

КІЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА

Л. І. ОСТАПЧЕНКО
Т. Б. СИНЕЛЬНИК
Т. В. РИБАЛЬЧЕНКО
В. К. РИБАЛЬЧЕНКО

БІОХІМІЧНІ МЕХАНІЗМИ АПОПТОЗУ

Навчальний посібник

Рекомендовано
Міністерством освіти і науки України
як навчальний посібник
для студентів медичних та біологічних спеціальностей
вищих навчальних закладів



УДК 576.32/.36:577.1(075)

ББК 28.073+28.05я73

Б63

Рецензенти:

д-р біол. наук, проф., чл.-кор. НАН України Р. С. Стойко,
д-р біол. наук А. П. Бурлака

Затверджено Вченого радою

Київського національного університету імені Тараса Шевченка
5 березня 2007 року

Остапченко, Л. І.

Б63 Біохімічні механізми апоптозу : навчальний посібник / Л. І. Остапченко, Т. Б. Синельник, Т. В. Рибальченко, В. К. Рибальченко. – К. : Видавничо-поліграфічний центр "Київський університет", 2010. – 311 с.

ISBN 978-966-439-302-4

Розглянуто основні уявлення про біохімічні механізми загибелі клітин шляхом апоптозу, вивчення яких передбачено програмою підготовки студентів-біологів вищих навчальних закладів.

Коротко висвітлено передумови виникнення, історію становлення і розвитку вчення про основні механізми загибелі клітин, загально-біологічні функції апоптозу у тваринних і рослинних організмах, в одно-клітинних, його роль у розвитку найпоширеніших захворювань людини.

Для студентів-біологів вищих навчальних закладів, магістрів і аспірантів медико-біологічних спеціальностей, науковців.

УДК 576.32/.36:577.1(075)

ББК 28.073+28.05я73

Гриф надано Міністерством освіти і науки України
(лист № 1/11-6429 від 03.08.09)

ISBN 978-966-439-302-4

© Остапченко Л. І., Синельник Т. Б.,
Рибальченко Т. В., Рибальченко В. К., 2010
© Київський національний університет імені Тараса Шевченка,
ВПЦ "Київський університет", 2010

ПЕРЕДМОВА

Різні організми мають приблизно однакову кількість клітин. Така постійність підтримується двома програмами: регуляції клітинного поділу і регуляції смерті клітини. Останнє явище називається апоптозом і є жорстко регламентованим процесом у часі й просторі. Загибель клітин відбувається двома шляхами – апоптозу і некрозу. Некроз – це незапрограмована, патологічна форма клітинної смерті, яка характеризується розривом усіх типів мембрани і виходом цитоплазми в міжклітинний простір, що є причиною реакції запалення. При апоптозі плазматична мембрана не розривається, ядра конденсуються, ДНК фрагментується і клітина розпадається на мембрани везикули – апоптозні тіла – із внутрішньоклітинним вмістом. Апоптозні тіла фагоцитуються макрофагами й іншими клітинами, тому при загибелі клітини шляхом апоптозу клітини-сусіди не відчувають дискомфорту.

Апоптоз є багатостадійним процесом, серед стадій якого можна виділити три головні. На першому етапі клітина зустрічається із "сигналом смерті", який потрапляє в клітину ззовні або виникає в самій клітині. Другим етапом є сприйняття такого сигналу рецепторами, його аналіз і передача молекулам-посередникам. Наступним етапом є активація особливих ферментів, які називаються каспазами. Їм притаманні протеазні властивості. Відомо близько 15 каспаз, і в активному центрі кожного ферменту є залишок цистеїну, тому їхня назва походить від англ. caspase, де буква с відповідає цистеїну, *asp* – аспартату, а *ase* – суфікс у назві ферменту. У клітині каспази синтезуються у формі латентних попередників – прокаспаз.

За субстратною специфічністю каспази поділяються на ініціюючі (каспази -2, -8, -10, -12) та ефекторні (каспази -3, -6 і -7). Регулюються ініціюючі каспази білковими регуляторами, до яких належать про- і антиапоптозні білки родини Bcl-2. Субстратами ініціюючих каспаз є попередники ефекторних каспаз, а субстратами останніх – понад 60 різних білків, зокрема інгібітор ДНКази, яка відповідає за деградацію ДНК, білки репарації ДНК, у тому числі полі(АДФ-рибозо)полімераза (ПАРП), білки цитоскелета (ламіни, актин, фодрин, кератини і фермент гельдолін, що каталізує деполімеризацію актину), білки-регулятори клітинного поділу, антиапоптозні білки, білки міжклітинної сигналізації, ядерні фактори транскрипції та ін. Найбільша активність у розщепленні цих білків притаманна каспазі-3. При активації ініціюючих прокаспаз білками-адаптерами клітина ще може зберегтися, після активації каспази-3 клітина незворотно втрачає шляхи до виживання.

Активація прокаспаз (до каспаз) є результатом їхньої взаємодії з білками-адаптерами. У таких білок-білкових взаємодіях беруть участь спеціалізовані ділянки продоменів: DED (death effector domain – домен ефектора смерті), CARD (caspase recruitment domain – домен активації й залучення каспази), DID (death inducing domain – домен, що індукує смерть). Виявлені білки IAPs, які, гальмуючи відщеплення продомену ефекторної прокаспази (блокують їхню активність), запобігають апоптозу. Активація же каспаз полягає в протеолітичному відщепленні продомену, результатом чого є утворення тетрамера – активної форми каспази з двома каталітичними центрами (по одному центру в гетеродимері).

Відомо кілька шляхів реалізації апоптозної програми. Одним із них є передача сигналу через рецептори загибелі – зокрема через Fas-R (від fibroblast-associated antigen receptor – рецептор антигену, асоційованого з фібробластами). Це трансмембраний білок, що експресується в тканинах різних органів, найактивніше – у тимусі, печінці, серці й нирках. Ліганди Fas-рецептора переважно експресуються Т-кілерами і НК-клітинами. Через механізми Fas-залежного апоптозу Т-клітини убивають інфіковані клітини, а натуральні кілери – пухлинні клітини. Аналогічним способом деякі пухлинні клітини також експресують відповідні ліганди до

Fas-рецепторів, що дозволяє їм контратакувати цитотоксичні Т-лімфоцити і НК-клітини, викликати їхній апоптоз.

Другий шлях апоптозу бере початок від мітохондрій. Стрес, індукований цитотоксичними сполуками, дефіцит ростових факторів, активні форми кисню, порушення структури ДНК приводять до утворення гіантської пори в зовнішній мембрани мітохондрії (PTP – permeability transition pore – пора, яка спричиняє зміну проникності) діаметром близько 3 нм. Завдяки цьому мітохондріальний матрикс набухає, зовнішня мембрана мітохондрії розривається й із міжмембранного простору в цитоплазму виходять апоптозні фактори: цитохром с, проакаспази -2, -3, -9, білки AIF (apoptosis inducing factor – фактор, що індукує апоптоз), Diablo/Smac (second mitochondria-derived activator of caspases/Direct IAP binding protein with low pI – другий активатор каспаз, що походить із мітохондрій/білок-зв'язувач IAP) та HtrA2/Omi (від high temperature requirement – потреба у високій температурі), ендонуклеаза endoG. Цитохром с разом із фактором Apaf-1 (Apoptotic Protease Activating Factor-1 – фактор активації апоптозних протеаз-1) активує каспазу-9. Флавопротеїн AIF транслокується в ядро і активує ДНКазу, яка розриває ДНК на фрагменти довжиною 50 тис. пар нуклеотидів. Мітохондріальні білки Diablo/Smac та HtrA2/Omi викликають активацію каспази-3 і каспази-9, зв'язуючись із білками IAPs і знімаючи таким чином їхню інгібуючу дію на каспази.

Загальноприйнятим є положення, що окиснення харчових продуктів киснем (дихання) є основним механізмом енергозабезпечення організму. Проте, як і більшість біохімічних процесів, дихання є поліфункціональним, спричиняючи й інші ефекти. Одним із них є одно- чи двохелектронне відновлення кисню до супероксидного аніона – O_2^- чи пероксиду водню H_2O_2 . Тобто дихання є і механізмом утворення токсичних активних форм кисню (АФК). O_2^- і H_2O_2 є попередниками радикала гідроксилу (OH^{\cdot}), найсильнішого окиснювача, який руйнує будь-яку сполуку живої клітини, включаючи і ДНК.

Окисно-відновні потенціали переносників електронів початкових і середніх ланок дихального ланцюга часто досягають значень

Біохімічні механізми апоптозу

-300 мВ, що є близьким до значень аналогічного потенціалу пари O_2 / O_2^- . Це означає, що випадкова взаємодія таких переносників електронів з O_2 може привести до одноелектронного відновлення O_2 до O_2^- . Клітина намагається запобігти таким реакціям, а якщо вони відбулися, то не допустити утворення OH^{\cdot} . Тому у мітохондрії виробився глибоко ешелонований захист від АФК:

- поглинання O_2 цитохромоксидазою, яка переносить чотири електрони на O_2 з утворенням H_2O і цим підтримує безпечно низький рівень кисню;
- реокиснення O_2^- до O_2 окисненим цитохромом с міжмембраниого простору (куди він десорбується із внутрішньої мембрани);
- перетворення O_2^- (супероксид не проникає через мембрани через свій заряд) під впливом супероксиддисмутази матриксу на H_2O_2 , який легко дифундує через мембрани;
- утилізація H_2O_2 : глутатіонпероксидаза перекисом водню окиснює глутатіон, а каталаза каталізує реакцію $H_2O_2 \rightarrow H_2O + O_2$;
- видалення АФК токоферолом, аскорбатом та іншими антиоксидантами, які безпосередньо реагують із АФК.

Якщо ж концентрація АФК і після такого захисту зростає, клітина застосовує радикальніші заходи:

➤ через утворення пор високої проникності (РТР), що є результатом окиснення SH-групи Цис-56 у АТФ/АДФ-антиторті, матрикс мітохондрії набуває, зовнішня мембра на розривається й із міжмембраниого простору в цитозоль виходять білки, у тому числі цитохром с;

➤ цитохром с приводить до мобілізації таких процесів антиоксидантного захисту:

- ◆ видаляє O_2^- із цитозолю, перетворюючи на O_2 ;
- ◆ цитохром с окиснює цитохром b, який забезпечує перенесення електронів в обхід тих ділянок дихального ланцюга, де можливе утворення супероксиду.

Якщо ж і ці механізми не допомогли, і мітохондрія продовжує утворювати великі кількості АФК, то вона "самоліквідується", підтримуючи чистоту популяції мітохондрій у клітині. Причиною такої самоліквідації мітохондрії (мітоптозу) є тривале існування РТР

і повне зникнення трансмембранної різниці потенціалів ($\Delta\psi$). Тобто мітоптоз є останнім ешелоном оборони мітохондрій від АФК, який включається тільки тоді, коли всі лінії захисту вичерпались і виникає загроза геному.

Ураховуючи наведене вище, послідовність захисту організму від АФК, які генеруються мітохондріями, можна уявити так. АФК, які утворилися в мітохондріях, відкривають PTP і, як наслідок, спричиняють вихід у цитозоль цитохрому c , що негайно включає додаткові антиоксидантні механізми, а потім мітоптоз. Якщо в мітоптоз увійшла лише невелика частина популяції мітохондрій, то концентрація цитохрому c у інших мітохондріальних проапоптозних білків у цитозолі не досягає значень, необхідних для активації апоптозу. Якщо кількість мітохондрій, які продукують АФК, збільшується, розпочинається апоптоз клітини. У результаті організм "очищується" від клітин, мітохондрії яких утворюють занадто багато АФК.

Третій шлях апоптозу залежить від ендоплазматичного ретикулуму, в якому локалізована прокаспаза-12, що активується при порушенні Ca^{2+} -гомеостазу. Ця каспаза активує прокаспазу-3, яка і приводить у дію програму загибелі клітини. Серед субстратів каспази-3 є й білок-попередник β -амілоїду (останній накопичується в нейронах при хворобі Альцгеймера). Каспаза-3 руйнує білок-попередник з утворенням цитотоксичного білка β -амілоїду, який за механізмом зворотного зв'язку підсилює перетворення прокаспази-3 на каспазу-3, чим прискорює загибель нейронів.

Ще один шлях апоптозу включається гранзимом В цитотоксичних Т-лімфоцитів. Тобто Т-лімфоцити можуть спричиняти апоптоз інфікованих клітин не тільки через Fas-R. Т-клітини виділяють у зону контакту з клітиною-мішеню білки перфорини. Останні, полімеризуючись, утворюють у плазматичній мембрані клітини-мішенні канали, якими до клітин надходять гранзими (суміш протеолітичних ферментів Т-кілера), серед яких головним є гранзим В. Ця специфічна до залишків аспарагінової кислоти серинова протеаза перетворює прокаспазу-3 на зрілий фермент у 2-3 рази активніше, ніж ініціюючі каспази-8 і -10.

Важливим шляхом апоптозу є олігомеризація та автопроцесинг прокаспази-3 з формуванням відповідної каспази. Суть та-

кого шляху полягає в тому, що RGD(аргінін-гліцин-аспартат)-послідовності деяких прокаспаз (у тому числі прокаспази-3) за-безпечують таку конформацію профермента, за якої протеазна активність не може виявитися. Ці послідовності взаємодіють з послідовностями DDM (аспартат-аспартат-метіонін). Тому, коли низькомолекулярний RGD-пептид проникає в клітину, він вступає в конкурентні взаємовідносини з RGD-послідовностями прокаспази-3 і витісняє її із сфери взаємодії з DDM-послідовністю, що й є причиною наступної олігомеризації та аутопроцесингу прокаспази-3. Цей шлях знайшов застосування в медичній практиці: синтетичні RGD-пептиди як антитромбозні препарати є інгібіторами ангіогенезу (утворення нових кровоносних судин), що відкриває перспективи для лікування пухлин.

Особливою формою апоптозу є нуклеоптоз – утрата клітинного ядра. Цей шлях можна зрозуміти з біогенезу еритроцитів із стовбурових клітин кісткового мозку, що включає стадію "вищтовхування" ядра із клітини.

Іншим способом ініціації апоптозу клітин лейкоцитами є "бомбардування" клітини-мішені супероксидом, що утворюється зовні лейкоцита спеціальним трансмембраним дихальним ланцюгом плазматичної мембрани. Цей ланцюг окиснює внутрішньоклітинний НАДФН, з якого електрони переносяться на флавін і далі на особливий цитохром b , який і окиснюється киснем з виділенням O_2^- й інших АФК. Ці позаклітинні АФК окиснюють фосфатидилсерин плазматичної мембрани клітини-мішені. У нормі фосфатидилсерин локалізований у внутрішньому моношарі плазматичної мембрани, а його окиснення сприяє більш рівномірному розміщенню в мембрані. Зв'язування окисненого фосфатидилсерину клітини-мішені з рецепторами до фосфатидилсерину індукує апоптоз самої клітини і стимулює проапоптозну активність лейкоцитів, які "стежать" за появою цього фосфоліпіду зовні клітини-мішені.

Ще одним проапоптозним механізмом є секреція лейкоцитами фактора некрозу пухлин (TNF – tumor necrosis factor). Цей пептид зв'язується з рецептором на плазматичній мембрані клітини-мішені, що активує кілька паралельних шляхів запуску апоптозу. В одному з них із прокаспази-8 утворюється каспаза-8, яка розщеплює цито-

зольний білок tBid (t – truncated – укорочений). Цей білок змінює конформацію іншого цитозольного білка Bax, який тепер може утворювати канали в зовнішній мембрані мітохондрій таких розмірів, що білки міжмембраниого простору, у тому числі й цитохром с, вільно виходять у цитозоль. Крім TNF, активують апоптоз і цитокіни, що діють кожний через свій власний рецептор.

У плані описаних проапоптозних шляхів важливим є існування антиапоптозних систем. Серед них добре вивчено антиапоптозні білки родини Bcl-2, які гальмують проапоптозну активність білків Bax (зв'язуючись з Bax у гетеродимери, інгібують каналоутворювальну функцію), інгібітори каспаз IAPs, білок NF-кВ (nuclear factor карпа В), що включає експресію групи генів, серед яких є ті, які кодують супероксиддисмутазу й інші антиоксидантні і антиапоптозні протеїни. Деякі білки одночасно "наглядають" і за апоптозом, і за поділом клітини. Тобто системи регуляції клітинного поділу і клітинної смерті тісно взаємодіють між собою, що має важливі біологічні значення. Одне з них полягає в тому, що апоптоз є природною профілактикою ракових новоутворень. Є спеціальні гени – антионкогени, серед яких важливе значення має ген, що кодує білок p53 (протеїн 53 кДа). Цей білок "наглядає" і за роботою генів, які здатні викликати несвоєчасний поділ клітини, і за неполадками в ДНК. У випадку необхідності p53 зсуває рівновагу на користь апоптозу і потенційно небезпечна клітина гине. Тобто, контролюючи появу розривів ДНК, p53 активує гени репарації ДНК, а якщо цього мало, блокує синтез білків клітинного поділу і включає програму апоптозу, якщо кількість пошкоджень ДНК перевищує критичний поріг. Якщо ж мутує сам p53, що часто спостерігається в клітинах пухлин, то система регуляції клітинного поділу залишається без належного нагляду, клітина безперервно ділиться і виникає пухлина. Якщо ж p53 залишається " нормальним", то апоптоз різко знижує частоту ракових захворювань. Порушення рівноваги між поділом і загибеллю клітин лежить в основі й інших (не пухлинних) захворювань. При СНІДі, наприклад, зменшується кількість лімфоцитів, що відіграють важливу роль в імунних процесах, що обумовлено їхньою апоптозною загибеллю. При дегенеративних розладах також порушується функція апоптозної програми. Такі складні системи підкреслюють

ті обставини, що для клітини рішення про самогубство є крайньою мірою, коли всі можливості виправити її помилкові дії вичерпані.

Крім пошкоджень ядерної ДНК (найбільш трагічного явища для будь-якої еукаріотичної клітини), причиною апоптозу є і денатурація клітинних білків. Відомо, що білок теплового шоку hsp 70 (heat shock protein, 70 кДа) бере участь у ренатурації таких білків. При цьому утворюється комплекс "денатураний білок – hsp 70", що приводить до зниження концентрації вільного hsp 70. Це активує апоптоз. Така активування обумовлена тим, що зв'язування hsp 70 з Araf-1 блокує запуск апоптозу цитохромом с. Тому денатурація білків цитозолю активує апоптоз через зниження концентрації вільного hsp 70 і, як наслідок, зняття блокади апоптозного шляху, який потребує Araf-1.

Таким чином, клітина стає на шлях апоптозу, якщо щось трапилося із: а) ДНК (активується проапоптозний білок p53); б) білками (знижується концентрація антиапоптозного білка hsp 70); в) ліпідами (фосфатидилсерин з'являється в зовнішньому моноліні ліпідів плазматичної мембрани). У будь-якому із цих випадків реалізується один із механізмів апоптозу, головним з яких є сигнал до самогубства → мітогтоз → апоптоз.

Зрозуміло, що масовий апоптоз клітин будь-якого органа призведе до ліквідації цього органа (органоптоз). Так, наприклад, тироксин може включати ланцюг таких процесів: тироксин → індукція NO-сінтази → ↑ [NO] → інактивація каталази і глутатіонпероксидази → ↑ [H₂O₂] → апоптоз → органоптоз. Крім таких процесів, NO може викликати апоптоз, реагуючи з O₂⁻ з утворенням пероксинітрату (ONOO⁻) – дуже агресивної форми АФК. Можна припустити, що окисники у випадках H₂O₂ і NO діють як медіатори апоптозу не тільки в клітині, в якій вони утворились, але й у клітинах-сусідах. Це важливо для явищ запрограмованої смерті на надклітинному рівні. H₂O₂ і NO є невеликими молекулами і легко проникають через мембрани, що може призвести до елімінації цілих ділянок, заражених, наприклад, вірусом. У результаті навколо інфікованої клітини виникає "мертва зона", що перешкоджає поширенню інфекції.

Інтенсивний органоптоз важливих органів може привести і до загибелі організму – феноптозу. Виходячи із суті явища феноптозу, можна уявити ситуацію, коли альтруїстична смерть індивіда принесе користь групі організмів, які продовжують свій життєвий шлях. Подібна групова адаптація могла б сприяти пристосуванню популяції до умов довкілля, які постійно змінюються. Тоді в межах запрограмованої смерті ланцюг явищ можна розглядати так: сигнал до самогубства → мітоптоз → апоптоз → органоптоз → феноптоз. А феноптоз можна визначити як спосіб "очистки" спільноти організмів від індивідів, які наносять шкоду, шляхом включення ними програми власної загибелі.

Одним із прикладів феноптозу є септичний шок. Ендотоксин як причина сепсису є ліпполісахаридом, який утворює зовнішній шар клітинної стінки грам-негативних бактерій. Ліпполісахарид зв'язується рецепторами плазматичної мембрани макрофагів, що ініціює масовий синтез і секрецію ними фактора некрозу пухлин та інших цитокінів – індуktorів апоптозу. Тобто ліпполісахаридний сигнал "повідомляє" організму про появу в крові й тканинах грам-негативних бактерій – потенційно небезпечного класу мікроорганізмів. Якщо ліпполісахаридний сигнал малий, до зараженої ділянки мігрують лейкоцити і, виділяючи TNF й інші цитокіни, "посилають" в апоптоз клітини інфікованих ділянок.

Явища, які приводять до мітоптозу, апоптозу, органоптозу і феноптозу, вивчаються на різних рівнях організації життя – від органоїдів еукаріотичних клітин і бактерій до тварин і рослин. Прикладом феноптозу у людей може бути запрограмована смерть хворих від бактеріальних токсинів. Проте наших знань ще недостатньо, щоб зробити вибір між двома концепціями старіння: смерть як результат накопичення випадкових помилок і смерть як включення запрограмованого самовбивства (ідея сформована ще А. Вейсманом більше сторіччя тому). Ці дві концепції розглядаються поки що як альтернативні. Проте сьогодні формується думка, що ці протилежні погляди є взаємодоповнювальними: накопичення поломок запускає програму феноптозу задовго до того, коли ці поломки самі стануть несумісними з життям. Тобто орга-

нізм, який "помітив" істотні відхилення у функціонуванні найважливіших систем, переходить на шлях біохімічної самоліквідації.

У той же час концепція феноптозу має перевагу над алтернативною точкою зору, яку підтримують переважна кількість геронтологів і деякі біохіміки. Вона може забезпечити подовження активного життя людини, якщо зсунути в область значних вікових термінів момент запуску старіння. Для цього потрібно або виключити сигнали, які викликають старіння, або зламати механізми їхньої реалізації. Такі цілі стануть реальними, коли ми узнаємо природу сигналів і механізмів, про які йдеться. Що ж до традиційної концепції поломок, то вона не має майбутнього, оскільки, виправивши сьогодні одну поломку, завтра ми зустрінемося з іншою, яку треба також виправляти... Без системи за-програмованої клітинної загибелі ми з Вами не могли б народитися такими, якими ми є.

Професор В. К. Рибальченко.

ВСТУП

В останні десятиріччя з'ясуванню механізмів загибелі клітин присвячено численні дослідження, за результатами яких опубліковано десятки тисяч наукових праць. А ще півстоліття тому будь-яку втрату клітин відносили до некрозу, спричиненого випадковим ушкодженням екзо- тичного або ендогенними факторами, що сприяло формуванню поглядів на загибель клітин як на патологічний процес. Разом з тим подібні теорії не пояснювали елімінації окремих клітин за відсутності ушкоджень, зокрема під час ембріогенезу, морфогенезу, диференціації лімфоїдних клітин.

Першу думку щодо існування певної "програми" загибелі клітин під час розвитку безхребетних у 1964 р. висловили Р. Локшин та К. Ульямс. Термін *програмована загибель клітин* (який ще кілька років тому часто застосовувався в науковій літературі як синонім терміну *апоптоз*) був запропонований в 1966 р. М. Тадою при дослідженні процесів метаморфозу в амфібії; у цьому ж році Дж. Саундерс виявив, що при ембріогенезі загибель клітин більш схожа на суїцид, ніж на некротичне видалення ушкоджених клітин.

Відкриття апоптозу пов'язують з іменами Дж. Керра, А. Віллі, А. Цурріє. З'ясовуючи наслідки перев'язки гілок ворітної вени, які прямують до печінки, через кілька годин після накладання лігатури дослідники виявили, що гепатоцити навколо центральної вени (перивенозні гепатоцити) гинули шляхом некрозу. Це не було дивним, адже кров у печінку надходить по ворітній вені й печінковій артерії, тоді як через центральну вену кров рухається від печінки, і тому навіть у контрольній печінці перивенозні ге-

патоцити мають найгірше кровопостачання. Перипортальні гепатоцити, розташовані ближче до порталової тріади (ворітна вена, печінкова артерія, жовчна протока), у ці терміни некрозу не підлягали, оскільки вони, як і в нормі, додатково отримували кров від печінкової артерії. Проте через кілька днів ці клітини ущільнилися, ядро стало пікнотичним ("зморщений некроз"). Далі вони розпалися на дрібні щільні тільця. Такі спостереження дозволили Дж. Керру зі співавторами заявити про виявлення ними нового типу загибелі клітин, який відрізняється від некрозу в сусідніх ділянках печінки не лише за своїми ознаками, а й за відсутністю запальної реакції. Цей новий вид клітинної смерті було названо його відкривачами *апоптозом* (неологізм, утворений від грец.: *apo* – відділення і *ptosis* – падіння, який відповідає українському слову *листопад*). Цікаво, що термін *апоптоз*, звичайно у відмінному від теперішнього значенні, вживали ще понад 2 тис. років тому в медицині й філософії Давньої Греції й Риму, зокрема Гіппократ (460–370 рр. до н.е.) – для опису відторгнення некротизованих ділянок кістки, а Гален (129–201 рр. до н.е.) – щодо процесів запалення і загоєння ран, зауваження струпа.

Сьогодні апоптоз визначають як АТФ-залежний генетично врегульований процес видалення клітин, із власними механізмами, що залишають плазматичну мембрани, ядро, мітохондрії, ендоплазматичний ретикулум, апарат Гольджі, лізосоми, цитоплазму. При цьому не ушкоджуються сусідні клітини і не розвивається запальна реакція. Спричинити апоптоз можуть як фізіологічні, так і низка патологічних факторів. Відповідно, апоптозу підлягають в організмі як нормальні, неушкоджені клітини (напр., під час ембріогенезу), так і патологічно змінені, присутність яких створює певну небезпеку для організму.

Першими дослідниками механізмів апоптозу стали його відкривачі. У 1980 р. А. Віллі зі співавторами показали, що однією з головних ознак апоптозу є олігонуклеосомна фрагментація ДНК (пізніше це явище стане основою для одного з методів виявлення апоптозних клітин), а в 1987 р. сформулювали чотири основні стадії апоптозу.

У 1986–1988 рр. у клітинах фолікулярної лімфоми було відкрито білок *Bcl-2* та його інгібуючу дію на апоптоз (Д. Ваукс та ін.). В-клітини, трансфектовані геном *bcl-2*, ставали резистентними до апоптозу, що дозволило авторам винаходу заявити про існування прямого зв'язку між апоптозом і злоякісним переродженням клітин. У 1990 р. С. Корсмейєр і Д. Хоскенбері з колегами охарактеризували нормальній *bcl-2* як ген "браку сүїциду" – оськільки він експресує білок, що блокує апоптоз. Протягом 90-х рр. було показано, що експресія *bcl-2* зростає не лише при В-клітинній лімфомі/лейкемії, а й при інших онкологічних захворюваннях, включаючи рак товстого кишечнику й простати, нейробластому, а також при деяких інших (непухлинних) розладах. Крім того, з'ясувалася причетність надекспресії гена *bcl-2* до формування резистентності до хемотерапевтичних ліків. У той же час світло на механізм дії антиапоптозних білків родини *Bcl-2* було пролито лише в 1997 р.

Перший проапоптозний білок цієї родини (Вах) ідентифікували також на початку 90-х рр. (С. Корсмейєр та ін., 1993).

У 1989 р. було виявлено існування Fas-рецептора. Його назва походить від назви антигену, що спричиняє загибель фібробластів (відкриття зробили дві незалежні групи дослідників під керівництвом С. Йонехара та Б. Траута). Надалі цей білок був клонований та ідентифікований як член родини TNF-рецепторів (1991–1992 рр., Н. Айтох та А. Еуехм). Тоді ж Р. Уатанабе-Фукунага з колегами виявили, що миші з лімфопроліферативними автоімунними зрушеннями характеризуються мутаціями Fas-R-залежного апоптозу. Наступного року (1993) установлено наявність домену загибелі (DD), завдяки якому здійснюються білок-білкові взаємодії з іншими проапоптозними білками у структурах TNF-R (рецептора фактора некрозу пухлин – Л. Тартаглі, Г. Уонг) та Fas-рецептора (Н. Айтох, С. Нагата). Трохи пізніше (1998) К. Скаффіді з колегами показали існування двох шляхів Fas-R-залежного апоптозу, один з яких залучає мітохондріальні події.

Із 1991 р. у фокус дослідників апоптозу потрапляє і транскрипційний фактор, супресор пухлин p53. Розвиток уявлень про функції білка p53 проходив кілька етапів:

1979 р. – p53 – пухлинний антиген;
1984 р. – p53 – онкоген;
1989 р. – p53 – пухлинний супресор;
1992 р. – p53 – "вартовий" геному;
1993 р. – запропоновано роль білка p53 в регуляції апоптозу;
1994 р. – p53 – регулятор транскрипції низки генів, у тому числі генів контролю клітинного циклу й життєздатності клітин.

Уперше ядерний ДНК-зв'язуючий білок p53 був ідентифікований в 1979 р. (Д. Лейн, Л. Крауфорд). У 1982 р. було клоновано кДНК і визначено первинну послідовність гена p53 миші (П. Чумаков, 1982, М. Орен, 1983, Д. Пенніка, 1984). Використовуючи як зонд кДНК p53 миші, у 1984 р. клонували ген p53 людини і пізніше визначили його первинну структуру (Е. Харлоу та ін., 1985, Р. Закут-Хеурі та ін., 1985, В. Бухман та ін., 1987).

Великий прорив у вивченні механізмів апоптозу було зроблено в кінці 80-х – на початку 90-х рр. завдяки дослідженням на нематоді *Caenorhabditis elegans* (Х. Хорвітц, С. Бреннер, Дж. Салстон), тіло якої складається із 959 клітин. Ними було вивчено весь процес розвитку цієї істоти – від заплідненої яйцеклітини до дорослої нематоди, установлено факт загибелі частини клітин шляхом апоптозу та ідентифіковано гени, що відповідають за окремі етапи онтогенезу. Зокрема, Дж. Салстон ідентифікував перший ген клітинного самогубства – *nuc-1* (від *nucleus* – ядро), необхідний для деградації ДНК у клітині, що встала на шлях апоптозу. Х. Хорвітц відкрив гени *ced-3* та *ced-4* (від *cell death* – клітинна загибель), також причетні до реалізації клітинного самогубства. Він же пізніше описав ген *ced-9*, що запобігає передчасному апоптозу клітини, а також установив існування гомологічних генів у вищих тварин і людини.

7 жовтня 2002 р. ці вчені стали лауреатами Нобелівської премії в галузі фізіології й медицини.

У 1992 р. Д. Баукс і С. Кім показали існування гомології в генах і відповідних білках нематоди й ссавців, установивши, що ген *bcl-2* людини може інгібувати апоптоз у клітинах черв'яка, що свідчило про апоптоз як еволюційно консервативний процес.

Пізніше поширеними і корисними моделями для досліджень механізмів апоптозу стали дріжджі, дрозофіла та "нокаутовані" миші (knockout mouse).

Після відкриття в 1993 р. першої каспази (С. Шахам, ICE/каспаза-1) розпочався новий період у вивченні цього типу клітинної смерті. Було виявлено її гомологію Ced-3 *C. elegans*, ідентифіковано інших представників родини каспаз. Завдяки роботам П. Уалкера (1994), К. Уїлсона (1994), Дж. Ротонди (1996) стають зрозумілішими механізми активації каспаз. У 1995 р. показано застосування каспаз до Fas-L-індукованого апоптозу, у 1996–1997 рр. – існування адаптерних білків, які за рахунок білок-білкових взаємодій опосередковують активацію каспаз при індукції Fas-R-залежного шляху. У ці ж роки продовжують інтенсивно досліджуватися механізми активації каспаз (Х. Уанг, І. Йошида, К. Куйда), функціонування їхніх інгібіторів (Д. Ніколсон, Н. Тхорнбері). Було також отримано важливі результати щодо існування та ролі в процесах апоптозу інших членів родини Bcl-2, зокрема Bid (Х. Люо, 1998), а з 1994–1996 рр. ще й розпочато дослідження мітохондріальних подій апоптозу (С. Фесік, Г. Кроемер). Так, у 1997 р. був ідентифікований білок Araf-1 і відкрито механізми утворення апоптосоми (П. Лі та ін.), у 1999 р. – AIF, його міграція до ядра і взаємодія з ДНК, що запускає деструкцію генетичного матеріалу і загибель клітин (С. Сасін та ін.), у 2000 р. – Smac/Diablo (А. Верхаген та ін.), а невдовзі й ще два білки – ендонуклеаза EndoG (Л. Лі з колегами, 2001) і білок Htr/Omi (А. Верхаген та ін., 2002).

У 1999 р. Е. Слі зі співробітниками встановили існування "каскаду каспаз" і систематизували відомі на той час каспази щодо їхньої ролі в апоптозі, зокрема, застосувавши терміни *ініціаторні* та *екзекуційні* каспази.

Про зацікавленість цим напрямом досліджень перш за все свідчить велика кількість наукових праць, яких з кожним роком стає все більше. Так, за даними Medline, у 1993 р. цій темі було присвячено всього 667 робіт, 1995 р. – 1200, 1997 р. – 3000, 1998 р. – 7457, а на 2000-й рік – 13000. І початок ХХІ ст. не змінює цієї тенденції – на вересень 2008 р. нараховується близько 145000 публікацій щодо механізмів апоптозу, з яких 13000 при-

падає на 2008-й р., а майже 75000 – на останні п'ять років. Саме із 2000-го р. дослідники приділяють усе більше уваги участі в реалізації апоптозної програми МАР-кіназ, похідних сфінтомієліну, а також механізмам, які визначають, на який шлях стане клітина після дії проапоптозних стимулів, більшість з яких може також спричиняти некротичне ушкодження клітин або їхню неконтрольовану проліферацію. Для з'ясування останньої проблеми особливо важливим стало вивчення ролі NO, активних форм кисню, процесів перекисного окиснення ліпідів, рівня енергозабезпечення клітин у механізмах апоптозу. Останніми роками з'явилася багато публікацій щодо участі в процесах апоптозу поряд із плазматичною мембраною, ядром і мітохондріями й інших органел – ендоплазматичного ретикулуму, апарату Гольджі, лісосом, а також праць, присвячених термінальним подіям апоптозу, а саме розпізнанню апоптозних клітин фагоцитами й сусідніми клітинами та їхньому безпосередньому фагоцитозу.

Тим часом стає все більше свідчень того, що механізми апоптозу залишаються до патогенезу широкого кола захворювань. Сред таких патологій – онкологічні, лімфопроліферативні, автоімунні, серцево-судинні, гастроентерологічні, алергійні, інфекційні захворювання, нейродегенеративні розлади, СНІД, цукровий діабет та його ускладнення, патології нирок, опорно-рухового апарату, легень, порушення внутрішньоутробного розвитку тощо. Таким чином, крім суто наукової, теоретичної зацікавленості дослідників, на новітні відкриття в цій галузі чекають лікарі-онкологи, невропатологи, кардіологи, інфекціоністи та інші фахівці в галузі медицини, а разом з ними і все людство, сподіваючись з їхньою допомогою поповнити свої знання щодо причин виникнення, розробки нових досконаліших методів ранньої діагностики і терапії цих захворювань. Крім того, з розвитком учення про механізми апоптозу є можливість з'ясувати причини і механізми старіння організму, адже останнім часом з'являється все більше свідчень того, що цей стан тісно пов'язаний з дисбалансом механізмів регуляції апоптозу, причому більшість патологій, про які йшлося вище, уперше найчастіше проявляються саме в похилому віці, що непрямо підкреслює цей зв'язок.

СПИСОК СКОРОЧЕНЬ ТА АБРЕВІАТУР ІЗ ПЕРЕКЛАДОМ

Таблиця умовних скорочень (україномовні терміни)

АКТГ	Адренокортикотропний гормон
АЛПС	Автоімунний лімфопроліферативний синдром
АФК	Активні форми кисню
ВІЛ	Вірус імунодефіциту людини
ДАГ	Діацилгліцерол
ЕПР	Ендоплазматичний ретикулум
КГМ	Кора головного мозку
кп.о.	Кілопари основ (= тисячі пар основ)
ЛПНГ	Ліпопротеїни низької густини
ЛПС	Ліпополісахарид
oЛПНГ	Оксиснені ліпопротеїни низької густини
ПМ	Плазматична мембрана
ПкВ	Протеїнкіназа В
ПкС	Протеїнкіназа С
ПкG	Протеїнкіназа G
п.о.	Пари основ
ПОЛ	Перекисне окиснення ліпідів
СЕМ	Сканувальна електронна мікроскопія
СМА	Спінальна м'язова атрофія
СНІД	Синдром набутого імунодефіциту людини
СОД	Супероксиддисмутаза
ТЕМ	Трансмісійна електронна мікроскопія
УФ	Ультрафіолетове випромінювання
ЦНС	Центральна нервова система
ШКТ	Шлунково-кишковий тракт

Біохімічні механізми апоптозу

Таблиця умовних скорочень (англомовні терміни)*

Термін	Розшифровка	Переклад	Примітки
$\Delta \Psi_m$	—	—	Зміна електрохімічного потенціалу внутрішньої мембрани мітохондрії
Aβ	β -amiloid	β -амілоїд	—
AIF	Apoptosis inducing factor	Фактор, що індукує апоптоз	Мітохондріальний проапоптозний білок, задучається до фрагментації ДНК в ядрі
ANT	Adenine nucleotide translocator	Переносник аденинового нуклеотиду	Компонент пори РТР
ApaF	Apoptotic Protease Activating Factor-1	Фактор активації апоптозних протеаз-1	Мітохондріальний білок, задучений до утворення апоптосоми
APP	Amiloid precursor protein	Білок-попередник амілоїду	Попередник бета-амілоїду
aSMase	Acid sphingomyelinase	Кисла сфінгомієліназа	—
ATM	Ataxia-telangiectasia mutated protein	Білок, мутований за атаксії-телангіестазії	Активатор білка p53
ATR	ATM related	ATM-подібний	Активатор білка p53
Bax	Bcl-2 associated X-protein	Bcl-2 асоційований Х-білок	Проапоптозний білок родини Bcl-2
Bcl-2	Від "B-cell lymphoma/leukemia"	Від "В-клітинна лімфома/лейкемія"	Білок, надекспресію якого вперше виявлено за цього стану
BDNF	Brain derived neurotrophic factor	Нейротрофічний фактор, що утворюється в мозку	Нейротрофічний фактор мозку

* Надалі за текстом, коли йдеться про ген, то його назва пишеться курсивом і з маленької літери (напр., *bcl-2*); у випадку відповідного білка – звичайним шрифтом з великої букви (Bcl-2).

Список скорочень та абревіатур із перекладом

Продовження табл.

Термін	Розшифровка	Переклад	Примітки
BH	Bcl-2 homolog	Bcl-2-гомолог	Гомологічні α -спіральні домени білків родини Bcl-2
Bid	BH3-interacting domain death agonist	Агоніст домену загибелі, що взаємодіє з BH3	Проапоптозний білок – член родини Bcl-2, залучений до передачі апоптозного сигналу через рецептори загибелі, каспазу-8 і мітохондрію
BIR	Baculovirus IAP repeat	IAP-повтори бакуловірусу	Послідовності із 70 амінокислот, що повторюються і забезпечують антиапоптозні властивості IAPs; гомологічні послідовності є в бакуловірусі
CAD	Caspase-activated DNase	DНКаза, що активується каспазою	Утворюється при розщепленні каспазою DFF
Cag-A	Від "cytotoxine associated"	Від "цитотоксин-ассоційований"	Білок, що продукується Helicobacter pylory
CAPK	Ceramide-activated protein kinase	Протеїнкіназа, що активується церамідом	–
CARD	Caspase activation and recruitment domain	Домен активації й залучення каспази	Ділянка, що міститься в деяких адаптерних білках і деяких каспазах
caspases	Cysteine-dependent aspartate-specific proteases	Цистеїнзалежні аспартат-специфічні протеази	Каспази
Cdk	Cycline dependent kinase	Циклінзалежна кіназа	Бере участь у регуляції клітинного циклу

Біохімічні механізми апоптозу

Продовження табл.

Термін	Розшифровка	Переклад	Примітки
Ced	Cell death	Загибель клітини	Гени <i>C. elegans</i>
Chk	Checkpoint kinase	Чекпойнт-кіназа	Кіназа, дія якої залежить від пошкодження ДНК
Crm-A	Cytokine response modifier A	Модифікатор цитокінової відповіді-А	Продукт гена вірусу коров'ячої віспи
DAG	Diacylglycerol	Діацилгліцерол	–
Daxx	Від "death domain-associated"	Від "асоційований з доменом загибелі"	Адаптерний білок
DD	Death domain	Домен загибелі	Ділянка у рецепторів загибелі та адапторних молекул
DED	Death effector domain	Ефекторний домен загибелі	Ділянка у адаптерних молекул і прокаспази-8
DEDD	Від "death effector domain"	Від "ефекторний домен загибелі"	Адаптерний білок, що містить ефекторний домен загибелі
DFF	DNA fragmentation factor	Фактор фрагментації ДНК	–
DR	Death receptor	Рецептор загибелі	–
DISK	Death-inducing signaling complex	Сигнальний комплекс, який включає загибель	Містить: рецептор загибелі; молекули адапторних білків; прокаспазу 8
EGF-R	Epidermal growth factor receptor	Рецептор епідермального фактора росту	–
egl-1	Egg-laying defective	Дефективна кладка яєць	Проапоптозний білок <i>C. elegans</i>
endo-G	Endonuclease G	Ендонуклеаза G	Мітохондріальний проапоптозний білок

Список скорочень та абревіатур із перекладом

Продовження табл.

Термін	Розшифровка	Переклад	Примітки
env	Envelope glycoprotein	Глікопротеїн оболонки	Структурний ген ВІЛ, що кодує глікопротеїни оболонки
erb-B	Від "erythroblastome"	Онкоген вірусу еритробластоми птахів	—
ERK	Extracellular signal regulated kinase	Кіназа, що регулюється позаклітинними сигналами	Родина МАРК
FADD	Fas-assosiated death domain protein	DD-вмісний білок, асоційований з рецептором Fas	Адаптерний білок
Fas-R	Fibroblast-assosiated antigene receptor	Рецептор фібробласт-асоційованого антигену	Рецептор, названий за антигеном, який викликає клітинну загибель
Fas-L	Fibroblast assosiated antigene	Фібробласт-асоційований антиген	Ліганд, названий за антигеном, який викликає клітинну загибель
FITC	Fluoresceine isothiocyanate	Флуоресцеїн-ізотіоцианат	Цією сполукою мітиться анексин-V для візуалізації фосфатидилсерину в зовнішньому шарі ПМ
FLICE	FADD-like interleukin-1 β -converting enzyme	FADD-подібний фермент, залучений до переворення інтерлейкіну-1 β	Синонім: каспаза-8
FLIP	FLICE-like inhibitory protein	FLICE-подібний інгібуючий білок	Білок-інгібітор, за будовою подібний до каспази-8, що унеможливлює проведення апоптозного сигналу

Біохімічні механізми апоптозу

Продовження табл.

Термін	Розшифровка	Переклад	Примітки
gag	Group-specific antigens	Групоспецифічні антигени	Структурний ген ВІЛ, що кодує внутрішні білки
G-CSF	granulocyte colony-stimulating factor	Колоніестимулювальний фактор гранулоцитів	–
gld-миши	Від "generalized lymphoproliferative disease"	Від "генералізований лімфопроліферативний розлад"	Модель АЛПС з мутаціями у гені, що кодує Fas-L
GM-CSF	Granulocyte /Macrophage colony stimulating factor	Гранулоцитарно-макрофагальний колоніестимулювальний фактор	–
gp	Glycoprotein	Глікопротеїн	–
HGF	Hepatocyte growth factor	Фактор росту гепатоцитів	–
HIP	Huntingtin interacting protein	Гентінгтін-взаємодіючий білок	Білок, зачленений до патогенезу хвороби Паркінсона
HIV	Human immunodeficiency virus	ВІЛ (вірус імунодефіциту людини)	–
 Hoechst	–	Хекст	Флуоресцентний барвник
 Hp	Helicobacter pylori	–	–
Htr/Omi	Від "high-temperature requirement"	Від "потреба у високій температурі"	Мітохондріальний проапоптозний білок; є гомологом бактеріальної ендопротеази HtrA
IAPs	Inhibitors of apoptotic proteases	Інгібітори апоптозних протеаз	Інгібітори каспаз

Список скорочень та абревіатур із перекладом

Продовження табл.

Термін	Розшифровка	Переклад	Примітки
ICAD		Інгібітор CAD	Складова частина DFF
ICE	Interleukin-1 β -converting enzyme	Фермент, залучений до переворення IL-1 β	Синонім: каспаза-1
IgE	Immuno-globulin E	Імуноглобулін Е	–
IgG	Immuno-globulin G	Імуноглобулін G	–
IgM	Immuno-globulin M	Імуноглобулін М	–
IkB	Inhibitor of NF-kB	Інгібітор NF-kB	–
IKK	IkB-kinase	IkB-кіназа	Кіназа, що здійснює фосфорилювання IkB, яке сприяє активації NF-kB
IL	Interleukin	Інтерлейкін	–
ISEL	In situ end labeling	In situ мітка кінця	Метод виявлення апоптозних клітин
KGF	Keratinocyte growth factor	Фактор росту кератиноцитів	–
knockout mouse	–	"Нокаутовані" мищі	Миші, дефіцитні за певним геном
JNK/SAPK	c-Jun N-terminal kinase/Stress activated protein kinase	Протеїнкіназа, що активується за умов клітинного стресу	Родина MAPK
lpr-миші	Від "lymphoproliferative"	Від "лімфопроліферативний"	Модель АЛПС з мутаціями в гені, що кодує Fas-R
LPS	Lipopoly-sacharide	Ліппополісахарид	–
LTR	Long terminal repeat	Довгий кінцевий повтор	Міститься на кінцях молекули РНК ВІЛ

Біохімічні механізми апоптозу

Продовження табл.

Термін	Розшифровка	Переклад	Примітки
MAPK	Mitogen activated protein kinases	Протеїнкінази, що активуються мітогенами	Група серин- треонінових протеїнкіназ, що передають сигнал від позаклітинних стимулів- мітогенів усередину клітини
MAPKAP	Mitogen activated protein kinase activated protein	Білок, що активується MAPK	Одна із мішеней MAPK
MAPKK	Mitogen activated protein kinase kinase	Кіназа протеїнкінази, що активується мітогенами	-
MAPKKK	Mitogen activated protein kinase kinase kinase	Кіназа кінази протеїнкінази, що активується мітогенами	-
MCP-1	Monocyte chemoattractant protein-1	Білок хемотаксису моноцитів	Його експресія зростає в апоптозних клітинах; відповідає за міграцію фагоцитів
M-CSF	Macrophage colony-stimulating factor	Колоніестимулювальний фактор росту макрофагів	-
Mdm2	Murine double minute 2	-	Білок-інактиватор білка p53
MFG-E8	Від "milk fat globule"	Від "жирова глобула молока"	Фактор росту епідермальних клітин із жиро- вих глобул молока
MPT	Mitochondrial permeability transition	Зміна мітохондріальної проникності	Зміна проникності вну- трішньої мітохондріа- льної мембрани
myc	Від "oncogene of the MC29 avian <u>myelo-</u> cytomatosis virus"	Від "онкоген вірусу мієлоцитоматозу птахів"	Онкоген віrusу лейкозу птахів чи пухлин людини і тварин

Список скорочень та абревіатур із перекладом

Продовження табл.

Термін	Розшифровка	Переклад	Примітки
NAIP	Neuronal apoptosis-inhibitor protein	Білок нейронів, здатний інгібувати апоптоз	Ген, що включається в патогенез СМА
Nef	Negative expression factor	Фактор негативної експресії	Регуляторний ген ВІЛ
NF-кВ	Nuclear factor-кВ	Ядерний фактор-кВ	Транскрипційний фактор
NGF	Nerve growth factor	Фактор росту нервів	—
NIK	NF-kappaB-inducing kinase	Кіназа, що індукує NF-кВ	—
NOS	NO-syntase	НО-сінтаза	—
NT3	Від "neuro-tropic"	Від "нейротропний"	Один із нейротропних факторів
nuk-1	Від "nuclease"	Від "нуклеаза"	Ген <i>C. elegans</i>
p53	Protein, 53 кДа	Білок, 53 кДа	Проапоптозний білок, супресор пухлин, транскрипційний фактор
PARP	Poly-(ADP-ribose)-polymerase	Полі-(АДФ-рибозо)-полімераза	—
PDGF	Platelet-derived growth factor	Фактор росту тромбоцитів	Протоонкоген
PDK-1	3-Phosphoinositide-dependent protein kinase 1	3'-фосфоінозитид-залежна протеїнкіназа-1	—
PI	Propidium iodide	Пропідіум іодид	Флуоресцентний барвник
PIDD	p53-induced protein with death domain	Білок з доменом смерті, який індукується протеїном p53	Адаптерний білок

Продовження табл.

Термін	Розшифровка	Переклад	Примітки
R13K	Phosphatidylinositol-3'-kinase	Фосфатидилінозитол-3'-кіназа	–
PkC	Proteinkinase C	Протеїнкіназа С	–
pol	Від "polymerase"	Від "полімераза"	Структурний ген ВІЛ, що кодує зворотну транскриптазу, інтергазу, протеазу
PS	Phosphatidyl-serine	Фосфатидилсерин	–
PTP	Permeability transition pore	Пора зміни проникності	Механізм, за яким здійснюється МРТ
RAIDD	RIP-associated ICE-1/CED-3-homologous protein with death domain	RIP-асоційований ICE-1/CED-3-гомологічний білок з доменом смерті	Адаптерний білок
Rb	Від "retinoblastoma"	Від "ретиноblastома"	Антионкоген
rev	Regulator of virus gene expression	Регулятор експресії вірусних генів	Регуляторний ген ВІЛ
RING	Really interesting new gene	Дійсно цікавий новий ген	Ген, що кодує відповідну ділянку деяких білків родини IAPs. Він надає цим білкам Е3-убіквітин-лігазної активності
RIP	Receptor interacting protein	Білок, що взаємодіє із рецептором	Адаптерний білок
ROS	Reactive oxygene species	Реактивні частки кисню	Активні форми кисню (АФК)

Список скорочень та абревіатур із перекладом

Продовження табл.

Термін	Розшифровка	Переклад	Примітки
sAPP	Soluble APP	Розчинний APP	–
SDK-1	Sphingosine-dependent kinase	Сфінгозинзалежна кіназа	–
sFas-R	Soluble Fas-R	Розчинний рецептор Fas	–
sFas-L	Soluble Fas-L	Розчинний ліганд Fas	–
SIDS	Sudden infant death syndrom	Синдром раптової дитячої смерті	–
Smac / Diablo	Second mitochondria-derived activator of caspases/direct IAP binding proprotein	Другий активатор каспаз, що продукується мітохондріями/прямий білок-зв'язувач IAP	Мітохондріальний проапоптозний білок
SMN	Від "survival motor neuron"	Білок, що кодується геном виживання мотонейронів	Ген, що включається в патогенез СМА
Src	Від "sarcoma"	Від "саркома"	Онкоген вірусу саркоми птахів та ссавців
S1P	Sphingosine-1-phosphate	Сфінгозинмонофосфат	–
tat	Transactivator of transcription	Трансактиватор транскрипції	Регуляторний ген ВІЛ
t-Bid	Truncated Bid	"Укорочений" Bid	Продукт розщеплення Bid ініціаторними каспазами-10, -8, -2, який пов'язує рецепторні події апоптозу з мітохондріальними
TGF	Tumor growth factor	Фактор росту пухлини	–

Продовження табл.

Термін	Розшифровка	Переклад	Примітки
TNF	Tumor necrosis factor	Фактор некрозу пухлин	–
TNF-R	Tumor necrosis factor receptor	Рецептор фактора некрозу пухлини	–
TRAIL	Tumor necrosis (TNF)-related apoptosis-inducing ligand	TNF-подібний ліганд, що індукує апоптоз	Ліганд до відповідного рецептора загибелі
TRADD	TNF receptor associated death domain protein	DD-вмісний білок, асоційований з рецептором TNF	Адаптерний білок
TRAF	TNF receptor associated factor	Фактор, асоційований з TNF-рецептором	Адаптерний білок
TSP-1	Від "thrombospondin-1"	Рецептор для тромбоспондіну-1	–
TUNEL	Terminal deoxytransferase-mediated dUTP nick-end labeling	Термінальне дезокситрансфераза-опосередковане дУТФ-мічення нік-кінців	Метод виявлення апоптозних клітин
Vac-A	Vacuolating toxin	Токсин, що вакуолізує	Токсин <i>Helicobacter pylory</i>
VDAC	Voltage-dependent anion channel	Потенціалзалежний аніонний канал	Аніонний канал – складова частина РТР, функціонування якого залежить від різниці потенціалів на мембрani
VEGF	Vascular endothelial growth factor	Фактор росту ендотелію судин	–

Список скорочень та абревіатур із перекладом

Закінчення табл.

Термін	Розшифровка	Переклад	Примітки
vif	Virus infection factor	Вірусний інфекційний фактор	Додатковий ген ВІЛ
vpr	Від "viral protein"	Від "вірусний білок"	Додатковий ген ВІЛ
vpu	Від "viral protein U"	Від "вірусний білок U"	Додатковий ген ВІЛ
z-VAD.fmk	Benzylloxycarbonyl-Val-Ala-Asp (OMe) – fluoromethylketone	Бензилоксикарбоніл-Val-Ala-Asp-флуорометилкетон	Інгібітор каспаз

Видавничо-поліграфічний Центр
"Київський університет"
Версія не для друку

1. БІОЛОГІЧНЕ ЗНАЧЕННЯ КЛІТИННОЇ ЗАГИБЕЛІ. ТИПИ КЛІТИННОЇ СМЕРТІ

Yвищих організмів гомеостатичний контроль кількості клітин є результатом динамічної рівноваги між клітинною проліферацією і клітинною загибеллю. Клітинна загиbelь може бути класифікована в одну із двох категорій: некроз і апоптоз (рис. 1.1).

1.1. НЕКРОТИЧНА ЗАГИБЕЛЬ КЛІТИН

Некроз (від грец. *necros* – мертвий) виникає в результаті прямої дії патогенного фактора, що порушує цілісність мембрани клітини. Це призводить до масивного викиду медіаторів запалення і до міграції імунних клітин до осередку ураження. Як синоніми терміна *некроз* у сучасній науковій літературі використовують такі поняття, як *патологічна клітинна загибель*, *некроз клітини*, *онкотичний некроз*, а інколи й *онкоз* (від *oncosis* – набрякання), хоч останнє правильніше вживати для позначення початкових етапів некротичної загибелі клітин. Причиною застосування цих термінів є намагання відокремити процес патологічної загибелі окремої клітини від поняття *некрозу* в патології для опису масштабних змін, які стосуються цілих тканин організму і насправді відбуваються вже після її смерті.

Основні характеристики некрозу клітин:

а) у результаті в зоні пошкодженої клітини розвивається септичне чи асептичне (залежно від причини) запалення (асептичне запалення характеризується відсутністю живих мікроорганізмів та їхніх спор);

Біохімічні механізми апоптозу

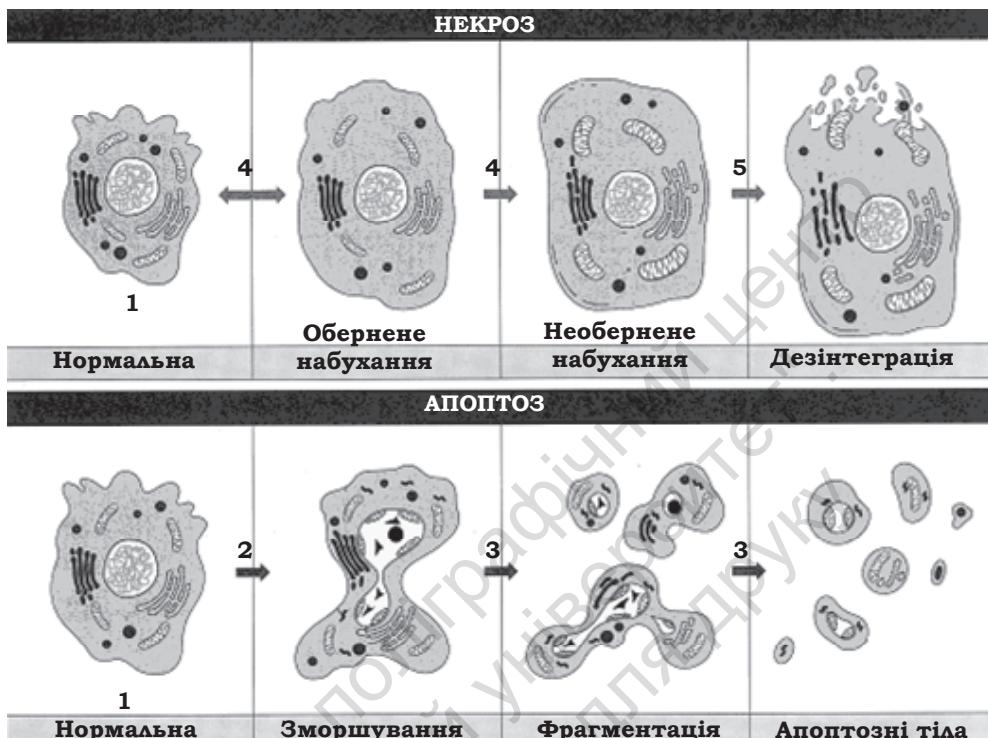


Рис. 1.1. Зміна ультраструктури клітин тварин при некрозі й апоптозі:
1 – нормальна клітина, 2 – апоптичне зморшування клітини з утворенням міхурцевих виростів, 3 – фрагментація клітини з утворенням апоптозних везикул, 4 – набухання клітини при некрозі, 5 – некротична дезінтеграція клітини (за В.Д. Самуїловим)

- б) спостерігається конденсація хроматину, ядро зморщується і стає інтенсивно базофільним, тобто забарвлюється в темно-синій колір гематоксиліном (*каріопікноз*), потім ядро розпадається на глибки (*каріорексіс*) і розчиняється в результаті дії лізосомальної дезоксирибонуклеази (*каріолізис*) (рис. 1.2). Унаслідок останнього процесу ядро візуально збільшується в об'ємі, слабко забарвлюється гематоксиліном, поступово втрачаються його контури. Якщо некроз розвивається швидко, ядро зазнає лізису без пікнотичної стадії;
- в) у цитоплазмі відбуваються *денатурація та коагуляція білків*;
- г) мембранисті структури руйнуються;

1. Біологічне значення клітинної загибелі. Типи клітинної смерті

д) порушуються окисно-відновні процеси та синтез АТФ у мітохондріях. Унаслідок цього загальний вміст АТФ у клітині знижується до 5–10 % від норми, і вся клітина починає страждати від недостачі енергії. Це спричиняє гальмування функціонування енергозалежної K^+ , Na^+ -АТФази, Ca^{2+} -помпи, викликає надходження натрію, кальцію та води до клітини, розбухання клітини й розрив мембрани;

е) поступово клітина розпадається на окремі глибки, які захоплюються та поглинаються макрофагами; на її місці формується сполучна тканина.

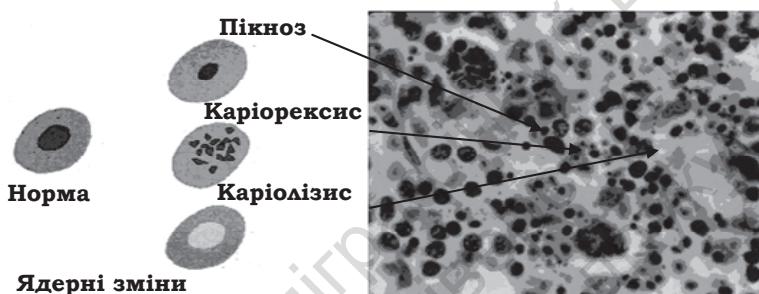


Рис. 1.2. Зміни в ядрах клітин при їхній некротичній загибелі

Цей тип загибелі клітин генетично не контролюється.

До факторів, що спричиняють некротичне ушкодження клітин, належать фізичні впливи (вогнепальне поранення, іонізуюче та ультрафіолетове випромінювання, електричне ураження, ефекти високих і низьких температур, тобто відмороження й опіки), дії токсинів (кислот, лугів, солей тяжких металів, ферментів, лікарських речовин, етилового спирту тощо), біологічні ефекти життєдіяльності бактерій, вірусів, простіших, алергійні реакції, викликані ендо- та екзоантігенами (зокрема, фібриноїдний некроз при інфекційно-алергійних та автоімунних захворюваннях). До причин некрозу також відносять зміни в судинах (судинний некроз при інфаркті), трофоневротичний фактор (при пролежнях і виразках, які не загоюються).

Залежно від механізму дії патогенного фактора розрізняють:

- прямий некроз, обумовлений безпосередніми ефектами індуктора (травматичні, токсичні, біологічні некрози);
- непрямий некроз, що виникає опосередковано через впливи судинної та нервово-ендокринної системи (алергійні, судинні та трофоневротичні некрози).

Некрозу передують ознаки *некробіозу* – незворотні дистрофічні зміни, що характеризуються переважанням катаболічних реакцій і є більш чи менш тривалим процесом відмиралля. На ранніх етапах некробіозу (який називають онкозом) клітина морфологічно не змінена. Зміни, які спроможні виявити методи електронної мікроскопії та гістохімії, з'являються протягом 1–3 годин; через 6–8 годин клітинні ушкодження стають видимими для світлової мікроскопії, а ще пізніше виникають макроскопічні прояви некробіозу. Наприклад, якщо хворий з інфарктом міокарда вмирає за кілька хвилин після початку приступу стенокардії (біль унаслідок недостатнього притоку крові до міокарда), то при автопсії (роздині) не виявлять жодної структурної ознаки некрозу; якщо загибелъ настає на другий день після гострого приступу, то зміни будуть явними.

Необоротне ушкодження клітин і поява морфологічних проявів некрозу тісно пов'язані з надходженням іонів Ca^{2+} до клітини. Якщо в нормі внутрішньоклітинна концентрація кальцію становить приблизно 0,0001 частину від його вмісту в позаклітинному середовищі (10^{-7} – 10^{-8}M і $1\text{--}2 \times 10^{-3}\text{M}$ відповідно; цей градієнт підтримується мембраною клітини, яка активно транспортує іони Ca^{2+} із клітини), то при некротичному ушкодженні клітин спостерігається накопичення кальцію. Ці іони діють як активатори низки ферментів – ендонуклеаз, фосфоліпази, протеаз, які здатні викликати, зокрема, гідроліз ДНК, руйнування мембрани і деструкцію цитоскелета. Збільшення активності цих ферментів можна виявити гістохімічними методами.

Активність окисно-відновних ферментів (напр., сукцинатдегідрогенази) різко знижується або навіть щезає. Зростання рівня кальцію в клітині також сприяє дисоціації рибосом, унеможливлюючи синтез білків клітиною, і гальмує процеси мітозу.

При некротичних ушкодженнях клітини зростає проникність внутрішньої мітохондріальної мембрани, унаслідок чого із мітохондрій звільняються протононі, цитохром с та інші фактори, а самі мітохондрії руйнуються (рис. 1.3).



Рис. 1.3. Розбуhanня та rуйнування мітохондрії внаслідок некротичних процесів (ушкоджену мітохондрію позначено літерою M)

1. Біологічне значення клітинної загибелі. Типи клітинної смерті

Приблизно через шість годин після початку процесу некротичної загибелі цитоплазма клітини стає гомогенною та виражено ацидофільною, тобто інтенсивно забарвлюється кислими барвниками, наприклад, у рожевий колір при фарбуванні еозином. Це є першою ознакою, яка виявляється світлою мікроскопією внаслідок коагуляції цитоплазматичних білків і руйнування (щезання) рибосом, оскільки рРНК надає нормальній цитоплазмі базофільного відтінку. Спеціалізовані утворення клітини (напр., міофібрили міокардіальних клітин) зникають у першу чергу. Набухання мітохондрій і деструкція мембрани органоїдів спричиняють вакуолізацію цитоплазми. Із власних клітинних лізосом звільняються ферменти, що здійснюють перетравлення клітини та її лізис (автоліз). Ключові стадії некротичної загибелі клітини подано на рис. 1.4.

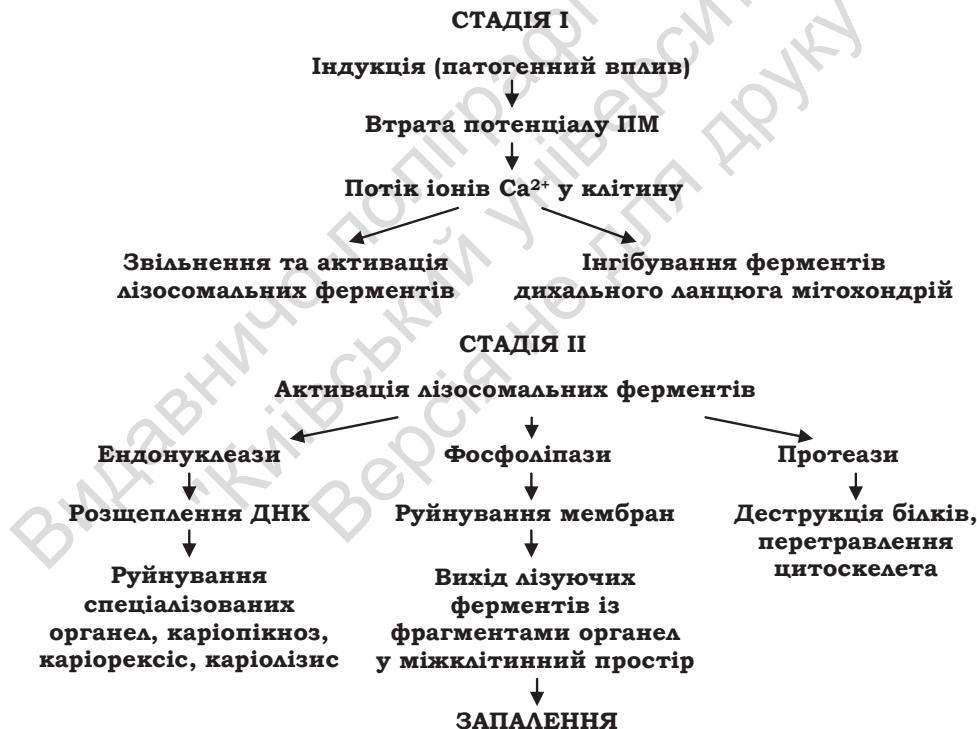


Рис. 1.4. Ключові стадії некрозу

1.2. НЕКРОЗ ТКАНИН ЯК НАСЛІДОК НЕКРОТИЧНОЇ ЗАГИБЕЛІ КЛІТИН

Некротичні зміни окремих клітин результуються в низці специфічних ознак ушкодженої тканини, за якими виділяють ряд клініко-морфологічних форм некрозу (тут термін *некроз* уживаємо з точки зору патології – для опису наслідків загибелі окремих клітин, що проявляються вже після їхньої смерті на рівні тканини). Ці форми відрізняються особливостями механізмів клітинної загибелі, типом тканин та етіологією індуктора некрозу, зокрема наявністю бактеріальної флори, збудників туберкульозу, сифілісу, дефіциту вітаміну Е, травм, локальних впливів високих чи низьких температур, алергійних чи автоімунних хвороб, ішемії тощо.

I. Коагуляційний (сухий) некроз – це тип некрозу, за якого клітини, що загинули, зберігають свої контури протягом кількох днів. Механізм цього типу клітинної загибелі недостатньо вивчений – наприклад, його пояснюють проникненням у тканини, що гинуть, кальцію. Останній активує ферменти, що беруть участь у зсіданні білків, зокрема фібрин плазми, що пропитує ці тканини. Коагуляція цитоплазматичних білків перетворює їх на важкорозчинні сполуки, резистентні до дії лізосомальних ферментів, у зв'язку із чим їхнє розрідження уповільнюється, а тканина зневоднюється. Така форма некрозу більш характерна для органів, багатих на білки та бідних на рідину – нирок, міокарда, надниркової залози, селезінки. Його причиною зазвичай є недостатній кровообіг, аноксія, дія фізичних, хімічних, інших ушкоджувальних впливів (напр., коагуляційний некроз клітин печінки при вірусному ушкодженні або при дії токсичних агентів бактеріального та небактеріального походження).

Коагуляційний некроз ще називають сухим, оскільки він характеризується виникненням мертвих ділянок білого або жовтого кольору, які є сухими, щільними й крихкими (рис. 1.5).

За тривалого терміну коагуляційний некроз може переходити в колікваційний і набувати ознак зватніння та секвестрації (від лат. *sequestro* – віddіляю, процес відторгнення некротичної ділянки (секвестра) від оточуючих живих тканин).

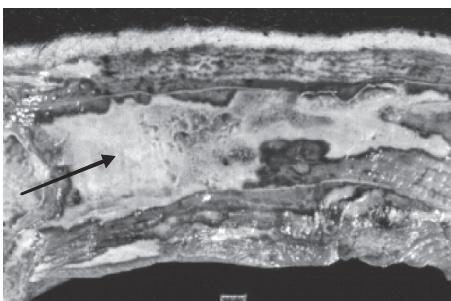


Рис. 1.5. Некротичні зміни м'яза коня (коагуляційний некроз)

специфічний некроз. Він характеризується появою у внутрішніх органах сухої крихкої обмеженої ділянки тканини білувато-жовтого кольору. У сифілітичних гранульомах часто такі ділянки не крихкі, а пастоподібні. Це мішаний (екстра- та інтрацелюлярний) тип некрозу, при якому гинуть одночасно і клітини, і волокна міжклітинної речовини. Мікроскопічно ушкоджена ділянка тканини виявляється безструктурною, гомогенною, забарвленою гематоксиліном та еозином у рожевий колір; добре видно глибки хроматину ядер, утворені внаслідок каріорексису. Інколи казеозний некроз виділяють в окрему групу – поряд із коагуляційним, коліквацийним і гангренозним. Його механізмом вважають дію бактеріальних і нейтрофільних протеаз, яка руйнує тканини; казеозний некроз здатний переходити в коліквацийний з ознаками мінералізації та інкапсуляції.

в) воскоподібний, або ценкерівський некроз (некроз м'язів, частіше передньої черевної стінки та стегна, при тяжких інфекціях – черевному та висипному тифах, холері. Його причиною також може бути дефіцит вітаміну Е);

г) фібринойдний некроз – тип некрозу сполучної тканини, спостерігається при алергійних та автоімунних хворобах (ревматизмі, ревматоїдному артриті, системному червоному вовчаку). Найбільш уражуються колагенові волокна та гладенькі м'язи середньої оболонки кровоносних судин. Фібринойдний некроз артеріол спостерігається при злюкісній гіпертензії. Цей тип некрозу проявляється втратою нормальної структури колагенових волокон і накопиченням гомогенного, яскраво-рожевого некротичного матеріалу, що

До коагуляційного некрозу відносять:

а) інфаркт – різновид судинного (ішемічного) некрозу внутрішніх органів (крім мозку). Це найбільш поширений вид некрозу;

б) казеозний, або сироподібний некроз – спостерігається при туберкульозі, сифілісі, лепрі, лімфогранулематозі. Він часто зустрічається при специфічних інфекційних гранульомах, тому інша його назва –

специфічний некроз.

в) воскоподібний, або ценкерівський некроз (некроз м'язів, частіше передньої черевної стінки та стегна, при тяжких інфекціях – черевному та висипному тифах, холері. Його причиною також може бути дефіцит вітаміну Е);

мікроскопічно подібний фібрину. Ділянки фібриноїдного некрозу містять різну кількість імуноглобулінів і комплементу, альбумінів, продуктів розпаду колагену та фібрину;

д) **жировий некроз:**

1) **ферментативний жировий некроз** – супроводжує гострий панкреатит та ушкодження підшлункової залози, коли панкреатичні ферменти виходять із протоків в оточуючі тканини. Панкреатична ліпаза діє на тригліцериди в жирових клітинах, розщеплюючи їх на гліцерин і жирні кислоти, які, взаємодіючи з іонами Ca^{2+} плазми, утворюють кальцієві мила. При цьому в жировій тканині, яка оточує підшлункову залозу, з'являються непрозорі, білі як крейда бляшки та вузлики (стеатонекроз). Потрапляння ліпази в кровотік з наступним широким розповсюдженням стає причиною жирового некрозу багатьох ділянок організму, найчастіше підшкірної жирової клітовини та кісткового мозку;

2) **неферментативний жировий некроз** – спостерігається в молочній залозі, підшкірній жировій тканині та в черевній порожнині. Більшість пацієнтів мають в анамнезі травми, тому інша назва такого некрозу *травматичний*, навіть якщо травма не визначена як основна його причина. Цей тип некрозу викликає запальну відповідь, яка характеризується наявністю численних макрофагів з пінистою цитоплазмою, нейтрофілів і лімфоцитів з наступним розвитком фіброзування. Цей процес буває нелегко диференціювати від пухлини.

За іншою класифікацією жировий некроз поділяють на панкреатичний, травматичний, метаболічний та жировий некроз, спричинений дефіцитом вітаміну Е.

II. Колікваційний (вологий) некроз характеризується розплавленням мертвої тканини. Він розвивається у тканинах, відносно бідних на білки та багатих на рідину, в яких є сприятливі умови для гідролітичних процесів. Лізис клітин відбувається в результаті дії власних ферментів (автоліз). Унаслідок цього цитоплазма розпадається на грудки (плазморексис). На заключному етапі руйнування мембраних структур клітини спричиняє її гідратацію, настає гідролітичне "розплавлення" цитоплазми. "Розплавлення" в одних випадках охоплює всю клітину (цитоліз), в інших – лише її частину (фокальний коагуляційний некроз або балонна дистро-

фія). Продукти розпаду клітин дифундують швидше, ніж білки, ліпіди та полісахариди, з яких вони виникають. Ці продукти швидко проникають в оточуючі живі тканини, подразнюючи чутливі нервові закінчення, тому розвитку некрозу зазвичай притаманний біль. Типовим болевим синдромом, пов'язаним з відмиранням тканин, є грудна чи черевна жаба при закритті вінцевих артерій серця або артерій брижі, тобто при некрозах міокарда і кишечнику. Типовим прикладом вологого коліквацийного некрозу є осередок сірого розм'якшення (ішемічний інфаркт) головного мозку (взагалі, некротичні процеси в ЦНС завжди відбуваються за механізмом коліквацийного некрозу). Інфаркт мозку часто називають "розм'якшенням", оскільки основною макроскопічною ознакою в будь-який термін є зниження пружності тканини мозку в осередку ураження. Протягом першої доби він виявляє себе нечітко обмеженою ділянкою синюшного відтінку, м'якою на дотик. Наприкінці першої доби осередок набуває більшої чіткості та блідне. Наступними днями речовина мозку в цій ділянці стає ще більш в'ялою, жовтуватого кольору із зеленуватим відтінком. У перші тижні об'єм мозку дещо збільшується через його набряк.

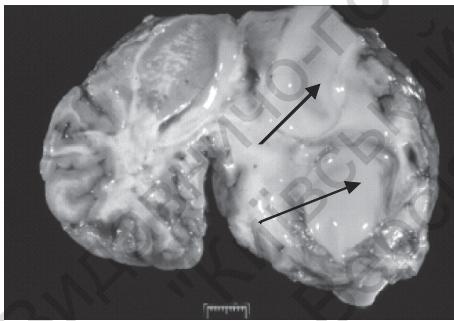


Рис. 1.6. Мозок собаки з ознаками коліквацийного некрозу

Через 1–1,5 місяці на місці інфаркту утворюється досить чітко обмежена порожнина, яка містить мутну рідину й детрит (лат. *detritus* – витертий від *detero*, *detritum* – терти, стирати – у патології кашкодібний продукт розпаду тканин) (рис. 1.6).

Тканина ураженого мозку є гомогенною, безструктурною, слабко-рожевого кольору при фарбуванні гематоксиліном та еозином.

Розсмоктування мертвих тканин здійснюється макрофагами, які мають вигляд жиро-зернистих сфер. Цей тип некрозу також виникає у вогнищах абсцесу через впливі бактеріальних протеолітичних ферментів та ензимів нейтрофілів.

ІІІ. Гангренозний некроз (від грец. *gangraina* – пожежа) – некроз тканин, які сполучаються із зовнішнім середовищем і змі-

нюються під його впливом. Термін *гангрена* широко застосовується для позначення клініко-морфологічного стану, при якому некроз тканини часто ускладнюється вторинною бактеріальною інфекцією різного ступеня або через сполучення із зовнішнім середовищем набуває вторинних змін. Розрізняють суху, вологу, газову гангрени та пролежні.

1) *Суха гангрена* – це некроз тканин, які стикаються із зовнішнім середовищем без участі мікроорганізмів. Найчастіше зустрічається на кінцівках у результаті ішемічного коагуляційного некрозу тканин. Некротизовані тканини здаються чорними, сухими, вони чітко відмежовані від суміжної життєздатної тканини. На межі із здоровими тканинами виникає демаркаційне запалення (рис. 1.7).



Рис. 1.7. Суха гангрена вуха свині (А) та хвоста американського алігатора (Б).
(Стрілкою показана демаркаційна лінія)

Зміна кольору обумовлена перетворенням гемоглобінових пігментів у присутності сірководню на сульфід заліза. Прикладами може бути суха гангрена кінцівок при атеросклерозі та тромбозі її артерій (атеросклеротична гангрена), при облітеруючому ендартеріїті, при обмороженні чи опіку; суха гангрена пальців при хворобі Рейно, шкіри – при висипному тифі та інших інфекціях. Лікування полягає в хірургічному видаленні мертвої тканини по межі демаркаційної лінії.

2) *Волога гангрена* – розвивається через нашарування на некротичні зміни тканини тяжкої бактеріальної інфекції, викликаної, зокрема, Bac. putrificans, Bac. sporogenes, Bac. histolyticus, Proteus bacteria, Clostridium perfringens, веретеноподібною паличкою (Bac.

fusiformis) та зубною спірохетою (*Spirocheta dentium*), причому два останніх мікроорганізми зазвичай вегетують одночасно, головним чином на межі мертвих і живих тканин. Під впливом ферментів мікроорганізмів виникає вторинна коліквация ("розм'якшення", за якого лізис клітини спричиняється ферментами, які утворюються не в самій клітині, а проникають ззовні (гетеролізис)). Тип мікроорганізмів залежить від локалізації гангрени. Волога гангрена розвивається переважно у тканинах, багатьох на вологу – частіше у внутрішніх органах, наприклад у кишечнику (рис. 1.8) при непрохідності брижових артерій через тромбоз чи емболію, у легенях як ускладнення пневмонії при грипі чи кору, хоча може спостерігатися і на кінцівках.



Рис. 1.8. Тонкий кишечник собаки з ознакою вологої гангрени

У послаблених інфекційною хворобою, зокрема кором, дітей може розвинутися волога гангрена м'яких тканин щік, проміжності, яка має назву *нома* – від грец. *pote* – водяний рак. Гостре запалення та ріст бактерій є причиною того, що некротична ділянка стає набряковою, червоно-чорною, з розрідженням мертвої тканини, унаслідок життєдіяльності бактерій виникає специфічний запах.

При вологій гангрені може виникнути некротизуюче запалення, яке поширюється та чітко не обмежене від суміжної здорової тканини і тому погано підлягає хірургічному лікуванню, що спричиняє високий відсоток летальності.

3) *Газова гангрена* – виникає при інфікуванні рані анаеробною флорою, наприклад *Clostridium hystolyticum*, *C. septicum*, *C. perfringens*. Вона характеризується поширеним некрозом тканини й утворенням газів у результаті ферментативної активності бактерій (за анаеробних умов ці клостридії починають рости, розщеплювати за участю протеїназ колаген та інші білки (*C. hystolyticum*, *C. septicum*), зброджувати глукозу, галактозу, мальтозу, лактозу та інші цукри (*C. perfringens* і *C. septicum*)).

Біохімічні механізми апоптозу

Основні прояви схожі на вологу гангрену, але з додатковою присутністю газів, у тому числі аміаку, сірководню, водню, у тканинах. Частим клінічним симптомом при газовій гангрені є крепітація – феномен потріскування при пальпації. Відсоток летальності при цьому типі гангрени також дуже високий.

4) Пролежні (*decubitus*) – це змертвіння поверхневих ділянок тіла (шкіри, м'яких тканин), які стискаються між ліжком та кістками. Тому найчастіше пролежні з'являються в ділянках крижі, остистих відростків хребців, великого вертела стегнової кістки. За своїм генезом це трофоневротичний некроз, оскільки стискаються судини та нерви, що посилює порушення трофіки тканин у тяжкохворих, які страждають на серцево-судинні, онкологічні, інфекційні чи нервові хвороби.

Клінічні прояви некрозу будь-якого типу поділяють на системні та місцеві. До системних належать: лихоманка (через вихід патогенних речовин із некротизованих тканин); нейтрофільний лейкоцитоз (через наявність гострої запальної реакції – демаркаційного запалення); звільнення вмісту некротичних клітин, зокрема ферментів. Останній процес має важливе діагностичне значення – адже присутність деяких звільнених із цитоплазми ферментів, характерних лише для тканин певного типу, у кровотоці може свідчити про певну локалізацію некрозу (т. зв. *індикаторні ферменти*) (табл. 1.1).

Таблиця 1.1. Найважливіші індикаторні ферменти

Фермент	Тканина
Креатинкіназа (МВ ізоензим)	Міокард
Креатинкіназа (ВВ ізоензим)	Мозок
Креатинкіназа (ММ ізоензим)	Скелетна мускулатура, міокард
Лактатдегідрогеназа (ЛДГ1)	Міокард, еритроцити
Лактатдегідрогеназа (ЛДГ5)	Печінка, скелетна мускулатура
Аспартат-амінотрансфераза (АСТ, або АсАТ)	Міокард, печінка, скелетна мускулатура
Аланін-амінотрансфераза (АЛТ, або АлАТ)	Печінка, скелетна мускулатура
Амілаза	Підшлункова залоза, слінні залози

Ці ферменти можуть бути виявлені різними лабораторними методами.

Наприклад, зростання рівня МВ-ізоферменту креатинкінази характерно для некрозу міокарда, оскільки цей фермент міститься лише в міокардіальних клітинах. Зростання рівня AcAT є менш специфічним, оскільки цей фермент поряд із міокардом міститься також у печінці та інших тканинах. Але найчастіше появу трансаміназ пов'язують з некрозом печінкових клітин.

До місцевих проявів некрозу належать крововиливи, кровотечі, збільшення об'єму тканин і, як наслідок, зростання тиску в обмеженому просторі (напр., у порожнині черепа при ішемічному некрозі мозку).

Некроз спричиняє функціональну недостатність органа, наприклад, виникнення гострої серцевої недостатності в результаті поширеного некрозу (інфаркту) міокарда (гостра ішемічна хвороба серця). Тяжкість клінічних проявів залежить від типу, об'єму ушкодженої тканини відносно загальної її кількості, збереження функції живої тканини. Наприклад, некроз в одній нирці не спричиняє ниркової недостатності, навіть якщо втрачається ціла нирка, оскільки інша нирка може компенсувати втрату. А некроз невеликої ділянки відповідного відділу кори головного мозку веде до паралічу відповідної групи м'язів.

Некроз – процес необоротний, пов'язаний зі смертю клітини. Як уже зазначалося, йому передує *некробіоз*. При некрозі процеси асиміляції повністю припиняються; при некробіозі вони певний термін співіснують з процесами дисиміляційними (катаболічними). Часом некробіоз триває досить довго – тижні й місяці. О. Хейбнер запропонував позначати такі стани *патобіозом*. Патобіоз – процес зворотний і за певних умов може і не результуватися в некротичній загибелі клітин і тканин. До патобіозів можна віднести тривалі індуративні набряки та виразки, спричинені впливами рентгенівського випромінювання, що повільно протікають, зміни в кровотворному апараті після інтенсивної загальної дії іонізуючого випромінювання, глибокі дистрофічні процеси в тканинах після їхньої деafferentації, зокрема при перерізуванні сідничного нерва, при захворюваннях спинного мозку. Незагоєння ран, виразок при загальному виснаженні, при порушеннях ін-

нервациї, кровообігу також відображають патобіотичні стани тканин, порушення їхньої життєдіяльності, зокрема їхньої здатності до регенерації. Аналогічні прояви спостерігаються при відмороженні, у тому числі за типом так званої "траншейної стопи" (це ураження стоп при тривалому впливі холоду й вологи, вид відмороження, що виникає при температурі вище 0 °C, уперше описане в період Першої світової війни 1914–1918 рр. у солдат при тривалому перебуванні їх у вологих траншеях. У легких випадках з'являються болісне оніміння, набряки, почевоніння шкіри стоп; у випадках середньої тяжкості – серозно-кров'янисті пухирі; при тяжкій формі – змертвіння глибоких тканин з приєднанням інфекції).

При відносно сприятливому протіканні некрозу навколо змертвілих тканин виникає реактивне запалення (*демаркаційне запалення*), що відділяє мертву тканину *демаркаційною зоною* – смугою червоного кольору з жовтуватим відтінком, що оточує зону некрозу (рис. 1.7). У межах останньої кровоносні судини розширяються, виникає набряк, з'являється велика кількість лейкоцитів, які звільнюють гідролітичні ферменти та "розплавляють" некротичні маси. Надалі некротичні маси розсмоктуються макрофагами, клітини сполучної тканини розмножуються і заміщують або обростають ділянку некрозу. При заміщенні мертвих мас сполучною тканиною кажуть про їхню організацію. У таких випадках на місці некрозу формується *сполучнотканинний рубець*. Обростання ділянки некрозу сполучною тканиною веде до його *інкапсуляції*.

У мертві маси при сухому некрозі та в осередок омертвляння після його організації можуть відкладатися солі Ca²⁺, унаслідок чого розвивається *звапніння* (петрифікація) вогнища некрозу. Звапніння є одним із шляхів нейтралізації ефектів некротичних тканин. У деяких випадках у ділянці омертвляння спостерігається утворення кістки – *осифікація*. При розсмоктуванні тканинного детриту та формуванні капсули, що зазвичай зустрічається при вологому некрозі, найчастіше – у головному мозку, на місці омертвляння з'являється порожнина – *кіста*.

При несприятливому протіканні некрозу розвивається гнійне (септичне) "розплавлення" вогнища омертвляння. Як уже зазначалося, секвестрація – це процес відторгнення некротичної ділянки від оточуючих живих тканин. При цьому ділянка мертвої тканини

1. Біологічне значення клітинної загибелі. Типи клітинної смерті

– секвестр – не підлягає автолізу, не заміщується на сполучну тканину та вільно розташовується поряд із живими тканинами. Секвестри звичайно виникають у кістках при запаленні кісткового мозку – остеомієліті. Навколо такого секвестру утворюється секвестральна капсула та порожнина, заповнена гноєм. Інколи секвестр виходить із порожнини через свищі, які закриваються лише після повного його видалення.

Значення некрозу полягає в його сутності – "місцевій загибелі" та виключенні із функцій таких ділянок, тому некроз життєво важливих органів (напр., інфаркт міокарда, ішемічні некрози головного мозку, некрози коркової речовини наднирникової залози, прогресуючий некроз печінки, гострий панкреатит з панкреонекрозом) часто спричиняє загибель усього організму. Інколи омертвлення тканини є причиною тяжких ускладнень багатьох хвороб (напр., розрив серця при міомалії, паралічі при геморагічному та ішемічному інсультах, інфекції при масивних пролежнях, інтоксикації, пов'язані із впливом на організм продуктів тканинного розпаду, зокрема при гангрені кінцівки).

Крім некрозу та апоптозу – двох основних шляхів загибелі клітин, у сучасній літературі зустрічаються терміни *автофагія*, *піроптоз*, *програмована клітинна загиbelь*, які також мають відношення до клітинної смерті.

Автофагія – це деградація клітинних компонентів, у першу чергу білків, у межах інтактної клітини, яка гине в автофагальних вакуолях (автофагосомах, оточених подвійною мембрanoю) за участю лізосом. До її морфологічних ознак можна віднести вакуолізацію, деградацію цитоплазматичного вмісту, легку конденсацію хроматину. Уперше цей тип клітинної загибелі описано при розвитку хребетних і може бути прикладом філогенетично давніх процесів. Сьогодні відомо, що автофагія також бере участь в адаптації організму до умов голодування (а саме – до дефіциту амінокислот), у підтримці цитоплазматичного та ендоплазматичного гомеостазу, у процесах дозрівання еритроцитів тощо. До цього механізму залучені ГТФази, фосфатидилінозитолкінази та убіквітин-подібна система кон'югації (підрозд. 3.5). Клітини, що підлягають автофагії, надалі фагоцитуються сусідніми клітинами [17, 27].

Піроптоз (від грец. *pyro* – вогонь) – це нова, нещодавно відкрита форма клітинної загибелі (Б. Кооксон, М. Бреннан, 2001). Її індукують організми видів *Salmonella* та *Shigella*. Піроптоз опосередкований активацією в макрофагах, інфікованих *Salmonella* та *Shigella*, каспази-1 (підрозд. 3.2, 3.4) – протеази, яка переводить проформи цитокінів запалення IL-1 β та IL-18 в активні форми і не бере участі в апоптозі. Цей шлях є прозапальним, характеризується лізисом клітини, звільненням клітинного вмісту. Крім макрофагів, активність каспази-1 виявляють в імунній, нервовій, кардіоваскулярній системах, що вказує на значну роль піроптозу в численних біологічних системах.

Хоч термін *програмована клітинна загибел* найчастіше використовують як синонім терміна *апоптоз*, це є не цілком коректним, оскільки між ними існує певна відмінність. Клітинну смерть можна віднести до програмованої, якщо її реалізація залежить від генетично закодованих сигналів або активності всередині клітини, яка гине. Таким чином, гостре ушкодження клітини не буде програмованим. За певними внутрішніми програмами здійснюються механізми автофагії (для якої відома участь у процесах ембріонального розвитку), піроптозу (оскільки тут необхідна активація каспази-1) та апоптозу.

2. АПОПТОЗНА ЗАГИБЕЛЬ КЛІТИН

2.1. ОСНОВНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ АПОПТОЗУ

Апоптоз (від грец. *apo* – відділення + *ptosis* – падіння) був уперше вивчений і описаний А. Віллі, який ввів цей термін для опису послідовності подій, що специфічно відрізняються від некрозу [34]. Такий тип загибелі характерний не для цілої тканини, а для окремих клітин чи їхніх певних груп (рис. 2.1).

Він ініціюється: а) зростанням експресії генів-індукторів апоптозу (чи пригніченням генів-інгібіторів) або б) підвищеним надходженням іонів кальцію всередину клітини.

Основні характеристики:

а) клітинна мембрана при цьому залишається збереженою;

б) мембрana мітохондрій не пошкоджується, проте окисновідновні процеси порушуються в цілому за рахунок блокування мітохондріального комплексу. У результаті збільшується синтез протеаз, які починають поступово розщеплювати внутрішньоклітинні структури;

в) від мембрани клітини відщеплюються невеликі везикули, які наповнені вмістом цитоплазми (мітохондрії, рибосоми та ін.), оточені мембраним ліпідним бішаром – так звані *апоптозні тільця* (рис. 2.2);

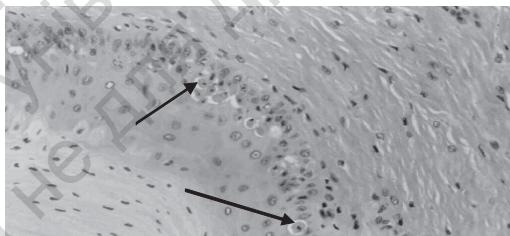


Рис. 2.1. Фотографія (світлова мікроскопія) препарату шийки матки собаки після пологів; стрілками показано еозинофільні клітини з піконтичними ядрами, що підлягають апоптозу

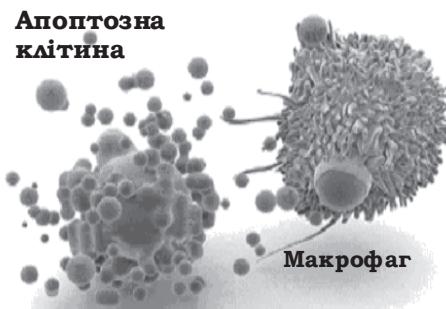


Рис. 2.2. Поглинання апоптозної клітини лейкоцитом; добре помітні "апоптозні тільця", що відщеплюються від клітини, що гине

г) відщеплені везикули поглинаються сусідніми клітинами. Ядро зморщується на останніх стадіях процесу, хроматин частково конденсується, що вказує на збереження активності низки ділянок ДНК. Елементи, що залишилися від клітини, фагоцитуються тканинними макрофагами (рис. 2.2) без розвитку реакції запалення і формування сполучної тканини.

Загальні характеристики некрозу та апоптозу наведено в табл. 2.1.

Таблиця 2.1. Порівняння некрозу та апоптозу

ПОДІЯ	НЕКРОЗ	АПОПТОЗ
Стимул	Токсини, гіпоксія, масивний інсульт, зменшення вмісту АТФ (енергодефіцит)	Фізіологічні та патологічні умови без зменшення вмісту АТФ
Енергетична залежність	-	АТФ-залежний процес
Гістологія	Клітинне розбухання, деструкція органел, загибель ділянок тканини	Конденсація хроматину, апоптозні тіла, загибель окремих ізольованих клітин
Модель уламків ДНК	Хаотична фрагментація	Фрагменти ДНК, за розмірами кратні 180–200 п.о. (міжнуклеосомна фрагментація)
Клітинні мембрани	Порушення мембраних функцій і функцій мембраних іонних каналів; лізис плазматичної мембрани (ПМ)	ПМ інтактна, везикулярна, з молекулярними перебудовами (підвищення проникності ПМ), порушення окисно-відновних процесів у мембрахах мітохондрій
Фагоцитоз клітин, що загинули	Імміграція фагоцитів	Сусідні клітини
Реакція тканини	Запалення; формування сполучнотканинних рубців	Без запалення і сполучнотканинних рубців

2.2. БІОЛОГІЧНА РОЛЬ АПОПТОЗУ

Існують чотири основні потреби в апоптозі в нормі:

1. Для підтримки сталості кількості клітин.
2. Для визначення форми організму та його частин.
3. Для забезпечення правильного співвідношення кількості клітин різних типів.

4. Для видалення генетично дефектних (мутованих) клітин.

Нижче наведено найяскравіші приклади фізіологічного апоптозу.

➤ ембріогенез – видалення та заміщення ембріональних клітин (напр., під час формування внутрішнього вуха або розвитку кінцівки у ссавців, при формоутворенні) (рис. 2.3, А, В);

➤ диференціація клітин і метаморфоз (регресія хвоста у пуголовків) (рис. 2.3, Б);

➤ функціонування лімфатичної системи (знищення незрілих або самореактивних Т-лімфоцитів у ході розвитку). Апоптоз клітин імунної системи захищає організм від автоімунних процесів і пояснює цитотоксичність Т-лімфоцитів. В-клітини також є суб'єктами апоптозної загибелі на всіх стадіях перетворення преB- на В-клітини – 60–70 % цих лімфоцитів утрачається в кістковому мозку під час дозрівання;

➤ постійне оновлення клітин (епітелій ворсинок кишечнику, клітини крові та сперматогонії, що диференціюються) і забезпечення клітинного гомеостазу;

➤ регуляція числа нервових клітин. При цьому виживають лише ті нейрони, до яких надійшов "сигнал виживання". Останній формується внаслідок зв'язування специфічних нейротропічних факторів (NGF, BDNF, NT3), що виділяються клітинами-мішенями, з їхніми специфічними Trk-рецепторами (receptor tyrosin kinases) нервових клітин (рис. 2.4). Таким чином досягається баланс між кількістю нейронів і числом клітин-мішеней. Загалом, близько 50 % нейронів гине шляхом апоптозу під час ранніх стадій розвитку нервової системи;

➤ при формуванні гормонзалежних органів (молочної залози, яєчника);

➤ знищення мутованих, вірус-інфікованих, чужорідних клітин;

➤ апоптоз відіграє певну роль у протіканні низки динамічних процесів – у ремоделюванні тканин, у відповіді на стрес.

Біохімічні механізми апоптозу

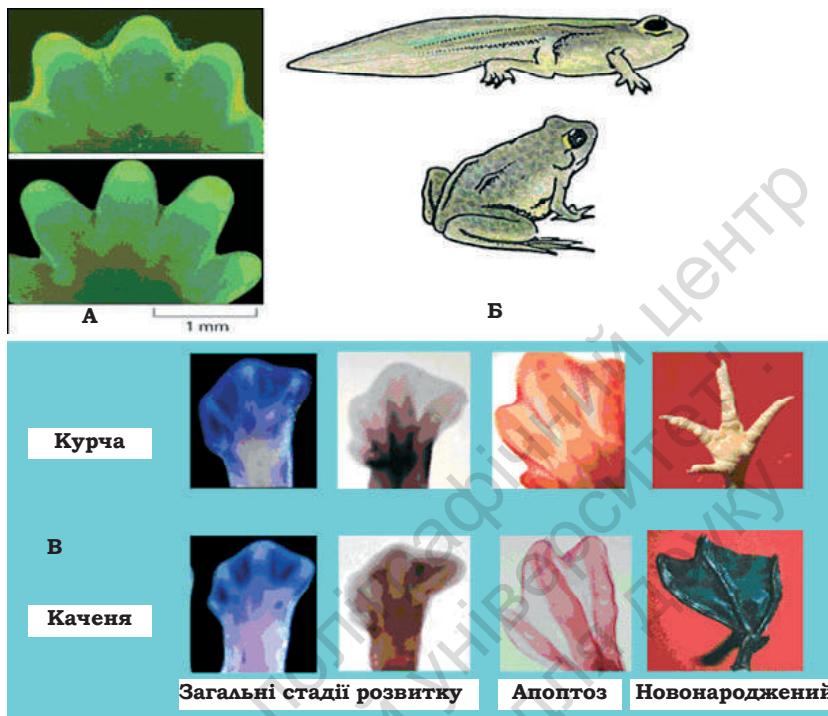


Рис. 2.3. А – апоптоз під час нормального розвитку кінцівки миши. Ділянка із клітин, що гинуть шляхом апоптозу (уверху), помічена жовтим. Та ж кінцівка (знизу) через один день [за Б. Альбертсом]; Б – у процесі розвитку жаби зростання вмісту тиреоїдного гормону індукує апоптоз клітин хвоста; В – роль апоптозу у формуванні протягом ембріогенезу різних форм кінцівок: кінцівка курчати (угорі) та качки (унізу)



Рис. 2.4. Апоптоз у регуляції числа нервових клітин

Апоптоз як форма клітинної загибелі є також характерною для рослин, безхребетних та одноклітинних організмів.

Із цією формою смерті клітин у житті рослин пов'язані процеси формоутворення в онтогенезі, імунні реакції на патогенні фактори тощо.

Відома роль апоптозних процесів у *ксило-* та *флоемогенезі*. Клітини-попередники трахеїдів ксилеми, яка виконує водопровідну та опірну функції, підлягають дробленню протопласту на везикули, характерні для апоптозу тварин. Розвиток ситоподібних трубок флоеми також супроводжується дробленням ядра. Є дані про існування генів *ted2*, що відповідають за реалізацію процесу судиноутворення.

Шляхом апоптозної загибелі клітин реалізується і формування контурів листя, тобто *формоутворення*. Наприклад, у представників *p. Monstera* (родина Ароникові) місця перфорацій та наявність лопатей визначаються ділянками загибелі клітин на ранніх стадіях розвитку. Цей процес також має генетичний контроль.

З апоптозними процесами пов'язана й адаптивна реакція рослин на дефіцит кисню, зокрема при затопленні (*аеренхімогенез*), яка полягає в утворенні порожнин, заповнених повітрям, за рахунок елімінації деяких клітин з повним руйнуванням клітинних стінок за участю гідролітичних ферментів, які активуються в цих умовах.

Шляхом апоптозу гинуть і клітини кореневого чохлика, які захищають апікальну меристему кореня при проростанні насіння.

Відповідно до походження терміна *апоптоз* ця клітинна смерть бере участь в *опаданні листя та зрілих плодів*. Ці процеси супроводжуються вибірковою загибеллю клітин відокремлювальної зони, розташованої між основою черешка листа і стеблом. Ця загиbelь активується завдяки експресії так званих *sag-генів* (*senescence-associated genes*). Клітини зазначеної ділянки секретують ферменти (пектинази та целюлази); ці ферменти частково розчиняють клітинну стінку власних клітин; останні при цьому підлягають автолізу. Одночасно із цими процесами в шарі клітин з боку стебла відкладається водостійкий субе-

рин, що захищає оголену ділянку тканини, яка виникла після відокремлення листа внаслідок ферментативного гідролізу клітинних полімерів.

З апоптозом пов'язана загибель клітин на шляху пилкової трубки, що проростає. Цей процес залежить від видової належності пилка і не ініціюється за умов впливу чужорідного пилка.

Стійкість рослинні до патогену визначається здатністю розпізнати і своєчасно включити механізм захисту. Поряд з індукцією синтезу фітоалексинів (рослинних антибіотиків) і гідролітичних ферментів до таких механізмів належить активація в інфікованих клітинах і клітинах, що локалізовані біля вогнища інфекції, програми власної загибелі, цей процес отримав назву *гіперчувствливої відповіді* (ГВ). Утворюється ділянка мертвих, зневоднених клітин, яка є бар'єром для подальшого розповсюдження патогену. ГВ – це відповідь рослин на патогенні віруси, бактерії, гриби та нематоди. При цьому загибель клітин рослин викликана не прямою деструктивною дією патогену, а активацією патогеном генетичної програми загибелі рослинної клітини. ГВ супроводжується змінами біохімічних процесів у пошкоджених ділянках, завдяки чому виникнення ГВ на одному чи кількох листках рослинни спричиняє розвиток імунітету в інших листках, які не мали контакту з патогеном (системна набута стійкість рослинни).

У рослин (як і у тварин) поряд з апоптозом існує некротичне пошкодження клітин. Наприклад, H_2O_2 в малих концентраціях є індуктором апоптозу, а у високих викликає швидку загибель клітин без будь-яких морфологічних змін, характерних для фізіологічної смерті [13, 7].

У прокаріот (бактерій) роль апоптозу пов'язують з лізисом материнської клітини при споруляції, руйнуванням вегетативних клітин при утворенні плодового тіла у міксобактерій, а також зі спонтанним автолізом внаслідок інфікування чи мутацій.

У еукаріот шляхом апоптозу видаляються мутантні організми, що забезпечує "чистоту" колоній; як і у бактерій цей тип загибелі клітин необхідний для утворення плодових тіл. У дріжджів апоптоз важливий в елімінації (видаленні) старіючих та

ушкоджених клітин, що сприяє підвищенню якості життя молодших нащадків. У бактерій і дріжджів апоптоз запускається факторами, які накопичуються при зростанні щільності культури (це жирні кислоти й глукозаміни для перших і оцтова кислота – для дріжджів). У той же час у інфузорій апоптоз виникає за низької щільноті в культурі, оскільки, імовірно, цим простішим необхідна висока щільність культури для полегшення кон'югації [8].

"Самогубство" клітин шляхом апоптозу функціонує також і на рівні клітинних органел. Прикладом може бути *нуклеоптоз* – видалення ядра при дозріванні еритроцитів або втрата макронуклеуса



Рис. 2.5. Академік В.П. Скулачов –
директор інституту
фізико-хімічної біології МДУ,
декан нового експериментального
факультету біоінженерії
та біоінформатики МДУ,
президент Російського
біохімічного товариства,
член президії
Європейської академії

в інфузорій після поділу. Самознищуються й мітохондрії – цей процес отримав назву *мітоптоз* (за В. Скулачовим, рис. 2.5). Мітоптоз може ініціюватися за умов утворення в мітохондрії з кисню не води, а супероксидного аніона, нащадок якого – OH⁻ – служить тригером для елімінації "неправильної" мітохондрії. За аналогією міто- та апоптозу Скулачов виділив ще дві категорії – органо- та феноптоз – як запрограмовану смерть органа і цілого організму відповідно. Зокрема, про органоптоз може йтись, коли видаляється орган при індивідуальному розвитку (так зникає хвіст у пуголовка), а до феноптозу можна віднести такі летальні випадки, причиненою яких стає активація певної закладеної в організм програми.

Найпростішим прикладом феноптозу може бути самознищення одноклітинних організмів унаслідок мутації їхньої ДНК

або через надкритичне зростання кількості їхніх клітин. Більш складними явищами феноптозу є загибель тварини, інфікованої небезпечними патогенами – дифтерійним токсином, бактеріями (у тих випадках, коли рівень інфекції надто високий); старіння організму (як засіб уберегти популяцію від накопичення шкідливих мутацій). В останньому випадку такі захворювання, як інфаркт, інсульт і рак (саме вони є найбільш частим смертельним станом людей похилого віку) можна розглядати як програмами самогубства організму [14].

Видавничо-поліграфічний
"Київський університет"
Версія не для друку

3. МЕХАНІЗМИ АПОПТОЗУ

3.1. ІНДУКТОРИ ТА ІНГІБІТОРИ АПОПТОЗУ

Cьогодні виявлено низку факторів, здатних активізувати чи сповільнювати розвиток апоптозу (табл. 3.1).

Індукторний сигнал, що викликає апоптоз, фактично є його причиною.

Індукція апоптозу може відбуватися при дії як зовнішніх, так і внутрішніх факторів за двома напрямками:

➤ через викликане індукторами апоптозу зростання входу кальцію всередину клітини;

➤ через підвищення експресії або розвитку мутації генів-активаторів апоптозу під впливом індуктора. Унаслідок підвищення експресії цих генів (тобто активації процесів біосинтезу білків, які ними кодуються) у клітинах, що підлягають апоптозу, синтезуються специфічні білки:

◆ *цистейнові протеази* (каспази). Представники – кальпайни, які необхідні для розщеплення білків цитоскелета, мембраних receptorів.

◆ *серинові протеази*. Представник – грамзин В/фрагментин, що є компонентом цитоплазматичних гранул, які секретуються цитотоксичними лімфоцитами. У тих же гранулах міститься пороутворювальний білок перфорин, який сприяє проникненню даних протеаз у клітини (підрозд. 3.3).

Біохімічні механізми апоптозу

Таблиця 3.1. Індуктори та інгібтори апоптозу

ІНГІБТОРИ АПОПТОЗУ		ІНДУКТОРИ АПОПТОЗУ		
Імовірні блокатори входу Ca^{2+} у клітину	Речовини, що діють на ядро клітини	Стимулятори входу Ca^{2+} у клітину	Речовини, що діють на ядро клітини	Інші механізми дії
Рилузол	Флупіртин	Глутамат	Глюкокортикоїди	Вільні радикали
Похідні аманадину	NGF (фактор росту нервів)	Аспартат	TNF (фактор некрозу пухлин)	Оксиданти
Zn^{2+}	Нейтральні амінокислоти	Дофамін	Білки теплового шоку	β -амілоїдний пептид, по-передник амілоїдного білка
Інгібтори протеаз	Естрогени	ВІЛ	Хіміотерапевтичні засоби (ци-сплатин, блеоміцин та ін.)	Етанол
Фенобарбітал	Андрогени	Іони Ca^{2+}		
	Вірусні гени: Аденовірус E1B Бакуловіруси p35 та IAP Cow-pox virus ctm A Epstein-Barr v. BHRF 1 African swine fever v. LMV5-HL Herpesvirus y1 34,5	Ацетат Pb		

У нервовій тканині зовнішня активація апоптозу найчастіше відбувається в результаті розвитку *ексайтотоксичності* ("збуджувальної токсичності" або "смерті від надмірного збудження" – ло-

кальної загибелі нервових клітин від токсичної дії збуджувального нейромедіатора глутамату). У цьому явищі першочергову роль відіграє іонотропний* NMDA-рецептор – високоспецифічний ліган-дзалежний Ca^{2+} -канал нейронів, що належить до родини іонотропних* глутаматних рецепторів.

Надмірна стимуляція NMDA-рецептора спричиняє посиленій вхід Ca^{2+} у клітину з наступною генерацією вільних радикалів (NO, ROS), руйнуванням потенціалу внутрішньої мітохондріальної мембрани, стимуляцією Ca^{2+} -залежних протеаз, утратою АТФ, що результується в апоптозі чи некрозі нейронів (залежно від розмірів ушкодження і швидкості поповнення пулу АТФ). Саме ці процеси і є проявами "збуджувальної токсичності" і включаються в патогенез уражень мозку при ішемії, церебральних дегенераціях, а також, можливо, у патогенез вірусних і пріонових енцефалітів. При вірусних енцефалітах можлива і пряма індукція апоптозу вірусними протеїнами.

Віковалежне зростання мембраноасоційованого оксидативного стресу і мітохондріальна дисфункція пришвидшують надмірний вхід Ca^{2+} через NMDA-рецептори в дендритах дофамінергічних нейронів. Ca^{2+} зв'язується з кальмодуліном, що активує nNOS – нейрональну NO-синтазу і результується в продукції NO (рис. 3.1). Метаболіти NO здатні дифундувати на дуже невеликі відстані (у середньому кілька мікрометрів), що і визначає ареал токсичної дії глутамату.

Серед можливих впливів NO в нейронах – пошкодження функцій протеасом унаслідок S-нітрозилювання; при цьому в нейронах накопичуються ті білки, що в нормі руйнуються протеасомами (напр., неправильно зібраний паркін). NO також може руйнувати білки внаслідок його взаємодії із супероксид-аніоном з утворенням пероксинітриту (OONO^-).

*С два типи регуляції діяльності іонних каналів: іонотропний та метаботропний. При іонотропній регуляції рецептор і канал є єдиною макромолекулою – у цьому випадку і говорять про іонотропний рецептор. Якщо до такого рецептора приєднується медіатор, то конформація всієї макромолекули змінюється таким чином, що в центрі каналу утворюється пора, і крізь неї проходять іони.

При метаботропному варіанті регуляції рецептори напряму не зв'язані з каналом; приєднання медіатора та відкриття каналу при цьому розділені кількома проміжними етапами (зокрема, за участю G-білків і вторинних месенджерів).

Біохімічні механізми апоптозу

Апоптоз може також індукуватися під впливом різних хімічних, фізичних або біологічних факторів, таких як іонізуюче випромінювання (ультрафіолет, γ -промені), гіпертермія (білки теплового шоку), гіпоксія, відсутність або, навпаки, наявність певних гормонів чи цитокінів, активація спеціальних клітинних антigenів, хіміотерапевтичні засоби (цисплатин, блеоміцин та ін.).

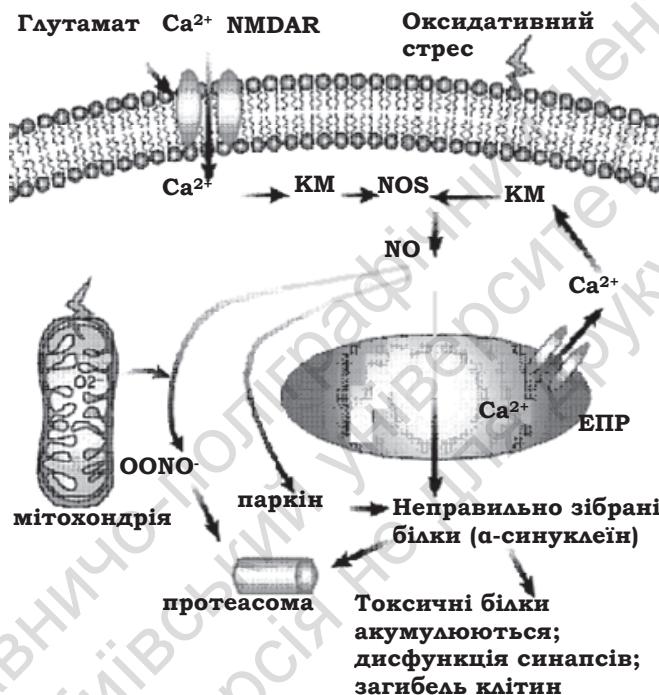


Рис. 3.1. Механізми ексайтотоксичності

Порушення контактів між клітинами в тканині чи органі зданте спричинити апоптоз, опосередкований інтегринами – мембраними білками, задіяними в адгезії клітин. Більшість інтегрінів специфічно взаємодіють з трипептидним мотивом *аргінін-гліцин-аспарагінова кислота*, який входить до складу білків по-заклітинного матриксу. Розчинні позаклітинні низькомолекулярні *аргінін-гліцин-аспарагінова кислота-вмісні пептиди* є ефективними індукторами апоптозу: проникаючи в клітину, вони активують каспазу-3 (підрозд. 3.4).

Є думка, що тип загибелі клітини (некроз чи апоптоз), імовірно, визначається *рівнем і тривалістю* дії *індукуючих агентів* і значно меншою мірою – *їхньою природою*. Крім того, важливе значення в індукції апоптозу мають такі фактори, як фаза клітинного циклу, метаболічна активність клітини, стадія розвитку організму та ін.

Інгібування апоптозу, подібно до індукції, теж може відбуватися за двома напрямками:

➤ впливаючи на вхід кальцію до клітини (у випадку інгібування – блокуючи його, таким чином діють рилузол, похідні аманадину, цинку, інгібітори протеаз, фенобарбітал);

➤ впливаючи на ядро клітини (флуорпротин, фактор росту нервів, нейтральні амінокислоти, естрогени, андрогени, деякі вірусні гени).

Суттєву роль в індукції чи гальмуванні апоптозу відіграють нейротрофічні фактори. Фактор росту нервів (NGF), мозковий нейротрофічний фактор та інсулінозалежній фактор росту гальмують апоптоз при нейродегенеративних захворюваннях. Стимулюючий вплив на апоптоз мають такі цитокіни, як інтерферони γ і α людини, а також фактор некрозу пухлини α (TNF α).

3.2. ГЕНЕТИЧНІ МЕХАНІЗМИ РЕАЛІЗАЦІЇ АПОПТОЗУ

У геномі будь-якої клітини є гени, що реагують на дію індукторів чи інгібіторів апоптозу і відповідно є активаторами чи блокаторами цього процесу.

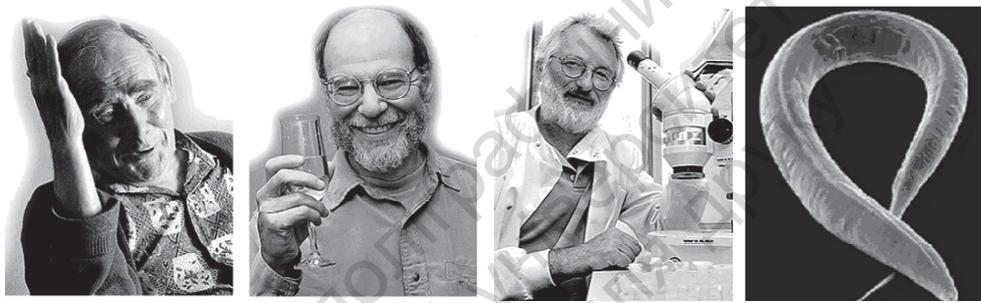
3.2.1. Нематода – перший об'єкт дослідження апоптозу

У 2002 р. Нобелівським комітетом з фізіології та медицині було присуджено премію трьом дослідникам – С. Бренеру, Х. Хорвицю та Дж. Салстону (рис. 3.2, А–В) – за відкриття в галузі генетичної регуляції розвитку органів і запрограмованої загибелі клітини. Той факт, що онтогенез є під генетичним контролем, навряд чи міг когось здивувати навіть у вже далекі 70-ті рр. ХХ ст. Такий контроль повинен був існувати, і відкрив його Бренер. Два інших "nobелівці" виявили "гени загибелі".

Генетичні та молекулярні механізми апоптозу були вперше охарактеризовані в кінці 80-х – на початку 90-х рр. у дослідах на нема-

Біохімічні механізми апоптозу

тоді *Caenorhabditis elegans* (рис. 3.2, Г). Вибір цієї мікроскопічної (1 мм) істоти був обґрунтований тим, що, по-перше, вона швидко (за 3 дні) досягає статевої зрілості та живе близько двох тижнів. По-друге, у ній легко викликаються мутації після впливу мутагену етилметилсульфонату, вона є гермафродитом, крім того, ця нематода є прозорою і спеціальна оптика дозволяє спостерігати апоптозну загибелю у живому організмі. Тому було досить легко дослідити долю кожної з її 959 клітин у процесі розвитку від заплідненої яйцеклітини аж до дорослої нематоди. Крім того, використовуючи мутаген, С. Бреннер отримав мутації, що зупиняють розвиток окремих етапів онтогенезу, та ідентифікував гени, що відповідають за них.



А

Б

В

Г

Рис. 3.2. А – Сідней Бреннер народився 1927 р. в Південній Африці.

У 1954 р перейхав до Великобританії й став працювати в Оксфордському університеті. Незабаром він увійшов до числа провідних молекулярних біологів країни, працював у групі Ф. Кріка, одного з відкривачів структури ДНК. У наш час працює в США, в Інституті Молекулярних досліджень (Molecular Science Institute).

Б – Роберт Хорвиць народився 1947 р. у США. Деякий час працював у Гарвардському університеті. У 1978 р. перейшов до Массачусетського технологічного інституту.

В – Джон Салстон народився 1942 р. у Великобританії.

Після кількох років роботи в одному з каліфорнійських інститутів (Salk-Institute) працював у Великобританії в Консульстві медичних досліджень (Medical Research Council).

Із 1992 р. є директором Центру Сенгера (Sanger Centre) в Кембриджі, де вже зробив великий внесок у розшифровку геному людини.

Г – Нематода *Caenorhabditis elegans* – перша модель для дослідження механізмів апоптозу

Дж. Салстон звернув увагу на те, що доросла нематода повинна була б мати 1090 клітин, а не 959, тобто 131 клітина гине під час онтогенезу, встаючи на шлях запрограмованої загибелі (апоптозу). Він ідентифікував перший ген клітинного самогубства – *nuc-1* (від *nucleus* – ядро), що необхідний для деградації ДНК у клітині, що гине. У ті ж 90-ті рр. Х. Хорвиць продовжив досліди Бреннера та відкрив гени *ced-3* і *ced-4* (від *cell death* – клітинна загибель), що необхідні для клітинного самогубства. Надалі Хорвиць описав також ген *ced-9*, який утримує клітину від апоптозу, поки не надійшов час, а також виявив гомологічні гени у вищих тварин та людини.

Дослідження на *C. elegans* показали, що апоптоз складається із чотирьох послідовних етапів:

- 1) поштовх до загибелі внутрішньо- чи зовнішньоклітинними тригерами;
- 2) клітинна екзекуція шляхом активації внутрішньоклітинних протеаз;
- 3) поглинання залишків клітини іншими клітинами;
- 4) деградація клітинних залишків за участю лізосом фагоцитарних клітин.

Ці етапи, а також гени, які регулюють їх, є консервативними протягом еволюції тварин, від черв'яка до людини.

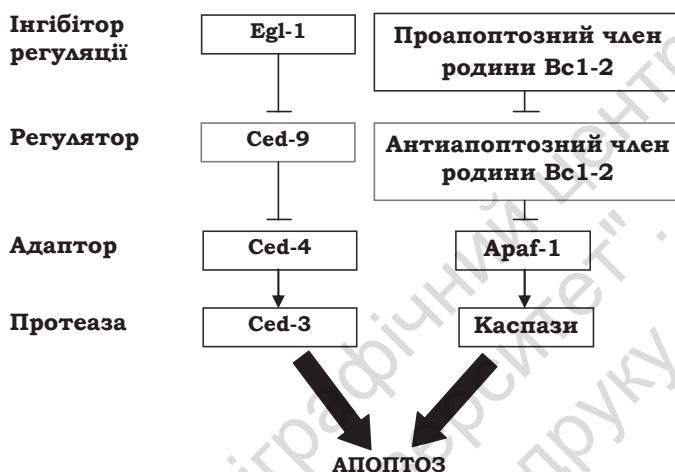
Існують чотири ключові гени, що запускають клітинну загибель у нематоди, і кожен із них має гомолога в організмі ссавців:

<i>C. elegans</i>	Ссавці	Ефект
<i>ced-3</i>	1. Ген, що відповідає за синтез каспази-1(ICE) 2. Ген, що відповідає за синтез каспази-3 (апопаїну)	Проапоптозний ефект
<i>ced-4</i>	Ген, що відповідає за синтез АРАФ-1	Проапоптозний ефект
<i>ced-9</i>	Ген, що кодує відповідний білок – член родини Bcl-2	Антиапоптозний ефект
<i>egl-1</i>		Проапоптозний ефект

Білкові продукти генів *ced-3*, *ced-4* та *egl-1* у *C. elegans* (та їхні гомологи у ссавців) є необхідними для клітинного знищення при

Біохімічні механізми апоптозу

апоптозі, а продукт гена *ced-9* (та *bcl-2* у ссавців – від *B-cell lymphoma/leukemia*, *B*-клітинна лімфома-лейкемія) запобігає апоптозу, інгібуючи активацію *ced-3* і *ced-4* (рис. 3.3).



**Рис. 3.3. Консервативність апоптозної програми в еволюції.
Білкові продукти генів розвитку апоптоза
у *C. elegans* та їхні гомологи у ссавців**

Білковий продукт гена *ced-3* має два гомологи у ссавців, усі вони є цистеїновими протеазами (каспазами, підрозд. 3.4). Він розщеплює попередник інтерлейкіну 1 β (IL-1 β) з утворенням зрілої форми цього цитокіну. Враховуючи таку специфічність дії, цей білок був названий ICE (від *interleukin-1 β -converting enzyme* – фермент, що *перетворює* IL-1 β), а за новою термінологією зветься *каспазою 1*. Відомо, що IL-1 β є одним з головних посередників у біологічній відповіді клітин на мікробну інфекцію, запалення, імунологічні реакції та пошкодження тканин.

У 1995 р. був установлений ще один ген, гомологічний гену *ced-3* нематоди та ICE ссавців. Показано, що продукт цього гена – *апопаїн* (нова назва – *каспаза 3*) також є цистеїновою протеїназою, мішенню для якої служить полі-(АДФ-рибозо)-полімераза (PARP), фермент, що бере участь у процесах репарації ДНК. Його альдегідний інгібітор запобігає апоптозній події *in vitro*.

Гомолог білкового продукту гена *ced-4*, який індукує апоптоз, має назву *фактор активації апоптичних протеаз-1* (Araf-1) (від *Apopotic Protease Activating Factor-1*). Коли мітохондріальний білок цитохром с зв'язується з Araf-1, Araf-1 здатний зв'язуватися й активувати прокаспазу-9, ініціюючи каспазний каскад (підрозд. 3.4). Araf-1 може також зв'язуватися з антиапоптозними Ced-9 гомологами Bcl-2 родини, які можуть віддаляти Araf-1 від каспази-9, тобто блокувати апоптоз.

23 % структурної гомології з описаним вище геном *ced-9* нематоди має ген *bcl-2* ссавців. Установлено, що експресія гена *bcl-2* людини здатна запобігати загибелі клітин у *C. elegans*, що свідчить про високий ступінь функціональної консервативності цього гена.

Ген *bcl-2* був відкритий у 1985 р. Й отримав свою назву від В-клітинної лімфоми/лейкемії (*B-cell lymphoma/leukemia*), під час якої спостерігається його гіперекспресія.

У клітинах з надлишком білка Bcl-2* спостерігається стійкість до індукції апоптозу.

3.2.2. Родина генів *bcl-2*

Крім *bcl-2*, який є інгібітором апоптозу, до родини *bcl-2* належать інші гени, що як блокують апоптоз, так і активують його. Відповідно, унаслідок їхньої експресії синтезуються антиапотозні або проапоптозні білки (табл. 3.2).

Члени родини Bcl-2 можуть активувати чи інгібувати апоптоз, індукований певними впливами, такими як відсутність ростового фактора (індукує апоптоз), але вони не завжди спрацьовують при інших видах сигналу загибелі, наприклад, при Fas-шляху в певних типах клітин.

Білки цієї родини – а їх у ссавців відкрито близько 30 – характеризуються наявністю у своєму складі гомологічних а-спіральних доменів, так званих *Bcl-2-гомологічних доменів* (BH1, BH2, BH3, BH4 – від *Bcl-2 homology*). Члени проапоптозної групи поді-

*Тут і далі: коли йдеться про ген – його назва пишеться курсивом і з малої літери (напр., *bcl-2*); у випадку відповідного білка – звичайним шрифтом і з великої букви (Bcl-2)

Біохімічні механізми апоптозу

ляються на два підкласи: Вах-підклас (Bax, Bak, Bok), які містять три домени – BH1, BH2, BH3, та підклас білків, які мають лише BH3-ділянку (Bid, Bim, Bik, Bad, Bmf, Bcl-x_S, Hrk, Noxa, Puma, Blk, BNIP3, Spike). До антиапоптозної групи, крім власне Bcl-2, відносять Bcl-x_L, Bcl-w, A1, Mct-1, які містять усі вказані домени (BH1–BH4) (рис. 3.4).

Таблиця 3.2. Про- і антиапоптозні білки родини Bcl-2

Антиапоптозні білки	Проапоптозні білки	
	Вах-підклас	Підклас білків, які мають лише BH3-ділянку
Bcl-2	Bax	Bid
Bcl-x _L	Bak	Bad
Bcl-w	Bok/Mtd	Bik
Bcl-B	Bcl-x _S	Bim
Boo		Hrk
A1		Noxa
NR13		Bcl-G
Mct1		BNIP3
		NIX

Вважають, що Bcl-2 та інші антиапоптозні члени цієї родини функціонують, регулюючи іонний потік через мітохондрію та стабілізуючи мембраний потенціал (підрозд. 3.4), регулюючи вивільнення цитохрому с, зв'язуючи та інгібуючи проапоптозні члени родини, Araf-1, інгібуючи перекисне окиснення ліпідів, впливаючи на кальцієвий гомеостаз, швидкість гідролізу АТФ. Проапоптозні члени родини Bcl-2 діють, димеризуючись і транслокуючись до мітохондрії (Bax), індукуючи звільнення цитохрому с із мітохондрій (Bid).

Регуляція апоптозу залежить від співвідношення між про- та антиапоптозними білками родини Bcl-2, зокрема найголовнішими її членами – власне Bcl-2 і Bax (рис. 3.5).

Експресія Bcl-2 присутня в усіх тканинах під час ембріогенезу, але в дорослих тканинах, асоційованих із тривалим життям (зокрема, у стволових клітинах і проліферативних ділянках), вона стає більш обмеженою.

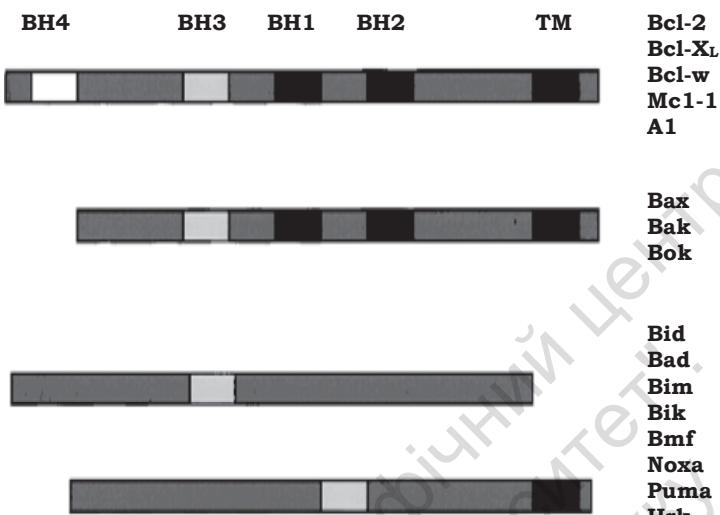


Рис. 3.4. Будова та класифікація білків родини Bcl-2

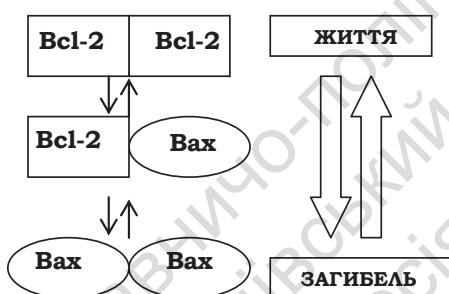


Рис. 3.5. Регуляція апоптозу та виживання клітин найголовнішими білками родини Bcl-2

Для вивчення ролі певних генів застосовують досліди на так званих "нокаутованих" миших ("knockout mouse") – це генетично модифікована лінія мишей, у яких "виключений" весь ген, що досліджується, або його частина. Це спричиняє втрату білка, за синтез якого відповідає даний ген, або зміну його функцій (табл. 3.3). Оскільки людина та миша мають близько 99 % гомології в генах, "нокаутовані" миші

можуть використовуватися як лабораторні моделі захворювань людини. Цей метод розроблено М. Евансом, О. Смітісом, М. Капеччі, які в 1989 р. отримали першу "нокаутовану" тварину, а в 2001 р. за ці дослідження їм було вручено премію Albert Lasker Award за базисні медичні винаходи. На наш час вивчено виключення більше ніж 4000 із 35 000 генів миши, і на основі цього отримано близько 500 моделей патологій людини (напр., chk1(-/-) – модель із "нокаутом"

Біохімічні механізми апоптозу

чекпойнт-кінази). Сьогодні нокаутовані миші використовуються тисячами вчених як в академічних інститутах, так і в галузі фармацевтично-біотехнологічної індустрії.

Таблиця 3.3. Фенотипи мишей, "нокаутованих" (дефіцитних) за компонентами ключових шляхів апоптозу

Ген, що відповідає за синтез:	Фенотип
♦ Каспаз:	
Каспаза-1	Життєздатні; редукований апоптоз тимоцитів шляхом мембрano-асоційованої клітинної загибелі; резистентні до ендотоксичного шоку при бактеріальному сепсисі
Каспаза-2	Життєздатні; редукований апоптоз ооцитів і лімфобластів; посилений апоптоз мотонейронів
Каспаза-3	Летальні наслідки на 3–5-му тижнях життя; дефектний апоптоз нейронів і формування нервової системи, а також антиген-індукований апоптоз Т-лімфоцитів
Каспаза-6	Змін у фенотипі не виявлено
Каспаза-7	Загиbelь на ранніх етапах ембріонального розвитку. Причина досі не описана
Каспаза-8	Дефекти в розвитку серця з летальністю на 12,5 ембріональний день (Е12,5). Неможливість апоптозу за участю мембраних рецепторів загибелі TNF α i Fas
Каспаза-9	Перинатальна загиbelь (тобто в період останніх днів внутрішньоутробного розвитку і перших днів після народження). Блокується нейрональний апоптоз і формування нервової систем
Каспаза-11	Життєздатні; резистентні до ендотоксичного шоку
Каспаза-12	Життєздатні; знижені деякі апоптозні процеси в організмі
♦ Мітохондріасоційованих білків:	
Цитохром c	Летальні наслідки всередині періоду внутрішньоутробного розвитку через дефекти в процесах окисного фосфорилювання
Araf-1	Перинатальна смерть. Блокується нейрональний апоптоз і формування нервової системи
Smac/Diablo	Не виявлено очевидних змін

3. Механізми апоптозу

Продовження табл. 3.3.

Ген, що відповідає за синтез:	Фенотип
◆ Антиапоптозних білків родини Bcl-2: Bcl-2 Bcl-x _L	Зростає апоптоз лімфоцитів, гіпоплазія тимусу, прогресуюча загибель нейронів; гіпопігментація, гальмування розвитку лімфатичної системи, нирок Летальні на Е13. Масивний апоптоз нейрональних, печінкових і гемопоєтичних клітин
◆ Проапоптозних білків родини Bcl-2: Bax Bid	Гіперплазія Т- і В-клітин; ненормальний розвиток яйцеклітин і дозрівання сперматозоїдів Життєздатні; зростає резистентність до Fas-L-індукованого апоптозу печінкових клітин. Редуковане звільнення цитохрому с та активація каспаз 3, 6 і 7
◆ Рецепторів клітинної загибелі: TNF-R1 Fas-L (ліганд) Fas-R (рецептор)	Життєздатні; дефектний лімфоїдний органогенез, присутні автоімунні тенденції, резистентність до TNFa-індукованого апоптозу Життєздатні; лімфопроліферативні та автоімунні розлади Життєздатні; лімфопроліферативні та автоімунні розлади
◆ Білків-адаптерів: FADD TRAF-2 RIP	Дефекти в розвитку серця, що спричиняють ембріональну летальність (Е12,5). Унеможливлений TNFa-R-, Fas-R-, DR-3-опосередкований апоптоз фібробластів Постнатальна загибель. Утрата Т- і В-клітин-попередників, зростання чутливості до TNFa-L-індукованого апоптозу через редукцію JNK-активації Постнатальна загибель. Апоптоз лімфоїдних тканин

Біохімічні механізми апоптозу

Закінчення табл. 3.3.

Ген, що відповідає за синтез:	Фенотип
♦ IKK (I κ B-kinase)	Ембріональна загибель самців через апоптоз печінки внаслідок суттєвого гальмування розщеплення I κ B та, відповідно, активації NF- κ B
♦ Інгібіторів і регуляторів апоптозу: XIAP Сюрвін	Жодних змін у фенотипі не виявлено, оскільки така втрата компенсується функціонуванням c-IAP-1 та c-IAP-2 Ембріональна летальність гомозигот. У гетерозигот зростає чутливість до Fas-L-індукованого апоптозу гепатоцитів
♦ Каспаза-незалежних ефекторів апоптозу: AIF Катепсин В	Зростання чутливості до оксидативного стресу Зростання резистентності до TNF α -індукованого апоптозу
♦ p53	Швидке зростання можливості спонтанного виникнення пухлин (лімфом і сарком)

bcl-2-дефіцитні миші, будучи зовні відносно нормальними при народженні, мають різке гальмування в розвитку лімфатичної системи та нирок і з часом утрачають меланоцити. При надекспресіях цього гена, навпаки, зростає виживаність В-клітин і настає велика ймовірність виникнення В-клітинної лімфоми. Є дані, що надлишок Bcl-2-білка гальмує апоптоз, ініційований c-Myc та p53 (підпідрозд. 3.2.3 та 3.2.4), через зниження вмісту у клітинах цих білків. Крім того, Bcl-2 може взаємодіяти з Bax – проапоптозним членом родини – і зв'язувати його, запобігаючи утворенню в зовнішній мітохондріальній мембрані пор і виходу з мітохондрій проапоптозних факторів. Таким чином, зростання експресії *bcl-2* може стати

причиною резистентності до хіміо- та радіотерапії. Фосфорилювання Bcl-2 під час деяких стадій клітинного циклу інгібує його активність.

Ген *bcl-x* – інший член даної родини – забезпечує транскрипцію двох продуктів – Bcl-x_L (від *long* – довга форма) та Bcl-x_S (від *short* – коротка форма). Білок Bcl-x_L має 233 амінокислоти та ділянки, подібні до Bcl-2; він гальмує апоптоз унаслідок зв'язування Araf-1, що унеможлилює активацію прокаспази-9. Bcl-x_S має 170 амінокислот і є проапоптозним фактором.

У відповідь на стимул загибелі проапоптозні члени активуються транскрипційною регуляцією (Bax, Noxa, Puma), субклітинною транслокацією (Bim, Bmf), дефосфорилюванням (Bad), протеолізом (Bid).

Проапоптозний білок Bad, зв'язуючись із Bcl-x_L, знижує його активність. Фосфорилювання цього білка за участю фосфатидилінозитол-3-кінази веде до його інактивації й до активації апоптозних шляхів – цей механізм є потенційно важливим регулятором сигналу виживання клітини.

Ше один проапоптозний член родини Bcl-2 – Bax – також може зв'язуватися з антиапоптозними білками Bcl-2 та Bcl-x_L, запобігаючи їхній здатності протектувати клітини від загибелі. Експресія *bax* транскрипційно активується впливом p53.

Проапоптозний фактор Bid є основною мішенню Fas-опосередкованого апоптозу (підрозд. 3.3), активується каспазою-8 і може зв'язуватися з білками Bcl-2, Bcl-x_L, Bax, поєднуючи зовнішньоклітинний запуск загибелі з мітохондріальними подіями й активацією каспаз. Він активує Bax, інгибує Bcl-2, але не діє на димер Bcl-2/Bax. Фосфорилювання захищає Bid від його активації каспазою-8.

Антиапоптозні білки цієї родини є первинними мішенями дії каспаз: каспаза-3 розщеплює Bcl-2 та Bcl-x_L; при цьому не лише інгібується їхня антиапоптозна активність, але й утворюються їхні проапоптозні COOH-кінцеві фрагменти. Каспаза-8 розщеплює Bid, активуючи його COOH-кінцеву ділянку, яка сприяє вивільненню цитохрому *c* із мітохондрій.

3.2.3. Роль гена p53 як регулятора клітинного циклу і транскрипційного фактора в розвитку апоптозу

Білок p53 (рис. 3.6), що є продуктом відповідного гена, постійно синтезується клітинами, хоч і дуже швидко деградує.

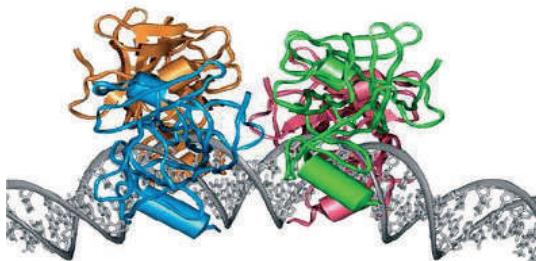


Рис. 3.6. Просторова структура білка p53 і зв'язування p53 із ДНК.

Тетramer p53 (жовта, блакитна, зелена й рожева субодиниці) зв'язується з ДНК (сіра) і впливає на експресію p53-залежних генів

Коли в клітині відбувається пошкодження ДНК (унаслідок дії хіміотерапевтичного агента або γ -випромінення), то деградація білка p53 закінчується і він починає функціонувати. У відповідь на пошкодження ДНК білок p53 індукує зупинку клітинного циклу. Продукт гена p53 має мол. масу 53кДа і складається із 392 амінокислотних залишків. Він утворює тетрамерний комплекс, здатний регулювати транскрипцію

низки генів, що мають у своєму складі специфічні послідовності ДНК, так звані p53-респонсивні елементи. У молекулі p53 виділяють кілька функціональних доменів, що відіграють важливу роль у здійсненні чи регуляції його активності (рис. 3.7).

N-кінцева ділянка (амінокислоти 1–42) відповідає за транскрипційну активацію генів-мішеней. Крім того, цей домен бере участь у білок-білкових взаємодіях, що регулюють стабільність молекули p53. I, нарешті, у ньому локалізовано кілька залишків серину і треоніну, фосфорилювання яких регулює активність p53. Центральний домен p53 (амінокислоти 120–290) безпосередньо розпізнає і зв'язує специфічні послідовності ДНК генів, які регулюються – p53-респонсивні елементи, що складаються з розташованих одна за одною послідовностей із загальною структурою типу PuPuC(A/T)(A/T)GPyPyPy (Pu – пурин, Py – піримідин). Саме в цьому ДНК-зв'язуючому домені локалізується більшість точкових мутацій, присутніх у різноманітних пухлинах людини. Далі містяться ділянки, що відповідають за ядерну

локалізацію (амінокислоти 305–323) та димеризацію/тетрамеризацію молекул p53 (амінокислоти 323–356). С-кінцева ділянка p53 (амінокислоти 363–392) є так званим інгібіторним доменом. У немодифікованому стані він запобігає посадці ДНК-зв'язувального домену на специфічну послідовність гена, який регулюється.

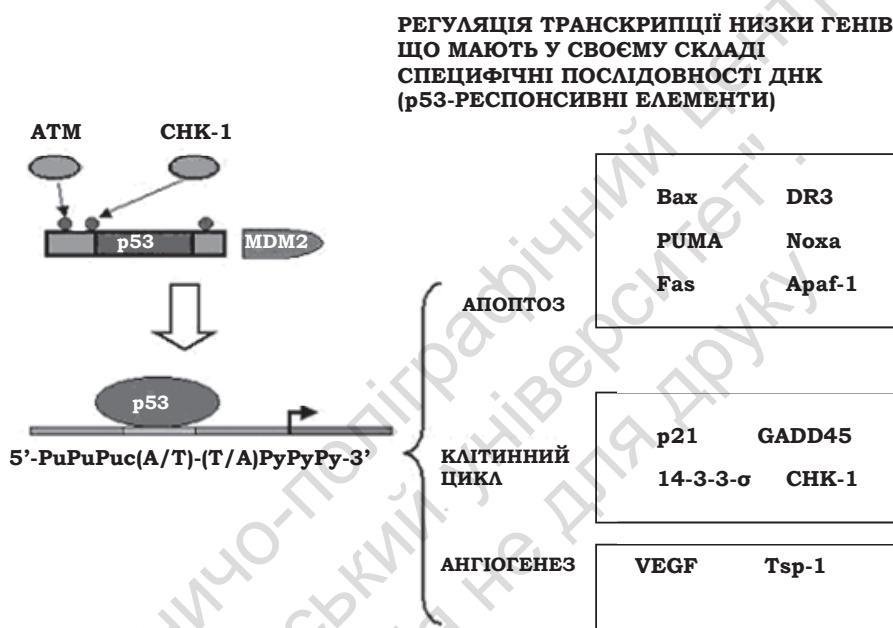


Рис. 3.7. Будова та регуляція експресії гена p53

У звичайних (нестресових) умовах практично весь p53 інактизується білком, що кодується протоонкогеном *mdm2* (*murine double minute 2*) (рис. 3.7). Білок Mdm2 є p53-специфічною убіквітин-лігазою (підрозд. 3.5); крім того, при зв'язуванні з p53 він екранує його N-кінцевий трансактиваційний домен. У результаті, незважаючи на постійну транскрипцію і трансляцію гена *p53*, утворений білок швидко підлягає убіквітин-залежній деградації. Не проявляє активності й та частина загального p53, що не встигла розщепитися [18].

Після виникнення пошкоджень ДНК білки родини фосфатидилінозитол-3-кінази (PI3K) фосфорилюють p53 за залишком серину¹⁵ (Ser-15). За іншими залишками цієї амінокислоти (Ser-20, Ser-33, Ser-37), а також і в п'ятнадцятому положенні фосфорилювання можуть здійснювати чекпойнт-кінази Chk1 та Chk2 (від *checkpoint* – контрольна точка, в якій клітинний цикл призупиняється, щоб перевірити, чи присутні дефекти у ДНК клітини) (рис. 3.7, 3.8). Унаслідок таких модифікацій конформація N-кінцевої ділянки p53 змінюється так, що він утрачає здатність зв'язувати Mdm2. Таким чином, p53 стабілізується в ядрі й набуває здатності зв'язувати низку транскрипційних факторів. У той же час після зазначених змін N-кінцевої ділянки транскрипційна активність p53 залишається невисокою. Для посилення транскрипційної активності модифікується С-кінець p53, що відповідає за зв'язування з ДНК. Ці зміни ініціюють дефосфорилювання Ser-376, яке теж є наслідком пошкоджень ДНК.

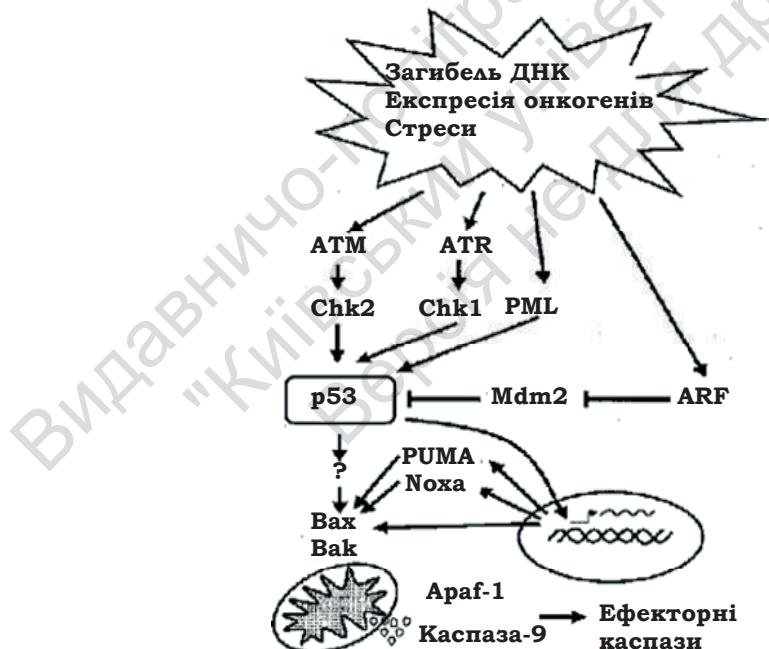


Рис. 3.8. Механізми функціонування білка p53

Після зазначених змін у структурі С-ділянки білка p53 із цією ділянкою зв'язуються білки родини 14-3-3, унаслідок чого p53 набуває конформації, в якій його С-кінцеві залишки лізину можуть ацетилюватися. Ацетилювання цих груп значно підвищує спорідненість p53 до ДНК, його транскрипційна активність зростає і запускається експресія генів-мішеней [18].

До активації p53 також може привести ATM-залежна стабілізація (від "*ataxia-telangiectasia mutated protein*" – білок, мутованний за комплексного захворювання, що характеризується симптомами атаксії і телангіоектезії), наприклад, у відповідь на радіоактивне випромінювання чи хіміотерапевтичні агенти – це основний механізм запуску клітинами p53-залежного апоптозу, який приводить до зупинки росту і супресії пухлин (рис. 3.8). Білок ATM має структурну схожість із фосфоінозитол-3-кіназою (PI3K, підпідрозд. 3.2.4) і накопичується в місцях ушкоджень, набуваючи кіназної активності при зв'язуванні фосфорилюваних білків хроматину та білків-сенсорів порушень структури ДНК. ATM активується у відповідь на виникнення дволанцюгових розривів ДНК, що викликаються гамма-випромінюванням, інгібіторами топоізомераз, і є резистентним до появи інших пошкоджень структури ДНК, зокрема зшивок основ унаслідок УФ-випромінювання або змін через дію алкінувальних агентів. В останніх випадках спостерігається функціональна активація гомолога ATM – білка ATR (ATM Related), активована форма якого також здатна фосфорилювати p53.

Індукувати активність p53 також здатні деякі онкогени, зокрема *c-myc* (підпідрозд. 3.2.4), тобто активація онкогенів не завжди результується в неконтрольованій проліферації клітин.

До мішеней p53, залучених до зупинки клітинного циклу, належать білки p21, GADD45, 14-3-3-сігма, Bax, Puma, Noxa, Apaf-1, Fas-R, DR5, які він активує, та Bcl-2 і Bcl-x_L, на які p53 має інгібіторний вплив.

Найважливіший представник білків p21-p21^{waf1}, подібно до GADD45, зупиняє клітинний цикл на стадіях G1 та G2. Зупинка клітинного циклу здатна викликати як апоптоз (через включення експресії проапоптозних білків Bax, Bid та інших проапоптозних механізмів), так і репарацію ДНК – остання може відбуватися

внаслідок активації білком p53 генів, залучених до репаративних процесів. p53 також підвищує експресію рецепторів загибелі (Fas-R та ін., підрозд. 3.3), деяких цитоплазматичних білків, що містять домени смерті (напр., PIDD – *p53-induced protein with a death domain (p53-індукований білок із доменом загибелі)*) та збільшує вміст білка Araf-1, який бере участь в активації апоптосоми і каспази-6, що специфічно розщеплює ядерні ламіни в процесі руйнування ядерної оболонки.

Існує й транскрипцієнезалежний шлях апоптозу за участю білка p53. При цьому зазначений білок транслокується до мітохондрій, де взаємодіє з Bcl-x_L, викликаючи зміну проникності мітохондріальної мембрани і вивільнення цитохрому с та інших проапоптозних білків.

У 1999 р. було виявлено, що p53 може індукувати апоптоз лізосомально-мітохондріальним шляхом, ініційованим лізосомальною дестабілізацією. Розрив лізосом є найбільш ранньою подією p53-залежного апоптозу, і подальша активація каспаз може відбуватися ферментами, звільненими із лізосом (підрозд. 3.6).

Мутовані p53-гени не викликають зупинки клітинного циклу при пошкодженні ДНК, що призводить до реплікації й розмноження мутованих клітин (напр., при пухлинних процесах). Так, при онкологічних захворюваннях у середньому в 50 % випадків спостерігають мутації в цьому гені (підрозд. 4.1).

3.2.4. Роль найважливіших онкогенів іprotoонкогенів у реалізації апоптозної програми

Наприкінці 70-х рр. ХХ ст. з вірусу саркоми курки було виділено перший онкоген, названий *src*. Незабаром виявили, що штучне введення гена *src* у генетичний апарат клітини трансформує її за відсутності вірусу, перетворюючи на пухlinну [1]. Це дозволило зробити висновок, що пухлинні віруси викликають пухлини не самі по собі, а шляхом внесення в генетичний апарат клітини онкогена та закріплюючи його в геномі клітини. Якщо онкоген видалити з генетичного апарату вірусу, то вірус втратить здатність до трансформування клітин зі збереженням спроможності розмножуватися та інтегрувати з геномом клітини.

Із часом відкрили вірусні онкогени *tus*, *ras*, *abl* та численні інші. Наступні дослідження виявили, що в усіх нормальніх клітинах є гени, дуже близькі за структурою до вірусних онкогенів – вони отримали назву protoонкогенів. У цьому випадку вірусні онкогени слід позначати, використовуючи букву "v" – від virus (напр., v-tus і v-ras), а відповідні protoонкогени – додаючи до назви онкогена літеру "c" (від cell), наприклад c-tus, c-ras.

Ці гени регулюють нормальну поведінку клітини – її відповіді на ростові фактори, на гормони, нормальний темп і число її поділів. Protoонкогени перебувають під жорстким і суворим контролем інших генів. Мутації protoонкогенів виводять їх із-під впливу контролюючих генів, роблять автономними. Зазвичай пухлинна дія різних канцерогенів спричиняє постійну, безперервну активність protoонкогена. Так, хромосомні транслокації призводять до того, що protoонкоген підпадає під контроль постійно діючого в даній тканині гена, і він працює без зупинки, не даючи клітині вийти із циклу поділів (*tus*), або надсилаючи безперервні сигнали з мембрани в ядро (*ras*), або спричиняючи синтез ростових факторів, які надсилаються для тієї ж клітини сигнали до поділу (автокринна стимуляція). Деякі пухлинні віруси самі по собі не містять онкогена, але після вбудовування в хромосому поряд із protoонкогеном активують його, викликаючи його безперервну активність ("вставний" канцерогенез). Канцерогенні речовини та опромінення мають високу мутагенну активність і викликають мутації в різних генах, у тому числі й у protoонкогенах. Ці мутації можуть вести або до порушення регуляції protoонкогена, і тоді він виходить із-під контролю, або до змін властивостей білка, що контролюється даним геном. Віруси вносять онкоген, що, як правило, не регулюється клітиною; крім того, цей ген викликає синтез "онкобілка" зі зміненими властивостями, і цей онкобілок уже викликає ті процеси, які визначають характерну пухлиногенну поведінку клітини. Активація онкогенів лежить в основі не тільки індукованих канцерогенними речовинами вірусами й опроміненням пухлин, але й пухлин спонтанних.

Таким чином, онкогени – це гени, які обумовлюють перетворення (трансформацію) нормальніх клітин на злоякісні, і попередником онкогенів є звичайні клітинні гени, у той же час дуже схожі на пухлинні – protoонкогени. У всіх формах раку мутованим є як мі-

німум один protoонкоген. Для зміни функцій protoонкогена зазвичай достатньо, щоб одна з його алелей перетворилася на онкоген. Таким чином, онкогени є домінантними відносно protoонкогенів. Прикладами онкогенів, зміни в яких характерні для багатьох типів раку, є *tus* і *ras*. Їхні функції протилежні функціям генів супресорів пухлинного росту. Пухлинні супресори – це клітинні гени, інактивація яких різко збільшує ймовірність виникнення новоутворень. Для втрати функції зазвичай дефектними мають бути обидві алелі гена пухлинного супресора. Тобто неактивні пухлинні супресори є рецесивними відносно нормально функціонуючих.

На наш час відкрито близько сотні потенційних онкогенів і приблизно двадцять пухлинних супресорів, найважливіші з них наведено в табл. 3.4. Дія онкогенів реалізується через онкобілки, що ними кодуються. Більшість відомих protoонкогенів і пухлинних супресорів є компонентами кількох загальних сигнальних систем, що контролюють цілісність геному, апоптоз, проліферацію та диференціацію клітин. Реалізація цих функцій онкогенів і пухлинних супресорів часто безпосередньо пов'язана з контролем клітинного циклу.

Регуляція клітинного циклу необхідна для контролю проліферації та диференціації клітин. Не менш важлива її роль і в збереженні цілісності геному. Якщо клітинний цикл не буде зупинений у клітинах, в яких уже відбулися чи можуть відбутися порушення структури або числа хромосом, викривлена генетична інформація може передатися нашадкам. Системи, здатні зупиняти клітинний цикл у певних точках у відповідь на різні ушкодження, отримали назву *чекпоінтів*.

Сигнальна система, що контролює пошкодження ДНК, складається з багатьох білків, різних за структурою та біохімічними функціями. Деякі з них виключно необхідні клітині/організму для розвитку – порушення у будові цих білків є летальними; мутанти за генами інших протеїнів наносять шкоду лише при виникненні сильних ушкоджень ДНК.

Із функціональної точки зору компоненти цієї системи поділяють на три класи: сенсори, датчики (transducers) та ефектори. Сенсорні білки знаходять пошкоджені ділянки ДНК і передають інформацію датчикам, які, у свою чергу, розподіляють її за різними ефекторами. Ефектори активують численні системи відпо-

3. Механізми апоптозу

віді на пошкодження ДНК: комплекс репараційних білків, механізми зупинки клітинного циклу в чекпойнтах і т. д.

Таблиця 3.4. Найважливіші онко- іprotoонкогени та пухлинні супресори, їхні функції

Protoонкогени	Онкогени	Функції онкобілка
Ген ростового фактора тромбоцитів – <i>pdgf</i>	<i>sis</i> – онкоген вірусу саркоми мавп	Ростовий фактор, аналог ростового фактора тромбоцитів
Ген рецептора епідермального фактора росту – <i>egf-r</i>	<i>erb-B</i> – онкоген вірусу еритробластоми птахів	Ушкоджений рецептор фактора росту, що безперервно надсилає сигнали до проліферації
Ген білка, що входить до системи передачі сигналу в клітину – <i>c-ras</i>	<i>v-ras</i> – онкоген вірусу саркоми та багатьох пухлин людини і тварин	Цитоплазматичний активований передавач сигналів до клітини, що спричиняє її проліферацію
Ген тирозинкінази – критичної ланки в системі передачі сигналу в клітину – <i>c-src</i>	<i>v-src</i> – онкоген вірусу саркоми птахів і ссавців	Активований передавач сигналів до клітини, що спричиняє її проліферацію
Ген ядерного транскрипційного фактора – <i>c-myc</i>	<i>v-myc</i> – онкоген вірусу лейкозу птахів та численних пухлин людини і тварин	Ядерний фактор, активність якого призводить до безперервного поділу клітини
Антионкогени	Трансформуюча форма	Функції білка
<i>rb</i> (від <i>retinoblastoma</i>)	<i>rb*</i> – мутація чи утрата	Ядерний білок, мутації якого спричиняють звільнення онкогенів і поділи клітин. Бере участь у виникненні численних пухлин людини
p53 (продукт гена p53 із М.м. 53кДа; у відповідь на пошкодження ДНК індукує зупинку клітинного циклу)	<i>p53*</i> – мутація чи інактивація	Ядерний білок. Мутація спричиняє безсмертя клітин, накопичення мутацій в геномі та клітинну проліферацію

Про детекцію пошкоджень є мало відомостей. Набагато більше даних про датчики сигналу – білки ATM і ATR (підпідрозд. 3.2.3). Численні ефектори також достатньо добре вивчено. Найважливішими ефекторами є чекпойнт-кінази та p53. При виникненні ушкоджень ДНК датчики ATM і ATR фосфорилюють чекпойнт-кіназу 2 (Chk2), у результаті чого відбувається її активація. Активована Chk2, у свою чергу, фосфорилює різноманітні мішені, серед яких і пухлинний супресор p53. Функції чекпойнт-кінази 1 (Chk1) вивчено менше, ніж Chk2, оскільки мутації гена *chk1* летальні й миши, дефіцитні по двох алелях *chk1* (*chk1*(-/-)), умирають у ранньому ембріогенезі через p53-незалежний апоптоз ембріональних стовбурових клітин. Проте виявлено, що клітини *chk1*(-/-) не здатні зупиняти клітинний цикл у постсинтетичній G2-фазі. Існують указівки на те, що Chk1 фосфорилює p53 *in vitro*. Водночас невідомо, чи відбувається цей процес *in vivo*.

Основні стимулятори клітинного циклу є компонентами сигнальних шляхів, що передають в ядро мітогенні сигнали від різноманітних ростових факторів. Найважливішими компонентами цих систем єprotoонкогени *ras* і *myc*. У той же час тільки гіперекспресії пропроліферативних сигнальних білків недостатньо для трансформації, оскільки в клітині є визначені системи контролю ростових сигналів. Принцип функціонування цих систем оснований на тому, що проліферативні сигнали не тільки стимулюють проліферацію, але й активують системи зупинки клітинного циклу й апоптозу. Найважливішу роль у контролі ростових сигналів відіграє p53. Конститутивна стимуляція проліферації стає можливою тільки у випадку, якщо порушується система контролю ростових сигналів (напр., унаслідок мутацій її компонентів). Лише тоді клітини починають рухатися по клітинному циклу. При цьому стимуляція клітинного циклу може бути настільки "агресивною", що пошкодження ДНК уже не будуть перепоною для входу в S-фазу та мітоз.

Нерегульована експресія *myc*-онкогена (від *oncogene of the MC29 avian myelocytomatosis virus* – онкоген вірусу міелоцитоматозу птахів MC29) ініціює проліферацію клітин і неопластичну трансформацію. Надекспресія *myc* виявляється в 50 % хворих на рак і часто асоційована з більш агресивними і швидко метастазуючими формами пухлин. Повноланцюговий білок с-Myc міс-

тить 439 амінокислот, локаційований в ядрі й має короткий період життя. Він функціонує як транскрипційний регулятор експресії низки генів, білкові продукти яких беруть участь у різноманітних клітинних процесах, включаючи індукцію проліферації, блокаду диференціації, активацію метаболізму та ініціацію апоптозу. У людини, крім власне *c-myc*, виявлено *L-myc* (від *small-cell lung carcinoma* – дрібноклітинна карцинома легень) і *N-myc* (від *neuroblastoma* – нейробластома). *c-myc* експресується як в ембріональних, так і в дорослих клітинах, тоді як *L-myc* і *N-myc* – лише у специфічних ембріональних і неонатальних тканинах (зокрема у мозку, легенях, печінці та нирках). Гіперекспресія онкогена *myc* може послаблювати роботу точки зв'язання (чекпойнта) в G1-фазі (пресинтетичній фазі). *myc*-залежний блок цього етапу спостерігається навіть у клітинах, що не мають явних дефектів у системі контролю ростових сигналів. Проте в цьому випадку ліквідація G1-чекпойнта не є небезпечною, оскільки клітини зупиняються в G2 (рис. 3.9).

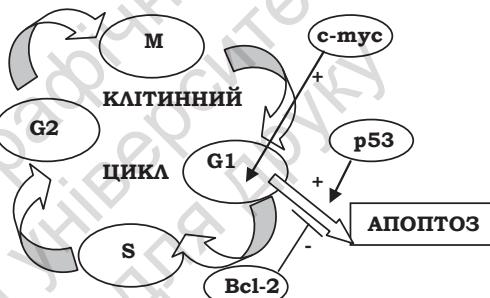


Рис. 3.9. Регуляція клітинного циклу та апоптозу білками *c-Myc* та *p53*

До того ж за нормального функціонування системи контролю проліферативних сигналів сильна гіперактивація *Myc* спричинить апоптоз. Механізми *Myc*-апоптозу поки залишаються гіпотетичними; припускають можливу участь у цих процесах стабілізації білка *p53*. *Myc* приєднується до промотора (регуляторної ділянки гена) гена *p21^{Cip}* – інгібітора кінази, яка "запускає" мітоз, у результаті чого блокується клітинний поділ. А надалі вже *p53* "вирішує" долю клітини: чи виправляти похибки, які виникли при подвоєнні ДНК, чи стимулювати апоптоз.

Продукти, що кодуються протоонкогенами *ras* (від *rat sarcoma* – саркома щура), належать до родини низькомолекулярних G-білків. Усі вони є одноланцюговими поліпептидами довжиною у 189 амінокислотних залишків і зв'язані з плазматичними мем-

бранами клітин. Вони зв'язують гуанінові нуклеотиди (ГТФ і ГДФ) і є ГТФ-азами, що гідролізують ГТФ до ГДФ.

У ссавців є три майже ідентичні *c-ras*-гени, що кодують білки з молекулярною масою 21 кДа (тому ці білки також відомі під загальною назвою *p21*-білки): *N-ras*, *Ha-ras* і *Ki-ras*. Назви двох останніх походять від штамів вірусу, в яких виявлено гомологічні вірусні онкогени: *Harvey* та *Kirsten*. Гомолога першого гена у вірусів не знайдено. Як структури, так і функції цих білків є висококонсервативними в еволюції: білки ссавців можуть замінити Ras-білки в дріжджах.

Показано, що ці білки регулюють проліферацію клітин і залучені до процесів метастазування пухлини. Пухлинні клітини містять мутантні форми генів *c-ras*, які активують численні внутрішньоклітинні ГТФ-залежні сигнальні системи, у тому числі пов'язані з тирозинкіназними рецепторами та мембраними G-білками. Характерний механізм передородження *c-ras* – точкові мутації (напр., за амінокислотними залишками 12, 61). Проліферативний сигнал від білка Ras проходить через ланцюг молекул-передатчиків сигналів (MAP-кіназний каскад) (підрозд. 3.7). Клітини з дефіцитом p53, в яких гіперактивований онкоген *ras*, майже не зупиняються в G1- та G2-чекпойнтах при пошкодженнях ДНК. При недрібноклітинному раку легень у 20–30 % хворих спостерігають точкову мутацію гена *ras*. Вважають, що така мутація виникає через дію нітрозамінів тютюнового диму.

Є думки, що препарати, здатні блокувати Ras-залежні сигнальні шляхи, можна буде з успіхом застосовувати з метою терапії багатьох онкологічних захворювань. Конститутивна (постійна) експресія онкогена *ras* ініціює одночасно й апоптогенні, і антиапоптогенні сигнали. Перші зумовлені активацією сигнального шляху Ras – Raf – MAPK – p53, другі пов'язані як зі здатністю одного з ефекторів Ras – білка Raf – прямо фосфорилювати та інактивувати проапоптотичний білок Bad (член родини Bcl-2), так і з дією іншого ефектора Ras – PI3K.

Гени, що кодують Raf-білки (подібно до *c-ras*-генів) також є protoонкогенами. Через це Raf-кінази є потенційними мішенями для нових напрямків антипухлинної терапії. Родина Raf-білків (від *V-Raf-1 Murine Leukemia Viral Oncogene Homolog* – гомолог вірусного онкогена лейкемії миші *V-Raf-1*) – це три серин/ треоні-

нові протеїнкінази, що кодуються генами *c-raf* – *A-raf*, *B-raf* і *c-raf-1*. Каталітичний домен протеїнкінази Raf міститься в С-кінцевій ділянці молекули, а N-кінцева має регуляторний домен, необхідний для взаємодії з Ras-білками. Крім того, молекули Raf мають кілька сайтів для фосфорилювання іншими протеїнкіназами. Усі три кінази беруть участь у передачі сигналу на MEK/ERK-каскад (підрозд. 3.7). Усередині цього каскаду Raf взаємодіє з MEK1 своєю С-ділянкою та із Ras – N-кінцем. Дисрегуляція ERK включається в патогенез близько 30 % онкологічних захворювань. Ізоформи Raf-білків відрізняються за своєю здатністю взаємодіяти з Ras та активувати ERK-каскад. Так, A-Raf-дефіцитні миші народжуються живими, хоч і мають деякі нейрологічні та інтестинальні дефекти. Навпаки, B-Raf і c-Raf-1-дефіцитні ембріони гинуть усередині внутрішньоутробного періоду і мають ознаки васкулярних геморагій та апоптозної загибелі диференційованих ендотеліальних клітин, а для c-raf-1-дефіцитних ембріонів, крім того, характерна підвищена активність апоптозних процесів у фетальній печінці (від лат. *fetus* – зародок, *plid*, синонім: *ембріональний*)

Механізм виживання клітин за участю *фосфоінозитол-3-кінази* (PI3K) пов'язаний або з рецепторами ростових факторів (напр., рецептори з тирозинкіназною активністю), або з іншими антиапоптозними сигнальними механізмами (протеїнкіназа А, NF-кВ). PI3K активується або через лігандну активацію рецепторів ростових факторів, або шляхом прямої взаємодії з білком Ras (рис. 3.10).

Активована PI3K каталізує утворення 3'-фосфорильованих фосфоінозитидів (PI-3,4-P2 і PI-3,4,5-P3) із фосфоліпідів плазматичної мембрани. Утворені фосфоінозитиди надалі активують серин/трегонінову 3'-фосфоінозитид-залежну кіназу-1 (*phosphoinositide-dependent kinase*, PDK-1), яка, у свою чергу, може активувати разноманітні кінази, включаючи Akt (=протеїнкіназа B). Серин-трегонінова протеїнкіназа Akt/ПкВ є клітинним гомологом вірусного онкогена v-Akt і активується численними ростовими факторами. У ссавців є три ізоформи Akt-кінази: Akt1, Akt2 і Akt3. У фізіологічних умовах активована ростовими факторами кіназа Akt служить для фосфорилювання білків, що підтримують основні функції клітин, зокрема транспорт і окиснення глюкози. Активована Akt спричиняє виживання клітин за двома основними шля-

Біохімічні механізми апоптозу

хами: 1) Akt інгібує апоптоз, фосфорилюючи компонент Bad комплексу Bad/Bcl-x_L. Фосфорилюваний Bad зв'язується з 14-3-3, це спричиняє дисоціацію комплексу Bad/Bcl-x_L, що приводить до виживання клітин. 2) Akt активує IKK-а, що завжди викликає активацію NF-кВ і виживання клітин. Крім того, активована Akt здатна напряму взаємодіяти з прокаспазою-9, інактивуючи її. Точний механізм цього процесу не досліджений. Ділянка фосфорилювання Akt (RXRXXS/T) ідентифікована і в інших білках-регуляторах апоптозу на кожному рівні апоптозного каскаду (каспаза-8, Bcl-2, Apaf-1, IAP_s, каспаза-7).

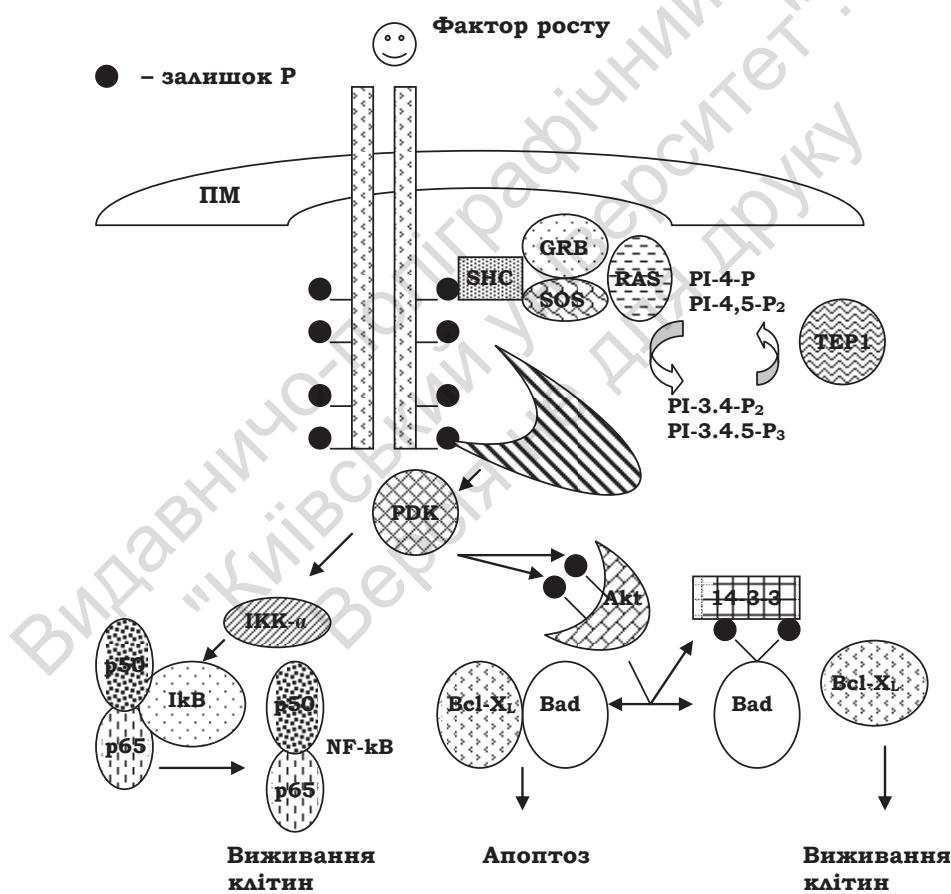


Рис. 3.10. PI3K/Akt-шлях виживання клітин

3.3. РОЛЬ МЕМБРАННИХ СТРУКТУР В ІНІЦІАЦІЇ АПОПТОЗУ

Клітинні та внутрішньоклітинні мембрани відіграють ключову роль на всіх етапах апоптозу, починаючи з індукції й закінчуючи деградацією апоптозних тілець. Клітини, що встали на шлях програмованої загибелі, мають менше структурних мембранних утворень. Різноманітні апоптоз-індукуючі агенти швидко модифікують транспортні властивості каналів, які контролюють трансмембраний потік іонів. Про індукцію апоптозу в клітинах свідчить і зміна діелектричних властивостей плазматичних мембран, а саме їхньої ємності та провідності, причому ці зміни передують активації каспаз і є першими ознаками клітин, які піддаються апоптозу. Більш віддаленою в часі, але дуже важливою є поява на поверхні клітин фосфатидилсерину, який в нормі міститься на внутрішній поверхні ліпідного бішару цитоплазматичної мембрани.

Плазматичні мембрани у своєму складі містять різноманітні клітинні рецептори, серед яких виділяють особливу групу так званих рецепторів загибелі. Це трансмембранні глікопротеїди, які після взаємодії зі специфічними лігандами передають апоптозний сигнал до клітини та викликають активацію каспаз (підрозд. 3.4). Більшість рецепторів загибелі належить до суперродини рецепторів фактора некрозу пухлини (*tumor necrosis factor*, TNF-R). Як приклад можна навести рецептори фактора некрозу пухлин (TNF-R1 і TNF-R2) і фактора росту нервів (*growth nerve factor*, GNF), Fas-рецептор (від *fibroblast associated antigen*, Fas-R, або APO-1/CD95). Між рецепторами цієї родини відмічається високий ступінь гомології у структурі та подібність у сигнальних шляхах. Найбільш вивченими серед них є Fas-R і TNF-R1.

До суперродини фактора некрозу пухлин, крім зазначених рецепторів загибелі, належать й інші білки – *B-клітинний антиген CD40*, маркер активації Т-лімфоцитів CD27 та деякі протеїни ссавців і вірусів. У позаклітинній частині молекул цієї суперродини міститься від двох до шести ділянок, багатих на залишки цистеїну, а їхні амінокислотні послідовності подібні у різних представників родини (до 25 % гомології). Цитоплазматичні частини ре-

цепторів є більш варіабельними за амінокислотним складом. Ті члени суперродини, що належать до рецепторів загибелі, містять у цитоплазматичному районі молекули домен розміром 65 амінокислот (так званий *домен загибелі*, *death domain*, *DD* (Л. Тартаглія, Н. Айтох, С. Нагата, 1993); така назва обумовлена його значимістю для передачі апоптозного сигналу). За допомогою методу ядерно-магнітного резонансу було показано, що *DD* складається із шести антипаралельних а-ланцюгів з великим числом заряджених амінокислотних залишків на його поверхні. Ці залишки, імовірно, відповідають за самоагрегацію доменів загибелі.

Здійснювати передачу проапоптозного сигналу здатні шість рецепторів загибелі, що містять *DD*-домен: *Fas-R*, *TNF-R1*, *DR3*, *DR4*, *DR5* і *DR6*.

Fas-рецептор (*Fas-R*) уперше був виявлений двома незалежними групами дослідників (Б. Траут та ін., С. Йонехара та ін., 1989, Н. Айтох та ін., А. Еуехм та ін., 1991–1992) і названий за антигеном, що викликає клітинну загибель. Після взаємодії з лігандом він індукує програмовану смерть клітини. У 1991 р. було показано, що апоптозна відповідь за *Fas-R*-механізмом є подібною до рецепторного шляху за участю фактора некрозу пухлин. У 1995 р. виявили, що каспази також беруть участь у *Fas-R*-опосередкованому апоптозі.

Fas-R людини є трансмембраним рецептором з М.м. 48 кД, що складається із 335 амінокислотних залишків. Він має сигнальну послідовність на N-кінці та трансмембранну ділянку всередині молекули, що є ознакою *мембраних білків I типу*.

Fas-R експресується багатьма, але не всіма клітинами (мієлодіними клітинами, Т-лімфобластами і диплодіними фібробластами в тимусі, клітинами печінки, серця, яєчника). Знайдено його експресію, зокрема, на різних типах печінкових клітин: гепатоцитах, холангіоцитах, активованих зірчастих ретикулоендотеліоцитах і клітинах Купфера. Його гіперекспресія виявлена в активованих зрілих лімфоцитах і лімфоцитах, трансформованих вірусом Т-клітинної лейкемії, імунодефіциту людини, вірусом Епштейна – Барра. Експресія *Fas-R* на мембрані клітин викликається низкою прозапальних цитокінів, таких як інтерлейкіни (IL-1, -2, -6), інтерферони (ІФН- γ), фактори некрозу пухлин (TNFa) тощо. Таким чином, імовірно, що запалення будь-якої природи може сприяти *Fas-R*-залежному ушкодженню клітин.

Ліганд рецептора Fas (Fas-L) був виділений із цитотоксичних Т-лімфоцитів. Він очищений до гомогенного стану за допомогою афінної хроматографії. Цей білок із М.м. 40 кД експресується в активованих спленоцитах і в ряді клітинних ліній цитотоксичних Т-лімфоцитів, що вказує на важливу роль Fas-системи в опосередкованні цитотоксичної дії останніх. Fas-ліганд є *трансмембраним білком II типу*: його NH₂-кінцева послідовність міститься в цитоплазмі, тоді як COOH-кінець орієнтований у позаклітинний простір. Fas-L синтезується як трансмембрана молекула, але може існувати і в солюбілізованій (розчинній) формі, яка утворюється із мембраноасоційованої при дії фермента матричної метапротеїнази. У плазматичній мембрани клітини-кілера Fas-ліганди містяться у вигляді тримерів. Такі тримери зв'язуються із Fas-рецепторами клітини-мішенні, причому зв'язування Fas-L із рецептором Fas викликає тримеризацію та активацію останнього.

Шляхом Fas-R-залежного апоптозу цитотоксичні Т-лімфоцити "розвправляються" із клітинами, інфікованими вірусами чи бактеріями, а справжні кілерні клітини – і пухлинними клітинами. Водночас цей шлях апоптозу регулює і гомеостаз лімфоцитів, викликаючи загибель активованих Т-лімфоцитів – продуцентів цитокінів і В-лімфоцитів – продуцентів антитіл по закінченні імунної відповіді.

Для функціонування рецептора Fas необхідні *адаптерні білкові молекули*, зокрема **FADD** (*Fas-associated death domain protein – білок, асоційований з доменами смерті рецептора Fas*). Такі білкові молекули подібно до самих рецепторів мають аналогічні ділянки DD, завдяки чому вони, приєднуючись до DD рецептора, активують рецептор загибелі, формуючи так званий сигнальний комплекс, що індукує загибель (*death inducing signalling complex, DISC*). Крім DD, адаптерні молекули FADD також містять *домен DED (death effector domain – ефекторний домен загибелі)*, який завдяки гомологічним взаємодіям DED–DED приєднує прокаспазу-8 до DISC. Локальна сконцентрованість декількох прокаспаз-8 у DISC спричиняє їхню автокаталітичну активацію та вивільнення активної каспази-8, що результується в активації каскаду каспаз (підрозд. 3.4), (рис. 3.11).

FADD-дефіцитні миші не переживали 12,5 днів ембріогенезу (табл. 3.3), що свідчить про важливу роль FADD в ембріональному

розвитку. Ембріони мали тонкий вентрикулярний міокард, геморагії та інші відхилення. FADD є необхідним для апоптозу, ініційованого зв'язуванням рецепторів загибелі, але його наявність не є обов'язковою для апоптозу, індукованого іншими впливами, напр., надекспресією онкогенів чи ефектами хіміотерапевтичних засобів.

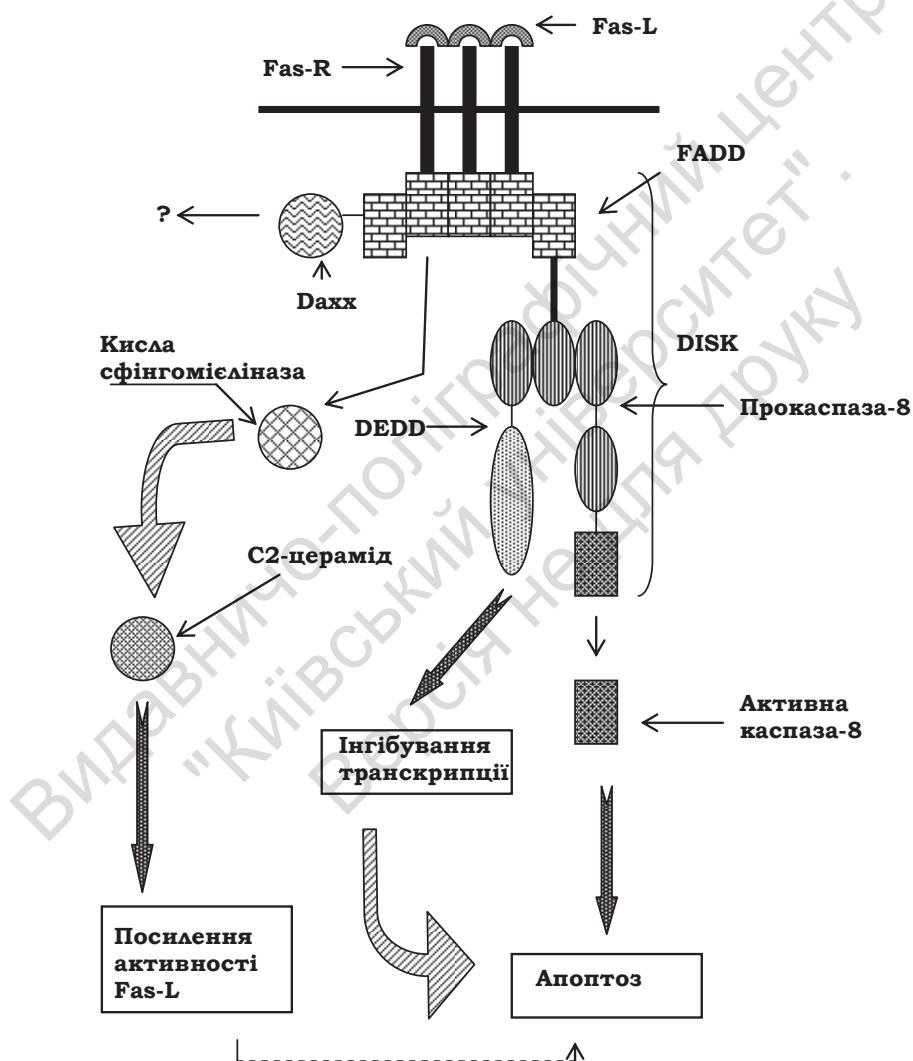


Рис. 3.11. Передача апоптозного сигналу через Fas-R-залежний шлях

Крім FADD, із цитоплазматичною частиною Fas-R можуть взаємодіяти й інші білки. **Білок Daxx** (*Fas death domain-associated protein* – білок, асоційований з доменами загибелі Fas-R; відкрито Х. Янгом і Р. Хосраві-Фаром, 1997) взаємодіє з доменом загибелі Fas-R, викликаючи активацію JNK (*c-jun-N-terminal kinase*) через кіназу ASK1 (від *Apoptosis signal-regulating kinase 1* – кіназа що регулює апоптозний сигнал), і, крім того, імовірно, впливаючи як транскрипційний фактор. Є дані, що цей адаптерний білок може спричиняти як індукцію апоптозу FADD-незалежним шляхом, так і мати антиапоптозну дію – пряму чи опосередковану JNK (клітини, дефіцитні за геном *daxx*, виявляються чутливішими до апоптозу). Білок **DEDD** (від *Death-effector domain-containing protein* – білок, що містить DED-домен) має DED, гомологічний подібним доменам FADD і каспази-8, два сигнали ядерної локалізації й С-кінцеву послідовність, гомологічну гістонам. Після взаємодії з Fas-R DEDD транслокується в ядро, де інгібує транскрипцію. Можлива фізіологічна роль цього процесу – блокування синтезу антиапоптозних білків при Fas-R-залежному апоптозі. Ще один із сигнальних шляхів, які запускає Fas-R – активація кислої сфінгомієлінази (aSMase), яка сприяє утворенню цераміду (підрозд. 3.8).

Передача сигналу від рецептора TNF-R1 (TNF α -R) здійснюється інакше. Відомо, що рецептор TNF-R1 може опосередковувати сигнали як апоптозу, так і клітинного виживання. Вибір долі клітини після агрегації рецептора, імовірно, є функцією необхідних для наступної передачі сигналу адаптерних білків, відповідних для кожного із цих шляхів. Із доменом загибелі TNF-R1 взаємодіє адаптерний білок **TRADD** (від *TNF receptor associated death domain* – DD-вмісний білок, асоційований із TNF-рецептором). Із TRADD, у свою чергу, зв'язуються DD-вмісні білки **RIP** (від *receptor interacting protein* – білок, що взаємодіє з рецептором) і FADD (рис. 3.12).

FADD здійснює індукцію апоптозу за описаним вище механізмом. RIP здатний взаємодіяти з адаптерними білками **TRAF2** (від *TNF receptor associated factor-2* – фактор-2, асоційований з TNF-рецептором) і **RAIDD** (від *RIP-associated ICE-1/CED-3-homologous protein with death domain* – RIP-ассоційований ICE-1/CED-3-гомологічний білок із доменом загибелі). TRAF2 і RIP запускають сигнальні шляхи, що результуються в активації транскрипційних факторів AP-1 і NF-kB (*Nuclear Factor-kappa B*, підрозд. 3.5), під контролем

яких експресуються прозапальні та імуномодлюючі гени, деякі антиапоптозні білки (деякі білки родини IAPs – *інгібіторів апоптозних протеаз (inhibitors of apoptosis proteases)*, підрозд. 4.5), Bcl-x тощо). RAIDD, зв'язуючись через свій домен загибелі з доменом загибелі RIP, а через CARD-домен – з аналогічною послідовністю ефекторної каспази-2, здатний ініціювати й апоптозну загибел.

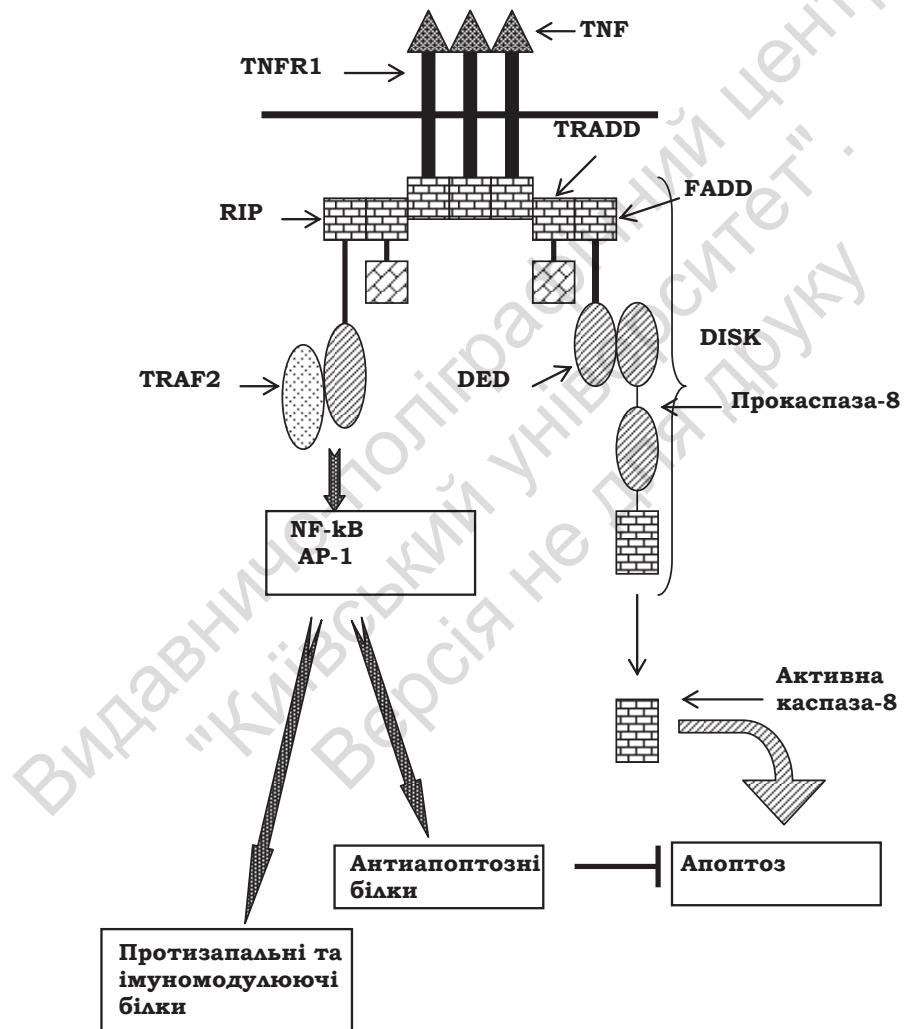


Рис. 3.12. Передача апоптозного сигналу через TNF-R1-залежний шлях

Завдяки продукції антиапоптозних білків активація TNF-R1 спричиняє апоптоз лише в певних умовах, зокрема, у випадку відсутності білкового синтезу в клітині.

TRAF – це родина адаптерних білків, до якої належать п'ять білків: TRAF1, TRAF2, TRAF3, TRAF5, TRAF6. Важливу роль у розвитку сигналу виживання має TRAF2. TRAF2-дефіцитні клітини виявляють посилені рівні апоптозу при стимуляції TNF α . Аналогічні антиапоптозні впливи має й адаптерний білок RIP. TRAF2 і RIP активують NF-kB-індукуючу кіназу (NIK), яка, у свою чергу, впливає на особливий кіназний комплекс, що фосфорилює інгібітор NF-kB (I-kB – підрозд. 3.5). Деградація I-kB робить можливим проникнення NF-kB в ядро та стимуляцію транскрипції генів, які відповідають за синтез інтерлейкінів-2, -4, γ -інтерферону та інших цитокінів.

Двома незалежними групами дослідників було виявлено **фактор TRAIL** (від *Tumor necrosis (TNF)-related apoptosis-inducing ligand* – TNF-подібний ліганд, який індукує апоптоз, або Apo2L), який є подібним до Fas-L і присутній, на відміну від нього, у багатьох тканинах організму. Головними рецепторами, які зв'язують Apo2L, є **DR4** (*death receptor-4*) та **DR5** – вони також виявлені в численних тканинах організму. З DR4 й DR5 сполучаються такі адаптерні білки, як FADD, TRADD, TRAF2 й RIP. Цікаво, що клітини, які не синтезують FADD, або синтезують його мутантну форму і тому є стійкими до Fas-L-індукованого апоптозу, чутливі до Apo2L-опосередкованого апоптозу, що свідчить про можливість FADD-незалежної передачі сигналу в клітину. Разом із тим, для реалізації Apo2L-залежного апоптозу необхідні процеси активації каспаз.

Поряд з експресією Fas-L-протеїну, цитотоксичні Т-лімфоцити та природні кілери при взаємодії з вірусним антигеном виділяють **гранзими** та **перфорин**, які початково містяться в гранулах.

При ультраструктурному дослідженні гранули мають дві ділянки. Кожна з них має щільний центральний стрижень, який містить гранзими, гранули перфорину та кислий протеоглікан хондроїтинсульфат. Негативний заряд хондроїтинсульфату полегшує з'єднання з гранзимами, які є лужними і позитивно зарядженими при pH гранули. Зовнішня ділянка гранули за будовою схожа на типову лізосому. Гранули розподілені хаотично в цитоплазмі, але швидко переміщуються при контакті з клітиною-мішенню до місця контакту – цей процес отримав назву *поляризація*.

Основна функція гранзимів – це індукція загибелі інфікованих вірусом та інших потенційно шкідливих клітин за участю ключових субстратів у клітинах-мішенях перфорин-залежним шляхом. У перфорин-дефіцитних мишей всі гранзим-опосередковані на прямки індукції клітинної загибелі заблоковані – такі тварини стають чутливими як до різноманітних вірусів, так і до інших внутрішньоклітинних патогенів.

Гранзим В є сериновою протеазою, котра проникає всередину клітини-мішені крізь трансмембральні канали (перфоринові пори), які утворюються в плазматичній мембрани за участю перфоринів лімфоцитів (рис. 3.13). Там фермент активує каспазу-8 з наступним включенням апоптозного протеолітичного каскаду.

Крім прямої активуючої дії на деякі каспази, гранзим В може безпосередньо розщеплювати низку субстратів каспаз, у тому числі й інгібітор активації каспази ДНКази (ICAD), що впливає на фрагментацію ДНК у клітині-мішені (підрозд. 3.9). Гранзим В має найбільшу високу апоптозну активність серед усіх гранзимів через його каспазоподібну здатність розщеплювати субстрати за ключовими залишками аспарагінової кислоти; інші сполуки цієї родини (зокрема гранзим А) мають значно меншу апоптозну активність.

Крім каспаза-залежних механізмів впливу гранзиму В, існують і каспаза-незалежні шляхи: клітини, дефіцитні за активністю каспаз, не втрачають здатності до гранзим В-опосередкованого апоптозу. Хоч механізми таких процесів недостатньо вивчені, передбачають їхню реалізацію через руйнування цитоскелета.

Каспаза-8 (або FLICE – від *FADD-like interleukin 1 β -converting enzyme* – *FADD*-подібний фермент, залучений до перетворення

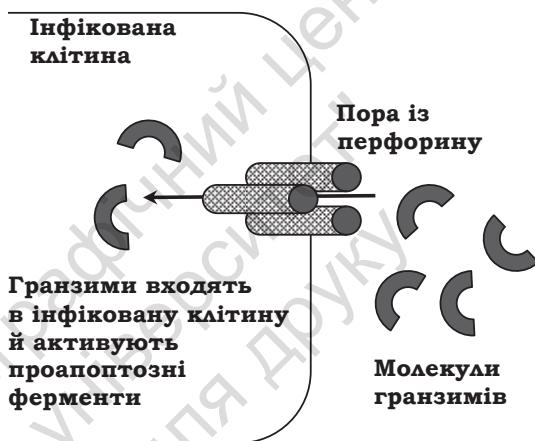


Рис. 3.13. Схема включення гранзиму-В в індукцію загибелі клітин

IL-1 β) – ключова ініціаторна каспаза апоптозного шляху, опосередкованого TNF α -R та іншими рецепторами загибелі. Вона взаємодіє з FADD гомологічними ділянками DED. Агрегація і зближення молекул каспази-8 спричиняють її активацію шляхом автопротеолізу. Клітинний білок-інгібітор FLICE (синонім: білок-інгібітор каспази-8) – c-FLIP – це клітинний гомолог вірусного білка-інгібітора FLICE, що за структурою гомологічний цій каспазі й має дві DED- та одну каспазоподібну ділянки. Водночас у c-FLIP відсутня каспазна активність. DED – DED взаємодіями c-FLIP високоафінно приєднується до комплексу DISK замість каспази-8, блокуючи апоптозний сигнал у випадку рецептор-опосередкованого апоптозу (рис. 3.14).

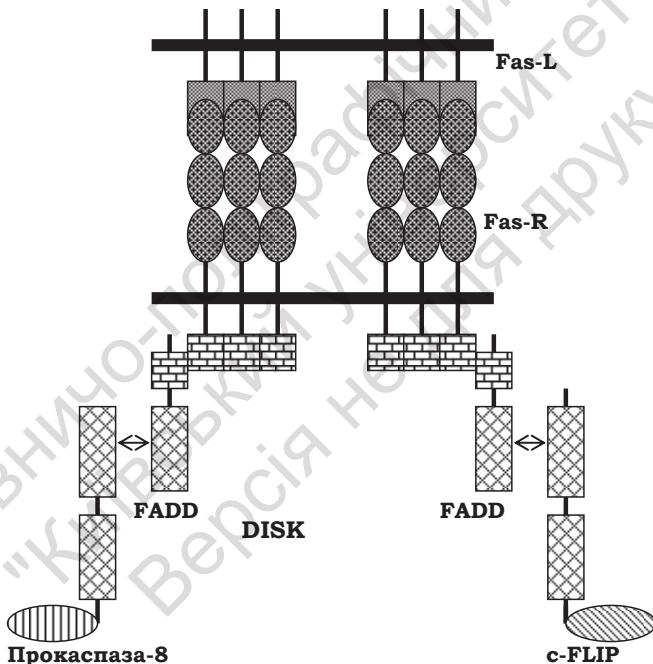


Рис. 3.14. Механізм інактивації Fas-R-залежного апоптозу білком-інгібітором каспази 8 c-FLIP

До речі, афінність DISK до c-FLIP більша, ніж до каспази-8. Таким чином, каспаза-8 та c-FLIP відіграють критичну, але протилежну роль у регуляції сигналу загибелі. Каспаза-8-дефіцитні миші

подібно FADD-дефіцитним тваринам гинуть приблизно на 12,5 день ембріогенезу з ознаками гіперемії та дефектами серця. Каспаза-8-дефіцитні клітини, як і FADD-дефіцитні, специфічно резистентні до апоптозу, викликаного рецепторами загибелі. c-FLIP має дві ізоформи, обидві з них мають здатність зв'язуватися з DISK.

У той же час низькі концентрації c-FLIP можуть бути проапоптозним фактором: у такому випадку цей білок сприяє утворенню активної форми каспази-8 через виникнення гетеродимерів c-FLIP – каспаза-8.

Багато хімічних і фізичних агентів, здатних викликати апоптоз, індукують також вільнорадикальні реакції. Так, іонізуюча й ультрафіолетова радіації генерують вільні радикали – гідроксил (OH^{\cdot}), супероксид ($\text{O}_2^{\cdot-}$), NO, пероксил (ROO^{\cdot}). Інші сполуки – пероксинітрат ($\text{OONO}^{\cdot-}$), гіпохлорна кислота (HOCl), пероксид водню (H_2O_2), синглетний кисень, озон (O_3), нітратна кислота (HNO_2), триоксид дінітрогену (N_2O_3) не є вільними радикалами, але легко спричиняють вільнорадикальні реакції в живому організмі.

Перекис водню, NO, протипухлинні цитостатики (цисплатин, доксорубіцин) водночас із генерацією вільнорадикальних реакцій є індукторами апоптозу. Ліганди TNF- α і Fas теж не є винятком і здатні спричиняти утворення в клітині реактивних форм кисню, а індукований ними апоптоз знімається антиоксидантами.

Оксидативний стрес приводить до утворення в мембрахах клітини окиснених ліпідів, які також є апоптогенними факторами. І оксидативний стрес є, можливо, універсальною формою реалізації апоптозної програми, пов'язаної з функціонуванням клітинних мембран (підпідрозд. 3.11.3).

3.4. РОЛЬ МІТОХОНДРІЙ У ПЕРЕДАЧІ АПОПТОЗНОГО СИГНАЛУ

Значна частина відкриттів дозволяє вважати, що в більшості випадків "вирішувати" питання, житиме клітина чи загине, буде мітохондрія. Саме з мітохондріальними подіями апоптозу насамперед пов'язана найважливіша стадія цього процесу – **активація каскаду каспаз.**

Каспази (*cysteine-dependent aspartate-specific proteases*) є цистеїновими протеазами, що активуються протеолізом і розщеплюють білки в ділянках розташування залишків аспарагінової кислоти. Ці ферменти містять цистеїн в активному центрі та є подібними до ICE (каспаза-1) і Ced-3 (підпідрозд. 3.2.1). Першу каспазу було відкрито в 1993 р.; сьогодні відомо 13 каспаз у людини (каспази 1–12 та 14). Усі вони поділяються на дві групи залежно від участі в апоптозі. До каспаз, що беруть участь в апоптозі, належать каспази-3, -9, -8 (головна роль) і -2, -6, -7 та -10 (другорядна); усі інші (-1, -4, -5, -11, -12, -14) відіграють роль у запальних процесах (табл. 3.5). Перша група – каспази, залучені до апоптозу – поділяється на два підкласи (*ініціаторні* (-2, -8, -9, -10) та *ефекторні*, або *екзекуційні* (-3, -6, -7) каспази).

Екзекуційні каспази мають лише короткі продомени, а ініціаторні – довгі, що містять ділянки DED (каспази-8 і -10) або CARD (від *caspases recruitment domains* – домени залучення каспаз, каспази-9 і -2). Завдяки їхньому продомену ініціаторні каспази активуються в DISK або у відповідь на зв'язування рецептора загибелі (зовнішній шлях апоптозу, в якому бере участь каспаза-8), або у відповідь на сигнал із середини клітини (внутрішній шлях апоптозу, до якого причетна каспаза-9, мітохондріальні події та утворення апоптосом).

Зовнішній шлях апоптозу, у свою чергу, може йти за двома напрямками. Клітини I типу здатні безпосередньо індукувати каспазозалежний апоптоз через утворення DISK та активацію каспази-8 (рис. 3.15).

У клітинах II типу сигнал, що приходить від активованого рецептора, передається через залежні від мітохондрій апоптозні шляхи. Зв'язок між каспазним сигнальним каскадом і мітохондрією забезпечується членом Bcl-родини – Bid. Bid розщеплюється каспазою-8 і у формі tBid транслокується до мітохондрії, де діє у спільноті з проапоптозними членами Bak і Bax, викликаючи звільнення в цитозоль проапоптозних факторів (цитохрому с та ін.) (рис. 3.16). У цьому випадку каскад каспаз запускається функціонуванням особливого утворення – *апоптосоми*.

Біохімічні механізми апоптозу

Таблиця 3.5. Структурно-функціональна характеристика цистеїнових протеїназ родини каспаз (за А.А. Фільченковим, 2003)

Ензим	М.м. прокаспази, кДа	Тип продомену	Активні с/o, кДа	Адаптерні білки
Каспази, що ініціюють апоптоз				
Каспаза-2	51	Довгий, із CARD-ділянкою	20/12	RAID, DEFCAP
Каспаза-8	55	Довгий, із двома DED-ділянками	18/11	FADD, DEDAF
Каспаза-9	45	Довгий, із CARD-ділянкою	17/10	Apaf, Nod-1, Bcl-10
Каспаза-10	55	Довгий, із двома DED-ділянками	17/12	FADD, DEDAF
Ефекторні каспази				
Каспаза-3	32	Короткий	17/12	Відсутній
Каспаза-6	34	Короткий	18/11	Відсутній
Каспаза-7	35	Короткий	20/12	Відсутній
Каспази, задушені в процесінг цитокінів				
Каспаза-1	45	Довгий, із CARD-ділянкою	20/10	CARDIAK, paf, CARD-8
Каспаза-4	43	Довгий, із CARD-ділянкою	20/10	Невідомий
Каспаза-5	48	Довгий, із CARD-ділянкою	20/10	Невідомий
Каспаза-11*	42	Довгий, із CARD-ділянкою	20/10	Невідомий
Каспаза-12**	50	Довгий, із CARD-ділянкою	20/10	Невідомий
Каспаза-14**	30	Короткий	20/10	Відсутній
Гомологи каспаз у безхребетних				
Ced-3	56	Довгий, із CARD-ділянкою	17/14	Ced-4
Dcp-1**	36	Короткий	22/13	Відсутній

* Виявлені у мишей.

** Гомолог каспази-1 у дрозофілі.

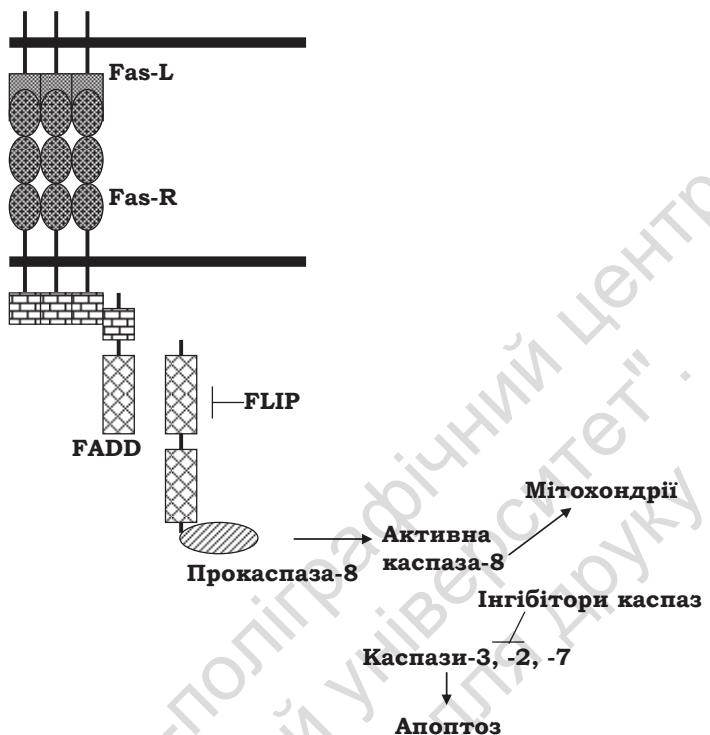


Рис. 3.15. Зовнішній шлях апоптозу в клітинах І типу

Велику користь щодо вивчення ролі різних каспаз у подіях апоптозу надали дослідження із застосуванням мишей, "нокаутованих" за генами, що кодують відповідні ферменти (табл. 3.3). З їхньою допомогою виявилося, що каспаза-1-дефіцитні миші хоч і не можуть продукувати дозрівання IL-1 β , але не мають великих аномалій в розвитку, що вказує на відсутність великої ролі цього ензиму в реалізації важливих апоптозних шляхів. Каспаза-3-дефіцитні миші в основному гинуть ще під час ембріогенезу. Ті, що залишилися живими, мають удвічі збільшену масу мозку, оскільки в нормі частина цих клітин підлягає апоптозу під час розвитку. Оскільки такі ефекти сконцентровані головним чином у мозку, каспаза-3 є домінантною в регуляції апоптозу нейронів. Подібна ситуація складається і з каспаза-9-дефіцитними мишами: ті, що вижили, мають збільшений та деформований мозок через відсутність апоптозу при розвитку нервової системи.

Біохімічні механізми апоптозу

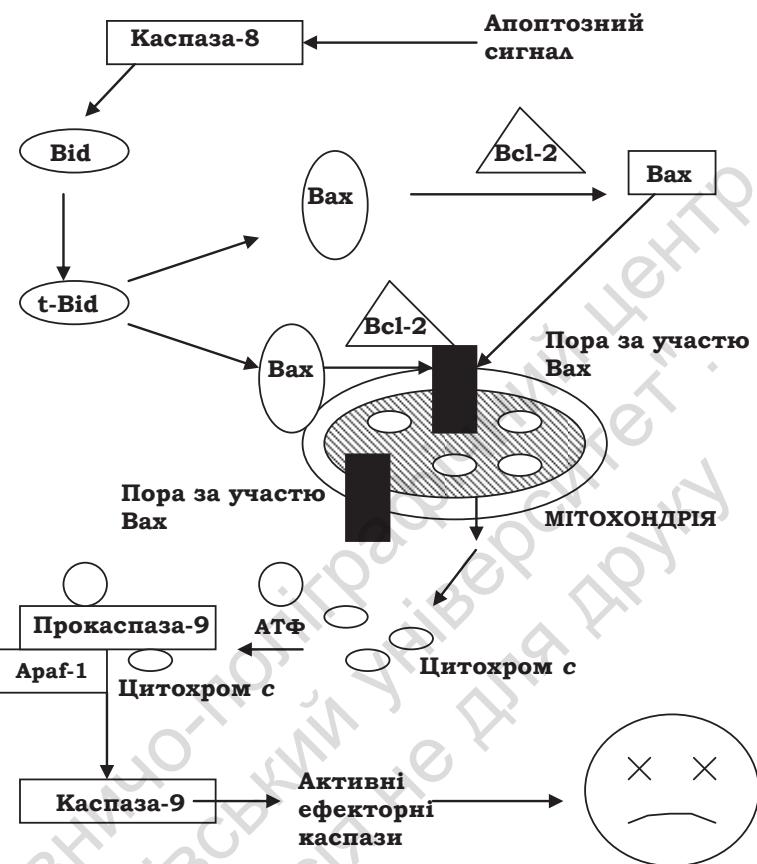


Рис. 3.16. Внутрішній шлях апоптозу в клітинах ІІ типу

Відомі такі інгібтори каспаз:

- 1) експериментальні реагенти, які можуть бути використані в медичній хімії – пептидні псевдосубстрати;
- 2) модифікатор А цитокінової відповіді (*cytokine response modifier A, CrtA*) – продукт вірусу коров'ячої віспи, який інгібує апоптоз у клітинах організму-хазяїна шляхом дезактивації каспази-8, але не каспази-3.
- 3) p35 – інгібітор бакуловірусу, гальмує каспази з мінімальною специфічністю, знижує активності всіх відомих каспаз. У людини подібного інгібітору не виявлено.

4) IAPs – родина поліпептидів, що інгібують каспази-3 та -7 (підрозд. 3.5).

Мітохондріальний білок Smac/Diablo після звільнення з мітохондріального міжмембрannого простору здатний знімати інгібіторний ефект IAPs на каспази, оскільки Smac/Diablo може зв'язуватися з IAPs, відокремлюючи їх від каспаз.

Субстратами каспаз є як самі каспази, так і PARP, ламіни та інші білки. Неактивний фермент (*прокаспаза*) містить дві субодиниці – велику й малу і продомен. Активна каспаза – це гетеротетramer, що містить по дві великі й по дві малі субодиниці (рис. 3.17).

Як зазначалося вище, для активації каскаду каспаз у випадку клітин II типу необхідна стадія утворення *апоптосоми* – колесоподібної структури, до складу якої входять Araf-1, мітохондріальний білок цитохром c, АТФ та ініціаторна прокаспаза-9 (рис. 3.18).

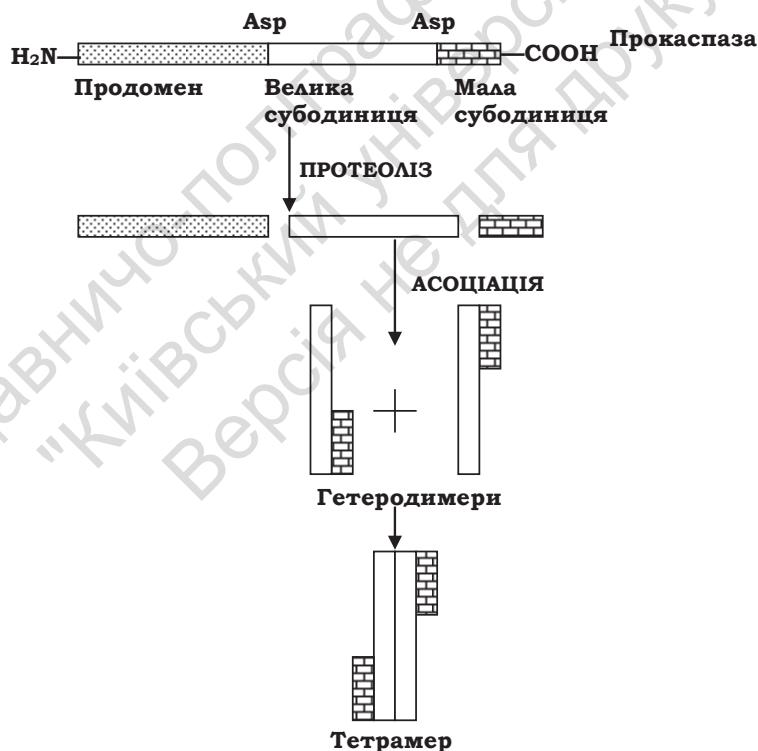


Рис. 3.17. Будова та активація каспаз

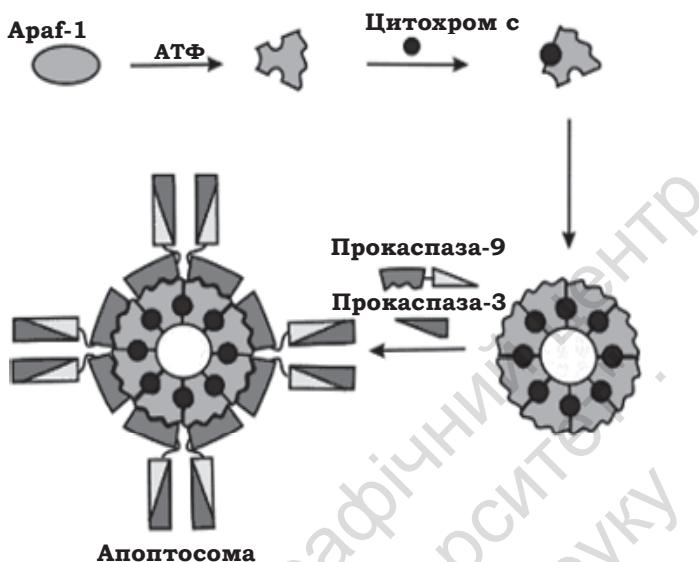


Рис. 3.18. Структура апоптосоми

Існують два незалежних механізми звільнення цитохрому с та інших проапоптозних факторів із мітохондрій (М. Уей та ін., 2001). Перший з них пов'язаний з утворенням у зовнішній мембрані цих органел під впливом проапоптозних білків Bax, Bad, Bak, Bid тощо каналів, тоді як антиапоптозні члени зберігають цілісність зазначененої мембрани (рис. 3.19).

Це підтверджується даними про структуру вказаних білків: практично всі вони мають трансмембраний домен, властивості якого дозволяють локалізовуватися їм у складі клітинних мембран, найчастіше – у зовнішній оболонці мітохондрій. Рекомбінантні Bcl-x_L, Bcl-2, Bax і Bid здатні утворювати в штучних мембранах іонні канали з різними властивостями. На цих фактах базується гіпотеза про участь зазначених білків у формуванні каналоподібних мембраних структур, через які проапоптозні фактори виходять за межі мітохондрій. Крім того, проапоптозні члени родини Bcl-2 можуть модифікувати вже існуючі пори, унаслідок чого зовнішня мітохондріальна мембрана проривається.

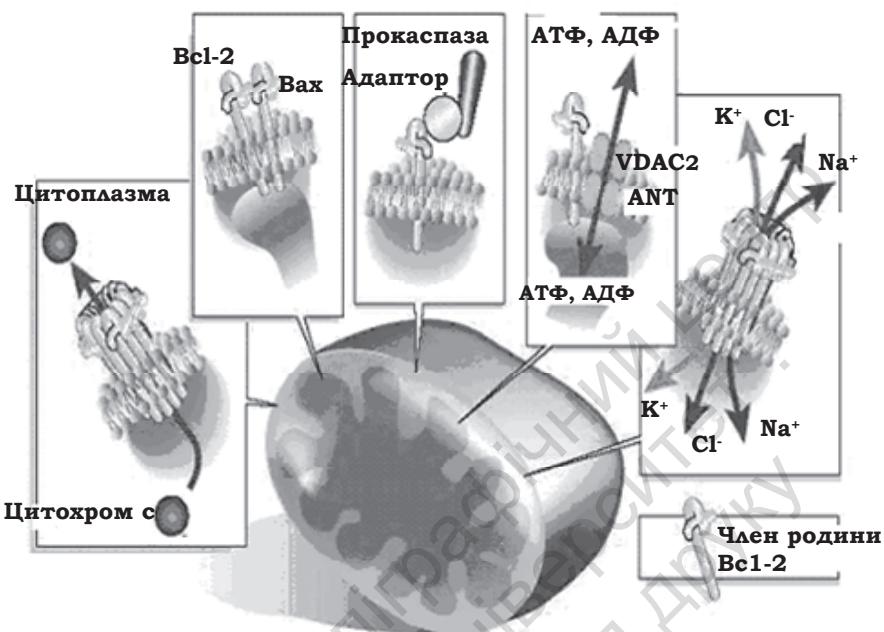


Рис. 3.19. Можливі механізми звільнення проапоптозних факторів із мітохондрій за участю білків родини Bcl-2

Інший механізм пов'язаний з раптовою зміною проникності зовнішньої мембрани мітохондрій, яка і запускає рішення про загибель клітини. Згідно з цією гіпотезою першопричинну роль у клітинній загибелі, як апоптозний так і некрозний, відіграє **MPT** (від *mitochondrial permeability transition*) – зміна мітохондріальної проникності, тобто раптове Ca²⁺-залежне зростання проникності внутрішньої мітохондріальної мембрани для розчинів із молекулярною масою менше 1,5 кДа. Це явище вперше було відкрито Д. Хантетром та ін. в 1976 р. Йому притаманна ключова роль в інтеграції та поширенні сигналів загибелі, що виникли всередині клітини (унаслідок руйнування ДНК, оксидативного стресу, голодування або дії хіміотерапевтичних ліків) або надійшли від рецепторів загибелі.

Більшість проапоптозних чинників викликають зниження електрохімічного трансмембранного потенціалу мітохондрій ($\Delta\psi$) та MPT. Ці події є одними з найбільш ранніх апоптозних подій, які відбуваються ще до розщеплення ДНК на олігонуклеосомальні фраг-

менти (підрозд. 3.9). Одночасно з надходженням води всередину матриксу внаслідок миттєвого прориву зовнішньої мітохондріальній мембрани спостерігається осмотичне розбухання мітохондрій. У результаті з мітохондріального міжмембранного простору в цитоплазму звільнюються проапоптозні білки: цитохром *c*, який активує апоптосому і таким чином каскад каспаз; фактор, що індукує апоптоз – AIF; Smac/Diablo; аденилаткіназа 2, ендонуклеаза EndoG, Htr/Omi. Цікаво, що МРТ завжди настає за руйнуванням трансмембранного потенціалу, але $\Delta\psi$ не завжди знижується після МРТ, і звільнення цитохрому *c* спостерігається навіть за відсутності зниження електрохімічного трансмембранного потенціалу мітохондрій.

Крім того, руйнування потенціалу та МРТ спричиняє втрату біохімічного гомеостазу в клітині: зупиняється синтез АТФ, окисно-відновні молекули (НАДН, НАДФН) і глутатіон окиснюються, генеруються активні форми кисню (АФК або ROS – *reactive oxygen species*: супероксидний радикал, пероксид водню та гідроксильний радикал). Збільшення рівня ROS веде до окиснення ліпідів, білків і нуклеїнових кислот, що збільшує розрив потенціалу (підпідрозд. 3.11.3).

Для МРТ запропоновані кілька можливих механізмів, але імовірнішим є відкриття так званої **пори зміни проникності** (PTP, *permeability transition pore*) діаметром 2,6–2,9 нм, основними компонентами якої є **ANT** (від *adenin nucleotide translocator* – транслокатор аденінового нуклеотиду) і **VDAC** (від *voltage-dependent anion channel* – напругозалежний аніонний канал) (рис. 3.20).

Блок ANT є більш представленим у внутрішній мітохондріальній мембрani. Це трансмембраний канал, який відповідає за експорт АТФ в обмін на АДФ (антиторт). Надекспресія ANT у рапакових клітинах людини індукує апоптоз.

VDAC, або порин – це блок, що вбудований у зовнішню мітохондріальну мемрану і формує через неї неселективну пору. Завдяки головним чином білок-білковим взаємодіям комплекс VDAC-ANT утворює пору PTP, зв'язуючи внутрішню та зовнішню мітохондріальні мембрани в так звані "контактні ділянки". Оскільки мікроін'єкції в клітину VDAC-нейтралізуючих антитіл спричиняють блокування апоптозу, імовірно, що VDAC є основними каналами для виходу цитохрому *c* із мітохондрій.

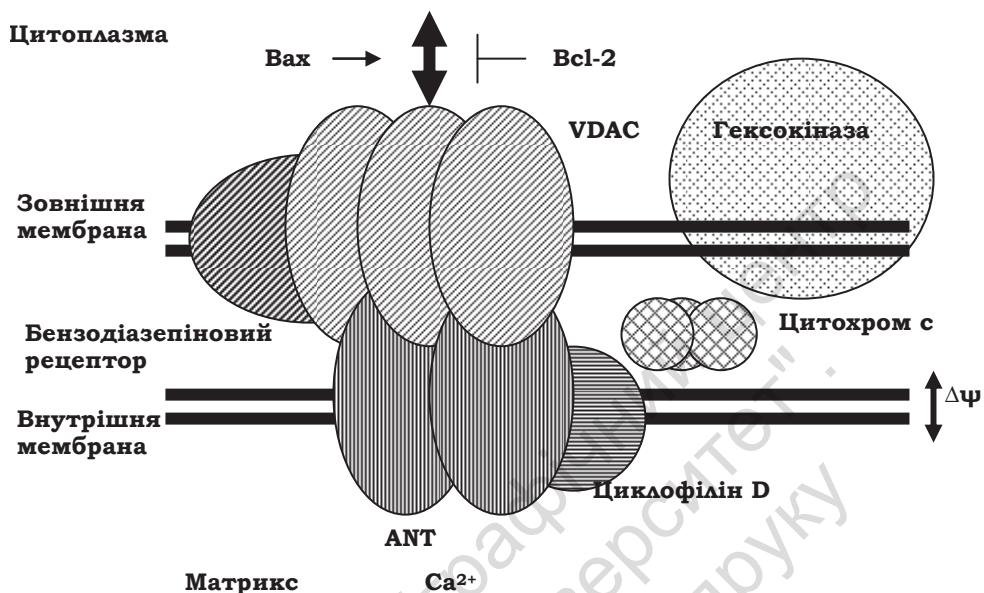


Рис. 3.20. Структура пори зміни проникності (PTP)

В утворенні РТР також задіяні:

- циклофілін D – пептидил-проліл-цис-транс-ізомераза матриксу, яка при асоціації з комплексом РТР (а саме з ANT) надає їй чутливості до циклоспорину А;
- гексокіназа (взаємодіє з VDAC), креатинкіназа;
- периферійний бензодіазепіновий receptor (також сполучається з VDAC);
- Вах-подібні проапоптозні члени родини *Bcl-2*.

Початок зміни мітохондріальної проникності індукують такі фактори:

- транспорт Ca^{2+} в мітохондрії;
- неорганічний фосфат;
- лужне середовище;
- ROS;
- оксигенні хімікати.

Блокаторами її виступають:

- Mg^{2+} ;
- кисле середовище;

- інгібітори фосфоліпази (зокрема трифлуоперазин, бібукаїн, мепакрин, квінакрин);
- циклоспорин А;
- імуносупресивні лікарські засоби.

Так, циклоспорин А запобігає зміні мітохондріальної проникності, активації каспази-3 і апоптозу в цілому. Він діє, перешкоджаючи транспорту Ca^{2+} в мітохондрії.

Оскільки МРТ, утрата $\Delta\phi$ та звільнення мітохондріальних білків є одними із ключових, найважливіших етапів апоптозних шляхів, ці мітохондріальні події мають знаходитися під чітким контролем регуляторних механізмів; частина таких механізмів залежить від білків-членів родини Bcl-2.

Взаємодія VDAC (порину) із проапоптозним білком родини Bcl-2 Вах сприяє виходу із мітохондрій проапоптозних факторів. Вах протягом апоптозу змінює свою конформацію, вбудовується в зовнішню мембрани мітохондрії та олігомеризується. Вах- і Bak-олігомери або беруть участь у стабілізації пори МРТ (взаємодіючи з VDAC), або самі утворюють канали. В інших випадках, як зазначалося, каспаза-8 розщеплює білок Bid, і один із продуктів цієї реакції – tBid – переміщується до мітохондрії й надалі діє через членів родини Bcl-2, впливаючи на олігомеризацію Вах/Bak і (або) звільнюючи цитохромом С із крист. Антиапоптозні члени родини Bcl-2 діють за аналогічним механізмом, гальмуючи утворення пор у зовнішній мітохондріальній мембрани. Зокрема, вони віддаляють проапоптозні члени родини Bcl-2, зв'язуючись з їхнім BH-3-доменом і, можливо, запобігаючи Вах- (Bak-) активації/олігомеризації, що гальмує мітохондріальні проапоптозні події. Надекспресія Bcl-2 і Bcl-x_L потенційно гальмує апоптоз у відповідь на численні цитокіні шляхом зниження генерації ROS, стабілізації $\Delta\phi$, запобігання МРТ і блокування звільнення із мітохондрій проапоптозних білків.

Експресія антиапоптозних білків, подібних до Bcl-2, Bcl-x_L, активується транскрипційним фактором NF-kB. Крім індукції експресії антиапоптозних членів Bcl-родини, NF-kB активує експресію низки інших антиапоптозних генів, таких як IAPs (підрозд. 3.5).

Оскільки зміна мітохондріальної проникності відбувається як при апоптозі, так і при некрозі, то існують фактори, що визначають шлях загибелі клітини, і одним із цих факторів є рівень АТФ

у клітині (підрозд. 3.11). Так як апоптоз потребує АТФ, то, якщо при зміні мітохондріальної проникності вичерпується АТФ, результатом стає некротична загибель клітини, тоді як за достатньою кількості АТФ розвивається апоптоз. Можливо, якщо з прогресією апоптозу АТФ буде вичерпуватися, одночасно з проявами останнього з'являтимуться й ознаки вторинного некрозу. Отже, дистанція між апоптозною і некрозною загибеллю в таких випадках стає нечіткою. Прикладом може бути одночасне співіснування обох типів загибелі клітин при ураженнях тканин токсичними хімікатами, вірусними інфекціями та при ішемії-реперфузії.

Каспаза-9 надалі активує екзекуційні каспази – каспази-3, -6 і -7, які, у свою чергу, мають багато білкових субстратів, активують проапоптозні білки та дезактивують антиапоптозні (рис. 3.21).

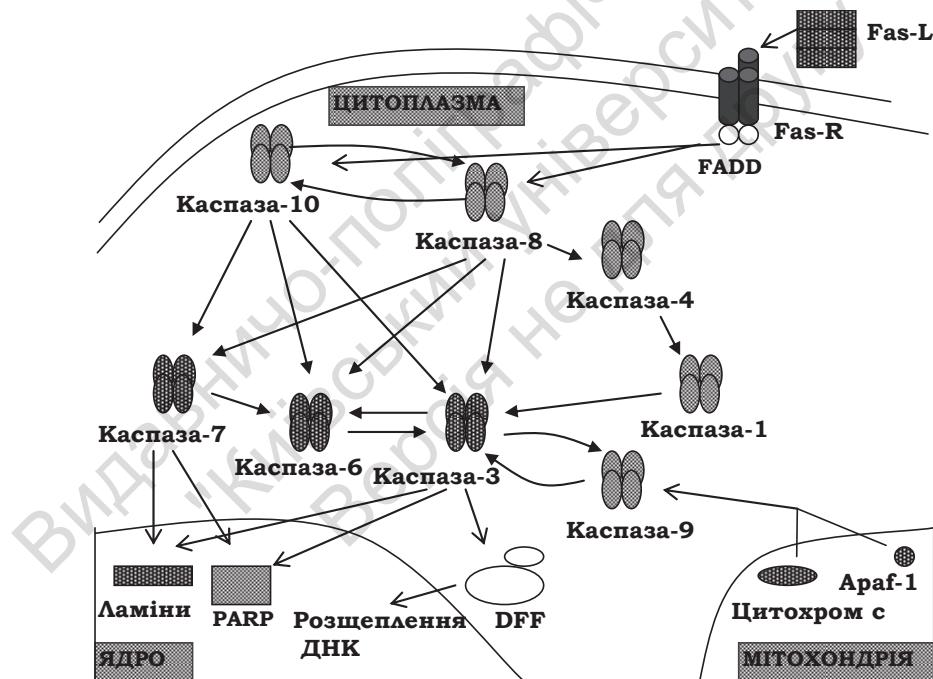


Рис. 3.21. Каскад каспаз

Як уже зазначалося, цитохром *c* не є єдиним білком, що звільнюється з мітохондрій під час апоптозу. Ще один звільнений білок – AIF

(фактор, що індукує апоптоз) – 57кД флавопротеїн, залучений до індуkcії конденсації та фрагментації ДНК в ядрі. Його активність не зінмається неспецифічним каспазним інгібітором z-VAD.fmk, що доводить незалежність шляху його дії від каспаз. Крім того, AIF індукує багато інших характеристик апоптозної загибелі клітин, таких як Δψ, вивільнення цитохрому с та зміна локалізації фосфатидилсерину між моношарами плазматичної мембрани. Гомологи цього білка знайдені в усіх трьох царствах metazoan (тварини, рослини та гриби), що свідчить про те, що AIF може бути одним із найбільш успадкованих відомих ефекторів загибелі.

Два інших білки – Diablo/Smac (*Second mitochondria-derived activator of caspases/Direct IAP binding protein with low pl* – другий активатор каспаз, що походить із мітохондрій/білок-зв'язувач IAP) та HtrA2/Omi (від *high temperature requirement – потреба у високій температурі*) містять із N-кінця молекули консервативну IAP-зв'язувальну послідовність (AVPS): Ala-Val-Pro-Ile. У результаті зв'язування зазначених білків із членами родини IAPs, зокрема із XIAP, c-IAP1, c-IAP2 та сюрвівіном, блокується дія цих інгібіторів, а каспази вивільнюються для роботи. Гіперекспресія Diablo/Smac або Omi/HtrA2 у клітинах підвищує їхню чутливість до індуkcії апоптозу ультрафіолетовим випромінюванням, що свідчить про здатність зазначених білків діяти як ендогенні активатори апоптозу.

Diablo/Smac синтезується як білок-попередник, який прямує до мітохондрій, де "дозріває" (видаляється послідовність із 55 амінокислот із N-кінця поліпептидного ланцюга, що відповідала за транслокацію Diablo/Smac до мітохондрій). Таке "дозрівання" забезпечує експозицію тетрапептиду AVPS назовні та набуття Diablo/Smac функціональної активності.

3.5. ТРАНСКРИПЦІЙНИЙ ЯДЕРНИЙ ФАКТОР NF-кВ

NF-кВ був ідентифікований як білок, що зв'язує специфічну послідовність ДНК усередині інtronу легкого ланцюга імуноглобуліну каппа (кappa) у зрілих В-клітинах, але не в їхніх попередниках (Р. Сен і Д. Белтімор, 1986).

Пізніше було показано, що ДНК-зв'язувальна активність цього фактора індукується численними екзогенними стимулами, і що ця активація не залежить від de novo-синтезу білків. NF-кВ знайдений у більшості типів клітин, а специфічні для його зв'язування ділянки ДНК ідентифіковані в промоторах та енхансерах великої кількості індуцибельних генів. Ядерний фактор NF-кВ контролює експресію генів, які беруть участь в імунній відповіді, апоптозі, регуляції клітинного циклу. Порушення такого контролю може спричинити запальні та автоімунні розлади, вірусні інфекції, рак.

Транскрипційний фактор NF-кВ – це гомо- чи гетеродимер. Його субодиниці є членами родини структурно подібних білків (*Rel/NF-кВ proteins*). У ссавців ідентифіковано п'ять членів цієї родини:

- NF-кВ1 (інша назва якого p50)
- NF-кВ2 (p52)
- RelA (p65)
- RelB
- c-Rel

Усі вони містять висококонсервативний Rel-гомологічний домен, який відповідає за їхню димеризацію та зв'язування з ДНК і специфічним інгібітором ІкВ (*inhibitor of NF-кВ*).

Активний NF-кВ є гетеродимером; найчастіше його складовими є p50 або p52 субодиниці та p65-субодиниця (рис. 3.22).

NF-кВ активується численними стимулами, наприклад цитокінами (TNF α і IL-1), Т- та В-клітинними мітогенами, вірусними білками, стресовими індукторами (ROS, ультрафіолетове випромінювання). У цитоплазмі NF-кВ зазвичай міститься в неактивній формі внаслідок його

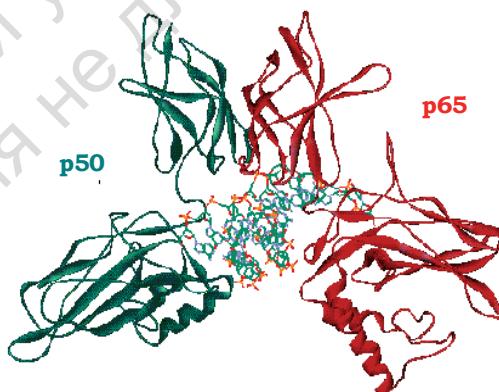


Рис. 3.22. Структура NF-кВ/ДНК комплексу.

Транскрипційний фактор складається з двох субодиниць: p50 (зелена) і p65 (червона).
(За Х. Верліндом)

асоціації з інгібіторами IкВ, до яких належать IкВ α , IкВ β та IкВ ϵ . Вищі активуючі сигнали (напр., зв'язування TNF α з його рецептором) можуть спричинити фосфорилювання IкВ відповідною кіназою (IKK (IкВ-kinase)). Це запускає деградацію IкВ через систему убіквітину, в якій молекула-мішень маркується ланцюгом убіквітину для деградації в 26S-протеосомі (рис. 3.23).

На цьому етапі необхідно детальніше зупинитися на термінах убіквітинування та протеасома.

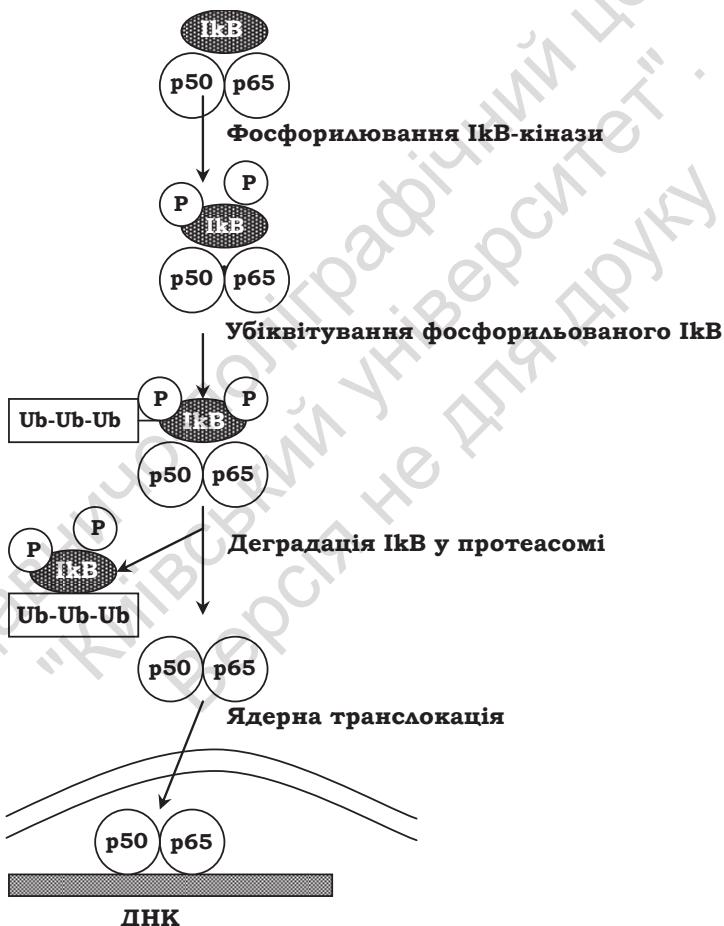


Рис. 3.23. Механізм активації NF-κB

Протеасома (від *протео-* і *сома* – частинка із протеолітичною функцією, за К. Танакою і А. Годбергом) – це високомолекулярний білковий комплекс, що функціонує в клітинах за певних умов як кілька протеолітичних ферментів, причому свою руйнівну дію він виявляє лише при нефізіологічних станах – під впливом речовин, здатних змінювати його структуру. Цей комплекс виявлено в клітинах як найбільш примітивних, так і вищих еукаріот, як в ядрі, так і в цитоплазмі, що свідчить про його важливу роль у нормальній життєдіяльності клітин. Протеасомою названі дві частинки з різною складністю будови, з різними молекулярними масами та коефіцієнтами седиментації (S): уперше виділений комплекс з молекулярною масою близько 700 кДа та коефіцієнтом седиментації 20S (т. зв. 20S-протеасома) як протеолітичне ядро входить до складу ще більш складної частинки – 26S-протеасоми.

У ссавців до 90 % клітинних білків – як з коротким, так і з тривалим терміном життя – підлягають гідролізу в порожнині протеасоми. Зрозуміло, що для початку такого процесу протеасома має розпізнати об'єкт гідролізу за певною ознакою. Таке "маркування" здійснює спеціальна система ферментів – система убіквітінування, а "ярликом" служить ланцюг не менш ніж із чотирьох молекул білка убіквітину, кожна з яких складається із 76 амінокислотних залишків. Як утворення ланцюга через залишок лізину в 48-му положенні кожної молекули, так і приєднання його до білка-субстрату здійснюється зазначеною ферментативною системою. Вона включає три типи ферментів – E1, E2 і E3 (рис. 3.24), є високоспецифічною та вибірковою за рахунок того, що побудована за принципом ієрархічного ускладнення. Фермент E1 (у клітині він лише один) активує молекулу убіквітину та передає її одному із ферментів родини E2 (це так звані "кон'югуючі" ферменти). Надалі залиучається третій ензим – представник родини E3 – лігаза, або "зшивний" фермент. Він приймає убіквітин від E2, з'єднується з білком-субстратом і ковалентно пришиває до нього ланцюг убіквітину [2].

Активований внаслідок убіквітинізації та протеосомальної деградації NF-кВ надалі може транслокуватися до ядра й активувати транскрипцію.

Як уже зазначалося, одними із мішней ядерного фактора NF-кВ є гени, що кодують антиапоптозні білки IAPs – **інгібітори апоптосомальних протеаз**. IAPs – це родина антиапоптозних білків, прототип яких описаний в бакуловірусу, та які мають виражену міжвидову гомологію. У людини відомо 8 IAPs-гомологів, серед яких NAIP, c-IAP1, c-IAP2, XIAP, сюрвін, лівін (рис. 3.25).

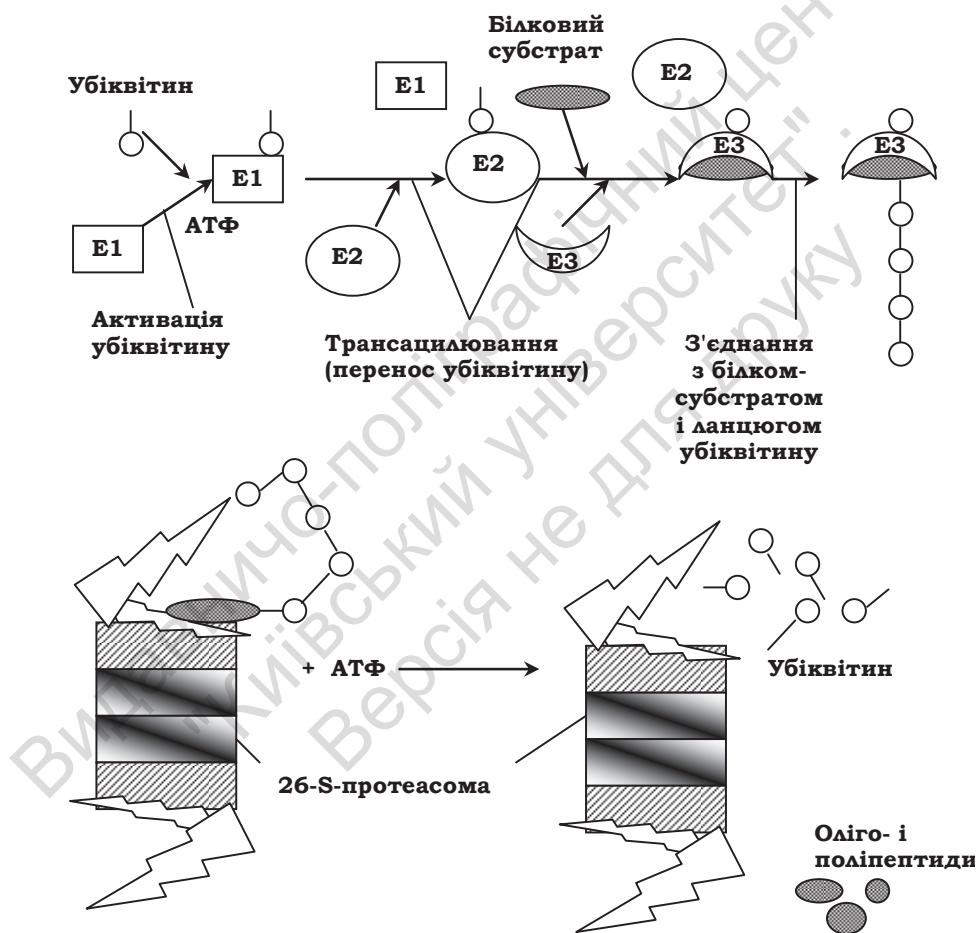


Рис. 3.24. Принцип функціонування системи протеасоми та убіквітинування як шляху гідролітичного розщеплення білків

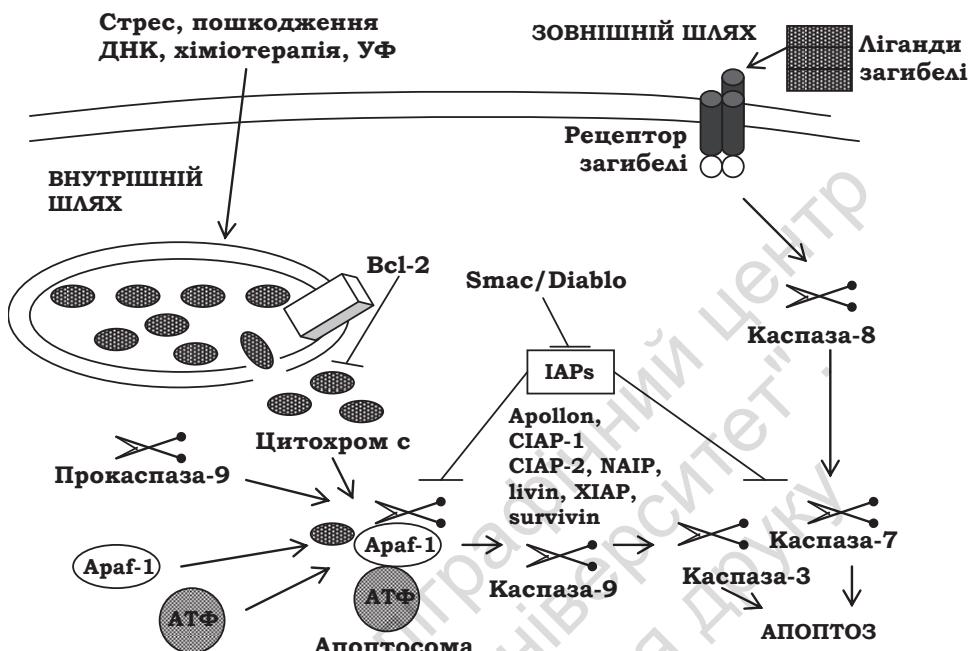


Рис. 3.25. Інгібування IAPs апоптозних шляхів.

IAPs-білки інгібують апоптоз, зв'язуючись з активними каспазами.

Вони пригнічують сигнали, генеровані як через зовнішній (опосередкований мембранистим рецептором), так і через внутрішній (за участю мітохондріальних подій) апоптозні шляхи

Усі IAPs містять специфічні ділянки – BIR-домени (від *baculovirus IAP repeat* – IAP-повтори бакуловірусу) – послідовності із 70 амінокислот, які забезпечують антиапоптозні властивості IAPs через взаємодію між IAPs і каспазою. XIAP, c-IAP1 і c-IAP2 містять три BIR-домени, завдяки чому можуть інгібувати каспази-3, -7 і -9. Активність IAPs, яка інгібує каспазу-3 та каспазу-7 (ці каспази мають до 54 % гомології у структурі), міститься у BIR-2 і потребує наявності лінкерної ділянки, що сполучає BIR-2 і BIR-1. Для гальмування активності каспази-9 достатня наявність ізольованого BIR-3-домену. Хоча тривимірні структури BIR-3 і BIR-2 дуже схожі, вони містять різні набори амінокислотних залишків, що є критичним для інгібування певних каспаз. Функцію домену BIR-1 до цього часу не вивчено. Можливо, він функціонує лише як ста-

білізатор молекул IAPs, є інгібітором інших, ще не відкритих каспаз або місцем зв'язування з потенційними модифікаторами активності IAPs, які також ще не відкрито [33]. Наприклад, XIAP зв'язується своїм BIR3-доменом із малою субодиницею каспази-9, причому він є інгібітором лише активної каспази-9, а не її неактивної прокаспазної форми. BIR2-домен (а точніше, лінкерна ділянка, що містить Gly-144, Val-146, Val-147, Asp-148) зв'язується з каспазами-3 та -7 шляхом формування водневих місточків з відповідними ділянками зазначених ферментів. Аналогічно діють і два інші представники родини IAPs – c-IAP1 та c-IAP2.

Крім BIR-домену, XIAP, c-IAP1 та c-IAP2 містять висококонсервативний RING-домен, який кодується геном *ring* (*really interesting new gene* – дійсно цікавий новий ген) на їхньому С-кінці, якому притаманна Е-3-убіквітин-лігазна активність. Завдяки цьому домену IAPs здатні каталізувати власне убіквітинування, і самі стають мішенями для деградації та можуть діяти й на інші білки, у тому числі на каспази-3 та -7, спричиняючи їхнє убіквітинування та деградацію.

Функціонально активний *Diablo/Smac* формує гомодимер і взаємодіє з BIR-2 і BIR-3-доменами IAPs, утворюючи з їхніми поверхнями специфічні контакти. Одна із форм *Diablo/Smac* – Smac-3 – здатна стимулювати приєднання убіквітину до інгібіторів апоптосомних протеаз, позначуючи ці білки для їхньої деградації в протеасомах.

У той же час, XIAP, лівін, c-IAP1 і c-IAP2 завдяки наявності RING-домену здатні протистояти інгібуючій дії *Diablo/Smac* шляхом приєднання до нього убіквітину – сигналу для деградації.

Оскільки *Diablo/Smac* викликає апоптоз шляхом гальмування IAP-каспазної взаємодії, деградація цього білка дозволяє IAPs ефективніше блокувати каспазну активність, сприяючи виживанню клітин. Взагалі, члени IAPs-родини високо експресовані в численних типах злойкісних пухлин.

Інший представник цієї родини, *сюрвівін* (відкритий в 1999 р.), не містить RING-домену і найбільш асоційований із раповими захворюваннями. Він зазвичай присутній у тканинах, що розвиваються, майже відсутній в нормальнích дорослих клітинах. За умов пухлиногенезу його активність зростає і стає асоційованою з хіміотерапевтичною резистентністю та низьким відсотком виживання серед пацієнтів.

Таким чином, члени родини IAPs стають одними з основних мішеней для потенціальної діагностики і терапевтичних напрямків онкологічних захворювань. Зокрема, гальмування сюрвівіну може зробити пухлинні клітини чутливішими до хіміотерапії внаслідок зростання в них апоптозних процесів.

3.6. АПОПТОЗ-ІНДУКУЮЧІ ПРОЦЕСИ ІНШИХ ОРГАНЕЛ

Останнім часом багато уваги приділяється апоптоз-індукуючим процесам в ендоплазматичному ретикулумі (ЕПР), апараті Гольджі та лізосомах.

3.6.1. Ендоплазматичний ретикулум

Відомо, що ЕПР бере участь у регуляції вмісту внутрішньоклітинного Ca^{2+} (оскільки ЕПР та мітохондрії є основними депо для цих іонів), у біосинтезі білків, їхньому експорті. Різні чинники, зокрема експресія мутантних білків, вірусні інфекції, недостатність енергії чи поживних речовин, екстремальні умови навколошнього середовища, зміни редокс-статусу, зміни в Ca^{2+} -гомеостазі порушують основні функції ЕПР і спричиняють так званий ЕПР-стрес. ЕПР-стрес веде до активації в клітинах самопротективних механізмів; у той же час надмірний і тривалий стрес спричиняє загибель клітин шляхом апоптозу (М. Шродер, Р. Кауфман, 2005) [44].

ЕПР-стрес має свої власні сигнальні шляхи. UPR (від *Unfolded Protein Response* – відповідь розгорнутих білків) є наслідком утворення агрегатів розгорнутих білків і використовує еволюційно консервативний сигнальний шлях, протягом якого "сигнал розгорнутих білків" активує низку трансмембраних ЕПР-локалізованих сенсорів, що реагують або на ЕПР-стрес у цілому, або на присутність розгорнутих білків. Серед таких білків-сенсорів є три найважливіші: IRE1 (від *inositol requiring 1*), PERK (*double-stranded RNA-activated protein kinase (PKR) – like endoplasmic reticulum kinase*) і ATF6 (*activating transcription factor 6*). Від них

починаються відповідно три головні шляхи виживання, які є наслідком транскрипційної відповіді на ЕПР-стрес.

UPR, крім того, заличає існуючі протеази і ферменти з убіквітин-лігазною активністю для контролю акумуляції.

IRE1 і PERK мають серин/треонін-кіназні цитоплазматичні домени, активуються ЕПР-стресом і при цьому піддаються гомодимеризації й фосфорилюванню. Шаперон BiP залишається асоційованим з люмінальним доменом (той, що звернений у просвіт органели) IRE1 і PERK – у такому стані ці молекули неактивні. За умов ЕПР-стресу надлишок розгорнутих білків у просвіті ЕПР спричиняє дисоціацію BiP з наступною олігомеризацією IRE1 і PERK, що активує трансдукцію сигналу. ATF6 також регулюється BiP, але в інший спосіб.

ЕПР-стрес-опосередкована активація IRE 1 результується у сплайсингу мРНК XBP-I (*X-box binding protein 1*). XBP-I є транскрипційним фактором, що надалі транслокується в ядро й індукує експресію широкого кола ЕПР-локалізованих шаперонів, у тому числі Grp78 (синонім: *BiP*) і Grp94 (від *glucose regulated protein*).

PERK-кіназа (або eIF2-кіназа) фосфорилює субодиницю фактора ініціації трансляції еукаріот eIF2 (від *eukaryotic initiation factor 2*), що спричиняє зниження загального білкового синтезу. Також зачучена в активацію низки транскрипційних факторів.

У нормі ATF6 у неактивному стані асоційований із мембрани ЕПР. Активація ATF6 також пов'язана з білком BiP, який за відсутності стресу зв'язується з двома послідовностями в поліпептидному ланцюзі, що мають назву GLS (від *Golgi localization signals – сигнал локалізації в апараті Гольджі*). За ЕПР-стресу BiP дисоціює, унаслідок чого ATF6 транспортується до апарату Гольджі, де активується розщепленням протеазами (*Site-1* і *Site-2* протеази – S1P і S2P) зі звільненням N-кінцевої послідовності, що є транскрипційним фактором bZIP (*basic leucine zipper*). Останній, зв'язуючись із ATF/CRE-елементами та елементами стресової відповіді I і II (*ER stress response elements I i II*), регулює експресію генів-мішеней ЕПР-стресу, серед яких BiP, XBP-J і CHOP.

Наслідками UPR, таким чином, є транскрипційна активація шаперонів, антиоксидантів, кофакторів і регуляторів, зачучених до деградації білків, асоційованих з ЕПР-стресом, та інгібування синтезу нових білків.

Відомо, що новосинтезовані білки після виходу з рибосом для правильного функціонування мають згорталися в стабільні тривимірні структури і лишатися такими протягом усього функціонального життя. Шаперони є спеціальними білками, що катализують укладку поліпептидів і забезпечують підтримку контролю якості структури білка. Збірка поліпептидів і укладка мультибілкових комплексів також здійснюється шаперонами. Шаперони зв'язуються з гідрофобними ділянками неправильно згорнутих білків і допомагають їм згорнутися й досягти стабільної нативної структури, чим запобігають їхнє включення в нерозчинні й нефункціональні агрегати. Крім того, протягом свого функціонального життя білок може підлягати численним стресам і денатурації. Такі частково денатуровані білки можуть стати мішенню протеаз, агрегувати або складатися в нативну структуру за допомогою шаперонів.

Таким чином, стресові умови призводять до зниження рівнів трансляції білків, що запобігає можливій наступній акумуляції розгорнутих білків. Активація ЕПР-стресом транскрипційних факторів індукує експресію шаперонів, які контролюють акумуляцію білкових агрегатів. Така скоординованість зупиняє утворення нових білків і надає час для видалення розгорнутих протеїнів, що відновлює клітинний гомеостаз. Однак, якщо ЕПР-стрес не врегульовується, клітина гине шляхом апоптозу (рис. 3.26). При цьому до ініціації проапоптозних відповідей також залучається активація шляхів UPR. Водночас механізми, за якими клітина за ЕПР-стресу "обирає" шлях апоптозу чи виживання, залишаються нез'ясованими.

ЕПР-стрес-індукований апоптоз асоційований із широким колом захворювань, у тому числі пошкодженнями при ішемії-реперфузії, нейродегенеративними розладами і діабетом. Точні молекулярні механізми ЕПР-стрес-індукованого апоптозу ще не повністю з'ясовано, але основними сьогодні вважаються такі.

Транскрипційна активація гена CHOP (від CCAAT/enhancer-binding protein (*C/EBP*) homologous protein, також відомий як GADD153 (від growth arrest and DNA damage-inducible gene 153) опосередкована всіма трьома трансдукторами ЕПР-стресу (PERK, IRE 1 і ATF6). Цей транскрипційний фактор залучається до ЕПР-стрес-індукованого апоптозу шляхом зниження експресії

Біохімічні механізми апоптозу

Bcl-2. Це підтверджується даними, згідно з якими СНОР-дефіцит спричиняє резистентність до ЕПР-стрес-індукованої загибелі клітин як *in vitro*, так і *in vivo*.

АДАПТАЦІЯ ТА АПОПТОЗ ЗА УМОВ ЕПР-СТРЕСУ

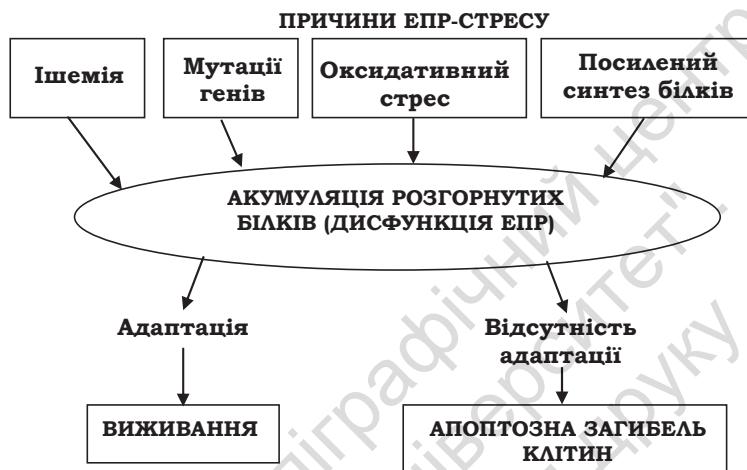


Рис. 3.26. Причини і можливі результати ЕПР-стресу

ЕПР-стрес також спричиняє зростання рівнів цитозольного Ca^{2+} . При цьому до поверхні ЕПР переміщуються кальпайн або каспаза-7, які розщеплюють попередник каспази-12. Наступна Арап-1-незалежна активація каспази-9, а за нею і каспази-3 та розвиток апоптозної програми залежать від виходу активованої каспази-12 з ЕПР у цитоплазму. До того ж в ЕПР експресується проапоптозний член родини Bcl-2 Вах, який сприяє виходу з ЕПР Ca^{2+} . Вах-опосередкований перехід Ca^{2+} з ЕПР у мітохондрії є важливим сигналом, який викликає вихід цитохрому *c* у цитозол.

Каспаза-12 може бути активована також **ЕПР-стрес-активованою IRE 1** (серин-треонінова кіназа і ендорибонуклеаза, трансмембраний білок), що може залучати каспазу-12 через адаптерний білок TRAF2 (*from tumour-necrosis-factor receptor-associated factor 2 protein*). Олігомеризована IRE1, крім того, може зв'язувати TRAF2 і Ask-1 (*apoptosis signal-regulating kinase 1*) з утворенням Ire-1-TRAF2-ASK1 комплексу, який надалі активує JNK (*c-Jun*

N-terminal kinase, підрозд. 4.7), що стимулює проапоптозні білки і запускає клітинну загибель.

При ЕПР-стресі також зростає утворення **ROS**, і антиоксиданти здатні протектувати клітини від ЕПР-стрес-індукованого апоптозу (підпідрозд. 3.11.3).

Як альтернатива каспазі-12 у людини до ЕПР-стрес-індукованого апоптозу залучається каспаза-4, що теж локацізована в ЕПР і розщеплюється специфічно за умов ЕПР-стресу (рис. 3.27).

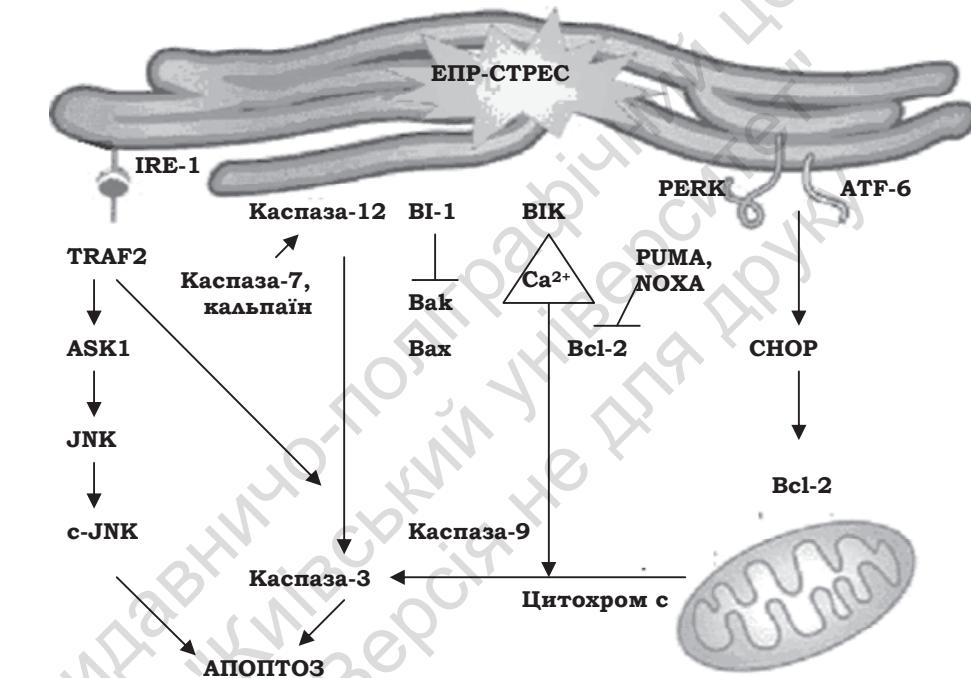


Рис. 3.27. Схема механізмів апоптозу із задученням ЕПР

Поряд із цими механізмами ЕПР-стрес також залучає **кілька шляхів апоптозу, що індукуються ЕПР-стрес-індукованими модуляторами клітинної загибелі**, серед яких різні члени родини Bcl-2 (Bcl-2, Bcl-x_L, BAX, BAK, BI-1 та BIK), BAP31 і p53-залежні продукти – NOXA і PUMA.

Останні дослідження вказують на важливу роль в ЕПР-стрес-опосередкованому апоптозі **протеасом**. ЕПР-стрес активує проа-

апоптозну ЕПР-локалізовану убіквітин-лігазу, мішенню якої є антиапоптозні члени родини Bcl-2. Завдяки цьому деградація антиапоптозних молекул зсуває баланс між про- і антиапоптозними факторами в клітині в бік апоптозу. При цьому активуються мітохондріальні події, у тому числі звільнюються інші проапоптозні фактори – цитохром c, AIF, Omi, Diablo/Smac, включаються каспазозалежні й каспазонезалежні сигнальні каскади, що спричиняють загибел клітин. Інгібування протеасомної активності (лактацистином, епоксоміцином тощо) запобігають деградації антиапоптозних факторів і таким чином протектиують клітини від ЕПР-стрес-індукованого апоптозу.

3.6.2. Ядро та апарат Гольджі

Каспаза-2 локалізована в апараті Гольджі, мітохондріях, ядрі й у цитоплазмі. Уперше цей фермент описаний як каспаза, що експресується в нейронах, активність якої знижується протягом розвитку мозку. Проапоптозна дія цієї протеази в апараті Гольджі пов'язана зі специфічним розщепленням білка гольджін-160. При цьому блокування активності зазначеного ензиму спричиняє інгібування дезінтеграції апарату Гольджі після ініціації апоптозу. Крім того, апарат Гольджі є основним місцем синтезу гангліозиду GD-3 (від *ganglioside-3*). За умов індукації фізіологічної загибелі клітин GD-3 переходить у мітохондрій й викликає там відкриття мембраних пор РТР з одночасним виходом апоптогенних факторів у цитоплазму.

Каспаза-2 також має два сигнали ядерного експорту в її про-домені; тому надекспресія каспази-2 результується в зростанні її ядерної локації. При цьому ядерна каспаза-2 залучається до розвитку МРТ.

Каспаза-2 поряд із цим залучена до p53-опосередкованого апоптозу (рис. 3.28). Специфічні стимули загибелі активують каспазу-2 із залученням адаптерних білків PIDD (від *p53-induced protein with a DD – p53-індукований білок із DD*) і RAIDD (від *receptor-interacting protein (RIP)-associated ICE-1/CED-3 homologous protein with a DD – RIP-асоційований ICE-1/CED-3-гомологічний білок із DD*), що спричиняє або немітохондріальні події апоптозу, або МРТ зі звільненням цитохрому с та інших проапоптозних факторів.

Оскільки PIDD залучений до p53-опосередкованого апоптозу, комплекс PIDD і каспази-2 відіграє критичну роль у регуляції апоптозу, індукованого генотоксинами.

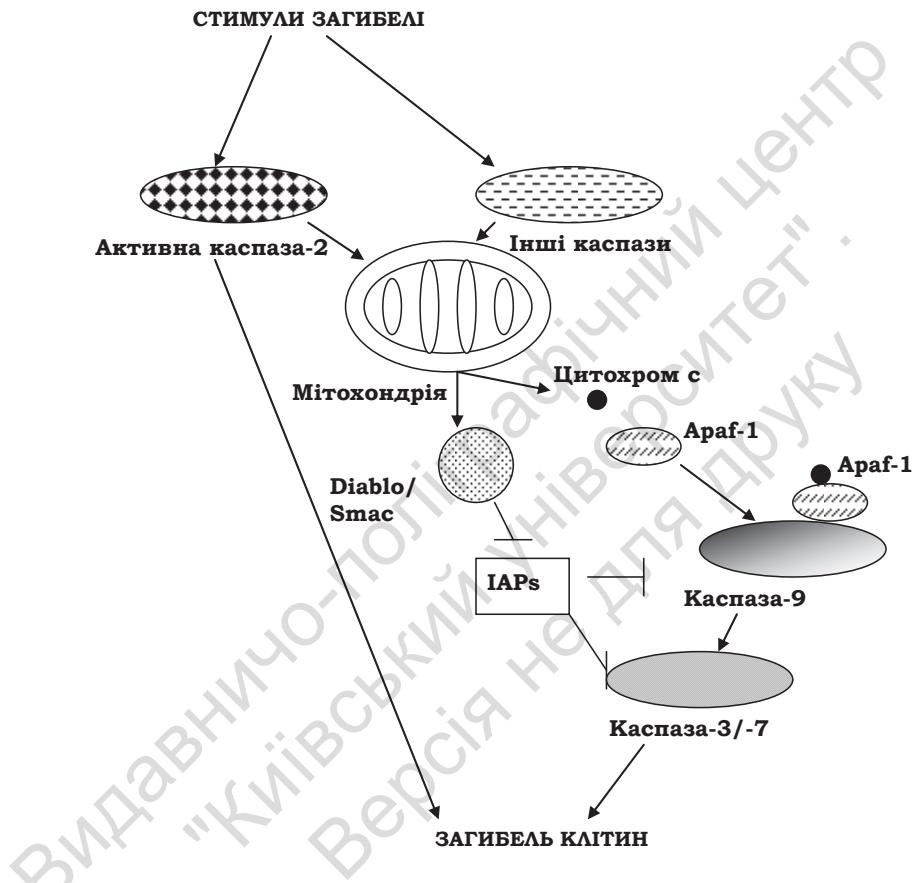


Рис. 3.28. Модель каспаза-2-опосередкованої загибелі клітин

3.6.3. Лізосоми

У лізосомах, як відомо, сконцентровані гідролітичні ферменти. При дії індукторів апоптозу лізосомальні ферменти, зокрема протеази родини катепсинів, надходять до цитозолю, що надалі може спричинити вихід із мітохондрій цитохрому с. Механізм

Біохімічні механізми апоптозу

виходу катепсинів із лізосом досі нез'ясовано, можливі різні варіанти – від відкриття специфічної пори до механічного розриву лізосомальних мембран.

Лізосомальні екстракти подібно до очищених катепсинів розщеплюють і активують проапоптозний член родини Bcl-2 Bid (рис. 3.29). Катепсин D може запускати активацію Bax і транслокацією його до мітохондрії, де він індукує відкриття пори в зовнішній мітохондріальній мембрани. Також показано пряме пошкодження мітохондрій і безпосередня активація прокаспаз лізосомальними ферментами, але ці результати потребують подальших досліджень. Генерація ROS унаслідок мітохондріальної дисфункції може впливати на лізосоми за типом зворотного зв'язку, що посилює проникність мембран лізосом і пошкодження мітохондрій.

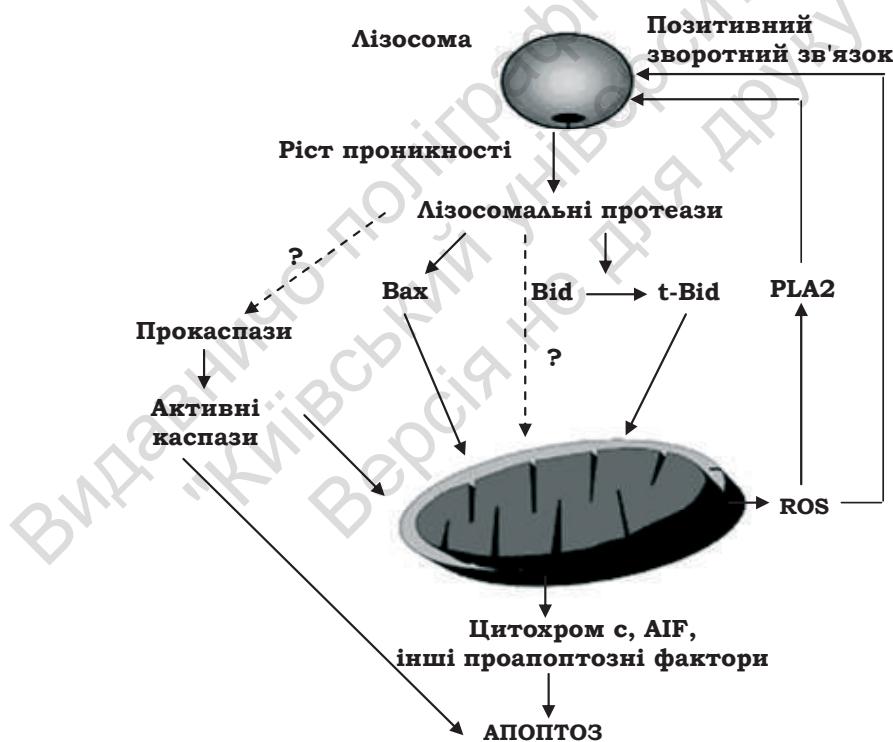


Рис. 3.29. Схема залучення лізосом до апоптозу

3.7. МАР-КІНАЗИ

МАР-кінази (*MAPK; Mitogen Activated Protein Kinases, протеїн-кінази, що активуються мітогенами*) – це група білкових серин-треонінових кіназ (кінази – це ферменти, які здійснюють фосфорилювання шляхом переносу фосфатних груп від АТФ, ГТФ, АДФ та інших макроергічних сполук на субстрати, у тому числі й ферменти, у деяких випадках при цьому активність останніх зростає). Вони активуються у відповідь на різноманітні позаклітинні стимули, які є мітогенами, тобто викликають мітотичний поділ клітин. До таких стимулів належать, зокрема, фактори росту, гормони, цитокіни, стрес. Хоча дуже активна проліферація клітин (мітоз) є необхідною для росту та розвитку молодих організмів, з віком проліферація може бути частіше асоційована із запаленням, крім того, у старих тварин проліферація легше спричиняє розвиток онкологічних захворювань.

Мітогени в основному діють на поверхні клітини, і передача сигналу ззовні всередину клітини відбувається саме за участю МАРК. Працюючи за каскадним принципом, вони фосфорилюють і активують одна одну в певній послідовності.

МАРК – це збірна група білків, містить три родини протеїнкіназ: p38, JNK/SAPK (*c-Jun-N-terminal kinase/Stress activated protein kinase*) та ERK (*Extracellular signal regulated kinase*). У більшості випадків активація протеїнкіназ родини ERK сприяє клітинному виживанню та проліферації, тоді як активація ферментів інших двох родин викликає індукцію апоптозу.

Основними мішенями МАРК є фактори транскрипції. У комбінації з низкою інших сигнальних шляхів МАР-кінази здійснюють фосфорилювання цих факторів, змінюючи їхню активність. При фосфорилюванні транскрипційних факторів МАРК функціонують усередині ядра та фосфорилюють білки, уже зв'язані із ДНК. Хоча транскрипційні фактори, локалізовані в ядрі, є важливими субстратами МАРК, лише частина активованих у цитоплазмі МАРК транслокується в ядро. Частина МАР-кіназ залишається в цитоплазмі та інших компартментах клітин, де ці ферменти можуть регулювати експресію генів і на посттранскрипційному рівні, використовуючи як субстрати цитоплазматичні білки, що беруть участь у стабілізації мРНК. МАРК-протеїнкінази також контролюють процес

Біохімічні механізми апоптозу

трансляції – у цих випадках каскад подовжений ще на одну кіназу, МАРКAP (*mitogen activated protein kinase activated protein*).

Загальний МАРК-кіназний каскад зазвичай включає трикіназний модуль (рис. 3.30).

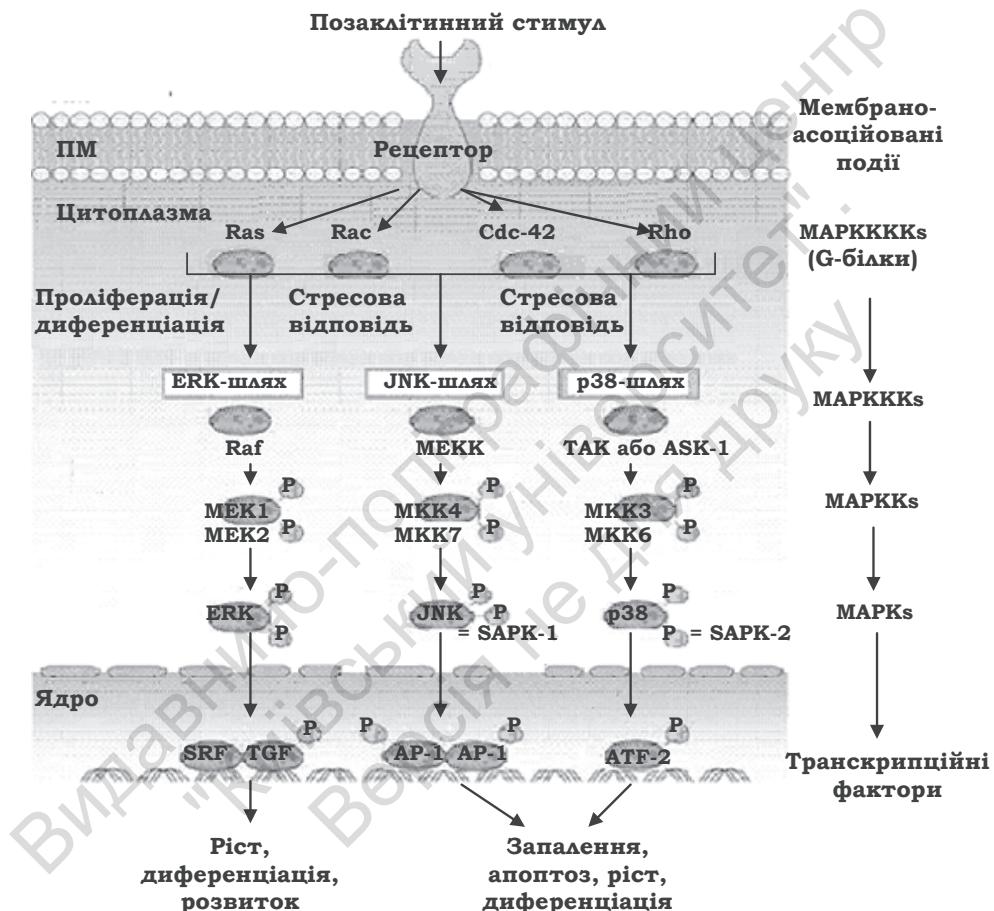


Рис. 3.30. Задучення ERK-, p38- та JNK/SAPK-кіназних каскадів до апоптозу, клітинної проліферації та диференціації.

З'язування зовнішнього сигналу з мембранистим рецептором активує кіназну активність рецептора. Подальші події: активування G-білка (МАРКІКК: Ras, Rho, ін.); активований Ras (Rho, ін.) активує МАРКІК; результатом є зміна транскрипції певних генів і фосфорилювання клітинних білків

Усередині цього модуля MAPK-кіназа (MAPK) фосфорилюється і активується кіназою MAPK (MAPK Kinase, MAPKK; інші назви – MKK, MEK). А MKK, у свою чергу, фосфорилюється та активується серин-треоніновими кіназами кінази MAPK (MAPK Kinase Kinase, MAPKKK; інші назви – MKKK, MEKK). Подібні трикомпонентні каскади ПК є еволюційно консервативними в усіх еукаріот – від дріжджів до людини.

Крім цих членів каскаду, останнім часом виділяють ще один рівень у ланцюзі передачі внутрішньоклітинних сигналів, до якого належать *малі ГТФази* (зокрема *Ras*) та *протеїнкінази*, що беруть участь у регуляції активності MKKK і здійсненні специфічності передачі сигналу на трикомпонентний протеїнкіназний каскад. Ці білки можна назвати "кіназа кінази кінази MAPK (MAPK Kinase Kinase Kinase, MAPKKKK; інші назви – MKKKK або MEKKK) [12].

Контрольована регуляція MAP-кіназного каскаду включається в клітинну проліферацію та диференціацію, тоді як нерегульована активація може спричинити онкогенез.

ERK-кінази активуються різними мітогенами шляхами, опосередкованими рецептором тирозинових кіназ, G-білок-спареними рецепторами або цитокіновими рецепторами. Як уже зазначалося, в основному вони відіграють роль у клітинній проліферації та диференціації.

Навпаки, p38, JNK/SAPK-кінази часто активуються у відповідь на різноманітні види стресів, дію запальних цитокінів та інші апоптозні стимули. Рецептори для подібних стимулів найчастіше невідомі. Прикладом стресорних тригерів, здатних активувати ці шляхи, можуть бути вінblastин, метилметансульфонат, кадмій, арсеніт натрію, саліцилат натрію, церамід, анізоміцин, тепловий шок, ультрафіолет, гіпероксія, гіперосмолярність, низький pH, пероксид водню, ішемія-реперфузія, деякі фактори росту, наприклад TNF α .

Відомо, що JNK фосфорилює Bcl-2, відміняючи його антиапоптозні властивості й сприяючи звільненню цитохрому c, каспаза-9-опосередкованій активації каспази-3 та іншим проапоптозним подіям. Крім того, мішенню JNK також є білок-супресор пухлини p53 – кіназа фосфорилює його за залишком серину (34), модулюючи його функціонування як ключового регулятора клітинної проліферації та загибелі. Є гіпотези щодо

подібного впливу на білок p53 і p38 МАРК. Водночас включення цих трьох сигнальних систем (ERK, p38, JNK/SAPK-кіназних каскадів) в апоптоз, клітинну проліферацію та диференціацію є комплексним.

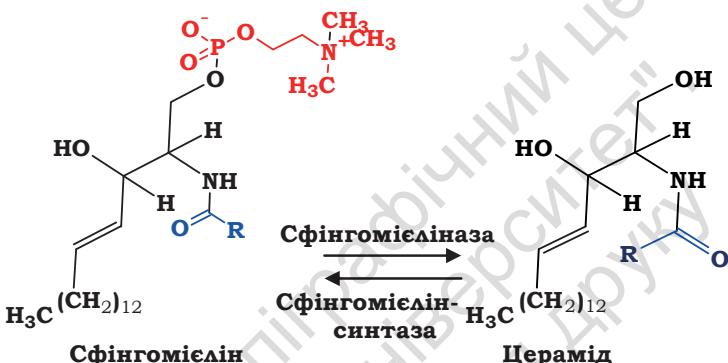
Імовірно, що кінцеве рішення щодо виживання чи загибелі клітини після тригерного сигналу визначається тонким балансом між активацією апоптозних шляхів і шляхів проліферації через індукцію/гальмування цих трьох (та інших) напрямків передачі сигналу.

3.8. СФІНГОЛІПІДИ В ПЕРЕДАЧІ АПОПТОЗНОГО СИГНАЛУ

Сфінгомієліновий шлях апоптозу – це всюдисуща консервативна сигнальна система, яка ініціюється гідролізом фосфоліпіду плазматичної мембрани сфінгомієліну до цераміду та передбачає залучення інших ферментів і утворення інших біологічноактивних похідних цього ліпіду – сфінгозину, церамід-1-фосфату, сфінгозин-1-фосфату. Ці сполуки є біосинтетично спорідненими біоактивними лігідними медіаторами, залученими до регуляції проліферації, диференціації, міграції, ембріогенезу, ангіогенезу, зупинки росту, апоптозу, гомеостазу Ca^{2+} і відповідають усім критеріям вторинних месенджерів: їхній вміст зростає у відповідь на дію позаклітинних агентів; відповідні екзогенні препарати викликають біологічний ефект, аналогічний дії позаклітинного агента; для них виявлено біохімічні мішенні.

Різні цитокінові рецептори та стреси використовують похідні сфінголіпідів як посередники про- або антиапоптозного сигналу. Зокрема, церамід (N-ацилсфінгозин), сфінгозин і сфінгозин-1-фосфат діють як "вторинні месенджери" в механізмах апоптозу. Церамід і сфінгозин індукують апоптоз, тоді як сфінгозин-1-фосфат є антиапоптозним чинником. Баланс – так званий сфінголіпідний реостат – між цими про- і антиапоптозними сфінголіпідами визначає долю численних типів клітин. У той же час, включення сфінгомієлінового шляху жорстко регулюється іншими антиапоптозними контролюючими механізмами і балансом про- та антиапоптозних систем [39].

Для більшості, а, можливо, й для всіх ссавців характерний такий механізм утворення біологічно активних сфінголіпідів. Біосинтез сфінгомієліну (*N*-ацилсфінгозин-1-фосфохоліну) включає перенос фосфорилхолінової групи фосфатидилхоліну на церамід, основу всіх сфінгомієлінів (фермент – сфінгомієлінсінтаза). Катаболізм сфінгомієліну включає активацію сфінгомієлінспецифіної фосфоліпази С – сфінгомієлінази, яка гідролізує фосфодієфірний зв'язок сфінгомієліну з утворенням цераміду і фосфорилхоліну:



На генерацію значної кількості цераміду за участю сфінгомієлінази витрачається кілька секунд/хвилин.

У людини є кілька ізоформ сферінгомієлінази, що відрізняються оптимальним pH і потребою в катіонах: кисла (опт. pH 4,5–5,0), Mg²⁺-залежна нейтральна та Mg²⁺-незалежна нейтральна, лужна, що продукуються різними генами.

Таким чином, церамід є центральним елементом метаболічного шляху сферінгомієліну (рис. 3.31), виступаючи як його попередник і як безпосередній продукт катаболізму.

Церамід може синтезуватися і *de novo* шляхом конденсації сесорину й пальмітоїл-КоА (рис. 3.32); синтез *de novo* стимулюється дією деяких ліків, іонізуючої радіації; при цьому для генерації значної кількості цераміду потрібно кілька годин.

Одразу після генерації церамід може або акумулюватися, або перетворюватися на інші метаболіти (рис. 3.31.):

- А) церамід-1-фосфат (фермент церамідкіназа);
- Б) сфінгозин (церамідаза) і сфінгозин-1-фосфат (сферінгозинкіназа);

Біохімічні механізми апоптозу

- В) сфінгомієлін (сфінгомієлінсінтаза);
 Г) в апараті Гольдгі – глікозилювання з утворенням глікосфінголіпідів.

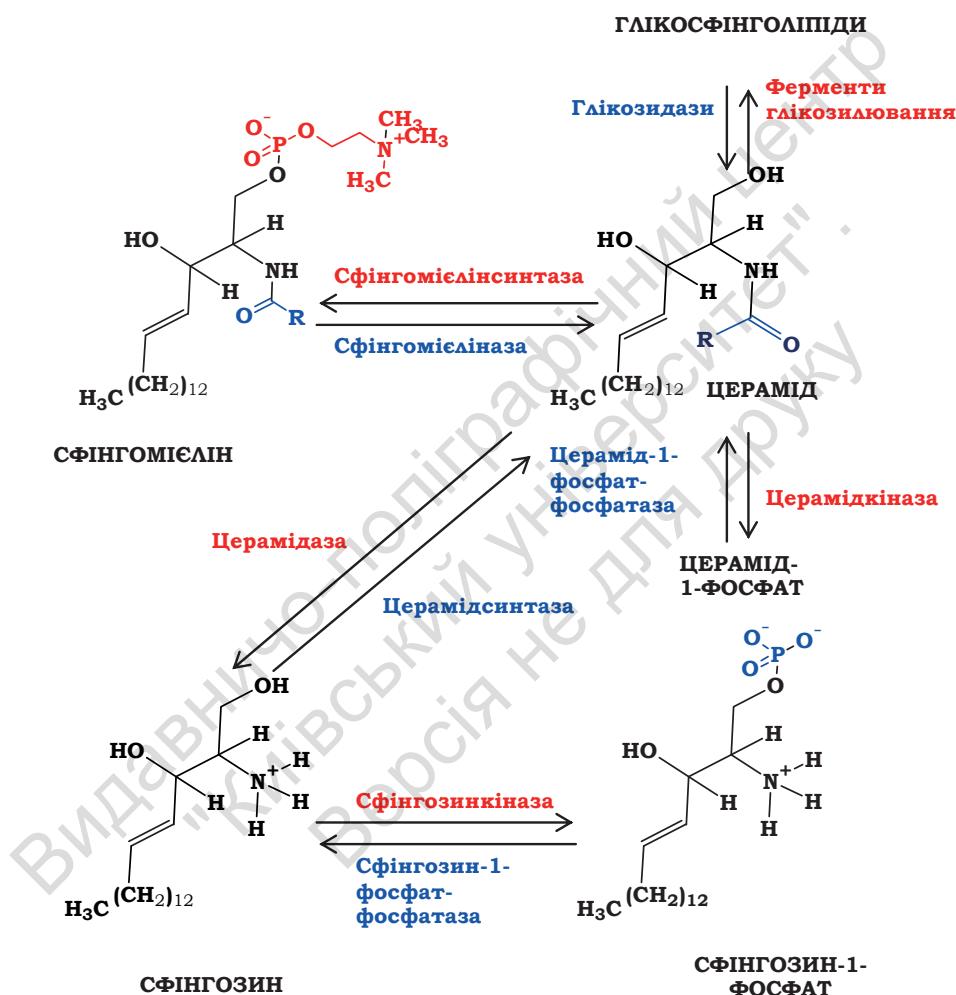


Рис. 3.31. Метаболічний шлях сферомієліну
ї утворення вторинних мессенджерів.

Ферменти, що перетворюють церамід на метаболіти, позначені червоним кольором, а ферменти, що катализують зворотні реакції – синім

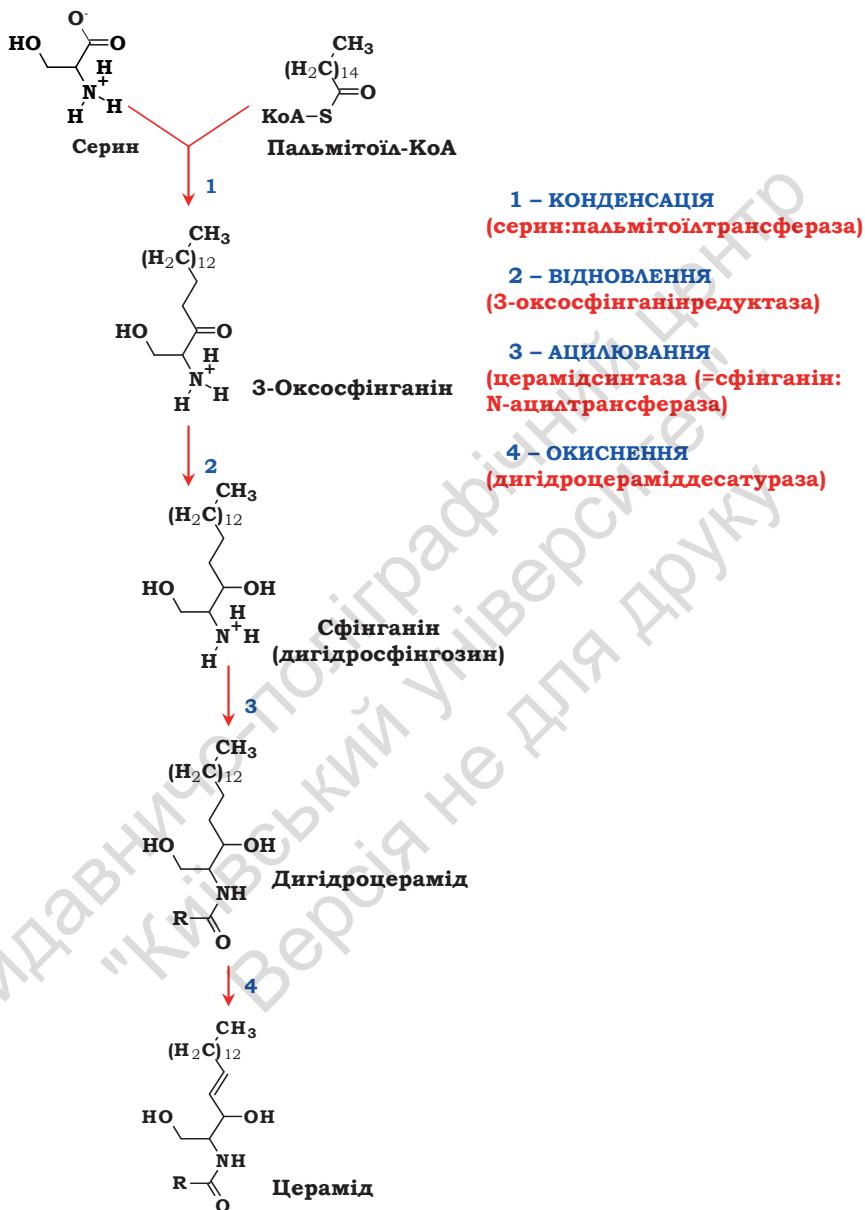


Рис. 3.32. de novo-метаболічний шлях цераміду в утворенні вторинних месенджерів

3.8.1. Церамід як вторинний месенджер

Церамід генерується під впливом численних фізіологічних сигналів (цитокіни, фактори росту, іонізуюче та УФ випромінювання, хемотерапевтичні ліки, 1,25-(OH)₂D₃, Fas-L, NGF, окисний стрес) (рис. 3.33, А). В останньому випадку фізіологічні концентрації глутатіону інгібують нейтральну сфінгомієліназу – зниження рівня цього трипептиду при окисному стресі може спричиняти пролонговану активацію нейтральної сфінгомієлінази, зростання генерації цераміду і як наслідок – апоптоз.

Ці фактори впливають у різних типах клітин або на активність *сфінгомієлінази* (TNFa, УФ, іонізуюче випромінювання, ін.), або на активність *церамідази* (цитотоксичні препарати типу етопозиду, даунорубіцину, форболового ефіру тощо), або модулюють активність обох ферментів.

Церамід після генерування стимулює:

- Протеїнкіназу, що активується церамідом (SAPK – *ceramide-activated protein kinase*), яка активує c-Raf-1 і далі – ERK-кіназний каскад;
- ПкСζ, що діє через NF-kB;
- Протеїнфосфатазу, що активується церамідом (SAPP – *ceramide-activated protein phosphatase*), мішень якої невідома;
- SAPK/JNK-каскад.

Усі ці шляхи можуть спричинити розвиток таких наслідків дії цераміду, як проліферація, диференціація, зупинка росту й клітинна загибель.

Отже, сфінгомієліновий шлях може діяти за різними напрямками, відіграючи роль як у розвитку запалення, у проліферації та диференціації, так і в апоптозних ефектах. Подібні розгалуження сфінгомієлінового шляху було досліджено на моделі із застосуванням TNF-α-рецептора. Специфічний домен рецептора може зв'язувати різні сфінгомієлінази (СМази): мембронопроксимальний відділ – нейтральну, а ділянка, що містить домен загибелі (DD) – кислу сфінгомієліназу. Активація нейтральної СМази опосередкована адаптерним білком FAN (*factor associated with neutral SMase activation*), який зв'язується з мембронопроксимальним доменом цитоплазматичної ділянки TNF-α-рецептора – цей домен має назву

NSD (*neutral sphingomyelinase domain*) (рис. 3.34). Нейтральна СМаза включає ERK-кіназний каскад і прозапальну відповідь.

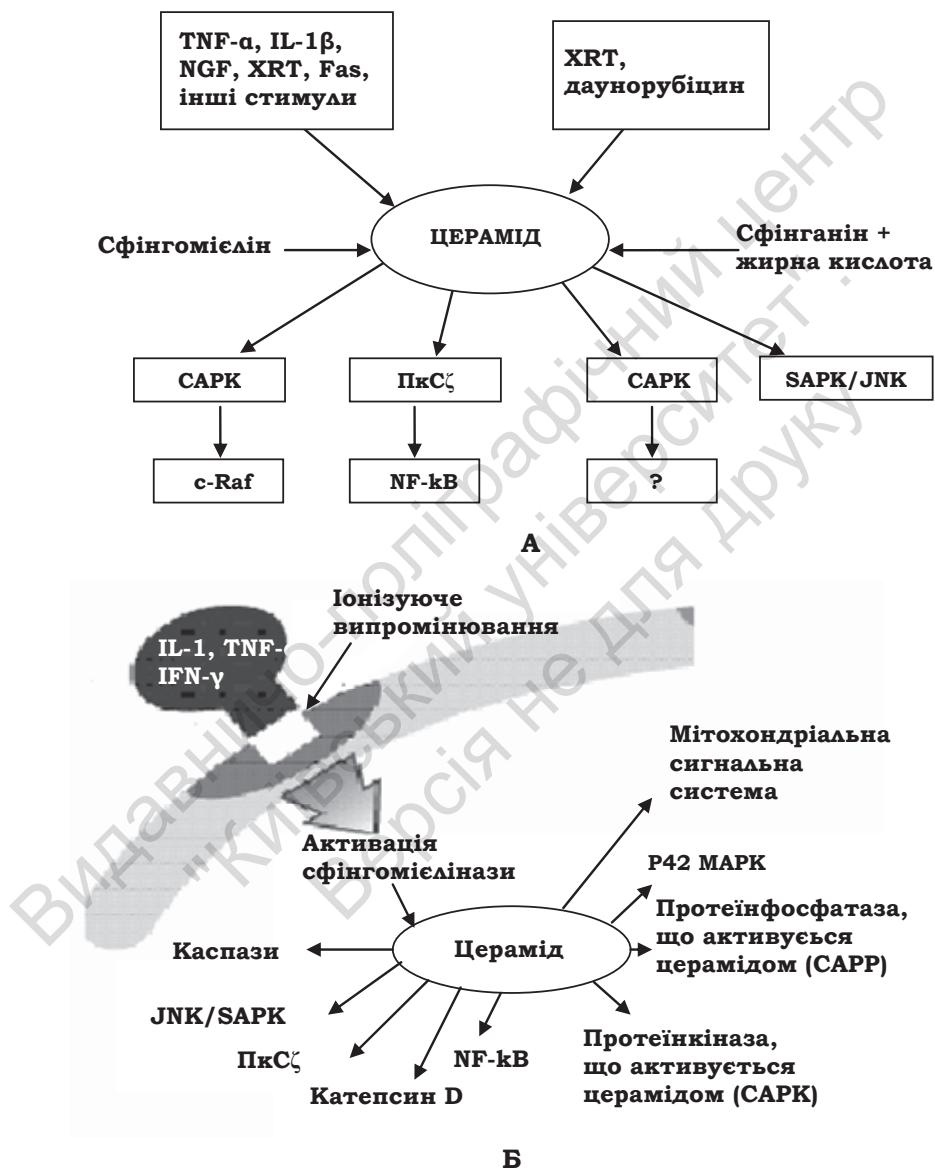


Рис. 3.33. Індукція синтезу цераміду та його основні мішені

Біохімічні механізми апоптозу

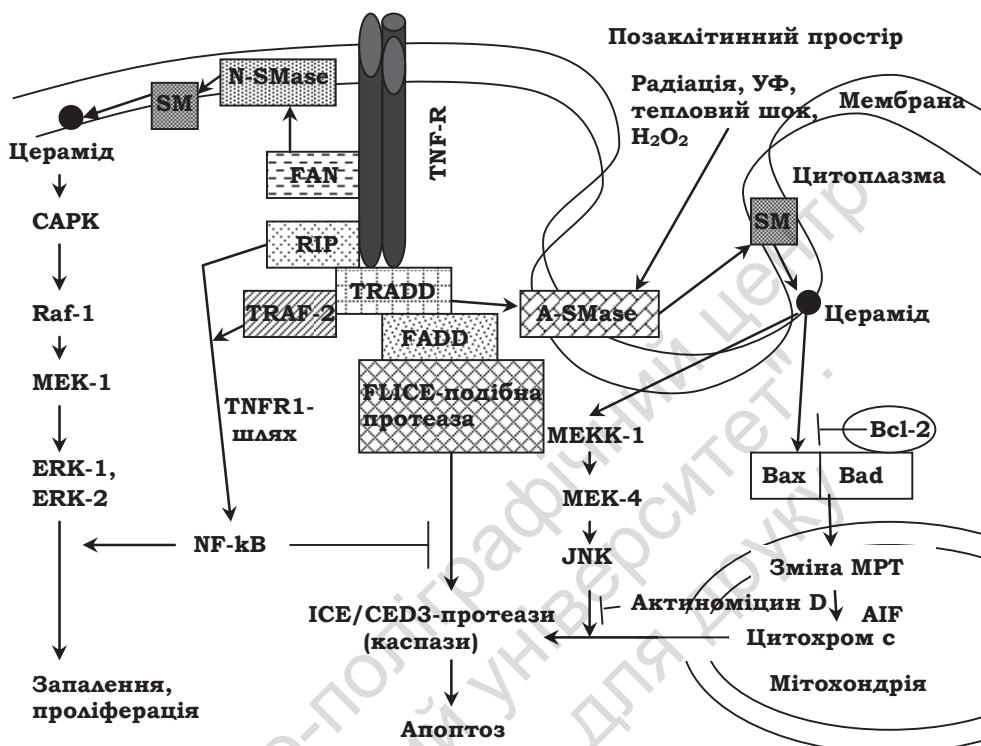


Рис. 3.34. Церамід-опосередковані шляхи апоптозу і виживання клітин.

SM – сфінгомієлін; N-SMase – нейтральна сфінгомієліназа;

A-SMase – кисла сфінгомієліназа

Через швидку активацію кислої СМази діють більшість цитокінів і стресів, які спричиняють апоптоз, включаючи CD-95 (Fas-L), TNF- α , іонізуюче та ультрафіолетове випромінювання, тепловий шок, оксидативний стрес. Проапоптозна відповідь цераміду генерується внаслідок стимулювання кислої СМази через адаптерні білки TRADD і FADD, що зв'язуються з доменом загибелі TNF-R1. Цей пул генерованого цераміду може активувати аспартилпротеазу катепсин D (сприяє автокаталітичному протеолізу його попередників) або передбачає ініціацію SAPK/JNK-каскаду.

Як уже зазначалося, генерація церамідів стає максимальною протягом декількох секунд після впливу цих стресів. Та-

ким чином, радіація може викликати два різних незалежних механізми індукації апоптозу, і ці механізми топологічно незалежні. Ініціація сфінгомієлінового шляху є мембранопов'язаним процесом, а р53-залежний апоптоз – це наслідок ушкодження ДНК.

Через те, що проліферативний і прозапальний ефекти цераміду залучають нейтральну СМазу і включають активацію ERK-кіназного каскаду, а проапоптозні його ефекти – SAPK/JNK-шлях, виникає гіпотеза, що у вирішенні питання щодо апоптозної загибелі клітини чи її виживання може відігравати значну роль баланс між активностями SAPK/JNK- та ERK-кіназних систем.

Крім впливу на MAP-кіназні каскади, генерація цераміду може змінювати активність мембраних білків-ферментів і трансмембраних рецепторів.

Церамід також напряму протидіє PI3-K/Akt сигнальному механізму виживання клітини внаслідок активації фосфатази та індукації протеолітичної деградації Akt. Утрата PI3-K/Akt-активності внаслідок подібних ефектів цераміду може спричинити зниження фосфорилювання та активацію низки ключових регуляторів апоптозу. У той же час, надекспресія Akt знижує продукцію цераміду і блокує церамід-індукований апоптоз.

Церамід може активувати серин-треонінові фосфатази (PP1 і PP2A). Ці фосфатази інактивують сигнальні молекули, що залучені у виживання клітин – наприклад класичні й нові ізоформи ПкС і Akt/PкВ. PP2A також може дефосфорилювати й інактивувати антиапоптозну молекулу Bcl-2.

Проапоптозні впливи цераміду можуть задіяти і мітохондрії шляхом дестабілізації їхніх мембран або звільнення з них апоптогенних факторів. Церамід здатний посилити Bax-індуковану проникність мембрани і спричинити формування пор, достатніх за розміром для вивільнення мітохондріальних іонів і невеликих білків, наприклад цитохрому с. Церамід, що утворюється в зовнішньому шарі клітинної мембрани, викликає полярний перерозподіл та олігомеризацію ("утворення шапки") рецептора Fas. У цьому випадку на цитоплазматичній поверхні клітини формується суперкаталітичний домен, який є посилюючим етапом, необхідним для Fas-R-опосередкованого апоптозу (підрозд. 3.3).

Сигнальна система діацилгліцеролу та протеїнкінази С (ДАГ/ПкС) є антиапоптозним регулятором мультиплетних елементів церамід/SAPK-сигнального каскаду. Активація ПкС форболовим ефіром інгібує радіаційно-індуковану сфінгомієліназну активність і генерацію цераміду, а також спричиняє ПкС-опосередковану зупинку сфінгомієлінзалежного шляху апоптозу. С. Спіегель описав механізм, за яким ПкС може пригнічувати церамід-опосередкований апоптоз через ERK-каскад виживання. У той час, як TNF- α збільшує рівні цераміду, активація ПкС зменшує це зростання, імовірно, включаючи деградацію цераміду ферментом церамідазою. Сфінгозин, що утворюється при цьому, фосфорилюється сфінгозинкіназою, яка також активується, і ПкС, з утворенням сфінгозин-1-фосфату (Сф-1-Ф).

3.8.2. Церамід-1-фосфат

Уперше ця регуляторна молекула була ідентифікована в 1990 р. (Р. Колесник, М. Хемер) у HL-60 клітинах лейкемії людини. Утворюється із цераміду шляхом фосфорилювання за участю церамідкінази. Церамідкіназа (CERK) є відмінною від сфінгозинкінази (SphK), але досить спорідненою до неї. Потенціальні біологічні функції церамід-1-фосфату були виявлені лише в 2003 р. (Х. Ліанг, Б. Петтус). Діє лише автокринно – усередині клітини, оскільки плазматична мембрана не має відповідних рецепторів для зв'язування церамід-1-фосфату.

Разом із церамідом, сфінгозином і сфінгозин-1-фосфатом – сполуками, які можуть взаємоперетворюватися, церамід-1-фосфат є компонентом системи "реостату", що регулює функції імунних клітин (у тому числі відповіді тучних клітин, нейтрофілів і макрофагів, хемотаксис, виживання й апоптоз імунних клітин – див. далі). Церамід-1-фосфат сприяє виживанню клітин, оскільки є інгібітором як PP1, так і PP2A, які в більшості клітин мають про-апоптозні ефекти й активуються церамідом. Інгібування цих фосфатаз асоційовано з активацією ERK-каскадів (проліферація) і зростанням синтезу ДНК [23].

3.8.3. Сфінгозин і сфінгозин-1-фосфат

Церамід, у свою чергу, є попередником синтезу сфінгозину і сфінгозин-1-фосфату.

Сфінгозин утворюється шляхом деацилювання цераміду за участю церамідаз (кисла, лужна) або через дефосфорилювання сфінгозин-1-фосфату (рис. 3.35).



Рис. 3.35. Біосинтез сфінгозину із цераміду і сфінгозин-1-фосфату

Сфінгозин (СФ) має виражені проапоптозні ефекти – його низький у нормі рівень різко зростає в клітинах, стимульованих індукторами апоптозу.

Сфінгозин діє через модуляцію функцій мультиплетних сигнальних молекул: ПкС δ (протеїнкінази Сδ), каспази-3, SDK-1 (сфінгозинзалежна кіназа-1; синонім: ПкС δKD), α3β1 інтегрину, Bcl-2, внаслідок чого її впливи є комплексними. Зокрема, він діє як потенційний інгібітор ПкС і є активатором таких проапоптозних факторів, як білок ретинобластоми (Rb) і p21-активовані кінази (PAKs).

Сфінгозин активує каспазу-3, яка катализує розщеплення ПкС зі звільненням С-кінцевого домену ПкС – ПкС δKD. Цей домен ідентифікували як *сфінгозинзалежну кіназу-1* (SDK-1). Ця кіназа фосфорилює за залишками серину протеїн 14-3-3. Таке фосфорилювання шкодить утворенню 14-3-3-димерів і веде до виникнення фосфорилюваних мономерів. Відомо, що утворення 14-3-3-димерів сприяє інактивації проапоптозних

білків Bad і Bax біля мітохондріальної мембрани і відповідно гальмує розвиток апоптозних процесів. Таким чином, сфінгозин через активацію SDK-1 сприяє фосфорилюванню протеїну 14-3-3 з наступною активацією проапоптозних білків Bad і Bax та, як наслідок, інактивацією антиапоптозних Bcl-2 та Bcl-x_L.

Інша участь сфінгозину в стимуляції апоптозу пов'язана з гальмуванням експресії мРНК Bcl-2 та Akt-кінази. Остання бере участь в інтегрин-посередкованому сигналі виживання.

Механізми сфінгозин-індукованого апоптозу можуть також передбачати участь лізосом, зокрема транслокацію лізосомальних гідролаз у цитозоль. Є дані про лізосомотропні та детергентні властивості сфінгозину. Високі дози сфінгозину ($> 20 \mu\text{M}$) в експерименті швидко руйнують лізосоми і спричиняють некроз без активації каспаз та інших ознак апоптозу. Низькі й середні його концентрації ($< 20 \mu\text{M}$) викликають часткове пошкодження лізосом, яке випереджає мітохондріальні події та активацію каспаз. Участь у цих процесах лізосомальних протеаз (зокрема катепсинів D, B та/або L) як важливих посередників сфінгозин-індукованого апоптозу підтвержується тим фактом, що застосування інгібітора лізосомальних протеаз – пепстатину А – знижує сфінгозин-індуковану каспазну активність, хоч безпосередньо на каспази він не діє.

Інші ефекти сфінгозину пов'язані з його перетворенням на сфінгозин-1-фосфат (Сф-1-Ф) шляхом фосфорилювання за участю однієї із двох кіназ: *сфінгозинкінази-1* (СфК-1) або *сфінгозинкінази-2* (СфК-2) (рис. 3.36). Сф-1-Ф є полярною еволюційно консервативною молекулою, що присутня у дріжджів, рослин і ссавців.



Рис. 3.36. Метаболічні шляхи СФ-1-Ф

Сфінгозин-1-фосфат є мультифункціональним ліпідним медіатором, що регулює клітинний ріст, диференціацію та програмовану клітинну загибель. Метаболічна конверсія цераміду на Сф-1-Ф є молекулярним перемикачем, який знижує чутливість клітини до летальних факторів.

СфК – ключовий фермент, що регулює відносні рівні СФ-1-Ф, Сф і цераміду. СфК1 (43 кДа) і СфК2 (65 кДа) активуються численними факторами росту і сигналами, що ведуть до виживання клітин. Зокрема, СфК1 активується через зв'язування PDGF з його рецептором. Крім PDGF, індукторами синтезу Сф-1-Ф є агоністи GPCR, цитокіни, форболові ефіри, вітамін D3, антигени. Усі зазначені активатори найчастіше діють на посттрансляційному рівні, впливають на стан фосфорилювання СфК, на її локалізацію, взаємодію з іншими білками. У той же час, деякі із зазначених агентів можуть впливати на рівень транскрипції/трансляції, або навіть на всі рівні. У такому випадку гострі впливи здійснюються шляхом посттрансляційних змін, а хронічні – на рівні транскрипції/трансляції.

СфК1 міститься в мозку, серці, тимусі, селезінці, нирках, легенях; її ген локалізований у хромосомі 17; сам фермент має чотири трансмембральні домени.

СфК2 характерна для нирок і печінки; її ген міститься в 19-й хромосомі; білок не має трансмембраних доменів.

Фактори, що спричиняють синтез СФ-1-Ф, одночасно знижуютьпули цераміду і сфінгозину та підвищують виживання клітин. Таким чином, СфК можна віднести доprotoонкогенів – порушення в її регуляції, а саме посилення активація може стати причиною переважання процесів проліферації над апоптозом і онкологічного переродження клітин. Надекспресія СфК сама по собі без сторонніх стимулів здатна посилити ріст клітин. Інгібування СфК має антипухлинну і проапоптозну дію, що показано на різних лініях пухлин. Інгібування СфК також збільшує чутливість ракових клітин до хемотерапії.

Сф-1-Ф може діяти як екстрацелюлярний медіатор (через G-білок-поєднані рецептори ПМ) або як внутрішньоклітинний месенджер (механізми повністю не досліджено) (рис. 3.37).

Біохімічні механізми апоптозу

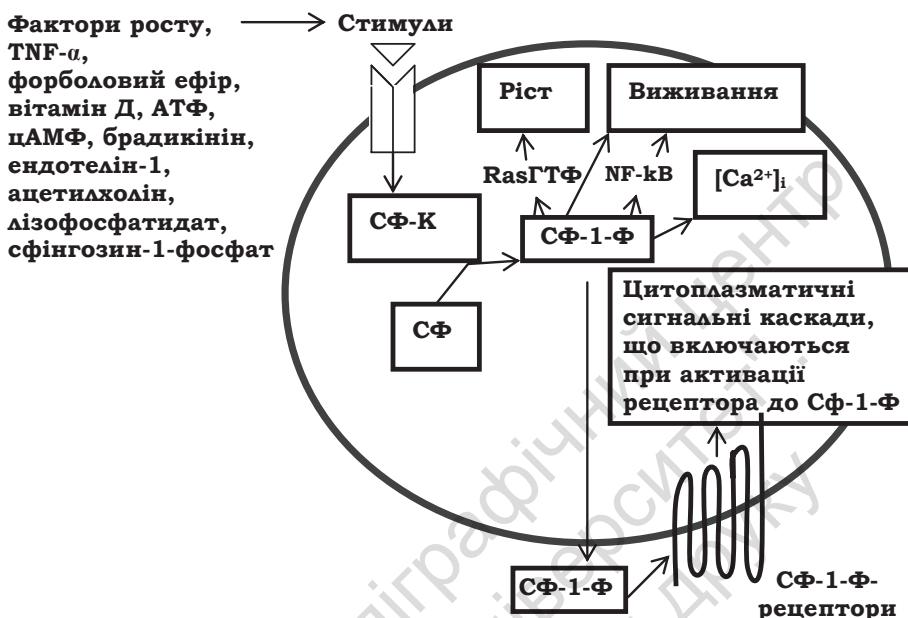


Рис. 3.37. Екстравітільярні та внутрішньоклітинні ефекти Сф-1-Ф

За екстравітільярних впливів Сф-1-Ф є лігандом для низки рецепторів родини рецепторів гена диференціювання ендотелію (EDG – *endothelial differentiation gene*), які експресуються на плазматичній мембрани більшості клітин: S1P1 (edg1), S1P2 (edg5), S1P3 (edg3), S1P4 і S1P5. Зв'язування Сф-1-Ф із певним типом S1P-рецепторів активує певний G-білок (рис. 3.38). Сфінгозин-1-фосфат через різні G-білки впливає на низку наступних мішеней, серед яких аденоідатіклаза (AC – у різних клітинах може активуватися або інгібуватися), фосфоліпаза С (PLC – активація, індукція утворення I3Ф, мобілізація Ca²⁺), ERK1/2 (стимуляція), PI3К (активація), Rho (активація і наступна стимуляція фосфоліпази D), Rac (індукція з наступною активацією JNK/p38).

Ендогенні рівні Сф-1-Ф модулюються в широкому колі клітин у відповідь на позаклітинні стимули – фактори росту, цитокіни, агоністи GPCR. Сф-1-Ф як внутрішньоклітинний вторинний месенджер в багатьох клітинних лініях проявляє антиапоптозну дію, активуючи Raf/MKK/ERK-кіназний каскад шляхом фосфо-

рилювання (тому Сф-1-Ф вважається мітогеном), і в той же час знижуючи рівень SAPK/JNK-опосередкованого апоптозу. Сф-1-Ф також безпосередньо активує транскрипційні фактори NF-кВ і AP-1, що залучені в антиапоптозні сигнальні шляхи. До того ж уведення Сф-1-Ф у лімфоцити знижує експресію представника проапоптозної родини Bcl-2 – Bax – і запобігає стрес-індукуваним процесам у мітохондріях (напр., блокує вивільнення цитохрому с і Diablo/Smac із мітохондрій та унеможливає запуск каскаду каспаз). Сф-1-Ф також залучений до I3Ф-незалежної мобілізації Ca^{2+} , в інгібування активності каспаз і в інші шляхи, що ведуть до клітинної проліферації й супресії церамід-індукуваного апоптозу.

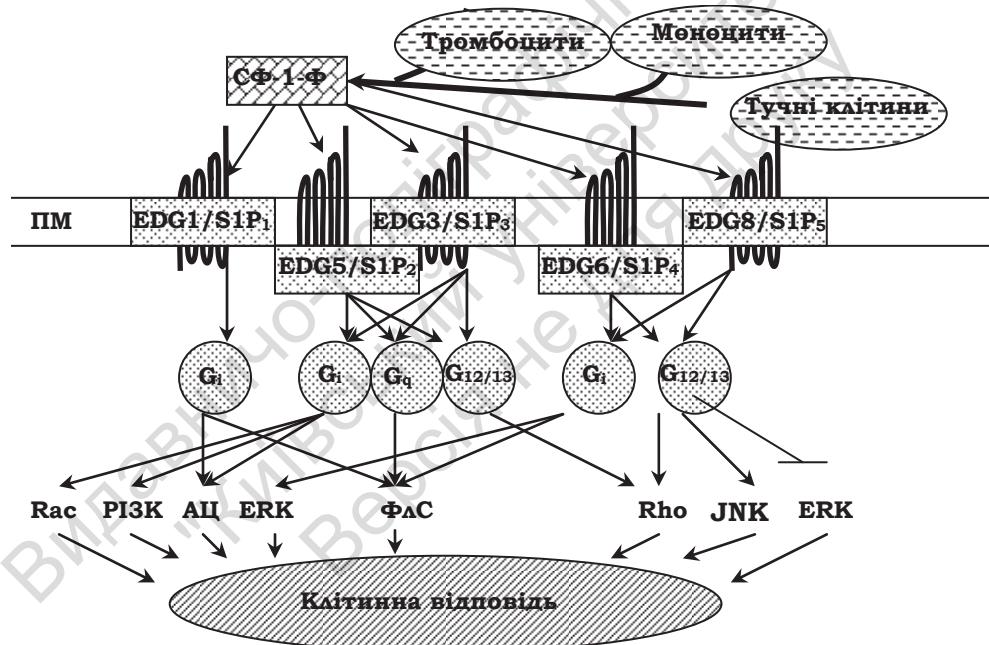


Рис. 3.38. Дія Сф-1-Ф як ліганду S1P-рецепторів

Припинення сигналу через Сф-1-Ф здійснюється за участю одного з наступних ферментів: Сф-1-Ф-фосфатази (синонім: фосфатаза ліпідного фосфату (LPP – *lipid phosphate phosphatase*))

або СФ-1-Ф-ліази (катализує розщеплення сфінгозин-1-фосфату до пальміталльдегіду і фосфоетаноламіну; потребує коферменту піридоксальфосфату) (рис. 3.36).

3.8.4. Модель церамід/сфінгозин-1-фосфатного реостату

Баланс між клітинними рівнями цераміду і СФ-1-Ф визначає фізіологічний стан клітини, оскільки ці сполуки мають протилежну дію: СФ-1-Ф сприяє проліферації й виживанню клітин, а церамід – припиненню росту й апоптозу. Причинами наявності таких протилежних впливів є різні ефекти цих сполук на членів ERK, JNK, p38, каспази (рис. 3.39).

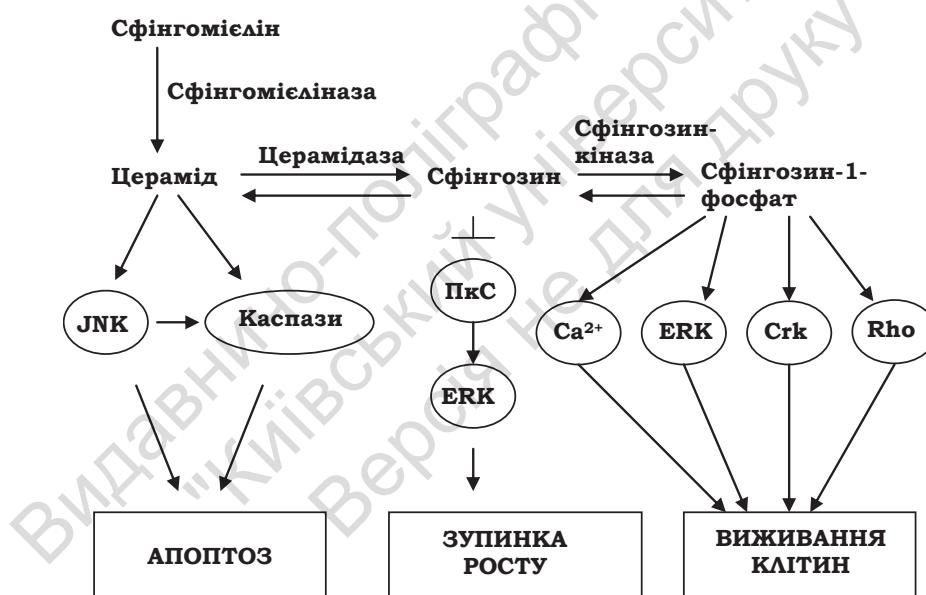


Рис. 3.39. Схема моделі церамід/СФ-1-Ф-реостату

Крім того, ростові фактори і цитокіни по-різному регулюють СМазу, церамідазу, СфК, і отже, цим сприяють установлению певних рівнів цераміду і СФ-1-Ф.

Оскільки церамід частіше проявляє проапоптозні ефекти, а сфінгозин-1-фосфат залучений до процесів виживання клітин, метаболічне перетворення цераміду на Сф-1-Ф може служити "перемикачем" між апоптозом і проліферацією, а інгібування цього перетворення потенційно може бути використано для індукції загибелі клітин, зокрема при таких захворюваннях, як рак.

Антиапоптозний контроль церамід-опосередкованого апоптозу може залучати Bcl-2-систему. Церамід індукує мітохондріальне пошкодження й апоптоз; у даному випадку антиапоптозні члени родини Bcl-2 (Bcl-2 та Bcl-x_L) діють як антагоністи церамідного сигналу в деструкції мембрани мітохондрії, захищаючи їх від пошкодження, розбужання і запобігаючи звільненню проапоптозних факторів.

Таким чином, ПкС-сигналізація і антиапоптозна Bcl-2-система можуть повернути загибелі клітин на шлях виживання у різних точках апоптозного шляху, причому ефекти антиапоптозних Bcl-2-білків на мітохондріальні функції, ймовірно, є регуляторами апоптозу на його кінцевих стадіях.

3.9. Міжнуклеосомна фрагментація ДНК

Мультиплетні шляхи апоптозу найчастіше підсумовуються фрагментацією ядерної ДНК. Розщеплення хромосомальної ДНК на фрагменти олігонуклеосомального розміру (про нуклеосомну організацію хроматину див. далі) є біохімічним маркером апоптозу, який відрізняє його від некрозу. Такі морфологічні та біохімічні зміни при апоптозі гарантують, що клітини, які гинуть, будуть залишати мінімальний вплив на сусідні тканини *in vivo*. Сьогодні відомо принаймні дві нуклеази, що беруть участь у деградації ядерної ДНК.

Х. Уанг зі співробітниками, намагаючись ідентифікувати ендонуклеазу, причетну до фрагментації ДНК, винайшли та очистили білок, який назвали **фактором фрагментації ДНК** (*DNA fragmentation factor*, DFF) [38]. Це гетеродимерний білок, що складається із факторів фрагментації ДНК 45 та 40. Він здатний спричиняти фрагментацію хромосомальної ДНК у присутності

Біохімічні механізми апоптозу

активованої каспази-3. DFF40 притаманна ДНКазна активність, тоді як DFF45 функціонує як інгібітор активності DFF40. При активації під час апоптозу DFF45 розщеплюється каспазою-3 і дисоціює від DFF40 (рис. 3.40).

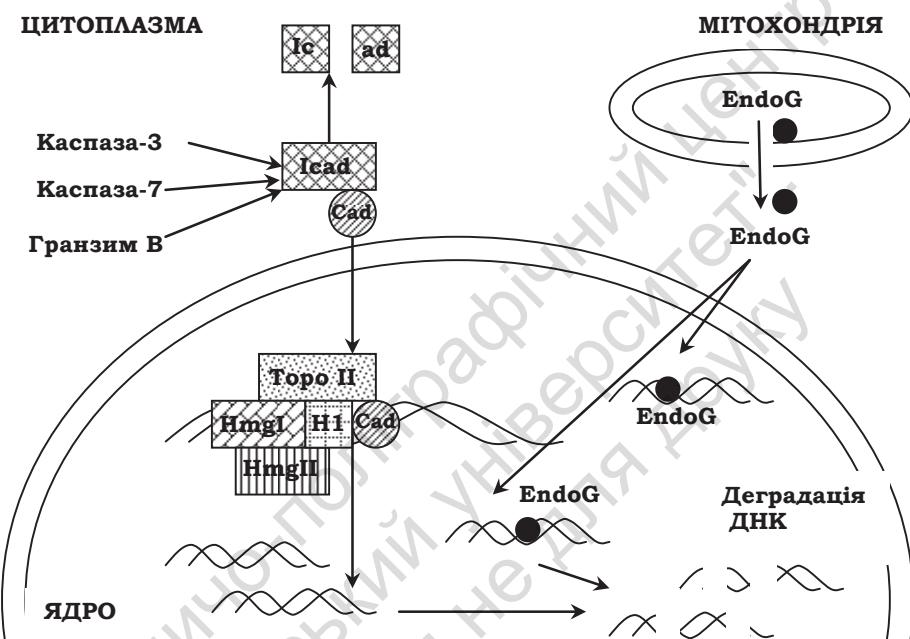


Рис. 3.40. Загальна схема деградації ДНК під впливом DFF40 (синонім: CAD) та endoG;

Торо II – топоізомераза II; Hmg1 і Hmg2 (від *High mobility group protein*) – негістонові ДНК-зв'язувальні білки, що включаються в низку фундаментальних процесів, зокрема в реплікацію, транскрипцію, рекомбінацію, репарацію і здатні стимулювати зв'язування ДНК з численними транскрипційними факторами та ядерними протеїнами, включаючи p53 та NF-kB

DFF40 складається із 338 амінокислотних залишків і має на-зви-синоніми CAD (*caspase-activated DNase* – ДНКаза, що активується каспазою) і CPAN (*caspase-activated nuclease* – нуклеаза, що активується каспазою). Унаслідок звільнення від DFF45 DFF40 стає активним і здатним розщеплювати ДНК на фрагме-

нти олігонуклеосомального розміру. У випадку мутації DFF45 ДНК-фрагментаційна активність комплексу втрачається. DFF40 може також активуватися каспазою-7 і гранзимом В. Ця активована ДНКаза здатна генерувати дволанцюгові розриви, її активність може бути спотенційована високорухливими білками, наприклад гістоном Н1. Таким чином, білок DFF відіграє роль апоптозної ендонуклеази. На додаток до деградації ДНК DFF також індукує конденсацію хроматину *in vitro*. Така конденсація теж утрачається в мутантних клітинах.

Крім регуляції ендонуклеазної активності, DFF45 є необхідним для синтезу та зборки DFF40. Як DFF40, так і DFF45 знайдені у людини, мишей та дрозофіл, проте у *C. elegans* гомолога поки що не виявлено.

Фрагментація ДНК і клітинних ядер за певних умов не є необхідною для апоптозу. Крім того, апоптоз у DFF45-дефіцитних клітинах може відбуватися, незважаючи на резистентність до ДНК-фрагментації та конденсації хроматину. Це наштовхує на думку, що в таких клітинах може міститись інший вид ендонуклеази.

У *C. elegans*, що не мають фактора DFF, виявлено ферментний білок NUC-1 – гомолог ДНКази II, що відіграє важливу роль в опосередкованні етапу ДНК-деградації внаслідок активації апоптозу (Х. Хорвітц та ін.). У той же час, С. Нагата показав, що у мишей з мутованим DFF45, у яких заінгібована активність DFF, фрагментація ДНК може відбуватися у фагоцитах. Більше того, ДНКаза II, що міститься в лізосомах фагоцитів, подібна до ендонуклеази, яка руйнує ДНК після того, як апоптозні клітини поглинулися.

Нещодавно виявлено, що новим фактором, який індукує клітинну загибель при звільненні з мітохондрій ссавців, є **ендонуклеаза G** (EndoG) (Л. Лі та ін.). Це білок, що складається з 297 амінокислот і має молекулярну масу 32646 Da, як кофактор потребує магнію та функціонує як гомодимер. EndoG є еволюційно консервативною, закодованою відповідним геном ендонуклеазою, основна функція якої за умов життя клітини – реплікація, рекомбінація та деградація мітохондріальної ДНК. Тому в нормі EndoG виявляють лише в мітохондріях, але у відповідь на апоптозний стимул вона виходить у цитоплазму клітини (підрозд. 3.4) і функціонує навіть за умов зниженої каспазної активності. Був

виявлений і ген, що кодує гомологічний білок у нематоди *C. elegans* – *cps-6* (відповідно, білок Cps-6). При мутаціях цього гена клітини протектуються від впливів активної форми каспази Ced-3 і від розвитку апоптозу. Ізольований білок Cps-6 виявив нуклеазну активність як в ізольованих ядрах, так і в плазмідах – невеликих замкнених молекулах ДНК.

При стимуляції апоптозу EndoG звільняється з мітохондріального міжмембраниового простору і транслокується в клітинне ядро, де індукує міжнуклеосомальну ДНК-фрагментацію. У протилежність DFF, який спричиняє розщеплення ДНК в обох ланцюгах одночасно (*double-stranded DNA breaks*), EndoG руйнує одноланцюгові ділянки швидше, ніж подвійну спіраль. У мишей, дефіцитних за DFF45 (DFF45(-/-)-миші, або миші, "нокаутовані" за відповідним геном – підпідрозд. 3.2.2) у відповідь на індукцію апоптозу EndoG розщеплює хромосому ДНК каспазо-незалежним шляхом: ця фрагментація може бути заблокована антитілами до EndoG і не знімається інгібіторами каспазної активності. Це підкреслює важливість активності зазначеної ендонуклеази для таких клітин і вказує на існування каспаза-незалежного шляху апоптозу, ініційованого мітохондріальними подіями [36].

Ще один каспаза-незалежний шлях апоптозу пов'язаний зі звільненням із мітохондрій іншого проапоптозного білка – **AIF** (підрозд. 3.4) (рис. 3.41). Цей флавопротеїн, гомологічний бактеріальним і рослинним оксидоредуктазам, транслокуючись до ядра, викликає ДНК-фрагментацію на фрагменти 50 кілопар основ (кп.о.) і периферійну конденсацію хроматину, але не олігонуклеосомальне розщеплення ДНК. Він синтезується як неапоптогенний попередник у цитоплазмі, звідки імпортуються до мітохондріального міжмембраниового простору, де шляхом протеолізу звільняється від амінотермінальної послідовності, яка забезпечувала транслокацію білка до мітохондрії. Таким чином, AIF набуває потенційної апоптогенності.

Його деградуючий вплив на ДНК показаний, зокрема, на ізольованих ядрах. Мікроін'єкції AIF у цитоплазму інтактних клітин також індукують конденсацію хроматину та експозицію фосфатидилсерину плазматичної мембрани (підрозд. 3.12). Мітохондріально-ядерне переміщення AIF запобігається антиапоптозним біл-

ком Bcl-2, який блокує мітохондріальні події апоптозу. Водночас інгібітор каспаз z-VAD.fmk не впливає на апоптозіндуковану транслокацією AIF, хоча й інгібує олігонуклеосомальну фрагментацію ДНК і конденсацію хроматину на ранніх стадіях [25, 45].

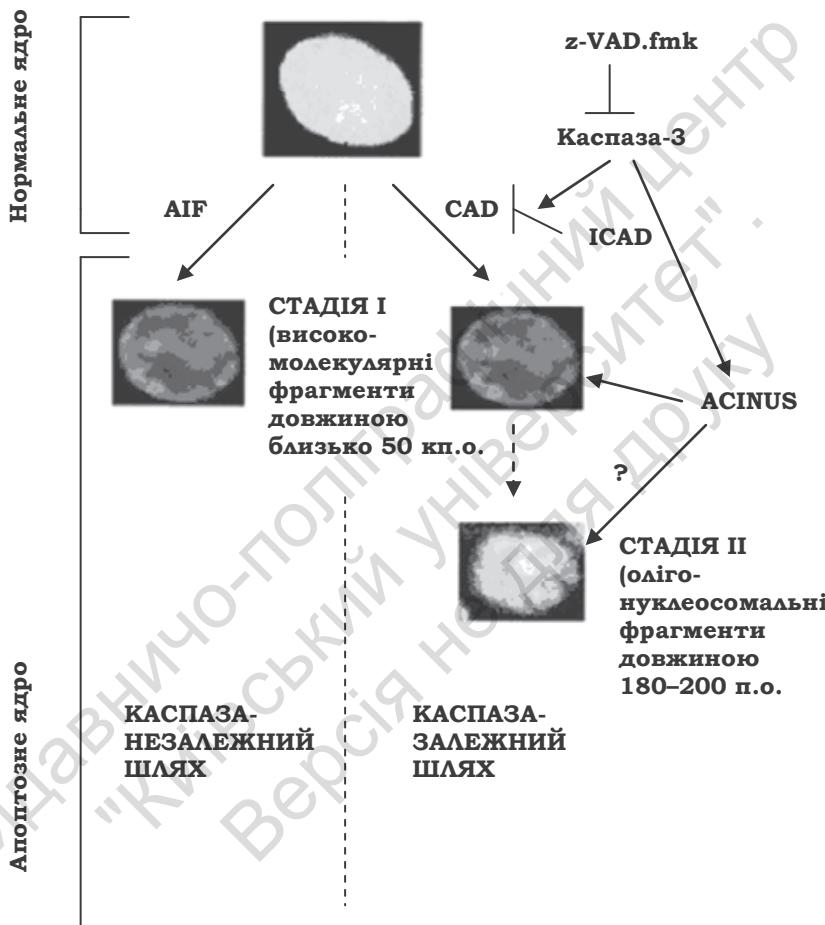


Рис. 3.41. Схема двох різних фаз ядерного апоптозу.

AIF спричиняє фрагментацію ДНК до високомолекулярних фрагментів і периферійну конденсацію хроматину (стадія I); CAD викликає олігонуклеосомальну фрагментацію та конденсацію ДНК (стадія II)

Апоптоз можливий і без фрагментації ДНК. Так, виявлено ядерний білок *acinus* (*apoptotic chromatin condensation inducer in the nucleus* – апоптозний індуктор конденсації хроматину в ядрі), з якого при комбінованій дії каспази-3 (протеоліз при Asp 1093) та неідентифікованої протеази (протеоліз при Ser 987) утворюється фрагмент Ser 987 – Asp 1093. Цей фрагмент у присутності додаткових неядерних факторів викликає апоптозну конденсацію хроматину та фрагментацію ядра (каріорексис) без фрагментації ДНК (рис. 3.41).

Крім двох розглянутих головних ендонуклеаз, існують й інші ензими, що каталізують міжнуклеосому фрагментацію ДНК у різних типах клітин і в клітинах різних типів тварин (напр., активність γ-ДНКази тимоцитів, нирок, селезінки, печінки та деяких інших органів щура відсутня в серці та мозку; Mg²⁺-залежна ендонуклеаза людини клітин HL-60; Ca²⁺/Mg²⁺-залежна ендонуклеаза активується в лімфоцитах при Т-клітинному апоптозі). Виявлено також ендонуклеази, що мають максимальну активність при кислих значеннях pH і потребують інших катіонів [17]. Перетравлювати ядерну ДНК можуть і циклофіліни.

Як відомо, основним елементом хроматину є нуклеосома – упорядкований комплекс гістонів і ДНК. Корова частина нуклеосоми містить по дві молекули гістонів H2A, H2B, H3, H4 і ланцюг ДНК довжиною 180–200 п.о.) (рис. 3.42).

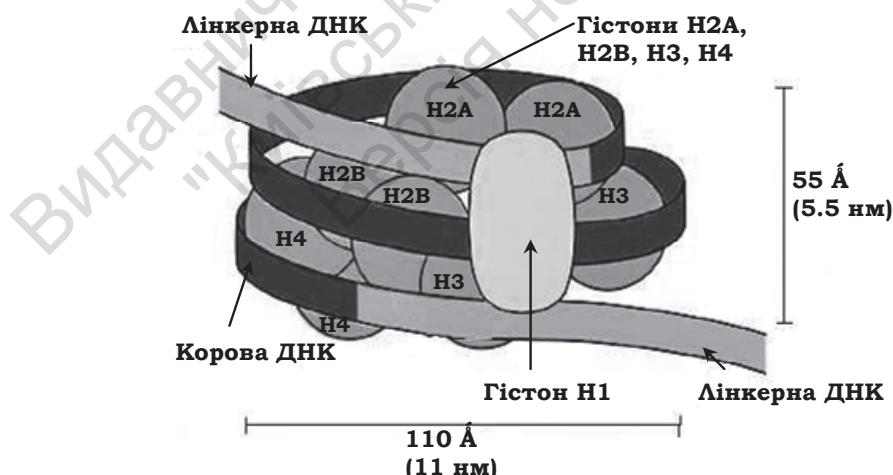


Рис. 3.42. Будова нуклеосоми

Корова ДНК робить навколо нуклеосоми 1,75 оберти. При обробці мікрококовою нуклеазою можна отримати мінімальну кількість основ на нуклеосомі – 146. Реально на одну нуклеосому припадає близько 180 пар основ. Крім того, до організації нуклеосомної послідовності залучений гістон H1, асоційований з лінкерною, або зв'язувальною ДНК (близько 50 п.о.). Кінцевий рівень укладки ланцюга нуклеосом – петельний (рис. 3.43).

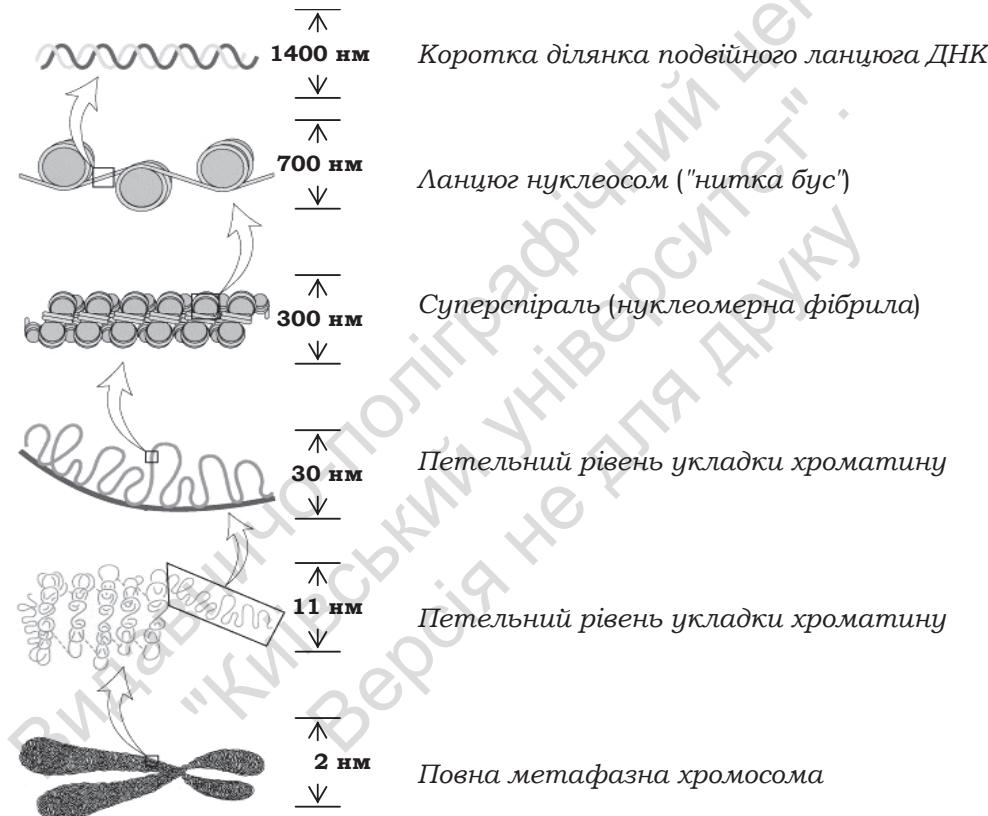


Рис. 3.43. Рівні організації хроматину

На перших стадіях утворюються фрагменти ДНК 300 кп.о. та 50 кп.о. – це, відповідно, складні гексамерні чи поодинокі петлеподібні структури, звільнені від білків ядерного каркасу. Цей тип зразка фрагментів ДНК у вигляді петель при апоптозі відрізня-

ється від фрагментів ДНК у вигляді плями, характерних для некротичних клітин.

В утворенні цих **високомолекулярних фрагментів ДНК** припускають участь топоізомерази II, протеолітичних ферментів (розщеплення зв'язків між білками ядерного каркасу і ділянками хроматинових петель), AIF.

Велике значення в цих процесах має концентрація Ca^{2+} усередині ядра. Її зростання активує Ca^{2+} -залежні протеази, які сприяють розгортанню хроматину та зміні його суперспіралізації. Унаслідок цього хроматин стає чутливішим до дії DFF та інших перерахованих вище ферментів з ендонуклеазною активністю, під дією яких утворюються високомолекулярні фрагменти ДНК, а надалі відбувається **міжнуклеосомальна деградація до олігонуклеотидів** розміром 180–200 п.о.

На більш пізніх стадіях, коли змінюється проникність ядерної мембрани для цитозольних ферментів, участь у фрагментації ДНК можуть брати й інші, неядерні ферменти, зокрема ДНКаза I, ДНКаза II, Mg^{2+} -залежна ендонуклеаза.

3.10. ТЕЛОМЕРА ТА АПОПТОЗ

Останнім часом багато уваги вчених приділяється механізмам розвитку пухлинних процесів. Після відкриття існування теломер, теломерази та їхньої участі в пухлиновенезі з'явилися дані що про зв'язок цих структур з апоптозною загибеллю клітин. Це є важливим, зокрема у плані можливості застосування індукторів апоптозу для зупинки мітозу патологічних клітин та ініціації клітинного самогубства.

Теломери, або кінцеві ділянки хромосом містять одноланцюгову ДНК, яка має багаторазову послідовність із 6–8 нуклеотидних залишків – TTAGGG (рис. 3.44).

Ця послідовність є висококонсервативною, наприклад, у ДНК простіших теломера представлена нуклеотидним модулем TTGGGG, а із TTAGGG-модулей побудовані теломери всіх ссавців, рептилій, амфібій, птахів і риб. У рослин – як вищих, так і водоростей – теломери містять послідовності TTTAGGG.

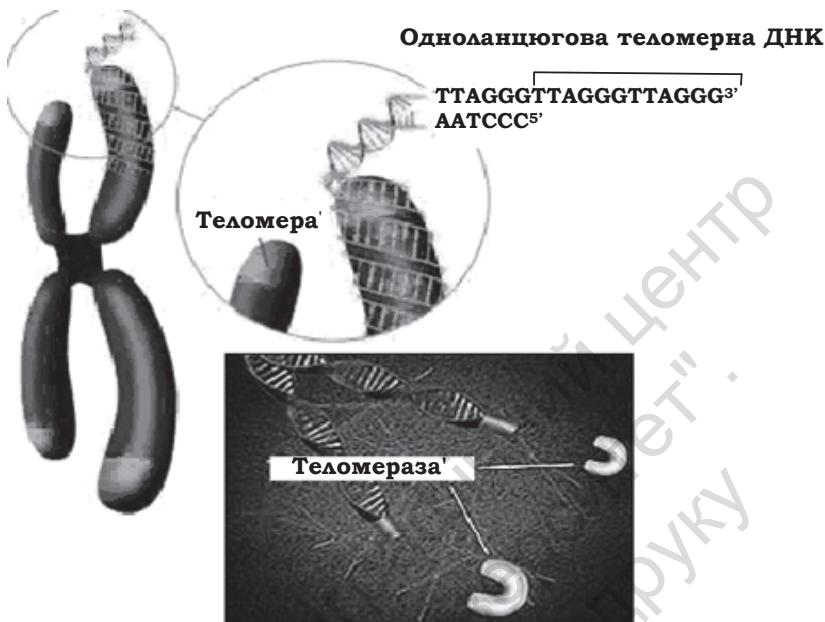


Рис. 3.44. Будова теломери

Найважливішою характеристикою теломер є їхня довжина, яка лежить у межах 2–20 000 п.о. Ця величина з кожним поділом клітини – мітозом – укорочується на 50–200 нуклеотидів. Від невпорядкованого вкорочення (розщеплення) одноланцюгової ДНК теломери захищають особливі білки, хоч, наприклад, при мутації Est (*ever shortening telomere – теломера, що постійно вкорочується*) спостерігають ранню загибель клітин шляхом апоптозу.

У 1961 р. Л. Хейфлік виявив, що клітини в культурі через певну кількість поділів (40–60) гинуть. Ця цифра була названа **лімітом Хейфліка** [32].

Через десять років російський вчений А. Оловніков висловив гіпотезу, яка пояснює, чому клітина людини може ділитися не більше 50–70 разів, а надалі всі її нащадки гинуть. Згідно з нею хромосоми при кожному поділі вкорочуються, а через 50–70 мітозів, коли це вкорочення досягає структурних генів, клітини включають програму самоліквідації.

Крім того, на його думку, у нестаріючих клітинах (зародкових, статевих тощо) повинна існувати спеціальна ферментативна система, яка контролює й підтримує довжину теломерної ДНК. Лише через 25 років ця схема підтвердилася експериментально, коли, по-перше, виявили наявність втрати теломерами певної кількості нуклеотидних залишків при кожному поділі, а, по-друге, ученими К. Грейдером і Е. Блекберном у клітинах було відкрито **теломеразу** – фермент, який за участю механізму, відмінного від реплікації ДНК, синтезує теломерну ДНК (це РНК-залежна ДНК-полімераза, або зворотна транскриптаза, що синтезує ДНК на матриці РНК). У 1998 р. американські дослідники здійснили "омолодження" культури клітин за допомогою теломерази [5]. Водночас виявилося, що ракові клітини подібно до нестаріючих здатні ресинтезувати теломерну ДНК через активацію теломерази, унаслідок чого відновлюються вихідні розміри теломери. Тому більшість пухлинних клітин не гине, а продовжує розмножуватися, і цей процес теоретично може продовжуватися нескінченно, що й супроводжує подальший розвиток пухлини.

Вивчення механізмів апоптозу показало, що критичне вкорочення теломер, мутації теломероз'язувальних білків є сигналами, які подібно до будь-якого іншого пошкодження ДНК запускають самогубство клітин багатьох типів і (або) зупинку клітинного циклу. У той же час апоптоз, викликаний ушкодженням ДНК, сам спричиняє швидку втрату теломер на ранніх стадіях клітинної загибелі – без активації каспази-3 та із залученням втрати мітохондріального мембраниого потенціалу і продукції АФК, що підкреслює важливість впливів мітохондріальної дисфункції на теломери.

Вплив на ракові клітини людини і тварин численних проапоптозних стимулів (стауроспорину, тапсигаргіну, анті-Fas-R-антитіл, хіміотерапевтичних агентів, але не безпосереднього ушкодження ДНК) також результується в розщепленні теломери. Утрата цих структур асоційована із зупинкою клітинного циклу в G2/M-фазі й передує ДНК-фрагментації на високомолекулярні фрагменти. Надекспресія антиапоптозних білків, наприклад Bcl-2, або застосування інгібітора каспаз z-VAD.fmk у цих випадках підтверджує, що зазначені процеси регулюються активностями каспаз [41].

3.11. РЕГУЛЯЦІЯ АПОПТОЗ-НЕКРОЗНОГО ПЕРЕМИКАННЯ І ВИЖИВАННЯ КЛІТИН

Молекулярний перемикач між апоптозними і некрозними подіями містить АТФ-залежні етапи активації каспаз та етапи, чутливі до впливів NO. У свою чергу, NO та деякі інші форми ROS є сполуками, що також визначають долю клітини по-іншому: встане вона на шлях виживання чи загине.

3.11.1. Стан енергозабезпечення клітини як перемикач між апоптозом і некрозом

In vivo за патологічних умов обидва типи клітинної загибелі часто можуть співіснувати (М. Лейст та ін., 1995). При дослідженнях різних рівнів внутрішньоклітинного АТФ було показано, що за низьких концентрацій АТФ у клітинах типові стимули апоптозу спричиняють некроз (М. Лейст та ін., 1997). Вміст АТФ може або знижуватися, або повертатися до норми, і це відбувається в певні проміжки часу. Це дозволяє ідентифікувати певні енергозалежні часові періоди, протягом яких після впливу на клітину апоптогенного індуктора для проведення апоптозної програми необхідна наявність достатнього рівня АТФ (рис. 3.45).

Якщо вміст АТФ на цих етапах значно нижчий за норму, подальша активація қаспаз і всіх апоптозних подій блокується, а стимульовані клітини гинуть за типом некрозу. Однією із таких стадій, наприклад, є МРТ, що відбувається у внутрішній мітохондріальній мембрани, що, як уже зазначалося, є ключовим механізмом обох типів загибелі клітин (підрозд. 3.4). Подальші події, характерні для апоптозу – формування апоптосом із цитохромом с, Apaf-1, проқаспази-9 та АТФ, активація каскаду каспаз – неможливі за умов енергодефіциту. У таких випадках МРТ буде спричиняти некроз.

Таким чином, апоптоз і некроз не є зовсім різними та незалежними явищами. Таку дихотомію їхніх шляхів Дж. Кім, Л. Хі та Дж. Лемастерс назвали терміном *некрапоптоз* [35]. У некрапоп-

тозі загальні шляхи, зокрема МРТ, ініціюють серії подій, які кульмінуються або в апоптозі, або в некрозі, що залежить від різних впливів, і, у першу чергу, від вмісту АТФ.

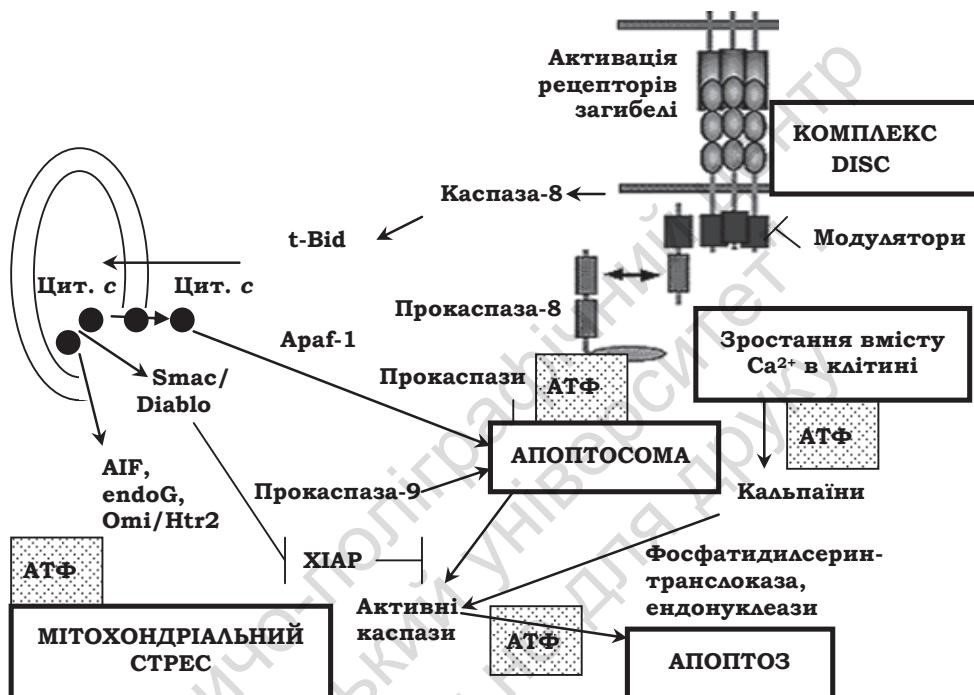


Рис. 3.45. АТФ-залежні етапи апоптозу (за [42])

3.11.2. NO як молекула-регулятор апоптозу, некрозу й виживання клітин

Іншим регулятором апоптозу та молекулярним перемикачем між двома типами загибелі клітин є NO (монооксид азоту, оксид азоту). NO – це молекула вторинного посередника з унікальними можливостями: вона є газом і тому здатна вільно переміщуватися з однієї клітини до іншої (С. Монкада зі співроб., 1991). NO як вторинний месенджер включається в численні фізіопатологічні

функції, наприклад, у релаксацію гладенької мускулатури, нейротрансмісію, імунну регуляцію, клітинну диференціацію, тканинний морфогенез, цитотоксичність, клітинну загибел. Ця сполука відіграє центральну роль у таких патологічних феноменах, як септичний шок, неспецифічний захист клітин "хазяїна" від пухлин і внутрішньоклітинних патогенів, гострі та хронічні нейродегенеративні захворювання, деструкція β-клітин підшлункової залози при діабеті, відторгнення транспланта. С. Снайдер, директор інституту нейробіології J. Hopkins Medical School відмітив: "За свої 25 років роботи в нейробіології я не знав іншої молекули, яка б так активно впливала на фізіологічні та патологічні функції організму". У 1992 р. NO була названа журналом *Science* "Молекулою Року".

Монооксид азоту є двоатомною молекулою малого розміру, що має високу реакційну здатність і паракринну, а інколи й автокринну дію.

NO в організмі може утворюватися ферментативним і неферментативним шляхами. Прикладом неферментативних може бути відновлення нітритів за участю гемоглобіну, міоглобіну, цитохромоксидази (рис. 3.46, А). Зокрема, нітрогліцерин (гліцерину тринітрат, рис. 3.46, Б) у процесі свого метаболізму утворює NO – на цьому базується його дія на судини.

За ферментативним шляхом NO генерується при окисненні L-аргініну до L-цитруліну родиною конститутивних або цитокін-індукованих НАДФ-залежних ферментів – NO-синтаз (NOS) (рис. 3.46, В).

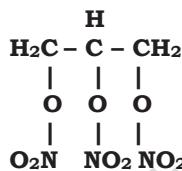
Нейроальльні NOS (nNOS) і ендотеліальні NOS (eNOS) зазвичай конститутивно експресовані у відповідних тканинах і активуються за умов зростання внутрішньоклітинного вмісту вільного Ca^{2+} , тобто їхня активність регулюється на посттранскрипційному рівні. У протилежність цитокін-індукованій ізоформі NOS – iNOS (цей тип NOS також має назву макрофагальної NOS) є транскрипційно-регульованою і за умов наявності цитокін-індуктора за кілька днів спричиняє потужну продукцію NO при базальних рівнях Ca^{2+} . Новоутворені молекули NO надалі спонтанно взаємодіють з NO-донорами – O_2 , іншою молекулою NO тощо (рис. 3.47).

Біохімічні механізми апоптозу

A. Реакція відновлення NO_2^- до NO
за участю гемоглобіну (або міоглобіну):



Б. Структурна формула нітрогліцерину:



В. NO -сінтазна реакція:



Рис. 3.46. Шляхи утворенняmonoоксиду азоту

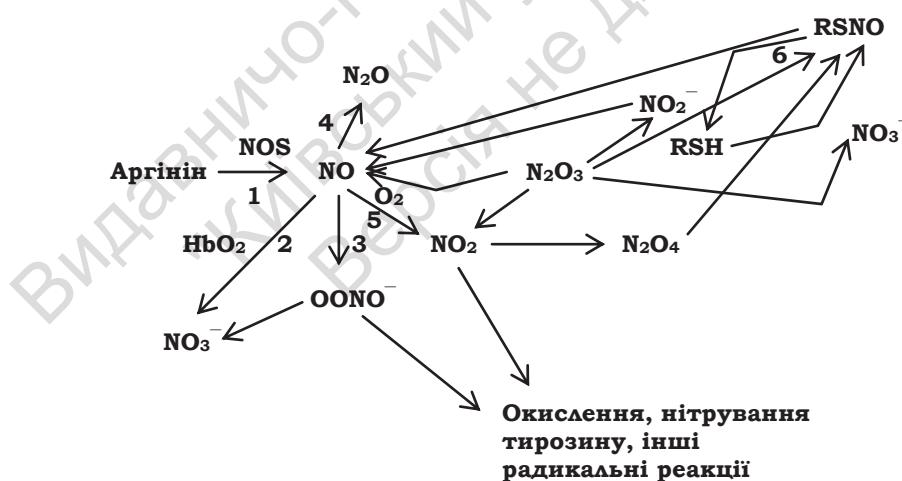
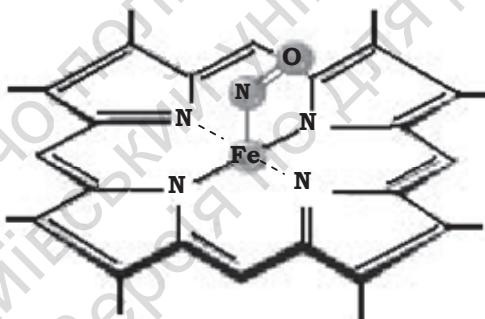


Рис. 3.47. Утворення NO -радикала (1) та його радикальні реакції (2–5)

Період напівжиття в організмі високореактивної молекули NO становить кілька мікросекунд і є дуже коротким для біологічних систем, оскільки NO швидко взаємодіє з іншими радикалами і сполуками (рис. 3.47).

Усі механізми дії NO поділяють на цГМФ-залежні й цГМФ-незалежні. У першому випадку NO-сигнальні шляхи опосередковані цГМФ, який утворюється при зв'язуванні цього оксиду гемовою групою розчинної гуанілатциклази, що спричиняє активацію ферменту.

Розчинна гуанілатциклаза – гетеродимер складається з $\alpha 1$ і $\beta 1$ субодиниць, обидві необхідні для каталітичної активності ферменту. N-термінальна ділянка кожної із субодиниць зв'язує гем, тоді як каталітичну функцію здійснює C-термінальна ділянка. Така її будова відрізняється від будови трансмембральної гуанілатциклази, яка не зв'язується з гемом. Зв'язування NO з гемовою простетичною групою розчинної гуанілатциклази спричиняє мінімум 400-кратне зростання швидкості синтезу цГМФ:



До цГМФ-залежних ефектів NO належать:

- 1) збільшення активності Ca^{2+} -АТФази, що спричиняє зменшення вмісту Ca^{2+} в клітинах, у тому числі й клітинок гладеньких м'язів, даючи ефект вазодилатації, зниження тонусу м'язів, бронходилатациї (дилатация – розширення);

- 2) гальмування фосфоліпази С, що запобігає активації протеїнкінази С і сприяє пригніченню агрегації й адгезії тромбоцитів;

3) запобігання активації фосфоліпази А2, унаслідок чого не утворюються ейкозаноїди через пригнічення метаболізму арахідонової кислоти;

4) активація ПкG, яка, у свою чергу, активує фосфатазу легкого ланцюга міозину. цГМФ-опосередковане дефосфорилювання міозину гладеньких м'язів спричиняє вазодилатацію й релаксацію;

5) вплив на іонні канали;

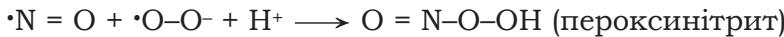
6) вплив на тирозинкінази й тирозинфосфатази, фосфодієстерази;

цГМФ-незалежні шляхи включають зв'язування Fe-S-центрів, ДНК-ушкодження, активацію полі-АДФ-рибозилювання зі зниженням вмісту енергозабезпечення клітини, білкову модифікацію шляхом *S-нітрозування* (=нітрозилювання) тіолових груп цистеїну (уведення NO-групи), окиснення метіоніну, *незворотне азотування* (=нітрування) тирозину (уведення NO₂-групи).

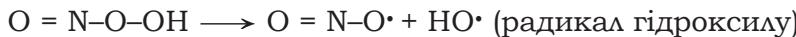
Плейотропний ефект NO пояснюється наявністю у цього радикала трьох проміжних редокс-форм (*нітрозоній* (NO⁺), *нітроксил-аніон* (NO⁻) та *вільний радикал* NO[•]), в яких він присутній в організмі. Ці форми існують у динамічній рівновазі й мають різну хімічну реактивність відносно різних груп-мішеней.

NO⁻ є відносно стабільною формою, у водному середовищі швидко перетворюється на N₂O, може утворювати Fe-комpleksi, реагуючи із Fe(III)-гемом. Фізіологічна роль NO⁻, вважають, зводиться до стабілізації форм NO.

NO[•] реагує з молекулярним киснем, супероксидним аніоном (•O₂⁻) і катіонами металів, що спричиняє утворення реактивних азотистих проміжних продуктів, які прямо чи опосередковано супроводжують додаткові **реакції нітрозування** (тобто реакції введення NO-груп). Наприклад, унаслідок взаємодії NO[•] та супероксиду утворюється пероксинітрит,



який надалі може розкладатися з утворенням радикала гідроксилу (OH[•]):



Пероксинітрит забезпечує незворотне нітрування білків за залишками тирозину (реакції нітрування) з утворенням нітротирозину ($\text{Tyr}-\text{NO}_2$) і відповідних нітрованих білків. Такі реакції запобігають фосфорилюванню або аденілованню залишків тирозину регуляторних білків. Наприклад, Тир міститься в активному центрі рибонуклеотидредуктази, і нітрування його інгібує цей фермент. NO -індуковане інгібування в цьому випадку може бути ще одним механізмом NOS-опосередкованої бактерицидної активності.

Пероксинітрит також здатний взаємодіяти з іншими вільними радикалами, ініціюючи реакції перекисного окиснення ліпідів і хімічного розщеплення ДНК.

NO у формі NO^\bullet є високореактивним щодо катіонів перехідних металів і тому здатний зв'язуватися із залізом гемопротеїнів (гемоглобін, міоглобін, гуанілатциклаза, каталаза, цитохроми) та Fe-вмісних негемових білків, у тому числі й Fe-S-центрів, при цьому змінюючи валентність цього катіона ($\text{Fe(II)} \rightarrow \text{Fe(III)}$). До білків із Fe-S-центраторами належать, зокрема, NADH:убіхіон-оксидоредуктаза (комплекс I) і сукцинат:убіхіон-оксидоредуктаза (комплекс II) дихального ланцюга мітохондрій та аконітаза, що каталізує дві реакції циклу Кребса, які забезпечують перетворення цитрату на ізоцитрат.

Взаємодія NO з Fe гему NOS лежить в основі здатності NO інгібувати NOS. Аналогічні впливи NO має на Cu- та Zn-вмісні білки.

Катіон нітрозонію (або нітрозильний катіон) NO^+ здійснює **S-нітрозилювання (=нітрозування)** нуклеофільних груп тіолів, амінів, карбоксильних, гідроксильних груп, ароматичних кілець. Прикладом може бути **реакція із SH-групами цистеїну з утворенням нітроцистеїну** (Цис- N=O); відповідно, **білки, модифіковані таким чином – S-нітрозотіоли (RS-N=O)**. Така модифікація залишає більшість білків, що беруть участь у клітинних процесах, сприяючи зміні ферментативної активності білків-ферментів. Зокрема, каспази при цьому інактивуються, а матриксні металопротеїнази – активуються. Приклади S-нітрозотіолів – S-нітрозоглутатіон, S-нітрозоальбумін. S-нітрозилювання NOS за залишками цистеїну є ще одним механізмом зворотного інгібування NO NOS.

Деякі нітрозотіоли, зокрема нідрозоальбумін, стають фізіологічним пулом еквівалентів NO, оскільки нітрозотіоли проявляють ефекти, подібні до вільного NO, і мають значно довший порівняно з ним період напівжиття.

Реакції нітрозилювання аміногруп можуть спричинити утворення нідрозоамінів ($R_2N-N=O$) – ці сполуки можуть бути канцерогенами, оскільки здатні атакувати ДНК і модифікувати її.

Розглянуті цГМФ-незалежні NO-індуковані відповіді пояснюють антимікробні, цитостатичні та цитотоксичні властивості NO. S-нітрозування цистеїну, наприклад, є білковою модифікацією, яку здійснює NO в присутності кисню, і звичайно асоціюється з утратою функцій цього білка. Така модифікація може регулювати клітинну сигнальну передачу, впливаючи на сигнальні білки (напр., p21 або с-jun-N-термінальну кіназу-2). Це впливає на машину транскрипції клітинних генів, зокрема шляхом інгібування ДНК-зв'язувальної активності ядерного фактора NF-kB.

NO-інгібування шляхів клітинної загибелі може здійснюватися за різними механізмами:

- S-нітрозування багатьох критичних факторів може бути важливим для виживання клітин. Зокрема, потенційними білками-мішнями є ініціаторні та екзекуційні каспази, транскрипційний фактор NF-kB;

- NO є "уловлювачем" активних форм кисню, що, реагуючи з алкоксильними та пероксильними радикалами, гальмує перекисне окиснення ліпідів;

- NO може індукувати протективні білки, зокрема білок теплового шоку Hsp 70. Відомо, що цей білок захищає гепатоцити від TNF α та актиноміцин-D-індукованого апоптозу, хоч механізм цього явища досі невідомий. NO також здатний посилювати експресію Bcl-2;

- цГМФ-залежний механізм: у гепатоцитах, в активованих Т-лімфоцитах NO має протективний ефект на Fas-R-індукований апоптоз; можливо, цей ефект опосередковується цГМФ-залежною кіназою;

- NO може спричиняти інгібування ANT, унаслідок чого гальмується мітохондріальні події апоптозу через унеможливлення звіль-

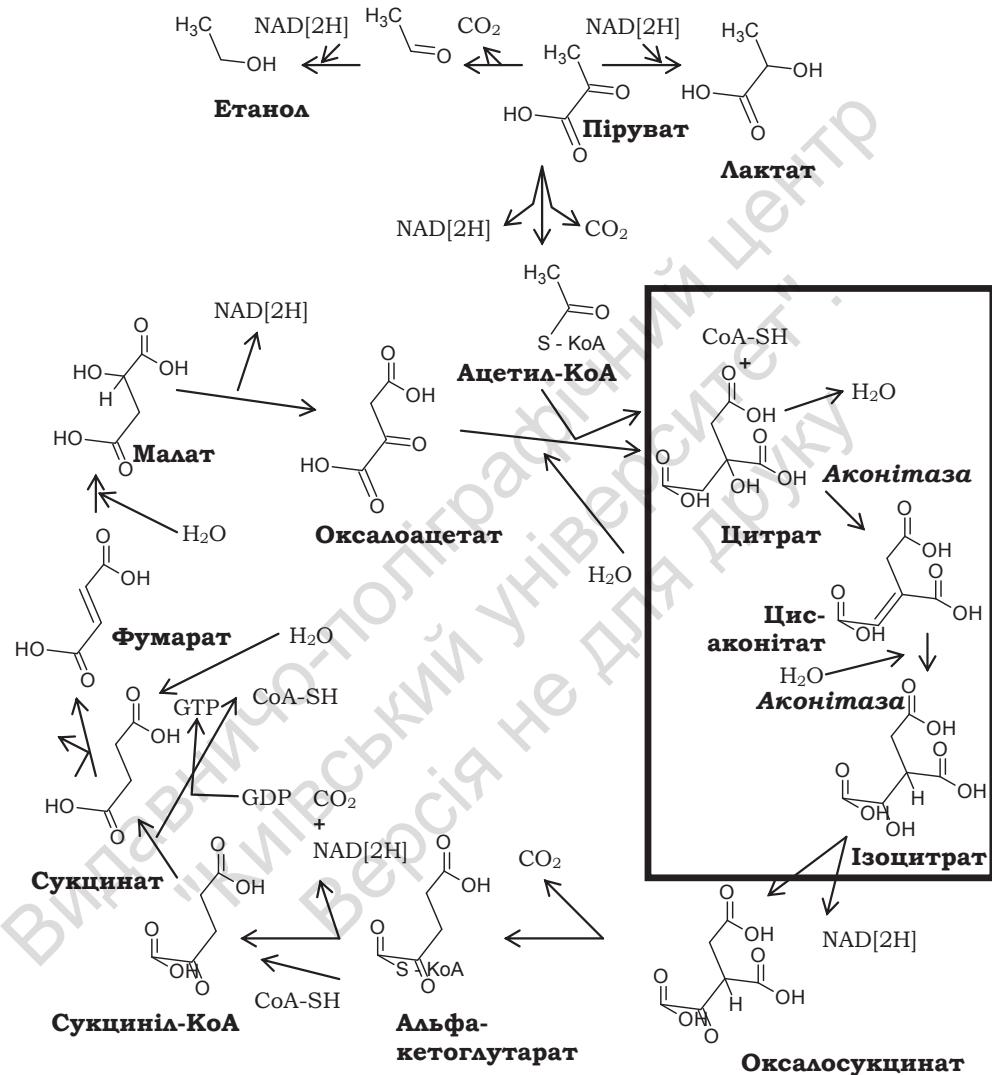
нення із цих органел проапоптозних білків: цитохрому *c*, AIF, Omi/HtrA2, Diablo/Smac.

NO включається як у процеси апоптозу, так і в некротичну загибель клітин залежно від редокс-форми оксиду азоту, стану клітини, від його вмісту (високі рівні NO в нейронах запускають некроз, тоді як тривалий вплив за низьких концентрацій – апоптоз).

NO-індукований апоптоз виникає в багатьох типах клітин – у макрофагах, нейронах, β -клітинах підшлункової залози, тимоцитах, гепатоцитах, хондроцитах. Його сигнальні шляхи досі не вивчено, проте відомо, що він може супроводжуватися акумуляцією гена-супресора пухлин p53, змінами в експресії про- та антиапоптозних членів родини Bcl-2, активацією каспаза-3-подібних протеаз, транслокацією цитохрому *c*. До того ж монооксид азоту здатний до хімічної взаємодії з білком Mdm-2 – інгібітором супресора p53, що спричиняє активацію останнього та ініціацію апоптозних шляхів (рис. 3.48).

NO-опосередкований некроз є характерним для численних клітинних систем і пов'язаний з його мультиплетними взаємодіями з мішенями (тіловими групами, гемом, Fe-S-центраторами, залишками тирозину білків, ДНК). Частина цих ефектів є прямыми; низка інших залежить від реагування NO із супероксидним аніоном, а за високих концентрацій цього оксиду – і з киснем з утворенням пероксинітрату $O=N-O-OH$ і нітрозативних агентів відповідно. Високий вміст NO або його швидка дія, як уже значалося, гальмують природні клітинні процеси – синтез ДНК, мітохондріальне дихання, метаболічні реакції. Зокрема, NO може порушувати функціонування дихального ланцюга мітохондрій, зворотно інактивуючи цитохром *c*-оксидазу, таким чином стимулюючи продукцію супероксидного аніона в дихальному ланцюзі. У результаті супероксидний аніон через утворення пероксинітрату незворотно гальмує комплекс I і III мітохондріального електронотранспортного ланцюга. Крім того, інактивуються критичні метаболічні ферменти, наприклад аконітаза. Цей фермент каталізує дві реакції циклу Кребса, які забезпечують перетворення цитрату на ізоцитрат:

Біохімічні механізми апоптозу



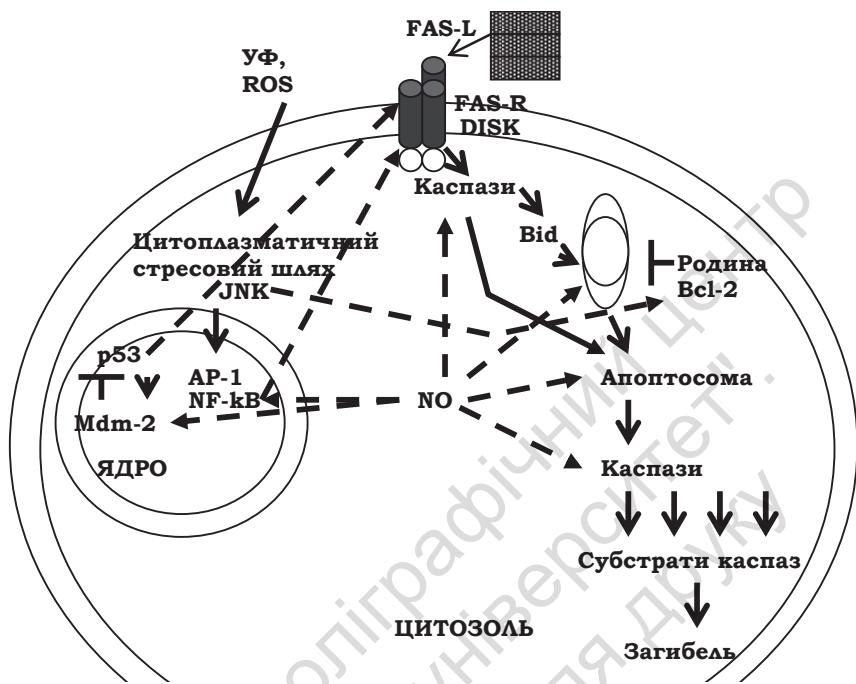


Рис. 3.48. Напрямки NO-індукованого апоптозу (за [42])

НО формує Fe-нітрозил-комплекси із залізосірчаними центрами аконітази. І хоч таке інгібування зазначеного ферменту циклу лимонної кислоти не обов'язково індукує зниження синтезу АТФ (це залежить від типу клітин), воно гальмує метаболізм глюкози та амінокислот, унаслідок чого поступово втрачається енергія. Ще один напрямок NO-індукованого некрозу включає ініціацію перекисинітритом перекисного окиснення ліпідів, хімічного розщеплення ДНК, азотування вільного та білокзв'язаного тирозину, яке змінює фосфорилювання білків та їхню третинну структуру.

Таким чином, NO-перемикач між подіями апоптозу та некрозу, викликаними дією різноманітних індуktorів (Fas-L, TNF α , цераміди, ретиноїди, хемотерапевтичні засоби тощо), працює за двома основними напрямками:

- викликаючи NO-опосередковану втрату АТФ;
- через безпосереднє запобігання активації каспаз.

При цьому на ймовірність перемикання впливають редокс-потенціал клітини, концентрація і тривалість впливу оксиду азоту, виникнення його комбінації з O_2 , супероксидом, іншими молекулами [15, 19].

3.11.3. ROS як сигнальні молекули: регуляція виживання й загибелі клітин

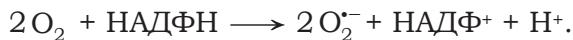
3.11.3.1. Особливості генерації ROS у клітинах

ROS (*reactive oxygen species, активні форми кисню – АФК*) – це збірний термін, що включає не лише радикали, але й нерадикальні молекули з високою реакційною здатністю. До найважливіших вільних радикалів належать гідроксил (OH^\cdot), супероксид-аніон ($O_2^\cdot-$), азотвмісні радикали NO_2^\cdot (діоксид азоту) і NO^\cdot (монооксид азоту) (які через наявність атома азоту відносять і до групи активних форм азоту (RNS – *reactive nitrogen species*)), пероксил (ROO^\cdot).

Інші сполуки – пероксинітрит ($OONO^-$), гіпохлорна кислота ($HOCl$), пероксид водню (H_2O_2), синглетний кисень, озон (O_3), нітратна кислота (HNO_2), триоксид дінітрогену (N_2O_3) не є вільними радикалами, але легко спричиняють вільнорадикальні реакції в живому організмі [11].

Первинним окисником у реакціях метаболізму є O_2 . У таких реакціях утворюється первинний радикал – **супероксидний аніон** $O_2^\cdot-$ (синоніми: супероксид-аніон, супероксид). Генерація супероксидного аніона здійснюється ферментативними і неферментативними шляхами за участю спеціалізованої й неспеціалізованих систем.

Єдиною в організмі спеціалізованою ферментативною системою є **НАДФН-оксидаза**, основною функцією якої є продукція ROS, а саме – $O_2^\cdot-$:



Усі інші системи – ферментативні й неферментативні – неспеціалізовані, ROS є їхнім побічним продуктом.

Серед внутрішньоклітинних ферментів, причетних до генерації активних форм кисню, найважливішими є: **ферменти обміну арахідонової кислоти** – ліпоксигеназа й циклооксигеназа (за участю циклооксигенази утворюються простагландини й тромбоксиани, за участю 5-ліпоксигенази – лейкотрієни)

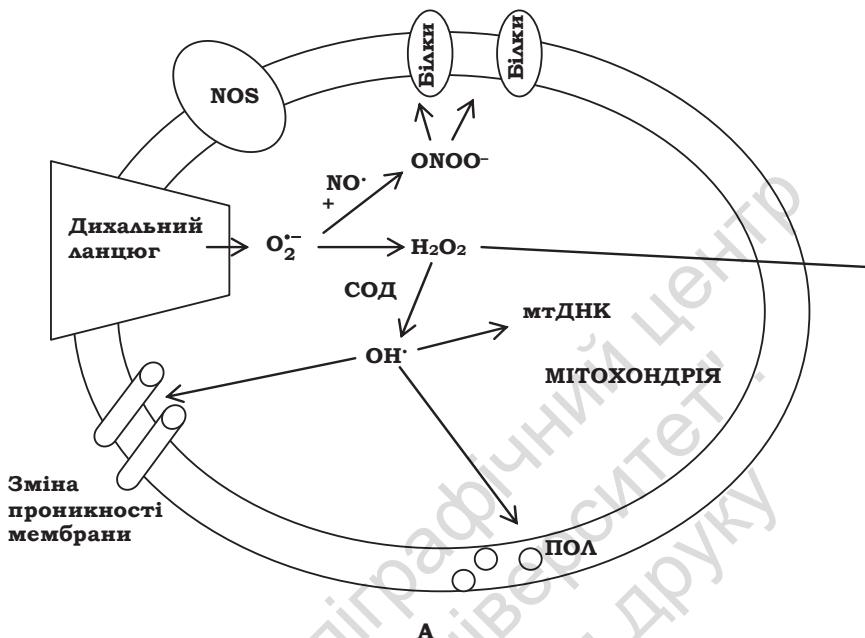
➤ **ксантиноксидаза** (Мо- і $[Fe_2S_2]$ -вмісний флавопротеїн, що катализує реакцію перетворення гіпоксантину на ксантин, а ксантину – на сечову кислоту);

- **альдегіддегідрогеназа;**
- **флавопротеїндегідрогеназа;**
- **NO-сінтаза;**
- **мієлопероксидаза.**

Одними з найважливіших місць синтезу ROS в організмі також є **електронотранспортні ланцюги мембрани** (мітохондріальний дихальний ланцюг і цитохром Р-450- та b5-вмісні ланцюги ЕПР, ядерні електронотранспортні ланцюги, механізми і функції яких ще на з'ясовано). Зокрема, невідповідність продукції НАДН і використання АТФ може "завантажити" електронотранспортний ланцюг (комплекси I–IV) і модулювати продукцію ROS. Будь-який білок, причетний до передачі електронів, або ферментативна система, можуть бути залучені до продукції ROS як "сопродукту" електронотранспортних реакцій. На таку "нецільову" генерацію ROS у мітохондріях припадає близько 1–2 % загального використання O_2 . Унаслідок високої концентрації мітохондріальної СОД внутрішньомітохондріальні концентрації O_2^- характеризуються дуже низькими рівнями. Таким чином, на відміну від H_2O_2 , який здатний дифундувати через мітохондріальну мембрани в цитоплазму, мітохондрієгенерований O_2^- практично не виходить у цитоплазму. Передбачають роль ROS, генерованого в мітохондріях, зокрема в регуляції апоптозу. Є дані, що TNF α і IL-1-індукований апоптоз може залучати мітохондрієпохідні ROS. Крім того, мітохондрія може функціонувати як " O_2 -сенсор" при опосередкованні транскрипції генів, експресія яких індукується за умов гіпоксії.

Більшість O_2^- швидко перетворюється на H_2O_2 (спонтанно або за участю супероксиддисмутази (СОД)) або сполучається з іншими реактивними молекулами, наприклад NO, з утворенням **пероксинітриту** (рис. 3.49, А, Б).

Біохімічні механізми апоптозу



Відновлення молекулярного кисню до супероксидного радикалу:



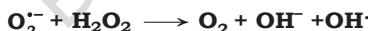
Дисмутація супероксидного радикалу:



Реакція Фентона (у присутності перехідних металів):



Реакція Хабера-Вейса:



Me – перехідний метал, напр., Fe³⁺/Fe²⁺

O₂⁻ – супероксидний радикал (=супероксид-аніон)

ОН[•] – гідроксильний радикал

ОН⁻ – гідроксильний аніон

H₂O₂ – пероксид водню

Б

Рис. 3.49. Схеми генерації найважливіших ROS

У присутності катіонів перехідних металів (Fe^{3+} , Cu^{2+}) $\text{O}_2^{\cdot-}$ може утворювати високореактивні **гідроксильні радикали ОН[·]** (реакція Фентона) (рис. 3.49, Б). OH^{\cdot} також утворюється при взаємодії супероксид-аніона з пероксидом водню (реакція Хабера – Вейса). OH^{\cdot} є одним із найтоксичніших радикалів щодо всіх типів біомолекул, продукуючи продукти, що не можуть бути регенеровані в клітинному метаболізмі.

У фагоцитах H_2O_2 використовується в нормі для синтезу гіпохлориту – HOCl (фермент *міелопероксидаза*):



3.11.3.2. Впливи ROS на біомолекули: небезпека і захисні механізми організму. Редокс-баланс клітини

Шкідливість **супероксидного аніона** в першу чергу зумовлена його перетворенням на **гідроксильний радикал**. OH^{\cdot} , що утворюється в реакціях Фентона й Хабера – Вейса, є дуже реактивним і руйнує практично будь-яку молекулу, що зустрічається у нього на шляху (радикал-руйнівник, радикал-убивця). У **молекулах білків** він впливає на SH-групи, гістидинові та інші амінокислотні залишки, спричиняючи денатурацію білків; утворення між- і внутрішньомолекулярних зшивок може викликати агрегацію білків і (або) зміну їхньої третинної структури. Усе це призводить до інактивації ферментів, порушення регуляторної, синтетичної, транспортної, структурної та інших функцій білків. У **молекулах нуклеїнових кислот** OH^{\cdot} руйнує вуглеводневі місточки між нуклеотидами і таким чином розриває ланцюги ДНК і РНК, що спричиняє мутації й загибель клітин або їхнє злойкісне переродження; веде до окиснення основ, їхньої модифікації. Мутації ДНК статевих клітин, спричинені ROS, можуть стати причиною спадкових захворювань. Компенсаторним явищем є активування ROS шляхів апоптозу – унаслідок цього ціною загибелі низки клітин запобігається загибель усього організму. У **молекулах ліпідів** OH^{\cdot} здійснює запуск реакцій ПОЛ із накопиченням ліпідних радикалів (L^{\cdot}), пероксилів (LOO^{\cdot}), гідропероксидів (LOOH), алкоксилів (LO^{\cdot}), що зумовлюють ушкодження мембрани, порушення їхніх функцій і загибель клітин.

Гіпохлорит у нормі руйнує стінку бактерій і таким чином знищує бактерії. Але гіпохлорит при взаємодії з іонами Fe(II) спричиняє утворення OH[·], причому навіть з більшим виходом, ніж у реакції Фентона:



Останніми роками дослідники все більше уваги приділяють активним формам кисню як регуляторним молекулам. Більшість регуляторних сигналів не прямо спричинені найбільш реактивними формами ROS (O₂^{·-}, OH[·]), а скоріш, їхніми похідними, з яких найважливішою сполукою є H₂O₂ (В. Дреге, 2001; С. Ри, 2003 – "ROS і H₂O₂ – не тільки "молекули загибелі", а й "молекули життя").

Завдяки існуванню певного рівня генерації ROS і певної активності антиоксидантних систем у клітині створюється певний **редокс-баланс**, тобто клітина набуває певного редокс-статусу. Редокс-статус клітини визначається за відношенням вмісту активних та інактивованих радикалів, їхніх похідних та окиснених і відновлених форм інших молекул, які є чутливими до дії активних форм кисню, зокрема НАД⁺/НАДН, НАДФ⁺/НАДФН, GSSG/GSH. Від цього відношення, у свою чергу, залежить регуляція різноманітних сигнальних шляхів, що пов'язано із впливом редокс-статусу клітини на активність низки ферментів, зокрема кіназ і фосфатаз, і на функції факторів транскрипції, зокрема AP-1 і NF-кВ. Редокс-баланс підтримується наявністю численних антиоксидантних систем, які умовно можна поділити на ферментативні та неферментативні (рис. 3.50).

У свою чергу, *ферментативні антиоксидантні системи* за їхніми функціями можна умовно поділити на чотири лінії захисту клітини від негативних впливів ROS (рис. 3.51, А). Першою лінією захисту клітин від ROS є СОД, що каталізує дисмутацію O₂^{·-} до H₂O₂ і O₂ (Cu²⁺, Zn²⁺-СОД (цитоплазматична), Mn²⁺-СОД (мітохондріальна) і ЕС-СОД (Cu²⁺, Zn²⁺-СОД позаклітинного матриксу, від *extracellular matrix*). Друга лінія захисту здійснює відновлення пероксиду водню із задученням каталази, глутатіонпероксидази або нещодавно відкритих систем пероксиредоксин/дисульфідредуктаза й пероксиредоксин/суль-

фіредоксин. Третя лінія захисту відновлює органічні гідроперекиси. Три перші лінії захисту зменшують або навіть запобігають прогресуванню ПОЛ й окисній модифікації нуклеїнових кислот і білків; четверта лінія захисту необхідна для знешкодження вторинних метаболітів окисної модифікації; до неї, крім наведених на рис. 4.51, також відносять низку інших ферментів – системи тіоредоксин/тіоредоксинредуктаза, глутаредоксин/глутатіон/ глутатіонредуктаза, сульфіредоксини тощо.

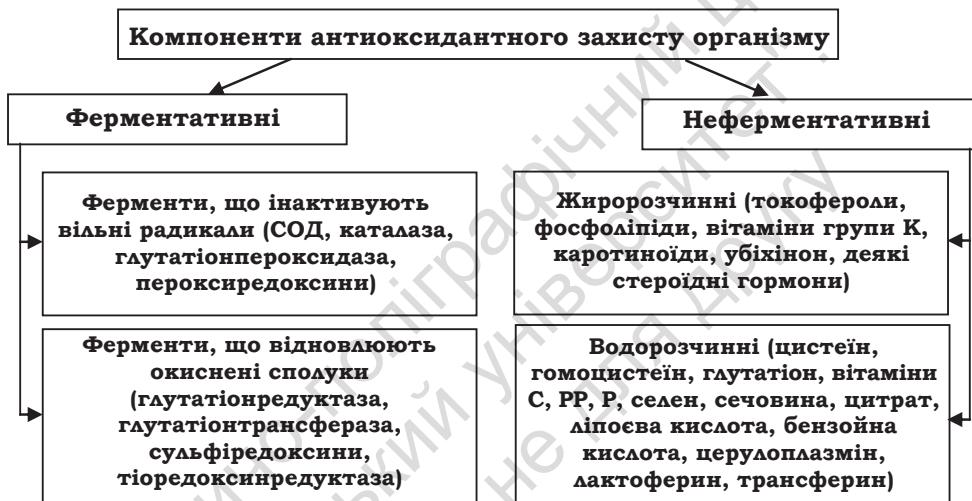
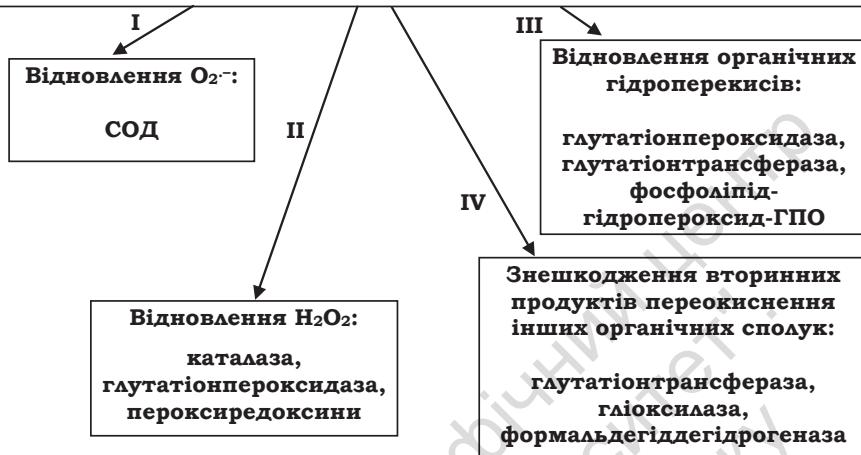


Рис. 3.50. Компоненти антиоксидантного захисту клітини

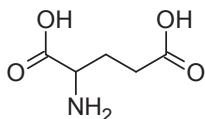
Із рис. 3.51, А видно, що **трипептид глутатіон** (рис. 3.51, Б) відіграє особливо важливу роль у функціонуванні антиоксидантної системи клітини. Це головний відновлювач клітини, його концентрація (1–10 мМ) є вищою, ніж вміст більшості органічних сполук. Подібно до інших низькомолекулярних антиоксидантів він здатний прямо відновлювати ROS. Глутатіон функціонує на трьох лініях ферментативного захисту (відновлення H_2O_2 , ROOH і знешкодження вторинних метаболітів окисної модифікації) із чотирьох. GSH-залежні ферменти працюють в усіх компартментах клітини, у тому числі в ядрі, мітохондріях і ЕПР.

Біохімічні механізми апоптозу

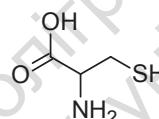
Чотири лінії захисту від ROS у клітині (ферментативні компоненти)



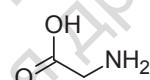
A



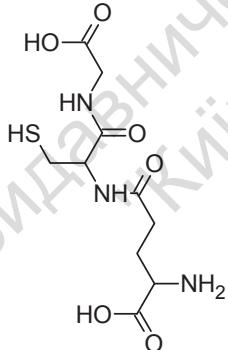
Глутамінова кислота



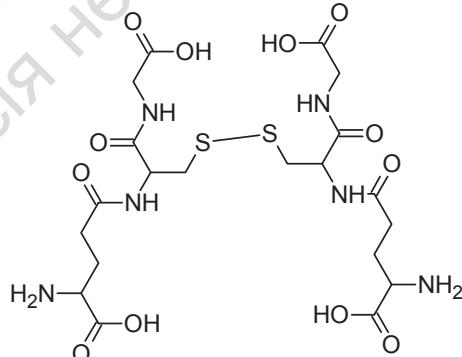
Цистеїн



Гліцин



Глутатіон відновлений

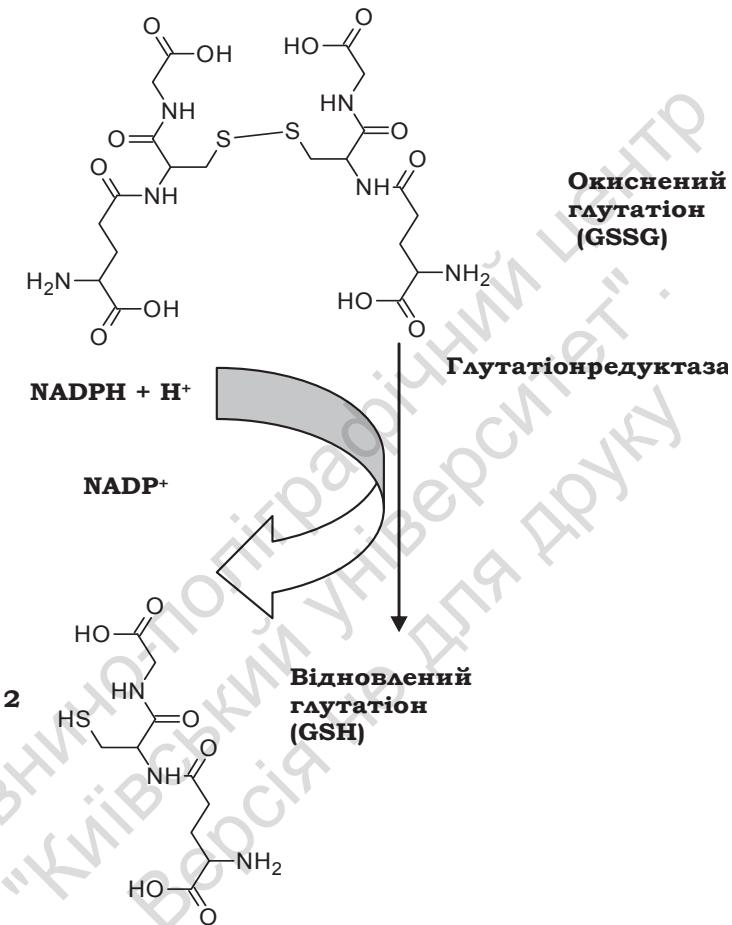


Окиснений глутатіон (глутатіондисульфід)

B

Рис. 3.51. Чотири лінії захисту клітини від негативних впливів ROS (A) і структура молекули трипептиду глутатіону (B)

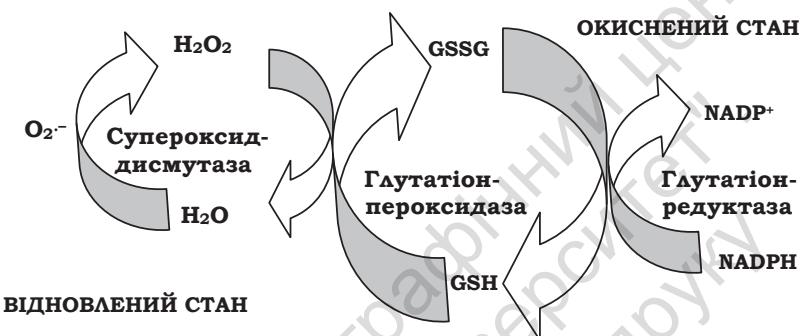
У клітині глутатіон існує у двох формах: *відновлена* (GSH) й *окиснена* (GSSG, глутатіондисульфід):



Він синтезується в клітинах печінки, з неї із жовчю надходить у плазму крові, а із крові – у клітини всіх тканин організму. Загальний вміст глутатіону (GSH + GSSG) у високих концентраціях присутній у цитоплазмі (1–11 мМ), ядрі (3–15 мМ), мітохондріях (5–15 мМ). Надходження глутатіону із плазми крові в клітину лімітується ферментом γ -глутаміл-цистеїніл-синтетазою. Вміст окисненого глутатіону в нормі становить лише 10 % від загального його вмісту; відношення GSSG/GSH у певній тканині є ве-

личиною сталою, а її зростання є чутливим індикатором окисного стресу. Коливання співвідношення GSH/GSSG – або на локальному, або на глобальному рівні – також може служити поштовхом до S-глутатіонування (див. далі).

Основними компонентами антиоксидантної системи глутатіону є глутатіон, глутатіонпероксидаза, глутатіонтрансфераза, глутатіонредуктаза і НАДФН:



Пентозофосфатний шлях відіграє важливу роль у рециклуванні глутатіону, оскільки він постачає для роботи глутатіонредуктази НАДФН.

Коли баланс між окисниками і антиоксидантами зсувается в бік окисників, або коли порушується редокс-сигналізація (див. далі) та (чи) її контроль, настає оксидативний стрес, що спричиняє загибель біомолекул (ДНК, білки, ліпіди) через окисну модифікацію, що залучається до патогенезу захворювань людини і цитотоксичності хіміотерапії [9].

3.11.3.3. ROS як регуляторні молекули: окисні модифікації білків

Як зазначалося раніше, активні форми кисню можуть виступати як регуляторні молекули. Одним із механізмів такої регуляції є **окисна модифікація білків**, зокрема білків-ферментів (рис. 3.52, А).

Є різні можливі результати окиснення тіолових груп у білках: утворення дисульфідів (-S-S-), сульфенової (-SOH), сульфінової (-SO₂H), сульфонової кислот (-SO₃H), сульфенаміду (-SNR₁R₂). **До функціонування H₂O₂ як регуляторної молекули залучаються тільки**

такі окисні модифікації білків, які є зворотними і не призводять до втрати функцій білків – найчастіше це утворення внутрішньо-, міжмолекулярних і мішаних дисульфідів. Найважливішу роль при цьому відведено окисним модифікаціям залишків цистеїну, які містяться в активних центрах і регуляторних ділянках великої кількості клітинних білків, зокрема ферментів.



Рис. 3.52, А. Зворотні й незворотні модифікації реактивними формами кисню білків-мішеней

Біохімічні механізми апоптозу

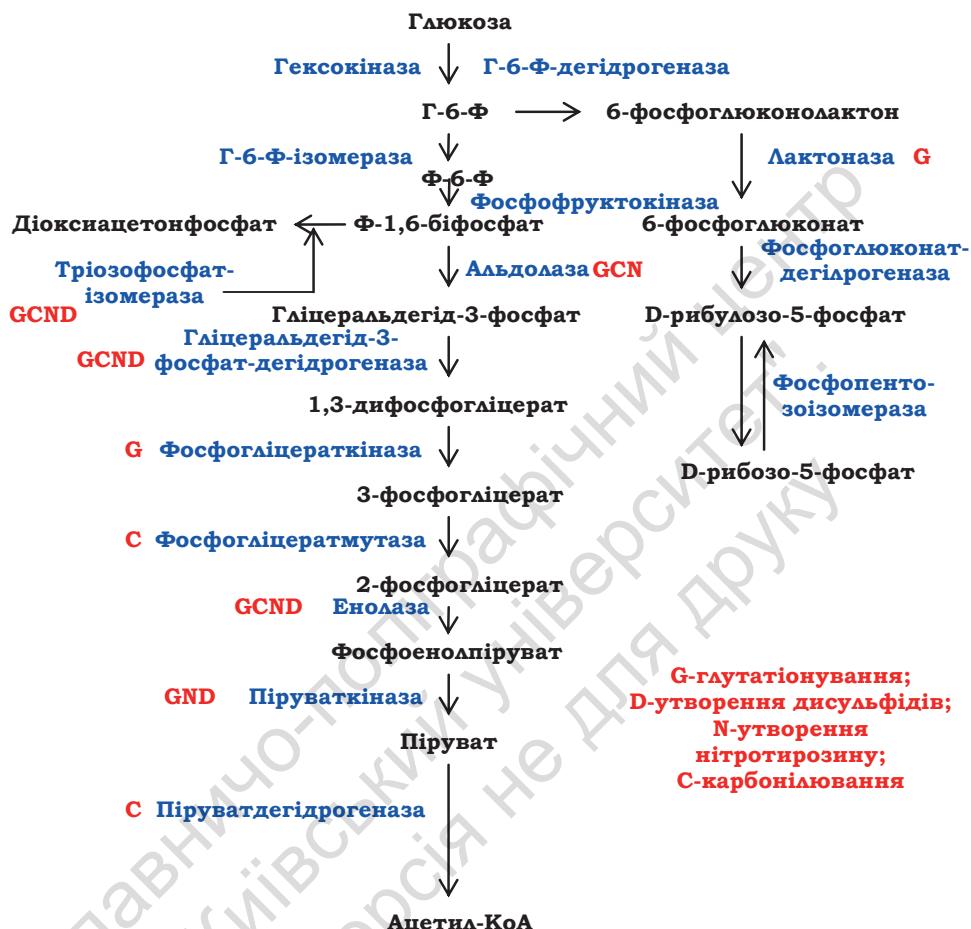
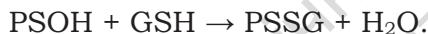
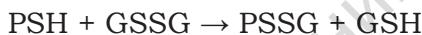


Рис. 3.52. Б. Роль окисних модифікацій білків у регуляції ферментів гліколізу

Окиснення SH-груп пероксидом водню можливе, лише коли Cys-SH групи мішенні мають константу дисоціації $pK_a < 7,0$. За фізіологічних pH такі Cys-SH групи є депротонованими, тобто містяться у вигляді тіолят-аніонів ($-S^-$). Чим легше депротонуються Cys-SH групи білка, тим легше цей білок буде окиснений за залишками цистеїну. Мішенні, які в активному центрі мають Cys-SH групи з низькою pK_a , – тіоредоксин, протеїн-дисульфідізомераза, **170**

тирозинові протеїнфосфатази, пероксиредоксини. Для більшості білків ця цифра $> 8,0$ – ці білки не модифікуються окисненням цистеїну. Кілька серин-треонінових ПК – ПкА, ПкG, Akt, ПкС – мають Cys-SH групи, не залучені до їхньої активності, але вони є консервативними, їхня модифікація може модулювати активність зазначених кіназ.

В умовах окисного стресу окиснення цистеїну може спричинити утворення мішаних дисульфідів між SH-групою білка (PSH) і SH-групою низькомолекулярного тіолу (реакція S-тіоляції). У випадку тіолу глутатіону утворюється S-глутатіоноване похідне (**реакція S-глутатіонування**) (рис. 3.53, А):



S-глутатіонування в клітинах має дуже важливі функції, зокрема, протектує білки від незворотного окиснення до сульфінової та сульфонової кислот (рис. 3.53, Б), здійснюючи модуляції функцій білків (рецепторів, транспортерів, протеїнкіназ, фосфатаз, протеаз, білків цитоскелета) при редокс-регуляції [29]. Якщо залишки Cys є функціонально критичними, їхня модифікація при зміні редокс-стану клітини може інактивувати білок; коли ж редокс-статус клітини нормалізується, через оберненість S-глутатіонування відновлюються й функції білків.

Серед білків і ферментів, активність яких модулюється реакцією S-глутатіонування – пероксиредоксини, аконітатгідратаза, а-кетоглутаратдегідрогеназа, креатинкіназа, гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназа, мітохондріальний комплекс I (НАДН:убіхіон оксидоредуктаза), нуклеотиддифосфаткіназа В, ПкСа, протеїнфосфатаза 2A, тирозинова протеїнфосфатаза 1B, тіоредоксин, тіоредоксинпероксидаза II, тріозофосфатізомераза, тирозингідроксилаза тощо.

До зворотної реакції – відновлення внутрішньомолекулярних, міжмолекулярних і мішаних дисульфідів – задучаються системи тіоредоксину і глутаредоксину.

Тіоредоксин (Trx) – білок, що в активному центрі має два залишки цистеїну і може існувати як в окисненій (-S-S-), так і у відновленій (2SH-) формах. Відновлена форма тіоредоксину взаємодіє з PSSP і відновлює його; сам тіоредоксин після цього відновлюється тіоредоксин-редуктазою (рис. 3.54).

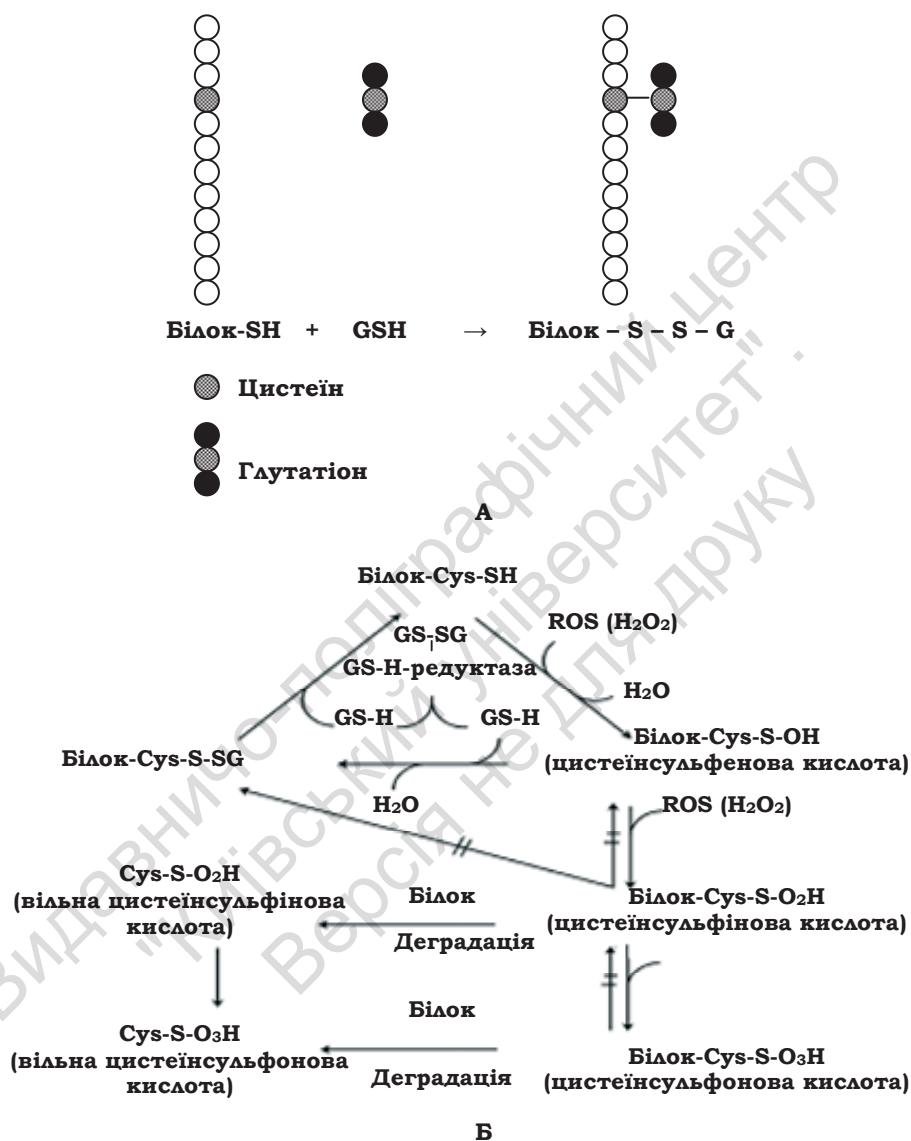
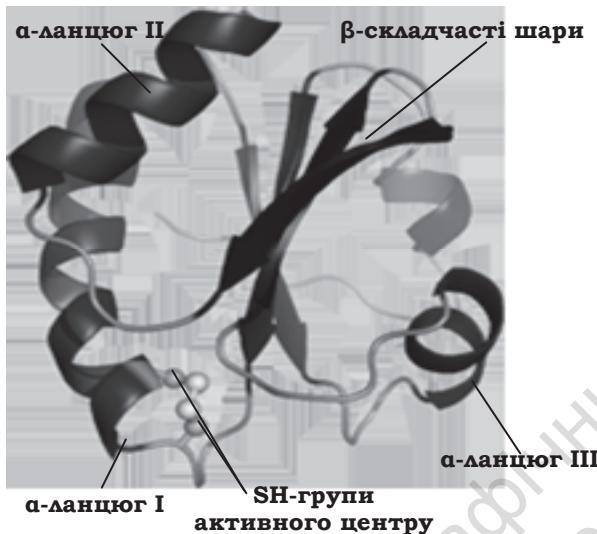
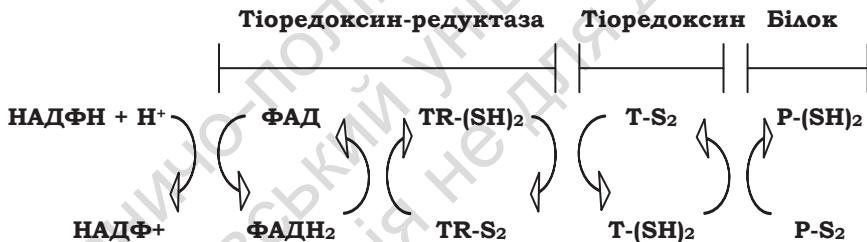


Рис. 3.53. А – реакція S-глутатіонування білків;
Б – продукти зворотного і незворотного окиснення SH-груп білків



**МЕХАНІЗМ ВІДНОВЛЕННЯ -S-S-ЗВ'ЯЗКІВ У БІЛКАХ
ЗА УЧАСТЮ СИСТЕМИ ТІОРЕДОКСИNU**



**Рис. 3.54. Модель молекули тіоредоксину
і схема механізму відновлення
дисульфідних зв'язків за участю системи тіоредоксину**

Глутаредоксин (=тіолтрансфераза) подібно до тіоредоксину в активному центрі має два залишки цистеїну; у відновленій формі (2SH-) відновлює субстрат, після чого сам відновлюється за рахунок ендогенного глутатіону. Для відновлення глутатіону, у свою чергу, використовується глутатіонредуктаза (рис. 3.55).

Для відновлення PSSP необхідні обидві SH-групи глутаредоксину (A), тоді як для відновлення PSSG – лише одна (B).

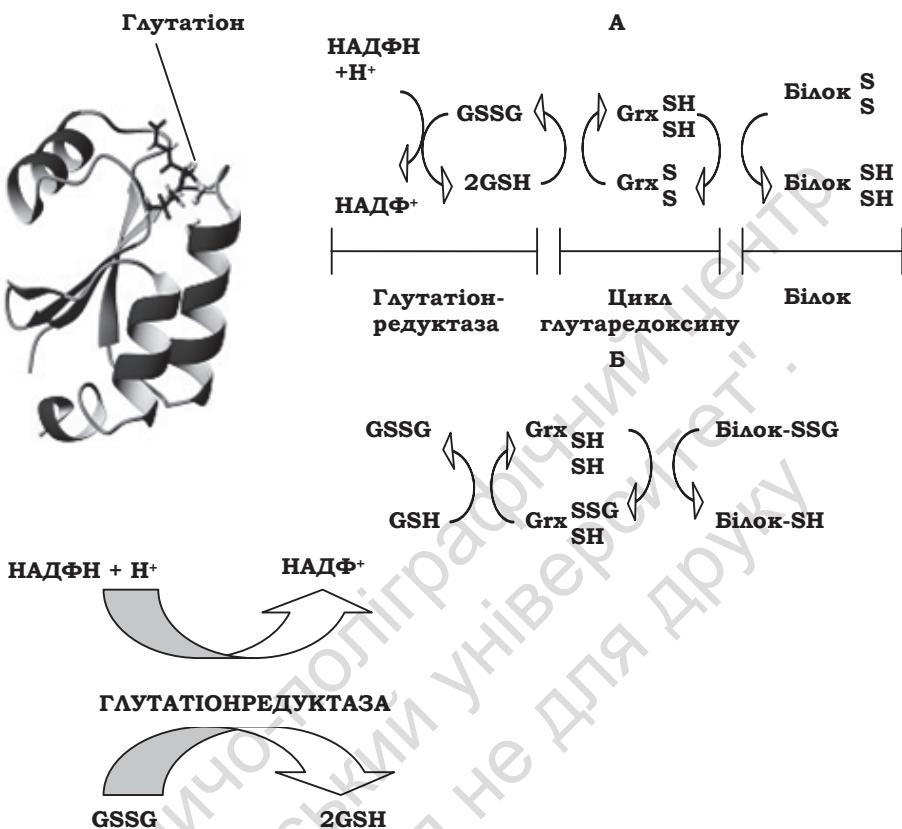


Рис. 3.55. Модель молекули глутаредоксину і схема механізму відновлення дисульфідних зв'язків за участию системи глутаредоксину

Оксисні модифікації залишків цистеїну по-різному впливають на активність різних ферментів. Зокрема, H_2O_2 шляхом окиснення залишків цистеїну каталітичного сайта, імовірно, до сульфено-вої кислоти зворотно інактивує **родину тирозинових протеїнфосфатаз** – це пояснює вже зазначений раніше факт, що продукція H_2O_2 необхідна для рецептор-індукованого фосфорилювання Тут. Зворотна реакція відновлення фосфатаз відбувається за рахунок тіоредоксину або глутаредоксину за їхніх фізіологічних концентрацій. **Цистеїнові залишки факторів транскрипції** є мішенями H_2O_2 -модифікацій, і ці модифікації разом із фосфорилюванням

можуть відповідати за їхні комплексні сигнальні механізми. Окиснення Cys-SH груп **Ca²⁺-транспортуючих систем ЕПР**, мітохондрій, ПМ може спричиняти зростання вмісту Ca²⁺ в цитозолі. Окиснення Cys-SH груп внутрішньоклітинних білків впливає на **їхню здатність упізнаватися іншими білками**. Окиснення Cys-SH груп деяких білків **сприяє їхньому руйнуванню в протеасомах**. Окиснення різних Cys-SH груп **каспаз** може як активувати їх, сприяючи апоптозу, так і інгібувати з розвитком некрозу. Слід зазначити, що молекули глутатіону й тіоредоксину є надчутивими до зміни редокс-статусу клітини, що спричиняє порушення функцій антиоксидантних систем за цих умов.

Що стосується окисних модифікацій інших амінокислот, то окисні модифікації залишків метіоніну (метіонін → метіонінсульфоксид; зворотна реакція – фермент метіонінсульфоксидредуктаза) зустрічаються відносно часто, але невідомо жодної каталітичної чи функціональної ролі залишків метіоніну. Окисні модифікації залишків тирозину можуть брати участь у регуляції білків-мішеней тирозинових протеїнкіназ і самих ТПК.

3.11.3.4. ROS як регуляторні молекули: вплив на внутрішньоклітинні сигнальні каскади

Загальну схему активації молекулами ROS, зокрема H₂O₂, внутрішньоклітинних сигнальних шляхів наведено на рис. 3.56, А.

Таким чином (рис. 3.56, Б), умовно дію ROS як сигнальної молекули можна розглядати на двох рівнях – на рівні внутрішньоклітинних білків і каскадів і на генному рівні [31, 46].

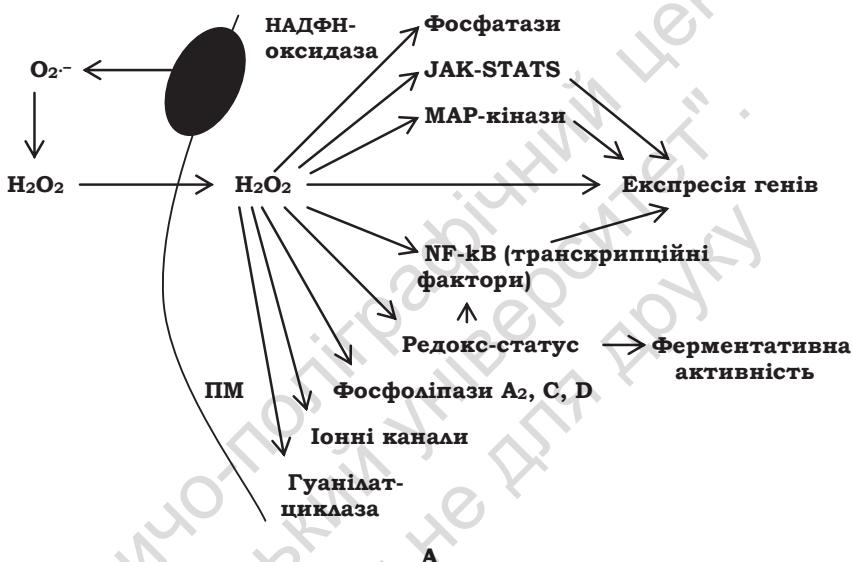
➤ ROS посилює **фосфорилювання залишків тирозину**. Стан Туг-фосфорилювання білків-мішеней залежить від активності двох класів ферментів – **тироzinovих протеїнкіназ** (рецепторних і цитозольних (Lck, Fyn, Syk, JAK-2, кінази родини Src – Lck, Fyn)) і **тироzinovих протеїнфосфатаз**. Отже, ефекти окисного стресу на активність цих ферментів є ключовим сайтом модуляції сигнальної трансдукції окисним стресом. Основним механізмом зростання Туг-фосфорилюючої активності під дією ROS є інгібування активності тирозинових протеїнфосфатаз шляхом окисної модифікації залишків цистеїну активного центру ТПФ. У клітинах, оброб-

Біохімічні механізми апоптозу

лених оксидантами, ліганд-незалежної базальної активності тирозинових протеїнкіназ може бути достатньо для зростання Туг-фосфорилювання білків унаслідок інактивації ТПФ.

ПОТЕНЦІЙНІ ВНУТРІШНЬОКЛІТИННІ СИГНАЛЬНІ ШЛЯХИ, ЩО МОЖУТЬ БУТИ АКТИВОВАНІ H_2O_2

Деякі із цих шляхів змінюють експресію генів, тоді як інші можуть спричинити модуляцію ферментативної активності



A

ROS у внутрішньоклітинній передачі сигналу	
Каскади, що закінчуються на рівні активації відповідних внутрішньоклітинних білків, тобто в цитоплазмі	Каскади, що ведуть до індукації експресії відповідних генів, тобто закінчуються в ядрі
Регуляція фосфорилювання / дефосфорилювання	Активування МАРК-каскадів
Регуляція вмісту внутрішньоклітинного Ca^{2+}	Активування факторів транскрипції
Регуляція вмісту цАМФ, цГМФ	
Регуляція S-глутатіонування / де-глутатіонування ("тілове перемикання")	

B

Рис. 3.56, А, Б: Активування молекулами ROS внутрішньоклітинних сигнальних шляхів

➤ Загальний ефект на всі **Ser/Thr-протеїнкінази** – активація. Оксиданти регулюють активність **ПкА** на рівнях утворення/деградації цАМФ (зокрема, активність аденилатциклази зростає при короткосочасних впливах ROS і знижується при їхній тривалій дії) і фосфорилювання/дефосфорилювання субстратів.

У структурі **ПкС**, що в нормі активується ДАГ через N-кінцеву ділянку, при цьому потребуючи наявності фосфоліпідів й Ca^{2+} , є й інша ділянка, через яку фермент активується окисниками (H_2O_2) – Cys-багата, Zn^{2+} -вмісна ділянка (т. зв. "цинковий палець", рис. 3.57).

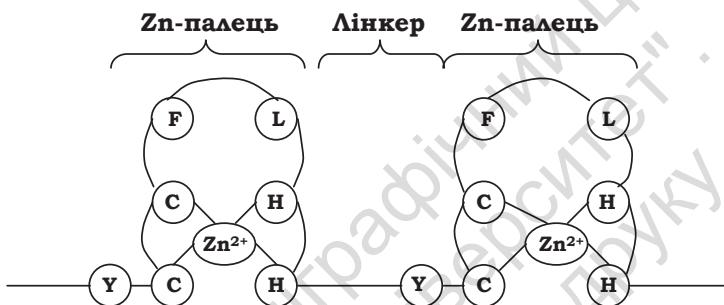


Рис. 3.57. Структура "цинкових пальців"

SH-групи цієї ділянки є високочутливими до окиснення, яке сприяє зміні конформації поділіпептидного ланцюга й активації ферменту. Крім того, "цинкові пальці" є сайтом зв'язування ретиноїдів, які виступають як кофактори в активації ПкС ROS (можливо, вони посилюють іонізацію SH-груп Cys), тоді як класичний шлях активації ПкС не залежить від наявності ретиноїдів. Взагалі, кілька серин-треонінових Пк, у тому числі **ПкА, ПкС, ПкG, Akt, S6-кіназа** – усі вони мають консервативні Cys-SH-залишки в межах їхнього активного центру, які не є обов'язковими для активності ферменту. Зворотне окиснення цих залишків може змінювати активність цих кіназ і модулювати взаємодії між регуляторною і каталітичною субодиницею або між ферментом і субстратом.

ПкRaf у нормі активується фосфатидилсерином або G-білком Ras (p21). Механізм активації за участю ROS – ретинол-залежна активація шляхом модифікації залишків цистеїну в "цинкових пальцях" активного центру; механізми аналогічні ROS-залежній активації ПкС. Ще один механізм активації протеїнкінази Raf при дії ROS опосередкований активацією при дії вільних радикалів

Біохімічні механізми апоптозу

G-білка Ras. Цей механізм залучений до активації транскрипційного фактора NF-кВ дією ROS. Підвищена чутливість Ras до ROS і редокс-статусу клітини є додатковим механізмом, за яким ROS можуть спричиняти онкогенез, оскільки надактивовані форми Ras часто виявляють у хворих на рак. Механізм ROS-активації Ras – S-глутатіонування Cys-118, що індукує конформаційні зміни Ras-білка і відповідає за його взаємодію з різними сигнальними білками-ефекторами Ras (серед них фосфатидилінозитол-3'-кіназа, Raf, PI3K, DAG-кіназа, MAPKKK, які при цьому активуються).

➤ Основні напрямки дії ROS у регуляції рівнів внутрішньоклітинного Ca^{2+} наведено в табл. 3.6.

Регуляторні впливи ROS на MAPK наведено в табл. 3.8 і рис. 3.58.

Таблиця 3.6. Основні напрямки дії ROS у регуляції рівнів внутрішньоклітинного Ca^{2+}

Основні напрямки ROS у регуляції вмісту внутрішньоклітинного Ca^{2+}	
Унаслідок зростання надходження із позаклітинного простору	За рахунок Ca^{2+} ЕПР і СР, рідше – за рахунок Ca^{2+} мітохондрій
А) активація різних типів Ca^{2+} -каналів ПМ	А) Ca^{2+} -АТФаза чутлива до ушкодженні вільними радикалами – при цьому відбувається окиснення SH-груп активного центру ферменту. Ушкоджена АТФаза не лише втрачає здатність закачувати Ca^{2+} , а й перетворюється на канал для Ca^{2+}
Б) активація K^+ , Na^+ , Cl^- -каналів ПМ	Б) активація ріанодинових рецепторів (великі Ca^{2+} -звільнюючі канали в мембраних СР, чутливі до інгібування рослинним алкалоїдом ріанодином)
В) активація іонних насосів (K^+ , Na^+ -АТФаза)	В) активація I3F-рецепторів ЕПР через активацію ROS фосфоліпази С (механізм невідомий); у клітині зростає продукція двох вторинних посередників – DAG і I3F. Останній, зв'язуючись з I3F-рецепторами, активує їх і спричиняє вихід Ca^{2+}
Г) активація іонних обмінників ($\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$)	Г) вплив ROS на вихід Ca^{2+} із мітохондрій, виникнення РТР під час апоптозу, спричиненого дією ROS
Д) активація котранспортерів (K^+/Cl^- , $1\text{Na}^+/2\text{Cl}^-$)	

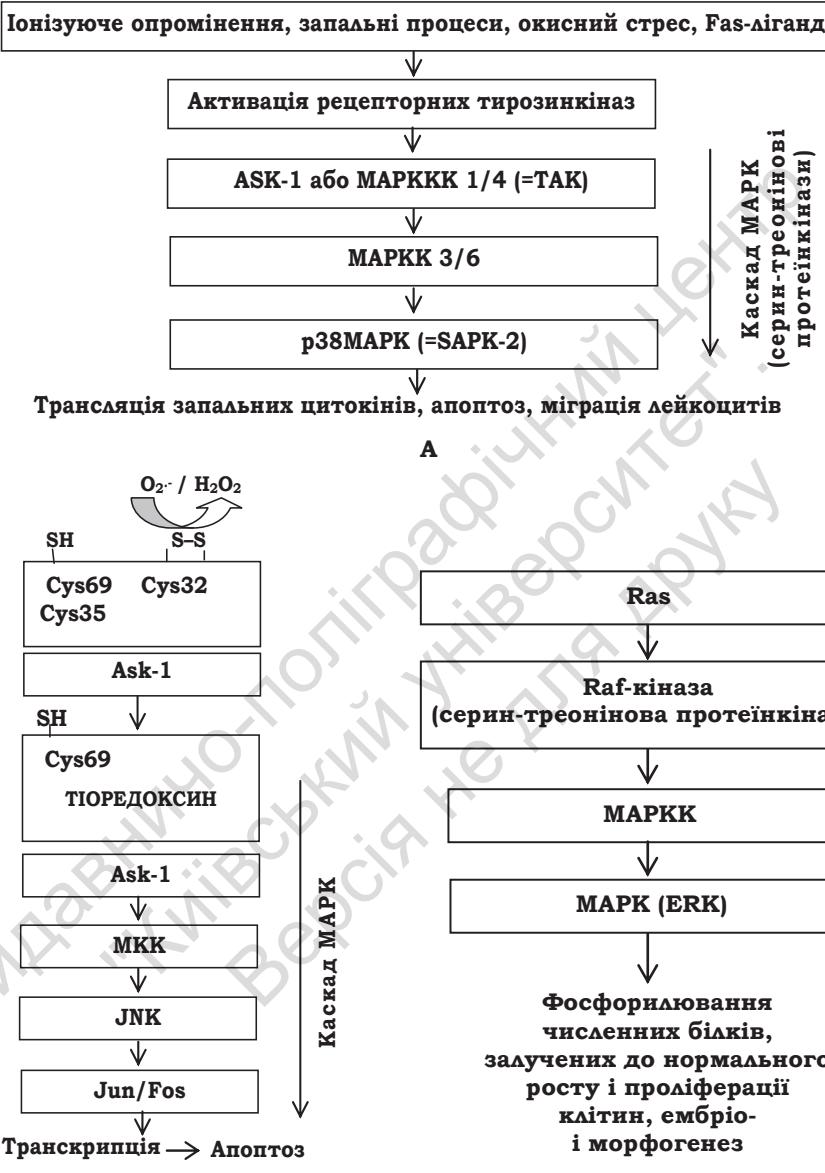


Рис. 3.58. Основні напрямки дії ROS в окисній активації МАРК-каскадів (дод. до табл. 3.7)

Біохімічні механізми апоптозу

Таблиця 3.7. Основні напрямки дії ROS в окисній активації МАРК-каскадів

Окисна активація МАРК-каскадів		
Безпосередня активація кіназ (p38, JNK, ERK)	Опосередкована активація кіназ – через ROS-активацію регуляторних систем	Інгібування фосфатаз
Через активацію фосфорилювання залишків Ser i Thr в активному центрі цих ферментів	1) Через ROS-активування тирозинових протеїнкіназ родини Src активуються p38 і JNK (рис. 4.58, А) 2) Регулятор протеїнкіназ, що активуються за умов стресу (SAPKs = p38 + JNK) – Ask-1 – інгібується в нестресових умовах через його асоціацію з тіоредоксином. Зростання рівній ROS спричиняє дисоціацію цього комплексу, активацію ASK-1 і SAPKs (рис. 4.58, Б) 3) Шляхом активації Ras i Raf (ERK-каскад) (рис. 4.58, В) 4) На рівні ліганд-рецепторної взаємодії	

3.11.3.5. ROS як регуляторні молекули: транскрипційні фактори й експресія генів

Кінцевим результатом активації МАРК-кіназ, як уже зазначається (підрозд. 3.7), є активація транскрипційних факторів (зокрема NF-кВ, AP-1), що здійснюють регуляцію експресії низки відповідних генів. Тому ROS можуть активувати такі транскрипційні фактори через індукцію МАРК-каскадів. Щодо **NF-кВ** (підрозд. 3.5), то інші механізми його регуляції активними формами кисню включають окиснення ключових сайтів кіназ, які фосфорилюють і активують ІкВ-кіназу, безпосередню редокс-modуляцію активності ІкВ-кінази, а також етапи транслокації активного NF-кВ із цитоплазми в ядро. При цьому антиоксиданти й тіолові сполуки інгібують NF-кВ. У той же час

для функціонування NF-кВ його ДНК-зв'язувальна ділянка має бути у відновленому стані, тому здатність NF-кВ сполучатися з ДНК знижується при дії окисників і зростає при дії відновників. Унаслідок цього кінцевий результат такої подвійної регуляції залежить від тривалості й сили окисника.

Інший транскрипційний фактор – **AP** (*activated protein*) – залучається до регуляції процесів диференціювання, регенерації й апоптозу. Це гетеродимер, що складається із двох білків – c-Fos і c-Jun – і активує експресію генів, що, зокрема, кодують колагеназу, TGF-1b, цитокіни тощо. Димерний комплекс (c-Fos + c-Jun) взаємодіє з ДНК-регуляторним елементом – AP-1-зв'язувальним сайтом AP-1 індуцибельних генів. Активацію AP-1 індукують мітогени, форболові ефіри, фактори росту, TNF α , H $_2$ O $_2$, УФ, іонізуюче випромінювання. Механізми ROS-індукованої активації AP-1 включають фосфорилювання специфічних залишків AP-1. Наприклад, ROS-залежна активація MAPK-каскаду (JNK) призводить до фосфорилювання Ser-63 і -73 в субодиниці c-Jun AP-1, що активує цю с/о. c-Fos блок в AP-1 також активується шляхом фосфорилювання Thr-232 внаслідок Fos-регуляторної кіназної активності білка Ras. Водночас, подібно до NF-кВ, один залишок цистеїну у висококонсервативному ДНК-зв'язувальному домені AP-1 є редокс-чутливим: відновний стан його необхідний для зв'язування AP-1 з ДНК. Модифікація цього залишку окисниками знижує активність AP-1, а обробка відновниками посилює зв'язування з ДНК.

ROS також впливає на функції транскрипційного фактора p53, який має багато залишків цистеїну, що можуть підлягати окисній модифікації. До мішеней p53, що залучені до зупинки клітинного циклу, належать білки p21, GADD45, 14-3-3-сігма, Bax, Puma, Noxa, Apaf-1, Fas-R, DR5, які він активує, і Bcl-2 та Bcl-x $_L$, на які p53 має інгібіторний вплив. Таким чином, p53 залучається до реалізації програми апоптозу і до репарації (підрозд. 3.2.3).

У табл. 3.8 підсумовано дані літератури про впливи ROS на різні типи сигнальних молекул.

Таблиця 3.8. Ефекти оксидантів на сигнальні молекули клітини

Сигнальна молекула	Ефект оксидантів
Тирозинові протеїнкінази (рецептори до EGF, PDGF, інсуліну; Src, Lck, Fyn, Zap-70, Syk, Lyn, Fgr, Hck, Btk, Ltk)	Активація
Тирозинові протеїнфосфатази	Інактивація
Ліпідна сигналізація (PLC, PLD, PLA ₂ , РІЗК)	Активація
Ca ²⁺ -сигналізація: I3Ф-рецептор, Ca ²⁺ -АТФаза	Активація
Малий G-білок (Ras)	Активація
Серин-тронінові протеїнкінази (MAPK – JNK, p38, ERK; BMK-1, Akt, S6-кіназа, ПкС)	Активація / інактивація
Серин-тронінові протеїнфосфатази (PP1, PP2A, кальциневрин)	Інактивація
Транскрипційні фактори (AP-1 (c-fos + c-jun), NF-kB, rel, Myb, p53, ATF, ін.	Активація / інактивація

На можливі напрямки дії активних форм кисню (у випадку активація / інактивація) впливають:

- тип ROS (різні форми мають різні ефекти на внутрішньоклітинні мішені, у тому числі й MAPK);
- сайт генерації ROS (таким чином визначаються первинні мішені ROS);
 - просторове розповсюдження;
 - діапазон концентрацій;
 - тривалість дії;
 - редокс-статус клітин.

3.11.3.6. Участь ROS у механізмах апоптозу і виживання клітин

Низькі рівні ROS, як уже зазначалося, регулюють клітинну сигналізацію і відіграють важливу роль у нормальній клітинній проліферації. Підвищені рівні ROS – залежно від наведених на-прикінці попереднього підпідрозділу критеріїв – можуть спричинити або виникнення і прогресію пухлин, тобто посилену проліферацію клітин, або їхню загибель шляхом апоптозу [28].

ROS залучаються як до ініціаторної фази апоптозу, так і на екзекуційних етапах цього типу клітинної загибелі як до зовнішнього шляху апоптозу, так і до внутрішнього, що відбувається без активації рецепторів загибелі (підрозд. 3.4). Зниження внутрішньоклітинного рівня GSH або посилення його окиснення до GSSG, як і зростання генерації ROS часто можуть виступати як проапоптозні фактори. Клітинні антиоксиданті, зокрема GSH і Trx, не лише регулюють рівні ROS, але й діють як зворотні редокс-модифікатори активності низки білків/ферментів, причетних до механізмів апоптозу (цитохрому с, білків родини Bcl-2, каспаз, ПкС, p53 тощо) (рис. 3.59).



Рис. 3.59. Схема модуляції ROS сигнальних шляхів апоптозу

ROS, генерований у мітохондріях, залучений до клітинної цитотоксичності при TNFa-, Fas-L-, тус-, p53- і вірус-індукованому апоптозі. За відсутності потужного окисного стресу клітини про-

Біохімічні механізми апоптозу

текуються від дії ROS шляхом зростання експресії гена природного антиоксиданту мітохондріального матриксу Mn²⁺-СОД.

Існують різні напрямки, за якими ROS проявляють проапоптозні ефекти. Так, ROS посилюють гідроліз сфінгомієліну з утворенням цераміду – вторинного месенджера, що залишається до проапоптозних сигнальних шляхів (підрозд. 3.8) (рис. 3.60, А, Б). Активні форми кисню також здійснюють пряму індукцію Fas-L (підрозд. 3.3), зв'язування якого з відповідним рецептором спричиняє індукцію апоптозу.

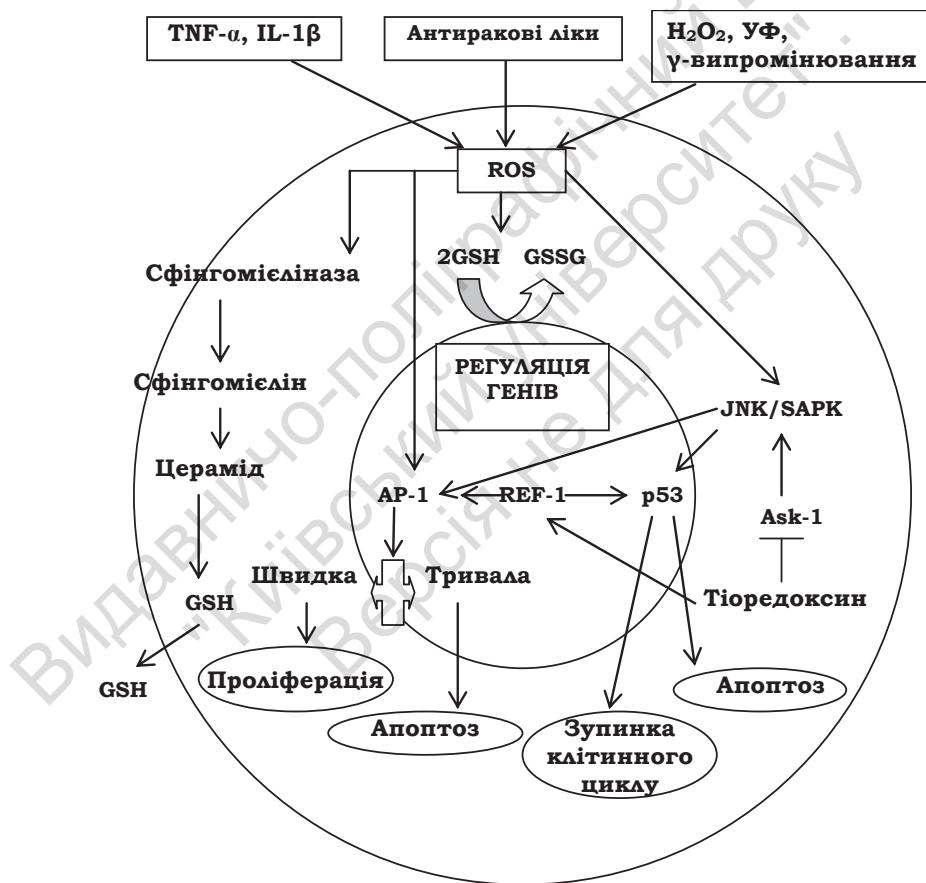


Рис. 3.60, А. ROS-індуковані сигнальні шляхи апоптозу

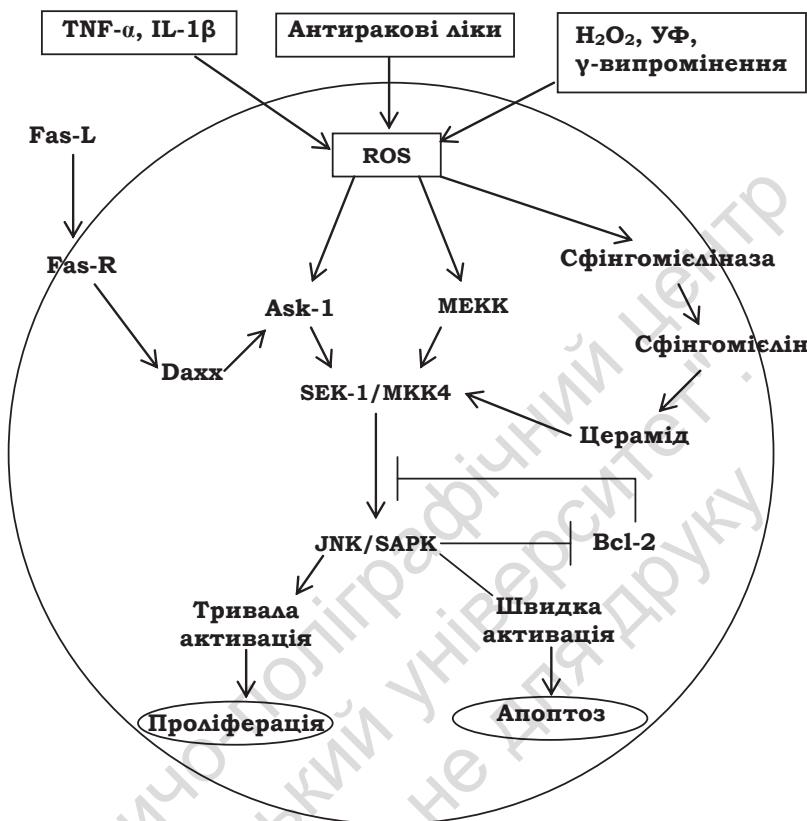


Рис. 3.60, Б. ROS-індуковані сигнальні шляхи апоптозу

Цитохром с (підрозд. 3.4) – розчинний білок, локалізований зовні внутрішньої мембрани мітохондрій. За нормальних умов він функціонує як переносник електронів у дихальному ланцюзі між комплексами III і IV.

Цитохром с може функціонувати як антиоксидант. При зростанні рівнів ROS він відокремлюється від внутрішньої мембрани мітохондрій і здатний окиснювати O_2^- з утворенням O_2 . Це значно знижує окисні властивості супероксидного аніона і зменшує його пошкоджувальні ефекти. Але за надмірної генерації ROS (або спустошення пулу GSH) цитохром с звільняється з мітохондрій через пору PTP чи (або) Bax/Bak-канали і в

цитоплазмі разом з Araf-1 і прокаспазою-9 утворює апоптосому – цей етап є одним із ключових серед мітохондріальних подій апоптозу; при цьому звільнення цитохрому c є незворотним. Цікаво, що цитохром c може індукувати апоптоз лише в тому випадку, коли він присутній у цитоплазмі в окисненому стані. Наявність високих рівнів цитозольного GSH підтримує цитохром c в неактивному відновленому стані. Таким чином, коли цитохром c звільняється з мітохондрій і в клітині достатньо відновленого глутатіону, апоптоз не спостерігатиметься (але в цьому випадку внаслідок звільнення цитохрому c руйнується дихальний ланцюг мітохондрій); якщо ж редокс-статус клітини порушений (посилена генерація ROS та/або) знижений пул GSH), цитохром c переходить в окисний стан з розвитком апоптозу. Це є одним із пояснень того, як редокс-статус клітини може регулювати активацію каспаз на віть після звільнення цитохрому c .

ROS активують усі три родини **MAPK** (підрозд. 3.7, а також табл. 3.8, рис. 3.58): ERK-каскад, що результується в посиленій проліферації, і протеїнкінази, що активуються стресом – SAPKs (JNKs + p38), які в стресових умовах спричиняють апоптозну загибель клітин, а в нестресових також можуть бути контрибутором проліфераційної відповіді. Результат залежить у першу чергу від тривалості дії активних форм кисню та від їхніх рівнів. Крім того, у проапоптозній індукції JNK- і p38-каскадів, обидва з яких залучають активацію кінази Ask-1, важливу роль відіграє редокс-статус клітини – за умов нормального вмісту відновленого Trx ці шляхи є заблокованими через зв'язування Trx із N-кінцевою ділянкою кінази, тобто Trx є редокс-чутливим фізіологічним регулятором активності Ask-1 і зазначених MAPK-каскадів (рис. 3.58). Активований ROS JNK-каскад залучений до індукції транскрипційних факторів p53, AP-1; фосфорилювання Bcl-2 за Ser-70 інгібує антиапоптозні властивості цього білка.

ROS активують одну із кіназ PI3K-каскаду – Akt (рис. 3.10). У фізіологічних умовах активована ростовими факторами кіназа Akt служить для фосфорилювання білків, що підтримують основні функції клітин, зокрема транспорт і окиснення глюкози. Во-

на здатна безпосередньо взаємодіяти з проакаспазою-9, інактивуючи її. Точний механізм цього процесу не досліджений. Ділянка фосфорилювання Akt (RXRXXS/T) ідентифікована і в інших білках-регуляторах апоптозу на кожному рівні апоптозного каскаду (каспаза-8, Bcl-2, Araf-1, IAP, каспаза-7). Таким чином, активація кінази Akt активними формами кисню спричиняє посилення виживання клітин.

Активація ROS транскрипційних факторів (теж залежно від сили окисного стресу та його тривалості) може стати причиною апоптозу або виживання клітини. Зокрема, індукція активними формами кисню NF- κ B (підпідрозд. 3.11.3.5), який контролює експресію проапоптозних білків Bax і p53 (у бік інгібування) та антиапоптозного Bcl-2 (у бік посилення), результується у виживанні клітин та їхньої проліферації. ДНК-зв'язувальна активність іншого транскрипційного фактора – AP-1 – потребує білка Ref-1 (*redox-factor-1*) – білкового редокс-фактора, який опосередковує зв'язування з ДНК Fos- і Jun-гетеродимерів шляхом відновлення консервативних SH-вмісних залишків у ДНК-зв'язувальних доменах цих білків (див. вище). Тіоредоксин здатний регулювати транскрипційну активність AP-1 через його пряму взаємодію з Ref-1, при цьому Trx слугує безпосереднім донором H⁺ для Ref-1.

Надекспресія **p53** в нормі (підпідрозд. 3.2.3) трансактивує серію p53-залежних генів (PIGs); деякі з них кодують редокс-активні білки, у тому числі два ферменти, здатні генерувати ROS (хіонон-оксидоредуктазу NQO-1 – *quinone oxidoreductase*, синонім PIG3 і проліноксидазу, POX – *prolin oxidoreductase*, синонім PIG6). Надмірна активація цих прооксидантів надалі спричиняє окисний стрес і апоптоз. Інші кандидати в p53-індуковані прооксиданти (і проапоптозні фактори) – Bax, PUMA і p66^{Shc}. Два перші білки (підпідрозд. 3.2.2) при гіперекспресії p53 індукують дисфункцію мітохондрій, що результується в генерації ROS унаслідок втрати електронів в електронотранспортному ланцюзі. p53-чутливі елементи також містяться в гені, що кодує антиапоптозний білок Bcl-2, але в цьому випадку відбувається пригнічення експресії зазначеного протеїну.

p66^{Shc}, який головним чином локацізований у цитоплазмі, за допомогою певних білкових факторів надходить до мітохондрій

рії, де викликає продукцію пероксиду водню, окиснює цитохром *c*, що сприяє відкриттю РТР і реалізації апоптозної програми (підрозд. 3.4).

Альтернативний шлях дії p53 як генератора ROS – супресія генів антиоксидантів (Mn^{2+} -СОД і глутатіонтрансферази).

Таким чином, гіперактивність p53 причетна до розвитку окисдативного стресу, і один із шляхів p53-залежного апоптозу може відбуватися саме завдяки посиленню генерації ROS. У той же час окисний стрес сам по собі здатний впливати на p53-сигнальні шляхи і власне на сам p53. Так, виявлено, що надмірна генерація ROS у мітохондріях стає причиною апоптозу (p53-залежного або незалежного), тоді як генерація активних форм кисню в ядрі викликає p53-залежну репарацію ДНК. Це є свідченням того, що вибір шляху, яким буде прямувати клітина (зупинка клітинного циклу, репарація ДНК, апоптоз) зумовлюється перетворенням редокс-сигналів на вибір певних p53-залежних генів, що й визначає кінцеву долю клітин.

Крім взаємодії ROS і p53 через сигнальні шляхи, існують також інші прямі ефекти на цей білок. Стабільність і активність p53 є об'єктом різних ковалентних посттрансляційних модифікацій, зокрема убіквітування, фосфорилювання, ацетилювання, метилювання та ін.). Убіквітування p53 залиcheno до деградації p53 і транслокації його фрагментів до мітохондрій; фосфорилювання (опосередковане p38, ERK або ATM), ацетилювання і метилювання сприяють стабілізації p53, його акумуляції та активації.

Як уже зазначалося, сам p53 є редокс-активним унаслідок присутності в його молекулі залишків Cys, що мають редокс-чутливі SH-групи. У p53 людини є два кластери Cys у ДНК-зв'язувальному домені, який є необхідним для специфічного зв'язування p53 з відповідною послідовністю ДНК у межах p53-чутливого гена. Cys-176, -238, -242 разом із His-179 становлять сайт зв'язування для Zn^{2+} . Мутації цих ділянок у поліпептидному ланцюзі знижують специфічне зв'язування p53 із ДНК. Інші залишки цистеїну – Cys-124, -135, -141, -182, -277 – локалізовані поряд із ДНК-зв'язувальним доменом p53 і створюють структурну платформу для редокс-регуляції. З усіх можливих результатів окиснення тіолових груп у білках

рення дисульфідів (-S-S-), сульфенової (-SOH), сульфінової (-SO₂H), сульфонової кислот (-SO₃H), сульфенаміду (-SNR₁R₂)) найчастіше при окисненні p53 його залишки цистеїну утворюють дисульфіди; про існування інших окиснених продуктів наразі невідомо.

Показано, що обробка p53 окисниками зворотно знижує його ДНК-зв'язувальну активність унаслідок того, що молекула глутатіону приєднується до Cys-124, -141 або -182 молекули p53 через дисульфідний зв'язок з утворенням мішаного дисульфіду. Як уже зазначалося (див. вище), подібні ефекти S-глутатіонування консервативних залишків цистеїну виявлені не лише для p53, а й для інших транскрипційних факторів – AP-1, NF-кВ.

Редокс-модифікація може бути потенційним механізмом для вибору генів-мішеней – наприклад, окиснення Cys-277 послаблює зв'язування p53 з геном GADD45, але не з p21^{CIP1}. Інший можливий механізм виникнення різної афінності p53 до p53-залежних генів – редокс-модифікації різних залишків цистеїну в молекулі білка.

Різні посттрансляційні модифікації в межах однієї молекули здатні співіснувати. Для молекули p53 відомо одночасне фосфорилювання і ацетилювання, обидва з яких стабілізують p53. S-глутатіонування може співіснувати з фосфорилюванням; водночас, як саме S-глутатіонування (і редокс-модифікації в цілому) впливають на стабільність p53, сьогодні невідомо. Однак не виключено, що редокс-модифікація може індукувати конфірмаційні зміни, що будуть впливати на стабільність p53 [37].

Подібно до AP-1, потенційним активатором p53 є Ref-1.

Окисні модифікації **каспаз** (зокрема каспази-3), які є чутливими до редокс-статусу клітини – залежно від типу і локалізації змін – можуть спричиняти як їхню активацію, так і інгібування.

Таким чином, ROS залежно від місця генерації, розповсюдження, типу вільних радикалів, тривалості й сили їхньої дії, а також від редокс-статусу клітини можуть мати різні ефекти на сигнальні каскади клітини, транскрипційні фактори, окрім білки-ферменті, що результується у виживанні клітин, їхній проліферації чи загибелі шляхом апоптозу (рис. 3.61).

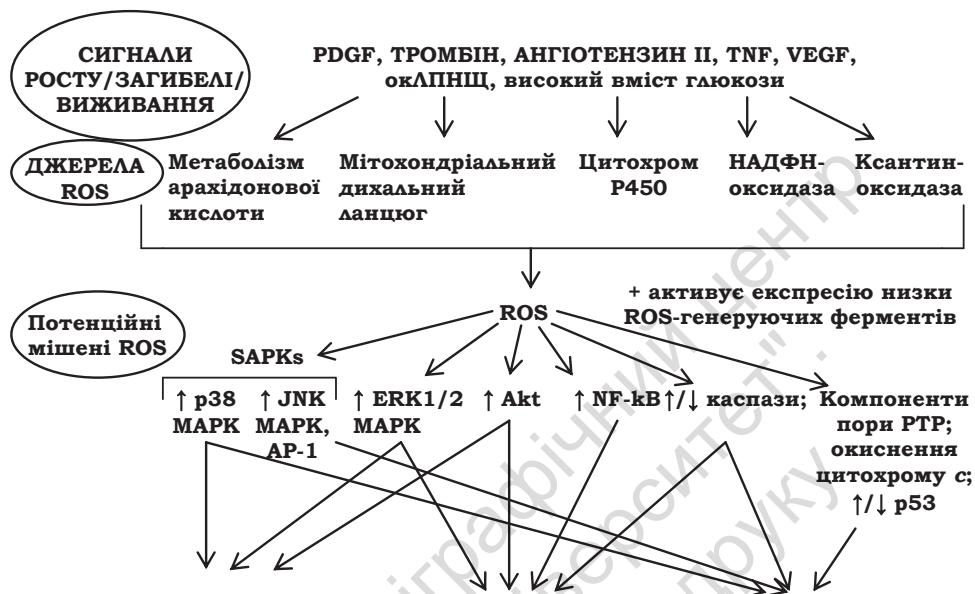


Рис. 3.61. ROS і доля клітин: підсумкова схема

3.12. ФАГОЦИТОЗ АПОПТОЗНИХ КЛІТИН

Описані вище події апоптозу спричиняють загибель окремих клітин, які при цьому повинні видалятися із живої тканини. Таке видалення здійснюється шляхом фагоцитозу за участю макрофагів або сусідніх клітин (рис. 3.62).

Фагоцитоз апоптозних клітин включає низку подій (рис. 3.63): міграцію фагоциту до апоптозної клітини, розпізнання клітини, що гине, фагоцитом, поглинання та процесинг її всередині фагоциту.

До **міграції** фагоцитів задушенено низку хемокінів, зокрема MCP-1 (*monocyte chemoattractant protein 1* – білок 1 хемотаксису моноцитів), експресія якого посилюється в апоптозних клітинах. Макрофаги за участю спеціальних рецепторів зв'язують цю сподіку та набувають здатності переміщуватися до місця загибелі.

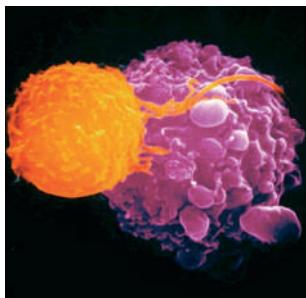


Рис. 3.62, А. Т-клітина поглинає апоптозну клітину (за А. Ліпінсом)

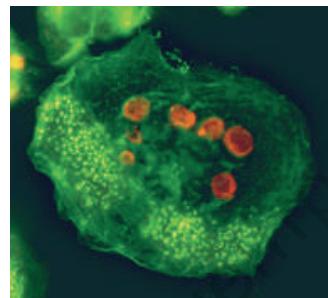


Рис. 3.62, Б. Клітина імунної системи (макрофаг, зеленої кольору) поглинає кілька клітин, що гинуть шляхом апоптозу (червоні) (за М. Джейнсом і П. Хенсоном)

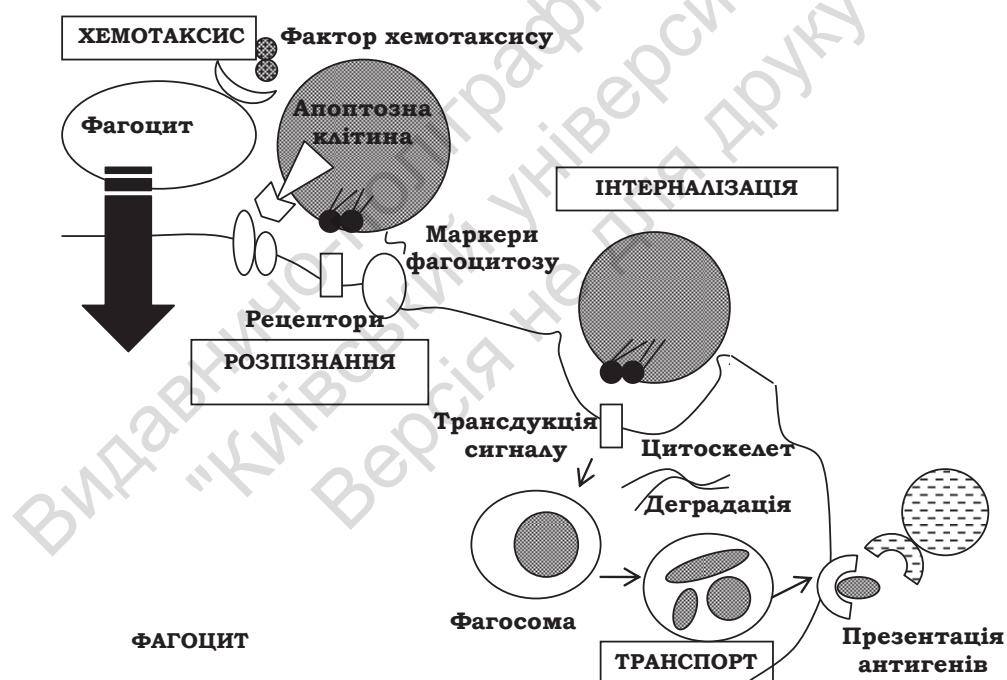


Рис. 3.63. Основні етапи фагоцитозу апоптозних клітин

Біохімічні механізми апоптозу

Щоб здійснювати подальші процеси, фагоцитарні клітини повинні виявити апоптозні індивідууми, у цьому і полягає стадія **розвізнання**. Існують три головні "маркери для фагоцитозу", або "сигнали для пойдання" (*eat-me signals*) (В. Фадок і П. Хенсон) [26, 30, 40] (рис. 3.64):

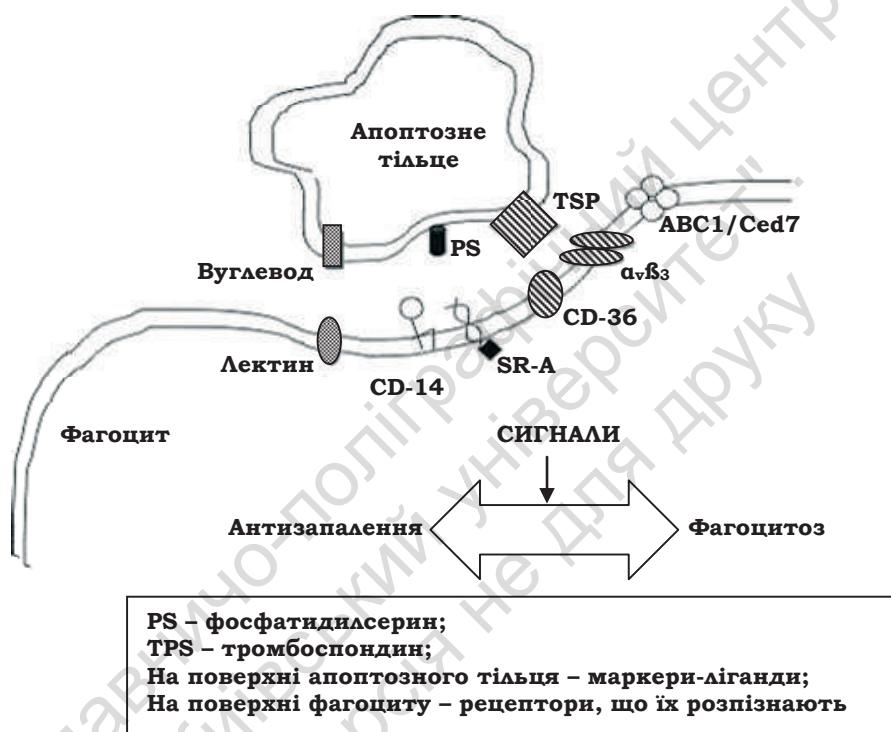


Рис. 3.64. Розпізнання апоптозної клітини
(за І. Наканіші) (пояснення в тексті)

1. На ранніх етапах програмованої загибелі клітин, ще до формування апоптичних тілець, відбувається **інверсія мембраних фосфоліпідів**. За звичайних умов зовнішній монолін мембрально-го бішару містить в основі нейтральні фосфоліпіди сфінгомієлін і фосфатидилхолін, тоді як від'ємно заряджені фосфоліпіди локалізовані в його внутрішньому моноліні. У апоптозних клітин ця мембрана асиметрія порушується (у цьому задіяний фермент

скрамблаза – цей Ca^{2+} -залежний фермент відповідає за транспорт фосфоліпідів між двома моношарами в ліпідному бішарі плазматичної мембрани і є специфічним членом великої родини трансмембраних ліпідних транспортерів фліппаз), і вони експресують назовні фосфатидилсерин (PS), який розпізнається макрофагальними рецепторами (рис. 3.65). Експозиція фосфатидилсерину на поверхні клітин викликає появу на імунокомпетентних клітинах специфічних рецепторів: в активованих макрофагах – лектино-подібних, а в неактивованих – інтегринових, зокрема рецептора вітронектину [17].

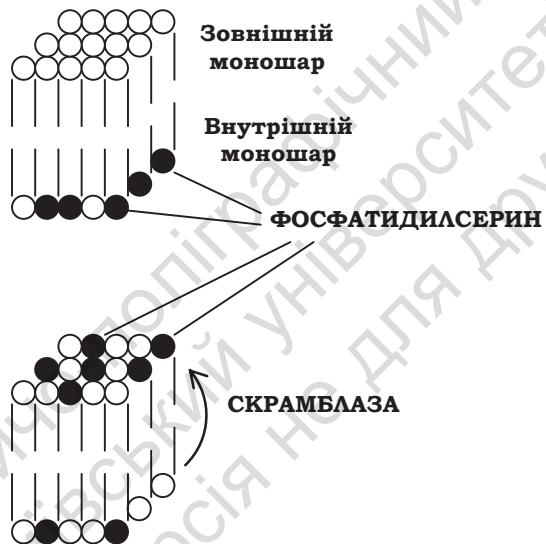


Рис. 3.65. Інверсія мембраних фосфоліпідів за участю скрамблази

2. Ще одним із ранніх мембраних проявів апоптозу є **специфічна перебудова вуглеводних компонентів мембрани** з утратою сіалових кислот, зовнішньою експресією цукрів і зниженням загального від'ємного потенціалу зовнішньої поверхні мембрани. Утрата термінальних сіалових кислот із бічних ланцюгів мембраних глікопротеїнів приводить до того, що екроновані у звичайних умовах N-ацетилглюкозамін, N-ацетилгалактозамін, β -D-галактоза, хітобіозамін, α -D-маноза набувають можливості взаємодіяти з лектинами макрофагів (лектини – це білки, здатні

зворотно специфічно зв'язувати вуглеводну частину глікокон'югатів без руйнування ковалентної структури вуглеводних глікозильованих лігандів). Ці глікопротеїни плазматичної мембрани апоптозних клітин також використовуються як маркери, за якими їх розпізнають специфічні та неспецифічні фагоцити.

3. Наступний тип розпізнання апоптозних клітин відбувається за допомогою **макрофагального аγ_Bβ₃ інтегринового рецептора** та специфічних глікопротеїнів, які з'являються на поверхні клітин, що гинуть. Ці глікопротеїни виконують роль рецептора для зв'язування *тромбоспондину* – адгезивної молекули, що синтезується макрофагами та виштовхується в мікрооточенні. Він функціонує, виконуючи роль молекулярного кріплення між апоптозною клітиною і макрофагом. Суттєву роль у цьому процесі відіграє мембраний мономер CD36.

Таким чином, для розпізнання апоптозних клітин макрофагом за будь-яким механізмом необхідна взаємодія "маркерів" і *рецепторів*, причому останні виконують функцію "*tether and tickle*," ("зв'яжи та впіймай" – за В. Фадоком і П. Хенсоном).

Макрофаги експресують численні *рецептори* для патоген-асоційованих молекулярних шляхів (*pathogen associated molecular pathways (PAMPs)*), наприклад ліппополісахаридні (LPS) та манозні. Вони здатні розпізнавати і фагоцитувати різні види патогенів з наступною генерацією запалення внаслідок поширення інфекції. Багато із цих *рецепторів* можуть включатися в розпізнання апоптозних клітин. Макрофагальними *рецепторами* – кандидатами на участь у фагоцитозі апоптозних клітин є насамперед **рецептори поглинання** (*scavenger receptors (SRs)* – CD36, CD14) та специфічний **макрофагальний фосфатидилсериновий рецептор** (*macrophage PS receptor*).

Рецептори поглинання – це структурно різноманітна родина *рецепторів* із широкою лігандною специфічністю, має шість підкласів, з яких у захопленні апоптозних клітин найголовнішу роль відіграють декілька представників. Мономер **CD36** (клас В, синонім: *TSP1-рецептор, рецептор для тромбоспондину*) розпізнає велику кількість лігандів, включаючи колаген I типу, тромбоспондин, фосфатидилсерин, (А. Ріготті, 1995). Виявлено, що білок плазми тромбоспондин-1 (TSP1) діє, зв'язуючи апопто-

зні клітини з рецептором CD36 та вітронектиновим рецептором ($\alpha_v\beta_3$ integrin) (Дж. Севілл, 1992). Антитіла до $\alpha_v\beta_3$ та TSP1 інгібують таке сполучення. У нематоди гени *ced-1*, *ced-6* і *ced-7* кодують білок, подібний до рецепторів поглинання людини (*scavenger receptor-like protein* (Х. Хорвітц та ін., 2001)), а функцію макрофагів виконують клітини-сусіди.

Інший рецептор – **CD14** – мембраний глікопротеїн, присутній на поверхні макрофагів ссавців, і може генерувати як запалення, так і антизапальну відповідь після взаємодії з чужорідними LPS або своїми власними апоптозними клітинами відповідно. Цей мультифункціональний рецептор може зв'язувати як залишки фосфатидилсерину, так й іншу сполуку – β_2 -глікопротеїн сироватки крові, що сам специфічно поєднується із фосфатидилсерином.

До розпізнання фосфатидилсерину в зовнішньому монощарі плазматичної мембрани апоптозних клітин також причетні **спеціфічний макрофагальний рецептор для фосфатидилсерину (macrophage PS receptor)**, **CD68** і **фактор росту епідермальних клітин-8 із жирових глобул молока (milk fat globule-EGF-factor 8 (MFG-E8))** (Р. Ханайама, 2002)). Останній постійно виділяють макрофаги. Цей глікопротеїн специфічно зв'язується з фосфатидилсерином на поверхні клітин, що встали на шлях апоптозу. Утворені комплекси фосфатидилсерину та MFG-E8 і служать тими маркерами, за якими розпізнають апоптозні клітини макрофаги. Цей білок також можуть розпізнавати й інтегрини, зокрема $\alpha_v\beta_3$ -інтегрин.

У фагоцитозі апоптозних клітин можуть брати участь не лише макрофаги, але й деякі інші клітини, для яких фагоцитоз є додатковою функцією (напр., інтеркаллярні клітини гломерул при гломерулонефриті, клітини Сертолі у щура). Використання процесів розпізнання апоптозних клітин макрофагами та іншими клітинами є потенційними напрямками щодо виявлення і виділення апоптозних клітин (розд. 6).

Наступні два етапи процесу фагоцитозу апоптозної клітини – поглинання та процесинг – вивчені недостатньо. Зв'язування маркера фагоцитозу з його рецептором індукує сигнал трансдукції, що спричиняє поглинання апоптозної клітини фагоцитом. Усередині макрофага існують так звані **Toll-подібні рецептори (Toll-like receptors)**.

like receptors), які регулюють взаємодію між фагосомами і лізо-сомами, забезпечуючи активне знищення захоплених клітин (*grab and stab: викрасти та пошкодити* (М. Хенгартнер)).

Нешодавно з'явилися дані про існування адгезивних молекул іншого типу (С. Браун та ін., 2002), які забезпечують упізнавання фагоцитами не сигналу *eat-me*, а *leave-me-alone* ("залиши мене") – маркера, що присутній на клітинах, які не гинуть. Є вказівки на те, що внутрішньоклітинна сигналізація, яку запускає жива клітина-мішень, включає фосфорилювання за тирозином CD31-рецептора (Д. Джексон та ін., 1997, Н. Пампрей та ін., 1999), що дає "інструкцію" фагоциту на звільнення живої клітини.

4. ПАТОЛОГІЧНІ АСПЕКТИ АПОПТОЗУ

В основі великої групи захворювань (злоякісні новоутворення, автоімунні хвороби, вірусні інфекції, різні дегенеративні процеси) лежить порушення балансу між проліферацією і загибеллю клітин. Крім того, існують патологічні стани (хвороби Альцгеймера і Паркінсона, латеральний склероз, спінальна м'язова дистрофія та ін.), за яких клітини характеризуються підвищеною чутливістю до індукції апоптозу, що призводить до надлишкової неконтрольованої загибелі (табл. 4.1).

Таблиця 4.1. Найяскравіші приклади захворювань, пов'язаних з активацією або пригніченням процесів апоптозу (пояснення в тексті)

Захворювання, пов'язані з активацією процесів апоптозу		Захворювання, пов'язані з пригніченням процесів апоптозу	
1	СНІД	1	Онкологічні захворювання різних органів і тканин – як пухлиногенез, так і резистентність до антиракової терапії
2	Нейродегенеративні захворювання: <ul style="list-style-type: none">◆ хвороба Альцгеймера;◆ хвороба Паркінсона;◆ аміотрофічний бічний склероз;◆ спінальна м'язова атрофія;◆ хорея Гентінгтона;◆ діабетичні нейропатії;◆ травматичні ушкодження головного й спинного мозку;◆ синдром раптової дитячої смерті	2	Автоімунні лімфопроліферативні розлади: <ul style="list-style-type: none">◆ системний червоний вовчак;◆ ревматоїдний артрит;◆ гломерулонефрит

Продовження табл. 4.1.

Захворювання, пов'язані з активацією процесів апоптозу		Захворювання, пов'язані з пригніченням процесів апоптозу	
3	Аплазії: <ul style="list-style-type: none">♦ тотальна лімфопенія;♦ апластична анемія;♦ анемії при дефіциті фолатів, заліза, вітаміну В12;♦ тромбоцитопенія;♦ нейропенія	3	Вірусні інфекції , викликані онковірусами: <ul style="list-style-type: none">♦ вірус Епштейна – Барра;♦ цитомегаловірус;♦ вірус герпесу;♦ вірус папіломи людини;♦ папо- та аденоіруси
4	Уроджені дефекти – "мінус-тканини" ("вовча пастка", "заяча губа")	4	Алергічні захворювання: <ul style="list-style-type: none">♦ бронхіальна астма;♦ атопічний дерматит
5	Токсичні захворювання печінки: <ul style="list-style-type: none">♦ гострі та хронічні вірусні гепатити;♦ алкогольні ураження;♦ первинний біліарний цироз;♦ атрофія печінки		
6	Відторгнення трансплантованої печінки		
7	Виразкова хвороба шлунка		
8	Серцево-судинні захворювання: <ul style="list-style-type: none">♦ гостра ішемія /реперфузія;♦ ішемічна хвороба серця;♦ інфаркт міокарда;♦ атеросклероз;♦ аритмії;♦ раптова коронарна загибель;♦ артеріальна гіпертензія		
9	Офтальмологічні розлади: <ul style="list-style-type: none">♦ ішемічні стани ока;♦ абіотрофій;♦ катаракта;♦ глаукома;♦ діабетична ретинопатія		
10	Розлади м'язової системи: <ul style="list-style-type: none">♦ спінальна м'язова дистрофія		

Закінчення табл. 4.1.

Захворювання, пов'язані з активацією процесів апоптозу		Захворювання, пов'язані з пригніченням процесів апоптозу
11	Захворювання кісток: ◆ остеопороз	
12	Захворювання нирок: ◆ гломерулосклероз; ◆ нефрити й нефропатії різного походження; ◆ полікістоз нирок; ◆ гостра ниркова недостатність	
13	Захворювання легень: ◆ гостре ушкодження легень (у тому числі й процеси відновлення); ◆ гіпероксія; ◆ пульмонарний фіброз	
14	Низка інфекційних захворювань: ◆ стафілококи; ◆ кишкові мікроорганізми; ◆ деякі віруси (гепатити А, В, С, ВІЛ тощо)	

4.1. РОЛЬ АПОПТОЗУ В РОЗВИТКУ ЗЛОЯКІСНИХ НОВОУТВОРЕНЬ

Онкологічні захворювання пов'язані з неконтрольованим зростанням клітинної проліферації.

Порушення процесів апоптозу є важливим етапом як у патогенезі новоутворень, так і в імовірності до антineопластичної терапії (розд. 6). Регуляція цього типу клітинної загибелі здійснюється завдяки функціонуванню численних онкогенів та антіонкогенів, або супресорів пухлин (підрозд. 3.2.4). Перші за певних умов здатні запускати проліферацію клітин або блокувати клітинну загибель, завдяки односпрямованій дії вони ініціюють неопластичне переродження тканини.

З мутаціями гена *p53* та його регуляторів (напр., білка Mdm 2, підрозд. 3.2.3) пов'язано 55–70 % випадків раку різного типу у людини (рис. 4.1). У відповідь на пошкодження ДНК, які не піддаються репарації, білок *p53* індукує зупинку клітинного циклу і викликає апоптоз, завдяки чому відбувається видалення клітин з ураженнями генетичного апарату, спонтанними чи індукованими.

КІЛЬКІСТЬ ВИПАДКІВ (x 1000) ІЗ МУТАЦІЯМИ *p53*



Рис. 4.1. Статистичні дані щодо ролі мутацій гена *p53* в розвитку різних типів пухлин

У *p53*-дефіцитних клітинах зупинки клітинного циклу не відбувається, вони втрачають здатність реалізувати процес програмованої загибелі. Замість утрати кількості аномальних клітин збільшується, що насамперед призводить до метастазування пухлин (рис. 4.2).

Крім того, саме мутаціями в гені *p53* і частково гіперекспресією антиапоптозних генів родини *bcl-2* (підрозд. 3.2.2) поясню-

ється формування лікарської резистентності пухлинних клітин до тих лікувальних впливів, дія яких базується на індукції апоптозу (хемо- та радіотерапії) (розд. 5).

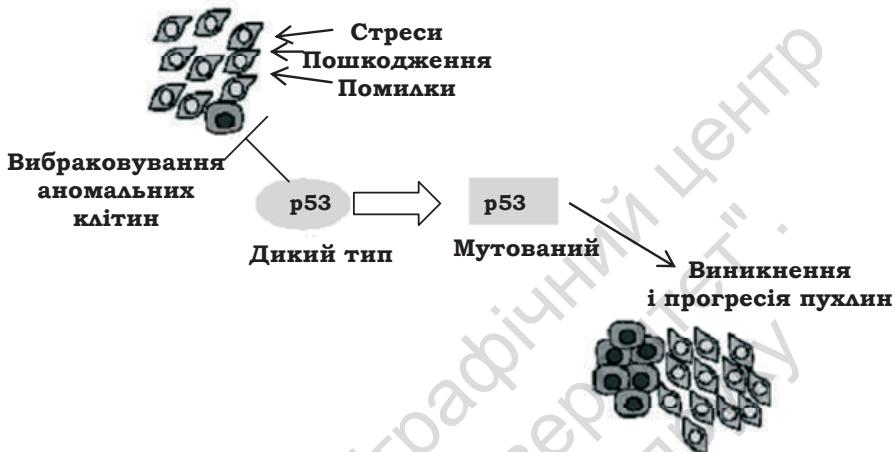


Рис. 4.2. Схема участі мутованого гена p53 в пухлиногенезі

На відміну від інших пухлинних супресорів, для яких характерні мутації, що подавляють синтез білка – делеції, утворення стоп-кодонів, зсув кодуючої рамки, порушення сплайсингу мРНК, 90 % мутацій p53 є місенс-мутаціями, що спричиняють заміну однієї з амінокислот у білковій молекулі на іншу. Крім того, мутації p53 найчастіше пошкоджують лише один із двох алелей гена (тобто є гетерозиготними). Мутації виявляють у різних ділянках молекули ДНК, найчастіше в тій, що кодує еволюційно консервативний ДНК-зв'язувальний домен білка p53, в його кодонах 175, 245, 248, 249, 273, 282 (т. зв. "гарячі точки"). Імовірність виникнення мутації в тій чи іншій ділянці ДНК залежить, зокрема, від локації пухлини та (або) етіологічного чинника. Наприклад, мутації в кодоні 175 не зустрічаються в пухлинах легень, для яких більш характерні зміни в кодоні 145; мутації в кодоні 249 виявляють головним чином у гепатокарциномах, спричинених специфічним канцерогеном афлатоксином В.

Біохімічні механізми апоптозу

Мутації одного з алелів гена *p53*, які відбулися в статевій клітині (т. зв. гермінальні мутації) викликають спадковий синдром Лі-Фраумені, який передбачає вроджену склонність до розвитку різноманітних новоутворень – сарком, раку молочної залози, лімфолейкозів.

Важлива роль у процесах злоякісного переродження тканин належить *транслокації гена bcl-2 між 14-ю та 18-ю хромосомами*. Така мутація призводить до аномальної експресії антиапоптозного гена *bcl-2* і сприяє появі стійкості до хемотерапії та погіршенню прогнозу захворювання. Подібну мутацію найчастіше виявляють у хворих на В-клітинну не-Ходжкінську лімфому (85 % при фолікулярній лімфомі, 20 % – при дифузній В-клітинній лімфомі).

Деякі дані про участь в онкогенезі інших найважливіших регуляторів апоптозу наведено в табл. 4.2.

Таблиця 4.2. Найважливіші порушення функції регуляторів апоптозу в розвитку онкологічних захворювань

Регулятор	Тип порушення	Тип пухлини	Вплив на хеморезистентність
Проапоптозні агенти:			
p53	Мутація	Численні типи раку	Стійкість
Fas-рецептор	Мутація або зниження експресії	Лімфоми; деякі інші типи раку	Зниження
Bax та Bak	Мутації чи інгібування експресії	Численні типи раку	Стійкість
Araf-1	Мутація або порушення транскрипції	Меланома, лейкемія	Зниження
Рецептор TRAIL	Мутація	Рак молочної залози	Зниження
Каспаза-8	Пригнічення експресії	Нейро-blastоми	Зниження

Закінчення табл. 4.2.

Регулятор	Тип порушення	Тип пухлини	Вплив на хеморезистентність
Антиапоптозні агенти:			
Bcl-2	Надекспресія	Численні типи раку	Стійкість
Myc	Порушення експресії	Численні типи раку	Стимулює проліферацію в присутності Bcl-2
Ras	Мутація	Численні типи раку	Зниження
IAP	Надекспресія	Численні типи раку	Стійкість
FLIP	Надекспресія	Деякі типи раку	Зниження
NF-кВ	Порушення регуляції	Численні типи раку	Стійкість
Mdm-2	Надекспресія	Деякі типи раку	Стійкість

4.2. АВТОІМУННІ ЛІМФОПРОЛІФЕРАТИВНІ РОЗЛАДИ

Лімфопроліферативні захворювання – це група захворювань, морфологічним субстратом яких є клітини лімфоїдної природи. Серед цієї групи виділяють лейкози – ці лімфопроліферативні захворювання первинно виникають у межах кісткового мозку (напр., хронічний лімфолейкоз). Якщо ж пухлина виникає в лімфоїдній тканині, яка розташована поза кістковим мозком (у лімфатичних вузлах), таку патологію класифікують як лімфому. При розвитку лімфоми з лімфоїдної тканини будь-якого органа (печінки, товстого кишечника, головного мозку) до терміна лімфома додають назву органа, з лімфоїдної тканини якого зазначена пухлина походить, наприклад лімфома головного мозку. За євро-

американською класифікацією лімфопроліферативні захворювання відповідно до морфологічних, імунофенотипових і молекулярно-генетичних ознак поділяються на три класи: Т-клітинні пухлини, В-клітинні пухлини та лімфогранулематоз, або хвороба Ходжкіна, кожен з яких, у свою чергу, поділяється на підкласи. У появі й розвитку цих злоякісних перероджень лімфатичної системи, як і в інших типах онкологічних зрушень, передбачається участь процесів апоптозу, які відбуваються за принципом, описаним у попередньому розділі. Поточний розділ присвячено проблемі автоімунних розладів з ознаками лімфопроліферації.

Автоімунні захворювання (від грец. *autos* – сам і лат. *immunis* – звільнення від будь-чого) – захворювання, в основі яких лежать реакції імунітету, спрямовані проти власних органів і тканин організму. На наш час відомо близько 80 різних розладів з автоімунними ознаками, які часто виникають у молодому віці (напр., юнацький діабет, при якому руйнуються бета-клітини підшлункової залози, що продукують інсулін); усі вони спричиняють тяжкі страждання, зниження фізичних здібностей, деякі з них можуть мати летальні наслідки. За механізмами виникнення такі стани можуть бути дуже різними. Такі захворювання, як енцефаломіеліт, ендофталміт, асперматогенез розвиваються через порушення судинно-тканинного бар'єра і звільнення фізіологічно ізольованих у нормі антигенів: тканин мозку, кришталіка, сперматозоїдів відповідно у кров. Оскільки організм не має толерантності (тобто стійкості) до цих антигенів, він буде відповідати на них автоімунною реакцією з утворенням автоімунних (або самореагуючих) лімфоцитів та автоантитіл. Друга група захворювань спричиняється власними тканинними компонентами організму, які змінюються під впливом фізичних, хімічних, вірусних, бактеріальних та інших факторів. Зазначені власні компоненти так змінюють свої властивості, що стають схожі на чужорідні. За таким типом розвиваються деякі автоімунні захворювання крові та центральної нервової системи. Третя група автоімунних розладів об'єднує захворювання, які розвиваються через схожість власних компонентів тканини з екзоантигенами. І, нарешті, в основі четвертої групи захворювань лежить порушення функції самої лімфоїдної тканини та

поява клітин, які руйнують власні тканини організму, наприклад системний червоний вовчак та ревматоїдний артрит. Розвиток станів, що належать до останньої групи, безпосередньо пов'язаний з порушенням реалізації програми апоптозу самореактивних лімфоцитів і з розвитком лімфопроліферації, тобто надлишкової появи лімфоїдних клітин [16].

Самореактивні лімфоцити в нормі завжди присутні в крові, але їхній відсоток дуже низький, оскільки майже одразу після їхньої появи вони підлягають знищенню (т. зв. *негативна селекція лімфоцитів*) шляхом апоптозу.

За сучасними даними, в основі патогенезу автоімунних лімфопроліферативних розладів лежить порушення видалення периферійних (тих, що циркулюють із кров'ю) самореактивних Т- та (або) В-лімфоцитів завдяки послабленню процесів Fas-R-опосередкованого апоптозу (підрозд. 3.3). Якщо потенційно автоагресивні лімфоцити стають активними і не видаляються або не знешкоджуються своєчасно, вони підвищують імовірність виникнення автоімунної реакції.

Асоціацію дефектів у Fas-R/ Fas-L-системі з продукцією автоантитіл виявляють, вивчають і на тваринних моделях. Зокрема, lpr-миші (від *lymphoproliferative* – лімфопроліферативний) та gld-миші (від *generalized lymphoproliferative disease* – генералізоване лімфопроліферативне захворювання) мають мутації відповідно в гені Fas-рецептора та Fas-ліганду.

Для автоімунних лімфопроліферативних синдромів (АЛПС) характерні різноманітні домінантні негативні й рецесивні мутації *Fas-рецептора*, які запобігають передачі апоптозного сигналу. Зокрема, коли внаслідок такої мутації відбуваються зміни в позаклітинній, ліганд-зв'язувальній ділянці рецептора або у внутрішньоклітинній його частині, що містить домен загибелі, говорять про АЛПС типу Ia. Мутації гена *Fas-ліганду* відбуваються рідко і спричиняють генералізований лімфопроліферативний розлад (АЛПС типу Ib). Обидві мутації приводять до різкого збільшення популяції самореактивних Т-лімфоцитів у селезінці та лімфатичних вузлах, унаслідок чого розвивається спленомегалія (збільшення розмірів селезінки) та непухлинна лімфаденопатія (потовщення лімфатичних вузлів), а при патології

В-системи – до автоімунного вовчакового синдрому. Останні спостереження виявили, що при системному червоному вовчаку не відбувається мутації Fas-рецептора та Fas-ліганду, проте клітинами посилено виробляється розчинна форма Fas-R, накопичення якої в мікрооточенні лімфоцитів запобігає реалізації Fas-R-залежного апоптозу. При цьому для включення процесу загибелі клітин необхідна присутність більшої кількості клітин-індукторів (приблизно на два порядки).

Детальний аналіз стану Fas-R-асоційованого комплексу DISC (підрозд. 3.3) виявив ще одну причину розвитку АЛПС, який у цьому випадку класифікували як АЛПС типу II: це мутації в молекулах адаптерних білків, що можуть входити до цього комплексу (зокрема FADD), або мутації ініціаторної каспази-8, які також запобігають реалізації програми Fas-R-залежного апоптозу.

Цікаво, що розвиток АЛПС асоціюється з підвищеною ймовірністю (на 20–30 %) виникнення пухлин, зокрема лімфом та інших гематологічних і негематологічних видів раку, у патогенезі яких першочергову роль відіграє порушення Fas-R-опосередкованих шляхів апоптозу (напр., хвороба Ходжкіна, гостра лімфобластична лейкемія дітей, рак простати тощо).

4.3. СЕРЦЕВО-СУДИННІ ЗАХВОРЮВАННЯ

Ознаки апоптозу виявляються при різноманітних формах серцево-судинних патологій: дисфункції ендотелія, наднапруzi судинної стінки, ішемічних і реперфузійних її порушеннях, атеросклеротичних змінах, інфаркті міокарда, ішемічному інсульті та ін. Оскільки апоптоз бере участь у постнатальному морфогенезі провідної системи серця – синусного та атріовентрикулярного вузлів, пучка Гіса – цей тип загибелі причетний до розвитку аритмій і порушення провідності. Апоптозна загиbel' пейсмекерних клітин може відігравати суттєву роль у виникненні раптової коронарної загибелі. Ознаки апоптозу спостерігають при ультраструктурних дослідженнях кардіоміоцитів хворих на кардіоміопатії, гіпертрофією серця, хронічну серцеву недостатність (саме апоптозом більшість дослідників пояснює структурну деградацію серця в ре-

зультаті втрати маси кардіоміоцитів при хронічній серцевій недостатності на пізніх етапах її декомпенсації); його участь доведено в патогенезі аритмогенної дисплазії правого шлуночка, відторгнення трансплантанту при аортокоронарному шунтуванні та в експериментальних моделях недостатності лівого шлуночка.

Утрата кардіоміоцитів визначає ступінь порушення скоротливої здатності тих клітин міокарда, які вижили, у результаті активуються компенсаторні механізми, зокрема, розвивається гіпертрофія життєздатних кардіоміоцитів за рахунок збільшення кількості саркомерів у міофібрилах, їхнє потовщення, зростання вмісту і маси мітохондрій. Такий гіпертрофований кардіоміоцит стає більш чутливим до реалізації апоптозної програми, що сприяє подальшій прогресії порушень скоротливої функції серця.

Тригером апоптозу при **інфаркті міокарда** є цитокіні, головним чином TNF α , експресія якого моноцитами і клітинами міокарда значно зростає за наявності тяжких розладів циркуляції крові. В ушкоджених клітинах при цьому виявляють зростання активності каспаз та утворення АФК. Інфаркт міокарда – це захворювання, що розвивається внаслідок обтурації (стискання) просвіту коронарної артерії – судини, через яку здійснюється кровопостачання міокарда. Причинами цієї хвороби можуть стати атеросклероз коронарної артерії (див. далі), її хірургічна обтурація або тромбоемболізація, бактеріальні або токсичні впливи, пухлини. Серед чотирьох стадій інфаркту – ішемії (впливу гіпоксії, див. нижче), пошкодження, некрозу та рубцювання – стадія ішемії безпосередньо пов'язана з процесами апоптозу. Вона є передінфарктним станом і може тривати досить довго, її навіть виділяють як окреме захворювання – ішемічна хвороба серця. Характеристика апоптозних процесів за умов ішемії детально буде розглянута в підрозд. 4.4. Інші стадії інфаркту пов'язані з вичерпанням компенсаторних механізмів, ушкодженням метаболізму та функції міокарда, отже, тут переважають некротичні процеси, особливо на двох останніх етапах.

До ішемичної хвороби серця відносять групу серцево-судинних захворювань, в основі яких є порушення кровообігу в коронарних артеріях (звідси інша назва цієї патології – коронарна хвороба серця). Загострення хвороби проявляється гострим інфарктом мі-

карда або раптовою коронарною загибеллю. Проявами хронічної ішемічної хвороби є стенокардія (нападоподібні болі в серці), аритмії, серцева недостатність, які можуть зустрічатися як окремо, так і співіснувати. Інколи спостерігають і так звану тимчасову ішемію, яка є результатом фізіологічної регуляції кровопостачання і виникає у здорової людини, зокрема при рефлекторному спазмі судини під впливом болю, холоду, гормональних змін тощо.

Найчастіше ішемічна хвороба серця виникає у людей після 30 років, більше хворіють чоловіки. Половина летальних випадків від серцево-судинних захворювань – це наслідок ішемічної хвороби, в якій точно встановлена першочергова роль процесів апоптозу.

Прикладом впливу **гострої ішемії-реперфузії** (від *ischo* – затримувати, *haïma* – кров – порушення кровопостачання будь-якої частини тіла (тканини, органа), напр., нирки, печінки, серця, мозку, унаслідок звуження чи непрохідності судин, по яких здійснюється її кровопостачання) може бути гіпоксія новонароджених, асфіксія тощо. Через деякий час після гострого ішемічного ураження певної тканини (органу) спостерігається покращення її (його) перфузії (*перфузія* – це рух рідини, у даному випадку крові, по судинах через орган чи тканину внаслідок зміни тиску), спричинене масивним поверненням крові в ішемізовану ділянку через реваскуляризовану частину артерії чи колатералі, які включилися в роботу. Останні дослідження поряд з участю процесів апоптозу в патогенезі ішемії (підрозд. 4.4) виявили посилене відмирання клітин у момент поновлення кровопостачання, тобто при реперфузії. Такі дані отримано на культурах клітин не лише серця, але й інших життєво важливих органів, які часто підлягають гіпоксії – нервової системи, нирок тощо. У механізмах, залучених до реалізації апоптозної програми за умов реперфузії, передбачають порушення у функціонуванні мітохондрій. Так, в умовах гіпоксії в мітохондріях змінюються процеси енергоутворення. При раптовій подачі кисню ця органела не встигає "переключитися" на нормальну роботу і починає продукувати надлишок АФК (пероксид водню, супероксид), здатних викликати апоптоз. Зокрема, рівень утворення H_2O_2 зростає майже в 600 разів, при цьому спостерігають зниження активності супероксиддисмутази, каталази, глутатіонпероксидази, утрачається вміст токоферо-

лу, унаслідок чого зростає ПОЛ. Крім того, за умов реперфузії зростає активність NO-сінтази і рівень продукції цитокінів, зокрема TNF α , IL-1, IL-6.

Поширені апоптозна загибель клітин, накопичення ліпідів, колагену, продуктів руйнування клітин, скупчення пінистих клітин (макрофагів, що містять ліпіди), гладком'язових елементів і макрофагів без вмісту ліпідів – основні морфологічні характеристики *аретоми* – атеросклеротичної бляшки, що утворюється в судинній стінці під час іншого захворювання серцево-судинної системи – **атеросклерозу**. Атеросклероз уражує артерії середнього і великого діаметра. Таке ушкодження виникає внаслідок впливу на клітини кровоносних судин – у першу чергу гладком'язові та ендотеліальні – різноманітних агентів (окиснений ліпопротеїн низької густини, окиснені форми холестеролу, високі концентрації NO, активні сполуки кисню, рентгенівське та УФ випромінення, гіпертермія, цитокіни, мікроорганізми), які завдяки здатності спричиняти атеросклероз отримали назву атерогенних.

Утворення аретоми пов'язано з неможливістю виведення та метаболізму її основних ліпідних складових, які створюють так зване ядро бляшки. Воно оточується сполучнотканинною оболонкою, яка є продуктом запалення і містить основну речовину, колагенові волокна, клітинні елементи. Зріла аретома багата на гладком'язові клітини і містить менше фібробластів та імунокомпетентних клітин. На початковому етапі утворення в судині атеросклеротичної бляшки не впливає на діаметр просвіту артерії, що пояснюється існуванням компенсаторного механізму – розширення (ремоделювання) судини. Останній процес здатний забезпечувати стабільність аретоми, уберігаючи її від розриву, але такі стани здатні спровокувати розвиток стенокардії. Згодом бляшка все ж таки звужує просвіт судини та ускладнює рух крові, що сприяє розвитку ішемічних уражень сусідніх тканин (рис. 4.3).

Водночас аретоми з великою ліпідною і тонкою сполучнотканинною частинами навіть за умов ремоделювання судини дуже нестійкі, їхня оболонка легко руйнується, і вміст бляшок звільнюється у просвіт судини (рис. 4.4). Це викликає зупинку руху крові в цій ділянці кровоносної системи, відповідна тканіна (напр., серцевий м'яз або мозок) лишається без кисню і гінє.

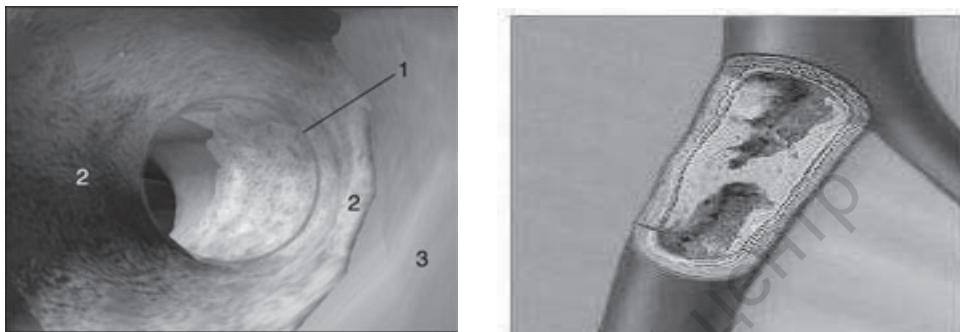


Рис. 4.3. Атеросклеротична бляшка в судині:
1 – просвіт артерії; 2 – атеросклеротична бляшка;
3 – внутрішня стінка артерії

Згідно із сучасними поглядами клітинна загибель шляхом апоптозу відіграє не останню роль у патогенезі атеросклерозу, причому смерті підлягають клітини різноманітних типів. За допомогою сучасних методів виявлення апоптозу (розд. 6), зокрема специфічних тестів на фрагментацію ДНК, показано, що в атеросклеротичній бляшці людини такому типу програмованої загибелі підлягає 10–40 % макрофагів, 10–15 % гладком'язових клітин і дуже невеликий відсоток Т- і В-лімфоцитів. Гладком'язові клітини з ознаками апоптозу локалізуються головним чином у сполучнотканинній частині аретоми, а апоптозні макрофаги – в її ядрі.

Механізм, за яким запускається апоптоз у макрофагах, досі не виявлений; у його запуску в пінистих клітинах – макрофагах, багатих на ліпіди – передбачають участь головного цитотоксичного чинника при атеросклерозі – окисненого ліпопротеїну низької густини (оЛПНГ). Можливо, таким чином на початкових етапах атеросклерозу апоптоз виконує захисну функцію, запобігаючи накопиченню ліпідів у судинній стінці. Але згодом у центральній частині бляшки виявляють значну кількість апоптозних клітин, які неспроможні видалятися і спричиняють ріст цього утворення – у цьому полягає парадоксальність участі апоптозу в розвитку атеросклерозу, адже зазвичай цей тип клітинної загибелі результується у зменшенні популяції клітин.



Tunica media – середній шар стінки кровоносної судини, що містить гладком'язові клітини і позаклітинні колагенові фібрilli

Інтіма – внутрішній шар стінки кровоносної судини з ендотеліальними клітинами

Адвентицій – зовнішній сполучнотканинний шар, що контактує з клітинами

Рис. 4.4. Будова атеросклеротичної бляшки (а) та її руйнування (б)

Нормальна кровоносна судина містить внутрішній шар ендотеліальних клітин (**інтіма**), що контактує з просвітом судини, в якій циркулює кров, середній шар гладком'язових клітин та еластичних фібрил екстрацелюлярного матриксу (**the tunica media**) і зовнішній шар сполучної тканини – **адвентицій** – що контактує з тканинами.

В атеросклеротичній блящці збагачене на холестерол ліпідне ядро формується в межах шару інтіми та інфільтрується різними клітинами – макрофагами, пінистими клітинами, гладком'язовими клітинами, CD4⁺ Т-клітинами (**а**). Якщо аретома руйнується (**б**), тромбогенне ядро ушкодження виходить у кров у просвіт судини, спричиняє адгезію кров'яних пластинок, що ініціює утворення судинного тромбу

Апоптоз гладком'язових клітин регулюється як продуктами специфічних генів (зокрема *c-myc*), так і впливом низки прозапальних цитокінів (напр., TNF α , IL-1, ү-інтерферон), які продукуються клітинами атеросклеротичних бляшок.

Інтенсифікація апоптозу може бути зумовлена також іншими факторами – гіперглікемією, оксидативним стресом, які поряд з оЛПНГ вважаються атерогенними чинниками. У ряді оглядів є вказівки на участь в ініціації апоптозу клітин атеросклеротичної бляшки Fas-R/Fas-L-системи, високих концентрацій NO (низькі дози цього оксиду, що утворюється за участю ендотеліальної NO-сінтази (підрозд. 3.11), зазвичай протекают ендотеліальні клітини судин від апоптозу), активних форм кисню.

У подальшій реалізації апоптозної програми передбачають участь сфінгомієліну та цераміду (підрозд. 3.8), каспаз, інгібування активності транскрипційного фактора NF-kB (підрозд. 3.5).

Таким чином, беручи до уваги важливість апоптозних процесів щодо атерогенезу, можна передбачити ймовірність існування (чи виявлення) фармакотерапевтичних агентів, здатних знищити апоптоз атеросклеротичних бляшок і через це вплинути на ініціювання, прогресію та клінічні прояви атеросклерозу. Такими сполуками можуть стати антиоксиданти (вітаміни С, Е), препарат пробукол (4, 4-(Ізопропілідендітіо)-біс(2, 6-дітрет-бутилфенол)), який гальмує біосинтез холестеролу та зменшує всмоктування холестеролу, що надійшов з їжею, таким чином запобігаючи й утворенню оЛПНГ. Є дані, що фермент каталаза усуває апоптогенний ефект пероксиду водню, а аналоги вітаміну Е протекают судини від атерогенезу та апоптозу. Антиатерогенна дія препаратів іншої групи – статинів ключового ферменту в біосинтезі холестеролу (інгібіторів З гідрокси-3-метилглутарил-КоА редуктази) – зумовлена стабілізацією атеросклеротичних бляшок і зниженням у них процесів апоптозу. Вплив цих препаратів пов'язаний з модуляцією NO-сінтази, впливом на роботу основних сигнальних систем клітини через G-білки [3].

Артеріальна гіпертензія (підвищений артеріальний тиск, гіпертонія) характеризується ознаками компенсаторної гіпертрофії та порушенням насосної функції серця. Запущена гіпертонія – одна з лідуючих причин інфарктів та інсультів. При цьому говорять про так звану патологію "гіпертонічного серця", що супроводжується гіпертрофією лівого шлуночка, яка приводить до ремоделювання міокарда, недостатньої васкуляризації, фіброзу (патологічного розростання волокнистої складової сполучної тканини), зменшення числа функціональних кардіоміоцитів та скоротливої здатності серця в цілому. За всі ці явища відповідають апоптозні процеси, що спровоковані хронічною ішемією та перевантаженням хворого серця.

Фізіологічно активні пептиди (ангіотензин II, ендотелін-1, брадікінін, адреномедулін, натрійуретичний фактор), нейротрофічні ростові поліпептиди (фактор пухлинного росту, фактор росту фібробластів, ендотеліальний фактор росту судин, ряд інших) можуть виконувати функцію як проапоптозних, так і антиапоптозних агентів при кардіоваскулярній патології. Їхнє співвідношення відіграє ключову роль у стадійному формуванні необоротних уражень міоцитів, ендотеліальних і васкулярних клітин і перетворенні патології на глобальний процес. У розвитку апоптозу при захворюваннях серцево-судинної патології відіграють певну роль і специфічні білки клітинної адгезії та мембрanoї взаємодії – інтегрини і селектини.

Деякі сучасні лікарські препарати-кардіопротектори в основі своєї дії мають антиоксидантні властивості. Тому вони можуть вважатися і антиапоптозними агентами, зокрема, при гострому інфаркті міокарда, гострій ішемії-реперфузії, хронічній серцевій недостатності, ішемічній хворобі серця, під час яких спостерігають зростання вмісту вільних радикалів у клітинах. Наприклад, препарат триметазидин здатний знижувати вміст у клітинах АФК та внутрішньоклітинного Ca^{2+} (ще один антиапоптозний ефект), а карведіол унаслідок структурної особливості молекули є уловлювачем вільних радикалів, за свою силу ефективнішим, ніж вітаміни Е та С.

4.4. НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНІ ЗАХВОРЮВАННЯ

Протягом розвитку ЦНС близько 50 % нейронів видаляється внаслідок апоптозу (рис. 4.4, підрозд. 2.2). Дослідження на трансгенних тваринах виявили, що дефіцит проапоптозних білків або надекспресія антиапоптозних факторів спричиняє численні аномалії мозку, зокрема, збільшення числа нейронів і розміру мозку, помилкову структурну організацію різних його відділів. У той же час дефіцит антиапоптозних білків знижує здатність нервових клітин до виживання та (або) посилює їхній апоптоз, викликаючи розвиток нейродегенеративних станів (хвороби Альцгеймера, Паркінсона, хорея Гентінгтона, бічний (латеральний) аміотрофічний склероз, діабетична нейропатія, спінальна м'язова атрофія, ін.), (табл. 4.3). З механізмами апоптозу також пов'язана і втрата нейронів при гострих захворюваннях і пошкодженнях нервової системи (ишемія, травма). Індукторами апоптозної загибелі нейронів можуть виступати глутамат, β -амілоїд, недостатність факторів росту, вільнорадикальні сполуки, гіпо- та гіперглікемія тощо.

Хвороба Альцгеймера ("старече недоумство", деменція) пов'язана з поступовою невпинною прогресивною втратаю пам'яті та інтелектуальних функцій, що корелують із синаптичною дегенерацією та загибеллю нейронів лімбічних структур (гіпокамп, amygdala) і ділянок кори головного мозку (КГМ) аж до повного розпаду інтелекту та психічної діяльності. Ця хвороба уражує від 3 % людей у віці 65 років до 30–35 % – у віці, старшому за 85 років, що становить близько 20 млн людей в усьому світі. Уперше цю хворобу виявив Алоїс Альцгеймер, який в 1907 р. описав стан 56-річної жінки з вираженими порушеннями пам'яті та мовними і зорово-просторовими розладами, що розвинулися поступово, і навів патоморфологічні характеристики хвороби. Назва "хвороба Альцгеймера" була запропонована Е. Креппеліном у 1909 р. До факторів ризику виникнення цієї дегенеративної хвороби відносять черепно-мозкові травми, захворювання щитоподібної залози, народження від матері, старішої за 30 років, низький рівень освіти, крім того, існують її спадкові форми. Цікаво, що ризик захворювання знижений у курців, у людей з активною творчою діяльністю та високим рівнем освіти.

Найхарактернішими патологічними ознаками хвороби Альцгеймера є позаклітинний вміст β -амілоїдних пластинок, утворених агрегацією молекул β -амілоїдного пептиду (рис. 4.5).

Таблиця 4.3. Найважливіші генетичні та набуті модулятори апоптозу за деяких нейродегенеративних розладів

Захворювання	Генетичні фактори	Набуті причини
Хвороба Альцгеймера	Мутації APP*, презеніліну*	Травма голови, низький рівень освіти, надмірне поглинання калорій
Хвороба Паркінсона	Мутації α -синуклеїну*, паркіну*	Травма голови, токсини, поглинання калорій
Хорея Гентінгтона	"Розширення" гена, що кодує білок гентінгтина*, унаслідок збільшення кількості тринуクлеотидних ЦАГ-повторів	—
Аміотрофічний латеральний склероз	Мутації Cu^{2+} , Zn^{2+} -СОД*	Токсини, автоімунна відповідь
Спінальна м'язова атрофія	Мутації SMN*, NAIP*	—
Синдром раптової дитячої смерті	Мутації генів, що кодують цитокіні IL-10, IL-6, VEGF*	— (але є низка фактірів, що збільшують ризик виникнення патології: напр., падіння під час вагітності та лактації, положення, в якому дитина спить тощо)

* Пояснення далі в тексті.

При цьому на відростках нервових клітин утворюються бляшки, які не лише блокують проведення нервових імпульсів, але й спричиняють відмирання цих клітин. β -амілоїд ($A\beta$) – основний компонент цих бляшок – це нерозчинний фрагмент поліпептид-

ного ланцюга із 40–42 амінокислот (М.м. 4 кДа), утворений при протеолітичному процесингу білка-попередника амілоїду (APP – *amyloid precursor protein*) (рис. 4.5, 4.6). Такий процесинг зазвичай відбувається у двох положеннях (рис. 4.5, 4.6). При розщепленні APP у межах послідовності А β (фермент – α -секретаза) із клітинної поверхні в міжклітинний простір звільнюється *секреторна форма APP* (sAPP) (рис. 4.6). Ефекти sAPP опосередковують виживання нейронів – у цьому передбачається передача сигналу через цГМФ і ПкG та участь NF-kB. Звільнення А β пов'язано з функціонуванням двох інших ферментів – β - та γ -секретаз, які розщеплюють APP відповідно по N- та C-кінцю. За певних умов (висока концентрація, оксидативний стрес) утворений β -амілоїд підлягає самоагрегації з утворенням А β -пластиинок.

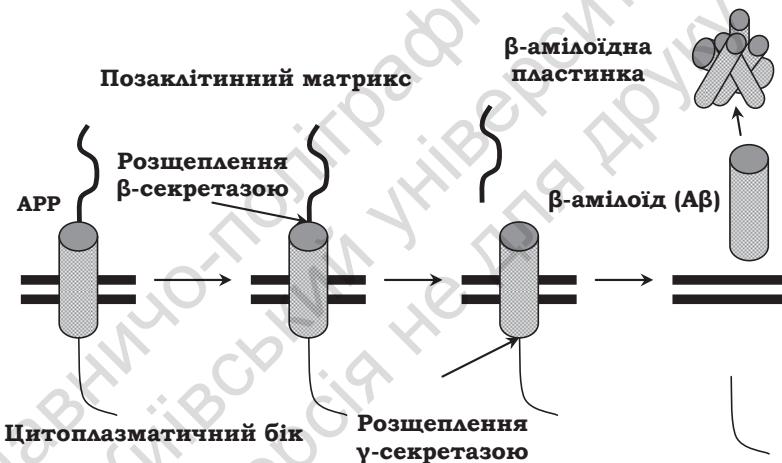


Рис. 4.5. Процесинг білка-попередника амілоїду

Відомості про існування зв'язку між хворобою Альцгеймера та апоптозом з'явилися ще в 1993 р. завдяки працям К. Кетмана і Д. Форлоні, які показали, що А β , який утворюється в мозку хворих людей, викликає загибелъ культутивованих нейронів внаслідок апоптозу [21]. Вплив А β на культуру нейронів спричиняє апоптоз безпосередньо або через зростання оксидативного стресу та пригнічення енергозабезпечення клітини (такі процеси відбуваються в мозку при старінні). Так, А β викликає перекисне окиснення ліпідів (ПОЛ) мем-

бран, що знижує функції мембраних АТФаз, транспортерів глюкози, глутамату і, як наслідок, деполяризацію мембрани, утрату АТФ, різкий вхід Ca^{2+} у клітину та мітохондріальну дисфункцію. Відповідно, антиоксиданти як супресори ПОЛ і лікарські препарати, що стабілізують клітинний Ca^{2+} -гомеостаз, можуть протектувати нейрони від $\text{A}\beta$ -індукованої загибелі. Маркери ПОЛ і змінені рівні антиоксидантних ферментів знайдено і в мозку та цереброспінальній рідині хворих на хворобу Альцгеймера; оральний прийом вітаміну Е, відомого антиоксиданту, гальмує прогресію хвороби. Крім антиоксидантів, у протекції нейронів від загибелі можуть брати участь нейротрофічні фактори та низка цитокінів. До апоптозу, індукованого $\text{A}\beta$, також заличені JNK- та p38^{MAPK}-каскади (підрозд. 3.7).

Існують і спадкові форми хвороби Альцгеймера – імовірність захворювання є вищою для родичів першого коліна і сягає 50 % у похилому віці. Їхньою причиною є мутації одного із трьох генів, що кодують APP (21-ша хромосома) (1), білки презенілін-1 (14-та хромосома) (2) і презенілін-2 (1-ша хромосома) (3). Оскільки ген APP локацізований в 21-й хромосомі, люди із синдромом Дауна, що мають зайву 21-шу хромосому, уражуються хворобою Альцгеймера у відносно молодому віці. Мутації APP викликають зміну протеолітичного процесингу попередника амілоїду, унаслідок якої зростає рівень утворення $\text{A}\beta$. Презенілін-1 (PS-1) – інтегральний мембраний білок, що локацізований в основному в ЕПР. Він є регулятором активності γ -секретази, у результаті чого його мутації впливають на процесинг APP через модуляцію ферментативної секреції. Мутації PS-1 також змінюють Ca^{2+} -гомеостаз в ЕПР, що спричиняє вихід Ca^{2+} через ріанодинові та інозитол-1,4,5-трифосфатні рецептори цієї органели (рис. 4.6). Таке внутрішньоклітинне зростання Ca^{2+} підвищує чутливість нейронів до апоптозу та змінює процесинг APP в напрямку, який забезпечує утворення надлишку $\text{A}\beta$. Індукція апоптозу, спричинена мутаціями PS-1, може бути блокована застосуванням агентів, які запобігають оксидативному стресу, зростанню внутрішньоклітинного Ca^{2+} , що передбачає включення PS-1 в індукцію апоптозу через оксидативний стрес, зміну Ca^{2+} -гомеостазу та мітохондріальну дисфункцію. Мутації PS-2 мають аналогічні впливи на утворення $\text{A}\beta$, проте механізми такого ефекту ще не розшифровані.

Біохімічні механізми апоптозу

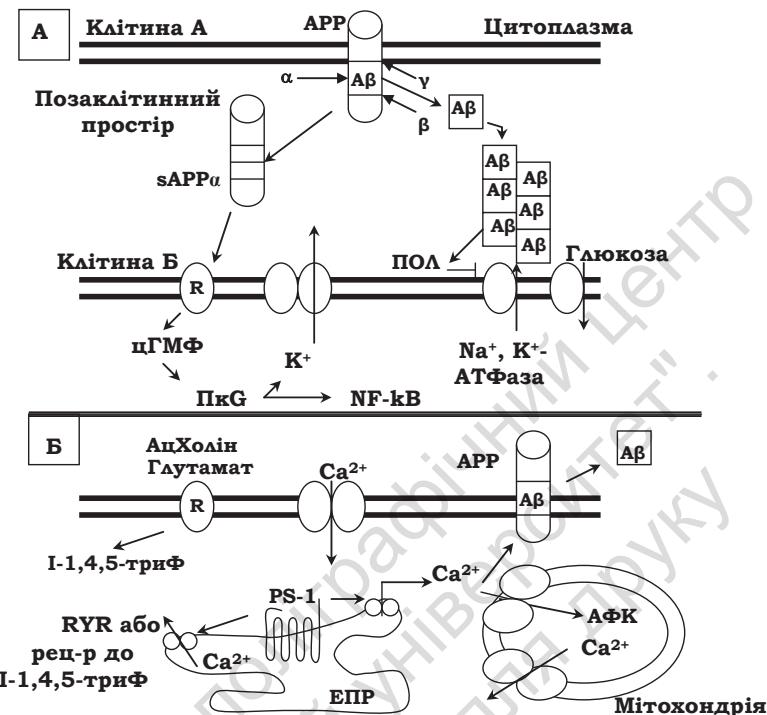


Рис. 4.6. Механізми проапоптозної активності "аномального" процесингу APP та мутацій презеніліну-1

А – α -секретаза розщеплює APP з утворенням sAPP, який секретується в позаклітинне середовище. sAPP активує мембраний рецептор R, унаслідок чого дія sAPP опосередковується цГМФ і ПкG, функціонування останньої сприяє відкриттю K^+ -каналів, що спричиняє гіперполаризацію плазматичної мембрани, а також активацію ядерного фактора NF-кВ (підрозд. 4.5), який опосередковує виживання нейронів. При розщепленні APP β - та γ -секретазами одночасно із клітини звільнюється β -амілоїд ($\text{A}\beta$). За певних умов (висока концентрація, оксидативний стрес) $\text{A}\beta$ здатний до самоагрегації з утворенням β -амілоїдних пластиинок. При цьому $\text{A}\beta$ індукує ПОЛ у плазматичній мембрani, що порушує функціонування мембраних АТФаз (K^+ , Na^+ -помп) і транспортерів глюкози, що, у свою чергу, збільшує чутливість нейронів до індукторів апоптозу.

Б – Презенілін-1 (PS-1) – інтегральний мембраний білок, локацізований головним чином в ЕПР. Мутації відповідного гена змінюють Ca^{2+} -гомеостаз в ЕПР, що результатується в посиленому виході Ca^{2+} із ЕПР через ріанодінові (RYR) та інозитол-1,4,5-трифосфатні (Ins(1,4,5)P₃) рецептори. Зростання вмісту Ca^{2+} всередині клітини посилює чутливість клітин до тригерів апоптозу і сприяє більш потужному процесингу APP в напрямку утворення $\text{A}\beta$.

Унаслідок існування чіткого зв'язку між апоптозом і розвитком хвороби Альцгеймера потенційний терапевтичний ефект можуть виявляти препарати, що впливають на основні функціональні ланки апоптозу. Прикладом може бути антиапоптозна дія естрогенів – вони стимулюють синтез білка-супресора апоптозу Bcl-x_L й інгібують внутрішньоклітинний протеоліз каспазами і проявляють антиамілодіну дію в культурі клітин гіпокампу. Потенційною мішенню ще одного напрямку терапевтичних впливів при хворобі Альцгеймера є використання блокаторів РТР (підрозд. 3.4), які запобігають відкриттю мітохондріальної пори і вивільненню проапоптозних факторів. Цей напрямок є особливо важливим, оскільки з віком спостерігається зниження порога для Ca²⁺-індукованого відкриття пори в мітохондріях клітин мозку.

Хворобу Паркінсона було вперше описано англійським лікарем Джеймсом Паркінсоном у 1817 р. в "Ессе про тремтливий параліч", в якому він узагальнив результати спостереження за шістьма пацієнтами. Дж. Паркінсон описував цю хворобу як "тремтливий параліч", що мав такі характерні симптоми: "мімовільні тремтливі рухи, послаблення м'язової сили, обмеження активності рухів, тулууб хворого нахиленій уперед, ходіння переходить у біг; при цьому чутливість та інтелект хворого зберігаються". За даними ООН, на паркінсонізм страждають близько 4 млн землян, а до 2040 р. внаслідок старіння населення Землі ці цифри можуть збільшитися вдвічі. Середній вік початку захворювання – 55 років, але в 10 % хворих патологічний стан проявляється вже до 40.

На наш час відомо, що хвороба характеризується прогресуючою втратою нейронів чорної субстанції. Ця частина середнього мозку містить *дофамін-продукуючі нейрони*, аксони яких інервують смугасте тіло – хвостате ядро і шкарапалупу – і контролюють рухи тіла. І чорна субстанція, і смугасте тіло є компонентами базальних гангліїв (рис. 4.7) – складних структур у глибині головного мозку, що відповідають за координацію та тонку регуляцію рухів.

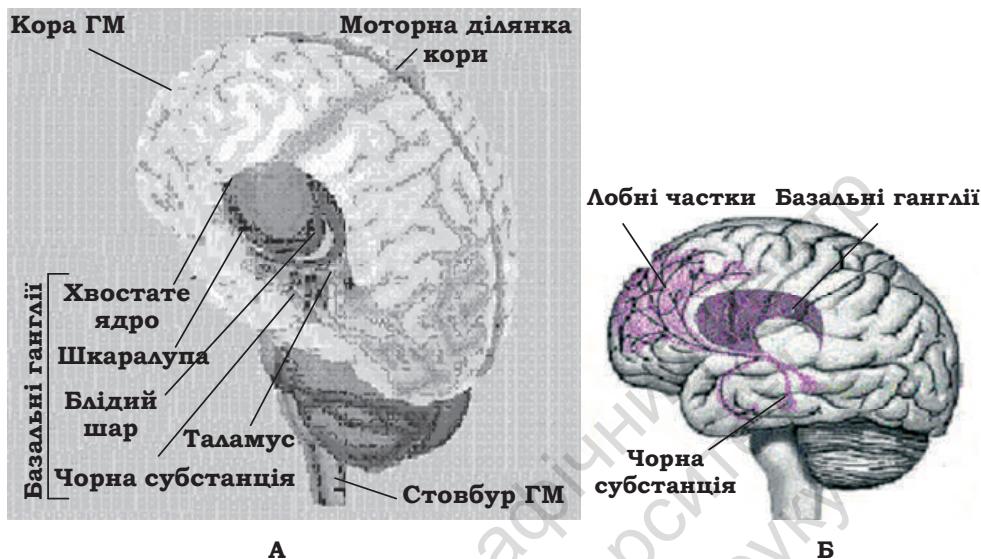


Рис. 4.7. Мозковий контроль моторної діяльності, порушення якого включається в патогенез хвороби Паркінсона

А – основні структури головного мозку, причетні до виникнення ХП.
Б – Шляхи розподілу дофаміну (виділено кольором): синтезуючись у чорній субстанції, цей неромедіатор розподіляється по нервових структурах, що регулюють рухливу активність.

Дефіцит дофаміну в базальних гангліях спричиняє тремор і ригідність – характерні симптоми хвороби Паркінсона.

На самому початку хвороби, коли кількість утрачених дофамінергічних нейронів невелика, мозок працює нормально, але з руйнуванням 50–80 % цих клітин взаємокомпенсація нейронів унеможливлюється. Тоді структури, що відповідають за рухи – таламус, базальні ганглії, кора головного мозку – перестають працювати як єдина система, і рухи стають неконтрольованими.

При цьому більше всього страждають клітини чорної субстанції, що відповідають за довільні рухи.

У нормі дофамін виробляється та накопичується у везикулах пресинаптичного нейрона, а надалі під впливом нервового імпульсу звільнюється в синаптичну щілину (рис. 4.8). У щілині він зв'язується з дофаміновими рецепторами постсинаптичної мембрани нейрона, завдяки чому здійснюється подальше проведення нерво-

вого імпульсу через постсинаптичний нейрон. Утрата дофамінергічних нейронів чорної субстанції викликає дисбаланс гальмівних (дофамінових) і збуджувальних (ацетилхолінових) нейротрансмітерів, що спричиняє клінічні симптоми хвороби Паркінсона.

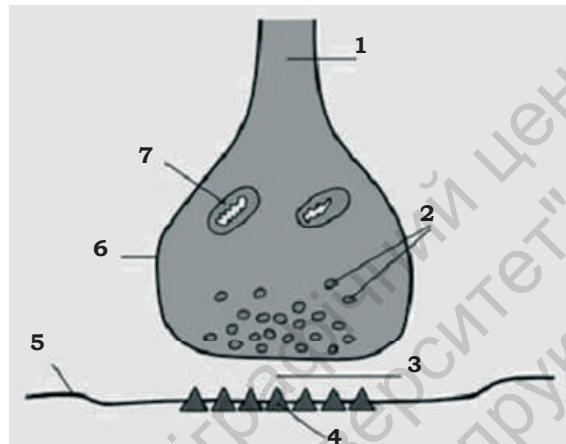


Рис. 4.8. Будова міжнейронального синапсу:

- 1 – нервове волокно (аксон); 2 – синаптичні пухирці;
- 3 – синаптична щілина; 4 – хеморецептори постсинаптичної мембрани;
- 5 – постсинаптична мембрана; 6 – синаптична бляшка; 7 – мітохондрія

Більшість випадків захворювання є вікозалежні та спорадичні, лише близько 5 % припадає на спадкові. В останньому випадку причиною розладів є мутації генів *α-синукліну*, *паркіну* та *убіквітин-С-термінальної гідролази*. Щодо неспадкових варіантів хвороби Паркінсона, то тут патогенними факторами стають травма голови, токсини, надмірне поглинання калорій, а центральними явищами – посиленій оксидативний стрес і мітохондріальна дисфункція. Свій внесок у розвиток захворювання можуть зробити впливи на ЦНС экзотоксинів (цианіди, гербіциди, пестициди, препарати ртутної, нафтової промисловості та ін.), інфекційних агентів (через енцефаліти, викликані вірусами грипу, кору, вітряної віспи, стафілококами тощо). Паркінсонізм може розвинутися внаслідок вживання нейролептиків, які впивають на дофамінові системи. За останній час збільшується кількість хворих на цю патологію серед людей, що вживають наркотичні речовини.

Аналіз тканин пацієнтів, хворих на паркінсонізм, виявляє в дофамінових нейронах, які підлягають загибелі, пошкодження ДНК, характерні для апоптозу, активацію каспази-3, -8, -9. У той же час тут є певні ускладнення щодо виявлення апоптозу: захворювання дуже повільно прогресує, загибель нейронів також відбувається повільно, і тому кількість нейронів, що гинуть за типом апоптозу, у чорній субстанції є малою і становить близько 2–10 % порівняно з 0,2 % для здорової людини того ж віку.

Мутований α -синуклеїн є компонентом *тілцець Леві* – еозинофільних цитоплазматичних нейрональних включень, що вперше були виявлені німецьким неврологом Фредериком Леві в 1912 р. Ці білкові утворення всередині нейронів у нормі відсутні – їхнє утворення характерне для хвороби Паркінсона і пов'язано або з аномальною продукцією α -синуклеїну, або з порушенням його переробки шляхом убіквітинації (підрозд. 3.5), що також спричиняє накопичення цього білка в нейронах (рис. 4.9).

Раніше вважалося, що саме тільцець Леві спричиняє загибель клітин головного мозку; згідно з однією із сучасних гіпотез (Вальтер Шульц-Шеффер, Михаель Крамер) їхнє утворення – це намагання нейронів звільнитися від "неправильного" білка α -синуклеїну. α -синуклеїн – це невеликий білок, що складається із 144 амінокислот. У нормі він бере участь в обміні сигналами між нейронами та зв'язаний з везикулами. Мутації в його гені спричиняють мінімальні зміни амінокислотної послідовності в білку, через що його зв'язок із везикулами унеможливлюється. У наш час ідентифіковано кілька таких мутацій, дві з яких спричиняють поодинокі амінокислотні заміни. Виявлено, що мутантні синуклеїни мають відхилення при упаковці та утворюють кластери – тільцець Леві; крім того, вони гальмують функціонування убіквітин-протеасомної системи і тому є стійкими до протеасомної деградації [22].

Мутований синуклеїн виявляє проапоптозну дію, яка пов'язана з контролем утворення синаптичних везикул у пресинаптичному закінченні нейронів. Експресія мутованого синуклеїну в культивованих клітинах індукує апоптоз із зростанням утворення вільних радикалів, формуванням специфічних структур у мітохондріях, що опосередковує мітохондріальні зміни та розвиток клітинного оксидативного стресу: він зменшує число утворювальних везикул

і сприяє акумуляції дофаміну в цитоплазмі з одночасною генерацією ROS та ініціацією апоптозного каскаду. Таким чином, дію мутантного синуклеїну щодо ініціації апоптозу частково опосередковує дофамін – зокрема, доведено його проапоптозну дію у клітинах нервової культури, так і в клітинах деяких інших типів. Крім самого дофаміну, в індукції апоптозу відіграють не останню роль його токсичні метаболіти, які при нормальному pH можуть самоокиснюватися, формуючи ROS, H₂O₂. З акумуляцією пероксиду водню в ділянці чорної субстанції пов'язано й існування компенсаторної відповіді – зростання в цій ділянці мозку активності деяких форм супероксиддисмутази (СОД).

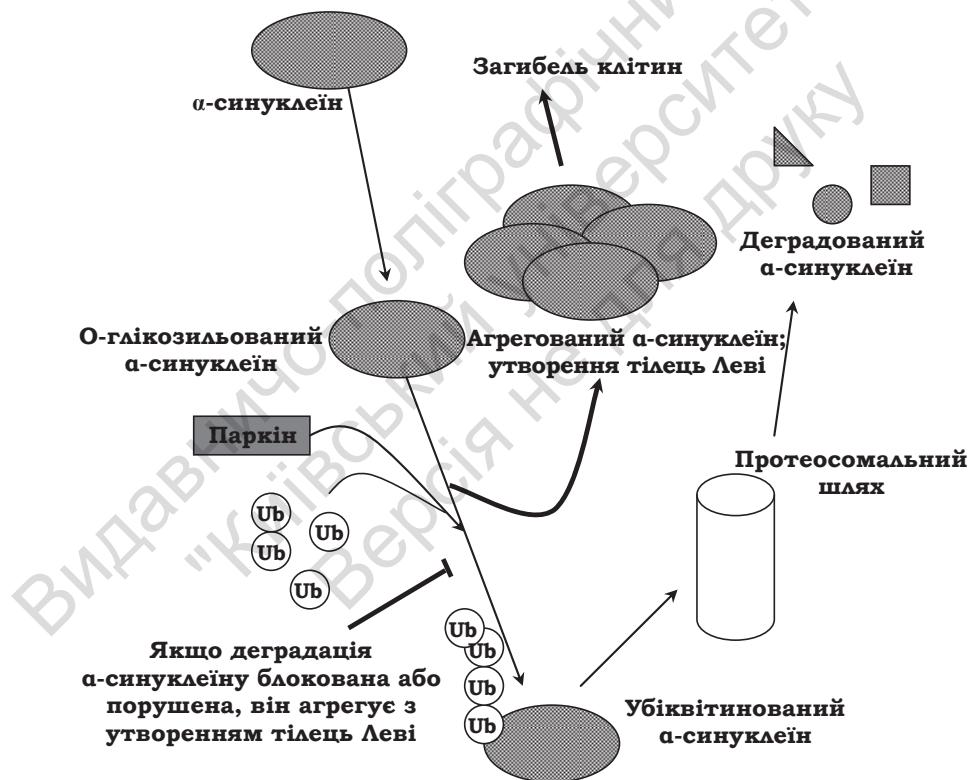


Рис. 4.9. Участь α-синуклеїну та паркіну в реалізації загибелі дофамінергічних нейронів при хворобі Паркінсона

У 1998 р. японські дослідники І. Мізуно й Н. Шімізу ідентифікували ще один ген, мутація якого спричиняє хворобу Паркінсона іншого типу. Цей ген кодує білок *паркін*. У молекулі паркіну є RING-домени (підрозд. 3.5), якими володіють деякі інші білки, і які надають їм убіквітинуючої активності (тобто він є убіквітин-E3-лігазою) (підрозд. 3.5).

У нормі паркін приєднує убіквітин до неправильно упакованих білків, що стає сигналом для їхнього протеолізу в протеасомах (рис. 4.9). При мутаціях паркіну ця система видалення аномальних білків порушується, що відіграє роль у порушенні життєздатності нейронів. Крім того, у тільциах Леві виявлено білок BAG5, який може зв'язуватися з паркіном і блокувати його роботу. Дослідження виявили, що при виникненні хвороби Паркінсона (як спадкової, так і спорадичної) у віці до 30 років у 20–40 % випадків виявляється мутація гена паркіну.

Немутований паркін здатний протектувати нейрони від апоптозу, індукованого дофаміном, шляхом значного зниження дофамін-індукованої активації с-Jun N-термінальної кінази (JNK) (підрозд. 3.7) та каспази-3. Цей білок також має антиоксидантну властивість, знижуючи рівень ROS у клітинах. Мутації паркіну, пов'язані з виникненням паркінсонізму, позбавляють білок зазначених антиапоптозних властивостей.

Ще один ген, мутації якого спричиняють хворобу Паркінсона – ген *убіквітингідролази*. Білок, що ним кодується, поряд із паркіном бере участь у розщепленні аномальної форми синукліїну. При відповідних мутаціях у клітині починають накопичуватися нерозчинні агрегати синукліїну і розвивається хвороба Паркінсона. У той же час відомостей про вплив убіквітингідролази та її мутованих форм на протікання апоптозних процесів поки недостатньо.

Хвороба Гентінгтона (або хорея Гентінгтона, від грец. *choreia* – пляска) – один із найважчих прогресуючих нейродегенеративних спадкових розладів головного мозку, який був уперше описаний Джорджем Гентінгтоном у 1872 р. як патологічний стан, що характеризується мимовільними, швидкими, нeregульованими рухами, які виникають у різних групах м'язів. Тривалість цього захворювання може сягати 15 років; з його

прогресією з'являються агресія, емоційні розлади з ознаками шизофренії, деменція та втрата пам'яті.

На наш час відомо, що хорея Гентінгтона пов'язана із селективною втратою нейронів у смугастому тілі (хвостате ядро і шкарадупа) та КГМ (рис. 4.7), що і спричиняє неконтрольованість рухів тіла. Такий стан виникає внаслідок збільшення кількості тринуклеотидних ЦАГ-повторів у межах гена, який кодує білок *гентінгтин* – відповідно, мутований білок містить надлишкові поліглутамінові повтори. У нормі довжина цього повтору міститься в межах від 11 до 34 триплетів, а у хворих – від 37 до понад 100 кодонів. Зазначений дефект здійснює свої впливи через змінений гентінгтин. Функція його нормальної форми точно не встановлена, вважають, що вона відіграє важливу роль в ембріогенезі. "Неправильний" гентінгтин викликає мітохондріальну дисфункцію – такий дефект може спричиняти навіть відокремлена поліглутамінова ділянка його поліпептидного ланцюга. Мутантні форми гентінгтину, крім того, здатні асоціювати з низкою інших білків нервової тканини з утворенням нерозчинних токсичних агрегатів, накопичення яких незворотно ушкоджує кору та смугасте тіло головного мозку. Р. Хагхес зі співробітниками виявили 234 білки із м'язової та нервової тканини людини та миші (із близько 3500 досліджених), які так чи інакше взаємодіють з мутантною формою гентінгтину. Майже кожен із понад 200 цих білків бере участь у таких найважливіших процесах у нервовій клітині, як збереження та секреція нейромедіаторів, синтез білка, створення архітектури нейрону.

Гентінгтин дикого типу захищає нервові клітини від численних проапоптозних стимулів (стимуляції рецепторів загибелі, впливів проапоптозних гомологів родини Bcl-2). Мутований білок через активацію каспаз, зокрема каспази-8, індукує цей тип загибелі клітин. Відомо, що і нормальній, і мутантний гентінгтини є субстратами для каспази-3, -2, -6. Проапоптозна функція мутантного гентінгтину є атрибутом його каспаза-генерованого токсичного N-термінального фрагмента, що містить "розширену" поліглутамінову ділянку. Вважають, що нормальні поліглутамінова ділянка (дикий тип білка) функціонує як супресор проапоптозного потенціалу даного фрагмента, тоді як "розширені" поліглутамінова ді-

лянка (мутований білок) зміщує цей баланс у бік апоптозу. Більше того, із прогресією хвороби більш тривале розщеплення каспазою гентінгтину збільшує генерацію фрагментів цього білка і, відповідно, зменшує вміст гентінгтину дикого типу, що також знижує виживання клітин. Ще один процес, що залучений до патогенезу хореї Гентінгтона, – порушення взаємодії між мутантним гентінгтином і *гентінгтин-взаємодіючим білком* (HIP-1, *huntingtin interacting protein*). HIP-1 має проапоптозні властивості (супресор апоптозу Bcl-2 гальмує HIP-1-індуковану клітинну загибел), активуючи внутрішній шлях загибелі. Тому надекспресія нативного гентінгтину, який здатний зв'язувати HIP-1, значно знижує його токсичність; при зростанні вмісту поліглутамінових ділянок у мутованому білку ця взаємодія послаблюється, і, відповідно, зростає можливість індукції апоптозу.

Аміотрофічний латеральний (бічний) склероз (від грец. *a* – від'ємна частинка, *myos* – м'яз і *trophe* – живлення, синонім: хвороба Шарко) уперше описаний в 1869 р. Жаном Мартином Шарко (Charcot, Jean-Martin) – французьким лікарем-психіатром, учитеlem Зігмунда Фрейда, фахівцем з неврологічних хвороб. Це фатальне порушення, що характеризується селективною та прогресуючою дегенерацією верхніх і нижніх мотонейронів зі зростанням оксидативного стресу, надактивацією глутамінових рецепторів, виявленням надлишку Ca^{2+} у клітинах. Аміотрофічний латеральний склероз становить близько 3 % усіх органічних уражень нервової системи і спостерігається головним чином у віці 30–50 років. Клінічна картина включає центральні та периферійні парези (послаблення довільних рухів) та паралічі (повна їхня втрата). Близько 10 % випадків захворювання – спадкові, більшість є спорадичними. Із них близько 20 % пов'язано із мутаціями гена *цитоплазматичної супероксиддисмутази* Cu^{2+} , Zn^{2+} -СОД, СОД-1. Цей фермент перетворює супероксидний аніон на H_2O_2 :



і ця функція передбачає участь у впливах мутованих СОД токсичних вільних радикалів.

Нормальний, немутований фермент проявляє виражену антиапоптозну дію, виступаючи, по-перше, одним із чинників ан-

тиоксидантного захисту організму, а, по-друге, блокуючи звільнення цитохрому с із мітохондрій в цитозоль і наступну активацію каскаду каспаз.

Надекспресія мутованої СОД спричиняє апоптозні процеси в численних клітинах мозку, причому такий апоптоз може бути заблокований хелаторами міді, інгібіторами каспаз, антиоксидантами (вітамін Е, глутатіон). Останні дослідження як на трансгенних мишиах, так і на зразках, отриманих від пацієнтів із АЛС, показали локалізацію мутантної СОД майже виключно в мітохондріях, де вона створює білкові агрегати, що пояснює її здатність руйнувати ці клітинні органели. Зокрема, таке розташування "неправильного" ферменту підвищує токсичні впливи на мітохондрію АФК, запускає звільнення в цитоплазму цитохрому с і наступну активацію каскаду каспаз, що спричиняє загибель нейронів у відсутності цитоплазматичного мутанту СОД-1 і вказує на критичну для патогенезу АЛС внутрішньомітохондріальну його локалізацію (рис. 4.10).

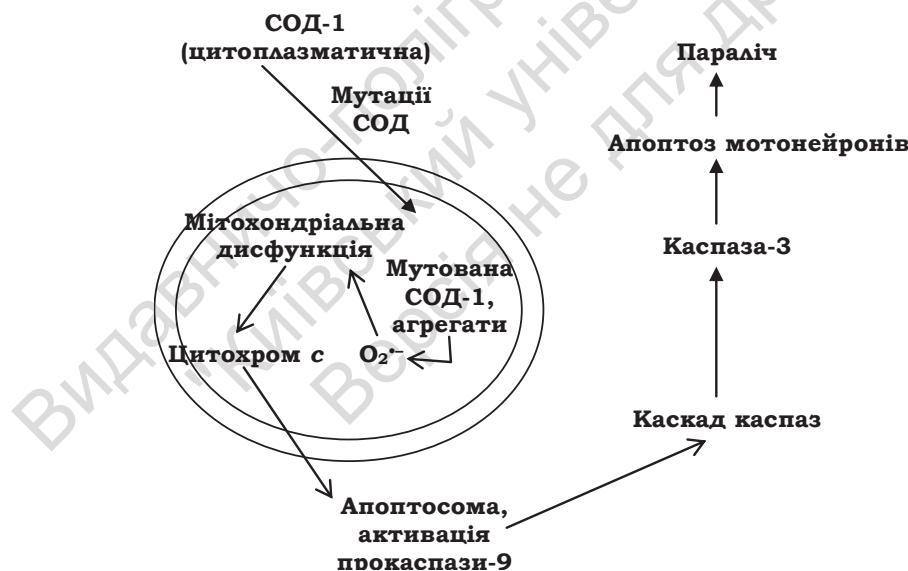


Рис. 4.10. Проапоптозні впливи мутованої СОД

Інші мітохондріальні зміни при аміотрофічному латеральному склерозі, причетні до реалізації апоптозної програми, включають

порушення співвідношення між кількістю про- та антиапоптозних членів білків родини Bcl-2, зокрема зниження рівнів антиапоптозних Bcl-2 і Bcl-XL і зростання Bax, Bid та Bcl-Xs.

Інший ген, залучений до патогенезу аміотрофічного латерального склерозу – ген *виживання мотонейронів* (*survival motor neuron gene*, SMN). Взагалі його мутації асоційовані зі зниженням виживання мотонейронів у спінальній м'язовій атрофії, але деякі зміни у структурі цього гена часто виявляються серед хворих на аміотрофічний склероз. Щодо можливості ініціації зазначеними змінами гена нейронального апоптозу даних немає.

У нейронах хворих на аміотрофічний латеральний склероз у надлишку виявляють ще один проапоптозний білок – білок *апоптозної відповіді простати* (*prostate apoptosis response*, Par-4). У клітинній культурі цей білок активується після оксидативного інсульту, що ініціює апоптоз, спричинений мітохондріальною дисфункцією; при цьому спостерігають знижені рівні білка Bcl-2 і надлишок Bax.

У нейронах людей, хворих на аміотрофічний склероз, незалежно від типу мутації, яка викликала цю хворобу, виявляють міжнуклеосомальну фрагментацію ДНК, збільшення мітохондріальної локалізації Bax і зменшення – Bcl-2. Подібні ознаки мають і нейрони СOD-1-мутантних мишей. Більше того, інгібування каспаз і надекспресія Bcl-2 гальмуєт дегенерацію і загибель мотонейронів у моделях аміотрофічного латерального склерозу, створених на мишиах.

Спінальна м'язова атрофія – це хвороба нейронів передніх рогів спинного мозку. Вона спричиняє атрофію м'язів, відповідальних за дії типу повзання, ходіння, тримання голови, управління шиєю, контролю над ковтанням. У першу чергу порушується функціонування проксимальних м'язів, які розташовані поруч із хребтом. Чутливість та інтелектуальна діяльність залишаються в нормі.

Ця хвороба вперше була описана Г. Верднігом і Дж. Хоффманом у 1891 р. у дітей (рис. 4.11). Вони навели чіткий опис патоморфологічних змін різних груп м'язів, периферійних нервів і спинного мозку, відзначивши симетричну атрофію клітин передніх рогів спинного мозку та передніх корінців. Пізніше (1893) Вердніг і Хоффман довели, що причиною захворювання є дегенерація клітин передніх рогів спинного мозку.



Рис. 4.11. А – характерний вигляд дитини, хворої на спінальну м'язову атрофію (за Дж. Хоффманом, ~1891); Б – спинний мозок хворого на спінальну м'язову атрофію (праворуч) порівняно з нормальним (ліворуч)

Сучасна статистика вказує на те, що із 6 000 немовлят один народжується із спінальною м'язовою атрофією, а 50 % діагностованих дітей не доживають до двох років. Один із кожних 40 людей є носієм гена, відповідального за розвиток цієї хвороби, отже, при його мутації захворювання може розвинутися в будь-якому віці. Цей ген був ідентифікований в 1995 р. і отримав назву SMN (*survival motor neuron*, або *ген виживання мотонейронів*).

Ген SMN міститься у відповідній хромосомі у двох високогомологічних копіях: SMN1 – близче до теломери та SMN2 – поруч із центромерою. 95 % випадків спінальної м'язової атрофії пов'язані з мутаціями в гені SMN1. Білок, який кодується немутованним SMN1, здатний гальмувати апоптоз, а його основною функцією вважається участь у метаболізмі РНК. Щодо механізму протективної антиапоптозної дії білка SMN1, то в наш час розгляда-

ється здатність однієї з його ділянок зв'язувати BH-4 домен антиапоптозних білків родини Bcl-2, що сприяє їхній активації й синергічному ефекту цих білків проти Bax- або Fas-R-опосередкованої клітинної загибелі. Відповідно, мутантний SMN1 утрачає можливість такої синергічної антиапоптозної відповіді. SMN1 також здатний взаємодіяти з проапоптозним білком p53, інактивуючи його при цьому, що робить нейрони менш чутливими до p-53 індукованого апоптозу, пов'язаного з пошкодженням ядерної ДНК. Унаслідок відповідних мутацій SMN1 утрачає зв'язок із p53, і в клітині зростає p-53-залежна проапоптозна активність.

Існують ще кілька генів-кандидатів на участь у патогенезі спінальної м'язової атрофії – і серед них найбільш дослідженим є ген білка-інгібітора апоптозу нейронів (*neuronal apoptosis-inhibitor protein (NAIP)*), продукт якого є гомологом родини інгібіторів апоптозних протеаз IAPs. Повноланцюговий немутований NAIP має виражені антиапоптозні властивості, інгибуєчи активності каспази-3 і -7 та гальмуєчи клітинну загибелю. Звідси зрозуміла здатність мутацій гена NAIP активувати апоптозні процеси. Так, порушення в гені NAIP знайдено в 35 % хворих на СМА. Про супутні цій хворобі зміни в клітинах м'язової системи див. підрозд. 4.8.

Розвиток ішемічного ураження та інсульту також передбачає залучення процесів апоптозу. При інсульті блокується постачання кров'ю частини мозку; у найбільш ушкоджений його ділянці нейрони миттєво гинуть унаслідок кисневого голодування (ішемія) шляхом некрозу. У ділянках мозку, розташованих поруч з ядром ішемії, в яких постачання киснем зменшено, але не відсутнє, спостерігається більш повільне (протягом днів і тижнів) відмиряння нервових клітин. Хоч ці клітини з часом могли б відновитися, вони гинуть саме внаслідок індуkcії в них програмами самогубства: нейрони "ишемічної тіні" мають ознаки фрагментації ДНК та інші морфологічні й молекулярні прояви апоптозу – активацію каспаз, експресію проапоптозних генів, звільнення цитохрому с. Тут та-кож задіяні оксидативний стрес, МАРК, мембрани шляхи (гідроліз фосфоліпідів, розщеплення мембраних сфінгомієлінів кислою сфінгомієліназою з утворенням цераміду (підрозд. 3.8) тощо).

У дослідах на трансгенних миших показано, що за відсутності сфінгомієлінази або при експозиції нормальних мишей препаратаами, що знижують продукцію цераміду, процеси загибелі в мозку гальмуються і характерні симптоми зникають. Інгібіторний ефект на деструктивні процеси при ішемічному інсульті мають і інгібітори каспаз, здатні обмежити пошкодження, спричинені інсультом. Крім того, інгібітори каспаз також потенційно можуть бути використані для запобігання церебрального паралічу та інших захворювань у немовлят, мозок яких ушкодився внаслідок ішемії при тяжких пологах, при народженні з малою вагою (у половини з яких розвивається будь-яка форма ішемії внаслідок недорозвиття мозку й легенів). Зокрема, інгібітори апоптозу, введені новонародженим шурам протягом трьох годин після того, як дослідники виявили ішемію мозку, запобігали загибелі нейронів (дані лабораторії Д. Хольцмана). Правда, необхідно провести додаткові дослідження щодо вивчення нормальноті функціонування "врятованих" нейронів і виникнення можливих побічних ефектів інгібіторів каспаз. Ще одним протекторним напрямком може стати налагодження постачання нейротрофічних факторів до нейронів.

Травматичні ушкодження головного та спинного мозку здатні ініціювати біохімічні та молекулярні події, подібні до нейродегенеративних явищ. 95 % усіх клітин, що зазнають апоптозної загибелі в різних ділянках мозку в різних моделях – це нейрони; але її ознаки має й низка інших клітин – астроцити, олігодендроцити, ендотеліальні клітини. При цьому в нейронах виявляють фрагментацію ДНК, активацію каспаз, зростання експресії p53 і Bax (хоча щодо останнього та інших про- і антиапоптозних членів родини Bcl-2 точних даних про експресію немає). Дослідження в моделях на миших показали існування кореляції між зниженням сенсорних, моторних і пізнавальних здібностей після травми та числом нейронів, які встали на шлях апоптозу, причому така загиbelь була асоційована зі зростанням експресії p53, рецепторів Fas та їхніх лігандів, збільшенням активності каспази-3. В іншій моделі інтратентрикулярна інфузія фактора росту нервів шурам через 24 години після травми сприяла відновленню пізнавання та пам'яті і знижувала число загиблих нейронів. Циклоспорин А – інгібітор МРТ – протекував нейрони від клі-

тинної загибелі, що свідчить про ключову роль зміни мітохондріальної проникності в нейродегенеративних процесах. Інгібтори каспази-3 при експозиції до і після ушкодження також знижують посттравматичний апоптоз і значно поліпшують стан мозку.

Із наведеного видно, що в апоптоз нейронів при травматичних ураженнях включається як внутрішній, так і зовнішній шляхи апоптозу (підрозд. 3.4). Перевагу того чи іншого напрямку може визначати, зокрема, тип травми. Наприклад, холодіндуковане травматичне ушкодження аксонів асоційовано зі звільненням із мітохондрій цитохрому с через кілька годин після травми (внутрішній шлях). За численних інших пошкоджень у реалізацію апоптозної програми включається Fas-R-система.

Ознаки апоптозу виявляють і в спинному мозку 14 із 15 помे-рих від травматичного ушкодження спинного мозку людей (від трьох годин до двох місяців після отримання травми). У цьому випадку переважає внутрішній (мітохондріальний) шлях клітинної загибелі зі звільненням цитохрому с та активацією каспази-9.

Синдром раптової дитячої смерті (Sudden Infant Death Syndrom, SIDS) – це раптова загиbelь дитини першого року життя, яка досі не має пояснень. Найчастіше така загиbelь відбувається уві сні, тому інша її назва – "смерть у колисці". Уперше цей термін запропоновано в 1969 р., а дослідження з установлення причин патології ведуться, починаючи з другої половини 80-х рр. Кількість випадків синдрому в різних країнах у межах одного на 1000 новонароджених, більшість із них припадає на дітей 2–4 місяців життя. На відміну від тимчасової зупинки дихання (апноє) чи асфікції синдром раптової дитячої смерті відбувається миттєво, у зв'язку із чим сьогодні ніяких методів його запобігання не винайдено.

У той же час наприкінці 2006 р. Д. Дракер з колегами нарешті виявили три гени, модифікації яких можуть спровокувати синдром раптової дитячої смерті. За умови появи всіх трьох мутованих генів ризик загибелі немовля зростає в 14 разів. Ці гени відповідають за синтез цитокінів (це білкові сполуки, які беруть участь у міжклітинній сигналізації, сприяючи проліферації, диференціації або загибелі клітин) – інтерлейкіну 10 (IL-10), 6 (IL-6) та васкулоендотеліального фактораросту (*vascular endothelial*

growth factor, VEGF) [24]. Останні дослідження вказують на виражену антиапоптозну дію зазначених цитокінів, отже, порушення їхніх функцій внаслідок мутації відповідних генів може викликати синдром раптової дитячої загибелі саме шляхом дисрегуляції процесів апоптозу. Це підтверджується тим, що у 80–95 % немовлят, які загинули, виявляють значну кількість апоптозопозитивних нейронів гіпокампу. На наш час у цій патології більше невідомого, ніж зрозумілого, і одна з робочих гіпотез – що апоптоз спричиняє численні ушкодження нервової координації та кардіореспіраторного контролю. Медіатори загибелі клітин при цьому поки невідомі, але відмічена роль у 80 % випадків синдрому оксидативного стресу.

Діабетична нейро- та ретинопатія є загальними проявами цукрового діабету – хвороби, що характеризується зростанням вмісту глукози в крові й дефектами в продукції та (або) активності інсуліну. Згідно з даними ВОЗ на наш час загальна кількість хворих на цукровий діабет у світі перевищила 100 млн людей, це близько 3 % населення Землі. Щорічно ця цифра збільшується на 5–7 % і подвоюється кожні 12–15 років.

Діабетична нейропатія (або полінейропатія) розвивається внаслідок пошкодження ендоневральних судин (це тонкі гілокки кровоносних судин, розташовані всередині пучків нервових волокон), що сприяє поширеному ушкодженню нейронів та їхніх відростків як у центральній (дуже рідко), так і в периферичній нервових системах. Понад 50 % хворих на цукровий діабет страждають на нейропатію; її факторами ризику є тривалість хвороби, тип цукрового діабету (І, за якого знижена продукція інсуліну β-клітинами підшлункової залози, або ІІ, більш поширений, що характеризується зниженою чутливістю тканин організму до інсуліну навіть за нормальнюю її продукцією), вираженість гіперглікемії, наявність патології мікроциркуляції, паління. Клінічно діабетична нейропатія проявляється зниженням ахілових і колінних рефлексів, чутливості дистальних відділів ніг з можливим розвитком виразки стопи та небезпекою ампутації кінцівки.

Діабетична ретинопатія виникає в 99 % хворих на цукровий діабет І типу і в 60 % із ІІ типом захворювання приблизно через 20 років після початку хвороби.

Біохімічні механізми апоптозу

Шкідливі впливи надлишкового вмісту цукру в крові перш за все стосуються судин, у тому числі й судин сітківки. Діабетична ретинопатія виникає внаслідок ураження капілярів сітківки із втратою *періцитів* (від *peri* – навколо та грец. *kύtos* – клітина; синоніми: *адвентиційні клітини*, *клітини Руже*, *відростчасті клітини стінок капілярів*) (рис. 4.12), зміною у структурі базальної мембрани, декомпенсацією бар'єрної функції ендотелію та зростанням проникності капілярів.

Будова стінки капіляра

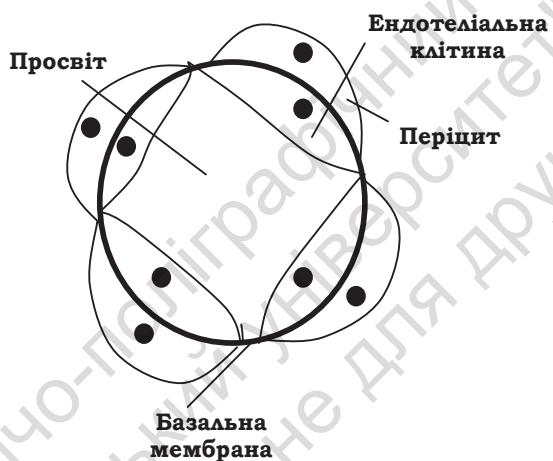


Рис. 4.12. Будова капіляра:

капіляри утворені поодиноким шаром ендотеліальних клітин, зовні якого розташована базальна мембра, до складу якої входять молекули позаклітинного матриксу. Ендотеліальний шар оточують періцити, які, у свою чергу, контактують із адвентиційною оболонкою – тонким шаром сполучної тканини, яка переходить у строму, що оточує навколошні тканини (строма на рисунку не показана)

Початкова стадія діабетичної ретинопатії має назву *непроліферативної*, або *фонової*. На цьому етапі стінки артерій стають крихкими, зростає їхня проникність, що спричиняє утворення точкових крововиливів і локальних розширень артерій –

мікроаневризмів. Фонова ретинопатія може протікати роками без будь-яких порушень з боку зорової функції. Друга стадія є перехідною, це так звана *препроліферативна*, або *тяжка непроліферативна ретинопатія*, під час якої через виражені зміни в проникності судинної стінки в сітківку виходить рідка частина крові, унаслідок чого сітківка набрякає та знижується якість зору. Під час наступної стадії захворювання (проліферативної) порушення кровообігу в сітківці призводить до її ішемічного ушкодження, спричиненого кисневим голодуванням. У відповідь на ішемію організм включає компенсаторний механізм: відбувається *неоваскуляризація* – створення нових судин для підтримки нормального рівня кисню в сітківці внаслідок виділення "голодуючою" сітківкою особливих вазопроліферативних речовин, здатних запустити ріст нових судин. Ці новостворені судини, проте, є недосконалими, мають підвищну проникність і ламкість, які спричиняють виникнення внутрішньоочних крововиливів різного ступеня тяжкості. Невеликі крововиливи в сітківку та склоподібне тіло здатні самовільно розсмоктуватися; масивні крововиливи – *гемофтальм* – спричиняють необернену фіброзну проліферацію у склоподібному тілі. На пізніх стадіях діабетичної ретинопатії з новоутворених судин у сітківку та склоподібне тіло виходять білки, здатні запустити порушення структури цих утворень, їхнє рубцювання та відшарування сітківки. Унаслідок посиленого виходу з новоутворених судин плазми крові блокуються шляхи відтоку внутрішньоочної рідини, що викликає розвиток *вторинної неоваскулярної глаукоми* (підрозд. 4.8).

Останні дослідження виявили, що роль апоптозу в розвитку діабетичної ретинопатії полягає у видаленні періцитів, які є структурним компонентом кровоносного капіляра (на ранніх стадіях), а також гангліозних клітин сітківки (на більш пізніх стадіях, для яких характерне зростання внутрішньоочного тиску і розвиток глаукоми, підрозд. 4.8). Так, у капілярах сітківки людини та щура в нормі кількість періцитів приблизно дорівнює кількості ендотеліальних клітин. На ранніх стадіях діабетичної ретинопатії товщина базальної мембрани капілярів зменшується і втрачається значна частина періцитів (і відношення їхнього

числа до кількості ендотеліальних клітин становить 0,3 : 1, або навіть і 0,1 : 1). Виявилося, що ця втрата клітин відбувається шляхом апоптозу із задушенням білків Bax і каспази-3, задучає звільнення цитохрому *c* та зниження рівня білка Bcl-2. Оскільки більшість відомих метаболічних і судинних механізмів розвитку патологій при діабетичних нейро- та ретинопатії включають гіперпродукцію супероксиду в мітохондріях, що спричиняє оксидативний стрес – порушення рівноваги між продукцією вільних радикалів та активністю антиоксидантної системи організму, то апоптоз періцитів може викликатися і впливом ROS. Деякі дослідники вказують також на наявність гальмівного ефекту патологічних концентрацій глюкози на проліферацію періцитів і на синтез компонентів базальної мембрани (колагену, ламініну, фібронектину).

Незалежно від змін у структурі капілярів та індукованих процесів неоваскуляризації патологічні зміни відбуваються і в нейронах ішемічної сітківки. Такі зміни корелюють з прогресивною втратою цих нервових клітин і порушенням функції зору. Механізми їх залишаються гіпотетичними, але, безперечно, до них залучена індукція апоптозу, спричинена ішемією, ROS, недостатністю ростових факторів тощо.

Аналогічні гіперглікемія-індуковані зміни в судинах характерні й для розвитку *діабетичної нейропатії*. У цьому випадку вони також сприяють виникненню ішемії, недостатності факторів росту, розвитку оксидативного стресу, які результирують в апоптозній загибелі нейронів. У клітинах, що гинуть, відмічають зниження рівня білка Bcl-2, звільнення цитохрому *c*, активацію каскаду каспаз. Усі ці ознаки, як і у випадку ретинопатії, указують на активацію в нейронах хворих внутрішнього шляху апоптозу. Таким чином, провідна роль процесів апоптозу в патогенезі діабетичної нейро- та ретинопатії дає можливість застосовувати певні його етапи та відповідні проапоптозні фактори як потенційні мішені для діагностики та терапевтичних впливів при цих ускладненнях цукрового діабету поряд з інсулін-опосередкованою нормалізацією рівня глюкози в крові.

4.5. СНІД

Вважають, що захворювання на *синдром імунодефіциту* (СНІД) виникло в Центральній Африці, звідки через Гайті потрапило до США, де й було вперше описано в 1981 р. і через швидке розповсюдження по всій планеті стало "чумою ХХІ століття". За даними ВОЗ уже в 1994 р. захворюваність на СНІД набула розмірів пандемії. До 2000 р. кількість інфікованих вірусом імунодефіциту людини (ВІЛ) на земному шарі досягла 40 млн, а кількість хворих на СНІД – 18 млн. *ВІЛ-інфекція* (*human immunodeficiency virus infection – HIV infection*) – це повільно прогресуюче інфекційне захворювання, що виникає через зараження вірусом імунодефіциту людини. Цей вірус ушкоджує імунну систему, унаслідок чого організм набуває надчутливості до інших інфекцій, пухлин, які спричиняють загибель хворого. Збудник ВІЛ-інфекції був уперше відкритий в 1983 р. у Парижі Р. Галло. Він належить до підродини лентивірусів (тобто вірусів повільних інфекцій, які характеризуються тривалим періодом між інфікуванням і появою перших симптомів) родини РНК-вмісних ретровірусів (які копіюють генетичний матеріал, використовуючи РНК як шаблон для утворення ДНК) і має 2 підтипи – ВІЛ-1 та ВІЛ-2, причому останній зрідка виділяють у хворих на СНІД у деяких регіонах Західної Африки. Обидва типи вірусів, імовірно, виникли від віrusу мавп і характеризуються ідентичною клінічною картиною викликаного ними захворювання. *Зрілий вірюон ВІЛ* – це сферичне утворення діаметром 100–150 нм, що має се-рцевину (кор) та оболонку (рис. 4.13). В його внутрішній порожнині містяться дві однакові молекули РНК (близько 5700 нуклеотидних залишків кожна), внутрішні білки та вірусні ферменти (зворотна транскриптаза синтезує вірусну ДНК з молекули вірусної РНК; протеаза "нарізає" попередники вірусних білків при дозріванні нової вірусної частинки; ендонуклеаза (*інтеграза*) здійснює вбудування вірусної ДНК у геном клітини-хазяїна).

Оболонка вірусу сформована глікопротеїнами (вони утворюють грибоподібні вирости) та ліпідами, при цьому глікопротеїн "шляпки гриба" – gp120 – має спорідненість до молекул CD4, присутніх на поверхні клітин-мішеней, а глікопротеїн "ніжки" – gp41 – вбудований в оболонку вірюону.

Біохімічні механізми апоптозу

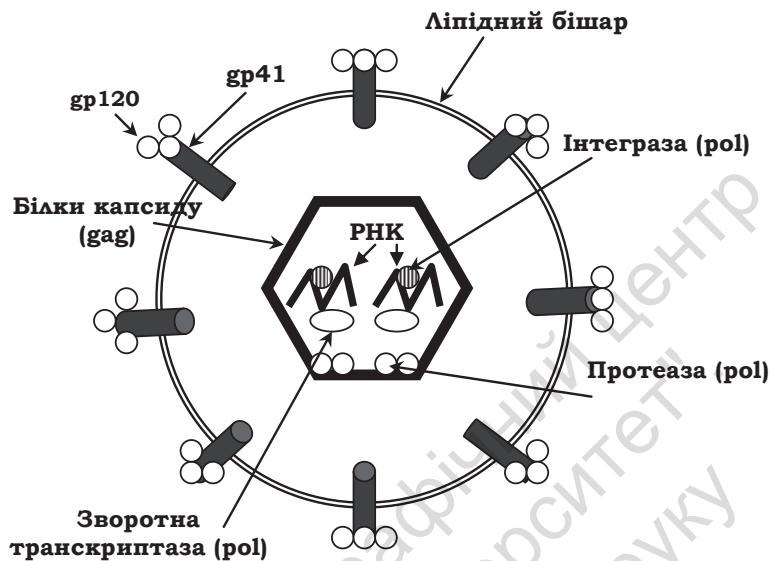


Рис. 4.13. Будова вірусу ВІЛ

Геном ВІЛ містить три основні **структурні гени**: *gag* (від *group-specific-antigens* – групоспецифічні антигени, кодує внутрішні білки p18, 24, 55); *env* (від *envelope glycoprotein* – глікопротеїн оболонки, кодує глікопротеїни оболонки gp41, 120, 160); *pol* (від *polymerase* – полімераза, кодує зворотну транскриптазу – p64/53, інтегразу – p31, протеазу – p22). Інша група генів ВІЛ – **регуляторні**: *tat* – від *transactivator of transcription* (трансактиuator транскрипції) – транскрипційний активатор усіх вірусних білків, *rev* (*regulator of viruse expression*) – регулятор експресії вірусних генів, *nef* (*negative expression factor*) – негативний фактор експресії, вони забезпечують контроль за його реплікацією. Три **додаткові гени** – *uri* (від *Viral Protein U* – вірусний білок U) і *upr* (від *Viral Protein* – вірусний протеїн), пряма функція яких ще не встановлена, та *vif* (*viruse infection factor*, вірусний інфекційний фактор) містять інформацію, необхідну для продукції білків, що регулюють здатність вірусу інфікувати клітину, реплікуватися і викликати захворювання. Кінці кожної молекули РНК містять дубльовану послідовність РНК, так званий довгий кінцевий повтор – LTR, в якій присутні ділянки зв'язування з регуляторними

білками віріону та клітини-хазяїна, у тому числі й NF-kB-зв'язуюча ділянка.

Основним способом потрапляння ВІЛ усередину клітини є його зв'язування зі специфічним рецептором клітинної оболонки – молекулою CD4 завдяки високоафінному зв'язуванню з ним gp120-глікопротеїну оболонки віріону. Рецептори CD4 містяться в першу чергу на Т-лімфоцитах-хелперах (CD4-лімфоцити), а також і на інших клітинах, у тому числі й з тривалим періодом життя (моноцити, макрофаги). Такі "довгоіснуючі" клітини можуть зберігати в собі великі кількості вірусів і при цьому не гинути і ставати, таким чином, "резервуаром" для вірусу. Саме нечутливість вірусу внаслідок такого зберігання до існуючих антивірусних препаратів і стає причиною неможливості повного виведення ВІЛ з організму. Ряд інших клітин, що можуть інфікуватися вірусом ВІЛ – клітини Лангерганса, фолікулярні дендритні клітини лімфатичних вузлів, клітини олігодендроглії, астроцити мозку, епітеліальні клітини кишечнику, клітини шийки матки – не завжди містять поверхневі рецепторні білки CD4, завдяки чому вірус не може безпосередньо адсорбуватися і потрапити до клітини. У цьому випадку інфікування може відбутися внаслідок злиття таких клітин з інфікованими лімфоцитами і макрофагами.

У той же час основними мішенями при ВІЛ стають саме Т-хелпери, основними функціями яких є розпізнання антигену, наступна стимуляція функцій Т-кілерів (ці лімфоцити експресують на своїй поверхні маркер (рецептор) CD8), макрофагів та індукція продукції антитіл В-лімфоцитами. Така цитопатична дія на Т-хелпери проявляється зниженням антивірусного, антимікробного та антипухлинного імунітету, унаслідок чого вірус накопичується в крові, швидко розповсюджується по організму, що погіршує протікання хвороби та сприяє розвитку опортуністичних (супроводжувальних) інфекцій, прискорення злокісного росту внаслідок впливу вірусних частинок на пухлинні клітини та ушкодження клітин-кілерів (CD8-лімфоцитів).

Після адсорбції на поверхні CD4-лімфоциту внаслідок взаємодії gp120 із білковою молекулою CD4 оболонка вірусу та клітинна мембрana зливаються, і генетичний матеріал (РНК) та зворотна транскриптаза вірусу потрапляють до клітини. Зво-

ротна транскриптаза каталізує синтез провірусної ДНК на матриці вірусної РНК. Новоутворена вірусна ДНК вбудовується в хромосому ДНК людини і надалі стає основою для реплікації ВІЛ (т. зв. *стадія провірусу*). З моменту інтеграції розпочинається *стадія латентної інфекції*, при якій транскрипція і трансляція вірусних генів відсутня і немає жодних клінічних проявів інфекції. Активуючими факторами провірусу можуть ставати різноманітні антигени, цитокіни, клітинні транскрипційні фактори, ін. Іноді процеси активації транскрипції та синтезу вірусних білків-попередників можуть набувати вибухоподібного характеру. Життєвий цикл вірусу закінчується "зборкою" нових вірусних частинок та їхнім виходом із клітини, після чого інфікована клітина підлягає прямій деструкції [6]. Останні дослідження показали, що провідна роль у втраті CD4-клітин ВІЛ-інфікованих належить подіям загибелі клітин шляхом апоптозу. Апоптоз взагалі характерний для хронічних неконтрольованих інфекцій, що спричиняють тривалу антигенну стимуляцію, зокрема цитомегаловірусної, при якій також спостерігають лімфопенію (зменшення числа лімфоцитів). Водночас ВІЛ здатний індукувати апоптоз і за додатковими механізмами – прямими та опосередкованими. До *прямої ініціації апоптозних подій* безпосередньо причетні білки, що кодуються вірусними генами, причому вони можуть ініціювати загибель як інфікованих, так і неінфікованих клітин (т. зв. *паракринна загибель*) [20] (табл. 4.4).

Так, високоафінне зв'язування gp 120 з рецептором CD-4 індукує зростання чутливості до Fas-R-опосередкованого апоптозу внаслідок зниження експресії антиапоптозного білка Bcl-2 та активації каспази-3, причому індукція Fas-R-залежного апоптозу може бути зупинена точковою мутацією гена *gp-120* або мутаціями самого маркера Т-хелперів. Tat-білок вклучається в активацію каспази-8 через збільшення продукції Fas-L, індукуючи апоптоз через Fas-R-залежний шлях. Мутації гена іншого вірусного білка – Nef – уповільнюють втрату CD4 клітин порівняно з нормальним Nef; крім впливу на інфіковану клітину, цей білок, імовірно, через зв'язування зі ще неідентифікованим рецептором здатний викликати Fas-R-незалежний апоптоз неінфікованих клітин. Vpr-білок, крім наведе-

них у таблиці механізмів, включається в регуляцію латентності, у контроль реплікації та резистентності до антивірусних агентів. Вірусна протеаза здатна до прямого розщеплення каспази-8 і до прямої модифікації клітинної чутливості до апоптозу шляхом протеолітичної деградації антиапоптозного білка Bcl-2.

Таблиця 4.4. Механізми ВІЛ-індукованого апоптозу

Ефектор	Механізм	Клітини-мішенні
Прямі ефекти вірусних білків		
Tat	Зростання чутливості до Fas-R-опосередкованого апоптозу; зростання утворення Fas-лігандів	Інфіковані та неінфіковані клітини
Nef	Зростання продукції Fas-лігандів; зв'язування з неідентифікованим рецептором	Інфіковані та неінфіковані клітини
Vpr	Зупинка клітинного циклу; прямий ефект на проникність мітохондріальної мембрани; вплив на вірусну транскрипцію, клітинну активацію, диференціацію	Інфіковані та неінфіковані клітини
Protease	Розщеплення структурних білків клітини-хазяїна	Інфіковані клітини (щодо неінфікованих клітин даних немає)
gp 120/160	Забезпечує активацію через зв'язування з CD4; зростання продукції Fas-лігандів і рецепторів	Неінфіковані клітини
Непрямі ефекти ВІЛ		
Клітинна загибель, індукована активацією	ВІЛ-асоційована активація; зростання продукції TRAIL/APO2L та (або) Fas-L	Неінфіковані клітини
Загибель, опосередкована автогенними інфікованими клітинами	Зростання утворення цитотоксичних лігандів ВІЛ-інфікованими клітинами	Неінфіковані клітини

Непрямі ефекти ВІЛ-індукованого апоптоза не залежать від вірусних білків і головним чином забезпечують загибель неінфікованих Т-клітин. Щодо клітинної загибелі, індукованої активацією, то за фізіологічних умов активація Т-клітин (за участю фактора некрозу пухлин, інтерферону γ , IL-2, ін.) спричиняє зниження експресії антиапоптозного білка c-FLIP, що підвищує чутливість клітин до зв'язування Fas-L та каспаза-8-опосередкованого апоптозу (підрозд. 3.3). Активація CD4-клітин ВІЛ-інфікованої людини різноманітними стимулами викликає посилений апоптоз порівняно з клітинами неінфікованих. І оскільки ВІЛ-інфекція асоціюється з фенотипом Т-активних клітин, то цей механізм відіграє не останню роль у швидкій та поширеній втраті Т-хелперів.

Загибель, опосередкована автогенними інфікованими клітинами ВІЛ-інфікованих (макрофагами, моноцитами, мононуклеарними клітинами периферійної крові, CD4-клітинами, CD8-клітинами), індукує втрату неінфікованих CD4-лімфоцитів. Така загибель може включати gp 120-взаємодії, Fas-R/Fas-L-систему. Зокрема, макрофаги та моноцити експресують базальні рівні Fas-L, які надмірно зростають після інфікування ВІЛ. У лімфатичних вузлах інфікованих індивідуумів апоптоз присутній головним чином у неінфікованих сусідніх клітинах, а більшість ВІЛ-позитивних клітин є достатньо резистентними до безпосередньої індуkcії апоптозу вірусом. Біологічне значення такого явища полягає в тому, що вірусу не вигідна загибель інфікованих клітин доти, доки кількість вірусних частинок не досягне потрібного рівня. Тому деякі вірусні білки мають антиапоптозні властивості й здатні інгібувати експресію рецептора CD4 на інфікованих клітинах, перешкоджаючи, таким чином, gp-120-CD4-опосередкованому апоптозу. Інші протеїни вірусу стимулюють експресію антиапоптозного Bcl-2, пригнічуєть експресію Bax і p53. Адже перед тим, як зруйнувати всю імунну систему за участю процесів апоптозу лімфоцитів, вірусу необхідно забезпечити власне виживання і збереження в інфікованих клітинах.

4.6. АТОПІЧНА АЛЕРГІЯ

Захворювання на алергію є розповсюдженими серед усіх вікових категорій. Основні типи алергійних реакцій наведено в табл. 4.5.

Таблиця 4.5. Типи алергійних реакцій

Тип I (атопічна алергія)	Тип II	Тип III	Тип IV
Опосередковується імуно-глобуліном Е, розташованим на тучній клітині. Алергени викликають перехресне зв'язування молекул IgE, що спричиняє звільнення медіаторів алергійної реакції та викликає локальне (алергія) чи системне (анафілаксія) запалення. Прояви: астма, ринокон'юктивіти (сінна лихоманка, або поліноз), крапивниця, атопічна екзема, гастроентерологічні прояви у відповідь на інгаляційні та харчові алергени	Антиген зафікований на мембрани клітини. Антитіла (тип IgG або IgM) містяться в крові в не-зв'язаному стані. Коли антитіла реагують з антигеном, відбувається активація комплемента, фагоцитоз, активація кілерних клітин, що спричиняє пошкодження чи лізис клітини. Прояви: реакції на ліки, гемотрансфузійні реакції	Антигени й антитіла (тип IgG) містяться в крові в не-зв'язаному стані, утворюючи вільноциркулюючі імунні комплекси. За високої концентрації такі комплекси відкладаються в тканинах, активізують комплемент, стимулюють утворення анафілотоксинів, хемотаксис нейтрофілів і фагоцитоз. Прояви: харчова непереносимість, системні васкуліти, гломерулонефрити, міокардити тощо	Загальмована гіперчутливість (прояв через 12–48 годин після контакту з алергеном). Опосередкована клітинами (макрофаги та еозинофіли), а не антитілами, як у типах 1–3. При kontaktі з алергеном клітини виділяють цитокіни – біологічно-активні речовини пептидної природи, що беруть участь у широкому спектрі процесів в організмі (регуляції хемотаксису лейкоцитів, процесів гемопоезу, диференціації імунокомpetентних клітин, синтезі білків гострої фази). Під впливом цитокінів макрофаги виділяють медіатори запалення. Прояви: алергійні контактні дерматити, целіакія

Найрозвсюдженішими із цих чотирьох типів є прояви *атопічної алергії* – гастроентерологічні (харчова алергія, особливо в дитячому віці), *анафілаксія* (початкові м'які прояви з наступним падінням кров'яного тиску, гострим судинним колапсом, рвотою, набряком легенів, обличчя та слизових оболонок дихальних шляхів, утрудненням дихання, що в тяжких формах може привести до смерті через задуху; такі стани можуть спричинити харчові алергени, ліки, отрути комах), *кропивниця* (гостре захворювання, що супроводжується появою еритематозних елементів, що зудять), *атопічна екзема* (хроніче захворювання з ознаками, схожими на крапивницю), *риніти* (запалення слизової оболонки порожнини носа, що супроводжується чиханням, зудом, ринореєю внаслідок сезонних (появи пильці рослин, спор грибів) або постійних (кліщів домашнього пилу, епітелію домашніх тварин, мишей, щурів, цвільових грибів, лабораторних тварин) причин, астма (підвищена реактивність дихальних шляхів на різноманітні стимули, що проявляється уповільненням форсованого вдоху, унаслідок дії алергенів – кліщів домашнього пилу, спор грибів, пилка дерев, трав, епідермісу тарганів, промислових алергенів, ін.).

Атопічна алергія супроводжується *еозинофілією* – збільшенням вмісту еозинофілів у крові. Еозинофіли – це один із типів білих кров'яних клітин, лейкоцитів. Вони здатні знешкоджувати бактеріальні токсини, але головна їхня функція – участь в алергічних реакціях організму. Свою назву ці клітини отримали через їхню здатність забарвлюватися кислими барвниками, зокрема еозином, у рожевий колір.

Еозинофіли продукуються в кістковому мозку та мігрують у тканини. На відміну від нейтрофілів, основною функцією яких є фагоцитоз дрібних чужорідних частинок, мікроорганізмів, і які тому займають в основному інтраваскулярні (внутрішньосудинні) простори, еозинофіли в периферійній крові становлять близько 1 % від їхнього загального числа (1500 клітин на 1 мм^3 крові). Мембрани еозинофілів містять специфічні рецептори (зокрема рецептори до імуноглобулінів Е та М, компонентів комплементу, гістаміну, агентів хемотаксису тощо). Їхня експресія може зростати або знижуватися під впливом різних факторів; з рівнем експресії рецепторів по-

в'язана здатність еозинофілів виділяти медіатори, що містяться в гранулах цих клітин (базисний білок, катіонний протеїн, нейротоксин, пероксидаза). При патологічних процесах, що супроводжуються збільшенням експресії мембраних рецепторів еозинофілів, активація цих рецепторів спричиняє збільшене виділення зазначених білків, які мають виражену протеолітичну активність як відносно чужорідних субстанцій, так і щодо нормальних тканин. При алергійних процесах базисний і катіонний білок і пероксидаза, впливаючи на імуно-компетентні клітини, у першу чергу на тучні (або мастоцити), викликають підвищене звільнення з них медіаторів запалення – гістаміну, лейкотрієнів, фактора активації тромбоцитів. Підвищений вміст катіонного білка в тканині бронхів виявляють при бронхіальній астмі, у шкірі – при рецидивній крапивниці та атопічному дерматиті. Таким чином, тканинна еозинофілія є не пасивною реакцією, як вважали раніше, а активним феноменом, що відповідає за алергійне запалення. При тяжких формах атопічної алергії, зокрема при атопічному дерматиті, виявлено міграцію еозинофілів із периферійної крові (де їхній вміст зменшується) у тканину пошкодженого органа, де здійснюються їхні патогенні впливи.

На наш час відомо, що при алергійному запаленні однією із причин акумуляції активованих еозинофілів у ділянці запалення є їхнє пролонговане життя через зниження відсотка клітин, що підлягають апоптозній загибелі [43]. Причиною надвиживання еозинофілів є вплив мікрооточення стінок дихальних шляхів, зокрема експресія його клітинами низки цитокінів. Життя еозинофілів пролонгують IL-5, IL-15, GM-CSF (колоніестимулювальний фактор макрофагів), які, впливаючи на різні ділянки апоптозної програми, блокують їх.

Еозинофіли можуть запускати власну загиbelь через рецептори загибелі, зокрема через receptor Fas. Ліганд до нього – Fas-L – високоекспресований на активованих Т-клітинах. Під час алергійної реакції спостерігається зниження експресії Fas-рецепторів і Fas-лігандів на еозинофілах та лімфоцитах відповідно, що сприяє резистентності цих клітин до Fas-L-індукованого апоптозу. γ -інтерферон завдяки здатності підвищувати рівень експресії

компонентів Fas-R/Fas-L-системи має проапоптозний ефект, за-
безпечуючи лікувальний ефект.

Еозинофілам також притаманна експресія генів факторів виживання – антиапоптозних білків Bcl-2 та Bcl-x_L, причому зниження апоптозу в ділянках алергійного запалення зазвичай супроводжується зростанням експресії цих факторів при збереженні рівня проапоптозних білків Bax та Bcl-x_S. Як уже за-значалося (підпідрозд. 3.2.2), чутливість клітин до апоптозних сигналів визначається співвідношенням агоністів і антагоністів клітинної загибелі та їхньою наступною взаємодією через гомоматичну гетеродимеризацію. Висока експресія *bax* спричиняє домінування Bax-гомодимерів і стимуляцію апоптозу (чого не спостерігається при алергійних станах), а перевага Bcl-2 захищає клітини від загибелі.

Ще одним фактором, який робить еозинофіли резистентними до Fas-L-індукованого апоптозу, є оксид азоту.

Хоча більш тонкі механізми апоптозу в розвитку алергійних захворювань ще не досліджено, явища, засновані на цьому типі загибелі клітин, уже тривалий час застосовуються в клініці. Так, для лікування бронхіальної астми призначають кортикоステроїди – найважливіші потенційні антизапальні агенти, які інгібують пролонгацію життя еозинофілів прямо – шляхом індукції в них апоптозу, або опосередковано – гальмуючи звільнення цитокінів цими клітинами. Теофілін, класичний бронходілятатор (бронходілятатори, або бронходілятатори – це препарати, що розширяють просвіт бронхів, звужених унаслідок спазму м'язів), також має антизапальний ефект, пов'язаний з індукцією апоптозу.

4.7. ГАСТРОЕНТЕРОЛОГІЧНІ ЗАХВОРЮВАННЯ

Значна кількість гастроентерологічних захворювань людини пов'язана як з активацією, так і з пригніченням процесів апоптозу в різних відділах шлунково-кишкового тракту (шлунку, тонкому кишечнику, печінці тощо). Посилення апоптозу

може бути зумовлене прямим впливом інфікуючих агентів (напр., вірусу гепатиту А, *Helicobacter pylory*), опосередковане імунною системою (хронічні вірусні ураження печінки, спричинені вірусами гепатитів В та С, неспецифічний виразковий коліт, хвороба Крона), токсичною дією медикаментів (кортикостероїди, імунодепресант циклоспорин А, який використовують для запобігання посттрансплантаційних ускладнень, цитостатики), хімічних речовин (азиди, пероксидні сполуки, вільні радикали), іонізуючого випромінення, нестачею трофічних факторів (глюкоза, амінокислоти метіонін і глутамін, вітамін Е, фолієва та пангамова кислоти, S-метилметіонін, ко-баламін). У низці інших гастроenterологічних захворювань апоптоз клітин, навпаки, не посилюється, а послаблюється. Такий антиапоптозний ефект характерний, зокрема, для так званих онкогенних вірусів (вірус Епштейна – Барра, цитомегаловірус, віруси герпесу, папіломи людини, папо- та адено-віруси). Ці віруси, утручаючись у механізми апоптозу, або блокують розвиток цього типу загибелі клітин через інактивацію проапоптозних факторів, або активують шляхи виживання клітин. Практично в усіх цих випадках інактивується білок p53 (підпідрозд. 3.2.3) і стимулюється експресія антиапоптозного білка Bcl-2 (підпідрозд. 3.2.2). Таке порушення програми апоптозу надалі може викликати виникнення або прогресію злойкісних пухлин, у тому числі й новоутворень ШКТ, а також бути причиною резистентності пухлинних клітин, що з'явилися, до впливу хіміотерапії. Крім зазначених вірусів, антиапоптозні властивості виявляє також низка цитокінів – фактор росту гепатоцитів, фактор росту нервів, епідермальний фактор росту, інсуліноподібний фактор росту-1, основний фактор росту фібробластів, IL-2 (але ряд інших цитокінів, напр. інтерферон, активують апоптоз).

Нижче будуть розглянуті сучасні відомості про участь порушень апоптозних процесів у низці найпоширеніших патологій ШКТ.

Вірусний гепатит А пов'язаний з прямою індукцією збудником апоптозу в інфікованих печінкових клітинах з наступним їхнім цитолізом. Унаслідок цього віріони здатні залишати

заражені гепатоцити ще до втручання імунної системи і за короткий термін інфікувати значну кількість інших печінкових клітин. У той же час апоптоз інфікованих клітин унеможливлює подальше розмноження вірусу в інфікованих гепатоцитах і тому сприяє досить швидкому звільненню організму від збудника, одужанню та пояснює відсутність хронічної форми захворювання.

Апоптоз залучений і до патології хронічних уражень печінки **вірусами гепатитів В та С**. У цьому випадку загибель інфікованих клітин поряд із безпосередньою індукцією віріонами опосередковується імунною системою, зокрема, здійснюється її цитотоксичними CD8+ клітинами за участю гранзим-В-перфорин-залежного шляху індукції апоптозу, а також Fas-R/ Fas-L-системи (підрозд. 3.3) (рис. 4.14).

Вірус гепатиту В інфікує більшість клітин печінки, і в більшості з них за участю імунних клітин виникає апоптоз. Під час швидкого розвитку зазначеного процесу спостерігають ознаки гострого гепатиту чи загострення хронічного. За досить довгої тривалості такого стану рівень процесів регенерації гепатоцитів стає невідповідним щодо рівня їхньої загибелі, тоді розпочинається невпинне прогресуюче заміщення паренхіматозних печінкових клітин на сполучну тканину з розвитком клінічних ознак цирозу. Інфікування вірусом більшої частини гепатоцитів, безперервне зараження нових печінкових клітин і пригнічення вірусним агентом Bcl-2- та p53-залежних шляхів апоптозу сприяють тривалій персистенції (*вірусна персистенція* – це збереження вірусу у функціонально активному стані в клітинах організму або в культурі тканин довше, ніж за умов гострої інфекції) збудника і хронічному перебігу вірусного гепатиту В.

Вірус гепатиту С має ще більш виражені проапоптозні ефекти на клітини печінки, які в цьому випадку можуть й не опосередковуватися імунною системою. Тому ця хвороба супроводжується ще більш інтенсивно прогресуючим фіброзом печінки за відсутності ознак запалення.

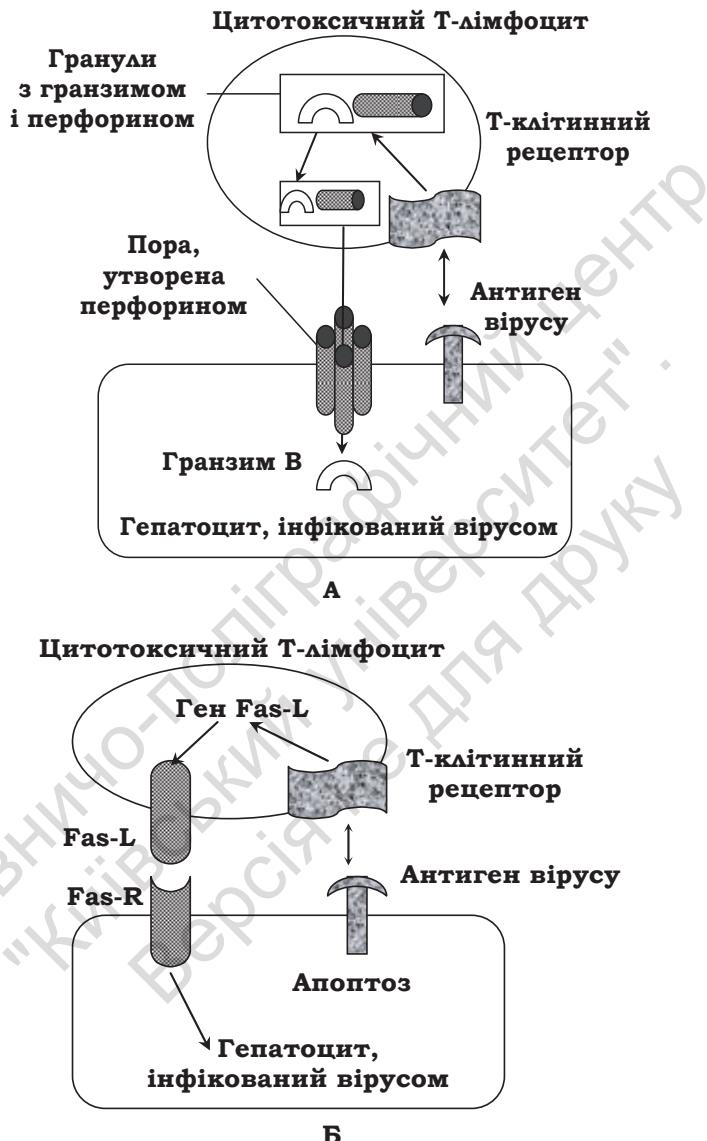


Рис. 4.14. Видалення інфікованого гепатоциту цитотоксичним Т-лімфоцитом за участю гранзим-В-перфоринзалежного шляху індукції апоптозу (**А**), а також Fas-R/Fas-L – системи (**Б**)

Завдяки дослідженням, які показали індукцію апоптозу в печінкових клітинах низкою жовчних кислот, зокрема гідрофобною дезоксихолевою та глікохенодезоксихолевою, з'явилася гіпотеза щодо можливості загибелі гепатоцитів шляхом цього типу програмованої загибелі клітин за умов **обструктивного холестазу**. У той же час відомо, що деякі інші жовчні кислоти, наприклад гідрофільні холева та урсодезоксихолева, можуть протекувати клітини печінки від загибелі через стабілізацію потенціалу внутрішньої мембрани мітохондрії та гальмування розвитку МРТ (підрозд. 3.4). *In vivo* на гепатоцити впливає суміш про- та антиапоптозних жовчних кислот. Тому не дивно, що в моделі обструктивного холестазу (лігатура жовчної протоки щура чи миші) не виявляють багатьох ознак апоптозу. Антиапоптозні жовчні кислоти та низка цитокінів включають надактивацію ядерного фактора NF- κ B (підрозд. 3.5), який запускає трансактивацію інгібіторів каспаз родини IAPs, що гальмує проапоптозні сигнали.

Результати останніх досліджень також указують на те, що за обструктивного холестазу ушкодження, індуковане жовчними кислотами, супроводжується розвитком запалення, що є ознакою некрозу. Ураховуючи сучасні погляди на наявність загальних етапів у процесах апоптозу і некрозу (некрапоптоз, підрозд. 3.11), можна зробити припущення, що форма загибелі гепатоцитів, індукована жовчними кислотами, залежить від характеру патологічних впливів: за умов холестазу, при якому вміст гідрофобних жовчних кислот зростає поступово, виявляють апоптоз (оскільки повільно зростає МРТ та відносно зберігається вміст АТФ); при гострій дії токсичних жовчних кислот МРТ швидко росте, АТФ втрачається, отже, розвивається некроз.

Апоптоз відіграє першочергову роль у розвитку інших різноманітних захворювань печінки – гепатоцелюлярної карциноми, алкогольних ушкоджень, автоімунних гепатитів, первинного біліарного цирозу, атрофії печінки, відторгнення трансплантованої печінки тощо. Цікаво, що при захворюваннях цього органа явище апоптозу виявили ще до того, як був запропонований термін "апоптоз": при вірусних і медикаментозних гепатитах, наприклад, виявляли так звані "ацидофільні тільця Коунсильмена", утворення яких, за сучасними даними, пов'язано саме із загибеллю гепатоцитів.

беллю гепатоцитів шляхом апоптозу – вони є ні чим іншим, як апоптозними тільцями.

Helicobacter pylori є етіологічним чинником **виразкової хвороби шлунка** і 12-палої кишki, а також викликає близько 90 % усіх хронічних гастритів. Цей мікроорганізм здатний безпосередньо стимулювати апоптоз оточуючих епітеліоцитів слизової оболонки шлунка, сприяючи її атрофії. Для хронічних гастритів характерними є прискорення оновлення клітин, унаслідок чого новоутворені епітеліоцити не встигають пройти повну диференціацію, і місце зрілих спеціалізованих клітин займають молоді клітини, не здатні виробляти соляну кислоту та пепсиноген. Імовірно, посила на загибель клітин спричиняє прискорення їхнього новоутворення (т. зв. *негативний зворотний зв'язок*); до того ж сама посила на проліферація активує апоптоз, що створює замкнене коло. При тривалому переважанні процесів апоптозу над проліферацією розвивається *атрофія слизової оболонки* з ознаками *атрофічного гастриту*; при значній швидкорозвинутій перевазі кажуть про утворення ерозії або виразки. Якщо ж домінуючими стають процеси проліферації, це спричиняє *гіпертрофію слизової оболонки шлунка* із симптомами *гіпертрофічного гастриту*. До того ж, оскільки посилення процесів проліферації за певних умов може спричинити зложакісне переродження клітин і виникнення новоутворень, гіпертрофічний гастрит вважають передраковим станом. За іншими спостереженнями ще небезпечнішим щодо можливості виникнення пухлинного росту є атрофічні стани – атрофічний гастрит і цироз печінки, оскільки в цьому випадку, як уже зазначалося, присутнє явище масового апоптозу, яке викликає надалі таке ж масове зростання інтенсивності проліферації й знижує елімінацію мутованих клітин. Це порушує розподіл у клітинах факторів росту, які контролюють спрямування клітин, що утворюються, на наступні етапи дозрівання. Через нестачу факторів росту ціла тканина вилучається з процесу диференціації й підлягає апоптозу; у той же час мутовані її клітини, що містять змінені онкогени, здатні блокувати в собі процеси апоптозу і залишаються недиференційованими, постійно проліферуючими, безсмертними і утворюють свій клон – пухлину. Така гіпотеза, що пов'язує виникнення пухлинного росту

з випадінням клітин із процесів диференціації, була висловлена в 1998 р. В. Галицьким.

Щодо механізмів Нр-індукованого апоптозу, то ця індукація спричиняється безпосередньо самим мікроорганізмом. Ліпополісахариди Нр, введені у шлунок, збільшують активність апоптозу майже в 100 разів. Крім того, цей тип загибелі клітин запускає аміак, що утворюється при розщепленні сечовини уреазою Нр. Проапоптозну дію має і низка білкових сполук, що синтезуються окремими штамами Нр – зокрема протеїни Cag-A (від *cytotoxine associated – асоційований із цитотоксином*) та Vac-A (*вакуолізуючий токсин*). Найбільш високою проапоптозною активністю володіють Cag-A-позитивні штами (ті, що продукують зазначену сполуку). Цей мікроорганізм також активізує Fas-R/ Fas-L-систему епітеліальних клітин (підрозд. 3.3) і здатний прямо послаблювати чи руйнувати контакти між епітеліоцитами (*анойкоз* – особлива форма апоптозу, за якої причиною загибелі клітини стає її відокремлення від сусідніх клітин). Аноїкоз спричиняє активацію JNK-кіназного каскаду і розвиток апоптозу або веде до клітинної загибелі через посилене виділення окремими клітинами TNF α .

Адгезія Нр супроводжується збільшенням числа нейтрофілів у слизовій оболонці. При цьому лейкоцити виробляють такі індуктори апоптозу, як АФК та NO. Отже, лейкоцитарна інфекція слизової оболонки за умов Нр-індукованого апоптозу є не наслідком загибелі клітин (лейкоцитарна реакція як наслідок характерна для некрозу), а однією з його причин.

Найпоширенішим із захворювань тонкого кишечнику є *целіакія*, або глютенова ентеропатія з ознаками гіперрегенераторної атрофії слизової оболонки, за якої атрофія ворсинок співіснує з гіперплазією крипт і посиленою проліферацією епітелію тонкого кишечнику. При активній формі целіакії різко зростає активність апоптозу; за аглютенової дієти інтенсивність цього типу клітинної загибелі швидко нормалізується.

Окреме місце при гастроентерологічній патології посідають онкологічні захворювання, зокрема рак шлунку, колоректальний рак, рак печінки. Загальні положення про роль порушення регуляції процесів апоптозу в пухлиногенезі наведено в підрозд. 4.1.

Цікаво, що рак тонкого кишечнику зустрічається дуже рідко, однією з причин цього може бути відсутність у його клітинах експресії антиапоптозного білка Bcl-2; колоректальний рак (рак товстої кишки) виявляється досить часто через посилену експресію зазначеного білка. Рак печінки пов'язаний із впливом генотоксичних і негенотоксичних факторів (етанол, цитотоксичні та прозапальні фактори, низка ліків, стероїдні гормони, деякі харчові продукти), що можуть впливати на ріст передпухлинних і пухлинних клітин.

4.8. Інші захворювання, пов'язані з порушенням процесів апоптозу

Найбільш виражені форми посилення апоптозу протягом внутрішньоутробного розвитку, при яких у процес апоптозу включаються клітини будь-яких типів, зазвичай несумісні з розвитком плода і ведуть до внутрішньоутробної загибелі.

Локальні розлади такого роду проявляються як дефекти розвитку з формуванням "мінус-тканини" (напр., "вовча пастка" – вроджена розщілина піднебіння, та "заяча губа" – вроджена розщілина губи) (рис. 4.15). Іншим прикладом може бути низка вроджених ушкоджень серця. У II триместрі розвитку плода в серці відбувається перебудова тканинних структур, в якій важлива роль належить апоптозу. Ці процеси порушуються при синдромі Дауна, що спричиняє формування міопатії.

Найбільш поширеними серед подібних дефектів розвитку є різного роду *аплазії* та *дегенеративні процеси*: тотальна лімфопенія (супроводжується загибеллю попередників В- і Т-лімфоцитів), апластична анемія, анемія при дефіциті заліза, фолатів, вітаміну В12, таласемія, тромбоцитопенія, нейропенія, панцитопенія (аналогічні причини). Вони пов'язані з нестачею факторів виживання клітин-попередників кісткового мозку (*гемопоетичних факторів росту* – глікопротеїнів (табл. 4.6)), які регулюють проліферацію й диференціювання клітин-попередників, а також функції зрілих клітин крові. Крім наведених у таблиці найважливіших факторів

Біохімічні механізми апоптозу

росту, до гемopoетичних також належать IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IL-10, гамма-інтерферон і тромбопоетин.



Рис. 4.15. Локальні вроджені розлади, пов'язані з дисфункцією апоптозу під час внутрішньоутробного розвитку:

А – "вовча пастика" й "заяча губа"; **Б** – аплазія кисті руки

Наприклад, інактивація генів IL-2, IL-7, IL-9, IL-4, IL-15 або рецепторів до цих факторів, розташованих на клітинах-мішенях, спричиняє тяжкий комбінований імунодефіцит з ознаками тотальної лімфопенії. Подібні причини лежать в основі й інших зазначених розладів кровотворення. У клініці з метою лікування постцитостатичної цитопенії (стан, зумовлений хемотерапією онкологічних захворювань), нейропенії, апластиичної анемії, мієлодисплазії застосовують GM-CSF та G-CSF.

При **інфекційних процесах** індукторами апоптозу служать бактеріальні ендотоксини (напр., ліппополісахарид кишкових мікроорганізмів) та екзотоксини (напр., стафілокок). Масовий апоптоз, опосередкований фактором некрозу пухлин, розвивається при сепсисі. При вірусних інфекціях співіснують фактори, які індукують та інгібують апоптоз, адже вірусам "не вигідна" тотальна загибель клітин-мішеней.

Таблиця 4.6. Найважливіші гемопоетичні фактори росту

Фактор росту	Клітини-мішені	Клітини-продуценти
Родина TGF-β	Велика кількість типів тканин	Велика кількість типів клітин
IGF-1 і -2	Велика кількість типів тканин	Печінка
IL-3	Гемопоетичні клітини	Т-лімфоцити
M-CSF	Гемопоетичні клітини	Фібробласти, моноцити, ендотелій
G-CSF	Гемопоетичні клітини	Макрофаги, фібробласти, ендотелій
GM-CSF	Гемопоетичні клітини	Т-лімфоцити, макрофаги фібробласти, ендотелій
Еритропоетин	Гемопоетичні клітини	Нирки

Уперше роль апоптозних процесів в **ембріональному розвитку м'язів** була показана на комахах. Сьогодні відомо, що аналогічні процеси притаманні ембріональним скелетним м'язам птахів, ссавців, у тому числі й людини, причому в останньому випадку втрата м'язових клітин може відбуватися на різних стадіях розвитку.

Утрата м'язових клітин у результаті посилення апоптозу також спостерігається в ранній постнатальний термін, але вже як патологічний процес. Так, у немовлят із фатальною формою **хвороби Вердніга – Хофмана** (спінальна м'язова атрофія, див. також підрозд. 4.4) частково недозрілі м'язові клітини підлягають видаленню шляхом апоптозу. Діти з такою патологією гинуть на 80-му тижні після народження.

На тваринних моделях, а також на зразках, отриманих у клініці, доведено, що атрофія м'язів супроводжується втратою ядер міоцитів і, як наслідок, – масивним зникненням цитоплазматичних білків. Причини і деякі механізми реалізації апоптозної програми в нейронах за цього патологічного стану детально було розглянуто в підрозд. 4.4. Цікавий момент виявився при дослідженні атрофованих і нормальних міофібріл в експресіях про- і антиапоптозних членів родини Bcl-2. Для Вах – проапоптозного білка – ха-

рактерна постійна наявність експресії в обох типах м'язових клітин, причому рівні Bax-експресії корелюють з порушенням інервації міофібріл; антиапоптозні Bcl-2 та Bcl-x_L білки виявляються лише в атрофованих міофібрілах, головним чином на пізніх стадіях спінальної м'язової атрофії. Поясненням цього може бути необхідність ініціації експресії антиапоптозних факторів для нейтралізації високих рівнів Bax, оскільки відсутність такої експресії за дефіциту іннервації продукуватиме вторинно загибель міофібріл.

Роль апоптозу в **запальніх міопатіях** (поліміозити, дерматоміозити) дискусійна. Зокрема, при поліміозитах деякі міофібріли є Fas-R-позитивними (за розміром вони менше тих, які не є носіями зазначеного рецептора), у той же час основних типових ознак цієї клітинної загибелі – ДНК-фрагментації, наявності експресії Bax – не виявлено; до того ж TUNEL-аналіз (розд. 6) не виявляє апоптозних клітин.

У дослідженнях на тваринах виявлена участь апоптозу в **загибелі м'язів, індукованій надмірними м'язовими навантаженнями**, обговорюється його причетність до розвитку **дистрофінопатій**.

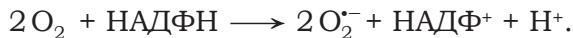
У **захворюваннях легень** патогенетичним фактором може бути як посилення, так і послаблення апоптозу. Недостатність видалення пошкоджених клітин шляхом апоптозу пролонгує запалення через звільнення токсичного вмісту цих клітин і знижує репаративні процеси. За нормального рівня апоптозу клітини з його ознаками надалі швидко упізнаються і поглинаються макрофагами чи сусідніми клітинами (підрозд. 3.12), що унеможливлює звільнення їхніх шкідливих компонентів і запобігає розвитку загибелі клітин шляхом некрозу. Зростання рівня апоптозу також спричиняє патологічні стани, наприклад, інтратрахеальний вплив Fas-L індукує гостре пошкодження епітелію альвеол і розвиток запалення легенів. Крім рецепторів і лігандів смерти, у патофізіологію захворювань цих органів дихання включаються й інші проапоптозні чинники: ROS, NO, прозапальні цитокіни, ін. Здатність епітеліальних та ендотеліальних клітин легенів до виживання, а також доля клітин, збільшення вмісту яких є характерним для запалення, можуть модулювати прогноз щодо протікання хвороби.

За **гострого ушкодження легень** у легеневій тканині пацієнтів виявляють апоптоз альвеолярних епітеліальних та ендотеліальних клітин за участю рецепторів смерті. В епітеліальних клітинах альвеол з'являється надекспресія Bach та Bcl-2; кількість клітин, що стали на шлях апоптозу, при цьому асоціюється з прогнозом захворювання.

Важливим фактором гострого пошкодження легень є ліпополісахарид. Він індукує апоптоз як в епітеліальних, так і в ендотеліальних клітинах, при цьому залишаючи активацію Fas-R/Fas-L-системи та каскаду каспаз. Виявлено, що застосування інгібітору каспаз широкого спектра – трипептида бензилоксикарбоніл-Val-Ala-Asp-флуорометилкетона (z-VAD.fmk) – протектує АПС-індуковане ушкодження легенів у мишей, тому застосування речовин-блокаторів апоптозних протеаз може бути новим потенційним напрямом щодо терапії вказаної патології. Інгібування Fas-R/Fas-L-системи також є однією з можливих стратегій у цьому плані.

Відновлення після гострого пошкодження легенів передбачає елімінацію проліферуючих мезенхімальних клітин і нейтрофілів, вміст яких зростає при запаленні, з альвеолярного простору або із стінок альвеол. Нейтрофіли відіграють важливу роль у загибелі ендотелію та епітелію при ураженні легень. Тому видалення апоптозних нейтрофілів макрофагами є важливим у запобіганні розвитку запалення й одужанні. Це забезпечує зниження продукції макрофагами прозапальних цитокінів, наприклад IL-1, TNF α , і зростання утворення трансформуючого фактора росту TGF β та фактора росту гепатоцитів HGF, які забезпечують регенерацію тканини, що встало на шлях загибелі. Відповідно, недостатність трьох зазначених систем: оптимальний рівень апоптозу нейтрофілів (1), видалення апоптозних нейтрофілів шляхом фагоцитозу (2) та звільнення ростових цитокінів фагоцитами (3) веде до пролонгації запалення і неможливості відновлення тканини.

ROS індукують апоптоз ендотеліальних та епітеліальних клітин легень за **гіпероксичних станів**. Гіпероксія через активацію НАДФН-оксидази генерує ROS (підпідрозд. 3.11.3):



НАДФН-оксидаза

Більшість O_2^- швидко перетворюється на H_2O_2 (спонтанно або за участю СОД), або сполучається з іншими реактивними молекулами.

Як уже зазначалося (підпідрозд. 3.11.3), дія активних форм кисню опосередковується через активацію МАР-кіназ. До того ж ROS (зокрема H_2O_2) можуть індукувати активацію Fas-рецептора шляхом активації цитоплазматичного транспорту Fas-R до клітинної поверхні і залучати p53-опосередкований апоптоз, безпосередньо впливати на мітохондріальні процеси тощо. Тому стратегії відновлення ROS за участю антиоксидантів можуть мати певний успіх щодо зниження пошкодження клітин альвеолярного енд- та епітелію. Корисними в плані відновлення клітин після гіпероксії можуть бути також такі ростові фактори, як фактор росту кератиноцитів (KGF, запобігає індукації p53, Bax та Bcl-2) та фактор росту гепатоцитів HGF (активує антиапоптозні білки FLIP (підрозд. 3.3)) і Bcl-x_L та інгібує проапоптозні Bid та Bax).

Посилене загибель паренхіматозних клітин легенів може спричинити незворотне ураження тканин і розвиток **пульмонарого фіброзу**. Моделлю цього стану на тваринах є блеоміцин-індукований пульмонарний фіброз. Дослідження на цій моделі, а також аналіз зразків тканин пацієнтів показують на активацію за умов розвитку ПФ як рецептор-залежного апоптозу, так і його мітохондріє-опосередкованого шляху (підрозд. 3.4). Масивний апоптоз і надекспресію Fas-рецептора виявляють у бронхіальних та альвеолярних епітеліальних клітинах; відповідно вміст Fas-L зростає на поверхні інфільтруючих лімфоцитів. Блокування зазначених структур може запобігти розвитку патологічного стану; зокрема, Fas-R-(Fas-L-) дефіцитні миші резистентні до індукації пульмонарного фіброзу в розглянутій моделі. У тих альвеолярних епітеліальних клітинах, що не експресують Fas-R, апоптоз розвивається за участю білків p53 та p21 (підрозд. 3.2.3), але цей механізм є другорядним. Інгібітор каспаз z-VAD.fmk гальмує прогресію блеоміцин-індукованого, пульмонарного фіброзу, що доводить участь у реалізації апоптозної програми каскаду каспаз і дає можливість розглядати інгібу-

вання цих ферментів як потенційну стратегію антифіброзної терапії. Потенційними мішенями для розробки нових шляхів терапії пульмонарного фіброзу також можна вважати вказані вище ростові фактори KGF та HGF, які сприяють диференціації альвеолярних клітин, зростанню процесів синтезу ДНК і зниженню процесів загибелі клітин.

За умов розвитку **бронхіальної астми**, навпаки, спостерігається зниження процесів апоптозу. Це захворювання характеризується алергійним запаленням дихальних шляхів, їхньою обструкцією, акумуляцією еозинофілів і лімфоцитів у бронхіальному слизу через знижений рівень апоптозу цих клітин, що пролонгує алергійне запалення і є критичним у патофізіології астми (детальніше див. підрозд. 4.6). Кортикостероїди та теофілін – речовини, що найчастіше застосовуються з метою лікування бронхіальної астми – знижують тривалість життя еозинофілів і лімфоцитів шляхом індукції апоптозу.

На цей час доведено роль апоптозу в патогенезі **низки захворювань нирок**. Активізацією апоптозу супроводжуються **гломерулосклероз, інтерстиційний нефрит, полікістоз нирок, гостра ниркова недостатність**. Апоптоз пригнічується при **гломерулонефриті, IgA-нефропатії, абсцесі нирки, пухлинних захворюваннях**. Зокрема, нефропатії різного генезу характеризуються посиленою клітинною проліферацією з накопиченням внутрішньоклітинного матриксу і наступним зморщуванням тканини. При подальшій прогресії хвороби **гломеруллярні клітини (клітини ниркових клубочків)** стають чутливішими до індукції апоптозу, що спричиняє їхню значну втрату й розвиток гломерулосклерозу. У той же час для більшості захворювань нирок (полікістозу, гострої ниркової недостатності тощо) основною причиною стає не апоптоз клітин клубочків, а загибель клітин канальцевого *епітелію* (уротелію, тубулярних клітин). На інтенсивність процесів апоптозу в нирковій паренхімі найчастіше впливають два процеси – інфекція сечовивідної системи та (або) порушення уродинаміки. Зокрема, пієлонефрит активізує загибель клітин кортикального шару нирки, при цьому спостерігається уповільнення росту органа, а ознаки де-

структур виявляють не лише безпосередньо в осередку інфекційного запалення, але й у прилеглих ділянках. Хронічна обструкція сечоводу спричиняє масивний апоптоз клітин ниркових каналців через пригнічення експресії антиапоптозного Bcl-2 у цих клітинах. Останні дослідження виявили, що речовини, які зазвичай використовують як терапевтичні агенти для лікування піелонефритів – аміноглікозиди (напр., гентаміцин), навіть у малих дозах мають виражену проапоптозну дію і таким чином ускладнюють процеси репарації тканини нирок і збільшують імовірність розвитку нефросклерозу.

Полікістоз нирок (автосомальне домінантне захворювання на полікістоз нирок) – це системний спадковий розлад, імовірність виникнення якого варіє в межах від 1:400 до 1:1000 на всій планеті. Патологічною подією захворювання є апоптоз клітин каналців нирок – його високі рівні виявляють як у зразках, отриманих від хворих осіб, так і в модельних дослідах. Потенційною терапевтичною мішенню можуть бути каспази, їхні інгібітори значно знижують апоптоз та уповільнюють морфологічну і функціональну прогресію хвороби.

Апоптозу відводять не останню роль у патофізіології **остеопорозу**. Це захворювання розглядають як "системну патологію скелета", що характеризується зниженням кісткової маси (остеопенія), порушенням мікроархітектоніки кісткової тканини, зростанням її крихкості та збільшенням ризику щодо виникнення переломів. Скелет дорослої людини підлягає ремоделюванню, під час якого оновлена кісткова тканина заміщує старіючу окремими групами функціонуючих остеокластів та остеобластів. Генез і частота апоптозу цих клітин мають вирішальне значення в підтримці гомеостазу кістки. Цитокіни та остеогенні фактори росту, що продукуються мікроточенням кістки, мають значний вплив на процеси апоптозу в кісткових клітинах. До того ж клітинна загибель перебуває під контролем й інших факторів, зокрема віку (підрозд. 4.9), змін гормонального фону.

До патогенезу **офтальмологічних розладів** унаслідок зниження кровопостачання органа зору також залишається загибель клітин шляхом апоптозу. Така схема характерна, зокрема, для численних ішемічних станів ока, для абіотрофій (це втрата функцій органа зору без будь-якої явної причини, наприклад абіотрофія сітківки, що характеризується прогресуючою дегенерацією сітківки, яка веде до погіршення якості зору і виникає через різноманітні генетичні дефекти), катаракти (помутніння кришталика), глаукоми, ретинобластоми (це злоякісна пухлина ока, що розвивається в дитячому віці із тканин ембріонального походження), діабетичної ретинопатії (підрозд. 4.4).

Результатом апоптозу при **глаукомі** є незворотна втрата зору. Основним проявом глаукоми є зростання внутрішньоочного тиску унаслідок порушення відтоку внутрішньоочної рідини. При цьому первинне пошкодження окремих аксонів унаслідок їхньої прямої компресії (стискання) в місцях проходження крізь решітчасту мембрани спричиняє низхідну й висхідну атрофію зорового нерва; гангліозні клітини сітківки, аксони яких створюють зоровий нерв, гинуть вторинно.

Згідно з цією гіпотезою необхідні фактори для трофіки гангліозних клітин сітківки, зокрема нейротрофічний фактор мозку (*brain derived neurotrophic factor, BDNF – нейротрофічний фактор мозкового походження*), утворюються в мозку і ретроградним шляхом (тобто від нервових закінчень до тіла гангліозної клітини) у напрямку від мозку до ока переміщуються до останнього. Унаслідок стискання аксонів такий ретроградний транспорт гальмується, і в гангліозних клітинах сітківки через недостатність трофічних факторів розвивається апоптоз. При цьому в ушкоджених клітинах виявляють характерні ознаки цього типу загибелі клітин: фрагментацію ДНК, конденсацію хроматину, утворення апоптозних тілець.

Цікаво, що при глаукомі апоптозу підлягають саме гангліозні клітини сітківки, аксони яких ушкоджені; усі інші структури сітківки ознак апоптозу не виявляють.

Одним із можливих медіаторів апоптозу при глаукомі є колапсин-1, що секретується самими аксонами. Цей білок викликає

апоптоз у гангліозних клітинах сітківки і не впливає на клітини нейроглії. Участь колапсину-1 в реалізації клітинної загибелі підтверджується застосуванням антитіл до цих білків: вони здатні запобігти апоптозу.

Крім прямої дії надлишкової компресії, причиною появи посередників апоптозу можуть бути ішемізація тканини, ендотельна екзогенна інтоксикація. Наприклад, у випадку гострої ішемії, механічної травми чи впливу дуже яскравого світла зростає продукція медіатора ретинальних нервових процесів L-глутамату, надлишок якого, у свою чергу, викликає зростання утворення NO і супероксиду – активних радикалів, впливи яких спричиняють загибель клітин. Глутамат активує постсинаптичні іонотропні глутаматові NMDA-(N-метил, D-аспартатні) рецептори, що спричиняє відкриття Ca^{2+} -каналів і посиленій вхід Ca^{2+} до клітини. На жаль, лікарські препарати, що тривало чи незворотно блокують NMDA-рецептори, також спричиняють значні побічні ефекти – нейротоксикоз, психози, навіть летальні наслідки. Такій "глутаматовій токсичності" належить провідна роль у дегенерації гангліозних клітин сітківки за первинної глаукоми.

NO залежно від концентрації може як стимулювати клітинну загибель шляхом апоптозу (підрозд. 3.11), так і сприяти виживанню клітин. Блокада NO-сінтази інгібує апоптоз і посилює дію нейротрофічного фактора BDNF на гангліозні клітини сітківки. У той же час за певних концентрацій NO має ефективний антиапоптозний ефект, реалізація якого залучає інактивацію низки каспаз (-3, -1, -8) та блокаду інших шляхів апоптозу. Крім прямого впливу на апоптозні процеси, оксид азоту за певних концентрацій знижує тонус судин ока, зменшуючи перфузію, змінюючи опір відтоку камерної вологи, зменшує щільність гангліозних клітин сітківки, таким чином усуваючи ці небажані за глаукоми ефекти.

Ще одним фактором індукції апоптозу при глаукомі є надлишковий вміст у водянистій волозі передньої камери ока продуктів ПОЛ та ROS (підпідрозд. 3.11.3).

4.9. АПОПТОЗ І СТАРІННЯ

В аналогічних клітинах людей різного віку змінюється активність 10–15 % усіх генів. Функція більшості з них при старінні знижується, гени "замовкають", тоді як інші – навпаки, активізуються. В експериментах на тваринах показано, що пригнічення активності певних генів збільшує тривалість їхнього життя. Наявність такого активного "включення" генів при реалізації програми старіння доводить необхідність існування системи старіння як механізму видалення окремих індивідуумів задля збереження виду. Як ще в 1882 р. відмітив німецький учений А. Вейсман, "недієздатні індивідууми не лише некорисні для виду, а й навіть шкідливі, оскільки займають місце дієздатних". А в 1982 г. С. Уманський висловив гіпотезу, що старіння може бути наслідком плейотропної дії генів, які відповідають за реалізацію програми апоптозу.

Клітинне і тканинне старіння є основою старіння всього організму. Клітини, що старіють, залежно від свого статусу (клітини, що не підлягають поділу; слабопроліферуючі та швидкопроліферуючі клітини) мають одну із двох характерних рис. Вони не підлягають поділу, оскільки не можуть подолати "ліміт Хейфліка" (підрозд. 3.10) у випадку клітин, що діляться – це, у першу чергу, стосується клітин шкіри, кровоносної та імунної систем, або знижується їхня функціональна активність (для тих клітин, що не діляться – напр., більшість нервових і м'язових клітин).

Старіння багатьох типів клітин асоційовано зі змінами в їхній чутливості до індукторів апоптозу. У більшості випадків такі зміни передбачають збільшення цього показника (зокрема, це стосується гепатоцитів, ооцитів, Т-клітин, мегакаріоцитів, макрофагів, хондроцитів-ендотеліоцитів, нейронів, спленоцитів, кардіоміоцитів) внаслідок вікової зміни в експресії про- та антиапоптозних генів, посиленої продукції ROS, укорочення теломер, зменшення постачання ростовими факторами тощо [4].

Апоптоз під час старіння, як і в нормі, захищає організм від старих клітин, генетичний матеріал яких з віком накопичує мутації, та передпухлинних клітин. Дисфункція цього типу програмованої загибелі клітин, у тому числі й при старінні, має прямий вплив на розвиток дегенеративних чи неопластичних вікових змін. Це пояснює виникнення таких станів переважно в похилому віці. Старіння серця асоційовано з утратою кардіоміоцитів через апоптозну загибель, пов'язану зі зростанням у клітинах вмісту Ca^{2+} і активацією процесів міжнуклеосомальної фрагментації ДНК. При старінні сенсорні клітини внутрішнього вуха також гинуть шляхом апоптозу, наслідком чого може бути погіршення слуху і порушення функціонування вестибулярного апарату. Вікова дисфункція апоптозу особливо шкідлива, коли вона стосується непроліферуючих клітин, наприклад клітин нервової та м'язової систем, оскільки вони не можуть бути замінені шляхом клітинної проліферації, і тому внаслідок посиленої загибелі клітин порушується тканинний гомеостаз.

Зміни співвідношення про- та антиапоптозних факторів у слабкопроліферуючих клітинах імунної системи стають причиною імунного старіння. Імунне старіння характеризується зміною фенотипу Т-клітин і зниженням Т-клітинної відповіді внаслідок втрати останніх шляхом апоптозу. Крім того, з віком також зростає елімінація й інших клітин, що беруть участь у регуляції імунної відповіді – макрофагів, спленоцитів, тимоцитів. Останні дослідження показали, що Т-лімфоцити CD4+ й CD8+ людей похилого віку, а також людей із синдромом передчасного старіння є високочутливими до Fas-R-опосередкованого апоптозу через підвищенну експресію Fas-рецептора і Fas-ліганду, зниження експресії антиапоптозних білків Bcl-2 і Bcl-xL та зростання проапоптозного Bax.

З віком зростає продукція макрофагами, Т- та В-клітинами TNF α , що сприяє індукції апоптозу клітин-мішеней у відповідь на стимуляцію клітин імунної системи. Старіння асоціюється з прогресивним зниженням функцій нирок, зокрема розвитком гломерулосклерозу, патогенез якого передбачає елі-

мінацію клітин ниркових клубочків (підрозд. 4.8). Збільшення рівня апоптозу виявлено в суглобових хрящах старіючих мишей та щурів, а також при дослідженні міжхребцевих дисків людини, що може підвищувати ризик виникнення міжхрящової вікової дегенерації. Виявлений у старіючих мишей апоптоз інших клітин – ооцитів – може бути однією із причин зниження їхньої плодючості.

Вікова дерегуляція клітинної загибелі стосується і швидко-проліферуючих клітин. Так, унаслідок надекспресії Fas-рецептора старіння сприяє збільшенню чутливості гепатоцитів до індукторів апоптозу; старіючі фібробласти, навпаки, стають більш стійкими до цього типу загибелі клітин через утрату здатності до зниження експресії антиапоптозного гена *bcl-2* у відповідь на індукцію апоптозу, що порушує функцію сподучної тканини.

Розглянуті вікові зміни в регуляції механізмів апоптозу, які відбуваються у більшості типів клітин, пов'язані зі збоем цих процесів на різних рівнях: ядра, мітохондрій та міжклітинної регуляції. На рівні ядра при старінні змінюється експресія й активність генів різних про- та антиапоптозних факторів, регуляторних білків, які залучені до реалізації апоптозної загибелі клітин (напр., *p53*, генів, що кодують білки родини *Bcl-2*, генів Fas-рецептора і Fas-L тощо). Ядерні процеси тісно пов'язані з подіями в мітохондріях, оскільки останні реалізуються білками *Bax*, *Bcl-2*, які до того ж контролюються білком *p53*. Міжклітинні механізми включають зміни у складі тканинної рідини, що оточує клітину (зокрема, вміст гормонів і цитокінів), та у вмісті лігандів receptorів загибелі (підрозд. 3.3); вони також пов'язані з ядерними.

З віком в організмі збільшується продукція активних форм кисню, що в одних клітинах сприяє накопиченню ушкоджених вільними радикалами молекул білків, жирів і ДНК, а в інших активує клітинне самогубство. Зміни (мутації) ДНК, що утворилися внаслідок такого ушкодження, підвищують ризик утворення пухлин, причому гени, що відповідають за відновлення цієї молекули в молодому віці, за невідомої досі причини

ни при старінні втрачають свою активність і стають неефективними. Тому найважливішими напрямами досліджень геронтологів (учених, що займаються проблемами старіння) є намагання зменшити контакт вільних радикалів із внутрішньоклітинними молекулами або посилити "ремонтні" механізми клітини для швидшого повного відновлення пошкоджених біологічних молекул. Адже порівняння тривалості життя тварин різних видів показало, що цей показник корелює з ефективністю природних систем антиоксидантного захисту клітин – активністю супероксиддисмутази, вмістом β-каротину й а-токоферолу в сироватці крові. Зокрема, птахи, що харчуються падаллю – ворони, грифи – у ході еволюції набули посилену систему ферментів, яка захищає їхні організми від впливів надлишкового утворення активних форм кисню і сприяє більшій тривалості життя.

Ще одним явищем, яке пов'язує між собою процеси апоптозу і старіння, є вкорочення теломер (підрозд. 3.10). Після того, як довжина теломерної ДНК стає гранично короткою, настає період кризи – нездатності клітини до подальших поділів, що сприяє запуску її загибелі шляхом апоптозу.

Старіння неможливо відокремити від патологій, які його супроводжують (табл. 4.7), тому деякі дослідники розглядають старість як захворювання, за якого відбувається дисрегуляція апоптозу.

Процеси дегенерації тканин відбуваються у всіх без винятку старіючих індивідуумів; численні вікові патології кровоносних судин (атеросклероз – підрозд. 4.3, гіпертонія), серця (ишемічна хвороба, інфаркт, інсульт – підрозд. 4.3), нервової системи (хвороби Паркінсона, Альцгеймера, аміотрофічний латеральний склероз – підрозд. 4.4), офтальмологічні захворювання (підрозд. 4.8) пов'язані з прискоренням цієї дегенерації. Уповільнення загибелі клітин спричиняє накопичення в організмі шкідливих мутацій та розвиток онкологічних захворювань (підрозд. 4.1).

Таблиця. 4.7. Найважливіші вікозалежні розлади

Система організму	Найбільш характерні розлади
Серцево-судинна система	Атеросклероз, гіпертонія, ішемічна хвороба, інфаркт міокарда
Імунна система	Організм перестає опиратися вірусам і бактеріям; прогресія СНІДу, автоімунних і лімфопроліферативних розладів; швидке розповсюдження ракових метастазів
М'язова система	Аміотрофічний латеральний склероз
Нервова система	Дегенеративні розлади, що супроводжуються втратою пам'яті, координації, здатності до навчання, а в тяжких випадках – хвороби Альцгеймера, Паркінсона; офтальмологічні розлади (глаукома, вікозалежна ретинальна дегенерація); аміотрофічний латеральний склероз

4.10. АПОПТОЗ І СТРЕС

Термін *стрес* (від англ. *stress* – *напруження*) був уперше введений канадським лікарем-патологом австро-угорського походження Гансом Сельє (рис. 4.16) для позначення "загального адаптаційного синдрому, що викликається ушкоджувальними агентами", ще в 1936 р., хоча в біологічних і медичних науках він поширився наприкінці 40-х – на початку 50-х рр.

Згідно з науковою концепцією Сельє, розробленою всередині ХХ ст., у відповідь на дії *стресора* (пошкоджувального агента) у гіпофізі синтезується пептидний адренокортicotропний гормон (*АКТГ*, або *кортиcotропін*), який,

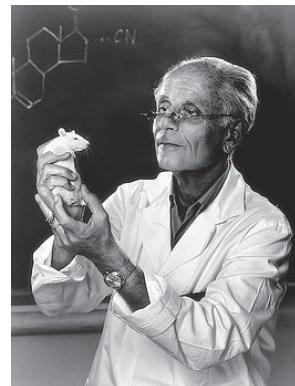


Рис. 4.16. Ганс Сельє

у свою чергу, індукує вироблення гормонів корою наднірникової залози (*кортикостероїдів*, до яких належать глюкокортикоїди – ці терміни також були введені Г. Сельє). Кортикостероїди мають сильний вплив на всі органи і тканини, у тому числі й на головний мозок. Саме під їхнім впливом в організмі розвивається *стрес-реакція*: посилюються обмінні процеси, пригнічуються імунні й запальні реакції, змінюється вміст нейротрансмітерів (мессенджерів нервової системи) у різних відділах головного мозку тощо.

Таким чином, залишаючи *гіпофіз*, діють на коркову речовину нирок всі стресори. Пізніше, у 1979 р., Сельє додав до цієї схеми *гіпоталамус*, що виробляє інший пептидний гормон – *кортиколіберин*, або *кортикотропний релізінг-фактор* (від *release* – звільнювати), який має активуючий вплив на продукцію АКТГ передньою часткою гіпофізу, і зробив висновок, що механізм стрес-реакції запускається в гіпоталамусі під впливом нервових імпульсів, які надходять з кори головного мозку та інших відділів нервової системи (рис. 4.17).

Стероїдні гормони кори наднірникової залози здійснюють також регуляторні впливи на тривалість і розвиток стресу: проникаючи в головний мозок, вони гальмують вироблення кортиколіберину за механізмом *негативного зворотного зв'язку*, що сприяє затуханню стресової відповіді.

У теорії стресу АКТГ і кортикоїди мають ще одну загальну назву – *адаптивних гормонів*, оскільки утворюються у великих кількостях за умов адаптації організму до змін, які викликає стресор. Кортикоїди спричиняють поступове руйнування лімфатичних органів (лімфатичних вузлів і тимусу), утрату лімфоцитів і еозинофілів, при цьому спостерігається гіпертрофія кори наднірникової залози, появу виразок у шлунково-кишковому тракті. Якщо піддослідним тваринам ввести надмірну кількість кортикостероїдів, вони будуть мати аналогічні зміни. Розлади, що виникають в організмі людини чи тварин під впливом власних, ендогенних, чи надлишкового надходження екзогенних кортикоїдів, мають назву *захворювань адаптації*. Це не патології одного органа, вони не викликаються

дією певного чинника – це комплекс захворювань, в основі яких може бути вплив будь-якого із численних агентів, і в розвитку яких особливу роль відіграє фактор порушення адаптації. Оскільки адаптація є внутрішньою властивістю самого організму, такі захворювання організм перемагає самостійно, без терапевтичних втручань.

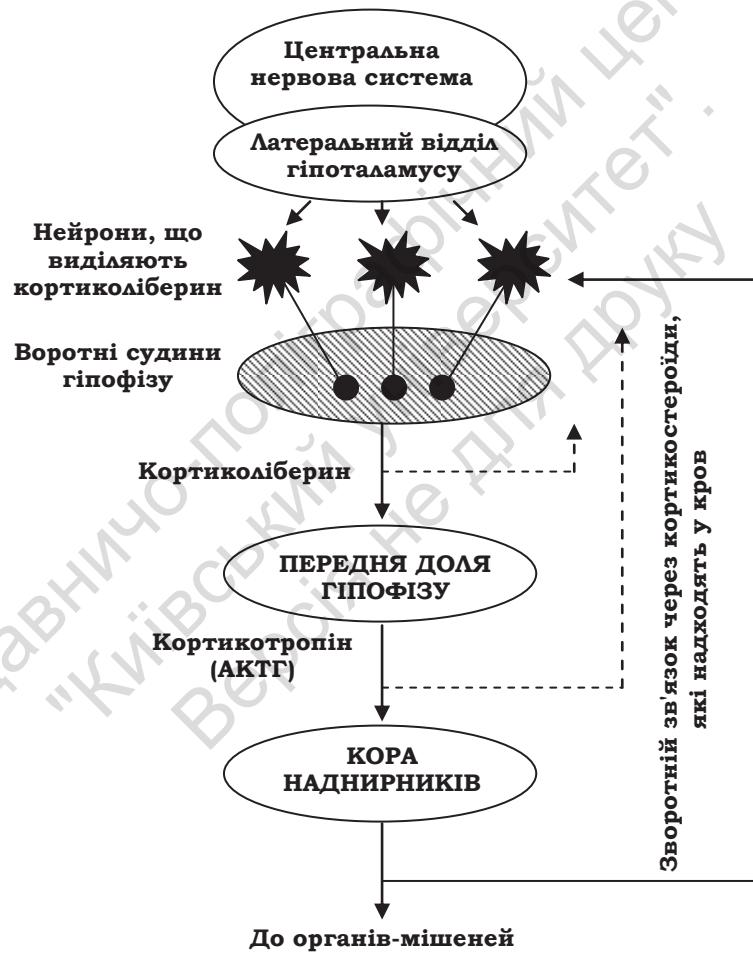


Рис. 4.17. Залучення кортикостероїдів до механізмів стресу

За останні 20 років у зв'язку з розвитком учення про стрес залижно від його особливостей (зокрема, від типу стресора) виділяють фізичний, нервовий (або психологічний), окисний, осмотичний, соматичний, холодовий, тепловий, адреналіновий, іммобілізаційний, травматичний, посттравматичний, фінансовий, юнацький, екзаменаційний, індустріальний, соціальний, боловий та ін. стреси. У той же час іноді слово *стрес* вживається в іншому значенні, наприклад клітинний стрес, що не має ніякого відношення до наведеної вище теорії стресу, розробленої Сельє та його послідовниками, адже в їхній концепції стрес – це реакція всього організму, а не будь-якої його частини, окрім кінських клітин чи молекул одного типу.

Крім викладеної теорії щодо ролі в розвитку стресу шляху "**гіпоталамус-гіпофіз-кортикалінний шар наднирників**", пізніше виявили існування й іншого, паралельного механізму реалізації програми стресу, який залишає **посилене виділення мозковим шаром наднирникової залози катехоламінів** – перш за все, **адреналіну**. Секреція адреналіну регулюється **симпатичною нервовою системою і вищими центрами, розташованими в корі головного мозку, ретикулярній формaciї та в гіпоталамусі**. Звільнення катехоламінів, а також посилене вироблення корою надниркової залози кортикостероїдів, у свою чергу, стимулює чи пригнічує секрецію гормонів наступного рівня регуляції – глюкагону, інсуліну, статевих гормонів, тиреоїдних гормонів, соматотропіну, алдостерону, ангіотензину, реніну, вазопресину, тіреокальцитоніну тощо, що залишає до стресової реакції організму одночасно всі фізіологічні системи, тканини й органи.

Таким чином, сучасні уявлення про стрес розглядають його як надмірну психологічну чи фізіологічну напругу, за якої раптово зростає в крові не лише рівень кортикостероїдів, а також і рівень адреналіну [10].

Отже, у реалізації програми стресу найважливішу роль відіграють кортикостероїди та катехоламіни. Звідси стають зрозумілими деякі механізми тих проявів стресу, про які йшлося на початку цього підрозділу, зокрема і участь у них апоптозу.

За умов стресу апоптозу належить роль одного із ключових чинників, який визначає специфіку реакції організму на стресор. Його участь у реалізації стресорної реакції пов'язана з посиленою секрецією стероїдних гормонів корою надниркової залози. Саме чутливістю до дії стероїдів визначається спектр тканин, які ушкоджуються при стресі (перш за все лімфоїдна тканина, тимус, результатом чого є спустошення лімфоїдних органів, а також слизові оболонки, у першу чергу кишечнику, що спричиняє характерні ушкодження з боку ШКТ).

Кортикостероїди є класичними індукторами апоптозу тимоцитів, отже, саме апоптоз є причиною руйнування тимусу внаслідок тривалого стресу; вони також спричиняють посилену загибель еозинофілів та низки інших клітин. Активувати процеси цього типу клітинної загибелі, зокрема у кардіоміоцитах і в ряді випадків у нейронах, можуть катехоламіни. У наш час ведеться дослідження ролі в реалізації програми апоптозу низки інших біологічно-активних речовин, вміст яких зростає за умов активації стресу, зокрема ангіотензину.

До активації процесів апоптозу причетне підвищення рівня холестеролу в крові (підрозд. 4.3); про зв'язок апоптозу і стресу свідчить підвищення ймовірності розвитку інфекційних захворювань, атеросклерозу, прогресії ВІЛ-СНІДу, автоімунних і ракових захворювань (зростання можливості виникнення онкологічних захворювань пов'язано з надлишком утворення за умов стресу активних форм кисню, які пошкоджують біологічні молекули клітини), тобто тих розладів, у патогенезі яких цьому типу програмованої загибелі клітин відводиться першочергова роль (табл. 4.8). Свою роль у реалізації апоптозу відіграє й порушення мікроциркуляції в судинах, поява гіпоксичних станів, активація ПОЛ, пошкодження клітинних мембран.

Існує тісний зв'язок між стресом і старінням. Деякі вчені, зокрема, розглядають старіння як виснаження організму внаслідок багаторазово перенесеного стресу.

Біохімічні механізми апоптозу

**Таблиця 4.8. Захворювання, що спричиняються
або посилюються за умов стресу**

Система організму	Найбільш характерні розлади
Серцево-судинна система	Спазм коронарних судин; аритмія; гіпертонія; атеросклероз; крововиливи; інфаркт міокарда
ШКТ	Пригнічення утворення соляної кислоти і пов'язані з цим стани (діарея, метеоризм, закрепи); коліти, синдром подразненої - товстої кишки, виразкова хвороба
Імунна система	Організм перестає опиратися вірусам і бактеріям; прогресія СНІДу, ревматоїдного артриту, лишаю; швидке розповсюдження ракових метастазів
М'язова система	Постійне напруження м'язів; м'язові спазми, судоми, біль у нижній щелепі, тремтіння
Нервова система	Замкнутість, погіршення пам'яті, гостроти реакції; емоційні розлади (безпричинний страх, паніка, депресія, порушення в орієнтуванні), розлади в поведінці (зокрема, порушення режиму, якості харчування, поява ознак алкоголізму)

5. ТЕРАПЕВТИЧНІ АСПЕКТИ АПОПТОЗУ

Особливе значення при вивченні апоптозу в наш час має можливість використання в цілях терапії гальмування чи активації цього виду смерті клітин.

Потенціально терапія може проводитися за такими основними категоріями:

- генна терапія (напр., заміна *p53*);
- використання ін'єкцій модуляторів апоптозу (напр., факторів росту, розчину *Fas-L*);
- регуляція експресії генів, пов'язаних з апоптозом (напр., *bcl-2*).
- регуляція активності білків, які відповідають за ключові етапи апоптозу (*Bcl-2*, *p53*, *Fas-R*, *Fas-L*, ендонуклеази, каспази, інгібітори каспаз тощо).

Генна терапія є найбільш перспективним напрямом, оскільки її методи дозволяють з великою вибірковістю будовувати в соматичні клітини з мутованими генами генетичні конструкції, що відновлюватимуть функції ушкоджених генів (позитивна генна терапія), або, навпаки, запобігати їхній аномальній дії чи надекспресії (негативна генна терапія).

Для апоптоз-основаної терапії важливо, щоб терапевтичні молекули були вбудовані й *активували лише специфічні клітини-мішені*: нерозбірливе інгібування апоптозу може привести до гіперплазії, а індукація – до небажаної дегенерації тканини.

Існують три можливі варіанти генної терапії, які відрізняються за способом введення хворому генетичних конструкцій:

1. Генетичні ушкодження компенсиують переносом рекомбінантної ДНК у клітини *in vivo* (*власне генна терапія*);

2. Клітини видаляють з організму, надалі в них вбудовують необхідний ген і культивують *in vitro*, після чого їх повертають реципієнту (*генно-клітинна терапія*);

3. Трансплантація хворому нормальних клітин, в яких експресується потрібний ген (*клітинна терапія*).

Для захворювань, пов'язаних з пригніченням апоптозу, найяскравішим прикладом яких можуть бути онкологічні розлади, у наш час розробляються методи, здатні прискорити цей процес. Прикладом є *метод вірусного вектора*: в ДНК вірусу (найчастіше використовують аденовіруси) з інактивованими патогенними властивостями і збереженою білковою капсuloю, що обумовлює його здатність проникати в певні клітини, вбудовуються *гени-індуктори апоптозу* (напр., ті, що кодують p53, Fas-L, TRAIL). При проникненні в клітину вірус починає розмножуватися, унаслідок чого включаються у функціонування і гени-індуктори апоптозу. Запускається механізм загибелі клітини, і вона гине. Застосування вірусних векторів має більшу ефективність за умови їхнього внутрішньопухлинного введення, оскільки при системному введенні їхня більша частина видаляється клітинами імунної системи. Крім того, внутрішньопухлинне введення генів Fas-L і TRAIL є безпечнішим, ніж ін'єкція відповідних білків, оскільки таким чином унеможливлюються токсичні впливи останніх на клітини нормальних тканин. Механізм вірусного вектора сьогодні широко апробується в лікуванні онкологічних захворювань. На стадії передклінічних випробувань перебувають препарати аденовірусних векторів, що містять гени *bax*, *bak*, каспази-9, мутовані форми генів сюрвівіну (підрозд. 4.5; у цьому випадку генна терапія пригнічує функції нормального гена сюрвівіну, який експресує білок-інгібітор апоптозу) та *Bcl-2*. Крім вірусного вектора, використовують й інші шляхи переносу генів у клітини, наприклад, *ліпосоми*. Цей метод також має свої недоліки, але перевагою є те, що після переносу гена (зокрема *p53*) клітини не гинуть від індукції антивірусної імунної відповіді.

Взагалі, більшість терапевтичних агентів, що використовуються в клініці як антипухлинні препарати, є токсичними для пухлинних клітин або здатні пригнічувати проліферацію. **Більшість**

антиракових агентів діють, індукуючи апоптоз у клітинах пухлини; при цьому апоптоз реалізується різними шляхами, що передбачають ушкодження ДНК, активацію відповіді на клітинний стрес і трансдукцію апоптозного сигналу. Оскільки агенти з різними первинними внутрішньоклітинними мішенями можуть ініціювати апоптоз за подібними механізмами (зокрема, в усіх апоптозних процесах відіграють найважливішу роль білки родини Bcl-2), дефекти у схожих ланках цих механізмів можуть відповісти за розвиток мультилікарської резистентності*.

Залежно від типу індукції (ушкодження ДНК, генерація ROS) апоптоз у відповідь на антиракові заходи може задіяти рецепторний чи (та) мітохондріальний сигнальні шляхи. Численні антипухлинні препарати ініціюють апоптоз, активуючи Fas-R/ Fas-L-систему; у той же час більшість цитотоксичних препаратів індукує загибел клітин із задученням цитохрому с, Араф-1 та каспази-9 (підрозд. 3.4) через мітохондріальний дисбаланс та інактивацію білка Bcl-2. Тому каспаза-9- та Араф-1-дефіцитні клітини є резистентними до цитотоксичних ліків, але залишаються чутливими до запуску апоптозу через рецептори загибелі. Відповідно, FADD-, Fas-R- та каспаза-8-дефіцитні клітини нечутливі до стимуляції рецепторів смерті, але чутливі до дії цитотоксичних агентів.

Як зазначалося вище, мутації *p53* найчастіше супроводжуються більшою агресивністю захворювання й асоційовані з лікарською резистентністю та поганою виживаністю (підрозд. 4.1). У резистентності до хіміотерапії передбачають не останню роль такого антиапоптозного білка, як FLIP (підрозд. 3.3), оскі-

* Ідентифіковано три головні рівні лікарської резистентності до цитотоксичних ліків:

1. Механізми, що запобігають досягненню ліками їхньої мішені; мішенню найчастіше виступають численні ядерні структури та (або) ферменти. Найбільш вивченим із цих механізмів є Р-глікопротеїн-опосередковане видалення ліків, введених у клітину.

2. Взаємодія між ліками та їхньою внутрішньоклітинною мішенню; якісні або кількісні зміни цих взаємодій можуть запобігти специфічним ефектам ліків.

3. Незалежна від надходження ліків та їхніх взаємодій з мішенню здатність клітини запускати її апоптозну програму у відповідь на специфічне ушкодження, індуковане ліками.

льки зростання його експресії (що виявляється в клінічних зразках багатьох пухлин, зокрема лімфоми Баретта) протидіє індукції апоптозу через рецептори загибелі. Подібне значення щодо розвитку резистентності до антинеопластичної терапії мають надекспресії антиапоптозного білка Bcl-2, інгібіторів каспаз родини IAPs (включаючи сюрвівін та XIAP), дефіцит Араф-1. Щодо IAPs, то їхня надекспресія є взагалі однією з най головніших причин резистентності до численних проапоптозних стимулів, оскільки каспази залишені до більшості шляхів реалізації апоптозу. Останнім часом показано, що агоністи (речовини з подібною дією) білка Smac/Diablo (підрозд. 3.4), який виступає інгібітором IAPs, можуть застосовуватися для подолання резистентності, зв'язуючи IAPs та звільнюючи каспази. Тому Smac/Diablo та його аналоги доцільно застосовувати в комплексі з іншими проапоптозними агентами. Модулювати чутливість до антипухлинних препаратів можуть і зміни в активності самих каспаз, наприклад, при розростанні пухлини, особливо на більш пізніх стадіях захворювання, ці протеази можуть бути пригнічені, що навіть за відсутності мутацій може надавати пухлині лікарської резистентності. Зокрема, існують посилання на те, що пацієнти, у яких під час діагностики захворювання виявили спонтанне зростання активності каспази-3, мали підвищену виживаність. Цей факт передбачає можливість застосування активаторів каспаз для поліпшення перебігу захворювання й підвищення виживаності хворих.

Індуктори апоптозу, пошук яких сьогодні інтенсивно ведеться, необхідні для лікування і ряду інших захворювань, наприклад автоімунних розладів.

Активно ведеться пошук і таких лікарських препаратів, що здатні **пригнічувати апоптоз**. Цей напрямок є суттєвим для створення ефективних методів лікування дегенеративних розладів (розсіяний склероз, інсульт, травма мозку, інфекції), захворювань, викликаних деякими вірусами. Ці антиапоптозні препарати будуть належати до нового класу імуностимуляторів.

Ураховуючи роль вільних радикалів у розвитку апоптозу, ведуться пошуки речовин, здатних запобігати їхньому токсичному впливу на клітину (антиоксидантів). На жаль, незважаючи на

виражений ефект цих препаратів у культурі клітин, їхнє використання в клініці поки не виправдало сподівань.

Існує багато **потенційних молекулярних мішень лікарських препаратів-модуляторів апоптозу**. Так, оскільки в більшості клітинних систем одним з обов'язкових етапів є міжнуклеосомна фрагментація ДНК, низка терапевтичних стратегій спрямована на ці *ядерні процеси*. Структура хроматину відіграє провідну роль у фрагментації ДНК: події останньої відбуваються лише за умов, коли лінкерні ділянки ДНК (ділянки, що поєднують окремі нуклеосоми – підрозд. 3.9) стають доступними для дії ендонуклеаз шляхом деконденсації або локальної редукції гістон-ДНК-взаємодії. Спермін – поліамін, здатний модифікувати ступінь доступності хроматину – може запобігати фрагментації ДНК у численних типах клітин. Ще один агент – іони Zn^{2+} – інгібує процеси апоптозу іншими шляхами: прямим гальмуванням ендонуклеази або через стабілізацію ДНК-гістонового комплексу.

Потенційною мішенню для регуляції процесів апоптозу може бути й ядерний фермент топоізомераза-II, залучений до утворення високомолекулярних фрагментів ДНК перед її міжнуклеосомною фрагментацією, проте можливість використання її інгібіторів як терапевтичних засобів для запобігання цієї фрагментації ще не досліджена.

У той же час існування механізмів реалізації процесів апоптозу за відсутності ядерної фрагментації (підрозд. 3.9) дозволяє передбачити, що терапевтичні стратегії, спрямовані на запобігання ядерних змін, можуть не відміняти цього типу загибелі клітин у цілому. Крім того, фрагментація ДНК є подією, що відбувається надто пізно, щоб стати ідеальною терапевтичною мішенню.

Запропоновано низку стратегій, мішенями яких є загальний *фінальний етап апоптозу*, до якого залучені білки-члени родини Bcl-2 і каспази, та який регулюється балансом між про- та анти-апоптозними білками. Як зазначалося вище, надекспресія білка Bcl-2 підвищує поріг чутливості клітин до індукторів апоптозу. Такі клітини здатні репарувати ушкодження, викликані дією ліків, унаслідок чого замість загибелі клітина буде підлягати подальшій проліферації. Тому для протекції нормальних клітин від хемотерапія-індукованої загибелі можуть бути корисними інгібі-

торні властивості Bcl-2. У протилежність, інгібітори цього білка або специфічні стратегії, направлені на зниження експресії відповідного гена, можуть бути застосовані для збільшення чутливості клітин до індукції апоптозу. Такими інгібіторами, наприклад, є антизмістовні олігонуклеотиди (нонсенс-нуклеотиди). Ці короткі ділянки одноланцюгової ДНК входять у клітину, зв'язуються зі специфічною послідовністю мРНК і запобігають експресії відповідного білка, що кодується зазначеною мРНК. Така "інтервенція" антизмістовних нуклеотидів зазвичай може мати потенційне клінічне застосування, хоча більш цінними стратегіями можуть стати агенти, які специфічно втрутчатимуться в біохімічні механізми, за якими Bcl-2 інгібує процеси апоптозу. У той же час, оскільки експресія Bcl-2 зустрічається далеко не в усіх клітинних лініях, а навіть за умови її наявності втрата цього білка може частково компенсуватися функціонуванням інших антиапоптозних членів цієї родини, зокрема Bcl-x_L, гальмування експресії чи функції білка Bcl-2 може не мати великої користі. Розроблено антизмістовні олігонуклеотиди, що скеровані й проти інших антиапоптозних генів – Bcl-x_L, сюрвівіну. Тому цікавим є пошук олігонуклеотидів, здатних блокувати продукцію одночасно кількох антиапоптозних білків. Ще одним способом інгібування антиапоптозних білків у пухлинних клітинах є препаратори рибозимів, дія яких пов'язана з пригніченням експресії певних генів (напр., *bcl-2*) через специфічний каталіз відповідних мРНК-мішеней.

Про можливість застосування як потенційних мішеней апоптоз-модулюючих стратегій каспаз та їхніх інгібіторів зазначалося раніше; гранзими А і В (підрозд. 3.3), що відповідають за індукцію апоптозу цитотоксичними клітинами, також є сполуками, корисними в плані пошуку нових модуляторів процесу загибелі клітин.

Більшість індукторів апоптозу використовують *специфічні сигнальні шляхи*, з якими, у свою чергу, також пов'язаний пошук специфічних терапевтичних напрямів. Наприклад, агенти, що ушкоджують ДНК, використовують запуск p53-залежного апоптозу; у клітинах лейкемії активація рецепторів Fas і TNF α індукує гідроліз сфінгомієліну та утворення цераміду; у тимоцитах взаємодія цитокінів і факторів росту з їхніми мембраними рецепторами активує Ca²⁺-залежний шлях; цитотоксичні Т-лімфо-

цити викликають апоптоз, звільнюючи в клітини-мішенні гранзими. Потенційними мішеннями щодо апоптоз-пов'язаної терапії можуть також бути МАРК (з інгібіторами й активаторами), цитотоксичний ліганд TRAIL (підрозд. 3.3), який індукує апоптоз у численних ракових клітинах різних типів, але не в нормальнích клітинах і має синергічну дію (подібно до Fas-L) з хемотерапевтичними агентами.

Зокрема, використовуючи генетичні вектори або ліпосоми, можна відновити активність білка p53, що підвищить терапевтичні ефекти ДНК-пошкоджувальних агентів. До того ж після ідентифікації мутацій у p53 можна запропонувати в таких клітинах індукувати апоптоз шляхом, який не залишає цей блок.

Порушення імунної відповіді можна використовувати для лікування автоімунних захворювань. У цьому випадку корисно специфічно видаляти ліфмоцити шляхом введення автоантигенів, що асоційовані із захворюванням, і повторювати це кількома курсами (за умови, що специфічні антигени, які включаються в імунні реакції, можна ідентифікувати).

Участь Fas-R-системи в деяких захворюваннях (гепатити В і С, ін.) дозволяє запропонувати використання з метою їхнього лікування розчинних форм цього рецептора, нейтралізуючих антитіл до Fas-R і Fas-L. Крім того, анти-Fas-антитіла можуть синергізувати (діяти в одному напрямку) з токсинами і терапевтичними агентами для подолання лікарської резистентності у численних клітинних лініях пухлини людини (існування такої синергічної дії передбачає той факт, що обробка клітин цисплатином або гамма-інтерфероном спричиняє зростання експресії Fas-рецептора). У той же час для застосування цього ефекту на практиці необхідно розробити метод точного направлення реагентів у клітини-мішенні, оскільки існує їхня потенційна токсичність і для нормальніх тканин. Цитокіни (представники родини низькомолекулярних білків, що виконують функції регуляції росту, проліферації, диференціації та загибелі клітин через міжклітинні взаємодії), до яких належить і Fas-L, і TNF α , є найважливішим класом потенційних лікарських речовин, здатних впливати на процеси апоптозу. Ще одним прикладом може бути спроба зупинити апоптоз CD4+ Т-лімфоцитів у хворих на СНІД застосу-

ванням цитокінів, що підвищують життєздатність клітин, сприяючи їхній проліферації, наприклад IL-2, IL-7, IL-15, IL-16. На жаль, клінічне застосування цих сполук (можливо, поки що) обмежене через високу цитотоксичність стосовно інших, нормальніх клітин. Зокрема, TNF α спричиняє загибель клітин ЦНС, а Fas-L – клітин печінки, що експресують Fas-рецептор.

Досі недослідженим як за механізмами, так і в плані створення лікарських препаратів залишається макрофагальний етап апоптозу.

Урахування змін процесів апоптозу під дією тих чи інших терапевтичних агентів є важливим для лікарської токсикології. Слід чекати, що речовини, які пригнічують апоптоз, при тривалому використанні будуть індукувати автоімунні хвороби і провокувати алергічні розлади. Можливо також, що канцерогенна і мутагенна активність препаратів безпосередньо пов'язана з антиапоптозною дією. Якщо лікарська речовина здатна індукувати апоптоз, то від неї слід чекати також імуносупресивної активності, виклику атрофії тканин, що швидко оновлюються, пригнічення кровотворення як побічні ефекти.

6. НАЙВАЖЛИВІШІ МЕТОДИ ДЕТЕКЦІЇ АПОПТОЗУ

6.1. ВИЯВЛЕННЯ АПОПТОЗУ IN VIVO

Cучасні мікроскопічні методи включають світлову, флуоресцентну, електронну та конфокальну мікроскопії, з яких детально буде розглянуто перші два.

6.1.1. Світлова мікроскопія використовує забарвлення цитологічних препаратів гематоксилін-еозином, що дозволяє виявити наявність апоптозних клітин за конденсацією цитоплазми та хроматину, вакуолізацією цитоплазми, фрагментацією ядра, утворенням апоптозних тілець (рис. 2.1).

Цей метод використовують як при роботі з культурами клітин, так і з клітинами крові, спинного мозку або тканин пацієнтів у клініці. У випадку тканини застосовують методи тонкошарових зрізів, які надалі фарбують гематоксилін-еозином або азуром А. Наведені вище ознаки апоптозних клітин відрізняють їх від клітин, що зазнали некротичної загибелі (для останніх характерна втрата цілісності плазматичної мембрани, мембрани ядра, набряк мітохондрій, утворення грудок хроматину, дезінтеграція клітинних органел – підрозд. 1.1 і 2.1). При кількісному визначенні апоптозу застосовують поняття *апоптозного індексу* – це відносна частка клітин, що встали на шлях апоптозу:

$$AI = \frac{\text{кількість AK}}{\text{загальна кількість клітин}} \times 100 \%,$$

де AI – апоптозний індекс, AK – апоптозні клітини.

Для виявлення некротичної загибелі клітин застосовують барвник *трипановий синій*, який проходить через пошкоджену мемброму, а інтактні живі клітини та апоптозні клітини із збереженою плазматичною мембраною не забарвлюють (рис. 1.2). Порахувавши вміст мертвих некротичних клітин, визначають інший показник – індекс виживання клітин:

$$IB = \frac{\text{Загальна кількість клітин} - \text{Кількість НК}}{\text{Загальна кількість клітин}} \times 100 \%,$$

де IB – індекс виживання клітин; НК – некрозні клітини.

Порівнюючи AI та IB, можна зробити висновок щодо поширення у зразку клітинної загибелі шляхом апоптозу чи некрозу, що може бути важливим, зокрема, при оцінці цитотоксичної дії низки препаратів.

6.1.2. Флуоресцентна мікроскопія

Добре відомо, що деякі флуоресцентні барвники, наприклад *Хехст 33342* (Hoechst 33342) і *пропідіум іодид* (PI), специфічно зв'язуються з ДНК, що забезпечує надійну візуалізацію конденсації хроматину методами флуоресцентної мікроскопії (рис. 6.1).

Поряд із цими барвниками широко використовують *акридиновий оранжевий*, який внаслідок змін у проникності мембрани легше і швидше проходить усередину апоптозних клітин, ніж в інтактні, накопичується в них і забезпечує яскраве світіння конденсованого хроматину і фрагментованого ядра, тоді як інтактні клітини мають слабку флуоресценцію. Акридиновий оранжевий при з'єднанні з дволанцюговою ДНК флуоресцює в жовто-зеленій ділянці спектра, а при сполученні з одноланцюговою – у червоній.

Для оптимізації методів флуоресцентної мікроскопії часто застосовують **комплексне фарбування зразків барвниками Хехст і PI одночасно**. Хехст зв'язується з усіма ядрами проліферуючих клітин (виявляючи конденсацію хроматину під час мітозу), у той

час як PI – лише з ядрами клітин із порушенюю інтегративністю мембрани. Після обробки матеріалу обома барвниками всі клітини класифікуються на такі чотири групи:

- 1) живі клітини із Хексст-позитивним інтактним ядром;
- 2) некротичні клітини з PI-позитивним ядром;
- 3) клітини на ранній стадії апоптозу із Хексст-позитивними фрагментами ядра;
- 4) апоптозні клітини на термінальній стадії з PI-позитивними фрагментами ядра.

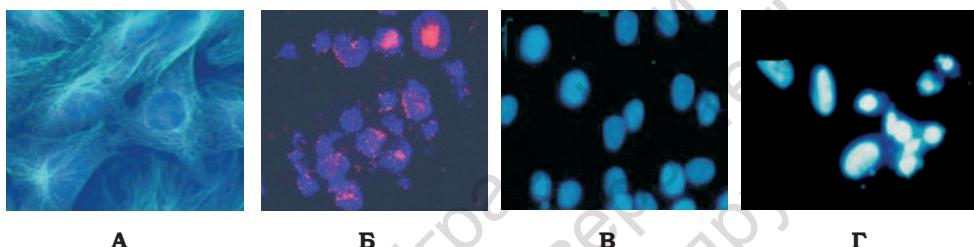


Рис. 6.1. **А** – клітини яєчника китайського хом'яка із забарвленими Хекстом 33342 у блакитний колір ядрами (ДНК); **Б** – клітини підшлункової залози свині: ядра апоптозних клітин забарвлені PI у червоний колір; **В** – нормальні клітини, забарвлені Хекстом; **Г** – забарвлені Хекстом апоптозні клітини з конденсованим хроматином та апоптозні тільця

Ще один комплексний метод флуоресцентної мікроскопії – **потрійне фарбування** (запропоновано С. Фоглієні) барвниками Хексст, акридиновий оранжевий, PI. Він дозволяє виявити живі й некротичні клітини, ранні та пізні апоптозні клітини і в нефіксованих, і у фіксованих пробах за їхніми різними забарвленнями.

Наступні два методи базуються на реакціях **нік-мічення**. Це реакції виявлення вільних 3'-ОН кінців ДНК, утворених у процесі фрагментації ДНК при апоптозі (підрозд. 3.9) за допомогою нуклеотидів, мічених радіоактивними ізотопами або кон'югованих із біотином. Перший метод – **нік-мічення in situ (in situ end labeling, ISEL)** – для включення нуклеотидів-міток

у 3'-кінці фрагментів ДНК використовує *ДНК-полімеразу-І*. У другому методі використовується *термінальна дезоксинуклеотид-трансфераза*, і метод має назву *dУТФ-нік-мічення, опосередковане термінальною дезоксинуклеотид-трансферазою* (*terminal deoxytransferase-mediated dUTP nick-end labeling*, або *TUNEL*). Термінальна дезоксинуклеотид-трансфераза – це ДНК-полімераза, яка в присутності праймера катализує приєднання до 3'-кінця молекули ДНК дезоксирибонуклеотидів, що утворюються з дезоксирибонуклеотидтрифосfatів з одночасним вивільненням пірофосфату. Найчастіше в цьому методі як мітку застосовують біотин-дУТФ, який потім виявляють візуально через зв'язування з авідином, кон'югованим із флуоресцентним барвником. Цей метод можна застосовувати для всіх видів матеріалу: культивованих клітин, тканин, зразків крові, навіть якщо вони містять лише кілька апоптозних клітин. Метод *TUNEL* є більш чутливим щодо виявлення апоптозних клітин, ніж *ISEL*. Однією із причин цього є можливість *TUNEL*-мічення як одно- так і дволанцюгових розривів ДНК, тоді як *ДНК-полімераза-І* помічає лише одноланцюгові. *TUNEL* часто застосовують у комплексі з іншими методами – трансмісійною електронною мікроскопією, конфокальною мікроскопією, іншими методами флуоресцентної мікроскопії, цитометрією в потоці. Разом із тим існують сумніви щодо строгої специфічності цього методу. У деяких випадках *TUNEL*-позитивні клітини можуть виявлятися не лише при апоптозі, але й за некрозної загибелі клітин.

Наступний метод флуоресцентної мікроскопії ґрунтуються на такій особливості апоптозних клітин, як *інверсія мембраних фосфоліпідів* (підрозд. 3.12). Фосфатидилсерин (ФС) в ін tactних клітинах розташований у внутрішньому шарі плазматичної мембрани; унаслідок індукції апоптозу він переміщується назовні й з'являється на поверхні клітин у зовнішньому шарі мембрани. Існує сполука *анексин-V* (М.м. 35 кДа), яка є членом родини білків з високою афінністю (спорідненістю) до ФС (рис. 6.2).

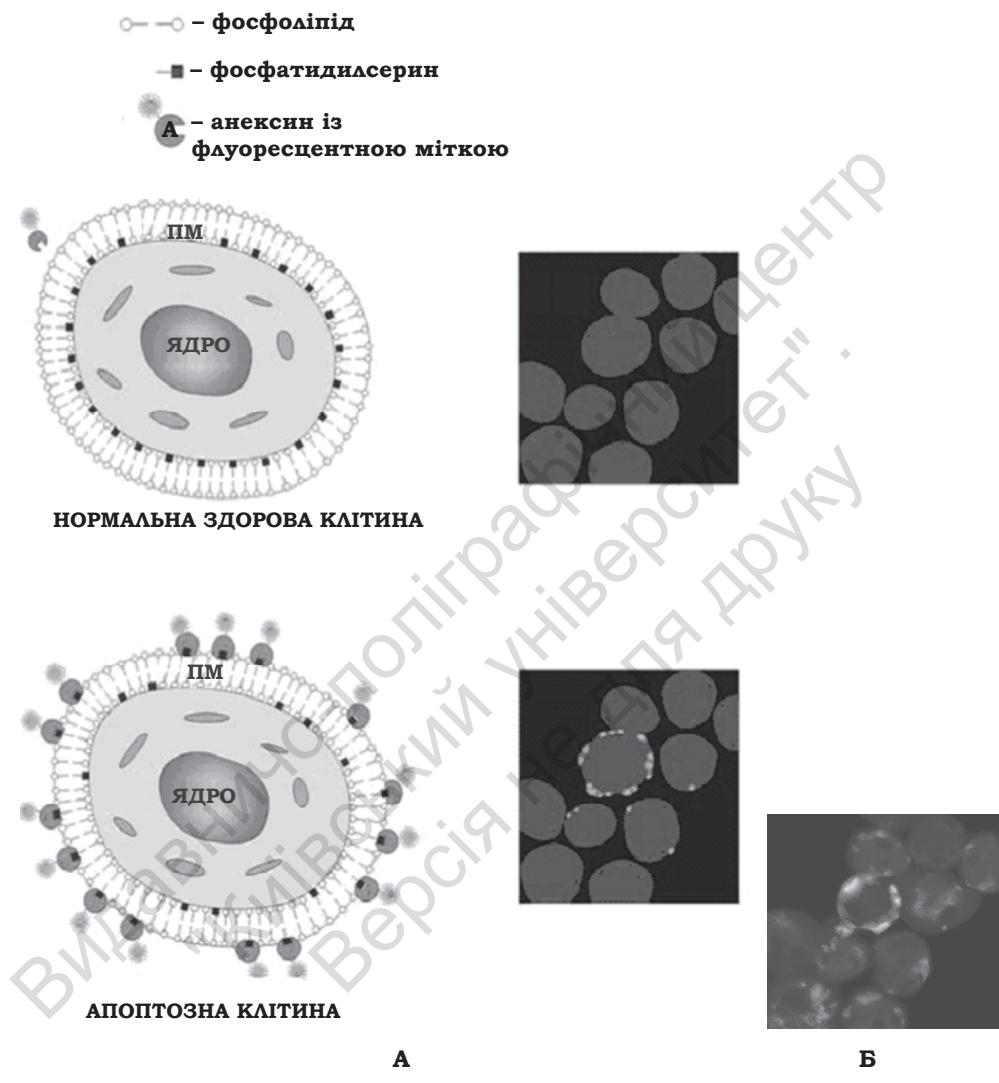


Рис. 6.2. А – Схема принципу методу виявлення апоптозу із застосуванням анексину-V, міченого флуоресцеїн-ізотіоціанатом;
Б – Мікрофотографія групи нормальних клітин та однієї – апоптозної, виявленої за допомогою анексину-V, міченого флуоресцеїн-ізотіоціанатом

Анексин-V, мічений флуоресцеїн-ізотіоціанатом (fluoresceine isothiocyanate, FITC), використовується як проба на апоптоз, індукований в численних клітинних лініях, і може застосовуватися разом з подвійним фарбуванням зразків барвниками Хехст та PI для визначення стадії апоптозу. Апоптозні клітини на ранніх стадіях зв'язуються головним чином з анексином-V, але не з PI. На проміжних стадіях, усередині реалізації апоптозної програми, клітини, що гинуть, починають зв'язувати Хехст, що вказує на присутність ядерної фрагментації. На пізніх стадіях апоптозу PI може переноситися через клітинні мембрани через порушення їхньої цілісності. Таким чином, унаслідок проведених фарбувань клітини на ранній та проміжній стадіях апоптозу стають зеленими. Таке забарвлення дає зв'язування анексину-V та Хехсту з клітинною поверхнею; пізня стадія апоптозу і некрозні клітини ідентифікують за появою внутрішньоклітинних жовто-червоних вкраплень PI. Ефективність зв'язування міченого анексину-V із ФС клітинної мембрани становить 8 молекул анексину на 1 молекулу ФС, що забезпечує високий рівень локальної флуоресценції апоптозних клітин. У той же час анексин-V може зв'язуватися із ФС, розташованим на внутрішньому боці плазматичної мембрани некротичних клітин після розриву останньої, це зменшує чутливість методу.

6.1.3. Електронна мікроскопія дозволяє дослідити структурні зміни в клітинах, які гинуть через апоптоз, у динаміці. В електронній мікроскопії широко застосовують модифікації описаних вище методів, зокрема TUNEL та використання анексину-V. Суттєвими недоліками електронної мікроскопії є висока вартість обладнання, складність у виготовленні зразків і тривалий час аналізу.

Найбільш поширеним із методів електронної мікроскопії є **ТЕМ – трансмісійна електронна мікроскопія**. Він підтверджує наявність апоптозу за кількома характерними для цього типу загибелі клітин ультраструктурами і може бути застосований як у культурі клітин, так і для аналізу зразків тканини. Зокрема, в апоптозних клітинах на відміну від некротичних наявні недегенеративні мітохондрії, які одночасно є дещо зміненими порівняно з мітохондріями інтактних клітин: вони розбухають і втрачають

цитохром с (підрозд. 3.4). Зміни, характерні для апоптозу, виявляються методом ТЕМ і в інших органелах апоптозних клітин: у плазматичній мембрані, ЕПР, ядрі. Отже, інформація, отримана ТЕМ, є найбільш повною порівняно з іншими, окрім взятими методами виявлення апоптозу (рис. 6.3).

Ще один метод, що широко використовується для виявлення апоптозних клітин і дослідження окремих стадій цього процесу – **сканувальна електронна мікроскопія (СЕМ)** (рис. 6.4).

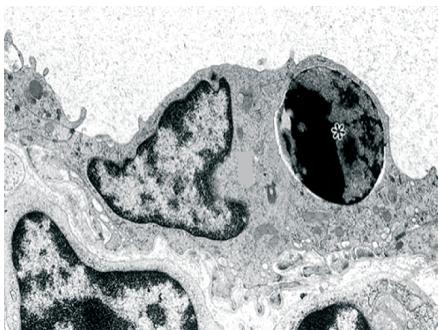


Рис. 6.3. Мікрофотографія фагоцитозу апоптозного тільця (*) сусідньою клітиною (ТЕМ)

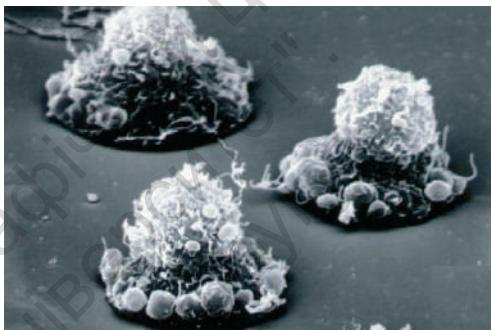


Рис. 6.4. Мікрофотографія клітин, що піддаються апоптозу, зроблена СЕМ

6.1.4. Цитометрія в потоці

У цьому методі використовуються описані вище способи флуоресцентного забарвлення. З використанням спеціального приставки – *проточного цитофлуориметра* – на основі змін оптичних властивостей апоптозних клітин (зокрема, у коефіцієнті заломлення і в гранулярності) виявляють їхні численні характеристики: розмір, форму, щільність, ДНК-фрагментацію, вихід назовні фосфатидилсерину. Цей метод дозволяє проаналізувати за короткий проміжок часу параметри великої кількості клітин. Але він має суттєві недоліки. По-перше, зміна розмірів чи щільності за умов індукції апоптозу характерна не для всіх типів клітин; по-

друге, необхідна відносно велика кількість клітин для проведення аналізу (близько 10^6 клітин на зразок); до того ж більшість флуоресцентних барвників не можуть бути використані у фіксованих клітинах або гістологічних зрізах (за винятком TUNEL-FITC), оскільки фіксовані клітини, як правило, утрачають специфічність зв'язування барвника з певними структурами клітини і можуть змінювати колір забарвлення. Для виявлення флуоресценції метод потребує недешевого ультрафаіолет-або лазер-обладнання. Крім того, при застосуванні цитометрії в потоці необхідно брати до уваги те, що рівень апоптозу при визначенні завжди буде вищим, ніж при використанні інших методів детекції, адже цитометрія виявляє кожне апоптозне тільце як окрему апоптозну клітину.

6.1.5. Гель-електрофорез ДНК (електрофорез ДНК в агарозному гелі)

Це група методів, серед яких найпоширенішими є такі.

Гель-електрофорез окремих клітин (метод ДНК-комет) – високочутливий метод визначення однониткових розривів ДНК. Уперше цей метод був запропонований в 1984 р. Остлінгом та Йоханссоном для оцінки індукованих радіацією ДНК-пошкоджень у клітинах ссавців. Метод заснований на реестрації різної рухливості в постійному електричному полі ДНК та її фрагментів після лізису ізольованих клітин, розміщених в агарозному гелі. При цьому ДНК мігрує до анода і формує електрофоретичний слід, що за формою нагадує хвіст комети (рис. 6.5), довжина і вміст ДНК в якому залежать від кількості розривів у ДНК. Як показник ушкодження ДНК використовують *відсотковий вміст ДНК у хвості* (% DNA in tail), або *момент хвоста* – відношення першого показника до довжини хвоста. За електрофоретичною рухливістю ДНК окремих клітин, поміщених в агарозний гель, розрізняють апоптозні, некрозні та інтактні клітини. Програмно-апаратний комплекс включає поєднану з мікроскопом високочутливу камеру і спеціалізоване програмне забезпечення, що дозволяє проводити

цифрову реєстрацію й обробку параметрів "ДНК-комет", які характеризують цілісність структури ДНК – довжину "комети", довжину її хвоста, діаметр голови, відсотковий вміст ДНК у голові чи хвості (% ДНК) тощо.

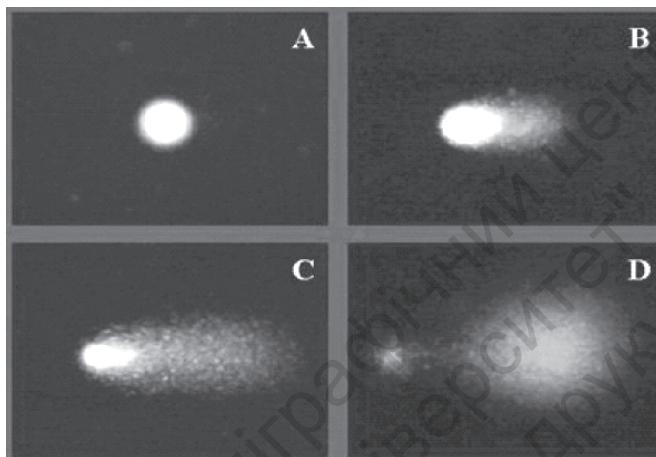


Рис. 6.5. Приклади електрофореграм, отриманих при використанні "методу комет". Різні довжини "хвостів" відповідають різним ступеням пошкодження ДНК

Пульс-електрофорез ДНК дозволяє виявити фрагменти ДНК великого розміру (50–300 кп. о.) (рис. 6.6); недоліком методу є дуже висока вартість апаратури.

Виявлення олігонуклеосомних фрагментів ДНК різної довжини. Вони мають значно більшу електрофоретичну рухливість при електрофорезі в агарозному гелі, ніж високомолекулярні фрагменти ДНК, і в присутності етидію броміду виявляються в ультрафіолетовому світлі як "драбина" ДНК (рис. 6.7).

На відміну від цього випадковий набір низькомолекулярних фрагментів ДНК некрозних клітин на електрофорерограмі має вигляд дифузної плями. Недоліки методу – апоптозна загибель клітин не завжди супроводжується міжнуклеосомною фрагментацією ДНК; зрідка за певних умов "драбина ДНК" виявляється в нормальних і некрозних клітинах. Для запобігання зазначенім недолікам доцільно поєднувати цей метод з іншими засобами детекції апоптозних клітин.



кп.о.

1900	
1640	2 642 п.о.
1100	1120
680	750 п.о.
555	500 п.о.
450	
375	
295	
225	

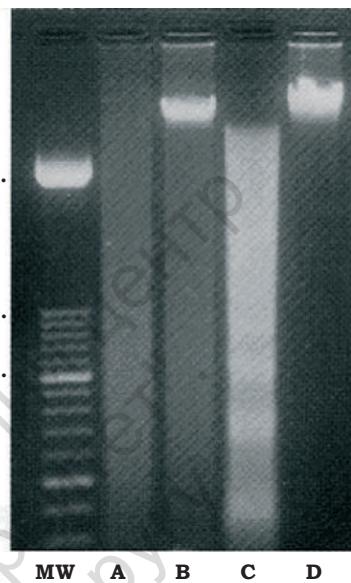


Рис. 6.7. Електрофореграма "драбини ДНК" апоптозних клітин

Рис. 6.6. Електрофореграма, отримана методом пульс-електрофорезу

6.1.6. Імуно- та гістохімічні методи дозволяють за допомогою специфічних антитіл до білків-маркерів апоптозу (напр., Fas-R-, Fas-L, білки родини Bcl-2, каспази, сюрвівін) або до продуктів ферментативного розщеплення, що утворюються при реалізації апоптозної програми, виявляти апоптозні клітини. Найпоширенішим методом цієї групи є **імуноблоттінг** (або **Western Blotting**). Його перевага полягає в можливості використання для аналізу як культури клітин, так і зразків тканин і біологічних рідин, що сприяє застосуванню цього методу для діагностики та визначення ефективності терапії розладів, пов'язаних з порушенням реалізації апоптозної загибелі, зокрема протипухлинної терапії. Суть методу полягає в перенесенні білків із гелю на нітроцелюлозну мемброму-носій та в подальшій їхній взаємодії зі специфічними антитілами, які візуалізують через коловорову реакцію, хемілюмінісценцію чи радіоактивні ізотопи.

Інші методи, що використовуються для виявлення апоптозних клітин – спектрофотометрія, магнітно-резонансна та інфрачервона спектроскопії – реєструють зміни біохімічних і біофізичних властивостей, які відбуваються в апоптозних клітинах.

6.2. НЕІНВАЗИВНІ (БЕЗ ХІРУРГІЧНОГО ВТРУЧАННЯ) МЕТОДИ ВІЗУАЛІЗАЦІЇ АПОПТОЗУ

З метою неінвазивної візуалізації апоптозу використовують томографічні, спектроскопічні методи та ультразвукові технології. Через велику кількість їхніх модифікацій у посібнику як приклад наводяться лише кілька з них.

Однофотонна емісійна комп'ютерна томографія (ОФЕКТ) ґрунтуються на явищі інверсії мембраних фосфоліпідів, для виявлення якого застосовують анексинові зонди, мічені ^{99m}Tc , ^{133}Xe , ^{123}I . Такі зонди вперше розробила група вчених під керівництвом Ф. Бланкенберга в 1998 р. Метод дозволяє одержати тривимірне зображення розподілу γ -випромінювання зазначених стабільних ізотопів. Ефективність методу доведено на *in vivo*-моделях Fas-R-опосередкованого апоптозу гепатоцитів, реакції відторгнення трансплантантів серця тощо. Його доцільно використовувати для оцінки ефективності терапії, пов'язаної з індукцією чи гальмуванням апоптозу. Позитивним моментом є й можливість застосування цього аналізу в умовах, коли взяття біопсійного матеріалу є небезпечним для життя хворого (напр., коли пухлина локалізована в серці або в мозку). Недоліком методу є вказівки щодо накопичення анексинового зонду в окремих органах і тканинах людини, зокрема в нирках і печінці, що може вносити похибку в отримані результати.

Флуоресцентна стереомікроскопія – метод прижиттєвої оптичної візуалізації апоптозних клітин за допомогою набору флуоресцентних зондів. Прикладом є можливість виявлення зв'язування поодинокими кардіоміоцитами анексину-V, міченого флуорохромом Орегоном зеленим, після ішемії-реперфузії лівого шлуночка серця миші із застосуванням збільшення мікроскопа в 100–160 разів. Попереднє введення інгібіторів апоптозних протеаз знижує кіль-

кість апоптозних кардіоміоцитів, що виявляються цим методом, який може бути використаний з метою контролю ефективності терапевтичних, зокрема антипухлинних програм.

6.3. ПРИЖИТЄВІЙ АНАЛІЗ БІОЛОГІЧНИХ РІДИН (СИРОВАТКИ І ПЛАЗМИ КРОВІ, СЕЧІ)

Найбільш поширеними методами кількісної оцінки апоптозу за аналізом зразків біологічних рідин є методи, пов'язані з визначенням у них вмісту каспази-3, цитохрому с або позаклітинної ДНК, яка з'являється в кровотоці і в сечі через те, що ядра частини апоптозних клітин не підлягають повному руйнуванню, і ДНК із них надходить у кров і в сечу. Для цього використовують модифікації описаних вище методів флуоресцентної мікроскопії, імуноблоттингу, електрофорезу ДНК.

Особливе значення має розроблений групою дослідників, очоленою Дж. Шарпом, Bio-Dot-тест для визначення вмісту антиапоптозного білка сюрвівіну (підрозд. 3.5) у сечі, заснований на перенесенні зразків надосадової рідини сечі на нітроцелюлонну мемброму-носій та на наступній імунодетекції сюрвівіну з використанням моноклональних антитіл проти цього білка. Чутливість зазначеного тесту становить 100 %; у зразках сечі, отриманих від клінічно здорових донорів, сюрвівін цим тестом не виявляється. Крім того, установлено прямопропорційну залежність між вмістом сюрвівіну в сечі та стадією раку, а також кореляцію між проведеним антипухлинної терапії та зниженням його концентрації в дослідних пробах. Особливе значення цей метод має для хворих на рак сечового міхура, оскільки воно мають проходити обстеження не рідше, ніж раз у три місяці, неінвазивний аналіз вмісту сюрвівіну в сечі дозволяє їм уникнути болючої процедури цитоскопії. Він також може застосовуватися з метою діагностики цього захворювання.

КОНТРОЛЬНІ ЗАПИТАННЯ ТА ЗАВДАННЯ

До розділу 1. Біологічне значення клітинної загибелі.

Типи клітинної смерті

1. Наведіть основні ознаки некротичної загибелі клітин.
2. Стадії некротичної загибелі клітини.
3. Що може бути наслідком некротичного ушкодження клітин на рівні тканини?
4. Некробіоз і патобіоз як стани, що передують некрозу тканини.
5. Коагуляційний і коліквацийний некроз.
6. Характеристика гангренозного некрозу. Суха, волога, газова гангрена, пролежні.
7. Дослідження вмісту якої групи ферментів у сироватці крові може бути використано для визначення локалізації некротичного ушкодження тканин?
8. Автофагія і піроптоз як форми загибелі клітин.
9. У чому полягає некоректність використання терміна *програмована загибель клітин* у значенні *апоптоз*?
10. Які фактори можуть спричинити некротичне ушкодження клітин?

До розділу 2. Апоптозна загибель клітин

1. Наведіть основні ознаки загибелі клітин шляхом апоптозу.
2. Які ключові відмінності є між некротичною загибеллю клітин і апоптозом?
3. Біологічна роль процесів апоптозу.

Біохімічні механізми апоптозу

4. Як залучаються процеси апоптозу до функціонування нервової системи ссавців?
5. У чому полягає роль апоптозу в процесах метаморфозу й ембріогенезу тваринних організмів?
6. Яким чином процеси апоптозу причетні до становлення лімфатичної системи ссавців?
7. Процеси апоптозу і рослинний організм.
8. Процеси апоптозу в організмах прокаріот.
9. Процеси апоптозу в організмах дріжджів.
10. Суть термінів *органелоптоз*, *органоптоз*, *феноптоз*.

До розділу 3. Механізми апоптозу

1. Модельні системи для вивчення механізмів загибелі клітин шляхом апоптозу: нематода *Caenorhabditis elegans* і "нокаутовані миші".
2. Білок p53: структура, функції, регуляція. p53 як регулятор клітинного циклу і як транскрипційний фактор.
3. Механізми Fas-R, TNF-R- і гранзим В-залежних шляхів апоптозу.
4. Каспази – ключові протеази апоптозу: класифікація, структура, механізми активації. Зовнішній і внутрішній шляхи програми апоптозної загибелі клітин.
5. Механізми вивільнення проапоптозних факторів із мітохондрій. Роль співвідношення про- і антиапоптозних білків-членів родини Bcl-2 в регуляції виживання й загибелі клітини. Характеристика проапоптозних мітохондріальних білків.
6. Структура і функції транскрипційного фактора NF-кВ. Механізми його активації. Гени антиапоптозних білків IAPs як мішені NF-кВ.
7. Рівні організації хроматину. Утворення високомолекулярних фрагментів і міжнуклеосомальна фрагментація ДНК як дві стадії руйнування ДНК за умов реалізації апоптозної програми. Які білки залучені до фрагментації ДНК під час апоптозу?
8. Що таке ліміт Хейфліка? Яким чином, застосовуючи терміни *теломера*, можна пояснити "програмованість" загибелі клі-

тин? Чим зумовлюється існування нестаріючих клітин (зародкових, статевих, клітин злоякісної пухлини)?

9. Які сполуки можуть служити "перемикачем" між апоптозом і некрозом?

10. Міграція фагоциту до апоптозної клітини, розпізнання клітини, що гине, фагоцитом, поглинання та процесинг її всередині фагоциту як стадії фагоцитозу. Маркери апоптозних клітин і рецептори фагоцитів, що їх розпізнають.

До розділу 4. Патологічні аспекти апоптозу

1. Які захворювання пов'язані з пригніченням апоптозу?

2. Які захворювання пов'язані з посиленням апоптозу?

3. Наведіть приклади порушень функції регуляторів апоптозу, які залучаються до розвитку онкологічних захворювань.

4. Суть автоімунних лімфопроліферативних розладів. Який шлях апоптозу найчастіше є порушенним за подібних станів?

5. Загибель клітин шляхом апоптозу в патогенезі атеросклерозу.

6. Яким чином процеси апоптозу залучаються до розвитку нейродегенеративних захворювань (на прикладі хвороб Альцгеймера і Паркінсона, діабетичних нейро- та ретинопатій)?

7. Будова вірусу ВІЛ. Механізми потрапляння вірусу в клітини-мішенні. Механізми ВІЛ-індукованого апоптозу імунних клітин.

8. Апоптоз у патогенезі вірусних гепатитів А, В і С та виразкової хвороби шлунку.

9. Взаємозв'язок між процесами старіння і загибеллю клітин шляхом апоптозу.

10. Ганс Сельє: основні положення теорії стресу. Залучення апоптозу до реалізації стресової реакції організму.

До розділу 5. Терапевтичні аспекти апоптозу

1. Основні напрями терапії захворювань, патогенез яких включає порушення рівнів апоптозної загибелі певних типів клітин.

2. Суть методів генної терапії.

3. На яких рівнях можливе виникнення лікарської резистентності до цитотоксичних ліків?

4. Ядерні процеси апоптозу як мішень для апоптозмодулюючих лікарських препаратів.
5. Мітохондріальні процеси апоптозу як мішень для апоптозмодулюючих лікарських препаратів.
6. p53-, Fas-R, TNF α -R-, Ca $^{2+}$ -, гранзим В-, МАРК-залежні шляхи апоптозу як мішенні терапевтичних дій.
7. Які терапевтичні напрями, засновані на модуляції процесів апоптозу, можна запропонувати для лікування онкологічних захворювань? Які додаткові аналізи доцільно для цього провести?
8. Які терапевтичні напрями, засновані на модуляції процесів апоптозу, можна запропонувати для лікування нейродегенеративних розладів?
9. Яка ділянка метаболізму сфінгомієліну може стати мішенню при антипухлинній терапії?
10. У пацієнта онкологічного відділення лікарні виявили мутований білок p53. Яка післяопераційна терапія (хіміо- чи радіотерапія) йому може бути призначена, а від якої треба відмовитися? Поясніть свою відповідь.

До розділу 6. Найважливіші методи детекції апоптозу

1. Використання методів світлої мікроскопії для виявлення апоптозних клітин *in vivo*: апоптозний індекс та індекс виживання клітин.
2. Принципи використання флуоресцентних барвників Хехст 33342, пропідіум іодиду, акридинового оранжевого для виявлення апоптозних клітин. Комплексні методи флуоресцентної мікроскопії.
3. Застосування реакцій нік-мічення для виявлення апоптозних клітин (методи ISEL і TUNEL). Плюси і мінуси зазначених методів.
4. На якій властивості апоптозних клітин базується метод детекції апоптозу з використанням анексину-V, міченого флуоресцеїн-ізотіоціанатом?
5. Які ознаки апоптозних клітин виявляються у зразках при застосуванні методів трансмісійної та сканувальної електронної мікроскопії?

6. В основі якого методу лежить визначення змін оптичних властивостей апоптозних клітин (зокрема, у коефіцієнті заломлення й у гранулярності)? Які переваги і недоліки цього методу?
7. У чому суть методу ДНК-комет?
8. Які методи використовуються для виявлення фрагментів ДНК розміром 50–300 кп. о. і олігонуклеосомальних фрагментів ДНК?
9. Принципи використання імуно- і гістохімічних методів виявлення апоптозних клітин.
10. Якими методами можна оцінити ступінь процесів апоптозу (напр., з метою контролю ефективності терапевтичних програм чи діагностики низки захворювань), не застосовуючи хірургічного втручання?

Видавничо-поліграфічний Центр
"Київський університет"
Версія не для друку

СПИСОК ЛИТЕРАТУРИ

1. Абелев, Г.И. Что такое опухоль // Соровский образовательный журн. – 1997. – № 10. – С. 85–90.
2. Абрамова, Е.Б. / Е.Б. Абрамова, В.Л. Карпов. Протеасома: разрушение во имя созидания // Природа. – 2003. – № 7. – С. 36–45.
3. Алеева, Г.Н. / Г.Н. Алеева, М.В. Журавleva. Апоптоз в патогенезе атеросклероза // Фарматека: междунар. мед. журн. – 2005. – № 8. – С. 28–31.
4. Анисимов, В.Н. Молекулярные и физиологические механизмы старения. – СПб., 2003.
5. Богданов, А.А. Теломеры и теломераза // Соросовский образовательный журн. – 1998. – № 12. – С. 12–18.
6. Букринский, М.И. Строение генома и экспрессия генов ви-
руса иммунодефицита человека (обзор иностранной литературы)
// Вопр. вирусологии. – 1987. – Т. 32, № 6. – С. 649–656.
7. Ванюшин, Б.Ф. Апоптоз у растений // Успехи биол. химии.
– 2001. – Т. 41. – С. 3–38.
8. Гордеева, А.В. / А.В. Гордеева, Ю.А. Лабас, Р.А. Звягильс-
кая. Апоптоз одноклеточных организмов: механизмы и эволюция
// Биохимия. – 2004. – Т. 69, № 10. – С. 1301–1313.
9. Казимирко, В.К. / В.К. Казимирко, В.И. Мальцев, В.Ю. Бу-
тылин, Н.И. Горобец. Свободнорадикальное окисление и антиок-
сидантная терапия. – К., 2004.
10. Каминский, Ю.Г. / Ю.Г. Каминский, Е.А. Косенко. Стресс
(вся и др. правда о стрессе...). – Пущино, 2003.
11. Кулинский, В.И. Активные формы кислорода и оксидатив-
ная модификация макромолекул: польза, вред и защита // Со-
росовский образовательный журн. – 1999. – № 1. – С. 2–7.

12. Потехина Е.С., / Е.С. Потехина, Е.С. Надеждина. Митоген-активируемые протеинкиназные каскады и участие в них Ste20-подобных протеинкиназ // Успехи биол. химии. – 2002. – Т. 42. – С. 235–256.
13. Самуилов, В.Д. / В.Д. Самуилов, А.В. Олескин, Е.М. Лагунова. Программируемая клеточная смерть // Биохимия. – 2000. – Т. 65, вып. 8. – С. 1029–1046.
14. Скулачев, В.П. Явления запрограммированной смерти. Организм // Соросовский образовательный журн. – 2001. – № 10. – С. 2–6.
15. Сосунов, А.А. Оксид азота как межклеточный посредник // Соросовский образовательный журн. – 2000. – Т. 6, № 12. – С. 27–34.
16. Фаворова, О.О. Аутоиммунные заболевания как следствие утраты иммунной системой способности отличать "свое" от "чужого" // Соросовский образовательный журн. – 1998. – № 12. – С. 19–24.
17. Фильченков, А.А. / А.А. Фильченков, Р.С. Стойка. Апоптоз и рак. – К., 1999.
18. Чумаков, П.М. Функция гена *p53*: выбор между жизнью и смертью // Биохимия. – 2000. – Т. 65, № 1. – С. 34–47.
19. Alderton, W.K. / W.K. Alderton, C.E. Cooper, R.G. Knowles. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition // Biochem. J. – 2001. – Vol. 357. – P. 593–615.
20. Badley, A.D. / A.D. Badley, A.A. Pilon, A. Landay, D.H. Lynch. Mechanisms of HIV-associated lymphocyte apoptosis // BLOOD. – 2000. – Vol. 96, № 9. – P. 2951–2965.
21. Barinaga, M. Is Apoptosis Key in Alzheimer's Disease? // Science. – 1998. – Vol. 28, № 5381. – P. 1303–1304.
22. Brandis, K. Oxidative Stress, α -Synuclein and Apoptosis in Parkinson's Disease // Eukaryon. – 2006. – Vol. 2. – P. 22–27.
23. Chalfant, C.E. / C.E. Chalfant, S. Spiegel. Sphingosine 1-phosphate and ceramide 1-phosphate: expanding roles in cell signaling // J. of Cell Science. – 2005. – Vol. 118, № 20. – P. 460–4612.
24. Dashash, M. / M. Dashash, V. Pravica, I.V. Hutchinson et al. Association of sudden infant death syndrome with VEGF and IL-6

- gene polymorphisms // Hum Immunol. – 2006. – Vol. 67, № 8. – P. 627–633.
25. Daugas, E. / E. Daugas, S.A. Susin, N. Zamzami et al. Mitochondrio-nuclear translocation of AIF in apoptosis and necrosis // The FASEB Journal. – 2000. – Vol. 14. – P. 729–739.
26. Fadok, V.A. / V.A. Fadok, G. Chimini. The phagocytosis of apoptotic cells // Semin Immunol. – 2001. – Vol. 13, № 6. – P. 365–72.
27. Fink, S.L. / S.L. Fink, B.T. Cookson. Apoptosis, Pyroptosis, and Necrosis: Mechanistic Description of Dead and Dying Eukariotic Cells // Infection and Immunity. – 2005. – Vol. 73. – № 4. – P. 1907–1916.
28. Fruehauf, J.P. / J.P. Fruehauf, F.L. Meyskens. Reactive Oxygen Species: A Breath of Life or Death? // Clin Cancer Res. – 2007. – Vol. 13. – № 3. – P. 789–794.
29. Giustarini, D. / D. Giustarini, R. Rossi, A. Milzani et al. S-Glutathionylation: from redox regulation of protein functions to human diseases // J. Cell. Mol. Med. – 2004. – Vol. 8, № 2. – P. 201–212.
30. Grimsley, C. / C. Grimsley, K.S. Ravichandran. Cues for apoptotic cell engulfment: eat-me, don't eat-me and come-get-me signals // Trends Cell Biol. – 2003. – Vol. 13, № 12. – P. 648–656.
31. Hancock, J.T., / J.T. Hancock, R. Desikan, S.J. Neill. Role of reactive oxygen species in cell signalling pathways // Biochemical Society Transactions. – 2001. – Vol. 29, part 2. – P. 345–350.
32. Hayflick, L. The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains // Exp Cell Res. – 1965. – Vol. 37. – 614–636.
33. Holcik, M. / M. Holcik, R.G. Korneluk. XIAP, the guardian angel // Nature Reviews Molecular Cell Biology. – 2001. – № 2. – P. 550–556.
34. Kerr, F.R. / F.R. Kerr, A.H. Wyllie, A.R. Currie. Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics // Br J. Cancer. – 1972. – Vol. 26. – P. 239–256.
35. Kim, J. / J. Kim, L. He, J. Lemasters. Mitochondrial permeability transition: a common pathway to necrosis and apoptosis // Biochemical and Biophysical Research Communications. – 2003. – Vol. 304. – P. 463–470.

36. *Li, L.Y. / L.Y. Li, X. Luo, X. Wang.* Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria // Nature. – 2001. – Vol. 412. – P. 27–29.
37. *Liu, B. / B. Liu, Y. Chen, D.K. Clair.* ROS and p53: versatile partnership // Free Radic Biol Med. – 2008. – Vol. 44. – № 8. – P. 1529–1535.
38. *Liu, X., / X. Liu, H. Zou., C. Slaughter, X. Wang.* DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis // Cell. – 1997. – Vol. 89, № 2. – P. 175–184.
39. *Mathias, S. / S. Mathias, L.A. Penn, R.N. Kolesnick.* Signal transduction of stress via ceramide // Biochem. J. – 1998. – Vol. 335. – P. 465–480.
40. *Moreira, M.E.C. / M.E.C. Moreira, M.A. Barcinski.* Apoptotic cell and phagocyte interplay: recognition and consequences in different cell systems // Anais da Academia Brasileira de Ciencias. – 2004. – Vol. 76, № 1. – P. 93–115.
41. *Multani, A.S. / A.S. Multani, M. Ozen, S. Narayan et al.* Caspase-Dependent Apoptosis Induced by Telomere Cleavage and TRF2 Loss // Neoplasia. – 2000. – Vol. 2. – № 4. – P. 339–345.
42. *Nicotera, P., Melino G.* Regulation of the apoptosis-necrosis switch // Oncogene. – 2004. – Vol. 23. – P. 2757–2765.
43. *Ohta, K. / K. Ohta, N. Yamashita.* Apoptosis of eosinophils and lymphocytes in allergic inflammation // J-Allergy-Clin-Immunol. – 1999. – Vol. 104, № 1. – P. 14–21.
44. *Schröder, M., / M. Schröder, R.J. Kaufman.* The mammalian unfolded protein response. Annual Review of Biochemistry. – 2005. – Vol. 74. – P. 739–789.
45. *Susin, S.A. / S.A. Susin, E. Daugas, L. Ravagnan et al.* Two Distinct Pathways Leading to Nuclear Apoptosis // The Journal of Experimental Medicine. – 2000. – Vol. 192. – № 4. – P. 571–580.
46. *Pavlović, D. / D. Pavlović, V. Đorđević, G. Kocić.* A "cross-talk" between oxidative stress and redox cell signaling // Facta Universitatis Series: Medicine and Biology. – 2002. – Vol. 9, № 2. – P. 131–137.

ПРО АВТОРІВ

Остапченко Людмила Іванівна

Доктор біологічних наук, професор, заслужений діяч науки і техніки України (2004).

Закінчила біологічний факультет Київського державного університету ім. Т.Г. Шевченка (1976), аспірантуру при кафедрі біохімії (1984). У 1997 р. захистила дисертацію на здобуття вченого ступеня доктора біологічних наук з теми "Молекулярні механізми функціонування систем білкового фосфорилювання в лімфоцитах селезінки щурів в умовах радіаційного впливу".



Із 1984 р. працює в університеті: молодший науковий співробітник; науковий співробітник; старший науковий співробітник; провідний науковий співробітник; головний науковий співробітник; професор кафедри біохімії; заступник декана біологічного факультету; завідувач кафедри біохімії; декан біологічного факультету (з 2002 р.).

Основним напрямом наукової діяльності є дослідження універсальних систем регуляції трансдукції сигналу в клітинах за умов розвитку різних патологічних станів, серед них – біохімічні процеси в клітинах слизової шлунка та кишечнику за умов розвитку різної патології шлунково-кишкового тракту. Автор 400 наукових праць, серед яких: монографій – 4; підручників і навчальних посібників – 7, наукових статей – 160, навчально-методичних праць – 22, патентів – 3.

Є головою методичної комісії з біології МОН України, головою спеціалізованої вченової ради Д 26.001.24, відповідальним редактором журналу "Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка (сер. "Біологія", сер. "Проблеми регуляції фізіологічних функцій"), членом багатьох наукових товариств і редколегій журналів. Нагороджена премією ім. О.В. Палладіна (2005); знаком "Петро Могила" (2007); знаком "За наукові досягнення" (2008).

Синельник Тетяна Борисівна

Кандидат біологічних наук, асистент.

У 2000 р. закінчила біологічний факультет Київського національного університету імені Тараса Шевченка (спеціальність "Біохімія"), у 2004 завершила навчання в аспірантурі при Київському національному університеті імені Тараса Шевченка і захистила дисертацію на здобуття ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю "Фізіологія людини і тварин". Із жовтня 2004 р. і дотепер працює в Київському національному університеті імені Тараса Шевченка на посадах молодшого наукового співробітника і наукового співробітника відділу цитофізіології НДІ фізіології біологічного факультету, а з 1 вересня 2007 р. – на посаді асистента кафедри біохімії.



Наукові дослідження присвячені з'ясуванню ролі детергентних властивостей жовчних кислот в їхньому впливі на секрецію канальцевої жовчі й вивченню впливу на стан жовчосекреторної функції печінки ксенобіотиків. Читає спецкурси "Функціональна біохімія", "Мембрани та регуляція обміну речовин", "Клінічна біохімія", а також проводить семінарські та лабораторні заняття з курсів "Біоорганічна хімія", "Біотехнологія", спецпрактикум "Функціональна біохімія" для студентів денного і заочного відділення біологічного факультету. Працюючи на посаді асистента кафедри біохімії, продовжує брати участь у наукових розробках.

Синельник Т.Б. є автором 46 наукових робіт (у тому числі 1 навчального посібника з грифом МОН України і 15 статей). За наукові досягнення нагороджена Почесною грамотою АМН України (2006).

Рибальченко Тарас Володимирович

Кандидат біологічних наук, доцент.

Закінчив біологічний факультет Київського національного університету імені Тараса Шевченка в 1998 р.

В університеті працює з 1998 р.: 1998–2001 рр. – аспірант кафедри біохімії біологічного факультету (у період навчання в аспірантурі працював за сумісництвом молодшим науковим співробітником відділу цитофізіології біологічного факультету; 2001–2002 рр. – молодший науковий співробітник відділу цитофізіології біологічного факультету, а з 2002 р. – науковий співробітник цього ж відділу; з 2006 р. – доцент кафедри цитології, гістології і біології розвитку.



Проводить лекційні та лабораторні заняття з курсів "Загальна цитологія та гістологія", "Біологія індивідуального розвитку", "Теорія еволюції", "Біологія розвитку", "Мембранилогія", "Гематологія", "Механізми клітинної диференціації" "Цитохімія" для студентів біологічного факультету денної й заочної форм навчання та лекційний курс "Основи біології та генетики" для студентів Військового інституту Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Основні напрями наукової діяльності стосуються досліджень хімічних і цитологічних механізмів, міжклітинної сигналізації, ролі ліпідного матриксу мембрани у сприйнятті й трансформації сигналів. Нині веде дослідження, що стосуються цитофізіологічних ефектів і механізмів дії гетерометальних комплексів і речовин з потенційною противухлиною дією. Автор 67 статей, 2 монографій і 5 навчальних посібників.

За наукові досягнення нагороджений у 2005 р. Почесною грамотою НАН України, а в 2006 р. – Почесною грамотою АМН України.

Рибальченко Володимир Корнійович



Доктор біологічних наук, професор.

Закінчив Московський державний університет імені М.В. Ломоносова в 1966 р., де спеціалізувався в галузі біофізики. Після закінчення університету і дотепер працює в Київському національному університеті імені Тараса Шевченка на посадах асистента, доцента, професора, провідного наукового співробітника,

декана біологічного факультету. З 1994 р. по 2006 р. В.К. Рибальченко очолював (за сумісництвом) кафедру медичної біології Медичного інституту Української асоціації народної медицини. Сьогодні є завідувачем сектора цитофізіології НДІ фізіології імені академіка Петра Богача біологічного факультету Київського національного університету імені Тараса Шевченка, який займається дослідженням мембронотропних властивостей ендо- та екзогенних біорегуляторів, у тому числі й біорегуляторів шлунково-кишкового тракту. Понад 450 робіт (у тому числі 4 монографії, 16 навчальних посібників і 1 підручник) присвячені проблемам біофізики й біохімії мембрани.

Зміст

ПЕРЕДМОВА	3
Вступ	13
Список скорочень та абревіатур із перекладом	19
1. БІОЛОГІЧНЕ ЗНАЧЕННЯ КЛІТИННОЇ ЗАГИБЕЛІ.	
Типи клітинної смерті	33
1.1. Некротична загибель клітин	33
1.2. Некроз тканин як наслідок некротичної загибелі клітин	38
2. АПОПТОЗНА ЗАГИБЕЛЬ КЛІТИН	
2.1. Основні характеристики апоптозу	49
2.2. Біологічна роль апоптозу	51
3. МЕХАНІЗМИ АПОПТОЗУ	
3.1. Індуктори та інгібітори апоптозу	57
3.2. Генетичні механізми реалізації апоптозу	61
3.2.1. Нематода – перший об'єкт дослідження апоптозу	61
3.2.2. Родина генів <i>bcl-2</i>	65
3.2.3. Роль гена <i>p53</i> як регулятора клітинного циклу і транскрипційного фактора в розвитку апоптозу	72

3.2.4. Роль найважливіших онкогенів іprotoонкогенів у реалізації апоптозної програми.....	76
3.3. Роль мембраних структур в ініціації апоптозу	85
3.4. Роль мітохондрій у передачі апоптозного сигналу	94
3.5. Транскрипційний ядерний фактор NF-кВ.....	106
3.6. Апоптоз-індукуючі процеси інших органел.....	113
3.6.1. Ендоплазматичний ретикулум	113
3.6.2. Ядро та апарат Гольджі.....	118
3.6.3. Лізосоми	119
3.7. MAP-кінази	121
3.8. Сфінголіпіди в передачі апоптозного сигналу	124
3.8.1. Церамід як вторинний месенджер.....	128
3.8.2. Церамід-1-фосфат.....	132
3.8.3. Сфінгозин і сфінгозин-1-фосфат	133
3.8.4. Модель церамід/сфінгозин-1-фосфатного реостату	138
3.9. Міжнуклеосомна фрагментація ДНК	139
3.10. Теломера та апоптоз.....	146
3.11. Регуляція апоптоз-некрозного перемикання і виживання клітин	149
3.11.1. Стан енергозабезпечення клітини як перемикач між апоптозом і некрозом.....	149
3.11.2. NO як молекула-регулятор апоптозу, некрозу і виживання клітин.....	150
3.11.3. ROS як сигнальні молекули: регуляція виживання й загибелі клітин	160
3.11.3.1. Особливості генерації ROS у клітинах.....	160
3.11.3.2. Впливи ROS на біомолекули: небезпека і захисні механізми організму.	
Редокс-баланс клітини	163

3.11.3.3. ROS як регуляторні молекули: окисні модифікації білків	168
3.11.3.4. ROS як регуляторні молекули: вплив на внутрішньоклітинні сигнальні каскади	175
3.11.3.5. ROS як регуляторні молекули: транскрипційні фактори й експресія генів	180
3.11.3.6. Участь ROS у механізмах апоптозу і виживання клітин.....	182
3.12. Фагоцитоз апоптозних клітин	190
4. ПАТОЛОГІЧНІ АСПЕКТИ АПОПТОЗУ	197
4.1. Роль апоптозу в розвитку злойкісних новоутворень	199
4.2. Автоімунні лімфопроліферативні розлади	203
4.3. Серцево-судинні захворювання.....	206
4.4. Нейродегенеративні захворювання	214
4.5. СНІД	237
4.6. Атопічна алергія	243
4.7. Гастроентерологічні захворювання.....	246
4.8. Інші захворювання, пов'язані з порушеннями процесів апоптозу	253
4.9. Апоптоз і старіння.....	263
4.10. Апоптоз і стрес	267
5. ТЕРАПЕВТИЧНІ АСПЕКТИ АПОПТОЗУ	273
6. НАЙВАЖЛИВІШІ МЕТОДИ ДЕТЕКЦІЇ АПОПТОЗУ	281
6.1. Виявлення апоптозу <i>in vivo</i>	281
6.1.1. Світлова мікроскопія	281
6.1.2. Флуоресцентна мікроскопія	282
6.1.3. Електронна мікроскопія.....	286
6.1.4. Цитометрія в потоці	287
	309

Біохімічні механізми апоптозу

6.1.5. Гель-електрофорез ДНК (електрофорез ДНК в агарозному гелі)	288
6.1.6. Імуно- та гістохімічні методи	290
6.2. Неінвазивні (без хірургічного втручання) методи візуалізації апоптозу	291
6.3. Прижиттєвий аналіз біологічних рідин (сироватки і плазми крові, сечі)	292
7. КОНТРОЛЬНІ ЗАПИТАННЯ ТА ЗАВДАННЯ	293
Список літератури	299
ПРО АВТОРІВ	303

Навчальне видання

**ОСТАПЧЕНКО Людмила Іванівна
СИНЕЛЬНИК Тетяна Борисівна
РИБАЛЬЧЕНКО Тарас Володимирович
РИБАЛЬЧЕНКО Володимир Корнійович**

БІОХІМІЧНІ МЕХАНІЗМИ АПОПТОЗУ

Навчальний посібник

Редактор Л. А. Воронцова

Оригінал-макет виготовлено Видавничо-поліграфічним центром
"Київський університет"

Виконавець Т. С. Яшкова

Автори несуть повну відповідальність за точність наведених фактів, даних, цитат,
прізвищ та ініціалів, інших відомостей



Підписано до друку 29.06.10. Формат 70x100^{1/16}. Вид. № 7. Гарнітура Bookman. Папір офсетний.
Друк офсетний. Наклад 200. Ум. друк. арк. 25,2. Обл.-вид. арк. 22,3. Зам. № 210-5306.

Видавничо-поліграфічний центр "Київський університет"
01601, Київ, б-р Т.Шевченка, 14, кімн. 43
телефон (38044) 239 32 22; (38044) 239 31 61; тел./факс (38044) 239 31 28
E-mail: vpc@univ.kiev.ua
Свідоцтво внесено до Державного реєстру ДК № 1103 від 31.10.02.

Видавничо-поліграфічний Центр
"Київський університет"
Версія не для друку