

Joanna Saluk-Juszczak, Barbara Wachowicz

AKTYWNOŚĆ BIOLOGICZNA LIPOPOLISACHARYDU BAKTERYJNEGO

Celem prezentowanej pracy jest przedstawienie struktury i aktywności biologicznej endotoksyny bakteryjnej. Endotoksyna (lipopolisacharyd, LPS) jest głównym składnikiem błony zewnętrznej ściany komórkowej bakterii Gram-ujemnych. LPS składa się z dwóch części: hydrofobowego lipidu A i hydrofilowego łańcucha polisacharydowego, posiadających odmienną budowę chemiczną i różne właściwości fizyczne. Toksyczna aktywność LPS jest głównie związana z częścią lipidową. LPS zdolny jest do aktywowania układu immunologicznego poprzez działanie na komórki immunologicznie kompetentne: głównie monocyty, makrofagi, granulocyty, ale także na płytki krwi i komórki śródbłónka. Powoduje uwalnianie mediatorów zapalnych: eikozanoidów, cytokin, chemokin, cząsteczek adhezyjnych, reaktywnych wolnych rodników, czynnika aktywującego płytki (PAF) i tlenu azotu NO[•]. LPS zdolny jest do wiązania się z osoczwymi lipoproteinami o dużej gęstości (HDL) i białkiem wiążącym lipopolisacharyd (LBP). Taki kompleks ma duże powinowactwo do receptora CD14 obecnego na leukocytach, monocytach i makrofagach i powoduje aktywację tych komórek indukując stany patofizjologiczne, takie jak zapalenie czy szok septyczny, prowadzące nawet do śmierci. Konsekwencje zakażenia makroorganizmu wynikają nie tylko z toksycznej aktywności LPS, ale także zależą od uruchomienia mechanizmów obronnych gospodarza.

WSTĘP

Budowa lipopolisacharydu

Endotoksyny bakteryjne (lipopolisacharydy, LPS) są integralną częścią ściany komórkowej bakterii Gram-ujemnych [1, 2]. Komórki tych bakterii okryte są specyficzną dla nich błoną zewnętrzną pełniącą wiele istotnych funkcji i odpowiedzialną za znacznie mniejszą, niż w przypadku bakterii Gram-dodatnich, wrażliwość na czynniki antybakteryjne. Cząsteczki endotoksyn tworzą sztywną osłonkę na powierzchni wytwarzających je bakterii uniemożliwiając wnikanie antybiotyków zwalczających zakażenie.

Ze względu na swoje zewnątrzkomórkowe występowanie, LPS oddziałuje z komórkami układu immunologicznego organizmów wyższych, które dzięki charakterystycznej strukturze endotoksyny rozpoznają wnikające drobnoustroje [3, 4]. Ogólny plan budowy lipopolisacharydów pochodzących z różnych rodzajów bakterii Gram-ujemnych wykazuje duże podobieństwo, co pozwala na schematyczne przedstawienie struktury tych związków.

Z chemicznego terminu lipopolisacharyd wynika, że endotoksyna bakteryjna jest heteropolimerem zbudowanym z części lipidowej i z części polisacharydowej [3–5]. Hydrofobową część lipidową stanowi tzw. lipid A, w skład którego wchodzi dwusacharyd, zwykle glukozoamino-glukozoaminowy podstawiony dwiema resztami fosforanowymi przypadającymi po jednej na każdy monosacharyd (w pozycjach 4' i 1) oraz acylowany resztami kwasów tłuszczowych. Lipidy A pochodzące z różnych bakterii Gram-ujemnych różnią się zwykle wzorem podstawienia kwasów tłuszczowych, a czasami także długością reszt kwasowych oraz rodzajem występującego w lipidzie A dwusacharydu [3, 4]. Lipid A utrzymuje LPS w ścianie komórki bakteryjnej, gdyż jest wbudowany do zewnętrznej warstwy ściany komórkowej tych drobnoustrojów [1, 5]. Ponadto lipid A, będący najbardziej konserwatywną częścią LPS, odpowiedzialny jest za toksyczne właściwości endotoksyny oraz jej wieloraką aktywność biologiczną. Fragment polisacharydowy może wykazywać pewien modulujący wpływ na właściwości części lipidowej, np. poprzez zmianę płynności kwasów tłuszczowych lipidu A [1, 3, 4].

Lipid A łączy się z częścią wielocukrową poprzez reszty kwasu Kdo (2-keto-3-deoksyoktonowego $\text{COOH-CO-CH}_2\text{-(CHOH)}_4\text{-CH}_2\text{OH}$). Część ta zbudowana jest z dwóch, syntezowanych oddzielnie i różniących się budową chemiczną fragmentów cukrowych: rdzenia i łańcucha O-swoistego. Bezpośrednio z lipidem A łączy się tzw. oligosacharyd rdzeniowy, w którym wyróżnia się region wewnętrzny i region zewnętrzny. Region wewnętrzny zawiera kwas Kdo oraz różnego typu heptozy, stąd też nazywa się go regionem heptozowym, natomiast fragment zewnętrzny, ze względu na występowanie w nim cukrów 6 węglowych, nazywa się regionem heksozowym. Region zewnętrzny połączony jest z częścią O-swoistą LPS (tzw. antygenem O-swoistym). Oligosacharydy O-swoiste poszczególnych rodzajów bakterii wykazują ogromną różnorodność strukturalną, różniąc się zarówno typem występujących monosacharydów jak i całkowitą długością łańcuchów. Łańcuchy O-swoiste zawierają od dwóch do ośmiu reszt cukrowych tworzących jednostki powtarzające się. Ich ilość może dochodzić nawet do 40. Region O-swoisty wykazujący bardzo dużą zmienność odpowiedzialny jest za swoistość antygenową bakterii [4].

Właściwości lipopolisacharydu

Badania dotyczące właściwości endotoksyn bakteryjnych prowadzone są już od wielu dziesiątków lat, a ich początek sięga końca XIX w., kiedy to Robert Koch stwierdził, że każda choroba zakaźna wywoływana jest przez specyficzny drobnoustrój. Obecnie wiadomo, że substancjami chorobotwórczymi pochodzenia bakteryjnego są toksyny odpowiedzialne za liczne objawy chorób zakaźnych. Wśród nich wydzielono z kolei endotoksyny, których występowanie charakterystyczne jest dla wszystkich bakterii Gram-ujemnych.

Postęp w dziedzinie analizy chemicznej, jaki nastąpił w połowie XX w., pozwolił prowadzić dokładne badania nad naturą endotoksyn i określić skomplikowaną strukturę tych związków. Wykryto, że wszystkie endotoksyny pochodzące z różnorodnych rodzajów bakterii stanowią modyfikacje tej samej cząsteczki. Jednak aby w pełni zrozumieć mechanizm działania endotoksyn należało jeszcze wyjaśnić szereg szczegółów dotyczących ich chemicznej budowy. W toku badań prowadzonych w ciągu ostatnich lat wyjaśniono wiele niezwykłych cech endotoksyn bakteryjnych. Wiadomo już, że endotoksyny to cząsteczki potencjalnie bardzo szkodliwe dla zdrowia człowieka, a często nawet zagrażające jego życiu. Są wytwarzane m. in. przez bakterie, które wywołują cholera, dżumę, krztusiec, czy zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych [1, 3].

Obecnie w organizmie endotoksyny wywołują szeroką gamę oddziaływań biologicznych. Zdolne są do indukowania zarówno fizjologicznych jak i morfologicznych zmian w wielu tkankach. Za najbardziej negatywne efekty działania LPS można uznać jego zdolność do wywoływania u ludzi i zwierząt takich objawów chorobowych jak dreszcze, podwyższenie temperatury ciała, objawy grypopodobne oraz indukowanie szoku septycznego związanego z zaburzeniami krążenia, które prowadzą do powstania wewnątrznaczyniowego rozsianego wykrzepiania (DIC) i do nieprawidłowego funkcjonowania narządów całego ciała, a w konsekwencji nawet do śmierci [1, 2, 6-8].

Objawy działania LPS zależą od gatunku zakażonego zwierzęcia oraz od szczepu bakteryjnego będącego dawcą endotoksyny. Mogą one obejmować zarówno odczyn uogólniony jak i miejscowy: leukopenię z następującą leukocytozą, hiperglikemię, nadciśnienie płucne, krwawienie, całkowite wyczerpanie organizmu, a także nekrozę komórek szpiku kostnego oraz somnogenność. Lipopolisacharyd bakterii Gram-ujemnych jest główną przyczyną posocznicy, której powikłaniem jest szok endotoksyczny kończący się w wielu przypadkach śmiercią [3, 9].

Te same cząsteczki endotoksyn, które są zagrożeniem życia ludzkiego, bywają jednocześnie bardzo pożyteczne dla człowieka. Stymulując układ

immunologiczny, aktywując klasyczną i alternatywną drogę dopełniacza oraz czynnik Hagemana, czy też działając nekrotycznie na komórki nowotworowe, LPS zwiększa ogólną odporność organizmu na zakażenia bakteryjne i wirusowe oraz na procesy nowotworowe [3].

Aby zrozumieć, w jaki sposób endotoksyny mogą dawać tak przeciwstawne efekty, należy poznać i wyjaśnić mechanizm ich działania. Wieloraka aktywność bakteryjnych lipopolisacharydów nie jest jeszcze całkowicie wyjaśniona, ale obecnie wiadomo już, że endotoksyna, aby osiągnąć swój biologiczny efekt, musi być uwolniona z powierzchni komórki bakteryjnej. Zjawisko to zachodzi zarówno w trakcie podziałów bakteryjnych jak i w chwili śmierci bakterii. Uwalniane z powierzchni bakterii cząsteczki endotoksyn nie zabijają komórek organizmu, ani też nie wywołują bezpośredniej odpowiedzi. Działanie LPS związane jest przede wszystkim z pobudzaniem komórek gospodarza do wydzielania różnorodnych mediatorów zapalnych. Mediatorzy te uwalniane są w wyniku oddziaływania LPS z komórkami fagocytarnymi, komórkami śródbłonna naczyń krwionośnych oraz z płytkami krwi [1, 10]. Do komórek aktywowanych przez endotoksynę należą głównie makrofagi, a także monocyty i granulocyty. Te obronne komórki organizmu w wyniku działania LPS wydzielają wiele różnorodnych cząsteczek określanych jako mediatory zapalne, które wywołują i wzmacniają swoistą i nieswoistą odpowiedź immunologiczną gospodarza [1, 3, 9, 11, 12]. Lipopolisacharyd wykazuje także aktywność mitogenną wobec limfocytów B. Będąc antygenem grasiczoniezależnym wzmacnia m. in. aktywność komórek NK wobec syngenicznych i allogenicznych komórek nowotworowych [1, 3]. Działa również na leukocyty obojętneochłonne i zasadochłonne, uwalniając z nich czynnik aktywujący płytki (PAF) [1, 13].

Lipopolisacharyd wykazuje również aktywność biologiczną, która nie jest związana z pośrednictwem mediatorów zapalnych. Ma on bowiem zdolność aktywowania klasycznej drogi dopełniacza poprzez bezpośrednie wiązanie lipidu A do czynnika C1, a także przez kompleks LPS-przeciwciała. Ponadto, zupełnie niezależnie, LPS może aktywować alternatywną drogę komplementu poprzez łańcuch O-swoisty oraz rdzeniową część polisacharydu [1, 3]. Uruchomienie kaskady komplementu przez LPS powoduje aktywację czynnika C5, który jako aktywna anafilatoksyna C5a stymuluje serię reakcji zapalnych prowadzących do uszkodzenia naczyń krwionośnych i wzrostu ich przepuszczalności. C5a aktywuje komórki zapalne (neutrofile, makrofagi, bazofile i płytki krwi) do produkcji cytokin zapalnych, powoduje wybuch tlenowy neutrofilów i uwalnianie wolnych rodników oraz wydzielanie serotoniny i histaminy przez płytki krwi [1].

Bez udziału mediatorów zapalnych LPS uczestniczy w procesach krzepnięcia krwi. W układzie wewnątrzpochodnym LPS aktywuje czynnik XII,

natomiast pozanaczyniowo uwalnia z monocytów i komórek śródbłonka czynnik tkankowy, co w obu przypadkach rozpoczyna kaskadę krzepnięcia krwi [1, 3, 6].

DZIAŁANIE LPS POPRZEC MEDIATORY ZAPALNE

Aktywacja makrofagów, granulocytów i monocytów wiąże się z wydzielaniem przez te komórki cząsteczek przekąźnikowych zwanych mediatorami zapalnymi. Mediatorami mogą być takie związki chemiczne jak: peptydy, białka, lipidy oraz wolne rodniki. Działają one jednocześnie lub w odpowiedniej kolejności wywołując szereg różnorodnych efektów biologicznych. Mediatory uczestniczą w działaniu LPS działając lokalnie w miejscu uwolnienia lub rozprzestrzeniając się wraz z krążącą krwią [14–17].

Objawy szoku septycznego, do którego dochodzi w wyniku zakażenia bakteriami Gram-ujemnymi są skutkiem aktywacji monocytów, makrofagów, i granulocytów wielojądrzastych. W wyniku tej aktywacji uwalniane są cytokiny prozapalne, enzymy, eikozanoidy i czynniki prokoagulacji. Do cytokin wydzielanych przez pobudzone endotoksyną komórki należą: interleukiny (IL-1, IL-6, IL-8), interferon γ (IFN- γ) i czynnik martwicy nowotworu (TNF- α) – główny mediator zapalny odpowiedzialny za rozwój ostrych reakcji zapalnych w szoku septycznym [1, 7, 9, 12, 14, 18]. Są to związki o budowie polipeptydów lub glikopolipeptydów odpowiedzialne za infekcje i stany zapalne z podwyższoną temperaturą ciała, senność i jadłowstręt, schorzenia immunologiczne i procesy nowotworowe [3]. Wykazują właściwości chemotaktyczne względem monocytów, makrofagów i neutrofilów oraz wzmagają cytotoksyczność tych komórek. Dzięki temu, uwalniane w miejscu zakażenia lub powstania guza nowotworowego, powodują napływ komórek obronnych gospodarza i rozwój reakcji zapalnych [19–21]. Wywołują także degranulację komórek fagocytarnych i uwalnianie enzymów proteolitycznych oraz generują duże ilości wolnych rodników tlenowych [20]. Oddziaływanie cytokin ze śródbłonkiem powoduje wzrost jego przepuszczalności i aktywuje krzepnięcie. Ponadto peptydy te hamują fibryrolizę obniżając ekspresję tkankowego aktywatora plazminogenu i wzmagając syntezę jego inhibitorów. Odpowiedzialne są również za adhezję limfocytów, monocytów i neutrofilów do komórek śródbłonka naczyń. Wykazano także, że cytokiny oddziałując ze śródbłonkiem stymulują produkcję PAF, co ma znaczącą rolę w indukowaniu szoku septycznego [1, 3, 19, 21–23]. W wyniku działania endotoksyny PAF uwalniany jest z licznych komórek gospodarza: neutrofilów, makrofagów, komórek śródbłonka naczyń i z płytek krwi [13, 24, 25]. Synteza PAF w czasie zakażenia bakteriami Gram-ujemnymi związana jest

zarówno z bezpośrednim działaniem LPS na wymienione komórki, jak i z pośrednią ich stymulacją przez wydzielane w czasie zapalenia mediatory zapalne, głównie TNF i IL-1 [19, 23].

PAF (1-O-alkil-2-acetyl-sn-glicero-3-fosfocholiny) jest endogennie produkowanym związkiem fosfolipidowym mającym wielorakie właściwości fizjologiczne. Synteza PAF zachodzi w organizmie zarówno *de novo* w wyniku reakcji przeniesienia fosfocholiny z CDP-choliny na 1-O-alkil-2-acetyl-sn-glicerol katalizowanej przez enzym cholinofosfotransferazę, jak i na drodze przebudowy. W tym drugim przypadku dochodzi do katalizowanej przez fosfolipazę A₂ (PLA₂) hydrolizy 1-O-alkil-2-acyl-sn-glicero-3-fosfocholiny obecnej w błonach komórkowych i do powstania w wyniku tej hydrolizy 1-O-alkil-2-lizo-sn-glicero-3-fosfocholiny czyli lizoPAF, który ulega następnie acetylacji przez specyficzną acetylotransferazę. Gwałtowna synteza PAF, do jakiej dochodzi w wyniku stymulacji komórek, zachodzi głównie na drodze przebudowy zależnej od aktywności PLA₂ [13]. Fosfolipaza A₂ odgrywa także kluczową rolę w uwalnianiu z fosfolipidów błon komórkowych kwasu arachidonowego – substratu dla syntezy eikozanoidów będących lipidowymi mediatorami zapalnymi [3, 13].

Działając poprzez specyficzny receptor należący do receptorów metabotropowych (serpentynowych), PAF może funkcjonować jako mediator zewnątrzkomórkowy, odpowiedzialny za przekazywanie sygnału pomiędzy komórkami, lub też może działać jako przekaźnik wewnątrzkomórkowy [19]. Uczestniczy w patogenezie zapalenia, w szoku wywołanym działaniem endotoksyn i w uszkodzeniu tkanek indukowanym zarówno LPS jak i TNF- α [25, 26]. Powoduje także spadek ciśnienia krwi i zmniejszenie ilości krwinek płytkowych. Proces ten jest odwrotnie proporcjonalny do ilości syntetyzowanego PAF [27]. Wraz z TNF- α , interleukinami prozapalnymi i trombiną PAF wzmacnia adhezję neutrofilów do śródbłonna naczyń krwionośnych, co ma ogromne znaczenie w ostrych stanach zapalnych [25]. PAF będąc silnym agonistą zarówno płytek krwi jak i wielojądrzastych granulocytów obojętnochłonnych uczestniczy w powstawaniu lipidowych czynników zapalnych przez generowanie syntezy eikozanoidów.

Eikozanoidy, w tym prostaglandyny, prostacyklina, tromboksan TXA₂, leukotrieny, kwasy epoksy- i hydroksyeikozatetraenowe oraz lipoksyny są tlenowymi pochodnymi kwasu arachidonowego powstającymi w wyniku przemian enzymatycznych na drodze lipooksygenazy lub cyklooksygenazy [1, 15]. Główną rolę odgrywają prostaglandyny szeregu E (PGE) oraz prostacyklina (PGI₂), które wskutek właściwości rozszerzających naczynia krwionośne powodują zwiększenie dopływu krwi do miejsca zapalenia i przyczyniają się do wysięku w ognisku zapalnym. Przypuszcza się, że związki te wzmacniają działanie histaminy i bradykininy potęgując ból i powodując gorączkę [28].

PAF wykazuje zdolność do generowania anionorodnika ponadtlenkowego w komórkach fagocytarnych [26]. Działając na monocyty PAF, analogicznie jak i $\text{TNF-}\alpha$ i $\text{IFN-}\gamma$, powoduje długotrwałe utrzymywanie się wysokiego poziomu wolnych rodników tlenowych [15]. Dodanie do kultury monocytów LPS lub PAF powoduje, tak jak i w przypadku dodania $\text{TNF-}\alpha$ i $\text{IFN-}\gamma$, ponad 96-godzinne utrzymywanie się dużego stężenia anionorodnika ponadtlenkowego, co może być blokowane przez wprowadzenie inhibitorów proteaz serynowych [29].

Sam lipopolisacharyd wywołuje stres oksydacyjny i jest zdolny do generowania różnorodnych wolnych rodników: wspomnianego już wcześniej anionorodnika ponadtlenkowego O_2^- , wysoce reaktywnego rodnika hydroksylowego $\text{OH}^\cdot$, a także rodnika tlenku azotu $\text{NO}^\cdot$ i H_2O_2 [8, 30]. Odpowiedź komórki na LPS jest gwałtowna, a wolne rodniki powstają natychmiast po zadziałaniu toksyny. Te wysoce reaktywne cząsteczki działają jako przekaźniki sygnału, czyli pełnią rolę mediatorów zapalnych, a ponadto zdolne są do zwalczania drobnoustrojów wnikających do komórek gospodarza. Jednak powstawanie dużych ilości wolnych rodników tlenowych prowadzi do przesunięcia równowagi reakcji red-ox w stronę zwiększonego utleniania i może powodować znaczne uszkodzenia komórek organizmu [30].

Na oddzielną uwagę zasługuje indukowany w wyniku działania LPS, rodnik tlenku azotu $\text{NO}^\cdot$. Jest on wielofunkcyjną reaktywną cząsteczką syntezowaną przez wiele rodzajów komórek: makrofagi, komórki śródbłonna, fibroblasty, komórki mięśni gładkich i neurony. Tlenek azotu powstaje w wyniku konwersji L-argininy do L-cytruliny, która jest katalizowana przez syntazę tlenku azotu (EC1.14.13.39) [7, 10, 31]. Enzym ten występuje w trzech izoformach: konstytutywnej neuronalnej (cNOS) i konstytutywnej endotelialnej (eNOS) zależnych od jonów Ca^{+2} i kalmoduliny oraz indukowanej (iNOS) wzbudzanej głównie w makrofagach przez różnorodne czynniki fizyczne i chemiczne m. in. endotoksyny i cytokiny: $\text{IL-1}\beta$, IL-4 , $\text{TNF-}\alpha$ i $\text{IFN-}\gamma$ [4, 22, 10, 32, 33].

Płytki krwi, które jako komórki pozbawione jądra komórkowego nie zdolne są do syntezy białek, posiadają obie formy syntazy tlenku azotu: konstytutywną i indukowaną. Uważa się, że enzymy te pochodzą z jądrzastych megakariocytów, z których w wyniku sekwestracji powstają płytki krwi. Nie pobudzone, pozostające w stanie spoczynku krwinki płytkowe nie wykazują aktywności syntazy tlenku azotu. Enzym staje się aktywny dopiero w wyniku ich agregacji [31, 34, 35]. Obecne w różnych komórkach konstytutywne formy syntazy $\text{NO}^\cdot$ generują niskie stężenia tego rodnika i odpowiedzialne są za utrzymanie prawidłowych fizjologicznych warunków przepływu i ciśnienia krwi, agregacji płytek i neurotransmisji. Ekspresja indukowanej izoformy enzymu iNOS zawsze związana jest z aktywacją komórek przez czynniki immunologiczne. Powstający wskutek tego rodnik tlenku azotu zaangażowany

jest w cytostatyczny lub cytotoksyczny mechanizm obronny skierowany przeciwko komórkom nowotworowym lub wnikającym do organizmu drobnoustrojom [10, 31, 36]. Uczestniczy w zabijaniu (przez zaktywowane makrofagi) bakterii, grzybów, pierwotniaków, komórek nowotworowych, a nawet wielokomórkowych pasożytów [4, 22], ale uwalniany w dużych ilościach podczas zakażenia, działa toksycznie nie tylko na patogeny, ale także na liczne komórki gospodarza [35].

Rodnik NO[•] jest związkiem endogennym, działa miejscowo, przejściowo rozszerza naczynia krwionośne (jest wazodilatorem), hamuje agregację i adhezję płytek krwi, indukuje proliferację limfocytów i komórek mięśni gładkich oraz wywołuje chemotaksję neutrofilów [4, 35, 37]. Odpowiedzialny jest za spadek ciśnienia krwi wywołany działaniem endotoksyny, a jego nadmierna synteza prowadzi do niedociśnienia, przed którym może chronić podanie równocześnie z LPS inhibitora syntazy NOS [36, 38, 39]. Zastosowanie przeciwciał skierowanych przeciwko TNF- α i IL-1 β również obniża znacznie produkcję tlenu azotu indukowaną LPS [7, 36].

Niedobór NO[•] prowadzi do agregacji płytek krwi i powstawania zakrzepów naczyńiowych [31, 35].

Rodnik tlenu azotu jest ściśle zaangażowany w patogenezę szoku septycznego wywołanego działaniem LPS. Lipopolisacharyd, jako główny egzogeny czynnik szoku wzmacnia ekspresję iNOS powodując nadprodukcję NO[•], co prowadzi do zaburzenia homeostazy organizmu. Wzrost stężenia NO[•] w odpowiedzi na działanie LPS ma także swoje implikacje w innych immunologicznych stanach patologicznych takich jak np. reumatoidalne zapalenie stawów [14, 10, 31, 35, 36].

Różnorodność mediatorów zapalnych uwalnianych w czasie infekcji bakteriami Gram-ujemnymi może stwarzać ogromne możliwości zwalczania zakażenia przez komórki obronne gospodarza. Jednak ilość wytwarzanych mediatorów jest różna w zależności od ilości dostarczonych przez bakterie endotoksyn. Jeśli niewielka liczba drobnoustrojów atakuje organizm gospodarza następuje niegroźne zakażenie, które dzięki uwalnianiu czynników zapalnych zostaje szybko zahamowane poprzez wywołanie miejscowej, kontrolowanej odpowiedzi immunologicznej. Dochodzi wówczas do podwyższenia temperatury ciała i pobudzenia układu odpornościowego, co przyspiesza proces wyzdrowienia i chroni przed innymi zakażeniami bakteryjnymi.

Przy ciężkim zakażeniu duże ilości endotoksyn gromadzone są w krążącej krwi i powodują uwalnianie znacznych ilości mediatorów, co prowadzi do zaburzeń w krążeniu krwi i może spowodować wstrząs zagrażający życiu.

Wynika stąd, że to nie tylko bakterie i ich endotoksyny są bezpośrednio zagrożeniem dla organizmu, ale istotną rolę odgrywać może odpowiedź

gospodarza. To uogólnione, niekontrolowane i samoniszące reakcje obronne zakażonego organizmu czynią endotoksyny aż tak niebezpiecznymi. Uruchomienie wszystkich możliwych mechanizmów prewencji powoduje niszczenie komórek gospodarza znajdujących się w pobliżu ogniska zapalnego, co w efekcie może prowadzić do wyniszczenia całego organizmu.

BIĄŁKA WIĄŻĄCE LPS

Aby wyjaśnić, jak endotoksyny bakteryjne uruchamiają całą kaskadę mechanizmów obronnych w zakażonym organizmie i jak dochodzi do różnorodnych interakcji pomiędzy LPS a komórkami gospodarza, należy przeanalizować dokładnie mechanizm aktywacji komórek uczestniczących w procesach zapalnych. Zarówno we krwi jak i w tkankach organizmów wyższych znajdują się liczne białka, które oddziałują z LPS modulując jego biologiczną aktywność [40].

Istnieją liczne doniesienia, że LPS działa na komórki poprzez specyficzny receptor CD14. Jest to glikoproteina o masie cząsteczkowej 55 kDa, która występuje w dwóch formach (mCD14): w postaci związanej z błoną komórkową poprzez fosfatydyloinozitol (obecna na makrofagach, monocytach i granulocytach) oraz w formie rozpuszczalnej (sCD14), w warunkach fizjologicznych obecnej w osoczu w stężeniu ok. 2-6 $\mu\text{g/ml}$ [1, 17, 20, 41]. Prawdopodobnie receptor CD14 obecny jest także na komórkach epitelialnych różnych narządów, co pozwala endotoksynie uczestniczyć w reakcjach zapalnych licznych tkanek [11]. Wydaje się, że wiązanie LPS do receptora CD14 jest warunkiem niezbędnym do aktywacji większości komórek uczestniczących w patogenezie zakażenia, przynajmniej przy niskich stężeniach endotoksyny [1, 9].

Receptor CD14 jest zaangażowany w produkcję cytokin zapalnych indukowaną LPS (jest ona blokowana poprzez przeciwciała anti-CD14), a także w produkcję PAF, TXA₂, NO[•], prostaglandyn, leukotrienów i rodników tlenowych [42, 43]. Precyzyjna rola, jaką odgrywa ten antygen w przekazywaniu sygnału nie jest jeszcze całkowicie wyjaśniona. Cząsteczka CD14 musi zawierać wewnątrzkomórkową sekwencję konieczną dla przekazywania sygnału (ale nie określono jeszcze jak zachowuje się ten receptor po zadziałaniu lipopolisacharydu) [43]. Najprawdopodobniej receptor CD14 w ogóle nie wiąże samego LPS, ale kompleks utworzony przez cząsteczkę endotoksyny z krążącym we krwi białkiem wiążącym LPS (LBP) [2, 17, 19, 41]. Jest to białko ostrej fazy syntezowane w wątrobie. W stanach zapalnych jego ilość wzrasta w surowicy ponad 10-krotnie [20]. Jest 60 kDa glikoproteiną osoczną, która wiąże się z lipidem A lipopolisacharydu tworząc kompleks

LPS-LBP o dużym powinowactwie do receptora CD14. Będąc ko-ligandem dla LPS, białko LBP wzmacnia od 100 do ponad 1000 razy odpowiedź komórek zawierających antygen CD14 na działanie endotoksyny [1, 2, 19, 41]. Rola białka LBP w przekazywaniu sygnału nie została jeszcze jednoznacznie potwierdzona, ale wykazano, że pełni ono istotną funkcję w transporcie lipopolisacharydu we krwi [41]. Tworząc kompleks z LBP endotoksyna jest dostępna zarówno dla błonowej jak i rozpuszczalnej formy receptora CD14. W tym ostatnim przypadku wiązanie LPS do LBP nie jest niezbędne, ale powstanie takiego kompleksu znacznie przyspiesza reakcję komórek pozbawionych receptora mCD14, np. komórek śródbłonna na niskie stężenia LPS. Rozpuszczalna forma receptora jest odpowiedzialna za zdolność endotoksyny do aktywowania komórek, które nie mają błonowego receptora CD14 [19, 41].

Białko LBP, wykazując zdolność wiązania i transportu LPS, uczestniczy także w neutralizacji jego aktywności poprzez przeniesienie i interakcję z cząstkami lipoprotein osocza (HDL) [2, 44, 45]. Detoksykacja LPS może następować na skutek internalizacji kompleksu LBP-LPS-CD14 przez komórki granulocytów obojętnochłonnych [2].

Białko wiążące lipopolisacharyd (LBP) należy do rodziny białek osoczowych przenoszących lipidy. Do grupy tej zaliczane są również: białko zwiększające przepuszczalność bakterii (BPI), białko przenoszące estry cholesterolu (CETP) i uczestniczące także w transporcie trójglicerydów i fosfolipidów oraz białko przenoszące fosfolipidy (PLTP). Wymienione białka wykazują wysoką homologię sekwencji i charakteryzują się powinowactwem do substratów lipidowych [2, 44]. Są zasocjowane w surowicy krwi z lipoproteinami o dużej gęstości (HDL) [44]. Białko LBP wykazuje 45% homologii sekwencji z BPI, 24% z PLTP i 23% z CETP. Ze względu na tak znaczny stopień podobieństwa budowy tych białek i podobne właściwości przypuszcza się, że wszystkie one są zdolne do wiązania i przenoszenia lipopolisacharydu [44, 45].

Oprócz LBP, najlepiej poznane jest 55 kDa kationowe białko BPI obecne w azurofilowych ziarnistościach dojrzałych neutrofilów. Wiąże ono LPS z większym powinowactwem niż LBP dając przy tym kompleks, który nie stymuluje komórek poprzez żadną z form receptora CD14. Dlatego też asocjacja białka BPI z LPS hamuje w pewnym stopniu toksyczną aktywność endotoksyny ograniczając możliwość tworzenia reaktywnego kompleksu LPS-LBP [2, 5, 46]. Zarówno LBP jak i BPI zawierają po 456 aminokwasów i wykazują 45% homologię budowy. Oba białka przyłączają LPS do swego N-terminalnego regionu. Region C-terminalny białka LBP zaangażowany jest w interakcję z receptorem CD14, a białko BPI posiada zdolność neutralizacji LPS. Geny tych białek leżą w sąsiednich regionach genomu ludzkiego. To sugeruje, że LBP i BPI mogły nawet powstać przez duplikację tego samego genu [2].

Zdolność inaktywacji LPS poprzez wiązanie się z nim posiadają także inne białka znajdujące się w krwiobiegu: składnik dopełniacza C1q, laktoferyna, albumina, transferyna, lizozym, a także wszystkie frakcje lipoprotein osoczowych VLDL, LDL, HDL. Łącząc się z LPS białka te ograniczają oddziaływanie endotoksyny z komórkami immunologicznie kompetentnymi i przez to ograniczają jej aktywność biologiczną [1, 4, 9, 40, 45, 47, 48].

Najlepiej poznanym białkiem jest lizozym (LZM), enzym rozkładający peptydoglikany ścian komórkowych bakterii, który łącząc się z LPS tworzy kompleks LZM-LPS hamujący produkcję mediatorów zapalnych TNF- α , IL-1, IL-6. Lizozym wiąże się zarówno z LPS, jak i z samym lipidem A. Wiązanie się LZM z LPS odbywa się poprzez hydrofobowe oddziaływanie z lipidem A i prowadzi nie tylko do neutralizacji immunostymulujących właściwości LPS, ale także do hamowania enzymatycznej aktywności LZM [24, 40]. Podobnie, poprzez lipid A wiąże się LPS z albuminą. Jednak to połączenie nie ogranicza spektrum działania endotoksyny. Można przypuszczać, że albumina pełni jedynie funkcję przenośnika łącząc się z LPS w stosunku 1:2 [47].

We krwi znajdują się także białka, które wiążąc się z LPS wzmagają jego biologiczną aktywność. Główną rolę pełni tu opisane wcześniej białko LBP. Podobne właściwości wykazuje również hemoglobina (Hb). Oddziaływanie hemoglobiny z LPS prowadzi do zmiany właściwości fizycznych endotoksyny i powstania trwałych kompleksów Hb-LPS. Hemoglobina uczestniczy w interakcji LPS z komórkami śródbłonna, co wzmacnia (nawet 10-krotnie) indukowaną endotoksyną produkcję w śródbłonku czynnika tkankowego (TF) biorącego udział w procesie krzepnięcia [49, 50].

Hemoglobina, podobnie jak i białko LBP, potęguje działanie LPS poprzez dezagregację lipopolisacharydowych agregatów i dostarczanie do komórek docelowych monomerów LPS, które wykazują znacznie wyższą aktywność biologiczną niż jego agregaty. Poprzez zmniejszenie stopnia agregacji cząsteczek zostaje obniżona masa cząsteczkowa i gęstość wnikać endotoksyny. LPS staje się przez to lepiej rozpuszczalny, a tym samym bardziej toksyczny [45, 49]. Nie jest wykluczone, że Hb, oprócz dezagregacji LPS, może powodować chemiczną modyfikację cząsteczek lipopolisacharydu (np. peroksydację lipidów) [49]. Można sądzić, że hemoglobina uwalniana do krwiobiegu w wyniku hemolizy erytrocytów wywołanej zakażeniem bakteriami Gram-ujemnymi oddziałuje z endotoksyną wzmagając jej patologiczne działanie [9, 49].

Wśród białek wykazujących zdolność wiązania LPS prawdopodobnie znajdują się także niektóre receptory komórkowe inne niż antygen CD14. Istnieją doniesienia wskazujące na rolę receptora PAF, białek integrynowych z podjednostką β_2 integryn oraz 73-kDa proteiny w aktywacji komórek zapalnych przez LPS [6, 12]. Sugeruje się, że przyłączenie LPS do receptora

dla PAF powoduje wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia jonów Ca^{+2} w różnego typu komórkach np. w makrofagach, neutrofilach, czy w płytkach krwi oraz wzmacnia agregację płytek. Efekty te są blokowane poprzez inhibitory receptora PAF [12, 51, 52]. Antagoniści receptora PAF nie powodują jednak zahamowania syntezy $\text{TNF-}\alpha$ ani produkcji anionorodnika ponadtlenkowego O_2^- [12, 52]. Dlatego można przypuszczać, że istnieją przynajmniej dwie różne drogi aktywacji komórek przez endotoksynę, z których jedna związana jest z receptorem PAF i może odgrywać istotną rolę w powstawaniu zakrzepów w trakcie zakażenia, podczas gdy druga jest niezależna od receptora PAF i przekazywania sygnału poprzez jony Ca^{+2} [51, 52].

Do glikoprotein z rodziny integryn β_2 wiążących LPS należą receptory: CD11a/CD18, CD11b/CD18 i CD11c/CD18 obecne na neutrofilach, makrofagach i monocytach [4, 22, 40]. LPS oddziałując z tymi receptorami nie indukuje wprawdzie syntezy cytokin, ale stymuluje aktywację fosfolipazy C (PLC), powoduje wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia jonów wapnia i aktywuje kinazy białkowe takie jak: białkowe kinazy tyrozynowe (PTK), kinazę MAP i białkową kinazę C (PKC). Stymulacja tych enzymów prowadzi w konsekwencji do aktywacji czynnika jądrowego κB [6, 12, 53]. Czynn timer jądrowy κB zlokalizowany jest w cytoplazmie, gdzie tworzy kompleks z jednostką inhibitorową I κB . W wyniku aktywacji endotoksyną następuje usunięcie inhibitora i natychmiastowe przeniesienie czynn timer κB do jądra. Działający w jądrze κB powoduje transkrypcję wielu genów związanych z układem immunologicznym np. genów kodujących cytokiny [6].

Najmniej poznanym receptorem dla LPS jest 73-kDa glikoptoteina błonowa obecna na limfocytach, granulocytach, makrofagach i płytkach krwi. Wydaje się, że receptor ten bierze udział w regulowaniu cytotoksyczności komórek zapalnych pod wpływem działania LPS, jednak jego obecność nie jest niezbędna do aktywowania tych komórek [4, 12, 53].

Opisując receptory błonowe dla lipopolisacharydu bakteryjnego nie sposób nie wspomnieć o zdolności LPS do aktywowania komórek na drodze całkowicie niezależnej od receptorów. Możliwość taka dotyczy jednak wyłącznie wysokich stężeń endotoksyny (powyżej 0,1 $\mu\text{g/ml}$ i związana jest z bezpośrednim aktywowaniem komórek poprzez niespecyficzne hydrofobowe oddziaływania LPS z fosfolipidami (PL) błony komórkowej [1, 9, 54]. W obecności białek transportujących LPS dochodzi do interkalacji lipopolisacharydowych agregatów do PL poprzez reszty acylowe lipidu A, co może np. indukować syntezę cytokin zapalnych [6, 9]. Dzięki oddziaływaniom niespecyficznym komórki pozbawione receptorów dla LPS są zdolne do odpowiedzi na wysokie dawki endotoksyny. Możliwość interkalacji LPS ustalono dotychczas w przypadku liposomów, a także dla niektórych komórek ssaków: monocytów, makrofagów, erytrocytów i hepatocytów [9, 54].

LITERATURA

- [1] Glauser M. P. (1996), *Drugs*, **52**, 9–17.
- [2] Abrahamson S. L., Wu H.-M., Williams R. E., Der K., Ottah N., Little R., Gazzano-Santoro H., Theofan G., Bauer R., Leigh S., Orme A., Horwitz A. H., Carroll S. F., Dedrick R. L. (1997), *J. Biol. Chem.*, **272**, 2149–2155.
- [3] Markiewicz Z. (1993), PWN, Warszawa.
- [4] Klink M., Kaca W. (1996), *Post. Hig. Med. Dośw.*, **50**, 333–350.
- [5] Wiese A., Brandenburg K., Carroll S. F., Rietschel E. Th., Seydel U. (1997), *Biochemistry*, **36**, 10311–10319.
- [6] Osnes L. T. N., Westvik A. B., Ovstebo R., Joo G.-B., Okkenbaug C., Kierulf P. (1995), *J. Endot. Res.*, **2**, 27–35.
- [7] Maestroni G. J. M. (1996), *J. Pineal Res.*, **20**, 84–89.
- [8] Sewerynek E., Ortiz G. G., Reiter R. J., Pablos M. I., Melchiorri D., Daniels W. M. U. (1996), *Mol. Cell. Endoc.*, **117**, 183–188.
- [9] Schromm A. B., Brandenburg K., Rietschel E. Th., Flad H.-D., Carroll S. F., Seydel U. (1996), *FEBS Lett.*, **399**, 267–271.
- [10] Mookhala S. M., Hon W.-M., Chhatwal V. J. S., Khoo H.-E. (1996), *Eur. J. Pharm.*, **316**, 287–296.
- [11] Watanabe A., Takeshita A., Kitano S., Hanazawa S. (1996), *Infect. Immunity*, **64**, 4488–4494.
- [12] Shinji H., Akagawa K. S., Tsuji M., Maeda M., Yamada R., Matsuura K., Yamamoto S., Yoshida T. (1997), *J. Immun.*, **158**, 1370–1376.
- [13] Ribaldi E., Mezzasoma A. M., Francescangeli E., Prosdocimi M., Nenci G. G., Goracci G., Gresele P. (1996), *Brit. J. Pharm.*, **118**, 1351–1358.
- [14] Parmely M. J., Hao S. Y., Morrison D. S., Pace J. L. (1995), *J. Endot. Res.*, **2**, 45–52.
- [15] Bozza P., Payne J. L., Goulet J. L., Weller F. (1996), *J. Exp. Med.*, **183**, 1515–1525.
- [16] Hirohashi N., Morrison D. C. (1996), *Infect. Immunity*, **64**, 1011–1015.
- [17] Rodeberg D. A., Babcock G. F. (1996), *Infect. Immunity*, **64**, 2812–2816.
- [18] Douzinas E. E., Tsidemiadou P. D., Pitaridis M. P., Andrianakis I., Bobota-Chloraki A., Katsouyanni K., Sfyras D., Malagari K., Rousos C. (1997), *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, **155**, 53–59.
- [19] Camussi G., Mariano F., Biancone L., De Martino A., Bussolati B., Montrucchio G., Tobias P. S. (1995), *J. Immun.*, **155**, 316–324.
- [20] Goldsmith J. A., Kavanagh B. P., Pearl R. G. (1996), *Crit. Care Trauma*, **83**, 242–246.
- [21] Rollins B. J. (1997), *Blood*, **90**, 909–928.
- [22] Jakóbisziak M. (1993), *Immunologia*, PWN, Warszawa.
- [23] Kocik J. (1996), *Post. Biol. Kom.*, **23**, 63–82.
- [24] Takada K., Ohno N., Yadomae T. (1994), *Circ. Shock*, **44**, 169–174.
- [25] Komatsu Y., Shiratori Y., Hikiba Y., Hashimoto N., Han K., Kawase T., Yoshida H., Okano K., Omata M. (1996), *Digest. Dis. Sci.*, **41**, 1030–1037.
- [26] Grigoriadis G., Stewart A. G. (1996), *Cell. Physiol. Biochem.*, **6**, 271–282.
- [27] Ono S. (1994), *Nippon Geka Gakkai Zasshi*, **95**, 849–859.
- [28] Zaorska B. (1986), *Prostaglandyny i inne eikozanoidy*, PZWL, Warszawa.
- [29] Megyeri P., Pabst K. M., Pabst M. J. (1995), *Immunology*, **86**, 629–635.
- [30] Clerch L. B., Wright A., Chung D. J., Massaro D. (1996), *Am. J. Physiol.*, **271**, 949–954.

- [31] Muruganandam A., Mutus B. (1994), *Biochim. Biophys. Acta*, **1200**, 1-6.
- [32] Xie K., Huang S., Dong Z., Fidler I. J., (1993), *Internation. J. Oncol.*, **3**, 1043-1048.
- [33] Schini-Kerth V. B., Fisslthaler B., Busse R. (1994), *Am. J. Physiol.*, **267**, 2483-2490.
- [34] Nathan C. (1992), *FASEB J.*, **6**, 3051-3064.
- [35] Radomski M. W., Moncada S. (1993), *Thromb. Haemost.*, **70**, 36-41.
- [36] Iuvone T., D'Acquisto F., Carnuccio R., Di Rosa M. (1996), *Pharmacol. Lett.*, **59**, 207-211.
- [37] Shultz P. J., Raj L. (1992), *J. Clin. Invest.*, **90**, 1718-1725.
- [38] Wang J.-F., Xie J.-M., Greenberg S. S., Spitzer J. J. (1995), *J. Endot. Res.*, **2**, 107-114.
- [39] Zurovsky Y., Eligal Z. (1995), *J. Endot. Res.*, **2**, 443-448.
- [40] Takada K., Ohno N., Yadomae T. (1995), *J. Endot. Res.*, **2**, 255-262.
- [41] Hailman E., Vasselton T., Kelley M., Busse A., Hu M. C.-T., Lichenstein H. S., Detmers P. A., Wright S. D. (1996), *J. Immunol.*, **156**, 4384-4390.
- [42] Olson N. C., Hellyer P. W., Dodam J. R. (1995), *Br. Vet. J.*, **151**, 489-522.
- [43] Landmann R., Knopf H.-P., Link S., Sansano S., Schumann R., Zimmerli W. (1996), *Infect. Immunity*, **64**, 1762-1769.
- [44] Hailman E., Albers J. J., Wolfbauer G., Tu A.-Y., Wright S. D. (1996), *J. Biol. Chem.*, **271**, 12172-12178.
- [45] Kitano H., Fukui H., Okamoto Y., Kikuchi E., Matsumoto M., Kikukawa M., Morimura M., Tsujita S., Nagamoto I., Hoppo K., Nakatani Y., Nakatani T., Tsujii T. (1996), *Alcoholm. Clin. Exp. Res.*, **20**, 356-359.
- [46] Wiese A., Brandenburg K., Linder B., Schromm A. B., Carroll S. F., Rietschel E. Th., Seydel U. (1996), *Biochemistry*, **36**, 10301-10310.
- [47] David S. A., Balaram P., Mathan V. I. (1995), *J. Endot. Res.*, **2**, 99-106.
- [48] Machnicki M. (1995), *Post. Hig. Med. Dośw.*, **49**, 53-57.
- [49] Kaca W., Roth R. I., Levin J. (1994), *J. Biol. Chem.*, **269**, 25078-25084.
- [50] Roth R. I. (1996), *Tromb. Haemost.*, **76**, 258-262.
- [51] Nakamura M., Honda Z., Waga I., Matsumoto T., Noma M., Shimizu T. (1992), *FEBS Lett.*, **314**, 125-129.
- [52] Waga I., Nakamura M., Honda Z., Ferby I., Toyoshima S., Ishiguro S., Shimizu T. (1993), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **197**, 465-472.
- [53] Cavaillon J.-M., Marie C., Caroff M., Ledur A., Godard I., Poulain D., Fitting C., Haeflner-Cavaillon N. (1996), *J. Endot. Res.*, **3**, 471-480.
- [54] Schromm A. B., Brandenburg K., Rietschel E. Th., Seydel U. (1995), *J. Endot. Res.*, **2**, 313-323.

Joanna Saluk-Juszczak, Barbara Wachowicz

THE BIOLOGICAL ACTIVITY OF BACTERIAL LIPOPOLISACCHARIDE

The purpose of this paper is to briefly review the structure and biological activity of bacterial endotoxin. Endotoxin or lipopolisaccharide (LPS) is the major component of the outer membranes of the cell walls of Gram-negative bacteria. LPS consists of two parts: the hydrophobic lipid A and hydrophilic polysaccharide with contrasting chemical and physical properties. The toxic activity is principally due to its lipid A moiety. LPS is capable of inducing stimulation of immunological system acting on monocytes, macrophages, granulocytes, platelets and endothelial cells leading to the release of inflammatory mediators: eicosanoids, cytokines, chemokines, adhesion molecules, reactive free radicals, platelet activating factor (PAF) and NO[•]. In the circulation LPS may bind to plasma components such as high-density lipoproteins (HDL) or LPS binding protein (LBP). This complex interacts with a high affinity receptor CD14 expressed on leukocytes, monocytes and macrophages resulting in activation of these cells and inducing pathophysiological effects such as inflammation, septic shock and death. The consequences for the host of all these events are dependent on the extent of LPS exposure and the status of the host defense mechanisms.