

АПОПТОЗ ТА ЙОГО МЕХАНІЗМИ (ОГЛЯД)

Мазуркевич Т.А., к.вет.н., доцент

Аксенінко А.В., студент

НУБіП України, м. Київ

Наведено матеріали вивчення апоптозу та його механізмів. Виділяють п'ять шляхів реалізації апоптозної програми: 1) передача сигналу через рецептори загибелі; 2) утворення гігантської пори в зовнішній мембрані мітохондрії; 3) активація прокаспазу в ендоплазматичній сітці при порушення Ca^{2+} -гомеостазу; 4) включення гранзиму «В» цитотоксичних Т-лімфоцитів; 5) олігомеризація і автопресинг прокаспазу-3.

Ключові слова: клітина, апоптоз, лімфоцити, мітохондрії, прокаспазу, каспаз, ферменти, білки.

Постановка проблеми. Апоптоз – це захисна реакція біосистеми на численні пошкодження окремо взятої клітини або популяції клітин заради збереження цілісності та життєздатності всього організму. Він є необхідним для всіх без винятку організмів – від прокариотів до багатоклітинних організмів. В організмі здорової людини клітинний гомеостаз визначається балансом між загибеллю і проліферацією клітин. Щодня, близько 5% клітин організму піддаються апоптозу, а їх місце займають нові клітини. В процесі апоптозу клітина зникає безслідно протягом 15–120 хв. [2, 3, 6, 8, 10].

Про існування фізіологічної смерті клітини було відомо з часу відкриття самої клітини. Ще в 1665 р. Роберт Гук описав формування кори дуба із загиблих клітин. Вперше гістологічні зміни, які відбуваються в клітині при її загибелі, описав та опублікував у 1842 р К.Фогт [6].

Фізіологічна роль апоптозу полягає у регуляції чисельності клітинних популяцій в ембріогенезі – видаленні надлишкових клітин, видаленні клітин у дорослому організмі без появи вогнища запалення, контроль розмноження клітин через зрівняльні точки, боротьбі організму з вірусними інфекціями та забезпеченні правильного співвідношення кількості клітин різних типів

Найяскравіші приклади фізіологічного апоптозу – це ембріогенез (видалення та заміщення ембріональних клітин), диференціація клітин і метаморфоз (регресія хвоста у пуголовків), формування гормонзалежних органів (молочної залози, яєчника). Гарним прикладом апоптозу також є функціонування імунної системи (знищення незрілих або самореактивних Т-лімфоцитів у ході розвитку). Апоптоз клітин імунної системи захищає організм від аутоімунних процесів і пояснює цитотоксичність Т-лімфоцитів. В-клітини також є суб'єктами апоптозної загибелі на всіх етапах перетворення попередників В-клітин на В-лімфоцити – 60–70% цих лімфоцитів утрачається у кістковому мозку під час дозрівання. Постійне оновлення клітин (ворсинок епітеліоцитів слизової оболонки кишечника,

клітини крові та сперматогонії, що диференціюються) і забезпечення клітинного гомеостазу також прояви апоптозу [5, 7].

Відомо, що апоптоз відіграє важливу роль у формуванні імунної відповіді при численних захворюваннях та його інтенсивність може бути маркером імунопатологічного стану. Вивчення процесу апоптозу та механізмів його регуляції в окремих клітинних популяціях імунної системи необхідне не тільки для з'ясування патогенезу багатьох захворювань, це також важливо для розробки нових підходів до управління імунопатологічними процесами, зокрема шляхом створення нового класу імуномодуючих препаратів, здатних регулювати інтенсивність апоптозу [2, 6, 9].

Мета роботи – вивчити механізми апоптозу.

Результати досліджень та їх обговорення. Апоптоз був уперше вивчений і описаний А.Віллі, який ввів цей термін для опису послідовності подій, що специфічно відрізняються від некрозу. Такий тип загибелі характерний не для цілої тканини, а для окремих клітин чи їхніх певних груп. До характерних ознак апоптозу прийнято відносити: дегідратаційне стискання клітин, втрату міжклітинних контактів, блеббінг, руйнування цитоскелета, конденсацію хроматину, фрагментацію ядер і деградацію ДНК. Найчастіше ідентифікацію апоптозу проводять за морфологічними ознаками, а також реєструючи інтернуклеосомні розриви ДНК на електрофореграмах і визначаючи активність каспаз [2, 16, 18, 20, 21, 23].

Зменшення об'єму клітин за рахунок виходу води історично розглядалося як головна ознака апоптозу, яка відрізняє його від некрозу (Кер, 1971р.). В останні роки розвиваються уявлення, згідно з якими апоптоз зумовлений виходом із клітини калію, як при відомій реакції RVD (regulatory volume decrease), що спостерігається після переносу клітин в гіпотонічне середовище [1, 2, 8, 16, 26, 29].

Апоптоз ініціюється зростанням експресії генів-індукторів апоптозу (чи пригніченням генів-інгібіторів) або підвищенням надходженням іонів кальцію всередину клітини [2, 11, 24, 27].

За апоптозу у тварин відбувається перехід фосфатидилсерину із внутрішнього моношару клітинної мембрани плазмолемі в зовнішній, зменшення об'єму клітини, зморщування цитоплазматичної мембрани, конденсація ядра (каріорексис та каріопікноз), розриви ниток ядерної ДНК та наступний розпад ядра, фрагментація клітини на мембранні везикули із внутрішньоклітинним вмістом (апоптозні тільця), які фагоцитуються макрофагами та сусідніми клітинами [4, 11, 15, 31].

Морфологічні зміни в мітохондріях не спостерігаються, хоча їх функціонування істотно порушується. Раніше вважали, що збільшення об'єму цих органел є більш характерним для некрозу, однак існують свідчення, що і за апоптозу відбувається суттєве набухання мітохондрій аж до розриву зовнішньої мітохондріальної оболонки [12, 30].

В розвитку апоптичного процесу бере участь велика кількість сигнальних молекул, більшість із яких регулюють і інші важливі функції організму [2, 8, 9].

Існують два основних шляхи розвитку апоптозу в клітині: мітохондріальний шлях і через активацію рецепторів апоптозу. Обидва вони призводять до активації каспаз і запускають каскад реакцій, результатом яких є загибель клітини.

Апоптоз – це багатостадійний процес. На першому етапі клітина отримує сигнал, який поступає ззовні або виникає в надрах самої клітини та сповіщає про її загибель. Сигнал сприймається рецепторами і піддається аналізу [2, 11].

У 2002 р. Нобелівським комітетом з фізіології та медицині було присуджено премію трьом дослідникам – С. Бренеру, Х. Хорвицю та Дж. Салстону – за відкриття в галузі генетичної регуляції розвитку людських органів і «запрограмованої» загибелі клітини.

Генетичні та молекулярні механізми апоптозу були вперше охарактеризовані в кінці 80 – на початку 90-х рр. у дослідях на нематоді *Caenorhabditis elegans*. Дж. Салстон звернув увагу на те, що доросла нематода повинна була би 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 – *pus-1* (від *nucleus* – ядро), що необхідний для деградації ДНК у клітині, що гине. В ті ж 90-ті рр. Х. Хорвиць продовжив досліді Бреннера та відкрив гени *ced-3* та *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.

Сигнальні і рецепторні молекули підходять одна до одної, як ключ до замка. Інформацією для збудження сигналу може слугувати і відсутність специфічної речовини в середовищі, що оточує клітину. Далі через рецептори отриманий сигнал послідовно передається молекулам посередникам різного рівня, які врешті-решт досягають ядра, де відбувається включення програми «клітинного самогубства» шляхом активації летальних та\або репресії антилетальних генів. Проте існування стовбурових клітин в без'ядерних

системах (симпластах) свідчить, що наявність ядра не є обов'язковою умовою для реалізації процесу [2, 10].

У клітинах тварин і людини апоптоз здебільшого пов'язаний з протеолітичною активацією каскаду каспаз які специфічно розщеплюють білки після залишків аспарагінової кислоти [10, 28].

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:

- цистеїнові протеази (каспази). Представники – кальпаїни, які необхідні для розщеплення білків цитоскелета, мембранних рецепторів.

- 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

Найчастіше зовнішня активація апоптозу відбувається в результаті розвитку ексайтотоксичності ("збуджувальної токсичності" або "смерті від надмірного збудження" – локальної загибелі нервових клітин від токсичної дії збуджувального нейромедіатора глутамату). У цьому явищі першочергову роль відіграє іонотропний NMDA-рецептор – високоспецифічний лігандзалежний Ca^{2+} -канал нейронів, що належить до родини іонотропних глутаматних рецепторів. Важливу роль в апоптозі відіграють каспази – це родина еволюційно консервативних протеаз. В нормальному стані каспази присутні в клітині у неактивній формі, як проензими [10].

Наступна фаза – ефекторна – відбувається активація каскаду білків-ефекторів і регулюючих їх білків-модуляторів апоптозу. Основними фігурантами ефекторної фази апоптозу є цистеїнові протеази (каспази). Каспази розщеплюють білки, що є мішенями для їх дії, характерним для апоптозу чином – в місцях розташування аспарагінової кислоти. До теперішнього часу ідентифіковано 14 видів каспаз, які за своїми функціональними особливостями можуть бути розділені на три групи: 1) Активатори цитокінів (каспаз -1, -4, -5, -13); 2) Ідуктори активації ефекторних каспаз (каспази -2, -8, -9, 010); 3) Ефекторні каспази – виконавці апоптозу (каспази -3, -6, -7) [25].

У активному центрі кожного ферменту є залишок цистеїну. В клітині каспази синтезуються у формі латентних попередників – прокаспаз. Ефекторні каспази, будучи активованими, починають ланцюг протеолітичних подій, метою яких є апоптичний «демонтаж» клітини. При цьому мішенями для дії ефекторних каспаз є білки, що відповідають за різні життєві функції клітини.

Каспази знаходяться в клітинах у неактивному стані (прокаспази). Активація каспаз відбувається шляхом їх протеолітичного розщеплення в місцях розташування аспарагінової кислоти, з подальшою димеризацією утворених таким чином активних субодиниць [15, 17, 21, 29, 32].

За субстратною специфічністю каспаз поділяються на ініціюючі (каспази -2, -8, -10, -12) і 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 ДНКаз, яка відповідає за деградацію ДНК, білки репарації ДНК, у тому числі полі (АДФ-рибозо) полімераза (ПАРП), білки цитоскелету (ламіни, актин, фадрин, кератини і фермент гелдолін, що каталізує де полімеризацію актину), білки-регулятори клітинного поділу, антиапоптозні білки, білки міжклітинної сигналізації, ядерні фактори транскрипції та ін. [4, 14, 19, 32]. 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 [33].

Останньою є деградаційна фаза. Підсумком програмованої клітинної загибелі незалежно від початкового ініціюючого впливу є деградація клітини шляхом фрагментації на окремі апоптичні тільця, обмежені плазматичною мембраною. Фрагменти загиблої клітини зазвичай дуже швидко (в середньому за 90 хв.) фагоцитуються макрофагами або сусідніми клітинами, минаючи розвиток запальної реакції [2, 10, 13, 22].

Висновки. Можна виділити п'ять шляхів реалізації апоптозної програми: 1) передача сигналу через рецептори загибелі; 2) утворення гігантської пори в зовнішній мембрані мітохондрії; 3) активація прокаспази в ендоплазматичній сітці при порушення Ca^{2+} -гомеостазу; 4) включення гранзиму «В» цитотоксичних Т-лімфоцитів; 5) олігомеризація і автопресинг прокаспази-3.

Список використаних джерел

1. Анисимов В.Н. Молекулярные и физиологические механизмы старения / Анисимов В.Н. – С.-Пб.: Наука, 2003. – 468 с.
2. Біохімічні механізми апоптозу: навч. посібник / Остапченко Л.І., Синельник Т.Б., Рибальченко Т.В., Рибальченко В.К. – К.: ВПЦ «Київський університет», 2010. – 312 с.
3. Ванюшин Б.Ф. Апоптоз у растений / Б.Ф.Ванюшин // Успехи биологической химии. – 2001. – Т. 41. – С. 3–38.
4. Гордеева А.В. Апоптоз одноклеточных организмов: механизмы и эволюция / А.В.Гордеева, Ю.А.Лабас, Р.А.Звягильская // Биохимия. – 2004. – Т. 69, № 10. – С. 1301–1313.
5. Кириченко А.М. Генетично програмована смерть клітин: основа гомеостазу та форма фітоімунної відповіді / А.М.Кириченко, О.Г.Коваленко // Цитологія і генетика. – 2010. – 44, № 4. – С. 70–83.

6. Манских В.Н. Морфологические методы верификации и количественной оценки апоптоза / В.Н. Манских // Бюллетень сибирской медицины. — 2004. — № 1. — С. 63-70
7. Мишуніна Т.М. Основні молекулярні механізми апоптозу та їх порушення при канцерогенезі щитоподібної залози (огляд літератури) / Мишуніна Т.М., Тронько М.Д. // Журн. АМН України. — 2006. — Т. 12, № 4. — С. 611-633.
8. Новожилова А.П. Программированная клеточная смерть / А.П.Новожилова, Н.Н.Плужников, В.С.Новиков. — С.-Пб.: Наука, 1996. — С. 9–29.
9. Самуилов В.Д., Олескин А.В., Лагунова Е.М. Программируемая клеточная смерть / В.Д.Самуилов, А.В.Олескин, Е.М.Лагунова // Биохимия. — 2000. — Т.65, Вып. 8. — С. 1029–1046.
10. Скулачев В.П. Явления запрограммированной смерти. Организм / Скулачев В.П. // Соросовский образовательный журнал. — 2001. — № 10. — С. 26.
11. Фильченков А.А. Апоптоз и рак / Фильченков А.А., Стойка Р.С. — К.: Морион, 1999.— С. 184.
12. Широкова А.В. Апоптоз. Сигнальные пути и изменение ионного и водного баланса клетки / А.В. Широкова // Цитология. — 2007. — Т. 49, № 5. — С. 385-394.
13. Ameisen J.C. On the origin, evolution, and nature of programmed cell death: a timeline of four billion years / J.C.Ameisen // Cell Death Differ. — 2002. — № 9. — P. 367–393.
14. Bates S., Vousden K.H. Mechanisms of p53mediated apoptosis // Cell. Mol. Life Sci. — 1999. — 55. — P. 28–37
15. Beers E.P. Programmed cell death during plant growth — and development // Cell Death Differ. — 1997 — 4. — P. 649–661
16. Fadok V.A. The phagocytosis of apoptotic cells / V.A.Fadok, G.Chimini // Semin Immunol. — 2001. — Vol.13, № 6. — P. 365–372.
17. Gottlieb R.A. Programmed cell death // Drug News Persp. — 2000. — 13, № 8. — P. 471–476.
18. Green D.R., Reed J.C. Mitochondria and apoptosis // Science. — 1998. — 281.— P. 1309–1312.
19. Greenberg J.T. Programmed cell death: a way of life for plants // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. — 1996. — 93. — P. 12094–12097.
20. Gross A., McDonnell J.M., Korsmeyer S.J. BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis//Genes and Dev. — 1999. — 13. — P. 1899–1911.
21. Hengartner M.O. The biochemistry of apoptosis / M.O.Hengartner // Nature. — 2000. — Vol. 407. — P. 770-776.
22. Kerr J.F.R., Wyllie A.H., Currie A.R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics // Brit. J. Cancer. — 1972. — 2. — P. 239–257.

23. Kressel M., Groscurth P. Distinction of apoptotic and necrotic cell death by in situ labelling of fragmented DNA / M. Kressel, P.Groscurth // *Cell Tissue Res.* — 1994. — Vol. 278. — P. 549-556.

24. Kaufmann S.H. Programmed cell death: alive and well in the new millennium / Kaufmann S.H., Hengartner M. // *Trends Cell Biol.* — 2001. — Vol. 11. — P. 526-534.

25. Kim M., Lee S., Park K., Jeong E.J., Ryu C.M., Choi D., Pai H.S. Comparative microarray analysis of programmed cell death induced by proteasome malfunction and hypersensitive response in plants // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* — 2006. — 342, № 2. — P. 514–521.

26. Lam E., Kato N., Lawton M. Programmed cell death, mitochondria and the plant hypersensitive response // *Nature.* — 2001. — 411. — P. 848–853.

27. Levine A., Pennell I., Alvarez M.E., Palmer R., Lamb C. Calciummediated apoptosis in a plant hypersensitive disease resistance response // *Curr. Biol.* — 1996. — 6. — P. 427–437.

28. Lockshin R.A., Williams C.M. Programmed cell death: cytology of degeneration in the intersegmental muscles of the silkworm // *J. Insect Physiol.* — 1965. — 11. — P. 123–133.

29. Schwartz L.M., Smith S.W., Jones M.E., Osborne B.A. Do all programmed cell death occur via apoptosis? // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* — 1993. — 90. — P. 980–984.

30. Raff M. Cell suicide for beginners // *Nature.* — 1998. 396. — P. 119–122.

31. Tsujimoto Y. Role of the mitochondrial membrane permeability transition in cell death / Y.Tsujimoto, S.Shimizu // *Apoptosis.* — 2007. — 12, № 5. — P. 835–840.

32. Vermeulen K. Apoptosis: mechanisms and relevance in cancer / K. Vermeulen, D.R. Van Bockstaele, Z.N. Berneman // *Ann. Hematol.* — 2005. — Vol. 84. — P. 627-639.

33. Zhivotovsky B. Caspase-2 function in response to DNA damage / B. Zhivotovsky, S. Orrenius // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* — 2005. — Vol. 331. — P. 359-867.

Мазуркевич Т.А., Аксенинко А.В. Апоптоз и его механизмы (огляд)

Приведены материалы изучения апоптоза и его механизмов. Выделяют пять путей реализации апоптозной программы: 1) передача сигнала через рецепторы гибели; 2) образование гигантской поры во внешней мембране митохондрии; 3) активация прокаспазы в эндоплазматической сетке при нарушении Ca^{2+} -

Mazurkevych T.A., Akseninko A.V. Apoptosis and its mechanisms (review)

Materials of studying of an apoptosis and its mechanisms are given. Mark out five paths of implementation of the apoptosis program: 1) signal transmission through death receptors; 2) formation of a huge pore in an external membrane of a mitochondrion; 3) activation procaspase in an endoplasmatic reticulum at violation of

гомеостазу; 4) включение гранзима «В» цитотоксических Т-лимфоцитов; 5) олигомеризация и аутопрессинг прокаспазы-3.

Ключевые слова: клетка, апоптоз, лимфоциты, митохондрии, прокаспазы, каспазы, ферменты, белки.

Ca²⁺-homeostasis; 4) inclusion granzime "B" cytotoxic T-lymphocytes; 5) oligomerization and autopressure prokaspazi-3.

Keywords: cell, apoptosis, lymphocytes, mitochondrions, procaspases, caspases, enzymes, proteins.