

# Роль NF-κB и p38-опосредованных сигнальных путей в регуляции кроветворения при иммобилизационном стрессе

Дыгай А.М., Жданов В.В., Мирошниченко Л.А., Удут Е.В., Зюзьков Г.Н., Хричкова Т.Ю., Симанина Е.В., Ставрова Л.А., Чайковский А.В., Агафонов В.И.

ФГБНУ «НИИ фармакологии и регенеративной медицины им. Е.Д. Гольдберга», г. Томск, 634028, Томск, пр. Ленина, д. 3, mmu@pharm.tsu.ru

*В условиях иммобилизационного стресса вскрыто участие протеинкиназы p38 в повышении выработки гранулоцитарного колониестимулирующего фактора клетками кроветворного микроокружения. Наблюдаемое усиление колониобразующей способности при отсутствии ускорения созревания клоногенных элементов гранулоцитарного роста костного мозга реализуется при участии NF-κB/IKK-зависимого сигналинга и p38MAPK сигнального пути. Показана важная роль MAPK p38 в регуляции гранулоцитопоэза, но не эритропоэза.*

**Ключевые слова:** сигнальные пути, транскрипционный фактор NF-κB, MAPK p38, иммобилизация, гранулоцитарный колониестимулирующий фактор

## Введение

Ранее установлено, что при действии различных по своей природе экстремальных факторов, как обладающих миелоингибирующим действием (цитостатики, ионизирующее излучение), так и не вызывающих гипоплазии кроветворной ткани (стресс, воспаление, кровопотеря), происходит последовательная активация отдельных звеньев единого каскадного механизма регуляции кроветворения. Основными компонентами системы управления гемопоэзом при этом являются центральные нейроэндокринные механизмы и элементы гемопоэзиндуцирующего микроокружения с продуцируемыми цитокинами и компонентами межклеточного матрикса, регулирующие процессы пролиферации и дифференцировки кроветворных клеток [4, 11]. В серии работ на модели иммобилизационного стресса было показано значительное увеличение продукции цитокинов, усиливающих колониобразующую функцию костного мозга [1, 3]. Известно, что в выработке данных веществ важную роль играют сигнальные каскады (STAT-, MAP- и PI3K/Акт-сигнальные каскады, включая триггер — ядерный фактор NF-κB) [8—10, 12—14]. Однако базисные принципы возникновения, передачи и трансформации гуморальных сигналов в изменения интенсивности пролиферации и дифференцировки клеток-предшественников при возмущающих воздействиях во многом остаются неясными. Все это определяет необходимость детального изучения роли элементов сигнальной трансдукции в регуляции кроветворения при стрессированном воздействии.

Целью настоящей работы было вскрытие участия NF-κB-зависимого сигналинга и MAP-киназного каскада в регуляции кроветворения на модели иммобилизационного стресса.

## Объект и методы исследования

Исследования проводились на 24 мышках-самцах линии F1 (СВАхС57В1/6) в возрасте 2 мес., массой 20—22 г. Животные получены из отдела экспериментальных био-

логических моделей НИИФиРМ им. Е.Д. Гольдберга (сертификат имеется).

Экспериментальные животные подвергались иммобилизации с помощью мягких вязок в положении лежа на спине в течение 10 ч [6]. Забор материала (костный мозг) для исследований осуществляли до воздействия (интактные мыши) и на 3-и сут. после иммобилизации [2].

С помощью культуральных методов изучали прямое влияние ингибитора транскрипционного фактора NF-κB (ядерный фактор «каппа-би», nuclear factor kappaB, nuclear factor κ-light-chain-enhancer of activated B cells) — ауриотиомалата и ингибитора MAP-киназы p38 — SB203580 (оба производства «Calbiochem», США) на продукцию гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (Г-КСФ) и эритропоэтина (ЭПО) прилипающими и неприлипающими элементами гемопоэзиндуцирующего микроокружения (ГИМ). Рабочая концентрация ингибиторов *in vitro* была определена в предварительных экспериментах и составляла 50 мкМ (микромоль) и 300 мкМ для ауриотиомалата и SB203580 соответственно. Кондиционную среду клеток костного мозга получали инкубированием прилипающих, либо неприлипающих миелокариоцитов в жидкой культуральной среде при 37°C в течение 24 ч в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> и 100% влажности [2]. Уровни Г-КСФ и ЭПО в кондиционных средах определяли методом иммуноферментного анализа (ИФА), с помощью наборов фирмы «R&D systems» (USA) и «BIOMERICA, INC» (USA) согласно методическим указаниям производителя.

Содержание коммитированных клеток-предшественников гранулоцитопоэза (КОЕ-Г, КлОЕ-Г) и эритропоэза (КОЕ-Э, КлОЕ-Э) в костном мозге изучали *in vitro* методом клонирования миелокариоцитов в полувязкой культуральной среде. Интенсивность созревания гранулоцитарных и эритроидных прекурсоров определяли по величине индекса созревания (отношение числа кластеров к количеству колоний, выросших в той же лунке) [2]. Культивирование предшественников осуществляли в стандартных условиях (среда метилцеллюлозная MethoCult® M3334 с эритропоэтином, среда метилцеллюлозная MethoCult™ GF M3001 с ГМ-КСФ (StemCell™ Techno-

Содержание гранулоцитарных колониеобразующих единиц (КОЕ-Г) во взвеси неадгезирующих клеток костного мозга мышей линии F1 (СВАхС57В1/6) при культивировании без ингибитора (1), с добавлением ингибитора Р38 (2), ингибитора NF-κВ (3), ингибитора Рi3к (4), ингибитора IKK2 (5), ингибитора сАМР (6), либо ингибитора МЕК1/2 (7)

Ингибиторы	КОЕ-Г
1	23,00 ± 2,12
2	17,33 ± 0,56*
3	18,57 ± 0,11*
4	27,56 ± 3,92
5	13,86 ± 6,09
6	13,86 ± 6,09
7	18,57 ± 5,82

Примечание. \* — различия достоверны по сравнению с клетками интактных мышей, не обработанных ингибитором

logies)), либо в указанных условиях с добавлением ингибиторов в рабочей концентрации: ингибитор транскрипционного фактора NF-κВ (ауротиомалат) — 50 мкМ, ингибитор MAP-киназы p38 (SB203580) — 300 мкМ, ингибитор аденилатциклазы (2',5'-dideoxyadenosine) — 30 мкМ, ингибитор Рi3-киназы (LY 294002) — 50 мкМ, блокатор IKK-2 (Inhibitor IV) — 0,02 мкМ и блокатор МЕК 1/2 (PD 98059) — 100 мкМ. Все ингибиторы производства «Calbiochem», США.

Обработку результатов проводили методом вариационной статистики с использованием t-критерия Стьюдента и непараметрического U критерия Манна—Уитни.

### Результаты исследования

В проведенных нами скрининговых исследованиях по изучению роли MAP- и Рi3K/Akt-киназных сигнальных каскадов в контроле ключевых функций клетки с помощью ингибиторного анализа было показано, что добавление ингибиторов Рi3-киназы, аденилатциклазы, IKK-2 и МЕК 1/2 в культуральную среду не влияло на выход КОЕ-Г, тогда как блокирование MAP-киназы p38 и ядерного фактора транскрипции NF-κВ снижало количество гранулоцитарных прекурсоров во взвеси клеток костного мозга интактных животных (таблица).

Эти результаты свидетельствуют о вкладе p38 и NF-κВ в регуляцию процессов пролиферации и дифференцировки прогениторных элементов в условиях равновесного кроветворения. Исходя из полученных данных и учитывая, что наблюдаемые при действии различных по своей природе возмущающих факторов изменения со стороны системы крови и механизмы, лежащие в их основе, являются во многом неспецифическими и однотипными, мы предположили, что данные сигнальные белки могут быть и компонентом адаптационных реакций в ходе развития гиперплазии костномозгового кроветворения при стрессе.

Ранее проведенные исследования показали, что у мышей на 6—7-е сут. после 10-часовой иммобилизации, в кроветворной ткани происходит возрастание количества миелокариоцитов, обусловленное в основном увеличением числа клеточных элементов эритроидного и гранулоцитарного ростков гемопоэза, развитие ретикулоцитоза, эритроцитоза, нейтрофилиза и моноцитоза в периферической крови [1, 3].

Стимуляции гранулоцито- и эритропоэза способствовало повышение колониеобразующей способности костного мозга (выход КОЕ-Г и КОЕ-Э возрастал на 3—5-е сут. эксперимента) [1, 3]. Также было установлено, что при иммобилизации животных повышенному колониеобразованию предшествует усиление активностей продукции ИЛ-1 и ИЛ-3 прилипающими и неприлипающими клетками костного мозга, которые, как известно, индуцируют выработку эндотелиоцитами, макрофагами и фибробластами Г-КСФ — гемопоэтина, необходимого для формирования колоний гранулоцитов *in vitro* [5]. Кроме того, известно, что избыточная продукция провоспалительных цитокинов — ИЛ-1, ИЛ-6 и ФНО-α может являться причиной снижения уровня ЭПО [7]. В связи с этим было определено содержание гемопоэтинов в кондиционных средах клеток костного мозга в условиях иммобилизационного стресса.

Изучение уровня Г-КСФ методом ИФА после иммобилизации выявило резкое возрастание его выработки (в 12 раз) неприлипающими миелокариоцитами по сравнению таковым у нестрессированных животных (рис. 1Б). В то же время продукция Г-КСФ адгезирующими миелокариоцитами на 3-и сут. после стрессирующего воздействия практически не изменялась (рис. 1А), что объясняется, видимо, более поздним «подключением» резидентных макрофагов и стромальных клеток костного мозга к реакции кроветворной ткани на возмущающее воздействие [1, 3]. Определение уровня ЭПО в супернатантах от прилипающих и неприлипающих миелокариоцитов не выявило статистически значимых различий по сравнению с таковым у интактных мышей (рис. 1В, Г).

Добавление ингибитора протеинкиназы p38 в культуру неадгезирующих элементов костного мозга мышей, подвергнутых иммобилизации, значимо снижало уровень Г-КСФ в кондиционных средах до  $69,56 \pm 15,37$  при  $330,74 \pm 34,40$  pg/mL в группе без ингибитора (рис. 1Б). Блокада ядерного фактора транскрипции не изменяла продукцию гемопоэтина неприлипающими миелокариоцитами в костном мозге стрессированных мышей (рис. 1Б). Повышение же Г-КСФ активности супернатантов от прилипающих миелокариоцитов после блокады изучаемых сигнальных путей при возмущающем воздействии сохраняло ту же тенденцию, что и у интактных животных (рис. 1А).

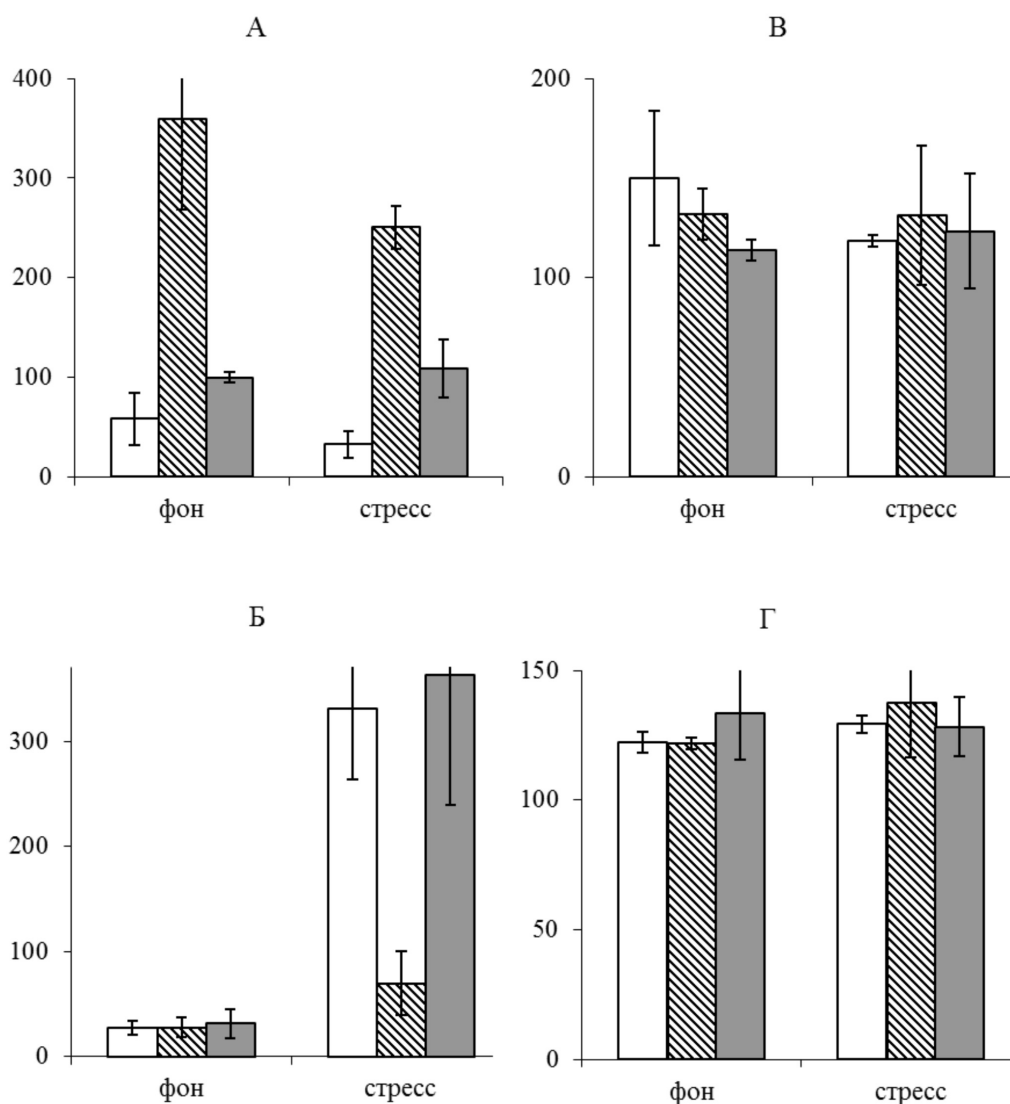


Рис. 1. Уровень Г-КСФ в кондиционных средах от прилипающих (А) и неприлипающих (Б) миелокарицитов и ЭПО в кондиционных средах от прилипающих (В) и неприлипающих (Г) миелокарицитов интактных либо стрессированных мышей линии F1 (СВАхС57В1/6) культивированных без ингибитора (белые столбики) и при добавлении в среду ингибитора протеинкиназы р38: SB203580 (заштрихованные столбики) и ингибитора транскрипционного фактора NF-κВ: ауротиомалата (серые столбики). По оси абсцисс — исследуемые группы; по оси ординат — значения показателя: pg/mL (А, Б) и mU/mL (В, Г). Доверительные интервалы при P ≤ 0,05.

Культивирование клеток костного мозга опытных мышей с ингибиторами снижало их колониобразующую способность при неизменном индексе созревания коммитированных клеток-предшественников гранулоцитопоэза (рис. 2А, Б). Этот факт свидетельствует о том, что NF-κВ-зависимый каскад и альтернативный протеинкиназный сигнальный путь не определяют интенсивность дифференцировки гемопоэтических предшественников на изучаемом этапе реакции кроветворной ткани на иммобилизационный стресс.

Анализ влияния ингибиции NF-κВ-зависимого сигнального и р38МАРК сигнального пути на систему эритрона после иммобилизационного воздействия не выявил статистически значимых изменений со стороны продукции ЭПО элементами кроветворного микроокружения (рис. 1В, Г). Блокада данных сигнальных путей в системе *in vitro* не изменяла также колониобразующую способность эритроидных предшественников, выделенных из костного мозга стрессированных животных, и интенсивность их созревания (рис. 2В, Г).

### Заключение

Учитывая все вышеизложенное, можно заключить, что изменение колониобразующей способности костного мозга после действия ингибиторов, вероятно, свидетельствует о непосредственном участии NF-κВ-зависимого сигнального и р38МАРК в определении пролиферативного статуса гранулоцитарных прекурсоров при иммобилизационном стрессе. При этом, учитывая динамику изменения уровня Г-КСФ в супернатантах от неприлипающих элементов гемопоэзинуцирующего микроокружения после добавления ингибитора Р38, можно сделать вывод о том, что продукция гемопоэтина мобильными субпопуляциями макрофагов [1] при иммобилизационном стрессе является р38-зависимым процессом. Таким образом, в условиях иммобилизационного стресса регуляция гранулоцитопоэза осуществляется при участии альтернативного протеинкиназного сигнального пути, тогда как в контроле активности эритроидного роста при возмущающих воздействиях, возможно, участвуют иные каскадные реакции.

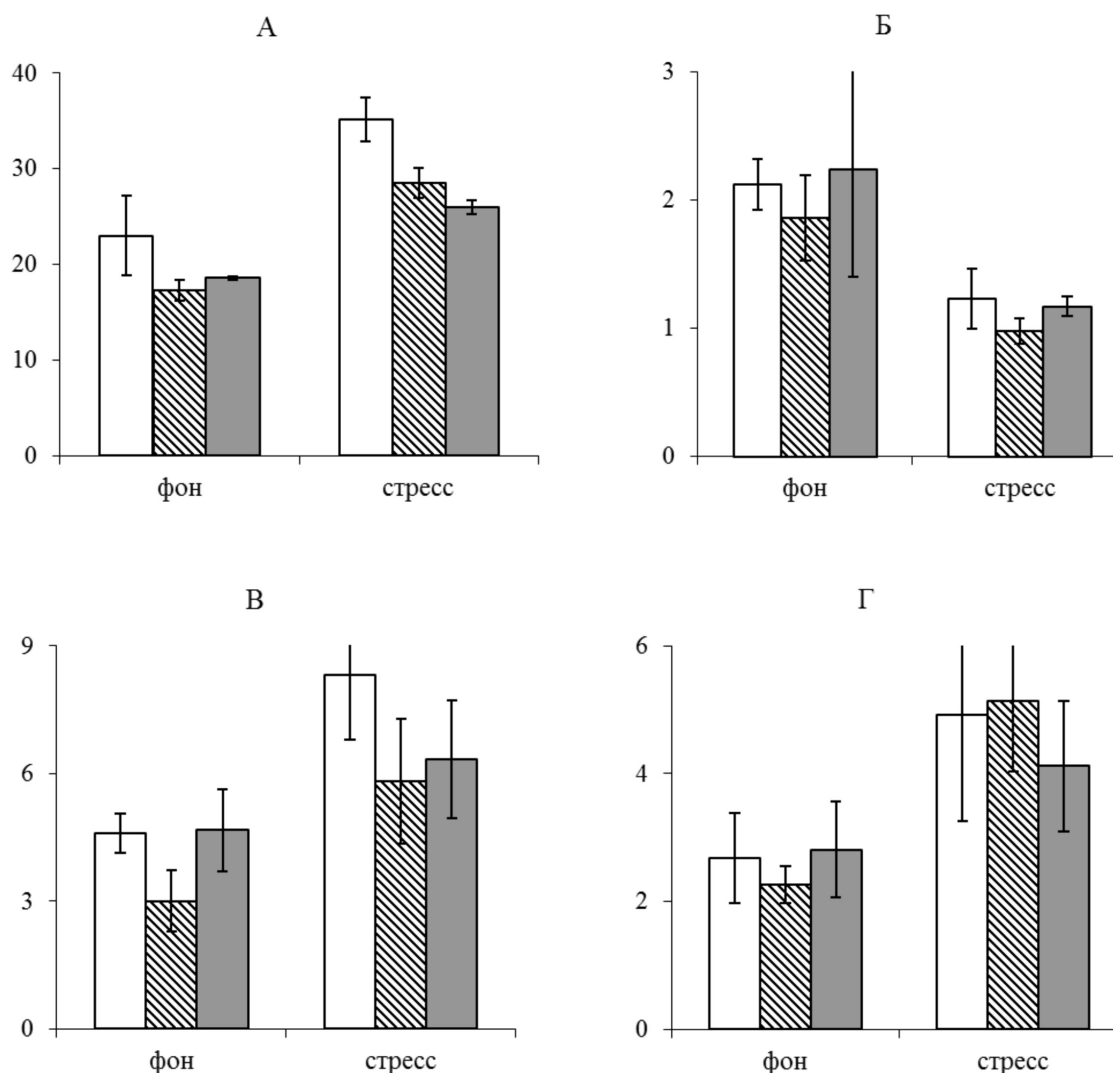


Рис. 2. Динамика содержания гранулоцитарных (KOE-Г) (А) и эритроидных (KOE-Э) (В) колоний, интенсивность их дифференцировки (KLOE-Г/KOE-Г) (Б), (KLOE-Э/KOE-Э) (Г) в костном мозге intactных либо стрессированных мышей линии F1 (CBAxС57Bl/6) культивированных без ингибитора (белые столбики) и при добавлении в среду ингибитора протеинкиназы p38: SB203580 (заштрихованные столбики) и ингибитора транскрипционного фактора NF-κB: ауротиомалата (серые столбики). По оси абсцисс — исследуемые группы; по оси ординат — значения показателя: А, В — на  $10^5$  нуклеаров, Б, Г — в усл. ед. Доверительные интервалы при  $P \leq 0,05$ .

### Список литературы

1. Гольдберг Е.Д., Дыгай А.М., Жданов В.В. Роль гемопоэз-индуцирующего микроокружения при цитостатических миелосупрессиях. — Томск: STT, 1999. — 128 с.
2. Гольдберг Е.Д., Дыгай А.М., Шахов В.П. Методы культуры ткани в гематологии. — Томск: Изд-во Том. ун-та, 1992. — 264 с.
3. Гольдберг Е.Д., Дыгай А.М., Шерстобоев Е.В. Механизмы локальной регуляции кроветворения. — Томск: STT, 2000. — 148 с.
4. Дыгай А.М., Жданов В.В. Теория регуляция кроветворения. — М.: Изд-во РАМН, 2012. — 140 с.
5. Дыгай А.М., Жданов В.В. Гранулоцитарный колониестимулирующий фактор. Фармакологические аспекты. — М.: Изд-во РАМН, 2010. — 138 с.
6. Дыгай А.М., Жданов В.В., Эпштейн О.И., Кириенкова Е.В., Гольдберг Е.Д. Роль гуморальных факторов в регуляции гемопоэза при иммобилизационном стрессе // Бюлл. эксперим. биологии и медицины. — 2004. — Т. 137, № 3. — С. 244—248.
7. Захаров Ю.М., Рассохин А.Г. Эритробластический острок. — М.: Медицина, 2002. — 280 с.
8. Зюзьков Г.Н., Данилец М.Г., Лигачева А.А. и др. Участие p13K, MAPK ERK1/2 и p38 в реализации ростового потенциала мезенхимальных клеток-предшественников в условиях in vitro //

Клеточные технологии в биологии и медицине. — 2013. — №4. — С. 206—209.

9. Новик А.А., Камилова Т.А., Цыган В.Н., Новик А.А. Введение в молекулярную биологию канцерогенеза. — М.: ГЭОТАР-Мед, 2004. — 224 с.

10. Bonilla-Hernan M.G., Miranda-Carus M.E., Martin-Mola E. New drugs beyond biologics in rheumatoid arthritis: the kinase inhibitors // Rheumatology (Oxford). — 2011. — Vol. 50, № 9. — P. 1542—1550.

11. Dygai A.M., Zhdanov V.V., Miroshnichenko L.A., Zyuz'kov G.N., Udut E.V., Simanina E.V., Stavrova L.A., Khrichkova T.Y., Reykhart D.V., Agafonov V.I. Mechanisms of stimulating effect of glycyram and D-glucuronic acid on granulocytopenia suppression by 5-fluorouracil // Bulletin of Experimental Biology and Medicine (Published: Springer Science + Business Media, Inc., New York, USA). — 2013. — Vol. 155, № 2. — P. 207—211.

12. Zyuz'kov G.N., Danilets M.G., Ligacheva A.A., Zhdanov V.V., Udut E.V., Miroshnichenko L.A., Simanina E.V., Trofimova E.S., Minakova M.Y., Chaikovskii A.V., Agafonov V.I., Dygai A.M. Role of NF-κB-dependent signaling in the realization of growth potential of mesenchymal progenitor cells in vitro // Bulletin of Experimental Biology and Medicine (Published: Springer Science+Business Media, Inc., New York, USA). — 2013. — Vol. 155, № 6. — P. 721—725.

13. Somerville T.C., Linch D.C., Khwaja A. Different levels of p38 MAP kinase activity mediate distinct biological effects in primary human erythroid progenitors // *Br. J. Haematol.* — 2003. — Vol. 120, № 5. — P. 876—886.
14. Uddin S., Ah-Kang J., Ulaszek J., Mahmud D., Wickrema A. Differentiation stage-specific activation of p38 mitogen-activated protein kinase isoforms in primary human erythroid cells // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 2004. — Vol. 101, № 1. — P. 147—122.

*Получена 17.08.2015*

### References

1. Gol'dberg E.D., Dygaj A.M., Zhdanov V.V. Rol' gemopojezinducirujushhego mikrookruzheniya pri citostaticeskikh mielosuppressijah. — Tomsk: STT, 1999. — 128 s.
2. Gol'dberg E.D., Dygaj A.M., Shahov V.P. Metody kul'tury tkani v gematologii. — Tomsk: Izd-vo Tom. un-ta, 1992. — 264 c.
3. Gol'dberg E.D., Dygaj A.M., Sherstoboev E.V. Mehanizmy lokal'noj reguljacji krovetvorenija. — Tomsk: STT, 2000. — 148 c.
4. Dygaj A.M., Zhdanov V.V. Teorija reguljacija krovetvorenija. — M.: Izd-vo RAMN, 2012. — 140 c.
5. Dygaj A.M., Zhdanov V.V. Granulocitarnyj koloniestimulirujushij faktor. Farmakologicheskie aspekty. — M.: Izd-vo RAMN, 2010. — 138 c.
6. Dygaj A.M., Zhdanov V.V., Jepshtejn O.I., Kirienkova E.V., Gol'dberg E.D. Rol' gumoral'nyh faktorov v reguljácii gemopojeza pri immobilizacionnom stresse // *Bjull. jeksperim. biologii i mediciny.* — 2004. — T. 137, № 3. — S. 244—248.
7. Zaharov Ju.M., Rassohin A.G. Jeritroblasticheskij ostrovok. — M.: Medicina, 2002. — 280 s.
8. Zjuz'kov G.N., Danilec M.G., Ligacheva A.A. i dr. Uchastie PI3K, MAPK ERK1/2 i r38 v realizacii rostovogo potenciala mezen-

himal'nyh kletok-predshestvennikov v uslovijah in vitro // *Kletochnye tehnologii v biologii i mediciny.* — 2013. — №4. — S. 206—209.

9. Novik A.A., Kamilova T.A., Cygan V.N., Novik A.A. Vvedenie v molekularnuju biologiju kancerogeneza. — M.: GJeOTAR-Med, 2004. — 224 s.

10. Bonilla-Hernan M.G., Miranda-Carus M.E., Martin-Mola E. New drugs beyond biologics in rheumatoid arthritis: the kinase inhibitors // *Rheumatology (Oxford).* — 2011. — Vol. 50, № 9. — P. 1542—1550.

11. Dygai A.M., Zhdanov V.V., Miroshnichenko L.A., Zyuz'kov G.N., Udut E.V., Simanina E.V., Stavrova L.A., Khrichkova T.Y., Reykhardt D.V., Agafonov V.I. Mechanisms of stimulating effect of glycyram and D-glucuronic acid on granulocytopenia suppression by 5-fluorouracil // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine (USA).* — 2013. — Vol. 155, № 2. — P. 207—211.

12. Zyuz'kov G.N., Danilets M.G., Ligacheva A.A., Zhdanov V.V., Udut E.V., Miroshnichenko L.A., Simanina E.V., Trofimova E.S., Minakova M.Y., Chaikovskij A.V., Agafonov V.I., Dygai A.M. Role of NF- $\kappa$ B-dependent signaling in the realization of growth potential of mesenchymal progenitor cells in vitro // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine (USA).* — 2013. — Vol. 155, № 6. — P. 721—725.

13. Somerville T.C., Linch D.C., Khwaja A. Different levels of p38 MAP kinase activity mediate distinct biological effects in primary human erythroid progenitors // *Br. J. Haematol.* — 2003. — Vol. 120, № 5. — P. 876—886.

14. Uddin S., Ah-Kang J., Ulaszek J., Mahmud D., Wickrema A. Differentiation stage-specific activation of p38 mitogen-activated protein kinase isoforms in primary human erythroid cells // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 2004. — Vol. 101, № 1. — P. 147—122.

*Received 17.08.2015*

## ***The role of NF- $\kappa$ B and p38-mediated signaling pathways in hematopoiesis regulation under immobilization stress***

**Dygaj A.M., Zhdanov V.V., Miroshnichenko L.A., Udut E.V., Zyuz'kov G.N., Khrichkova T.Y., Simanina E.V., Stavrova L.A., Chaikovskij A.V., Agafonov V.I.**

FSBSI «Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine named after E.D.Goldberg», 634028, Tomsk, Lenin Avenue, 3

*Under the conditions of immobilization stress was found participation protein kinase p38 in the production of granulocyte colony-stimulating factor by hematopoietic microenvironment cells. The observed increased colony-forming ability in the absence of maturation processes elements of clonogenic granulocytic lineage bone marrow is implemented with the participation of NF- $\kappa$ B/IKK-dependent signaling and p38MAPK signaling pathway. It is shown important role of p38MAPK in the regulation of granulocytopenia, but not erythropoiesis.*

**Keywords:** *signaling pathways, transcriptional factor NF- $\kappa$ B, p38 mitogen-activated protein kinase, immobilization, granulocytic colony-stimulating factor*