

АПОПТОЗ. СИГНАЛЬНЫЕ ПУТИ И ИЗМЕНЕНИЕ ИОННОГО И ВОДНОГО БАЛАНСА КЛЕТКИ

© А. В. Широкова

*Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург;
электронный адрес: veren@mail.cytspb.rssi.ru, annashirokova@hotmail.com*

Представлен обзор литературы, касающейся связи общих механизмов индукции апоптоза с такими его признаками, как сжатие клетки и изменение ее ионного состава. Рассмотрены общая схема передачи сигналов, приводящих к апоптозу, рецепторный и митохондриальный пути активации каспазного каскада и каспазонезависимая индукция апоптоза. Основное внимание уделено обзору работ, посвященных исследованию дегидратационного сжатия клеток при апоптозе и связанному с ним изменению ионного состава клетки (содержания К, Na, Cl и P), изменению уровня pH и мембранного потенциала. Рассматриваются связанные с апоптозом изменения в основных трактах переноса однозарядных ионов через плазматическую мембрану (натриевый насос, калиевые, натриевые и хлорные каналы, Na⁺/H⁺-обменник и др.).

Ключевые слова: апоптоз, ионный и водный баланс клетки, ионная регуляция апоптоза.

Апоптоз — программируемая гибель клеток — естественный процесс, предназначенный для элиминации поврежденных клеток либо клеток, «не нужных» по программе морфогенеза и индивидуального развития организма. Важной особенностью апоптоза, отличающей его от некроза, является отсутствие воспалительной реакции соседних клеток на продукты распада, так как деградирующая клетка сохраняет целостность мембраны до конечных стадий процесса (см. обзор: Var, 1996), а затем подвергается фагоцитозу (см. обзор: Savill, Fadok, 2000). К характерным признакам апоптоза принято относить: дегидратационное сжатие клеток, утрату межклеточных контактов, блеббинг, разрушение цитоскелета, конденсацию хроматина, фрагментацию ядер и деградацию ДНК (см. обзоры: Näcker, 2000; Bortner, Cidlowski, 2002). Чаще всего идентификацию апоптоза проводят по морфологическим признакам, а также регистрируя интернуклеосомные разрывы ДНК на электрофореграммах и определяя активность каспаз. При работе с живыми клетками широко используется мечение аннексином V, выявляющим появление фосфатидилсерина на внешней стороне плазматической мембраны в процессе апоптоза. В зависимости от типа клеток, их состояния и вида индуктора основные признаки апоптоза могут варьировать, а некоторые могут вовсе отсутствовать, как это происходит, например, при апоптозе безъядерных эритроцитов. При более строгом подходе необходимо учитывать, что критерием апоптоза может быть только комплекс признаков (см. обзор: Darzynkiewicz et al., 1998).

Цель настоящего обзора — обобщить данные по изменению ионного и водного баланса клеток при апоптозе и рассмотреть их в связи с общими механизмами индукции апоптоза.

Сигнальные пути при апоптозе

Общая схема запуска и развития апоптоза представлена на рис. 1. Апоптоз может быть вызван как внешними, так и эндогенными сигналами, к важнейшим из которых относится повреждение ДНК (см. обзоры: Reed, 2000; Roy, Nicholson, 2000; Ghobrial et al., 2005). Апоптоз — сложный многостадийный процесс, в котором существенную роль играют каспазы — семейство эволюционно консервативных протеаз (см. обзор: Earnshaw et al., 1999). В нормальном состоянии каспазы присутствуют в клетке в неактивной форме, как проэнзимы. Различают два вида каспаз — «инициирующие» и «эффекторные» (см. обзор: Kaufmann, Earnshaw, 2000). К первым относятся каспазы 8, 9, 10 и 12 (см. обзоры: Ho, Hawkins, 2005; Vermeulen et al., 2005), которые после активации действуют на эффекторные каспазы 3, 6, 7 и 14. Каспаза 2 обладает как иницирующими, так и эффекторными функциями (см. обзор: Zhivotovsky, Orrenius, 2005). Мишени эффекторных каспаз многообразны: например, для каспазы 3 это могут быть фактор фрагментации ДНК DFF-45, гельзолин, PARP-полимераза или PAK2-киназа (Janicke et al., 1998). Только на этапе активации иницирующих каспаз апоптоз обратим.

Механизмы активации иницирующих каспаз могут быть различными. Рецепторный путь запуска каспазного каскада начинается с активации одного из расположенных на клеточной мембране рецепторов, воспринимающих внешний сигнал, например Fas/CD95, TNF, DR-4, DR-5 и т. п. (см. обзор: Kaufmann, Hengartner, 2001). В случае рецептора Fas его активация одноименным лигандом либо антителами ведет к присоединению к рецептору адаптора FADD (Fas-associated protein with death domain). FADD в свою очередь связывается с про-

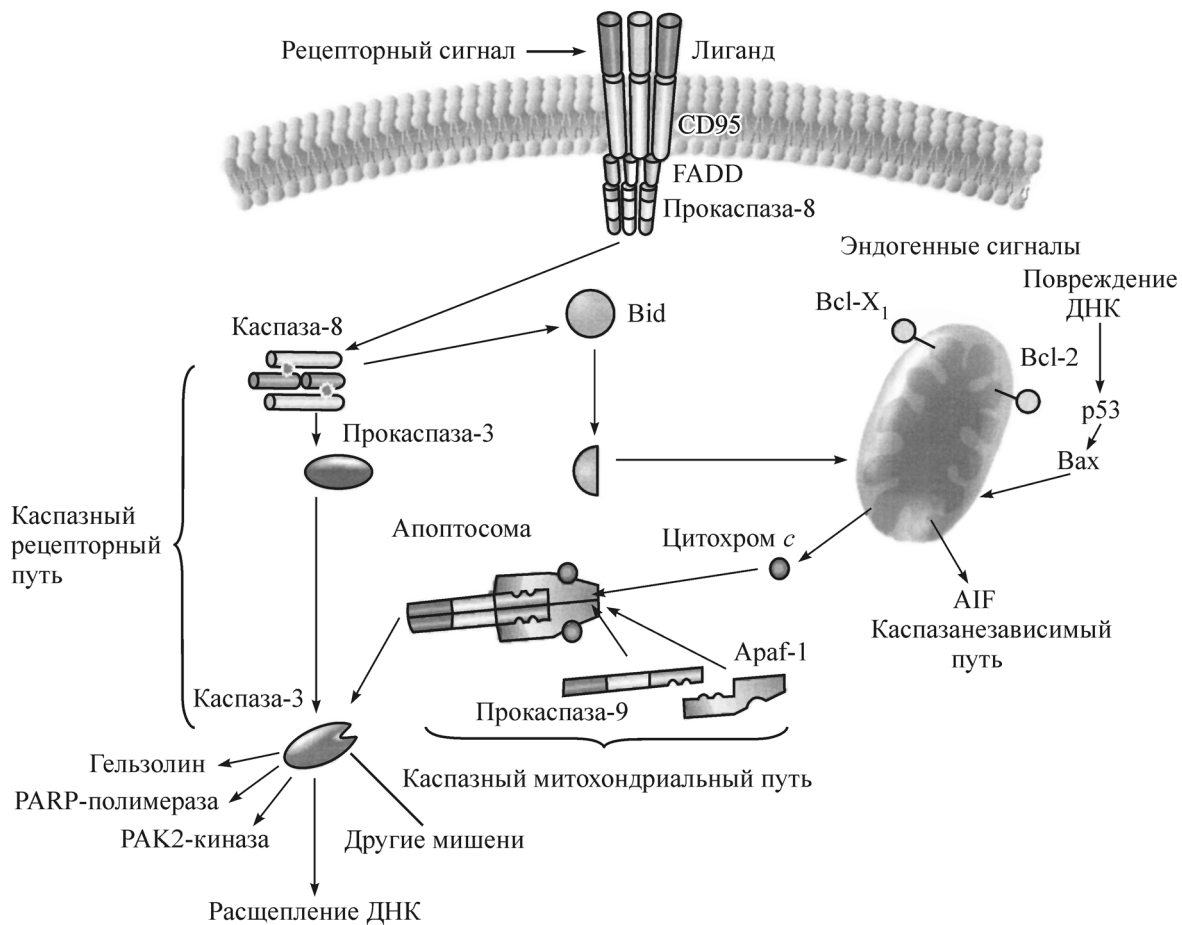


Рис. 1. Схема передачи сигналов при апоптозе (по: Hengartner, 2000, с дополнениями).

CD95 — рецептор, расположенный на клеточной мембране; FADD — (Fas-associated protein with death domain) — адаптер; Bid, Bcl-X_L, Bcl-2, Bax — белки семейства Bcl-2; p53 — белок-супрессор развития опухолей; Apaf-1 — фактор активации протеаз; AIF — фактор индукции апоптоза; цитохром *c* — белок митохондриальной электрон-транспортной цепи.

каскадой 8, что приводит к активации каспазы 8, которая затем активирует прокаспазу 3 (рис. 1). Такой тип передачи сигнала имеет место, например, у лимфоидных клеток. У других клеток активации каспазы 8 недостаточно для активации прокаспазы 3 (см. обзор: Kaufmann, Hengartner, 2001).

В случае митохондриального пути запуска каспазного каскада ключевым звеном является изменение состояния митохондрий, при котором снижается мембранный потенциал на внутренней мембране, в ней образуются гигантские поры, матрикс набухает, разрывается наружная мембрана, из митохондрий выходит ряд белков, в частности цитохром *c* (см. обзор: Bernardi et al., 2001). Последний в комбинации с фактором Apaf-1 (apoptotic protease-activating factor-1) и прокаспазой 9 образует так называемый апоптосомный комплекс, в котором прокаспазы превращаются в каспазы 9 (см. обзор: Green, Reed, 1998). Далее каспаза 9 активирует каспазу 3. Рецепторный и митохондриальный пути активации каспазного каскада сходятся на стадии активации какой-либо эффекторной каспазы. Так, например, каспаза 3 или 7, действуя на комплекс ДНКазы CAD (caspase activated DNase) с ингибитором DFF-45/ICAD, отщепляет и инактивирует последний. Свободная CAD вызывает межнуклеосомные разрывы ДНК и образование фрагментов в 180—200 пар оснований (Tang, Kidd, 1998; Na-

gata et al., 2003). Один из белков семейства Bcl-2 — промотор апоптоза Bid — также может связывать рецепторный и митохондриальный пути (см. обзор: Roy, Nicholson, 2000).

Митохондрии являются ключевым звеном в передаче сигнала во время апоптоза, связанного с повреждением ДНК при действии на клетку разного рода факторов, в частности радиации, активных форм кислорода (Aoki et al., 2002), высокой температуры (Veeger, 2004) и др. Важную роль при этом играет белок p53. Отсутствие или мутация гена *p53* приводит к блокированию апоптоза и способствует развитию злокачественных новообразований из-за прекращения элиминации злокачественных клеток. При действии ультрафиолетового излучения, радиации, химиопрепаратов и других факторов, приводящих к нарушениям структуры ДНК, уровень p53 повышается (Chen et al., 1996; Bedner et al., 2000). Помимо передачи сигнала в митохондрии p53 может участвовать в активации экспрессии проапоптотических генов и подавлении экспрессии антиапоптотических генов (см. обзор: Haupt et al., 2003).

На наружной мембране митохондрий локализована большая часть белков семейства Bcl-2, в состав которого входят промоторы (Bax, Bid и Bik) и ингибиторы (собственно Bcl-2 и Bcl-X_L) апоптоза. От соотношения активности этих белков зависит, состоится апоптоз или нет

(см. обзор: Hengartner, 2000). Открытие AIF (apoptosis inducing factor) является важным этапом в развитии представлений о существующих в клетке сигнальных апоптотических каскадах. Этот митохондриальный флавопротеин перемещается от митохондрий к ядру, где вызывает конденсацию хроматина на периферии ядра и разрыв ДНК с образованием крупных фрагментов. В этом случае действует каспазонезависимый механизм (Susin et al., 2000; см. обзор: Cande et al., 2002). Таким образом, AIF и цитохром *c* выполняют важную роль проапоптотических факторов.

Дегидратация клеток при апоптозе

Уменьшение объема клетки исторически принято считать одним из важнейших признаков, отличающим апоптоз от некроза (Кегг, 1971). Первоначально заключение об уменьшении объема делали на основании микроскопии фиксированных гистологических препаратов. В настоящее время объектами исследований являются преимущественно живые клетки, и вывод о сокращении размеров клеток при индукции апоптоза чаще всего основан на измерениях малоуглового светорассеяния при проточной цитометрии, хотя этот метод нельзя считать строгим (см. обзор: Shapiro, 1988). В настоящее время апоптотическое снижение объема клеток (apoptotic volume decrease, AVD) связывают с их дегидратацией (Okada et al., 2001). Различие клеток по плавучей плотности, которая определяется содержанием в клетках воды, давно используется для выделения апоптотических тимоцитов и других клеток (Thomas, Bell, 1981; Wyllie, Morris, 1982; Cohen et al., 1993; Dumont et al., 2000). Именно измерениями плавучей плотности показано, что апоптоз не всегда сопровождается дегидратацией клеток (Веренинов и др., 2003, 2004; Yurinskaya et al., 2005a, 2005b). Полагают, что механизм AVD аналогичен механизму реакции регуляторного снижения объема клеток после их первичного набухания в гипосмотической среде (regulatory volume decrease, RVD). Считается, что дегидратация клеток — не только следствие апоптоза, но может быть и индуктором апоптоза. Показано, что апоптоз вызывается гипертоническим шоком (Morales et al., 2000; Michea et al., 2002; Rao et al., 2004; Friis et al., 2005). Апоптотическое сжатие клеток может наблюдаться как в течение первых десятков минут, так и в течение десятков часов (Benson et al., 1996; Chang et al., 2000). На клетках HL60, HeLa и U937 показано, что уменьшение клеточного объема опережает такие проявления апоптоза, как выход фосфатидилсерина на поверхность плазматической мембраны, выявляемый по связыванию аннексина V (McCarthy, Cotter, 1997), выход цитохрома *c* из митохондрий, активация каспазы 3 и фрагментация ДНК (Maeno et al., 2000).

Каким образом уменьшение объема клеток при апоптозе связано с каспазным каскадом? На клетках Jurkat показано, что каспазный ингибитор широкого спектра действия z-VAD блокирует все основные проявления апоптоза, вызванного через Fas-рецептор, включая уменьшения объема, а при индукции апоптоза кальциевым ионофором A23187 или тапсигаргином этот ингибитор не отменяет уменьшения объема, что предполагает каспазный механизм в первом случае и некаспазный механизм — во втором (Bortner, Cidlowski, 1999). Уменьшение клеточного объема и конденсацию хроматина при апоптозе активированных Т-лимфоцитов отмечали при

каспазонезависимом механизме с участием AIF (Dumont et al., 2000). При апоптозе клеток Jurkat, индуцированном радиацией или через Fas-рецептор, уменьшение объема, регистрируемое по малоугловому светорассеянию при проточной цитометрии, имело место в обоих случаях, хотя и регулировалось различными иницирующими каспазами — 8 и 9 (Vu et al., 2001). Из вышесказанного можно сделать вывод о том, что AVD может наблюдаться как при каспазозависимой (рецепторной, митохондриальной), так и при каспазонезависимой индукции апоптоза. На клетках Jurkat, апоптоз которых вызывали через Fas-рецептор, обнаружено, что стимуляция протеинкиназы С форболовым эфиром (PMA) и бриостатином-1 отменяет апоптотическое снижение объема, а ингибирование протеинкиназы С индолкарбазолом Gö6976 способствует AVD (Gómez-Angelats et al., 2000).

Изменение внутриклеточного содержания и концентрации K^+ при апоптозе

Широко распространено представление о том, что выход внутриклеточного K^+ является важным процессом, сопровождающим, а по мнению многих исследователей, и обуславливающим AVD (см. обзоры: Bortner, Cidlowski, 2002; Park, Kim, 2002; Yu, 2003a). Тем не менее работ, в которых ионный и водный баланс клеток при апоптозе измеряли бы параллельно, мало. Необходимо различать изменение концентрации катионов во внутриклеточной воде и изменение содержания катионов на единицу сухой массы клеток. Показано, что вызванный дексаметазоном апоптоз лимфоидных клеток СЕМ не сопровождается существенным снижением концентрации K^+ , в то время как содержание K^+ , измеренное методом пламенной фотометрии, уменьшается на 15 % (Benson et al., 1996). О снижении внутриклеточной концентрации K^+ в клетках HL60 при апоптозе, вызванном ультрафиолетовым облучением, сообщают Мак-Карти и Коттер (McCarthy, Cotter, 1997). По другим данным, полученным на фибробластах мыши с помощью флуоресцентных зондов, концентрация K^+ при апоптозе уменьшалась от 110 до 50 мМ (Barbiero et al., 1995). По данным рентгеновского микроанализа, при апоптозе, вызванном ультрафиолетовым облучением, содержание K^+ в клетках U937 снижается с 391 до 196 мкмоль на 1 г сухой массы (Fernández-Segura et al., 1999). Аналогичные данные получены на моноцитах человека при апоптозе, вызванном окисленными липопротеидами. В этом случае содержание K^+ снижалось с 616 до 291 мкмоль на 1 г сухой массы (Skepper et al., 1999). Снижение содержания K^+ от 416 до 216 мкмоль на 1 г сухой массы показано методом рентгеновского микроанализа при апоптозе клеток U937, вызванном стауроспорином (Arrebola et al., 2005b).

Ряд исследователей считают, что изменение концентрации K^+ во внутриклеточной воде изменяет при апоптозе состояние каспаз (Hughes et al., 1997; Hughes, Cidlowski, 1999). В наших опытах, проводившихся на клетках гистиоцитарной лимфомы человека U937, апоптоз которых вызывали стауроспорином, было установлено, что снижение содержания в клетках воды хорошо согласуется с параллельным уменьшением суммарного содержания K^+ и Na^+ , и снижение концентрации K^+ во внутриклеточной воде составляет при этом только 7—8 %. Вряд ли такое изменение может влиять на состояние каспаз или нуклеаз (Yurinskaya et al., 2005a).

Уменьшение концентрации K^+ в расчете на воду, сопровождающееся снижением суммарной концентрации K^+ и Na^+ , о котором говорится в работах с использованием флуоресцентных зондов, свидетельствует, по нашему мнению, о набухании клеток, а набухание клеток — это признак некроза, а не апоптоза (Кегг, 1971). Следует отметить, что при апоптозе, не сопровождающемся дегидратационным сжатием, как это происходит при апоптозе клеток U937, вызванном этопозидом, тоже наблюдаются существенные изменения соотношения K^+/Na^+ в клетке, но при неизменном суммарном содержании K^+ и Na^+ (Yurinskaya et al., 2005a). Показано, что изменение ионного состава клеток с помощью ионофоров (валиномицина, нигерицина и амфотерицина В) может индуцировать апоптоз у клеток разного типа (Inai et al., 1997; Oh et al., 1997; Furlong et al., 1998; Marklund et al., 2001).

Изменение внутриклеточного содержания и концентрации Na^+

Рост концентрации Na^+ во внутриклеточной воде от 15 до 30 мМ отмечали при апоптозе фибробластов мыши, индуцированном этопозидом. Измерения флуоресценции натриевого зонда (SBFI) в этой работе проводили в монослое клеток (Barbiero et al., 1995). Аналогичные данные получены тоже по флуоресценции SBFI, но методом проточной цитометрии на клетках Jurkat при апоптозе, индуцированном через Fas-рецептор (Bortner et al., 2001).

Увеличение содержания Na^+ от 52 до 197 мкмоль на 1 г сухой массы при апоптозе клеток U937, вызванном ультрафиолетовым облучением, показано с помощью рентгеновского микроанализа (Fernández-Segura et al., 1999). Тем же методом нашли, что у моноцитов человека при апоптозе, вызванном окисленными липопротеидами, содержание натрия увеличивается от 42 до 103 мкмоль на 1 г сухой массы (Skepper et al., 1999). Увеличение внутриклеточного содержания Na^+ от 63 до 143 параллельно с уменьшением содержания K^+ с 416 до 216 мкмоль на 1 г сухой массы показано с помощью рентгеновского микроанализа на клетках U937, апоптоз которых индуцировали стауроспорином (Arrebola et al., 2005b).

При анализе связи между изменением ионного состава и изменением водного баланса клетки существенны изменения не концентраций K^+ и Na^+ во внутриклеточной воде, а изменение их содержания. Решающую роль в том, состоится AVD или нет, играет соотношение между убылью содержания K^+ и ростом содержания Na^+ . Если уменьшение внутриклеточного содержания K^+ при апоптозе не покрывается увеличением содержания Na^+ , то суммарное содержание K^+ и Na^+ уменьшается и можно ожидать уменьшения объема клетки. По нашим данным, так и происходит. При апоптозе тимоцитов крысы, вызванном дексаметазоном, снижение внутриклеточного содержания K^+ составляло 0.49 ммоль на 1 г белка, а увеличение внутриклеточного содержания Na^+ — 0.25 ммоль на 1 г белка (Yurinskaya et al., 2005b). Апоптоз клеток U937 при 4-часовом действии стауроспорина также сопровождался снижением внутриклеточного содержания K^+ от 1.10 до 0.78 ммоль на 1 г белка и ростом содержания Na^+ от 0.30 до 0.34 ммоль на 1 г белка (Yurinskaya et al., 2005a). Во всех перечисленных случаях наблюдали AVD. По нашим данным, при апоптозе клеток U937, вызванном этопозидом, уменьшение содержания K^+ пере-

крывалось увеличением содержания Na^+ , суммарное содержание K^+ и Na^+ не изменялось и апоптозной дегидратации клеток не было (Yurinskaya et al., 2005a).

Изменение внутриклеточного содержания и концентрации Cl^- и P

Снижение содержания в клетке катионов должно сопровождаться снижением содержания анионов. Что это за анионы? На клетках U937, апоптоз которых был вызван стауроспорином, по данным рентгеновского микроанализа содержание Cl^- снижается от 143 до 103 ммоль на 1 кг сухой массы, а содержание P не изменяется (Arrebola et al., 2005b). При апоптозе этих клеток, вызванных ультрафиолетовым облучением, по данным той же группы исследователей, содержание Cl^- уменьшалось от 156 до 115 мкмоль, а содержание P составляло 299 и 314 мкмоль на 1 г сухой массы (Fernández-Segura et al., 1999). При апоптозе, вызванном окисленными липопротеидами, на моноцитах человека методом рентгеновского микроанализа показано снижение содержания Cl^- от 152 до 58, а P — от 672 до 465 мкмоль на 1 г сухой массы (Skepper et al., 1999). Содержание «не проникающих через клеточную мембрану» анионов, которое можно оценить по разности содержания в клетках катионов K^+ и Na^+ , и «проникающих» анионов Cl^- и $H_2PO_4^-$ при апоптозе либо не изменяется (Fernández-Segura et al., 1999), либо уменьшается (Skepper et al., 1999; Arrebola et al., 2005b).

Изменение внутриклеточного pH

Большинство исследователей отмечают подкисление цитоплазмы при апоптозе примерно на 0.3—0.4 ед. pH. Впервые это было показано на клетках HL60 (Barry, Eastman, 1992). Сводку данных по изменению величины внутриклеточного pH (pH_i) при апоптозе можно найти в обзоре Лагадик-Госсмана с сотрудниками (Lagadic-Gossmann et al., 2004). По данным Ланга с сотрудниками (Lang et al., 2000), в случае CD95-индуцированного апоптоза клеток Jurkat закисление внутриклеточной среды связано с ингибированием Na^+/H^+ -обмена. Аналогичные результаты получены для клеток Molt4, SEM и K562 (Rich et al., 2000).

Связано ли изменение pH_i при апоптозе с его сигнальными каскадами? Подкисление цитоплазмы наблюдали при рецепторной, митохондриальной и каспазозависимой индукции апоптоза. При рецепторном запуске апоптоза снижение pH наблюдали после активации каспаз. При митохондриальном запуске апоптоза закисление, по данным некоторых авторов, предшествует активации каспаз (Furlong et al., 1998; Matsuyama, Reed, 2000). Обнаружена pH-чувствительная эндонуклеаза, играющая, как полагают, важную роль во фрагментации ДНК (Barry, Eastman, 1993). С другой стороны, на клетках SEM было показано, что при апоптозе, вызванном дексаметазоном и этопозидом, подкисление несущественно для эффекторной стадии развития апоптоза. Максимум активности каспазы 3 достигался в этом случае при нейтральном pH (Benson et al., 1999). Некоторые авторы сообщают о раннем внутриклеточном подщелачивании, предшествующем активации каспаз и фрагментации ДНК, иногда с последующим подкислением (Belaud-Rotureau et al., 2000). Подводя итоги, отметим точку

зрения, согласно которой изменения рН_i не связаны с регуляцией апоптоза, а представляют собой сопутствующее явление (см. обзор: Shrode et al., 1997).

Изменение разности электрических потенциалов на клеточной мембране

Деполаризация клеток при апоптозе описана рядом авторов. Снижение мембранного потенциала при апоптозе тимоцитов, окрашенных потенциал-чувствительным красителем DiOC₆, наблюдали после изменения митохондриального мембранного потенциала; деполаризация наступала в присутствии тетрапентиламмония — блокатора K⁺-каналов (Dallaporta et al., 1999). Сообщалось об уменьшении разности потенциалов на плазматической мембране клеток Jurkat при Fas-индуцированном апоптозе и апоптозе, вызванном тапсигаргином (Bortner et al., 2001). Деполаризация, выявленная в этой работе по изменению флуоресценции DiBAC₄ с помощью проточной цитометрии клеток, предшествовала уменьшению объема клеток, которое определяли по малоугловому светорассеянию. Деполаризация мембраны, связанная, как полагают, с деградацией натриевого насоса, обнаружена путем электрических измерений на тимоцитах крысы, апоптоз которых вызывали глюкокортикоидами (Mann et al., 2001). Деполаризация в этом случае наступала одновременно с клеточным сжатием. Описана каспазозависимая деполаризация клеток MCF7 при апоптозе, индуцированном стауроспорином, которую авторы связывают с нарушением работы натриевого насоса (Düssmann et al., 2003). На клетках U937 при Fas- и As₂O₃-индуцированном апоптозе также наблюдали деполаризацию плазматической мембраны, причем в случае Fas-индукции деполаризация была каспазозависимой. Авторы предполагают, что существуют различные механизмы деполаризации на одних и тех же клетках в зависимости от типа индуктора (Nolte et al., 2004). Возможные механизмы деполаризации при апоптозе рассматриваются в обзоре Франко с сотрудниками (Franco et al., 2006). Необходимо отметить и случай, когда наблюдали связанную с апоптозом гиперполяризацию клеток (Zurgil et al., 2000), которая имела место при индуцированном дексаметазоном апоптозе тимоцитов мыши. В этом случае гиперполяризация предшествовала выходу фосфатидилсерина на поверхность плазматической мембраны и коррелировала с изменением малоуглового светорассеяния.

Механизмы изменения внутриклеточного ионного состава при апоптозе

Два фактора обуславливают характерное для всех клеток асимметричное распределение однозарядных ионов между цитоплазмой и средой: 1) наличие в плазматической мембране транспортеров, способных переносить ионы через мембрану против градиента их электрохимического потенциала за счет гидролиза АТФ или за счет движения через мембрану по градиенту каких-либо других ионов или незаряженных молекул (рис. 2); 2) наличие внутри клетки анионов, которые не способны выходить из нее в среду (см. обзоры: Веренинов, 1978; Hoffmann, 1987; Macknight, 1987; Sperelakis, 1997). На K⁺ приходится около 1/3 общей осмотической активности

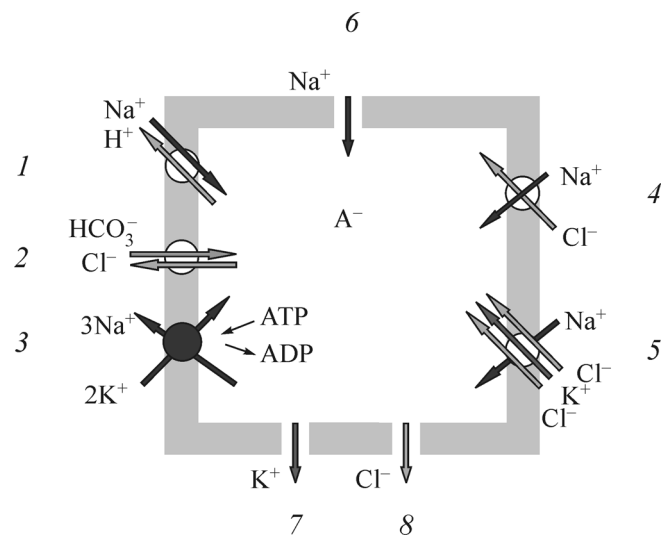


Рис. 2. Основные пути переноса однозарядных ионов через плазматическую мембрану (по: Hoffmann, 1987, с изменениями).

1 — Na⁺-H⁺-обмениватель, 2 — Cl⁻/HCO₃⁻-обмениватель, 3 — Na⁺,K⁺-АТФазный насос, 4 — Na⁺-Cl⁻-котранспортер, 5 — Na⁺,K⁺-2Cl⁻-котранспортер, 6 — натриевые каналы, 7 — калиевые каналы, 8 — хлорные каналы. А⁻-анионы, не проникающие через мембрану. Стрелки вверх указывают на движение ионов против градиента, стрелки вниз — на движение по градиенту электрохимического потенциала.

внутриклеточных компонентов. Содержание K⁺ в клетке зависит от содержания в ней непроникающих анионов и от состояния соответствующих трактов переноса K⁺ через клеточную мембрану. На распределение K⁺ влияет распределение других ионов, в частности Na⁺ и Cl⁻, которое в свою очередь зависит от состояния путей их переноса через мембрану. Каким образом при апоптозе изменяется работа вышеперечисленных трактов? Ниже приведены данные, характеризующие состояние основных из них, наиболее часто упоминающихся в связи с апоптозом.

Na⁺, K⁺-АТФаза играет ключевую роль в поддержании низкой концентрации в клетке Na⁺ и высокой концентрации K⁺. Ряд данных указывает на снижение активности насоса при апоптозе (см. обзор: Yu, 2003b). Дегградация обеих субъединиц натриевого насоса при апоптозе тимоцитов, вызванном дексаметазоном, показана методом иммуноблотинга (Mann et al., 2001). Дегградация каталитической и регуляторной субъединиц Na⁺, K⁺-АТФазы, уменьшение входного убаин-чувствительного потока Rb⁺ и проапоптотное действие убаина (ингибитора Na⁺, K⁺-АТФазы) при Fas-индукции показаны на клетках Jurkat (Bortner et al., 2001). Дегградация регуляторной субъединицы Na⁺, K⁺-АТФазного насоса показана при апоптозе клеток MCF7, индуцированном стауроспорином (Düssmann et al., 2003). Существенное уменьшение убаин-чувствительного входного потока Rb⁺ наблюдали при апоптозе клеток P31, вызванном амфотерицином В (Marklund et al., 2001). Рентгеновский микроанализ показал, что апоптоз клеток U937, вызванный стауроспорином, сопровождается снижением входного потока рубидия через натриевый насос (Arrebola et al., 2005a, 2005b). При CD95-индуцированном апоптозе клеток Jurkat были отмечены уменьшение числа сайтов связывания убаина и изменение константы связывания, что, по мнению ав-

торов, указывает на конформационные изменения соответствующей субъединицы натриевого насоса (Nobel et al., 2000). Описано уменьшение общего уровня АТФ в апоптотных клетках, которое, по мнению некоторых авторов, может быть причиной снижения активности насоса (Komatsu et al., 2000; Yang et al., 2002; Wang et al., 2003). В связи с этим необходимо отметить, что, по другим данным, на клетках HeLa, PC12 и U937 при апоптозе, вызванном стауроспорином, фактором TNF или этопозидом, уровень АТФ в цитозоле возрастает (Zamagaeva et al., 2005).

Большая группа работ посвящена исследованию влияния убаина на апоптоз. Результаты этих работ противоречивы. На трансфицированных клетках PW с повышенной экспрессией Bcl-2 показано увеличение активности Na^+ , K^+ -АТФазы, сопряженное с увеличением устойчивости к апоптозу. Эффект снимался ингибитором натриевого насоса убаином (Gilbert, Knox, 1997). Увеличение клеточного сжатия при действии убаина наблюдали при CD95-индуцированном апоптозе клеток Jurkat. Авторы пришли к выводу о том, что ингибирование Na^+ , K^+ -АТФазы способствует апоптотному уменьшению объема клетки (Nobel et al., 2000). Усиление апоптоза активированных лимфоцитов убаином наблюдали при Fas-индуцированном апоптозе (Esteves et al., 2005). Противоположный результат был получен при исследовании апоптоза, вызванного ультрафиолетовым облучением, на клетках HL60, у которых изменения содержания субъединиц Na^+ , K^+ -АТФазы не было. Инкубация клеток с убаином приводила к снижению числа клеток с уменьшенным объемом и уменьшению числа апоптотных тел по результатам проточной цитометрии (McCarthy, Cotter, 1997). Эти различия, возможно, обусловлены тем, что в одном случае имел место рецепторный, а в другом — митохондриальный механизм индукции апоптоза. По данным Орлова с сотрудниками (Orlov et al., 1999), при апоптозе гладкомышечных клеток убаин подавляет каспазную активность независимо от типа индуктора.

K^+ -каналы. Насчитывают по крайней мере 14 разновидностей K^+ -каналов, так или иначе причастных к апоптозу (см. обзоры: Yu, 2003a; Remillard, Yuan, 2004; Burg et al., 2006). Показано, что апоптоз может быть предотвращен блокированием K^+ -каналов. Так например, при апоптозе эозинофилов уменьшение размеров клеток ингибируется блокатором K^+ -каналов 4-аминопиридином (Beauvais et al., 1995).

При апоптозе, индуцированном через рецептор или действием стауроспорина, в клетках HeLa и U937 не наблюдали уменьшения клеточного объема в присутствии хинина и бария (Maeno et al., 2000). AVD лимфоцитов предотвращалось при блокировании кальций-чувствительных калиевых каналов хинином, клотримазолом или харибдотоксином (Elliot, Higgins, 2003).

Показано, что при апоптозе изменяется состояние K^+ -каналов (Lang et al., 2006). Увеличение интегральной проводимости калиевых каналов K_v наблюдали при индукции стауроспорином апоптоза гладкомышечных клеток (Ekhterae et al., 2001). Увеличение проводимости калиевых каналов maxi-K показано при апоптозе гладкомышечных клеток (Krick et al., 2001). На клетках Jurkat при Fas-индуцированном апоптозе наблюдали увеличенные активности каналов K_v 1.3 (Storey et al., 2003). Противоположный результат был получен при исследовании Fas- и керамидиндуцированного апоптоза на клетках Jur-

kat, у которых было обнаружено уменьшение интегральной проводимости каналов K_v 1.3 (Szabò et al., 1996; Gulbins et al., 1997). На основании компьютерного моделирования ионного и водного баланса клеток при апоптозе Верениновым с сотрудниками (2004б) было сделано заключение о том, что существенное уменьшение объема вследствие изменения интегральной проводимости K^+ -каналов возможно лишь в ограниченных условиях и только у клеток определенного типа.

Активацию потенциалзависимых Na^+ -каналов отмечали при апоптозе нейронов, вызванном кислородным голоданием (Banasiak et al., 2004). Ингибитор Na^+ -каналов сакситоксин предотвращал индуцированный через Fas-рецептор апоптоз клеток Jurkat (Bortner, Cidlowski, 2003). Показано влияние на уменьшение объема клеток при апоптозе активности Cl^- -каналов, играющих важную роль в реакции регуляторного изменения объема при гипотонии (Maeno et al., 2000). Выход Cl^- через каналы ORCC наблюдали при Fas-индуцированном апоптозе клеток Jurkat (Szabò et al., 1998). Активацию Cl^- -каналов VSOR наблюдали при апоптозе клеток HeLa, индуцированном стауроспорином, Fas или TNF (Shimizu et al., 2004). Активация тех же каналов отмечена при апоптозе кардиомиоцитов мыши (Wang et al., 2005; Okada et al., 2006).

Другие тракты. Имеются указания на то, что спонтанный апоптоз тимоцитов сопровождается активацией Na^+/H^+ -обменника, $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-/\text{CO}_3^{2-}$ -котранспортера и $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -обменника (Tsaao, Lei, 1996). Ингибирование Na^+/H^+ -обменника отмечено при апоптозе клеток Jurkat, Molt4, CEM и K562 (Lang et al., 2000; Rich et al., 2000). Ингибирование $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ -котранспортера показано на клетках P31, апоптоз которых индуцировали амфотерицином B (Marklund et al., 2001). Подводя итог разделу о механизмах изменения ионного состава при апоптозе, следует отметить, что уже ясно, что все перечисленные тракты могут изменять свою активность, но в какой последовательности это происходит и какова роль отдельных трактов в изменении ионного состава клеток при апоптозе, пока неясно.

Появляются работы, в которых исследуется динамика изменения ионного баланса, в частности изменение во времени внутриклеточной концентрации и содержания K^+ , Na^+ и Cl^- (Arrebola et al., 2006). По данным, полученным на клетках Jurkat, повышение внутриклеточной концентрации Na^+ является ранним событием и опережает AVD (Bortner, Cidlowski, 2003). На клетках U937 показано, что после 30 мин действия стауроспорина имеет место существенное уменьшение внутриклеточного содержания K^+ и Cl^- , а содержание Na^+ не изменяется (Arrebola et al., 2005a). Через 2 ч на фоне продолжающегося уменьшения содержания K^+ содержание Na^+ и Cl^- увеличивается, причем содержание Cl^- остается ниже, чем в контрольных клетках. Через 3 ч действия стауроспорина содержание Na^+ существенно увеличивалось, а содержание K^+ в это время не изменялось; через 5 ч содержание K^+ в клетках продолжало уменьшаться, а Na^+ и Cl^- увеличивалось (Arrebola et al., 2005a).

Заключение

Хотя сегодня еще трудно дать ответ на многие вопросы, касающиеся связи механизмов клеточного сжатия и индукции апоптоза, уже предпринимаются попыт-

ки обобщить имеющиеся данные в виде гипотетических схем (Krick et al., 2001; Platoshyn et al., 2002; см. обзоры: Yu, 2003a; Remillard, Yuan, 2004). Согласно одной из них (см. обзор: Yu, 2003a), индуктор апоптоза активирует K^+ -каналы. Открытие каналов приводит к гиперполяризации плазматической мембраны. Далее при участии факторов Bcl-2/Bid происходит набухание митохондрий, сопровождающееся их деполяризацией, снижается уровень АТФ и как следствие — изменяется работа Na^+ , K^+ -АТФазы, затем происходит деполяризация плазматической мембраны, сжатие клетки, выход цитохрома *c*, формирование апоптосомного комплекса и, наконец, деградация ДНК.

Обращает на себя внимание разнообразие форм и проявлений апоптоза, связанное, по-видимому, с разнообразием клеток и типов индуктора. Например, апоптоз клеток U937, вызванный этопозидом, не сопровождается дегидратационным сокращением объема, в то время как апоптоз, индуцированный на тех же клетках стаурополином, включает этот признак (Веренинов и др., 2004а). Можно полагать, что роль однозарядных ионов в апоптозе многообразна. Несомненно, что в апоптотической дегидратации клеток первостепенное значение имеет уменьшение содержания в клетке такого «мажорного» внутриклеточного осмотика, как K^+ (Веренинов и др., 2003, 2004а; Yurinskaya et al., 2005а, 2005b). Однако вряд ли роль ионной составляющей сводится только к этому.

В существующих представлениях о механизме апоптотической дегидратации клеток некоторые положения кажутся противоречивыми. Так, снижение активности Na^+ , K^+ -АТФазного насоса должно приводить к набуханию клетки, однако характерным признаком апоптоза является дегидратация клеток. Открывание K^+ -каналов должно приводить к гиперполяризации клеточной мембраны, но большинство исследователей наблюдали при апоптозе деполяризацию. В одной из недавних работ на основе анализа математической модели было высказано предположение о том, что дегидратация клеток при апоптозе, сопровождающаяся снижением внутриклеточного отношения K^+/Na^+ , деполяризацией клеточной мембраны и уменьшением потоков K^+ и Na^+ , обусловлена комбинацией снижения активности Na^+ , K^+ -АТФазного насоса и сокращения Na^+ -Cl⁻-симпорта либо открывания Cl⁻-каналов (Веренинов и др., 2006). В более поздней работе те же авторы на основании прямых измерений входных и выходных потоков ^{22}Na , Rb^+ и Li^+ у нормальных и апоптотических клеток U937 и математического моделирования баланса потоков пришли к заключению о том, что изменение ионного и водного баланса исследованных клеток обусловлено снижением активности Na^+ , K^+ -АТФазного насоса, сокращением Na^+ -Cl⁻-симпорта и снижением интегральной проводимости Na^+ -каналов (Vereninov et al., 2007).

Автор выражает глубокую благодарность А. А. Веренинову и В. Е. Юринской за руководство работой и помощь в подготовке статьи.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 06-04-48060 и 06-04-04000-ННИОа) и С.-Петербургского научного центра РАН (проект А. А. Веренинова).

Список литературы

- Веренинов А. А. 1978. Транспорт ионов через клеточную мембрану. Анализ потоков. Л.: Наука. 286 с.
- Веренинов А. А., Волгарева Е. В., Матвеев В. В., Мошков А. В., Розанов Ю. М., Широкова А. В., Юринская В. Е. 2003. Водный и ионный баланс тимоцитов крысы при апоптозе, вызванном дексаметазоном и этопозидом. Ионно-осмотическая модель уменьшения объема клетки. Цитология. 45 (5): 500—509.
- Веренинов А. А., Горячая В. В., Матвеев В. В., Мошков А. В., Розанов Ю. М., Сакута Г. А., Широкова А. В., Юринская В. Е. 2004а. Дегидратационное сокращение объема клеток при апоптозе — факультативный признак. Цитология. 46 (7): 609—619.
- Веренинов А. А., Юринская В. Е., Рубашкин А. А. 2004б. Роль калия, калиевых каналов и симпортеров в апоптотическом сокращении клеточного объема. Эксперимент и теория. Докл. РАН. 398 (4): 555—559.
- Веренинов А. А., Юринская В. Е., Рубашкин А. А. 2006. Апоптотическая дегидратация лимфоидных клеток: моделирование изменения баланса ионных потоков. Докл. РАН. 411 (6): 824—828.
- Aoki H., Kang P. M., Hampe J., Yoshimura K., Noma T., Matsuzaki M., Izumi S. 2002. Direct activation of mitochondrial apoptosis machinery by c-Jun N-terminal kinase in adult cardiac myocytes. J. Biol. Chem. 277: 10 244—10 250.
- Arrebola F., Cañizares J., Cubero M. A., Crespo P. V., Warley A., Fernández-Segura E. 2005a. Biphasic behavior of changes in elemental composition during staurosporine-induced apoptosis. Apoptosis. 10: 1317—1331.
- Arrebola F., Fernández-Segura E., Campos A., Crespo P. V., Skepper J. N., Warley A. 2006. Changes in intracellular electrolyte concentrations during apoptosis induced by UV irradiation of human myeloblastic cells. Amer. J. Physiol. Cell. Physiol. 290: C638—C649.
- Arrebola F., Zabiti S., Cañizares F. J., Cubero M. A., Crespo P. V., Fernández-Segura E. 2005b. Changes in intracellular sodium, chlorine, and potassium concentrations in staurosporine-induced apoptosis. J. Cell. Physiol. 204: 500—507.
- Banasiak K. J., Burenkova O., Haddad G. G. 2004. Activation of voltage-sensitive sodium channels during oxygen deprivation leads to apoptotic neuronal death. Neuroscience. 126: 31—44.
- Bar P. R. 1996. Apoptosis — the cell's silent exit. Life Sci. 59: 369—378.
- Barbiero G., Duranti F., Bonelli G., Amenta J. S., Baccino F. M. 1995. Intracellular ionic variations in the apoptotic death of L cells by inhibitors of cell cycle progression. Exp. Cell Res. 217: 410—418.
- Barry M. A., Eastman A. 1992. Endonuclease activation during apoptosis: the role of cytosolic Ca^{2+} and pH. Biochem. Biophys. Res. Commun. 186: 782—789.
- Barry M. A., Eastman A. 1993. Identification of deoxyribonuclease II as an endonuclease involved in apoptosis. Arch. Biochem. Biophys. 300: 440—450.
- Beauvais F., Michel L., Dubertret L. 1995. Human eosinophils in culture undergo a striking and rapid shrinkage during apoptosis. Role of K^+ channels. J. Leukoc. Biol. 57: 851—855.
- Bedner E., Li X., Kunicki J., Darzynkiewicz Z. 2000. Translocation of Bax to mitochondria during apoptosis measured by laser scanning cytometry. Cytometry. 41: 83—88.
- Beere H. M. 2004. «The stress of dying»: the role of heat shock proteins in the regulation of apoptosis. J. Cell Sci. 117: 2641—2651.
- Belaud-Rotureau M. A., Leducq N., Macouillard Poulletier D. G., Dirolez P., Lacoste L., Lacombe F., Bernard P., Belloc F. 2000. Early transitory rise in intracellular pH leads to Bax conformation change during ceramide-induced apoptosis. Apoptosis. 5: 551—560.
- Benson R. S., Dive C., Watson A. J. 1999. Cytoplasmic acidification is not an effector mechanism of VP16 or DEX-induced apoptosis in CEM T leukaemia cells. J. Cell Sci. 112 (Pt 11): 1755—1760.

- Benson R. S., Heer S., Dive C., Watson A. J. 1996. Characterization of cell volume loss in CEM-C7A cells during dexamethasone-induced apoptosis. *Amer. J. Physiol.* 270 : C1190—C1203.
- Bernardi P., Petronilli V., Di Lisa F., Forte M. 2001. A mitochondrial perspective on cell death. *Trends Biochem. Sci.* 26 : 112—117.
- Bortner C. D., Cidlowski J. A. 1999. Caspase independent/dependent regulation of K⁺, cell shrinkage, and mitochondrial membrane potential during lymphocyte apoptosis. *J. Biol. Chem.* 274 : 21 953—21 962.
- Bortner C. D., Cidlowski J. A. 2002. Apoptotic volume decrease and the incredible shrinking cell. *Cell Death Differ.* 9 : 1307—1310.
- Bortner C. D., Cidlowski J. A. 2003. Uncoupling cell shrinkage from apoptosis reveals that Na⁺ influx is required for volume loss during programmed cell death. *J. Biol. Chem.* 278 : 39 176—39 184.
- Bortner C. D., Gómez-Angelats M., Cidlowski J. A. 2001. Plasma membrane depolarization without repolarization is an early molecular event in anti-Fas-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* 276 : 4304—4314.
- Burg E. D., Remillard C. V., Yuan J. X. 2006. K⁺ channels in apoptosis. *J. Membr. Biol.* 209 : 3—20.
- Candé C., Cecconi F., Dessen P., Kroemer G. 2002. Apoptosis-inducing factor (AIF): key to the conserved caspase-independent pathways of cell death? *J. Cell Sci.* 115 : 4727—4734.
- Chang S. H., Phelps P. C., Berezsky I. K., Ebersberger M. L., jr., Trump B. F. 2000. Studies on the mechanisms and kinetics of apoptosis induced by microinjection of cytochrome *c* in rat kidney tubule epithelial cells (NRK-52E). *Amer. J. Pathol.* 156 : 637—649.
- Chen X., Ko L. J., Joyaraman L., Prives C. 1996. p53 levels, functional domains, and DNA damage determine the extent of the apoptotic response of tumor cells. *Genes Develop.* 10 : 2438—2451.
- Cohen G. M., Sun X. M., Snowden R. T., Ormerod M. G., Dinsdale D. 1993. Identification of a transitional preapoptotic population of thymocytes. *J. Immunol.* 151 : 566—574.
- Dallaporta B., Marchetti P., de Pablo M. A., Maise C., Duc H. T., Métivier D., Zamzani N., Geuskens M., Kroemer G. 1999. Plasma membrane potential in thymocyte apoptosis. *J. Immunol.* 162 : 6534—6542.
- Darzynkiewicz Z., Bedner E., Traganos F., Murakami T. 1998. Critical aspects in the analysis of apoptosis and necrosis. *Hum. Cell.* 11 : 3—12.
- Dumont C., Dürrbach A., Bidère N., Rouleau M., Kroemer G., Bernard G., Hirsch F., Charpentier B., Susin S. A., Senik A. 2000. Caspase-independent commitment phase to apoptosis in activated blood T lymphocytes: reversibility at low apoptotic insult. *Blood.* 96 : 1030—1038.
- Düssmann H., Rehm M., Kögel D., Prehn J. H. 2003. Outer mitochondrial membrane permeabilization during apoptosis triggers caspase-independent mitochondrial and caspase-dependent plasma membrane potential depolarization: a single-cell analysis. *J. Cell Sci.* 116 : 525—536.
- Earnshaw W. C., Martins L. M., Kaufmann S. H. 1999. Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu. Rev. Biochem.* 68 : 383—424.
- Ekhterae D., Platoshyn O., Krick S., Yu Y., McDaniel S. S., Yuan J. X. 2001. Bcl-2 decreases voltage-gated K⁺ channel activity and enhances survival in vascular smooth muscle cells. *Amer. J. Physiol. Cell. Physiol.* 281 : C157—C165.
- Elliott J. I., Higgins C. F. 2003. IKCa1 activity is required for cell shrinkage, phosphatidylserine translocation and death in T lymphocyte apoptosis. *EMBO Rep.* 4 : 189—194.
- Esteves M. B., Marques-Santos L. F., Affonso-Mitidieri O. R., Rumjanek V. M. 2005. Ouabain exacerbates activation-induced cell death in human peripheral blood lymphocytes. *Ann. Acad. Bras. Cienc.* 77 : 281—292.
- Fernández-Segura E., Cañizares F. J., Cubero M. A., Warley A., Campos A. 1999. Changes in elemental content during apoptotic cell death studied by electron probe X-ray microanalysis. *Exp. Cell Res.* 253 : 454—462.
- Franco R., Bortner C. D., Cidlowski J. A. 2006. Potential roles of electrogenic ion transport and plasma membrane depolarization in apoptosis. *J. Membr. Biol.* 209 : 43—58.
- Friis M. B., Friborg C. R., Schneider L., Nielsen M. B., Lambert I. H., Christensen S. T., Hoffmann E. K. 2005. Cell shrinkage as a signal to apoptosis in NIH 3T3 fibroblasts. *J. Physiol.* 567 : 427—443.
- Furlong I. J., Lopez M. C., Ascaso R., Lopez R. A., Colins M. K. 1998. Induction of apoptosis by valinomycin: mitochondrial permeability transition causes intracellular acidification. *Cell Death Differ.* 5 : 214—221.
- Chobrial I. M., Witzig T. E., Adjei A. A. 2005. Targeting apoptosis pathways in cancer therapy. *CA Cancer J. Clin.* 55 : 178—194.
- Gilbert M., Knox S. 1997. Influence of Bcl-2 overexpression on Na⁺,K⁺-ATPase pump activity: correlation with radiation-induced programmed cell death. *J. Cell. Physiol.* 171 : 299—304.
- Gómez-Angelats M., Bortner C. D., Cidlowski J. A. 2000. Protein kinase C (PKC) inhibits Fas receptor-induced apoptosis through modulation of the loss of K⁺ and cell shrinkage. A role for PKC upstream of caspases. *J. Biol. Chem.* 275 : 19 609—19 619.
- Green D. R., Reed J. C. 1998. Mitochondria and apoptosis. *Science.* 281 : 1309—1312.
- Gulbins E., Szabo I., Baltzer K., Lang F. 1997. Ceramide-induced inhibition of T lymphocyte voltage-gated potassium channel is mediated by tyrosine kinases. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 94 : 7661—7666.
- Häcker G. 2000. The morphology of apoptosis. *Cell Tissue Res.* 301 : 5—17.
- Haupt S., Berger M., Goldberg Z., Haupt Y. 2003. Apoptosis — the p53 network. *J. Cell Sci.* 116 : 4077—4085.
- Hengartner M. O. 2000. The biochemistry of apoptosis. *Nature.* 407 : 770—776.
- Ho P. K., Hawkins C. J. 2005. Mammalian initiator apoptotic caspases. *FEBS J.* 272 : 5436—5453.
- Hoffmann E. K., 1987. Volume regulation in cultured cells. In: Current topics in membranes and transport. San-Diego: Acad. Press. 30 : 125—180.
- Hughes F. M., jr., Bortner C. D., Purdy G. D., Cidlowski J. A. 1997. Intracellular K⁺ suppresses the activation of apoptosis in lymphocytes. *J. Biol. Chem.* 272 : 30 567—30 576.
- Hughes F. M., jr., Cidlowski J. A. 1999. Potassium is a critical regulator of apoptotic enzymes *in vitro* and *in vivo*. *Adv. Enzyme Regul.* 39 : 157—171.
- Inai Y., Yabuki M., Kanno T., Akiyama J., Yasuda T., Utsumi K. 1997. Valinomycin induces apoptosis of ascites hepatoma cells (AH-130) in relation to mitochondrial membrane potential. *Cell Struct. Funct.* 22 : 555—563.
- Janicke R. U., Ng P., Sprengart M. L., Porter A. G. 1998. Caspase-3 is required for alpha-fodrin cleavage but dispensable for cleavage of other death substrates in apoptosis. *J. Biol. Chem.* 273 : 15 540—15 545.
- Kaufmann S. H., Earnshaw W. C. 2000. Induction of apoptosis by cancer chemotherapy. *Exp. Cell Res.* 256 : 42—49.
- Kaufmann S. H., Hengartner M. O. 2001. Programmed cell death: alive and well in the new millennium. *Trends Cell Biol.* 11 : 526—534.
- Kerr J. F. 1971. Shrinkage necrosis: a distinct mode of cellular death. *J. Pathol.* 105 : 13—20.
- Komatsu N., Nakagawa M., Oda T., Muramatsu T. 2000. Depletion of intracellular NAD⁺ and ATP levels during ricin-induced apoptosis through the specific ribosomal inactivation results in the cytolysis of U937 cells. *J. Biochem. (Tokyo).* 128 : 463—470.
- Krick S., Platoshyn O., Sweeney M., Kim H., Yuan J. X. 2001. Activation of K⁺ channels induces apoptosis in vascular smooth muscle cells. *Amer. J. Physiol. Cell. Physiol.* 280 : C970—C979.
- Lagadic-Gossmann D., Huc L., Lecœur V. 2004. Alterations of intracellular pH homeostasis in apoptosis: origins and roles. *Cell Death Differ.* 11 : 953—961.

- Lang F., Madlung J., Bock J., Lukewille U., Kaltenbach S., Lang K. S., Belka C., Wagner C. A., Lang H. J., Gulbins E., Lepple-Wienhues A. 2000. Inhibition of Jurkat-T-lymphocyte Na⁺/H⁺-exchanger by CD95 (Fas/Apo-1)-receptor stimulation. *Pflugers Arch.* 440 : 902—907.
- Lang F., Shumilina E., Ritter M., Gulbins E., Vereninov A., Huber S. M. 2006. Ion channels and cell volume in regulation of cell proliferation and apoptotic cell death. *Contrib. Nephrol.* 152 : 142—160.
- Macknight A. D. C. 1987. Volume maintenance in isosmotic conditions. *Curr. Top. Membr. and Transp.* 30 : 3—43.
- Maeno E., Ishizaki Y., Kanaseki T., Hazama A., Okada Y. 2000. Normotonic cell shrinkage because of disordered volume regulations an early prerequisite to apoptosis. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 97 : 9487—9492.
- Mann C. L., Bortner C. D., Jewell C. M., Cidlowski J. A. 2001. Glucocorticoid-induced plasma membrane depolarization during thymocyte apoptosis: association with cell shrinkage and degradation of the Na⁺/K⁺-adenosine triphosphatase. *Endocrinology.* 142 : 5059—5068.
- Marklund L., Behnam-Motlagh P., Henriksson R., Grankvist K. 2001. Bumetanide annihilation of amphotericin B-induced apoptosis and cytotoxicity is due to its effect on cellular K⁺ flux. *J. Antimicrob. Chemother.* 48 : 781—786.
- Matsuyama S., Reed J. C. 2000. Mitochondria-dependent apoptosis and cellular pH regulation. *Cell Death Differ.* 7 : 1155—1165.
- McCarthy J. V., Cotter T. G. 1997. Cell shrinkage and apoptosis: a role for potassium and sodium ion efflux. *Cell Death Differ.* 4 : 756—770.
- Michea L., Combs C., Andrews P., Dmitrieva N., Burg M. B. 2002. Mitochondrial dysfunction is an early event in high-NaCl-induced apoptosis of mINCD3 cells. *Amer. J. Physiol. Renal Physiol.* 282 : F981—F990.
- Morales M. P., Galvez A., Eltit J. M., Ocaranza P., Diaz-Araya G., Lavandero S. 2000. IGF-1 regulates apoptosis of cardiac myocyte induced by osmotic-stress. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 270 : 1029—1035.
- Nagata S., Nagase H., Kawane K., Mukae N., Fukuyama H. 2003. Degradation of chromosomal DNA during apoptosis. *Cell Death Differ.* 10 : 108—116.
- Nobel C. S., Aronson J. K., van den Dobbelen D. J., Slater A. F. 2000. Inhibition of Na⁺/K⁺-ATPase may be one mechanism contributing to potassium efflux and cell shrinkage in CD95-induced apoptosis. *Apoptosis.* 5 : 153—163.
- Nolte F., Friedrich O., Rojewski M., Fink R. H., Schrezenmeier H., Korper S. 2004. Depolarization of the plasma membrane in the arsenic trioxide (As₂O₃)- and anti-CD95-induced apoptosis in myeloid cells. *FEBS Lett.* 578 : 85—89.
- Oh J. H., O'Malley K. L., Krajewski S., Reed J. C., Oh Y. J. 1997. Bax accelerates staurosporine-induced but suppresses nigericin-induced neuronal cell death. *Neuroreport.* 8 : 1851—1856.
- Okada Y., Maeno E., Shimizu T., Dezaki K., Wang J., Morishima S. 2001. Receptor-mediated control of regulatory volume decrease (RVD) and apoptotic volume decrease (AVD). *J. Physiol.* 532 : 3—16.
- Okada Y., Shimizu T., Maeno E., Tanabe S., Wang X., Takahashi N. 2006. Volume-sensitive chloride channels involved in apoptotic volume decrease and cell death. *J. Membr. Biol.* 209 : 21—29.
- Orlov S. N., Thorin-Trescases N., Kotelevtsev S. V., Tremblay J., Hamet P. 1999. Inversion of the intracellular Na⁺/K⁺ ratio blocks apoptosis in vascular smooth muscle at a site upstream of caspase-3. *J. Biol. Chem.* 274 : 16 545—16 552.
- Park I. S., Kim J. E. 2002. Potassium efflux during apoptosis. *J. Biochem. Mol. Biol.* 35 : 41—46.
- Platoshyn O., Zhang S., McDaniel S. S., Yuan J. X. 2002. Cytochrome c activates K⁺ channels before inducing apoptosis. *Amer. J. Physiol. Cell. Physiol.* 283 : C1298—C1305.
- Rao R., Hao C. M., Breyer M. D. 2004. Hypertonic stress activates glycogen synthase kinase 3beta-mediated apoptosis of renal medullary interstitial cells, suppressing an NFkappaB-driven cyclooxygenase-2-dependent survival pathway. *J. Biol. Chem.* 279 : 3949—3955.
- Reed J. C. 2000. Mechanisms of apoptosis. *Amer. J. Pathol.* 157 : 1415—1430.
- Remillard C. V., Yuan J. X. 2004. Activation of K⁺ channels: an essential pathway in programmed cell death. *Amer. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 286 : L49—L67.
- Rich I. N., Worthington-White D., Garden O. A., Musk P. 2000. Apoptosis of leukemic cells accompanies reduction in intracellular pH after targeted inhibition of the Na⁺/H⁺ exchanger. *Blood.* 95 : 1427—1434.
- Roy S., Nicholson D. W. 2000. Cross-talk in cell death signaling. *J. Exp. Med.* 192 : F21—F25.
- Savill J., Fadok V. 2000. Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature.* 407 : 784—788.
- Shapiro H. M. 1988. Practical flow cytometry. New York: Alan R. Liss, Inc. 353 p.
- Shimizu T., Numata T., Okada Y. 2004. A role of reactive oxygen species in apoptotic activation of volume-sensitive Cl⁻ channel. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 101 : 6770—6773.
- Shrode L. D., Tupper H., Grinstein S. 1997. Role of intracellular pH in proliferation, transformation, and apoptosis. *J. Bioenerg. Biomembr.* 29 : 393—399.
- Skepper J. N., Karydis I., Garnett M. R., Hegyi L., Hardwick S. J., Warley A., Mitchinson M. J., Cary N. R. 1999. Changes in elemental concentrations are associated with early stages of apoptosis in human monocyte-macrophages exposed to oxidized low-density lipoprotein: an X-ray microanalytical study. *J. Pathol.* 188 : 100—106.
- Sperelakis N. 1997. Cell physiology source book. San Diego: Acad. Press. 1095 p.
- Storey N. M., Gómez-Angelats M., Bortner C. D., Armstrong D. L., Cidlowski J. A. 2003. Stimulation of Kv1.3 potassium channels by death receptors during apoptosis in Jurkat T lymphocytes. *J. Biol. Chem.* 278 : 33 319—33 326.
- Susin S. A., Daugas E., Ravagnan L., Samejima K., Zamzami N., Loeffler M., Gostantini P., Ferri K. F., Irinopoulou T., Prévost M. C., Brothers G., Mak T. W., Penninger J., Earnshaw W. C., Kroemer G. 2000. Two distinct pathways leading to nuclear apoptosis. *J. Exp. Med.* 192 : 571—580.
- Szabó I., Gulbins E., Apfel H., Zhang X., Barth P., Busch A. E., Schlottmann K., Pongs O., Lang F. 1996. Tyrosine phosphorylation-dependent suppression of a voltage-gated K⁺ channel in T lymphocytes upon Fas stimulation. *J. Biol. Chem.* 271 : 20 465—20 469.
- Szabó I., Lepple-Wienhues A., Kaba K. N., Zoratti M., Gulbins E., Lang F. 1998. Tyrosine kinase-dependent activation of a chloride channel in CD95-induced apoptosis in T lymphocytes. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 95 : 6169—6174.
- Tang D., Kidd V. J. 1998. Cleavage of DFF-45/ICAD by multiple caspases is essential for its function during apoptosis. *J. Biol. Chem.* 273 : 28 549—28 552.
- Thomas N., Bell P. A. 1981. Glucocorticoid-induced cell-size changes and nuclear fragility in rat thymocytes. *Mol. Cell. Endocrinol.* 22 : 71—84.
- Tsao N., Lei H. Y. 1996. Activation of the Na⁺/H⁺ antiporter, Na⁺/HCO₃⁻/CO₃²⁻ cotransporter, or Cl⁻/HCO₃⁻ exchanger in spontaneous thymocyte apoptosis. *J. Immunol.* 157 : 1107—1116.
- Vereninov A. A., Goryachaya T. S., Moshkov A. V., Vassilieva I. O., Yurinskaya V. E., Lang F., Rubashkin A. A. 2007. Analysis of the monovalent ion fluxes in U937 cells under the balanced ion distribution: recognition of ion transporters responsible for changes in cell ion and water balance during apoptosis. *Cell Biol. Int.* 31 : doi. 1016/J. Cell. Biol. 01.023.
- Vermeulen K., Van Bockstaele D. R., Berneman Z. N. 2005. Apoptosis: mechanisms and relevance in cancer. *Ann. Hematol.* 84 : 627—639.
- Vu C. C., Bortner C. D., Cidlowski J. A. 2001. Differential involvement of initiator caspases in apoptotic volume decrease and potassium efflux during Fas- and UV-induced cell death. *J. Biol. Chem.* 276 : 37 602—37 611.
- Wang X., Takahashi N., Uramoto H., Okada Y. 2005. Chloride channel inhibition prevents ROS-dependent apoptosis induced by

ischemia-reperfusion in mouse cardiomyocytes. *Cell. Physiol. Biochem.* 16 : 147—154.

Wang X. Q., Xiao A. Y., Sheline C., Hyrc K., Yang A., Goldberg M. P., Choi D. W., Yu S. P. 2003. Apoptotic insults impair Na⁺,K⁺-ATPase activity as a mechanism of neuronal death mediated by concurrent ATP deficiency and oxidant stress. *J. Cell Sci.* 116 : 2099—2110.

Wyllie A. H., Morris R. G. 1982. Hormone-induced cell death. Purification and properties of thymocytes undergoing apoptosis after glucocorticoid treatment. *Amer. J. Pathol.* 109 : 78—87.

Yang N. C., Jeng K. C., Ho W. M., Hu M. L. 2002. ATP depletion is an important factor in DHEA-induced growth inhibition and apoptosis in BV-2 cells. *Life Sci.* 70 : 1979—1988.

Yu S. P. 2003a. Regulation and critical role of potassium homeostasis in apoptosis. *Prog. Neurobiol.* 70 : 363—386.

Yu S. P. 2003b. Na⁺,K⁺-ATPase: the new face of an old player in pathogenesis and apoptotic/hybrid cell death. *Biochem. Pharmacol.* 66 : 1601—1609.

Yurinskaya V., Goryachaya T., Guzhova I., Moshkov A., Rozanov Y., Sakuta G., Shirokova A., Shumilina E., Vassilieva I., Lang F., Vereninov A. 2005a. Potassium and sodium balance in

U937 cells during apoptosis with and without cell shrinkage. *Cell. Physiol. Biochem.* 16 : 155—162.

Yurinskaya V. E., Moshkov A. V., Rozanov Y. M., Shirokova A. V., Vassilieva I. O., Shumilina E. V., Lang F., Volgareva E. V., Vereninov A. A. 2005b. Thymocyte K⁺, Na⁺ and water balance during dexamethasone- and etoposide-induced apoptosis. *Cell. Physiol. Biochem.* 16 : 15—22.

Zamaraeva M. V., Sabirov R. Z., Maeno E., Ando-Akatsuka Y., Bessonova S. V., Okada Y. 2005. Cells die with increased cytosolic ATP during apoptosis: a bioluminescence study with intracellular luciferase. *Cell Death Differ.* 12 : 1390—1397.

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

Zurgil N., Schiffer Z., Shafran Y., Kaufman M., Deutsch M. 2000. Fluorescein fluorescence hyperpolarization as an early kinetic measure of the apoptotic process. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 268 : 155—163.

Поступила 20 IX 2006

APOPTOSIS. SIGNALING NETWORK AND CHANGES OF CELL ION AND WATER BALANCE

A. V. Shirokova

Institute of Cytology RAS, St. Petersburg;
e-mail: veren@mail.cytspb.rssi.ru, annashirokova@hotmail.com

The review focuses on the shift of the monovalent ion balance, pH, and the membrane potential during apoptosis with respect to the ionic mechanism of apoptotic cell shrinkage. As an introduction the current views on the main signaling network, involved in the induction of apoptosis, i. e. receptor and mitochondrial pathways of caspase cascade activation and a caspase-independent induction of apoptosis are considered. The review summarizes the recent data on alteration of ion transporters and channels of the plasma membrane during apoptosis.

Key words: apoptosis, ion and water balance, apoptotic ion regulation.