ПЕРМЕАБИЛИЗАЦИЯ ЛИЗОСОМНЫХ МЕМБРАН КАК АПОПТОГЕННЫЙ ФАКТОР

© *А. Б. Пупышев*

Новосибирский государственный медицинский университет;
электронный адрес: apupyshev@mail.ru

Представленный обзор литературы посвящен роли пермеабилизации мембран лизосом в процессе апоптоза. Рассмотрены лабилизирующие мембраны воздействия (в том числе действия белков семейства Bcl-2, LAPF, p53) и мембраностабилизирующие факторы (включая белок Hsp70), а также возможность прижизненной оценки пермеабилизации лизосомных мембран. Сделана попытка проанализировать новые данные о дифференциальной проницаемости мембран лизосом и оценить связь между повреждениями этих мембран и инициацией апоптоза. Подробно описан сигнальный эффект пермеабилизации лизосомных мембран, обусловленный преимущественно высвобождением в цитозоль катепсинов B и D. Особое внимание уделено последующим множественным путям апоптогенной сигнализации, включающим в себя «протеолитическую атаку» и активацию сигнальных цитозольных белков, митохондрий, прокаспаз, клеточного ядра. В отличие от активации каспазного каскада вследствие пермеабилизации мембраны митохондрий высвобождение лизосомных ферментов может запускать как каспазозависимый, так и каспазонезависимый пути апоптоза.

Ключевые слова: апоптоз, катепсин B, катепсин D, лизосомы, некроз, пермеабилизация лизосомных мембран.

Принятые сокращения: АО — акридиновый оранжевый, ПЛМ — пермеабилизация лизосомных мембран, ПММ — пермеабилизация митохондриальных мембран, РФК — реактивные формы кислорода, JNK — c-Jun N-концевые киназы, TRAIL — родственный ТНФ апоптозиндуцирующий лиганд.

Внутриклеточное освобождение лизосомных ферментов (всего около 70 различных ферментов) представляет интерес в силу их высокого гидролитического потенциала и широкого спектра действия. Лабилизацию мембран лизосом обычно рассматривали как негативное явление, отражающее распад лизосом, и часто — как показатель воспалительного процесса, нередко сопряженного с некрозом клеток (Покровский, Тутельян, 1976; Ferri, Kroemer, 2001; Terman et al., 2006b). Однако не удавалось установить патологически значимые границы лабилизации, и, кроме того, лабилизация нередко отмечалась при визуализации морфологически интактных лизосом, поэтому интерес к повреждению лизосом угас к концу 1980-х годов.

В настоящее время прижизненная пермеабилизация (достижение проницаемости) лизосомных мембран (ПЛМ) снова активно изучается по причине открытия взаимосвязи между освобождаемыми лизосомными ферментами и запуском процессов гибели клетки, в частности апоптоза. Во многих работах по моделированию апоптоза обнаружена ранняя утечка в цитозоль лизосомных ферментов, в первую очередь катепсинов, при этом морфологически лизосомы могут выглядеть интактными. Удалось показать, что ингибирование высвобождаемых лизосомных катепсинов или их генетически опосредованная инактивация существенным образом тормозит некоторые пути апоптоза (Stoka et al., 2007; Benes et al., 2008).

Мишенями лизосомных катепсинов в разных ситуациях являются сигнальные цитозольные белки, прокаспазы, митохондрии и ядро клетки (Broker et al., 2005; Terman et al., 2006b). Активно исследуются возможность специфического расщепления и активации сигнальных пептидов апоптоза лизосомными катепсинами, а также связь окислительного стресса с лабилизацией мембран лизосом. Так, показано, что слабый окислительный стресс, вызывающий ограниченное повреждение лизосом, может индуцировать апоптоз, тогда как выраженное повреждение лизосом приводило к некрозу (Brunk et al., 2001).

Интерес представляют новые данные о последовательности внутриклеточных событий, связанных с вовлечением лизосом в апоптоз, факторах пермеабилизации лизосомной мембраны, механизмах «утечки» лизосомных гидролаз в цитозоль, гидролитической и сигнальной роли высвобождающихся лизосомных ферментов при индукции апоптоза.

Прижизненная пермеабилизация лизосомных мембран

В интактных клетках лизосомные ферменты находятся в латентном состоянии, обусловленном изоляцией их от цитозоля посредством лизосомной мембраны. При различных повреждающих мембраны воздействиях происходит проникновение низкомолекулярных внелизосомных субстратов в лизосомы, растет скорость их гидролиза, и при дальнейшем повреждении мембран лизосомные ферменты могут высвобождаться из лизосом и атаковать внелизосомные структуры.

Таблица 1

Выявление прижизненной лабилизации лизосомных мембран

Детектор	Способ выявления	Литературный источник
Акридиновый оранжевый	Потеря красной флуоресценции лизосом (или прирост зеленой флуоресценции цитозоля)	Zdolsek et al., 1990, 1993; Antunes et al., 2001
Нейтральный красный	Потеря красной окраски лизосом	Zang et al., 2001
Детекторы серии Lysotrackers (желтые, красные, синие, зеленые)	Потеря гранулярной флуоресценции	Kagedal et al., 2001b; De Milito et al., 2007
ФИТЦ-декстран	Потеря зеленой флуоресценции лизосом	Bidere et al., 2003; Thibodeau et al., 2004
Флуоресцентные антитела к лизосомным ферментам	Иммунофлуоресценция	Boya et al., 2003a, 2003b
Иммуноферментное выявление	Иммуноблотинг субклеточной фракции цитозоля (с ограничениями)	Michallet et al., 2004
Непроникающие субстраты и ингибиторы лизосомных ферментов (zFR-aminotrifluoromethyl-coumarin, pepstatin-BODIPY)	Флуоресцентная микроскопия продуктов и лигандов в цитозоле и лизосомах	Yiu et al., 2005; Groth-Pedersen et al., 2007; Baumgartner et al., 2007
Генетически опосредованная конъюгация катепсинов с зеленым флуоресцирующим белком GFP	Зеленая флуоресценция белка	Werneburg et al., 2004, 2007

Биохимические подходы выявили два вида доступной (нелатентной) активности ферментов — свободную и неседиментируемую. Первая является совокупностью активности фермента, содержащегося в среде и цитозоле, сорбированного на мембранах и частично доступного субстрату через возможные локальные повреждения лизосомной мембраны. Вторая представляет собой активность фермента, выявляемую в неседиментируемой субклеточной фракции (цитозоле).

Признаки повреждения лизосом наблюдаются при огромном разнообразии воздействий на клетки и организм. Уже в 60-е годы прошлого века возник вопрос о соответствии данных на гомогенатах клеток и органов с внутриклеточной ситуацией. Оценка эффекта гомогенизации печени на величину свободной активности лизосомных ферментов при моделировании индукции вторичных лизосом глюкагоном (Deter, De Duve, 1967) показала, что рост свободной активности ферментов может отражать увеличение относительного содержания крупных и ломких вторичных лизосом, способных разрушаться преимущественно во время процедуры гомогенизации (Пупышев, Короленко, 1987). Присутствие цитолитических процессов, однако, затрудняло трактовку данных о свободной активности.

Тем не менее функциональная связь между дестабилизацией лизосомных мембран в клетке и гидролизом внелизосомных клеточных субстратов, по-видимому, существует. Так, при повреждении фенантреном лизосом клеток пищеварительных желез моллюсков следили за расщеплением цитозольных белков, меченных радиоактивностью. Обнаружена прямая зависимость между контактом цитозольных белков с лизосомными ферментами и их гидролизом по мере роста свободной активности ферментов (Moore, Viarengo, 1987).

Изучение прижизненной целостности мембран лизосом чаще всего проводят с помощью лизосомотропных красителей (табл. 1). В первую очередь это акридиновый оранжевый (АО), являющийся метахроматическим флуорохромом (pKa 10). АО характеризуется красной флуоресценцией при высоких концентрациях (в частности, в лизосомах) и зеленой при низких концентрациях (в цитозоле и ядре). В клетках, обработанных АО, обычно видна гранулярная красная флуоресценция, а после ПЛМ выявляется диффузное зеленое свечение (Zdolsek et al., 1990; Antunes et al., 2001). Более того, утечка красителя видна по приросту зеленой флуоресценции в цитозоле (Zdolsek et al., 1990; Zdolsek, Svensson, 1993). АО может использоваться также и для цитофотометрии клеток в потоке (Michallet et al., 2004; De Milito et al., 2007). Аналогичным способом используются и другие лизосомотропные флуорохромы, в частности красители серии Lysotracker (De Milito et al., 2007). В результате ПЛМ клетки теряют наблюдаемую с помощью этих красителей зернистость цитоплазмы, соответствующую локализации лизосом, и слабо флуоресцируют в потоковой цитофотометрии (Boya et al., 2003b).

Возможна идентификация ПЛМ световой микроскопией нейтрального красного, имеющего характерную окраску в кислой среде лизосом (Zang et al., 2001).

Повреждение мембран лизосом можно также обнаружить с помощью нагрузки лизосом ФИТЦ-декстраном (Thibodeau et al., 2004) по его зеленой флуоресценции в кислой среде. При этом с помощью флуоресцентных декстранов возрастающей полимерности удается следить за размером образующихся пор в лизосомной мембране, через которые маркер высвобождается в цитозоль (Bidere et al., 2003).

Активно применяются иммунофлуоресцентные и иммуноцитохимические методы с использованием антител к лизосомным ферментам, позволяющим оценить транслокацию белковых молекул из лизосом в цитозоль. Так, с помощью антител к катепсинам B и D выявляют гранулярные структуры цитоплазмы, которые содержат также и характерные белки лизосомной мембраны, такие как мембранные белки, ассоциированные с лизосомами, LAMP1 и LAMP2 (Fehrenbacher et al., 2008). После ПЛМ антитела к катепсинам B и D распределяются диффузно по всей клетке. Эта транслокация видна также в неседиментируемой субклеточной фракции (цитозоле) по приросту содержания катепсинов, выявляемых методом иммуноблотинга (Michallet et al., 2004), или по их активности по отношению к специфическим субстратам

(Groth-Pedersen et al., 2007). Успешно применяется также специфически связывающийся с катепсином D флуоресцентный пепстатин-BODIPY, не проникающий через лизосомную мембрану (Yin et al., 2005).

Наконец, ПЛМ видна при трансфекции клеток сшитыми полинуклеотидными конструкциями, кодирующими катепсины и спаренные с ними флуоресцентные белки (Werneburg et al., 2002, 2007; Broker et al., 2005). Важно отметить, что в настоящее время расширяется спектр кодируемых флуресцентных белков различного цвета.

Таким образом, набор методов слежения за ПЛМ достаточно широк. Важно подчеркнуть, что выявление прижизненной ПЛМ с помощью лизосомотропных красителей и регистрации освобождения лизосомных ферментов обычно дает согласованную информацию, т. е. высвобождение красителей коррелирует с транслокацией лизосомных ферментов в цитозоль (Brunk et al., 1995), несмотря на некоторые исключения (Ollinger, Brunk, 1995). В отношении лизосомных ферментов наиболее часто исследуют транслокацию катепсинов, что обусловлено особым интересом к их сигнальной роли в инициации апоптоза.

Индукторы пермеабилизации лизосомных мембран

Наиболее распространенным и изученным фактором повреждения лизосом является активация перекисного окисления липидов, запускаемая образованием реактивных форм кислорода (РФК), короткоживущих свободных радикалов (Terman et al., 2006b) (табл. 2). В лизосомах образование свободных радикалов может происходить по механизму реакций Фентона, катализироваться из перекиси водорода с участием Fe^{2+} в кислой среде в присутствии восстановленного цистеина (Terman et al., 2006b). Предварительная нагрузка лизосом Fe^{2+} активирует повреждение мембран лизосом, а его связывание хелатами (деферриоксамином или дифенилен йодониумом) препятствует лабилизации мембран (Persson, 2005; Kurz et al., 2006). Способностью индуцировать гибельную для клетки липидпероксидацию обладают многие субстраты, например бактерии, фагоцитируемые нейтрофилами (Blomgran et al., 2007), частицы кремния (Shen et al., 2001), ингибитор протонной помпы омепразол, эффект которого отменяется антиоксидантом N-ацетил-цистеином (De Milito et al., 2007), и др.

Повреждающее действие на мембрану оказывает сфинголипид сфингозин, обладающий свойствами липофильного слабого основания и поверхностно-активного соединения (Kagedal et al., 2001b). Эктопический сфингозин в низких дозах способен вызывать гибель клеток, сопровождающуюся ПЛМ, пермеабилизацией мембран митохондрий (ПММ), активацией каспаз, а в высоких дозах вызывает обширное разрушение лизосом и некроз клеток (Kagedal et al., 2001b). Индукцию наработки эндогенного сфингозина с последующей гибелью клеток можно наблюдать в печени при воздействии ТНФ-α (Werneburg et al., 2002).

Способностью вызывать ПЛМ обладают фосфолипаза A2 (Zhao et al., 2001a) и продукты ее активности лизофосфатидилхолин (лизолецитин) (Hu et al., 2007), а также свободные жирные кислоты (Feldstein et al., 2006; Li et al., 2008). Однако есть данные о том, что для жирных кислот возможен и опосредованный эффект, связанный с участием белка Bax, поскольку если при воздействии метилпальмитата на гепатоциты с геномом $Bax^{+/+}$ наблюдалась относительная чувствительность лизосом к повреждению, то с геномом $Bax^{-/-}$ лизосомы проявляли устойчивость (Feldstein et al., 2006). Аналогичным образом цитозольная фосфолипаза C способна повреждать лизосомы гепатоцитов, при этом пермеабилизующий эффект зависел от концентрации Ca^{2+} (Zhao et al., 2005b).

ПЛМ клеток печени и последующий апоптоз вызываются также солями желчных кислот (в частности, гликохендезоксихолатом), обладающими поверхностно-активными свойствами (Roberts et al., 1997).

Лабилизирующий эффект на мембрану обнаружен у окисленных продуктов холестерина при их поглощении макрофагами (Yuan et al., 2000). Подобным действием обладают и окисленные липопротеины низкой плотности (Li et al., 1998). Лабилизация лизосом предотвращалась предварительной нагрузкой клеток деферриоксамином, связывающим Fe^{2+}, что указывает на вероятную окислительную природу повреждения мембран (Li et al., 1998; Li, Yuan, 2004).

Прижизненное разрушение лизосом достигается трансмембранным проникновением и последующим накоплением синтезированных лизосомотропных детергентов, обладающих свойствами слабых оснований (MSDH, N-додецил-имидазол) (Miller et al., 1983; Li et al., 2000). При этом вызываемое ими ограниченное повреждение лизосом приводит к апоптозу, выраженное — к некрозу. Подобные повреждающие мембрану свойства выявлены и у амфифильного амина сирамесина (Ostenfeld et al., 2005).

Избирательную ПЛМ клеток вызывают некоторые производные олигопептидов, в частности метиловый эфир L-лейцил-L-лейцина (Cirman et al., 2004).

Некоторые токсины животных ядов, являющиеся часто неферментными пептидами, оказывают быстрое повреждающее мембраны действие. Так, кротамин из яда гремучей змеи быстро интернализуется клетками CHO-K1 и уже через 5 мин оказывается в лизосомах в токсической концентрации, вызывая повреждения лизосом, сопровождающиеся освобождением катепсинов и активацией каспаз (Hayashi et al., 2008).

Распространенная модель лабилизации мембран лизосом фотоповреждением в присутствии лизосомотропных фотосенсибилизаторов, по-видимому, сопровождается индукцией РФК (Xue et al., 2003; Ichinose et al., 2006). Подобным эффектом обладают и некоторые лизосомотропные красители (AO и нейтральный красный) (Zdolsek et al., 1990; Yao, Zhang, 1997).

В последнее время выявлено участие в индукции ПЛМ некоторых белковых медиаторов апоптоза. Так, в меланоцитах человека при действии ультрафиолета показана JNK-зависимая регуляция ПЛМ при участии белка Bim (Bivik, Ollinger, 2008). Подобно этому в клетках холангиокарциномы и гепатомы человека TRAIL-индуцированная гибель клеток включала JNK-зависимую активацию Bim, которая в свою очередь определяла последующую ПЛМ (Werneburg et al., 2007). Поскольку Bim не обладает пермеабилизующими свойствами, эту способность в отношении лизосом искали у белков Bax и Bak, зависимых от Bim и участвующих в ПММ. Используя известный подход визуализации зеленого флуоресцентного химерного белка GFP-Bax, выявили, что активированный Bax может переноситься к лизосомам и вызывать ПЛМ аналогично его действию на митохондрии. Эти результаты согласуются с другими исследованиями, где показано, что Bax способен вызывать ПЛМ при непосредственном

Таблица 2

Факторы повреждения мембран лизосом

Общая характеристика	Название индуктора	Механизм действия	Литературный источник
Реактивные формы кислорода и их индукторы	H_2O_2 (в присутствии Fe^{2+}), нафтазарин, редокс-активные хиноны, кремний	Образование РФК, перекисное окисление липидов мембран	Zdolsek, Svensson, 1993; Shen et al., 2001; Yu et al., 2003; Terman et al., 2006b
Агенты, генерирующие фотоиндуцируемое повреждение мембран	Акридиновый оранжевый, метиленовый синий, NPe6, ATXs10	Возможно, через образование РФК	Zdolsek et al., 1990; Yao, Zhang, 1996; Xue et al., 2003; Ichinose et al., 2006
Лизосомотропные (слабоосновные) детергенты	О-метил-серин-додециламид-гидрохлорид (MSDH), сирамесин, N-додецил-имидазол	Поверхностно-активное действие	Miller et al., 1983; Li et al., 2000; Ostenfeld et al., 2008
Лизосомотропные амины	Хлорохин, оксихлорохин, 3-аминопропанал	Возможно, через блок тиолов мембранной протонной помпы и генерацию РФК	Boya et al., 2003a; Li et al., 2003; Michihara et al., 2005
Окисленные липиды	7β-окси-холестерин, окси-ЛПНП	Возможно, за счет генерации РФК	Li et al., 1998; Yuan et al., 2000
Поверхностно-активные (амфифильные) липиды	Свободные жирные кислоты, желчные кислоты, лизолецитин, сфингозин	Поверхностно-активное действие	Roberts et al., 1997; Kagedal et al., 2001b; Feldstein et al., 2006; Paris et al., 2007; Hu et al., 2007
Фосфолипазы	Фосфолипазы A2 и C	Образование поверхностно-активных липидов	Zhao et al., 2001a, 2001b; Zhao et al., 2005b
Токсины	Крототоксин, йесотоксин, пиоцианин		Malagoli et al., 2006; Yan et al., 2006; Prince et al., 2008
Эфиры олигопептидов	L-лейцил-L-лейцин-метиловый эфир	Возможно, через поверхностно-активное действие и осмотическое повреждение	Cirman et al., 2004; Droga-Mazovec et al., 2008
Ингибиторы вакуолярной помпы	Бафиломицин A омепразол	Блок транслокации протонов, осмотическое набухание лизосом; возможно, через генерацию РФК	Nakashima et al., 2003; De Milito et al., 2007
Ингибиторы микротрубочек	Винбластин, винкристин, винорелбин		Grouth-Pedersen et al., 2007
Тропные к лизосомам цитозольные белки	LAFP, p53	Возможно, за счет образования пор	Yuan et al., 2002; Chen et al., 2005; Li et al., 2007
Белки семейства Bcl-2	Белок Bax во взаимодействии с белками «BH3-only»	То же	Guicciardi et al., 2005; Feldstein et al., 2006; Werneburg et al., 2007

воздействии на лизосомы (Kagedal et al., 2005; Feldstein et al., 2006). По-видимому, в клетке Bax при посредничестве Bim может перемещаться также и к лизосомам и вызывать ПЛМ.

Все больше литературных данных посвящено тому, что мембраны лизосом подвержены повреждающему действию ряда клеточных протеиназ. Кроме транслоцирующихся в цитозоль катепсинов (Werneburg et al., 2002) этой способностью обладают и цитозольные протеиназы кальпаины (Yap et al., 2006; Cheung et al., 2007), и, по некоторым данным, каспазы (Gyrd-Hansen et al., 2006). Атака лизосом внутриклеточными агентами важна в плане индукции апоптоза путем сигнализации с клеточной поверхности (в частности, посредством «рецепторов гибели»), как это происходит в случае действия ТНФ-α, лиганда Fas/APO-1/CD95 или TRAIL. Для ТНФ-α обнаружена активация нейтральной мембранно-связанной сфингомиелиназы, нарабатывающей церамид, который далее под действием церамидазы расщепляется до сфингозина, обладающего лабилизирующими мембраны свойствами (Guicciardi et al., 2004). Аналогичный эффект оказывает и активация кислой сфингомиелиназы. Другой вариант «внешней» индукции ПЛМ обнаружен в эмбриональных фибробластах мыши и связан с последовательной активацией каспазы-8 и каспазы-9, которая в свою очередь выполняет сигнальную роль активатора «эффекторных» каспаз и обусловливает повреждение мембран лизосом (Gyrd-Hansen et al., 2006).

Показано, что раннюю ПЛМ вызывает также белок p53, участвующий в ПММ и вместе с тем тропный к мембранам лизосом (Yuan et al., 2002). Этому способствует белок LAPF из семейства фафинов (Chen et al., 2005), характеризующийся как белок-адаптор, способный ассоциироваться с фосфорилированной формой p53, осуществляющий перемещение комплекса к мембранам лизосом, связывание с ними и индукцию ПЛМ (Li et al., 2007). Предполагается, что здесь возможен механизм образования мембранных пор, проницаемых для лизосомных ферментов.

В целом мы представили далеко не весь спектр индукторов ПЛМ, но среди основных факторов повреждения лизосом можно выделить индукцию РФК и липидпероксидации, внутрилизосомное и внутримембранное образование или накопление поверхностно-активных продуктов и гидролитическую атаку ферментов на лизосомные мембраны. Молекулярные процессы, лежащие в

Таблица 3

Факторы стабилизации лизосомных мембран

Общая характеристика	Агент	Мишень	Литературный источник
Антиоксиданты	α-Токоферол, восстановленный глутатион, аскорбиновая кислота, каталаза, супероксиддисмутаза, N-ацетилцистеин	Удаление свободных радикалов	Bivik, Ollinger, 2008; De Milito et al., 2007; Roussi et al., 2007
Хелаторы редокс-активного железа	Деферриоксамин, апоферритин, α-липоевая кислота	Связывание окислительно-активного железа	Kurz et al., 2006; Persson et al., 2003
Ингибиторы фосфолипаз	4-бромфенацилбромид, D609	Фосфолипаза A2	Zhao et al., 2001a, 2001b; Marchi et al., 2004; Zhao et al., 2005b
Ингибиторы нейтральной сфингомиелиназы	3-*o*-метил-сфингомиелин, дезипрамин	Ингибирование образования церамида	Caruso et al., 2005; Liu et al., 2004
Шапероны, белки-ассистенты	Белки семейства Hsp70, белок LEDGF	Лизосомная мембрана	Gyrd-Hansen et al., 2004; Daugaard et al., 2007a
Ингибиторы пермеабилизующих белков Bax и Bid	Антиапоптозный белок семейства Bcl-2	Белковые поры лизосомной мембраны?	Zhao et al., 2001b
Ингибиторы цистеиновых катепсинов	E64d, CA074Me, R3032	Катепсин B	Werneburg et al., 2004; Michallet et al., 2004; Nagaraj et al., 2006
Ингибиторы аспартильных катепсинов	Пепстатин A	Катепсин D	Roberg et al., 1999
Ингибиторы цитозольных протеиназ	Серпины	Сериновые протеиназы	Liu et al., 2004
Ингибиторы цитозольных протеиназ	Цистатины	Цистеиновые протеиназы	Jones et al., 1998
Цитопротективный белок	NF-κB-зависимый белок A20	?	Tran et al., 2009

основе увеличения проницаемости лизосомных мембран, обычно связаны с ослаблением межмембранного взаимодействия составляющих их фосфолипидов, нарушением плотной упаковки липидного бислоя мембран, появлением гидрофильных участков проницаемости мембраны для водорастворимых и заряженных молекул. Таков, например, эффект пероксидации липидов мембран, вызывающей гидрофилизацию фосфолипидов и нарушение структурной организации мембран (Girotti, 1998).

Однако наиболее интригующей находкой последних лет стала теория образования белковых пор, обеспечивающих выход лизосомных ферментов в цитозоль без признаков повреждения лизосомных мембран, высказанная в отношении действия белков Bax, LAPF и p53 (Chen et al., 2005; Li et al., 2007; Werneburg et al., 2007), подобно известным механизмам ПММ. Но реальное существование таких пор в мембранах лизосом еще предстоит установить.

Отметим, что мембраны лизосом обладают дифференциальной проницаемостью для ферментов лизосом в зависимости от молекулярной массы белков (Nakashima et al., 2003), при этом органеллы могут даже сохранять градиент pH через лизосомную мембрану (Bidere et al., 2003). В клетке существуют эффективные средства и системы противодействия ПЛМ и восстановления барьерной функции мембран лизосом, на которых мы остановимся ниже.

Факторы стабилизации мембран лизосом

С момента открытия лизосом не прекращается поиск стабилизаторов лизосомных мембран, препятствующих их повреждению, приводящему к гибели клеток. Ряд таких веществ эндогенной и экзогенной природы приведен в табл. 3.

Прежде всего, защитный эффект на мембраны оказывают эндогенные факторы антиоксидантной защиты, такие как витамины C, E (α-токоферол), восстановленный глутатион, каталаза, супероксиддисмутаза, мелатонин и др. (Iannitti, Palmieri, 2009). Следует отметить, что содержание важнейшего антиоксиданта α-токоферола в мембранах лизосом очень высокое — в 30 раз выше, чем, например, в мембранах микросом. Это, по всей вероятности, вызвано эволюционно обусловленной потребностью в их устойчивости к окислительному стрессу, часто встречающемуся в жизнедеятельности организма (Terman et al., 2006a).

К эффективным средствам стабилизации лизосом относятся хелатирующие соединения, поступающие в лизосомы путем эндоцитоза или аутофагоцитоза, такие как деферриоксамин, ферритин и α-липоевая кислота (Persson et al., 2003; Kurz et al., 2006). В лизосомах они связывают редокс-активное железо и тем самым подавляют реакции Фентона, генерирующие из перекиси водорода гидроксильные радикалы и приводящие к пероксидации липидов лизосомных мембран. В физиологических ситуациях стабилизация лизосом, по-видимому, может достигаться эндоцитозом апоферритина или аутофагией металлотионеинов, связывающих Fe^{2+} (Kurz et al., 2008).

Стабилизирующим эффектом в отношении мембран лизосом обладает сфингомиелин. Соответственно ингибирование нейтральной сфингомиелиназы (например, 3-*o*-метил-сфингомиелином) стабилизирует лизосомы по отношению к лабилизирующим мембраны факторам (фотоповреждению, ТНФ-α) и препятствует клеточной гибели (Caruso et al., 2005).

В ряде случаев оказываются эффективными ингибиторы ферментов, участвующих в дестабилизации лизосомных мембран, таких как фосфолипазы A2 и C (Zhao et al., 2001a, 2005b).

Недавно обнаружили свойства эндогенного стабилизатора мембран лизосом у белка теплового шока Hsp70, являющегося АТФ-зависимым шапероном и участвующего в фолдинге и переносе белков через клеточные мембраны (Daugaard et al., 2007b). Он обладает цитопротекторным действием и может подавлять апоптозную сигнализацию, связанную с ПММ. Белок способен переноситься и к лизосомам. С помощью иммунной электронной микроскопии и биохимических методов показали, что мембраны эндосом и лизосом опухолевых клеток содержат Hsp70. Белок способен защищать лизосомные мембраны от повреждения различными воздействиями (окислительный стресс, ТНФ-α и этопозид) (Nylandsted et al., 2004). Избирательное подавление экспрессии Hsp70-2 вызывает ПЛМ- и катепсинзависимую клеточную гибель (Daugaard et al., 2007b), а его повышающая регуляция позитивно влияет на стабильность мембран лизосом и выживаемость клеток при действии повреждающих агентов сирамесина, этопозида и ТНФ-α (Gyrd-Hansen et al., 2004). В клетках рака прямой кишки Hsp70 подавлял апоптоз двумя путями — снижением цитозольного уровня Ca^{2+} и стабилизацией лизосом (Dudeja et al., 2009).

Кроме того, идентифицирован белок LEDGF как Hsp70-2-регулируемый протектор мембран лизосом. Нокдаун гена белка LEDGF в онкотрансформированных клетках человека вызывал дестабилизацию мембран лизосом и последующую клеточную гибель (Daugaard et al., 2007a). Соответственно эктопический LEDGF стабилизирует лизосомы и защищает раковые клетки от цитотоксического действия противоопухолевых препаратов, индуцирующих клеточную гибель по лизосомному пути.

Применение ингибиторов катепсинов или повышающая регуляция эндогенных ингибиторов цистеиновых протеиназ (цистатинов) во многих случаях способствует стабилизации лизосом и устранению апоптогенной сигнализации (Jones et al., 1998; Peri et al., 2007). Лизосомы, выделенные из гепатоцитов, дефектных по катепсину B, в отличие от таковых нормальных клеток оказываются устойчивыми к лабилизирующему действию сфингозина (Werneburg et al., 2002). У мышей с дефектом рецептора манноза-6-фосфата, блокирующим накопление катепсинов в лизосомах, также не было повреждения лизосом и клеточной гибели в ответ на применение индукторов ПЛМ ТНФ-α или CD95/FasL (Tardy et al., 2004).

Способностью гасить апоптогенную сигнализацию освобождающихся цистеиновых катепсинов обладают эндогенные цистатины (Jones et al., 1998; Turk et al., 2008). В некоторых случаях эффективны цитозольные ингибиторы сериновых протеиназ серпины (Liu et al., 2004).

Стабилизирующим мембраны эффектом обладает цитопротекторный NF-κB-зависимый белок A20, который при обработке клеток ТНФ-α защищал лизосомы макрофагов от разрушения, предотвращая выход в цитозоль катепсина B, ПММ и каспазонезависимую клеточную гибель (Tran et al., 2009). Однако механизм его действия на лизосомы пока неясен.

Невозможно привести в данном литературном обзоре хотя бы значительную часть агентов, стабилизирующих мембраны лизосом и (или) препятствующих ПЛМ-зависимой апоптогенной сигнализации, поскольку практически для каждого лабилизирующего фактора обычно существует несколько антагонистов. Эффективность направленной стабилизации мембран лизосом зависит от природы повреждающих факторов и адресного воздействия стабилизаторов мембран. Важно отметить, что в последнее время обнаружены новые эндогенные белковые факторы стабилизации лизосом. Индукцию мембранных протекторов применяют не только во многих случаях клеточного повреждения в культуре клеток или на уровне целостного организма, но уже используют в медицинской практике (Iannitti, Palmieri, 2009).

Апоптоз, зависимый от пермеабилизации лизосомных мембран

Апоптоз, или программированная клеточная гибель, характеризуется уменьшением клетки в размере, конденсацией ядра и хроматина, их последующей фрагментацией. Наблюдается «пузырение» плазматической мембраны, клетка в конечном счете распадается на апоптозные тельца. Характерными особенностями апоптоза являются ПММ, определяющая «точку невозврата» с летального пути, и активация каскада специфических цитозольных протеиназ (каспаз), вызывающих свойственные для апоптоза морфологические и биохимические изменения (Манских, 2007; Boya, Kroemer, 2008; Северин, Скулачев, 2009).

Регистрация прижизненной утечки лизосомных ферментов в цитозоль, а также результаты исследований по избирательному ингибированию активности высвобождаемых ферментов или эффектов генетически опосредованного подавления экспрессии катепсинов свидетельствуют о том, что частичная ПЛМ может быть независимым фактором индукции апоптоза (Guicciardi et al., 2004; Terman et al., 2006b) (табл. 4).

Раннее вовлечение ПЛМ в апоптоз показано на многих моделях, в основном в культуре клеток. Так, на мышиных макрофагах J774 обнаружили, что фагоцитируемые кремниевокварцевые частицы вскоре вызывают пероксидативную ПЛМ, предшествующую активации каспаз, ПММ, фрагментации ДНК и апоптозу. Предварительное подавление пероксидации липидов внутрилизосомным связыванием Fe^{2+} предотвращало повреждение лизосом и индукцию апоптоза (Persson, 2005). Аналогичным образом значение ранней ПЛМ в индукции апоптоза выявили на клетках лейкемии человека HL-60, обработанных синтетическим ретиноидом AHPN/CD437 (Zang et al., 2001). Апоптоз тормозился добавлением как антиоксиданта α-токоферола, так и ингибитора катепсина D пепстатина A, отменяющего кроме ПЛМ также и CD437-индуцируемое образование свободных радикалов.

Какого-то универсального механизма сигнализации клеточной гибели в результате ПЛМ не установлено. Полагают, что во многих случаях высвобождение катепсинов из лизосом является решающим событием для опосредованной лизосомами клеточной гибели и ответственно за активацию последующих путей сигнализации. Мишенями катепсинов являются разные субклеточные структуры, в первую очередь сигнальные цитозольные белки семейства Bcl-2, причем, согласно разным источникам, возможно непосредственное действие данных ферментов на прокаспазы, митохондрии, клеточное ядро и хроматин (Broker et al., 2005; Stoka et al., 2007; Boya, Kroemer, 2008). Основной функцией катепсинов считают непрямую индукцию ПММ: активация цепочки сигнальных

Таблица 4

Примеры апоптоза, инициируемого пермеабилизацией лизосомных мембран

Клетки	Индуктор апоптоза	Лизосомные эффекторы	Нисходящая регуляция	Литературный источник
Клетки NSCLC	Паклитаксель	Катепсин B	Каспазонезависимая	Broker et al., 2004
Клетки лейкемии человека HL-60	Синтетический ретиноид AHPN/CD437	Катепсин D	Каспаза-3, повреждение митохондрий	Zang et al., 2001
Фибробласты человека	Стауроспорин	» »	Каспазы, ПММ, освобождение цитохрома *c*	Johansson et al., 2003
Клетки гепатоцеллюлярной карциномы	Кампотехин	Катепсины B и D	Каспаза-8	Roberts et al., 1999
Клетки OSCC человека	Гипоксия, TRAIL	Катепсины B, D и L	Каспазы-3, -9, Bid, ПМП	Nagaraj et al., 2007
Эпителиальные и онкотрансформированные клетки	Нокдаун гена белка LEDGF	Катепсин B	Каспазонезависимая регуляция	Daugaard et al., 2007a
Клетки рака яичника A2780	Гиперэкспрессия Bax, цитотоксины	Катепсин D	Олигомеризация Bax, ПММ, активация каспаз	Castino et al., 2008
Эмбриональные фибробласты мыши	Оксихолестерин	Катепсин B	Bax- и Bak-зависимая, каспазонезависимая ПММ	Boya et al., 2003a
Клетки линий Jurkat и BJAB	Бревинин-2R	Катепсины B и L	ПММ, образование АФК	Ghavami et al., 2008
Нейтрофилы человека	Пиоцианин	Катепсин D	ПММ, активация каспаз	Prince et al., 2008
» »	Бахромчатые (тип 1) бактерии *E. coli*	Цистеиновые катепсины	Активация Bid, удаление антиапоптозного белка Mcl-1, ПММ, активация каспаз	Blomgran et al., 2007
Клетки рака груди человека	Ингибиторы деградации протеасом NSC687852 и NSC638646	Катепсин D	Повреждение митохондрий, активация каспаз	Berndtsson et al., 2009
Клетки нейробластомы человека	Перекись водорода	» »	Транслокация Bax к митохондриям, повреждения митохондрий	Castino et al., 2007
Макрофаги человека	*M. tuberculosis*	Катепсин L, сериновые протеиназы	Активация Bid, повреждение митохондрий, каспазонезависимый путь	O'Sullivan et al., 2007
Макрофаги человека (ингибирование NF-κB)	ТНФ-α	Катепсин B	ПЛМ, каспазонезависимый путь	Tran et al., 2009
Клетки глиомы человека	Гемцитабин	Церамид	Освобождение катепсина D, активация Bax и атака митохондрий	Dumitru et al., 2009

цитозольных белков Bid, Bak и Bax, индукция транслокации Bax на внешнюю мембрану митохондрий, что и приводит к ПММ (Droga-Mazovec et al., 2008). В некоторых случаях катепсины могут также непосредственно повреждать митохондрии (Guicciardi et al., 2000, 2004). Показана их способность активировать каспазы (Vancompernolle et al., 1998), в частности «эффекторную» каспазу-3 (Hishita et al., 2001). Катепсины могут также перемещаться в клеточное ядро (Roberts et al., 1997; Li et al., 2003), вызывая быструю конденсацию хроматина. Так, показано фрагментирующее действие очищенного катепсина B на изолированные ядра клеток HeLa (Vancompernolle et al., 1998).

Интересен тот факт, что различные катепсины (B, D и L) одновременно освобождаются в цитозоль после ПЛМ (Bidere et al., 2003; Zhao et al., 2003; Michallet et al., 2004; Chen et al., 2005), несмотря на то что для торможения клеточной гибели обычно достаточно ингибирования или генетического повреждения лишь одного из катепсинов (Kagedal et al., 2001a; Bidere et al., 2003). Высвобождающиеся в цитозоль катепсины B и D какое-то время сохраняют стабильность при физиологических значениях pH (Stoka et al., 2007; Benes et al., 2008). Катепсин B отличается не только высокой экспрессией в клетке, но и достаточно долго сохраняет активность при нейтральных значениях pH и способен индуцировать ПММ (Guicciardi et al., 2000, 2004). Следует подчеркнуть, что подобный эффект показан и для катепсина D (Zhao et al., 2003). В ряде случаев катепсин B выступает как «эффекторная» протеаза, действующая после каспаз в некоторых типах клеток (Jones et al., 1998; Foghsgaard et al., 2001) и способная вызывать апоптоз в клетках фибросаркомы WEHI-S и в опухолевых клетках NSCLC (Foghsgaard et al., 2001; Broker et al., 2004). Однако чаще лизосомные протеазы способствуют клеточной гибели непрямым путем, опосредованно запуская ПММ и в конечном счете апоптоз (Roberg et al., 2002; Boya et al., 2003a, 2003b; Johansson et al., 2003).

В целом лизосомные протеазы запускают апоптоз посредством множественных путей, которые могут протекать с участием известных медиаторов апоптоза. Так, известно, что ПЛМ происходит и в течение церамидопосредованного апоптоза (Pettus et al., 2002). Накопление церамида отмечается при различных способах индукции

апоптоза (цитокинами, радиацией, противоопухолевыми препаратами и др.). Он собирается во внутримембранные блоки («ceramide-rich drafts»), вызывающие независимую от лизосом апоптогенную сигнализацию. Однако показан и лизосомный путь сигнализации, состоящий в связывании с прокатепсином D, активации фермента и его освобождении в цитозоль (Heinrich et al., 2004).

В апоптозе, связанном с запуском ПЛМ посредством РФК, чаще всего наблюдается сценарий с выходом катепсина D в цитозоль, высвобождением из митохондрий цитохрома *c* и активацией каспазозависимого пути (Kagedal et al., 2001a; Boya, Kroemer, 2008). Типичная цепочка катепсин D-зависимой сигнализации апоптоза показана на клетках нейробластомы при действии перекиси водорода, состоящая в ранней ПЛМ и последующей ПММ (Castino et al., 2007). В присутствии хелатора железа деферриоксамина устраняются все характерные особенности апоптоза, начиная с ПЛМ. Причем ингибирование катепсина D (но не катепсина B) подавляет всю последующую нисходящую регуляцию апоптоза, включая повреждение митохондрий и активацию каспаз. От активности катепсина D зависят перемещение белка Bax на поверхность митохондрий и их последующее повреждение.

В РФК-зависимом апоптозе нейтрофилов, вызываемом бактериями (Blomgran et al., 2007), ранним этапом в инициации апоптоза также является ПЛМ, приводящая к расщеплению белка Bid, повреждению митохондрий и активации каспаз. Ингибирование катепсина D (но не цистеиновых катепсинов) приводило к подавлению расщепления Bid и торможению апоптоза.

При индукции апоптоза в клетках L929 гиперэкспрессией проапоптозного белка LAPF показаны его транслокация к лизосомам, ПЛМ, освобождение катепсинов B и D, ПММ, освобождение апоптозиндуцирующего фактора AIF и каспазонезависимый апоптоз. При этом ингибирование катепсина D (но не катепсина B) препятствовало клеточной гибели (Chen et al., 2005). В индуцируемом цитотоксинами апоптозе клеток рака яичника высвобождение катепсина D с последующей активацией Bax приводило к повреждению как лизосом, так и митохондрий (Castino et al., 2008). Вообще говоря, можно индуцировать апоптоз прямой инъекцией катепсина D в цитозоль фибробластов (Roberg et al., 2002).

В целом значение этого фермента как медиатора апоптоза показано для широкого круга воздействий, в частности при применении таких агентов, как стауроспорин, γ-интерферон, Fas/CD95/APO-1, ТНФ-α, этопозид, цисплатин, доксорубицин, сфингозин и др. (Benes et al., 2008).

Сигнальная роль в апоптозе другого катепсина — катепсина B — также широко исследуется (Stoka et al., 2007). Так, в клетках глиомы, устойчивых к TRAIL или цисплатину, парвовирус H-1 был способен вызывать апоптоз посредством освобождения в цитозоль катепсинов B и L и снижения уровня их ингибиторов цистатинов B и C. Подавление этих эффектов защищало клетки глиомы от литического действия вируса (Di Piazza et al., 2007). Блокирование экспрессии катепсина B на модели нокаут-мышей *CatB*$^{-/-}$ повышало устойчивость изолированных гепатоцитов к индуцируемому ТНФ-α апоптозу (Guicciardi et al., 2000). За освобождением фермента в цитозоль обычно следует индукция ПММ (Broker et al., 2005). В гепатоцитах при действии TNF-α эта цепочка продолжается освобождением цитохрома *c* и активацией каспазы-9 (Guicciardi et al., 2000). В клетках холангиокарциномы человека вызываемый TRAIL апоптоз связан с ПЛМ транслокацией катепсина B в цитозоль. Результат достигается JNK-зависимой активацией Bim, который в свою очередь активирует Bax, атакующий лизосомную мембрану. Ингибирование активируемой каспазы-9 с нисходящей регуляцией ПММ подавляло клеточную гибель, но не предотвращало ПЛМ (Werneburg et al., 2007).

В некоторых случаях ПЛМ и последующая катепсин B-опосредуемая ПММ связаны активацией каспазы-2. Так, в гепатоцитах мыши ТНФ-α инициирует Bid-зависимую ПЛМ с последующим освобождением катепсина B в цитозоль и активацией каспазы-2, которая затем запускает освобождение из митохондрий цитохрома *c* и в конечном счете апоптоз (Guicciardi et al., 2005). Активация каспазы-2 подавляется, если инактивируется катепсин B, т. е., по-видимому, освобождение катепсина B происходит ранее активации каспазы-2.

Отмечено участие в этой цепочке и других каспаз. Так, на клетках оральной сквамозной карциномы, подвергающихся действию гипоксии и(или) TRAIL, показана следующая последовательность апоптогенных событий: освобождение в цитозоль катепсинов B, D и L, активация каспаз-3 и -9, расщепление Bid, активация Bax, освобождение цитохрома *c*, фрагментация ДНК. При этом инактивация катепсинов B и D такими агентами, как CA074Me и пепстатин A, подавляла апоптоз и прерывала всю цепочку последующей сигнализации, свидетельствуя о ключевой роли этих катепсинов в гибели клеток (Nagaraj et al., 2007).

Ранняя активация каспаз вслед за транслокацией катепсина B в цитозоль индуцируется действием гликогендезоксихолата на клетки гепатомы крысы, причем апоптоз клеток тормозится ингибированием каспаз или гиперэкспрессией ингибитора цистеиновых катепсинов цистатина A (Jones et al., 1998). Этот путь, по-видимому, играет важнейшую роль при моделировании холестаза на животных, когда инактивация катепсина B ослабляет повреждение клеток печени (Roberts et al., 1997).

ПЛМ может инициировать также каспазонезависимый путь клеточной гибели; так, в ряде работ показано, что ингибиторы каспаз оказывались неспособными блокировать этот процесс. Например, стабилизирующие микротрубочки агенты, такие как эпотилон B, дискодермолид, паклитаксель, вызывали катепсин B-зависимый и каспазонезависимый апоптоз, поскольку выживание клеток повышал ингибитор катепсина B CA074Me, но не ингибитор каспаз z-VAD-fmk (Broker et al., 2004). Интересно, что в разных типах клеток модуляторы микротрубочек вызывали каспазозависимую или каспазонезависимую гибель клеток. Подобным образом лиганд TRAIL запускает ПЛМ- и каспазозависимый апоптоз (Werneburg et al., 2007) или ПЛМ- и каспаза-8-независимую клеточную гибель (Garnett et al., 2007).

В целом цитозольная транслокация катепсинов в результате ПЛМ способна непосредственно активировать каспазы, запускать известный путь каскада ПММ, равно как ПММ- и каспазонезависимый апоптоз. ПЛМ нередко рассматривается преимущественно как сигнал каспазонезависимого апоптоза (Broker et al., 2005). Пути каспазонезависимого апоптоза, по-видимому, являются защитным механизмом, предохраняющим организм от потенциально опасных клеток, в которых опосредуемые каспазами пути апоптоза не срабатывают, но в которых в ответ на гибельные стимулы могут быть запущены дублирующие апоптогенные каскады.

Заключение

Важно отметить, что границы ПЛМ, соответствующие индукции апоптоза, остаются размытыми, и, согласно некоторым данным, даже 15%-ная лабилизация лизосом может не вызывать апоптоза (Michihara et al., 2005). Большое значение в индукции ПЛМ-зависимого апоптоза имеют тип клеток, статус иммортализации, генетический фон и внешние условия (Broker et al., 2005), поэтому одинаковые цитотоксические воздействия приводят к разным результататам, в том числе могут не вызывать гибели клеток.

Мы рассмотрели достаточно много примеров, когда в цепи сигнализации апоптоза уровень ПЛМ выше уровня ПММ и ПЛМ запускает ПММ и активацию каспаз (Guiccardi et al., 2000; Boya et al., 2003a, 2003b). При этом ПЛМ, как правило, не является «исполнительным» звеном. Показано, что на фоне ПЛМ, ведущей к активации каспаз, ингибирование каспаз отменяет апоптоз, но не препятствует лабилизации лизосом (Werneburg et al., 2007; Droga-Mazovec et al., 2008).

Рассматривая место ПЛМ-зависимого апоптоза в жизнедеятельности клетки и клеточных реакциях на внешние факторы, следует отметить, что апоптоз, связанный с центральным повреждением ядер и митохондрий, встречается гораздо чаще, чем ПЛМ-зависимый апоптоз (Ferri, Kroemer, 2001; Мойбенко и др., 2005; Северин, Скулачев, 2009). ПЛМ-зависимый апоптоз нуждается в избирательном повреждении лизосом, поэтому в целом в индукции апоптоза лабилизация мембран лизосом часто не является легко поражаемой мишенью. Показано, что ПЛМ-зависимая клеточная гибель может развиваться по разным сценариям — каспазозависимым или каспазонезависимым, при этом последний рассматривают как «страховочный» путь в условиях каспазной недостаточности.

В заключение следует отметить, что ПЛМ-зависимый апоптоз достаточно часто выявляется при воздействиях на онкотрансформированные клетки, что связывают с их более обширным кислым компартментом и повышенной экспрессией катепсинов (Fehrenbacher, Jaattela, 2005). По этой причине, возможно, опухолевые клетки более уязвимы к ПЛМ, чем нормальные клетки. И эта их особенность может стать мишенью для разработки нового направления противоопухолевых препаратов и стимулом в изучении молекулярной и клеточной биологии лизосом и лабилизации их мембран.

Список литературы

Манских В. Н. 2007. Пути гибели клетки и их биологическое значение. Цитология. 49 (11) : 909—915.

Мойбенко А. А., Досенко В. Е., Нагибин В. С. 2005. Ферментативные механизмы апоптоза. Патол. физиол. эксперим. терапия. 3 : 17—26.

Покровский А. А., Тутельян В. А. 1976. Лизосомы. М., Наука: 382 с.

Пупышев А. Б., Короленко Т. А. 1987. Повышенная повреждаемость лизосом тяжелых субклеточных фракций печени крыс. Библиогр. указатель ВИНИТИ «Депониров. рукописи». № 5, б/о 378.

Северин Ф. Ф., Скулачев В. П. 2009. Запрограммированная клеточная смерть как мишень борьбы со старением организма. Успехи геронтологи. 22 (1) : 37—48.

Antunes F., Cadenas E., Brunk U. T. 2001. Apoptosis induced by exposure to a low steady-state concentration of H_2O_2 is a consequence of lysosomal rupture. Biochem. J. 356 : 549—555.

Baumgartner H. K., Gerasimenko J. V., Thorne C., Ashurst L. H., Barrow S. L., Chvanov M. A., Gillies S., Criddle D. N., Tepikin A. V., Petersen O. H., Sutton R., Watson A. J., Gerasimenko O. V. 2007. Caspase-8-mediated apoptosis induced by oxidative stress is independent of the intrinsic pathway and dependent on cathepsins. Amer. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. 293 : G296— G307.

Benes P., Vetvicka V., Fusek M. 2008. Cathepsin D — many functions of one aspartic protease. Crit. Rev. Oncol. Hematol. 68 : 12—28.

Berndtsson M., Beaujouin M., Rickardson L., Havelka A. M., Larsson R., Westman J., Liaudet-Coopman E., Linder S. 2009. Induction of the lysosomal apoptosis pathway by inhibitors of the ubiquitin-proteasome system. Int. J. Cancer. 124 : 1463—1469.

Bidere N., Lorenzo H. K., Carmona S., Laforge M., Harper F., Dumont C., Senik A. 2003. Cathepsin D triggers Bax activation, resulting in selective apoptosis-inducing factor (AIF) relocation in T lymphocytes entering the early commitment phase to apoptosis. J. Biol. Chem. 278 : 31 401—31 411.

Bivik C., Ollinger K. 2008. JNK mediates UVB-induced apoptosis upstream lysosomal membrane permeabilization and Bcl-2 family proteins. Apoptosis. 13 : 1111—1120.

Blomgran R., Zheng L., Stendahl O. 2007. Cathepsin-cleaved Bid promotes apoptosis in human neutrophils via oxidative stress-induced lysosomal membrane permeabilization. J. Leukoc. Biol. 81 : 1213—1223.

Boya P., Andreau K., Poncet D., Zamzami N., Perfettini J. L., Metivier D., Ojcius D. M., Jaattela M., Kroemer G. 2003a. Lysosomal membrane permeabilization induces cell death in a mitochondrion-dependent fashion. J. Exp. Med. 197 : 1323—1334.

Boya P., Gonzales-Polo R. A., Poncet D., Andreau K., Vieira H. L., Roumier T., Perfettini J. L., Kroemer G. 2003b. Mitochondrial membrane permeabilization is a critical step of lysosome initiated apoptosis induced by hydroxychloroquine. Oncogene. 22 : 3927—3936.

Boya P., Kroemer G. 2008. Lysosomal membrane permeabilization in cell death. Oncogene. 27 : 6434—6451.

Broker L.E., Huisman C., Span S. W., Rodriguez J. A., Kruyt F. A., Giaccone G. 2004. Cathepsin B mediates caspase-independent cell death induced by microtubule stabilizing agents in non-small cell lung cancer cells. Cancer Res. 64 : 27—30.

Broker L. E., Kruyt F. A. E., Giaccone G. 2005. Cell death independent of caspases: a review. Clin. Cancer Res. 11 : 3155—3162.

Brunk U. T., Neuzil J., Eaton J. W. 2001. Lysosomal involvement in apoptosis. Redox Rep. 6 : 91—97.

Brunk U. T., Zhang H., Dalen H., Ollinger K. 1995. Exposure of cells to nonlethal concentrations of hydrogen peroxide induces degeneration-repair mechanisms involving lysosomal destabilization. Free Radic. Biol. Med. 19 : 813—822.

Caruso J. A., Mathieu P. A., Reiners J. J., Jr. 2005. Sphingomyelins suppress the targeted disruption of lysosomes/endosomes by the photosensitizer NPe6 during photodynamic therapy. Biochem. J. 392 : 325—334.

Castino R., Bellio N., Nicotra G., Follo C., Trincheri N. F., Isidoro C. 2007. Cathepsin D-Bax death pathway in oxidative stressed neuroblastoma cells. Free Radic. Biol. Med. 42 : 1305—1316.

Castino R., Peracchio C., Salini A., Nicotra G., Trincheri N. F., Demoz M., Valente G., Isidoro C. 2008. Chemotherapy drug response in ovarian cancer cells strictly depends on a cathepsin D-Bax activation loop. J. Cell. Mol. Med. 13 : 1096—1109.

Chen W., Li N., Chen T., Han Y., Li C., Wang Y., He W., Zhang L., Wan T., Cao X. 2005. The lysosome-associated apoptosis-inducing protein containing the pleckstrin homology (PH) and FYVE domains (LAPF), representative of a novel family of PH and FYVE domain-containing proteins, induces caspase-independent apoptosis via the lysosomal-mitochondrial pathway. J. Biol. Chem. 280 : 40 985—40 995.

Cheung N. S., Peng Z. F, Chen M. J., Moore P. K., Whiteman M. 2007. Hydrogen sulfide induced neuronal death occurs via glutamate receptor and is associated with calpain activation and ly-

sosomal rupture in mouse primary cortical neurons. Neuropharmacology. 53 : 505—514.

Cirman T., Oresic K., Mazovec G. D., Turk V., Reed J. C., Myers R. M., Salvesen G. S., Turk B. 2004. Selective disruption of lysosomes in HeLa cells triggers apoptosis mediated by cleavage of Bid by multiple papain-like lysosomal cathepsins. J. Biol. Chem. 279 : 3578—3587.

Daugaard M., Kirkegaard-Sorensen T., Ostenfeld M. S., Aaboe M., Hoyer-Hansen M., Orntoft T. F., Rohde M., Jaattela M. 2007a. Lens epithelium derived growth factor is an Hsp70-2 regulated guardian of lysosomal stability in human cancer. Cancer Res. 67 : 2559—2567.

Daugaard M., Rohde M., Jaattela M. 2007b. The heat shock protein 70 family: highly homologous proteins with overlapping and distinct functions. FEBS Lett. 581 : 3702—3710.

De Milito A., Iessi E., Logozzi M., Lozupone F., Spada M., Marino M. L., Federici C., Perdicchio M., Matarrese P., Lugini L., Nilsson A., Fais S. 2007. Proton pump inhibitors induce apoptosis of human B-cell tumors through a caspase-independent mechanism involving reactive oxygen species. Cancer Res. 67 : 5408—5417.

Deter R. L., De Duve C. 1967. Influence of glucagon, an inducer of cellular autophagy, on some physical properties of rat liver lysosomes. J. Cell Biol. 33 : 437—449.

Di Piazza M., Mader C., Geletneky K., Herrero Y., Calle M., Weber E., Schlehofer J., Deleu L., Rommelaere J. 2007. Cytosolic activation of cathepsins mediates parvovirus H-1-induced killing of cisplatin and TRAIL-resistant glioma cells. J. Virol. 81 : 4186—4198.

Droga-Mazovec G., Bojic L., Petelin A., Ivanova S., Romih R., Repnik U., Salvesen G.S., Stoka V., Turk V., Turk B. 2008. Cysteine cathepsins trigger caspase-dependent cell death through cleavage of bid and antiapoptotic Bcl-2 homologues. J. Biol. Chem. 283 : 19 140—19 150.

Dudeja V., Mujumdar N., Phillips P., Chugh R., Borja-Cacho D., Dawra R. K., Vickers S. M., Saluja A. K. 2009. Heat shock protein 70 inhibits apoptosis in cancer cells through simultaneous and independent mechanisms. Gastroenterology. 136 : 1772—1782.

Dumitru C. A., Sandalcioglu I. E., Wagner M., Weller M., Gulbins E. 2009. Lysosomal ceramide mediates gemcitabine-induced death of glioma cells. J. Mol. Med. 87 : 1123—1132.

Fehrenbacher N., Bastholm L., Kirkegaard-Sorensen T., Rafn B., Gottzauw T., Nielsen C., Weber E., Shirasawa S., Kallunki T., Jaattela M. 2008. Sensitization to the lysosomal cell death pathway by oncogene-induced down-regulation of lysosome-as-sociated membrane proteins 1 and 2. Cancer Res. 68 : 6623—6633.

Fehrenbacher N., Jaattela M. 2005. Lysosomes as targets for cancer therapy. Cancer Res. 65 : 2993—2995.

Feldstein A. E., Werneburg N. W., Li Z., Bronk S. F., Gores G. J. 2006. Bax inhibition protects against free fatty acid-induced lysosomal permeabilization. Amer. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. 290: G1339—G1346.

Ferri K. F., Kroemer G. 2001. Organelle-specific initiation of cell death pathways. Nat. Cell Biol. 3 : E255—E263.

Foghsgaard L., Wissing D., Mauch D., Mauch D., Lademann U., Bastholm L., Boes M., Elling F., Leist M., Jaattela M. 2001. Cathepsin B acts as a dominant execution protease in tumor cell apoptosis induced by tumor necrosis factor. J. Cell Biol. 153 : 999—1010.

Garnett T. O., Filippova M., Duerksen-Hughes P. J. 2007. Bid is cleaved upstream of caspase-8 activation during TRAIL-mediated apoptosis in human osteosarcoma cells. Apoptosis. 12 : 1299—1315.

Ghavami S., Asoodeh A., Klonisch T., Halayko A.J., Kadkhoda K., Kroczak T. J., Gibson S. B., Booy E. P., Naderi-Manesh H., Los M. 2008. Brevinin-2R(1) semi-selectively kills cancer cells by a distinct mechanism, which involves the lysosomal-mitochondrial death pathway. J. Cell. Mol. Med. 12 : 1005—1022.

Girotti A. W. 1998. Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems. J. Lipid Res. 39 : 1529—1542.

Groth-Pedersen L., Ostenfeld M.S., Hoyer-Hansen M., Nylandsted J., Jaattela M. 2007. Vincristine induces dramatic lysosomal changes and sensitizes cancer cells to lysosome-destabilizing siramesine. Cancer Res. 67 : 2217—2225.

Guicciardi M. E., Bronk S. F., Werneburg N. W., Yin X. M., Gores G. J. 2005. Bid is upstream of lysosome-mediated caspase 2 activation in tumor necrosis factor alpha-induced hepatocyte apoptosis. Gastroenterology. 129 : 269—284.

Guicciardi M. E., Deussing J., Miyoshi H., Bronk S. F., Svingen P. A., Peters C., Kaufmann S. H., Gores G. J. 2000. Cathepsin B contributes to TNF-alpha-mediated hepatocyte apoptosis by promoting mitochondrial release of cytochrome *c*. J. Clin. Invest. 106 : 1127—1137.

Guicciardi M. E., Leist M., Gores G. J. 2004. Lysosomes in cell death. Oncogene. 23 : 2881—2890.

Gyrd-Hansen M., Farkas T., Fehrenbacher N., Bastholm L., Hoyer-Hansen M., Elling F., Wallach D., Flavell R., Kroemer G., Nylandsted J., Jaattela M. 2006. Apoptosome-independent activation of the lysosomal cell death pathway by caspase-9. Mol. Cell. Biol. 26 : 7880—7891.

Gyrd-Hansen M., Nylandsted J., Jaattela M. 2004. Heat shock protein 70 promotes cancer cell viability by safeguarding lysosomal integrity. Cell Cycle. 3 : 1484—1485.

Hayashi M. A., Nascimento F. D., Kerkis A., Oliveira V., Oliveira E. B., Pereira A., Radis-Baptista G., Nader H. B., Yamane T., Kerkis I., Tersariol I. L. 2008. Cytotoxic effects of crotamine are mediated through lysosomal membrane permeabilization. Toxicon. 52 : 508—517.

Heinrich M., Neumeyer J., Jakob M., Hallas C., Tchikov V., Winoto-Morbach S., Wickel M., Schneider-Brachert W., Trauzold A., Hethke A., Schütze S. 2004. Cathepsin D links TNF-induced acid sphingomyelinase to Bid-mediated caspase-9 and -3 activation. Cell Death Differ. 11 : 550—563.

Hishita T., Tada-Oikawa S., Tohyama K., Miura Y., Nishihara T., Tohyama Y., Yoshida Y., Uchiyama T., Kawanishi S. 2001. Caspase-3 activation by lysosomal enzymes in cytochrome *c*-independent apoptosis in myelodysplastic syndrome-derived cell line P39. Cancer Res. 61 : 2878—2884.

Hu J. S., Li Y. B., Wang J. W., Sun L., Zhang G. J. 2007. Mechanism of lysophosphatidylcholine-induced lysosome destabilization. J. Membr. Biol. 215 : 27—35.

Iannitti T., Palmieri B. 2009. Antioxidant therapy effectiveness: an up to date. Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci. 13 : 245—278.

Ichinose S., Usuda J., Hirata T., Inoue T., Ohtani K., Maehara S. S., Kubota M., Imai K., Tsunoda Y., Kuroiwa Y., Yamada K., Tsutsui H., Furukawa K., Okunaka T., Oleinick N. L., Kato H. 2006. Lysosomal cathepsin initiates apoptosis, which is regulated by photodamage to Bcl-2 at mitochondria in photodynamic therapy using a novel photosensitizer, ATX-s10 (Na). Int. J. Oncol. 29 : 349—355.

Johansson A.C., Steen H., Ollinger K., Roberg K. 2003. Cathepsin D mediates cytochrome *c* release and caspase activation in human fibroblast apoptosis induced by staurosporine. Cell Death Differ. 10 : 1253—1259.

Jones B., Roberts P. J., Faubion W. A., Kominami E., Gores G. J. 1998. Cystatin A expression reduces bile salt-induced apoptosis in a rat hepatoma cell line. Amer. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. 275 : G723—G730.

Kagedal K., Johansson A.C., Johansson U., Heimlich G., Roberg K., Wang N. S., Jurgensmeier J. M., Ollinger K. 2005. Lysosomal membrane permeabilization during apoptosis — involvement of Bax? Int. J. Exp. Pathol. 86 : 309—321.

Kagedal K., Johansson U., Ollinger K. 2001a. The lysosomal protease cathepsin D mediates apoptosis induced by oxidative stress. FASEB J. 15 : 1592—1594.

Kagedal K., Zhao M., Svensson I., Brunk U. T. 2001b. Sphingosine-induced apoptosis is dependent on lysosomal proteases. Biochem. J. 359 : 335—343.

Kurz T., Gustafsson B., Brunk U. T. 2006. Intralysosomal iron chelation protects against oxidative stress-induced cellular damage. FEBS J. 273 : 3106—3117.

Kurz T., Terman A., Gustafsson B., Brunk U. T. 2008. Lysosomes in iron metabolism, ageing and apoptosis. Histochem. Cell Biol. 4 : 389—406.

Li N., Zheng Y., Chen W., Wang C., Liu X., He W., Xu H., Cao X. 2007. Adaptor protein LAPF recruits phosphorylated p53 to lysosomes and triggers lysosomal desta-bilization in apoptosis. Cancer Res. 67 : 11 176—11 185.

Li W., Yuan X. M. 2004. Increased expression and translocation of lysosomal cathepsins contribute to macrophage apoptosis in atherogenesis. Ann. N.Y. Acad. Sci. 1030: 427—433.

Li W., Yuan X. M., Brunk U. T. 1998. OxLDL-induced macrophage cytotoxicity is mediated by lysosomal rupture and modified by intralysosomal redox-active iron. Free Radic. Res. 29:389—398.

Li W., Yuan X. M., Ivanova S., Tracey K. J., Eaton J. W., Brunk U. T. 2003. 3-Amino-propanal, formed during cerebral ischaemia, is a potent lysosomotropic neurotoxin. Biochem. J. 371 : 429—436.

Li W., Yuan X., Nordgren G., Dalen H., Dubowchik G. M., Firestone R. A., Brunk U. T. 2000. Induction of cell death by the lysosomotropic detergent MSDH. FEBS Lett. 470: 35—39.

Li Z., Berk M., McIntyre T. M., Gores G. J., Feldstein A. E. 2008. The lysosomal-mitochondrial axis in free fatty acid-induced hepatic lipotoxicity. Hepatology. 47 : 1495—1503.

Liu N., Wang Y., Ashton-Rickardt P. G. 2004. Serine protease inhibitor 2A inhibits caspase-independent cell death. FEBS Lett. 569 : 49—53.

Marchi B., Burlando B., Moore M. N., Viarengo A. 2004. Mercury- and copper-induced lysosomal membrane destabilisation depends on [Ca2+]i dependent phospholipase A2 activation. Aquat. Toxicol. 66 : 197—204.

Michallet M. C., Saltel F., Flacher M., Revillard J. P., Genestier L. 2004. Cathepsin-dependent apoptosis triggered by supraoptimal activation of T lymphocytes: a possible mechanism of high dose tolerance. J. Immunol. 172 : 5405—5414.

Michihara A., Toda K., Kubo T., Fujiwara Y., Akasaki K., Tsuji H. 2005. Disruptive effect of chloroquine on lysosomes in cultured rat hepatocytes. Biol. Pharm. Bull. 28 : 947—951.

Miller D. K., Griffiths E., Lenard J., Firestone R. A. 1983. Cell killing by lysosomotropic detergents. J. Cell Biol. 97 : 1841—1851.

Moore M. N., Viarengo A. 1987. Lysosomal membrane fragility and catabolism of cytosolic proteins: evidence for a direct relationship. Experientia. 43 : 320—323.

Nagaraj N. S., Vigneswaran N., Zacharias W. 2006. Cathepsin B mediates TRAIL-induced apoptosis in oral cancer cells. J. Cancer Res. Clin. Oncol. 132 : 171—183.

Nagaraj N. S., Vigneswaran N., Zacharias W. 2007. Hypoxia inhibits TRAIL-induced tumor cell apoptosis: involvement of lysosomal cathepsins. Apoptosis. 12 : 125—139.

Nakashima S., Hiraku Y., Tada-Oikawa S., Hishita T., Gabazza E.C., Tamaki S., Imoto I., Adachi Y., Kawanishi S. 2003. Vacuolar H^+-ATPase inhibitor induces apoptosis via lysosomal dysfunction in the human gastric cancer cell line MKN-1. J. Biochem. 134 : 359—364.

Nylandsted J., Gyrd-Hansen M., Danielewicz A., Fehrenbacher N., Lademann U., Hoyer-Hansen M., Weber E., Multhoff G., Rohde M., Jaattela M. 2004. Heat shock protein 70 promotes cell survival by inhibiting lysosomal membrane permeabilization. J. Exp. Med. 200 : 425—435.

Ollinger K., Brunk U. T. 1995. Cellular injury induced by oxidative stress is mediated through lysosomal damage. Free Radic. Biol. Med. 19 : 565—574.

Ostenfeld M. S., Fehrenbacher N., Hoyer-Hansen M., Thomsen C., Farkas T., Jaattela M. 2005. Effective tumor cell death by sigma-2 receptor ligand siramesine involves lysosomal leakage and oxidative stress. Cancer Res. 65 : 8975—8983.

Ostenfeld M. S., Hoyer-Hansen M., Bastholm L., Fehrenbacher N., Olsen O. D., Groth-Pedersen L., Puustinen P., Kirkegaard-Sorensen T., Nylandsted J., Farkas T., Jaattela M. 2008. Anti-cancer agent siramesine is a lysosomotropic detergent that induces cytoprotective autophagosome accumulation. Autophagy. 4 : 487—499.

O'Sullivan M. P., O'Leary S., Kelly D. M., Keane J. 2007. A caspase-independent pathway mediates macrophage cell death in response to *Mycobacterium tuberculosis* infection. Infect. Immun. 75 : 1984—1993.

Paris C., Bertoglio J., Breard J. 2007. Lysosomal and mitochondrial pathways in miltefosine-induced apoptosis in U937 cells. Apoptosis. 12 : 1257—1267.

Peri P., Hukkanen V., Nuutila K., Saukko P., Abrahamson M., Vuorinen T. 2007. The cysteine protease inhibitors cystatins inhibit herpes simplex virus type 1-induced apoptosis and virus yield in HEp-2 cells. J. Gen. Virol. 88 : 2101—2105.

Persson H. L. 2005. Iron-dependent lysosomal destabilization initiates silica-induced apoptosis in murine macrophages. Toxicol. Lett. 159 : 124—133.

Persson H. L., Yu Z., Tirosh O., Eaton J. W., Brunk U. T. 2003. Prevention of oxidant-induced cell death by lysosomotropic iron chelators. Free Radic. Biol. Med. 34 : 1295—1305.

Pettus B. J., Chalfant C. E., Hannun Y. A. 2002. Ceramide in apoptosis: an overview and current perspectives. Biochim. biophys. acta. 1585 : 114—125.

Prince L. R., Bianchi S. M., Vaughan K. M., Bewley M. A., Marriott H. M., Walmsley S. R., Taylor G. W., Buttle D. J., Sabroe I., Dockrell D. H., Whyte M. K. 2008. Subversion of a lysosomal pathway regulating neutrophil apoptosis by a major bacterial toxin, pyocyanin. J. Immunol. 180: 3502—3511.

Radis-Baptista G., Nader H.B., Yamane T., Kerkis I., Tersariol I. L. 2008. Cytotoxic effects of crotamine are mediated through lysosomal membrane permeabilization. Toxicon. 52 : 508—517.

Roberg K., Johansson U., Ollinger K. 1999. Lysosomal release of cathepsin D precedes relocation of cytochrome *c* and loss of mitochondrial transmembrane potential during apoptosis induced by oxidative stress. Free Radic. Biol. Med. 27 : 1228—1237.

Roberg K., Kagedal K., Ollinger K. 2002. Microinjection of cathepsin D induces caspase-dependent apoptosis in fibroblasts. Amer. J. Pathol. 161 : 89—96.

Roberts L. R., Adjei P. N., Gores G. J. 1999. Cathepsins as effector proteases in hepatocyte apoptosis. Cell. Biochem. Biophys. 30: 71—88.

Roberts L. R., Kurosawa H., Bronk S. F., Fesmier P. J., Agellon L. B., Leung W. Y., Mao F., Gores G. J. 1997. Cathepsin B contributes to bile salt-induced apoptosis of rat hepatocytes. Gastroenterology. 113 : 1714—1726.

Roussi S., Gosse F., Aoude-Werner D., Zhang X., Marchioni E., Geoffroy P., Miesch M., Raul F. 2007. Mitochondrial perturbation, oxidative stress and lysosomal destabilization are involved in 7beta-hydroxysitosterol and 7beta-hydroxycholesterol triggered apoptosis in human colon cancer cells. Apoptosis. 12 : 87—96.

Shen H. M., Zhang Z., Zhang Q. F., Ong C. N. 2001. Reactive oxygen species and caspase activation mediate silica-induced apoptosis in alveolar macrophages. Amer. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol. 280 : L10—L17.

Stoka V., Turk V., Turk B. 2007. Lysosomal cysteine cathepsins: signaling pathways in apoptosis. Biol. Chem. 388 : 555—560.

Tardy C., Autefage H., Garcia V., Levade T., Andrieu-Abadie N. 2004. Mannose 6-phosphorylated proteins are required for tumor necrosis factor-induced apoptosis: defective response in I-cell disease fibroblasts. J. Biol. Chem. 279 : 52 914—52 923.

Terman A., Gustafsson B., Brunk U.T. 2006a. The lysosomal-mitochondrial axis theory of postmitotic aging and cell death. Chem. Biol. Interact. 163 : 29—37.

Terman A., Kurz T., Gustafsson B., Brunk U. T. 2006b. Lysosomal labilization. IUBMB Life. 58 : 531—539.

Thibodeau M. S., Giardina C., Knecht D. A., Helble J., Hubbard A. K. 2004. Silica-induced apoptosis in mouse alveolar macrophages is initiated by lysosomal enzyme activity. Toxicol. Sci. 80 : 34—48.

Tran T. M., Temkin V., Shi B., Pagliari L., Daniel S., Ferran C., Pope R. M. 2009. TNFalpha-induced macrophage death via caspase-dependent and independent pathways. Apoptosis. 14 : 320—332.

Turk V., Stoka V., Turk D. 2008. Cystatins: biochemical and structural properties, and medical relevance. Front. Biosci. 13 : 5406—5420.

Vancompernolle K., Van Herreweghe F., Pynaert G., Van de Craen M., De Vos K., Totty N., Sterling A., Fiers W., Vandenabeele P., Grooten J. 1998. Atractyloside-induced release of cathepsin B, a protease with caspase-processing activity. FEBS Lett. 438 : 150—158.

Werneburg N. W., Guicciardi M. E., Bronk S. F., Gores G. J. 2002. Tumor necrosis factor-alpha-associated lysosomal permeabilization is cathepsin B dependent. Amer. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. 283 : G947—G956.

Werneburg N. W., Guicciardi M. E., Bronk S. F., Kaufmann S. H., Gores G. J. 2007. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand activates a lysosomal pathway of apoptosis that is regulated by Bcl-2 proteins. J. Biol. Chem. 282 : 28 960—28 970.

Werneburg N. W., Guicciardi M. E., Yin X. M., Gores G. J. 2004. TNF-α-mediated lysosomal permeabilization is FAN and caspase 8/Bid dependent. Amer. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. 287 : G436—G443.

Xue L. Y., Chiu S. M., Fiebig A., Andrews D. W., Oleinick N. L. 2003. Photodamage to multiple Bcl-xL isoforms by photodynamic therapy with the phthalocyanine photosensitizer Pc 4. Oncogene. 22 : 9197—9204.

Yan C. H., Liang Z. Q., Gu Z. L., Yang Y. P., Reid P., Qin Z. H. 2006. Contributions of autophagic and apoptotic mechanisms to CrTX-induced death of K562 cells. Toxicon. 47 : 521—530.

Yao J., Zhang G. J. 1996. Loss of lysosomal integrity caused by the decrease of proton translocation in methylene blue-mediated photosensitization. Biochim. biophys. acta. 1284 : 35—40.

Yap Y. W., Whiteman M., Bay B. H., Li Y., Sheu F. S., Qi R. Z., Tan C. H., Cheung N. S. 2006. Hypochlorous acid induces apoptos is of cultured cortical neurons through activation of calpains and rupture of lysosomes. J. Neurochem. 98 : 1597—1609.

Yin L., Stearns R., Gonzalez-Flecha B. 2005. Lysosomal and mitochondrial pathways in H_2O_2-induced apoptosis of alveolar type II cells. J. Cell. Biochem. 94 : 433—445.

Yu Z., Persson H. L., Eaton J. W., Brunk U. T. 2003. Intralysosomal iron, a major determinant of oxidant-induced cell death. Free Radic. Biol. Med. 34 : 1243—1252.

Yuan X. M., Li W., Brunk U. T., Dalen H., Chang Y. H., Sevanian A. 2000. Lysosomal destabilization during macrophage damage induced by cholesterol oxidation products. Free Radic. Biol. Med. 28 : 208—218.

Yuan X. M., Li W., Dalen H., Lotem J., Kama R., Sachs L. Brunk U. T. 2002. Lysosomal destabilization in p53-induced apoptosis. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 99 : 6286—6294.

Zang Y., Beard R. L., Chandraratna R. A., Kang J. X. 2001. Evidence of a lysosomal pathway for apoptosis induced by the synthetic retinoid CD437 in human leukemia HL-60 cells. Cell Death Differ. 8 : 477—485.

Zdolsek J.M., Svensson I. 1993. Effect of reactive oxygen species on lysosomal membrane integrity. A study on a lysosomal fraction. Virchows Arch. B. Cell Pathol. Incl. Mol. Pathol. 64 : 401—406.

Zdolsek J. M., Olsson G. M. Brunk U. T. 1990. Photooxidative damage to lysosomes of cultured macrophages by acridine-orange. Photochem. Photobiol. 51 : 67—76.

Zhao H., Cai Y., Santi S., Lafrenie R., Lee H. 2005a. Chloroquine-mediated radiosensitization is due to the destabilization of the lysosomal membrane and subsequent induction of cell death by necrosis. Radiat. Res. 164 : 250—257.

Zhao H. F., Wang X., Zhang G. J. 2005b. Lysosome destabilization by cytosolic extracts, putative involvement of $Ca(2^+)$/phospholipase C. FEBS Lett. 579 : 1551—1556.

Zhao M., Antunes F., Eaton J. W., Brunk U. T. 2003. Lysosomal enzymes promote mitochondrial oxidant production, cytochrome *c* release and apoptosis. Eur. J. Biochem. 270 : 3778—3786.

Zhao M., Brunk U. T., Eaton J. W. 2001a. Delayed oxidant-induced cell death involves activation of phospholipase A2. FEBS Lett. 509 : 399—404.

Zhao M., Eaton J. W., Brunk U. T. 2001b. Bcl-2 phosphorylation is required for inhibition of oxidative stress-induced lysosomal leak and ensuing apoptosis. FEBS Lett. 509 : 405—412.

Поступила 18 XI 2010

LYSOSOMAL MEMBRANE PERMEABILIZATION AS APOPTOGENIC FACTOR

A. B. Pupyshev

Novosibirsk State Medical University;
e-mail: apupyshev@mail.ru

Lysosomal membrane labilizing agents (incl. proapoptotic proteins of Bcl-2 family, LAPF, p53), estimation of lysosomal membrane permeabilization in living cells, the new data on differential permeabilization of lysosomal membranes, membrane stabilizing factors (incl. Hsp70), relations between lysosomal membrane damage, and initiation of apoptosis were considered. Signal effect of lysosomal membrane permeabilization is caused preferentially by release of cathepsin B and D in cytosol. Subsequent numerous pathways of apoptogenic signalization include proteolytic attack/activation on signal cytosolic proteins, mitochondria, procaspases, cell nuclei. The mainstream of the cell damage is connected with activation pf proapoptotic Bid and Bax, leading to permeabilization of the outer mitochondrial membrane, release of cytochrome *c* into cytosol and activation of caspase cascade. Translocation of the lysosoma enzymes in cytosol is capable to induce both the caspase-dependent and caspase-independent paths of apoptosis.

Key words: apoptosis, cathepsin B, cathepsin D, lysosomal membrane permeabilization, lysosomes, necrosis.