

УДК 577.152.6/385.5

ОКСИД АЗОТА – АКТИВАТОР MAP-КИНАЗНОГО КАСКАДА В НЕЙРОНАХ

Сумбаев В. В.

В последнее время было установлено, что MAP (mitogen activated protein) – киназный каскад является причиной индукции апоптоза нейронов [1]. Данный киназный каскад активируется протеинкиназой ASK 1 (apoptosis signal-regulating kinase 1), в норме связанной водородными связями с реактивными SH-группами тиоредоксина, что вызывает ингибирование ASK 1 [2]. Диссоциация ASK 1 от тиоредоксина приводит к активации фермента, индуцирующего MAP-киназный каскад и, соответственно, апоптоз клеток [2]. Показано, что супероксидные радикалы взаимодействуют с реактивными SH-группами тиоредоксина с образованием сульфеновых, а затем сульфиновых анионов, что вызывает диссоциацию ASK 1 от тиоредоксина и приводит к активации фермента [3]. Установлено, что глутатион и аскорбиновая кислота ингибируют образование сульфенатов тиоредоксина, а также разрушают их (но не способны разрушать сульфинаты), что тормозит активацию ASK 1 и апоптоз клеток [3]. Выдвигались гипотезы о том, что оксид азота также может являться активатором ASK 1 в нейронах и других клетках. Однако данные гипотезы не были подтверждены экспериментально до настоящего времени.

Целью настоящей работы явилось изучение влияния оксида азота на активацию ASK 1 в коре головного мозга крыс в отсутствие и в присутствии антиоксидантов – аскорбиновой кислоты и глутатиона.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

На первом этапе изучали влияние оксида азота на гомогенный тиоредоксин в реакционной системе, содержащей 2 мг тиоредоксина (растворяли в 4,5 мл 0,1 М трис-НСl-буфера, pH 7,4) и 0,5 мл 10 мкМ нитропруссид натрия (донор NO [4]) в 10 мМ NaOH [4]. Реакционные системы инкубировали 30 мин при 37°C, после чего определяли концентрацию S-нитрозотиолов описанным ранее методом [5]. Готовили также описанные выше реакционные системы, в которые вместе с 0,1 М трис-НСl-буфером вносили 1,0 мМ (конечная концентрация) аскорбиновой кислоты или глутатиона, инкубировали 30 мин при 37°C и определяли концентрацию S-нитрозотиолов. В контрольные реакционные системы данные агенты добавляли после 30-минутной инкубации, инкубировали 15 мин при 37°C и определяли концентрацию S-нитрозотиолов.

На втором этапе исследовали влияние оксида азота на активность ASK 1 в гомогенатах коры головного мозга крыс. Кору головного мозга декапитированных

животных гомогенизировали в четырехкратном объеме бидистиллированной воды, центрифугировали в течение 15 мин при 20000 g, осадок отбрасывали, а супернатант использовали для исследований. К супернатанту прибавляли 0,1 объема 10 мкМ нитропруссид натрия (донор NO [4]) в 10 мМ NaOH [4]. Готовили также реакционные системы, содержавшие 0,1; 0,5 и 1,0 мМ аскорбиновой кислоты или глутатиона. Все пробы инкубировали при 37°C и через 5, 10, 20, 30 и 60 мин определяли активность ASK 1 и концентрацию S-нитрозотиолов. Кроме того, в отдельные реакционные системы, не содержавшие антиоксидантов, вносили аскорбиновую кислоту и глутатион (конечная концентрация 1,0 мМ) через 30 мин инкубации, инкубировали 15 мин при 37°C, после чего определяли активность ASK1 и концентрацию S-нитрозотиолов.

Активность ASK1 определяли описанным нами ранее методом, основанном на регистрации количества фосфатных групп АТФ, присоединенных к экзогенному субстрату (в качестве субстрата использовали MBP – myelin basic protein [2], иммобилизованный на агарозе через спейсер аспарат [6]) в течение 1 мин на 1 мг белка [6].

Статистическую обработку результатов исследований проводили в соответствии с t-критерием Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Показано, что в течение 30 мин инкубации тиоредоксина с донором NO концентрация S-нитрозотиолов в реакционной системе резко возрастала (рис. 1). В реакционных системах, которые инкубировали вместе с аскорбатом и глутатионом, количество S-нитрозотиолов было незначительным (рис. 1), что является доказательством ингибирования образования S-нитрозотиолов при участии антиоксидантов. Внесение в реакционную систему антиоксидантов через 30 мин инкубации приводило к снижению концентрации S-нитрозотиолов через 15 мин (рис. 1), что свидетельствует о разрушении S-нитрозотиолов антиоксидантами.

В гомогенатах коры головного мозга, инкубированных с нитропруссидом натрия, активность ASK 1 резко возрастала в течение 60 мин (рис. 2). Этому соответствовало увеличение концентрации S-нитрозотиолов в реакционных системах в течение инкубации (рис. 3). Присутствие в реакционной системе аскорбиновой кислоты и глутатиона приводило к тому, что ASK 1 активировалась незначительно, обратно пропорционально концентрации антиоксидантов в реакционных системах (рис. 4). В случае, когда концентрация аскорбата в реакционной системе составляла 1,0 мМ наблюдалось незначительное ингибирование ASK 1 (рис. 4). Этим результатам соответствовало незначительное увеличение концентрации S-нитрозотиолов в реакционных системах, содержавших антиоксиданты, причем оно было обратно пропорционально концентрации антиоксидантов в реакционной среде (рис. 5).

Внесение аскорбиновой кислоты и глутатиона (по 1,0 мМ) в реакционные системы после 30 мин инкубации приводило к снижению активности ASK 1 и концентрации S-нитрозотиолов в реакционных системах через 15 мин (рис. 6 и 7).

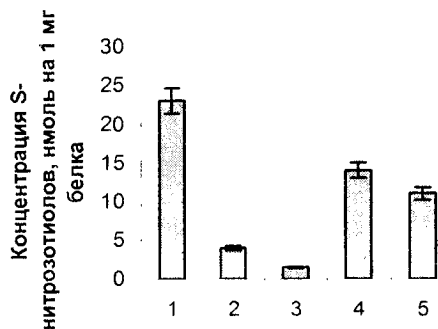


Рис. 1. Концентрация S-нитрозотиолов, в составе тиоредоксина: в отсутствии антиоксидантов (1), в присутствии глутатиона (2), в присутствии аскорбата (3), в присутствии глутатиона (добавлен через 30 мин, 4), в присутствии аскорбата (добавлен через 30 мин, 5)

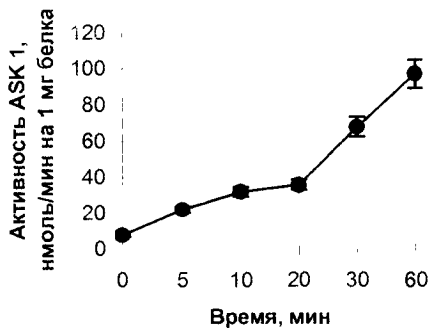


Рис. 2. Активность ASK 1 в течение 60-минутной инкубации гомогената с нитропруссидом натрия

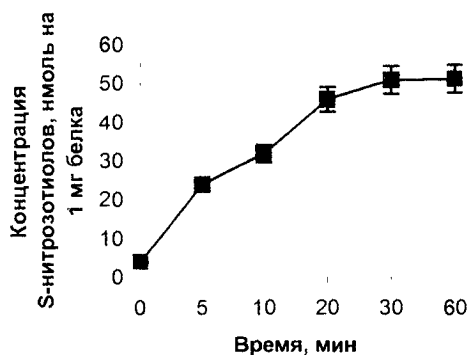


Рис. 3. Концентрация S-нитрозотиолов в течение 60-минутной инкубации гомогената с нитропруссидом натрия

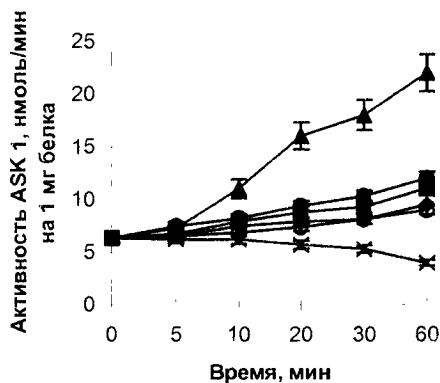


Рис. 4. Активность ASK 1 в течение 60-минутной инкубации гомогената с нитропруссидом натрия в присутствии аскорбиновой кислоты: 0,1 мМ (■), 0,5 мМ (◆) и 1,0 мМ (×) и глутатиона: 0,1 мМ (○), 0,5 мМ (●) и 1,0 мМ (∇)

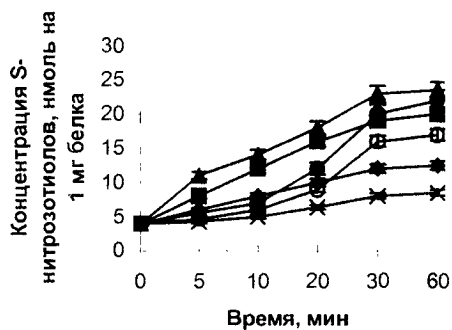


Рис. 5. Концентрация S-нитрозотиолов в течение 60-минутной инкубации гомогената с нитропруссидом натрия в присутствии аскорбиновой кислоты: 0,1 mM (■), 0,5 mM (◆) и 1,0 mM (×) и глутатиона: 0,1 mM (○), 0,5 mM (●) и 1,0 mM (◇)

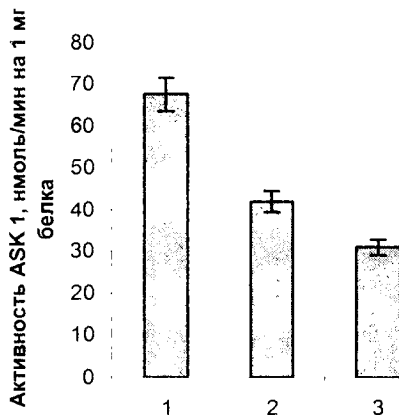


Рис. 6. Активность ASK 1 после 30-минутной инкубации гомогената с нитропруссидом натрия (1), через 15 мин после добавления глутатиона(2) и аскорбата (3).

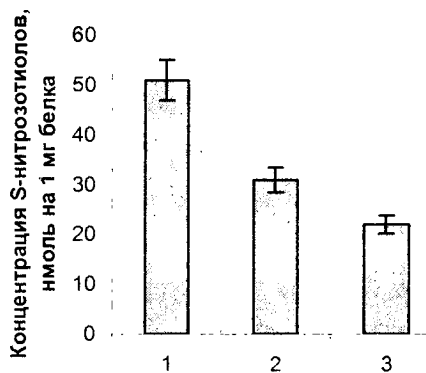


Рис. 7. Концентрация S-нитрозотиолов после 30-минутной инкубации гомогената с нитропруссидом натрия (1), через 15 мин после добавления глутатиона(2) и аскорбата (3).

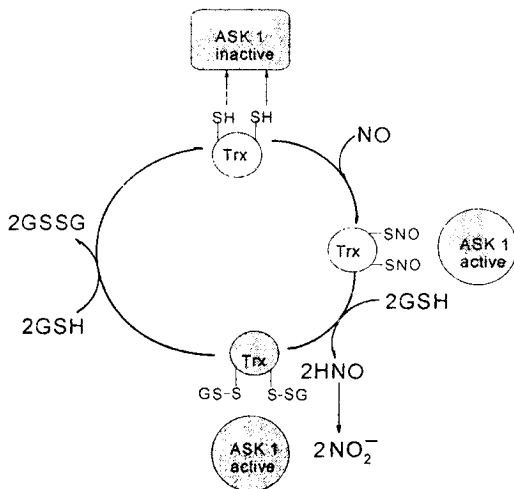


Рис. 8 NO-зависимая активация ASK 1 и ее ингибирование глутатионом (Trx – тиоредоксин)

Полученные результаты свидетельствуют о том, что оксид азота активирует ASK 1 (а соответственно и MAP-киназный каскад) в гомогенатах коры головного мозга крыс путем образования S-нитрозотиолов с SH-группами ее непосредственного ингибитора – тиоредоксина. Аскорбиновая кислота и глутатион ингибируют NO – зависимую активацию ASK 1 путем торможения образования S-нитрозотиолов, а также их разрушения. Аскорбиновая кислота проявляет более мощный ингибирующий эффект, чем глутатион, что, скорее всего, обусловлено ее более мощной восстановительной способностью по сравнению с глутатионом. Схематически путь NO-зависимой активации ASK 1 и ее ингибирования антиоксидантами (на примере глутатиона) показан на рис. 8.

Список литературы

1. Takashi K., Mota M., Takeda K., et al. Role of apoptosis signal-regulating kinase in regulation of the c-Jun N-terminal kinase pathway and apoptosis in sympathetic neurons // *Molecular and Cellular Biology*. – 2000. – 20. – P. 196-204.
2. Saitoh M., Nishitoh H., Fujii M., et al. Mammalian thioredoxin is a direct inhibitor of apoptosis signal-regulating kinase (ASK) 1 // *EMBO J.* – 1998. – 17. -- P. 2596-2606.
3. Finkel T. Redox-dependent signal transduction // *FEBS Lett.* – 2000. – 476. – P. 52-54.
4. Keefer L. K., Nims R. W., Davies K. M., Wink D. A. «NONOates» (1-substituted diazen-1-ium-1,2-diolates) as nitric oxide donors: convenient nitric oxide dosage forms // *Methods Enzymol.* – 1996. – 268. – P. 281-293.
5. Cook J. A., Kim S. Y., Teague D., et al. Convenient colorimetric and fluorometric assays for S-nitrosothiols // *Anal. Biochem.* – 1996. – 238. – P. 150-158.
6. Sumbayev V. V., Yasinska I. M. Nitric oxide activates apoptosis-signal regulating kinase 1 forming S-nitrosothiols with reactive thioredoxin SH-groups // *LAMSO Biochem.* – 2000. – 1. – P. 95-100.