Содержание

Введение

1. Фосфолипазы

1.1 Классификация. Свойства

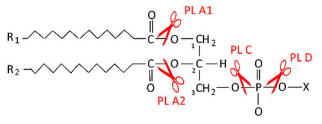
1.2 Система фосфолипаза С - инозитол-3-фосфат

1. Фосфолипазы А2
   1. Общие сведения (реакция, открытие, строение)
   2. Классификация и свойства
      1. Цитозольные ФЛА2
      2. Секреторные ФЛА2
      3. Кальцийнезависимая ФЛА2
   3. Субстратная специфичность
   4. Ингибиторы ФЛА2
      1. Неконкурентное ингибирование
      2. Конкурентное ингибирование
   5. Значение для организма при нарушении активности
   6. Использование ФЛА2 в медицине
   7. Биологическая роль ФЛА2

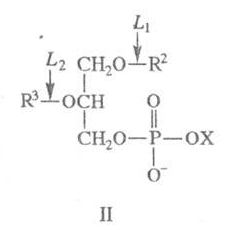
Список литературы

Введение

Фосфолипазы (англ. phospholipase) ферменты класса гидролаз, катализирующие гидролиз фосфоглицеридов.. В зависимости от положения гидролизуемой связи в фосфолипиде различают 4 основных класса фосфолипаз: A, B, C и D.



Лизофосфолипиды расщепляются под действием фосфолипаз L (существование позиционно специфичных фосфолипаз L1 и L2 не доказано). Фосфолипазы В - устаревшее назв. препаратов, обладающих активностью по типу фосфолипаз А и L.



X - остаток холина, серина, миоинозита и др.; для фосфолипаз L1 R2=C(O)R4, R3=H; для фосфолипаз L2 R2=H, R3=C(O)R4

Каждое из семейств фосфолипаз неоднородно и включает ферменты, значительно отличающиеся по молекулярным массам, субъединичному составу и другим свойствам. Все фосфолипазы наиболее активно катализируют гидролиз на поверхности раздела фаз фосфолипид - вода; медленно гидролизуют водорастворимые субстраты.

Фосфолипаза A1 - (КФ 3.1.1.32, англ. phospholipase A1) отщепляет SN-1 ацильную цепь.

Фосфолипаза A2 - (КФ 3.1.1.4, англ. phospholipase A2) отщепляет SN-2 ацильную цепь.

Фосфолипаза B -(лизофосфолипаза, англ. phospholipase B) отщепляет обе SN-1 и SN-2 ацильные цепи. Фосфолипаза, обладающая активностями как фосфолипазы А1 так и А2, то есть способной гидролизовать ацильную цепь фосфолипида в sn-1 и sn-2 положениях.

Фосфолипаза C - (КФ 3.1.4.3, англ. phospholipase C) гидролизует связь между глицериновым остатком фосфолипида и полярной фосфатной группой, при этом образуются диацилглицерин и фосфат-содержащая полярная группа.

Фосфолипаза D - (КФ 3.1.4.4, англ. phospholipase D) гидролизует связь между фоасфатной группой и спиртовой группой, при этом высвобождаются фосфатидная кислота и спирт. Существует 2 изоформы этой фосфолипазы D1 и D2.

Фосфолипазы играют важную роль в обмене липидов в живых организмах. Их используют для определения структуры фосфоглицеридов и места их локализации в мембранах.

1. Фосфолипазы.

1.1 Классификация. Свойства

Фактически различают несколько фосфолипаз группы А, они являются составной частью многих тканей и секретов живых организмов.

Фосфолипазы A1 в большинстве своем - внутриклеточные ферменты, часто мембраносвязанные, не нуждаются в коферменте. Их молекулярные массы варьируют в пределах 15-90 тыс.; оптимальная каталитическая активность проявляется при рН 4,0 (для лизосомальных ферментов) или 8,0-9,5 (для ферментов микросом, плазматических мембран и цитозоля); широко распространены в животных тканях (печень, сердце, мозг) и в микроорганизмах (Bacillus subtilis, В. megateiium, Mycobacter phlei, Escherichia coli).

Фосфолипазы А1 отщепляют ацильную цепь фосфолипида в sn-1 положении. При действии фосфолипазы А1 на фосфолипид образуется 1-лизофосфолипид и жирная кислота. Фосфолипаза является активным компонентом змеиного яда гемолитического действия.

Фосфолипазы A2 - наиболее изученные представители фосфолипаз. Известны 3 группы фосфолипаз A2: 1) ферменты ядов змей, рептилий и насекомых, существующие в виде большого количества изоформ; 2) ферменты поджелудочной железы млекопитающих, продуцирующиеся в организме в виде зимогенов (предшественников с большей молекулярной массой) и активирующиеся трипсином; 3) внутриклеточные ферменты из крови и тканей животных, среди которых имеются как растворимые, так и мембраносвязанные.

Фосфолипазы A2 первых двух подгрупп являются водорастворимыми ферментами с молеклярной масссой 11-19 тыс. (некоторые активны в виде димеров), обладают высокой стабильностью благодаря большому числу (6-7) дисульфидных связей. Оптимальная каталитическая активность при рН 7,5-9,0; рI от 4,0 до 10,5; кофермент - Ca2+. Для множества представителей этих подгрупп фосфолипаз известны первичная и пространственная структур. В активном центре обнаружены остатки гистидина и аспарагиновой кислоты. Свойства внутриклеточных фосфолипаз A2 (третья подгруппа) зависят от субклеточной локализации фермента. Их молекулярная масса 12-75 тыс.; оптимальная каталитическая активность при рН 4,2-9,0. Некоторые ферменты этой подгруппы не содержат коферментов.

Фосфолипазы В выделены из растений, микроорганизмов, яда пчел, тканей млекопитающих. Ферменты этой группы крайне неспецифичны, катализируют гидролиз различных сложноэфирных связей, обладают литическим (разрушающим) действием по отношению к биологически мембранам (что обусловливает их токсичность). Молекулярная масса фосфолипаз В 15-65 тыс., они менее стабильны, чем фосфолипазы А; их оптимальная каталитическая активность проявляется при рН от 4,5 (лизосомальный фермент) до 10,0 (ферменты ядов). Фосфолипазы не имеют коферментов, не ингибируются этилендиаминтетрауксусной кислотой. Некоторые фосфолипазы В ингибируются диизопропилфторфосфатом и п-хлормеркурбензойной кислотой. Универсальные ингибиторы для всех фосфолипаз В - ПАВ.

Фосфолипаза В способна гидролизовать ацильную цепь фосфолипида в sn-1 и sn-2 положениях Как правило фосфолипаза действует на лизолецитин (лизофосфатидилхолин), образующийся в результате действия фосфолипазы А1 на лецитин (фосфатидилхолин).

Фосфолипазы С обнаружены у бактерий Clostridium, Bacillus и Pseudomonas, а также в клетках млекопитающих (печень, мозг, поджелудочная железа). Для некоторых из них характерна строгая специфичность по отношению к спиртовой группе молекулы субстрата, например к остатку холина (фосфолипазы Cx) и миоинозита (фосфолипазы Си). Молекулярная масса фосфолипаз С от 23 до 51 тыс. Ионы Zn2+ являются для них коферментом и стабилизатором. Оптимальная каталитическая активность при рН около 7 для фосфолипаз Cx, и при рН < 7 для фосфолипаз Си.

Фосфолипаза С, гидролизующая фосфодиэфирную связь между глицериновым остатком фосфолипида и полярной фосфатной группой, относится к фосфодиэстеразам также как и фосфолипаза D. Фосфолипаза С является ключевым ферментом метаболизма фосфатидилинозитола и липидных сигнальных путей.

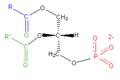
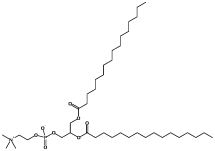
Фосфолипаза С активируется Gαq или Gβγ субъединицами G-белка. Таким образом, она является частью G-белоксвязанного рецептора (англ. G protein-coupled receptor) и соответствующего сигнального пути или частью трансмембранного рецептора с внутренней или ассоциированной тирозинкиназной активностью.

Фосфолипаза С гидролизует фосфатидилинозитол (PIP2) на два вторичных медиатора инозитолтрифосфат (IP3) и диацилглицерин (DAG). Эти медиаторы становятся вовлечены в последующие этапы сигнальных путей. В частности, они модулируют кальциевые каналы эндоплазматического ретикулума и протеинкиназу С, соответственно.

Фосфолипаза D относится к группе важных ферментов, которые в живых системах выполняют разнообразные функции от усвоения питательных веществ до синтеза биологически активных соединений. Обнаружены в растениях (овощи, водоросли), микроорганизмах и в тканях животных. Их молекулярная масса 90-116 тыс. Оптимальная каталитическая активность при рН 4,7-8,0. Катионные ПАВ ингибируют фосфолипазы D, анионные - активируют.

Фосфолипаза D проявляет прежде всего гидролитическую активность, в результате которой происходит расщепление сложноэфирной связи между остатком фосфатидной кислоты и спирта в молекулах фосфолипидов (ФЛ). При этом последний замещается на водород, но возможен перенос остатка фосфатидной кислоты на самые разные гидроксилсодержащие акцепторы, что представляет большой интерес для биотехнологии, так как трансфосфатидилирующая активность фосфолипазы может быть использована для синтеза разнообразных лекарственных препаратов.

Фосфолипаза D специфически расщепляет фосфатидилхолин на фосфатидную кислоту и холин, высвобождая последний в цитоплазму.

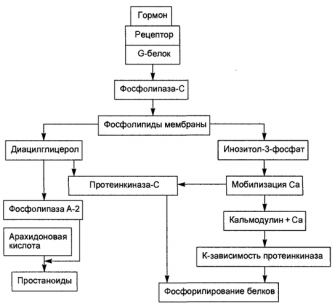


фосфатидилхолин фосфатидная кислота холин

1.2 Система фосфолипаза С - инозитол-3-фосфат

Активация мембранной гуанилатциклазы происходит не под непосредственным влиянием гормон-рецепторного комплекса, а опосредованно через ионизированный кальций и ок-сидантные системы мембран. Определяющая эффекты ацетилхолина стимуляция активности гуанилатциклазы также осуществляется опосредованно через Са2+. Через активацию гуанилатциклазы реализует эффект и на-трийуретический гормон предсердий — атриопептид. Путем активации пе-рекисного окисления стимулирует гуанилатциклазу гормон эндотелия сосудистой стенки оксид азота — расслабляющий эндотелиальный фактор. Под влиянием гуанилатциклазы из ГТФ синтезируется цГМФ, активирующий цГМФ-зависимые протеинкиназы, которые уменьшают скорость фосфорилирования легких цепей миозина в гладких мышцах стенок сосудов, приводя к их расслаблению.

В большинстве тканей биохимические и физиологические эффекты цАМФ и цГМФ противоположны. Примерами могут служить стимуляция сокращений сердца под влиянием цАМФ и торможение их цГМФ, стимуляция сокращения гладких мышц кишечника цГМФ и подавление цАМФ. цГМФ обеспечивает гиперполяризацию рецепторов сетчатки глаза под влиянием фотонов света. Ферментативный гидролиз цГМФ, а следовательно, и прекращение гормонального эффекта, осуществляется с помощью специфической фосфодиэстеразы.



Опосредование гормонального сигнала системой фосфолипаза С—инозитол-3-фосфат.

Образование гормон-рецепторного комплекса при участии регуляторного G-белка активирует мембранную фосфолипазу С, вызывающую гидролиз фосфолипидов мембраны с образованием двух вторичных посредников: инозитол-3-фосфата и диацилглицерола. Инозитол-3-фосфат ведет к выходу Са2+ из внутриклеточных депо. Связывание ионизированного кальция со специализированным белком кальмодулином активирует протеинкиназы и вызывает фосфорили-рование внутриклеточных структурных белков и ферментов. Диацилглицерол повышает сродство протеинкиназы С к Са2+, способствуя ее активации, что также завершается процессами фосфорилирования белков. Диацилглицерол одновременно реализует другой путь опосредования гормонального эффекта, активируя фосфолипазу А2 и образование простаноидов.

Гормонрецепторный комплекс с участием регуляторного G-белка ведет к активации мембранного фермента фосфолипазы С, вызывающей гидролиз фосфолипидов мембраны с образованием двух вторичных посредников: инозитол-3-фосфата и диацилглицерола. Инозитол-3-фосфат вызывает выход Са2+ из внутриклеточных депо, в основном из эндоплазматического ретикулума, ионизированный кальций связывается со специализированным белком кальмодулином, что обеспечивает активацию протеинкиназ и фосфорилирование внутриклеточных структурных белков и ферментов. В свою очередь диацилглицерол способствует резкому повышению сродства протеинкиназы С к ионизированному кальцию, последний без участия кальмоду-лина ее активирует, что также завершается процессами фосфорилирования белков.

Диацилглицерол одновременно реализует и другой путь опосредования гормонального эффекта за счет активирования фосфолипазы А2. Под влиянием последней из мембранных фосфолипидов образуется арахидоновая кислота, являющаяся источником мощных по метаболическим и физиологическим эффектам веществ — простагландинов и лейкотриенов. В разных клетках организма превалирует один или другой путь образования вторичных посредников, что в конечном счете и определяет физиологический эффект гормона. Через рассмотренную систему вторичных посредников реализуются эффекты адреналина (при связи с альфа-адренорецептором), вазопрессина (при связи с V-1-рецептором), ангиотензина-И, соматостатина, окситоцина.

1. Фосфолипазы А2

2.1 Общие сведения (реакция, открытие, строение)

Фосфолипаза А2 (К.Ф.3.1.1.4.) – фермент, катализирующий отщепление остатка жирной кислоты - лецитин, кефалин - от фосфолипидов, превращая их в токсичные соединения, сильно уменьшающие поверхностное натяжение. Эти соединения растворяют эритроциты и другие, клеточные и субклеточные структуры и поэтому его называют лизолецитинами и лизокефалинами

В молекуле фосфолипидов фосфолипаза пчелиного яда отщепляет жирную кислоту со второго места в молекуле и поэтому ее называют фосфолипазой А2. Она известна с 1897 года (Лангер) как фактор, усиливающий гемолитическую активность пчелиного яда после добавления лецитина. Фосфолипаза является наиболее исследованным энзимом пчелиного яда. Как пищеварительный фермент фосфолипаза была открыта в 1900 году. Сейчас очевидно, что фосфолипаза А2 (ФЛА2) – больше чем пищеварительный фермент. Она широко распространена и присутствует в большинстве клеток и тканей млекопитающих, выполняя функции регулятора метаболизма, поддержания мембранного гомеостаза, образования предшественников эйкозаноидов.

В зависимости от молекулярной массы, клеточной локализации и присутствия ионов Са2+ различают цитозольные ФЛА2, секреторные и Са-независимые ФЛА2 или ФЛА2 внешней мембраны.

ФЛА2 включают несколько не связанных белковых семейств с общей ферментативной активностью. Два наиболее важных семейства — это секретируемые и цитозольные фосфолипазы А2.

Цитозольные ФЛА2:

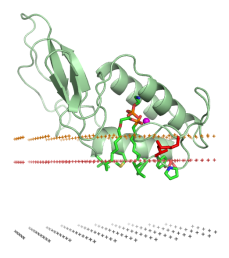
Внутриклеточные фосфолипазы, также как и внеклеточные, относятся к кальций-зависимым ферментам. Структурно, однако, они сильно отличаются от секретируемых фосфолипаз. Как правило, они значительно крупнее (более 700 аминокислот) и содержат C2 домен, который направляет фермент к клеточной мембране. Эти фосфолипазы в основном участвуют в клеточных сигнальных путях, таких как воспалительная реакция. Под действием ФЛА2в клетке может образовываться арахидоновая кислота, предшественник эйкозаноидов, таких активных сигнальных молекул как лейкотриены и простагландины.

ФЛА2 внешней мембраны:

Грам-отрицательные бактерии содержат на внешней мембране ФЛА2 с широким спектром специфичности. В кишечной палочке (Escherichia coli) этот фермент участвует в выбросе токсина бактериоцина из клетки за счёт повышенной проницаемости мембраны при увеличении уровня лизофосфолипидов и жирных кислот в мембране.

Секретируемые ФЛА2:

Экстраклеточные формы фосфолипаз были выделены из различных ядов змей, пчёл и ос. Они также находятся во всех тканях млекопитающих и в бактериях. Активность этих фосфолипаз требует наличия кальция.



Фосфолипаза А2 пчелиного яда во внеклеточном пространстве вблизи липидного бислоя. Полярные группы фосфолипидов находятся между жёлтой и красной плосткостями. Неполярные ацильные цепи — между красной и чёрной плоскостями.

Панкреатическая фосфолипаза относится к ферментам пищеварения и участвует в переваривании липидов пищи. Фосфолипазы яда участвуют в обездвиживании жертвы за счёт лизиса её клеток.

2.2 Классификация и свойства

2.2.1 Цитозольные ФЛА2

История цитозольных фосфолипаз группы А2 началась в 1991 г., когда из цитозоля различных клеток животных был выделен и клонирован белок молекулярной массой 85 кДа, который кроме молекулярной массы отличался от известных к тому времени фосфолипаз отсутствием дисульфидных мостиков и чувствительностью к кальцию. Позже скрининг нуклеотидных баз позволил найти ещё два паралога – cPLA2b и cPLA2g. Первый из найденных белков получил название cPLA2a. Называясь «цитозольным», фермент действует тем не менее на мембранах цитоплазматического ретикулума и ядра. Эта изоформа ФЛА2 присутствует во многих клетках и тканях: мозге, почках, селезенке, легких, макрофагах, нейтрофилах, альвеолярных эпителиальных клетках и др. Фермент становится активным в результате фосфорилирования митоген-активируемыми протеинкиназами и протеинкиназой С. Различные внеклеточные цитокины, митогены, гормоны, нейромедиаторы, факторы роста, антигены, эндотоксины, а так же определенные физические и стрессовые воздействия, включая ультрафиолетовый свет и оксидативный стресс, индуцируют активацию и синтез цитозольной ФЛА2.

Основной особенностью этого изотипа фермента является то, что он наиболее активно гидролизует фосфолипидные субстраты, содержащие во втором положении арахидоновую кислоту. Такая субстратная селективность и определяет основную функцию фермента в клетке.

Методом ядерного магнитного резонанса была охарактеризована пространственная структура этого фермента; несколько позже появились рентгеноструктурные данные. Фермент гидролизует сложноэфирную связь в положении sn-2. Для проявления максимальной ферментативной активности требуются сравнительно низкие концентрации ионов Ca2+ (порядка 500 нмоль/л); причём присутствие ионов Ca2+ необходимо не для проявления ферментативной активности, а для связывания белка с поверхностью внутриклеточных мембран или в случае модельных систем – с липидными частицами. Фермент практически не различает группы в положении sn-1, но обладает специфичностью к фосфолипидам, содержащим арахидоновую кислоту в положении sn-2. Олеиновая (18: 1) и линолевая (18: 2) кислоты под действием cPLA2a слабо отщепляются от соответствующих фосфолипидов, но a-линолевая (18: 3) и эйкозапентаеновая (20: 5) кислоты имеют преимущества перед арахидоновой кислотой. Поскольку указанные кислоты находятся в клетках в крайне низких концентрациях, то фосфолипиды с арахидоновой кислотой в положении sn-2 становятся основным субстратом. Фермент не проявляет специфичности к заместителю в положении sn-3, но тем не менее диацилглицерин не является его субстратом. Помимо основной активности фермент проявляет и лизофосфолипазную активность, т. е. способен отщеплять ацил из положения sn-1 лизофосфолипида. Предполагают, что эта активность нужна для защиты клетки от повышенной концентрации лизофосфолипидов, при которой могут нарушаться функции мембран. Показано, что фермент может также проявлять трансацилазную активность. Биологическое значение этой активности изучается.

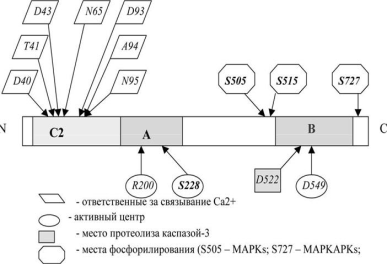
Паралоги цитозольной ФЛА2 описаны совсем недавно и сведения об их свойствах ограничены. Известно, что белок cPLA2g не содержит кальцийсвязывающего домена и не зависит от ионов Ca2+; имеет всего 29 % сходства с аминокислотной последовательностью белка cPLA2a. Он связан с мембраной за счёт пальмитинового сайта и проявляет в основном изофосфолипазную активность. Показано его участие в развитии апоптоза макрофагов. Белок cPLA2b имеет кальцийсвязывающий домен, но также проявляет преимущественно свойства ФЛА1, т.е. гидролизует связь sn-1.

Фермент cPLA2a – единственная на сегодняшний момент фосфолипаза, которая специфична к арахидоновой кислоте и предпочитает субстраты, локализованные в мембране, а не находящиеся в мономерной форме в растворе. Возможно, эти свойства можно объяснить существованием амфифильной «крышки» (аминокислотные остатки 413-457), которая предотвращает вход жирнокислотного остатка фосфолипида в туннель активного центра в случае, если белок не локализован на мембранах. «Крышка» открывается при взаимодействии белка с анионными липидами мембраны. Межфазный катализ, осуществляемый этим ферментом, интенсивно изучается.

Открытие цитозольной ФЛА2 в конце 1980-х гг. дало толчок к изучению регуляции синтеза эйкозаноидов в организме при остром ответе на различные провоспалительные стимулы. Регуляция секреторной фосфолипазы происходит на уровне её экспрессии, а активность цитозольной фосфолипазы в клетке регулируется также на уровне активности фермента. Основными факторами, влияющими на активность цитозольной фосфолипазы являются концентрация внутриклеточного Са2+ и фосфорилирование этого фермента протеинкиназами. Концентрация ионов Са2+ и активность различных протеинкиназ в клетке являются весьма лабильными параметрами, изменяющимися в течение нескольких секунд после связывания лигандов - агонистов с соответствующими клеточными рецепторами, что позволяет эффективно регулировать в клетке продукцию арахидоновой кислоты и соответственно синтез эйкозаноидов.

В неактивированных клетках концентрация внутриклеточного Са2+ обычно колеблется в пределах 30-100 нмоль/л. При активации различных рецепторов концентрация ионов Са2+ может достигать 1-3 мкмоль/л. В ряде работ было показано, что увеличение активности цитозольной ФЛА2 происходит в диапазоне концентраций ионов Са2+ 150-800 нмоль/л. При увеличении концентрации ионов Са2+ происходит миграция фосфолипазы к мембранам и её прикрепление к ним, после чего начинается гидролиз фосфолипидов.

Связывание фосфолипазы с мембраной происходит за счёт имеющегося в белке домена С2:



Домен С2 гомологичен подобным доменам протеинкиназы С, ГТФазы, и фосфолипазы С. Все эти белки связываются с мембранами в присутствии ионов Са2+. Наличие достаточных концентраций ионов Са2+ необходимо для ориентации фосфолипазы и её прикрепления. В отсутствие ионов Са2+ фермент сохраняет активность по отношению к растворимым субстратам, таким как 1-пальмитил-2-лизофосфатидилхолин.

В зависимости от типа агониста концентрация ионов Са2+ в клетке меняется по-разному. Одни агонисты вызывают её кратковременный рост внутри клетки; под действием этих агонистов концентрация ионов Са2+ после резкого подъёма возвращается к исходному уровню в течение 1-2 мин. Другие же вызывают продолжительный рост концентрации ионов Са2+, и повышенная концентрация ионов Са2+ сохраняется в клетке от 5-30 мин. На эпителиальных клетках было показано, что для устойчивого прикрепления ФЛА2 к поверхности биологических мембран необходима повышенная концентрация ионов Са2+ в течение 5 мин, а при кратковременном подъёме через 1-2 мин происходит обратная диссоциация белка в цитозоль без заметного высвобождения арахидоновой кислоты. Если же повышенная концентрация ионов Са2+ сохраняется в течение 5 мин и более, то цитозольная фосфолипаза ФЛА2 остаётся на мембране и гидролиз фосфолипидов продолжается даже после возврата концентрации внутриклеточного Са2+ к нормальным значениям.

Для проявления максимальной активности фосфолипазы при кратковременном увеличении концентрации ионов Са2+ внутри клетки необходимо также фосфорилирование белка киназами. В опытах in vitro было показано, что цитозольная фосфолипаза может быть фосфорилирована протеинкиназой С, митогенактивируемыми протеинкиназами р42/р44 или протеинкиназой А, но только фосфорилирование митогенактивируемыми протеинкиназами (MAPK) приводит к значительному увеличению активности фосфолипазы. Митогенактивируемые протеинкиназы фосфорилируют фосфолипазу по остатку Ser-505. В ряде случаев именно фосфорилирование определяет проявление активности фосфолипазы в клетке.

Таким образом, цитозольная фосфолипаза принимает участие как в регуляции синтеза эйкозаноидов при остром ответе клеток на различные провоспалительные стимулы, так и в ряде случаев при отложенном ответе. Основными факторами, регулирующими активность цитозольной фосфолипазы, являются концентрация внутриклеточного Са2+ и активность митогенактивируемых протеинкиназ. Активность фермента может значительно возрастать в течение первых минут после стимуляции клеток. Транслокация фермента при активации важна по двум причинам: 1) позволяет ферменту взаимодействовать с фосфолипидами мембраны; 2) доставляет селективную по арахидоновой кислоте липазу к месту расположения ферментов синтеза простагландинов (PG) и лейкотриенов (LT), т. е. потенциально возможно образование компартмента, в котором высвобождаемая арахидоновая кислота непосредственно метаболизируется далее.

* + 1. Секреторные ФЛА2

Секреторные ФЛА2 имеют молекулярную массу около 14 кДа, характеризуются абсолютной необходимостью ионов Са2+ в миллимолярных концентрациях для каталитической активности, рН оптимум находится в интервале 7-9.

В настоящее время описано десять типов секреторной ФЛА2 (IВ, IIА, IIC, IID, IIE,IIF,III,V, X,XII) которые различаются первичной структурой и расположением дисульфидных мостиков. Все типы секреторных фосфолипаз представляют собой глобулярные белки, богатые цистеином (5-8 дисульфидных мостиков), что обеспечивает стабильность фермента, в том числе устойчивость к протеолизу и денатурации. Фермент не проявляет избирательности в отношении жирнокислотного состава фосфолипидов, но предпочтительно гидролизует отрицательно заряженные фосфолипиды (фосфатидную кислоту и фосфатидилглицерол).

Долгое время была известна только одна ФЛА2, которая в изобилии присутствует в панкреатической жидкости (тип IB). В 1989 г. была открыта и клонирована фосфолипаза типа IIA, которая хранится в секреторных гранулах тромбоцитов и концентрация которой значительно увеличивается в местах воспаления, таких как синовиальная жидкость при ревматоидном артрите. Эти белки имеют большое сходство с белками яда змей. Среди белков ядов пчёл и ящериц были обнаружены другие фосфолипазы, которые отнесены к типу III. У млекопитающих белок, соответствующий этому типу, был обнаружен только в 2000 г.. Новый период в исследованиях секреторных фосфолипаз начался в 1994 г., когда были открыты белки типа IIC и V. Это открытие привело к пересмотру роли этого семейства белков в регуляции функций клеток и интенсивному поиску новых аналогичных белков. Были открыты белки типа X, IID, IIE и IIF, XII.

Все эти белки (кроме белка типа III) имеют молекулярную массу 14-17 кДа, содержат гистидин в каталитическом центре и проявляют фосфолипазную ктивность в присутствии миллимолярных концентраций кальция. Они имеют высококонсервативные аминокислотные последовательности в каталитическом участке (DXCCXXHD) и участке кальцийсвязывающей петли (XCGXGG), а также 6-8 консервативных сульфидных мостиков. В активном центре находится также аспартат, который совместно с кальцийсвязывающей петлей выполняет роль кармана для иона Ca2+.

Ферменты этого семейства не проявляют специфичности ни по отношению к группе, связанной с остатком фосфатидной кислоты, ни по отношению к ацильной группе в положении sn-2. Наличие в фосфолипидах окисленных форм жирных кислот увеличивает активность секреторных фосфолипаз, что предполагает их участие в регуляции вязкости мембран при окислительном стрессе. Из данных рентгеноструктурного анализа первых двух групп белков следует существование гидрофобного канала, в который входит молекула фосфолипида после межфазного связывания белка на фосфолипидной поверхности.

Секреторная ФЛА2 конститутивно содержится в различных клетках, участвующих в развитии иммунных и воспалительных ответов: макрофагах, тучных клетках, фибробластах и тканях таких органов, как печень, селезенка, тимус, костный мозг, кишечник. Активность фермента на уровне клеток регулируется за счет его индукции различными воспалительными стимулами (интерлейкин-1 и интерлейкин-6, фактор некроза опухоли,липополисахарид, интерферон-g, форболовые эфиры, фактор роста нервов). В соответствии с индукцией разнообразными стимуляторами промотер гена IIA содержит нуклеотидные последовательности TATA и CAAT, а также последовательности связывания таких факторов транскрипции, как AP-1, C/EBP, CREB, NF-kB, STAT, PPA Rg. В некоторых клетках экспрессия ФЛА2 зависит от предварительной активации цитозольной фосфолипазы PLА2a, при этом предполагается вовлечение в процесс регуляции фосфолипазы IIA продуктов 12/15- липоксигеназного пути. Глюкокортикоиды (стероидные противовоспалительные препараты) являются супрессорами экспрессии фосфолипазы IIA.

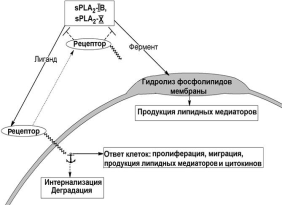
Изменение экспрессии фосфолипазы IIA во многих случаях связано с модуляцией простагландиновой ветви каскада арахидоновой кислоты. Так, при стимуляции интерлейкином-1 и фактором некроза опухоли активировался как синтез и секреция фосфолипазы, так и синтез простагландина Е2 и простациклина в мезангиальных или эндотелиальных клетках, соответственно. При добавлении к клеткам антител к фосфолипазе синтез простациклина частично подавлялся. Из результатов, полученных в последние годы, следует, что секреторные фосфолипазы (IIA и схожие с ней V, X) участвуют в процессах как быстрой, так и замедленной продукции арахидоновой кислоты и простаноидов.

Следует отметить, что добавление секреторных фосфолипаз во внеклеточную среду приводит к активному высвобождению арахидоновой кислоты и синтезу простаноидов активированными клетками, но практически не влияет на гидролиз фосфолипидов мембран покоящихся клеток.

Помимо роли фермента, ответственного за наличие арахидоновой кислоты, секреторные фосфолипазы могут выступать в роли физиологически активных веществ. Так, в тучных клетках специфические ингибиторы секреторных фосфолипаз уменьшали стимулированную фактором роста нервов экспрессию циклооксигеназы-2. При этом каталитически неактивные мутанты белка фосфолипазы также были способны вызывать экспрессию циклооксигеназы-2, т.е. этот эффект не зависит от ферментативных свойств фосфолипазы. Механизм этого процесса не ясен. Возможно, вовлекаются функции секреторной ФЛА2 как лиганда специфических рецепторов.

Действительно, в 1995 г. было показано, что существуют специфические белки, которые связываются с фосфолипазой типа IB (константа диссоциации образовавшегося комплекса 1 нмоль/л) и проявляют различные биологические эффекты. За последующие 10 лет обнаружено ещё много белков, растворимых и мембраносвязанных, которые способны связывать секреторную фосфолипазу. Однако свойства «классического» рецептора, который при связывании лиганда активирует систему внутриклеточной передачи сигнала, проявляет только один из этих белков. Это белок M-типа, или sPLA2R. Ген данного белка локализован во второй хромосоме; белковая последовательность имеет 75 % гомологии среди ряда видов млекопитающих; ген имеет 1 копию и ничем не похож на другие гены. Белок имеет молекулярную массу 180-200 кДа, значительная его часть расположена во внеклеточной области, в цитозоле находится последовательность из 40 аминокислотных остатков. Белок без этого цитозольного участка встречается в растворимой форме и показана его роль как ингибитора эффектов секреторных фосфолипаз. У человека белок экспрессирован в поджелудочной железе, лёгких и почках. Показана важная роль активации этого рецептора в развитии эндотоксического шока.

На рисунке представлена схема участия рецептора секреторной фосфолипазы в реализации биологической роли фермента на уровне клеток.



На схеме показано, как активные формы фосфолипазы sPLA2-IB или sPLA2–X проявляют свою ферментативную активность, что приводит к появлению липидных медиаторов, а также являются высокоаффинными лигандами для рецептора, локализованного в плазматической мембране. Взаимодействие фосфолипазы с рецептором мембраны приводит к индукции митогенактивированных протеинкиназ (MAPK) и соответствующего пути внутриклеточного проведения сигнала, что стимулирует различные ответы клеток: пролиферацию и миграцию клеток, синтез ими физиологически активных веществ. При потере контакта с мембраной рецептор сохраняет возможность связывать фосфолипазу, что позволяет регулировать активность последней как фермента и как лиганда.

Таким образом, секреторные фосфолипазы играют существенную роль в развитии и распространении воспалительных процессов в организме. Экспрессия секреторных фосфолипаз значительно увеличивается при разнообразных воспалительных заболеваниях. По этой причине разрабатывают селективные ингибиторы ферментативной активности белков этого семейства как потенциально новый класс противовоспалительных веществ. Для поиска ингибиторов секреторных фосфолипаз перспективно применение методов компьютерного моделирования, так как эти низкомолекулярные белки (их молекулярная масса около 14 кДа) получены в кристаллическом состоянии, известны их трёхмерные структуры. Есть основания полагать, что в ближайшие 5-10 лет на основании результатов этих исследований будут созданы новые терапевтические технологии и новые лекарственные средства.

2.2.3 Кальцийнезависимая ФЛА2

Классическая кальцийнезависимая ФЛА2 (iPLA2-VIA) существует в олигомерной форме и имеет несколько сплайс-вариантов, из которых, по крайней мере, два (VIA-1 и VIA-2) обладают ферментативной активностью. Белок iPLA2-VIA-1 имеет молекулярную массу 85 кДа; содержит 8 анкириновых повторов в области N-конца, каталитический домен с характерной аминокислотной последовательностью GXSXG, где S – серин-465 действует как центр катализа. Имеется также ATP-связывающая последовательность GXGXXG. Около С-конца (в области аминокислотных остатков 694-705) существует связывающая область для калмодулина. Образование комплекса белка iPLA2-VIA с активированным калмодулином (т. е. в присутствии ионов Ca2+) приводит к инактивации данной фосфолипазы. Хотя обе сплайс-формы VIA-1 и VIA-2 имеют ATP- связывающие последовательности, показано, что только белкок iPLA2-VIA-2, но не iPLA2-VIA-1, активируется в несколько раз в присутствии ATP.

Анкириновые повторы встречаются у нескольких сотен белков, таких как факторы транскрипции, регуляторы клеточного цикла. Считается, что данный мотив участвует в белок- белковых взаимодействиях. Предполагают, что в клетках белок iPLA2-VIA присутствует в виде тетрамера и, возможно, анкириновые мотивы участвуют в олигомеризации белка. Фосфолипаза iPLA2-VIA не специфична к природе жирных кислот в положении sn-2 и заместителю в положении sn-3 фосфолипида; полностью активна в отсутствие кальция и осуществляет межфазный катализ. Фермент также проявляет лизофосфолипазную активность по положению sn-1, трансацилазную активность и активность, характерную для белка PAF-AH.

Белок iPLA2-VIB содержит липазный мотив GVSTG, где серин-483 находится в каталитическом центре; ATP-связывающий мотив; мотив сигнала локализации в пероксисомах на С- конце молекулы. С-концы молекул, включая ATP-связывающий повтор и каталитический участок, белков iPLA2-VIB и iPLA2-VIA сходны. Отличия наблюдаются в N-конце белка, где у белка iPLA2- VIB нет анкириновых мотивов, много сериновых и треониновых остатков, часть которых может фосфорилироваться протеинкиназами А и С. Также имеются пять участков Ser-Pro, которые являются мишенями для пролиновых киназ. Одна из этих последовательностей (PTSP, остатки 269-272) является сайтом фосфорилирования митогенактивированными протеинкиназами. От ионов кальция активность данной изоформы не зависит. Наличие различных участков фосфорилирования у белков группы iPLA2-VI указывает, что роль белков iPLA2-VIA и iPLA2-VIB в клетках может отличаться. Обе кальцийнезависимые фосфолипазы (iPLA2-VIA и iPLA2-VIB) являются мембраносвязанными белками.

2.3 Субстратная специфичность

Катализ код действием ФЛА2 характеризуется поверхностной, позиционной и стерической специфичностью фермента. Фосфолипаза катализирует реакцию на поверхности раздела липид/вода. С одной стороны, для большинства липолитичсскнх ферментов, включая и ФЛА2, активность фермента оказывается значительно выше при существовании субстратов в форме агрегатов (мицелл, смешанных мицелл, монослоев и бислоев), чем при действии на водорастворимые субстраты в мономолекулярной форме.

С другой стороны - ФЛА2 не действует на липидные молекулы в составе плотно упакованных и, следовательно, труднодоступных липидных агрегатов. Для создания поверхности раздела фаз в этих случаях обычно используют детергенты (тритон х-100, дезоксихолат натрия). Доказано, что для оптимального проявления поверхностной специфичности фермента необходимо наличие агрегированных субстратов с определенной длиной ацильной цепи.

С обнаружением стерической и позиционной специфичности ФЛА2, были сформулированы довольно строгие минимальные требования фермента к субстрату: в положении sn-2 глицеринового остатка липид должен содержать сложноэфирную группу, а в положении sn-з - фосфатную. Позднее было показано, что остаток фосфорной кислоты может быть замещен сульфониевым: сульфолипид оказался хорошим субстратом ФЛА2, соответствующие фосфолппиды, где связь С-О-Р замещена на связь С-Р, также гидролизуются ферментом, но в меньшей степени. Поэтому минимальные требования фермента к субстрату в настоящее время сводят к тому, чтобы глицерофосфолипид обладал природной L-конфигурацией и имел сложноэфирную связь в sn-2-положении глицерина, а также содержал на расстоянии пяти-шести атомов от карбоксильного углерода группу с сильными анионными свойствами. Считается, что фосфатная группа должна иметь одну свободную кислотную функцию.

В фосфолипиде с двумя чувствительными сложиоэфирными связями - дифосфатидилглицерине(кардиолипинс) - гидролизоваться могут обе. Было установлено, что β-лецитины (1, 3-диацил-sn-глпцеро-2-фосфохолиньг) гидролизуются ФЛА2из яда змеи *Crotalus adaincniteus,* хотя и со сравнительно низкой скоростью. ФЛА2 не гидролизует амидную связь сфинголипидов. Тиоловые аналоги фосфатидилхолинов являются хорошими субстратами, что позволяет следить за процессом гидролиза спектрофотометрически. Де Хаас и др. установили, что отрицательный заряд на фосфатной группе не является абсолютным требованием к субстрату.

Благодаря стерической и позиционной специфичности, ФЛА2 - ценный инструмент в химии и биохимии липидов. Их используют для установления позиционного распределения жирных кислот при анализе фосфоглицеридов, для разделения рацемических смесей липидов, а также в синтезе липидов для получения фосфоглицеридов со смешанным составом жирных кислот.

Субстратная специфичность клеточных ФЛА2 до сих пор еще полностью не очерчена, однако накоплены данные относительно строения субстратов для ФЛА2 клеток крови и иммунной системы, в частности, доказана специфичность этих ферментов к фосфатидилхолинам, содержащим в sn-2-положении глицерина арахидонат.

* 1. Ингибиторы ФЛА2
     1. Неконкурентные ингибиторы

Снижение каталитической активности ФЛА2 может происходить вследствие нарушения равновесия на одной или на нескольких стадиях ферментативной реакции, поэтому известные ингибиторы этого фермента можно условно разделить следующим образом.

а) Связывание ингибитором фермента (Е) может сдвигать равновесие Е↔Е\* влево и понижать концентрацию каталитически активного Е\*. Это происходит при добавлении к везикулам субстрата везикул негидролизуемого аналога субстрата, с которым фермент связывается, но не может быстро десорбироваться. Необходимость наличия ионов кальция при связывании ФЛА2 с межфазной поверхностью дает основания относить к числу ингибиторов хелатирующие агенты, например EDTA.

б) Липофилъные соединения изменяют фазовые свойства субстратов и уменьшают плотность заряда на межфазной поверхности, сдвигая равновесие Е↔Е\* влево. Было показано, что такие изменения вызывают органические растворители, детергенты, спирты, а также катионные амфифилы, фенотиазины и местные анестетики различной химической природы. Другие ингибиторы - жирные кислоты, мепакрин, аристолоховая кислота - также влияют на стадию связывания-десорбции Е↔Е\*, не затрагивая каталитического действия фермента на межфазной поверхности.

в) Некоторые типы неспецифического ингибирования. При определенных условиях скорость гидролиза под действием ФЛА2 фосфолипидов, подвергшихся перекисному окислению, значительно увеличивается. Поэтому антиоксиданты считаются потенциально способными понижать активность фермента. Белки типа липокортина и калпактина солюбилизируют фосфолипиды межфазной поверхности, тем самым снижая активность ФЛА2. Водорастворимые анионы, такие как гепарин, ингибируют связывание ФЛА2с межфазной поверхностью путем блокирования анионного участка связывания фермента.

г) Ковалентные модификации аминокислотных остатков ФЛА2. 1-Бромоктан-2- он и n-бромфенацилбромид ковалентно связываются с His-48 в каталитическом центре фермента и полностью угнетают каталитическую активность; скорость такой модификации значительно снижается, когда фермент уже связан с межфазной поверхностью. Диальдегиды, подобные госсиполу, модифицируют аминогруппы остатков лизина ФЛА2,ответственные за ее межфазное связывание; скорость модификации увеличивается в случае уже связанного с межфазной поверхностью фермента. Подобным образом действуют нестероидный терпеноид маноалид, выделенный из морской губки и его синтетический аналог маноалог.

д) Другие соединения. Предположительно, многие другие соединения, в том числе некоторые лекарства, подавляют активность ФЛА2 in vivo, однако, механизм их ингибиторного действия еще не выяснен. Среди таких веществ - биофлавоноиды и ретиноиды, гидроксиэйкозатетраеновые кислоты, фенофетол (агонист [β-адренэргических рецепторов), габексатмезилат, нисерголин, папаверин, циннаризин и амперон.

2.4.2 Конкурентные ингибиторы

Конкурентные ингибиторы ФЛА2 - это аналоги субстратов, продуктов реакции или комплекса переходного состояния. Они конкурируют с субстратом за связывание с активным центром молекулы Е\*, эффективно понижая концентрацию комплекса ES\*. Этот механизм ингибирования был экспериментально подтвержден при изучении катализа фосфолипидов под действием ФЛА2 по типу "scooting".

Общепринятая стратегия создания ингибиторов состоит в замене чувствительной к ФЛА2 сложноэфирной связи на негидролизуемую группу. При этом ингибитор должен оставаться близким структурным аналогом субстрата и не вызывать изменений в липидных мембранах. В настоящий момент не представляется возможным сопоставить имеющиеся данные о конкурентных ингибиторах, поскольку еще не выработано единой теории и количественного описания липолиза на границе раздела фаз липид/вода.

Аминоацильные фосфолипиды. Среди фосфатидилхолинов с модификацией.sn-2-сложноэфирной связи был открыт класс мощных конкурентных ингибиторов ФЛА2 - sn-2-амидных аналогов. Замена sn -2-сложноэфирной связи на простую эфирную связь или на углеводородный остаток также приводила к ингибированию ФЛА2 по конкурентному типу, но в меньшей степени.

Влияние аминоацильных аналогов фосфолипидов на ферментативную активность ФЛА2, исследовалось, в основном, в модельных экспериментах со смешанными мицеллами при соблюдении следующих условий:

1)общая концентрация липидов (ингибитора и субстрата) [I] + [S] должна быть постоянной для расчета мольной доли ингибитора, α = [I]/([I] + [S]);

2)молекулы субстрата и ингибитора должны занимать одинаковую площадь на межфазной поверхности;

3)межфазная поверхность мицелл должна быть достаточно большой, чтобы фермент находился только в связанной форме.

Для оценки воздействия ингибитора на активность ФЛА2 была использована условная величина ингибиторной силы (Z), которая является мерой соотношения констант межфазной диссоциации для субстрата и ингибитора и определяется выражением:

*Rv* = I + αZ,

где Rv - отношение скорости реакции при К≠Кm к скорости реакции при Кi = Кm*,* α - мольная доля ингибитора в мицелле.

Изучали также ингибиторное действие (R)-1- алкил-2-ациламино-1,2-дидезоксиглицеро-З-фосфохолиновых аналогов на панкреатические фосфолипазы млекопитающих. Среди ингибиторов с насыщенными жирнокислотными цепями наибольшую активность имели аналоги с С10-ацильными цепями. Поведение ненасыщенных аналогов было более сложным как в цвиттерионных, так и в анионных ингибиторах, увеличение числа цис-двойных связей при их определенном расположении в ацильной цепи приводило к возрастанию параметра Z [80].

В ходе исследований стиоамидными аналогами субстратов выяснилось, что тиоамидный аналог фосфатидилэтаноламина с lС50=4.5 \* 10-7 М является самым сильным из известных ингибиторов ФЛА2.

Исследования, проведенные с аминоацильными ингибиторами, выявили некоторые аспекты взаимодействия фермент/липид:

1) Введение амидного остатка в sn-2-положение фосфолипида значительно увеличивает его связывание с каталитическим центром ФЛА2: более нуклеофильный атом кислорода амидной группы способен сильнее взаимодействовать с электрофилом этого центра (предположительно, Са2+). Амидная группа предоставляет лучшие возможности и для водородного связывания.

2) α-Метиленовая группа ацильного остатка sn-2-положении фосфолипида отвечает за связывание фосфолипида с каталитическим центром фермента.

3) Увеличение гидрофобности функциональной группы sn-1-положении фосфолипида повышает сродство между ферментом и субстратом.

4) Фосфатидилэтаноламииы оказались более сильными ингибиторами, чем фосфатидилхолины.

Подход к синтезу оптически активных 1-ацил- 2-ациламино-2-дезоксиглицерофосфохолинов основывается на сохранении хиральности исходного соединения (L-серина) на протяжении всего синтеза. Выбранная последовательность введения заместителей предполагает использование минимального числа защитных групп. Также разработан стереоспецифический метод синтеза 1-алкил-2-ациламино-2-дезоксиглицерофосфохолинов исходя из L-серина. Введение алифатической алкильной группы осуществляют взаимодействием метансульфоната жирной кислоты с оксазолинзащищенным дезоксиглицеридом. Рацемические длинноцепочечные ациламиноаналоги фосфолипидов предложено получать исходя из 2-аминопропанола. Описан синтез оптически активного тиоамидного аналога фосфатидилхолина.

Фтаркетоновые аналоги**.** Ранее установлено, что аналоги субстратов, содержащие поляризованные кетоновые группы, включая фторкетоновые и 1,2-дикетоновые, ингибируют гидролитические ферменты. Наилучшим ингибитором оказался замещенный фосфоэтаноламин с единственным ацильным остатком, несмотря на то, что фермент предпочитает субстраты с двумя ацильными остатками

Так как дифторкетоновая группа легко гидратируется в водном растворе, ингибиторы напоминают по структуре тетраэдрический интермедиат, который образуется во время липолиза.

Среди фторкетоновых аналогов были найдены селективные ингибиторы внутриклеточных цитозольных ФЛА2. Такими ингибиторами оказались электрофильные кетоновые аналоги арахидоновой кислоты.

Самым мощным ингибитором оказался, α-трифторметилкетон арахидоновой кислоты. Методами l9F- и 13С-ЯМР-спектроскопии анализировали строение комплекса этого вещества с ФЛА2. Результаты подтвердили гипотезу о том, что при связывании с активным центром фермента образует полукеталь с остатком серина или треонина молекулы белка, благодаря способности α-фторкетонов легко гидратироваться в водных растворах.

Фосфатные аналоги. Для изучения природы ингибирования ФЛА2 из различных источников и влияния заместителей на ингибиторную способность было синтезировано более 100 sn-2-фосфатных аналогов фосфатидилхолинов. Соединения данного класса ингибировали только фермент, уже связанный с межфазной поверхностью и не оказывали влияния на десорбцию фермента. Фосфатные ингибиторы связываются с активным центром фермента через ион кальция координационной связью Е-Са....О=Р, конкурируя с субстратами. Это взаимодействие модулируется заместителями молекулы ингибитора. Замещение в этом комплексе атома О на S, NН2, группы 0=Р на О=С-О, присутствие отрицательно заряженной фосфатной группы значительно понижало сродство к ферменту. Ингибиторная способность фосфоэфиров находилась в строгой зависимости от стереохимических и структурных особенностей: хиральности sn-2-положения, длины алкильной цепи вsn-положении и присутствия гидрофобного заместителя в sn -3-положении глицерина. Сульфонатные, амидные, оксимсодер жащие, дианионные фосфомоноэфирные аналоги не проявляли ингибиторных свойств.

Алкильные фосфотидилхолины. Для фармакологического использования, по-видимому, наиболее перспективными являются вещества, способные ингибировать ФЛА2 без нарушения структурной организации мембраны. Особый интерес в этом плане представляют липиды с простой эфирной связью. В молекулах липидов данного класса гидрофобные заместители присоединены к гидрофильному остатку за счет негидролизуемой ФЛА2 простой эфирной связи. Вместе с тем, по своему поведению в составе мембран липиды с простой эфирной связью практически не отличаются от своих диацильных аналогов. Изучали влияние длинноцепочечных фосфатидилхолинов с простой эфирной связью на разрушение мембран под действием ФЛА2 методом спектроскопии ''Р-ЯМР и оценивали возможность применения липидов при местных воспалительных реакциях.

Для исследуемых ингибиторов были получены практически одинаковые результаты: введение соединений в состав липидного бислоя из яичного фосфатидилхолина в мольном соотношении 1: 1 приводило к настолько эффективной стабилизации мембран, что не наблюдалось никаких структурных перестроек под действием этого фермента.

Среди фосфолипидов данного класса были найдены ингибиторы цитозольных ФЛА2:, обладающие противовоспалительными и антиаллергическими свойствами.

* 1. Значение для организма при нарушении активности

В патогенезе повреждения клетки важное значение имеет чрезмерная активация ФЛА2. Освободившиеся под действием фосфолипазы, ненасыщенные жирные кислоты (арахидоновая, пентаноевая и др.) расходуются на образование физиологически активных соединений — простагландинов и лейкотриенов. Оставшаяся часть молекулы фосфолипида (лизофосфолипид) имеет лишь один жирнокислотный "хвост", вследствие чего обладает способностью к мицеллообразованию и является очень сильным детергентом. С детергентным действием лизофосфолипидов и связано повреждение клеточных мембран в условиях чрезмерной активации ФЛА2.

Фармакологические и токсические свойства фосфолипазы обусловлены ее биохимической активностью. С помощью своего токсического лизолецитина, она расщепляет кровяные и тканевые структуры, повреждая их клеточные мембраны и органеллы. Фосфолипаза снижает свертывание крови, разрушая способствующие свертыванию компоненты, в структуре которых имеются фосфолипиды. Она повреждает мембраны митохондрий, а последние являются важным органоидом клетки, носителями сложных ферментных систем. Они участвуют в обмене веществ и окислительно-восстановительных процессах. Повреждение фосфолипидной структуры нервных волокон, вероятно, обусловлено фосфолипазой, которая блокирует проводимость между нервной и мышечной тканью.

Введение фосфолипазы под кожу вызывает местное воспаление, а внутривенное сопровождается снижением кровяного давления у подопытных животных, отеком легких, кровоизлияниями в альвеолах. У переживших несколько часов животных, в моче обнаруживается гемоглобин разрушенных эритроцитов. Кроме того, установлено, что фосфолипаза пчелиного яда, введенная под кожу, усиливает развитие модельных воспалительных процессов различной этиологии.

Высказывается предположение, что своим снижающим поверхностное натяжение действием мелиттин подготавливает фосфолипиды к энзимной активности фосфолипазы. Из всех составных частей пчелиного яда фосфолипаза является наиболее сильным антигенным и аллергенным раздражителем. В крови иммунных к пчелиному яду пчеловодов имеются антитела с высоким титром против яда. Сверхчувствительные к пчелиному яду пациенты при лабораторных исследованиях на аллергичность остро реагировали на фосфолипазу.

Усиливающие воспалительные процессы токсические и аллергические свойства фосфолипазы характеризуют ее как вредную для организма человека составную часть пчелиного яда.

Активация ФЛА2 зависит от кальция. Она происходит при стимуляции клеток надпочечников, что приводит к ускорению кругооборота арахидонилфосфатидилинозитола. Этот эффект вызывается также кальциевым ионофором и может отражать повышение внутриклеточного уровня кальция и вторичной стимуляцией ФЛА2 в качестве ранней реакции, сопутствующей рецепторному взаимодействию. Известно, что действие на стероидогенез в надпочечниках зависит от кальция, а не только от образования цАМФ. По крайней мере, часть потребностей в кальции может быть связана с опосредуемым ФЛA2 кругооборотом мембранных фосфолипидов при активации коры надпочечников.

Механизм, включающий активацию фосфолипазы, может отражать общее свойство гормонрегулируемых секреторных клеток, при гормональной стимуляции специфических клеток мишеней меняются и другие этапы метаболизма фосфолипидов. Так, в клетках гранулемы яичника, где ЛГ увеличивает продукцию простагландинов, гормон не повышает образование арахидоновой кислоты, а действует на более поздних этапах, увеличивая активность простагландинсинтетазы. Этот эффект ЛГ на синтез простагландинов в граафовом фолликуле (пузырчатый яичниковый фолликул), по-видимому, не опосредует стероидогенного действия гонадотропина, но играет важную роль в развитии овуляции.

* 1. Использование ФЛА2 в медицине

Секреторную ФЛА2 рассматривают как один из патогенетических факторов формирования ряда заболеваний: ревматоидного артрита, атеросклероза. В последние годы появились сведения о причастности этого фермента к патологии легких. Особый интерес представляет патогенетическая цепь "сФЛА2 –острый респираторный дистресс синдром (ОРДС) – сурфактант легких".

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

Сурфактант легких – липогликопротеиновый комплекс, который синтезируется альвеолоцитами II типа. Он состоит на 80-90% из фосфолипидов, 5-10% нейтральных липидов и 5-10% белков. Кроме поверхностно-активных свойств, необходимых для нормального дыхания, он обладает противовоспалительным и иммунорегуляторным действием. Нарушение его целостности приводит к увеличению сил поверхностного натяжения не только в альвеолах, но и в бронхиолах и мелких бронхах.

Субстратная специфичность цитозольной ФЛА2 к арахидоноил-содержащим субстратам предполагает, что именно эта изоформа играет основную роль в патогенезе астмы. Известно, что лейкотриены В4, С4, D4, E4 – основная группа медиаторов, вовлеченная в комплексный воспалительный процесс и приводящая к клиническим проявлениям астмы. Действие лейкотриенов заключается в сокращении гладкой бронхиальной мускулатуры, увеличении количества вырабатываемой слизи, стимулировании сосудистой проницаемости и образовании отека. Все эти признаки свойственны астме. Лейкотриены синтезируются в ответ на воздействие аллергена или неспецифической реакции, приводящей к активации цФЛА2.

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

Предполагается также участие цФЛА2 в возникновении и развитии легочного фиброза – малопонятного, на сегодняшний день, интерстициального поражения паренхимы легких. Патогенез этого состояния включает чрезмерную продукцию провоспалительных медиаторов, воспаление альвеол, пролиферацию фибробластов и накопление коллагена. Классической экспериментальной моделью этого состояния является фиброз легких, вызванный внутритрахеальным или внутрибрюшинным введением блеомицина.

Велика роль фосфолипазы в развитии некоторых форм панкреатита.

При недостаточности большого сосочка двенадцатиперстной кишки и повышенном давлении в двенадцатитперстной кишке возможен рефлюкс желчи или дуоденального содержимого в протоки поджелудочной железы. Желчь, попадая в протоки поджелудочной железы, может подвергаться воздействию панкреатической фосфолипазы, уже активированной трипсином, в результате чего образуется лизолецитин, который, проникая в интерстициальное пространство поджелудочной железы, вызывает глубокие повреждения в клетках.

Также доктором Heidi May была доказана, что липопротеин-ассоциированной ФЛА2 предсказывает риск коронарной смерти.

Полученные в последние годы сведения о причастности цитозольной и секреторной ФЛА2 к формированию патологии легких открывают перспективу поиска новых подходов к лечению таких заболеваний. Однако прежде необходимо четко определить место этих ферментов в патогенетической цепи молекулярных событий. И здесь важное значение может принадлежать "синдромальному " подходу. К примеру, еще нет сведений о состоянии ФЛА2 при гипертермии и гипоксии, при активации клеток продуцентов. Между тем, большинству заболеваний легких присущи эти состояния, которые во многом определяют клиническую картину, течение и исход патологического процесса.

* 1. Биологическая роль ФЛА2

К настоящему времени достаточно полно охарактеризованы и изучены секретируемые ФЛА2 ядов и панкреатических желез млекопитающих. Напротив, относительно низкие концентрацииin vivo внутриклеточных и непанкреатических внешнеклеточных ФЛА2, серьезно осложняют исследования этого класса ферментов.

Установлено, что мембраносвязанные ФЛА2 играют важную роль в регуляторных процессах клеточного метаболизма. Известно несколько путей регуляции этих ферментов, однако общий механизм очень сложен и до конца не изучен. ФЛА2 участвует в передаче через мембраны химических сигналов в ответ на внешнее воздействие. Фермент эффективно гидролизует фосфолипиды, имеющие в своем составе пероксиды жирных кислот, восстанавливая структурно-функциональные свойства клеточных мембран. По-видимому, изменение молекулярной конформации окисленных липидов облегчает доступ фермента к sn-2-сложноэфирной связи.

На сегодняшний день установлено, что фосфолипазы А2 играют значительную роль в развитии воспалительного процесса. Вклад фермента заключается в запуске синтеза липидных регуляторов этой реакции - одной из групп так называемых химических медиаторов воспаления. Они образуются, активируются или мобилизуются в воспалительном очаге и их соотношением определяется характер течения патологического процесса. Медиаторы воспаления липидной природы представлены жирными кислотами и их производными (простагландинами, лейкотриенами, тромбоксанами), а также фосфолипидным фактором активации тромбоцитов (ФАТ). Полагают, что в воспалительном процессе участвуют внутриклеточные цитозольные ФЛА2, высвобождающие полиеновые кислоты из sn-2-положения глицеринового остатка мембранных фосфолипидов. Полиеновые жирные кислоты, включая и арахидоновую, обладают собственной биологической активностью, в т.ч. усиливают сосудистую проницаемость, вызывают агрегацию тромбоцитов, оказывают вазоактивное действие.

Другие продукты фосфолипазной реакции гидролиза - лизофосфолипиды, обладающие ярко выраженной цитотоксичностью и детергентными свойствами. Эти соединения обнаруживают при таких заболеваниях, как холецистит, инфаркт миокарда, катаракта, псориаз и др. Если жирная кислота высвобождается из фосфатидилхолина 1-О-алкилыюго типа, образующийся лизофосфолипид служит предшественником ФАТ - медиатора воспаления, аллергической реакции, септического шока и астматического состояния. Это соединение в настоящее время интенсивно изучается, агонистам и антагонистам ФАТ посвящено большое число публикаций.

Важное значение, которое имеет мембраносвязанная ФЛА2 в клеточной регуляции, а также ее повышенный уровень при ряде патологических процессов, приводят к необходимости регулирования активности этого фермента. Поэтому поиск новых классов липидных ингибиторов и разработка удобных методов их синтеза представляют в настоящее время практический интерес.

Список литературы

1. Брагина Н.А., Чупин В.В.,Булгаков В.Г. Липидные ингибиторы фосфолипазы А2, М., 1999, с. 83-96
2. Брокерхоф X., Дженсен Р., Липолитические ферменты,пер. с англ., M., 1978, с. 242-356