

## РОЛЬ РЕДОКС-ЗАВИСИМЫХ СИГНАЛЬНЫХ СИСТЕМ В РЕГУЛЯЦИИ АПОПТОЗА ПРИ ОКИСЛИТЕЛЬНОМ СТРЕССЕ

© Н. В. Рязанцева, В. В. Новицкий, Н. Ю. Часовских,<sup>1</sup> Е. В. Кайгородова,  
Е. Г. Старикова, Ю. В. Стариков, Т. Т. Радзивил, И. В. Крат

*Кафедра фундаментальных основ клинической медицины и кафедра патофизиологии  
Сибирского государственного медицинского университета Федерального агентства  
по здравоохранению и социальному развитию, Томск;*

<sup>1</sup> электронный адрес: [cnil@mail.ru](mailto:cnil@mail.ru)

Исследовали программированную гибель мононуклеаров периферической крови пациентов с острыми воспалительными заболеваниями (острым аппендицитом, внебольничной пневмонией) в условиях окислительного стресса *in vitro* (мононуклеары здоровых доноров) и при селективном ингибировании MAP-киназ JNK и p38. С помощью иммуноблотинга определен уровень активных и неактивных форм MAP-киназ, факторов транскрипции p53 и NF-κB. Увеличение апоптотической гибели в условиях окислительного стресса *in vitro* и при острых воспалительных заболеваниях сопряжено с возрастанием уровня активных форм кислорода в клетках. Действие ингибиторов MAP-киназ JNK (SP600125) и p38 (ML3403) *in vitro* предотвращает увеличение количества аннексин-положительных мононуклеаров в условиях окислительного стресса, что свидетельствует о вовлечении JNK и p38 MAP-киназ в механизмы окислительной дисрегуляции апоптоза. Продемонстрировано появление NF-κB в мононуклеарах при окислительном стрессе в клинике острого воспаления и в эксперименте; p53 регистрировался только в условиях окислительного стресса *in vitro*. Результирующим эффектом p53 и NF-κB является увеличение числа апоптотических мононуклеарных лейкоцитов, что свидетельствует об отсутствии антисуицидальной регуляции NF-κB.

**Ключевые слова:** окислительный стресс, острое воспаление, АФК, апоптоз, митогенактивируемые протеинкиназы JNK, p38, p53, NF-κB.

**Принятые сокращения:** АФК — активные формы кислорода, IL — интерлейкин, MAP-киназы — митогенактивируемые протеинкиназы, TNF — фактор некроза опухоли.

Апоптоз представляет собой активную форму клеточной гибели, которая является физиологическим механизмом устранения избыточных и (или) функционально неполноценных клеток. Нарушение реализации данной программы вследствие дисбаланса про- и антиапоптогенных факторов приводит к патологическим изменениям органов и тканей. Показано, что различные заболевания (онкологические, инфекционные, воспалительные, сердечно-сосудистые и др.) сопровождаются нарушением программы апоптоза, с одной стороны, и дисбалансом окислительного метаболизма — с другой (Зенков и др., 2001). При этом избыточная генерация активных форм кислорода (АФК) в тканях на фоне истощения резервов антиоксидантной защиты оказывает влияние на функциональное состояние редокс-чувствительных систем внутриклеточной регуляции апоптоза. К числу последних относятся митогенактивируемые протеинкиназы JNK и p38, фосфорилирующие ответственные за реализацию летальной программы клеток белки-мишени, среди которых факторы транскрипции NF-κB и p53 (Gallo, Johnson, 2002).

Активация JNK играет ведущую роль в запуске летальной программы клеток в ответ на стресс, вызванный воздействием провоспалительных цитокинов, свободных

радикалов и ингибированием синтеза белков (Gallo, Johnson, 2002). JNK может индуцировать апоптоз путем фосфорилирования и активации фактора транскрипции p53 (Моргункова, 2005). Установлено, что JNK-киназа способна проникать в митохондрии, где фосфорилирует и активирует проапоптотические белки Bax и Bad, а также инактивирует антиапоптотические белки семейства Bcl-2 (Gallo, Johnson, 2002; Влапулос, Зумпурлис, 2004; Дас, Молик, 2004; Teraishi, Wu, 2005; Harada, Nakamura, 2006). Киназа p38 активирует факторы NF-κB, MEK2C (Gallo, Johnson, 2002), способствует экспрессии одного из важнейших апоптогенных митохондриальных белков Bax, опосредуя свое влияние через фосфорилирование p53 (Kim et al., 2002; Mayr et al., 2002).

Активируемые киназами NF-κB и p53 в свою очередь контролируют синтез ключевых белков-регуляторов апоптоза. NF-κB стимулирует транскрипцию антиапоптотических генов Bcl-X<sub>L</sub>, X-IAP, c-IAP1 и c-IAP2, ингибируя тем самым летальную программу клеток (Wenger, 2000). Вместе с тем имеются данные о блокировании программы апоптоза NF-κB за счет снижения экспрессии p53 и Bax (Mayr et al., 2002). p53 осуществляет транскрипционный контроль апоптотических протеинов семейства Bcl-2 (Bax, Puma, Noxa, Bid) (Wenger, 2000; Моргункова,

2005). Несмотря на накопленный к настоящему времени фактический материал, существуют значительные пробелы в оценке про- и антиапоптогенной функции данных элементов сигнальной трансдукции в зависимости от природы индуцирующего сигнала и сопутствующих условий стимуляции. В связи с этим целью работы явилось исследование роли редокс-чувствительных киназ JNK, p38 и факторов транскрипции NF-κB, p53 в реализации летальной программы клеток при окислительном стрессе, являющемся универсальным механизмом их повреждения при патологии разного генеза.

### Материал и методика

Материалом исследования являлись мононуклеарные лейкоциты крови, полученные у 23 здоровых доноров (10 женщин, 13 мужчин) и 25 больных с острым воспалительным процессом (14 пациентов с острой внебольничной пневмонией, 11 пациентов с острым аппендицитом) в возрасте от 18 до 55 лет (12 женщин, 13 мужчин). Клетки выделяли путем центрифугирования на градиенте плотности Ficoll-Paque Plus ( $\rho = 1.077 \text{ г/см}^3$ ) (GE Healthcare, Швеция) и культивировали в полной питательной среде, содержащей 90 % RPMI-1640 (Вектор-Бест, Россия), 10%-ную эмбриональную телячью сыворотку (Биолот, Россия), инактивированную при 56 °C в течение 30 мин, 0.3 мг/мл L-глутамин, 100 мкг/мл гентамицина, 2 мМ/мл HEPES (Flow, Великобритания) в 96-луночных планшетах ( $2 \cdot 10^6$  в 1 мл).

Индукцию окислительного стресса в мононуклеарных лейкоцитах у здоровых доноров достигали добавлением 1 мМ  $\text{H}_2\text{O}_2$  в культуральную среду с последующей инкубацией клеток в течение 18 ч при 37 °C и 5 %  $\text{CO}_2$ . Для изучения роли киназ JNK и p38 в культуре мононуклеарных лейкоцитов добавляли 4 мкл 20 мМ селективного ингибитора JNK — SP600125 (Biosource, США) либо ингибитора p38 — ML3403 (Biosource, США) и инкубировали 1 ч при 37 °C и 5 %  $\text{CO}_2$ , затем добавляли 1 мМ  $\text{H}_2\text{O}_2$  и продолжали культивировать в течение 18 ч. Культуры мононуклеарных лейкоцитов крови пациентов с острыми воспалительными заболеваниями инкубировали с ингибиторами MAP-киназ без добавления перекиси водорода.

Уровень АФК и выраженность апоптоза в культурах мононуклеарных лейкоцитов определяли с помощью проточной лазерной цитометрии (Epics XL (Beckman Coulter, Франция)), для чего использовали дихлорфлуоресцеина диацетат (DCF-DA) (Sigma Aldrich, США) и FITC-меченный аннексин V (Catlag, США) соответственно. Содержание АФК в мононуклеарах характеризовали в условных единицах (интенсивность свечения на клетку), апоптоз в культуре — в процентном содержании аннексин-положительных клеток.

Определение содержания общих и фосфорилированных форм MAP-киназ p38, JNK и факторов транскрипции p53 и NF-κB в мононуклеарах проводили методом вестерн-блоттинга. В культуру клеток добавляли лизирующий буферный раствор (50 мМ Трис-HCl (pH 6.5), 100 мМ дитиотрейтол, 2 % SDS, 0.1%-ный бромфеноловый синий, 15%-ный глицерол (Helikon, США), смесь протеазных ингибиторов (Sigma, США) и фосфатно-солевой буфер). Методом электрофореза белки разделяли в SDS-PAGE-геле, содержащем 10%-ный полиакриламид, затем переносили (в течение 12 ч при напряжении 35 В) на нитроцеллюлозную мембрану (Bio-Rad, США). Мемб-

раны последовательно инкубировали в TBST-буфере с 5%-ным обезжиренным сухим молоком и с первичными антителами к JNK 1 и 2, p38, к активным формам MAP-киназ (фосфо JNK 1 и 2, фосфо p38) и к p53, NF-κB (Biosource, США) в разведении 1 : 200. Затем добавляли вторичные антитела с пероксидазной меткой (Biosource, США). Вывод о содержании исследуемого антигена в клетке делали по изменению отношения величины сигнала метки искомого белка к величине сигнала с фермента глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназы (G3FDG) (Chemicon, США).

Полученные данные обрабатывали методами вариационной статистики. Оценку нормальности распределения полученных результатов проводили с помощью критерия Колмогорова—Смирнова. Достоверность различий оценивали с помощью непараметрических критериев Манна—Уитни (для независимых выборок) и Вилкоксона (для зависимых выборок). Различия считали достоверными при уровне значимости  $P < 0.05$ . Данные представлены в виде медианы (Me), верхнего и нижнего квартилей ( $Q_1$ — $Q_3$ ).

### Результаты и обсуждение

Распространенным методологическим подходом к исследованию особенностей метаболизма клеток при окислительном стрессе является воздействие на клеточные культуры экзогенных АФК. В нашем исследовании в роли агента, индуцирующего нарушение окислительно-восстановительного баланса мононуклеарных лейкоцитов, полученных у здоровых доноров, была использована  $\text{H}_2\text{O}_2$  в конечной концентрации 1 мМ. Поскольку окислительный стресс является одним из типовых механизмов повреждения клеток при различных патологических процессах, представлялось интересным сравнить полученные в условиях *in vitro* результаты с таковыми при остром воспалении в клинике внутренних болезней (в частности, при внебольничной пневмонии и остром аппендиците).

Отмеченное возрастание уровня внутриклеточных АФК (до 0.61 (0.51—0.68) усл. ед. по сравнению с 0.23 (0.18—0.33) усл. ед. в контроле) в условиях окислительного стресса *in vitro* соответствовало таковому у пациентов с острым воспалением (см. таблицу). При этом отсутствие статистически значимых различий между содержанием АФК в мононуклеарных клетках крови у пациентов с внебольничной пневмонией и острым аппендицитом позволило объединить пациентов в одну клиническую группу.

При инкубации культуры мононуклеарных лейкоцитов, полученных у здоровых доноров, с 1 мМ  $\text{H}_2\text{O}_2$  и при культивировании клеток, выделенных у пациентов с острым воспалением, отмечалось увеличение числа апоптотически измененных клеток по сравнению с контрольными значениями (см. таблицу).

Запуск программированной клеточной гибели в культурах мононуклеаров, сопряженный с возрастанием уровня АФК в клетках, свидетельствует о вовлеченности редокс-чувствительных механизмов в данный процесс. Действительно, регуляция программы апоптоза изменяется при активации процессов свободнорадикального окисления и (или) недостаточности антиоксидантной системы, т. е. в условиях окислительного стресса (Скулачев, 2001; Лильин, Иваницкая, 2003; Klein, Ackerman, 2003; Logue et al., 2005). В основе данного явления лежит несколько ме-

**Уровень внутриклеточных активных форм кислорода  
и содержание апоптотических мононуклеарных лейкоцитов крови,  
полученных от здоровых доноров при окислительном стрессе *in vitro*  
и у больных с острыми воспалительными заболеваниями (Me(Q<sub>1</sub>—Q<sub>3</sub>))**

Условие	Показатель	
	уровень АФК в клетке, усл. ед.	количество аннексин-поло- жительных клеток, %
Интактная культура мононуклеаров здоро- вых доноров	0.23 (0.18—0.33)	1.34 (0.98—2.15)
Инкубирование с 1 мМ Н <sub>2</sub> О <sub>2</sub> <sup>а</sup>	0.61 (0.51—0.68) ( <i>P</i> < 0.001)	13.10 (12.16—15.13) ( <i>P</i> < 0.001)
Интактная культура клеток больных с ост- рым аппендицитом <sup>а</sup>	0.48 (0.46—0.51) ( <i>P</i> < 0.001)	10.46 (9.83—10.94) ( <i>P</i> < 0.001)
Интактная культура клеток пациентов с внебольничной пневмонией <sup>а</sup>	0.50 (0.49—0.56) ( <i>P</i> < 0.001)	10.98 (8.79—11.33) ( <i>P</i> < 0.001)

<sup>а</sup>*P* — достоверность различий по сравнению с аналогичными показателями в интактной культуре.

ханизмов: увеличение содержания высокотоксичных свободных радикалов в условиях нарушения процессов перекисного окисления липидов; явление экзайтотоксичности за счет экспрессии аскарбата и глутамата (Чалисова, 2002); повышение уровня внеклеточного Ca<sup>2+</sup>; фосфорилирование ключевых белков-регуляторов (Зенков и др., 2001; Лильин, Иванецкая, 2003). Показано, что повышение уровня АФК активирует сигналпередающие (в частности, JNK- и p38-киназные) пути, запуская каскады реакций фосфорилирования. При этом индукция апоптоза может быть обусловлена активацией некоторых факторов транскрипции (NF-κB, p53), проапоптотических протеинов Bad и Bax (Haddad, 2002) и (или) фосфорилированием и инактивацией антиапоптотических белков семейства Bcl-2 (Fan et al., 2000; Lei, Davis, 2003). Вместе с тем, по данным литературы, MAP-киназы JNK, p38 и транскрипционные факторы NF-κB и p53 в ряде случаев выступают в роли антиапоптогенных факторов (Craig et al., 2000; Andreka et al., 2001; Hreniuk et al., 2001).

Блок исследований, проведенных нами для выяснения роли JNK и p38 в регуляции программы апоптоза при окислительном стрессе, включал в себя два этапа. На первом использовался подход, основанный на избирательном блокировании функции киназ селективными ингибиторами (в случае JNK — SP600125, p38 — ML3403). Полученные данные свидетельствуют о том, что добавление ингибиторов JNK и p38 в культуру мононуклеарных лейкоцитов препятствовало увеличению числа аннексин-положительных клеток при окислительном стрессе *in vitro* (соответственно 0.91 (0.25—2.78) и 0.68 (0.33—2.12) % против 13.10 (12.17—15.13) %) и уменьшало значения аналогичных показателей у пациентов с острым воспалением (с 10.22 (9.56—11.32) до 3.25 (2.78—3.67) % и 3.70 (2.85—3.73) % соответственно) (рис. 1). Таким образом, в условиях дисбаланса окислительного метаболизма мононуклеарных лейкоцитов MAP-киназы JNK и p38 выступают в качестве проапоптогенных регуляторных молекул.

На следующем этапе исследования были изучены молекулярные механизмы данного явления. Для этого предстояло ответить на вопрос о сопряжении апоптогенной функции JNK и p38 с увеличением содержания в мононуклеарных лейкоцитах их активных (фосфорилированных) форм, которые могут оказывать воздействие на другие элементы сигнальной системы (факторы транскрип-

ции, белки-регуляторы апоптоза). Результаты проведенной методом вестерн-блотинга оценки содержания в моноцитах (лимфоцитах) общих и фосфорилированных форм JNK и p38 показали, что при окислительном стрессе, индуцированном добавлением 1 мМ Н<sub>2</sub>О<sub>2</sub> в культуру интактных клеток, общее содержание JNK (подклассы JNK1 и JNK2) не изменялось по сравнению с контролем (рис. 2); аналогичные результаты были получены и в случае острого воспаления. Содержание фосфорилированных форм JNK и p38 увеличивалось (по отношению к контролю) при инкубации мононуклеаров, полученных у здоровых доноров, с 1 мМ Н<sub>2</sub>О<sub>2</sub> и в мононуклеарных лейкоцитах крови у пациентов с острым воспалением (рис. 2). Полученные данные свидетельствуют о том, что при окислительном стрессе увеличение уровня фосфорилированных форм редокс-чувствительных киназ JNK и

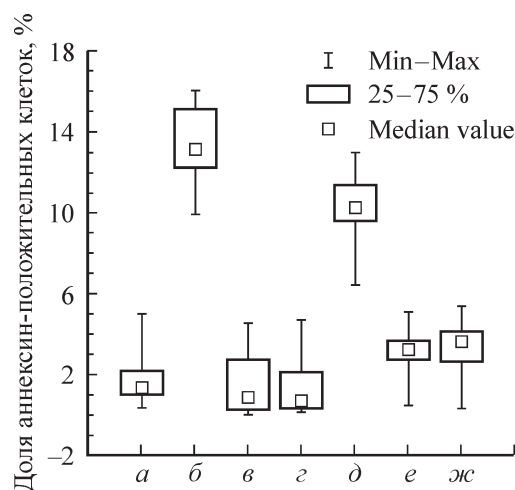


Рис. 1. Содержание апоптотически измененных мононуклеарных лейкоцитов крови в условиях культивирования *in vitro* с ингибиторами MAP-киназ.

а — контроль, б — окислительный стресс *in vitro*, в — культивирование мононуклеаров здоровых доноров с 1 мМ Н<sub>2</sub>О<sub>2</sub> и ML3403, г — культивирование мононуклеаров здоровых доноров с 1 мМ Н<sub>2</sub>О<sub>2</sub> и SP600125, д — культивирование мононуклеаров пациентов с острыми воспалительными заболеваниями, е — культивирование мононуклеаров пациентов с острыми воспалительными заболеваниями в присутствии ML3403, ж — культивирование мононуклеаров пациентов с острыми воспалительными заболеваниями в присутствии SP600125.

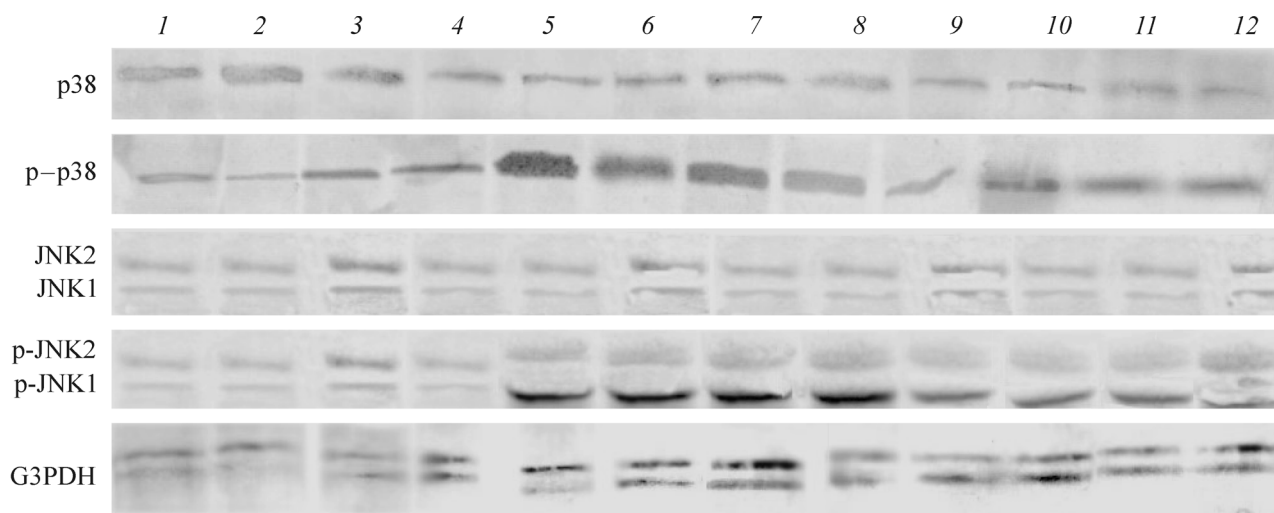


Рис. 2. Уровень активных и неактивных форм стрессактивируемых киназ, определенный методом иммуноблотинга, в культурах мононуклеарных лейкоцитов, полученных у здоровых доноров (1—4 — интактная культура, 5—8 — культура после воздействия 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) и у больных с внебольничной пневмонией (9—12).

p38 сопряжено с возрастанием внутриклеточной продукции АФК.

Важнейшими сигнальными молекулами, активирующимися МАР-киназами и непосредственно АФК, а также участвующими в реализации летальной программы клеток, являются транскрипционные факторы NF-κB и p53 (последний действует как эффекторный проапоптогенный белок). В связи с этим особый интерес для нас представляло определение их содержания и изучение влияния на регуляцию апоптоза мононуклеарных лейкоцитов при окислительном стрессе (в условиях эксперимента и в клинике острого воспаления). Оценка содержания транскрипционного фактора p53 в мононуклеарных клетках крови у здоровых доноров и больных с острым воспалением, проведенная методом вестерн-блотинга, показала отсутствие данного белка в указанных клетках. p53 появлялся лишь после воздействия на мононуклеарные лейкоциты, полученные у здоровых доноров, 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (рис. 3). По данным литературы, p53 имеет короткий период полужизни и в зависимости от типа клеток и природы стрессового сигнала инактивируется в течение 6—20 мин MDM2 убиквитин лигазой (Dornan et al., 2004). Отсутствие p53 в мононуклеарных лейкоцитах, выделенных из периферической крови у больных с острым воспалением (пневмония), несмотря на высокий уровень продукции АФК, может быть обусловлено образованием комплекса p53—MDM2 в результате продолжительного

по сравнению с экспериментальной моделью нарушения окислительного баланса в организме. Проапоптотическая функция p53 подтверждается полученными нами данными о высоком содержании аннексин-положительных клеток в исследованных культурах мононуклеарных лейкоцитов. Известно, что p53 контролирует экспрессию белков семейства Bcl-2, выполняющих апоптотическую функцию, транскрибирует ген, кодирующий Araf1, участвуя таким образом в реализации митохондриального пути запуска апоптоза (Joza et al., 2001; Моргункова, 2005).

Было установлено, что не связанный с ингибитором транскрипционный фактор NF-κB (p65-субъединица) в моноцитах (лимфоцитах) интактной культуры клеток крови у здоровых доноров отсутствует. Однако анализ содержания p65-субъединицы NF-κB в мононуклеарных лейкоцитах при остром воспалении и экспериментальном окислительном стрессе продемонстрировал появление указанного белка в клетках (рис. 3). Учитывая многообразие активационных стимулов в клинике острого воспаления, выявить, по какому варианту происходит накопление p65-субъединицы NF-κB, в данных условиях представляется затруднительным, поскольку это возможно через ENF- и липополисахаридопосредованные пути. Полученные результаты позволяют предположить доминирующую роль АФК в высвобождении данного транскрипционного фактора из комплекса с ингибитором при дисбалансе окислительного метаболизма.

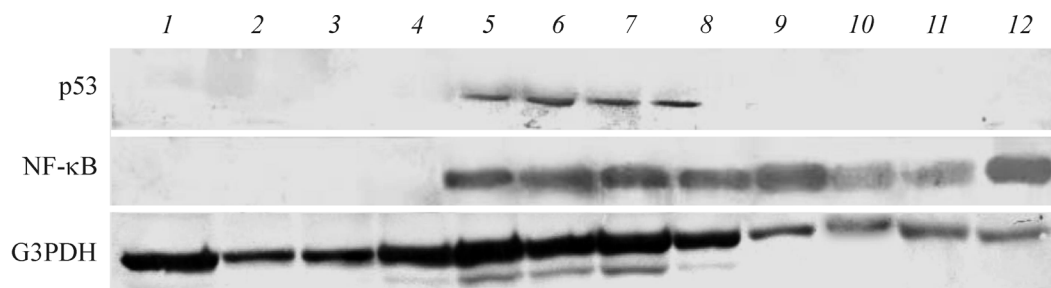


Рис. 3. Уровень транскрипционных факторов p53 и NF-κB, определенный методом иммуноблотинга, в культурах мононуклеарных лейкоцитов, полученных у здорового донора (1—4 — интактная культура, 5—8 — культура после воздействия 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) и у больного с внебольничной пневмонией (9—12).



Таким образом, в результате проведенного нами исследования уровня транскрипционных факторов (p53 и NF-κB) с использованием метода вестерн-блоттинга было продемонстрировано появление NF-κB в мононуклеарных лейкоцитах при окислительном стрессе в клинике острого воспаления и в эксперименте; p53 регистрировался только в условиях окислительного стресса *in vitro*. Однако, как свидетельствуют полученные данные, результирующим вектором активации p53 и NF-κB является запуск программы апоптоза, что свидетельствует о неэффективности антисуицидальной регуляции NF-κB в данном случае. По литературным данным, функция NF-κB из антиапоптотической может трансформироваться в проапоптотическую в зависимости от природы индуцирующего сигнала (Perkins, Gilmore, 2006). Полученные фактические данные позволили предположить, что окислительный стресс индуцирует активацию редокс-чувствительных элементов внутриклеточных MAP-киназ каскадов мононуклеарных лейкоцитов. Возникающая при этом дисрегуляция апоптоза является одним из компонентов патогенетических изменений при состояниях, сопровождающихся дисбалансом окислительного метаболизма.

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 и 02.445.11.7419) и при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 07-04-12150).

### Список литературы

- Влаопулос С., Зумтурлис В. С. 2004. JNK: ключевой модулятор внутриклеточной сигнальной системы. Биохимия. 69 (8) : 1038—1050.
- Дас Д. К., Молик Н. 2004. Превращение сигнала гибели в сигнал выживания при редокс-сигнализации. Биохимия. 69 (1) : 16—24.
- Зенков Н. К., Ланкин В. З., Меньшикова Е. Б. 2001. Окислительный стресс: биохимические и патофизиологический аспекты. М.: МАЙЛ Наука/Интерпериодика. 343 с.
- Лильин Е. Т., Иваницкая И. Н. 2003. Роль гипоксии как пускового механизма апоптоза при некоторых неврологических заболеваниях у детей. Вопросы современной педиатрии. 2 (5) : 74—79.
- Моргункова А. А. 2005. Семейство генов p53: контроль клеточной пролиферации и программа развития организма. Биохимия. 70 (9) : 1157—1176.
- Скулачев В. П. 2001. Явления запрограммированной смерти. Митохондрии, клетки и органы: роль активных форм кислорода. Соросовский образовательный журн. 7 (6) : 4—10.
- Чалисова Н. И. 2002. Регулирующая роль некоторых аминокислот при развитии апоптоза в органической культуре нервной и лимфоидной ткани. Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова. 5 : 627—633.
- Andreka P., Zang J., Dougherty C. 2001. Cytoprotection by Jun kinase during nitric oxide-induced cardiac myocyte apoptosis. Circ. Res. 88 : 305—312.
- Craig R., Larkin A., Mingo A. M., Thuerauf D. J., Andrews C., McDonough P. M. 2000. p38 MAPK and NF-κB collaborate to induce interleukin-6 gene expression and release. Evidence for a cytoprotective autocrine signaling pathway in a cardiac myocyte model system. J. Biol. Chem. 275 : 23 814—23 824.
- Dornan D., Wertz I., Shimizu H., Arnott D., Frantz G. D., Dowd P., O'Rourke K., Koeppen H., Dixi V. M. 2004. The ubiquitin ligase COP1 is a critical negative regulator of p53. Nature. 429 : 86—92.
- Fan M., Goodwin M., Vu T. et al. 2000. Vinblastine-induced phosphorylation of Bcl-2 and Bcl-X<sub>L</sub> is mediated by JNK and occurs in parallel with inactivation of the Raf-1/MEK/ERK cascade. J. Biol. Chem. 275 : 29 980—29 985.
- Gallo K. A., Johnson G. L. 2002. Mixed-lineage kinase control of JNK and p38 MAPK pathways. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 3 : 663—672.
- Haddad J. J. 2002. Oxygen-sensing mechanisms and the regulation of redox-responsive transcription factors in development and pathophysiology. Respir. Res. 3 : 26—35.
- Harada C., Nakamura K. 2006. Role of apoptosis signal-regulating kinase 1 stress-induced neural cell apoptosis *in vivo*. Amer. J. Pathol. 168 : 262—269.
- Hreniuk D., Garay M., Gaarde W., Monia B. P. 2001. Inhibition of C-Jun N-terminal kinase 1, but not c-Jun N-terminal kinase 2, suppresses apoptosis induced by ischemia/reoxygenation in rat cardiac myocytes. Mol. Pharmacol. 59 : 867—874.
- Joza N., Susin S. A., Daugas E. 2001. Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. Nature. 410 : 549—554.
- Kim S. J., Hwang S. G., Shin D. Y. 2002. p38 kinase regulates nitric oxide-induced apoptosis of articular chondrocytes by accumulating p53 via NF-κB-dependent transcription and stabilization by serine 15 phosphorylation. J. Biol. Chem. 277 : 33 501—33 508.
- Klein J. A., Ackerman S. L. 2003. Oxidative stress, cell cycle, and neurodegeneration. J. Clin. Invest. 111 : 785—793.
- Lei K., Davis R. J. 2003. JNK phosphorylation of Bim-related members of the Bcl-2 family induces Bax-dependent apoptosis. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 100 : 2432—2439.
- Logue S. E., Gustafsson A. B., Samali A., Gottlieb R. A. 2005. Ischemia/reperfusion injury at the intersection with cell death. J. Mol. Cell. Cardiol. 38 : 21—33.
- Mayr M., Hu Y., Hainaut H., Xu Q. 2002. Mechanical stress-induced DNA damage and rac-p38MAPK signal pathways mediate p53-dependent apoptosis in vascular smooth muscle cells. FASEB J. 16 : 1423—1428.
- Perkins N. D., Gilmore T. D. 2006. Good cop, bad cop: the different faces of NF-κB. Cell Death Differ. 13 : 759—772.
- Teraishi F., Wu S. 2005. Identification of a novel synthetic thiazolidine compound capable of inducing c-Jun NH2-terminal kinase-dependent apoptosis in human colon cancer cells. Cancer Res. 65 : 6380—6387.
- Wenger R. H. 2000. Mammalian oxygen sensing, signaling and gene regulation. J. Exp. Biol. 203 : 1253—1263.

Поступила 21 II 2008

THE ROLE OF REDOX-DEPENDENT SIGNAL SYSTEMS  
IN THE REGULATION OF APOPTOSIS UNDER OXIDATIVE STRESS CONDITION

N. V. Ryazanceva, V. V. Novitskiy, N. Yu. Chasovskiy,<sup>1</sup> E. V. Kaigorodova, E. G. Starikova,  
U. V. Starikov, T. T. Radzivil, I. V. Krat

Siberian State Medical University, Tomsk;

<sup>1</sup> e-mail: cnil@mail.ru

Programmed death of peripheral blood mononuclear cells from donors with acute inflammatory diseases (an acute appendicitis, a community-acquired pneumonia) was investigated under condition of oxidative stress *in vitro* and under effect of selective inhibitors of MAP-kinases JNK and p38. Levels of active and inactive forms of MAP-kinases, and factors of transcription were determined by immunoblotting (western blot analysis). The increase in the activity of apoptosis under condition of oxidative stress *in vivo* and during the acute inflammatory diseases is associated with the increase in the level of reactive oxygen species (ROS) in the cells. The action of inhibitors of MAP-kinases JNK (SP600125) and p38 (ML3403) *in vitro* under condition of oxidative stress prevents increase in the quantity of annexin-positive mononuclear leucocytes that testifies to involving JNK and p38 MAP-kinases in apoptosis deregulation oxidative mechanisms. The appearance of NF- $\kappa$ B in the mononuclear leucocytes under condition of oxidative stress during the acute inflammatory diseases and at the experiment was shown; p53 was registered only under condition of oxidative stress *in vitro*. The effect of p53 and NF- $\kappa$ B results in the increase in the quantity of apoptosis annexin-positive mononuclear leucocytes that testify to inoperativeness of antiapoptotic regulation NF- $\kappa$ B.

Key words: oxidative stress, acute inflammation, ROS, apoptosis, mitogen-activated protein kinases JNK, p38, p53, NF- $\kappa$ B.

---