

Топчий Н. Н., Бердышев Г. Д., Демидов С. В., Скрипка Е. А., Шкляр С. Е., Мельничук И. В.

ИНФОРМАЦИЯ О СМЕРТИ КЛЕТОК НЕОБХОДИМА ДЛЯ ЖИЗНИ ВСЕГО ОРГАНИЗМА

Киевский национальный университет им. Тараса Шевченко,
ул. Владимирская 64, г. Киев-33, 01033, Украина;
e-mail: topchiy_nataliya@univ.kiev.ua

В настоящей статье мы даем обзор собственных экспериментальных и литературных данных, посвященных запрограммированной гибели клеток — апоптозу у животных и растений, показываем, что наследственная информация о смерти необходима для жизни и эволюционного процветания многоклеточных организмов. За эти работы группе американских и английских учёных в 2002 г. была присуждена Нобелевская премия по физиологии и медицине. Апоптоз — центральная проблема современного комплекса наук о жизни.

Ключевые слова: старение, запрограммированная клеточная гибель, апоптоз, некроз, каспазы.

Введение

Уже на первых этапах возникновения жизни ее основа — наследственная информация — содержала три компонента. Первый компонент наследственной информации предусматривает все аспекты поддержания жизни — сведения об анаболических процессах, размножении клеток и организмов, их прогрессивной эволюции. Поскольку в ходе жизнедеятельности повреждаются все структуры и функции живых систем, второй компонент наследственной информации содержит инструкции о разнообразных механизмах репарации, восстановлении поврежденных структур и функций. Третья часть наследственной информации живой системы — информация смерти, сведения о катаболизме, распаде органелл, гибели клеток, смерти целых организмов. В процессе жизнедеятельности клеток и организмов осуществляется постоянное, непрерывное взаимодействие этих трех наследственных программ, заложенных эволюцией во все биологические системы. В последние годы в биологии и медицине осуществлен революционный прорыв в познании этого компонента наследственной информации биосистем, увенчанный Нобелевской премией 2002 г. Были открыты гены смерти, включение которых вызывает повреждение структуры и функции клеток, их гибели, приводит к многочисленным заболеваниям, в том числе раку, и, в конце концов, к смерти всего организма.

В настоящей статье мы даем обзор собственных экспериментальных и литературных данных, посвященных запрограммированной гибели клеток — апоптозу у животных и растений, показываем, что наследственная информация о смерти необходима для жизни и эволюционного процветания всех биосистем.

1. История и определение основных понятий

В XIX веке выдающийся немецкий учёный А. Вейсман считал, что клетки сами по себе бессмертны. Смерть появляется тогда, когда клетки объединяются в многоклеточный организм. Он полагал, что в дикой природе старения нет, так как животные погибают задолго до развития выраженных признаков старения.

Большую роль в старении играет гибель клеток, которую описал ещё Р. Гук. Еще в 1665 г. он описал роль клеточной гибели в формировании погибших клеток коры дуба [14]. Однако это наблюдение длительное время оставалось без внимания. В 1842 г. К. Фогт и в 1859 г. Р. Вирхов опубликовали свои наблюдения, которые касались клеточной смерти [14]. А в 1923 г. П. Аллен, исследуя инфицированные грибами растительные клетки, выдвинул концепцию ЗГК, согласно которой клетка активно участвует в своем разрушении [22].

В 1922 г. медицинский факультет Гейдельбергского университета основал специальную премию за разработку темы «Гибель клеток во время жизненного процесса». Эта премия была присуждена Максусу Эрнсту за подробную работу «О гибели клеток на протяжении нормального

развития позвоночных» [19]. Автор обнаружил и изучил гибель клеток у эмбрионов многих классов позвоночных — круглоротых рыб, амфибий, пресмыкающихся, птиц, млекопитающих (в том числе человека). Гибель клеток постоянно наблюдается в том или другом локусе ткани зародышевых листков на строго определенной стадии развития эмбрионов. Эрнст выделял гибель клеток, которая наблюдалась во всех изученных эмбрионах всех классов позвоночных, и гибель клеток, которая была присуща только эмбрионам известного класса.

А. Глюксман [24–25] и Дж. Саундерс [27–29] подробно изучали морфологию клеточной гибели в разных тканях и органах эмбрионов, дали ее классификацию. Они показали, что без ЗГК не осуществляется морфогенез, устранение личиночных органов.

Глюксманн предполагал, что в период морфогенеза активизируется специальный адаптивный механизм, который оказывает содействие элиминации избыточных и/или функционально аномальных клеток. Позднее, в 1966 г., аналогичный механизм самоликвидации (суицид) клеток был описан Дж. Саундерсом у беспозвоночных животных [29]. В обеих работах была изложена мысль о том, что элиминация клеток происходит благодаря программе, которая заложена в самих клетках.

Ряд работ Локшина и соавторов в 1969–1974 годах [30–31] посвящены исследованию изменений в межсегментарных мышцах, которые дегенерируют во время метаморфозы у шелковой моли (*Antheraea polyphemus*, *Philosamia cynthia*, *Manduca sexta*). Эти мышцы являются личиночными и действуют на протяжении трёхнедельного периода развития куколок. После выхода взрослого насекомого из куколки мышцы рассасываются на протяжении 48 часов.

Последние исследования на горных баранах и на мухах привели к выводу, что старение — это реальный процесс в жизни животных, обитающих в диких условиях, и оно сильно влияет на судьбу животных. В 60-е годы питерский радиобиолог Кайдо Хадсон обратил внимание на то, что при облучении большинство клеток гибнет не потому, что получили сильную дозу радиации, а потому, что кончают свою жизнь самоубийством в ответ на облучение.

В 1968 г. Г. Д. Бердышев изучил феноменологию и биохимические механизмы гибели клеток в органах и тканях некоторых животных, которые умирают после единственного в их жизни акта размножения вследствие запрограммированной гибели [11]. Роль генов в данном процессе в то время ещё не была известной. В качестве удобного модельного объекта исследования были предложены тихоокеанские лососи, в частности, горбуша (*Oncorhynchus gorbusha Walb.*), гибнущие в результате массовой ЗГК после единственного акта репродукции. В исследовании Бердышева и его соавторов было установлено, что во время запрограммированной гибели клеток (ЗГК) во многих органах нерестующей горбуши закономерно изменяется содержание ДНК, РНК, их физико-химические свойства, особенно метилирование ДНК. Впервые был выявлен процесс деметилирования ДНК, установлена возрастная специфичность этого явления [12]. Изучена динамика выхода нуклеаз из лизосом, изучены особенности этих ферментов [13]. На основании собственных исследований Г. Д. Бердышевым была сформулирована генетическая теория гибели тихоокеанских лососей [14–16], эколого-генетическая теория старения позвоночных животных, согласно которой старение вызывается как случайными повреждениями клеток, так и запрограммированными, в том числе и ЗГК [16–19]. Эта концепция стала популярной после того, как ЗГК стала актуальной проблемой биологии.

В 1972 году британский ученый Керр и его коллеги опубликовали работу о том, что любая живая клетка снабжена программой самоубийства, которую назвали греческим словом «апоптоз» (это понятие было введено древним врачом Галеном и означает «опадание листьев») [20].

Программа самоубийства используется в самых разных целях. Антираковая защита организма построена в основном на апоптозе. Сбой в программе апоптоза приводит к возникновению опухоли.

Кульминацией стало присуждение Нобелевской премии 2002 года по физиологии и медицине за открытие генов, единственная функция которых — кодировать белки, которые вызывают самоубийство клеток [18, 23].

Внутри клетки среди органоидов есть митохондрии. Экспериментально установлено, что митохондрии, которые в ходе окислительного фосфорилирования образуют ядовитые активные формы кислорода — супероксидные радикалы, в ходе функционирования как бы кон-

чают с собой — сами принимают это решение, и сами постепенно приводят его в исполнение. Это и есть внутриклеточный апоптоз. Так же действуют токсины вирусов. Мертвая зона вокруг зараженной клетки изолирует остальную часть от вирусной инфекции.

Некоторые учёные, опираясь на своих экспериментальные данные, полагают, что смертоносным сигналом, инструментом апоптоза служит перекись водорода. Оказалось, что ставшая на путь самоубийства клетка образует в больших количествах перекись водорода, которая легко проникает через клеточную мембрану в соседние клетки. У них есть рецепторы, воспринимающие этот сигнал для запуска программы самоубийства.

Известно, что если бактерия заражается бактериофагом, то в целом ряде случаев она кончает с собой точно так же, как и зараженная вирусом клетка многоклеточного организма. Одноклеточная бактерия — это одновременно и клетка, и целостный организм, то есть здесь мы можем говорить о самоубийстве организмов. Академик В. П. Скулачёв предложил называть это явление термином «феноптоз» по аналогии с апоптозом.

Совсем недавно феноптоз описан у дрожжей. Оказалось, что и у них при определенных условиях включается программа самоубийства. Есть удивительные примеры самоубийства растений и животных. Бамбук 15-20 лет может размножаться вегетативно и, казалось бы, быть бессмертным, но потом вдруг принимает решение перейти на половое размножение, появляются цветы, семена и буквально через несколько дней после созревания семян бамбук погибает. Безусловно, это программа самоубийства: бамбук гибнет не из-за плохих внешних условий — условия прекрасные, разгар лета, другим растениям хорошо, — а следует внутренней команде гибели, записанной в его геноме.

Рак — это поломка какого-то механизма самоубийства клеток. Американские ученые в экспериментах на мышах повысили активность одного из белков — и рак полностью исчез. Но при этом ускорилось старение животных. Обычно каждая вторая мышка в старости умирает от рака. Казалось бы, основная причина смерти исчезла, и теперь мыши должны жить дольше, а они начали умирать странной смертью без внешних признаков заболевания — просто засыпали. Причем умирали в среднем на 20 процентов раньше, чем, если бы их сразил рак.

Есть основания считать, что механизмы самоубийства клеток разные. Тот механизм, который вызывает рак отличается от того, который вызывает старение. Кислород участвует во втором, но не в первом механизме. Старение человека — это не поломка организма, это программа медленного апоптоза.

Явление апоптоза в эволюции появилось на уровне прокариот. У многоклеточных организмов оно служит для регуляции численности клеток и установления определённых взаимоотношений между отдельными клетками в целостном организме. Эукариотические клетки — это как бы «общественные» существа. Для их развития необходим постоянный контакт с себе подобными клетками. Взаимоотношение клеток друг с другом в многоклеточном организме давно привлекает внимание исследователей. И это не случайно, т. к. именно благодаря этому происходит деление, рост, развитие, дифференцировка и, как это выяснилось совсем недавно — гибель клеток.

Особенно важную роль апоптоз играет в процессе эмбрионального развития. Он наблюдается при различных морфогенетических процессах, росте тканей, формировании органов.

Хорошо исследована апоптотическая гибель клеток при эмбриональном развитии беспозвоночных животных, например нематоды (*Chaenorhabditis elegans*). ЗГК наблюдается при метаморфозе насекомых. Изучена также запрограммированная клеточная гибель в процессе эмбриогенеза высших позвоночных — при развитии глаза млекопитающих, сердца, нервной системы. Нарушение апоптоза в эмбриогенезе может приводить к внутриутробной гибели плода, врожденным уродствам или различным заболеваниям, в том числе и злокачественным новообразованиям.

Во взрослом организме апоптоз распространён в различных типах тканей. Он встречается как в медленно пролиферирующей популяции клеток (гепатоциты, клетки эпителия коры надпочечников), так и в быстро пролиферирующей популяции. В первом случае он выполняет функцию гомеостатической регуляции оптимального объёма ткани. Во втором случае роль апоптоза, в основном, связана с дифференцировкой клеток и морфогенетическими процессами.

Апоптотическая гибель клеток наблюдается при различных патологических состояниях. Этим путём осуществляется гибель клеток в эндокринно-зависимых тканях, при уменьшении концентрации соответствующего гормона (например, клеток простаты после кастрации и коры надпочечников после подавления синтеза АКГГ глюкокортикоидами). Гибель клеток путём апоптоза происходит также при уменьшении кровоснабжения органа (ишемическая болезнь сердца).

Путём запрограммированной клеточной гибели происходит удаление клеток, выживание которых нежелательно для организма, например, мутантных клеток или клеток, зараженных вирусом. В последнем случае этот процесс имеет важное биологическое значение, поскольку фрагментация ДНК предупреждает перенос генетического материала в другие клетки. Воздействие радиации вызывает апоптоз в пролиферирующих клетках эпителия кишечника и в непролиферирующих клетках иммунной системы. Т. е. апоптоз является широко распространенным общебиологическим механизмом, ответственным за поддержание постоянства численности клеток, формообразование, элиминацию дефектных клеток.

В процессе роста, дифференцировки и естественного обновления клеток у человека каждый день появляется 10 миллиардов новых клеток. Примерно столько же клеток гибнет, подвергая себя процессу апоптоза. Этот процесс эффективен, избирателен и осуществляется без образования токсических метаболитов. Результаты исследования апоптоза в первую очередь пытаются применять для решения проблем раковых опухолей у человека.

При злокачественном перерождении нормальных клеток и тканей происходят мутации, ведущие к:

- генетической нестабильности;
- аномальной экспрессии генов;
- неэффективности иммунного ответа;
- нарушениям в передаче сигналов пролиферации и дифференцировки клеток и тканей;
- отсутствию контактного торможения роста клеток;
- стимулированию роста сосудов в опухоли;
- инвазии и метастазированию.

В случае раковой как болезни большинство этих мутаций реализуется и чтобы противостоять раку, необходимо устранить действие каждой из этих мутаций.

При функционировании система апоптоза одновременно использует более ста различных молекул, которые согласованно действуют, выполняя приказ по деструкции клетки. В любой клетке организма эти молекулы находятся наготове, и только ждут дня действия. Программа развития и дифференцировки, а также программа ликвидации клетки заложены на генном уровне. Мы не замечаем всех этих сложных процессов, если они идут естественным образом и апоптоз функционирует как четкое исполнение генетической программы клетки.

Хотя термины «запрограммированная гибель клеток» и «апоптоз» часто используются как синонимы, между ними существуют определённые различия. Под запрограммированной гибелью клетки понимают механизм её элиминации, который активируется во время формирования органов, тканей и целого организма в период эмбрио- и морфогенеза, некоторых форм старения, и у растений — в качестве ответа клетки на патогены. В тоже время во время апоптоза гибель клетки не обязательно является запрограммированной. И, наоборот, ЗГК не всегда осуществляется путём апоптоза. Кроме, того, Керр с соавторами отметили существование двух разных видов клеточной смерти у животных — апоптоза и некроза [20].

2. Феноменология и механизмы апоптоза

В настоящее время бурный поток информации об апоптозе размыл все искусственные барьеры и вырвался на просторы широкого комплекса естественных научных исследований. Каждый год появляется несколько тысяч статей и книг по исследованию апоптоза. Мы ограничимся кратким обсуждением феноменологии и механизмов этого вида гибели клеток.

Апоптоз вызывают различные по происхождению факторы (физические, химические, биологические) (табл. 1).

Таблица 1. Этиологические факторы, которые приводят к апоптозу [2].

Физические факторы	Химические факторы	Биологические факторы
Высокая температура	Геннотоксичные ксенобиотики	Вирусы
Низкая температура	Афлатоксины	Бактерии
Электрический ток	Бенз(а)пирен	Генетические дефекты
Гипероксия	Метилхолантрен	
Ионизирующая радиация	Лекарства:	
УФ-лучи	АСЕ-ингибиторы	
	карведилол	
	цитостатики	
	глюкокортикоиды	
	тиреоидные гормоны	
	прогестерон	

В последнее время появляется все больше данных о том, что апоптоз является дозозависимым и при увеличении дозы и экспозиции различные агенты могут индуцировать некроз клетки [10, 11] (рис. 1).

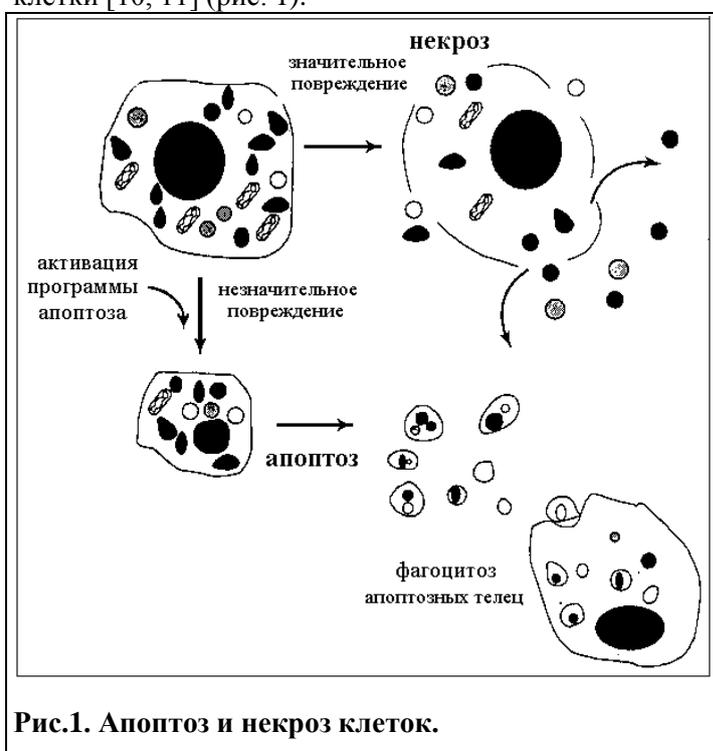


Рис.1. Апоптоз и некроз клеток.

До недавнего времени считалось, что некроз — это сугубо патологический процесс, который развивается одновременно в большой группе клеток в результате гипоксии, физических и химических влияний, под действием вирусов и т. д. [4–7], связанных с полным метаболическим коллапсом, который приводит к отеку клеток, ранней потере целостности ее мембран, повреждению митохондрий и других органелл, что в конечном счете заканчивается лизисом клеток [8–11]. Некроз не связан с поглощением энергии и синтезом белка [14, 21]. В то же время, апоптоз — это энергозависимый процесс, который приводит к «суициду» ненужных клеток, на протяжении которого в результате фрагментации ДНК их ядерный хроматин конденсируется. После этого клетки распадаются на так называемые «апоптозные тельца»,

которые имеют в своем составе внешне неповрежденные митохондрии и другие органеллы. Потом такие тельца фагоцитируются как «профессиональными», так и «не профессиональными» макрофагами, роль которых исполняют соседние клетки, например, мезангиоциты или клетки тубулярного эпителия [10, 14, 21].

За последнее время стали накапливаться факторы, которые свидетельствуют о сближении понятий о некротической и апоптической форм элиминации «нежелательных» клеток, об этом свидетельствуют следующие факторы. Оказалось, что:

- патологическое влияние (стрессы): ионизирующая радиация, патогены, цитокинины вызывают в одной и той же популяции обе формы гибели;
- антиапоптотические механизмы способны защитить клетки и от некротической, и от апоптической деструкции;
- биохимическое вмешательство (например, ингибиторы поли(ADP)-рибозополимеразы) в сигнальный и исполнительный аппарат ЗГК может изменять выбор формы клеточной гибели [14].

Некроз характеризуется разрывом цитоплазматической и внутриклеточной мембран, что приводит к разрушению органелл, освобождению лизосомальных ферментов и выходу содержания цитоплазмы в межклеточное пространство [10–16]. Во время апоптоза сохраняется целостность мембран: органеллы морфологически интактны, а продукты клеток, апоптотические тельца (или везикулы) представляют собой отдельные фрагменты, окруженные мембраной [8, 9].

Форма клеточной гибели — путь апоптоза или некроза — во многих случаях определяется внутриклеточной концентрацией NAD^+ или АТФ. Понижение уровня NAD^+ и АТФ приводит к индукции некроза [14].

Таким образом, процессы апоптоза и некроза имеют как схожие, так и различающиеся черты.

Проблема исследования молекулярных механизмов запрограммированной гибели клетки стала в последние годы одной из самых трудных и актуальных проблем биологических и медицинских наук. Трудность этой проблемы, очевидна: несмотря на большое количество экспериментальных данных, до сих пор остаются не исследованными механизмами этого явления, не до конца выяснена регуляция апоптоза отдельных клеток в целостном многоклеточном организме. Актуальность этой проблемы определяется взаимосвязью нарушения регуляции процесса апоптоза с большинством заболеваний. Выявление конкретных механизмов нарушения регуляции апоптоза, сопровождаемых конкретными заболеваниями, позволит определить этиологию и патогенез многих заболеваний, и как следствие этого — возможность их лечения.

На молекулярном уровне процесс апоптотической гибели представляет собой сложный каскад реакций, связанный с экспрессией генов и синтезом белков, ассоциированных с апоптозом, участием протеаз, протеинкиназ и эндонуклеаз, конечным результатом которого является дезинтеграция клетки с образованием апоптотических телец. Существуют многочисленные доказательства в пользу того, что апоптоз может инициироваться под действием как внутриклеточных, так и внеклеточных факторов. Инициация внутриклеточных механизмов апоптоза происходит в результате связывания определённых лигандов (гранзимы, глюкокортикоиды и др.) со своими специфическими рецепторами, либо вследствие дефицита экзогенных лигандов (факторы выживания клеток, компоненты внеклеточного матрикса и др.). Когда не происходит активации рецепторов, ответственных за передачу сигналов, необходимых для выживания клеток (рис.2). Наиболее изученным механизмом рецепторопосредованной инициации апоптоза является связывания «лигандов смерти» семейства фактора некроза (TNF) с рецепторами плазматической мембраны.

С помощью рецепторов полученный сигнал последовательно передаётся молекулам-посредникам разного уровня и достигает ядра, где и осуществляется включение программы ликвидации клетки [5, 22]. Однако существование ЗГК в безъядерных системах показывает, что присутствие ядра не является обязательным для реализации данного процесса. Программа гибели осуществляется клеткой-мишенью в зависимости от типа стимула, биохимического фенотипа клетки и т. д.

В большинстве случаев апоптоз у животных и человека связан с протеолитической активацией каскада каспаз — семейства эволюционно консервативных цистеиновых протеаз, которые специфически расщепляют белки у остатков аспарагиновой кислоты [17, 19]. Хотя известно, что апоптоз возможен и без их участия.

Каспазы — это цистеиновые протеазы, которые содержат аспарагиновые остатки в P1 позиции субстрат. Каспазы синтезируются в клетке в виде зимогенов-предшественников, состоящих из четырех доменов: NH_2 -концевого продомена, большой субъединицы (молекулярная масса около 20 кДа), малой субъединицы (около 10 кДа) и линкерного участка, соединяющего большую и малую субъединицы. После протеолитического расщепления зимогена большая и малая субъединицы разъединяются и образуют комплексный активный энзим, состоящий из гетеродимеров большой и малой субъединиц.

Каспазы различаются по длине аминокислотной последовательности NH_2 -концевого продомена, который бывает коротким (20–30 аминокислотных остатков) или длинным (табл. 2). В длинном (более 90 аминокислотных остатков) продоме обнаружено два модульных участка, которые опосредуют взаимодействие каспаз с адаптерными белками. Это эффекторный до-

мен смерти (DED, death effector domain) и домен мобилизации каспаз (CARD, caspase recruitment domain).

Гидрофобные белковые взаимодействия осуществляются в основном с участием DED-DED-контактов, тогда как в электростатических взаимодействиях принимают участие CARD-CARD-контакты. Существует 14 каспаз (табл. 2), которые имеют высокую разнородность [8, 10].

Таблица 2. Семейство каспаз (цистеин-аспартат специфичных протеаз).

Каспаза	Другое название	Функция	Молекулярная масса (кDa)
Каспаза-1	ICE	Воспаление, распознавание цитокининов	45
Каспаза-2	ICH-1, Nedd-2	Эффектор	51
Каспаза-3	Cpp-32, уапа, ароpain	Эффектор	32
Каспаза-4	TX, ICH-2, ICErel-II	Эффектор, распознавание цитокининов	43
Каспаза-5	TY, ICErel-III	Эффектор	48
Каспаза-6	Mch2	Эффектор	34
Каспаза-7	Mch3, ICE-LAP3, CMH-1	Эффектор	35
Каспаза-8	FLICE, Mch, Mch5	Индуктор	55
Каспаза-9	Mch6, ICE-LAP6	Индуктор	46
Каспаза-10	Mch4	Индуктор	55
Каспаза-11	mICH-3, mCASP-11	Воспаление, эффектор	43
Каспаза-12	mICH-4, mCASP-12	Эффектор	50
Каспаза-13	ERICE	Эффектор	43
Каспаза-14	MICE	Эффектор	30

В зависимости от своей структуры и механизмов каспазном каскаде их разделяют на две основные группы:

- начальные (инициаторные) каспазы (каспазы -1, -2, -8, -9, -10);
- крайние (эффекторные) каспазы (каспазы -2, -3, -4, -5, -6, -7, -11, -12, -13, -14) [10].

Инициаторные каспазы могут выступать и в роли эффекторных каспаз, что, по-видимому, необходимо для усиления активности каспазного каскада. Так, например, в определенных условиях каспаза-8 может активироваться только после того, как каспаза-9 трансактивирует каспазу –6 [16].

Первая группа каспаз принимает апоптотический сигнал и передает его на эффекторные каспазы, которые непосредственно гидролизуют структурные белки клетки. Среди молекулярных мишеней каспаз — эффекторов известно много белков, деградация которых вызывает развитие не обратимых процессов, характерных для апоптоза.

Один из путей активации каспаз связан с взаимодействием индуктора апоптоза со специфичными рецепторами (например, активация каспазы-8 во время взаимодействия Fas-лиганда с Fas-рецептором). Другой путь — активация каспазы –9 вследствие образования гетеродимеров белками семейства Bcl-2. Третий путь активации каспаз — с помощью гранзимов В (в случае индукции апоптоза клетки цитотоксическими Т-лимфоцитами, которые секретируют эти ферменты). При этом необходимо присутствие перфоринов, которые также продуцируются цитотоксическими Т-лимфоцитами [10].

Известно более семидесяти про- и антиапоптотических белковых субстратов каспаз, которые локализованы в клеточном ядре. Каспазы специфически распознают последовательность, состоящую из четырех аминокислотных остатков и обозначаемую как P4-P3-P2-P1. Наиболее консервативными в данной последовательности каспазного субстрата являются остаток аспарагиновой кислоты, находящейся в позиции P1, и остаток глутамина в позиции P3. В результате гидролиза каспазами биологическая функция их субстратов может активироваться или ингибироваться.

Каспазы проявляют также антиапоптотическое действие. Показано, что панкаспазный ингибитор z-VAD-FMK препятствует гибели линии клеток Jurkat, индуцированной TNF- α , нитро-

пруссидом натрия или этопозоидом. Однако в макрофагах линии RAW246.7, активированных липополисахаридом, этот ингибитор каспаз наоборот стимулирует апоптоз, что свидетельствует о роли каспаз в предупреждении клеточной гибели.

Индукция Fas-зависимого апоптоза происходит путём кластеризации рецепторов Fas после специфического связывания тримеров лиганда Fas (FasL) или в результате действия моноклональных антител (МКАТ) к Fas [10, 16]. Активация тримеров рецепторов Fas обуславливает образования белкового комплекса DISC (death-inducig signaling complex), играющего особую роль в инициации апоптоза [10]. С помощью двугибридной дрожжевой системе был идентифицирован адаптерный белок Fadd (Fas-associating protein with death domain), связывающийся с цитоплазматическим доменом Fas благодаря наличию в структуре последнего DD-участков [17]. Fadd также содержит эффекторный домен смерти (DED, death effector domain), который отвечает за дальнейшую передачу проапоптотического сигнала. У мышей с «нокаутированным» (то есть лишённым обеих аллелей) геном *Fadd* развивается резистентность к Fas-зависимому апоптозу активированных Т-лимфоцитов [10].

Генотоксические эффекты ряда повреждающих ДНК агентов реализуются за счёт их непосредственного воздействия на ядро клетки. Опасны продукты одноэлектронного восстановления кислорода. По ядовитости они соперничают с хлоркой, убивают все живое и могут испортить любое вещество. Чтобы бороться с этими радикалами, организм изобрел изошренную систему защиты. И, тем не менее, у всех живых существ всегда есть некоторое количество ДНК, поврежденное кислородом, что представляет чреватое опасными последствиями вмешательство в геном.

Видимо, это и объясняет, почему все системы самоубийства клетки так или иначе связаны с активными формами кислорода. И митохондрии с их помощью кончают с собой, и клетка, и группы клеток — везде сигнал идет через перекись водорода и пероксидный радикал. Есть основание полагать, что самоубийство организма, или старение, также опосредовано активными формами кислорода. Если бы мы могли каким-то способом их обуздать, то, возможно, отменили бы генетическую программу фенотоза.

Центральным звеном в клеточных механизмах, активирующихся в ответ на повреждение ДНК, является фактор транскрипции p53. Этот ядерный белок p53 кодируемый одноимённым геном — супрессором опухолевого роста, регулирует многие клеточные функции, включая митотический цикл, репарацию повреждённой ДНК, дифференцировку клеток и их гибель по типу апоптоза [10, 16]. Белок p53 постоянно синтезируется клетками, но очень быстро расщепляется (перед его полураспада составляет около 20 мин); поэтому концентрация p53 в большинстве нормальных клеток и тканей очень низка. Когда в клетке под действием проникающей радиации, УФ-излучения или некоторых химиопрепаратов происходит повреждение ДНК, содержания белка p53 резко повышается в следствии его стабилизации. Негативным регулятором экспрессии p53 является белок Mdm2 (murine double minute 2), который подавляет транскрипционную активность p53, а также индуцирует его протеолитическое расщепление убиквитинным комплексом [21].

Активация p53, которая отмечается уже через 30 мин. после повреждения клеточного генома, способствует подавлению процессов, связанных с делением клеток. Такое действие белка p53 реализуется с помощью трёх основных механизмов, функционирующих независимо друг от друга или совместно (см. рис. 2). Во-первых, при незначительном повреждении структуры ДНК активированный p53 индуцирует транскрипцию генов *WAF1*, *GADD45* 14- и 3-3s, белковые продукты которых участвуют в остановке клеточного цикла. Такая «передышка» позволяет клетки обеспечить репарацию повреждённой ДНК. Во-вторых, в случае значительных повреждений ДНК белок p53 активирует экспрессию проапоптотических генов, в том числе *bax*, *Fas*, *DR-5*, *PIG1-14* (p53-induced genes), *IGF-BP3* (IGF-binding protein 3), *p85* и *PAG-608* [17]. Кроме активации отдельных генов белок p53 способен подавлять экспрессию антиапоптотических генов (например, выявлено p53 –зависимое снижение экспрессии генов *bcl-2* и рецептора IGF-I). В-третьих, результаты исследований p53-зависимой индукции апоптоза в присутствии ингибиторов синтеза РНК и белков свидетельствует о том, что существуют механизмы инициации белком p53 апоптоза, которые не связаны с транскрипционной активностью названного белка. Пока эти механизмы практически не изучены, хотя имеются предварительные данные,

которые указывают на способность p53 непосредственно взаимодействовать с апоптозассоциированными белками [8-10].

Вызываемый усилением экспрессии онкогенов сигнал, обуславливающий гиперпролиферацию клеток, в некоторых случаях также способен индуцировать их апоптоз. Показано, что при действии подобного сигнала в ядре клетки может накапливаться белок p53 и развиваться p53-зависимый апоптоз. Однако, механизмы, реализующие этот процесс, отличаются от тех, которые активируются, при повреждениях ДНК клетки [8]. Экспрессия онкогенов *mys*, *ras*, гена фактора транскрипции *E2F1* и гена аденовируса *E1A* (который активирует *E2F*) приводит к накоплению белка Arf (alternative reading frame), являющегося продуктом альтернативной рамки считывания локуса Ink4A. Проапоптолитическое действие белка Arf реализуется посредством его связывания с белком Mdm2 и блокирования способности последнего вызывать расщепление белка p53 с участием протеосомных ферментативных комплексов [8-11].

Известно, что в клетках эукариотических организмов каждая хромосома имеет на своих окончаниях особый ДНК-белковый комплекс, называемый теломерой. Биологическую роль теломеры связывают с обеспечением целостности хромосом и процессов их репликации, а также с регуляцией продолжительности жизни клеток. Теломерный комплекс представлен повторами двухцепочных участков ДНК, содержащих нуклеотидные повторы (TTAGGG/CCCTAA)_n, и 3'-концевой участок одноцепочечной ДНК с последовательностью нуклеотидов (TTAGGG)_n. Поскольку при делении клеток ДНК-полимераза не обеспечивает репликацию концевых нуклеотидов в цепочке ДНК, то с каждым последующим делением длина хромосомы укорачивается примерно на 150 пар оснований нуклеотидной последовательности 5'-конца молекулы ДНК. Достигая определённой критической длины, теломера перестаёт выполнять свои защитные функции, что приводит к активации белка p53, остановке клеточного цикла и апоптозу [16]. Восстановление длины теломерного участка ДНК обеспечивает РНК-зависимая ДНК-полимераза, которую чаще называют теломеразой. В подавляющем большинстве клеток нормальных тканей теломераза находится в неактивном состоянии (исключение составляют стволовые клетки и клетки репродуктивных органов). Её антиапоптоическое действие состоит в препятствии естественному «изнашиванию» хромосомной ДНК, и постоянная активация этого фермента может вызывать иммортализацию (бессмертие) клеток. Факт длительного выживания клеток, экспрессирующих теломеразу (>200 делений *in vitro*) без формирования злокачественного фенотипа не подтверждает существовавшее мнение об участии этого фермента в злокачественной трансформации клеток.

3. Заключение

Таким образом, апоптоз является общебиологическим механизмом, ответственным за поддержания постоянства численности клеточной популяции, а также формообразования и выбраковку дефектных клеток. Нарушение регуляции апоптоза приводит к возникновению различных заболеваний, связанных с усилением или, наоборот, ингибированием апоптоза. Следовательно, изучение механизмов регуляции различных этапов данного процесса позволит определённым образом воздействовать на его отдельные этапы с целью их регуляции или коррекции. В настоящее время общепринято: если клетка погибает от апоптоза — подразумевается возможность терапевтического вмешательства, если вследствие некроза — вмешательство невозможно.

На основании знаний о запрограммированной гибели клетки получен широкий ряд препаратов с целью регуляции этого процесса в различных типах клеток. Так, для лечения бокового амиотрофического склероза часто применяют препарат рилузол, являющийся антагонистом NMDA-рецепторов. В условиях *in vitro* препарат снижает уровень апоптоза нейронов, который был индуцирован глутаматом и аспартатом. Использование рилузола позволяет в среднем на 5 лет продлить жизнь больных и отдалить их госпитализацию.

Осознание роли апоптоза в гибели клеток интенсифицировало поиск фармакологических средств, защищающих их от апоптоза. Активно изучаются ингибиторы специфических протеаз в качестве фармакологических агентов. Это, как правило, три- или тетрапептиды, содержащие аспарагин. Ограничивает их терапевтическое использование низкая способность проникать в клетку. Однако, несмотря на это, в экспериментах *in vivo* получены успешные ре-

зультаты при использовании ингибитора различных каспаз N-бензилоксикарбонил-Val-Ala-Asp-фторметилкетона для снижения зоны инфаркта при инсульте. В ближайшие годы можно ожидать появления новых лекарственных препаратов для лечения и предупреждения различных заболеваний, в основе действия которых заложен принцип регуляции процессов апоптоза.

Многообещающими являются также подходы, связанные с регуляцией апоптоз-специфических генов и реализующиеся, в частности, в генной терапии — одной из самых перспективных областей современной медицины — при лечении заболеваний, вызванных нарушением функционирования отдельных генов. Известны тысячи канцерогенов, выявлены многочисленные механизмы опухолевого роста и способы лечения некоторых форм рака. Глубокое понимание систем иммунитета и опухолевого роста позволит уже сегодня выбирать оптимальный вариант лечения рака и существенно продлить или спасти жизнь больному. Дальнейшее исследования морфологических и биохимических механизмов запрограммированной гибели клеток позволит более глубоко понять патогенез многих заболеваний, улучшит их дифференциальную диагностику и откроет потенциально новые направления терапии. Без глубокого понимания ЗГК невозможно понять механизмы старения многоклеточных организмов и вести поиск новых методов борьбы с ними.

Л и т е р а т у р а :

1. Бердышев Г. Д. Генетически обусловленная гибель клеток. Её механизмы и значение в многоклеточном организме // Успехи современной биологии. — 1968. — Т.66, вып. 2(5). — С.226-246.
2. Ванюшин Б. Ф., Бердышев Г. Д. Молекулярно-генетические механизмы старения. — М.: Медицина, 1977. — 296 с.
3. Бердышев Г. Д. Нуклеиновые кислоты пойкилотермных морских животных (эволюционные и возрастные аспекты). — Киев: Наукова думка, 1973. — 170 с.
4. Бердышев Г. Д., Проценко Н. А. Современные представления о механизмах посленерестовой гибели тихоокеанских лососей // Гидробиологический журнал. — 1972. — Т.6, №4. — С.101-112.
5. Бердышев Г. Д. Запрограммированная гибель соматических клеток как причина быстрого старения и смерти тихоокеанских лососей. В кн. 9-й Международной конференции геронтологов. — Киев, 1972. — Т.3, с. 14.
6. Бердышев Г. Д., Проценко Н. А. Генетическая теория постнерестовой гибели тихоокеанских лососей. В кн.: Современные вопросы экологической физиологии рыб. — М.: Наука, 1979. — С. 156-159.
7. Бердышев Г. Д. Экологические факторы старения и долголетия. — Л.: Наука, 1968. — 204 с.
8. Бердышев Г. Д. Генетически обусловленная гибель клеток и её роль в процессе старения организмов. В кн. «Химические исследования минерального, растительного и животного сырья Дальнего Востока». — Владивосток: Дальневосточный Филиал Сиб. Отдел. АН СССР, 1961. — С. 35-37.
9. Бердышев Г. Д. Соотношение генетических и стохастических повреждений в процессах старения клетки и организма // Цитология и генетика. — 1976. — Т.10, № 1. — С.65-73.
10. Лазаров С., Пенев М. Ролята на апоптозага в процеса на атерогенеза. Първа част // Съвременна медицина — 2002. — ЛIII, №5. — С.54-66.
11. Матишевська О. П. Апоптоз — запрограмована форма клітинної загибелі // Вісник Київського університету імені Тараса Шевченка. Біологія. — 1998. — Вип.27. — С.3-7.
12. Матишевская О. П. Биохимические аспекты вызванного радиацией апоптоза // Укр. биохим. журн. — 1998. — Т.70, № 5. — С. 15-27.
13. Проскуряков С. Я., Габай В. Л., Коноплянников А. Г. Некроз — активная, управляемая форма программируемой клеточной гибели // Биохимия. — 2002. — Т.67, вып. 4. — С.467-491.
14. Самуилов В. Д., Олескин А. В., Лагунова Е. М. Программированная клеточная смерть // Биохимия. — 2000. — Т.65, вып. 8. — С. 1029-1046.
15. Стойка Р. С., Фильченков О. О., Стойка Б. Р. Чому і як відмирають клітини тканин і органів? // Биополимеры и клетка. — 1997. — Т.13, № 5. — С.352-361.
16. Фильченков А. А., Бутенко З. А. Механизмы регуляции апоптоза и антиапоптотическое действие онкогенных вирусов // Биополимеры и клетка. — 2000. — Т.16, №6. — С. 455-465.
17. Фильченков А. А. Каспазы: регуляторы апоптоза и других клеточных функций // Биохимия. — 2003. — Т.68, вып. 4. — С. 453-466.
18. Ellis H., Horvitz H. Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans* // Cell. — 1985. — V 44, №3. — P. 817-829.
19. Ernst M. Über untergang von zellen während der normalen entwicklung bei wirgeltieren // Ztschr. für Anatomie und Ehtwickl. — 1926. — V.79, №1/2. — P.228.

20. Kerr J., Winterford C., Harman B. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics// Br. J. Cancer. — 1972. — V.26. — P. 239-257.
21. Levine A., Pennell R., Alvarez M., Palmer R., Lamb O. Calcium-mediated apoptosis in a plant hypersensitive disease resistance response// Curr. Biol.- 1996. — 1 6. — P. 427-437.
22. Jones A. Programmed cell death in development and defense// Plant Physiology. — 2001.- V.125. — P.94-97.
23. Hedgecock E., Sulston J., Tomson J. Mutations affecting programmed cell death in the nematode *Caenorhabditis elegans*// Science. — 1983. — V.220. — P.1277-1279.
24. Glucksmann A. Cell death in normal and vertebrata ontogeny// Biol. Rev. — 1951. — V.26. — P.59-86.
25. Glucksmann A. Cell Degeneration and cell Death// In: X^e Congress International de Biologie Cellulaire. Paris. — 1960. — P. 24-26.
26. Glucksmann A. Cell death in normal development// Arch. Biol. — 1965. — V.76, № 2-4. — P. 419-437.
27. Saunders J. The morphogenetic significans of cell death in embrionic development// In: X^e Congres International de Biologie Celendire. Paris. — 1960. — P. 120-122.
28. Saunders J. Cell death in embryonic accelerated senescence?// In: Topics in the Biology of Aging. — 1966. — P.159-161.
29. Saunders J. Death in embryonic systems// Science. — 1966. — V.154. — P. 604-612.
30. Lockshin K., Williams M. Programmed cell death. Cytology of degeneration in the Inte segmental muscles of the Pernyi Silkmoth// J. Insect Physiology. — 1965. — V.11, № 2. — P. 123-133.
31. Lockshin R. Degeneration of insect intersegmental muscles: electrophysiological studies of population of fibres// J. Insect Physiol. — 1973. — V.19, № 5. — P. 2359-2372.

Topchiy N. N., Berdishev G. D., Demidopv S. V., Skripka K. A., Shklyar S. E., Melnichuk I. V.

THE INFORMATION ABOUT DEATH IS NECESSARY FOR LIFE

Kiev Taras Shevchenko National university,
Vladimirska ul. 64, Kiev-33, 01033, Ukraine
e-mail: topchiy_nataliya@univ.kiev.ua

In present paper we give the review of own experimental and literary given, devoted to programmed destruction cells — apoptosis at animal and plants. We show, that the inheritable information about cell death is necessary for life and evolutionary prosperity of multicellular organisms.

Key words: senescence, programmed cell death, apoptosis, necrosis and caspases.