСКИХ СОСТОЯНИЙ И ИХ СВОЕВРЕМЕННОЙ ДИАГНОСТИКЕ

Поскольку, как указывалось ранее, до 2000-х годов для изучения физиологической активности PLD применяли первичные спирты, которые могут неспецифично и независимо от PLD влиять на клеточные процессы, результаты многих ранее проведенных экспериментов по ингибированию PLD сегодня могут пересматриваться [11, 43, 44]. Так, в ряде исследований было показано, что PLD необходима для образования нейтрофилами супероксидного анион-радикала при их стимуляции бактериальным трипептидом fMLP (N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanin) и для дегрануляции нейтрофилов, в то время как ингибирование PLD при помощи этанола или *н*-бутанола подавляло данные процессы [45-47]. Однако в 2013 году в нескольких исследованиях [48, 49] было доказано, что фармакологическое ингибирование PLD1 и PLD2 при помощи FIPI и нокаут генов PLD1 и PLD2 у мышей *PLD*$^{-/-}$ не влияют на образование супероксида и дегрануляцию нейтрофилов в присутствии fMLP.

Следовательно, именно спирты, а не ингибированные PLD влияли на функции нейтрофилов.

На сегодняшний день наиболее изученными изоформами являются PLD1 и PLD2, поэтому возможности их фармакологического ингибирования активно исследуются для получения терапевтических эффектов у человека [11, 14].

4.1. Онкологические заболевания

Существует множество мнений о роли PLD в развитии онкологических заболеваний и потенциале её фармакологического ингибирования, однако, все они нуждаются в проверке на животных моделях, так как развитие опухоли *in vivo* является сложным взаимосвязанным явлением [11]. Результаты целого ряда исследований подтверждают участие PLD1 и PLD2 в патогенезе рака молочной железы, яичников, лёгких, толстой кишки, поджелудочной железы, почки, предстательной железы, а также головного мозга [33]. Известно, что в опухолевых клетках значительно повышены экспрессия и активность PLD1 [38, 50, 51], которая участвует в пролиферации, обеспечении инвазивности и жизнеспособности раковых клеток [14]. PLD1 и PLD2 также участвуют в передаче сигнала сосудистого эндотелиального фактора роста, который выделяется в опухоли под действием гипоксического стресса для стимулирования ангиогенеза, обеспечивающего кровоснабжение опухолевых клеток [52, 53]. Установлено, что PA, образование которой в организме человека происходит преимущественно путём PLD-опосредованного гидролиза фосфолипидов, обладает митогенным и антиапоптотическим эффектом, что при определенных условиях может стать фактором развития новообразований. PA активирует протеинкиназу mTOR (mammalian target of rapamycin), регулирующую рост и пролиферацию клеток через сигнальный путь mTOR [54]. Помимо этого, было показано, что PA, образованная под действием PLD2, необходима для передачи внеклеточных сигналов при помощи Ras-каскада [55]. PA взаимодействует с фактором Sos (Son of Sevenless) и способствует его присоединению к плазматической мембране с последующей активацией G-белка Ras путём обмена гуанозиндифосфата на гуанозинтрифосфат. Вызывая перемещение серин-треониновой киназы Raf-1 из цитозоля к плазматической мембране, PA активирует сигнальный каскад MAPK (mitogen-activated protein kinase), который ответственен за регуляцию процессов митогенеза, клеточной пролиферации и дифференциации [56]. Образуемая из PA лизофосфатидная кислота оказывает митогенные эффекты, а также вовлечена в процессы пролиферации и миграции клеток [57]. Помимо вышесказанного, сама PLD1 опосредованно принимает участие в метастазировании опухоли при помощи тромбоцитов [58]. Однако применение ингибиторов PLD в онкологии может быть ограничено, поскольку в случае некоторых видов опухолей, для которых уменьшение подвижности клеток приводит к прогрессированию развития опухоли, их назначение противопоказано [11].

4.2. Грипп

В 2009 году при помощи РНК-интерференции в организме человека были выявлены гены, влияющие на репликацию вируса гриппа, в том числе кодирующие PLD2 [14, 59]. Авторами [60] было показано, что PLD2 принимает участие в процессе эндоцитоза вируса в клетку, тем самым, способствуя его ускользанию от воздействия факторов врожденного иммунитета. На основании полученных данных предполагается, что селективные ингибиторы PLD2 могут оказывать противовирусное действие, блокируя эндоцитоз вируса. Экспериментально было доказано [60], что ингибирование PLD2 при помощи VU0364739 приводит к частичному блокированию эндоцитоза вируса гриппа, что с одной стороны позволяет иммунной системе эффективно бороться с инфекцией и остановить репликацию вируса, а с другой – не полностью останавливает процессы эндоцитоза в клетке. Это позволяет сохранить нормальный клеточный метаболизм и обуславливает низкую токсичность VU0364739. Действие ингибиторов PLD2 может объясняться тем, что присутствие большого числа молекул PA в определённом участке клеточной мембраны обуславливает образование отрицательной кривизны, что является необходимым для процессов мембранного слияния и деления при осуществлении везикулярного транспорта [61]. Подавляя PLD-обусловленное образование PA, появляется возможность блокировать проникновение вируса в клетку хозяина. С другой стороны, в исследовании Ali и соавт. [62] показано, что ингибирование PLD2 негативно влияет на функции иммунной системы в целом, подавляя процессы миграции нейтрофилов и фагоцитоза, поэтому вопрос о целесообразности использования ингибиторов PLD2 в лечении гриппа требует дальнейшего изучения.

4.3. Тромботические состояния

Ещё одна область возможного использования ингибитора PLD1 и PLD2 – лечение тромботических состояний [11]. Как известно, в процессе формирования тромба важную роль играет взаимодействие активированного интегрина $\alpha_{IIb}\beta_{III}$, находящегося на поверхности тромбоцитов, с фибриногеном. Так как активация интегрина $\alpha_{IIb}\beta_{III}$ контролируется PLD, терапевтическое ингибирование PLD1 и PLD2 может быть использовано для замедления процессов тромбообразования [63, 64]. Было показано, что использование FIPI может успешно применяться в профилактике артериальных тромбозов и ишемического инсульта [65]. В проведённых исследованиях на мышиных моделях применение ингибиторов PLD не увеличило частоту кровотечений [65], что выгодно отличает их от используемых в клинической практике антитромботических препаратов различных классов.

4.4. ВИЧ

В исследовании Taylor и соавт. [66] было установлено, что ингибирование PLD1 под действием VU0359595 снижает способность

вируса ВИЧ реплицироваться в $CD4^+$ Т-лимфоцитах *in vitro*. Это происходит благодаря подавлению фосфорилирования внеклеточных сигнал-регулируемых киназ, которые обуславливают метаболические изменения, происходящие при активации Т-клеток. Тем самым ингибирование PLD1 не позволяет вирусу ВИЧ использовать метаболические запасы активированных Т-лимфоцитов и может использоваться в качестве нового подхода в антиретровирусной терапии.

4.5. Болезнь Альцгеймера

Как уже было упомянуто выше, редкие полиморфизмы PLD3 могут приводить к развитию болезни Альцгеймера с поздним началом. Предполагается, что потеря функции PLD3 вызывает увеличение секреции β-амилоидного пептида. Однако вследствие малоизученности PLD3 на настоящий момент не является возможным фармакологическое воздействие на данный процесс. В то же время было показано, что в отсутствии PLD2 β-амилоидный пептид теряет способность влиять на показатели электрофизиологической активности нейронов, в частности, подавлять долговременную потенциацию. Ингибирование PLD2 препятствует потери памяти и способствует защите синаптических окончаний при болезни Альцгеймера [11, 33].

4.6. Алкоголизм

Образование фосфатидилспиртов под действием PLD нашло прикладное применение в лабораторно-диагностической практике злоупотребления алкоголем. Установлено, что реакция трансфосфатидилирования протекает даже при минимальных количествах спирта, так как сродство фермента к нему в 1000 раз больше, чем к воде [67]. В результате под действием PLD в присутствии этанола в организме человека образуется фосфатидилэтанол (PEth). Было показано, что PLD1 и PLD2 катализируют трансфосфатидилирование *in vitro* [31], однако, к настоящему моменту не решён вопрос о вкладе каждой из этих изоформ в образование PEth *in vivo* [68]. Разработке методики определения содержания PEth в крови для установления факта злоупотребления алкоголем посвящено много исследований [68, 69].

В отличие от таких традиционных непрямых биомаркеров злоупотребления алкоголем, как γ-глутамилтрансфераза (ГГТ), карбогидратдефицитный трансферрин (CDT), средний корпускулярный объём эритроцитов (СКОЭ, MCV), на образование PEth не оказывают влияние патологические процессы, происходящие в организме человека и не связанные с употреблением алкоголя [70]. Поэтому специфичность PEth составляет 100% [71, 72], так как его образование происходит при превращении фосфатидилхолина и других мембранных фосфолипидов под действием PLD только в присутствии этанола (рис. 5).

К PEth относятся 48 гомологичных глицерофосфолипидов, обладающих одинаковым глицериновым остатком и полярной фосфоэтанольной

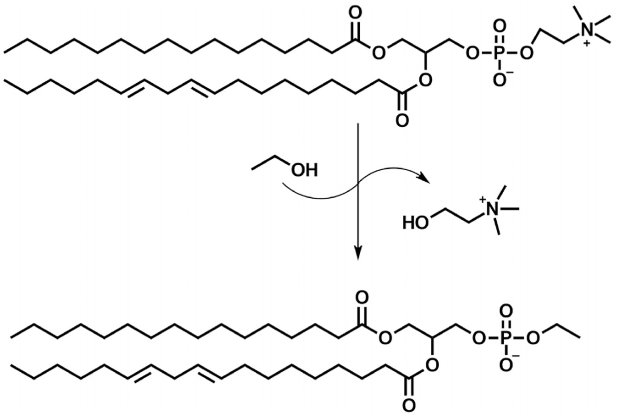

Рисунок 5. Образование PEth 16:0/18:2 из фосфатидилхолина под действием PLD

головной группой и отличающихся по остаткам жирных кислот различной длины (от 14 до 22 атомов углерода) и степени ненасыщенности (от 0 до 6 двойных связей) [73]. Наиболее часто встречающимися гомологами являются PEth 16:0/18:1 и PEth 16:0/18:2, которые в сумме составляют приблизительно 60% от общего количества PEth, причем их сумма коррелирует с общей величиной PEth в организме человека лучше, чем значение каждого из двух гомологов по отдельности [74].

Такое разнообразие гомологов объясняется тем, что на образование фосфолипидов большое влияние оказывает характер питания, так как пища является основным источником жирных кислот. Поэтому предполагается, что индивидуальный профиль гомологов PEth также зависит от состава рациона [75]. На сегодняшний день показано, что на зависимость между потреблением алкоголя и уровнем PEth в организме человека не влияют такие факторы, как пол и возраст, а также такие сопутствующие заболевания, как гипертония и поражения печени [76, 77]. Имеются данные о том, что на формирование PEth не оказывают воздействие гематологические показатели: СКОЭ, гематокрит, количество эритроцитов [78]. Необходимо отметить, что при лабораторной диагностике PEth влияние температурного режима хранения взятых на анализ проб крови может изменить количественное содержание PEth. Так, в условиях *in vitro* при -20°C и при комнатной температуре уровень PEth увеличивается из-за сохранённой активности PLD, что может привести к ложноположительным результатам анализа. Однако при температуре +4°C (до 72 ч) и при температуре -80°C увеличения уровня PEth не наблюдается [79].

Образование PEth происходит в различных тканях, таких как головной мозг, печень, в лимфоцитах, тромбоцитах и эритроцитах [80]. Синтез PEth пропорционален концентрации этанола и может индивидуально отличаться в зависимости от активности PLD. При этом на образование PEth влияет скорость всасывания этанола из ЖКТ, которая зависит от пола, процентного содержания жира

в организме, содержимого желудка, генетически обусловленных различий в алкогольдегидрогеназе и ацетальдегиддегидрогеназе [81].

В разрушении PEth участвуют фосфолипаза A_2, фосфолипаза С и фосфогидролаза [68]. Однако в эритроцитах замедлен процесс деградации PEth из-за предполагаемого отсутствия фосфолипазы С [80]. Этим обусловлен длительный период полувыведения PEth, который в среднем составляет 4 дня, а при хроническом злоупотреблении данный биомаркер накапливается в эритроцитах, что позволяет детектировать его спустя 28 дней после последнего приёма алкоголя [76, 82, 83]. Важно отметить, что скорость элиминации для гомологов PEth различается во время периода абстиненции. Было показано, что 16:0/18:2 выводится быстрее из организма, чем PEth 16:0/18:1 [84].

В различных исследованиях было доказано, что существует отчетливая корреляция между количеством потребленного алкоголя и концентрацией PEth в крови, причём чувствительность PEth как биомаркера злоупотребления алкоголем составляет от 94% [71] до 100% [85]. Наиболее высокие показатели специфичности и чувствительности PEth среди всех прямых и непрямых биомаркеров злоупотребления алкоголем позволяют считать PEth самым точным и объективным биомаркером на сегодняшний день. Для анализа PEth в большинстве случаев используется метод жидкостной хроматографии – тандемной масс-спектрометрии (LC-MS/MS) в различных модификациях [80]. Однако, учитывая тот факт, что большая часть данных о корреляции концентрации PEth с количеством употребляемого алкоголя получена в относительно небольших группах населения и с использованием различных методик определения PEth, то представляется актуальным дальнейшее проведение крупномасштабных исследований на больших популяциях людей.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изоформы PLD являются одними из ключевых ферментов сигнальных и метаболических путей клетки. PLD1 и PLD2 участвуют в процессах реорганизации цитоскелета, экзоцитоза и эндоцитоза, пролиферации и миграции клеток, аутофагии, апоптозе и везикулярном транспорте, а также вовлечены в патогенез некоторых онкологических и инфекционных заболеваний, тромботических состояний и нейродегенеративных расстройств, что открывает перспективы лечения данных заболеваний с использованием ингибиторов PLD. Продукт реакции трансфосфатидилирования фосфолипидов, PEth, является самым специфичным и чувствительным биомаркером злоупотребления алкоголем, что расширяет возможности лабораторной диагностики алкоголизма. Таким образом, суперсемейство фосфолипаз D можно рассматривать как важный объект биомедицины с высокой перспективой для дальнейших исследований.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Jenkins G.M., Frohman M.A.* (2005) Cell. Mol. Life Sci., **62**, 2305-2316.
2. *Hanahan D.J., Chaikoff I.L.* (1947) J. Biol. Chem., **169**, 699-705.
3. *Hanahan D.J., Chaikoff I.L.* (1948) J. Biol. Chem., **172**, 191-198.
4. *Selvy P.E., Lavieri R.R., Lindsley C.W., Brown H.A.* (2011) Chem. Rev., **111**, 6064-6119.
5. *Ponting C.P., Kerr I.D.* (1996) Protein Sci., **5**, 914-922.
6. *Колесников Я.С., Нохрина К.П., Кретинин С.В., Волотовский И.Д., Мартинец Я., Романов Г.А., Кравец В.С.* (2012) Биохимия, **77**, 5-20.
7. *Yun C.H., Ahn T., Guengerich F.P., Yamazaki H., Shimada T.* (1999) Arch. Biochem. Biophys., **367**, 81-88.
8. *Leiros I., McSweeney S., Hough E.* (2004) J. Mol. Biol., **339**, 805-820.
9. *Orth E.S., Brandão T.A., Souza B.S., Pliego J.R., Vaz B.G., Eberlin M.N., Kirby A.J., Nome F.* (2010) J. Am. Chem. Soc., **132**, 8513-8523.
10. *Damnjanović J., Iwasaki Y.* (2013) J. Biosci. Bioeng., **116**, 271-280.
11. *Frohman M.A.* (2015) Trends Pharmacol. Sci., **36**, 137-144.
12. *Hammond S.M., Altshuller Y.M., Sung T.C., Rudge S.A., Rose K., Engebrecht J., Morris A.J., Frohman M.A.* (1995) J. Biol. Chem., **270**, 29640-29643.
13. *Colley W.C., Sung T.C., Roll R., Jenco J., Hammond S.M., Altshuller Y., Bar-Sagi D., Morris A.J., Frohman M.A.* (1997) Curr. Biol., **7**, 191-201.
14. *Nelson R.K., Frohman M.A.* (2015) J. Lipid. Res., **56**, 2229-2237.
15. *Sung T.C., Zhang Y., Morris A.J., Frohman M.A.* (1999) J. Biol. Chem., **274**, 3659-3666.
16. *Stahelin R.V., Ananthanarayanan B., Blatner N.R., Singh S., Bruzik K.S., Murray D., Cho W.* (2004) J. Biol. Chem., **279**, 54918-54926.
17. *Osisami M., Ali W., Frohman M.A.* (2012) PLoS One, **7**, e33341, DOI: 10.1371/journal.pone.0033341
18. *Yoshikawa F., Banno Y., Otani Y., Yamaguchi Y., Nagakura-Takagi Y., Morita N., Sato Y., Saruta C., Nishibe H., Sadakata T. et al.* (2010) PLoS One, **5**, e13932, DOI: 10.1371/journal.pone.0013932
19. *Cruchaga C., Karch C.M., Jin S.C., Benitez B.A., Cai Y., Guerreiro R., Harari O., Norton J., Budde J., Bertelsen S. et al.* (2014) Nature, **505**, 550-554.
20. *Otani Y., Yamaguchi Y., Sato Y., Furuichi T., Ikenaka K., Kitani H., Baba H.* (2011) PloS One, **6**, e27544, DOI: 10.1371/journal.pone.0027544
21. *Choi S.Y., Huang P., Jenkins G.M., Chan D.C., Schiller J., Frohman M.A.* (2006) Nat. Cell. Biol., **8**, 1255-1262.
22. *Zhang Y., Liu X., Bai J., Tian X., Zhao X., Liu W., Duan X., Shang W., Fan H.Y., Tong C.* (2016) Mol. Cell, **61**, 111-124.
23. *Baba T., Kashiwagi Y., Arimitsu N., Kogure T., Edo A., Maruyama T., Nakao K., Nakanishi H., Kinoshita M., Frohman M.A., Yamamoto A., Tani K.* (2014) J. Biol. Chem., **289**, 11497-11511.
24. *Philip F., Ha E.E., Seeliger M.A., Frohman M.A.* (2017) Methods Enzymol., **583**, 309-325.
25. *Huang H., Gao Q., Peng X., Choi S.Y., Sarma K., Ren H., Morris A.J., Frohman M.A.* (2011) Dev. Cell, **20**, 376-387.
26. *Patil A.A., Tatsuke T., Mon H., Lee J.M., Morokuma D., Hino M., Kusakabe T.* (2017) Biochem. Biophys. Res. Commun., **493**(2), 971-978.

27. *Nishimasu H., Ishizu H., Saito K., Fukuhara S., Kamatani M.K., Bonnefond L., Matsumoto N., Nishizawa T., Nakanaga K., Aoki J. et al.* (2012) Nature, **491**, 284-287.
28. *Sciorra V.A., Morris A.J.* (1999) Mol. Biol. Cell, **10**, 3863-3876.
29. *Gomez-Cambronero J., Morris A.J., Henkels K.M.* (2017) Methods Enzymol., **583**, 327-357.
30. *McDermott M., Wakelam M.J., Morris A.J.* (2004) Biochem. Cell. Biol., **82**, 225-253.
31. *Siddiqi A.R., Srajer G.E., Leslie C.C.* (2000) Biochim. Biophys. Acta, **1497**, 103-114.
32. *Zhang Y., Frohman M.A.* (2014) J. Biol. Chem., **289**, 22567-22574.
33. *Brown H.A., Thomas P.G., Lindsley C.W.* (2017) Nat. Rev. Drug Discov., **16**(5), 351-367.
34. *Nelson R.K., Ya-Ping J., Gadbery J., Abedeen D., Sampson N., Lin R.Z., Frohman M.A.* (2017) Sci. Rep., **7**(1), 9112. DOI: 10.1038/s41598-017-09852-4.
35. *Loonen A.J., Soe-Agnie C.J., Soudijn W.* (1981) Brain Res., **210**, 485-492.
36. *Loonen A.J., Soudijn W.* (1985) Pharm. Weekbl. Sci., **7**, 1-9.
37. *Monovich L., Mugrage B., Quadros E., Toscano K., Tommasi R., LaVoie S., Liu E., Du Z., LaSala D., Boyar W., Steed P.* (2007) Bioorg. Med. Chem. Lett., **17**, 2310-2311.
38. *Bruntz R.C., Lindsley C.W., Brown H.A.* (2014) Pharmacol. Rev., **66**, 1033-1079.
39. *Su W., Yeku O., Olepu S., Genna A., Park J.S., Ren H., Du G., Gelb M.H., Morris A.J., Frohman M.A.* (2009) Mol. Pharmacol., **75**, 437-446.
40. *Scott S.A., Selvy P.E., Buck J.R., Cho H.P., Criswell T.L., Thomas A.L., Armstrong M.D., Arteaga C.L., Lindsley C.W., Brown H.A.* (2009) Nat. Chem. Biol., **5**, 108-117.
41. *Stieglitz K.* (2017) Curr. Drug Discov. Technol., DOI: 10.2174/1570163814666170816112135.
42. *Kulkarni A., Quang P., Curry V., Keyes R., Zhou W., Cho H., Baffoe J., Török B., Stieglitz K.* (2014) Chem. Biol. Drug Des., **84**, 270-281.
43. *Norton L.J., Zhang Q., Saqib K.M., Schrewe H., Macura K., Anderson K.E., Lindsley C.W., Brown H.A., Rudge S.A., Wakelam M.J.* (2011) J. Cell Sci., **124**, 1973-1983.
44. *Yanase Y., Carvou N., Frohman M.A., Cockcroft S.* (2010) Biochem. J., **425**, 179-193.
45. *Azuma Y., Kosaka K., Kashimata M.* (2007) Eur. J. Pharmacol., **568**, 260-268.
46. *Bonser R.W., Thompson N.T., Randall R.W., Garland L.G.* (1989) Biochem. J., **264**, 617-620.
47. *Kanaho Y., Kanoh H., Saitoh K., Nozawa Y.* (1991) J. Immunol., **146**, 3536-3541.
48. *Sato T., Hongu T., Sakamoto M., Funakoshi Y., Kanaho Y.* (2013) Mol. Cell. Biol., **33**, 136-145.
49. *Kanaho Y., Sato T., Hongu T., Funakoshi Y.* (2013) Adv. Biol. Regul., **53**, 128-134.
50. *Gozgit J.M., Pentecost B.T., Marconi S.A., Ricketts-Loriaux R.S., Otis C.N., Arcaro K.F.* (2007) Br. J. Cancer, **97**, 809-817.
51. *Dhingra S., Rodriguez M.E., Shen Q., Duan X., Stanton M.L., Chen L., Zhang R., Brown R.E.* (2010) Int. J. Clin. Exp. Pathol., **4**, 134-146.
52. *Chen Q., Hongu T., Sato T., Zhang Y., Ali W., Cavallo J.A., van der Velden A., Tian H., Di Paolo G., Nieswandt B., Kanaho Y., Frohman M.A.* (2012) Sci Signal., **5**, ra79, DOI: 10.1126/scisignal.2003257
53. *Ghim J., Moon J.S., Lee C.S., Lee J., Song P., Lee A., Jang J.H., Kim D., Yoon J.H., Koh Y.J. et al.* (2014) Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol., **34**, 1697-1703.
54. *Wang X., Devaiah S.P., Zhang W., Welti R.* (2006) Prog. Lipid. Res., **45**, 250-278.
55. *Zhao C., Du G., Skowronek K., Frohman M.A., Bar-Sagi D.* (2007) Nat. Cell. Biol., **9**, 706-712.
56. *Rizzo M.A., Shome K., Watkins S.C., Romero G.* (2000) J. Biol. Chem., **275**, 23911-23918.
57. *Choi J.W., Herr D.R., Noguchi K., Yung Y.C., Lee C.W., Mutoh T., Lin M.E., Teo S.T., Park K.E., Mosley A.N., Chun J.* (2010) Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol., **50**, 157-186.
58. *Labelle M., Hynes R.O.* (2012) Cancer Discov., **2**, 1091-1099.
59. *Karlas A., Machuy N., Shin Y., Pleissner K.P., Artarini A., Heuer D., Becker D., Khalil H., Ogilvie L.A., Hess S., Mäurer A.P., Müller E., Wolff T., Rudel T., Meyer T.F.* (2010) Nature, **463**, 818-822. DOI: 10.1038/nature08760
60. *Oguin T.H. 3rd, Sharma S., Stuart A.D., Duan S., Scott S.A., Jones C.K., Daniels J.S., Lindsley C.W., Thomas P.G., Brown H.A.* (2014) J. Biol. Chem., **289**, 25405-25417.
61. *Roth M.G.* (2008) Traffic, **9**, 1233-1239.
62. *Ali W.H., Chen Q., Delgiorno K.E., Su W., Hall J.C., Hongu T., Tian H., Kanaho Y., Di Paolo G., Crawford H.C., Frohman M.A.* (2013) PLoS One, **8**, e55325, DOI: 10.1371/journal.pone.0055325
63. *Elvers M., Stegner D., Hagedorn I., Kleinschnitz C., Braun A., Kuijpers M.E., Boesl M., Chen Q., Heemskerk J.W., Stoll G., Frohman M.A., Nieswandt B.* (2010) Sci. Signal., **3**, ra1, DOI: 10.1126/scisignal.2000551
64. *Thielmann I., Stegner D., Kraft P., Hagedorn I., Krohne G., Kleinschnitz C., Stoll G., Nieswandt B.* (2012) J. Thromb. Haemost., **10**, 2361-2372.
65. *Stegner D., Thielmann I., Kraft P., Frohman M.A., Stoll G., Nieswandt B.* (2013) Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol., **33**, 2212-2217.
66. *Taylor H.E., Simmons G.E. Jr., Mathews T.P., Khatua A.K., Popik W., Lindsley C.W., D'Aquila R.T., Brown H.A.* (2015) PLoS Pathog., **11**(5), e1004864, DOI: 10.1371/journal.ppat.1004864.
67. *Frohman M.A., Sung T.C., Morris A.J.* (1999) Biochim. Biophys. Acta, **1439**, 175-186.
68. *Heier C., Xie H., Zimmermann R.* (2016) IUBMB Life, **68**, 916-923.
69. *Schröck A., Thierauf A., Wurst F.M., Thon N., Weinmann W.* (2014) Bioanalysis, **6**, 2285-2294.
70. *Петухов А.Е., Надеждин А.В., Богстранд С.Т., Брюн Е.А., Раменская Г.В., Кошкина Е.А., Мельник Е.В., Смирнов А.В., Тетенова Е.Ю.* (2017) Наркология, **16**, 42-47.
71. *Hartmann S., Aradottir S., Graf M., Wiesbeck G., Lesch O., Ramskogler K., Wolfersdorf M., Alling C., Wurst F.M.* (2007) Addict. Biol., **12**, 81-84.
72. *Hannuksela M.L., Liisanantti M.K., Nissinen A.E., Savolainen M.J.* (2007) Clin. Chem. Lab. Med., **45**, 953-961.
73. *Isaksson A., Walther L., Hansson T., Andersson A., Alling C.* (2011) Drug Test. Anal., **3**, 195-200.
74. *Zheng Y., Beck O., Helander A.* (2011) Clin. Chim. Acta, **412**, 1428-1435.
75. *Gnann H., Engelmann C., Skopp G., Winkler M., Auwärter V., Dresen S., Ferreirós N., Wurst F.M., Weinmann W.* (2010) Anal. Bioanal. Chem., **396**, 2415-2423.
76. *Wurst F.M., Thon N., Aradóttir S., Hartmann S., Wiesbeck G.A., Lesch O., Skala K., Wolfersdorf M., Weinmann W., Alling C.* (2010) Addict. Biol., **15**, 88-95.
77. *Stewart S.H., Reuben A., Brzezinski W.A., Koch D.G, Basile J., Randall P.K., Miller P.M.* (2009) Alcohol Alcohol., **44**, 464-467.
78. *Aradóttir S., Moller K., Alling C.* (2004) Alcohol Alcohol., **39**, 8-13.
79. *Aradóttir S., Seidl S., Wurst F.M., Jönsson B.A., Alling C.* (2004) Clin. Exp. Res., **28**, 1718-1723.

80. *Viel G., Boscolo-Berto R., Cecchetto G., Fais P., Nalesso A., Ferrara S.D.* (2012) Int. J. Mol. Sci., **13**, 14788-14812.
81. *Hahn J.A., Anton R.F., Javors M.A.* (2016) Alcohol. Clin. Exp. Res., **40**, 2292-2295.
82. *Gnann H., Thierauf A., Hagenbuch F., Röhr B., Weinmann W.* (2014) Alcohol. Clin. Exp. Res., **38**, 322-326.
83. *Varga A., Hansson P., Johnson G., Alling C.* (2000) Clin. Chim. Acta, **299**, 141-150.
84. *Javors M.A., Hill-Kapturczak N., Roache J.D., Karns-Wright T.E., Dougherty D.M.* (2016) Alcohol. Clin. Exp. Res., **40**, 1228-1234.
85. *Aradóttir S., Asanovska G., Gjerss S., Hansson P., Alling C.* (2006) Alcohol Alcohol., **41**, 431-437.

Поступила: 11. 10. 2017.
Принята к печати: 18. 12. 2017.

PHOSPHOLIPASE D: ITS ROLE IN METABOLISM PROCESSES AND DISEASE DEVELOPMENT

G.V. Ramenskaia[1], E.V. Melnik[1], A.E. Petukhov[1,2]

[1]Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenovskiy University), Moscow, Russia
[2]Moscow Research and Practical Centre for Narcology,
37/1 Lyublinskaya str., Moscow, 109390 Russia; e-mail: a-l-e-x4@yandex.ru

Phospholipase D (PLD) is one of the key enzymes that catalyzes the hydrolysis of cell membrane phospholipids. In this review current knowledge about six human PLD isoforms, their structure and role in physiological and pathological processes is summarized. Comparative analysis of PLD isoforms structure is presented. The mechanism of the hydrolysis and transphosphatidylation performed by PLD is described. The PLD1 and PLD2 role in the pathogenesis of some cancer, infectious, thrombotic and neurodegenerative diseases is analyzed. The prospects of PLD isoform-selective inhibitors development are shown in the context of the clinical usage and the already-existing inhibitors are characterized. Moreover, the formation of phosphatidylethanol (PEth), the alcohol abuse biomarker, as the result of PLD-catalyzed phospholipid transphosphatidylation is considered.

Key words: phospholipase D (PLD), phospholipase D isoforms, phospholipase D inhibitors, phosphatidylethanol (PEth), alcohol abuse biomarkers