

Роль протеинкиназ JNK и p38 в регуляции апоптоза мононуклеарных лейкоцитов крови при окислительном стрессе

Часовских Н.Ю.

Role of protein kinases JNK and p38 in regulation of mononuclear leucocytes apoptosis in oxidative stress

Chasovskikh N. Yu.

Сибирский государственный медицинский университет, г. Томск

© Часовских Н.Ю.

Проведено исследование программированной гибели мононуклеаров периферической крови здоровых доноров в условиях культивирования с различными концентрациями H_2O_2 , селективными ингибиторами JNK (SP600125), p38 MAPK (ML3403) и у пациентов с внебольничной пневмонией. Интенсификация внутриклеточной продукции активных форм кислорода сопровождается увеличением числа аннексин-положительных и TNF-R1-презентирующих клеток, а также мононуклеаров со сниженным значением митохондриального трансмембранного потенциала в случае индукции окислительного стресса H_2O_2 в концентрации 1 ммоль *in vitro* и у больных пневмонией. Действие ингибиторов SP600125 и ML3403 *in vitro* в условиях окислительного стресса предотвращает увеличение количества аннексин-положительных мононуклеаров, что свидетельствует о вовлечении JNK и p38 MAP-киназ в механизмы окислительной дисрегуляции апоптоза.

Ключевые слова: окислительный стресс, апоптоз, митогенактивируемые протеинкиназы (JNK, p38), митохондрия, TNF-рецептор.

Programmed cell death of peripheral blood mononuclear leucocytes taken from healthy donors and cultivated with various concentration of H_2O_2 , selective inhibitors of JNK (SP600125), p38 MAPK (ML3403) and in case of pneumonia was investigated. Intensification of intracellular production of reactive oxygen species was accompanied by the increase in number of apoptotic and TNFR1-presented cells and mononuclears with reduced value of mitochondrial transmembrane potential in a case of oxidative stress induction with 1 mM hydrogen peroxide and in blood taken from patients with pneumonia. Action of inhibitors SP600125 and ML3403 *in vitro* in oxidative stress conditions prevents the increase in number of annexin-positive mononuclear cells, that confirms the participation of JNK and p38 MAP-kinases in mechanisms of oxidative stress-mediated apoptosis dysregulation.

Key words: oxidative stress, apoptosis, mitogen-activated protein kinases (JNK, p38), mitochondria, TNF-receptor.

УДК 616.155.3-091.818:577.3

Введение

Окислительный стресс является универсальным механизмом повреждения клетки при патологии разного генеза и характеризуется повышением внутриклеточной генерации активных форм кислорода (АФК) вследствие нарушения сбалансированности антиоксидантной и прооксидантной систем [5]. В настоящее время концепция, предполагающая исключительно повреждающее влияние АФК на функционирование клетки, пересматривается. Широко известность

приобрел термин «окислительная регуляция», отражающий активную роль окислительно-восстановительной модификации протеинов в регуляции функции клетки [5, 6, 12]. Измененные в результате воздействия АФК молекулы можно считать сигналами, несущими биологическую информацию, необходимую для регуляции различных клеточных функций, в частности реализации апоптоза [6]. АФК могут влиять на различные пути инициации апоптотической программы через внутриклеточные редоксзависимые сигналпередающие системы [5]. Оксидан-

тактивированные фосфолипазы стимулируют множество киназ, включая митогенактивируемые протеинкиназы (MAP-киназы) семейств JNK и p38. Последние фосфорилируют белки-мишени, связанные с регуляцией программированной клеточной гибели и функционированием соответствующих факторов транскрипции [3].

Установлено, что редоксзависимая киназа JNK может индуцировать апоптоз за счет участия в передаче иницирующего сигнала с TNF-рецептора, путем фосфорилирования и активации фактора транскрипции p53 [3], проапоптотических белков Bax и Bad (после транслокации в митохондриях), фосфорилирования и инактивации антиапоптотических белков семейства Bcl-2 [10, 12, 13, 16]. Активация протеинкиназы p38 также вызывает фосфорилирование Bad и повышает уровень экспрессии проапоптогенного белка p53 [8].

Однако имеются данные, свидетельствующие об антиапоптотической функции JNK и p38 [13, 15], зависящей от характера стрессовых сигналов, вариантов сочетания путей их передачи и типов клеток. В связи с этим целью настоящего исследования явилось изучение влияния протеинкиназ JNK и p38 на реализацию апоптоза при окислительном стрессе, являющемся неотъемлемым элементом патогенеза широкого спектра заболеваний (онкологических, сердечно-сосудистых, воспалительных).

Материал и методы

Исследованы мононуклеарные лейкоциты у 15 здоровых доноров (7 мужчин и 8 женщин) и 16 пациентов (8 мужчин, 8 женщин) с внебольничной пневмонией в возрасте от 18 до 50 лет.

Клетки выделяли из крови путем центрифугирования на слое фиколла («Pharmacia», Швеция) плотностью 1,077, затем ресуспендировали в полной питательной среде (90% RPMI-1640, 10% инактивированной (при 56 °С в течение 30 мин) эмбриональной телячьей сыворотки («Биолот», Санкт-Петербург), 0,3 мг/мл L-глутамин, 100 мкг/мл гентамицин, HEPES с концентрацией 2 ммоль/мл («Flow», Великобритания)). Затем мононуклеарные лейкоциты инкубировали при 37 °С и 5% CO₂ в течение 18 ч. Окислительный

стресс индуцировали добавлением в культуральную среду перекиси водорода в концентрациях 10, 50, 100, 500 мкмоль и 1 ммоль.

Для изучения роли JNK- и p38-киназ в культуре мононуклеарных лейкоцитов добавляли 4 мкл с концентрацией 20 мкмоль селективного ингибитора JNK — SP600125 («Biosource», США) либо ингибитора p38 — ML3403 («Biosource», США) и инкубировали 1 ч при 37 °С и 5% CO₂, затем добавляли H₂O₂ в концентрации 1 ммоль и продолжали культивировать в течение 18 ч. Культуры мононуклеарных лейкоцитов крови пациентов с внебольничной пневмонией инкубировали с ингибиторами MAP-киназ без добавления перекиси водорода.

Уровень продукции внутриклеточных АФК, количество апоптотических мононуклеарных лейкоцитов и клеток со сниженным потенциалом митохондриальной мембраны определяли методом проточной лазерной цитометрии (Epics XL («Beckman Coulter», Франция)), для чего использовали ди-хлорфлуоресцеина диацетат (DCF-DA) («Sigma Aldrich», США), FITC-меченый аннексин V («Cattag», США) и набор реагентов «MitoScreen» («BD Pharmingen», США) соответственно. Показатель, характеризующий содержание АФК в моноцитах (лимфоцитах), выражали в условных единицах (интенсивность свечения на клетку).

Для определения количества клеток, презентующих на своей поверхности мембранную форму рецептора к фактору некроза опухоли- α 1-го типа (TNF-RI) (CD120), мононуклеарные лейкоциты отмывали фосфатным буфером (рН = 7,2) и окрашивали стандартными моноклональными антителами к данному рецептору, меченными FITC («Immunotech», Франция), согласно протоколу производителя в течение 30 мин. Анализ образцов проводили на проточном цитометре.

Полученные данные обрабатывали методами вариационной статистики. Уровень статистической значимости различий ($p < 0,05$) для независимых и зависимых выборок оценивали с помощью непараметрических критериев Манна-Уитни и Вилкоксона соответственно. Данные представлены в виде медианы Me, верхнего и нижнего квартилей q_1 – q_3 .

Результаты и обсуждение

Для моделирования условий, соответствующих окислительному стрессу, при инкубации мононуклеарных лейкоцитов крови здоровых доноров в культуральную среду добавляли перекись водорода в различных концентрациях. Добавление в культуру клеток перекиси водорода в концентрациях 10, 50, 100 и 500 мкмоль не приводило к достоверному возрастанию внутриклеточного содержания АФК по сравнению с контролем, что могло свидетельствовать об эффективной работе антиоксидантной системы (табл. 1). Статистически достоверное возрастание внутриклеточной АФК-продукции, свидетельствующее об истощении резерва антиоксидантной системы, наблюдали при инкубации мононуклеарных лейкоцитов H_2O_2 с концентрацией 1 ммоль. Поскольку дисбаланс окислительного метаболизма сопряжен с развитием ряда распространенных патологий, в том числе воспалительных процессов различной этиологии [5], для подтверждения результатов эксперимента исследуемые показатели оценивались при внебольничной пневмонии. Было зарегистрировано возрастание (по сравнению с нормой) уровня АФК в мононуклеарах крови у больных острой пневмонией, сопоставимое с таковым в случае экспериментально индуцированного окислительного стресса (см. табл. 1).

Результаты аннексинового теста, полученные при инкубации моноцитов (лимфоцитов) здоровых доноров с перекисью водорода в концентрациях 10, 50, 100 и 500 мкмоль, не отличались от контрольных значений (см. табл. 1). Статистически значимое возрастание числа аннексин-положительных клеток было зафиксиро-

вано при индукции экспериментального окислительного стресса H_2O_2 с концентрацией 1 ммоль и у пациентов с внебольничной пневмонией.

Наблюдаемая активация апоптоза в культуре мононуклеарных лейкоцитов при окислительном стрессе (экспериментальном и в клинике острого воспаления) может быть обусловлена индукцией различных путей ее запуска (вне- и внутриклеточных).

Одним из ключевых путей инициации летальной программы клеток является рецепторный (TNF-опосредованный) [2, 7, 9]. Связывание рецептора $TNF-R1$ с соответствующим лигандом приводит к формированию комплекса внутриклеточных областей рецептора с адаптерным белком TRADD (TNFR-associated death domain). В результате этого происходит олигомеризация каспазы-8 и ее саморасщепление. Последующая активация эффекторных каспаз-3 и -7 активирует каспазу-6, расщепляющую белок ядерного митотического аппарата, что приводит к сжатию и фрагментации ядра [1, 2].

Результаты проведенного исследования свидетельствуют, что количество $TNF-R1$ -презентирующих клеток возрастало в культуре мононуклеаров больных пневмонией и в культуре клеток при экспериментальном окислительном стрессе (табл. 2). Таким образом, увеличение числа $TNF-R1$ -несущих клеток в культуре сопряжено с активацией апоптоза на фоне интенсификации внутриклеточной продукции АФК. Можно предположить, что дисбаланс окислительного метаболизма влияет на функцию редоксзависимых систем сигнальной трансдукции, ответственных за экспрессию и презентацию $TNF-R1$, запуск программированной клеточной гибели.

Таблица 1

Уровень активных форм кислорода и содержание апоптотических клеток в популяции мононуклеарных лейкоцитов крови у здоровых доноров в условиях культивирования *in vitro* с различными концентрациями перекиси водорода и у больных с острыми воспалительными заболеваниями (Me (Q₁-Q₃))

Условие	Уровень АФК в клетке, усл. ед	Количество аннексин-положительных клеток, %
ИКМЛ ЗД	0,24 (0,19—0,33)	1,33 (0,99—1,95)
ИМЛ ЗД с H_2O_2 в концентрации:		
10 мкмоль	0,12 (0,05—0,20)	1,83 (1,01—2,07)
50 мкмоль	0,17 (0,16—0,256)	1,55 (1,12—2,21)

100 мкмоль	0,25 (0,22—0,38)	1,65 (0,21—2,43)
500 мкмоль	0,27 (0,24—0,35)	1,23 (0,43—2,10)
1 ммоль	0,62 (0,52—0,69)*	13,12 (12,17—15,14)*
ИКМЛ больных пневмонией	0,50 (0,46—0,54)*	10,54 (9,24—11,09)*

Примечание. Здесь и в табл. 2 и 3: ИКМЛ — интактная культура мононуклеарных лейкоцитов; ИМЛ — инкубирование мононуклеарных лейкоцитов; ЗД — здоровые доноры.

* $p < 0,001$ по сравнению с аналогичным показателем в интактной культуре.

Таблица 2

Внутриклеточная продукция активных форм кислорода, содержание апоптотических и TNFR1-презентирующих клеток, клеток со сниженным трансмембранным потенциалом в общей популяции мононуклеарных лейкоцитов периферической крови у здоровых доноров в условиях окислительного стресса *in vitro* и у больных с внебольничной пневмонией (Ме (Q₁—Q₃))

Условие	ИКМЛ ЗД	ИМЛ ЗД с H ₂ O ₂ в концентрации 1 ммоль	ИКМЛ больных пневмонией
Уровень АФК в клетке, усл. ед	0,24 (0,19 — 0,33)	0,62 (0,52—0,69)*	0,50 (0,46—0,54)*
Количество клеток со сниженным Δψ, %	1,34 (1,10 —1,64)	9,05 (6,15—9,24)*	7,52 (5,01—8,84)*
Количество TNF-R1-презентирующих клеток, %	1,47 (0,97 — 2,07)	8,87 (5,81—10,47)*	10,19 (9,13—1,96)*

* $p < 0,001$ по сравнению с аналогичным показателем в интактной культуре.

Другим важнейшим механизмом инициации апоптоза является митохондриальный путь. В митохондриях сосредоточено большое количество проапоптотических факторов (в частности, цитохром с) [11, 14], выход которых в цитозоль активирует прокаспазу-9, запуская программу апоптоза [1]. Этот процесс осуществляется благодаря открытию пор пермеабиллизационного перехода между наружной и внутренней митохондриальными мембранами, а также формированию каналов в наружной мембране, что сопровождается падением митохондриального трансмембранного потенциала [14]. В настоящем исследовании проводилась оценка числа клеток со сниженным Δψ в культуре мононуклеарных лейкоцитов при окислительном стрессе. Увеличение значений исследуемого показателя (по сравнению с контролем) наблюдали в случае инкубации клеток с перекисью водорода с концентрацией 1 ммоль и у пациентов с пневмонией (см. табл. 2). Поскольку митохондрии изменяют свои функциональные характеристики (в том числе трансмембранный потенциал) в зависимости от редокс-статуса клетки, очевидна их роль в активации апоптогенных механизмов, зафиксированной при окислительном стрессе в данном исследовании.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о запуске различных механизмов инициации программированной гибели клеток

при окислительном стрессе. В качестве элементов редоксзависимых путей, обеспечивающих данный процесс, могут выступать митогенактивируемые киназы JNK и p38 [3—5, 12]. Установлена корреляция между повышенным уровнем АФК и активацией фосфорилирования JNK и p38 [10, 13].

Для оценки вклада протеинкиназ JNK и p38 в реализацию апоптогенной программы при окислительном стрессе использовались селективные ингибиторы данных ферментов (SP600125 и ML3403 соответственно). Полученные результаты демонстрируют, что добавление селективного ингибитора p38 ML3403, а также селективного ингибитора JNK SP600125 в культуры мононуклеарных лейкоцитов здоровых доноров предотвращало апоптоз, индуцируемый добавлением H₂O₂ с концентрацией 1 ммоль в культуру (табл. 3). При культивировании мононуклеарных лейкоцитов периферической крови, полученных у пациентов с внебольничной пневмонией, в присутствии SP600125 или ML3403 отмечалась аналогичная тенденция к снижению апоптотической активности клеток. Блокирование запуска летальной программы мононуклеарных лейкоцитов селективными ингибиторами p38 (ML3403) и JNK (SP600125) может свидетельствовать о проапоптотической функции JNK и p38 в условиях окислительного стресса. Известно, что JNK участвует в передаче иницирующего сигнала от TNF-R и способна фосфорилировать белки-регуляторы

апоптоза, отвечающие за изменение проницаемости мембран митохондрий [3]. Фосфорилированные MAP-киназы воздействуют на факторы транскрипции, в частности, NF-κB (в ряде случаев стимулирует экспрессию апоптозиндуцирующих генов *Fas* и рецепторов смерти) и p53-

необходимый элемент для запуска внутреннего пути летальной программы [3, 5, 9].

Таким образом, в условиях окислительного стресса MAP-киназы p38 и JNK выступают в качестве редоксзависимых сигнальных молекул с проапоптотической функцией.

Таблица 3

Уровень аннексин-положительных клеток в общей популяции мононуклеаров периферической крови здоровых доноров в условиях культивирования *in vitro* с перекисью водорода и ингибиторами MAP-киназ (Me (Q₁-Q₃))

Условие	Количество аннексин-положительных клеток, %
ИКМЛ ЗД	1,33 (0,99—1,95)
ИМЛ ЗД с H ₂ O ₂ в концентрации 1 ммоль	13,12 (12,17—15,14)*
ИМЛ ЗД с H ₂ O ₂ в концентрации 1 ммоль и ингибитором p38 ML3403	0,91 (0,24—2,56)**
ИМЛ ЗД с H ₂ O ₂ в концентрации 1 ммоль и ингибитором JNK SP600125	0,67 (0,32—2,13)**
ИКМЛ больных пневмонией	10,54 (9,24—11,09)*
ИМЛ больных пневмонией с ингибитором p38 ML3403	3,24 (2,76—3,65)***
ИМЛ больных пневмонией с ингибитором JNK SP600125	3,95 (2,85—3,56)***

* $p < 0,001$ по сравнению с аналогичным показателем в интактной культуре мононуклеарных лейкоцитов здоровых доноров.

** $p < 0,001$ по сравнению с аналогичным показателем в культуре с добавлением перекиси водорода в концентрации 1 ммоль.

*** $p < 0,001$ по сравнению с аналогичным показателем в интактной культуре мононуклеарных лейкоцитов больных пневмонией.

Заключение

В настоящее время выявлено большое число сигнальных путей, регулируемых АФК. Среди них в наибольшей степени изучены механизмы, основанные на фосфорилировании и дефосфорилировании белков специфическими киназами и фосфатазами. В частности, универсальными трансмиттерами сигналов от множества поверхностных трансмембранных рецепторов и внеклеточных стимуляторов к внутриклеточным компартаментам являются MAP-киназы.

Известно, что после активации MAP-киназы могут участвовать в процессах клеточной пролиферации, дифференцировки и апоптоза. Полученные результаты свидетельствуют о проапоптотической роли данных киназ в условиях окислительного стресса, так как использование их селективных ингибиторов блокирует запуск летальной программы мононуклеарных лейкоцитов.

Результаты проведенного исследования могут выступать в качестве предпосылок для разработки теоретических основ технологии коррекции нарушений реализации апоптоза при за-

болеваниях, сопровождающихся дисбалансом окислительного метаболизма, путем фармакологического воздействия на соответствующие молекулярные мишени.

Работа выполнена в рамках Федеральной целевой научно-технической программы «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития науки и техники» на 2002—2006 гг. (ГК № 02.442.11.7276, ГК № 02.445.11.7419), при финансовой поддержке РФФИ (грант 07-04-12150).

Литература

1. Аббасова С.Г., Липкин В.М., Трапезников Н.Н., Кушлинский Н.Е. Система Fas—FasL в норме и при патологии // *Вопр. биол. мед. фарм. химии*. 1999. № 3. С. 3—17.
2. Белецкий И.П., Мошникова А.Б., Прусакова О.В. Пути передачи цитотоксического сигнала рецепторами семейства TNF-Rs (обзор) // *Биохимия*. 2002. Т. 67. Вып. 9. С. 377—395.
- 3.

Часовских Н.Ю. Роль протеинкиназ JNK и p38 в регуляции апоптоза мононуклеарных лейкоцитов крови...

4. **Влаопулос С., Зумпурлис В.С.** JNK: ключевой модулятор внутриклеточной сигнальной системы // Биохимия. 2004. Т. 69. Вып. 8. С. 1038–1050.
5. **Дубинина Е.Е.** Роль активных форм кислорода в качестве сигнальных молекул в метаболизме тканей при состояниях окислительного стресса // Вопр. мед. химии. 2001. Т. 47. № 6. С. 561–581.
6. **Меньшикова Е.Б., Ланкин В.З., Зенков Н.К. и др.** Окислительный стресс. Прооксиданты и антиоксиданты. М.: Слово, 2006. 600 с.
7. **Октябрьский О.Н., Смирнова Г.В.** Редокс-регуляция клеточных функций // Биохимия. 2007. Т. 72. Вып. 2. С. 158–174.
8. **Рязанцева Н.В., Новицкий В.В., Жукова О.Б. и др.** Роль нарушения регуляции апоптотической гибели в механизмах развития вирусиндуцированной цитогенетической нестабильности лимфоцитов крови // Бюл. эксперим. биологии и медицины. 2006. Т. 141. № 5. С. 544–549.
9. **Baines C.P., Molkentin J.D.** Stress signaling pathways that modulate cardiac myocyte apoptosis // J. of Molecular and Cellular Cardiology. 2005. V. 38. P. 47–62.
10. **Bredesen D.E.** Apoptosis: overview and signal transduction pathways // J. Neurotrauma. 2000. V. 17. № 2. P. 801–810.
11. **Cho S.D., Ahn N.S., Jung J.W. et al.** Critical role of the c-JunNH2-terminal kinase and p38 mitogen-activated protein kinase pathways on sodium butyrate-induced apoptosis in DU145 human prostate cancer cells // Eur. J. Cancer Prev. 2006. V. 15. № 1. P. 57–63.
12. **Cory S., Adams J.M.** The Bcl-2 family: regulators of the cellular life-or-death switch // Nat. Rev. Cancer. 2002. V. 2. № 9. P. 647–656.
13. **Haddad J.J.** Oxygen-sensing mechanisms and the regulation of redox-responsive transcription factors in development and pathophysiology // Respir. Res. 2002. V. 3. № 1. P. 26–30.
14. **Harada C., Nakamura K.** Role of apoptosis signal-regulating kinase 1 stress-induced neural cell apoptosis *in vivo* // Am. J. Pathology. 2006. V. 168. № 1. P. 262–269.
15. **Joza N., Susin S.A., Daugas E. et al.** Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death // Nature. 2001. V. 410. № 6828. P. 549–554.
16. **Sabapathy K., Hu Y., Kallunki T. et al.** JNK2 is required for efficient T-cell activation and apoptosis but not for normal lymphocyte development // Curr. Biol. 1999. V. 9. P. 116–125.
17. **Teraishi F., Wu S.** Identification of a Novel Synthetic Thiazolidin Compound Capable of Inducing c-Jun NH2-Terminal Kinase-Dependent Apoptosis in Human Colon Cancer Cells // Cancer Res. 2005. V. 65. № 14. P. 6380–6387.

Поступила в редакцию 20.03.2008 г.

Сведения об авторах

Н.Ю. Часовских – канд. мед. наук, ассистент кафедры фундаментальных основ клинической медицины СибГМУ (г. Томск).

Для корреспонденции

Часовских Наталья Юрьевна, тел. 8-913-811-71-32, Cnil@mail.ru