

## ПУТИ ГИБЕЛИ КЛЕТКИ И ИХ БИОЛОГИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

© В. Н. Манских

*Кафедра патологической анатомии Сибирского государственного медицинского университета, Томск;  
электронный адрес: Manskikh@mail.ru*

Приводится характеристика и дается критический обзор данных о биологическом и соответствующем ему клиническом значении апоптоза, некроза, аутофагии, митотической катастрофы, фагоцитоза, опосредованного «сигналами гибели», и клеточном старении.

Ключевые слова: апоптоз, некроз, аутофагия, митотическая катастрофа, фагоцитоз, клеточное старение.

Точкой отсчета, с которой начинается возрастающий год от года интерес к вопросам гибели клеток, является появление в 1972 г. известной работы Дж. Керра с соавторами (Kerr et al., 1972), которые ввели в цитологию термин «апоптоз» и представление о программируемой гибели клеток. Оба эти понятия было принято противопоставлять некрозу как примитивной генетически недетерминированной форме смерти клетки, и в этом виде их основные различия (Бережков, 1990). Данные, полученные главным образом в последние 5—6 лет, показали, что отношения между различными биохимическими и морфологическими вариантами процессов смерти клеток отнюдь не сводятся к простой дилемме «апоптоз—некроз», а само это противопоставление начало приобретать более глубокий смысл, не сводимый к программируемому или непрограммируемому характеру процессов. В последние годы были выделены в качестве самостоятельных форм гибели клетки аутофагия, митотическая катастрофа и сенесенс, информация о механизмах и особенно о биологическом значении которых достаточно противоречива. Не ставя перед собой задачи в связи с гигантским объемом материала дать полную сводку всех данных о каждом из типов гибели клеток, мы попытаемся в данной статье отразить наиболее принципиальные изменения, произошедшие в представлениях о гибели клеток за последние годы. При этом мы постараемся обратить внимание на вопросы, которые возникают при анализе этих новых представлений и нуждаются, как нам кажется, в дальнейшей разработке.

### Апоптоз и некроз

Детальное описание сигнальных механизмов апоптоза с характеристикой всех известных к настоящему времени участников каспазозависимых и каспазозависимых путей этого процесса можно найти в ряде обзоров (Johnstone et al., 2002; Мушкамбаров, Кузнецов, 2003; Белушкина, Белецкий, 2004; Jaattela, 2004; Lockshin, Zakeri, 2004; Nicotera, Melino, 2004; Okada, Mak, 2004; Москале-

ва, Северин, 2006). Следует только отметить, что выделение каспазозависимого пути апоптоза, осуществляемого AIF (apoptosis inducible factor), в отдельный тип «апоптозоподобной» смерти клетки (Jaattela, 2004) представляется недостаточно обоснованным, поскольку отличия этого варианта от классического апоптоза сводятся только к менее ярким морфологическим изменениям хроматина.

Наиболее принципиальным достижением в изучении программируемой гибели клетки явилось установление программируемого характера биохимических изменений, приводящих к некрозу (Проскуряков и др., 2002; Proskuryakov et al., 2003; Jaattela, 2004; Lockshin, Zakeri, 2004; Okada, Mak, 2004). В связи с этим в современной классификации запрограммированной смерти клетки (ПСК) апоптоз получил название «ПСК I типа», а некроз — «ПСК II типа» (синоним: «онкоз»); «ПСК III типа» представлен аутофагией. Установлено, что некроз может происходить не только как итог апоптоза в ситуации энергодифицита клетки, что было известно довольно давно (Fiers et al., 1999), но и как самостоятельная танатогенная программа, ключевую роль в которой играют белок PARP, индукторы митохондриального окислительного стресса, протеаза *omi*, а также некоторые каспазы и ряд других ферментов (Проскуряков и др., 2002; Bouchard et al., 2003; Proskuryakov et al., 2003; Lockshin, Zakeri, 2004; Okada, Mak, 2004).

Этот факт привел к коренному пересмотру проблемы биологических различий некроза и апоптоза. Если ранее определяющую роль приписывали характеру индукторов этих процессов (физиологические — при апоптозе и сверхфизиологические — при некрозе), то в настоящее время на первый план выходят различия в последствиях апоптоза и некроза для окружающих живых клеток и организма в целом. Апоптоз заканчивается «аккуратным» фагоцитозом макрофагами или окружающими паренхиматозными и стромальными клетками образовавшихся апоптотных телец без последствий для окружающей ткани в виде альтерации, воспаления и иммунного ответа (Okada, Mak, 2004; Degenhardt et al., 2006). Этому способствуют не только особые лаганды на мембране апоптотных телец, но и секреция ими хемокинов и противовоспа-

лительных цитокинов (Проскуряков и др., 2005). Напротив, гибель клетки путем некроза всегда сопровождается развитием альтерации окружающих клеток и воспаления, а фагоцитоз остатков погибших клеток — развитием полноценного иммунного ответа, если в них имеются антигены (Проскуряков и др., 2002; Proskuryakov et al., 2003). Эти различия имеют колоссальное значение для патологии.

Считается, что одной из причин иммунологической толерантности при некоторых вирусных инфекциях и злокачественных опухолях является именно активация гибели клеток по программе апоптоза (Белушкина, Белецкий, 2004). Важным следствием такого вывода может быть пересмотр стратегии лечебных воздействий при этих процессах, направленных не на активацию апоптоза, а на переключение механизма гибели клеток с апоптотического на некротический. Правда, по отношению к бластомам вопрос обстоит значительно сложнее, так как показано, что активация некроза и следующего за ним воспаления может усиливать прогрессию опухоли (Degenhardt et al., 2006).

Вторым важнейшим фактором, который несколько ограничивает высказанное выше утверждение об отсутствии влияния клеток, гибнущих по апоптотической программе, на окружающие живые клетки, является обнаружение коллективного апоптоза (Reznikov et al., 2000). Это явление было описано на раковых клетках HeLa после воздействия индукторами апоптоза, активирующими программу гибели через воздействие на мембранные рецепторы (TNF $\alpha$ ), ингибирование клеточных протеинкиназ (стауроспорин) и посредством оксидантного стресса (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (Pletushkina et al., 2005). Все это приводит к образованию «кластеров апоптоза» в культуре *in vitro*. Установлено, что гибнущие клетки секретируют H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, который служит индуктором гибели окружающих клеток (Скулачев, 2005; Pletushkina et al., 2005). Считается, что этим путем достигается удаление органов и тканей при метаморфозе — так называемой органоптоз (Скулачев, 2005), а также осуществляется борьба с распространением вирусной инфекции в клеточных популяциях *in vivo* (Скулачев, 1998, 2005). Однако открытие явления «коллективного» апоптоза порождает целый ряд новых вопросов, имеющих большое биологическое и медицинское значение. Остановимся коротко на наиболее существенных из них.

Прежде всего нужно отметить, что образование «кластеров апоптоза» в нормальных тканях и при различных патологиях *in vivo* удается наблюдать относительно редко. Обычно выявляются или обширные поля гибнущих клеток, например вокруг очага сосудистого некроза, или отдельные претерпевающие апоптоз клетки, но не изолированные «кластеры апоптоза». Чаще всего апоптоз *in vivo* происходит в отдельных клетках, что имеет место, например, в активно пролиферирующих нормальных тканях (костный мозг, селезенка, крипты кишечника), в ткани злокачественных опухолей различных органов или паренхиме печени при вирусном гепатите С. Пример с гепатитом С нужно особенно подчеркнуть, так как именно для вирусных инфекций постулировано особое биологическое значение коллективного апоптоза. Однако классическое для гепатита С проявления апоптоза в печени в виде «телец Каунсильмана» почти всегда встречаются изолированно, что послужило поводом для старого обозначения их как «моноцеллюлярный коагуляционный некроз» (Бережков, 1990). Поэтому клиническое и биологи-

ческое значение явления коллективного апоптоза, по-видимому, весьма ограничено. Конечно, возможно допущение, что *in vivo* из-за быстрой элиминации апоптотических телец наблюдение этого процесса представляет определенные трудности. Однако учитывая, что индукция апоптоза осуществляется одновременно в ряде близко лежащих клеток, это возражение оказывается несостоятельным.

Очевидно, что далеко не каждый случай апоптотической смерти клетки (и даже, по-видимому, лишь в очень ограниченном числе ситуаций) должен вести к сигналу массовой гибели. Биологически это целесообразно, поскольку если бы каждый случай апоптоза увлекал за собой целый участок ткани, данное явление приводило бы к слишком большой и неоправданной потере клеточных элементов. Однако остается непонятным, что регулирует размах этого процесса. Почему в одних (по-видимому, наиболее частых) случаях апоптоз ограничивается одной клеткой, в других — удаляет участок ткани, а в третьих — целый орган (хвост у личинок амфибий), тем более что, исходя из полученных данных, процесс «коллективного апоптоза» индуцируется в эксперименте *in vitro* разнообразными агентами (TNF $\alpha$ , стауроспорином и даже самим H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)? Отчего эта цепная реакция обрывается и, как правило, не увлекает орган к гибели целиком? Содержащаяся в ткани каталаза, для которой показано ингибирующее влияние на коллективный апоптоз *in vitro* (Скулачев, 2005; Pletushkina et al., 2005), вряд ли способна препятствовать неуправляемому цепному распространению гибели клеток, если она позволяет протекать этому процессу между соседними клетками. В то же время если гормон-индуцированный «коллективный апоптоз» распространяется за счет H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, то почему происходит избирательная гибель клеток? Например, в тимусе или селезенке при действии глюкокортикоидов почти тотально гибнут лимфоциты, а стромальные клетки при этом остаются интактными. То же самое можно сказать и о гибели клеток паренхимы простаты после кастрации.

Очевидно, что если процесс «коллективного апоптоза» не зависит от механизма индукции, то он должен определяться реакцией клетки-реципиента. Можно предположить, что клетки-реципиенты каждой следующей генерации апоптоза выделяют все меньше H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Это может быть вызвано, например, индукцией супероксиддисмутазы или ферментов глутатионового цикла, которые понижают синтез H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в клетках-реципиентах, или усилением продукции этими клетками каталазы, разрушающей перекись.

Еще одно возможное объяснение ограничения «коллективного» апоптоза заключается в передаче индуктора гибели клеток, природа которого не установлена, через клеточные контакты-коннексоны, в образовании которых участвует коннексин Сx43, что было показано на клетках карциномы мочевого пузыря (Крутовских, 2005). В таком случае становится понятным ограничение распространения сигнала только кластером соединенных между собой коннексами клеток, а не в ткани *in toto*. Несомненно, что четкое понимание этих механизмов необходимо для регуляции интенсивности апоптоза на надклеточном уровне.

## Аутофагия

Описанный почти одновременно с апоптозом (Schwartzel, Merker, 1973) как альтернативный вариант программируемой гибели клетки («ПСК II типа») процесс аутофа-

гии имеет более сложный биологический смысл. Механизм, который вовлекается в процессы аутофагии, функционирует в нормальной клетке как способ обновления (turnover) органелл (Lockshin, Zakeri, 2004; Kondo et al., 2005). Основу этого процесса составляют события, аналогичные таковым при фагоцитозе: мечение подлежащей удалению части клетки, обергивание мембраной с образованием аутофагосомы и последующее слияние с лизосомой с формированием аутофаголизосомы (Gozuacik, Kimchi, 2004; Lockshin, Zakeri, 2004; Okada, Mak, 2004; Levine, 2005). Однако под влиянием некоторых стрессорных факторов указанные явления могут значительно активизироваться. Аутофагия может быть индуцирована активными формами кислорода, ионизирующей радиацией, некоторыми противоопухолевыми препаратами, прекращением действия факторов роста и особенно снижением содержания аминокислот и АТФ в цитозоле клетки (Kondo et al., 2005; Levine, 2005; Hait et al., 2006). В трех последних случаях аутофагия служит компенсаторным механизмом, позволяющим питание клетки из эндогенных источников, тогда как в других ситуациях ее биологическая роль связана с удалением поврежденных структур клетки.

Интересно отметить, что цитокины, активирующие фагоцитоз (TNF $\alpha$  и IF $\gamma$ ), также способны вызывать аутофагию (Levine, 2005). Морфологически этот процесс визуализируется с помощью электронной микроскопии и представлен образованием многочисленных везикул и вакуолей, содержащих лизируемые компоненты клетки (Levine, Yuan, 2005). Ядро при этом процессе не содержит конденсированного хроматина и разрывов в ДНК, определяемых TUNEL-методом (Lockshin, Zakeri, 2004; Kondo et al., 2005). Эти признаки отличают аутофагию от апоптоза. Завершаться аутофагия может различно. В одних случаях этот процесс заканчивается как некроз (Jaattela, 2004), в других на финальных этапах проходит по механизму апоптоза (Lockshin, Zakeri, 2004; Kondo et al., 2005). Некоторые авторы выделяют также самостоятельный, не сводимый к некрозу и апоптозу, финал аутофагии (Kondo et al., 2005), чаще в виде фагоцитоза (Lockshin, Zakeri, 2004). Парадокс явления аутофагии заключается также в том, что она может выступать не только как вариант реализации танатогенного сигнала, но и, наоборот, как программа выживания клетки. Показано, что если вслед за активацией апоптоза в клетке будет запущен процесс аутофагии, то происходит отмена программируемой гибели (Kondo et al., 2005).

Молекулярный механизм аутофагии достаточно сложен. Основные данные об этих процессах получены на дрожжевых клетках. Аналогичные механизмы затем были выявлены в клетках млекопитающих, причем выяснялась их большая эволюционная консервативность. Основную роль в этих процессах играют продукты генов семейств *ATG* и *AUT* (у дрожжей, с соответствующими аналогами у млекопитающих), объединенные в две автономно работающие системы конъюгации, осуществляющие формирование аутофагосомы (Meijer, Codogno, 2004).

Первая система включает в себя белки Atg 5, 7, 10 и 12, из которых Atg 7 и Atg 10 являются аналогами E1 и E2 убиквитинзависимого пути деградации белков клетки, которые выступают в качестве «метки» для материала, подлежащего удалению (Levine, Klionsky, 2004). После стадии распознавания материала к указанным белкам присоединяется комплекс Atg 5-12, а затем на нем происходит мультимеризация Atg 16. Образовавшийся комплекс белков необходим для мембранной секвестрации подлежа-

щей удалению органеллы с образованием аутофагосомы (Meijer, Codogno, 2004).

Вторая конъюгирующая система аутофагии представлена белками Atg 3 и Atg 4, которые также выполняют функции E1 и E2 протеинов убиквитинзависимого пути деградации белков. За этим следует активация фермента Atg 4 (у человека он называется Autophagin-1), представляющего собой сериновую протеазу из семейства каспаз. Этот белок активирует Atg 8 (аналогами его у человека являются MAP1-LC-3 и некоторые другие белки), а также закрепляет его на мембране аутофагосомы за счет модификации мембраны с образованием фосфолипидного «якоря» (Levine, Klionsky, 2004; Meijer, Codogno, 2004). Белок Atg 8 ассоциирован с микротрубочками цитоскелета, благодаря чему происходят движение и расширение аутофагосомы для последующего слияния с лизосомой. Показано участие и других белков семейства ATG в процессе аутофагии (Gozuacik, Kimchi, 2004; Levine, Yuan, 2005).

Регуляция аутофагии осуществляется чрезвычайно разнообразными факторами. Помимо упомянутых выше аминокислот и АТФ к ним относятся С-Мус, mTOR, Atg 1, ГТФаза, ферменты класса I PI-3K/ПКВ (PI3K PtdIns4P, PtdIns(4,5)P2, PtdIns(3,4)P2, PtdIns(3,4,5)P3), Beclin-1, PTEN, E2F-киназа, LAMP-2 и др. (Arico et al., 2001; Meijer, Codogno, 2004; Kondo et al., 2005; Levine, Yuan, 2005; Hait et al., 2006). Эти белки влияют на разные фазы процесса аутофагии. Например, Beclin-1 регулирует процесс мембранной секвестрации подлежащих удалению органелл (Gozuacik, Kimchi, 2004; Meijer, Codogno, 2004; Hait et al., 2006), LAMP-2 отвечает за процесс слияния аутофагосомы с лизосомой (Meijer, Codogno, 2004), а mTOR (target of rapamycin) является ключевым элементом регуляции (ингибитором) стадии инициации аутофагии (Meijer, Codogno, 2004; Levine, Yuan, 2005). Интересно, что ингибитор митохондриального этапа апоптоза — Bcl-2 — способен ингибировать и аутофагию, что указывает на важную роль митохондрий в обоих процессах (Pattingre et al., 2005; Pattingre, Levine, 2006).

Установлено, что аутофагия играет существенную роль в процессах эмбриогенеза и постэмбрионального метаморфоза (Levine, Klionsky, 2004). Показано, что нарушения регуляции этого процесса имеют место при большом числе патологических состояний — нейродегенеративных заболеваниях (хорее Геттингтона, болезни Альцгеймера и Паркинсона) (Kondo et al., 2005; Levine, Yuan, 2005), миодистрофиях и кардиомиопатиях (Nishino, 2003; Meijer, Codogno, 2004), старении (Meijer, Codogno, 2004), инфекциях (механизм аутофагии вовлекается во внутриклеточное разрушение шигелл, сальмонелл, стрептококков, микобактерий туберкулеза) (Meijer, Codogno, 2004; Levine, 2005; Levine, Yuan, 2005) и злокачественных опухолей. Учитывая ту роль, которая отводится нарушениям программируемой смерти в канцерогенезе, неудивительно, что взаимоотношениям злокачественного роста и аутофагии посвящено большое число работ (Gozuacik, Kimchi, 2004; Jaattela, 2004; Meijer, Codogno, 2004; Okada, Mak, 2004; Kondo et al., 2005; Levine, Yuan, 2005; Degenhardt et al., 2006; Hait et al., 2006; Kim et al., 2006; Pattingre, Levine, 2006). Однако выводы этих работ крайне противоречивы даже в оценке противоопухолевой роли аутофагии, не говоря уже о возможности использования ее триггеров в качестве мишеней для терапии.

Согласно наиболее распространенной точке зрения, на ранних фазах канцерогенеза имеет место противоопухолевый эффект аутофагии (Gozuacik, Kimchi, 2004; Jaat-

tela, 2004; Kondo et al., 2005; Pattingre, Levine, 2006). Показано, например, что активация онкогена *c-myc* индуцирует гибель клетки путем аутофагии (Gozuacik, Kimchi, 2004). У мышей, нокаутных по активирующему аутофагию гену *Beclin-1*, значительно повышается частота карцином легких, гепатоцеллюлярного рака и лимфом (Kondo et al., 2005). Однако существуют данные о том, что этот эффект связан не с нарушением аутофагии, а с потерей контроля за пролиферацией, в котором участвует *Beclin-1* (Levine, Yuan, 2005). Кроме того, предлагается использовать усиление аутофагии в опухолевых клетках с нарушением механизма апоптоза с помощью блокатора mTOR Rad001 для усиления ответа на лучевую терапию (Kim et al., 2006). Имеются работы, в которых показана роль аутофагии в ингибировании ангиогенеза (Gozuacik, Kimchi, 2004).

С другой стороны, многочисленные данные говорят о том, что аутофагия используется опухолевой клеткой и как механизм выживания в стрессовых ситуациях, которыми являются анемия и гипоксия при несостоятельности кровоснабжения опухолевого узла или его участков, а также лучевая терапия и действие противоопухолевых препаратов, индуцирующих апоптоз (Kondo et al., 2005; Levine, Yuan, 2005; Hait et al., 2006). Поэтому активация аутофагии может быть причиной лекарственной устойчивости и ускорения роста опухоли. Интересно при этом отметить, что блокада процесса аутофагии в апоптоз-дефицитных опухолях приводит к массовой гибели клеток путем некроза (Degenhardt et al., 2006). Однако такой на первый взгляд положительный эффект, как выяснилось, усиливает опухолевую прогрессию из-за развития воспалительной реакции, индуцированной некрозом. Таким образом, модуляция опухолевого роста с помощью влияния на аутофагию представляет собой весьма тонкий подход, реализация которого еще требует уточнения сложных взаимоотношений между факторами, регулирующими как саму аутофагию, так и ее исход в опухолях.

### Митотическая катастрофа

Вероятно, ни один другой тип смерти клеток не порождает столько вопросов, как митотическая катастрофа. Этот тип клеточной гибели стали выделять позже всех остальных, и не вполне ясно, в какой степени ее можно квалифицировать как программируемую. Под митотической катастрофой принято понимать гибель клетки в результате грубых нарушений митоза, таких как отставание хромосом в мета- и анафазе, К-митозы, мультиполюсные и многогрупповые мета- и анафазы (Roninson et al., 2001; Проскуряков и др., 2002; Castedo et al., 2004). Ведущим морфологическим признаком этой формы гибели клетки считается образование одного или нескольких микроядер, в которых отсутствуют явления маргинации и конденсации хроматина, что отличает ее от апоптоза (Okada, Mak, 2004). Отсутствуют также разрывы ДНК, выявляемые TUNEL-методом (Roninson et al., 2001; Okada, Mak, 2004). Морфологический и биохимический механизм гибели клетки, претерпевшей митотическую катастрофу, обычно описывается как некроз (Roninson et al., 2001). Однако имеются также указания на то, что в некоторых случаях возможен апоптоз через активацию каспазы 2 (функциональный аналог каспазы 8) и за счет высвобождения из митохондрий факторов, формирующих апоптосому (Castedo et al., 2004). В этом случае удается визуализировать разрывы в ДНК TUNEL-методом.

Впервые этот тип смерти был описан у дрожжей с мутацией, обуславливающей повышенную чувствительность клеток к изменению температуры (Russell, Nurse, 1986). Основанием для выделения митотической катастрофы в отдельный тип смерти клеток послужили данные экспериментов по определению клоногенности облученных опухолевых клеток с заблокированным апоптозом. Оказалось, что блокада апоптоза не может повысить выживаемость клеток и способность к колониеобразованию после облучения, причем наблюдалась обратная корреляция между этими показателями и частотой образования клеток с микроядрами (Roninson et al., 2001). Из этих фактов были сделаны далеко идущие выводы о существовании особой формы гибели клеток, отличной от апоптоза, некроза и аутофагии.

Считается, что митотическая катастрофа играет большую роль не только при облучении ионизирующей радиацией, но и как механизм клеточного ответа на применение ряда противоопухолевых препаратов — цисплатины, блеомицина, винбластин и винкристина (Roninson et al., 2001; Castedo et al., 2004). Высказываются предложения использовать гены и их продукты, участвующие в инициации митотической катастрофы, в качестве мишеней для терапевтического воздействия на MtP53-позитивные опухоли (Roninson et al., 2001).

Известен в общих чертах и молекулярный механизм, приводящий к митотической катастрофе. Ключевую роль в этом процессе может играть любое воздействие, ингибирующее прохождение клеткой «второй сверточной точки» клеточного цикла — checkpoint 2, что может быть достигнуто нокаутом генов *chk1*, *chk2*, *atm*, *atr*, *plk1*, *pik1*, *mlh1*, *p53*, *p21* и *14-3-3σ*, а также воздействие кофеином, пентоксифиллином и некоторыми другими средствами (Roninson et al., 2001; Castedo et al., 2004; Okada, Mak, 2004). Явления митотической катастрофы могут быть вызваны и прямым ингибированием сборки микротрубочек веретена деления колхицином, винбластином и винкристином (Roninson et al., 2001).

Говоря о митотической катастрофе, нужно отметить, что с цитогенетической точки зрения это явление не вполне согласуется с общепринятыми представлениями о судьбе клеток с микроядрами, а именно: гибель таких клеток не считается однозначно предопределенной. Известно, что микроядра как структуры, лишенные полноценной ядерной оболочки, способны лизироваться и исчезать из клетки или включатся в геном при следующем за образованием микроядра митозе (Ильинских и др., 1992). Показано, что недостаток генетического материала может быть компенсирован с помощью эндорепродукции и полиплоидизации генома клетки (Павлов и др., 2005). Рядом авторов, в том числе и нами (Манских, 2006), было установлено, что микроядра могут образовываться как в норме, так и при действии мутагенов из интерфазного ядра путем внемитотической экстружии (выброса) хроматина. Все эти факты указывают на то, что выделение и однозначная трактовка явлений митотической катастрофы как особого типа гибели клеток пока еще достаточно противоречивы. Практическая сторона проблемы заключается в том, что учет количества клеток с микроядрами является распространенным методом, применяемым для скрининговой оценки мутагенности и возможной канцерогенности (Худолей, 1999). Интерпретация данных, получаемых этим методом, в значительной мере определяется решением вопроса о дальнейшей судьбе клетки, содержащей микроядро.

## Клеточное старение

Англоязычный термин «senescence» может быть приблизительно переведен на русский язык как «одряхление» и обозначает особую форму программируемой гибели клетки или, скорее, клеточного ответа на ряд внутриклеточных и внеклеточных факторов: укорочение теломер при репликативном старении, воздействие радиации и цитостатических средств, повреждение ДНК и др. (Roninson et al., 2001; Seluanov et al., 2001; Feldser et al., 2003; Okada, Mak, 2004). Помимо необратимого выключения из пролиферации такие клетки отличаются набором морфологических и биохимических свойств: они характеризуются уплощением, повышенной гранулярностью цитоплазмы, наличием особых морфологических изменений гетерохроматина ядра в виде «сенесенсассоциированных» фокусов, выявляемых при электронной микроскопии, повышенной экспрессией P53 и фосфорилированной RB, экспрессией металлопротеиназ, продуктов генов INK4A и ARF и особенно наличием в цитоплазме активности фермента  $\beta$ -галактозидазы (Roninson et al., 2001; Okada, Mak, 2004). Последний считается специфическим маркером клеточного старения (Глухов и др., 2003).

Конкретный механизм, вызывающий сенесенс, пока еще изучен недостаточно. Особенно это касается случая, когда его триггером выступает укорочение теломер. Первоначальное предположение о том, что клеточное старение вызывается распространением концевой недорепликации после укорочения теломерной ДНК на структурные гены (Оловников, 1971; Глухов и др., 2003), не нашло фактического подтверждения (Мушкамбаров, Кузнецов, 2003). Существует предположение о том, что укорочение теломеры вызывает гиперэкспрессию гипотетических *age*-генов, запускающих сенесенс. Наиболее вероятным триггером клеточного ответа на укорочение теломеры представляется P53, поскольку установлена его роль в активации сенесенса другими воздействиями, например повреждением ДНК. Показано, что P53 активирует P21, который останавливает клеточный цикл за счет взаимодействия с циклинзависимыми протеинкиназами. В дальнейшем происходит активация экспрессии P16, INK4A и ARF, что провоцирует синтез и накопление в клетке маркера сенесенса —  $\beta$ -галактозидазы (Roninson et al., 2001). Имеется и другое, правда чрезвычайно гипотетическое, представление о возможности активации репликативного сенесенса укорочением «латеральной ДНК» и потерей «нонстоп-генов» (Оловников, 2003). Возможно, что посредником здесь выступает взаимодействие с ионными каналами ядерной оболочки (Оловников, 2001).

Сенесенс представляет интерес в связи с возможным участием его в процессах старения организма и злокачественного роста. Трудности, связанные с решением первой проблемы, относятся целиком к теломерной теории старения (Оловников, 2003). Что касается опухолей, то на первых этапах их развития, при достижении стимулированными к пролиферации клетками лимита Хейфлика, сенесенс выступает не только в качестве механизма элиминации таких клеток, но и как фактор селекции иммортальных клонов (Глухов и др., 2003). Более того, установлено, что клетки в состоянии сенесенса способны синтезировать целый набор провоспалительных цитокинов, факторов роста, ингибиторов апоптоза и активаторов ангиогенеза, способствующих опухолевой прогрессии (Campisi, 2000; Elenbaas, Weinberg, 2001). Показано, в частности, что экспрессия  $\beta$ -галактозидазы в нормальных гепатоци-

тах, окружающих гепатокарциному, коррелирует со скоростью роста опухоли (Paradis et al., 2001). Именно это обстоятельство создает затруднения для многочисленных предложений использовать индукцию сенесенса с целью достижения регрессии опухоли (Roninson et al., 2001). Нужно учитывать также, что замедленная регрессия опухоли после цитостатической и лучевой терапии может быть связана с наступлением сенесенса в опухолевых клетках (Cox, Kline, 1983).

## Фагоцитоз, опосредованный презентацией на мембране «сигналов гибели»

Под этим определением понимается фагоцитоз клетки другими клетками за счет презентации ею на мембране специальных лигандов, служащих сигналом к распознаванию и элиминации, т. е. осуществление своеобразного варианта программируемой гибели. В современной литературе это явление принято рассматривать не как отдельную форму смерти клеток, а как часть программы апоптоза, которая в физиологических условиях производит удаление остатков погибших клеток (апоптозных тел) (Krieser, White, 2002; Проскураков и др., 2005). Однако существуют случаи, когда фагоцитоз осуществляется вне зависимости от активации программы апоптоза, а триггером этого процесса служат специальные лиганды, презентированные на мембране фагоцитируемой клетки.

Наиболее изученным является процесс фагоцитоза стареющих эритроцитов (Krieser, White, 2002). Показано, что он осуществляется за счет связывания тех же рецепторов, что и при фагоцитозе апоптозных тел. Роль этих рецепторов оказалась весьма различной. CD36 и интегрин  $\alpha_v\beta_3$  способствуют связыванию макрофагов с эритроцитами, но не активируют фагоцитоз. Только появление на мембране эритроцитов остатков фосфатидилсерина и связывание его с соответствующим рецептором на макрофаге приводило к быстрому поглощению эритроцита (Krieser, White, 2002). Роль других рецепторов изучена меньше. Этой цели могут служить макрофагальные рецепторы группы SR («scavenger receptors»), а также TLR («toll-like receptors»), способные распознавать на мембране подлежащей элиминации клетки «универсальный паттерн патогена» (Проскураков и др., 2005; Хаитов, Манько, 2006). Путем фагоцитоза могут удаляться инфицированные и стареющие клетки, а также клетки опухолей (Рапопорт и др., 2005; Хаитов, Манько, 2006). Механизм распознавания подлежащих элиминации клеток в первых двух случаях в целом известен, чего нельзя сказать о роли фагоцитоза в генетическом гомеостазе и противоопухолевом надзоре.

Нами была высказана гипотеза (Манских, 2005), которая предполагает участие мутантного p53 в качестве триггера, запускающего экспрессию лигандов макрофагальных рецепторов и, таким образом, маркирующего для элиминации клетки с нарушенным контролем за целостностью генома и течением клеточного цикла. Прямых экспериментальных данных, позволяющих проверить эту гипотезу, до настоящего времени не существует.

## Заключение

Как видно из представленного материала, в настоящее время благодаря интенсивному изучению вопросов танатогенеза клетки представления о разнообразии меха-

низмов клеточной гибели и их биологической роли значительно усложнились. Чрезвычайно важным явилось понимание их неоднозначного, зачастую диалектического влияния на ход физиологических и особенно патологических процессов, что хорошо видно на примере опухолевого роста. Вместе с тем расширение знаний о смерти клетки привело к постановке многочисленных новых, пока еще не решенных вопросов. Все эти обстоятельства нужно учитывать при разработке подходов к активному вмешательству в регуляцию клеточной гибели в разнообразных патологических процессах.

### Список литературы

- Белушкина Н. Н., Белецкий И. П. 2004. Молекулярно-медицинские аспекты клеточной гибели. В кн.: Введение в молекулярную патологию. М.: Медицина. 414—445.
- Бережова Н. В. 1990. Апоптоз — управляемая смерть клетки. Арх. анат. гистол. эмбриол. 99 (12) : 68—75.
- Глухов А. И., Зимник О. В., Хаитов Р. М., Северин С. Е. 2003. Теломераза — потенциальный опухолевый маркер. Рос. онкол. журн. 2 : 53—57.
- Ильинских Н. Н., Новицкий В. В., Ванчугова Н. Н., Ильинских И. Н. 1992. Микроядерный анализ и цитогенетическая нестабильность. Томск: Изд-во ТГУ. 272 с.
- Крутовский В. А. 2005. Роль межклеточных взаимодействий через щелевые контакты в канцерогенезе: Автореф. докт. дис. СПб. 31 с.
- Манских В. Н. 2005. Смерть клетки: системный анализ некоторых ключевых проблем. Естествознание и гуманизм. 2 (1) : 22—26.
- Манских В. Н. 2006. К вопросу о механизмах образования микроядер в норме и при действии N-нитрозо-N-метилкарбамида. Бюл. эксперим. биол. мед. 141 (2) : 217—220.
- Москалева Е. Ю., Северин С. Е. 2006. Возможные механизмы адаптации клетки к повреждениям, индуцирующим программируемую гибель. Связь с патологией. Патол. физиол. и эксперим. терапия. 2 : 2—16.
- Мушкамбаров Н. Н., Кузнецов С. Л. 2003. Молекулярная биология. М.: Мед. информ. агентство. 544 с.
- Оловников А. М. 1971. Принцип маргинотомии в матричном синтезе полинуклеотидов. ДАН СССР. 201 : 1496—1499.
- Оловников А. М. 2001. Внутриядерные ионные фонтаны как регуляторы работы генома: фонтанная гипотеза доминантности и некоторых эпигенетических эффектов. Молекуляр. биол. 35 : 163—176.
- Оловников А. М. 2003. Редусомная гипотеза старения и контроля биологического времени в индивидуальном развитии. Биохимия. 68 (1) : 7—41.
- Павлов А. В., Гансбургский А. Н., Гансбургский М. А. 2005. Пloidность микронуклеированных тимоцитов, индуцированных введением метилнитрозомочевины. Бюл. эксперим. биол. мед. 140 (12) : 695—697.
- Проскураков С. Я., Габай В. Л., Коноплянников А. Г. 2002. Некроз — активная, управляемая форма программируемой клеточной гибели. Биохимия. 67 (4) : 467—491.
- Проскураков С. Я., Габай В. Л., Коноплянников А. Г., Замулаев И. А., Колесникова А. И. 2005. Иммунология некроза и апоптоза. Биохимия. 70 (12) : 1593—1605.
- Рапопорт Е. М., Сапотько Ю. Б., Пазынина Г. В., Боженко В. К., Бовин Н. В. 2005. Участие синалосвязывающих макрофагальных лектинов в фагоцитозе апоптотических телец. Биохимия. 70 (3) : 406—415.
- Скулачев В. П. 1998. О биохимических механизмах эволюции и роли кислорода. Биохимия. 63 (12) : 1570—1579.
- Скулачев В. П. 2005. Старение как атавистическая программа, которую можно попытаться отменить. Вестн. РАН. 75 (9) : 831—843.
- Хаитов Р. М., Манько В. М. 2006. Физиологические особенности активации и торможения функций клеток иммунной системы. Рецепторные структуры и внутриклеточные сигнальные пути макрофагов и естественных клеток-киллеров. Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова. 92 (6) : 662—674.
- Худoley В. В. 1999. Канцерогены: характеристики, закономерности, механизмы действия. СПб.: НИИ химии СПбГУ. 419 с.
- Arico S., Anne Petiot A., Bauvy C., Dubbelhuis P. F., Meijer A. J., Codogno P., Ogier-Denis E. 2001. The tumor suppressor PTEN positively regulates macroautophagy by inhibiting the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B pathway. J. Biol. Chem. 276 : 35 243—35 246.
- Bouchard V. J., Rouleau M., Poirier G. G. 2003. PARP-1, a determinant of cell survival in response to DNA damage. Exp. Hematol. 31 : 446—454.
- Campisi J. 2000. Cancer, aging and senescence. In Vivo. 14 : 183—188.
- Castedo M., Perfettini J.-L., Roumier T., Andreau K., Medema R., Kroemere G. 2004. Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition. Oncogene. 23 : 2825—2837.
- Cox J. D., Kline R. W. 1983. Do prostatic biopsies 12 months or more after external irradiation for adenocarcinoma? Stage III, predict long-tem survival. J. Rad. Oncol. Biol. Biophys. 9 : 299—303.
- Degenhardt K., Mathew R., Beaudoin B., Bray K., Anderson D., Chen G., Mukherjee C., Shi Y., Ge'linas C., Fan Y., Nelson D. A., Jin S., White E. 2006. Autophagy promotes tumor cell survival and restricts necrosis, inflammation, and tumorigenesis. Cancer Cell. 10 : 51—64.
- Elenbaas B., Weinberg R. A. 2001. Heterotopic signaling between epithelial tumor cells and fibroblasts in carcinoma formation. Exp. Cell Res. 264 : 169—184.
- Feldser D. M., Hackett J. A., Greider C. W. 2003. Telomere dysfunction and the initiation of genome instability. Nat. Rev. Cancer. 3 : 1—5.
- Fiers W., Beyaert R., Declercq W., Vandenabeele P. 1999. More than one way to die: apoptosis, necrosis and reactive oxygen damage. Oncogene. 18 : 7719—7730.
- Gozuacik D., Kimchi A. 2004. Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism. Oncogene. 23 : 2891—2906.
- Hait W. N., Jin S., Yang J.-M. 2006. A matter of life or death (or both): understanding autophagy in cancer. Clin. Cancer Res. 12 : 1961—1965.
- Jaattela M. 2004. Multiple cell death pathways as regulators of tumour initiation and progression. Oncogene. 23 : 2746—2756.
- Johnstone R. W., Ruefli A. A., Lowe S. W. 2002. Apoptosis: a link between cancer genetics and chemotherapy. Cell. 108 : 153—164.
- Kerr J. F., Wyllie A. H., Currie A. R. 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. Br. J. Cancer. 26 : 239—257.
- Kim K. W., Mutter R. W., Cao C., Albert J. M., Freeman M, Hallahan D. E., Lu B. 2006. Autophagy for cancer therapy through inhibition of proapoptotic proteins and mTOR signaling. J. Biol. Chem. 281 : 36 883—36 890.
- Kando Y., Kanzawa T., Sawaya R., Kondo S. 2005. The role of autophagy in cancer development and response to therapy. Nat. Rev. Cancer. 5 : 726—734.
- Krieser R. J., White K. 2002. Engulfment mechanism of apoptotic cells. Curr. Opin. Cell Biol. 14 : 734—738.
- Levine B. 2005. Eating oneself and uninvited guests: autophagy-related pathways in cellular defense. Cell. 120 : 159—162.
- Levine B., Klionsky D. J. 2004. Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. Develop. Cell. 6 : 463—477.
- Levine B., Yuan J. 2005. Autophagy in cell death: an innocent convict? J. Clin. Investig. 115 : 2679—2688.
- Lockshin R. A., Zakeri Z. 2004. Apoptosis, autophagy, and more. IJBCB. 36 : 2405—2419.
- Meijer A. J., Codogno P. 2004. Regulation and role of autophagy in mammalian cells. IJBCB. 36 : 2445—2462.
- Nicotera P., Melino G. 2004. Regulation of the apoptosis-necrosis switch. Oncogene. 23 : 2757—2765.

- Nishino I.* 2003. Autophagic vacuolar myopathies. *Curr. Neurol. and Neurosci. Reprod.* 3 : 64—69.
- Okada H., Mak T. W.* 2004. Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumor cells. *Nat. Rev. Cancer.* 4 : 592—603.
- Paradis V., Youssef N., Dargere D., Ba N. Bonwoust F., Deschatrette J.* 2001. Replicative senescence in normal liver, chronic hepatitis C, and hepatocellular carcinomas. *Hum. Pathol.* 32 : 327—332.
- Pattingre S., Levine B.* 2006. Bcl-2 inhibition of autophagy: a new route to cancer? *Cancer Res.* 66 : 2885—2888.
- Pattingre S., Tassa A., Qu X., Garuti R., Liang X. H., Mizushima N., Packer M., Schneider M. D., Levine B.* 2005. Bcl-2 antiapoptotic protein inhibits beclin-1-dependent autophagy. *Cell.* 122 : 927—939.
- Pletushkina J. Yu., Fetisova E. K., Lyamzaev K. D., Ivanova O. Yu., Domnina L. V., Vyssokikh M. Yu., Pustovidko A. V., Vasiliev J. M., Murphy M. P., Chernyak B. V., Skulachev V. P.* 2005. Long-distance apoptotic cell killing is mediated by hydrogen peroxide via mitochondrial ROS-dependent fashion. *Cell Death Diff.* 12 : 1442—1444.
- Proskuryakov S. Y., Konoplyannikov A. G., Gabaib V. L.* 2003. Necrosis: a specific form of programmed cell death? *Exp. Cell Res.* 283 : 1—16.
- Reznikov K., Kolesnikova A. L., Pramanik A., Tan-No K., Gileva I., Yakovleva T., Regler R., Terenius L., Bakalkin G.* 2000. Clustering of apoptotic cells via bystander killing by peroxides. *FASEB J.* 14 : 1754.
- Roninson I. B., Broude E. V., Chang B.-D.* 2001. If not apoptosis, then what? Treatment-induced senescence and mitotic catastrophe in tumor cells. *Drug Resist. Updates.* 4 : 303—313.
- Russell P., Nurse P.* 1986. Cds25 functions as an inducer in the mitotic control of fission yeast. *Cell.* 45 : 145—153.
- Schweichel J.-U., Merker H.-J.* 1973. The morphology of various types of cell death in prenatal tissues. *Teratology.* 7 : 253—266.
- Seluanov A., Gorbunova V., Falcovitz A., Sigal A., Milyavsky M., Zurer I., Shohat G., Goldfinger N., Rotter V.* 2001. Change of the death pathway in senescent human fibroblasts in response to DNA damage is caused by an inability to stabilize p53. *Mol. Cell Biol.* 21 : 1552—1564.

Поступила 15 I 2007

## PATHWAYS OF CELL DEATH AND THEIR BIOLOGICAL IMPORTANCE

V. N. Manskikh

The Chair of Pathological Anatomy, Siberian State Medical University, Tomsk; e-mail: Manskikh@mail.ru

The characteristic and the critical review of the data on clinical and biological importance of apoptosis, necrosis, autophagy, mitotic catastrophe, autophagocytosis and senescence are presented here.

**Key words:** apoptosis, necrosis, autophagy, mitotic catastrophe, autophagocytosis, senescence.