

ПРОГРАМИРОВАННАЯ КЛЕТОЧНАЯ ГИБЕЛЬ (АПОПТОЗ): МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ И РОЛЬ В БИОЛОГИИ И МЕДИЦИНЕ

К.П. ХАНСОН

НИИ онкологии им. проф. Н.Н. Петрова Минздрава РФ, С.-Петербург

В последние годы изучение клеточной гибели (КГ) стало одной из наиболее быстро развивающихся областей биологии. Установлено, что КГ наряду с пролиферацией и дифференцировкой играет фундаментальную роль в эмбриогенезе, морфогенезе и в поддержании клеточного гомеостаза тканей взрослого организма. Нарушение нормального процесса КГ лежит в основе ряда важнейших патологий человека, таких как злокачественные новообразования, СПИД, различные дегенеративные процессы и аномалии развития. Выяснение механизмов КГ открывает новые возможности в познании природы заболеваний, а также в поиске эффективных средств их терапии.

Ключевые слова: клеточная смерть, апоптоз, молекулярные механизмы, болезни человека.

Изучение феномена клеточной гибели (КГ) имеет уже более чем 100 летнюю историю [62]. Однако в последние годы в этой области произошли поистине революционизирующие изменения, связанные главным образом с появлением концепции апоптоза [51]. В рамках традиционных представлений, принятых в патологии, токсикологии и фармакологии, КГ рассматривали как пассивный дегенеративный процесс, наступающий вследствие необратимого повреждения клеток [61]. Токсический тип КГ обычно обозначается термином некроз, наиболее характерными изменениями при котором являются увеличение объема клеток и субклеточных органелл с последующим их аутолизом [51]. Изменения ядер начинаются позднее и выступают как следствие аутолиза [16]. По существу, некроз представляет собой метаболическую катастрофу, обусловленную необратимыми молекулярными и клеточными изменениями [36, 93]. Нетоксическую гибель клеток длительное время считали присущей лишь эмбриональному развитию и морфогенезу [39, 80]. Поскольку гибель клеток при этом управляется программой развития организмов, она получила название программированной. Однако более широкое биологическое значение программированной клеточной гибели (ПКГ) и, в частности, ее роль как фактора поддержания клеточного гомеостаза тканей взрослого организма осознавалась не в полной мере [24].

В настоящее время стало очевидным, что ПКГ (апоптоз) является филогенетически древним феноменом, присущим всем многоклеточным организмам. ПКГ проявляется на строго определенных стадиях онтогенеза, принимая непосредственное участие в формировании и регуляции роста и инволюции тканей [76, 99]. Естественно, что представления о ПКГ и концепция апоптоза не возникли на пустом месте, они базируются на многолетнем опыте изучения биологии клетки. Вопрос о спонтанной гибели клеток, как физиологическом явлении, начал обсуждаться сразу же после открытия методик окраски клеток и тканевых срезов. Этот вид КГ был впервые описан в 1885 году Флемингом [16], исследователем, который в XIX веке ввел в обиход термины митоз и хроматин. В эпителиальных клетках регрессирующих фолликулов яичников он наблюдал морфологическую картину пикноза ядер и описал структуры, которые сейчас носят название апоптотных телец (apoptotic bodies). Автор назвал обнаруженное им явление хроматолизом, подчеркивая тот факт, что клеточное ядро подвергается распаду и исчезает.

В недавно опубликованном историческом обзоре [62] приводятся многочисленные примеры классических работ, в которых дано морфологическое описание КГ, полностью укладывающееся в рамки современного понятия апоптоз.

Концепция клеточного суицида, из которой в дальнейшем выросло представление о ПКГ, также появилась довольно давно. После открытия в 50-е гг. лизосом возникла идея о возможном клеточном самоубийстве в результате их "взрыва" и высвобождения литических ферментов [62]. В качестве другого механизма реализации клеточного суицида, как предполагалось, может выступать гиперпродукция свободных радикалов под влиянием некоторых токсикантов. В конечном итоге эта линия исследований привела к представлению, согласно которому на заключительной стадии КГ непосредственной общей ее причиной является возрастания внутриклеточного содержания кальция [35, 93].

С наступлением эпохи апоптоза изучение молекулярных и клеточных механизмов КГ стало одним из наиболее бурно прогрессирующих направлений в современной клеточной биологии. Впервые термин апоптоз и описание морфологической картины данного вида КГ появились в работе [51]. Авторы описали дискретный механизм гибели клеток, характеризующийся четкой последовательностью структурных изменений, начинающихся с ядерного пикноза.

Исходные эксперименты, на основании которых возникло представление об апоптозе, были чрезвычайно просты. Кегг [49] вызывал атрофию печени у крыс путем частичной перевязки портальной вены, наблюдая при этом последовательное развитие дискретной картины гибели клеток, которую первоначально назвал отсроченным некрозом, а несколько позднее, в своей следующей публикации, апоптозом [51].

В настоящее время феноменология КГ по механизму апоптоза достаточно хорошо изучена и многократно описана [11, 51, 100]. Для клеток, подвергающихся апоптозу, характерно преходящее, однако явно выраженное, изменение плавучей плотности, что позволяет методом центрифугирования выделить популяцию погибших клеток [1, 101]. Поскольку потеря воды клетками не сопровождается выходом макромолекул, то на данной стадии апоптоза не отмечается повышения проницаемости плазматической мембраны [16]. Уменьшение объема клеток приводит к потере межклеточных контактов с одновременной конденсацией хроматина и компактизацией цитоплазматических органелл.

Хроматин постепенно приобретает гранулярность, становится осмофильным и смещается к периферии ядерной мембраны [51, 100]. На мембране ядра образуются выпячивания, но она сохраняет двуслойную структуру с интактными порами.

Плазматическая мембрана апоптозных клеток претерпевает морфологические и химические изменения, которые делают клетку узнаваемой для фагоцитов. Данный процесс узнавания имеет фундаментальное значение с точки зрения контроля клеточного гомеостаза тканей.

Наиболее подходящей моделью для изучения свойств погибающих клеток оказались тимоциты, поскольку их легко получать в препаративных количествах, и поэтому имеющиеся в настоящее время данные получены главным образом на этих клетках [50, 63]. Поверхностный заряд апоптозных клеток становится несколько меньше, происходят изменения в структуре и химическом составе липидов плазматической мембраны [63, 78, 100]. При обработке поверхности клеток нейраминидазой выяснилось, что на плазматической мембране отсутствуют терминальные группы N-ацетилнейраминовой кислоты (М-АНК). Обнаруживаются также изменения в значительной части поверхностных углеводов, что облегчает связывание апоптозных клеток макрофагами [33]. Узнавание клеток макрофагами, как известно, происходит при участии витронектинового рецептора,

принадлежащего к цитоадгезивному семейству интегринов. Антиген к витронектиновому рецептору в значительной степени ингибирует взаимодействие с макрофагами, что свидетельствует об участии данного рецептора в процессе узнавания [81]. На заключительной стадии апоптоза дилатированный эндоплазматический ретикулум сливается с наружной клеточной мембраной, которая теряет свою характерную структуру, приобретая пузырчатость (blebbing), и клетка зачастую полностью распадается на отдельные, окруженные мембраной апоптотические тельца.

Исключительно важное значение для становления концепции апоптоза имело открытие явления межнуклеосомной деградации хроматина. Это наблюдение было сделано независимо тремя группами исследователей [6, 7, 87, 101, 108], которые установили, что хроматин в лимфоидных тканях облученных животных подвергается распаду на кратные нуклеосомам фрагменты, образуя при электрофоретическом разделении характерную картину так называемой "лесенки". Непосредственно вслед за этим Wyllie [99] выдвинул идею, согласно которой между межнуклеосомной деградацией хроматина и морфологической картиной апоптоза существует строгая причинная взаимосвязь. Эта гипотеза способствовала огромному росту интереса к проблеме апоптоза, выяснению его молекулярных механизмов, генетической регуляции и роли в биологии и медицине.

В дальнейшем межнуклеосомная деградация, инициированная эндогенными нуклеазами, была описана в многочисленных работах, на самых разных моделях [12, 13, 86]. При распаде хроматина образуются олигонуклеотидные фрагменты двух типов: более протяженные, обогащенные H1-гистоном и короткие олиго- и моонуклеотиды, содержащие HMG-белки (high mobility group proteins) [14, 86].

Длительное время считалось бесспорным, что межнуклеосомная деградация ДНК составляет молекулярную основу конденсации хроматина и пикноза ядер [33]. Однако появились работы [22, 109], которые заставили усомниться в этом заключении. Оказалось, что формирование апоптотных телец иногда происходит раньше распада ДНК до олигонуклеосом [22], а последнему процессу предшествует образование крупных фрагментов ДНК длиной 50 и 300 килобаз [109]. При этом обнаружили, что конденсация хроматина коррелирует скорее с появлением крупных фрагментов, чем с олигонуклеосомной фрагментацией [109].

Ферментативный механизм крупномасштабного типа деградации хроматина, по-видимому, отличается от ранее известного межнуклеосомного прежде всего тем, что для его осуществления необходимо участие топоизомеразы II и протеазы. Известно, что оба эти фермента вызывают протеолиз белков хроматина, что приводит к нарушению связи петель хроматина с ядерным матриксом и, вследствие этого, к образованию крупномолекулярных фрагментов ДНК [70].

Существование межнуклеосомной деградации ДНК послужило поводом к интенсивному поиску нуклеаз, ответственных за данный процесс. Этому также способствовал тот факт, что распад хроматина удается легко индуцировать, обрабатывая ядра экзогенной микрококковой эндонуклеазой [6, 7, 108].

Попытки выделить специфические нуклеазы из апоптотных клеток предпринимались во многих лабораториях [17, 85, 110]. Наиболее подробно охарактеризована низкомолекулярная нуклеаза NUC [18], обладающая интернуклеосомной активностью в погибающих лимфоидных клетках и проявляющая зависимость от ионов кальция и магния [38, 65]. Так как ингибиторы белкового синтеза предотвращают распад хроматина и КГ, можно предположить, что обнаруженная эндонуклеаза является вновь синтезированным белком с коротким

периодом жизни [17]. Однако, более вероятно предположение, что фермент предсуществует в клетке, а под влиянием апоптотических стимулов происходит его активация [85].

Остается пока неясным, каким путем происходит активация этих эндонуклеаз. Весьма активно обсуждается в данном отношении роль поли (АДФ-рибозо)-полимеразы (ПАРП), фермента, участвующего в репарации ДНК [79]. Однако полученные к настоящему времени данные весьма противоречивы. Так, например, в работах группы С.Р. Уманского [94] обнаружено резкое снижение активности ПАРП при индуцированном радиацией апоптозе тимоцитов, причем это сопровождалось увеличением активности Ca^{2+} , Mg^{2+} - зависимых эндонуклеаз. Авторы высказали предположение, согласно которому эндонуклеаза в обычных условиях репрессирована вследствие поли-(АДФ-рибоаил)-ирования ее молекулы, а под влиянием индукторов апоптоза происходит диссоциация полимера и активация фермента. Данная гипотеза получила подтверждение в некоторых работах [73]. Однако, появились и противоположные данные [15], свидетельствующие о том, что *in vivo* не обнаруживается поли-(АДФ-рибозил)-ирования молекул эндонуклеазы. Не удалось также однозначно подтвердить факт индукции апоптоза под влиянием ингибиторов ПАРП [97]. Учитывая существующие методологические трудности, такие, например, как недостаточную специфичность ингибиторов и короткий период существования ПАРП в клетках, интерпретация имеющихся результатов остается затруднительной.

Другая возможная роль ПАРП может сводиться к ее участию в деконденсации поврежденного хроматина и увеличению его доступности к перевариванию эндонуклеазами [41]. Дополнительные трудности с выяснением участия ПАРП в деградации хроматина возникли в связи с усложнением представлений о роли данного фермента в апоптозе. Как упоминалось выше, морфологические проявления апоптоза коррелируют в большей степени с открытым недавно распадом хроматина на крупные фрагменты чем с межнуклеосомной деградацией [70]. Описаны также случаи, когда при морфологически выраженном апоптозе не обнаруживаются эндонуклеазного переваривания ДНК [27]. Поэтому в настоящее время все больше внимания начинают уделять процессам протеолиза и нарушениям структуры мембран как возможным ключевым событиям в апоптозе [10, 27, 53].

Первоначально роль протеолиза в апоптозе многими исследователями отрицалась, однако появляется все больше сведений о том, что протеазы участвуют в регуляции апоптоза [106]. Установлено, что многие белки подвергаются протеолизу в процессе апоптотической гибели клеток, причем на ранних стадиях в протеолиз вовлекаются преимущественно ядерные белки, а затем белки, локализованные в цитоплазме. Б.Д. Животовский с соавт. [106] изучали внутриклеточную локализацию протеаз в ядрах тимоцитов, в присутствии ионов Ca^{2+} и Mg^{2+} и цитозоля клеток Jurkat, обработанных анти-Fas антителами. Действие этих факторов оценивали по их влиянию на расщепление белков, распад хроматина и морфологические изменения клеток. Полученные в данной работе результаты позволили заключить, что расщепление ПАРП и расплавление ламины, - независимые процессы и требуют активации разных протеаз, причем протеазы, расщепляющие ПАРП, локализованы в цитоплазме, в то время как по крайней мере одна из протеаз, взаимодействующих с ламинном B1, имеет ядерную локализацию.

Наибольший интерес привлекает специфическая цистеиновая протеаза IRC, расщепляющая предшественник интерлейкина 1β (IL- 1β) [64]. Описано несколько гомологов ICE, являющихся цистеиновыми протеазами с субстратной специфичностью к аспарагину в положении Р и способных индуцировать апоптоз [11].

Хотя гиперэкспрессия любого члена ICE семейства вызывает апоптоз, их роль в гибели разных клеток, индуцируемыми различными сигналами, недостаточно изучена. Так,

например, чувствительность к дексаметазону и облучению у тимоцитов мышей, несущих дефект гена ICE, не отличается от нормальной, в то же время мутантные клетки значительно более резистентны к индукции апоптоза антителами к CD 45 [54].

Накапливается все больше данных об участии ICE-подобных протеаз в апоптозе, однако точки приложения функционально значимой протеолитической атаки остаются пока неизвестными. Выявлены и другие группы протеаз, участие которых в апоптозе представляется вполне вероятным. Прежде всего это ферменты, ответственные за цитолитический эффект лимфоцитов. Один из них, гранзим В/фрагментин, входит в состав плотных цитоплазматических гранул, секретируемых цитолитическими лимфоцитами (ЦТЛ) или естественными киллерами (ЕК) [44, 83]. Этот белок представляет собой нейтральную сериновую протеазу с аспартазной активностью, подобной таковой ICE-семейства и совместно с другим компонентом плотных гранул, перфорином, осуществляет как лизис клеток мишеней, так и фрагментирование ДНК.

Известно, что Ca^{2+} является одним из реальных кандидатов на роль вторичного мессенджера при апоптозе [69, 107]. Поэтому внимание исследователей привлекает кальпин, являющийся кальций-зависимой нейтральной протеазой [77]. Описана активация кальпина в различных клетках при индукции апоптоза. Ингибиторы кальпина предотвращают апоптоз тимоцитов, индуцированный дексаметазоном и облучением, а также гибель кардиомиоцитов при ишемии и последующей реперфузии [11]. Потенциальными субстратами регулирующего действия кальция могут быть цитоскелет, рецепторы, протеинкиназы и фосфатазы, т.е. компоненты клетки, роль которых в апоптозе неоднократно подчеркивалась в разных публикациях [20].

Несомненно специального рассмотрения заслуживает участие в апоптозе свободных радикалов и структурных нарушений биомембран [52, 68]. Существуют многочисленные данные о нарушении транспортных функций мембран [3, 66] и компартментализации низкомолекулярных соединений [82], а также об изменениях энергетического обмена [3, 82] в погибающих клетках. Не существует, однако, однозначного взгляда на роль указанных процессов в индукции апоптоза.

В качестве наиболее общей причины метаболических сдвигов в клетке, по-видимому, могут выступать процессы перекисного окисления липидов (ПОЛ) [2, 41]. Приведем лишь некоторые факты, подтверждающие эту точку зрения:

- усиление продукции радикальных форм кислорода и ингибирование системы антиоксидантной защиты вызывают индукцию апоптоза;
- клетки, в которых индуцирован апоптоз, производят избыточные количества супероксид-радикалов и их мембраны подвержены ПОЛ;
- в ряде случаев антиоксиданты и перехватчики свободных радикалов подавляют индукцию апоптоза.

Суммируя сказанное, можно утверждать, что редокс состояния клетки и равновесие между образованием радикалов и их детоксикацией оказывают свое влияние на ранние стадии развития апоптоза. Тем не менее, создается впечатление, что генерация радикалов не является процессом обязательным для апоптоза. Так, например, некоторые агенты способны индуцировать апоптоз по механизму, нечувствительному к действию антиоксидантов. Это относится, в частности к CD45/FAS/AP01 пути. Более того, клетки, культивируемые практически в отсутствие кислорода и неспособные генерировать свободные радикалы, тем не менее подвергаются апоптозу по механизму, чувствительному к продуктам генов bcl-2 и bcl-XLV [41].

Безусловно, наиболее увлекательной страницей в изучении апоптоза является выяснение механизмов генетического контроля данного феномена. Непосредственно после того как было высказано предположение об активном характере ПКГ и зависимости ее от клеточного метаболизма, появились данные о модификации апоптоза ингибиторами синтеза РНК и белков. Полученные результаты могут быть разделены на две группы, одна из которых свидетельствует о защитном действии ингибиторов транскрипции и трансляции [9,90], а другая указывает на их противоположный эффект [32]. На основании первой группы данных можно заключить, что клетки, коммитированные к гибели, для включения суицидного каскада нуждаются в синтезе новых типов мРНК и эффекторных белков. В самом деле, в погибающих клетках описан синтез ряда новосинтезированных мРНК [5] и белков [8]. Предпринимались неоднократные попытки обнаружить специфические последовательности ДНК, транскрибируемые в погибающих клетках. Впервые о существовании подобных последовательностей сообщено в работе [42], а в дальнейшем выявлены специфические мРНК, ассоциированные с ПКГ: PD1 [46], RP-2, RP-8 [72] и TRPM-2 [55]. Роль этих последовательностей ДНК и кодируемых ими мРНК в реализации апоптоза остается пока неясной.

Результаты, указывающие на индукцию апоптоза под влиянием ингибиторов транскрипции и трансляции, позволяют считать, что в некоторых клетках программа гибели постоянно активна, а ее включение предотвращается присутствием молекул-репрессоров, прекращение синтеза которых снимает данный запрет. Подобная ситуация наблюдается в клетках, проявляющих зависимость от факторов роста, гормонов или гемотопозитических факторов [59].

Учитывая многофакторность регуляции ПКГ, естественно было бы предположить, что апоптоз должен находиться под таким же строгим генетическим контролем, как пролиферация и дифференцировка [98].

Наиболее удобным объектом для исследования генетической регуляции ПКГ оказалась нематода *Caenorhabditis elegans* [34]. Среди генов, управляющих индивидуальным развитием *C. elegans*, особый интерес представляют гены, индуцирующие гибель определенных типов клеток, такие как *ced-3* и *ced-4*, необходимые для инициации апоптоза, и ген *ced-9*, противодействующий данному эффекту [43]. Гомологом *ced-3* у млекопитающих выступает ген ICE, а *ced-9* эквивалентен *bcl-2*, обладающему способностью ингибировать ПКГ [95]. Клетки, в которых происходит гиперэкспрессия или неадекватная экспрессия *bcl-2*, не отвечают на обычные сигналы индукции апоптоза. Так, например, у *bcl-2*, трансгенных мышей обнаруживается экспансия В-лимфоцитов, подобная той, которая имеет место при фолликулярной В-клеточной лимфоме [63]. Однако для приобретения В-клетками злокачественных потенций необходима вторая мутация, что четко проявляется при скрещивании *bcl-2* и Еμ-тус мышей, у потомства которых обнаруживается быстрое развитие злокачественных диссеминированных лимфом [88].

В настоящее время известно несколько гомологов *ced-9*, которые вместе образуют семейство генов *ced-9/bcl-2*. Члены этого семейства могут быть функционально разделены на две группы, представители одной из которых, подобно *ced-9*, *bcl-2* и *bcl-XL*, препятствуют апоптозу, а другие (*Bax*, *Bak*) индуцируют апоптоз [71]. Продукты этих генов могут существовать в виде гомо- или гетеродимеров в разных комбинациях. Так, например, *bcl-2* преимущественно образует гетеродимеры с *Bax*, а *bcl-x* - с *Bak*. Пока неясно, какие структуры-гетеродимеры или гомодимеры важны для проявления способности клеток к гибели. Создается, тем не менее, впечатление, что чем выше экспрессия *bcl-2* или *bcl-XL*

тем больше шансов имеет клетка на выживание и, напротив, усиленная экспрессия Вах и Bak способствуют ее гибели [28].

Как упоминалось выше, в качестве гомологов *ced-3* у млекопитающих выступает открытый недавно ген ICE [104]. Описаны несколько гомологов ICE/*ced-3*, среди которых CPP32/Yama, расщепляющий ПАРП [56] и ген *mdd-2* (*inch-1*) [96]. Более редкими представителями ICE-активных белков являются ICErel II и ICErel III, Mch 2 и Mch 3 и Tx[52]. Все ICE-подобные протеазы индуцируют апоптоз и требуют для проявления своей активности присутствия пентапептида QACRG. Остается, однако неясным, действуют ли эти протеазы в комплексе на один и тот же субстрат, или, напротив, функционируют как иерархический каскад ферментов, индуцирующих апоптоз.

Очевидно, что для поддержания гомеостаза многоклеточного организма необходимо существование не только строгой системы контроля деления клеток и их дифференцировки, но в той же степени и клеточной гибели. В качестве одного из генов, обеспечивающих сопряжение пролиферации и гибели, выступает протоонкоген *c-myc* [18]. Установлено, что гибель клеток, индуцированная *c-myc*, может ингибироваться многими факторами выживания или экспрессией антиапоптозных генов. По-видимому, *c-myc* индуцирует ПКГ, зависимость от ICE-подобных цистеиновых протеаз. Каким образом сигнальные системы выживаемости и гены *bcl-2* семейства регулируют активацию ICE-подобных протеаз, остается неизвестным.

Активное изучение роли поверхностных рецепторов клеток в регуляции апоптоза началось после того, как одновременно в двух лабораториях были получены мышиные антитела, оказывающие цитолитическое действие на различные виды клеток человека в культуре [92, 102]. Поверхностные белки, узнаваемые антителами, получили название Fas и APO-1 (CD 95). APO-1/Fas (CD 95) представляет собой трансмембранный рецептор типа I с мол. массой 48 кДа, состоящий из богатого цистеинами экстраклеточного домена (155 аминокислот), трансмембранного (19 аминокислот) и внутриклеточного (145 аминокислот) доменов. APO-1/Fas принадлежит к семейству факторов роста нервов и некроза опухолей фактора (ФНД). Взаимодействие APO 1/ Fas с таковыми антителами, как анти-APO-1/ Fas или естественными лигандами семейства ФНД, индуцирует апоптоз в клетках, несущих рецептор и чувствительных к данным сигналам [52, 67]. Основная функция рецептора - индукция апоптоза, хотя он может также играть определенную роль в стимуляции клеточной пролиферации. APO-1/Fas экспрессирован во многих, хотя и не во всех клетках. Среди лимфоидных клеток он представлен преимущественно на поверхности активированных Т- и В-лимфоцитов. Ген APO-1/Fas картирован на хромосоме 10 у человека и на хромосоме 19 у мыши [47]. Рецептор отсутствует у мутантных мышей *Irg*, лимфоциты которых дефектны по системе апоптоза, что приводит к резкому увеличению популяции аберрантных дважды негативных Т-лимфоцитов в селезенке и лимфатических узлах этих животных. Весьма сходный синдром развивается у мышей, несущих мутацию *gld*, у которых отсутствует экспрессия APO-1/Fas лиганда [75]. Следовательно, в отличие от *bcl-2*, APO-1/Fas относится к категории факторов, индуцирующих апоптоз. Свою функциональную активность APO-1/Fas проявляет, главным образом, в клетках иммунной системы, обеспечивая нормальное функционирование последней. Действительно, описаны патологические состояния, обусловленные наличием дефектов в системе APO-1/Fas [29]. Так, например, установлено, что в сыворотке крови больных системной красной волчанкой (СКВ) обнаруживается повышенное содержание растворимой формы APO-1/Fas, лишенной трансмембранного домена белковой молекулы [29]. Поскольку растворимая форма APO-1/Fas способна вызывать лимфаденопатию и спленомегалию, высказано предположение, что ее появление

приводит к развитию СКВ фенотипа. Некоторые иные виды патологии человека также могут быть обусловлены избыточной активностью системы APO-1/Fas. Наибольшее внимание привлекает участие APO-1/Fas в гибели CD4⁺ Т-клеток при ВИЧ инфекции. Установлено, что экспрессия APO-1/Fas на Т лимфоцитах ВИЧ-инфицированных индивидумов значительно превосходит нормальный уровень. Возможно поэтому Т-клетки человека, трансформированные ВИЧ, проявляют высокую чувствительность к индукции апоптоза APO-1/Fas [52]. В настоящее время выяснение роли APO-1/Fas в клеточной гибели занимает важное место в том широком спектре работ, которые ориентированы на выяснение патогенеза СПИДа.

Существуют некоторые другие заболевания, природа которых может найти объяснение в рамках представлений о нарушении регуляции апоптоза APO-1/Fas. В частности, это касается так называемого молниеносного гепатита, когда клетки печени приобретают аномально высокую чувствительность к ЦТЛ и к индуцированному APO-1/Fas апоптозу [45]. При этом вирусные антигены гепатита В или С, экспрессированные на поверхности гепатоцитов, способствуют гиперпродукции лиганда APO-1/Fas, который в свою очередь связывается с рецептором и вызывает гибель клеток. Избыточная экспрессия APO-1/Fas может наблюдаться также в клетках сердца и легких [67]. Надежды терапевтического воздействия на систему APC-1/Fas, по-видимому, могут быть связаны с блокированием проявления заболевания, путем инактивации рецепторов APO-1/Fas или лигандов антителами. Предпринимались попытки использовать антитела против лиганда APO-1/Fas и APO-1/Fas для лечения злокачественных новообразований. Здесь, однако, возникает проблема направленной доставки антител в опухоль, чтобы избежать их повреждающего действия на нормальные ткани [92].

В более широком плане участие апоптоза в патогенезе различных заболеваний определяется важнейшей ролью этого феномена в регуляции клеточного гомеостаза организма и в поддержании необходимой сбалансированности между пролиферацией и гибелью клеток.

Именно поэтому нарушение способности клеток к апоптозу может иметь непосредственное отношение ко многим болезням человека, включая злокачественные новообразования, аутоиммунные болезни, вирусные инфекции и различные дегенеративные процессы [91]. Так, клетки многих опухолей человека отличаются сниженной чувствительностью к физиологическим сигналам апоптоза. Особенно четко это проявляется при метастазировании, когда клетки выживают и размножаются в несвойственных им местах локализации в результате выхода из - под контроля факторов, ограничивающих деление.

Становление концепции апоптоза заставило также в определенной мере пересмотреть представления о механизме действия противоопухолевых препаратов. Оказалось, что такие известные химиопрепараты, как цитозин арабинозид, метотрексат, винкристин и цисплатина являются эффективными индукторами апоптоза [60]. Механизм действия многих химиотерапевтических агентов связан с инициацией повреждения ДНК, вызывающих апоптоз, поэтому потеря способности инициировать апоптоз в ответ на генотоксическое воздействие может проявляться как фенотип множественной лекарственной устойчивости, хорошо известный в онкологии [11].

Не менее важным представляется роль апоптоза в биологии опухолевого роста, так как установлено, что опухолевые промоторы обладают свойствами специфических факторов клеточного выживания в условиях индукции их физиологической гибели [23]. Известно, что выход клеток из - под контроля механизмов, ограничивающих пролиферацию, связан с нарушением регуляции генов клеточного деления, таких как циклины и циклин-связанные киназы [23]. В нормальных условиях клетки способны распознавать подобные нарушения и

отвечать на них инициацией апоптоза, т.е. апоптоз выступает в качестве фактора, защищающего организм от клеток, несущих приобретенные генетические дефекты, предрасполагающие их к неограниченной пролиферации.

Другим аспектом рассматриваемой проблемы является существование патологических состояний, при которых клетки характеризуются повышенной восприимчивостью к сигналам, индуцирующим апоптоз, что приводит к их неконтролируемой гибели. Хотя усиленная апоптотическая гибель клеток наблюдается при многих заболеваниях, нельзя считать окончательно доказанной причинную связь между данным явлением и природой дегенеративных нарушений, сопровождающих некоторые болезни. Как уже отмечалось ранее, одним из примеров данной категории являлся иммунодефицит при ВИЧ инфекции; сюда можно также отнести радиационные поражения организма, сопровождающиеся выраженным дефицитом клеток гемопоэтических и лимфоидных тканей [14]. Известен широкий круг неврологических заболеваний, в основе которых лежит прогрессирующая потеря определенных популяций нейронов. К подобным заболеваниям относятся болезни Альцгеймера и Паркинсона, латеральный склероз, спинальная мышечная атрофия, а также различные формы мозжечковой дегенерации [57]. Потеря клеток при этих заболеваниях не сопровождается воспалением и, по-видимому, их гибель происходит по механизму апоптоза.

Порог чувствительности к индукторам апоптоза может изменяться под влиянием различных внутриклеточных и внешних факторов. Так, например, одна из форм латерального склероза обусловлена наличием мутации гена Co-Zn-супероксиддисмутазы (СОД), что приводит к снижению способности клеток обезвреживать свободные радикалы [74]. Повреждение клеток свободными радикалами увеличивает их восприимчивость к сигналам апоптоза, причем их усиленную гибель удастся предотвратить с помощью факторов роста и антиоксидантов. При болезни Альцгеймера отмечается прогрессивное накопление β -амилоидного пептида, что связано с мутацией в белковом предшественнике пептида. Установлено, что β -амилоидный пептид вызывает гибель нейронов по механизму апоптоза, причем этот эффект возможно предотвратить антиоксидантами [19].

Большое число работ посвящено исследованию роли апоптоза в гемопоэзе. Известно, что гемопоэз находится под контролем многочисленных факторов роста, включая факторы стволовых клеток, эритропоэтины, колониестимулирующие факторы и тромбопоэтины. Эти факторы не только стимулируют пролиферацию соответствующих клеток, они необходимы также для поддержания жизнеспособности клеток-мишеней, так как в их отсутствие гемопоэтические клетки быстро подвергаются апоптозу [9]. Гемопоэтические факторы участвуют также в поддержании выживания зрелых постмитотических клеток периферической крови, в частности, нейтрофилов. Только гемопоэтические стволовые клетки, в которых апоптоз ингибирован гиперэкспрессией *bcl-2*, способны дифференцироваться в отсутствие факторов роста. В свою очередь, мутация *bcl-2* может служить причиной злокачественной трансформации клеток и их клональной экспансии, как это описано в случае фолликулярной В-клеточной лимфомы. Существуют также гематологические заболевания, которые ассоциированы со сниженной продукцией клеток крови. К таким болезням могут быть отнесены анемии при хронических инфекциях, апластические анемии, хронические нейтропении и миелодиспластические синдромы. Показано, что по крайней мере миелодисплазия и некоторые другие формы апластической анемии характеризуются усиленной апоптотической гибелью клеток костного мозга. Предполагается, что в основе данного явления может лежать как активация генов ПКГ, так и приобретенные нарушения функций клеток стромы или дефицит гемопоэтических факторов роста [103]. Наконец, заметим, что апоптоз принимает участие в развитии очень

широкого круга патологических состояний, в том числе и тех, где участие апоптоза считалось маловероятным. Одними из наиболее распространенных заболеваний, сопровождающихся массовой гибелью клеток, являются инфаркт миокарда и инсульт, возникающие как следствие острого нарушения кровообращения и развития ишемии. При обоих этих состояниях в центре ишемической зоны происходит быстрая некротическая гибель клеток. Однако за пределами этой зоны отмечается отсроченная гибель клеток со всеми морфологическими признаками апоптоза [31]. Более того, при реперфузии зоны инфаркта возникает дополнительная волна обширной апоптотической гибели клеток [40]. В настоящее время ведется интенсивный поиск препаратов, способных купировать клеточную гибель, связанную с процессами восстановления кровоснабжения после ишемии [11].

Учитывая сказанное, выяснение роли апоптоза в патогенезе заболеваний человека приобретает все более важное значение, а разработка на этой основе эффективных индукторов и ингибиторов клеточной гибели становится одним из бурно прогрессирующих направлений современной фармакологии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Борисова Е.А., Животовский Б.Д., Хансон К.П. // Радиобиология. - 1984. - Т. 24, - С. 723 - 727.
2. Бурлакова Е.Б., Храпова Н.Г. // Успехи хим. - 1985. - Т. 54, вып. 9. - С. 1540 - 1558.
3. Валькович А.А., Долгопятова М.А., Хансон К.П. // Радиобиология. - 1981. - Т. 21, - С. 14 - 17.
4. Валькович А.А., Хансон К.П. // Радиобиология. - 1978. - Т. 18, N. 4. - С. 14 - 17. - С. 648 - 654.
5. Евтушенко В.И., Хансон К.П. // Цитология. - 1984. - Т. 26, - С. 719 - 723.
6. Животовский Б.Д., Звонарева Н.Б., Воскобойников Г.В. и др. // Радиобиология. - 1980. - Т. 20, - С. 502 - 507.
7. Животовский Б.Д., Звонарева Н.Б., Воскобойников Г.В. и др. // Радиобиология - 1980. - Т. 20, вып. 5. - С. 643 - 647.
8. Животовский Б.Д., Пучкова Л.В., Денежкина В.В. и др. // Радиобиология - 1988. - Т. 28, вып. 6. - С. 737 - 744.
9. Иванник Б.П., Голубева Р.В., Мурзаев В.И. и др. // Радиобиология. - 1978. - Т. 18, вып. 6. - С. 803 - 808.
10. Посохов В.С., Розенберг О.А., Хансон К.П. // Бюлл. эксп. биол. мед. 1992.- №2. С. 136 - 138
11. Уманский С.Р. // Успехи совр. биол. - 1996. - Т. 30, - С. 487 - 507.
12. Хансон К.П. // Радиобиология. - 1979. - Т. 19. - С. 814 - 819.
13. Хансон К. П., Животовский Б.Д., // Вестник АМН. - 1990. - N2. - С. 34 - 39.
14. Хансон К.П., Комар В.Е. // Молекулярные механизмы радиационной гибели клеток - М., 1985.
15. Adamiet P. // Eur. J. Biochem. - 1987. - Vol. 169, - P. 365 - 372.
16. Afanasiev V.N., Korol B.A., Mantsygin L.A. et al. // FEBS Lett. - Vol. 197.- P. 347-351.
17. Arends M.J., Morris R.G., Wyllie A.H. // Amer. J. Pathol. - 1990. - Vol.136.- P.593 - 608
18. Asken D., Ashmun R., Simmon B. et al. // Oncogene. - 1991. - Vol. 6. -P. 1915 - 1922.
19. Behl C., Davis J., Cole G.H. et al. // Biochem. Biophys. Res. Com. - 1992. - Vol. 186. - P. 944 - 949.
20. Binder C., Widdeman C. // Ann. Hematol. - 1994. - v. 69, - P. 45 -55.
21. Bowen I.D. // Cell Biol. Int. Reps. - 1993. - Vol. 17, - P. 365 - 380.
22. Brown D.G., Sun X.-M., Cohen G.M. // J. Biol. Chem. - 1993. - Vol. 286. - P. 3037 - 3039.
23. Bursch W. // Carcinogenesis. - 1990. - Vol. 11, - P. 847 - 852.
24. Bursch W., Oberhammer F., Schulte-Horrmann R. // TIPS. - 1992. - Vol.13, - P. 245 - 251.
25. Bursch W., Taper H.S., Laner B. et al. // Virchows Arch. Cell Pathol. - 1985. Vol. 50, N1. - P. 50 - 58.
26. Carson D., Seto S., Wasson B. et al. // Exp. Cell. Res. - 1986. - Vol. 164. - P. 273 - 281.
27. Catchpoole D., Stewart B. // Cancer Res. - 1993. - Vol. 53. P. 4287 - 4296.
28. Chittenden T., Harrington E., O'Connor R. et al. // Nature. - 1995. - Vol. 374. - P. 733 - 736.
29. Cheng J. // Science. - 1994. - Vol. 263. - P. 1759 - 1763.
30. Clarke P.H. // Anat. Embryoi. - 1990. - Vol. 181, - P. 195 - 213.
31. Cohen J.J.// Hosp.Pract - 1993. - Vol.28, - P 35 - 43.
32. Collins R., Harmon B., Souvlis T. et al. // Br. J. Gancer. - 1991. - Vol. 64. - P. 518 - 522.
33. Duvall E., Wyllie A.H., Morris R.G. // Immunology. - 1985. - Vol. 56, - P. 351 - 358.

34. Ellis R., Jacobson M., Horwitz H. // *Genetics*. - 1992. - Vol. 129. - P. 79 - 94.
35. Farber J.L. // *Lab. Invest.* - 1982. - Vol. 47. - P. 114 - 123.
36. Farber E. // *Modern. Pathol.* - 1994. - Vol. 7. - P. 605 - 609.
37. Flemming W. // *Arch. Anat. Entw. Geschw.* - 1885. - P. 221 - 244.
38. Gaido M.L., Cidlovski J.A. // *J. Biol. Chem.* - 1991. - Vol. 286. - P. 18580 - 18585.
39. Gluksmann A. // *Biol. Rev. Camb. Phil. Soc.* - 1950. - Vol. 26. - P. 59 - 86.
40. Gotlieb R.A., Burleson K.O., Kloner B.M. // *J. Clin. Invest.* - 1994. - V 94. - P. 1621 - 1628.
41. Grassilli E., Carcereri de Pratia A. et al. // *Biochem. Biophys. Res. Com.* - 1992. - vol. 108. - P. 1261 - 1266.
42. Hanson K.P., Evtushenko V.I. // *Abstr. of the 20th FEBS Meeting, Budapest*. - 1990. - P. 242.
43. Hengartner M., Horwitz H. // *Cell*. - 1994. - Vol. 76. - P. 665 - 676.
44. Hensel J.W., Wesselschmidt R.L., Shresta S. et al. // *Eur. J. Immunol.* - 1994. - V. 24. - P. 2073 - 2080.
45. Hiramatsu H. // *Hepatology*. - 1994. - V. 19. - P. 1354 - 1363.
46. Ishida Y., Agata Y., Shibahara K. et al. // *EMBO J.* - Vol. 11. - P. 3887 - 3895.
47. Itoh N., Yonehara A., Ishii A. et al. // *Cell*. - 1991. - Vol. 66. - P. 233 - 243.
48. Jacobson M.D., Raff M.C. // *Nature*. - 1995. - Vol. 374. - P. 814 - 816.
49. Kerr J.F.R. // *J. Pathol.* - 1971. - vol. 105. - P. 13 - 20.
50. Kerr J.F.R., Searle J., Harmon B.V. et al. // *In: Perspectives on Mammalian Cell Death* // S. Potten, Ed., Oxford Univ. Press, NY. - 1987. - P. 93 - 107.
51. Kerr J.F.R., Wyllie A.H., Currie A.R. // *Br. J. Cancer*. - 1972. - Vol. 26. - P. 239 - 257.
52. Krammer P.H., Behrmann I., Daniel P. et al. // *Current. Opin. Immunol.* - 1994. - Vol. 6. - P. 279.
53. Kubasova T., Sotosy S., Hanson K.P. et al. // *Acta. Physiol. Hung.* - 1993 Vol 81. - P 277-288
54. Kuida K., Lippke J.A., Ku G. et al. // *Science*. - 1995. - Vol. 267. - P. 2000 - 2003.
55. Kyprianou N., Alexander R., Isaacs J. // *J. Natl. Cancer Inst.* - 1993. Vol. 85, N1. - P. 346 - 350.
56. Lazebnik Y., Kaufmann S., Desnoyers S. et al. // *Nature*. - 1994. - Vol. 371. - P. 346 - 347.
57. Littman D.R. // *Curr. Biol.* - 1994. - Vol. 4. - P. 618 - 623.
58. Lockshin R.A., Zakeri Z.F. // *J. Gerontol.* - Vol. 45., N5. - P. 135 - 140.
59. Lotem J., Gragoe E., Sachs L. // *Blood*. - 1991. - Vol. 78 - P. 953 - 960.
60. Lotem J., Sachs L. // *Cell Growth Differ.* - 1993. - Vol. 4. - P. 41 - 46.
61. Majno G., La Gattuta M., Thompson T.E. // *Virchows Arch. Pathol. Anat.* - 1960. - vol. 333, N2. - P. 421 - 465.
62. Majno G., Joris I. // *Amer. J. Pathol.* - 1995. - Vol. 146, N1. - P. 3 - 15.
63. Mc Donnell T.J., Deane N., Platt F.M. et al. // *Cell*. - 1989. - Vol. 57. - P. 79-88.
64. Miura M., Zhu H., Rotello R. et al. // *Cell*. - 1993. - Vol. 75. - P. 653 - 660.
65. Montaque J.W., Gaido M.L., Frye C. et al. // *J. Biol. Chem.* - 1994. - Vol. 289. - P. 18877 - 18880.
66. Munk A. // *Perspect. Biol. Med.* - 1971. - Vol. 14. - P. 265 - 271.
67. Nagata S., Goldstein P. // *Science*. - 1995. - Vol. 267. - P. 1449 - 1456.
68. Nicotera P., Ancrcona M., Bonfoco E. et al. // *Apoptosis*. - 1996. - Vol. 1, N1. - P. 5 - 10.
69. Nicotera P., Zhivotovsky B., Bellomo G. et al. // *In: Apoptosis*, Schimke R.T., Mihirh E., eds., Plenum Press, NY. - 1994. - P 97 - 115.
70. Oberhammer F., Wilson J.N., Dive C. et al. // *EMBO J.* - 1993. - Vol. 12. - P. 3679 - 3681.
71. Oltvai Z., Millman C., Korsmeyer S. // *Cell*. - Vol. 74. - P. 609 - 619.
72. Owens G., Kahn W., Cohen J. // *Mol. Cell Biol.* - 1991. - Vol. 11. - P. 4177 - 4188.

73. Rice W., Hillgier C., Harten B. et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. - 1992. - Vol. 89, - P. 7703- 7707.
74. Rosen O.R. // Nature. - 1993. - v. 362. - P. 59 - 61.
75. Rouvier E., Lucrani M.F., Goldstein P. // J. Exp. Med. - 1993. - Vol. 177, N1 - P. 19 -200
76. Rubin L.L., Philipott K.L., Brooks S.F. // Current Biol. - 1991. - Vol. 3., - P. 391 - 393.
77. Saido T.C., Sorimachi H., Suzuki K. // FASEB J. - 1994. - Vol. 159. - P. 229 - 237.
78. Sambrano G.R., Steinberg D. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. - 1995. - Vol. 92. - P. 1396 - 1400.
79. Satoh M., Lindahl T. // Nature. - 1993. - Vol. 356, - P. 356 - 358.
80. Saunders J.W. // Science. - 1966. - Vol. 154. - P. 607 - 612.
81. Savill J.S., Dransfield I., Hogg N. et al. // Nature. - 1990. - Vol. 343. - P. 170 - 173.
82. Schulze-Osthoff K., Krammer P.H., Droge W. // EMBO J. - 1994. - Vol. 13. - P. 4587 - 4596.
83. Shi L., Kam C.-M., Powers J.C. et al. // J. Exp. Med. - 1995. - Vol. 176. - P. 1521 - 1529.
84. Shimizu S., Eguchi Y., Kosaka H. et al. // Nature. - 1995. - vol. 374. - P. 811 - 813.
85. Seiliev A.A., Zvonareva N.B., Hanson K.P. // Environ. Biophys. - 1992. Vol. 31., N2. - P. 123 - 132.
86. Sen S. // Biol. Rev. - 1992. - Vol. 67. - P. 287 - 319.
87. Skalka M., Matyasova J., Chejkova M. // FEBS Lett. - 1976. - Vol. 72, - P. 271 - 274.
88. Strasser A., Harris A.W., Bath M.L. et al. // Nature. - 1990. - Vol. 348. -P. 331 - 333.
89. Sun D.Y., Shibo Jiang, Li Mou Zheng et al. // J. Exp. Med. - 1994. - Vol.179.- P. 559 - 568.
90. Takkar n., Potten C. // Biochem. Pharmacol. - 1993. - Vol. 43. - P. 1683- 1691.
91. Thompson C.B. // Science. - 1995. - Vol. 267. - P. 1456 - 1462.
92. Trauth B.C., Klas G., Peters A.M.J. et al. // Science. - 1989. - Vol. 245. - P. 301. - 305.
93. Trump B.F., Berezsky I.K. // Current Opin. Cell Biol. - 1992. - Vol. 4., N2. - P. 227 - 232.
94. Umansky S.R. // In: Apoptosis: the molecular basis of cell death Tomei L., Cope F. (eds), Cold Spring Harbor, NY. - 1991. - P. 193 - 207.
95. Vaux D., Haeccker G., Strasser A. // Cell. - 1994. - Vol. 76., - P. 777- 779.
96. Wang L., Miura M., Bergesson L. et al. // Cell. - 1994. - Vol. 78, - P.739 - 750.
97. Wielckens K., Delfs T. // Endocrinology. - 1986. - Vol. 119. - P. 2383 -2392.
98. Williams G., Smith C. // Cell. - 1993. - Vol. 74, - P. 777 - 779.
99. Wyllie A.H. // J. Pathol. - 1987. - Vol. 153,- P. 313 - 316.
100. Wyllie A.H., Kerr J.F.R., Currie A.R. // Int. Rev. Cytol. - 1980. - Vol. 68. - P. 251 - 306.
101. Yamada T., Ohyama H., Kinio Y. et al. // Radiat. Res. - 1981. - Vol. 85, N2. - P. 544- 553.
102. Yonehara S., Ishii A., Yonehara M. // J. Exp. Med. - Vol. 169. - P. 1747- 1753.
103. Yoshida Y. // Leukemia. - 1993. - Vol. 7. - P. 144 - 151.
104. Yuan J.Y., Shaham S., Ledoux S. et al. // Cell. - 1993. - Vol. 75, -P. 641 - 652.
105. Zakeri 2., Bursch W., Tenniswood M. et al. // Cell Death Diff. - Vol. 2,N1 P 87 -96
106. Zhivotovsky B.D., Cahm A., Grrenius S. // Cell Prolif. - 1996. - Vol. 29,N6. - P. 346.
107. Zhivotovsky B.D., Nicotera P., Hanson K. et al. // Exp. Cell Res. - 1993.- Vol. 207, N1. - P. 163 - 170.
108. Zhivotovsky B.D., Zvonareva N.B., Hanson K.P. // Int. J. Rad. Biol. - 1981. - Vol. 39. - P. 437 - 440.
109. Zhivotovsky B.D., Wade D., Cahm A. et al. // FEBS Lett. - 1994. - Vol. 351. - P. 150 - 154.
110. Zhivotovsky B.D., Wade D., Nicotera P. et al. // Int. Arch. Allerg. Immunol. - 1994. - Vol. 301, N1. - P. 1-6.

PROGRAMMED CELL DEATH (APOPTOSIS): MOLECULAR MECHANISMS AND THE ROLE IN BIOLOGY AND MEDICINE .

K.P. Hanson

N.N.Petrov Research Institute of Oncology, Ministry of Health, St. Petersburg .

Over the recent years studies of the cell death (CD) were progressing with an outstanding speed. CD is found to play a key role in proliferation, differentiation, embryogenesis, morphogenesis and homeostatic processes. CD abnormalities significantly contribute into numerous human diseases as cancer, AIDS, degenerative pathologies of nervous system and developmental abnormalities. The elucidation of CD mechanisms may promote our understanding of pathogenesis of various diseases and facilitate search for their treatment.

Key words: cell death, apoptosis, molecular mechanisms, human diseases.