

АПОПТОЗ ТА ІНШІ ВИДИ ЗАПРОГРАМОВАНОЇ КЛІТИННОЇ ЗАГИБЕЛІ

Р. К. Мельниченко, кандидат біологічних наук, доцент кафедри зоології Житомирського державного університету імені Івана Франка. М. Житомир

Питання клітинної загибелі надзвичайно актуальні і важливі для розуміння багатьох загальнобіологічних проблем – індивідуального розвитку організмів, морфогенезу, регенерації, утворення пухлин тощо. Саме тому вони включені в програму шкільного курсу біології профільного рівня і, сподіваємося, будуть цікавими для вчителів біології та старшокласників, абітурієнтів. В даній статті узагальнено найважливіші результати досліджень різних видів запрограмованої клітинної загибелі.

Кожна особина має певну тривалість життя, характерну для даного виду, до якого вона належить. Для клітин також характерна певна тривалість існування, яка залежить від ступеня диференціації, через який вони пройшли. Спочатку біологи думали, що клітини безсмертні, оскільки здатні безмежно ділитися, а тому старіння і смерть – це властивості лише великих об'єднань клітин, що формують організм. Однак з'ясувалося, що ці фізіологічні прояви живої речовини притаманні й клітинному рівню організації життя.

Старіння клітини – закономірний не обернений руйнівний процес вікових змін, що призводить до порушень метаболізму клітини, її пристосувальних можливостей, підвищує вірогідність її смерті.

Найпоширенішими видами клітинної загибелі є апоптоз і некроз (рис. 1). Природна запрограмована смерть клітини називається **апоптозом**, на відміну від **некрозу** – пасивної загибелі клітин внаслідок інтенсивної дії шкідливих факторів навколишнього середовища (травм, нестачі кисню, високої температури тощо). Слід зазначити, що обидва процеси (апоптоз і некроз) можуть відбуватися незалежно один від одного, послідовно, і навіть одночасно.

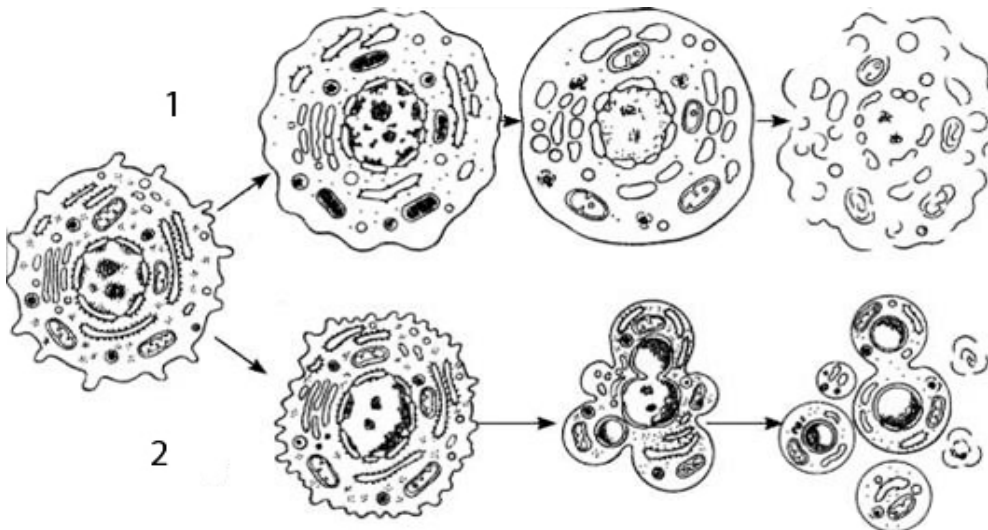


Рис. 1. Морфологічні зміни клітини під час некрозу (1) та апоптозу (2)

На клітинному рівні смерть – процес нормальний і необхідний, відсутність якого порушила б певним чином функції організму. Розглядаючи смерть клітини як біологічну проблему, що не пов'язана зі смертю цілого організму, можна виділити дві категорії цього явища: смерть клітин внаслідок старіння, яка впродовж життя організму врівноважується відповідними новоутвореннями і заміщеннями молодих клітин; та смерть, яка настає у результаті нормальних процесів розвитку й диференціації, наприклад, під час

ембріонального розвитку організмів, метаморфозу личинок тощо. Відомі усім випадки перетворення пуголовка на жабу, гусені на метелика супроводжуються загибеллю великої кількості клітин. Цікаво, що шляхом апоптозу клітин шкірних перетинок між пальцями формуються п'ятипалі кінцівки наземного типу (рис. 2).

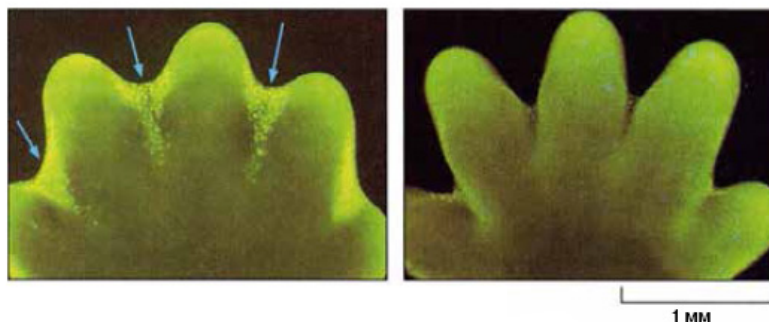


Рис. 2. Апоптоз клітин шкірних перетинок (їх вказано стрілками) під час ембріонального розвитку кінцівки миші

Отже, *апоптоз* – це нормальний генетично запрограмований процес загибелі клітин під час розвитку організму. Термін походить від грецького слова, що означає «*листопад*». Подібно до того, як рослина звільняється від листя з метою оновлення і збереження цілісного організму, апоптоз має велике значення у видаленні дефектних чи непотрібних клітин з цією ж метою!

Дослідження запрограмованої клітинної загибелі (ЗКЗ або PCD, від англ. *programmed cell death*) розпочалися з кінця 60-х років XX ст. американськими клітинними біологами Річардом Локшином і Керролом Вільямсом у Гарвардському університеті. Вони опублікували серію статей під назвою «*Programmed cell death*», що містили результати дослідження загибелі клітин під час розвитку метелика шовкопряда. Термін «*апоптоз*» вперше було застосовано в роботі вчених Дж. Керра, Е. Уайлі та А. Керрі (1972), що була опублікована у «Британському журналі онкологічних досліджень». У 1974 р. група дослідників з лабораторії молекулярної біології Кембриджа – Сідней Бреннер, Джон Салстон і Роберт Хорвіц розпочали вивчення розвитку досить вдалого об'єкту – *Caenorhabditis elegans*. Це один з видів нематод, круглих червів, в організмі якого всього 1090 клітин, причому під час ембріогенезу шляхом апоптозу гине 131. З часом цим біологам вдалося виявити генетично обумовлені причини і молекулярні механізми запрограмованої клітинної смерті. У цієї тварини було виділено 14 генів, котрі впливають на реалізацію програми апоптозу. Згодом численні гени подібної дії та різноманітні ферменти було експериментально виявлено і у клітинах ссавців, мушки дрозофіли та інших тварин. Як підсумок успішної праці, С. Бреннера, Дж. Салстона і Р. Хорвіца у 2002 р. було удостоєно Нобелівської премії за відкриття в галузі генетичної регуляції онтогенезу і дослідження механізмів запрограмованої клітинної загибелі. Взагалі, кінець XX – початок XXI ст. характеризуються значним інтересом міжнародної наукової спільноти до даної проблеми, число публікацій з даної тематики сягає кількох тисяч, що пов'язано з перспективами застосування знань про ЗКЗ у лікуванні онкологічних, аутоімунних і нейродегенеративних захворювань людини.

Які ж основні функції апоптозу, його біологічна роль? Завдяки апоптозу здійснюються формоутворюючі процеси під час ембріонального розвитку; точно регулюється кількість клітин в тих чи інших органах і тканинах (підтримується тканинний гомеостаз); відбувається видалення старіючих клітин у зрілих тканинах, забезпечення важливих імунних реакцій, знищення генетично змінених чи потенційно небезпечних клітин (клітин пухлин, деяких лімфоцитів, пошкоджених, інфікованих бактеріями і вірусами клітин). Саме апоптоз називають запрограмованою клітинною загибеллю I типу.

Механізми активації програми апоптозу. Сьогодні встановлено, що сигнали, які ініціюють цілий ланцюг реакцій, які призводять врешті-решт до загибелі клітини, можуть

бути дуже різноманітними. По-перше, це *зовнішні, позаклітинні чинники*, які можуть бути специфічними (антигени, цитокіни, гормони глюкокортикоїди, а також особливий мембранний білок, індуктор апоптозу FAS-ліганд, який активується Т-лімфоцитами) та неспецифічними, які не порушують цілісність клітинних мембран, але пошкоджують клітинні структури (опромінення, хіміотерапія, токсичні речовини, гіпоксія тощо). По-друге, існують *внутрішньоклітинні механізми* розвитку апоптозу. До останніх належить особлива група цитоплазматичних протеолітичних ферментів – *каспази*, при активації яких запускається своєрідний каскад хімічних реакцій протеолізу: руйнування білків цитоплазми, цитоскелету, ядра, мембран органел та ін. Важливими біохімічними внутрішньоклітинними чинниками апоптозу є також ферменти *ендонуклеази*, які фрагментують ДНК ядра на окремі ділянки; лізосомальні ферменти *катепсини*, котрі розчиняють білки цитоплазми; ферменти, що порушують проникність зовнішньої мембрани клітини.

Фази апоптозу. Зміни в клітині під час апоптозу мають певну закономірність у своєму розвитку. Розрізняють три фази: сигнальну (індукторну); ефекторну і деградаційну (деструкційну).

Під час сигнальної фази відбувається ініціація апоптозу. Існує рецепторно-залежний сигнальний шлях і мітохондріальний. В першому випадку відбувається взаємодія білків-рецепторів клітинної загибелі, що розташовані на поверхні клітинної мембрани (TNF-рецептори, від англ. *tumor necrosis factor receptor*, найбільш відомі з них Fas або APO-1, TNFR1, DR3) зі специфічними зовнішньоклітинними чинниками, або лігандами. Активовані рецептори взаємодіють з внутрішньоклітинними чинниками, або адаптерами, а потім з ефекторами прокаспазами – неактивними попередниками протеолітичних ферментів каспаз. В результаті ланцюжка взаємодії «ліганд – рецептор – адаптер – ефектор» формуються сигнальні комплекси, або апоптосоми, в яких активуються каспази. Каспази запускають процеси руйнування білків всередині клітини.

Мітохондріальний сигнальний шлях реалізується завдяки вивільненню особливих апоптогенних білків (цитохрому С та флавопротеїну, або AIF-протеази, від англ. *apoptosis inducible factor*) із міжмембранного простору мітохондрій у цитоплазму. Це може відбуватися внаслідок розриву мембран мітохондрій або відкриття у них особливих каналів у зовнішній мембрані. Згадані білки мітохондрій також беруть участь у формуванні апоптосом і активуванні каспаз.

Окрім цих двох основних шляхів, сигнальну фазу можуть ініціювати ферменти лізосом, атака Т-лімфоцитів та інші чинники.

Ефекторна фаза характеризується роботою ферментів каспаз. Це протеази, які розщеплюють амінокислотні послідовності у пептидних ланцюгах після залишку аспарагінової кислоти. У клітинах ссавців виявлено 13 видів каспаз, серед яких провідна роль належить каспазам –3, –7 і –9. В результаті своєрідного каспазного каскаду руйнуються білки ядра і ядерної ламіни, цитоскелету, пошкоджуються антиапоптозні білки, які блокували клітинну загибель. Мішенями каспаз стають ферменти реплікації і репарації ДНК, інгібітори ендонуклеаз. В свою чергу, активні ендонуклеази відіграють важливу роль в системі апоптозу. Вони руйнують ядерну ДНК, але не до нуклеотидів, а до досить крупних фрагментів.

Деградаційна фаза є завершальною. Клітина фрагментується з утворенням *апоптозних тілець* – фрагментів хроматину, оточених мембраною (рис. 1). Згодом відбувається їх швидкий фагоцитоз макрофагами, причому без запального процесу.

Регуляція апоптозу. Як уже зазначалося, з міжмембранного простору мітохондрій через спеціальні канали виділяються білки (цитохром С, AIF-протеаза), які активують каспазу – 9 і запускають каскадний цикл. Регулятори апоптозу впливають саме роботу цих каналів. До них належать, насамперед, білки родини Bcl-2, які поділяються на дві протилежні групи. Одні з них (Bcl-2, Bcl-X, Bcl-W та ін.) закривають спеціальні канали мембран мітохондрій і блокують апоптоз. Інші (Bax, Bak та ін.) – навпаки, відкривають ці канали і стимулюють апоптоз.

Ще одним регулятором апоптозу є антипухлинний білок – p53, якого називають «сторожем геному». Загальновідомо, що білок p53 активується у відповідь на дію мутагенних чинників, які можуть пошкодити ДНК (ультрафіолетове та радіоактивне опромінення, низькі і високі температури, вірусна інфекція, стрес тощо). Він вмикає програму загибелі клітини, цим самим знищуючи потенційно небезпечні клітини, пухлини. Встановлено, що нормальний білок p53 блокує антиапоптичну функцію Bcl-2 і навпаки, активує гени білків, що відкривають мітохондріальні канали (Bax, Bak та ін.). Також цей «сторож геному» стимулює гени рецепторів, чутливих до сигналів апоптозу, призводить до зупинки клітинного циклу, гальмує ріст пухлин.

Різновиди запрограмованої клітинної загибелі. В останні роки вчені розглядають апоптоз як провідний, проте не єдиний варіант загибелі клітин. До різновидів клітинної смерті належать *некроз, аутофагія, мітотична катастрофа, парптоз, апонекроз, клітинний «канібалізм» (ентоз), злуццвання, корніфікація* та ін.

Відмінності між апоптозом і некрозом – найпоширенішими видами клітинної смерті, узагальнено у таблиці.

Окрім класичного апоптозу та некрозу, в експериментах було описано форми ЗКЗ, що схожі морфологічно до некрозу, але вимагають активації генів і синтезу певних білків. Впливаючи на дихальний ланцюг мітохондрій антибіотиком антимицином, дослідники отримали форми клітинної смерті, які поєднали ознаки як апоптозу, так і некрозу. Вони отримали назву *апонекрози або некроптози*. Було ідентифіковано також каспазо-незалежні форми ЗКЗ – *парптоз* в нейронах та *псевдоапоптоз* у дріжджах. При цьому провідна роль у руйнівних змінах клітини належить не каспазам, а мітохондріальному чиннику АІФ (апоптозо-індукуючий фактор) та ендонуклеазам.

Порівняльна характеристика апоптозу та некрозу клітини

Ознаки	Апоптоз	Некроз
Причини загибелі клітин	Руйнування ДНК, порушення роботи генів, метаболізму клітини внаслідок сприйняття мембранними рецепторами сигналів зовні, порушення ферментних систем клітини	Порушення цілісності мембран внаслідок агресивних зовнішніх чинників (температури, опромінення, токсичних речовин)
Локалізація первинного ушкодження	В ядрі	В плазмалемі
Швидкість розвитку	1-12 год	В межах 1 год
Зміни розміру клітини	Зменшення (зморщення)	Збільшення (набухання)
Зміни ядра	Спіралізація хроматину, каріопікноз, фрагментація	Набухання
Зміни в цитоплазмі	Конденсація гіалоплазми, ущільнення гранул	Розрив мембран гранул, їх лізис
Зміни плазмалеми	Втрата мікро ворсинок, утворення пухирців	Порушення цілісності
Стан ДНК	Розрив на великі фрагменти	Невпорядкована деградація
Залежність від органічних сполук та енергії	Залежить від енергії АТФ, синтезу РНК і білка	Не залежить
Завершальні стадії загибелі	Фагоцитоз апоптозних тілець макрофагами сполучної тканини без запального процесу й імунної відповіді організму	Фагоцитоз залишків клітини, супроводжується запальним процесом та імунними реакціями

Досить поширеною формою клітинної смерті (запрограмована загибель клітин II типу) є аутофагія. *Аутофагія* – процес «самоперетравлення», при якому органели та ділянки цитоплазми оточуються мембранами, спрямовуються до власних лізосом, формуючи аутофагосому, та розщеплюються гідролітичними ферментами. Цей процес детально досліджено відомим бельгійським біохіміком, Нобелівським лауреатом в галузі фізіології і медицини, Крістіаном де Дювом. Він відкрив лізосому і назвав їх «зброями самогубства» клітини. В нормальній клітині аутофагія використовується для омолодження вмісту клітини. Проте стресові чинники (пероксида, опромінення, деякі протипухлинні препарати, зниження

вмісту амінокислот і АТФ у цитоплазмі, тощо) значно активізують цей процес. У клітині виявляються численні мембранні пухирці (везикули, вакуолі) з компонентами клітини, що перетравлюються. Ядро при аутофагії не гетерохроматизоване, не містить фрагментів ДНК (на відміну від апоптозу). Аутофагія відіграє важливу роль при знищенні тканин під час індивідуального розвитку організму, метаморфозі комах, боротьбі з паразитарними інфекціями, пухлинами.

Ще одним різновидом ЗКЗ є *ентоз*, або «клітинний канібалізм». При цьому феномені клітина відкріпляється від субстрату, всередину її проникає інша жива клітина, індукуючи загибель першої. Ентоз виявлено в клітинах молочної залози, яєчників, злоякісних пухлин. На цей процес впливають актин і міозин цитоскелету та білок кадгерин, що сприяє контакту клітин.

Мітотична катастрофа – загибель клітини в результаті серйозних порушень мітозу, переважно під час мета- і анафази. При цьому відсутні процеси фрагментації і конденсації хроматину, проте морфологічно виявляються одне чи кілька мікроядер. Цей вид ЗКЗ має місце при дії іонізуючого опромінення, деяких протипухлинних препаратів, а також речовин, що діють на мікротрубочки веретена поділу (колхіцин, вінбластин, вінкристин). Цікаво, що підрахунок кількості клітин з мікроядрами традиційно використовується як показник для оцінки мутагенності середовища. Проте загибель клітин з мікроядрами не є однозначною: мікроядра можуть зникати, інтегруватися в геном при наступному мітозі. Саме тому не всі біологи вважають мітотичну катастрофу різновидом ЗКЗ.

Своєрідними формами ЗКЗ є *злуцування* та *корніфікація*. *Злуцування* – процес механічного видалення старих епітеліальних клітин у верхньому шарі слизової оболонки кишечника. Це один з найінтенсивніших процесів організму – щоденно одна ворсинка кишечника втрачає 1400 клітин! Механізм цього процесу вивчений недостатньо. Подібно до апоптозу, він регулюється каспазами, білками Bcl-2 та ще особливим чинником LKB1. *Корніфікація* – спеціалізована загибель клітин епідермісу ссавців. При цьому кератиноцити більш глибоких шарів епітелію сплющуються, втрачають ядро і органели, претворюючись на рогові лусочки, або корнецити. Вони інтенсивно видаляються з поверхні шкіри.

Підводячи підсумок, хочемо зазначити, що багаторічні дослідження цитологів, біохіміків, молекулярних генетиків значно розширили наші уявлення про шляхи запрограмованої шляхи клітинної загибелі. Якщо вивчення апоптозу є досить тривалим і успішним, то механізми інших видів ЗКЗ містять багато «білих плям». Залишається відкритим питання, як і чому організм обирає необхідний шлях клітинної загибелі в різних випадках. Сподіваємося, що подальші дослідження ЗКЗ не лише збагатять біологічну науку, а й матимуть практичне значення у лікуванні хвороб організму, регуляції його розвитку.

ЛІТЕРАТУРА

1. Гребінник Д. М. Альтернативні форми елімінації клітин / Д. М. Гребінник // Фізика живого. – Т. 21, № 1-2, 2014. – С. 4 – 14.
2. Корочкин Л. И. Биология индивидуального развития (генетический аспект): Учебник / Л. И. Корочкин – М. : Изд-во МГУ, 2002. – С. 190 – 199.
3. Майборода А. А. Апоптоз – гены и белки / А. А. Майборода // Сибирский медицинский журнал (Иркутск). – № 3, 2013. – С. 130 – 135.
4. Манских В. Н. Пути гибели клетки и их биологическое значение / В. Н. Манских // Цитология. – 2007. – Т. 49, № 11. – С. 909– 915 (Електронний режим доступу – http://tsitologiya.cytspb.rssi.ru/49_11/manskikh.pdf)
5. Собко В. М. Вплив електромагнітних полів різних частотних діапазонів на клітинні ушкодження та запрограмовану клітинну загибель / В. М. Собко, В. С. Мартинюк, О. О. Ратушна // Фізика живого. – Т. 17, № 1. – 2009. – С. 119 – 125.
6. Стоян С. А. Апоптоз: современный взгляд на проблему / С. А. Стоян // Сибирский медицинский журнал (Иркутск). – Вып.1, Т. 42– 2004. – С. 16– 19.
7. Ченцов Ю. С. Введение в клеточную биологию: Учебник / Ю. С. Ченцов, 4-е изд., перераб. и доп. – М. : Академкнига, 2004. – 495 с.
8. <https://ru.wikipedia.org/wiki/Апоптоз>