

УДК 577.152:612 + 577.354.26:612

© Коллектив авторов

TNF-ИНДУЦИРУЕМЫЙ АПОПТОЗ И НЕКРОЗ В КЛЕТКАХ МИЕЛОЛЕЙКОЗА HL-60 РЕГУЛИРУЕТСЯ РЕАКТИВНЫМИ МЕТАБОЛИТАМИ КИСЛОРОДА В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ФАЗЫ КЛЕТОЧНОГО ЦИКЛА.

Е.А. Мартынова¹, Е.В. Поддубская², Е.Р. Полосухина², С.В. Климова³

¹ГУ НИИ питания РАМН, лаборатория обмена веществ и энергии,
109240 Москва, Устьинский проезд, 2/14,
эл.адрес: eamartinova@lycos.com; факс: 7(095)298-1850, 298-1872.

²РОНЦ им. Н.Н.Блохина РАМН, 115478 Москва,

³ГНЦ Ин-т Иммунологии МЗМП РФ, 115478 Москва

Фактор некроза опухолей (TNF- α) является лигандом рецепторов гибели клеток и инициирует апоптоз и некроз, в реализации которых принимают участие каспазы, реактивные метаболиты кислорода и церамид, как синтезированный *de novo*, так и образованный в результате распада сфингомиелина плазматической мембраны. Взаимоотношение вторичных мессенджеров этих сигнальных путей TNF остается неясным. Мы показали, что каспаза-3 активируется при апоптозе и некрозе на ранних стадиях их развития. Индукция апоптоза или некроза под действием TNF определяется фазой клеточного цикла. Разобщитель митохондриальной дыхательной цепи динитрофенол (DNP), отменяет некротические эффекты TNF. Предварительная обработка клеток экзогенной бактериальной сфингомиелиназой потенцировала развитие TNF-зависимого апоптоза, но не некроза, что указывает на участие церамида, образованного в результате распада сфингомиелина, в качестве вторичного мессенджера только апоптозного сигнального пути. Добавление DNP после инициирования сфингомиелинового цикла и запуска сигнальных путей TNF приводило к развитию некроза. Роль церамида, синтезированного *de novo*, показана с помощью ингибитора церамидсинтазы фумонизина B1, причем его эффект регулировался ингибиторами дыхательной цепи митохондрий. Моноклональные антитела к рецепторам TNF-R1 обуславливали развитие некроза более выраженного, чем при добавлении самого TNF. Впервые показана индукция некроза в клетках HL-60 под действием антител к рецепторам TNF-R2, регулируемая DNP. Таким образом, для развития TNF-индуцированного апоптоза и некроза необходима активация каспазы-3, образование реактивных метаболитов кислорода, а также церамида, как синтезированного *de novo*, так и образованного в результате распада сфингомиелина. Преимущественное проявление того или иного типа гибели клетки зависит, в частности, от фазы клеточного цикла. Незавершенная программа апоптоза с выходом клетки в некроз является характерной чертой действия TNF вследствие потери энергии клетки, что может быть охарактеризовано как апонекроз.

Ключевые слова: апоптоз, некроз, TNF, церамид, фумонизин B1, сфингомиелиназа.

Принятые сокращения: СССР - карбоанилицианид-3-хлорфенилгидразон; CD - кластеры дифференцировки клеток; CD95/Fas/Apo-1 - рецептор сигнального пути апоптоза; DNP - динитрофенол; FB1 - фумонизин B1; IL-1 β - интерлейкин-1 β ; mAb - моноклональные антитела; MAPK - митоген-активированные протеинкиназы; NF- κ B - фактор транскрипции; PKC - протеинкиназа C; PLC - фосфолипаза C; R - рецептор; SMase - сфингомиелиназа; TNF- α - фактор некроза опухолей альфа; TNF-R1, TNF-R2 - рецепторы фактора некроза опухолей.

TNF-ИНДУЦИРУЕМЫЙ АПОПТОЗ И НЕКРОЗ В КЛЕТКАХ МИЕЛОЛЕЙКОЗА

ВВЕДЕНИЕ. Фактор некроза опухолей (TNF- α) является многофункциональным регуляторным цитокином. В реализации его эффектов участвуют четыре рецептора. Связывание лигандов с TNF- α R1-рецептором (p55) сопряжено с несколькими сигнальными путями, которые могут активироваться одновременно. Вторичными мессенджерами являются церамид, NO, реактивные метаболиты кислорода (ROS), факторы транскрипции [1]. Действие TNF- α сопряжено с активацией протеолитического каскада каспаз [2]. На клетках WEHL-164 показано, что TNF- α -зависимый апоптозный сигнал, который активирует каспазу-8 и далее каспазу-7, может быть прерван универсальным ингибитором каспаз z-VAD-fmk [3]. Нокаут рецепторов R1 (p55) и R2 (p75) TNF- α обуславливает повышение экспрессии каспаз -1, -2, -7, -11, -14 [4].

Морфологические изменения в клетках после воздействия TNF- α относятся, по меньшей мере, к трем различным типам гибели клеток - апоптозу, некрозу и апонекрозу [5]. Для некоторых типов клеток показано, что развитие апоптоза или некроза определяется фазой клеточного цикла. TNF- α -зависимый некроз в опухолевых клетках обнаружен в G0/G1 фазовом переходе, тогда как апоптоз - в G1/S фазовом переходе [3]. Активность каспаз показана в обоих случаях, но ингибиторы каспаз не прерывают развития некроза.

В настоящее время существуют разноречивые данные, касающиеся кинетики передачи сигналов от рецепторов TNF- α . Некоторые авторы показывают доминантную регуляцию апоптозного каскада церамидом, синтезированным *de novo*, что ингибируется действием фумонизина B1 - специфического ингибитора церамид-синтазы [6]. Наиболее ранний сигнал определяется фосфорилированием белка FAN, связывающего участок цитоплазматического домена p55 рецептора TNF- α и нейтральной сфингомиелиназы (nSMase) [7]. Это инициирует сфингомиелиновый цикл, в результате чего гидролизуется сфингомиелин и образуется церамид [8].

Другие авторы показали, что апоптоз, индуцированный TNF- α , сопровождается сначала активацией каспазы-3, которая является связующим звеном между рецептор-зависимыми протеолитическими каскадами и сфингомиелиновым циклом [9]. Каспаза-3 активирует интерлейкин-1 β (IL-1 β), который, в свою очередь, активирует nSMase плазматической мембраны [10]. Этот путь образования церамида блокируется при инициации сигнальных путей ростовых факторов. В клетках HL-60 сигнальный путь каспазы-3 включает в себя перекись водорода в качестве вторичного мессенджера [11].

Активация кислой SMase происходит в течение нескольких минут после связывания рецепторов TNF- α . Это сопровождается накоплением церамида в кислых компартаментах клетки, активацией ферментов синтеза комплексных сфинголипидов и образованием ганглиозида GD3. GD3 перераспределяется в мембрано-ассоциированных доменах, где он связан с белком цитоскелета эзрином и регулирует, таким образом, сигнальные пути интегринов. GD3 обладает про-апоптозным эффектом, непосредственно индуцируя изменение митохондриальной проницаемости [12].

Окислительный стресс в клетках LLC-PK1 обуславливает быстрое (в течение пяти минут) повышение активности церамидсинтазы в эндосомах, но не в плазматической мембране. То есть, образованный пул церамида не связан со сфингомиелиновым циклом. Образование этого пула церамида предшествует повреждению ДНК и ингибируется фумонизином B1, препятствующему синтезу церамида *de novo* [13].

Ранняя фаза активации рецепторов TNF- α сопровождается изменениями в комплексе I дыхательной цепи митохондрий. Ингибирование комплекса I приводит к нарушению транспорта электронов и высвобождению цитохрома c и последующему повышению мембранной проницаемости [14]. Регулируется ли этот эффект продуктами сфингомиелинового цикла - неизвестно.

Задачей данной работы являлось установление соотношения между такими TNF- α -зависимыми событиями, как активация сфингомиелинового цикла и изменение митохондриального дыхания, а также регуляции этих событий в зависимости от фазы клеточного цикла.

МЕТОДИКА. *Среды и реактивы.* Работу с клетками проводили в среде RPMI-1640 ("Flow Laboratories"), обогащенной 10 mM Hepes ("Sigma", США), 2 mM L-глутамином ("Sigma"), 100 ЕД/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина ("Sigma"), 50 мкМ 2-меркаптоэтанолом ("Flow") и 10% эмбриональной телячьей сывороткой (ЭТС) ("Flow"). После инкубации и перед окраской пропидиумом йодида лимфоциты отмывались в 0,85% растворе NaCl или в фосфатном буфере (Phosphate Buffered Saline - PBS) ("Sigma"). В работе использовали моноклональные антитела (mAb) ("Becton Dickinson", США) α -CD95 к Fas/APO-1 рецептору, α -R55 - к p55 рецептору TNF, α -R75 - к p75 рецептору TNF. Для окраски mAb к активной каспазе-3, меченными FITC, использовали гипотонический цитратный буфер с 0,1% тритоном X-100 для пермеабилзации клеток, которые предварительно фиксировались 1% параформальдегидом в течение 10 минут.

Определение фрагментации ДНК на проточном цитометре. Метод основан на включении пропидиума йодида (PI) в олигонуклеосомальные фрагменты ДНК [15]. К фиксированным клеткам селезенки или тимуса (1×10^6 клеток в 150 мкл 1% параформальдегида) добавляли по 0,5 мл гипотонического раствора PI (50 мкг PI ("Sigma")) на 1 мл 0,1% цитратного буфера ("Реахим", Россия) с 0,1% тритоном X-100 ("Sigma"), инкубировали 40 минут в темноте при 4°C и анализировали на проточном цитометре. Флуоресценцию PI определяли на канале FL2 при длине волны 585 ± 10 нм или FL3 при длине волны 635 ± 10 нм. На гистограмме клеток, окрашенных PI, по оси абсцисс отложена логарифмическая шкала интенсивности флуоресценции, отражающая количество ДНК в клетке, по оси ординат дается относительное число окрашенных пропидиумом клеток в гейте в линейной шкале.

Клеточный цикл. Культуры клеток HL-60 на разных стадиях развития, а также синхронизированные 5 нМ D-сфинганином, разделяли на самоформирующемся градиенте плотности, представляющем собой смесь Перколла (исходная плотность 1,12) с Фиколлом (30%) ("Pharmacia"). Это позволяет разделить клетки на несколько популяций в зависимости от их плавучей плотности и, одновременно, от скорости седиментации. Полученные фракции отмывали, окрашивали пропидиумом йодидом, бром-дезоксисуридином и аннексином V и анализировали характер диплоидного пика на проточном цитометре, определяя накопление клеток и интенсивность их флуоресценции в области пика, соответствующей G0/G1 или G2/M фазам клеточного цикла.

Определение фрагментации ДНК в агарозном геле. Для определения распада ДНК на олигонуклеосомальные фрагменты клетки лизировали, экстракты переносили в 1 мл буфера (50 mM Трис (pH 8,0), 1 mM ЭДТА, 0,5% твин-20 и 0,2 мг/мл протеиназы К) на 4 часа при 55°C, затем центрифугировали 20 мин при 14000 об/мин и 4°C. В супернатантах определяли концентрацию ДНК на спектрофотометре ("Hitachi", Япония) при длине волны 260 нм. По 10 мкл каждого образца, содержащих 2 мкг ДНК, наносили в лунку камеры, залитой 1,5% агарозным гелем. Электрофорез проводили при постоянной силе тока в 15 мА до тех пор, пока краситель не достигал нижнего конца геля. ДНК проявляли этидиумом бромидом. Некротический "шмер" ДНК определялся в виде сплошной полосы с постепенно ослабевающей интенсивностью окраски. Олигонуклеосомальные фрагменты ДНК при апоптозе имели характерное исчерченное окрашивание, появляющееся от 1 тысячи и до 35 пар оснований по маркеру.

Статистический анализ. Все эксперименты проводились, как минимум, в четырех повторях, полученные данные представлены средней величиной (\pm ошибка средней). Все данные подвергали статистическому анализу с использованием программы Biostat. Сравнение между двумя группами проводили

TNF-ИНДУЦИРУЕМЫЙ АПОПТОЗ И НЕКРОЗ В КЛЕТКАХ МИЕЛОЛЕЙКОЗА

по критерию t Стьюдента, статистический анализ более чем двух групп проводился методом множественного сравнения по критерию Ньюмена-Кейлса. Различия считали статистически значимыми при $p \leq 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Клеточная линия HL-60 представляет собой недифференцированные клетки миелоидного лейкоза человека, экспрессирующие рецепторы фактора некроза опухолей TNF-R1 и слабо или почти не экспрессирующие Fas рецептор апоптоза, что делает их удобным объектом изучения TNF-зависимых путей апоптоза и некроза [14]. Концентрации TNF (5 - 20 нМ) соответствовали эффективным рабочим дозам, полученным экспериментальным путем в предыдущих опытах по влиянию TNF на дифференцировку лимфоцитов и моноцитов.

Анализ культуры клеток HL-60, разделенной на две фракции в градиенте плотности (см. раздел "Методика") показал, что TNF- α индуцирует преимущественно некроз во фракции, для которой диплоидный пик располагается в зоне интенсивной флюоресценции, соответствующей G2/M фазам клеточного цикла. В менее интенсивно светящихся клетках, что соответствует G1 фазе, TNF индуцировал как апоптоз, так и некроз, причем этот эффект не носил дозозависимого характера. Наличие некроза подтверждалось данными электрофореза в геле, где ДНК окрашивалась в виде сплошной полосы, а апоптоз, соответственно, в виде "лестницы". В тех образцах, где одновременно определялся апоптоз и некроз, при электрофорезе обнаруживалась слабо просвечиваемая "лестница" на фоне сплошной окраски. Процент клеток в апоптозе и некрозе, по данным проточной цитометрии, представлен на рис. 1.

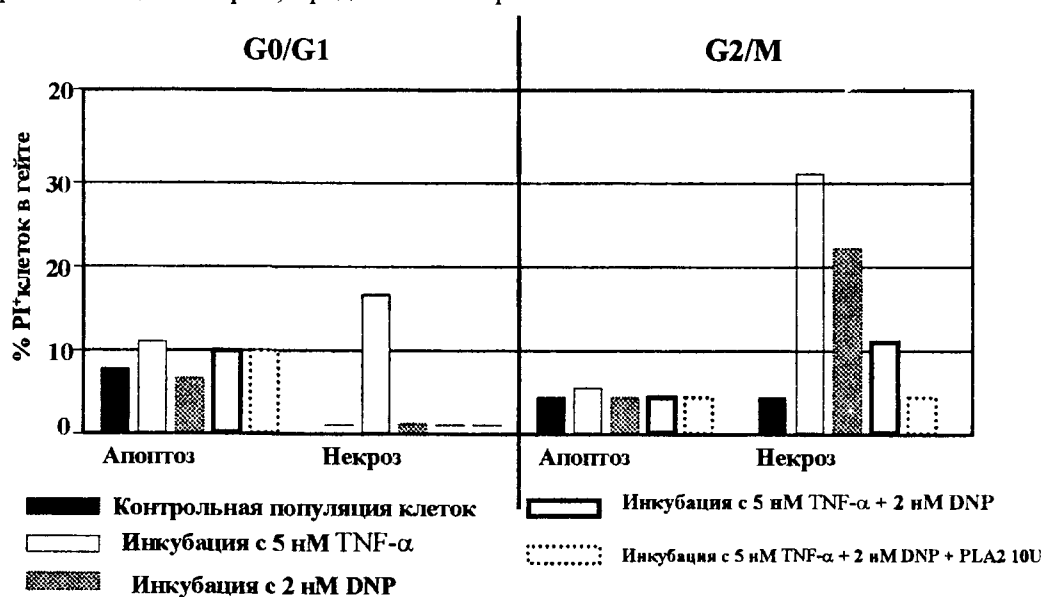


Рисунок 1.

Взаимодействие фактора некроза опухолей и динитрофенола при индукции апоптоза и некроза в клетках HL-60 в зависимости от фазы клеточного цикла.

Клетки культивировали в полной среде RPMI 1640 с 15% ЭТС, отмывали, доводили до концентрации 30×10^6 /мл и центрифугировали в самоформирующемся градиенте плотности перколла и фиколла. Полученные фракции клеток с наименьшей и наибольшей плотностью отмывали, часть клеток окрашивали пропидиумом йодидом и анализировали на проточном цитометре. Характер распределения диплоидного пика указывал на фазу клеточного цикла. Соответствующие фракции клеток затем инкубировали в присутствии 20 нМ TNF- α и/или 2 нМ DNP, а также 10 Ед фосфолипазы A2 (PLA2) в течение 2,5 часов. Клетки отмывали, фиксировали, окрашивали пропидиумом йодидом и анализировали на проточном цитометре по специальной программе на основе SimulSet, с настройками, позволяющими развести гейты апоптотических и некротических клеток. Приведено среднее значение процента некротических и апоптотических клеток по данным четырех опытов.

Синхронизация клеточных культур сфинганином в течение 6 часов приводила к преимущественному накоплению клеток в G1/S фазе. После отмывки и перевода их в полную среду RPMI 1640 с 15% ЭТС экспозиция клеток в течение 2,5 часов с 20 нМ TNF- α приводила к преимущественному развитию апоптоза.

Добавление в культуру клеток HL-60 5 - 50 нМ TNF- α сопровождалось активацией каспазы-3. Интенсивность флуоресценции измеряли в параллельных клеточных культурах через каждые пятнадцать минут. Пик активности каспазы-3 обнаруживался не позднее 60 минут после добавления 20 нМ TNF (рис. 2). Те же результаты по активации каспазы-3 получены и для связывания рецепторов TNF-R1, -R2. Работами других авторов показано, что на клетках HL-60 TNF- α инициирует апоптозный сигнальный путь, в котором появление церамида предшествует активации каспаз-1 и -4. Активность каспазы-3 для данного сигнального пути показана не была (только для Fas-индуцированного апоптоза на клетках HL-60 [16]). Другие работы прямо указывают на значение каспазы-1 и каспазы-3 в проведении апоптозного сигнала от TNF в клетках HL-60, поскольку ингибиторы каспазы-1 (Ac-YVAD-fmk) и каспазы-3 (Ac-DEVD-fmk) существенно снижают процент апоптозных клеток [17].

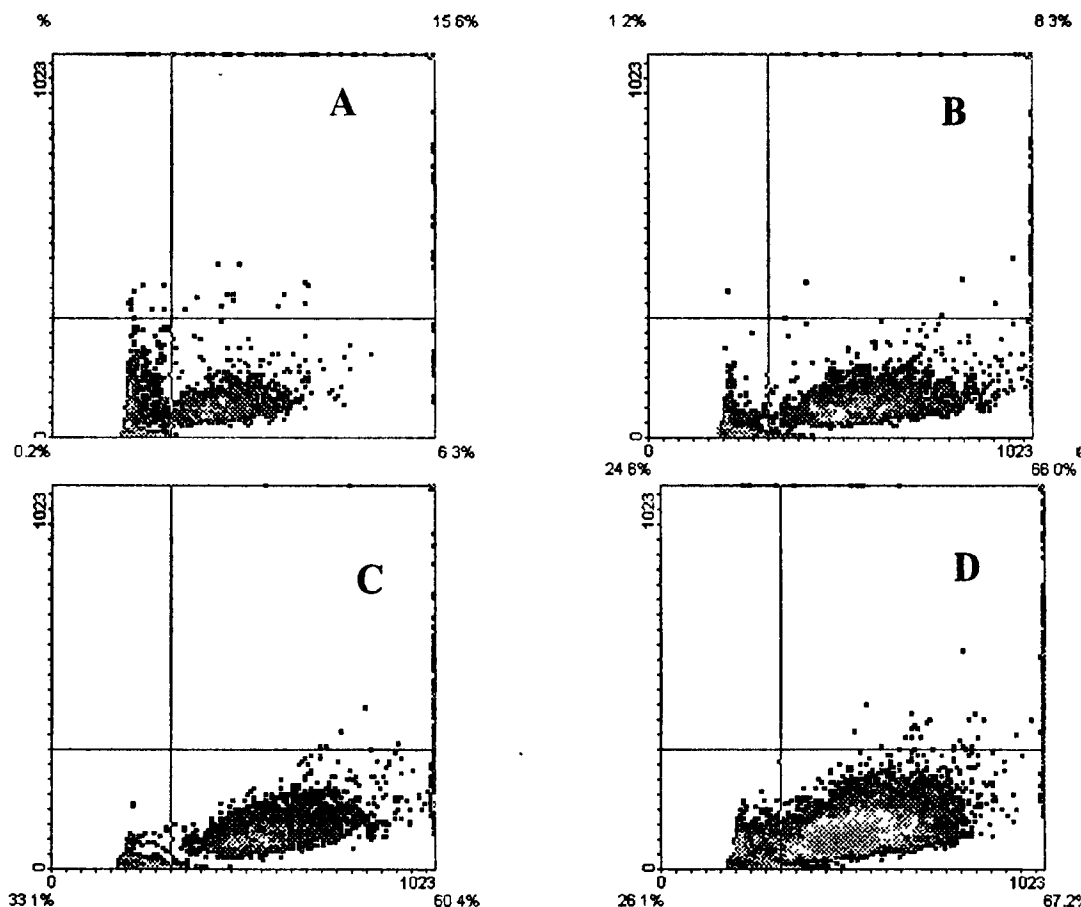


Рисунок 2

Активация каспазы-3 в клетках HL-60 через 15, 30, 45 и 60 минут (А, В, С, Д соответственно) после воздействия TNF- α .

На рисунке по осям координат представлены данные DotPlot анализа распределения интенсивности флуоресценции образца, окрашенного моноклональными антителами к активированной каспазе-3, меченными FITC. Флуоресценция возрастает вправо и вверх от нулевой точки и указывает на плотность свечения, соответствующую активности фермента.

Активность каспазы-3 нарастает, как минимум, в течение 60 минут после добавления 5 нМ TNF- α .

TNF-ИНДУЦИРУЕМЫЙ АПОПТОЗ И НЕКРОЗ В КЛЕТКАХ МИЕЛОЛЕЙКОЗА

Для клеток HL-60 показано, что активация каспазы-3 обуславливает активацию каспазо-зависимой эндонуклеазы (гидролизует фосфодиэстеразные связи между двумя внутренними последовательностями в молекуле нуклеиновой кислоты). Разрушение ДНК и образование крупных фрагментов при воздействии TNF на клетки HL-60 начинается на позднее, чем через 30 минут, и связано с гидролизом поли(ADP-рибозо)-полимеразы (PARP) под действием каспазы-3. Это не зависит от клеточного цикла [18]. Гидролиз PARP идет параллельно и независимо от падения митохондриального потенциала дельта пси мю [19].

На рис. 3 приведен пример опыта по взаимодействию TNF-зависимых путей апоптоза и некроза с реактивными метаболитами кислорода в несинхронизированной культуре клеток HL-60. Клетки окрашены пропидиумом йодидом, данные получены на проточном цитометре. Крайний правый пик отражает число диплоидных клеток. Курсор M1 показывает зону некротических остатков клеток. Курсор M3 указывает на пик апоптозных клеток. Инкубация клеток 2,5 часа в присутствии TNF- α (20 нМ) обуславливает гибель клеток как апоптозом ($9 \pm 3\%$), так и некрозом ($18 \pm 3\%$). Предварительная инкубация клеток с DNP полностью блокировала развитие TNF-индуцированного некроза, но повышала уровень апоптоза (с 9 до 19%). Эти результаты можно сравнить с данными, приведенными на рис. 1, из которого следует, что влияние разобщителя DNP на TNF-зависимый сигнал определяется фазой клеточного цикла.

Для TNF- α известно, что апоптозный сигнал проводится на некоторые изоформы нейтральной SMase плазматической мембраны с последующей активацией сфингомиелинового цикла, то есть гидролиза сфингомиелина с образованием церамида, далее сфингозина, функционирование их как вторичных мессенджеров и т.д. Более поздний сигнал связан с активацией кислой SMase, причем двух изоформ - мембрано-связанной и эндосомальной.

Экзогенная бактериальная SMase инициирует сфингомиелиновый цикл в некоторых мембрано-связанных доменах, что, однако, достаточно для существенного и длительного накопления церамида в клетке [20]. В наших экспериментах (рис. 3) SMase (10 Ед.) обуславливали появление некротической популяции ($7 \pm 2\%$) и незначительное повышение уровня апоптоза (с 12% до 15%) в клетках HL-60. DNP не оказывал существенного влияния на апоптоз и некроз, инициируемые SMase. Добавление к клеткам TNF- α после SMase инициировало только апоптоз, тогда как добавление антител к рецептору p55 TNF- α не влияло на механизм гибели клеток под действием SMase. Учитывая литературные данные о преимущественной индукции сфингомиелинового цикла за счет связывания именно p55 рецептора TNF- α , можно предположить, что TNF- α в клетках HL-60 проводит несколько сигналов, наиболее ранним из которых является активация сфингомиелинового цикла.

DNP обуславливает почти полную потерю популяции клеток за счет некроза в том случае, если TNF- α инициирует дополнительные сигнальные пути на фоне уже начинающегося распада сфингомиелина под действием SMase. Если же клетки активированы вначале TNF- α , а только затем экзогенная SMase гидролизует оставшийся пул сфингомиелина, то DNP потенцирует развитие некроза и апоптоза. Эти данные согласуются с нашими результатами по полной блокаде клеточного дыхания при добавлении DNP к клеткам HL-60 после инкубации их с TNF- α после действия SMase, что приводит к остановке развития энергозависимой программы апоптоза (данные в печати). Уровень АТФ в клетке прямо определяет: возможна ли реализация апоптоза полностью, а также каким путем погибнет клетка (апоптозом, некрозом или апонекрозом, то есть неполноценным циклом апоптоза с переходом в некроз [6]).

Мы показали, что связывание рецепторов TNF-R1 и R2 моноклональными антителами не инициирует апоптоз в клетках HL-60, но приводит к быстрому развитию некроза (рис. 4). Одновременное связывание этих двух рецепторов mAb TNF индуцирует апоптоз в G0/G1 фазе клеточного цикла. При этом процент

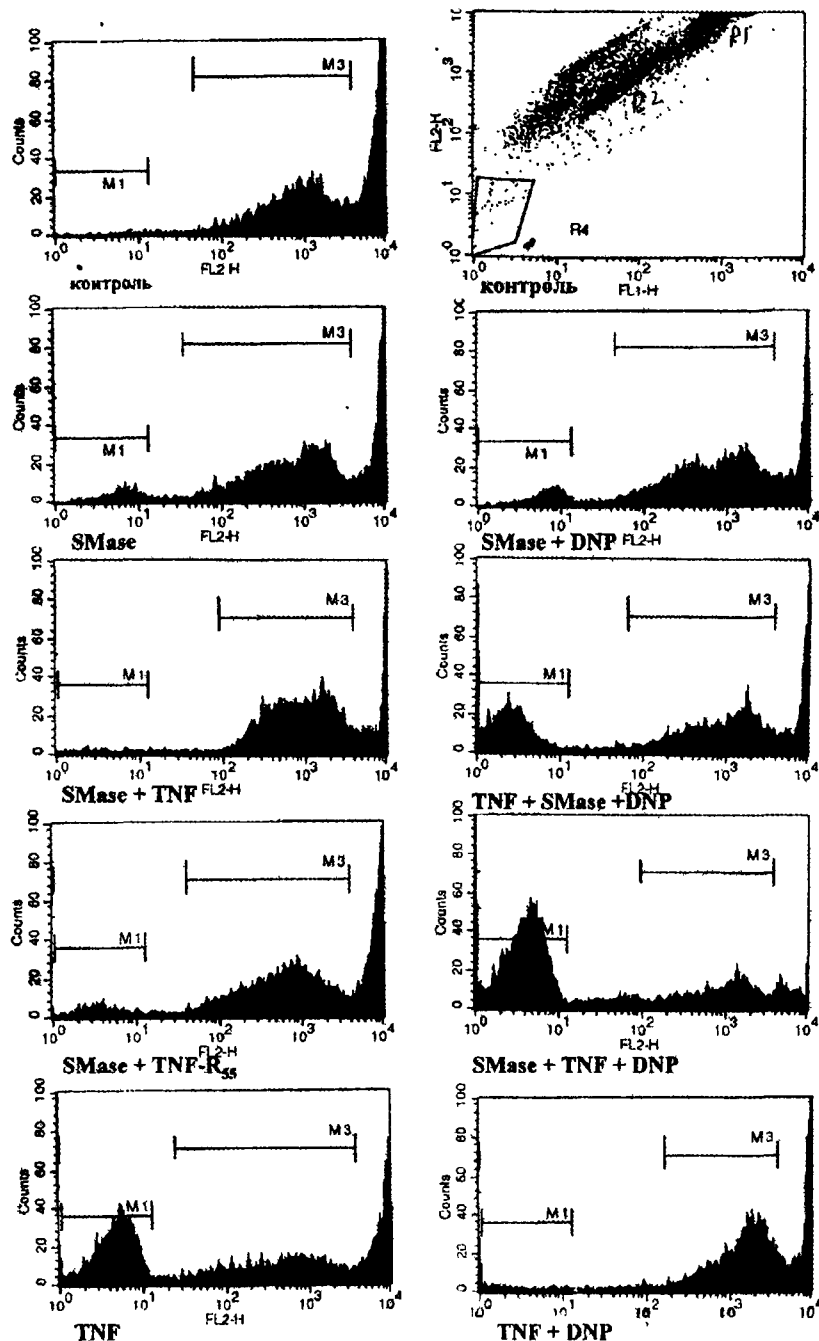


Рисунок 3.

Влияние активаторов сфингомиелинового цикла (сфингомиелиназы и $\text{TNF-}\alpha$) на индукцию апоптоза и некроза в клетках HL-60.

Клетки культивировали в полной среде RPMI 1640 с 15% ЭТС, отмывали, доводили до концентрации $1 \times 10^6/\text{мл}$ и инкубировали в присутствии 10 Ед экзогенной бактериальной SMase, 20 нМ $\text{TNF-}\alpha$, mAb к рецептору p55 $\text{TNF-}\alpha$ (20 нМ) или 2 нМ DNP в течение 2,5 часов. После этого клетки отмывали, фиксировали, окрашивали пропидиумом йодидом и анализировали на проточном цитометре по специальной программе на основе SimulSet с настройками, позволяющими развести гейты апоптотических и некротических клеток. Правый узкий пик отражает число диплоидных клеток. Крайний левый пик, обозначенный курсором M1, показывает число некротических остатков клеток, курсор M3 обозначает пик апоптотических клеток. На рисунке также приведено распределение клеток в контрольном образце с указанием гейта R4, соответствующего накоплению некротических остатков клеток.

TNF-ИНДУЦИРУЕМЫЙ АПОПТОЗ И НЕКРОЗ В КЛЕТКАХ МИЕЛОЛЕЙКОЗА

некротических клеток несколько снижен в этой фазе, а в G2/M гибнет большинство клеток. Эффект суммарного воздействия двух mAb к рецепторам TNF минимизируется добавлением в культуральную среду DNP (рис. 4).

Важным моментом является тот факт, что в переживаемой клеточной культуре, когда концентрация клеточной массы выходит на плато, добавление одновременно двух антител к рецепторам TNF-R1, -R2 приводит к появлению как апоптотического ($30 \pm 3\%$), так и некротического ($39 \pm 4\%$) пиков. Причем первоначальная обработка клеток SMase, а затем антителами, обуславливает развитие только апоптоза в случае анти-R1 антител ($55 \pm 4\%$), тогда как анти-R2 антитела приводят к развитию как апоптоза ($44 \pm 5\%$), так и некроза ($22 \pm 4\%$). В этих условиях добавление TNF в культуральную среду после инициирования сфингомиелинового цикла экзогенной сфингомиелиназой обуславливает развитие только апоптоза ($64 \pm 5\%$).

Поскольку одним из вторичных мессенджеров сигнального пути TNF- α является синтезированный *de novo* церамид [8], мы показали влияние 20 нМ ингибитора церамидсинтазы фумонизина B1 (FB1,) на клетки HL-60 (табл.).

Таблица. Влияние ингибитора церамидсинтазы фумонизина B1 на TNF-индуцированный апоптоз в клетках HL-60.

Клетки HL-60	Некроз, %	Апоптоз, %
Контроль	0%	10%
20нМ FB1 + 20нМ TNF- α	8%	0%
20нМ FB1	$22 \pm 3\%$	0%
20нМ FB1 + 20нМ DNP	$15 \pm 2,5\%$	$1,5 \pm 0,3\%$
20нМ FB1 + 20нМ СССР	$20 \pm 3\%$	$1,5 \pm 0,3\%$
20нМ FB1 + DNP + 20нМ СССР	$2 \pm 0,3\%$	$1 \pm 0,3\%$
20нМ DNP	$8 \pm 1\%$	$1,5 \pm 0,5\%$
20нМ СССР	$7 \pm 1\%$	$1,5 \pm 0,5\%$

Предварительная обработка клеток фумонизином B1 практически полностью блокирует развитие TNF-индуцированного апоптоза, однако повышает процент некротических клеток. Эти данные вполне согласуются с работами, показывающими необходимость синтеза церамида *de novo*, как одной из составляющих сигнального пути TNF-индуцированного апоптоза. Фумонизин B1 (как и TNF) обуславливает развитие некроза, частично ингибируемого DNP. Инкубация клеток с фумонизином B1 и двумя разобщителями дыхания (динитрофенолом и карбонилцианид-3-хлорфенилгидразоном (СССР)) приводит к полному ингибированию как апоптоза, так и некроза, что указывает на энергозависимый характер первоначальной фазы некроза. Значит, мы можем говорить не о некрозе, а, скорее, об апонекрозе, то есть незавершенной программе гибели клетки путем апоптоза.

В клетке существует несколько конкурентных сигнальных путей, которые способны блокировать апоптотический сигнал и прерывать активацию каскада каспаз. Сигнальный путь TNF-R2 изучен не достаточно, однако имеются данные о его более тесных контактах с сигнальными путями ростовых факторов и об активации фосфолипазы A2 (PLA2). Активация протеинкиназы C (PKC) блокирует сигналы апоптоза, передаваемые церамидом, и препятствует изменениям в мембране митохондрий. Активация каскада MAP-киназ, как части сигнального пути ростовых факторов, ингибирует сигнальные пути апоптоза даже в тех клетках, в которых отмечен высокий уровень экспрессии Fas-рецепторов. Для этого необходимы реактивные метаболиты кислорода, выполняющие функцию вторичных мессенджеров [21]. Активация PLA2 также иницирует конкурентный апоптозу сигнальный путь. С другой стороны, цитозольная cPLA2 специфически активируется при передаче сигналов апоптоза от рецепторов TNF- α [22]. При этом показано, что PLA2 выполняет двойную роль в TNF-зависимых сигнальных путях, действуя как вторичный мессенджер и как эффекторный фермент апоптоза [23].

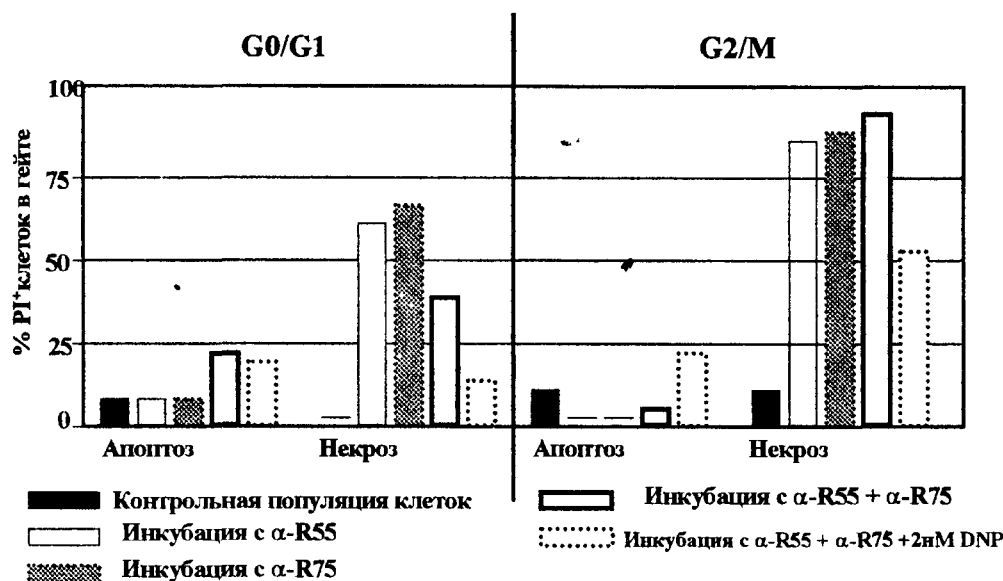


Рисунок 4.

Индукция апоптоза и некроза антителами к рецепторам R55 и R75 TNF- α в клетках HL-60 в зависимости от фазы клеточного цикла.

Клетки культивировали в полной среде RPMI 1640 с 15% ЭТС, отмывали, доводили до концентрации 30×10^6 /мл и центрифугировали в самоформирующемся градиенте плотности перколла и фиколла. Полученные фракции клеток с наименьшей и наибольшей плотностью отмывали, часть клеток фиксировали, окрашивали пропидиумом йодидом и анализировали на проточном цитометре. Характер распределения диплоидного пика указывал на фазу клеточного цикла. Соответствующие фракции клеток затем инкубировали в присутствии антител к рецепторам TNF-R1 (R55) и TNF-R2 (R75), а также динитрофенола (DNP) [2 нМ] в течение 2,5 часов. После этого клетки отмывали, окрашивали пропидиумом йодидом и анализировали на проточном цитометре по специальной программе на основе SimulSet, с настройками, позволяющими развести гейты апоптозных и некротических клеток. Показано среднее значение процента некротических и апоптозных клеток по данным четырех опытов. Контролем апоптоза и некроза служил электрофорез в геле (см. раздел "Методика").

В опухолевых клетках секреторная PLA2 индуцирует апоптоз, сигнальный путь которого включает церамид, образованный при активации SMase [24]. Этот пул церамида участвует в каспазо-независимых сигнальных путях апоптоза [25]. По нашим данным, добавление экзогенной PLA2 (10 Ед) одновременно с 20 нМ TNF- α и DNP резко снижает процент TNF-зависимого некроза в культуре клеток HL-60 (рис. 1).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. Связывание рецепторов TNF-R1, -R2 фактором некроза опухолей, а также моноклональными антителами, на клетках HL-60 инициирует изменения, которые можно квалифицировать как апоптоз, и некроз. Это регулируется передачей сигналов в клетках, вторичными мессенджерами которых являются кислородные радикалы, церамид, синтезированный *de novo* или образованный в результате распада сфингомиелина, каспаза-3, а также PLA2. Преимущественное влияние того или иного сигнального пути зависит от фазы клеточного цикла. Разобщители митохондриальной дыхательной цепи полностью или частично блокируют TNF-индуцированный некроз и апоптоз в зависимости от фазы клеточного цикла.

Данная работа подчеркивает тот факт, что для всех типов TNF-зависимой гибели клеток, так же как и для апоптоза, необходим синтез церамида, активация сфингомиелинового цикла и активация каспаз. Это позволяет сделать вывод о едином механизме запуска TNF-зависимого апоптоза и некроза, и о некрозе как незавершенном

TNF-ИНДУЦИРУЕМЫЙ АПОПТОЗ И НЕКРОЗ В КЛЕТКАХ МИЕЛОЛЕЙКОЗА

апоптозе, то есть состоянии апонекроза. Так как одновременное взаимодействие TNF и SMase блокирует клеточное дыхание (то есть прерывается энергозависимый сигнальный путь апоптоза) можно предположить, что состояние апонекроза является характерной отличительной чертой действия TNF на клетки HL-60.

ВЫВОДЫ:

1. TNF α опухолей индуцирует апоптоз и некроз в клетках HL-60, которые регулируются клеточным дыханием и зависят от фазы клеточного цикла.

2. Для реализации как апоптоза, так и некроза требуется синтез церамида *de novo*, активация сфингомиелинового цикла, активность каспаз и наличие реактивных метаболитов кислорода. Оба сигнальных пути негативно регулируются PLA2.

3. TNF-зависимый некроз скорее представляет собой незавершенный процесс гибели клетки путем апоптоза, что можно рассматривать как состояние апонекроза.

ЛИТЕРАТУРА.

1. Manna, S., Haridas, V., Aggarwal B. (2000) J. Interferon Cytokines, **20**, 725-735.
2. Higuchi, M., Honda, T., Proske, R., Yeh, E. (1998) Oncogene, **17**, 2753-2760.
3. Faraco, P., Ledgerwood, E., Vandenabeele, P. et al. (1999) Biochem. Biophys. Res. Commun., **261**, 385-392.
4. Von Mering, M., Wellmer, A., Michel, U. et al. (2001) Brain Pathol., **11**, 282-295.
5. Formigli, L., Papucci, L., Tani, A. et al. (2000) J. Cell. Physiol., **182**, 41-49.
6. Suzuki, A., Iwasaki, M., Kato, M., Wagai, N. (1997) Exp. Cell. Res., **233**, 41-47.
7. Adam-Klages, S., Adam, D., Weigmann, K. et al. (1996) Cell, **86**, 937-947.
8. Hannun, Y. (1994) J. Biol. Chem., **269**, 3125-3128.
9. Spinedi, A., Amendola, A., Di Bartolomeo, S. and Piacentini, M. (1998) Biochem. Biophys. Res. Commun., **243**, 852-857.
10. Kaszkin, M., Huwiler, A., Scholz, K. et al. (1998) FEBS Lett., **440**, 163-166.
11. Lee, W., Shen, S., Lin, H. et al (2002) Biochem. Pharmacol., **63**, 225-236.
12. Kristal, B. and Brown, A. (1999) J. Biol. Chem., **274**, 23169-23175.
13. Higuchi, M., Proske, R., Yeh, E. (1998) Oncogene, **17**, 2515-2524.
14. Ueda, N., Camargo, S., Hong, X. et al. (2001) J. Am. Soc. Nephrol., **12**, 2384-2391.
15. Nicoletti, I., Migliorati, G., Pagliacci, M. et al. (1991) J. Immunol., **139**, 271-281.
16. Laouar, A., Glense, D., Huberman, E. (1999) J. Biol. Chem., **274**, 23526-23534.
17. Mundel, S., Reza, S., Ali, A. et al. (1999) Cancer Lett., **140**, 201-207.
18. Li, X. & Darzynkiewicz, Z. (2000) Exp. Cell. Res., **255**, 125-132.
19. Li, X., Du, L., Darzynkiewicz, Z. (2000) Exp. Cell. Res., **257**, 290-297.
20. Borchardt, R., Lee, W., Schmidt, B. et al. (1994) Biochim. Biophys. Acta, **1212**, 327-336.
21. Krauss, S. and Brand, M. (2000) FASEB J., **14**, 2581-2588.
22. De Valck, D., Vercammen, D., Fiers, W. et al. (1998) J. Cell. Biochem., **71**, 392-399.

23. Wu, Y., Jiang, X., Newland, A., Kelsey, S. (1998) J. Immunol., **160**, 5929-5935.
24. Zhao, S., Du, X., Chai, M. et al. (2002) Biochim. Biophys. Acta, **1581**, 75-88.
25. Pirianov, G. and Colston, K. (2001) Mol. Cell. Endocrinol., **172**, 69-78.

Поступила 13.08.2002.

**TNF-INDUCED APOPTOSIS AND NECROSIS IN HL-60 LEUKEMIA CELLS
IS REGULATED BY REACTIVE OXYGEN METABOLITES AND
DEPENDENT ON CELL CYCLE.**

E.A.Martynova¹, E.V.Poddubskaya², E.R.Polosukhina², S.V.Klimova³

¹ State Institute of Nutrition RAMS, Ustinsky proezd 2/14, Moscow, 109240 Russia;
fax: 7(095)298-1850, 298-1872, e-mail: eamartynova@lycos.com;

² Blokhin Cancer Research Center RAMS, 115478 Moscow, Russia,

³ State Scientific Center - Institute Immunology, 115478 Moscow, Russia.

TNF is the known death receptor ligand which induce apoptosis and necrosis. Reactive oxygen metabolites, ceramide (synthesized *de novo* and as a product of sphingomyelin cycle), and caspases have been implicated as potential mediators of cell death. Their mechanistic relationship remains to be elucidated. The presence and activation of executor caspase-3 has been found to be regulated during both TNF-induced apoptosis and necrosis on their early stages. TNF-induced cell damage, suggesting the induction of both, apoptosis and necrosis, depended on the cell cycle. Necrosis induced by TNF was inhibited by denitrophenol (DNP). Pretreatment of these cells with exogenous bacterial sphingomyelinase (SMase) potentiates TNF- α induced apoptosis only, suggesting the role of ceramide from sphingomyelin cycle in TNF signaling pathways of apoptosis. DNP was found to initiate necrosis after SMase and TNF common action. The role of ceramide synthesis in enhanced ceramide generation in response to oxidant stress was shown using inhibitor of ceramide synthase - fumonisin B1. Its effect was found to be modulated by mitochondrial chain respiration inhibitors. Monoclonal antibodies to TNF- α receptors R1 and R2 exhibit the more high level of necrosis compared with TNF and both regulated by DNP and phospholipase A2. TNF-R2 effect was not found previously. Conclusion: Ceramide synthesis and sphingomyelin breakdown, caspase activation and reactive oxygen metabolites production are required for the TNF- α -induced apoptosis and necrosis which may be regulated dependently on cell cycle. TNF-initiated necrosis seems to be the disrupted apoptotic program and may be classified as aponecrosis.

Key words: apoptosis, necrosis, TNF, ceramide, fumonisin B1, sphingomyelinase.