

Влияние регуляторов клеточной активности на ферментативный гидролиз дипальмитоилфосфатидилхолина клетками легких

Белорусский государственный медицинский университет

Катаболизм сурфактанта легких осуществляется с участием фосфолипаз группы А, действие которых направлено на расщепление основного компонента - дипальмитоилфосфатидилхолина (ДПФХ). Целью нашего исследования было выяснение внутриклеточных механизмов оказывающих влияние на гидролиз ДПФХ фосфолипазами из альвеолярных макрофагов и альвеолоцитов II типа.

Ключевые слова: фосфолипаза А, дипальмитоилфосфатидилхолин, альвеолярные макрофаги, альвеолоциты II типа.

O.A. Golovach

The influence of modulators of cell activity on the enzymatic hydrolysis of dipalmitoylphosphatidylcholine by lung cells

The catabolism of lung surfactant is realized with participation of phospholipases group A, which action is directed on splitting of the main component - dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC). Our study was directed to clearing up what intracellular mechanisms have an influence on the hydrolysis DPPC by phospholipases, which were produced by alveolar macrophages and alveolar type II pneumocytes from rat lungs.

Key words: phospholipase A., dipalmitoylphosphatidylcholine, alveolar macrophages, alveolar type II pneumocytes.

Катаболизм сурфактанта легких осуществляется с участием фосфолипаз группы А, действие которых направлено на расщепление основного компонента - дипальмитоилфосфатидилхолина (ДПФХ) [4]. Фосфолипазы А (ФЛА) - ферменты, катализирующие гидролиз сложноэфирной связи во втором положении глицерофосфолипидов, отщепляя жирную кислоту и приводя к продукции лизофосфолипидов [3]. В зависимости от молекулярной массы, клеточной локализации различают цитозольные и секреторные ФЛА. Источником фосфолипаз в нижних отделах дыхательных путей являются клетки легких: альвеолярные макрофаги (АМ) и альвеолоциты ?? типа (А-2).

Повышение активности ФЛА2 при различных воздействиях, таких как гипоксия и бактериальные агенты, приводит к усилению гидролиза фосфолипидных компонентов сурфактанта, нарушению его целостности, за счет детергентного действия лизолипидов и увеличению сил поверхностного натяжения в альвеолах. Они стремятся к спадению, возникают необратимые множественные ателектазы, которые не поддаются расправлению. За счет повышения проницаемости альвеолокапиллярной мембраны возникает интерстициальный отек. Такой комплекс событий характерен, к примеру, для острого респираторного дистресс синдрома [4].

До сих пор точно не известно, какие внутриклеточные сигнальные пути ответственны за изменение фосфолипазной активности в условиях стимуляции клеток легких. Мы предположили, что молекулярно-клеточный уровень реализации этих

механизмов может обеспечиваться изменением активности систем вторичных мессенджеров. Поэтому целью настоящего исследования явилось выяснение влияния на внутриклеточную и секреторную фосфолипазную активность АМ и А-2 регуляторов клеточной активности АТФ, дибутирил - цАМФ, тетрафорболмиристат ацетата (ТРА), действие которых реализуется через различные сигнальные пути.

Материал и методы

Из бронхоальвеолярной лаважной жидкости (БАЛЖ) крыс выделяли альвеолярные макрофаги. Для этого клетки осаждали путем центрифугирования (900 об/мин, 10 мин, +5° С). Из легких крыс, после обработки их эластазой и ДНК- азой, выделяли А-2 по методу Dobbs L.G. с соавторами [2].

Клетки суспендировали в культуральной среде ДМЕ (Sigma, США), содержащей 10% эмбриональной сыворотки теленка. 3·10⁶ клеток вносили в пластиковые чашки Петри (Falcon, США), диаметром 3,5 см и инкубировали в течение 1ч и 20 ч без модуляторов (контроль), либо в присутствии АТФ, дибутирил - цАМФ, ТРА в концентрациях 10⁻⁷, 10⁻⁵, 10⁻⁴ моль/л, соответственно. Все манипуляции с клеточными культурами проводили в стерильных условиях. Жизнеспособность клеток определяли тестом с трипановым синим, она составила 96 ± 0,54%.

Субстратом ферментов гидролиза ДПФХ служили многослойные липосомы, для приготовления которых использовали хлороформный раствор липидного экстракта легких свиньи (100 мкл) и 160 нг (0,025 μCi) L-³-фосфатидилхолин ди[1-¹⁴C]пальмитоила (Amersham, Великобритания). Для определения фосфолипазной активности к липосомам добавляли клеточный гомогенат или среду, в которой культивировались АМ или А-2. Экстракцию липидов проводили по Bligh E.G. и Dyer W.J.[1]. Продукты гидролиза ДПФХ анализировали с помощью тонкослойной хроматографии в системе растворителей хлороформ:метанол:уксусная кислота:вода (65:43:1:4) [3]. Радиоактивность ДПФХ и ЛФХ определяли с помощью жидкостного сцинтилляционного ³-счетчика СБС-2 (Россия). Об активности ферментов гидролиза ДПФХ судили, определяя процент расщепленного радиоактивного субстрата.

Все результаты обработаны общепринятыми методами вариационной статистики с использованием t- критерия Стьюдента.

Результаты и их обсуждение

Таблица 1

Влияние модуляторов клеточной активности на фосфолипазную активность (n = 3).

	контроль	АТФ	цАМФ	ТРА
АМ, 1 ч	16,9 ± 0,14	21,2 ± 0,53*	16,1 ± 0,09*	20,72 ± 0,32*
АМ, 20 ч	17,3 ± 0,16	22,6 ± 0,28*	14,31 ± 0,29*	16,43 ± 0,58
среда АМ, 1 ч	5,6 ± 0,04	5,5 ± 0,11	4,92 ± 0,15*	7,04 ± 0,09*
среда АМ, 20 ч	17,8 ± 0,07	18,4 ± 0,37*	14,34 ± 0,37*	25,3 ± 0,1*
А-2, 1 ч	7,2 ± 0,05	11,1 ± 0,18*	14,93 ± 0,18*	22,4 ± 0,14*
А-2, 20 ч	7,6 ± 0,09	11,6 ± 0,126*	15,5 ± 0,21*	23,0 ± 0,07*
среда А-2, 1 ч	0,4 ± 0,14	1,7 ± 0,10*	3,4 ± 0,20 *	8,3 ± 0,17 *
среда А-2, 20 ч	2,1 ± 0,09	1,8 ± 0,06 *	6,8 ± 0,18 *	11,4 ± 0,09 *

* - p < 0,05, по сравнению с соответствующим контролем

При воздействии на А-2 АТФ и дибутирил - цАМФ мы наблюдали повышение активности как внутриклеточных так и секреторных ФЛА, причем эффект был более выражен для цАМФ (табл. 1). Известно, что АТФ реализует свое действие на клетки, связываясь с пуриnergическими рецепторами на поверхности клеточной мембраны с последующим запуском аденилатциклазного механизма. В результате нарастает уровень внутриклеточного цАМФ, который в свою очередь, активирует ряд протеинкиназ А (ПКА), что приводит к изменению активности исследуемых внутриклеточных ферментов.

Действительно, действие АТФ и цАМФ на фосфолипазную активность, продуцируемую А-2, было однотипным. Особенно резкий ее подъем отмечен в среде через 1 ч инкубации А-2. Стимулирующее влияние цАМФ на секреторную активность более чем в 2 раза превышало действие АТФ через 1 ч инкубации клеток со стимулятором и более, чем в 3 раза - через 20 ч инкубации. Характерно, что процент гидролиза ДПФХ в клетках зависел от времени инкубации А-2. Однако тенденция к его повышению через 20 ч инкубации по сравнению с 1 ч присутствовала как в стимулированных, так и в нестимулированных А-2.

АТФ также значительно повышал активность внутриклеточных фосфолипаз АМ даже при кратковременном воздействии (на 23%), но не оказывал влияния на активность секреторных ферментов. Дибутирил-цАМФ, напротив, снижал активность всех исследуемых ФЛА АМ, причем при увеличении времени воздействия эффект усиливался. По данным литературы, экспрессия гена ФЛА2 в АМ стимулируется ФНО-?. Избыток цАМФ в клетке ингибирует экспрессию мРНК ФНО-?, приводя тем самым к снижению активности ферментов гидролиза ДПФХ [5].

Из всех исследуемых добавок наиболее сильный положительный эффект был установлен для тетрафорболмиристатацетата. При воздействии на А-2, независимо от времени инкубации, обнаруживался значительный рост как внутриклеточной фосфолипазной активности так и активности секретируемых фосфолипаз группы А. В АМ только при кратковременном воздействии ТРА (1 ч) нарастала внутриклеточная фосфолипазная активность (21%). Через 20 часов инкубации, наоборот, активность фермента имела тенденцию к снижению по сравнению с контролем. ТРА повышал активность сФЛА2. Причем, с увеличением времени инкубации эффект усиливался с 24,9%, через 1 ч инкубации, до 41,8% через 20 ч.

ТРА является аналогом диацилглицерола, который активирует протеинкиназу С (ПКС). Активация этого внутриклеточного каскадного механизма приводит к увеличению уровня цитоплазматического ионизированного Ca^{2+} , а он является необходимым кофактором как внутриклеточных так и секретируемых ФЛА2, способствуя связыванию этих ферментов с субстратами и повышению их каталитической активности. Неоднозначное влияние ТРА на фосфолипазную активность внутри клетки связано вероятно с тем, что увеличение уровня цитоплазматического ионизированного Ca^{2+} является кратковременным, быстрореализуемым процессом, поскольку депо кальция ограничено. Не исключено что, многочасовая инкубация клеток с ТРА ведет к протеолитической деградации ПКС, что приводит к потере ПКС-опосредованного клеточного ответа и снижению активности цФЛА2 через 20 ч инкубации.

Выводы.

1. Действие стимуляторов, реализующих свое действие в клетке через протеинкиназу С и протеинкиназу А в АМ и А-2 отличается.

2. Наиболее чувствительны к их регуляторному влиянию А-2. И тот и другой сигнальные пути в этих клетках реализуются значительным подъемом внутриклеточного гидролиза ДПФХ.

3. Такой же по направленности, но значительно менее выраженный эффект имеет место в АМ при активации ПКС. Различные стимуляторы образования активной ПКА приводят к разнонаправленному эффекту в ферментативном гидролизе ДПФХ. Взаимодействие АТФ с пуринорецепторами на поверхности клеток усиливает его, а избыток цАМФ внутри клетки угнетает.

Литература

1. Bligh E.G., Dyer W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification //Can. J. Biochem. Physiol.- 1959-37:911.

2. Dobbs L. G., Gouzales R., Williams M. An improved method for isolating type II cells in high yield and purity // Am Rev. Respir.Dis 1986; 134, p. 141-145

3. Hidi R., Vargaftig B., Touqui L. Increased synthesis and secretion of 14-kDa phospholipase A2 by guinea pig alveolar macrophages //The Journal of immunology - 1993.-vol.151, 5613-5623.

4. Hite D.R. et.al Hydrolysis of surfactant-associated phosphatidylcholine by mammalian secretory phospholipases // Am. J. Physiol. - 1998-275:L740-L747.

5. Vial D., Arbibe L., Havet N. et.al Down-regulation by prostaglandins of type-II phospholipase A2 expression in guinea-pig alveolar macrophages: a possible involvement of cAMP // Biochem. J. 1998, 330, p. 89-94