

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО ПО ЗДРАВООХРАНЕНИЮ И СОЦИАЛЬНОМУ
РАЗВИТИЮ
ГОСУДАРСТВЕННОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО
ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ
СИБИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ

Г.А.Суханова, О.Е.Акбашева

А П О П Т О З

Рекомендовано в качестве учебного пособия
Учебно-методическим объединением
по медицинскому и фармацевтическому образованию
вузов России

ТОМСК-2005

УДК: 577.1(075)

Г. А. Суханова, О. Е. Акбашева. Апоптоз : учебное пособие. – Томск - 2005 - 140 с.

В учебном пособии изложены современные представления о программируемом типе гибели клеток. Приводится сравнительный анализ апоптоза и некроза, их морфологические и биохимические проявления. Представлены механизмы развития апоптоза с участием Fas-системы, каспаз, митохондриальных факторов, а также индукции апоптоза при повреждении ДНК и дефиците факторов роста. Показано значение апоптоза при старении, в развитии заболеваний. Рассмотрены критерии оценки и методы изучения апоптоза.

Учебное пособие предназначено для студентов медицинских, биологических специальностей и может быть использовано аспирантами и научными сотрудниками.

Рецензенты:

В.Е.Высокогорский, заведующий кафедрой биохимии Омской государственной медицинской академии, профессор, д.м.н.

Н.Н.Маянская, профессор кафедры биохимии Новосибирской государственной медицинской академии, д.м.н.

Утверждено и рекомендовано к печати учебно-методической комиссией медико-биологического факультета СибГМУ (протокол №7 от 07. 12. 2004 г.) и Центральным методическим советом СибГМУ (протокол № 5 от 28. 02. 2005 г.).

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение.....	4
История открытия апоптоза	5
Типы гибели клеток	8
Морфологические признаки некроза.....	13
Клинико-морфологические формы некроза	15
Клинические проявления некроза	20
Процесс повреждения клетки при некрозе.....	22
Характеристика апоптоза	28
Физиологические активаторы апоптоза	34
Сигналпередающие пути индукции апоптоза в клетке	36
Межнуклеосомная деградация ДНК.....	37
Окислительный стресс	40
Митохондриальные факторы	41
Мембранные эффекты	44
Гормоны	45
Ингибирование процесса апоптоза.....	47
Механизм передачи апоптоз-специфического сигнала с.....	49
помощью белков семейства Bcl-2	49
Индукция апоптоза, вызванная активацией Fas-системы.....	54
Молекулярные механизмы TNF-R1 - опосредованного апоптоза	56
.....	
Типы клеток, участвующих в апоптозе.....	62
Каспазы	65
Молекулярные механизмы действия каспаз.....	80
Фагоцитоз погибающих клеток	86
Липидные микродомены клеточных мембран.....	87
Значение апоптоза в развитии заболеваний.....	90
Роль апоптоза в регуляции роста опухолей.....	96
Роль апоптоза при старении	99
Роль апоптоза при заболеваниях нервной системы	103
Роль апоптоза в патогенезе заболеваний печени	105
Роль апоптоза в патологии кожи.....	109
Роль апоптоза в патогенезе заболеваний почек.....	114
Апоптоз при ожогах и сепсисе.....	116
Роль апоптоза при сердечно-сосудистых заболеваниях.....	117
Роль апоптоза при формировании клеток иммунной системы ...	120
Методы изучения апоптоза	128

Введение

Феномен апоптоза известен как физиологическая гибель клеток, представляющая естественный процесс. В переводе с греческого он означает "опадание" (листьев с деревьев, лепестков с цветов). *Апоптоз* — это гибель клеток путем самоликвидации, происходящая в нормальных и патологически измененных тканях. Синонимами термина апоптоз являются "активная гибель клетки", "программированная гибель клетки".

Апоптоз универсально распространен в мире многоклеточных организмов, ему подвержены все виды тканей. В противоположность некрозу, апоптоз происходит по строго определенному биохимическому и морфологическому стереотипу и не зависит от причины, приводящей к началу этого процесса. Апоптоз составляет основу таких важных процессов как позитивная и негативная селекция Т- и В-лимфоцитов, гибель лимфоцитов, индуцированная глюкокортикоидами, интерфазная гибель тимоцитов при облучении, гибель при дефиците ростовых факторов. Апоптоз необходим для формирования и функционирования иммунной системы, развития нервной системы. Благодаря апоптозу организм защищен от вирусных инфекций, в связи с тем, что клетки пораженные вирусом, элиминируются. Иммунодефицит при ВИЧ-инфекции определяется нарушениями в контроле апоптоза. Многие противоопухолевые препараты индуцируют процесс апоптоза. Интерес к изучению проблемы апоптоза постоянно растет.

Молекулярно-биологические исследования проблем апоптоза раскрывают важную роль этого явления в развитии многих заболеваний — онкологических, инфекционных, нейродегенеративных и др., позволяют детализировать механизмы клеточной гибели. Для многих цитотоксических сигналов изучена последовательность реакций от момента его взаимодействия с клеточной мишенью до межнуклеосомной деградации хроматина.

Интенсивность исследований проблемы апоптоза в последние годы связана с рядом обстоятельств. Прежде всего, появились методические возможности регистрации различных проявлений апоптоза и анализа его молекулярных механизмов, которые тесно связаны с механизмами других актуальных явлений (например, активацией клеток и связанной с ней межклеточной коммуникацией). Кроме того, изучение апоптоза оказалось

очень продуктивным для понимания ряда важнейших процессов, включая иммунный гомеостаз и онкогенез. Возникла необходимость пересмотра ряда положений физиологии и патологии по типам гибели клетки. Гибель клетки по типу некроза рассматривается как неуправляемое, отрицательное и часто случайное явление. В противоположность этому, апоптотическая гибель клеток в пределах организма является закономерным и необходимым явлением, а само существование многоклеточного организма подразумевает баланс жизни и смерти на уровне составляющих его клеточных популяций. В зависимости от интенсивности и характера повреждающих воздействий гибель клетки может пойти по апоптотическому либо некротическому пути. Запуск той или иной формы клеточной гибели в определенном типе клеток зависит, по-видимому, не только от природы и амплитуды повреждающего воздействия, но и функционального состояния клеток. Более того, в некоторых случаях начальные этапы реализации апоптоза и некроза практически идентичны, а «выбор» пути гибели осуществляется на последующих стадиях и зависит от активности ферментных систем, регулирующих энергоснабжение клетки.

Механизмы регуляции апоптоза очень сложны и, как показали исследования последних лет, практически не изменились в процессе эволюции, что дает основание судить о фундаментальной биологической роли апоптоза. Многие в осуществлении механизмов апоптоза остаются неясным, сигнальные пути передачи апоптотического сигнала других программ жизнедеятельности клеток часто переплетаются между собой, создавая сложную картину внутри- и межклеточных взаимодействий, составляющих основу регуляции клеточного роста, дифференцировки и гибели клеток.

История открытия апоптоза

Термин «apoptosis» был введен J.F.Kerr и A.H.Wyllie в 1972 г. для обозначения процесса противоположного митозу. При митозе, как известно, происходит увеличение числа клеток в результате их деления. Апоптоз связан с гибелью и уменьшением количества клеток. Гибель отдельных клеток в организме известна достаточно давно. Но вначале она воспринималась как сугубо дегенеративное явление, т.е. как процесс постепенного отмирания

клеток в результате терминальной дифференцировки, характерной для эритроцитов и кератиноцитов, или при старении, например, нейронов.

К семидесятым годам двадцатого века было очевидно, что на определенных этапах онтогенеза происходит уничтожение отдельных клеток, участков тканей и даже целых органов. Однако оставалось неясным каким путем осуществляется их элиминация.

Основные принципы программируемой гибели клеток впервые были установлены в генетических исследованиях нематоды *Caenorhabditis elegans*. Этот плоский червь, длиной 1мм, совершенно прозрачен, живет пару недель, состоит из 959 клеток. Программа включает прежде всего экспрессию генов клеточной смерти, играющих центральную роль, *ced-3* и *ced-4* с образованием белков CED-3 и CED-4, необходимых для реализации эффекта, и CED-9 (продукта гена *ced-9*), защищающего клетки от гибели путем ингибирования CED-4. Название генов программируемой гибели дано по начальным буквам: *C. elegans death (ced) -3, 4 и 9*. *Ced-3* и *ced-4* являются промоторами гибели клеток, а *ced-9* ингибирует этот процесс. Все три гена образуют комплекс, в котором *ced-9* предотвращает активацию *ced-3* при непосредственном взаимодействии с *ced-4*. Установлено, что делеция или мутация единственного гена *ced-3* обеспечивает сохранение 131 клетки плоского червя, запрограммированных погибнуть во время его развития по пути гермафродитизма.

. У млекопитающих также обнаружены гены, гомологичные *ced-3, ced-4* и *ced-9*. Оказалось, что ген, подобный *ced-3* кодирует цистеиновую протеазу ICE, которая превращает предшественник интерлейкина IL-1 β в зрелую форму этого провоспалительного цитокина. Позже у млекопитающих были выявлены и другие цистеиновые протеазы, содержащие консервативные последовательности участков связывания и катализа субстрата и расщепляющие свои субстраты после остатка аспарагиновой кислоты. Вследствие этого они получили название каспаз (caspases, cysteinyl aspartate-specific proteinases).

Апоптоз регулируется комплексом биохимических, молекулярных и генетических факторов, большинство из которых полностью не изучено. В конечном счете, программируемая гибель клетки является результатом

баланса про- и противоапоптозных факторов. К наиболее важным регуляторам этого процесса относятся рецепторы гибели клетки, каспазы, митохондрии, семейство Bcl-2 протоонкогенов. После получения сигнала к апоптозу в клетке происходит два последовательных события: первое – немедленное – развивается в мембране, с участием рецепторов гибели клетки, и второе – в течение нескольких часов, приводящее к ее уничтожению и заключающееся в активации каскада внутриклеточных протеаз (каспаз).

За открытие в области генетической регуляции развития органов и запрограммированной гибели клеток С.Бреннеру, Р.Горвицу и Дж.Салстону в 2002 году была присуждена Нобелевская премия в области физиологии и медицины.



С. Бреннер в 1960-х годах поняв, что исследовать процессы развития клеток на примере высших животных слишком сложно, предложил в качестве объекта исследования нематоду *C.elegans*. Он вызывал у червя искусственные мутации и связывал их с конкретными нарушениями в развитии органов животного (эти проявления можно непосредственно наблюдать под микроскопом). Основываясь на этих достижениях, Дж. Салстон в 1970-е годы показал, что дифференцировка клеток *C.elegans* направляется единой генетической программой и что часть клеток обязательно погибает путем апоптоза. Он же обнаружил мутацию одного из генов, регулирующих апоптоз. В 1980-е годы Р.Хорвиц описал у *C.elegans* три «гена смерти» и показал, что аналогичные гены существуют и в геноме человека.

Типы гибели клеток

Апоптоз обычно противопоставляется другой форме гибели клеток — некрозу.

Некроз развивается при воздействии внешних по отношению к клетке повреждающих агентов и неадекватных условий среды. Обычно некроз начинается с повреждения плазматической мембраны клетки, приводящего к нарушению способности клеток сохранять ионный гомеостаз. В результате повышения проницаемости мембраны происходит набухание, прежде всего, митохондрий, а затем и всей клетки, что сопровождается разрывом мембран, активацией лизиса и разрушением внутриклеточных структур. Из-за разрывов плазматической мембраны содержимое цитоплазмы, включая лизосомальные ферменты, попадает во внеклеточное пространство. Некроз рассматривается как метаболическая катастрофа, вызванная тяжелыми структурными повреждениями клетки, приводящими к развитию активного воспалительного процесса. Наиболее хорошо изучены некротические процессы при действии внешних и внутренних факторов, к которым относятся гипоосмия, крайние значения pH, гипертермия, литическая вирусная инфекция, механические воздействия, влияние агентов, повреждающих мембрану, формирование пор в мембране с участием факторов комплемента. В результате некроза происходит набухание клетки, разрыв мембран вследствие повышения их проницаемости, выход содержимого клетки в среду.

Апоптоз — гораздо более распространенное явление, чем некроз. При апоптозе происходит сморщивание клеток, уменьшение их объема, уплотнение гранул. Различают следующие этапы апоптоза:

1. Конденсация хроматина и цитоплазмы. Первые события при апоптозе начинаются в ядре. На ранних стадиях апоптоза клетки округляются, отделяясь от соседних. Хроматин приобретает вид плотных и резко очерченных гомогенных масс, образуя плотные агрегаты серповидной формы вблизи ядерной оболочки, ядрышки фрагментируются. Эндоплазматический ретикулум расширяется и образует везикулы, имеющие тенденцию к слипанию с плазматической мембраной. Это приводит к характерному «почкованию», видимому с помощью электронной микроскопии.

2. *Фрагментация ядра и цитоплазмы с образованием апоптозных телец.* На данной стадии ядро распадается на отдельные фрагменты в виде лопастей с постепенно сужающимися ножками, окруженные ядерной оболочкой и содержащей очень плотные массы хроматина. Плазматическая мембрана при этом изгибается. Затем эти фрагменты разделяются и образуются апоптотические тельца, которые нередко содержат морфологически интактные митохондрии и другие органеллы. Апоптотические тельца быстро подвергаются фагоцитозу макрофагами и соседними эпителиальными клетками. Однако апоптоз является иммунологически инертным событием и удаление апоптотических телец не сопровождается воспалительным процессом.

Морфологические проявления апоптоза трудно выявить в тканях *in situ*, в связи с тем, что они быстро фагоцитируются не только макрофагами и нейтрофилами, но и другими окружающими клетками, не являющимися «профессиональными» фагоцитами. Скорость фагоцитоза зависит от появления на внешней поверхности клетки некоторых молекул, распознаваемых фагоцитами, к ним относятся фосфатидилсерин, тромбоспондин, десИАлированные мембранные гликопротеины и гликолипиды. При фагоцитозе апоптотических клеток их содержимое не выделяется в межклеточное пространство и не отражается на их окружении. Морфологические стадии апоптоза совершаются довольно быстро, за несколько часов.

Некроз, в отличие от апоптоза развивается при сильном повреждении клетки или изменении условий их существования, например, прекращении кровотока. На ранних стадиях некроза повреждается плазматическая и другие мембраны клетки, повышается их проницаемость для воды и ионов. Это вызывает набухание клетки в целом, ядра, митохондрий. Объем клетки при некрозе увеличивается. Хроматин вовлекается в морфологически различимые события не сразу, а к середине или к концу процесса. Вначале он тоже конденсируется у ядерной мембраны, но его массы значительно менее гомогенны и не так четко очерчены по краям, как при апоптозе.

Затем в результате кариолизиса хроматин исчезает. Заканчивается некроз разрывом плазматической мембраны и высвобождением продуктов

клеточного распада в межклеточную среду. При некрозе, в отличие от апоптоза, вокруг гибнущих клеток скапливаются их активные внутриклеточные компоненты, включая ферменты, происходит закисление среды, развивается очаг воспаления. Весь процесс некроза может завершиться за 1 час, но его последствия столь значительны, что при микроскопическом исследовании случаи некроза наблюдаются значительно чаще, чем апоптоза (рис 2.)

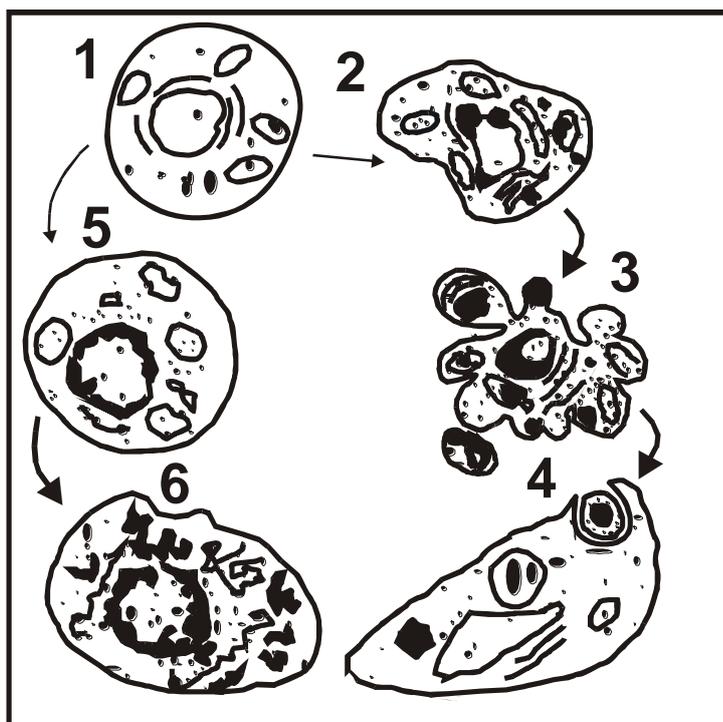


Рис. Морфология апоптоза и некроза

1-исходная клетка

2,3- клетка на разных стадиях апоптоза

4 -фагоцитированные апоптозные тела

5,6- клетка на разных стадиях некроза

Итак, в результате апоптоза происходит уменьшение размера клетки, наблюдаются конденсация и фрагментация хроматина, уплотнение плазматической и внутриклеточных мембран, без выхода содержимого клетки в окружающую среду. Проницаемость мембраны повышается лишь в отношении низкомолекулярных веществ, причем это происходит позже изменений в ядре. Если конденсация хроматина обнаруживается в пределах 1 часа, то повышение проницаемости для пропидия йодида проявляется только через 3–5 часов.

Гибель клеток по апоптотическому типу обнаруживается на самых ранних стадиях эмбриогенеза: при формировании органов, замене одних

тканей на другие, резорбции временных органов. Во взрослом организме клеточная гибель необходима для регуляции популяций клеток. Апоптоз является физиологическим механизмом устранения избыточных и функционально аномальных клеток. Этот процесс необходим для нормального развития многоклеточного организма в эмбриональном периоде и для поддержания тканевого гомеостаза у взрослых особей. Нарушения механизмов апоптоза, его ингибирование или излишняя активация, приводят к развитию атеросклероза, СПИДа, нейродегенеративных и онкологических заболеваний. Благодаря апоптозу человек защищен от рака и аутоиммунных заболеваний, в то же время активация этого процесса способствует старению организма.

Одним из основных признаков апоптоза является изменение состояния ДНК. В ДНК образуются одно- и двунитевые разрывы, формируются сначала крупные, затем мелкие фрагменты. В отличие от некроза, апоптоз зависит от нарушения энергетических процессов в клетке. У клетки должны сохраняться энергетические и материальные ресурсы для экспрессии генов апоптоза (табл.1).

Таким образом, при некрозе происходит увеличение размеров клетки, но не ядра, а при апоптозе уменьшается объем клетки, наблюдаются ранние изменения в ядре, но не в цитоплазме клетки. Способность к запрограммированной гибели клеток есть неотъемлемое и обязательное свойство любой клетки многоклеточного организма. У высших организмов путем апоптоза выбраковываются клетки, где повреждена ДНК или другие жизненноважные системы, клетки иммунной системы, образующие антитела к собственным белкам, а также клетки, случайно оказавшиеся вне своей ткани.

Характеристика некроза

Изучение молекулярных механизмов некроза значительно отстает от накопления знаний в области апоптоза. Это связано с тем, что долгое время считалось, что некроз является пассивным ответом клеток на внешнее воздействие и его регуляция терапевтическими средствами принципиально не возможна. Кроме того, некроз часто сопровождает апоптоз на завершающих стадиях. Терминология, используемая для характеристики явлений некроза, часто затрудняет целостное восприятие процесса. Однако можно полагать, что

некроз, подобно апоптозу, является активным и строго контролируемым событием.

Таблица 1

Сравнительная характеристика апоптоза и некроза

Признак	Апоптоз	Некроз
Индукция	Физиологические или патологические факторы	Повреждающие факторы
Биохимические изменения	Энергозависимая фрагментация ДНК эндонуклеазами без участия лизосом	Нарушение ионного обмена, активация лизосомальных ферментов
Распад ДНК	Внутриядерная конденсация с расщеплением на фрагменты	Диффузная локализация в некротизированной клетке
Целостность клеточной мембраны	Сохранена	Нарушена
Морфологические изменения	Сморщивание, уменьшение размеров клеток, формирование апоптотических телец	Набухание, разрыв мембран, увеличение размеров и лизис клеток
Воспалительный ответ	Нет	Есть
Удаление погибших клеток	Фагоцитоз соседними клетками	Фагоцитоз нейтрофилами и макрофагами

Некроз (от греч. *nekros* — мертвый) — омертвление, гибель клеток и тканей в живом организме под действием температуры — отморожение и ожог. Этот вид гибели клеток генетически не контролируется.

Факторы вызывающие некроз:

- *физические* (огнестрельное ранение, радиация, электричество, низкие и высокие температуры – отморожение и ожог;

- *токсические* (кислоты, щелочи, соли тяжелых металлов, ферменты, лекарственные препараты, этиловый спирт и др.);
- *биологические* (бактерии, вирусы, простейшие и др.);
- *аллергические* (эндо- и экзоантигены, например, фибриноидный некроз при инфекционно-аллергических и аутоиммунных заболеваниях, феномен Артюса);
- *сосудистый* (инфаркт — сосудистый некроз);
- *трофоневротический* (пролежни, незаживающие язвы).

В зависимости от *механизма действия патогенного фактора* различают:

- прямой некроз, обусловленный непосредственным действием фактора (травматические, токсические и биологические некрозы),
- не прямой некроз, возникающий опосредованно через сосудистую и нервно-эндокринную системы (аллергические, сосудистые и трофоневротические некрозы).

Под влиянием этих факторов увеличивается проницаемость плазматической мембраны или в результате изменения её структуры (комплемент, вирусы), или из-за нарушения работы мембранных ионных насосов (гипоксия, дыхательные яды). В этих условиях происходит перемещение ионов Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} по градиенту концентрации и сопутствующее перераспределение молекул воды. Сначала это вызывает серию обратимых изменений в поврежденной клетке. А затем развиваются необратимые. Важной особенностью некротической гибели клеток является то, что их удаление в организме сопровождается активацией воспалительных процессов.

Описано несколько механизмов, лежащих в основе необратимых некротических изменений: высвобождение лизосомальных ферментов; образование активных форм кислорода; истощение клеточного пула АТФ ниже критического уровня и активация кальций-зависимых фосфолипаз. Наиболее вероятно, что названные причины являются последовательными стадиями одного механизма приводящего к некрозу.

Морфологические признаки некроза

Некрозу предшествует период некробиоза, морфологическим субстратом которого являются дистрофические изменения.

Ранние изменения: В начальном периоде некробиоза клетка морфологически не изменена. Должно пройти 1-3 часа, прежде чем появятся изменения, распознаваемые при электронной микроскопии или гистохимически, и по крайней мере 6-8 часов, прежде чем появятся изменения, выявляемые при световой микроскопии; еще позже развиваются макроскопические изменения. Например, если больной с инфарктом миокарда умирает спустя несколько минут от момента начала приступа стенокардии (боль при недостаточном притоке крови к миокарду), то на аутопсии не будет выявлено никакого структурного свидетельства некроза; если же смерть наступает на 2-й день после острого приступа, то изменения будут очевидны.

Гистохимические изменения: приток ионов кальция в клетку тесно связан с необратимым повреждением и появлением морфологических проявлений некроза. В нормальной клетке внутриклеточная концентрация кальция составляет приблизительно 0.001 от концентрации его во внеклеточной жидкости. Этот градиент поддерживается мембраной клетки, которая активно транспортирует ионы кальция из клетки. Экспериментально доказано, что при повреждении клеток в результате ишемии или под воздействием различных токсических агентов, накопление кальция внутри клеток наблюдается только тогда, когда изменения необратимы. Кальций активирует эндонуклеазы (гидролиз, расщепление ДНК), фосфолипазы (разрушение мембран) и протеазы (деструкция, переваривание цитоскелета). Повышение их активности выявляется гистохимическими методами. Активность окислительно-восстановительных ферментов (например, сукцинатдегидрогеназы) резко снижается.

Изменения в ядрах клетки. Хроматин клетки конденсируется в крупные глыбки и ядро становится уменьшенным в объеме, сморщенным, плотным, интенсивно базофильным. Оно окрашивается в темно-синий цвет гематоксилином. Этот процесс назван пикнозом (сморщиванием). Пикнотическое ядро может затем разрываться на многочисленные маленькие базофильные частицы (кариорексис) или подвергнуться лизису (растворению) в результате действия лизосомальной дезоксирибонуклеазы (кариолизис). Тогда оно увеличивается в объеме, слабо окрашивается гематоксилином,

постепенно теряются контуры ядра. При быстро развивающемся некрозе ядро подвергается лизису без пикнотической стадии.

Цитоплазматические изменения: приблизительно через 6 часов после того, как клетка подверглась некрозу, цитоплазма ее становится гомогенной и выражено ацидофильной, то есть окрашивается интенсивно кислыми красителями, например, в розовый цвет при окраске эозином. Это - первое изменение, выявляемое световой микроскопией, которое возникает в результате коагуляции цитоплазматических белков и разрушения (исчезновения) рибосом. РНК рибосом придает базофильный оттенок нормальной цитоплазме. Специализированные органеллы клетки, например, миофибриллы в миокардиальных клетках, исчезают в первую очередь. Набухание митохондрий и деструкция (разрушение) мембран органелл вызывают вакуолизацию цитоплазмы. Наконец, переваривание клетки ферментами, которые высвобождаются из собственных лизосом, вызывает лизис клетки (аутолиз). Таким образом, в цитоплазме происходит коагуляция белков, сменяемая обычно их колликвацией.

Изменения межклеточного вещества охватывают как межклеточное вещество, так и волокнистые структуры. Чаще всего развиваются изменения, характерные для фибриноидного некроза: коллагеновые, эластические и ретикулиновые волокна превращаются в плотные, гомогенные розовые, иногда базофильные массы, которые могут подвергаться фрагментации, глыбчатому распаду либо лизироваться. Реже может наблюдаться отек, лизис и ослизнение волокнистых структур, что свойственно колликвационному некрозу.

Клинико-морфологические формы некроза

Некроз проявляется различными клиническими и морфологическими изменениями. Различия зависят от структурно-функциональных особенностей органов и тканей, скорости и типа некроза, а также причины его возникновения и условий развития. Среди клинико-морфологических форм некроза различают *коагуляционный (сухой)* некроз и *колликвационный (влажный)* некроз.

Коагуляционный некроз: при этом типе некроза погибшие клетки сохраняют свои очертания в течение нескольких дней. Клетки, лишённые ядра, выглядят как масса коагулированной, гомогенной, розовой цитоплазмы. Механизм

коагуляционного некроза недостаточно ясен. Коагуляция цитоплазматических белков делает их резистентными к действию лизосомальных ферментов и в связи с этим замедляется их разжижение.

Коагуляционный некроз обычно происходит в органах, богатых белками и бедных жидкостями, например, в почках, миокарде, надпочечниках, селезенке, обычно в результате недостаточного кровообращения и аноксии, действия физических, химических и других повреждающих факторов, например, коагуляционный некроз клеток печени при вирусном поражении или при действии токсических агентов бактериального и небактериального генеза. Коагуляционный некроз еще называют сухой, поскольку он характеризуется тем, что возникающие при нем мертвые участки сухие, плотные, крошащиеся, белого или желтого цвета.

К коагуляционному некрозу относят:

—инфаркт — разновидность сосудистого (ишемического) некроза внутренних органов (кроме мозга). Это самый частый вид некроза.

—казеозный (творожистый) некроз развивается и при туберкулезе, сифилисе, лепре, а также при лимфогрануломатозе. Его еще называют специфическим, поскольку чаще всего встречается при специфических инфекционных гранулемах. Во внутренних органах выявляется ограниченный участок ткани сухой, крошащийся, беловато-желтого цвета. В сифилитических гранулемах очень часто такие участки не крошащиеся, а пастообразные, напоминают аравийский клей. Это смешанный (то есть экстра- и интрацеллюлярный) тип некроза, при котором одновременно гибнет и паренхима, и строма (и клетки, и волокна). Микроскопически такой участок ткани бесструктурный, гомогенный, окрашен гематоксилином и эозином в розовый цвет, хорошо видны глыбки хроматина ядер (кариорексис).

—восковидный, или ценкеровский некроз (некроз мышц, чаще передней брюшной стенки и бедра, при тяжелых инфекциях - брюшном и сыпном тифах, холере);

—фибриноидный некроз — тип некроза соединительной ткани, который представлен как исход фибриноидного набухания. Наиболее часто он наблюдается при аллергических и аутоиммунных болезнях (например, ревматизме, ревматоидном артрите и системной красной волчанке). Наиболее

сильно повреждаются коллагеновые волокна и гладкая мускулатура средней оболочки кровеносных сосудов. Фибриноидный некроз артериол наблюдается при злокачественной гипертензии. Фибриноидный некроз характеризуется потерей нормальной структуры и накоплением гомогенного, ярко-розового некротического материала, который похож микроскопически на фибрин. Обратите внимание, что понятие "фибриноидный" отличается от понятия "фибринозный", так как последнее обозначает накопление фибрина, например, при свертывании крови или при воспалении. Участки фибриноидного некроза содержат различное количество иммуноглобулинов и комплемента, альбуминов, продуктов распада коллагена и фибрина.

—жировой некроз, ферментный и неферментный:

Ферментный жировой некроз: наиболее часто происходит при остром панкреатите и повреждениях поджелудочной железы, когда панкреатические ферменты выходят из протоков в окружающие ткани. Панкреатическая липаза действует на триглицерины в жировых клетках, расщепляя их на глицерин и жирные кислоты. При этом в жировой ткани, окружающей поджелудочную железу, появляются непрозрачные, белые (как мел) бляшки и узелки (стеатонекроз).

При панкреатитах возможно попадание липазы в кровоток с последующим широким распространением, что является причиной жирового некроза во многих участках организма. Наиболее часто повреждаются подкожная жировая клетчатка и костный мозг.

Неферментный жировой некроз: неферментный жировой некроз наблюдается в молочной железе, подкожной жировой ткани и в брюшной полости. Большинство пациентов имеют в анамнезе травмы. Неферментный жировой некроз называют также травматическим жировым некрозом, даже если травма не определена как основная причина. Неферментный жировой некроз вызывает воспалительный ответ, характеризуемый наличием многочисленных макрофагов с пенистой цитоплазмой, нейтрофилов и лимфоцитов. Затем следует фиброзирование, при этом данный процесс бывает трудно отличить от опухоли.

—гангрена (от греч. *gangraina* — пожар): это некроз тканей, сообщающихся с внешней средой и изменяющихся под ее воздействием. Термин "гангрена"

широко используется для обозначения клинико-морфологического состояния, при котором некроз ткани зачастую осложняется вторичной бактериальной инфекцией различной степени выраженности либо, находясь в соприкосновении с внешней средой, претерпевает вторичные изменения. Сюда относятся:

Сухая гангрена — это некроз тканей, соприкасающихся с внешней средой, протекающий без участия микроорганизмов. Сухая гангрена наиболее часто возникает на конечностях в результате ишемического коагуляционного некроза тканей. Некротизированные ткани кажутся черными, сухими, они четко отграничены от смежной жизнеспособной ткани. На границе со здоровыми тканями возникает демаркационное воспаление. Изменение цвета обусловлено превращением гемоглобиновых пигментов в присутствии сероводорода в сульфид железа. Примерами может служить сухая гангрена конечности при атеросклерозе и тромбозе ее артерий (*атеросклеротическая гангрена*), облитерирующем эндартериите; при отморожении или ожоге пальцев, кожи, при сыпном тифе и др. инфекциях; при болезни Рейно или вибрационной болезни;

Лечение состоит в хирургическом удалении мертвой ткани.

Влажная гангрена: развивается в результате наслоения на некротические изменения ткани тяжелой бактериальной инфекции. Под действием ферментов микроорганизмов возникает вторичная колликвация. Лизис клетки ферментами, которые возникают не в самой клетке, а проникают извне, называется гетеролизисом. Тип микроорганизмов зависит от локализации гангрены. Влажная гангрена развивается обычно в тканях, богатых влагой. Она может встречаться на конечностях, но чаще — во внутренних органах, например, в кишечнике при непроходимости брыжеечных артерий (тромбоз, эмболия), в легких как осложнение пневмонии (грипп, корь). У ослабленных инфекционным заболеванием (чаще корью) детей может развиваться влажная гангрена мягких тканей щек, промежности, которую называют номой (от греч. *nome* - водяной рак). Острое воспаление и рост бактерий являются причиной того, что некротическая область становится отечной и красно-черной, с обширным разжижением мертвой ткани. При влажной гангрене может возникнуть распространяющееся некротизирующее воспаление, которое не

четко ограничено от смежной здоровой ткани и, таким образом, трудно поддается хирургическому лечению. В результате жизнедеятельности бактерий возникает специфический запах. Очень высок процент летальности.

Газовая гангрена: возникает при инфицировании раны анаэробной флорой, например, *Clostridium perfringens* и другими микроорганизмами этой группы. Она характеризуется обширным некрозом ткани и образованием газов в результате ферментативной активности бактерий. Основные проявления сходны с влажной гангреной, но с дополнительным присутствием газа в тканях. Крепитация (феномен потрескивания при пальпации) - частый клинический симптом при газовой гангрене. Процент летальности также очень высок.

Пролежень (decubitus): как разновидность гангрены выделяют пролежни - омертвление поверхностных участков тела (кожа, мягкие ткани), подвергающихся сдавлению между постелью и костью. Поэтому пролежни чаще появляются в области крестца, остистых отростков позвонков, большого вертела бедренной кости. По своему генезу это трофоневротический некроз, так как сдавливаются сосуды и нервы, что усугубляет нарушения трофики тканей у тяжелобольных, страдающих сердечно-сосудистыми, онкологическими, инфекционными или нервными болезнями.

Колликвационный (влажный) некроз: характеризуется расплавлением мертвой ткани. Он развивается в тканях, относительно бедных белками и богатых жидкостью, где имеются благоприятные условия для *гидролитических процессов*. Лизис клеток происходит в результате действия собственных ферментов (*аутолиз*). Типичным примером влажного колликвационного некроза является очаг серого размягчения (ишемический инфаркт) головного мозга.

Инфаркт мозга часто называют размягчением, так как основным *макроскопическим* признаком является понижение упругости ткани мозга в очаге поражения во все сроки. В течение первых суток он представлен нечетко ограниченным участком синюшного оттенка, мягковатого на ощупь. К концу первых суток очаг становится более четким и бледнеет. В последующие дни вещество мозга в этой зоне становится еще более дряблым, цвет его становится желтоватым или даже с зеленоватым оттенком. В первые недели

объем мозга несколько увеличивается из-за отека его. Через 1-1.5 мес на месте инфаркта образуется довольно четко ограниченная полость, содержащая мутную жидкость и детрит. Определение точных сроков инфаркта весьма затруднительно не только по внешнему виду его, но и по гистологической картине.

Микроскопически ткань мозга гомогенная, бесструктурная, слабо розового цвета при окраске гематоксилином и эозином. Рассасывание мертвых тканей осуществляется макрофагами.

Клинические проявления некроза

Системные проявления: при некрозе обычно появляется лихорадка (вследствие выхода пирогенных веществ из некротизированных клеток и тканей) и нейтрофильный лейкоцитоз (вследствие наличия острой воспалительной реакции — демаркационного воспаления). *Высвобождение содержимого некротических клеток:* высвобождающиеся компоненты цитоплазматического содержимого некротизированных клеток (например, ферменты) поступают в кровоток, где их присутствие имеет диагностическое значение для определения локализации некроза. Эти ферменты могут быть обнаружены различными лабораторными методами (таблица 6.1). Специфичность появления ферментов зависит от преимущественной локализации фермента в различных тканях организма; например, повышение уровня МВ-изофермента креатинкиназы характерно для некроза миокарда, потому что этот фермент найден только в миокардиальных клетках. Повышение уровня аспаратаминотрансферазы (АСТ) менее специфично, так как этот фермент найден не только в миокарде, но также в печени и других тканях. Появление трансаминаз характерно для некроза печеночных клеток.

Местные проявления: Изъязвление слизистой оболочки желудочно-кишечного тракта может осложняться кровоизлиянием или кровотечением (пример — кровоточащая пептическая язва). Увеличение объема тканей в результате отека может вести к серьезному повышению давления в ограниченном пространстве (например, в полости черепа при ишемическом или геморрагическом некрозе).

Нарушение функции: некроз ведет к функциональной недостаточности органа, например, возникновение острой сердечной недостаточности в результате обширного некроза (инфаркта) миокарда (острая ишемическая болезнь

сердца). Тяжесть клинических проявлений зависит от типа, объема пораженной ткани относительно общего ее количества, сохранности функции оставшейся живой ткани. Некроз в одной почке не вызывает почечной недостаточности, даже когда теряется целая почка, потому что другая почка может компенсировать потерю. Однако, некроз маленькой области двигательной коры головного мозга приводит к параличу соответствующей группы мышц.

Исход некроза. Некроз — процесс необратимый. При *относительно благоприятном* исходе вокруг омертвевших тканей возникает *реактивное воспаление*, которое отграничивает мертвую ткань. Такое воспаление называется *демаркационным*, а зона отграничения — *демаркационной зоной*. В этой зоне кровеносные сосуды расширяются, возникают полнокровие, отек, появляется большое число лейкоцитов, которые высвобождают гидролитические ферменты и расплавляют некротические массы. Некротические массы рассасываются макрофагами. Вслед за этим размножаются клетки соединительной ткани, которая замещает или обрастает участок некроза. При замещении мертвых масс соединительной тканью говорят об их *организации*. На месте некроза в таких случаях образуется *рубец* (рубец на месте инфаркта). Обрастание участка некроза соединительной тканью ведет к его *инкапсуляции*. В мертвые массы при сухом некрозе и в очаг омертвения, подвергшийся организации, могут откладываться соли кальция. В этом случае развивается *обызвествление (петрификация)* очага некроза. В некоторых случаях в участке омертвения отмечается образование кости - *оссификация*. При рассасывании тканевого детрита и формировании капсулы, что встречается обычно при влажном некрозе и чаще всего в головном мозге, на месте омертвения появляется полость— *киста*.

Неблагоприятный исход некроза - гнойное (септическое) расплавление очага омертвения. Секвестрация - это формирование участка мертвой ткани, который не подвергается аутолизу, не замещается соединительной тканью и свободно располагается среди живых тканей. Секвестры обычно возникают в костях при воспалении костного мозга - остеомиелите. Вокруг такого секвестра образуется секвестральная капсула и полость, заполненная гноем. Нередко секвестр выходит из полости через свищи, которые закрываются

лишь после полного его выделения. Разновидность секвестрации - мутиляция - отторжение концов пальцев.

Значение некроза. Оно определяется его сущностью - “местной смертью” и выключением из функции таких зон, поэтому некроз жизненно важных органов, особенно крупных участков их, нередко ведет к смерти. Таковы инфаркты миокарда, ишемические некрозы головного мозга, некрозы коркового вещества почек, прогрессирующий некроз печени, острый панкреатит, осложнившийся панкреонекрозом. Нередко омертвление ткани является причиной тяжелых осложнений многих заболеваний (разрыв сердца при миомаляции, параличи при геморрагическом и ишемическом инсультах, инфекции при массивных пролежнях, интоксикации в связи с воздействием на организм продуктов тканевого распада, например, при гангрене конечности и т.д.). Клинические проявления некроза могут быть самыми разнообразными. Патологическая электрическая активность, возникающая в областях некроза в мозге или миокарде, может приводить к эпилептическим припадкам или сердечной аритмии. Нарушение перистальтики в некротизированной кишке может вызвать функциональную (динамическую) кишечную непроходимость. Нередко наблюдаются кровоизлияния в некротизированную ткань, например, кровохаркание (hemoptysis) при некрозе легкого.

Процесс повреждения клетки при некрозе

Среди многих причин, вызывающих гибель клеток по некротическому типу, на первом месте стоит *ишемия*. Первично она развивается на фоне сердечно-сосудистых заболеваний и травм, а в ряде других случаев, она является ведущим типом повреждения клеток.

Ишемию обычно определяют, как снижение притока крови к тканям, что сопровождается снижением концентрации кислорода и субстратов окисления. По степени выраженности ишемия может быть полной или частичной. В эксперименте полную ишемию моделировать не удастся в связи с системой коллатерального кровообращения, да и на практике она проявляется не так уж часто.

Процесс повреждения и гибели клеток в условиях ишемии был исследован на тканях трех типов: на миокарде, почках и в печени, для которых эта патология имеет существенное значение.

С биохимической точки зрения у клеток чаще всего исследуют:

фазу начальных изменений;

фазу обратимых изменений;

фазу необратимых изменений;

фазу появления некроза.

Рассмотрим эти стадии гибели клетки.

Фаза начальных изменений

В случае ишемии ситуация более или менее ясна: речь идет о прекращении поступления кислорода и субстратов и о замедлении выведения продуктов обмена веществ. Все это в начальной фазе не сопровождается структурными изменениями, и проявляется в виде нарушений обмена энергии, что и является основным типом функциональных нарушений клетки как в этой стадии, так и в последующей.

В физиологических условиях кислород, как известно, проникает внутрь митохондрий путем свободной диффузии, где становится конечным акцептором электронов в системе транспорта электронов по дыхательной цепи. Транспорт электронов в системе обеспечивает векторный перенос протонов через внутреннюю митохондриальную мембрану. Возникший градиент протонов становится кладовой энергии, находящейся в двух формах: 1) в форме градиента концентрации, созданного разницей концентрации протонов (H^+) и, следовательно, разными значениями рН по обеим сторонам внутренней митохондриальной мембраны; 2) в форме электрического градиента, обусловленного разной концентрацией зарядов. Концентрационный градиент обеспечивает энергией образование АТФ, АДФ, неорганического фосфата и, кроме того, способствует транспорту Ca^{2+} из цитоплазмы в митохондрии, связанного с Na^+/H^+ обменом. В физиологических условиях протоны никаким другим способом не могут пройти через внутреннюю митохондриальную мембрану.

В случае снижения или даже прекращения притока кислорода происходит следующее: прекращается транспорт электронов по дыхательной цепи, т.к. отсутствует конечный акцептор. В результате этого прекращается создание градиента протонов. В дальнейшем прекращается транспорт Ca^{2+} внутрь митохондрий. Более того, отмечается обратно направленное движение

этих ионов, так как обычно концентрация Ca^{2+} в митохондриях значительно превышает их содержание в цитоплазме. Прекращается выход Na^+ из митохондрий и замедляется или останавливается синтез АТФ. В дальнейшем:

изменяется соотношение концентрации адениловых нуклеотидов:
 $[\text{АТФ}] / [\text{АДФ}] + [\text{АМФ}]$,

активируется гликолиз, увеличивается концентрация лактата,
 снижается концентрация субстратов цикла трикарбоновых кислот.

Однако активность ферментов дыхательной цепи не изменяется на протяжении всего периода обратимого поражения клетки. Их обратимость и обусловлена, тем, что после восстановления притока кислорода и субстратов транспорт электронов и образование АТФ восстанавливается в полном объеме.

Фаза обратимых изменений

Среди субклеточных структур изменения чаще всего встречаются в митохондриях. По мере снижения образования АТФ наблюдается конденсация матрикса митохондрий. Эта ситуация напоминает физиологическую стадию перехода от состояния покоя митохондрий (состояние 4) к активному дыханию (состояние 3), которая регулируется содержанием АДФ. В физиологических условиях при избытке АДФ матрикс приобретает "конденсированную форму", но в присутствии кислорода моментально увеличивается транспорт электронов, усиливается окислительное фосфорилирование и матрикс вновь принимает "ортодоксальную форму".

Конденсация матрикса митохондрий осуществляется за счет изменения конформации структур матрикса. Кроме того, в матриксе начинают накапливаться ионы натрия и вода за счет усиления проницаемости внутренней митохондриальной мембраны. Матрикс постепенно приобретает вид, очень похожий на "ортодоксальный", но затем он увеличивается в объеме, что проявляется увеличением объема всей митохондрии и деформацией крист. Постепенное снижение рН матрикса митохондрии приводит к частичной денатурации находящихся в нем белков, что проявляется наличием мелких хлопьевидных структур, содержащих, как правило, Ca^{2+} . И все-таки до этого момента все структурные изменения митохондрий обратимы.

Мембранные структуры эндоплазматического ретикулума (ЭПР) вначале не подвергаются никаким изменениям, но их проницаемость увеличивается.

Ядро клетки с самого начала возникновения гипоксии подвергается ряду изменений, прогрессивно усугубляющихся, но ещё обратимых. Прежде всего это относится к перераспределению хроматина в ядре, что зависит от постоянного снижения рН среды, и представляет собой основу для прекращения синтеза РНК.

В стадии обратимого повреждения клетки возможно восстановление гомеостаза при увеличении кровотока и притока кислорода, структурные изменения клетки и её органелл при этом исчезают.

Фаза необратимых изменений

Характеризуется углублением метаболических и структурных изменений. Клетка на этой стадии теряет способность поддерживать механизмы гомеостаза. В результате этого стимулируются процессы катаболизма, связанные, прежде всего, с лизосомами. Отмечается перераспределение ионов между цитоплазмой клетки и окружающей средой, что в конечном итоге приводит к выравниванию их концентраций внутри и снаружи клетки. Происходит набухание митохондрий, с расширением внутреннего и внешнего компартментов, они теряют способность к синтезу АТФ. Из митохондриальных мембран исчезают молекулы фосфатидилхолина и фосфатидилсерина и возникают мультимембранные структуры, похожие на липосомы, что, очевидно, обусловлено взаимодействием фосфатидных кислот, возникающих в результате расщепления фосфолипидов. Рибосомы отделяются от мембран ЭПР, а плазматические мембраны становятся проницаемыми для макромолекул (белки, ферменты). Затем цитоплазма резко увеличивается в объеме, внутриклеточные органеллы растворяются и плазматическая мембрана разрушается.

Можно наблюдать первые признаки фрагментации мембран, сопровождающихся проникновением витальных красителей внутрь клетки. Лизосомы начинают увеличиваться в объеме.

Фаза появления зон некроза

Характеризуется прогрессирующей дезинтеграцией клеточных структур. Происходит расщепление молекул ДНК, РНК и белков, наблюдается увеличение неорганического фосфата и аминокислот в клетке.

Особая роль в процессе деградации макромолекул отводится гидролазам, выходящим из лизосом и активируемых кислой реакцией среды. Разрушается структура ядра, образуются фрагменты мембран митохондрий, ЭПР. Происходит снижение рН среды до 4,0–5,0. В опытах на почках крыс, проведенных при 0° С, нормальные значения всех ключевых метаболитов и ультраструктурных характеристик отмечались на протяжении 2 часов после начала ишемии. При 37°С этот период для клеток почек составлял 25–40 мин.

В зависимости от факторов, вызывающих указанные изменения, и интенсивности их воздействия они сказываются только на скорости указанных процессов, но ни в коей мере на их последовательности. В ряде случаев, например, при тяжелом ожоге, необратимые изменения происходят мгновенно и некроз является первым признаком поражения клеток.

Тепловой ожог как пример повреждения клеток при некрозе

Местом приложения действия теплового ожога являются молекулы белков, которые подвергаются структурным изменениям различного характера: от обратимой денатурации до минерализации с освобождением углерода при обугливания. Местом проявления действия теплового ожога в первую очередь становятся молекулы белков мембран в эндотелиальных клетках капилляров кожи. В результате повреждения повышается проницаемость эндотелия и плазма крови (главным образом, альбумин) выходит в интерстиций. В интерстициальном пространстве накапливается содержащая альбумин жидкость, наблюдается отек. Увеличению объема ткани в месте повреждения способствует и нарушение транспортных процессов в мембранах клеток пораженной области. Скопление жидкости в интерстиции приводит к повышению притока крови к пораженному участку. В очаге некроза происходит снижение рН, активируются протеолитические ферменты. В результате этого образуются биологически активные вещества, прежде всего брадикинин.

Брадикинин усиливает проницаемость, вызывает дилатацию сосудов, стимулирует образование простагландина E₂. Важным свойством брадикинина

является его стимулирующее действие на деление лимфоцитов, связанное с модификацией иммунного ответа.

При обратимых изменениях мембран и транспортных механизмов постепенно восстанавливается исходное состояние, а отек исчезает. В противном случае, поврежденные клетки постепенно погибают. До сих пор неизвестно никакого химического метода, с помощью которого можно было бы в данной ситуации отличить обратимые и необратимые изменения мембран.

При очень сильном тепловом воздействии часть клеток погибает уже в момент его приложения и продукты их распада покрывают большую или меньшую часть поверхности (некрозы). Так как участки некроза лишены каких-либо защитных свойств, они становятся благоприятной почвой для микробов самых разных видов.

С момента ожога пораженный организм постоянно и длительно находится под влиянием катехоламинов (адреналина), высвобождающихся в результате центрального влияния, что вызвано стрессом (боль, страх и т.п.). Организм в течение первых часов после травмы может обеспечить себе необходимый уровень глюкозы за счет расщепления гликогена в печени (переход фосфоорилазы b в фосфоорилазу a). Однако запасы гликогена в печени (около 200 г) будут исчерпаны в течение нескольких часов.

Для создания необходимого уровня глюкозы в крови будут включаться дополнительные механизмы, в том числе активация глюконеогенеза. Глюкоза в этом случае образуется из аминокислот с разветвленной цепью – валина, изолейцина, лейцина, высвобождающихся в результате внутриклеточного гидролиза. После переаминирования и декарбоксилирования они через сукцинил-КоА превращаются в оксалоацетат и пируват. Пируват, с помощью той же трансаминазы, превращается в аланин, который с кровью переносится в печень, где дезаминируется. Пируват в процессе глюконеогенеза в печени превращается в глюкозу.

В течение первых дней после повреждения этим путем разрушается до 75 г мышечных белков ежедневно. Затем это количество снижается. Расщепление белков сопровождается выходом K^+ из клеток и его повышенным

выведением из организма. Потеря 1г азота с мочой обычно сопровождается потерей 2,5 – 3,0 молей K^+ .

Ускоряется разрушение жиров и жирных кислот путем окисления в гепатоцитах, что приводит к увеличению содержания ацетил-КоА. Возникает относительная недостаточность пирувата, а, следовательно, и оксалоацетата, который мог бы возникнуть из пирувата в результате реакций карбоксилирования. Поэтому избыток ацетил-КоА не может быть превращен в цитрат и затем окислен в цикле трикарбоновых кислот. Он становится источником кетоновых тел (ацето-ацетата и β -гидроксibuтирата), которые вместе с лактатом способствуют возникновению метаболического ацидоза.

Было показано, что при обширных ожогах повышенное испарение воды с раневой поверхности, видимо, не является первичной причиной повышения обмена веществ, как предполагалось раньше. Очевидно, стимуляция метаболизма осуществляется в результате усиленного продуцирования адреналина. Под влиянием адреналина происходит разобщение окислительного фосфорилирования и усиленное выделение тепла. Наряду с этим усиливается гидролиз АТФ, следствием чего является повышение температуры тела. Поэтому всегда нужно стараться снизить образование или ослабить действие адреналина. После коррекции параметров внутренней среды нужно обеспечить достаточный приток энергии, возместить потерю белков и обеспечить достаточный перенос кислорода к пораженным клеткам.

Характеристика апоптоза

Процесс гибели клетки состоит из четырех отдельных стадий: *начальной, эффекторной, стадии деградации и поглощения*. Если проапоптозные сигналы в начальной стадии преобладают над антиапоптозными, то клетка автоматически переходит в эффекторную стадию, в которой запускаются каспазы. Стадия деградации представляется типичными морфологическими и биохимическими изменениями, является неуправляемой и необратимой. В конечной стадии активированные фагоциты поглощают апоптозные тельца. Нарушение регуляции каждой фазы может привести к развитию патологического процесса.

Запуск апоптоза осуществляется через внутриклеточные и внеклеточные сигналы (табл.2). К **внутриклеточным** сигналам относятся: повреждения

хромосом, нарушения конформации ДНК, одно- и двунитевые разрывы, сшивки между цепями. Иногда пусковым моментом являются повреждения внутриклеточных мембран, особенно митохондрий, в результате перекисного окисления липидов. Повреждения структуры мембраны происходят при образовании больших количеств окиси азота, супероксидных радикалов. Особое значение имеет дефицит факторов роста. **Внеклеточные** сигналы осуществляют свое действие через рецепторы клетки, специально предназначенные для включения программы апоптоза. Сигнал воспринимается рецептором и подвергается анализу. Далее через рецепторы или их сочетания полученный сигнал последовательно передается молекулам-посредникам (мессенджерам) различного порядка и в конечном итоге достигает ядра, где и происходит включение программы клеточного самоубийства.

Таблица 2

Сигналы апоптоза

Внутриклеточные сигналы	Повреждения хромосом Нарушения структуры ДНК Повреждения структуры мембран Окислительный стресс Активация Bcl-2 Факторы роста Прекращение цитокиновой регуляции Ионизирующие излучения УФ-излучение
Внеклеточные сигналы	Fas-лиганды TNF (ФНО) Глюкокортикоиды

Примерами апоптоза являются отрицательная селекция тимоцитов при активации антигенами, цитокинами, Fas-лигандом, элиминация аутореактивных Т-клеток в тимусе, селекция В-клеток в лимфоидных

фолликулах. Известно также удаление с помощью апоптоза стареющих нейтрофильных лейкоцитов и мегакариоцитов, потерявших большую часть своей цитоплазмы при образовании тромбоцитов. Цитолитическое действие Т-киллеров связано с тем, что на поверхности клеток-мишеней имеется рецепторный белок Fas, а на поверхности Т-киллеров – Fas-лиганд (Fas-L). Их взаимодействие запускает в клетке-мишени процесс апоптоза.

Дефицит ростовых факторов чаще всего имеет значение в регуляции кроветворения. Для развития лимфоидных и миелоидных клеток, как известно, необходимы определенные цитокины – например, колониестимулирующие факторы. В отсутствие этих факторов клетки, вступившие на определенный этап развития, погибают, в них запускается механизм апоптоза.

Под влиянием глюкокортикоидов гибнут популяции Т-клеток, локализованные в коре тимуса, и Т-лимфоцитов крови. Глюкокортикоиды участвуют в реализации хронического стресса путем усиления катаболизма белков в лимфоидной и соединительной ткани и обеспечения стимуляции биосинтетических процессов в печени, имеющих существенное значение для снабжения метаболитами жизненно важных органов - мозга и сердца.

Схема развития апоптоза с включением перечисленных механизмов представлена на рис.2. При повреждении внутриклеточных структур, особенно хромосом и мембран, происходит передача сигнала на транскрипционный фактор p53 через ДНК-протеинкиназу. На следующем этапе повышается проницаемость митохондриальных мембран, благодаря влиянию p53 на гены семейства Bcl-2, а также из-за непосредственного повреждения мембран. Затем включается каспазный каскад, происходит частичный протеолиз многочисленных белков-мишеней каспазами. В последствии наблюдается конденсация хроматина, активация ядерных эндонуклеаз, изменение липидного состава плазматической мембраны. На последних стадиях эндонуклеазы приводят к постепенной фрагментации хроматина, затем ядра и цитоплазмы с образованием апоптозных телец. Этот этап сопровождается фагоцитозом этих телец окружающими клетками.

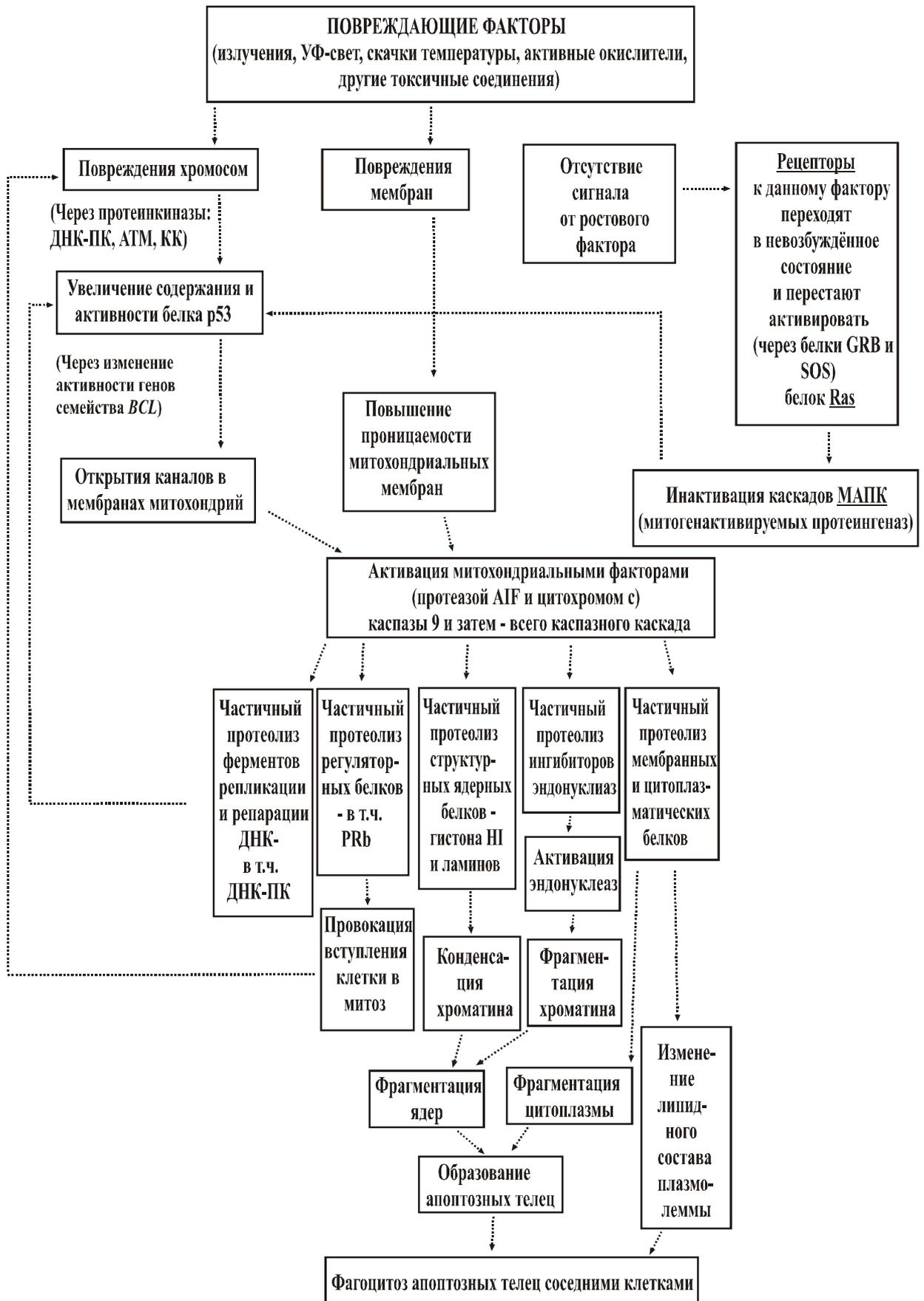


Рис. Схема апоптоза

В случае, когда апоптоз развивается в результате дефицита ростовых

факторов, события могут развиваться следующим образом. В начале изменяется состояние рецепторов ростового фактора, расположенного на плазматической мембране клетки. Из-за отсутствия сигнала от рецептора инактивируются каскады *МАПК* (*митогенактивируемых протеинкиназ*), нарушается передача сигнала на белок p53. В результате активность данного белка возрастает. После этого ход апоптоза практически не отличается от предыдущего (открытие каналов в мембранах митохондрий, активация каспаз).

Действие разнообразных проапоптотических сигналов направлено на активацию каспаз, специфических протеолитических ферментов участвующих в реализации апоптоза. Основные пути апоптоза, связаны с активацией каспаз двух типов:

- 1) активация каспазы-9 - повреждение ДНК, радиация, действие токсических агентов, глюкокортикоидов, прекращение цитокиновой регуляции, укорочение до критического уровня теломеров;
- 2) активация каспазы-8 - проапоптотические сигналы, возникающие при активации рецепторов «региона клеточной смерти» (например, Fas-R, TNF-R).

Одним из важных моментов при повреждении ДНК является активация гена *p53*. Дальнейшее прохождение апоптотического сигнала этого типа происходит через активацию проапоптотических генов семейства *Bcl2* (*Bax* и *Bid*). Белки, являющиеся продуктами этих генов, вызывают повышение проницаемости мембраны митохондрий и выход в цитозоль цитохрома *c*, dATP, апоптоз индуцирующего фактора *Aif* и ДНКазы. Цитохром *c* вместе с dATP активирует находящийся в цитозоле белок АРАФ-1, образуя апоптосому, в которой происходит активация каспазы-9. Последняя активирует каспазу-3. Вслед за этим активируются другие каспазы, протеазы и ДНКазы. Высвобожденные из митохондрий *Aif* и ДНКаза выполняют дополнительный внекаспазный путь апоптоза, реализуют свою активность непосредственно в ядре.

Связывание рецепторов «региона клеточной смерти» с соответствующими лигандами приводит к активации каспазы-8, способной к

независимой активации каспазы-3. На этом пути может происходить дополнительное вовлечение генов семейства *Bcl2* путем активации каспазой-8 белков гена *Bid* (рис.3)

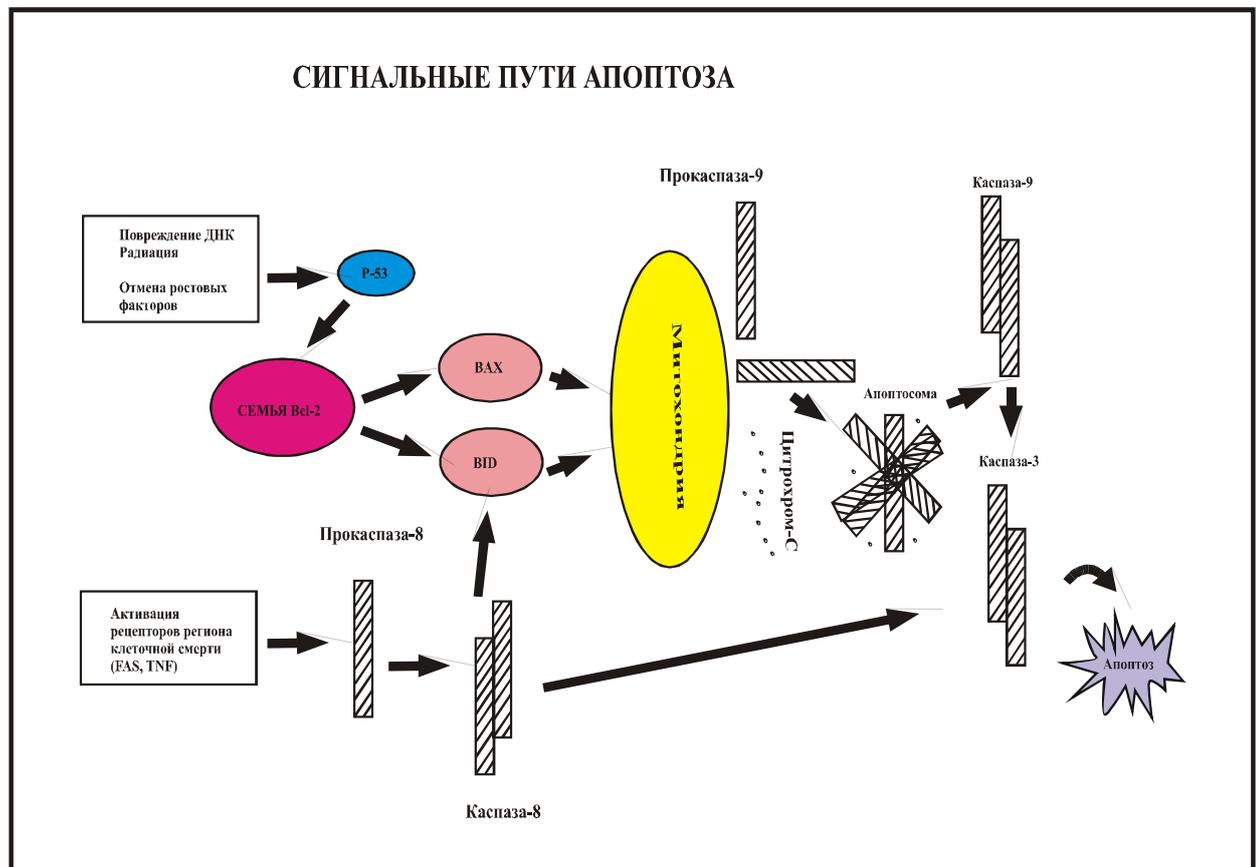


Рис.3. Сигнальные пути апоптоза

Подавляющее большинство известных цитотоксических агентов вызывает гибель клетки с использованием описанных механизмов передачи сигнала. Так, УФ-излучение приводит к резкому повышению экспрессии одного из «рецепторов смерти», Fas-антигена, который, активируясь запускает гибель клетки с участием FADD, каспаз и нуклеазы. Агенты, повреждающие ДНК, как правило, запускают каспазный каскад через изменение экспрессии генов семейства *Bcl-2*, причем таким образом, что активируются проапоптотические гены семейства. Цитотоксические факторы, связывающиеся с рецепторами, отличными от «рецепторов смерти», как правило, активируют каспазы путем передачи сигнала через те или иные адаптерные белки на FADD или RIP или посредством активации транскрипции упомянутых выше генов.

Различные пути апоптоза могут взаимодействовать между собой. В некоторых случаях зависимый от рецепторов путь ведет к малоэффективной активации прокаспазы-8. В этом случае подключается зависимый от митохондрий путь апоптоза. Каспаза-8, образовавшаяся в небольших количествах, взаимодействует в цитоплазме с белком Bid из семейства Bax, расщепляя его надвое. С-концевой домен Bid далее внедряется в митохондриальную мембрану, индуцируя выход цитохрома c из митохондрий и его связывание с APAF-1.

Физиологические активаторы апоптоза

Хотя при развитии организма апоптотическая гибель представляется как запрограммированное событие, в этом процессе участвуют внеклеточные факторы – индукторы апоптоза. Сейчас является общепринятым мнение, что пусковые сигналы и начальные механизмы его развития могут быть довольно разнообразными и лишь на определенном этапе они вливаются в единый путь, реализуются в виде стандартного механизма. Наиболее известные индукторы и ингибиторы апоптоза представлены в табл.3.

Таблица

3

Индукторы и ингибиторы апоптоза

Индукторы	Ингибиторы
Глюкокортикоиды антигены цитокины УФ и γ -излучение Ca^{2+} Fas / APO-1 (CD95) ced-3, ced-4 TNF α -интерферон Церамид Ca^{2+} -зависимая трансглутаминаза Фосфатидилсерин p53 c-myc	Bcl-2 (bcl-x, BAX) теломераза мутация p53 p35 Zn^{2+} ингибиторы синтеза РНК и белка ингибиторы протеиназ γ -интерферон

К индукторам апоптоза относятся цитокины, интерлейкины, фактор некроза опухоли (TNF), интерфероны, колониестимулирующие факторы,

эпидермальный фактор роста, инсулиноподобный фактор роста, и гормоны (глюкокортикоиды, половые гормоны, гормоны гипофиза). Следует заметить, что их действие неоднозначно: для одних клеток они выступают в роли индукторов апоптоза, для других – в роли ингибиторов. Это зависит от типа клетки и стадии ее дифференцировки. Очевидно, для осуществления нормальной регуляции система должна находиться в постоянном динамическом равновесии.

В результате взаимодействия лигандов со специфическими рецепторами происходит активация апоптозоспецифических сигналпередающих систем: протеинкиназы С (ПКС), церамида, кальция, активных форм кислорода и т.д., что приводит к активации апоптозоспецифических генов и запуска программы апоптоза.

В регуляции апоптоза принимают участие *гормоны*. Центральное место в исследованиях апоптогенного действия гормонов принадлежит изучению действия глюкокортикоидов на лимфоидные клетки. Для многих видов животных, в том числе и человека, характерна чувствительность незрелых тимоцитов к глюкокортикоид-индуцированному апоптозу, которая зависит от стадии дифференцировки лимфоцитов. Было показано, что натуральные киллеры и цитотоксические Т-лимфоциты, а также В-клетки претерпевают апоптоз под действием глюкокортикоидов. Стероидные гормоны оказывают дифференцированный эффект на различные типы клеток – предотвращают апоптоз одних типов клеток и индуцируют его у других.

Важная роль в регуляции апоптоза клеток иммунной системы принадлежит *цитокинам* – интерлейкинам (ИЛ), интерферонам (ИФН), факторам роста. Было обнаружено, что ИЛ являются индукторами апоптоза как в здоровых, так и в опухолевых клетках и клеточных линиях. ИЛ-12, к примеру, индуцирует апоптоз натуральных киллеров, ИЛ-4 и ИЛ-10 – периферических моноцитов человека, ИЛ-10 – Т-лимфоцитов.

Кроме вышперечисленных факторов самого организма, апоптоз лимфоидных клеток могут вызывать и скрытые *антитела*. Последние взаимодействуют с отрицательно заряженными фосфолипидами: кардиолипином, фосфатидилсеринном, углеводами. Было показано, что инкубация *in vitro* лимфоцитов со скрытыми антителами приводит к

транслокации фосфатидилсерина с внутренней стороны мембраны на внешнюю, что является начальным этапом апоптоза. Возможным регулятором апоптоза считается также *ретиноевая кислота*. Причем индукция апоптоза происходит при участии ретиноидных X-рецепторов (RXR). Ретиноевая кислота и ее рецепторы также являются не только индукторами, но и ингибиторами апоптоза.

Белок p53. Предполагалось, что одной из функций программы клеточной гибели является элиминация постоянно возникающих клеток с онкогенными свойствами. Подтверждением этой гипотезы является открытие белка p53, индуктора апоптоза и опухолевого супрессора.

Белок p53 является фактором транскрипции, способным узнавать специфические последовательности ДНК, регулировать активность ряда генов. Белок p53 активирует несколько генов (WAF1 / Cip1, ингибитор циклин-зависимой киназы, ген остановки роста, p26-ген, вызывающий развитие рабдомиосаркомы), которые задерживают деление клеток в фазе G₁. После действия факторов, вызывающих повреждение ДНК (радиация, УФ-облучение) экспрессия гена p53 в клетках существенной усиливается.

Предполагается, что ответная реакция на образование белка p53 зависит от степени нарушения клеточного генома. При умеренном нарушении генома происходит остановка клеточного деления, осуществляется репарация ДНК, и клетка продолжает свое существование. При чрезмерном нарушении генома, когда ДНК уже не поддается репарации, включаются рецепторный и цитохром c-зависимый апоптозные каскады активации каспаз.

Сигналпередающие пути индукции апоптоза в клетке

В настоящее время не найдено апоптозоспецифической сигнальной системы. Однако все многообразие действия различных активаторов апоптоза можно свести к нескольким сигналпередающим системам. В первую очередь, это *кальцийзависимый путь* передачи сигнала, который активируется при действии ряда цитокинов и глюкокортикоидов на различные клетки. В результате индукции в клетке происходит активация протеинкиназы C, приводящая к образованию ряда вторичных мессенджеров. Важное значение придается ИТФ, который способствует выходу кальция из ЭПР в цитозоль, в результате чего активируются кальцийзависимые процессы. Роль кальция, по-

видимому, сводится к непосредственной активации Ca^{2+} - и Mg^{2+} -зависимых эндонуклеаз, разрушению цитоскелета и образованию апоптозных телец путем активации Ca^{2+} -зависимой протеазы – кальпаина, регуляции транскрипции генов и вступления в клеточный цикл, активации Ca^{2+} -зависимой трансклутаминазы II, которая приводит к перекрестному сшиванию белков.

Другой путь – активация *сфингомиелиназы*, необходимой для активации апоптоза под действием ИЛ-1, TNF, а также в Fas-индуцируемых системах. Этот путь начинается с ферментативного гидролиза сфингомиелина до фосфатидилхолина и церамида. Основной мишенью действия церамида является цитозольная протеинфосфатаза, что приводит к активации целого ряда специфических протеаз, в результате чего развивается апоптоз.

Еще один путь активации – образование *активных форм кислорода*. Через окислительный стресс опосредует свое действие ионизирующее и ультрафиолетовое излучения. Некоторые лекарственные средства индуцируют образование в клетке свободных радикалов. По такому же механизму действует и ФНО, который вызывает быстрое увеличение активных форм кислорода (АФК) в различных типах клеток и апоптоз. Существуют данные о том, что АФК реализуют свое действие через увеличение внутриклеточной концентрации кальция и повышение фосфорилирования белков, что приводит к изменению экспрессии генов. Возможно, что сигнал от АФК передается через циклический АМФ.

Межнуклеосомная деградация ДНК

При повреждении ДНК сначала происходит образование крупных фрагментов ДНК, содержащих 700, 200-250 пар оснований. Уже на этой стадии регистрируются конденсация хроматина и выпячивание ядерной мембраны, характерные для апоптоза, а процесс становится необратимым. Затем наступает очередной этап деградации, который хорошо изучен и является основным признаком апоптоза – *межнуклеосомная деградация ДНК*, т.е. разрывы нитей ДНК, находящихся между нуклеосомами.

Нуклеосома представляет собой глобулу из 8 белковых молекул, она включает по 2 молекулы гистонов H2A, H2B, H3 и H4. Вокруг одной такой глобулы молекула ДНК делает примерно два оборота. При межнуклеосомной деградации образуются фрагменты ДНК, кратные по величине 180 – 200 пар

оснований, что соответствует протяженности нити ДНК в пределах одной нуклеосомы. Этот этап обычно завершается в течение суток.

Фрагментация ДНК может происходить в результате расщепления антиапоптозных белков семейства Bcl-2. При этом ингибитор ДНКазы, ответственный за фрагментацию ДНК подвергается протеолизу под действием каспаз. В нормальных клетках апоптозная ДНКаза CAD (caspase-activated DNAase) образует неактивный комплекс с ингибитором CAD, обозначаемым I^{CAD} или DFF (DNA fragmentation factor). При апоптозе ингибитор I^{CAD} с участием каспаз 3 или 7 инактивируется. Свободная CAD, вызывая межнуклеосомальные разрывы хроматина, ведет к образованию фрагментов ДНК с молекулярной массой 180-200 пар нуклеотидов.

Апоптоз возможен и без фрагментации ДНК. Обнаружен ядерный белок Acinus (apoptotic chromatin condensation inducer in the nucleus), из которого при комбинированном действии каспазы-3 (протеолиз при Asp 1093) и неидентифицированной протеазы (протеолиз при Ser 987) образуется фрагмент Ser 987 – Asp 1093. Этот фрагмент в присутствии дополнительных неядерных факторов вызывает апоптотическую конденсацию хроматина и фрагментацию ядра (кариорексис) без фрагментации ДНК.

При электрофоретическом разделении ДНК апоптотических клеток в агарозном геле выявляется характерная "лестница", образованная участками, кратными длине самых коротких межнуклеосомных фрагментов (рис.4).

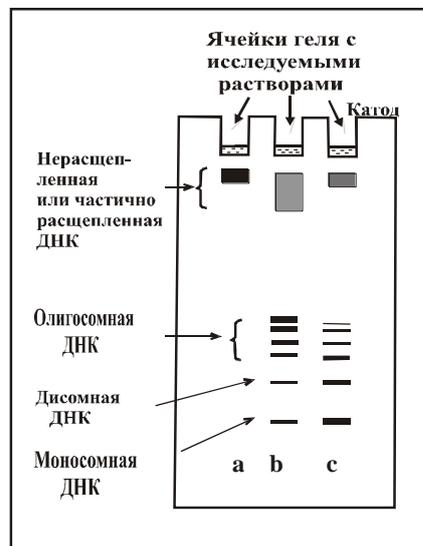


Рис. Электрофорез ДНК в геле, а-интактная ДНК, б-инкубация 40 мин, с -инкубация 2 часа.

Этот показатель широко используется для идентификации апоптоза. Межнуклеосомная деградация ДНК при апоптозе обусловлена активацией ядерной Ca^{2+}, Mg^{2+} -зависимой эндонуклеазы. Ca^{2+}, Mg^{2+} -зависимая эндонуклеаза расщепляет ДНК не в случайных местах, а только в линкерных (межнуклеосомных) участках. Поэтому хроматин не подвергается полному лизису, а лишь фрагментируется. Молекулярная масса Ca^{2+}, Mg^{2+} -зависимой эндонуклеазы 18000 Да. В интактных клетках она входит в состав высокомолекулярного комплекса с массой 100000 Да, где её активность угнетена. Под действием индукторов фермент высвобождается из этого комплекса и становится активным.

Ионы Ca^{2+} . Роль ионов Ca^{2+} в осуществлении межнуклеосомной деградации ДНК и развитии апоптоза связывают с активацией Ca^{2+}, Mg^{2+} -зависимой эндонуклеазы. Повышение внутриклеточной концентрации Ca^{2+} регистрируется при действии многих, но не всех индукторов апоптоза (например: глюкокортикоидов, антител к рецепторному комплексу TCD-CD3). Препараты, повышающие уровень Ca^{2+} (ионофоры) вызывают апоптоз тимоцитов, но не зрелых Т-клеток. Дело в том, что для активации апоптоза Т-клеток необходимо сочетанное действие ионофора Ca^{2+} и активатора протеинкиназы С (обычно для этой цели используют фоболмиристат), тогда как для включения апоптоза тимоцитов достаточно действия одного ионофора.

Ключевые механизмы на поздних этапах передачи сигнала связаны с экспрессией генов апоптоза и проявлением активности *каспаз*, а также сериновых протеиназ — *гранзимов* и *цитолизин*ов.

Механизмы индукции апоптоза при повреждении ДНК. Важная роль в индукции апоптоза принадлежит белку p53. Этот белок с молекулярной массой 53 кД локализован в ядре клетки и является одним из транскрипционных факторов. Под влиянием белка p53 клетки, имеющие множественные разрывы ДНК, задерживаются в фазе G_1 , а если входят в S-фазу (например, в случае опухолевой трансформации), то подвергаются апоптозу. Повышенная экспрессия гена p53 приводит к репрессии ряда генов, регулирующих транскрипцию и причастных к задержке клеточного цикла в фазе G_1 . Блок клеточного цикла в фазах G_1 и G_2 делает возможной репарацию ДНК.

Белок p53 синтезируется в клетке постоянно, но быстро разрушается, так что его концентрация в клетках в обычных условиях оказывается весьма низкой. При наличии в клетке хромосомных повреждений и повреждений ДНК происходит «включение» гена *p53*. Активация белка p53 приводит к транскрипции гена p21 - ингибитора всех комплексов *циклин-Cdk* и остановке клеточного цикла. Если повреждения хромосом достаточно велики и их исправление за счет включения ДНК-полимеразы и ДНК-лигазы затягивается, то длительно сохраняющий свою активность белок p53 начинает стимулировать серию других генов, запускающих апоптоз через «киллерные» рецепторы (*Fas*, *Bax*, *Killer/DR5*, *Pig*). Одновременно ингибируются антиапоптозные гены (*Bcl2*, *Rela*).

Белок p53 активирует и такие гены, продукты которых выделяются из гибнущей клетки и воздействуют на её окружение. Например, торможение ангиогенеза реализуется через гены *Tsp*, *Vas*. При этом клетки с начавшимся апоптозом секретируют белки (тромбоспондин и др.), подавляющие новообразование сосудов в соседней ткани. Этот эффект составляет основу такой важной функции апоптоза как ограничение опухолевого роста.

Мутация гена p53 позволяет клеткам с поврежденной ДНК завершать митоз, сохраняет клетки, подвергшиеся опухолевой трансформации, при этом клетки оказываются резистентными к лучевой и химиотерапии. Мутантная форма белка p53 не обладает способностью останавливать клеточный цикл.

В ряде случаев программируемая гибель клетки (ПГК) реализуется в результате комбинированного действия двух путей – с участием и рецепторов плазматической мембраны, и митохондриального цитохрома *c*. Так, повреждение ДНК ведет к накоплению в клетке белкового продукта гена p53, который может останавливать деление клеток и/или индуцировать апоптоз. У более чем 50% изученных видов опухолевых клеток ген p53 инактивирован, у них нарушена p53-зависимая регуляция клеточного гомеостаза.

Окислительный стресс

Кроме каспаз и эндонуклеаз разрушению клеточных структур способствуют сильные окислители. Образование в клетке активных форм кислорода (АФК), таких как окись азота, супероксидный и гидроксильный

радикалы является важным элементом апоптоза. Накопление АФК приводит к развитию антиоксидантной недостаточности, развитию окислительного стресса и повышению проницаемости мембран. Особенно чувствительны к радикалам мембраны митохондрий и ядер. Через поврежденные мембраны митохондрий выходят *протеаза AIF* (апоптоз-индуцирующий фактор) и цитохром *c*, которые активируют каспазный каскад. Через поврежденную ядерную оболочку каспазы легче проникают в ядро и активируют здесь эндонуклеазы путем воздействия на их ингибиторы.

Митохондриальные факторы

Апоптоз возможен и без участия каспаз: сверхсинтез белков-промоторов апоптоза *Bax* и *Bak* индуцирует программируемую клеточную смерть в присутствии ингибиторов каспаз. В мембранах митохондрий находятся два белка – протеаза *AIF* и цитохром *c*, которые активируют каспазу-9, а через неё – весь каспазный каскад. Высвобождение этих белков происходит при повышении проницаемости мембран под контролем белков семейства *Bcl-2/Bax*. К ним относятся следующие белки.

Bcl-2, Bcl-X^L, A1/Bfl-1 являются ингибиторами апоптоза, находятся в нормальных клетках в составе митохондриальных мембран и контролируют специальные каналы для транспорта протеазы *AIF* и цитохрома *c*. Они закрывают эти каналы и защищают клетку от спонтанного апоптоза.

Bax, Bad, Bak, Bid, Bcl-X^s, Bik относятся к тому же семейству, но выполняют противоположные функцию – стимулируют апоптоз, являясь его индукторами. В нормальной клетке они находятся в цитоплазме, а при апоптогенных сигналах перемещаются к митохондриальным мембранам, где способствуют открытию каналов для протеазы *AIF* и цитохрома *c*. Эти белки находятся в состоянии постоянного динамического равновесия, образуя гомо- и гетеродимеры. Показано, что решающим моментом в запуске апоптоза является гетеродимеризация белков семейства *Bcl-2*.

Один из механизмов связан с изменением степени фосфорилирования белка-индуктора *Bad*. Осуществляется он через рецептор к ИЛ-3. ИЛ-3, связываясь с рецептором активирует специфические киназы, которые и фосфорилируют *Bad*, что увеличивает его сродство к цитоплазматическому

белку. В итоге, гетеродимеризация не происходит и апоптоз не наступает. В отсутствие ИЛ-3 активируются фосфатазы, Bad дефосфорилируется, образуются гетеродимеры Bcl-2/Bad и запускается процесс апоптоза за счет высвобождения митохондриальных факторов (цитохром С, апоптозиндуцирующие протеазы), при этом в конечном итоге происходит активация каспазы-9. Второй механизм обусловлен фосфорилированием белка Bax и ингибированием апоптоза из-за невозможности формирования гетеродимеров. Третий механизм связан с взаимодействием Bcl-2 с белком Bag-1 и цитоплазматическим доменом рецептора для гепатоцеллюлярного и тромбоцитарного факторов роста. При отсутствии в среде этих факторов происходит связывание Bag-1 с Bcl-2. При взаимодействии этих факторов со специфическими рецепторами Bag-1 соединяется с цитоплазматическим доменом и освобождает Bcl-2 для гетеродимеризации, что приводит к апоптозу.

При наличии во внеклеточном матриксе *факторов роста* PDGF (platelet-derived growth factor – тромбоцитарный фактор роста) или NGF (nerve growth factor – фактор роста нервов) и цитокина интерлейкина-3 (IL-3) проапоптозный белок Bad не активен. Факторы роста, связавшись со своим рецептором на плазматической мембране, вызывают активацию цитозольной протеинкиназы В (ПКВ), обозначаемой Akt/ПКВ/RAC и катализирующей фосфорилирование Bad по Ser-136. IL-3 тоже связывается со своим рецептором на плазматической мембране и активирует митохондриальную сАМР-зависимую протеинкиназу А (ПКА), катализирующую фосфорилирование Bad по Ser-112. Будучи фосфорилированным по обоим остаткам серина, Bad образует комплекс с белком 14-3-3, располагающийся в цитоплазме. Дефицит факторов роста и IL-3 воспринимается клеткой как сигнал к апоптозу: происходит дефосфорилирование Bad, его внедрение в наружную мембрану митохондрий, выход цитохрома с из митохондрий и последующая активация каспазы-9 через АРАF-1-зависимый механизм. Кроме этого дефицит IL-3 вызывает перемещение мономерного проапоптозного белка Bax из цитоплазмы в наружную мембрану митохондрий. Последующая сшивка молекул Bax с образованием гомодимеров тоже ведет к выходу цитохрома с из митохондрий и гибели клетки.

Флавопротеин AIF, будучи добавленным к изолированным ядрам из клеток HeLa, вызывает конденсацию хроматина и фрагментацию ДНК, а при добавлении к изолированным митохондриям печени крыс – высвобождение цитохрома *c* и каспазы-9. Микроинъекция AIF в интактные фибробласты крыс приводит к конденсации хроматина по периферии ядра, разрыву ДНК на крупные фрагменты длиной 50 пар нуклеотидов, диссипации D_u в митохондриях и переходу фосфатидилсерина из внутреннего слоя цитоплазматической мембраны в наружный. Ни один из этих эффектов AIF не предотвращается пептидным ингибитором каспаз N-бензоилоксикарбонил-Val-Ala-Asp.трифторметилкетон (Z-VAD.fmk), который предотвращает апоптоз, индуцированный микроинъекцированным цитохромом *c*. Эти данные показывают, что AIF является митохондриальным эффектором ПКС у животных, действующим независимо от каспаз.

Кроме рассмотренных компонентов, при нарушении наружной мембраны митохондрий из межмембранного объема выделяется термолабильный фактор, вызывающий необратимое превращение ксантиндегидрогеназы в ксантиноксидазу. Фактор устойчив к ряду испытанных ингибиторов протеаз, включая каспазы, сериновые и металлопротеазы. Ксантиндегидрогеназа катализирует зависимое от NAD^+ окисление ксантина до гипоксантина и последующее окисление гипоксантина до мочевой кислоты. Ксантиноксидаза катализирует те же реакции, но не с NAD^+ , а с O_2 в качестве акцептора электронов. При этом образуются $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 , а из них – и другие активные формы кислорода, которые разрушают митохондрии и являются мощными индукторами апоптоза. Механизмы образования АФК, конечно, не ограничиваются ксантиноксидазной реакцией. Главным источником АФК в клетках являются митохондрии. Резкое увеличение АФК происходит при возрастании мембранного потенциала в митохондриях, когда снижено потребление АТФ и скорость дыхания лимитируется ADP. Доля электронного потока через дыхательную цепь митохондрий, идущая на образование $O_2^{\bullet-}$, достигает 1-5%. Плазматическая мембрана макрофагов и нейтрофилов, как уже отмечалось, содержит $O_2^{\bullet-}$ – генерирующую NADPH-оксидазу.

Мембранные эффекты

Структура плазматической мембраны клетки также имеет значение для апоптоза. При апоптозе изменяется характер упаковки фосфолипидов. При этом устраняется асимметрия фосфолипидов мембраны. Ряд ферментов способны при активации менять структуру мембраны. К таким ферментам относится *транслоказа фосфатидилсерина*, активация которой при апоптозе переводит соответствующие липиды на внешнюю поверхность мембраны. Фосфатидилсерин, локализованный на внешней поверхности мембраны, относится к маркерам апоптоза и служит сигналом к фагоцитозу.

Мембраны клеток, подвергающихся апоптозу, уже на ранних этапах претерпевают значительные изменения, что позволяет фагоцитам и макрофагам распознавать и очень быстро элиминировать такие клетки, не вызывая повреждения клеток окружающих тканей продуктами распада. Реорганизация мембраны при апоптозе обеспечивает последнюю стадию – поглощение апоптозных телец окружающими клетками.

Трансмембранный потенциал митохондрий

Повышение проницаемости мембран митохондрий при апоптозе сопровождается падением трансмембранного потенциала.

Как известно, перенос электронов по дыхательной цепи митохондрий сопряжен с откачкой протонов из матрикса митохондрий в межмембранное пространство. Таким образом создается градиент концентрации водородных ионов – внутри образуется избыток отрицательных зарядов, а снаружи – положительных. Энергия протонного градиента используется для синтеза АТФ.

В клетках, подвергшихся воздействию индуктора апоптоза, резко снижается мембранный потенциал ($\Delta\psi$) митохондрий. Падение $\Delta\psi$ обусловлено увеличением проницаемости внутренней мембраны митохондрий вследствие образования гигантских пор. К факторам, вызывающим раскрытие пор, относятся: восстановленный глутатион, NAD(P)H, АТФ и ADP, активные формы кислорода, разобщение окислительного фосфорилирования протонофорными соединениями, увеличение содержания Ca^{2+} в цитоплазме. Образование пор в митохондриях можно вызвать церамидом, окисью азота (NO), каспазами, амфипатическими пептидами, жирными кислотами. Поры

имеют диаметр 2,9 нм, позволяющий пересекать мембрану веществам с молекулярной массой 1,5 кДа и ниже. Следствием раскрытия поры является набухание митохондриального матрикса, разрыв наружной мембраны митохондрий и высвобождение растворимых белков межмембранного объема. Среди этих белков имеется ряд апоптогенных факторов: цитохром *c*, прокаспазы 2, 3 и 9, белок AIF (apoptosis inducing factor), представляющий собой флавопротеин с молекулярной массой 57 кДа. Прокаспаза-3 обнаруживается как в межмембранном объеме митохондрий, так и в цитоплазме.

Образование гигантских пор не является единственным механизмом выхода межмембранных белков митохондрий в цитоплазму. Предполагается, что разрыв наружной мембраны митохондрий может быть вызван гиперполяризацией внутренней мембраны. Возможен и альтернативный механизм, без разрыва мембраны, который связан с раскрытием гигантского белкового канала в наружной мембране, способного пропускать цитохром *c* и другие белки из межмембранного пространства.

Падение трансмембранного потенциала рассматривают как одно из ведущих проявлений апоптоза. Но падение потенциала относится к *антиапоптозным*, а не проапоптозным факторам. Оно лишает клетку главного источника энергии, но не стимулирует механизмы апоптоза. Между тем, всегда подчеркивается, что апоптоз является энергозависимым процессом. Энергия требуется для синтеза транскрипционных и регуляторных факторов апоптоза. Недостаток энергии может нарушить ход апоптоза и свести процесс к некрозу.

Гормоны

Глюкокортикоид-индуцированный апоптоз. Центральное место в исследовании апоптогенного действия гормонов принадлежит изучению влияния глюкокортикоидов (ГК) на лимфоидные клетки. Деструкция незрелых тимоцитов к гормонам коры надпочечников характерна для человека, грызунов и птиц. Чувствительность Т-клеток к ГК зависит от стадии развития лимфоцитов. Пре-Т-клетки костного мозга и незрелые Т-клетки тимуса чувствительны к физиологическим дозам ГК. Определенные субпопуляции зрелых Т-лимфоцитов (натуральные киллеры, цитотоксические Т-

лимфоциты) претерпевают апоптоз под действием ГК. В-клетки также чувствительны к ГК в зависимости от стадии своего развития. Пре-В-клетки и незрелые В-клетки гибнут путем апоптоза под действием ГК. Зрелые В-лимфоциты нечувствительны к ГК.

Действие глюкокортикоидов опосредовано внутриклеточными специфическими рецепторами. Рецептор, связывая лиганд, регулирует транскрипцию гормоночувствительных генов. Это могут быть гены, продукты которых регулируют продвижение клетки по клеточному циклу или апоптозспецифические гены. Чувствительность лимфоидных клеток к апоптозу, индуцированному ГК, определяется концентрацией рецептора и аффинностью лиганда к рецептору. Рецептор ГК, связывая лиганд, регулирует транскрипцию ГК-чувствительных генов. Некоторые исследователи полагают, что активированный рецептор ГК запускает экспрессию «лизисных» генов, так как ингибиторы транскрипции и трансляции блокируют его действие. Другие считают, что его эффект связан, скорее, с репрессией генов, чем с их активацией. Установлено, что под влиянием ГК повышается экспрессия кальмодулина, снижается продукция ИЛ-2, увеличивается концентрация внутриклеточного 3',5'-цАМФ, резко повышается уровень образования активных форм кислорода. При исследовании молекулярных механизмов реализации начальных этапов ГК-индуцированного апоптоза тимоцитов были получены данные о том, что механизм действия ГК связан с активацией K^+ -каналов и ингибированием Na^+/H^+ -обмена. В результате этого происходит освобождение калия и хлора из клетки, также могут уходить бикарбонат-ион и отрицательно заряженные аминокислоты. Потеря калия и сжатие становятся заключительным этапом в апоптотической гибели.

Андрогены являются ингибиторами апоптоза для клеток простаты. В то же время они являются индукторами апоптоза для фолликулярных клеток яичника. На данном примере можно видеть, как одни и те же гормоны являются ингибиторами апоптоза для одних клеток и индукторами апоптоза для других. Также изучено противоположное действие по регуляции апоптоза одним и тем же гормоном в зависимости от стадии дифференцировки клетки. Так *эстрогены* являются ингибиторами апоптоза эпителия матки в начале менструального цикла и индуктором апоптоза - в

конце цикла. В ингибировании апоптоза эпителия матки в конце цикла также участвует прогестерон. На примере половых гормонов мы рассмотрели физиологическую регуляцию апоптоза клеток в зависимости от типа клеток и стадии их дифференцировки.

Ингибирование процесса апоптоза

При ингибировании апоптоза наблюдается не менее выраженный, чем при его индукции, эффект цитокинов. При этом один и тот же ИЛ может быть как индуктором апоптоза, так и его ингибитором. Различия в ответе клеток наблюдаются для разных клеток-мишеней и, возможно, зависят от степени их дифференцировки и развития. ИЛ-2, например, является ингибитором апоптоза Т- и В-лимфоцитов, ИЛ-4 также ингибирует апоптоз Т- и В-лимфоцитов. ИЛ-3, ИЛ-6, ИЛ-9 известны только как ингибиторы апоптоза клеток. Неоднозначно и влияние на клетки ИФН. Так, α -ИФН является индуктором апоптоза клеток костного мозга и ингибитором апоптоза моноцитов.

Имеются убедительные сведения о том, что факторы роста предотвращают развитие апоптоза в клетках. Удаление факторов роста из культур клеток приводит к типичным апоптотическим проявлениям. Так, было показано, что гранулоцитарно-макрофагальный КСФ увеличивает период жизни нейтрофилов *in vivo* с 8 до 48 часов. Механизм действия остается неясным, однако существует предположение, что этот эффект обеспечивается прямым или косвенным (через внутренние антиапоптотические медиаторы) ингибированием каспазы-3 – одного из главных исполнителей процесса апоптоза нейтрофила. Интересно также, что ингибитором апоптоза может служить избыточное количество растворимого sFas.

Гормональная регуляция апоптоза также неоднозначна для разных клеток-мишеней, находящихся на разных этапах дифференцировки и клеточного цикла. Так, для клеток простаты ингибиторами апоптоза являются андрогены, которые приводят к апоптозу фолликулярные клетки яичников. Эстрогены являются ингибиторами апоптоза эпителия матки в начале и индукторами в конце менструального цикла. Ингибитором апоптоза эпителия матки в конце цикла является прогестерон. Антиапоптотическими факторами для фолликулов яичника являются также ФСГ и ЛГ.

Теломераза. Среди ингибиторов апоптоза большое внимание уделяется ферменту теломеразе. Его считают ферментом “бессмертия”. Теломераза — это клеточный фермент, обеспечивающий восстановление длины теломерного (концевого) участка хромосомной ДНК. Цикл работы теломеразы включает две стадии: элонгацию и транслокацию. Фермент работает как обратная транскриптаза, т.е. осуществляет синтез ДНК на РНК-матрице. Фермент пристраивает к старой цепи несколько десятков или сотен теломерных повторов.

Известно, что каждая хромосома имеет на всех своих окончаниях особую структуру, называемую *теломерой*. Этот участок, который содержит свыше тысячи нуклеотидных повторов T-T-G-G-G-G. Теломерные повторы не несут генетической информации, они отвечают за генетическую стабильность и оберегают хромосомы. ДНК-полимераза неспособна обеспечивать репликацию концевых нуклеотидов в нити ДНК и с каждым последующим делением длина хромосомы становится короче на 10–20 теломерных фрагментов. После достижения определенной критической длины теломеры теряют способность поддерживать целостность хромосомы и в ней может происходить нарушение структуры ДНК, несовместимое с нормальным существованием клетки. Чем старше организм, тем длина нити ДНК меньше. Когда человек испытывает стресс, количество теломер заметно сокращается, организм стареет, будто бы проживает несколько лет за год.

В большинстве клеток нормальных тканей человека теломераза неактивна и поэтому клетки подвергаются апоптозу через 50–100 делений, считая от их образования из клетки-предшественницы (тысяча теломер на одном конце хромосомы / 10–20 теломер в одном клеточном цикле = 50–100 клеточных циклов). В клетках злокачественных опухолей ген теломеразы активен. Поэтому, несмотря на свою “старость” по количеству пройденных клеточных циклов и накопление большого количества мутационных изменений в структуре ДНК, продолжительность жизни злокачественных клеток в принципе почти не ограничена.

У человека теломераза функционирует только в эмбриональных клетках и семенниках, вырабатывающих сперматозоиды в течение всей жизни. Таким образом, длину теломеры можно образно сравнить с часами, определяющими

возраст клетки, считая за единицу времени один клеточный цикл. От количества активной теломеразы в клетках в значительной мере зависит скорость старения организма.

Обнаружение активной теломеразы в опухолевых клетках предполагает развитие нового направления в разработке противоопухолевых препаратов. Если раньше большинство таких препаратов использовали против быстро делящихся злокачественных клеток (при этом повреждались и клетки иммунной системы, костного мозга, кишечника), то антителомеразные препараты должны атаковать только опухолевые клетки, поскольку их мишень (теломераза) отсутствует в нормальных клетках.

Механизм передачи апоптоз-специфического сигнала с помощью белков семейства Bcl-2

Белки семейства Bcl-2 имеют в своем составе высококонсервативные гомологичные области (ВН). Количество их варьирует у разных членов от одного до четырех: ВН1, ВН2, ВН3, ВН4 (рис.5). Наличие этих областей определяет способность белков семейства Bcl-2 взаимодействовать друг с другом или с другими белками, не относящимися к этому семейству.

Консервативные области **ВН1** и **ВН2** участвуют в образовании гомо- или гетеродимеров белков семейства Bcl-2. Образование гомодимеров происходит при преобладании белков одного вида. Эти области также участвуют в формировании гетеродимеров белка ингибитора апоптоза (Bcl-2) и индуктора апоптоза (Bax). **ВН3**-область имеется в основном у Bcl-2 белков — агонистов апоптоза. Его функция заключается в образовании гетеродимеров с Bcl-2 и Bcl-X¹. Обмен 23 аминокислотными остатками в окружении ВН3 от агониста апоптоза с Bcl-2 превращает Bcl-2 в агонист смерти. С помощью метода ядерно-магнитного резонанса было показано, что ВН3 домен вместе с ВН1 и ВН2 белков ингибиторов апоптоза формируют общую гидрофобную полость. **ВН4**-область имеется в основном среди антиапоптотических белков семейства Bcl-2. ВН4 необходим для взаимодействия Bcl-2 или Bcl-X¹ с апоптоз-регуляторными белками, которые структурно не относятся к белкам семейства Bcl-2. В частности, это белки Rat-1, Araf-2, Bag-1. Образование гомо- и гетеродимеров белками семейства Bcl-2 находится в постоянном динамическом равновесии, что в конечном

счете влияет на развитие апоптоза клеток. Активные формы этих белков определяют соотношение жизни и смерти клетки.

На развитие апоптоза также влияют **посттрансляционные модификации** белков семейства Bcl-2. Одним из возможных типов посттрансляционной модификации является инактивация Bcl-2 **протеазами**. Варибельная зона Bcl-2 между аминокислотными остатками 37—85 области между BH4 и BH1 может подвергаться гидролизу протеазами типа трипсин и химотрипсин. Считается, что активность внутриклеточных протеаз определяет количество Bcl-2, от которого зависит выбор клеткой жизни или смерти. Другой путь посттрансляционной модификации белков семейства Bcl-2

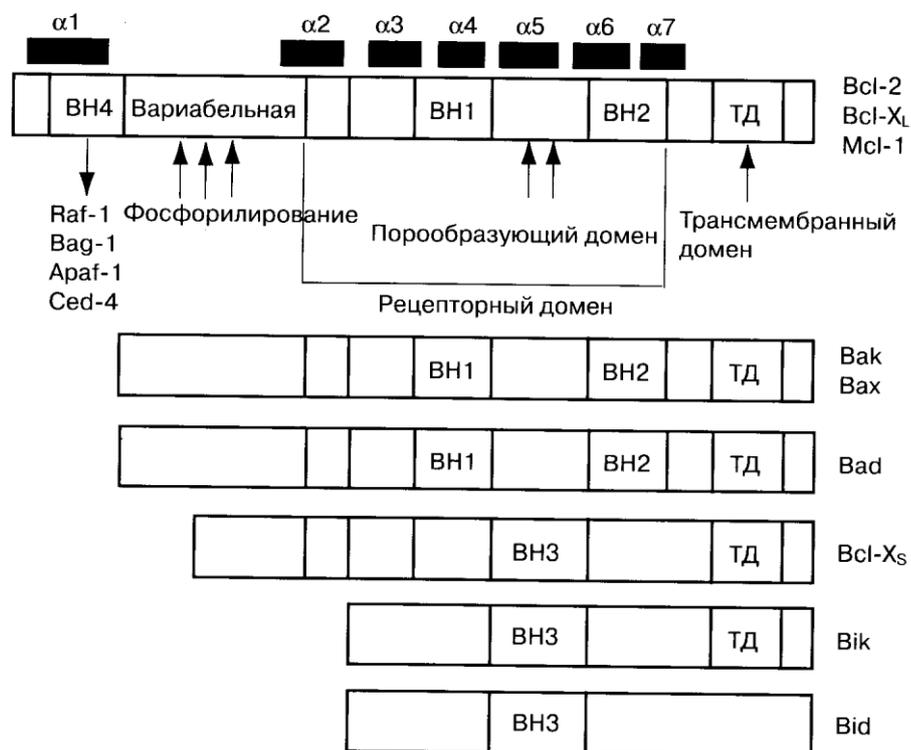


Рис.5. Структура белков Bcl-2

заключается в изменении функциональной активности этих белков путем **фосфорилирования/дефосфорилирования**. Участок фосфорилирования также находится в варибельной зоне между BH4 и BH1. Фосфорилирование Bcl-2 снижает его антиапоптотические свойства. Активность апоптоз-индуцирующих белков, например Bad, также регулируется фосфорилированием/дефосфорилированием, что влияет на его способность образовывать гетеродимеры с другими членами белков семейства Bcl-2.

Сверхэкспрессия белка Bcl-2 снижает проницаемость митохондрий, в то время как сверхэкспрессия белка Bax повышает ее. Открытие митохондриальных пор и увеличение митохондриальной проницаемости приводит к угнетению функции дыхательной цепи, увеличению содержания цитоплазматического кальция, влияет на окислительно-восстановительный статус клетки. Открытие митохондриальных пор сопровождается высвобождением ряда факторов, участвующих в активации апоптоз-специфических протеаз и запуску терминальной стадии апоптоза. К числу этих факторов в первую очередь следует отнести цитохром *c*, необходимый для формирования апоптосомы и активации каспаз.

Один из механизмов реализации апоптоз-специфического сигнала основан на стимулирующих сигналах митохондриальных белков. В этом случае в качестве ранней мишени каспазы-8 выступает проапоптотический член семейства Bcl-2 белков, Bid, отличительной особенностью которого является наличие исключительно BH-3 домена. В составе Bid отсутствуют другие три домена — BH-1, -2, -4, присущие белкам Bcl-2 семейства, участвующие в формировании гомо- и гетероолигомеров. Каспаза-8 расщепляет Bid, находящийся в цитоплазматической фракции погибающих клеток, на два фрагмента — N-концевой полипептид (6,5 кДа) и C-концевой (15 кДа), содержащий BH-3 домен. C-концевой домен перемещается в митохондрии, индуцируя высвобождение митохондриального цитохрома *c* в цитоплазму.

Существует, вероятно, несколько путей активации апоптогенных сигналов с помощью Bid. В одном из них Bid встраивается во внешнюю мембрану митохондрий, образуя пору, что способствует выходу цитохрома *c* из межмембранного пространства митохондрий. По другой версии, Bid стимулирует открытие поры во внутренней мембране митохондрий вследствие взаимодействия с переносчиком адениловых нуклеотидов. В результате митохондрии набухают, что ведет к разрыву внешней мембраны и выходу цитохрома *c*. По третьей версии, роль Bid заключается в олигомеризации другого проапоптотического белка — Bax. После олигомеризации Bax приобретает способность либо встраиваться во внешнюю мембрану митохондрий, образуя пору, либо вызывает закрытие VDAC и тормозит транспорт АДФ через

внешнюю мембрану. Это ведет к угнетению синтеза АТФ, повышению мембранного потенциала, набуханию матрикса митохондрий и как следствие нарушению целостности внешней мембраны митохондрий.

В цитоплазме цитохром *c* взаимодействует с Араф-1 (apoptosis protease activating factor-1). АРАФ-1 – белок с молекулярной массой 130 кДа, содержит CARD-домен (caspase activation and recruitment domain) на N-конце, NOD-ответственный за олигомеризацию и связывание нуклеотидов, и 12 повторяющихся аминокислотных WD-40-последовательностей (WD – дипептид из триптофана и аспартата) на С-конце. CARD является аналогом эффекторного домена смерти, WD-40-повторы, участвуют в белок-белковых взаимодействиях. АРАФ-1 играет роль арматуры, на которой происходит аутокаталитический процессинг каспазы-9 (рис. 6).

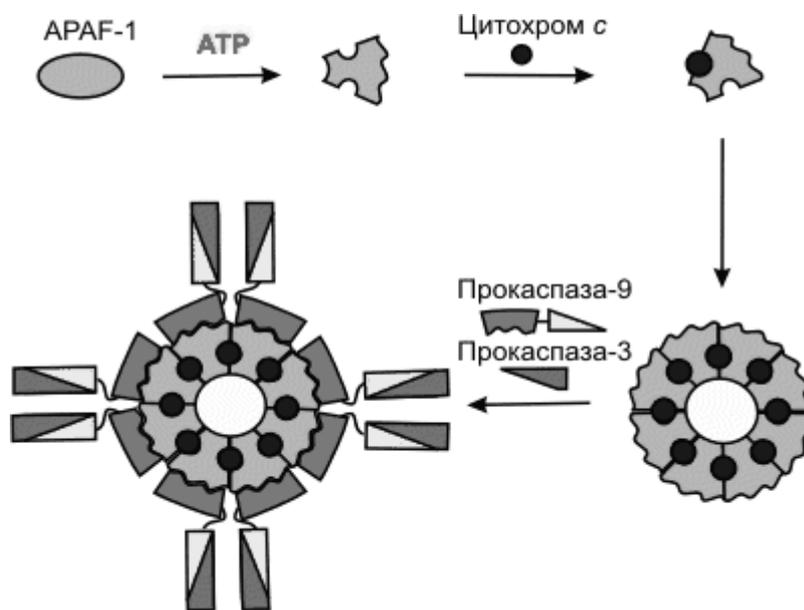


Рис.6. Взаимодействие АРАФ с цитохромом С, образование апоптосомы

Комплекс АРАФ-1 с прокаспазой-9 образуется в присутствии цитохрома *c* и dАТФ или АТФ. Концентрация dАТФ в клетке в 1000 раз ниже концентрации АТФ. К наиболее охарактеризованным WD-белкам относится β -субъединица G-белков. Из этих субъединиц собираются жесткие, симметричные структуры, наподобие веера или пропеллера. WD-повторы свойственны белкам, участвующим в регуляции деления и дифференцировки эукариотных клеток, транскрипции генов, модификации мРНК, трансмембранной передачи сигналов, слияния мембранных везикул.

Связав цитохром *c*, АРАF-1 претерпевает дальнейшее конформационное изменение, способствующее его олигомеризации и открывающее доступ CARD-домена АРАF-1 для прокаспазы-9, которая тоже содержит CARD-домен. Так образуется конструкция, называемая *апоптосомой*, с молекулярной массой > 1,3 млн дальтон, в составе которой не менее 8 субъединиц АРАF-1. Благодаря гомофильному CARD-CARD-взаимодействию с АРАF-1 в эквимольном соотношении связывается прокаспаза-9.

Пространственное сближение молекул прокаспазы-9 на мультимерной арматуре из АРАF-1-цитохром-*c*-комплексов, по-видимому, приводит к межмолекулярному протеолитическому процессингу прокаспазы-9 с образованием активной каспазы-9. Альтернативный вариант – прокаспаза-9, связавшись с апоптосомой, может принять конформацию, которая приводит к внутримолекулярному процессингу (самоактивации). Зрелая каспаза-9 затем расщепляет и активирует каспазы-3, -6, -7, запуская протеолитическую каскадную реакцию. Ключевую роль в этом процессе играют WD-40 повторы Араf-1. Далее события развиваются, по-видимому, аналогично тому, что происходит при активации протеолитического каскада, индуцированного каспазой-8. Следует отметить, что выход цитохрома *c* в цитоплазму может приводить не только к апоптотической, но и некротической гибели клеток, так как потеря митохондриями цитохрома *c* может обуславливать прерывание электронно-транспортной дыхательной цепи и как следствие падение уровня АТФ и продукцию кислородных радикалов в количестве, превышающем антиоксидантные возможности клетки.

Таким образом, известны по крайней мере два механизма FADD-зависимого апоптоза. Кроме этого, известны примеры запуска некротической гибели клеток на этапе активации каспаз. Так, расщепление и инактивация кальциевого насоса плазматической мембраны в нейронах приводят последовательно к резкому увеличению концентрации внутриклеточного Ca^{++} , замедлению кинетики апоптоза и переключению с апоптотического на некротический путь гибели. Активация того или иного пути клеточной гибели зависит, вероятно, от природы клеток и/или их функционального состояния, однако молекулярные и биохимические причины, определяющие выбор клеткой цитотоксического механизма, остаются неисследованными.

Индукция апоптоза, вызванная активацией Fas-системы

Существует несколько путей реализации программы клеточной гибели. Среди них важное место занимает путь, опосредованный физиологическими индукторами, действие которых реализуется через клеточные рецепторы, специально предназначенные для включения программы апоптоза. Этот путь передачи сигнала схематически можно изобразить следующим образом: «индукторы - рецепторы - адаптеры - каспазы первого эшелона - регуляторы - каспазы второго эшелона».

Наиболее хорошо изучены *Fas-лиганд (Fas L)* и *Fas-рецептор (Fas)*. Началом апоптоза является взаимодействие белка Fas (Fas-рецептора, его же обозначают как CD95 или APO) с Fas-лигандом (FasL). Все они представлены трансмембранными белками, которые внеклеточными участками взаимодействуют с тримерами лигандов-индукторов (рис. 7).

FasL – лиганд, относящийся к многочисленному семейству фактора некроза опухолей (TNF – tumor necrosis factor). Это семейство гомотримерных лигандов, кроме FasL и TNF α , включает TNF β (лимфотоксин), TRAIL (Apo2L), CD40L, CD27L, CD30L, OX40L. FasL является гомотримером, связывается с тремя молекулами Fas. Взаимодействие рецептора и лиганда приводит к образованию кластеров рецепторных молекул и связыванию их внутриклеточных участков с адаптерами. Адаптер, связавшись с рецептором, вступает во взаимодействие с эффекторами, пока еще неактивными предшественниками протеаз из семейства каспаз первого эшелона (инициирующих каспаз).

Связь адаптера с рецептором и эффектором осуществляется через гомофильные белок-белковые взаимодействия небольших доменов: DD (death domain – домен смерти), DED (death-effector domain – домен эффектора смерти), CARD (caspase activation and recruitment domain – домен активации и рекрутирования каспазы). Все они имеют сходную структуру, содержат по шесть α -спиральных участков. В результате олигомеризации этих белков происходит активация апоптозспецифической протеазы – каспазы-8, и развиваются характерные для апоптоза процессы.

Fas L экспрессируется на поверхности клеток многих типов. К ним относятся активированные Т- и В-лимфоциты, фибробласты, гепатоциты,

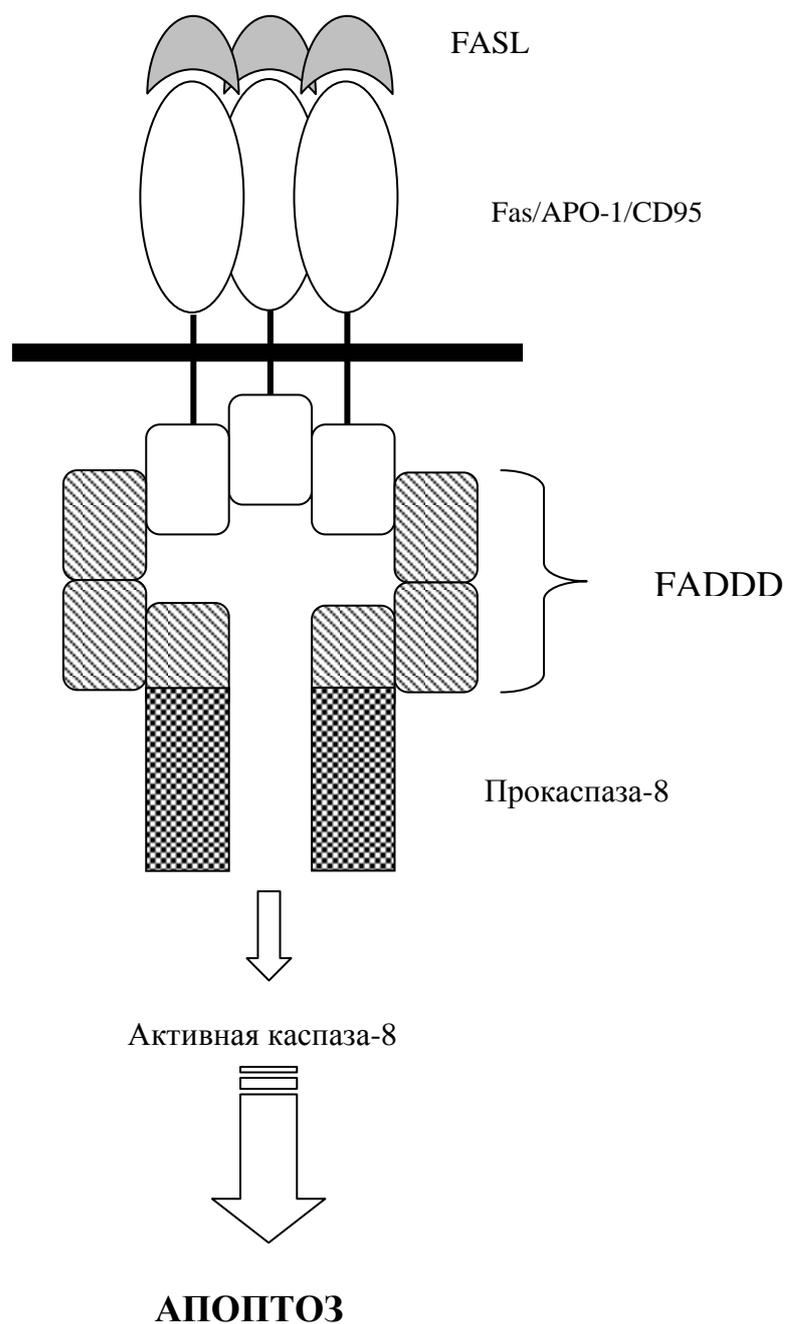


Рис.7. Образование апоптосомы при Fas-опосредуемом апоптозе

кератиноциты, миелоидные клетки. Fas-опосредуемый апоптоз участвует в элиминации дефектных и “отработавших” клеток и в предупреждении аутоиммунных и лимфопролиферативных процессов. Fas-

система играет важную роль в развитии Т-клеток, цитотоксичности, удалении незрелых Т-клеток, реагирующих с аутоантигенами. Критическим моментом в регуляции апоптоза иммунной системы является выработка рецептора Fas. Мутации в гене, кодирующем рецептор Fas/APO-1, индуцируют процесс образования опухоли. У мышей с мутациями CD95 развивается лимфаденопатия и аутоиммунная патология, аналогичная системной красной волчанке. FAS-L выделяется цитотоксическими Т-лимфоцитами и NK-клетками и является «фактором смерти», индуцирующим апоптоз в клетках-мишенях. Экспрессия FAS-L на некоторых клетках (например, строме глаза или сертолиевых клетках яичек) немедленно убивает попавшие туда активированные клетки воспаления, обеспечивая тем самым запрет иммунных реакций.

Система Fas-L–Fas-рецептор Т-киллера, запускает программу смерти клетки, инфицированной вирусом. Тем же путем при взаимодействии с лигандом FasL на поверхности T_H1-лимфоцитов или с антителом к Fas-рецептору погибают ставшие ненужными выздоровевшему организму В-лимфоциты, продуценты антител, несущие Fas-рецептор. Тому же способствует белок *перфорин*, который выделяется Т-киллером и образует каналы в плазматической мембране клетки-мишени. Через эти каналы в клетку проникают протеолитические ферменты *гранзимы*.

Молекулярные механизмы TNF-R1 - опосредованного апоптоза

Механизмы TNF-R1-зависимой гибели можно рассматривать как универсальные, поскольку последовательности цитотоксических реакций, индуцированных другими агентами биологической, химической или физической природы, как правило, укладываются в цепочку событий, запускаемых активацией TNF-R1. Цитотоксическая сигнализация, опосредованная TNF-R1, как и другими рецепторами смерти (Fas, DR3, DR4, DR4), изучена наиболее хорошо. Цитотоксическая сигнализация касается делящихся, или недавно делившихся, или ещё способных к делению клеток, для которых апоптоз является одним из эффективных способов регуляции численности клеток.

Фактор некроза опухолей вызывает активацию тримеров TNF-R1 при связывании, в результате чего DD-домены рецепторов оказываются

ассоциированными. Этот процесс протекает очень быстро. Затем DD-домен TNF-R1 взаимодействует с адаптерным белком TRADD (TNF-R1 associated death domain), который содержит собственный DD на С-концевом участке. Посредством этого взаимодействия осуществляется гомоассоциация TRADD и образуется связь TRADD—TNF-R1. Кроме того, TRADD способен взаимодействовать с белками TRAF (TNF receptor-associated factor), FADD/MORT1 (Fas-associated death domain protein) и RIP (receptor interacting proteins). Образование комплекса TRADD—TRAF приводит к активации транскрипционных факторов NF-κB (способствует пролиферации) и Янус-киназы — JNK (в зависимости от условий может вызывать как пролиферацию клеток, так и апоптоз); TRADD—FADD необходим для запуска апоптоза. Взаимодействие TRADD—RIP может передавать сигналы, активирующие как NF-κB и JNK, так и гибель клеток. Эти сигнальные пути представлены на рис. 8.

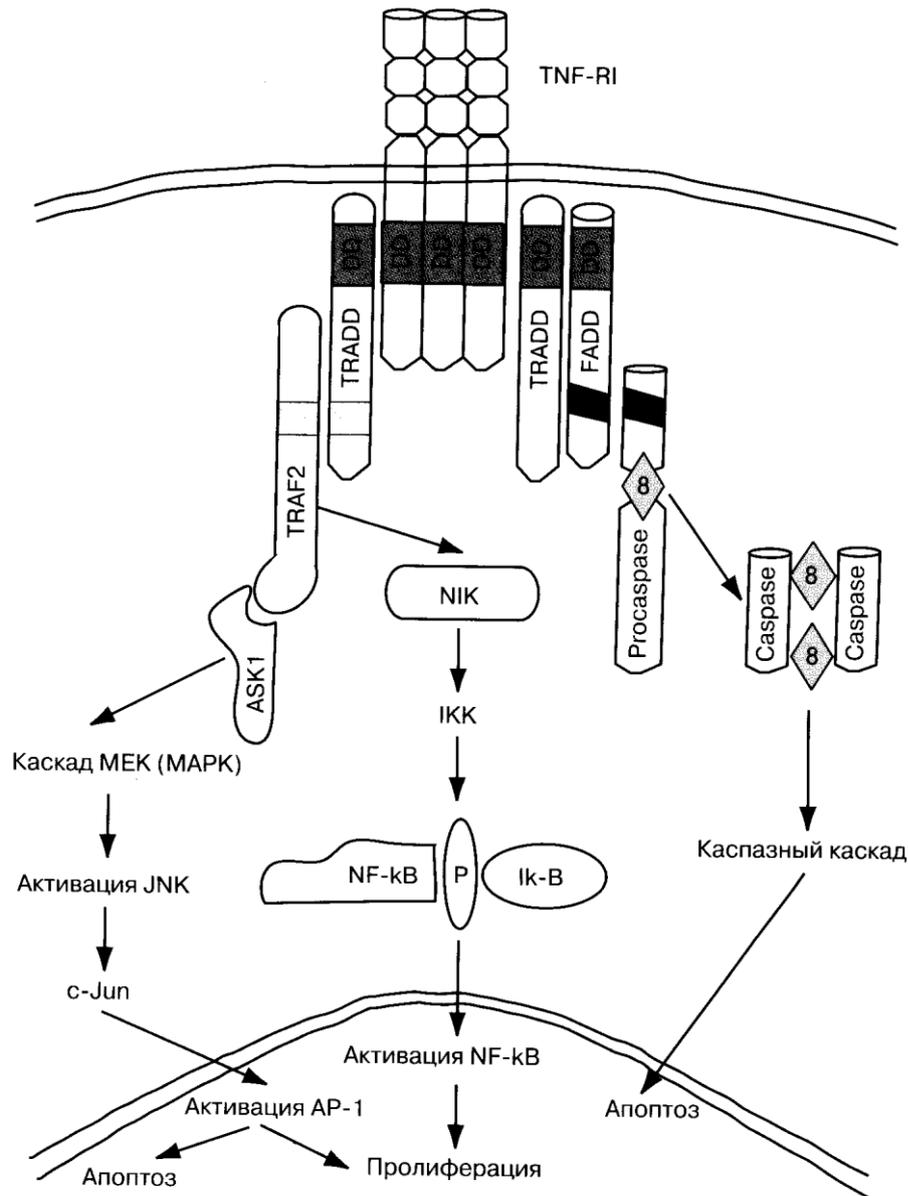


Рис.8. Сигнальные пути TNFR1

Передача сигналов, опосредованная комплексом TNF-RI—TRADD—TRAF. Активация янус-киназы JNK комплексом TRADD—TRAF происходит посредством передачи сигнала по следующей цепочке. TRADD—TRAF через апоптотическую сигнал-регулирующую киназу (ASK1) фосфорилирует киназу MEK1 и запускает каскад MEK. Киназа MEK относится к митоген-активируемым протеинкиназам (МАРК), которая фосфорилирует киназу JNK. В свою очередь JNK активирует транскрипционный фактор AP1 (activator protein-1) путем фосфорилирования входящего в его состав c-Jun. Сигнальный путь от TRADD—TRAF к усилению транскрипции AP1-зависимых генов приводит к синтезу различных цитокинов, включая провоспалительные и иммуномодуляторные.

Комплекс TRADD—TRAF участвует также в активации транскрипционного фактора NF-κB, стимулирующего ген iNO-синтетазы. Последовательность событий в этом случае описывается следующим образом. Киназа NIK, связываясь с TRADD—TRAF, фосфорилирует киназный комплекс IKK, что в свою очередь фосфорилирует I-κB (ингибитор NF-κB). Фосфорилирование I-κB приводит к его деградации и высвобождению NF-κB из неактивного комплекса I-κB - NF-κB, транслокации последнего в ядро и активации транскрипции NF-κB- регулируемых генов. На клеточном уровне активация NF-κB выражается в ингибировании апоптоза.

Фактор NF-κB способен активировать транскрипцию генов *traf*, *c-iap*. Продукты генов *c-iap* являются белками, ингибирующими апоптоз, и способны физически ассоциировать с TRAF. Повышенная экспрессия c-IAP стимулирует активацию NF-κB и предотвращает TNF-индуцированную гибель клеток. Таким образом, образование комплекса TRAF—c-IAP может рассматриваться как альтернативный путь TNF-R1-зависимой активации NF-κB по механизму положительной обратной связи. c-IAP также могут связываться с апоптоз-специфическими протеолитическими ферментами — каспазами-3, -7 и -9, блокируя их активность. Отсюда произошло название IAP — ингибитор апоптоз-специфических протеаз. Этот механизм является дополнительным способом ингибирования цитотоксического сигнала, опосредованного TRAF.

Передача сигналов, опосредованная комплексом TNF-R1-TRADD-FADD. Адаптерный белок FADD/MORT1 (Fas-associated death domain protein), 23 кДА белок, не обладает, по-видимому, какой-либо ферментативной активностью и содержит в своем составе два функциональных домена – DD в С-концевой части и подобный ему по последовательности и структуре эффекторный домен смерти (ED) на N-конце.

Предполагается, что TRADD и FADD, связываясь посредством собственных доменов смерти, образуют комплекс TRADD—FADD. Эффекторный домен смерти FADD взаимодействует с аналогичными тандемно повторяющимися доменами прокаспазы-8. FADD индуцирует олигомеризацию каспазы-8, что в свою очередь активирует саморасщепление фермента с образованием активной протеиназы и реализацией процесса апоптоза клетки. Однако эффекторные домены смерти FADD и каспазы-8 могут быть блокированы с-FLIP (FLAICE – ингибирующим белком), содержащим в своем составе два эффекторных домена смерти и домен, гомологичный последовательностям каспаз-8 и -10, но с делециями аминокислот, необходимых для проявления каспазной активности (рис.9). Следует отметить, что повышенная экспрессия с-FLIP в онкотрансформированных клетках, как правило, приводит к угнетению гибели, опосредованной рецепторами, содержащими домен смерти.

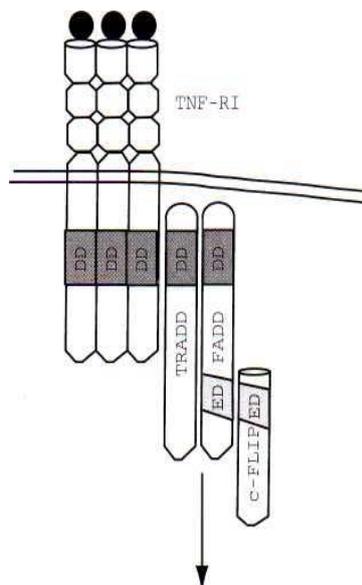


Рис.9 Ингибирование апоптоза с помощью белка с-FLIP

Передача сигналов, опосредованная комплексом TNF-RI—TRADD—RIP. Адаптерный белок RIP (receptor interacting proteins), 74 кДа, является основоположником семейства RIP серин/треониновых киназ, отличающихся присутствием киназного домена на N-концевой части молекулы и домена смерти или эффекторного домена смерти на C-конце. Наличие функционально разных доменов обуславливает способность RIP запускать

реакции, определяющие как выживание клеток (активация NF-κB), так и их гибель.

RIP-зависимая активация осуществляется путем каскадной реакции фосфорилирования сигнальных киназ. Передача сигнала в этом случае может быть представлена следующей схемой:

TNF-R1 → *TRADD-RIP* → *MEK (MAPK/ ERK kinases)* → *JNK* → *API*

Аналогичные сигнальные пути активации API (activator protein-1 transcription factor) характерны и для других членов RIP-семейства.

В настоящее время известны по крайней мере два пути активации NF-κB с участием RIP. Первый практически не отличается от сигнального пути, опосредованного TRAF, за исключением того, что RIP не способен образовывать прочных ассоциаций с киназой NIK и фосфорилирует ее за счет собственной киназной активности. Второй путь активации NF-κB специфичен для RIP, но не для TRAF. Хотя апоптоз- и NF-κB-индуцирующие свойства RIP были обнаружены одновременно, конкретные молекулярные механизмы RIP-зависимой гибели остаются неизвестными. Предполагают, что белок RIP способен взаимодействовать с адаптерными белками TRADD и FADD. В результате образуется комплекс TRADD—RIP—FADD. В дальнейшем происходит запуск каскадной протеазной реакции по аналогии с реакцией, индуцированной комплексом TRADD—FADD. Учитывая возможность фосфорилирования TRADD и FADD киназной активностью, присущей RIP, можно допустить, что фосфорилированные TRADD и FADD приобретают другие свойства, нежели в комплексе TRADD—FADD, и становятся доступными для других взаимодействий.

Существует и другое, довольно оригинальное, объяснение RIP-зависимой цитотоксичности. Было обнаружено специфическое расщепление RIP каспазой-8 при обработке клеток TNF. При этом блокируется TNF-индуцированная активация NF-κB и усиливается связывание TRADD и FADD. Поскольку NF-κB стимулирует, в частности, транскрипцию антиапоптотических генов, а комплекс TRADD—FADD запускает апоптоз, расщепление RIP рассматривается как мощный проапоптотический сигнал.

В последние годы появилась серия работ, выполненных в различных лабораториях, указывающих на вовлечение FADD, RIP и TRAF2 в передачу TNF-индуцированного некротического сигнала. Роль киназной активности RIP и каспазных активностей в этих процессах еще предстоит выяснить, однако уже сейчас можно полагать, что некроз является, по-видимому, активным и строго контролируемым событием подобно апоптозу.

Как уже говорилось выше, подавляющее большинство известных на сегодня цитотоксических агентов вызывает гибель клеток с использованием описанных механизмов передачи сигнала. Так, УФ-облучение приводит к резкому повышению экспрессии одного из «рецепторов смерти», Fas-антигена, который, активируясь, запускает гибель клеток с участием FADD, каспаз и нуклеазы. Агенты, повреждающие ДНК, как правило, запускают каспазный каскад через изменение экспрессии генов семейства Bcl-2, причем таким образом, что активируются проапоптотические члены семейства. Цитотоксические факторы, связывающиеся с рецепторами, отличными от «рецепторов смерти», как правило, активируют каспазы путем передачи сигнала через те или иные адаптерные белки на FADD или RIP или посредством активации транскрипции упомянутых выше генов.

Типы клеток, участвующих в апоптозе

В зависимости от пути, по которому осуществляется активация каспаз, выделяют разные типы клеток. Клетки *типа I* (в частности, линия лимфобластоидных В-клеток SKW и Т-клетки линии H9) подвергаются программируемой гибели клеток (ПГК) по пути, зависящему от апоптотических рецепторов плазматической мембраны без участия митохондриальных белков. Клетки *типа II* (например, линии Т-клеток Jurkat и СЕМ) погибают по пути апоптоза, зависящему от митохондриального цитохрома *c*. ПГК, вызванная химиотерапевтическими соединениями, УФ- или γ -облучением, по-видимому, напрямую связана с апоптотической функцией митохондрий: клетки, лишённые генов белка АРАF-1 или каспазы-9, устойчивы к химио- и радиационной обработке, но погибают при индукции Fas-рецептора.

Некоторые клетки, например клетки *эмбриональной нервной системы*, включают механизмы апоптоза, если они испытывают дефицит апоптозподавляющих сигналов, называемых также факторами выживания.

Физиологический смысл процесса – в элиминации избыточных нервных клеток, конкурирующих за ограниченный фонд факторов выживания. Эпителиальные клетки при отделении от внеклеточного матрикса, вырабатывающего факторы выживания, тоже обречены на ПГК. Факторы выживания связываются соответствующими цитоплазматическими рецепторами, активируя синтез подавляющих апоптоз агентов и блокируя стимуляторы апоптоза.

Существует путь передачи сигнала ПГК с участием *эндоплазматического ретикулума* (ЭР). В ЭР локализована прокаспаза-12. Нарушение внутриклеточного Ca^{2+} -гомеостаза добавкой тапсигаргина или Ca^{2+} -ионофорного антибиотика A23187 ведет к апоптозу клеток, вызванному превращением прокаспазы-12 в каспазу-12. ЭР-зависимый апоптоз связан с болезнью Альцгеймера: кортикальные нейроны мышей, дефицитных по каспазе-12, устойчивы к апоптозу, индуцированному I-амилоидным белком, но не к апоптозу с участием рецепторов плазматической мембраны или митохондриального цитохрома *c*.

Цитотоксические лимфоциты, Т-киллеры, могут вызывать апоптоз у инфицированных клеток с помощью белка *перфорина*. Полимеризуясь, перфорин образует в цитоплазматической мембране клетки-мишени трансмембранные каналы, по которым внутрь клетки поступают TNF β , гранзимы (фрагментины) – смесь сериновых протеаз. Существенным компонентом этой смеси является гранзим В – протеолитический фермент, превращающий прокаспазу-3 в активную каспазу-3.

Взаимодействие клеток с внеклеточным матриксом осуществляется с помощью интегринов. *Интегрины* – большое семейство гетеродимерных мембранных белков, которые участвуют в адгезии клеток, связывая внутриклеточный цитоскелет с лигандами внеклеточного матрикса. Нарушение адгезии клеток индуцирует апоптоз. Большинство интегринов специфически взаимодействует с трипептидным RGD (аргинин-глицин-аспартат)-мотивом, входящим в состав белков внеклеточного матрикса. Растворимые низкомолекулярные RGD-содержащие пептиды являются эффективными индукторами апоптоза: проникая в клетки, они активируют латентную каспазу-3. Ряд каспаз, включая каспазу-3, содержит RGD-

последовательность вблизи активного центра фермента. В молекуле прокаспазы эта последовательность, вероятно, вовлечена во внутримолекулярное взаимодействие, придающее молекуле профермента такую конформацию, при которой протеазная активность не может проявиться. Предположительно RGD-последовательность взаимодействует с последовательностью DDM (аспартат-аспартат-метионин), локализованной вблизи участка протеолитической активации прокаспазы-3. Низкомолекулярный RGD-пептид, проникая в клетку и вступая в конкурентные взаимоотношения с RGD-последовательностью прокаспазы-3, вытесняет ее из сферы взаимодействия с DDM-последовательностью молекул профермента и индуцирует изменение их конформации, олигомеризацию и аутопроцессинг прокаспазы-3 с образованием активной каспазы-3.

Особую форму апоптоза претерпевают *эритроциты*. Биогенез эритроцитов из плюрипотентной стволовой клетки в костном мозге включает ряд промежуточных этапов. На этапе эритробласта ядро изгоняется (выталкивается) из клетки и пожирается макрофагом. Альтернативный вариант: кариорексис (деструкция ядра) с образованием телец Жолли и их последующий распад и лизис внутри клетки. Безъядерная клетка, называемая ретикулоцитом, в дальнейшем теряет митохондрии и рибосомы и превращается в эритроцит. Потерю ядра эритробластом можно рассматривать как особую форму ядерного апоптоза. Выяснение его механизма позволило бы применить его для обезвреживания опухолевых клеток. Эритроцит человека функционирует около 4 месяцев, а затем, поизносившись, исчезает в недрах ретикулоэндотелиальной системы, не причиняя неудобств окружающим клеткам. Лишенный ядра и митохондрий эритроцит, исполнив свое назначение, по-видимому, включает программу гибели, чтобы после этого поступить в распоряжение макрофагов печени и селезенки. Однако ингибитор протеинкиназы стауроспорин и ингибитор синтеза белка циклогексимид (индуцирующий ПКС у большинства испытанных типов клеток млекопитающих) не вызывает ПКК у безъядерных эритроцитов человека. Стауроспорин и циклогексимид, а также отсутствие сыворотки в среде инкубации индуцируют гибель эритроцитов цыпленка (содержащих транскрипционно неактивное клеточное ядро) с выраженными признаками

апоптоза по пути, который реализуется без участия каспаз. Сперматозоиды мыши, у которых ядра тоже не обладают активностью в транскрипции ДНК, при инкубации в искусственных средах спонтанно погибают за 1–2 суток; стауроспорин, циклогексимид и пептидный ингибитор каспаз z-VAD.fmk не ускоряют и не замедляют клеточную гибель.

Каспазы

Характеристика каспаз. В процессе апоптоза в клетке происходят драматические события: конденсация ядра и цитоплазмы, фрагментация, реорганизация внутриклеточных структур с последующим фагоцитозом, перевариванием макрофагами и соседними клетками. Для осуществления таких деструктивных процессов имеется целый ряд протеолитических ферментов. Ключевые механизмы связаны с экспрессией генов апоптоза и активацией цистеиновых и сериновых протеиназ. Выведение из строя белков, важных для поддержания жизнеспособности клеток, осуществляется при участии *каспаз* (*caspases*). Общей отличительной чертой каспаз, благодаря которой они получили свое название, является наличие аминокислотного остатка цистеина в активном центре фермента и специфическое расщепление полипептидной цепи после остатка аспарагиновой кислоты.

Каспазы относятся к цистеин-зависимым аспарат-специфичным протеиназам (*cysteinil aspartat-specific proteinases*), участвующим в каскадных реакциях протеолиза в апоптотических клетках. Каспазы осуществляют протеолиз белков, играющих основную роль в инициации апоптоза. Имеется несколько причин того, что протеиназам отводится центральная роль в клеточной гибели. Это связано с тем, что реакции протеолиза необратимы, контролируются многими механизмами, существует система проферментов, ингибиторов и активаторов протеиназ. Каспазы удовлетворяют всем этим требованиям.

К настоящему времени идентифицировано 14 различных каспаз, нумерация которых соответствует хронологическому порядку их открытия. В соответствии с их основной биологической функцией, каспазы объединены в две группы ICE-семейство и Ced-3-семейство (табл.4).

Семейства каспаз

ICE-семейство	Синоним	Ced-3-семейство	Синоним
caspase-1	ICE	caspase-3	CPP-32, Yama, apopain
caspase-4	ICH-2, ICE _{rel} -II	caspase-6	Mch2
caspase-5	ICE _{rel} -III, TY	caspase-7	Mch3, ICE-LAP3
caspase-13	ERICE	caspase-8	FLICE, MACH,
caspase-14	MICE	caspase-9	ICE-LAP6, Mch6
caspase-11	Ich-3	caspase-10	Mch4, FLICE2
caspase-12		caspase-2	Nedd-2, ICH-1

Оказалось, что ген, подобный *ced-3*, кодирует цистеиновую протеиназу *ICE* (*интерлейкин-конвертирующий фермент*), которая превращает предшественник интерлейкина *IL-1 β* в зрелую форму этого провоспалительного цитокина.

Структура каспаз

Каспазы, в основном, синтезируются в виде предшественника и именно апоптотический сигнал способствует их созреванию. Все каспазы имеют высокую степень гомологии аминокислотных последовательностей, имеют похожую структуру и субстратную специфичность. Они синтезируются в виде проферментов (30-50 kD), которые содержат 3 домена: N-концевой домен, большую и малую субъединицы. N-концевые фрагменты прокаспаз, прикреплены к большой (17-20 kD) или малой (9-12 kD) субъединицам, которые высвобождаются из зимогена путем протеолиза.

Во время активации каспазы подвергаются протеолитическому отщеплению N-концевого домена, отличающегося наибольшей вариабельностью как по размерам, так и по аминокислотной гомологии. Этот процессинг сопровождается ассоциацией большой и малой субъединиц в гетеродимеры с формированием активного центра.

Большая и малая субъединицы аналогичны во всех семействах каспаз, в то время как N-концевые фрагменты варьируют от 20 у каспазы-3 до 200 у каспаз 8 – 10. В зависимости от длины и структуры N-концевого домена каспаз, их условно делят на два типа. Прокаспазы 1, 2, 4, 5, 8, 9, 10 имеют

длинный продомен, тогда как прокаспазы 3, 6, 7, 11, 13 характеризуются коротким продоменом. Длинные продомены содержат 2 модульных участка: *death effector domain (DED, эффекторный домен смерти)*, который имеется у каспаз 8 и 10 и *caspase recruitment domain (CARD, домен мобилизации каспаз)*, входящий в состав прокаспаз 1, 2, 4 и 9. Большинство каспаз активируются путем аутопротеолиза. У ряда каспаз освобождается Asp297, удаляется N-фрагмент, с последующей ассоциацией большой и малой субъединиц. Гидрофобные белковые взаимодействия осуществляются в основном с участием DED-DED-контактов, тогда как в электростатических принимают участие CARD-CARD-контакты (рис 10).

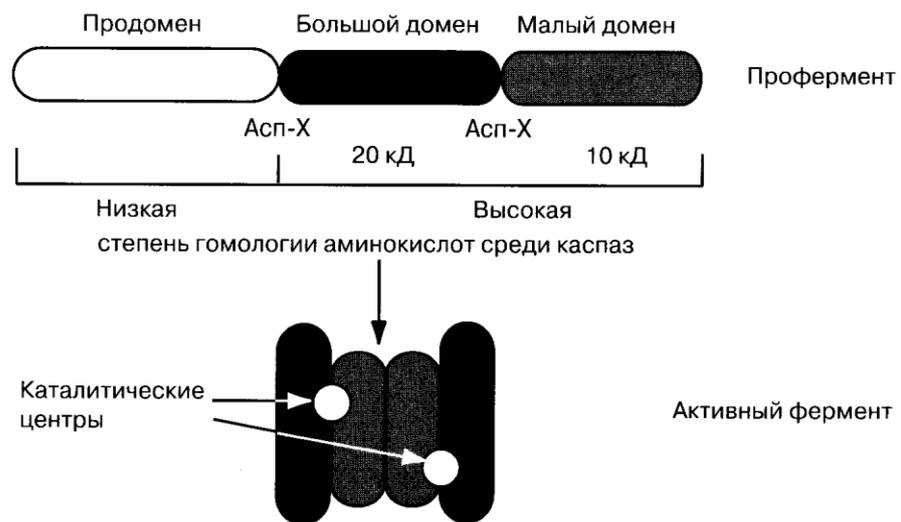


Рис.10. Структурная организация каспаз

В активной форме каспазы являются тетрамерами, состоящими из двух больших и двух малых субъединиц, с двумя активными центрами. Ферменты из ICE-семейства действуют в основном как активаторы цитокинов. Считают, что члены семейства ICE (каспазы 1, 4, 5, 13) преимущественно задействованы в воспалительных процессах, тогда как члены семейства *ced-3* (каспазы 2, 3, 10) непосредственно участвуют в апоптозе. Следует отметить, что каспаза 1, и подобные ей по структуре каспазы-4, -5 и -13, отнесены в группу каспаз, участвующих в процессинге цитокинов, нельзя исключить их роль и в апоптотической гибели клеток (рис.11).

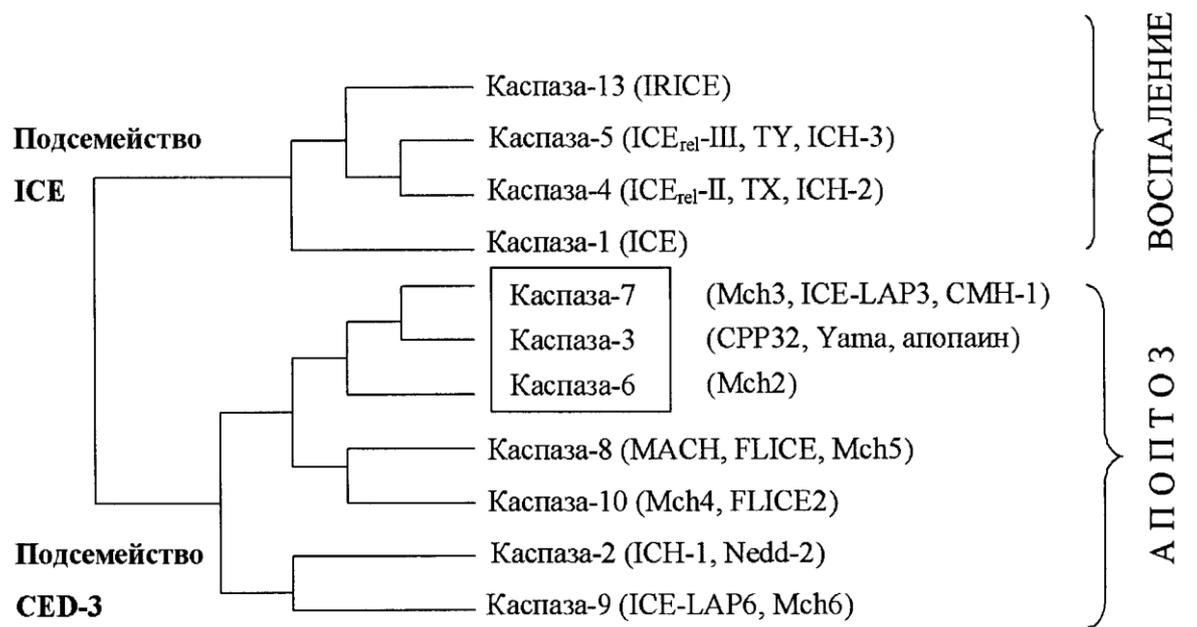


Рис. 11. Каспазы подсемейств ICE- и Ced-3-семейств. В квадрат заключены каспазы, имеющие короткий продомен.

Наиболее подробно охарактеризована прокаспаза-8 (FLICE/MACH/Mch5), рекрутируемая рецептором Fas через адаптер FADD. Образуются агрегаты FasL – Fas – FADD – прокаспаза-8. Подобные агрегаты, в которых происходит активация каспаз, названы апоптосомами, апоптозными шаперонами, или сигнальными комплексами, индуцирующими смерть (DISC – death-inducing signaling complex).

Прокаспазы обладают незначительной протеолитической активностью, составляющей 1–2% активности зрелой каспазы. Будучи в мономерной форме, прокаспазы, концентрация которых в клетке ничтожна, находятся в латентном состоянии. Предполагается, что пространственное сближение молекул прокаспаз при их агрегации ведет к образованию активных каспаз через механизм протеолитического само- и перекрестного расщепления (ауто- или транс-процессинга). В результате от прокаспазы (молекулярная масса 30–50 кДа) отделяется регуляторный N-концевой домен (продомен), а оставшаяся часть молекулы разделяется на большую (~20 кДа) и малую (~10 кДа) субъединицы. Затем происходит ассоциация большой и малой субъединиц. Два гетеродимера образуют тетрамер с двумя каталитическими участками, действующими независимо друг от друга. Таким образом прокаспаза-8 активируется и высвобождается в цитоплазму в виде каспазы-8.

Существуют другие пути активации каспазы-8 – с участием рецепторов TNFR1 и DR3. Однако эти пути, включаемые одним и тем же адаптером TRADD, конкурируют с параллельными путями активации ядерных факторов транскрипции NF-κB (nuclear factor kappa B) и JNK/AP-1 (JNK, Jun-N-концевая киназа, является компонентом митоген-активируемого киназного пути, ведущего к активации фактора транскрипции AP-1), зависимыми от адаптеров RIP и TRAF (TNFR1-associated factor). Под контролем этих факторов транскрипции находится синтез белковых регуляторов, которые блокируют TNF- или Aро3L-индуцированную активацию каспазы-8. Предполагаются следующие пути передачи про- и антиапоптозных сигналов.

Адаптеры каспаз

Наличие DED- и CARD-участков обеспечивает образование комплексов прокаспаз со специальными адаптерными белками, которые способствуют активации каспаз. Известно о существовании по крайней мере девяти таких адаптерных белков (RAIDD, FADD, Apaf-1, CARDIAK, DEFCAP, DEDAF, Nod-1, Iraf, CARD-8). В результате их взаимодействия с каспазами образуются такие комплексы, как каспаза-1/CARDIAK, каспаза-1/Iraf, каспаза-1/CARD-8, каспаза-2/AIDD, каспаза-2/DEFCAP, каспаза-8/FADD, каспаза-8/DEDAF, каспаза-9/Apaf-1, каспаза-9/Nod1, каспаза-10/FADD, каспаза-10/DEDAF и Сед-3/Сед-4 соответственно. Адаптерные белки каспаз содержат домены смерти (DD, death domain), с помощью которых осуществляется взаимодействие длинного продомена каспаз с «рецепторами смерти», такими как Fas или TNFR1.

Процесс димеризации отдельных каспаз, приводящий к их аутопроцессингу и активации; осуществляется с участием длинного продомена молекулы-предшественника. По-видимому, одна из функций рассмотренных выше адаптерных белков связана с обеспечением максимально тесного взаимодействия между молекулами прокаспаз, что необходимо для их дальнейшей димеризации. Например, белок Apaf-1 способствует изменению конформации мономеров каспазы-9 и сближению их комплементарных поверхностей, стимулируя тем самым процесс образования энзиматически активных димеров этой каспазы.

Субстраты каспаз

Известно более семидесяти белковых субстратов каспаз, которые локализованы в клеточном ядре, других внутриклеточных структурах и цитоплазме. Каспазы специфически распознают последовательность, состоящую из четырех аминокислотных остатков и обозначаемую как P4-P3-P2-P1. Наиболее консервативными в данной последовательности каспазного субстрата являются остаток аспарагиновой кислоты, находящийся в позиции P1, и остаток глутамина в позиции P3. В результате гидролиза каспазами биологическая функция их субстратов может активироваться или ингибироваться. Расщепление белков ядерного матрикса вызывает нарушение структурной организации ядра и конденсацию хроматина; расщепление белков цитоскелета (актина и актин-связывающих белков гельзолина и фодрина) способствует образованию выпячиваний клеточной мембраны и в дальнейшем - распаду клетки с образованием апоптотических телец. При участии каспаз происходит инактивация протеинкиназ (Akt-1 и Raf-1), обеспечивающих деление и выживание клеток.

Из белков, ответственных за поддержание структурной целостности ядра, субстратами каспаз являются ламины, белки NuMa и acinus. Установлено, что в результате расщепления каспазой-6 ламин А и С образуются белковые продукты с молекулярной массой соответственно 47 и 37 кДа. Мутантные формы ламин, у которых отсутствует аминокислотный остаток аспарагиновой кислоты, вызывают задержку фрагментации ДНК и полностью блокируют конденсацию ядра. Сжатие и фрагментация ядра во время Fas-опосредуемого апоптоза обычно происходит после гидролиза пептидной связи в ядерном белке NuMa, осуществляемого каспазой-6. В отличие от ламин и белка NuMa, которые служат субстратами нескольких каспаз, белок acinus подвергается воздействию исключительно каспазы-3. Протеолитическое расщепление acinus необходимо для конденсации хроматина.

Еще одним субстратом каспаз является поли(ADP-рибозил)полимераза (PARP), которая играет важную роль в процессах репарации ДНК, благодаря способности регулировать активность

$\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -зависимой эндонуклеазы, обеспечивающей межнуклеосомное расщепление ДНК. Недавно был расшифрован иной механизм активированной каспазами деградации ДНК. Оказалось, что в цитоплазме клеток присутствует комплекс ДНКазы, ответственной за фрагментацию ДНК, с его ингибиторным белком ICAD. Такой комплекс обычно неактивен, однако расщепление белка ICAD под действием каспазы-3 приводит к активации ДНКазы и последующей деградации ДНК клетки.

Ингибиторы каспаз

Антиапоптотическое действие эндогенных ингибиторов каспаз связывают с их способностью блокировать активацию каспаз либо ингибировать их протеолитическое действие после активации. Первые ингибиторы каспаз были выявлены среди вирусных белков, ответственных за выживание вирус-инфицированных клеток. Препятствуя гибели клеток хозяина, эти белки обеспечивают накопление вирусных частиц во время литической инфекции и сохранение вируса в организме при хронической инфекции. Белок CrmA (cytokine response modifier A) вируса оспы, относящийся к семейству серпинов, способен подавлять апоптоз, ингибируя активность каспазы-8 и каспазы-1. CrmA образует с этими каспазами стабильный комплекс, в результате чего блокируется развитие апоптоза, опосредованное рецептором Fas. CrmA ингибирует не только цистеиновые, но и сериновые протеазы, например, гранзим В. Кроме блокирования апоптоза, серпин CrmA может подавлять воспалительные реакции в организме, что обусловлено, скорее всего, ингибированием активности каспазы-1 и последующего процессинга провоспалительных цитокинов.

В экспериментах по направленному мутагенезу бакуловируса *Autographa californica* были получены его мутантные варианты, которые обладают значительно меньшей вирулентностью. В указанных вариантах вируса обнаружены изменения в гене, кодирующем белок p35. Оказалось, что этот белок может ингибировать апоптоз не только в клетках насекомых, но и у млекопитающих. В последнем случае белок p35 способен подавлять *in vitro* активность каспазы-1, -3, -6, -8 и -10. Причем такое действие белка p35 является специфическим в отношении каспаз, но не других сериновых или цистеиновых протеаз. Гомолог белка p35 у млекопитающих пока не выявлен.

К ингибиторам каспаз относятся также белки семейства IAP (*inhibitors of apoptosis*), подавляющие активность каспаз-3 и -9. Эта группа белков была выявлена у бакуловирусов, они ингибировали гибель вирус-инфицированных клеток. На сегодняшний день у млекопитающих обнаружено восемь белков, подобных IAP бакуловирусов. При анализе структуры белков семейства IAP выявлен специфический участок BIR (baculoviral IAP repeat) длиной около 70 аминокислотных остатков. Белки XIAP, c-IAP1, C-IAP2 и NAIP человека имеют три таких BIR-последовательности. Оказалось, что для реализации антиапоптотического действия белков этого семейства требуется сохранение по крайней мере одного из участков **BIR**. Со стороны COOH-конца молекулы белка IAP обнаружен домен RING, наличие которого для подавления апоптотического сигнала в большинстве типов клеток не обязательно. Доказано, что белки c-IAP1, C-IAP2 и XIAP сохраняют свою антиапоптотическую функцию в отсутствие домена RING. Для структуры белков c-IAP1 и c-IAP2 характерно также наличие описанного выше домена CARD, который расположен между участками BIR и RING. С его помощью c-IAP1 связывается с CARD-содержащей киназой CARDIAK/RIP2, участвующей в активации каспазы-1.

Белок XIAP, который способен наиболее эффективно (среди других IAP-белков) ингибировать апоптоз, связывается только с активными формами каспазы-3 и -7, но не с их зимогенными проформами. За связывание с эффекторными каспазами-3 и -7 ответственен BIR2-домен белка XIAP, тогда как для ингибирования инициаторной каспазы-9 требуется наличие в белке XIAP домена BIR3.

К семейству IAP-белков также относится открытый в 1999 г. белок *сурвивин*, который содержит лишь одну BIR-последовательность. Сурвивин, экспрессирующийся в клетках многих перевиваемых опухолевых линий, подобно другим членам семейства IAP, связывается с каспазой-3 и -7 и ингибирует развитие апоптоза, инициированное различными индукторами. Локализация сурвивина в микротрубочках, скорее всего, способствует его антикаспазной активности во время G₂/M-фазы клеточного цикла.

Подобно сурвивину, два других недавно открытых члена семейства IAP-белков — ILP-2 и *ливин* (также называемый ML-IAP) - содержат лишь одну

VIR-последовательность. Однако, в отличие от сурвивина, для ливина и ILP-2 характерно наличие RING-домена. Ливин способен ингибировать апоптоз клеток, опосредуемый «рецепторами смерти», а также иницируемый гиперэкспрессией белков FADD, Вах, RIP и RIP3. Хотя белок ILP-2 не ингибирует Fas- или TNF-зависимый апоптоз, отмечено его выраженное антиапоптотическое действие в случаях гиперэкспрессии белка Вах или коэкспрессии каспазы-9 и ее адаптера Araf-1. Оба белка: ILP-2 и ливин, способны ингибировать инициаторную каспазу-9. Кроме того, ливин проявляет функцию, характерную для других IAP-белков, а именно, способность связываться с активированными формами каспаз-3 и -7.

Механизм, с помощью которого блокируется антиапоптотическое действие белков семейства IAP, связан с тем, что после инициации апоптоза из митохондрий в цитоплазму выходят, среди прочих, белки Smac (second mitochondria-derived activator of caspase)/DIABLO и Omi/HtrA2 (high temperature requirement A2), содержащие со стороны NH₂-конца молекулы консервативную IAP-связывающую последовательность (AVPS). В результате связывания Smac/DIABLO или Omi/HtrA2 с белком XIAP блокируется его действие, что способствует активации каспаз.

Имеется еще один эндогенный ингибитор каспаз, белок FLIP (FLICE-inhibitory protein), который существует в виде короткой (FLIP_S) и длинной (FLIP_L) форм. FLIP_S содержит два эффекторных DD-участка, тогда как FLIP_L имеет еще каспазоподобный домен, лишенный протеолитической активности. Как было показано, белок FLIP с высокой аффинностью связывается с белковым комплексом DISC (death-induced signaling complex), что блокирует активацию каспазы-8 (и, возможно, каспазы-10), а также передачу проапоптотического сигнала от «рецепторов смерти» семейства TNF. Некоторые вирусы (γ -герпесвирусы и вирус контагиозного моллюска) способны продуцировать антиапоптотические вирусные белки vFLIP, которые способствуют выживанию инфицированных клеток.

Кроме того, открыт белок BAR (bifunctional apoptosis regulator), который имеет DED-участок, способен конкурировать с адапторным белком FADD за связывание с предшественниками каспазы-8 и -10. Соединение белка BAR с прокаспазами препятствует их процессингу и активации. Благодаря наличию

трансмембранного домена и SAM-участка, белок BAR взаимодействует с антиапоптотическими белками Bcl-2 и Bcl-x_L, подавляя таким образом Вах-индуцированную гибель клеток. Эти свойства белка BAR определяют его уникальную способность блокировать экзогенно («рецепторы смерти») или эндогенно (Вах) индуцированную гибель клеток.

Еще один ингибитор активации каспаз, получивший название ARC (apoptosis repressor with CARD), подобно ингибитору каспаз BAR, взаимодействует с каспазой-8 (но не с каспазами-9, -3 или -1). В отличие от BAR, белок ARC содержит CARD-участок со стороны N-конца молекулы. Экспрессия белка ARC является тканеспецифической и ограничена скелетными и сердечной мышцами, что позволяет говорить об избирательности антиапоптотического действия белка ARC, особенно в случае гибели клеток, опосредованной «рецепторами смерти».

Белки семейства Bcl-2 непосредственно не взаимодействуют с каспазами. Большая часть Bcl-2-подобных белков имеют трансмембранный домен, позволяющий им находиться в составе внутриклеточных мембран, преимущественно во внешней оболочке митохондрий. Показано, что рекомбинантные Bcl-x_L, Bcl-2, Вах или Bid способны образовывать в искусственных мембранах ионные каналы с различными свойствами. Можно предположить, что «склонность» проапоптотических Bcl-2-подобных белков к димеризации в мембранах может иметь отношение к их способности формировать ионные каналы. Вероятнее всего, в формировании каналов участвуют белки Вах или Bid, через которые проапоптотические факторы (активирующий каспазу-9 цитохром c, прокаспазы-2, -3, -9, апоптозиндуцирующий фактор AIF, эндонуклеаза G и др.) покидают пределы митохондрий.

Помимо способности стимулировать переход проапоптотических факторов из митохондрии в цитоплазму через вновь образованные каналы, Bcl-2-подобные белки регулируют этот процесс, воздействуя на уже имеющиеся мембранные поры. Показано, что в результате взаимодействия белка Вах с потенциал-зависимыми анионными каналами (VDAC) происходит выход из выделенных митохондрий проапоптотических медиаторов. В присутствии АТР, цитохрома c и адаптерного белка Araf-1 каспаза-9 активируется, что

инициирует последующий каскад реакций с участием каспазы-3, -6 и -7. При этом антиапоптотический белок Bcl-2 способен закрывать VDAC и ингибировать апоптоз.

В последние годы были синтезированы небольшие пептидные соединения, являющиеся псевдосубстратами каспаз и ингибиторами их активности. Они имеют альдегидную (-CHO) или карбонильную (FMK, -CMK) группу и обратимо или необратимо подавляют активность каспаз, конкурируя за их клеточные субстраты. Причем получены не только специфические ингибиторы определенных каспаз (например, альдегиды тетрапептидов Ac-WEDH-CHO и Ac-YVAD-CHO ингибируют действие каспаз-1 и -4, а Ac-VEID-CHO - каспазы-6), но и панкаспазные ингибиторы (например, N-бензилоксикарбонил-Val-Ala-Asp-фторметилкетон, z-VAD-FMK). Особое внимание исследователей привлекают флуорометилкетоны, которые с высокой эффективностью блокируют активность не только каспаз, но и сериновых протеиназ, в частности катепсина В. Кроме того, цистеиновые протеиназы чувствительны к действию катионов Zn^{2+} . Воздействие $ZnCl_2$ приводит к блокированию расщепления субстрата каспазы-3 и сохранению жизнеспособности промиелоцитарных лейкемических клеток линии HL60 после их обработки ингибитором топоизомеразы II.

Существует ещё такой механизм, как «физиологическое секвестрирование» каспаз в отдельных органеллах клетки, что препятствует их доступу к субстратам, находящимся в цитоплазме или других клеточных компартментах. Внутриклеточная локализация прокаспаз и переход их активированных форм из одних клеточных участков в другие имеют важное значение для реализации апоптотической гибели клеток. В табл.5 обобщены данные литературы о субклеточной локализации зимогенных и активированных форм девяти наиболее изученных каспаз у млекопитающих. Перемещение активированных каспаз из одного клеточного компартмента в другой имеет важное значение для передачи проапоптотического сигнала по каспазному каскаду. Приведем в этой связи один показательный пример. Установлено, что для активации каспазы-12 необходим переход каспазы-7 из цитоплазмы в эндоплазматический ретикулум, тогда как последующая активация каспазы-9 и -3 зависит от выхода активированной каспазы-12 в

цитоплазму. Поскольку после активации каспазой-9 каспаза-3 способна в свою очередь расщеплять как цитоплазматические, так и ядерные субстраты, легко сосчитать, что в протеолитическом каскаде каспаза-7-каспаза-12-каспаза-9-каспаза-3 - специфические субстраты происходит по крайней мере три смены субклеточной локализации каспаз. Биологическое действие отдельных каспаз может компенсироваться другими каспазами.

Таблица 5

Субклеточная локализация каспаз

Активная генная или форма	Цитоплаз	Ядро	Митохондрии	Аппара Гольдж	Эндоплазмат ческий
Каспаза-1	+	+			
Каспаза-2		+		+	
Каспаза-3	+	+	+		
Каспаза-6	+	+			
Каспаза-7	+	+	+		+
Каспаза-8	+				
Каспаза-9	+	+	+		
Каспаза-10	+				
Каспаза-12					+
Прокаспаза-1	+				
Прокаспаза-2	+	+	+		
Прокаспаза-3	+		+		
Прокаспаза-6	+				
Прокаспаза-7	+				
Прокаспаза-8	+				
Прокаспаза-9	+		+		
Прокаспаза-10	+				
Прокаспаза-12					+

Функции каспаз

Продукция цитокинов. Активация каспаз в организме человека необходима для регуляции гомеостаза клеток иммунной системы, а также для продукции цитокинов с разной направленностью действия и, следовательно, обеспечивает функционирование различных звеньев иммунитета. Известно, что специфическими субстратами каспазы-1 являются предшественники интерлейкина(1L)-1 β и другого провоспалительного цитокина — IL-18, который индуцирует продукцию γ -интерферона цитотоксическими Т-лимфоцитами и естественными киллерными клетками. Провоспалительные эффекты указанных цитокинов связаны с их способностью стимулировать

синтез белков острой фазы воспаления, простагландинов и других медиаторов. Мыши, у которых отсутствует ген каспазы-1, резистентны к индукции эндотоксического шока и выживают при действии липополисахарида в дозе, вызывающей гибель интактных мышей в течение 30 ч. Аналогичными свойствами обладают мыши с дефицитом каспазы 11.

Предшественник провоспалительного цитокина IL-16 также является каспазным субстратом. Под действием каспазы-3 от молекулы про-IL-16 отщепляется зрелая форма IL-16 с молекулярной массой 13 кДа. Стимулированная α -интерфероном продукция лимфоцитами периферической крови IL-16 также зависит от активации каспазы-3, ингибиторы которой блокируют продукцию IL-16 этими клетками. Лимфобластные Т-клетки линии Jurkat в ответ на стимуляцию фитогемагглютинином или комбинированную обработку антителами против CD-3 и CD-28 начинают секретировать IL-2 в среду культивирования. Одновременно с этим в стимулированных клетках обнаружена активация каспазы-3, сопровождающаяся расщеплением ее субстратов PARP и α -спектрина. При этом ингибиторы каспаз z-D-DCB и DEVD-CHO блокируют не только деградацию указанных каспазных субстратов, но и продукцию IL-2 активированными клетками линии Jurkat. Пока не известно, участвует ли каспаза-3 в процессинге предшественника IL-2, как в случае с про-IL-16, или же такое ее действие является опосредованным.

Антиапоптотическая функция каспаз. Выявлены формы каспаз-2, -3 и -9, которые образуются в результате альтернативного сплайсинга. Характерной особенностью таких «усеченных» форм каспаз является их действие в качестве эндогенных ингибиторов каспаз. Какими же могут быть механизмы антиапоптотической активности каспаз? В случае короткой формы каспазы-9 рассматриваются следующие возможности: 1) связываясь с апоптосомой (белковый комплекс, активирующий каспазу-9), короткая форма каспазы-9 конкурирует с каспазой-9, что блокирует активацию последней; 2) короткая форма каспазы-9 димеризуется с каспазой-9, что препятствует олигомеризации каспазы-9; 3) короткая форма каспазы-9 образует комплексы с каспазой-3, блокируя активацию каспазы-3 каспазой-9. Весьма примечательным является факт выявления высоких значений соотношения короткая форма каспазы-9/каспаза-9 в таких органах, как яичник, мозг и

сердце. Полагают, что в яичнике короткая форма каспазы-9 оказывает антиапоптотическое действие в периоды менструального цикла, не связанные с массовой потерей клеток, тогда как в мозге и сердце она поддерживает жизнеспособность клеток, которые не заменяются новыми.

Установлено, что процесс гибели клеток несинхронизированной культуры клеток линии U-937 (гистиоцитарная лимфома человека) в условиях постоянного присутствия TNF- α не завершается через 3—4 ч, а продолжается в течение по крайней мере 96 ч. Такой «персистирующий» апоптоз протекает волнообразно, что, по-видимому, объясняется вовлечением в этот процесс все новых субпопуляций клеток. При этом лишь в отдельных временных точках (что, возможно, зависит от фазы клеточного цикла) выявляются изменения морфологии, характерные для начальных этапов апоптоза (конденсация ядра и цитоплазмы). Эти изменения обычно предшествуют увеличению количества клеток с фрагментированным ядром. На фоне указанных изменений сохраняется субпопуляция клеток, выживающих в присутствии TNF- α . Поскольку на аналогичной модели апоптоза была отмечена активация каспазы-3, -8 и -9, можно предположить, что одним из факторов, ответственным за персистирующий характер TNF- α -индуцированного апоптоза клеток U-937, является изменение в различных фазах клеточного цикла соотношения форм каспаз с про- и антиапоптотической активностью.

Регуляция жизнеспособности клеток. Различные домены одной и той же каспазы способны оказывать разнонаправленное действие на жизнеспособность клеток. Усеченные формы каспаз могут образовываться не только в результате альтернативного сплайсинга, но и после расщепления обычной формы этого энзима. Так, активированная каспазой-9 каспаза-3 способна переваривать пептидную связь каспазы-9 по Asp¹³⁰. В результате этого высвобождается CARD-домен каспазы-9, который способствует активации фактора транскрипции NF- κ B и последующей экспрессии антиапоптотических генов *bcl-x* и *iap*.

Мыши, дефицитные по каспазе-3, обычно погибают через 1—3 недели после рождения. У таких мышей наблюдаются гиперплазия и дезорганизация структур мозга, обусловленные нарушением индукции апоптоза в нейронах. При этом мыши, лишенные гена каспазы-3, рождаются меньшими по размеру

и массе, чем интактные животные. Такая особенность предполагает, что каспаза-3, помимо участия в апоптозе клеток мозга во время онтогенеза, может быть важным регулятором процессов, связанных с пролиферацией и/или дифференцировкой клеток.

Активация каспазы-3 в стимулированных фитогемагглютинином лимфоцитах не сопровождается апоптотическими изменениями в этих клетках. Активация каспазы-3 была также обнаружена в Т-лимфоцитах, стимулированных митогенами и ИЛ-2. При этом уровень активности каспазы-3 в пролиферирующих клетках оказался даже выше, чем в апоптотических опухолевых клетках. Более того, при стимуляции Т- и В-лимфоцитов отмечается не только усиление активности каспазы-3, но и расщепление ее специфических субстратов (PARP, ламин В, киназа Weel, но не фактор фрагментации ДНК DFF45). CD3-индуцированная пролиферация Т-клеток человека блокируется после их обработки синтетическими ингибиторами каспаз, хотя в этом случае активация клеток сопровождается быстрым процессингом каспазы-8, а не каспазы-3. Кстати, гипотрофия сердечной мышцы, часто наблюдаемая у мышей с дефицитом гена каспазы-8, также указывает на роль этой каспазы как эндогенного регулятора выживания и пролиферации клеток *in vivo*.

При хроническом панкреатите экспрессия каспазы-1 была обнаружена в атрофических ацинарных клетках поджелудочной железы, пролиферирующих клетках желчных протоков и в ацинарных клетках, редифференцирующихся для образования каналоподобных структур. Такое распределение каспазы-1 в клетках поджелудочной железы и желчных протоков свидетельствует по крайней мере о двух функциях этого энзима *in vivo*: индукции гибели атрофических ацинарных клеток и стимуляции пролиферации и/или дифференцировки в клетках желчных протоков. В дополнение к этому, при стимуляции Т-лимфоцитов отмечается активация каспазы-6 и -7 (но не каспазы-1, -2 или -4), что предполагает участие широкого спектра каспаз в регуляции клеточной пролиферации.

Каспазы принимают участие в регуляции дифференцировки клеток. При дифференцировке клеток линии U-937, индуцированной форболовым эфиром ТРА, происходит выход цитохрома *c* из митохондрий и активация

каспазы-3. Во время дифференцировки клеток миелолейкоза человека (линия HL-60) и клеток остеосаркомы, индуцированной ретиноевой кислотой, также отмечено увеличение экспрессии и функциональной активности каспаз-3, -8 и -9. Кроме того, от активности каспаз зависит дифференцировка клеток эритролейкемии линии K562, индуцированная мутантной формой белка p53. Активация каспазы-3 в незрелых эритроблестах и последующее расщепление ее субстратов, ответственных за целостность ядра и конденсацию хроматина (ламин В и acinus соответственно), не приводит к гибели клеток, но обеспечивает их дифференцировку. Важно отметить, что активирующиеся при этом каспазы-3 и -6 не оказывают протеолитического воздействия на другие свои субстраты (DFF44 и GATA1), расщепление которых обычно приводит к апоптозу. При дифференцировке эпителиальных клеток хрусталика глаза и кератиноцитов кожи происходит активация каспаз, необходимая для элиминации из этих клеток ядер. Хотя эффекторные каспазы-3, -6 и -7 при этом не активируются, дифференцировка клеток эпидермиса сопровождается синтезом и процессингом прокаспазы-14. Интересно, что каспаза-14, в отличие от каспазы-3, не принимает участия в гибели дифференцированных кератиноцитов, инициируемой традиционными индукторами апоптоза. Таким образом, можно сделать вывод, что наши знания о структуре каспаз, молекулярных механизмах их активации и ингибирования во многом опережают представления об их физиологических функциях. Становится ясным, что ограниченный протеолиз субстратов-мишеней, катализируемый каспазами, также чрезвычайно важен для регуляции иммунного ответа и процессов, связанных с пролиферацией, выживанием и дифференцировкой клеток. Механизмы участия каспаз в реализации указанных клеточных функций, по-видимому, связаны с активацией (в результате процессинга) эндогенных стимуляторов.

Молекулярные механизмы действия каспаз

После получения сигнала к апоптозу в клетке происходит два последовательных события: первое – немедленное – развивается в мембране, с участием рецепторов гибели клетки, и второе – в течение нескольких часов, приводящее к ее уничтожению и заключающееся в активации каскада внутриклеточных протеаз (каспаз). Белки-предшественники каспаз обычно

активируются путем их протеолиза или образования димерных/олигомерных комплексов. В результате активации каспаз активируется фактор фрагментации ДНК, что ведет к необратимому распаду ДНК на нуклеосомальные фрагменты. Так запускается каскад протеолитических ферментов, осуществляющих апоптоз.

Олигомеризация *Fas*-рецептора активирует каспазу-8, а также каспазу-10, которые через *DED*-участок связаны с белком *FADD*. При этом индукция олигомеризации каспазы-8 или -9 приводит к их аутоактивации и развитию апоптоза. Активация каспазы-2 связана с действием адаптерного белка *RAIDD*. Этот белок, подобно адаптеру *Araf-1*, содержит *CARD*-участок, необходимый для реализации белок-белковых взаимодействий. *CARD*-содержащая киназа *CARDIAK* также активирует прокаспазу-1 через *CARD* – *CARD*-контакты. К активации каспаз могут приводить факторы, высвобождающиеся из митохондрий при повышении проницаемости их мембраны. В присутствии АТФ и цитохрома *c* прокаспаза-9 взаимодействует с адаптерным белком *Araf-1*, что приводит к её активации и инициации последующего каскада биохимических реакций с участием каспаз-3, -6, -7.

Активация каспаз является ключевым этапом в промежуточных и терминальных стадиях апоптоза. Поскольку одни каспазы могут активировать другие, выделяют две группы каспаз: инициаторы и эффекторы. **Инициаторные каспазы** принимают апоптотический сигнал и передают его на эффекторные каспазы. Они воздействуют на прокаспазы путем их протеолитического расщепления в местах расположения аспарагиновых оснований с последующей димеризацией образованных таким образом активных единиц. **Эффекторные каспазы**, т.е. ферменты непосредственно гидролизующие структурные белки клетки, будучи активированными, начинают цепь протеолитических событий, целью которых является апоптотический “демонтаж” клетки.

Инициаторы (каспазы-2, -8, -9, -10) воздействуют на эффекторы (каспазы-3, -6, -7 и -14), которые, в свою очередь, гидролизуют внутриклеточные субстраты. Первой активируется каспаза-8 под действием сигнала, идущего от мембранного рецептора. Инициаторные каспазы могут выступать в роли эффекторных каспаз, что, по-видимому, необходимо для

усиления активности каспазного каскада. Так, например, в определенных условиях каспаза-8 может активироваться только после того как каспаза-9 трансактивирует каспазу-6.

Рис.12 иллюстрирует взаимодействие между каспазами первого и второго эшелона. На этапе активации инициирующих каспаз первого эшелона жизнь клетки еще можно сохранить. Каспаза-8 активирует каспазу второго эшелона (эффекторную каспазу): путем протеолиза из прокаспазы-3 образуется каспаза-3. Каспаза-3 способна в дальнейшем к самостоятельной активации (автокатализу или автопроцессингу), активирует ряд других протеаз семейства каспаз. После этого процесс, запущенный программой смерти, оказывается необратимым. После активации каспазы-8, инициируется один из возможных механизмов клеточного суицида.

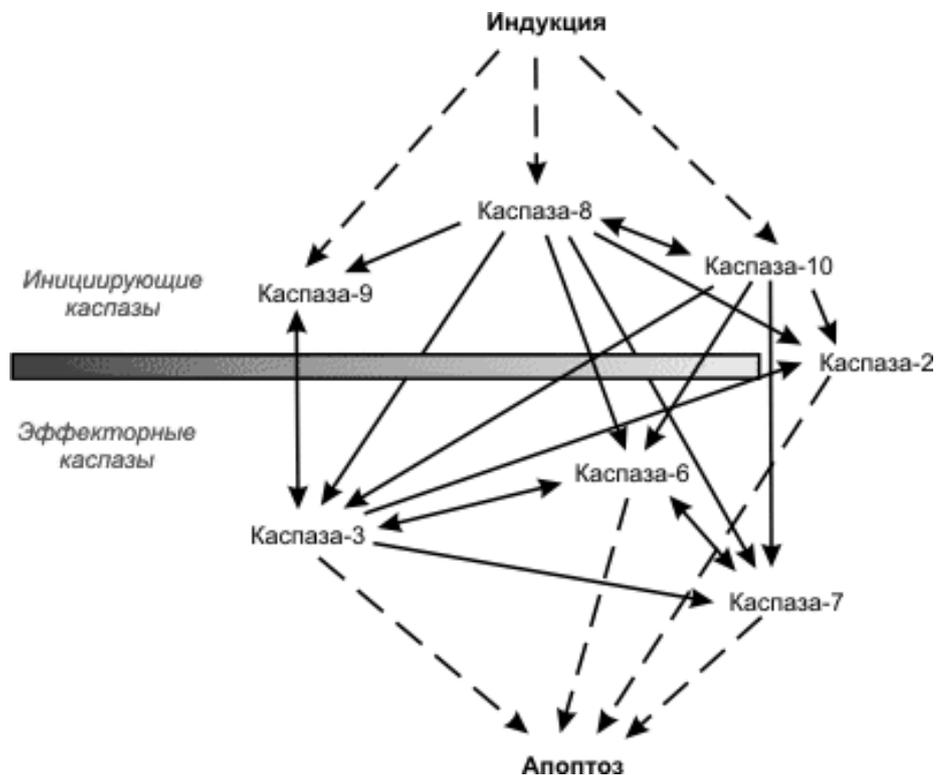


Рис.12. Взаимодействие инициирующих и эффекторных каспаз

Первый заключается в непосредственной активации эффекторных каспаз (-3, -4, -5, -6, -7). Последовательность каскадной реакции активации эффекторных каспаз может варьировать, видимо, в зависимости от типа и состояния клеток. Наиболее вероятной является следующая цепочка: каспаза-8 расщепляет каспазу-9, каспаза-8 и/или каспаза-9 активирует каспазы-3 и -7, после чего каспаза-3 индуцирует каспазу-6. Расщепление разнообразных

субстратов каспазами обуславливает появление характерных для апоптотической или некротической гибели признаков. В частности, субстратом каспазы-3 является белок DFF45 (45-kDa inhibitor of DNA Fragmentation Factor), ингибитор нуклеазы CPAN/DFF40, высвобождение которой обеспечивает межнуклеосомную фрагментацию хроматина в погибающих клетках. Расщепление другого белка, acinus, является причиной конденсации хроматина. В основе «пузырчатости» плазматической мембраны лежит расщепление p21-активируемой киназы-2 и гельзолина. Каспазная инактивация таких ферментов, как транслоказы фосфолипидов и скрамблазы, ответственных за поддержание липидной асимметрии плазматической мембраны, приводит к появлению на внешней стороне мембраны погибающих клеток фосфатидилсерина.

Среди молекулярных мишеней каспаз-эффекторов известны многие белки, деградация которых вызывает развитие необратимых процессов, характерных для апоптоза. К ним относятся цитозольные белки: Bcl-2, каспазы, белки цитоскелета, ядерные белки: поли-(АДФ-рибозил)полимераза, DFF40 (40 kDa DNA Fragmentation Factor), ламины, гистон H1, топоизомеразы, белки, отвечающие за сплайсинг мРНК, репликативный фактор С и др. Белки Bcl-2 являются негативными регуляторами апоптоза, разрезаемыми каспазами. Оказывается, что разрезание дезактивирует эти белки, а также продуцирует образование их фрагментов, способствующих апоптозу.

Каспазы также участвуют в реорганизации клеточных структур непрямым образом, разрезая некоторые белки цитоскелета, такие как гелсолин, киназа фокальной адгезии (ФАК) и киназа-2, активируемая p21 (РАК2). Разрезание этих белков приводит к нарушению регуляции их активности. Гелсолин является белком, который организует выстраивание актиновых филаментов регулярным образом. Разрезание каспазой генерирует фрагменты, которые сами являются активными. Диссоциация регуляторных и эффекторных доменов является отличительной чертой функций каспаз. Например, они дезактивируют и нарушают регуляцию белков, задействованных в репарации ДНК (такие как DNA-RKcs), сплайсинге митохондриальных РНК (такие как U1-70к) и в репликации ДНК (такие как фактор репликации С).

Каспазы относятся к конститутивным ферментам, что позволяет быстро индуцировать гибель клеток. Один из путей активации каспаз опосредован взаимодействием индуктора со специфическими рецепторами, другой связан с активацией каспазы-9 в результате образования гетеродимеров белками семейства Bcl-2. Третий путь активации каспаз осуществляется при помощи гранзимов В и является актуальным в случае индукции апоптоза цитотоксическими лимфоцитами, которые секретируют эти ферменты. При таком способе активации каспаз необходимо присутствие порообразующих белков перфоринов. Мишенями гранзимов В являются каспазы 1, 3 и 9.

Но откуда бы ни запускался каскад, его узловым звеном является каспаза-3. Она активируется и каспазой-8 и каспазой-9. Например, удаление из клеточных экстрактов каспазы-9 препятствует зависимой от цитохрома с активации каспаз-2, -3, -6, -7, -8 и -10. При этом каспаза-3 необходима для активации каспаз-2, -6, -7, -8 и -10 в условиях зависимой от цитохрома с активации каспазы-9. *In vitro* каспаза-8 активирует, помимо прокаспазы-8, семь зимогенов других каспаз (прокаспазы-1, -2, -3, -6, -7, -9 и -11). Каспазы-1 и -11 способствуют активации эффекторных каспаз-3 и -7, и в значительно меньшей степени каспазы-6. Поскольку каспаза-11 активирует каспазы-1 и -3, это позволяет отнести ее к группе инициаторных каспаз. Хотя каспаза-2 не способна непосредственно инициировать процессинг эффекторных каспаз, показано, что она, расщепляя белок Bid, стимулирует выход из митохондрий цитохрома с (и других проапоптотических медиаторов), что способствует активации каспазы-9. Каспазу-2 также способны активировать каспазы-3, -7 и -8.

На этапе активации каспаз первого эшелона жизнь клетки еще можно сохранить. Существуют регуляторы, которые блокируют или, напротив, усиливают разрушительное действие каспаз первого эшелона. К ним относятся белки Bcl-2 (ингибиторы апоптоза: A1, Bcl-2, Bcl-W, Bcl-X_L, Breg-1, Mcl-1 и NR13) и Bax (промоторы апоптоза: Bad, Bak, Bax, Bcl-X_S, Bid, Bik, Bim, Hrk, Mtd).

Пути активации каспаз и последовательность их взаимодействия зависят как от типа клеток, так и от типа индуктора апоптоза. Активированные каспазы могут перемещаться из цитоплазмы в ядро, где они

принимают участие в протеолизе ядерных белков *гистона H1* и *ламина В*. Разборка клеточных структур осуществляется путем разрушения ядерной ламины, жесткой структуры, подстилающей ядерную мембрану, причастную к организации хроматина. Ламина сформирована последовательностью одинаково ориентированных полимеров белков промежуточных филаментов, называемых *ламинами*. В ходе апоптоза, ламины (полимеры) разрезаются каспазами в определенном месте, что приводит к деструкции ламины и способствует конденсации хроматина.

Следует отметить, что фосфорилирование этих белков в профазе митоза приводит к конденсации хроматина и фрагментации ядра. При апоптозе модификация гистона H1 и ламина В осуществляется путем частичного протеолиза. Этим можно объяснить, например то, что ядерная оболочка распадается не на микропузырьки, а на оболочки нескольких ядерных фрагментов. В результате действия каспаз активируется *ДНК-протеинкиназа*, способная фосфорилировать белок *p53*, что приводит к активации и этого белка. Частичный протеолиз белка *pRb* ингибирует его и способствует апоптозу.

Каспазы способны воздействовать на цитоплазматические белки: *фодрин* и *актин*. Фодрин участвует в изменении поверхности клетки – появлению впячиваний и выступов, “гофрированию” плазматической мембраны.

Активация каспаз необходима не только для реализации клеточной гибели, но и для нормальной пролиферации и дифференцировки. Увеличение активности каспаз в этих случаях значительно слабее, чем в погибающих клетках. Одна из функций каспаз состоит в дезактивации белков, которые предохраняют живую клетку от апоптоза. Ещё один пример связан с разрезанием *Icad/DFF45*, ингибитора нуклеазы, ответственной за фрагментацию ДНК, а также *CAD* (caspase-activated deoxyribonuclease). В неапоптотических клетках *CAD* присутствует как неактивный комплекс с *Icad*. В ходе апоптоза *Icad* дезактивируется каспазами, оставляя *CAD* свободной и позволяя ей действовать как нуклеазе.

Таким образом, каспазы нарушают контакты с окружающими клетками, реорганизуют цитоскелет, выключают репликацию и репарацию ДНК,

прерывают сплайсинг, разрушают ДНК, разрывают ядерные структуры, стимулируют клетки продуцировать сигналы их присутствия фагоцитам и дезинтегрируют клетки на апоптотические тела.

Фагоцитоз погибающих клеток

Апоптотическая гибель клеток завершается их фагоцитозом без индукции воспалительных реакций, а некроз приводит к воспалению. В этом, очевидно, и заключается биологический смысл существования двух различных типов клеточной гибели. Одним из подтверждений такого вывода является то, что экспериментальное нарушение или блокирование фагоцитоза апоптотических телец приводит к развитию аутоиммунных заболеваний.

В основе поглощения погибающих клеток фагоцитирующими клетками лежат принципы межклеточного взаимодействия. В настоящее время известны три основных типа молекул, экспрессирующихся на поверхности апоптотических клеток или телец и выступающих в роли лигандов для рецепторов фагоцитирующих клеток: 1) - *фосфатидилсерин*, появляющийся в большом количестве на внешней стороне мембраны погибающих клеток в результате нарушения липидной асимметрии плазматической мембраны, 2) - *окисленные фосфолипиды*, в частности окисленный фосфатидилсерин и фосфолипиды, входящие в состав липопротеидов низкой плотности, 3) - *ICAM-3*, специфические мембранные белки, запускающие фагоцитоз. В процессе узнавания и активации фагоцитирующих клеток, по-видимому, участвует не столько пептидная цепь гликопротеинов, сколько углеводные группы.

Помимо макрофагов, погибающие клетки могут поглощаться дендритными, эпителиальными, эндотелиальными клетками, фибробластами, гепатоцитами. Показано, что в узнавании сахаров, экспрессируемых на мембране погибающих клеток, участвуют асиалогликопротеиновый рецептор, обнаруженный на поверхности макрофагов, гепатоцитов и эндотелиальных клеток печени, а также CD 14. В связывании фосфатидилсерина и окисленных фосфолипидов погибающих клеток участвуют молекулы самой различной природы. К формированию межклеточных контактов, опосредованных фосфолипидами, причастны рецепторы $\alpha\nu\beta 3$ -витронектина и $\alpha\nu\beta 5$ -

витронектина, β_1 и β_2 - интегрин, компоненты комплемента C1q и iC3b, «scavenger» рецепторы CD36, SR-BI, oxLDL, CD68, CD91, LOX-1, SREC, β_2 – гликопротеин 1, продукты генов gas6 и MER. Для связывания лигандов необходима кооперация нескольких рецепторов между собой — C1q и CD96, gas6 и MER. Многие из этих рецепторов не проявляют выраженной специфичности к фосфатидилсерину по сравнению с другими фосфолипидами.

На сегодня известен единственный рецептор, специфичный для фосфатидилсерина. Фосфатидилсериновый рецептор обнаружен на поверхности макрофагов, фибробластов, дендритных, эпителиальных и эндотелиальных клеток, но отсутствует в лимфоцитах, эритроцитах, моноцитах и нейтрофилах. Установлено, что взаимодействие фосфатидилсерина апоптозных клеток и фосфатидилсеринового рецептора фагоцитирующих клеток стимулирует экспрессию и секрецию противовоспалительных медиаторов, таких как TGF- β , IL-10, PGE₂ и др., и подавляет продукцию цитокинов, активирующих воспаление, IFN- γ и TNF, и таких цитотоксических соединений, как NO.

Если на поверхности мембраны погибающих клеток отсутствует фосфатидилсерин, то происходит активация CD14, CD91, C1q и интегринов, что вызывает воспалительную реакцию. Поскольку такая ситуация характерна для фагоцитоза некротических клеток, можно было бы полагать, что CD14, CD91, C1q и некоторые интегрин отвечают за удаление некротических клеток, а фосфатидилсериновый рецептор — апоптозных. Предполагается, что узнавание погибших клеток осуществляется с участием многих, если не всех, рецепторов, но продукция против- или провоспалительных медиаторов фагоцитирующими клетками зависит от того, задействован ли фосфатидилсериновый рецептор.

Липидные микродомены клеточных мембран

Исследования структурной организации клеточных мембран апоптозных клеток позволили сформировать представление о существовании особых липидных микродоменов (ЛМД), получивших название rafts (рис.13).

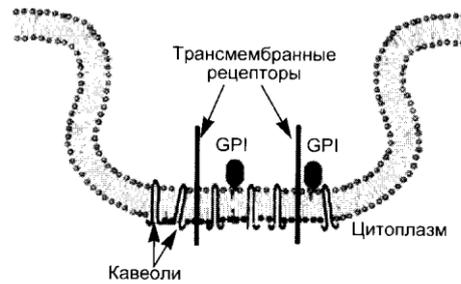


Рис.13. Структурная организация липидных микродоменов

Другие обозначения этих структур, используемые разными авторами,— DRMs, detergent-resistant membranes. DIGs, detergent-insoluble glycolipid-enriched membranes, GEMs, glycolipid-enriched membranes, TIFF, Triton-insoluble floating fraction. Липидная компонента ЛМД представлена сфинголипидами и холестерином. Холестерол играет центральную роль в структурной целостности и в функционировании ЛМД. Также в составе ЛМД выявлены ганглиозиды GM1, GM3, GD3 и керамид.

Церамид, образуемый в результате биосинтеза *de novo* или катаболизма сфингомиелина с участием сфингомиелиназ, рассматривается как вторичный мессенджер, участвующий в процессах пролиферации, дифференцировки, а также гибели клеток. Предполагается, что керамид необходим и достаточен для индукции некоторых форм стресс-опосредованного апоптоза.

Липидные микродомены, по-видимому, участвуют в поддержании холестерового баланса в клетке. С помощью ЛМД происходит транспорт холестерина из внутриклеточных органелл к экстраклеточным акцепторам холестерина, например к липопротеинам высокой плотности (ЛПВП). В ЛМД обнаружен клеточный рецептор для ЛПВП (SR-B1). Этот рецептор участвует как в захвате холестерина из ЛПВП, так и в его доставке из клетки к ЛПВП. Следовательно, одним из механизмов, с помощью которого ЛМД поддерживают баланс холестерина в клетке, является регуляция функций SR-B1. Также ЛМД участвуют в транспортировке синтезируемого *de novo* холестерина от эндоплазматического ретикулума к плазматической мембране.

Белковые компоненты ЛМД представлены семейством белков *кавеолинов*. Кавеолин-1 и -2 экспрессируются в большинстве типов клеток, тогда как кавеолин-3 специфичен для мышечных тканей и обнаруживается в клетках скелетной и гладкой мускулатуры, в сердечной мышце. Точный

механизм связывания кавеолина с мембранами пока не известен, однако было показано, что кавеолин-1 взаимодействует с холестерином и сфинголипидами, основными компонентами ЛМД. Установлено, что большая часть белков ЛМД является молекулами различных сигнальных путей. Была сформулирована кавеолярная сигнальная гипотеза, заключающаяся в том, что локализация кавеолинов в ЛМД дает им заметные преимущества в обеспечении механизма последовательной регуляции событий, а также способствует взаимодействию различных сигнальных путей. В большинстве случаев сигнальные компоненты в ЛМД могут находиться в неактивном состоянии, будучи связанными с кавеолином, до тех пор, пока активация и высвобождение не будут вызваны подходящим стимулом.

Белки, связывающиеся с кавеолином, а также сам кавеолин, как правило, содержат по крайней мере один из следующих аминокислотных мотивов: $\Phi\text{X}\Phi\text{X}\text{X}\text{X}\Phi$, $\Phi\text{X}\text{X}\text{X}\Phi\text{X}\text{X}\Phi$, $\Phi\text{X}\Phi\text{X}\text{X}\text{X}\Phi\text{X}\text{X}\Phi$, где Φ — ароматическая аминокислота (фенилаланин, тирозин или триптофан), а X — любая аминокислота. Этот мотив получил название — *домен связывания с кавеолином*. Кавеолины выступают в роли белков-интеграторов, которые концентрируют и регулируют сигнальные молекулы.

ЛМД участвуют в передаче сигналов, опосредованных рецепторами семейства TNF-R, играют определяющую роль в TNF-зависимой активации NF- κ B. Предполагается, что разрушение ЛМД блокирует TNF-зависимую активацию NF- κ B, переключая при этом TNF-индуцированный сигнал с пролиферативного на апоптотический.

Другой вариант заключается в том, что при взаимодействии рецептора и лиганда активируются каспазы, которые в свою очередь, расщепляя мембранные белки, вызывают нарушение липидной асимметрии плазматической мембраны. При этом сфингомислин оказывается на внутренней стороне мембраны и становится доступным для цитоплазматических или мембранно-ассоциированных сфингомиелиназ. В результате действия сфингомиелиназ сфингомиелин гидролизуется, что приводит к образованию цсрамида и изменению проницаемости плазматической мембраны. Церамид способен взаимодействовать с

различными белковыми субстратами: протеинкиназами С и К, катепсином D, церамид-активируемыми протеинфосфатазами, фосфолипазой A2. Далее возможны различные пути регуляции клеточной гибели. Взаимодействие с протеинфосфатазами PP 1 и 2 индуцирует, в частности, дефосфорилирование белковых факторов SR, контролирующего альтернативный сплайсинг. Вследствие этого повышается экспрессия Bcl-Xs и каспазы-9. Эти же фосфатазы, по-видимому, участвуют в дефосфорилировании Bcl-2, необходимым для индукции выхода цитохрома c. При связывании церамида с катепсином D образуется новая форма фермента, активирующая, вероятно, эффекторные каспазы.

Исследования механизмов церамид-зависимой гибели, цитокин-зависимого апоптоза и нарушений структуры клеточных мембран позволили наметить неизвестные ранее пути, активируемые различными сигналами.

Значение апоптоза в развитии заболеваний

Исследования последних лет показали, что патогенез многих болезней человека, в том числе рака, лейкозов, аутоиммунных заболеваний и вирусных инфекций, связан с неспособностью клеток подвергаться апоптозу. Такие болезни, как нейродегенеративные расстройства, СПИД, остеопороз, апластическая анемия, напротив, могут быть связаны с повышенной способностью клеток к апоптозу (табл.6).

Таблица 6

Болезни, связанные с торможением и усилением апоптоза

Торможение апоптоза	Усиление апоптоза
Злокачественные опухоли: некоторые острые лейкозы: фолликулярная лимфома рак с мутацией гена p53 гормонзависимые опухоли: рак молочной железы рак простаты рак яичника Аутоиммунные болезни:	СПИД Нейродегенеративные изменения: болезнь Альцгеймера болезнь Паркинсона боковой амиотрофический склероз пигментная ретинопатия регенерация мозжечка Апластическая анемия

<p>системная красная волчанка</p> <p>гломерулонефрит</p> <p>Вирусные инфекции:</p> <p>вирусы герпеса</p> <p>вирус оспы</p> <p>аденовирусы</p>	<p>Ишемические поражения:</p> <p>инфаркт миокарда</p> <p>инсульт</p> <p>краш-синдром</p> <p>Токсическое поражение печени:</p> <p>алкогольный цирроз</p>
---	---

В настоящее время доказана прямая связь между нарушениями регуляции апоптоза и *заболеваниями иммунной системы*. При системной красной волчанке, ревматоидном артрите в сыворотке крови часто обнаруживаются растворимые формы sFas, что связано с индукцией апоптоза, достаточной для развития системного аутоиммунного процесса. У пациентов с опухолями лимфоидной ткани, также выявлены белки Fas с измененной структурой.

Апоптоз лимфоцитов рассматривается как один из механизмов *специфической иммунотерапии* atopических заболеваний, таких как бронхиальная астма. При этом под влиянием терапии вначале наблюдается активация иммунной системы с повышением выработки Ig E, после чего запускается процесс апоптоза лимфоцитов и снижение выработки Ig E. Активно изучаются ингибиторы специфических протеаз в качестве фармакологических агентов.

Развитие *инфекционного воспаления* связано с игибированием процесса апоптоза. Существуют данные о способности некоторых вирусов и микроорганизмов вырабатывать вещества похожие на естественные ингибиторы процесса клеточной гибели. Так, аденовирус синтезирует белок, похожий на Bcl-2, хламидии влияют на поступление в цитозоль митохондриального цитохрома c, *Toxoplasma gondii*, проникая в клетку, делает ее устойчивой к различным медиаторам апоптоза.

Наряду с этим, существует целый ряд патологических состояний, вызванных *активацией апоптоза*. В гепатоцитах, пораженных вирусом гепатита С, определяется повышенная экспрессия Fas, что приводит к их быстрой гибели под воздействием цитотоксических Т-лимфоцитов. Похожие изменения происходят в клетках щитовидной железы при тиреоидите

Хашимото. Повышенная предрасположенность к апоптозу лимфоцитов и усиление экспрессии Fas-L гранулоцитами выявлено у больных системной красной волчанкой. В результате быстрой гибели нейронов возникают болезни Альцгеймера и Паркинсона. При инфаркте миокарда или инсульте происходит лизис клеток вокруг очага ишемии, что приводит к расширению зоны поражения. Это объясняет положительный терапевтический эффект ингибиторов Bcl-2, позволяющих уменьшить объем поврежденных тканей. Получены хорошие результаты, свидетельствующие о снижении зоны инфаркта миокарда при использовании ингибиторов каспаз.

Большой интерес представляют данные о значении апоптоза в развитии *нефропатий*, прогрессирование которых характеризуется усиленной клеточной пролиферацией с накоплением внеклеточного матрикса и последующим сморщиванием ткани. При этом компоненты матрикса влияют на чувствительность мезангия к индукторам апоптоза, что приводит к значительным потерям гломерулярных клеток и развитию гломерулосклероза. Однако недостаточность почечных функций определяется в первую очередь наличием тубулоинтерстициальных нарушений, а не гломерулосклерозом. Разрушение клеток канальцевого эпителия, наряду с некрозом, может происходить и путем апоптоза, который, в ряде случаев является основной причиной развития острой почечной недостаточности. При этом гибель тубулярных эпителиоцитов может происходить по двум патогенетическим путям: FAS/FAS-L с передачей сигналов посредством JNK (c-Jun N-terminal kinase) и RANK/RANK-L (receptor activator of NFkB) с активацией каскада каспаз. В конечном счете, происходит высвобождение цитохрома *c* и фрагментация ядра, что завершает процесс гибели клетки.

Одной из частых причин снижения функций почек является инфекция мочевой системы, нередко сочетающаяся с нарушениями уродинамики. Оба процесса в равной степени могут влиять на интенсивность апоптоза в почечной паренхиме. В частности, при пиелонефрите происходит активация гибели клеток кортикального слоя почки, что приводит к замедлению роста органа. Признаки деструкции ткани обнаруживаются не только непосредственно в очаге инфекционного воспаления, но и в прилегающих зонах. Хроническая обструкция мочеточника приводит к массивному апоптозу

канальцев в результате подавления экспрессии Bcl-2 в тубулярных клетках независимо от возраста животных (новорожденные или взрослые). Аминогликозиды, часто используемые для лечения воспаления в органах мочевой системы, даже в малых дозах, обладают выраженным проапоптозным действием, осложняя процесс репарации почечной ткани и увеличивая вероятность развития нефросклероза. Наиболее выраженными побочными действиями отличается гентамицин. Менее опасным с позиций стимуляции апоптоза оказался нетромицин.

Кроме генетически детерминированных медиаторов апоптоза, клетка может подвергаться действию других соединений, регулирующих этот процесс, например, цитокинов (интерлейкинов 2, 4, 10), циркулирующих в крови или связанных с биомембранами. Эти соединения способны запускать специфические взаимодействия лиганд-рецептор (Fas лиганд / Fas, TNF- α /TNF-R1), определяющие динамику апоптоза.

Особая роль в регуляции процессов клеточной гибели принадлежит оксиду азота (NO). Известно, что NO обладает провоспалительным эффектом и воздействует на иммунную систему. NO усиливает потенциал мембраны митохондрий и изменяет химическую структуру цитохрома *c*, что способствует высвобождению его из митохондрий. При тяжелой рефлюкс-нефропатии (РН) наблюдается значительное нарастание интенсивности апоптоза в проксимальных канальцах, одной из причин которого является выраженная экспрессия индуцибельной NO-синтазы (iNOS). Возможно, iNOS играет роль триггерного механизма развития апоптоза, приводящего к атрофии канальцев и потере функционирующей массы почечной паренхимы при РН.

Необходимо отметить, что исследования путей регуляции апоптоза способствуют более глубокому и полному пониманию механизмов развития заболеваний, что, в свою очередь, необходимо для разработки новых подходов к лечению этих состояний. Терапевтическое применение, возможно, найдут низкомолекулярные ингибиторы каспаз. В качестве индукторов апоптоза при онкологических заболеваниях предполагается использование олигонуклеотидов, которые ингибируют ген, отвечающий за выработку белка Bcl-2.

Однако апоптоз не является обязательной составляющей, например, воспалительной реакции. Хотя для *воспаления* характерно повреждение тканей, гибель клеток при этом происходит преимущественно по механизму некроза и сопровождается выходом содержимого клеток в межклеточное пространство, что может стать причиной гибели соседних клеток. Однако на завершающих этапах воспаления апоптозу принадлежит важная роль, поскольку в этот период происходит устранение активированных клеток иммунной системы, выполнивших свои функции. То же относится к аллергическому воспалению, при котором элиминация эффекторных клеток затруднена в связи с их способностью к выработке аутокринных цитокинов. Так, активированные эозинофилы секретируют ГМ-КСФ, являющийся ингибитором апоптоза.

Развитие апоптоза при инфекционных процессах часто зависит от факторов, выделяемых микроорганизмами, к которым относятся суперантигены – экзотоксины, часто выступающие в качестве индукторов активационного апоптоза. Важное исключение составляет септический шок, который развивается в ответ на гиперпродукцию ФНО α макрофагами и другими клетками при действии эндотоксинов. Наряду с другими многочисленными проявлениями при шоке значительно усиливается гибель от апоптоза клеток, несущих рецептор TNFR1.

При стрессе апоптозу принадлежит роль одного из ключевых механизмов, определяющих специфику реакции организма на стрессор. Его участие в реализации стрессорной реакции связано с повышенным выделением стероидных гормонов корой надпочечников. Именно чувствительностью к действию стероидов определяется спектр тканей, поражаемых при стрессе. К таким тканям относятся в первую очередь лимфоидная ткань (особенно кора вилочковой железы) и слизистые оболочки, прежде всего кишечника. Результатом является такое типичное проявление стресса, как опустошение лимфоидных органов.

Выраженные формы нарушений, при которых в процесс апоптоза тотально вовлекаются клетки любых типов, наблюдаются при *беременности*. Они обычно несовместимы с развитием плода и приводят к внутриутробной гибели. Известны также более ограниченные нарушения такого типа, которые

проявляются как дефекты развития, например, врожденные поражения сердца. Во II триместре развития плода в сердце происходит перестройка тканевых структур, в которой важная роль принадлежит апоптозу. Эти процессы проявляются как миопатии при *синдроме Дауна*, или как *аритмогенная кардиопатия правого желудочка*, при которой происходит замещение кардиомиоцитов жировой тканью в результате усиленного апоптоза.

Распространенными вариантами усиления апоптоза при патологии *системы крови* являются разного рода аплазии и дегенеративные процессы. Чаще всего они развиваются вследствие недостаточности «факторов выживания» костномозговых клеток-предшественников. Так, инактивация гена ИЛ-7 приводит к тотальной лимфопении, связанной с гибелью предшественников Т- и В-лимфоцитов. Дефицит железа лежит в основе апластической анемии, анемии; недостаточность фолатов, витамина В₁₂ является причиной талассемии, тромбоцитопении, нейтропении, панцитопении, хотя конкретные механизмы гибели клеток-предшественников в этих случаях не всегда установлены. Отключение генов факторов выживания в ряде случаев не приводит к указанным последствиям в силу избыточности контроля выживания клеток. Особое внимание уделяется апоптозу в патогенезе миелодиспластических процессов, приводящих к панцитопении в результате апоптоза стволовых клеток и ранних кроветворных предшественников.

Усиление апоптоза нервных клеток наблюдается при боковом амиотрофическом склерозе, болезни Альцгеймера, спинальной мышечной атрофии и других заболеваниях *нервной системы*. Идентифицирован «ген болезни Альцгеймера», продукт которого оказался транскрипционным фактором ALG-2.

Решающая роль принадлежит апоптозу при *инфаркте миокарда*. Апоптоз является преобладающей формой гибели миоцитов в период «реперфузии» участка миокарда, ранее подвергшегося ишемии. Изучение механизмов действия препаратов, таких как β-блокаторы, блокаторы кальциевых каналов, антиоксиданты, антимераболиты, применяемых в настоящее время, открывает новые перспективы в аспекте проблемы апоптоза.

Следует отметить, что со временем увеличивается доля патологических процессов, основывающихся на усилении апоптоза, которое вызвано действием внешних апоптогенных факторов. Первое место среди них занимает ионизирующая радиация. В связи с тем, что она индуцирует апоптоз преимущественно лимфоидных клеток, эта сторона ее действия проявляется в иммунной недостаточности, хотя вызываемые облучением нарушения кроветворения, по крайней мере, частично, обусловлены индукцией апоптоза клеток-предшественников. Аналогичным эффектом обладают многие химиотерапевтические препараты, используемые при лечении опухолей, а также гормоны, прежде всего глюкокортикоиды. Источником апоптогенных факторов является также внешняя среда, при формировании экологического неблагополучия.

Таким образом, в основе достаточно большого числа патологических процессов лежат нарушения регуляции апоптоза. У взрослых могут обнаруживаться лишь ограниченные фенотипические нарушения, поскольку организмы с обширными дефектами гибнут на ранних этапах онтогенеза. Наиболее характерным проявлением недостаточности апоптоза является развитие аутоиммунных процессов и злокачественных новообразований, проявлениями усиленного апоптоза служат аплазии и дегенеративные процессы. Вклад апоптоза в реализацию различных форм патологии в одних случаях может быть ключевым, в других — апоптоз определяет тот патологический фон, на котором разворачиваются специфические процессы.

Роль апоптоза в регуляции роста опухолей

Апоптоз регулируется комплексом биохимических, молекулярных и генетических факторов, большинство из которых полностью не изучено. В конечном счете, ПК является результатом баланса про- и противоапоптозных факторов. К наиболее важным регуляторам этого процесса относятся рецепторы гибели клетки, каспазы, митохондрии, семейство Bcl-2 протоонкогенов, отдельные опухоль-подавляющие гены. В развитии многих опухолей существенное значение имеет угнетение способности к апоптозу. Наиболее хорошо изученным механизмом ингибирования апоптоза является аутокринное и паракринное повышение экспрессии ростовых факторов и

рецепторов к ним, возникающее в опухолевых клетках в результате активации онкогенов. Это свойство делает клетки опухолевого клона независимым от микроокружения и составляет основу их метастазирования.

Одним из примеров наработки опухолевого клона клеток является мутация онкогена *c-myc*. В норме экспрессия онкогена *c-myc* выражается в усилении пролиферации и в то же время способствует апоптозу при прекращении действия на неё ростовых факторов. Способность трансформированных клеток погибать по типу апоптоза рассматривается как причина, позволяющая опухолям избегать иммунологического надзора. Мутация *c-myc* в опухолевых клетках лимфомы мышей и опухолево-трансформированной линии фибробластов отключает механизм запуска апоптоза в поврежденных пролиферирующих клетках, активируя ген *Bcl-2* либо препятствуя активации *Araf-1*-комплекса. Суперэкспрессия гена *Bcl-2*, тормозящего апоптоз, лежит в основе развития В-клеточной фолликулярной лимфомы человека.

Белок p53 трансформирует сигнал о нерепарированных разрывах цепей ДНК в сигнал к развитию апоптоза. Благодаря этому элиминируются клетки с повреждениями генетического аппарата. Онкогенная трансформация клетки часто сопровождается мутацией гена *p53* и превращением его из индуктора в ингибитор апоптоза. Мутантную форму белка p53 синтезируют до 70 % трансформированных клеток. Мутация гена *p53* наблюдается:

при снижении поступления ростовых факторов,
 потере межклеточных взаимодействий и связей с микроокружением,
 гипоксии вследствие недостаточного кровообращения,
 повреждении ДНК в результате мутаций и воздействия токсинов,
 укорочения теломер вследствие митогенного стресса.

Все эти факторы должны включать апоптоз через посредство гена *p53*. При снижении его активности или в результате патологической мутации этого не происходит, что составляет основу накопления опухолевых клеток и дальнейшей опухолевой прогрессии. Мутация гена *p53* является также одним из факторов метастазирования опухоли.

Развитие опухолевого процесса снижение противоопухолевого иммунного надзора. Известно, что в этих процессах принимают участие сами

опухолевые клетки, секретируя растворимые иммуносупрессивные факторы и снижая иммуногенную активность экспрессированных на своей поверхности молекул главного комплекса гистосовместимости. Однако имеется альтернативный механизм подавления опухолевыми клетками иммунного надзора, связанный с апоптозом.

В сыворотке крови больных лейкозами и лимфомой, а также на клетках некоторых солидных опухолей, был обнаружен FAS-L. Молекулы FAS-L оказались функционально активными, так как были способны убивать клетки-мишени, экспрессирующие FAS-R. На основании этих данных была предложена гипотеза, согласно которой опухолевые клетки могут отражать иммунную атаку, убивая цитотоксические Т-лимфоциты и NK-клетки. При экспрессии FAS-L на опухолевых клетках его растворимая форма может попадать в кровь, провоцируя к апоптозу клетки, имеющие на своей поверхности FAS-R, вызывая множественные поражения органов, часто наблюдаемые у онкологических больных.

Апоптоз и противоопухолевая терапия. Противоопухолевые препараты стимулируют развитие апоптоза, т.е. индуцируют гибель опухолевых клеток, используя те же пути, что и физиологические индукторы апоптоза: стимуляция гена *p53*, модуляция генов семьи *bcl-2*, включение FAS-R, активация эффекторных протеаз и эндонуклеаз, блокирование рецепторов антиапоптотических ростовых факторов и стимуляция проапоптотических. При этом многие опухоли сохраняют способность к апоптозу в ответ на те же стимулы, что и их нормальные клетки. Сведения о рецептор-опосредованной регуляции процесса апоптоза клеток используются для терапии гормонозависимых новообразований. Андрогенблокирующая терапия применяется при раке простаты. Рак молочной железы часто подвергается регрессии при использовании антагонистов эстрогеновых рецепторов. Подходы, связанные с регуляцией апоптозспецифических генов, реализуются в генотерапии – одном из самых перспективных направлений современной медицины.

Способность к спонтанному апоптозу лейкемических клеток коррелирует с их лекарственной чувствительностью. В соответствии с

гипотезой, объясняющей проапоптотическое действие, клеточная смерть, индуцированная химиопрепаратами, проходит три фазы.

1. *Повреждение.* В этой фазе препарат, действуя на свои мишени (ДНК, РНК, микроканальцы) вызывает их повреждение или дисфункцию.
2. *Прохождение сигнала.* В этой стадии клетка расшифровывает и оценивает полученное повреждение. Например, повреждение ДНК включает ген p53, следствием чего является остановка прохождения митотического цикла и невозможность репарации и включение апоптотического пути. Некоторые препараты, например доксорубин, могут действовать в обход гена p53, вызывая апоптоз путем активации FAS-R.
3. *Индукция апоптоза.* В этой фазе принимается окончательное решение и запускаются механизмы апоптоза в тех случаях, когда репарация невозможна.

Повышение эффективности химиопрепаратов достигается за счет сопроводительной терапии. Однако в определенном проценте случаев развивается резистентность опухолевых клеток к химиотерапии, часто связанная с нарушением в них механизмов апоптоза. У большинства больных отмечается отсутствие или мутация гена *p53* (в 40 - 50% опухолей человека), усиление экспрессии гена *Bcl-2* и уменьшение экспрессии гена *Bax*. Транслокация указанных генов из 18 хромосомы в 14 приводит к развитию неходжкиновской лимфомы. Увеличение продукции белка *Bcl-2* отмечается у больных, резистентных к химиотерапии, которая преимущественно направлена на стимуляцию апоптоза путем активации прокаспаз, ускорения фрагментации ДНК и угнетение синтеза p53.

Роль апоптоза при старении

Клеточный гомеостаз в норме поддерживается за счет баланса между апоптозом и пролиферацией. Супрессия, гиперэкспрессия или мутация генов, контролирующих апоптоз, приводят к активации или ингибированию этого процесса. Старение организма может быть следствием активации группы генов апоптоза и постепенной убыли функционально активных клеток. Значение апоптоза в процессе старения заключается в следующем:

при помощи апоптоза устраняются поврежденные клетки (например, фибробласты, макрофаги), которые затем могут быть заменены путем клеточной пролиферации,

- путем апоптоза происходит элиминация постмитотических клеток (например, нейронов, кардиомиоцитов), которые не могут быть заменены.

Старение многих типов клеток ассоциировано с изменением их чувствительности к апоптозу. С возрастом происходит повышение чувствительности к индукции апоптоза в таких клетках как гепатоциты, Т-клетки, ооциты, мегакариоциты, макрофаги, хондроциты, эндотелиоциты, нейроны, спленоциты, кардиомиоциты. В стареющих кардиомиоцитах накапливаются ионы Ca^{2+} и повышается активность ДНКазы I. Кальций активирует апоптоз, зависимый от ДНКазы I, сопровождающийся межнуклеосомальным расщеплением ДНК. Происходит значительное уменьшение количества миоцитов в результате апоптоза. Раннее старение, вызванное окислительным стрессом, коррелирует с увеличением продукции ДНК-фрагментов в мозге мышей, что свидетельствует о повышении чувствительности к апоптозу по сравнению с молодыми животными. В то же время показано, что чувствительность к апоптозу для кератиноцитов не изменяется, а для фибробластов даже снижается.

Апоптоз играет важную роль в возрастных изменениях в нервной системе. В мозге стареющих собак наблюдается активация апоптоза нейронов и клеток глии, в ухе происходит гибель сенсорных и поддерживающих клеток. Зависимая от возраста гибель клеток внутреннего уха может являться причиной ухудшения слуха и нарушения равновесия в старости. Для нервной системы показано возрастное изменение экспрессии целого ряда апоптоз-индуцирующих факторов. Так, с возрастом снижается содержание проапоптозного белка Вах в мозжечке и коре мозга. Однако содержание другого проапоптозного белка Вак не изменяется.

Дофамин исполняет роль нейротрансмиттера в центральной нервной системе. Однако он способен оказывать нейротоксический эффект при старении. Предполагается, что дофамин запускает апоптотическую программу гибели, вовлекающую окислительный стресс, через сигнальный механизм активации JNK (c-Jun amino-terminal kinases), принадлежащую к семейству

митоз-активируемых протеинкиназ (МАРК). Снижение эффективности антиоксидантной защитной системы при старении активирует нейротоксический эффект дофамина, что ведет к развитию нейродегенеративных заболеваний нервной системы. Как при старении, так и при нейродегенерации в нейронах наблюдается фрагментация ДНК, ведущая к апоптозу.

При старении организма наблюдается постепенное снижение содержания мелатонина, что является следствием уменьшения адренергической иннервации и количества β -адренергических рецепторов на поверхности пинеалоцитов. Мелатонин повышает экспрессию в нервной ткани магний-, медь- и цинк-зависимой супероксиддисмутазы, защищая нейроны от апоптоза, опосредованного активными формами кислорода и накоплением Са. Кроме того, мелатонин предотвращает апоптоз тимоцитов, а хроническое введение мелатонина мышам предотвращает возраст-зависимую инволюцию тимуса.

Известны два признака иммунного старения: измененный Т-клеточный фенотип и сниженный Т-клеточный ответ. Одним из механизмов, ответственных за лимфопению и недостаток Т-клеток, является усиление апоптоза. Кроме того, апоптоз макрофагов, спленоцитов и тимоцитов, играющих важную роль в регуляции иммунного ответа, активируется с возрастом. Т-клеточные линии, полученные от людей, страдающих синдромами преждевременного старения, проявляют высокую чувствительность к Fas-опосредованному апоптозу. При старении наблюдается повышенная экспрессия апоптотического рецептора Fas и его лиганда и сниженная экспрессия Bcl-2 в CD4⁺ и в CD8⁺ Т-клетках. Происходит значительное накопление с возрастом растворимого Fas в сыворотке крови. Экспрессия проапоптотического фактора Bax возрастает в лимфоцитах при старении, как на уровне мРНК, так и белка. С возрастом увеличивается соотношение проапоптотического фактора Bax к антиапоптотическому Bcl-xL. Стимуляция CD3/TCR рецепторного комплекса на поверхности тимоцитов антителами более эффективно индуцирует апоптоз клеток от наиболее старых особей. С возрастом также снижается ингибирующее действие цинка на апоптоз. Таким образом, изменение соотношения про- и

антиапоптозных факторов в клетке может являться причиной иммунного старения.

При старении возрастает чувствительность полиморфноядерных гранулоцитов к апоптозу, что имеет немаловажную роль в старческих патологиях, связанных с иммунной системой, таких, как рак, инфекционные и аутоиммунные заболевания. Со старением значительно возрастает продукция TNF макрофагами, Т- и В-клетками, что связано со способностью TNF индуцировать апоптоз клеток-мишеней, в ответ на стимуляцию иммунокомпетентных клеток.

Клетки эндотелия сосудов с возрастом становятся более чувствительными к недостатку факторов роста, что в результате приводит к их гибели по механизму апоптоза. Старение мегакариоцита, дающего начало тромбоцитам, характеризуется его апоптотической гибелью.

Исследование процесса апоптоза хондроцитов в суставных хрящах мышей и крыс, а также в межпозвоночных дисках при старении у человека, показало повышение уровня этого типа клеточной гибели, что может увеличивать риск возрастной хрящевой дегенерации. Образованные хондроцитами апоптотические тела проявляют содержат щелочную фосфатазу, преципитируют кальций, которые могут способствовать кальцификации хряща, наблюдаемой при старении.

Уровень ДНК фрагментации, интерпретируемый как апоптотические изменения, значительно выше в ооцитах старых мышей по сравнению с молодыми и зрелыми особями. Апоптоз ооцитов может быть одной из причин снижения плодовитости.

Старение усиливает апоптоз гепатоцитов при нормальных физиологических условиях, что связано с возрастным повышением чувствительности гепатоцитов. Возможно, это объясняется сверхэкспрессией Fas. Старение сопровождается увеличением количества TUNEL-окрашиваемых (апоптозных) гепатоцитов. Стареющие фибробласты, напротив, приобретают устойчивость к апоптозу. Они теряют способность снижать экспрессию гена bcl-2 в ответ на апоптотический сигнал. Таким образом, апоптоз стареющих фибробластов блокирован даже в случае получе-

ния иницирующего сигнала. Это может нарушать функцию соединительной ткани.

Изменения в механизмах апоптоза приводят к развитию возрастных патологий. Не исключено, что апоптоз является одним из центральных механизмов старения целостного организма, наряду с генетической нестабильностью, накоплением ошибок синтеза и клеточно-тканевых повреждений.

Роль апоптоза при заболеваниях нервной системы

Среди заболеваний нервной системы особую роль апоптоз играет в развитии нейродегенеративных состояний. К ним относятся болезнь Альцгеймера, Паркинсона, боковой амиотрофической склероз. Предполагают, что триггерные факторы апоптоза обусловлены влиянием нейротропных, персистирующих внутриклеточно вирусов, нарушением считывания генетической информации, воздействием индукторов апоптоза.

Общим для всех дегенеративных заболеваний ЦНС является снижение устойчивости нервных клеток к стимуляторам апоптоза - эксайтотаминокислотам, вирусным белкам или ионам кальция. Однако цепь событий, приводящих к апоптозу, имеет существенные различия при разных заболеваниях.

Болезнь Паркинсона (БП). В патогенезе БП большое значение имеет нарушение функции митохондрий за счет блокирования 1 митохондриального комплекса. Результатом этого является снижение содержания в клетках АТФ и угнетение образования глутатиона, универсального антиоксиданта ЦНС. Следующим этапом патогенеза является окислительный стресс, связанный с накоплением свободных радикалов. В условиях окислительного стресса происходит активация NMDA-рецепторов, приводящая к повышенному входу кальция внутрь клетки и развитию апоптоза. Окислительный стресс может дополнительно вызывать экспрессию гена p53 с последующей стимуляцией дегенерации нервных клеток. Процесс избирательно поражает нейроны подкорковых образований мозга, в большей степени стриатума и компактной части черного вещества. Специфическая терапия БП препаратами леводопы, усиливающими окислительный стресс, может активировать апоптоз. При обработке клеточных культур раствором леводопы обнаруживались

фрагментация ДНК, дезинтеграция аксонов, сморщивание клеток. Такие же изменения наблюдались при обработке культуры нейронов раствором дофамина в физиологической концентрации (0,1-1 мМ) в течение 24 ч. Напротив, применение агонистов дофаминовых рецепторов и блокаторов моноаминоксидазы типа В (L-депренил) приводит к увеличению выживаемости культуры стволовых клеток в эксперименте, что предположительно связывают с возрастанием экспрессии генов-ингибиторов апоптоза и активацией нейро-трофических факторов, ингибирующих апоптоз.

Болезнь Альцгеймера (БА). Одним из возможных патогенетических механизмов считается внутриклеточное отложение β -амилоида и предшественника амилоидного белка (amyloid precursor protein -APP). В первую очередь при этом страдают ацетилхолинергические нейроны базального ядра Мейнерта, результатом чего являются недостаточность холинергических терминалей и дегенерация клеток коры головного мозга, преимущественно теменно-височно-затылочной области. В нейронах, обрабатываемых раствором, содержащим компоненты амилоида, развиваются изменения, типичные для апоптоза: отпочковывание везикул от мембраны и фрагментация ДНК. Процессы, происходящие в культуре клеток, при этом равнозначны при воздействии как β -амилоида, так и APP. Помимо этого, отмечается внутриклеточное отложение амилоида, также препятствующее нормальной жизнедеятельности клетки. Не исключено, что апоптоз при БА реализуется по механизму ускоренного старения с патологическим накоплением кальция внутри клетки за счет активации NMDA-рецепторов с последующей активацией протеаз и разрушением клеточных структур.

Синдром Дауна (СД). СД, или трисомия хромосомы 21, является одной из наиболее частых генетических причин умственной отсталости. Основными характерными признаками СД служат уменьшенное количество нейронов ЦНС. Показано, что кортикальные нейроны эмбрионов с трисомией-21 до определенного момента нормально развиваются в культуре, однако потом начинают подвергаться апоптозу. Представляет интерес тот факт, что при СД, как и при БА, отмечаются интрацеллюлярные отложения амилоида в церебральных нейронах, что, возможно, косвенно указывает на сходный патогенез этих заболеваний. Помимо отложений амилоида, при СД выявлено

возрастание концентрации свободных радикалов и уровня перекисного окисления липидов, что также может способствовать развитию апоптоза. Таким образом, возможно, что одним из проявлений трисомии-21 служит недостаточная инактивация окислительных процессов.

Хорея Гентингтона (ХГ). Показано, что при ХГ происходит мутация гена, кодирующего белок хантингтин, играющего важную роль в процессах пролиферации нервных клеток и способствующего сохранению их нормальной структуры в зрелой стадии. Мутация гена, кодирующего хантингтин, приводит к изменениям, типичным для апоптоза.

Боковой амиотрофический склероз (БАС). В патогенезе этого заболевания принимают участие, по-видимому, несколько факторов: мутация гена СОД1, приводящая к увеличению содержания в нервной ткани свободных радикалов; повышение концентрации эксайтоаминокислот и числа постсинаптических рецепторов в ликворе пациентов с БАС; возрастание содержания внутриклеточного кальция в мотонейронах с дальнейшей активацией внутриклеточных протеаз и стимуляцией процессов деструкции цитоскелета и фрагментации ДНК, характерных для апоптоза.

Нейроны ЦНС по способности вступать в апоптоз подразделяются на несколько типов:

- медленно теряющие часть своих функций, но остающиеся живыми и неподвергающиеся апоптозу;
- относительно более быстро теряющие свои функции в ходе нормального старения и подвергающиеся дегенерации;
- быстро подвергающиеся апоптозу в ходе различных патологических состояний.

Таким образом, в основе церебральных дегенерации и старения ЦНС лежат сходные механизмы. И в том, и в другом случае имеет место апоптоз нейронов, однако в условиях нормального старения эти процессы реализуются гораздо медленнее.

Роль апоптоза в патогенезе заболеваний печени

В норме апоптоз принимает участие в процессе физиологического обновления гепатоцитов. Несмотря на то, что в норме апоптотически измененных клеток печени очень незначительно (1:2000), их количество мо-

жет быть вполне достаточно для уравнивания той весьма низкой митотической активности, которая свойственна нормальной печени.

Уже не вызывает сомнений, что апоптоз — очень частое проявление патологии печени. Ему принадлежит ведущая роль в развитии алкогольных поражений, острых и хронических вирусных гепатитов. Апоптоз участвует в морфогенезе первичного билиарного цирроза, атрофии печени, аутоиммунных гепатитов и др. состояний.

Апоптоз гепатоцитов при алкогольной интоксикации. В патогенезе алкогольной интоксикации печени, как известно лежит образование токсического соединения ацетальдегида как продукта метаболизма этанола. Накопление ацетальдегида в печени приводит к функциональному повреждению митохондрий, микротрубочек, антиоксидантой глутатионовой системы. Хроническое злоупотребление алкоголем обуславливает избыточное образование свободных радикалов, ведет к эндотоксемии. Эндотоксины участвуют в каскаде реакций, инициируют фиброгенез, цирроз.

При алкогольной патологии печени в гепатоцитах обнаружены апоптотические тельца, являющиеся маркерами апоптоза. Хроническое введение алкоголя мышам способствовало достоверному повышению количества апоптотических телец в гепатоцитах, в основном, вокруг терминальных печеночных венул. Данные изменения были дозозависимыми и несколько уменьшались после отмены алкоголя. Показано повышение числа апоптотических гепатоцитов у алкогользависимых мышей с сопутствующей патологией печени (в т.ч. жировое перерождение печени, хронический гепатит).

Термином "токсическая" патология печени некоторые авторы отмечают состояния, при которых гепатоциты оказываются более восприимчивыми к алкоголь-индуцированному апоптозу. Это характерно для случаев, обусловленных перегрузкой печени солями тяжелых металлов, которые в ряде случаев сопровождают картину алкоголь-зависимой интоксикации. Действительно, на моделях у животных с накоплениями солей тяжелых металлов в паренхиме печени отмечено существенное повышение количества апоптотических гепатоцитов.

Отдельные цитокины также способствуют развитию алкогользависимого апоптоза гепатоцитов. Трансформирующий фактор роста (ТФР- β) индуцирует гибель клеток печени в культуре тканей. Продуктируемый алкоголь-поврежденной тканью печени ТФР- β оказывает влияние на прогрессирование заболевания, ускоряя фиброгенез и апоптотическую гибель гепатоцитов. Повышение активности TNF- α было продемонстрировано в клинике у больных с алкогольной болезнью печени и у экспериментальных животных на модели этаноловой интоксикации. Хроническое введение алкоголя также способствовало повышению уровня рецепторов TNF- α гепатоцитов мышей, повышению чувствительности гепатоцитов к апоптозу, что свидетельствует о важной роли цитокинов в патогенезе алкогольного поражения печеночной ткани.

Апоптоз гепатоцитов при вирусных болезнях печени. Апоптозу печеночных клеток отведена важная роль в патогенезе вирусных гепатитов. При вирусном гепатите апоптоз является результатом как прямого воздействия вируса, так и опосредованной иммунной реакцией. Развитие апоптоза при попадании в гепатоцит вируса следует рассматривать как своего рода защитный механизм, так как в погибшей клетке репликация вируса становится невозможной. Оказалось, что некоторые кодируемые вирусами белки обладают антиапоптотической активностью. Она осуществляется подавлением функции белка p53, вызывающего апоптоз, инактивацией протеаз, а также усиленной экспрессией bcl-2.

Существует два механизма с помощью которых вирусы гепатита В и С активируют апоптоз: во-первых, путем непосредственного проапоптотического действия специфических вирусных белков, образующихся в процессе репликации вируса X белка вируса В и кор-белка вируса С и во-вторых, путем повышения количества на клеточной мембране тех рецепторов, через которые передается сигнал к индукции апоптоза, например Fas и увеличения чувствительности клеток к различным проапоптотическим стимулам, в частности к TNF- α .

Однако, чаще апоптоз при вирусных инфекциях печени формируется через эффекты цитотоксических Т-лимфоцитов. Т-лимфоцитарная индукция апоптоза гепатоцитов реализуется за счет выброса из Т-клеток перфорина,

который, образует поры в плазматической мембране печеночной клетки. Через них в клетки проникают гранзимы, содержащие протеазы, которые, как уже говорилось, являются одним из важных проапоптотических факторов. Второй путь апоптоза с участием Т-лимфоцитов и их действием на Fas-антигены, связан с их экспрессией на поверхности инфицированных гепатоцитов. Присоединение Fas-лиганда к Fas-рецептору на гепатоцитах и служит причиной апоптоза клетки-мишени.

Если проанализировать связь этиотропного фактора, клинического течения и апоптотической гибели гепатоцита, то можно получить следующие результаты. Геном вируса гепатита А представлен однонитчатой РНК. Вирус локализуется в цитоплазме гепатоцитов, дает прямой цитогенный эффект, но без деструкции клеток. Репликация вируса в гепатоцитах приводит к нарушению клеточного метаболизма, усилению перекисного окисления липидов, повышению проницаемости клеточных мембран, повреждению лизосом, нарушению энергетического обмена. Вышеперечисленные признаки клеточных изменений являются признаками индукции апоптоза в гепатоцитах. Как правило, течение гепатита А благоприятное, а организм проводит адекватное уничтожение инфицированных гепатоцитов. Вирус гепатита С обладает большей цитотоксичностью, апоптоз инфицированных гепатоцитов весьма выражен.

Вирус гепатита В является двуспиральным ДНК-содержащим, сферической формы, покрытым оболочками. В наружной липопротеиновой оболочке вируса гепатита В, расположенного в цитоплазме инфицированного гепатоцита, "встроены" молекулы поверхностного антигена (HBsAg). Внутренняя оболочка вируса, проникающая в ядро гепатоцита, содержит внутренний антиген нуклеокапсида. На модели мышинного гепатита показано, что HBsAg является сигналом, вызывающим агрессию цитотоксических Т-лимфоцитов по отношению к гепатоцитам. Клиническая картина острого вирусного гепатита В зависит от интенсивности этого взаимодействия. Цитотоксические Т-лимфоциты способствуют развитию апоптоза в гепатоцитах, высвобождая γ -интерферон, обладающий проапоптотическим и гепатотоксическим действием. Подавление апоптоза способствует объединению вируса с геномом хозяина и хронизации процесса с

перспективой онкотрансформации. Это тем более актуально, что чаще гепатитом В болеют люди, имеющие токсическое поражение печени, при котором наблюдается ингибирование апоптоза в гепатоцитах.

Апоптоз гепатоцитов при первичном билиарном циррозе. Фактор bcl-2 обнаружен только в эпителии желчных протоков, постоянно контактирующих с желчью, но не в гепатоцитах. Это расценивается как важный механизм физиологической адаптации и противоапоптозной защиты. При первичном билиарном циррозе (ПБЦ) соли желчных кислот, такие как глюкородеохсолаты, накапливаются в условиях холестаза с последующим развитием механизма апоптоза гепатоцитов.

В перипортальных гепатоцитах, где влияние холестаза сказывается раньше, чем в гепатоцитах других участков, отмечена экспрессия bcl-2. В связи с этим считают, что гепатоцеллюлярный апоптоз у больных ПБЦ может быть результатом нарушения баланса между проапоптозными (цитотоксические соли желчных кислот) и противоапоптозными (bcl-2) факторами. Соли желчных кислот могут индуцировать Fas-олигомеризацию с последующей активацией каспазы-8, катепсина В и каспазного каскада, что в конечном итоге приводит к апоптозу.

Роль апоптоза в патологии кожи

Апоптоз играет важную роль в гомеостазе кожного покрова и в патогенезе кожных болезней. Предполагают, что пролиферация кератиноцитов регулируется апоптозом, направленного на поддержание постоянства толщины эпидермиса. Терминальная стадия дифференцировки кератиноцитов считается особой формой апоптоза, так как имеет биохимическое и морфологическое сходство с апоптогическими клетками. В кератиноцитах зернистого слоя выявлены признаки активации эндонуклеазы и фрагментации ДНК. Обнаруженная экспрессия Fas, Fas-L и Bcl-2 при различных дерматозах и кожных опухолях также подразумевают участие апоптоза в регуляции гомеостаза кожи .

При световой микроскопии в апоптических кератиноцитах (АК) отмечают конденсированное базофильное ядро и гомогенную эозинфильную цитоплазму, иногда содержащую нерегулярные участки базофилии. Такие клетки обозначаются в гистологических терминах как

дискератотические клетки, коллоидные тельца, темные клетки, сателлитноклеточный некроз, клетки загара.

Апоптоз кератиноцитов при дерматозах проявляется их альтерацией, вакуолярными изменениями, тесно ассоциированными с инфильтратом из Т-клеток. Подобные изменения называются лихеноидной тканевой реакцией. К лихеноидной тканевой реакции относят красный плоский лишай, красную волчанку, многоформную экссудативную эритему, фиксированную лекарственную эритему и кожную реакцию типа "трансплантат против хозяина". В последнем случае апоптоз кератиноцитов - это преобладающая форма клеточного повреждения, которая коррелирует с выраженностью лимфоцитарной инфильтрации. Известно, что апоптоз кератиноцитов при лихеноидной реакции может развиваться и без взаимодействия с активированными лимфоцитами, но в большинстве случаев он является результатом клеточно-опосредованной иммунной реакции против эпидермиса.

Описано несколько механизмов индукции апоптоза кератиноцитов:

1. Активированные цитотоксические Т-лимфоциты экспрессируют Fas-L, который связывается с Fas кератиноцитов, что запускает апоптоз. Экспрессия Fas-антигена на кератиноцитах показана в очагах повреждения эпидермиса при лихеноидных болезнях кожи; установлено также, что антитела к Fas могут ингибировать апоптоз, индуцированный γ -интерфероном в культуре кератиноцитов.
2. Апоптоз может быть запущен эффекторными клеточными гранулами, содержащими перфорины и гранзимы. Гранзимы В способны активировать клеточные протеазы семейства каспазов и тем самым инициировать апоптоз.
3. Факторы некроза опухоли могут индуцировать апоптоз как протеазозависимым, так и протеазонезависимым путями, поэтому предполагают, что их поступление из тучных клеток и активация Т-клеток — важный стимул к запуску апоптического процесса в кератиноцитах.

Недавно было показано, что эпидермальные кератиноциты способны продуцировать гранзим В, перфорин и Fas-L, что может быть использовано

для защиты от иммунно-обусловленного апоптоза или проникновения митогенов. Предполагают, что в процессе лихеноидной тканевой реакции Fas-L-несущие кератиноциты могут индуцировать Fas-опосредованный апоптоз эпидермотропных Fas-несущих Т-клеток и тем самым инактивируют осуществляемую ими иммунную реакцию.

Лихеноидная тканевая реакция может быть рассмотрена и как результат защитной стратегии кератиноцитов, направленной на удаление потенциально опасных аутоагрессивных Т-лимфоцитов, и как защитная иммунная реакция, направленная на элиминацию поврежденных кератиноцитов. С теоретических позиций достижение относительного баланса между аутоагрессивными Т-лимфоцитами и анормальными кератиноцитами должно приводить к излечиванию лихеноидного дерматоза.

Еще одним кожным заболеванием, при котором возможность регуляции процесса апоптоза могла бы способствовать прогрессу терапии, является псориаз.

Псориаз рассматривают как гиперпролиферативное состояние кератиноцитов, медиаторами которого являются Т-клетки. В отличие от лихеноидных болезней кожи, при псориазе отсутствуют микроскопически выявляемые АК. Одно из возможных объяснений этого явления - сверхэкспрессия Vcl-x1 на кератиноцитах псориазных бляшек, блокирующая апоптоз. Таким образом, увеличение толщины эпидермиса при псориазе может быть обусловлено нарушением физиологического пути клеточного отсева.

Отличия в поведении кератиноцитов при лихеноидных кожных болезнях и псориазе можно отчасти объяснить различной способностью экспрессировать про- и антиапоптотические гены. Возможно также, что псориазные кератиноциты обладают повышенной способностью продуцировать гранзим В и Fas L и, следовательно, резистентны к поражению Fas-представляющей и Т-клетками.

Таким образом, уязвимость эпидермиса для иммунного повреждения может зависеть от способности кератиноцитов экспрессировать Fas L и плотности его Fas-мембранной экспрессии.

Особый интерес вызывают механизмы индукции и ингибиции апоптоза как в эпителиальных, так и в меланоцитарных опухолях кожи. Долго считали, что рост опухоли объясняется в основном усилением клеточной пролиферации. Однако, контроль за количеством клеток, как в норме, так и при опухолевом росте зависит от факторов, влияющих на баланс размножающихся и умирающих клеток. Становится ясным, что пролиферация опухолей частично контролируется апоптозом. Известно, что меланоциты относятся к производным нервного гребешка. Нервная ткань характеризуется высокой экспрессией Bcl-2. Меланоциты нормальной кожи постоянно экспрессируют Bcl-2, это долгоживущие постмитотические клетки, не продуцирующие митогенов, стимулирующих их собственный рост. Экспрессия Bcl-2 на меланоцитах может быть необходима для их защиты от апоптоза. Как правило, экспрессия Bcl-2 наблюдается и в меланоцитарных опухолях — невусах и злокачественных меланомах. Это отчасти объясняет резистентность злокачественной меланомы к химиотерапии и лучевой терапии, а поиски путей снижения экспрессии Bcl-2 могут привести к улучшению результатов лечения меланомы. Клетки злокачественной меланомы экспрессируют Fas L, но не Fas. В нормальных меланоцитах экспрессия Fas L не выявляется, что косвенно свидетельствует о том, что система Fas задействована в процессе онкогенеза. Fas L-экспрессирующие клетки меланомы могут убивать Fas-несущие активированные Т-лимфоциты и таким образом ускользать от иммунной защиты.

Апоптоз можно наблюдать в доброкачественных и злокачественных опухолях кожи, гистогенетически связанных с эпидермисом - пиломатриксом, кератоакантоме, базалиоме базальноклеточном раке (БКР), плоскоклеточном раке, раке из клеток Меркеля.

Известно, что БКР — обычно медленно растущая опухоль, которой нужны месяцы и даже годы, чтобы достичь значительной величины, несмотря на то, что при гистологическом исследовании в ней могут быть обнаружены множественные фигуры митоза. Медленные темпы роста БКР могут быть объяснены апоптозом. Действительно, количество апоптотических клеток в БКР может превышать количество митотически делящихся клеток.

Предполагают, что неопластическая трансформация при БКР скорее является следствием увеличения продолжительности жизни леток, чем результатом повышения их митотической активности. Это предположение базируется на противоречивости представлений о факторах, ответственных за апоптоз клеток БКР. В них показаны высокая экспрессия Bcl-2 снижение частоты апоптоза, ассоциированное с усилением экспрессии Bcl-2. Эти данные явно не согласуются с высокой частотой апоптоза в клетках БКР и заставляют предполагать, что одной экспрессии Bcl-2 недостаточно для их защиты от действия апоптотических стимулов. Клетки БКР экспрессируют Fas L, что позволяет им убивать Fas-несущие активированные Т-лимфоциты. Введение в опухоль α -интерферона весьма эффективно влияет на регрессию БКР, так как в этом случае опухолевые клетки начинают экспрессировать не только Fas L, но и Fas, и Fas—FasL взаимодействие между ними может служить альтернативным механизмом терапевтически обусловленной регрессии БКР. Bcl-2 экспрессируется в плоскоклеточном раке (ПКР) кожи, но только базальными клетками; частота АК в опухоли достаточно высока. В отличие от БКР, в ПКР за опухолевый рост, по-видимому, ответственно усиление пролиферации, а не снижение частоты апоптоза. Апоптоз можно видеть в пилломатриксах, очень много АК в регрессирующих кератоакантомах. В последних Bcl-2 экспрессируется на базальных клетках только в фазе пролиферации; в фазе инволюции кератоакантомы Bcl-2 экспрессируется чрезвычайно редко, что отчасти может объяснить биологическое поведение этой опухоли. Кроме того, апоптоз, инициируемый активированными Т-лимфоцитами, также может быть механизмом спонтанной регрессии кератоакантом, а в отдельных случаях и высокодифференцированного ПКР кожи.

Как уже упоминалось выше, клетки загара, возникающие в эпидермисе при воздействии ультрафиолетовых лучей, представляют собой разновидность АК. Вместе с тем показано, что в опухолях кожи, в частности БКР, ультрафиолетовые лучи могут активировать Fas L, тем самым, давая им возможность избегать иммунной атаки со стороны лимфоцитов. При псориазе ультрафиолетовые лучи вызывают активацию Fas L на дефектных кератиноцитах псориатических бляшек, что может

способствовать их устранению Fas-несущими интраэпидермальными Т-лимфоцитами и наступлению ремиссии.

Одним из главных регулирующих факторов, участвующих в индукции апоптоза кератиноцитов при воздействии ультрафиолетовых лучей, является ген p53. Установлено, что после воздействия ультрафиолетовых лучей в культуре клеток эпидермиса сначала повышается экспрессия p53, а уже затем индуцируется апоптоз. В эпидермисе мышей, имеющих мутантный (инактивированный) ген p53, индукции апоптоза после воздействия ультрафиолетовых лучей не наступает. Возможно, биологический смысл АК типа клеток загара заключается в том, что их образование способствует снижению риска развития рака кожи при повышенной инсоляции. По-видимому, апоптоз играет ключевую роль в цикле волосяных фолликулов. В фазе регресса нормального волосяного фолликула АК рассеяны в его наружном слое и фагоцитируются соседними эпителиальными клетками. Показано, что эта фаза ассоциирована с активацией эндонуклеазы и инверсией соотношения Bcl-2/Bax .

Развитие алопеции под воздействием радиации и химиотерапии, запускающих апоптоз, свидетельствует о том, что волосяной фолликул особенно подвержен действию апоптотических стимулов. Механизмы апоптоза задействованы в развитии склеротических изменений кожи при склеродермии и формировании келоидных рубцов. Апоптоз и некроз приводят к селективной убыли определенных клеточных популяций дермы (прежде всего эндотелия), участвуя в формировании аваскулярного коллагена, характерного для склеродермы и келоида.

Таким образом, целенаправленная индукция или ингибция апоптоза — идеальный путь лечения ряда дерматозов и опухолей кожи, развитие исследований в этой области следует считать высокоприоритетным.(6)

Роль апоптоза в патогенезе заболеваний почек

Большой интерес представляют данные о значении апоптоза в развитии различного рода нефропатий, прогрессирование которых характеризуется одной общей особенностью - клеточной пролиферацией с накоплением

внеклеточного матрикса и последующим сморщиванием ткани. При этом компоненты матрикса влияют на чувствительность мезангия к различным индукторам апоптоза, что приводит к значительным потерям гломерулярных клеток и развитию гломерулосклероза. Недостаточность почечных функций определяется в первую очередь наличием тубулоинтерстициальных нарушений, а не гломерулосклерозом. Разрушение клеток канальцевого эпителия, наряду с некрозом, может происходить и путем апоптоза, который, в ряде случаев является основной причиной развития острой почечной недостаточности. При этом гибель тубулярных эпителиоцитов может происходить по двум патогенетическим путям: FAS/FAS-L с передачей сигналов посредством JNK (c-Jun N-terminal kinase) и RANK/RANK-L (receptor activator of NFkB) с активацией каскада каспаз. В конечном счете, происходит высвобождение цитохрома С и фрагментация ядра, что завершает процесс гибели клетки. Полученные результаты дают авторам основание предложить использование ингибиторов каспаз и блокаторов рецепторов к ангиотензину II, ингибирующих апоптоз, в качестве эффективного метода лечения тубулоинтерстициальных нарушений, с целью уменьшения потери функционирующей паренхимы почки.

Одной из частых причин снижения функций почек является инфекция мочевой системы, нередко сочетающаяся с нарушениями уродинамики. Исследования последних лет свидетельствуют о том, что оба процесса в равной степени могут влиять на интенсивность апоптоза в почечной паренхиме. В частности, пиелонефрит активизирует гибель клеток кортикального слоя почки, при котором происходит замедление роста органа. При этом признаки деструкции ткани обнаруживаются не только непосредственно в очаге инфекционного воспаления, но и в прилегающих зонах. Результаты экспериментальных исследований R. Chevalier и соавт. свидетельствуют о том, что хроническая обструкция мочеточника приводит к массивному апоптозу канальцев в результате подавления экспрессии Bcl-2 в тубулярных клетках независимо от возраста животных (новорожденные или взрослые).

Большинство исследователей подчеркивают отрицательное влияние активации апоптоза на течение патологических процессов в почечной

паренхиме. Но иногда это явление может быть полезным, улучшая качество и продолжительность жизни больного. Показано положительное влияние апоптоза на выживаемость почечного трансплантата у крыс. Животные, получавшие иммуносупрессивную терапию эверолимусом, не имели признаков хронической нефропатии благодаря антипролиферативному и проапоптозному действию препарата. Результаты этих работ открывают перспективы лечения посттрансплантационных больных посредством воздействий на процессы апоптоза.

Апоптоз при ожогах и сепсисе

Септический шок связан с нейронным и глиальным апоптозом, который индуцируется экспрессией эндотелиальной растворимой нитридоксидсинтетазы.

При сепсисе индуцируется апоптоз лимфоцитов, лежащий в основе иммуносупрессии. Продемонстрировано значительное уменьшение веса тимуса и увеличение фрагментации ДНК с характерной ДНК-лестницей на гелевой электрофореграмме в эксперименте при моделировании перитонеального сепсиса.

Позже установлено, что ключевую роль в регуляции клеточной пролиферации лимфоцитов и их гибели при сепсисе играет серин-треониновая киназа Akt. Определено, что сверхэкспрессия этого фермента в лимфоцитах предупреждает апоптоз лимфоцитов и улучшает выживаемость мышей при сепсисе.

Термическая травма приводит к усилению печеночного апоптоза и пролиферации, связанной с экспрессией ядерного фактора NF-κB. В эксперименте на крысах при термическом ожоге 40% поверхности тела у крыс изучали апоптоз и пролиферацию печеночных клеток на 1, 2, 5 и 7 сут после ожога. Показано, что апоптоз и клеточная пролиферация усилены во все сроки по сравнению с контролем на фоне снижения синтеза белка.

Известно, что при термическом поражении происходит резкое возрастание белкового катаболизма, особенно в скелетной мускулатуре. Tisdale MJ (2002) изучал пути индукции этого процесса на клеточном уровне. Выяснилось, что протеиновая деградация в условиях катаболического состояния первично запускается активацией протеосомно-протеолитической

трансцеллюлярной системы. Глюкокортикоиды непосредственно активируют эту систему. При онкопатологии срабатывает другой пусковой механизм: опухолью вырабатывается протеолизиндуцирующий фактор (сульфогликопротеин), повышающий катаболизм мышечного белка. Причем, индукция экспрессии протеосомных субъединиц глюкокортикоидами является результатом снижения активности ядерного фактора -карра В. Апоптоз может также играть существенную роль в потерях белка на первых стадиях кахексии.

Роль апоптоза при сердечно-сосудистых заболеваниях

Известно, что в условиях гипоксии *in vitro* кардиомиоциты погибают путем апоптоза. При изучении локализации меченого аннексина-V в мышце сердца животных с острым инфарктом миокарда были подтверждены данные о роли апоптоза в элиминации кардиомиоцитов *in vivo* после острой коронарной окклюзии. Первая успешная прижизненная визуализация АК в кардиологии была проведена с применением ОФЭКТ-техники формирования изображения и зонда ⁹⁹Tc-аннексин-У. Полученные серийные изображения миокардиальной ткани в зоне инфаркта явились существенным ориентиром дальнейшей тактики и объема терапевтических вмешательств, имеющих своей целью снижение уровня клеточной гибели в участках повреждения миокарда и перинфарктной зоны в результате замедления или стабилизации апоптоза.

Интересный подход предложен для использования аннексинового зонда у больных с острым инфарктом миокарда с целью контроля риска повторного его возникновения. Оказалось, что по визуальным признакам раннего накопления этого зонда на поверхности апоптотически измененных кардиомиоцитов можно судить о возможности повторного возникновения острого инфаркта миокарда за 24 ч до появления первых признаков стенокардии.

Роль апоптоза в процессах возникновения и развития атеросклероза может быть достаточно существенной. Посттравматическая инфильтрация артериальной стенки моноцитами сопровождается формированием зоны реэндартализации, т.е. появлением нового слоя клеток с повышенной проницаемостью к циркулирующим липидам и комплексам холестерина.

Данный феномен описан как результат процессов активации макрофагов и последующего захвата липидов под эндотелий, что приводит к формированию атеромы. При этом апоптотические изменения наиболее часто отмечаются в макрофагах, гладкомышечных и эндотелиальных клетках, находящихся в области нестабильной бляшки. Особенно опасным является вялотекущее развитие данного процесса, так как АК эндотелия сосудов могут способствовать образованию тромба на поверхности атеромы даже с интактной покрывкой, т.е. не разрушенным поверхностным слоем бляшки. Хотя визуализация специфических апоптотических изменений с помощью сцинтилляционной методики пока достаточно проблематична, инструментальные методы зондирования коронарного русла позволяют сравнительно легко регистрировать зону атерогенного повреждения сосудов.

Исследование апоптоза при онкологических заболеваниях

Степень интенсивности апоптоза опухолевых клеток может служить самостоятельным прогностическим фактором. Высокие значения апоптотического индекса (АИ) при раке желудка, толстой и прямой кишки, легкого, мочевого пузыря или шейки матки коррелируют с большей продолжительностью жизни больных. Вместе с тем, у больных раком молочной железы, языка, печени, гортани, предстательной железы, яичника, саркомами мягких тканей, лимфогранулематозом увеличение доли АК являются скорее негативным прогностическим фактором. При этом предпочтительно проведение неинвазивных технологий количественной оценки апоптоза.

L. Hofstra et al. представили данные по использованию конъюгата $^{99\text{Tc}}$ -аннексин-V (Aromate, Theseus Imaging, США) в условиях онкологической клиники. Достигнута визуализация АК в опухоли, растущей из папиллярных мышц створок митрального клапана левого желудочка сердца, у больного 65 лет на предоперационном этапе. Результаты ОФЭКТ, выполненной в режиме одновременного применения двух изотопных меток ($^{99\text{Tc}}$ -аннексин-V и $^{201\text{Tl}}$), показали наличие отчетливых границ локализации АК в области левого желудочка. После проведения хирургической операции по удалению опухоли у этого больного, с помощью сцинтиграфии (ОФЭКТ) сердца в полости левого желудочка была зарегистрирована аннексиновая метка, но не изотоп

таллия, что свидетельствовало о неполном удалении опухоли. После смерти больного (через 2,5 мес после удаления опухоли) был проведен гистологический анализ аутопсийного материала, который показал наличие множественных микроочагов саркомы в стенке левого желудочка. Таким образом, используя пред- и послеоперационное проведение ОФЭКТ-анализа, можно своевременно выявлять очаги опухоли, оставшиеся после неадекватно выполненных хирургических операций.

При онкологических заболеваниях определение значений АИ также важно для оценки эффективности химио- или лучевой терапии. С этой целью чаще всего АИ определяют долю АК в ткани опухоли после проведения предоперационной, неoadъювантной лучевой и/или химиотерапии. Количество АК в этом случае обычно коррелирует с чувствительностью опухоли к применяемому препарату или γ -излучению. Показана эффективность методов ОФЭКТ и ПЭТ для оценки ближайших результатов цитотоксических программ лечения больных с лимфомами, новообразованиями легкого и молочной железы, глиомами, раком толстой и прямой кишки.

Исследования апоптоза в ревматологии

Известно, что одним из главных проявлений системного хронического заболевания ревматоидного артрита является увеличение объема синовиальной ткани, которое сопровождается прогрессирующей деградацией хряща и кости. У больных ревматоидным артритом отмечается ослабление апоптоза фибробластоподобных синовиоцитов, которое служит одной из причин гиперплазии синовиальной ткани, и, одновременно с этим, усиление апоптотической гибели остеобластов. На модели коллагенового артрита у мышей с помощью метода ОФЭКТ было показано, что через 4 нед (время максимального «отека околосоуставных тканей задних конечностей») происходит многократное увеличение поступления аннексинового зонда в зону костно-хрящевого повреждения. После проведенной обработки животных преднизалоном (4 сут) спустя 4 нед от введения им бычьего коллагена II типа наблюдали снижение накопления ^{99}Tc -аннексина-У по сравнению с животными контрольной группы. Данный подход позволит оценивать эффективность применяемых в настоящее время для лечения

больных ревматоидным артритом противовоспалительных, гормональных и иммуносупрессивных препаратов.

Решение актуальной для клинической ревматологии проблемы повышения эффективности терапии остеопороза связано с разработкой нового класса антирезорбентов костной ткани (бисфосфонаты и др.), которые способны индуцировать апоптоз остеокластов. В настоящее время оценка качества лечения этой категории больных требует сравнения исходной и последующей (повторный денситометрический контроль через 6-12 мес) характеристик минеральной плотности костной ткани. Поэтому метод, позволяющий непосредственно (а не через год!) визуально оценивать фармакологические эффекты антиостеопорозных препаратов, в частности, ОФЭКТ-анализ с аннексином, меченым ^{99}Tc , может быть использован для выявления ранних нарушений osteoобразования.

Роль апоптоза при формировании клеток иммунной системы

Апоптоз представляет собой важный процесс для формирования и функционирования иммунной системы. Организм использует механизм апоптоза для освобождения от чужеродных клеток, клеток с дефектным генетическим аппаратом, аутоагрессивных лимфоцитов и "отработавших" клеток иммунной системы, которое выполнили свою функцию. Апоптотическая гибель клеток на ранних этапах развития иммунной системы связана с дефицитом ростовых факторов. Зрелые лимфоциты и другие клетки иммунной системы устойчивы к индукции апоптоза. Повторная стимуляция и просто старение активированных клеток приводят к апоптозу. Благодаря апоптозу осуществляется цитолиз клеток-мишеней Т-лимфоцитами и естественными киллерами. В процессе созревания Т и В лимфоцитов чувствительность клеток к индукции апоптоза меняется: то значительно повышается, то вновь снижается. Общеизвестная в настоящее время точка зрения связывает гибель незрелых иммунокомпетентных клеток с процессом селекции клонов через механизм апоптоза при отрицательной селекции или его избегания при положительной селекции.

Апоптоз при селекции Т-лимфоцитов. Основные этапы образования Т-лимфоцитов представлены на рис 14. Созревание Т-лимфоцитов начинается в

красном костном мозге из стволовых клеток. За тем они перемещаются в кору тимуса, в подкапсулярной зоне которого образуются Т-лимфобласты. На ранних стадиях созревания деление Т-лимфопоэтических клеток в костном мозге и коре тимуса зависит от присутствия специфических индукторов. В костном мозге индуктором служит Т-лимфопоэтин. В коре тимуса необходимо присутствие интерлейкина 7. На поверхности развивающихся клеток имеются рецепторы к данным индукторам. При отсутствии индуктора инициируется апоптоз. Связывание индуктора с этими рецепторами не только предупреждает апоптоз, но и стимулирует дифференцировку Т-лимфобластов. Однажды вступив на путь дифференцировки Т-лимфобласты не могут «повернуть обратно» или «законсервироваться». Биологический смысл этого принципа состоит в том, что удаляются беспризорные и бесполезные клетки.

При нормальном лимфопоэзе в пре-Т-клетках происходит перестройка той области генома, которая кодирует Т-клеточные рецепторы (TCR). В процессе перестройки генома в созревающих иммунокомпетентных клетках происходит перенос (транспозиция) некоторых генов и образуется один полный ген, кодирующий Т-клеточные рецепторы (TCR) мембраны тимоицита. В результате перестройки образуются Т-клетки двух видов $CD4^+$ (хелперы), $CD8^+$ (киллеры). В результате переноса фрагментов ДНК из одной области хромосомы в другую возникают многочисленные разрывы и повреждения ДНК. Клетки с поврежденной ДНК подвергаются апоптозу.

Напомним, что основу функционирования Т клеток составляет способность реагировать с антигенами главного комплекса гистосовместимости (ГКГ)-1, имеющимися практически во всех клетках; с антигенами ГКГ-II, содержащимися лишь в антиген-представляющих клетках, лимфоцитах, макрофагах и некоторых специализированных эпителиоцитах.

Дальнейшее созревание Т-клеток направлено на положительную селекцию клеток, способных распознавать антигены ГКГ ретикулоэпителиальных клеток в глубоких слоях коры тимуса. Ретикулоэпителиальные клетки одновременно содержат на своей поверхности набор антигенов ГКГ-I и ГКГ-II. В результате положительной селекции, тимоициты, рецепторы которых не способны реагировать с вышеперечисленными антигенами ГКГ, вступают в апоптоз.

Активация апоптоза происходит следующим образом. В связи с тем, что TCR дефектных тимоцитов не взаимодействует с антигенами ГКГ ретикулоэпителиоцита, то Fas-рецептор, который появляется к моменту селекции, связывается с Fas-лигандом ретикулоэпителиоцита или другой клетки микроокружения. Взаимодействие Fas с Fas –рецептором, как известно, ведет к запуску апоптоза. Таким образом, на данном этапе отбраковывается или погибает большое количество Т клеток, чьи TCR не могут узнать антигены ГКГ. При положительной селекции у одних клеток остается белок CD8⁺ (будущие Т-киллеры), у других только CD4⁺ (будущие Т-хелперы).



Рис 14. Схема дифференцировки Т лимфоцитов.

Следующий этап положительной селекции CD4⁺- клеток и CD8⁺-Т клеток происходит в глубоких слоях коры тимуса. Из популяции удаляются (дефектные, аномальные) киллеры и хелперы CD 4⁺-Т клетки, распознающие

ГКГ-I и CD8⁺-Т клетки узнающие ГКГ-II. На этом положительная селекция заканчивается. Уцелевшие клетки направляются на границу коркового и мозгового вещества тимуса или непосредственно в мозговое вещество. Затем на мембране лимфоцитов возрастает количество молекул TCR и связанных с ними молекул CD.

При отрицательной селекции удаляются аутореактивные клетки, которые не могут распознавать антигены ГКГ на дендритные клетки тимуса. По окончании процессов селекции с поверхности клеток исчезает «рецептор смерти» (Fas-R) и усиливается экспрессия генов BCL-2 и BCL-X. В результате устойчивость к апоптозу повышается и клетки переходят в покоящееся состояние.

Апоптоз при селекции В-лимфоцитов. Общая схема дифференцировки В-лимфоцитов представлена на рис 15. В костном мозге из стволовых клеток образуются В-лимфобластов и затем В-лимфоцитов. Также как для Т-лимфоцитов, деление предшественников В-клеток зависит от индукторов лимфопоэза. Индуктором дифференцировки В-лимфоцитов является В-лимфопоэтин. При его недостатке предшественники лимфопоэза вступают в апоптоз.

Дальнейшее развитие В-лимфоцитов требует присутствия антигена. Вначале, в слизистых оболочках и поверхностных слоях кожи происходит первичное взаимодействие В-клеток с чужеродным антигеном и последующая активация Т-хелпером. Этот этап не связан с апоптозом. Последующая антигензависимая дифференцировка В-лимфоцитов протекает в лимфатических узлах.. В лимфатическом фолликуле различают несколько зон:

Светлый реактивный центр с интенсивным делением В-иммунобластов.

В нем подразделяют:

темную зону, где происходит деление В-клеток-центробластов

светлую базальную зону –селекция centroцитов

светлую апикальную зону –деление В-иммунобластов

Темная корона (мантия) с В-клетками памяти и протоплазмацитами.

После стимуляции антигеном и Т-хелпером В-клетки мигрируют в темную зону реактивного центра лимфатического фолликула, что сопровождается: усилением продукции клеткой мутагенных факторов

(например, оксида азота, активных форм кислорода и др.) и ослаблением деятельности систем репарации, антиоксидантов.

Основная задача В-клеток это продукция иммуноглобулинов. Иммуноглобулины состоят из легких и тяжелых цепей, которые подразделяются на переменные и константные участки. У иммуноглобулинов с разной специфичностью имеются переменные домены. Существует

350 генов переменных доменов легких цепей

250 генов переменных доменов тяжелых цепей

5 генов соединительных участков тяжелых и легких цепей

2 гена константного участка легких

5 генов константного участка тяжелых цепей.

В результате перестройки области генома, кодирующей полипептидные фрагменты иммуноглобулинов, в В-клетках образуются два полных гена для тяжелой и легкой цепи Ig-подобного рецептора. Важнейший результат транспозиции генов это образование большого количества клеток лимфоцитов с различной иммуноспецифичностью. Биологический смысл мутагенеза – образование В-клонов, чьи Ig-подобные рецепторы имели бы большее сродство к попавшему в организм антигену. Часть клеток, с поврежденной в результате мутагенеза ДНК, подвергается апоптозу.

Далее, в светлой базальной зоне лимфатического фолликула, происходит положительная селекция В-клеток с высоким сродством к антигенным детерминантам, находящимся на поверхности дендритных клеток. Антигенные детерминанты, попавшего в организм антигена, фиксированы на поверхности дендритных клеток и связаны с ГКГ –II. «Удачное» взаимодействие между Ig-рецептором и антигенными детерминантами скрепляется неспецифическим взаимодействием двух белков из группы CD. Но на поверхности контактирующих клеток наготове пара Fas –рецептор (у В-клеток) и Fas-лиганд (у дендритной клетки). И, если сродство невысоко, то взаимодействие этой пары запускает апоптоз. Таким образом, клетки, слабо взаимодействующие с антигенными детерминантами, вступают в апоптоз.

клетки становятся устойчивы к апоптозу. С другой стороны интенсивное деление повреждает ДНК некоторых клеток и, как следствие, стимулирует апоптотическую гибель клеток.

Клетки, выходящие из митотического цикла в короне лимфоузла дифференцируются либо в клетки памяти, либо в проплазмоциты. Плазматические клетки накапливаются в мозговых тяжах лимфоузлов или в рыхлой соединительной ткани и активно продуцируют IgM. Через некоторое время происходит синтез иммуноглобулинов остальных четырех классов (продукция Ig G, A, E, D). Этот феномен обозначается как C_n -переключение – переход от образования иммуноглобулина с одной C_n -области к синтезу иммуноглобулина с другой одноименной областью. Механизм перехода состоит в транспозиции генов. Там где происходит реорганизация генетического материала всегда возможны ошибки и часть клеток будет подвергаться апоптозу, в результате повреждения хромосом.



Рис 15. Схема дифференцировки В лимфоцитов.

По окончании селекции отобранные клетки перемещаются в самую светлую (апикальную) зону реактивного центра и становятся иммунобластами. Они интенсивно делятся. Fas-рецепторы исчезают и

После Сн-переключения наблюдается стабилизация плазмоцитов и В-клеток памяти. В-клетки соответствующего клона вступают в апоптоз в отсутствие стимуляции антигеном.

Таким образом, в процессе развития клеток иммунной системы апоптоз многократно выступает в роли регулятора общей численности клеточных популяций и их распределения в тканях. К заболеваниям с патологией апоптоза относятся аутоиммунные, лимфопролиферативные, иммунодефицитные состояния.

Методы изучения апоптоза

Существуют морфологические и биохимические методы изучения апоптотической гибели клетки (табл.7). При выборе того или иного метода следует учитывать:

1. Объект исследования
2. Природу индуктора
3. Технические возможности лаборатории
4. Объем исследования

Таблица 7

Показатели апоптоза

Морфологические	Конденсация ядерного материала Образование апоптотических телец
Электрофоретические	Фрагментация ДНК, наличие “лестницы”
Проточная цитофлуориметрия	Уменьшение размеров клеток Уменьшение окрашиваемости ДНК- тропными красителями
Биохимические	ICE (interleukin converting enzyme) CPP-32 (сериновая протеиназа) Ca-зависимая транслугтаминаза (тип II) Fas, Bcl-2, bax, белок p-53

Микроскопические методы изучения апоптоза

Самыми ранними проявлениями апоптоза, выявляемыми с помощью *морфологических методов* являются резко очерченные уплотнения ядерного

хроматина. Результаты микроскопических исследований свидетельствуют о конденсации цитоплазмы и ядерного материала. Позже ядро распадается с образованием компактных апоптотических телец, которые ограничены плазматической мембраной. Трудности выявления апоптотических телец обусловлены быстрым разрушением и перевариванием их макрофагами или клетками окружения. Для количественной оценки используют апоптотический индекс (АИ), который характеризует количество клеток с морфологическими признаками апоптоза по отношению к общему количеству клеток (в %). Микроскопия позволяет выявлять ранние изменения проницаемости мембраны и нарушения хроматина, предшествующие межнуклеосомной фрагментации ДНК. Окружающие клетки не имеют таких изменений. Следует отметить отсутствие воспалительных явлений в тканях. Ультраструктурные проявления некроза значительно отличаются от апоптотических. Ранние изменения при некрозе являются результатом повреждения клеточных мембран и снижения синтеза АТФ. Некроз обычно сопровождается воспалением.

Световая микроскопия

Световая микроскопия является наиболее доступным методом изучения апоптоза. Используются тонкослойные срезы. Применяют стандартные методы окрашивания клеток с использованием азур А, эозина и гематоксилина. Азур А выявляет изменения структуры хроматина, а гематоксилин и эозин окрашивают цитоплазму. Для идентификации апоптотических клеток используют краситель Hoechst -33342 и пропидий йодид, которые быстро поглощаются апоптотическими клетками в отличие от интактных клеток.

При флуоресцентной микроскопии состояния ядра клеток также используют акридин оранжевый, который в концентрации 30 мкг/мл вызывает флуоресценцию ДНК в желто-зеленой области и РНК в красной области спектра. В интактных клетках при связывании с этим красителем флуоресцирует только ядро в зеленой области спектра. В апоптотических клетках, в связи с повреждением ядра наблюдается флуоресценция по всему объему клетки. Метод позволяет обнаружить РНК в ядрышке.

Электронная микроскопия

Электронная микроскопия более трудоемкий метод, требующий длительной подготовки исследуемых образцов. При микроскопии можно наблюдать поляризацию клеток (с одной стороны клетки находится конденсированное ядро, с другой стороны – большое количество выростов и ворсинок цитоплазматической мембраны) и образование электронно-прозрачных аутофагальных вакуолей и лизосом. *Для электронно-микроскопического исследования* материал фиксируют 3% раствором глутарового альдегида в буфере, рН 7,4, в течение 2 часов при 4С, затем обрабатывают 1% раствором четырехоксида осмия в буфере в течение 1,5 часа и обезвоживают в растворе спирта (50-80,89%) с возрастающей концентрацией (70% спирт насыщают уранилацетатом). Материал заливают в эпоксидную смолу Эпон-812. Срезы делают на ультрамикротоме LKB-III и окрашивают свинцом по Рейнольдсу. Полученные препараты просматривают и фотографируют в электронном микроскопе NU-11В (Hitachi Япония)

Проточная цитофлуориметрия

Апоптоз сопровождается изменением размера и плотности клеток, вызванных потерей молекул воды. Следует отметить, что уменьшение размеров и уплотнение клеток наблюдается в тех клетках, в которых еще не образовались апоптотические тельца. Эти изменения обнаруживаются с помощью проточной цитофлуориметрии.

С помощью *проточной цитофлуориметрии* можно обнаружить изменения размеров и плотности клеток, вызванных потерями молекул воды. Уменьшение размеров и увеличение плотности клеток при апоптозе наблюдается только на ранних стадиях апоптоза, когда еще не произошло образование апоптотических телец, что необходимо учитывать при использовании этого метода. Перспективным является *флуориметрический* метод для определения активности каспаз. Активация каспаз происходит на ранних этапах апоптоза и определение их активности служит показателем инициации процесса. Используют субстрат конъюгированный с флуорохромом AFC (7-амино-4-трифлуорометил-кумарин).

Методом проточной цитометрии можно получить самые разные данные: определить содержание в клетке ДНК и РНК, суммарное количество специфически белков, измерить внутриклеточный рН, изучить транспорт ионов кальция и кинетику ферментативных реакций.

Проточная цитофлуориметрия позволяет определить клетки, находящиеся в разных стадиях клеточного цикла - G_1 , S, G_2/M (рис 1.А). Конденсация хроматина в апоптотических клетках приводит к появлению добавочного пика A_0 (рис 1, Б). Обнаружение такого пика в клеточном цикле после обработки клеток пропидием йодидом свидетельствует о присутствии апоптотических клеток. При этом методе следует учитывать возможность механического повреждения клеток, которые также дают пик A_0 и могут быть ошибочно оценены как апоптотические.

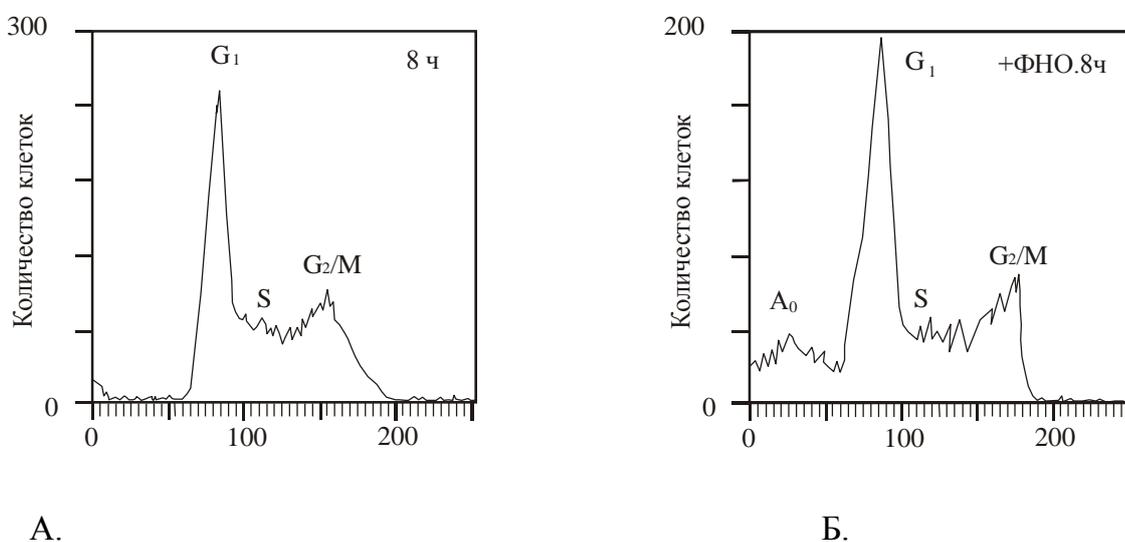


Рис 1. Распределение ДНК клеток по фазам клеточного цикла (аргоновый лазер, $\lambda = 488$ нм) в норме (А) и при стимуляции апоптоза (Б). Добавочный пик A_0 соответствует популяции апоптотических клеток.

Метод проточной цитофлуориметрии наиболее удобен при исследовании апоптоза клеток крови. Апоптоз клеток можно определять как в свежее выделенных лейкоцитах периферической крови, так и после их инкубации в культуральной среде RPMI-1640 в течение 18 часов при 37С и 5% CO_2 . После инкубации в присутствии индукторов или ингибиторов апоптоза клетки (в концентрации 1 млн/мл) фиксируют в 70% ледяном этаноле в течение 1 часа при 4° С. Фиксированные клетки отмывают от этанола путем суспендирования в фосфатно-солевом буфере (рН 7,4) и центрифугирования

10 мин при 1500 об/мин. Затем клетки ресуспендируют в 1 мл ДНК-окрашивающего реагента (фосфатно-солевой буфер, pH=7,4, содержащий 0,1% тритон X-100, 0,1мМ ЭДТА, 0,05 мг/мл рибонуклеазы А и 50мкг/мл йодистого пропидия) в течение 1 ч при комнатной температуре. Окрашенные клетки анализируют с помощью проточного цитофлюориметра EPICS-XL2 при возбуждении 488 нм и эмиссии 620-700 нм. Процент клеток в состоянии апоптоза подсчитывают по программе STAT PASC, анализируя флюоресценцию 50 000 клеток в каждом образце. (А.Хасан Мамад и др. // Вопросы биологической медицинской и фармацевтической химии 2000, №4)

Электрофорез ДНК

Электрофорез ДНК позволяет выявить фрагменты, образуемые эндонуклеазами при апоптозе. Известны не менее трех типов фрагментации ДНК во время апоптоза : 1) однонитевые разрывы; 2) фрагментация ДНК на большие участки (50-300 п.о.); 3) межнуклеосомное расщепление ДНК на фрагменты (180-200 п.о.). Метод электрофореза в агарозном геле является высокочувствительным для выявления однонитевых разрывов. Межнуклеосомные фрагменты обладают значительно большей подвижностью при электрофорезе, чем высокомолекулярная ДНК, подвижностью в агарозном геле и в присутствии бромистого этидия обнаруживаются в ультрафиолетовом свете в виде так называемой лестницы ДНК. В некротических клетках расщепление ДНК происходит с образованием случайного набора низкополимерных фрагментов и на электрофореграмме имеется большое диффузное пятно ДНК.

Для электрофореза используют приборы разных фирм и марок. Прибор АГГЭ-3 обеспечивает проведение электрофореза в агарозной пластине размером 120 на 115 мм толщиной от 2 до 10 мм, и в полиакриламидной гелевой пластине с максимальными размерами 120 на 115 мм и толщиной 1,2 ил 3 мм. Одновременно при использовании двух шаблонов-ребешков в агарозном геле можно вести разделение до 40 проб.

Наиболее удобный способ визуализации ДНК в агарозных гелях это окрашиванием ее флуоресцирующим красителем – бромистым этидием. Этот краситель интеркалирует между соседними основаниями ДНК, что

сопровождается значительным увеличением его флуоресценции при облучении светом длиной волны 253,7 нм (ртутные лампы низкого давления) при этом зоны ДНК испускают свет в красно-оранжевой области видимого спектра (560 нм). Чаще всего бромистый этидий добавляют и в гель и в электродный буфер (0,5 мкг/мл). Его присутствие снижает электрофоретическую подвижность зон на 15 %, но дает возможность наблюдать за процессом разделения непосредственно под источником ультрафиолетового излучения во время или в конце разделения.

Для проведения электрофореза в кювету для геля заливают агарозу в конечной концентрации 0,35-0,45 % приготовленной на 0,9 М трис-боратном буфере pH=8,1-8,2, содержащем 20 мМ ЭДТА. Можно использовать 1% агарозу и трис-ацетатный буфер (0,04М трис-ацетат буфер pH=8,0 содержащий 0,002 М ЭДТА).

К смеси добавляют бромистый этидий до конечной концентрации 0,5 мкг/мл. Гель полимеризуется в течение 30 мин. Образцы исследуемой и маркерной ДНК смешивают с буфером в соотношении 5:1, добавляют краситель (0,025 % бромфенолового синего) и смесь наносят в лунки в количестве 200 нг ДНК. Проводят электрофорез в течение 1-3 часа, пока бромфеноловый синий не дойдет до конца геля, при напряжении 1-3 В на 1 см геля (при использовании 1% агарозы электрофорез занимает 1,5 часа при 4-5 В/см). Гель просматривают в УФ-свете.

TUNEL метод

Основан на определении 3'концов ДНК, образующихся при апоптозе, с помощью модифицированных нуклеотидов (биотин-dUTP) в реакции ник-мечения, катализируемой ДНК-полимеразой или терминальной дезоксинуклеотидтрансферазой. Ник-меченные концы выявляются с помощью авидина, конъюгированного с флуоресцентным красителем. Специфическую биотиновую метку визуализируют микроскопически после взаимодействия авидина с пероксидазой хрена и обработки диаминобензидином (субстрат пероксидазы). TUNEL метод обладает высокой чувствительностью (достаточно 5 нг ДНК) и позволяет выявить «ранние» апоптотические клетки с фрагментацией ДНК, у которых еще не развились морфологические изменения.

Для проведения TUNEL метода ткань фиксируют в течение суток в 4% формальдегиде в фосфат-солевом буфере (ФСБ) и заливают парафином. Готовят срезы толщиной 5 мкм, которые фиксируют на предметном стекле, обработанном 0,01% раствором полилизина. Депротеинизацию проводят двукратной отмывкой толуолом в течение 5 минут, трехкратной отмывкой абсолютным спиртом в течение 5 мин и однократной отмывкой 70% этиловым спиртом и фосфатно-солевым буфере.

Депротеинизированные срезы обрабатывают раствором протеиназы К (20 мкг/мл) в течение 30 мин при 25°C и промывают фосфатно-солевым буфером. Эндogenous пероксидазную активность ингибируют обработкой срезов 2% раствором H₂O₂ в ФСБ в течение 5 минут. Для блокирования эндогенного биотина в тканях используют Biotin blocking system (ДАКО).

Мечение ДНК биотином проводят в течение 1 часа при 37°C в 100 мкл 25мМ трис HCL -буфера, рН=6,6, содержащего 0,2 М какодилата натрия, 0,25мг/мл БСА, 2 мМ CoCl₂, 0,2 нмоль биотин-16-d-уридинтрифосфат, 10 ЕД терминальной дезоксирибонуклеотидилтрансферазы (TdT).

Для блокирования неспецифического связывания авидина срезы инкубируют в растворе, содержащем 2% БСА в ФСБ в течение 40 минут при 37° С. Затем срезы инкубируют в растворе конъюгата авидин-пероксидаза хрена (0,6 мкг/мл) в ФСБ с 0,05% твином 20 (ФСБТ), содержащем 1% БСА в течение 40 минут при 37°C.

После 30 минутной промывки в ФСБТ и 20 минутной промывки в фосфатно-солевом буфере срезы окрашивают раствором диаминобензидина. В качестве положительного контроля используют срезы, которые депарафинировали обработкой ДНКазой 1 (10ЕД/100 мкл на срез) в 25 мМ трис HCL- буфере, рН=8,0, 5мМ HgCl₂ в течение 30 минут при 25°C. В качестве отрицательного контроля используют срезы, обработанные на стадии мечения ДНК раствором, не содержащим биотин-16-d-уридинтрифосфата. Ядра, содержащие фрагменты ДНК, окрашиваются в коричневый цвет, интенсивность которого прямопропорциональна апоптотической деградаци ДНК.

Определение экспрессии Fas/Fas-L, Bcl-2, Вах, р53

Проводят иммуногистохимическим методом с применением моноклональных первичных антител к Fas/Fas-L, Bcl-2, Вах, р53, к которым присоединяются вторичные антитела, меченные флуоресцентным красителем.

Для определения экспрессии Fas/Fas-L используют антитела к человеческому Fas (клон DX2, мышинные IgG₁, фирма «PharMigen», США) и к человеческому Fas-L (клон NOK-1, мышинные IgG₁, фирма «PharMigen», США). Клетки суспендируют в ледяном фосфатно-солевом буфере (рН=7,4) с 0,1 % азидом натрия и инкубируют 30 мин при 4° С. После инкубации клетки дважды промывают ледяным буфером с 0,1 % азидом натрия. Затем центрифугируют 10 мин при 1500 об/мин. В качестве вторичных антител используют козы или антимышинные IgG₁, меченные ФИТЦ (флуоресцина изотиоцианат, имеющий желто-зеленую люминесценцию). Вторичные антитела используют в разведении 1:100 в фосфатно-солевом буфере, рН=7,4) с 0,5 % желатином и 0,1 % азидом натрия. Клетки, фиксированные 1% параформальдегидом, анализируют с помощью проточной цитофлуориметрии на EPICS-XL2 (Beckman Coulter). Для анализа используют 5000 клеток и в каждом образце, анализируют процент экспрессии Fas и Fas-L.

Для определения степени олигонуклеосомной фрагментации ДНК к 10⁶ клеткам в 150 мкл 1% параформальдегида приливают 500 мкл пропидиума иодида (0,05% раствор в гипотоническом цитратном буфере с 0,5% раствором тритона X-100) и оставляют на 40 минут при 4°С. Процент клеток, экспрессирующих данный антиген, и интенсивность флуоресценции определяют на проточном цитометре FACSCalibur (Becton Dickinson). Флуоресценцию ФИТЦ измеряют на канале FL-1 при λ=530, флуоресценцию пропидия иодида – на канале FL-2 при λ=585. А.Х.Мохиль –Дейн и др. // Вопросы биологической медицинской и фармацевтической химии 2003, №2).

Для определения Bcl-2, Вах, р53 готовят парафиновые срезы исследуемой ткани толщиной 4 мкм с последующей обработкой в СВЧ печи. В качестве первичных антител используют моноклональные мышинные антитела. Срезы инкубируют с антителами в течение 16 часов при 4°С, промывают в фосфатном буфере, обрабатывают вторичными антителами и вновь инкубируют во влажной камере в течение 1 часа. В качестве вторичных

антител используют биотинилированные антитела к мышинным иммуноглобулинам. После инкубации среды промывают фосфатно-солевым буфером на 0,9% NaCl, обрабатывают авидином, меченным пероксидазой в течение 30 мин при комнатной температуре. Пероксидазу выявляют с помощью диаминобензальдегида. В качестве фонового красителя используют гематоксилин. Продукты реакции выявляют по коричневому окрашиванию ядер или цитоплазмы клеток. При постановке негативного контроля вместо первичных антител используют иммуноглобулины свиньи в той же концентрации. Результаты исследования определяют полуколичественным методом.

Определение антигена CD95

Содержание клеток с антигеном CD95, маркером апоптоза, проводят непрямым иммунофлюоресцентным методом с использованием моноклональных антител к данному антигену.

Принцип метода основан на специфическом взаимодействии антигена с комлементарными антителами, которые в дальнейшем реагируют с флуоресцирующими иммуноглобулинами.

Метод применим для оценки апоптоза клеток крови, например, лимфоцитов. Предварительно лимфоциты выделяют на градиенте фиколлапака. Выделенные лимфоциты дважды отмывают в среде 199 и центрифугируют 5 мин при 1500 об/мин.

25 мкл взвеси клеток (лимфоцитов) в количестве 2-4 млн/мл наносят на предметное стекло, которое помещают во влажную камеру на 40 мин для осаждения клеток. Избыток среды удаляют фильтровальной бумагой. Клетки фиксируют на стекле 8 мин в холодном ацетоне. Затем на стекло наносят 5 мкл моноклональных антител (ООО «Сорбент», Москва) и инкубируют 30 мин при комнатной температуре. Избыток моноклональных антител удаляют раствором для отмывки (2 мл эмбриональной телячьей сыворотки на 100 мл среды 199 или Хенкса). Затем наносят 15 мкл вторых антител, F(ab')₂-овечьи антител к Ig мыши, меченных FITC (ООО «Сорбент», Москва) и инкубируют 40 мин при температуре +4⁰С. Промывают эмбриональной телячьей сывороткой, разведенной на среде 199 и наносят каплю глицероля. Препараты можно хранить в течение недели.

Подсчет клеток, содержащих антиген CD95 проводят с помощью люминисцентного микроскопа. Светящимися считали те лимфоциты, которые имеют на мембране тонкое яркое свечение в виде дуги или точек. Диффузное свечение по всему объему клетки, или по экватору, наблюдаемое при повреждении клеток, не учитывают.

Методы прижизненной визуализации апоптоза

Подверженность в организме человека процессу апоптоза клеток любого типа обуславливает необходимость разработки универсальных клинических методов его визуального контроля. Существует несколько методов выявления апоптотических клеток *in vivo*:

1. однофотонная эмиссионная компьютерная томография
2. позитронная эмиссионная томография
3. магнитно-резонансная томография
4. магнитно-резонансная спектроскопия
5. ультразвуковая доплероспектроскопия

Однофотонная эмиссионная компьютерная томография

позволяет получать трехмерное изображение распределения γ -излучающих стабильных изотопов (^{133}Xe , ^{123}I , $^{99\text{Tc}}$) Этот метод применяется, в основном, для исследования регионарного мозгового и коронарного кровотока. Однако в последнее время предложено его использование и для прижизненной визуализации апоптоза.

Выявление апоптотических клеток методом однофотонной эмиссионной компьютерной томографии основано на том, что на ранних этапах развития апоптоза молекулы анионного липида фосфатидилсерина перемещаются из внутренней на внешнюю сторону клеточной мембраны, что связывают с инактивацией ферментов транслоказы и флоппазы и соответствующей активацией фермента скрамблазы. Такое перераспределение локализации фосфатидилсерина является важным сигналом для распознавания апоптотических клеток макрофагами и другими близлежащими клетками, которые участвуют в элиминации погибающих клеток или их фрагментов. Молекулы фосфатидилсерина, экспрессирующиеся на поверхности апоптотических (но не интактных)

клеток, можно визуализировать *in vivo* с помощью зонда, содержащего белок аннексин-V, меченный ^{99}Tc . У человека аннексин-V имеет молекулярную массу 36 кДа и с высокой аффинностью связывается с фосфатидилсеринем плазматической мембраны. Результаты клинических исследований препарата ^{99}Tc -аннексин-V свидетельствуют о хорошей переносимости процедуры его внутривенного введения и отсутствии побочных эффектов. Период полураспада в организме ^{99}Tc -аннексина-V достаточно продолжительный и составляет 50-75 ч. Одним из общих ограничений применения метода является наложение контраста кровотока на детали компьютерного изображения в первые часы после введения аннексинового зонда. Поэтому получение высококонтрастного изображения тканей и органов возможно не ранее, чем через 10-15 ч после введения метки.

Методом позитронной эмиссионной томографии получают изображения анатомических структур на основе их физиологических или функциональных параметров. Это достигается путем внутривенного или ингаляционного введения излучающих позитроны меченых изотопов (в том числе кислорода, углерода, азота, фтора или гелия). На модели гепатомы Морриса у крыс показано, что индукция апоптоза опухолевых клеток цитостатиком гемцитабином сопровождается увеличением поступления в них флюоро-2-деоксиглюкозы, меченой ^{18}F . Метод позитронной эмиссионной томографии также используется в сочетании с описанным выше методом однофотонной эмиссионной компьютерной томографии для визуализации апоптоза, индуцированного химиопрепаратами у больных раком молочной железы, легкого и лимфомами. Однако короткий период полураспада позитрон-излучающих радиоизотопов обуславливает необходимость их приготовления *ex tempore*, что ограничивает возможности применения метода.

Магнитно-резонансная томография. Метод основан на получении изображения за счет тканевых изменений в поведении протонов при воздействии сильного магнитного поля. Благодаря эффекту ядерно-магнитного резонанса (избирательного поглощения электромагнитного излучения различными тканями) протоны переориентируются по

направлению магнитного поля и излучают сигнал, который преобразуется в изображение.

Один из подходов магнитно-резонансной томографии, разработанный для визуализации апоптотических клеток, связан с использованием белка синаптоагмина-1, который специфически распознает молекулы фосфатидилсерина на наружной мембране клеток при апоптозе. С этой целью синаптоагмина-1 конъюгируют с суперпарамагнитными частицами оксида железа. Вводимый внутривенно конъюгат позволяет выявлять клетки на самых ранних апоптоза, когда в них еще отсутствуют выраженные морфологические изменения. При введении мышам-опухоленосителям комбинации циклофосфамида и этопозида через 48 ч в области роста опухоли отмечается увеличение среднего уровня апоптотических клеток. После внутривенного введения конъюгата синаптоагмина-1 отмечается повышенная интенсивность сигнала в участках опухоли, содержащих высокий уровень клеток в апоптозе. Используемый в качестве контрастного агента конъюгат синаптоагмина-1 не проявляет токсичности и при анализе апоптотических клеток по степени их контрастирования не уступает методу компьютерной томографии. Особый интерес представляет методика прижизненной визуализации апоптоза с применением другого контрастного агента - конъюгата аннексина V с суперпарамагнитными частицами оксида железа (аннексин-V-CLIO). Авторы такого подхода считают, что применение указанного конъюгата позволит улучшить контрастность изображений зоны апоптотических клеток.

Ограничением к широкому использованию магнитно-резонансной томографии для визуализации апоптоза следует считать его относительную специфичность (подобно аннексину-V, синаптоагмин связывается также с некротическими клетками) и высокую стоимость аппаратуры.

Магнитно-резонансная спектроскопия. Метод основан на эффекте ядерно-магнитного резонанса и позволяет оценить химический состав и динамику метаболических изменений в исследуемой ткани. Протонная магнитно-резонансная спектроскопия позволяет серийно регистрировать изменения клеточной мембраны и цитоплазмы в апоптотических клетках, выражающиеся в появлении липидных включений. Возрастание

концентрации липидных телец не зависит от типа индуктора апоптоза. Однако, высокое содержание липидных телец характерно также для активированных форболовым эфиром лимфобластов, что свидетельствует об относительной специфичности этого метода к определению апототических клеток.

Помимо протонной спектроскопии существуют и другие варианты метода, связанные с использованием для выявления клеток в состоянии апоптоза стабильных изотопов ^{13}C , ^{19}F и ^{31}P . С помощью математического анализа спектров ^{13}C и ^{31}P в клетках, погибающих путем апоптоза, выявлено достоверное увеличение уровня фруктозо-6-бифосфата, Ca^{2+} , жирных кислот и фосфолипидов. Полученные результаты свидетельствуют о высокой чувствительности этого метода при обнаружении метаболических отклонений в апототических клетках. Преимуществом магнитно-резонансной спектроскопии является проведение исследования без необходимости применения контрастного агента. К недостаткам этого метода можно отнести постоянный расход достаточно дорогих хладагентов (жидкий азот и гелий).

Метод **ультразвуковой доплероспектроскопии** основан на анализе радиочастотных характеристик отраженных ультразвуковых сигналов, поступающих от ограниченной популяции клеток, с помощью компьютерного калибрования спектров рассеивания и усреднения отраженных ультразвуковых сигналов. При этом два широкополосных ультразвуковых датчика, излучающие на частотах 30 и 34 МГц, и совмещенные с системой регистрации и автоматического анализа отраженных сигналов, позволяют получать графическое изображение ультразвуковых сигналов. Для апототических клеток характерно двукратное увеличение интенсивности рассеивания отраженных ультразвуковых сигналов по сравнению с интактными клетками. Специфическое смещение индуцированного ультразвуком спектра рассеивания, имеющее диапазон значений от 0,37 дБ/МГц (после проведенной химиотерапевтической нагрузки) до 0,57 дБ/МГц (спустя 24 ч после воздействия), согласуется с диаграммой направленности рассеивания ультразвука в исследуемой ткани. Полученная высокая степень усреднения ультразвуковых сигналов во

времени позволяет выявить отчетливый пик (соответствующий 14 дБ), появление которого обусловлено повреждением ДНК в ядрах АК. Появление отраженных микросигналов ("microechoes") ультразвука предшествует конденсации хроматина ядра и апоптотической гибели клеток. К преимуществам метода следует отнести быстроту проведения анализа, безболезненность и возможность многократного применения у одного и того же больного при отсутствии лучевой нагрузки.