

ВНУТРИКЛЕТОЧНЫЕ ГАЗОВЫЕ ПОСРЕДНИКИ ОКСИД АЗОТА, МОНООКСИД УГЛЕРОДА И СУЛЬФИД ВОДОРОДА УЧАСТВУЮТ В РЕГУЛЯЦИИ АПОПТОЗА

© Н. В. Рязанцева, Е. Г. Старикова, Л. А. Таширева, Е. А. Степовая, Ю. В. Стариков, И. А. Осихов, В. В. Новицкий

Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации (ГБОУ ВПО СибГМУ Минздравсоцразвития России), Томск; электронный адрес: to-elen@yandex.ru

На основании данных литературы и результатов собственных исследований проанализировано участие газов оксида азота, монооксида углерода и сульфида водорода в регуляции апоптоза клеток. Описаны различные механизмы, с помощью которых оксид азота модулирует апоптотическую реакцию, включающие в себя изменение активности факторов транскрипции и повышение проницаемости митохондриальной мембраны. Дана краткая характеристика процессов образования и внутриклеточной трансдукции сигнала с участием монооксида углерода. Проанализированы про- и антиапоптотические механизмы влияния сульфида водорода на судьбу клеток.

Ключевые слова: газовые мессенджеры, оксид азота, монооксид углерода, сульфид водорода, апоптоз.

Последние десятилетия ознаменованы открытием новой группы сигнальных молекул — газовых мессенджеров, включающих в себя в настоящее время оксид азота, монооксид углерода и сульфид водорода. Данные молекулы обладают высокой реакционной способностью и играют важную роль в регуляции различных физиологических и патологических реакций.

Существует ряд специфических свойств, характерных для газовых посредников (Wang, 2002). Во-первых, все известные на сегодняшний день газовые мессенджеры являются простыми молекулами. Во-вторых, эти вещества легко проникают через клеточные мембраны, а значит, их внутриклеточное действие не связано с распознаванием мембранных рецепторов. В-третьих, они образуются эндогенно с участием ферментов, что делает генерацию газов высокорегулируемым процессом. В-четвертых, внутриклеточное действие газовых посредников сопряжено с химической модификацией белков-мишеней.

В настоящее время известно, что внутриклеточные газы необходимы для функционирования практически всех органов и тканей. Важнейшими физиологическими функциями оксида азота (NO) являются поддержание сосудистого тонуса, участие в качестве нейротрансмиттера в неадренергической и холинергической синаптической передаче и в регуляции апоптоза иммунокомпетентных клеток (Ванин, 2000). Монооксид углерода (CO) вовлечен в регуляцию тонуса сосудов и ангиогенеза, передачу импульсов в мозге, а также в метаболизм ксенобиотиков в печеночной ткани. CO ингибирует провоспалительные сигнальные пути и способствует индукции противовоспалительных и антипролиферативных механизмов. Сульфид водорода

(H₂S) участвует в индукции потенциала действия в гиппокампе, развитии мозга и регуляции артериального давления (Wang, 2002). Моделирование различных патологических процессов показало, что H₂S обладает защитными свойствами при артериальной и легочной гипертензии, ишемии/реперфузии миокарда, эректильной дисфункции, колите и травмах мозга. При этом H₂S усугубляет повреждение тканей при септическом шоке, панкреатите и ишемии сердца (Lowicka, Beltowski, 2007).

Одним из уникальных свойств газовых посредников является молекулярный механизм, за счет которого данные вещества передают сигнал. Классические мессенджеры передают сигнал по принципу каскада. Так, гормоны и нейротрансмиттеры воздействуют на рецепторы, связанные с G-белками (GPCRs), вызывая изменения G-белка, который затем реагирует с ферментами, генерирующими циклические нуклеотиды или инозитол-1,4,5-трифосфат (IP₃). Циклические нуклеотиды воздействуют на различные протеинкиназы, IP₃ вызывает высвобождение ионов кальция, что приводит к изменению активности различных внутриклеточных белков. Газовые мессенджеры прямо модифицируют внутриклеточные протеины, изменяя таким образом клеточный метаболизм более быстрым способом, нежели рецепторопосредованный. При этом если в случае NO и CO один из главных физиологических эффектов — расслабление сосудистой стенки — обусловлен взаимодействием с гуанилатциклазой, то для H₂S аналогичный эффект достигается за счет изменения активности калиевых АТФ-чувствительных каналов. Показано, что NO влияет на жизнедеятельность клеток за счет связывания с железом гемсодержащих белков — гуанилат-

циклазы, ряда митохондриальных белков и транскрипционных факторов (Kajimura et al., 2010). Схожий механизм был продемонстрирован для CO, однако его способность взаимодействовать с гемом значительно меньше, чем у NO. Кроме того, NO нитрозилирует сульфгидрильные группы цистеина. Нитрозилируются метаболические ферменты, ионные каналы, рецепторы нейротрансмиттеров и структурные белки (Hess et al., 2005). Молекулярные механизмы действия H₂S опосредованы реакциями сульфгидрирования (по аналогии с нитрозилированием для NO) (Sen, Snyder, 2010).

Газы NO, CO и H₂S на протяжении долгого времени были известны только своими цитотоксическими свойствами. В высоких концентрациях они ингибируют терминальный акцептор электронов митохондриальной электронно-транспортной цепи, вызывая гибель клеток от энергетического коллапса (Kajimura et al., 2010). В миллимолярных и высоких микромолярных дозах газовые посредники действуют проапоптотически за счет нарушения функционирования митохондрий. Действуя в низких микромолярных концентрациях, эти газы могут оказывать как про- так и антиапоптотическое действие в зависимости от клеточного типа (Wang, 2003; Yang et al., 2004; Wu, Wang, 2005; Pacher et al., 2007). В последние годы интерес исследователей сосредоточен на изучении роли газовых мессенджеров, действующих в физиологических концентрациях, в регуляции программированной гибели клеток. В норме апоптоз необходим для поддержания тканевого гомеостаза за счет устранения избыточных и (или) функционально неполноценных клеток. Нарушение реализации программированной гибели клеток является важным патогенетическим фактором развития заболеваний (злокачественные новообразования, сердечно-сосудистые и нейродегенеративные заболевания, острые и хронические воспалительные процессы, сахарный диабет и др.). Это делает актуальными исследования, посвященные молекулярным механизмам ее дисрегуляции.

Регуляция апоптоза наряду с участием в функционировании сердечно-сосудистой и нервной систем является важной физиологической функцией NO. Показано, что NO регулирует апоптоз нейтрофилов, обладает проапоптотическим действием в отношении опухолевых клеток и ряда бактерий. В настоящее время в литературе в сравнительном ключе широко освещено участие газов в регуляции сосудистого тонуса и передаче нервного импульса (Wang, 2002; Lowicka, Beltowski, 2007; Mustafa et al., 2009b; Kajimura et al., 2010). Однако несмотря на большое количество экспериментальных данных, нет обзорных публикаций, характеризующих вовлечение газов по внутриклеточные механизмы гибели клеток. Сравнительный анализ существующих данных литературы позволяет выявить или предположить наличие специфических мишеней действия газовых мессенджеров в трансдукции апоптотического сигнала.

В настоящей работе систематизированы результаты исследований, посвященных изучению участия внутриклеточных газовых посредников в регуляции апоптоза клеток.

Роль NO в регуляции апоптоза

Влияние газовых мессенджеров на процессы реализации апоптоза наиболее полно изучено на примере оксида азота. Последний является липофильной молекулой, обладающей, несмотря на крайнюю простоту строения,

большим набором функций в организме (Львова и др., 2010). NO в организме животных и человека синтезируется из L-аргинина с помощью цитохром P-450-подобных гемопротеинов — NO-синтаз. Молекулы NO-синтаз содержат домены с оксигеназной и редуказной активностью и при синтезе NO присоединяют молекулярный кислород к конечному атому азота в гуанидиновой группе L-аргинина (Марков, 2000). По характеру индукции и действия NO-синтазы подразделяются на ряд типов, каждый из которых имеет свои особенности в механизмах действия, локализации и в биологической значимости для организма. Выделяют следующие изоформы: Ca²⁺-независимую индуцибельную NO-синтазу (iNOS, 2-й тип) и менее мощные конститутивные (ингредиентные) Ca²⁺- и кальмодулинзависимые NO-синтазы — нейрональную (nNOS, 1-й тип) и эндотелиальную или макрофагальную (eNOS, 3-й тип). Последние два типа (1-й и 3-й) NO-синтазы считаются конститутивными, поскольку экспрессируются постоянно и в условиях физиологической нормы, и при патологии. nNOS является цитозольным белком, а eNOS — мембранно-связанным белком (Терещенко и др., 2009). Экспрессия iNOS резко увеличивается под влиянием различных цитокинов (Ванин, 2000; Голиков, 2004).

Конечное влияние NO на жизнедеятельность клеток определяется его концентрацией. NO в низких концентрациях регулирует физиологические процессы в норме и может иметь как про- так и антиапоптотическое действие в различных клеточных системах. Регулирующее влияние NO на внутриклеточные процессы осуществляется путем активации растворимой гуанилатциклазы (ГЦ, КФ 4.6.1.2) с образованием циклического 3',5'-гуанозинмонофосфата (цГМФ), который является непосредственным медиатором при действии NO (Ballou et al., 2002). NO в наномолярных концентрациях активирует ГЦ за счет связывания с железом гема активного центра фермента. Подобным образом NO влияет на митохондриальные гемсодержащие белки. Биологические эффекты NO можно разделить на цГМФ-зависимые и цГМФ-независимые. Ингибирование апоптоза с участием NO ассоциировано с активацией ГЦ, индукцией антиапоптотических механизмов за счет гемоксинегазы и циклооксигеназ, ингибированием каспаз за счет S-нитрозилирования или через цГМФ-зависимые механизмы, ведущие к инаktivации каспаз, индукции белка теплового шока Hsp70, а также подавлению экспрессии гена *Bax* (Thomas et al., 2004; Pacher et al., 2007; Рязанцева и др., 2010).

Установлено, что NO изменяет ДНК-связывающую активность многих транскрипционных факторов за счет S-нитрозилирования тиоловых групп цистеина и последующего образования S-нитрозотиолов, что служит пусковым механизмом трансдукции сигнала (Осипов и др., 2007). С помощью S-нитрозилирования может регулироваться функция многих тиолсодержащих ферментов, включая транскрипционные факторы NF-κB AP-1 и СКЕВ (Thomas et al., 2008). Показано, что NFκB может прямо ингибироваться NO за счет S-нитрозилирования субъединицы p50. Данная модификация препятствует связыванию p50 со специфическим сайтом ДНК. NO также обладает способностью стабилизировать ингибитор NF-κB — IκBα, предотвращая его отщепление от самого фактора. NO увеличивает экспрессию IκBα, но не субъединиц NF-κB (p65 и p50), что позволяет предполагать наличие специфического механизма регуляции экспрессии IκBα под действием NO. NF-κB может стимулировать

экспрессию антиапоптотических генов bcl-XL, x-IAP, cI-AP1, cIAP2 и A20 (Новицкий и др., 2009).

Было показано, что NO сенсibiliзирует клетки рака яичника и аденомы простаты к TNF-индуцированному апоптозу за счет ингибирования NF-κB-зависимой экспрессии (Huerta-Yepez et al., 2004). Установлено участие NO в регуляции экспрессии Fas-рецептора при сенсibiliзации клеток рака яичников с помощью NO к Fas-индуцированному апоптозу (Wang et al., 1998). Также было показано, что NO индуцирует экспрессию Fas-антигена через цГМФ-независимые механизмы в гладких мышцах (Fukuo et al., 1996) и праймирует β-клетки поджелудочной железы к Fas-индуцированному апоптозу (Stassi et al., 1997). Идентификация специфического механизма, за счет которого NO может влиять на экспрессию Fas, продемонстрировала, что NO прямо действует на негативные регуляторные трансактивационные домены Fas-промотора. NO повышает экспрессию Fas-рецептора различных опухолевых клеток за счет инактивации ДНК-связывающей активности транскрипционного репрессора Yin-Yiag1 (YY1) к сайленсерному региону промотора гена *Fas* (Garban, Bonavida, 2001). YY1 представляет собой повсеместно присутствующий и мультифункциональный цинксодержащий транскрипционный фактор. YY1 взаимодействует со многими элементами, вовлеченными в регуляцию клеточного цикла (p53, MDM2, циклином D1 и др.), обычно способствует клеточной пролиферации. YY1 также вовлечен в активацию экспрессии апоптозассоциированных молекул (NF-κB, Fas, DR5 (TRAIL-рецептор) и др.). Кроме того, была продемонстрирована специфическая роль NO в регуляции экспрессии гена TRAIL-рецептора (DR5) за счет отмены репрессорной активности YY1 (Lee et al., 2007). Установлено, что механизм NO-опосредованного ингибирования связывания YY1 с ДНК опосредован S-нитрозированием критических цистеиновых остатков. Это приводит к ингибированию репрессорной активности YY1 и повышению экспрессии Fas-рецептора и CD95 с последующей сенсibiliзацией опухолевых клеток к Fas- и TRAIL-индуцированному апоптозу (Hongo et al., 2005).

Скрининговый анализ ДНК микрочипов показал, что NO регулирует экспрессию генов различных внутриклеточных сигнальных путей (Hemish et al., 2003). Среди генов, модулируемых NO, имеется значительная группа, ответственная за специфическую утилизацию p53. Это позволяет предполагать, что NO стабилизирует и активирует p53 и, таким образом, изменяет экспрессию генов, ответственных за апоптоз (пролиферацию). Также показано, что в высоких концентрациях NO вызывает фосфорилирование p53, что приводит к цитостатическому ответу или апоптозу (Hussain et al., 2003).

Зависимость направленности апоптотической реакции от концентрации NO прослеживается на примере функционирования митохондрий. Эти органеллы содержат большое количество гемсодержащих, а также железосодержащих белков, с которыми NO (или ONOO-) активно соединяется (Реутов, 2002). Ранее нами было показано, что NO в низких концентрациях оказывает стабилизирующее действие на митохондриальную мембрану (Степовая и др., 2008). Высокие концентрации приводят к разобщению окислительного фосфорилирования на уровне цитохромксидазы, увеличению количества супероксидного аниона и к синтезу пероксинитрита, образующегося при взаимодействии NO с супероксидом. Пероксинитрит ингибирует практически все компоненты

электронной транспортной цепи, включая комплекс I (NADH-дегидрогеназу), комплекс II (сукцинатдегидрогеназу), комплекс III (цитохром c-редуктазу) и комплекс V (АТФ-синтазу), путем окисления цистеина, нитрозилирования тирозина и повреждения Fe-S-центров белков (Racher et al., 2007). Показано, что пероксинитрит приводит к открытию пор внешней митохондриальной мембраны, состоящих из транслокатора адениловых нуклеотидов (ANT), циклофиллина D (CycD), и потенциалзависимого анионного канала (VDAC). Пероксинитрит вызывает окисление тиолов в ANT (Vieira et al., 2001).

Таким образом, NO оказывает модулирующее дозозависимое влияние на развитие апоптотической реакции. В нашей лаборатории были получены фактические доказательства дозозависимого влияния NO на апоптоз различных типов клеток. Нами продемонстрировано, что NO отменяет апоптоз нейтрофилов при окислительном стрессе *in vitro* и при воспалении (Степовая и др., 2008). Ингибирование апоптоза нейтрофилов имеет высокую физиологическую значимость при развитии воспалительной реакции, способствуя эффективной элиминации патогена. Сенсibiliзация опухолевых клеток к апоптозу при действии NO в низких концентрациях может быть использована в терапевтических целях. NO в высоких дозах оказывает цитотоксическое действие на все клетки организма млекопитающих, однако гибель клеток в этом случае происходит по пути не только апоптоза, но и некроза.

Роль CO в регуляции апоптоза

Молекула CO в настоящее время рассматривается уже не как вещество с исключительно токсическим действием или как один из продуктов распада гема, а как один из представителей межклеточной коммуникации (Коржов и др., 2010).

Продуцируется CO оксигеназой гема (гемоксигеназой). Известны три изоформы гемоксигеназ (HO-1, HO-2 и HO-3). Эти ферменты расщепляют протогем IX с образованием биливердина-IXα, двухвалентного железа и CO. Индуцибельный изофермент HO-1 (известен как белок теплового шока Hsp32) играет важную роль в адаптации клеток и тканей в ответ на действие стрессорных факторов различной природы. HO-1, экспрессируемая в эндотелиальных и гладкомышечных клетках сосудистой стенки, контролирует образование CO, необходимого для размножения клеток и роста капилляров. В низких концентрациях CO рассматривают как фактор цитопротекции и модулятор сосудистого тонуса при гипоксии. Конститутивная изоформа HO-2, имеющаяся во многих клетках, определяет скорость деградации гема в норме. Максимально она представлена в нейронах гиппокампа и имеет такое же распределение, как и растворимая гуанилатциклаза, что предполагает участие монооксида углерода в передаче информации в ЦНС (Zuckerbraun, 2008). HO-3 также является конститутивной изоформой гемоксигеназы. Роль HO-3 в деградации гема *in vivo* четко не определена, так как данный фермент обладает более высокой константой Михаэлиса к протогему IX, чем два других изоэнзима (Fang et al., 2003).

Молекулы CO и NO имеют несколько функциональных параллелей. HO-2, как и eNOS, локализована в эндотелиальном слое кровеносных сосудов. CO вызывает релаксацию кровеносных сосудов, однако эффект CO зна-

чительно слабее, чем NO и H₂S. В тонком кишечнике NO-2 и nNOS опосредуют нааднергическую и нонхолинергическую нейротрансмиссию (Battish et al., 2000). Как и NO, CO активирует растворимую гуанилатциклазу, что ведет к многократному увеличению продукции цГМФ, однако эта его способность в 30—100 раз ниже, чем у NO. Способность CO влиять на гуанилатциклазу имеет высокую физиологическую значимость. Полагают, что таким образом CO способствует усилению активации гуанилатциклазы, вызванной действием NO (Tsuburai et al., 2002).

CO и NO влияют на активность ядерных транскрипционных факторов за счет связывания с гемом в активных центрах данных молекул. В настоящее время идентифицирован транскрипционный фактор, являющийся специфической мишенью действия CO. Нейрональный транскрипционный фактор NPAS2 связывается с ДНК как димерный партнер гена *BMAL1* для регуляции циркадных ритмов. PAS-домен NPAS2 содержит гем как простетическую группу, ответственную за связывание с ДНК. CO в низких концентрациях ингибирует ДНК-связывающую активность holo-NPAS2, что приводит к формированию неактивного BMAL-гомодимера вместо активного NPAS-BMAL1-гетеродимера. Таким образом, связывание CO с гемом может влиять на транскрипционную активность, лежащую в основе циркадных ритмов (Dioum et al., 2002).

Антиапоптотический потенциал CO был впервые продемонстрирован в экспериментальных условиях при исследовании действия этого газа на эндотелиальные клетки и β-клетки поджелудочной железы. Так, добавление в клеточные культуры экзогенного CO препятствовало TNF-индуцированному апоптозу мышечных фибробластов и эндотелиальных клеток. Подобный антиапоптотический эффект наблюдался в условиях *in vitro* при гиперэкспрессии HO-1 (Inguaggiato et al., 2001). Показано, что в культуре эндотелиальных клеток ингибирующее влияние CO на TNF-индуцированный апоптоз может быть отменено воздействием на клетки вещества SB203580 — селективного химического ингибитора MAP-киназы p38 — или доминантной негативной мутацией p38. Нами было установлено, что p38 обладает проапоптотическим действием, реализующимся, в частности, за счет фосфорилирования транскрипционного фактора p53 (Рязанцева и др., 2009). Показано, что CO может активировать MAP-киназу p38 для ингибирования митохондриального пути апоптоза и способствовать фосфорилированию ERK MAP-киназ, увеличивающих рецепторный апоптотический путь (Song et al., 2004).

Антиапоптотический эффект CO, показанный на культуре фибробластов, опосредован также активацией гуанилатциклазы. Индукция cGMP-пути в дополнение к MAP-киназному обеспечивает антиапоптотический эффект CO в β-панкреатических клетках (Gunther et al., 2002). Показано, что HO-1 или CO защищает эндотелиальные клетки от TNF-опосредованного апоптоза за счет активации NF-κB-зависимых антиапоптотических генов (Zuckerbraun, Billiar, 2003). Еще одной мишенью CO-опосредованной регуляции апоптоза является транскрипционный фактор HIF1. Экспрессия HIF1 увеличивается под влиянием CO, что позволяет предполагать наличие положительной обратной связи в цепи CO—HIF1—HO-1—CO (Wegiel et al., 2008). В экспериментах на изолированных митохондриях было продемонстрировано, что CO препятствует деполаризации и перме-

аблизации митохондриальных мембран, предотвращая выход в цитозоль апоптоз-индуцирующих факторов (Queiroga et al., 2011).

Однако в экспериментах с использованием клеток линии Jurkat было показано, что CO ускоряет клеточную смерть, активированную Fas/FasL или TRAIL-лигандами (Song et al., 2004). На примере эндотелиальных клеток показано, что CO повышает продукцию NO за счет Akt-опосредованного фосфорилирования eNOS (Fujimoto et al., 2004). Возможно, апоптоз клеток Jurkat под действием CO также происходит с участием NO-зависимых механизмов и детерминирован бласттрансформированной природой указанных клеток.

Таким образом, CO проявляет антиапоптотическую активность в отношении целого ряда нормальных клеток организма при разных молекулярных механизмах индукции апоптоза. Этот факт позволяет предполагать наличие специфических мишеней (транскрипционные факторы NF-κB и HIF-1) его действия. CO может быть проапоптотическим фактором для опухолевых клеток. Проапоптотическое действие CO может быть опосредовано повышением внутриклеточной концентрации NO. Физиологическая значимость этого явления до конца не понята, а молекулярные пути трансдукции апоптотического сигнала с участием CO требуют детального исследования.

Роль H₂S в регуляции апоптоза

В последние годы были накоплены доказательства широкого спектра биологических функций H₂S. Основная из них — роль внутриклеточного газового мессенджера (наряду с NO и CO) (Lowicka, Beltowski, 2007).

Молекула H₂S образуется в значительных количествах в большинстве тканей. Высокий уровень ее продукции отмечается в головном мозге, сердечно-сосудистой системе, в печени и почках. Единственным субстратом для продукции эндогенного H₂S является L-цистеин. Один из путей катаболизма цистеина связан с конденсацией гомоцистеина и с продукцией H₂S. Катализаторами процесса являются 2 фермента, зависящих от пиридоксаль-5'-фосфат (витамина B6): цистатионин-β-синтаза (CBE) и цистатионин-γ-лиаза (CSE). Цистатионин-β-синтаза в основном действует в центральной нервной системе, а цистатионин-γ-лиаза — в клетках гладкой мускулатуры сосудистой стенки и в кардиомиоцитах. В печени и почках работают оба фермента (Резник, 2009). Как и NO, H₂S является мощным вазодилататором. Фермент цистатионин-γ-лиаза, так же как eNOS и HO-2, локализован в эндотелиальном слое кровеносных сосудов. Холинергическая релаксация кровеносных сосудов значительно снижена у животных, дефицитных по CSE. Нокатут CSE приводит к увеличению кровяного давления, сопоставимому с таковым при нокаутах eNOS (Mustafa et al., 2009b).

Активация АТФ-чувствительных калиевых каналов представляет собой основной механизм влияния сероводорода на сокращение гладкомышечных клеток. Благодаря ему происходит вазодилатация при ишемии (реперфузии) (Bhatia, 2005). Кроме того, H₂S ингибирует ангиотензинконвертирующий фермент, что приводит к расслаблению гладких мышц сосудов (Chunyu et al., 2003). H₂S может усиливать вазодилатацию, индуцированную действием NO (Ali et al., 2006). Однако H₂S в низких концентрациях может приводить к вазоконстрикции в

результате образования нитрозотиолов при взаимодействии с NO (Webb et al., 2008).

Было показано, что H₂S передает сигнал путем сульфгидрирования SH-групп цистеина белков-мишеней по аналогии с NO и нитрозилированием. При этом нитрозилирование приводит к ингибированию активности белков, а сульфгидрирование, напротив, индуцирует ферменты. Сульфгидрирование глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (ГАФДГ) по остатку Cys150, ответственного за ее каталитическую активность, активирует энзим на 700 %. Подобная регуляция имеет физиологическую значимость. Так, у мышей с нокаутом по CSE активность ГАФДГ в печени снижена на 30 % при неизменном уровне белка (Mustafa et al., 2009a). От 10 до 25 % эндогенного ГАФДГ, β-тубулина и актина сульфгидрировано на базальном уровне (Mustafa et al., 2009a). Возможно, сульфгидрирование опосредует большинство физиологических эффектов H₂S. Поскольку сульфгидрирование может подвергаться большая масса белков млекопитающих, что существенно изменяет их активность, эта реакция может представлять собой новый механизм посттрансляционной модификации белков (Mustafa et al., 2009b).

Одной из внутриклеточных мишеней H₂S является цитохром *c* (Wang, 2002). Токсический эффект действия H₂S связан с ингибированием митохондриального дыхания и представляет собой возможный механизм регуляции потребления кислорода клеткой. H₂S обладает антиоксидантными свойствами благодаря наличию SH-групп, способных к окислению. Показано, что защитные антиоксидантные свойства H₂S реализуются за счет утилизации пероксинитритов (Nuycke, Gaskins, 2004). Однако было установлено, что H₂S лишь частично имитирует свойства тиолсодержащих агентов (Lowiska, Beltowski, 2007).

В экспериментальных исследованиях выявлено, что H₂S может оказывать как про-, так и антиапоптотический эффект в зависимости от внутриклеточной концентрации и клеточного типа. H₂S индуцирует апоптоз гладкомышечных клеток аорты человека (Yang et al., 2004). С другой стороны, NaHS (донор H₂S) ингибирует апоптоз изолированных нейтрофилов человека и не оказывает никакого влияния на их бактерицидные свойства (Wang, 2003).

В культуре мышиных макрофагов RAW264.7 H₂S подавлял LPS-индуцированную экспрессию iNOS. Эффект опосредован H₂S-индуцированной активацией киназы ERK, повышенной экспрессией HO-1, продукцией CO и CO-опосредованным ингибированием провоспалительных факторов транскрипции, в частности NF-κB (Hagiwara et al., 2007).

Исследования показали, что обработка клеток поджелудочной железы H₂S способна активировать фосфорилирование MAP-киназ и в результате индуцировать апоптоз. Все 3 стрессактивируемые MAP-киназы активируются после воздействия на клетки донора H₂S (эффект блокируется соответствующими ингибиторами). Было показано, что H₂S индуцирует апоптоз в инсулин-секретирующих клетках через активацию MAP-киназы p38 (Cao et al., 2006). В гладкомышечных клетках стенки аорты человека ERK играла активную роль посредника в апоптозе. Эти данные также коррелируют с изменениями содержания проапоптотического протеина Bax (Yang et al., 2004).

Проведенное нами исследование молекулярных механизмов реализации H₂S-индуцированного апоптоза клеток линии Jurkat показало, что проапоптотическое дейст-

вие этого газа опосредовано активацией каспаз 3 и 9 (Рязанцева и др., 2011). Продемонстрировано, что программная гибель клеток поджелудочной железы сопряжена с активацией эффекторной каспазы-3 и происходит на фоне снижения содержания антиапоптотического белка Bcl-2 (Adhikari, Bhatia, 2007). В нашей лаборатории были получены результаты, свидетельствующие о ключевой роли баланса между про- и антиапоптотическим членами семейства Bcl-2 в регуляции апоптоза и в генезе различных патологических состояний (Часовских и др., 2009). Однако в случае воздействия H₂S на гладкомышечные клетки аорты человека индукция запрограммированной гибели происходит без изменения содержания Bax и Bcl-2 (Yang, 2004).

Таким образом, H₂S также обладает способностью изменять апоптотическую реакцию клеток. Имеющиеся в настоящее время в литературе данные не дают информации о наличии специфических мишеней действия H₂S в регуляции апоптотического процесса. Обращает на себя внимание индукция стрессактивируемых MAP-киназ при передаче сигнала с участием H₂S. Данный эффект может служить доказательством того, что действие H₂S в проапоптотических дозах не является физиологичным для клеток. Научный интерес представляют собой данные, свидетельствующие о базальной активации ферментов путем сульфгидрирования. Возможно, за счет этого механизма происходит модификация белков, участвующих в апоптотическом процессе (Mustafa et al., 2009b).

Заключение

Накопленные к настоящему времени фактические данные создают предпосылки для изучения роли и общих закономерностей в механизмах действия газовых мессенджеров в путях внутриклеточной передачи сигнала. Исследования трансдукции апоптотического сигнала с участием NO позволили выявить NO-чувствительные мишени регуляции запрограммированной гибели клеток. Влияние NO на процессы реализации апоптоза обусловлены взаимодействием с гемом транскрипционных факторов и нитрозилированием активных центров ферментов. В случае CO сигнал передается за счет его взаимодействия с гемом. Молекула H₂S опосредует свои физиологические функции за счет сульфгидрирования. В настоящее время не определены специфические молекулярные механизмы действия H₂S и CO при передаче апоптотического сигнала. Данные литературы пока позволяют предполагать наличие специфических мишеней в регуляции апоптоза для CO и отсутствие таковых для H₂S.

В изучении влияния газовых мессенджеров на передачу апоптотического сигнала обращает на себя внимание факт избирательного про- или антиапоптотического действия газов NO и CO на различные клетки, который может быть использован для селективного управления апоптозом при ряде патологических процессов и состояний.

Работа выполнена при финансовой поддержке Федеральной целевой программы «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007—2012 годы» (ГК № 16.512.11.2087) и программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России на 2009—2013 годы» (ГК № П1311 и ГК 14.740.11.0932).

Список литературы

- Ванин А. Ф. 2000. Оксид азота в биомедицинских исследованиях. Вестн. РАМН. 4 : 3—5.
- Голиков П. П. 2004. Оксид азота в клинике неотложных заболеваний. М.: ИД Медпрактика-М. 180 с.
- Коржов В. И., Видмаченко А. В., Коржов М. В. 2010. Моноксид углерода. Журн. АМН Украины. 16 (1) : 23—37.
- Львова О. А., Орлова А. Е., Гусев В. В. 2010. К вопросу о роли оксида азота в норме и при патологии нервной системы. Системная интеграция в здравоохранении. 4 : 20—35.
- Марков Х. М. 2000. Роль оксида азота в патогенезе болезней детского возраста. 4 : 43—47.
- Новицкий В. В., Рязанцева Н. В., Часовских Н. Ю., Старикова Е. Г., Кайгородова Е. В., Стариков Ю. В., Филиппенко М. Л., Боярских У. А. 2009. Участие факторов транскрипции p53 и NF-κB в редоксзависимых механизмах нарушения апоптоза мононуклеарных лейкоцитов. Вестн. РАМН. 4 : 3—7.
- Осипов А. Н., Борисенко Г. Г., Владимиров Ю. А. 2007. Биологическая роль нитрозильных комплексов гемопротеинов. Успехи биол. химии. 47 : 259—292.
- Резник Н. Л. 2009. Третий газ: сульфид водорода как нейротрансмиттер. Химия и жизнь. 10 : 24—29.
- Реутов В. П. 2002. Цикл оксида азота в организме млекопитающих и принцип цикличности. Биохимия. 67 (3) : 353—376.
- Рязанцева Н. В., Жаворонок Т. В., Степовая Е. А., Стариков Ю. В., Бычков В. А. 2010. Роль индукции и ингибирования синтеза оксида азота в регуляции апоптоза нейтрофилов крови в условиях окислительного дисбаланса. Биомед. химия. 9 (5) : 13—18.
- Рязанцева Н. В., Новицкий В. В., Кайгородова Е. В., Часовских Н. Ю., Старикова Е. Г. 2009. Митогенактивированные протеинкиназы JNK и P38 — редокс-зависимые молекулярные мишени нарушения апоптоза при окислительном стрессе. Успехи физиол. наук. 40 (2) : 3—11.
- Рязанцева Н. В., Новицкий В. В., Старикова Е. Г., Клепцова Л. А., Якушина В. Д., Кайгородова Е. В. 2011. Роль сульфида водорода в регуляции апоптоза клеток. Бюл. эксперим. биол. и мед. 151 (6) : 656—659.
- Степовая Е. А., Жаворонок Т. В., Стариков Ю. В., Бычков В. А., Часовских Н. Ю., Старикова Е. Г., Петина Г. В., Новицкий В. В., Рязанцева Н. В. 2008. Регуляторная роль оксида азота в апоптозе нейтрофилов. Бюл. эксперим. биол. мед. 146 (12) : 646—650.
- Терещенко С. Н., Затеициков Д. А., Жиров И. В. 2009. Полиморфизм генов ангиотензин-превращающего фермента, ангиотензина II, NO-синтетазы, эстрогеновых рецепторов и гендерные различия в их влиянии на развитие сердечно-сосудистой патологии. Кардиология. 4 : 22—26.
- Часовских Н. Ю., Рязанцева Н. В., Новицкий В. В., Филиппенко М. Л., Боярских У. А., Старикова Е. Г., Кайгородова Е. В., Стариков Ю. В., Соколович Е. Г. 2009. Белки семейства Bcl-2 участвуют в редокс-зависимой регуляции апоптоза мононуклеарных лейкоцитов крови при воспалении. Иммунология. 30 (2) : 98—101.
- Adhikari S., Bhatia M. 2007. H₂S induced pancreatic acinar cell apoptosis is mediated via Jnk and p38 MAP kinase. J. Cell. Biol. Med. 12 : 1374—1383.
- Ali M. Y., Ping C. Y., Mok Y. Y. 2006. Regulation of vascular nitric oxide *in vitro* and *in vivo*; a new role for endogenous hydrogen sulphide. Br. J. Pharmacol. 149 : 625—634.
- Ballou D. P., Zhao Y., Brandish P. E. 2002. Revisiting the kinetics of nitric oxide (NO) binding to soluble guanylate cyclase: the simple NO-binding model is incorrect. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 99 : 12 097—12 101.
- Battish R., Cao G. Y., Lynn R. B., Chakder S., Rattan S. 2000. Heme oxygenase-2 distribution in anorectum: colocalization with neuronal nitric oxide synthase. Amer. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. 278 : 148—G155.
- Bhatia M. 2005. Hydrogen sulfide as vasodilator. Life. 57 : 603—606.
- Cao Y., Adhikari S., Ang A. D., Moore P. K., Bhatia M. 2006. Mechanism of induction of pancreatic acinar cell apoptosis by hydrogen sulfide. Amer. J. Physiol. Cell. Physiol. 291 : 503—510.
- Chunyu Z., Junbao D., Dingfrang B., Hui Y., Xiuying T., Chaoushi T. 2003. The regulatory effect of hydrogen sulfide on hypoxic pulmonary hypertension in rats. Biochem. Biophys. Res. Commun. 302 : 810—816.
- Dioum E. M., Rutter J., Tuckerman J. R., Gonzalez G., Gilles-Gonzalez M. A., McKnight S. L. 2002. NPAS2: a gas-responsive transcription factor. Science. 298 : 2385—2387.
- Fang J., Sawa T., Akaike T. 2003. *In vivo* antitumor activity of pegylated zinc protoporphyrin: targeted inhibition of heme oxygenase in solid tumor. J. Cancer Res. 63 : 3567—3574.
- Fujimoto H., Ohno M., Ayabe S., Kobayashi H., Ishizaka N., Kimura H., Yoshida K., Nagai R. 2004. Carbon monoxide protects against cardiac ischemia — reperfusion injury *in vivo* via MAPK and Akt—eNOS pathways. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 24 : 1848—1853.
- Fukuo K., Hata S., Suhara T. 1996. Nitric oxide induces upregulation of Fas and apoptosis in vascular smooth muscle. Hypertension. 27 : 823—826.
- Garban H. J., Bonavida B. 2001. Nitric oxide inhibits the transcription repressor Yin-Yang 1 binding activity at the silencer region of the Fas promoter: a pivotal role for nitric oxide in the up-regulation of Fas gene expression in human tumor cells. J. Immunol. 167 : 75—81.
- Gunther L., Berberat P. O., Haga M., Brouard S., Smith R. N., Soares M. P., Bach F. H., Tobiasch E. 2002. Carbon monoxide protects pancreatic β-cells from apoptosis and improves islet function/survival after transplantation. Diabetes. 51 : 994—999.
- Hagiwara S., Iwasaka H., Matsumoto S., Noguchi T. 2007. Changes in cell culture temperature alter release of inflammatory mediators in murine macrophagic RAW264. 7 cells. Inflamm. Res. 56 : 297—303.
- Hemish J., Nakaya N., Mittal V. 2003. Nitric oxide activates diverse signaling pathways to regulate gene expression. J. Biol. Chem. 278 : 42 321—42 329.
- Hess D. T., Matsumoto A., Kim S. O., Marshall H. E., Stampler J. S. 2005. Protein S-nitrosylation: purview and parameters. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 6 : 150—166.
- Hongo F., Garban H., Huerta-Yepez S. 2005. Inhibition of the transcription factor Yin Yang 1 activity by S-nitrosation. Biochem. Biophys. Res. Commun. 336 : 692—701.
- Huerta-Yepez S., Vega M., Jazirehi A. 2004. Nitric oxide sensitizes prostate carcinoma cell lines to TRAIL-mediated apoptosis via inactivation of NF-κB and inhibition of Bcl-x1 expression. Oncogene. 23 : 4993—5003.
- Hussain S. P., Hofseth L. J., Harris C. C. 2003. Radical causes of cancer. Nat. Rev. Cancer. 3 : 276—285.
- Huycke M. M., Gaskins H. R. 2004. Commensal bacteria, redox stress, and colorectal cancer: mechanisms and models. Exp. Biol. Med. 229 : 586—597.
- Inguaggiato P., Gonzalez-Michaca L., Croatt A. J., Haggard J. J., Alam J., Nath K. A. 2001. Cellular overexpression of heme oxygenase-1 up-regulates p21 and confers resistance to apoptosis. Kidney Int. 60 : 2181—2191.
- Kajimura M., Fukuda R., Bateman R. M., Yamamoto T., Suetatsu M. 2010. Interactions of multiple gas-transducing systems: hallmarks and uncertainties of CO, NO and H₂S gas biology. Antioxidants & Redox Signaling. 13 : 157—193.
- Lee J. Y., Huerta-Yepez S., Vega M. 2007. The NO TRAIL to YESTRAIL in cancer therapy (review). Int. J. Oncol. 31 : 685—691.
- Lowicka E., Beltowski J. 2007. Hydrogen sulfide (H₂S) — the third gas of interest for pharmacologists. Pharmacol. Rep. 59 : 4—24.
- Mustafa A. K., Gadalla M. M., Sen N., Kim S., Mu W., Gazi S. K., Barrow R. K., Yang G., Wang R., Snyder S. H. 2009a. H₂S signals through protein S-sulfhydration. Sci. Signal. 2 : 72—87.
- Mustafa A. K., Gadalla M. M., Snyder S. H. 2009b. Signaling by gasotransmitters. Sci. Signal. 2 : 1—17.

- Pacher P., Beckman J. S., Liaudet L. 2007.* Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol. Rev.* 87 : 315—424.
- Queiroga C. S., Almeida A. S., Alves P. M., Brenner C., Vieira H. L. 2011.* Carbon monoxide prevents hepatic mitochondrial membrane permeabilization. *BMC Cell Biol.* 12 : 1—8.
- Sen N., Snyder S. H. 2010.* Protein modification involved in neurotransmitter and gasotransmitter signaling. *Trends Neurosci.* 33 : 493—502.
- Song R., Zhou Z., Kim P. K., Shapiro R. A., Liu F., Ferran C., Choi A. M., Otterbein L. E. 2004.* Carbon monoxide promotes Fas/CD95-induced apoptosis in Jurkat cells. *J. Biol. Chem.* 279 : 44 327—44 334.
- Stassi G., De Maria R., Trucco G. 1997.* Nitric oxide primes pancreatic beta cells for Fas-mediated destruction in insulin-dependent diabetes mellitus. *J. Exp. Med.* 186 : 1193—1200.
- Thomas D. D., Espey M. G., Ridnour L. A. 2004.* Hypoxic inducible factor 1 alpha, extracellular signal-regulated kinase, and p53 are regulated by distinct threshold concentrations of nitric oxide. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 101 : 8894—8899.
- Thomas D. D., Ridnour L. A., Isenberg J. S. 2008.* The chemical biology of nitric oxide. Implications in cellular signaling. *Free Radic. Biol. Med.* 45 : 18—31.
- Tsuburai T., Suzuki M., Nagashima Y., Suzukis S., Inoue S., Hashiba T., Ueda A., Ikehara K., Matsuse T., Ishigatsubo Y. 2002.* Adenovirus-mediated transfer and overexpression of heme oxygenase 1 cDNA in lung prevents bleomycin-induced pulmonary fibrosis via a Fas-Fas ligand-independent pathway. *Hum. Gene Ther.* 13 : 1945—1960.
- Vieira H. L., Belzac A. S., Haouzi D. 2001.* The adenine nucleotide translocator: a target of nitric oxide, peroxynitrite, 4-hydroxynonenal. *Oncogene.* 20 : 4305—4316.
- Wang C. Y., Mayo M. W., Korneluk R. G. 1998.* NF-kappaB antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation. *Science.* 281 : 1680—1683.
- Wang R. 2002.* Two's company, three's a crowd: can H₂S be the third endogenous gaseous transmitter? *FASEB J.* 16 : 1792—1798.
- Wang R. 2003.* The gasotransmitter role of hydrogen sulfide. *Antioxid. Redox Signal.* 5 : 493—501.
- Webb G. D., Lim L. H., Oh V. M., Yeo S. B., Cheong Y. P., Ali M. Y., El Oakley R., Lee C. N., Wong P. S., Caleb M. G., Salto-Tellez M., Bhatia M., Chan E. S., Taylor E. A., Moore P. K. 2008.* Contractile and vasorelaxant effects of hydrogen sulfide and its biosynthesis in the human internal mammary artery. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 324 (2) : 876—882.
- Wegiel B., Chin B. Y., Otterbein L. E. 2008.* Inhale to survive, cycle or die? *Cell Cycle.* 7 : 1379—1384.
- Wu L., Wang R. 2005.* Carbon monoxide — endogenous production, physiological functions, and pharmacological applications. *Pharmacol. Rev.* 57 : 585—630.
- Yang G., Sun X., Wang R. 2004.* Hydrogen sulfide-induced apoptosis of human aorta smooth muscle cells via the activation of MAP kinases and caspase-3. *FASEB J.* 18 : 1782—1784.
- Zuckerbraun B. S. 2008.* Therapeutic delivery of carbon monoxide: WO2008/003953. *Expert Opinion on Therapeutic Patents.* 2 : 1321—1325.
- Zuckerbraun B. S., Billiar T. R. 2003.* Carbon monoxide protects against liver failure through nitric oxide-induced heme oxygenase 1. *J. Exp. Med.* 198 : 1707—1716.

Поступила 28 V 2011

INTRACELLULAR GASEOUS MESSENGERS, NITRIC OXIDE, CARBON MONOXIDE AND HYDROGEN SULFIDE PARTICIPATE IN APOPTOSIS REGULATION

*N. V. Ryazantseva, E. G. Starikova, L. A. Tashireva, Ye. A. Stepovaya,
Yu. V. Starikov, I. A. Osihov, V. V. Novitsky*

State Budget Educational Institution of High Professional Education «Siberian State Medical University» of Ministry of Health and Social Development of the Russian Federation, Tomsk;
e-mail: to-elen@yandex.ru

In this paper, participation of gases, nitric oxide, carbon monoxide and hydrogen sulfide, in cell apoptosis regulation has been analyzed according to the literature data and our own findings. Different mechanisms of nitric oxide influence on apoptotic reaction including modulation of transcription factors activity and increase in mitochondrion membrane permeabilisation are described. Brief description of the generation and signal transduction pathways of carbon monoxide is presented. Pro- and antiapoptotic mechanisms of hydrogen sulfide influence on cell fate are analyzed.

Key words: gaseous mediators, nitric oxide, carbon monoxide, hydrogen sulfide, apoptosis.