

Федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего образования
«Сибирский государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации

Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Томский национальный исследовательский медицинский центр
Российской академии наук»

Л.В. Спирина, Д.И. Кузьменко, М.Н. Стахеева,
Г.В. Какурина

МЕДИЦИНСКАЯ БИОХИМИЯ: ПАТОХИМИЯ, ДИАГНОСТИКА

ИЗБРАННЫЕ ЛЕКЦИИ

В 2-х частях. Часть 1

УЧЕБНОЕ ПОСОБИЕ

Томск
Издательство СибГМУ
2023

УДК 577.1:616-098](075.8)
ББК 52.57я73+52.526я73
М422

Авторы:

Л.В. Спирина, Д.И. Кузьменко, М.Н. Стахеева, Г.В. Какурина

Медицинская биохимия: патохимия, диагностика.
М 422 **Избранные лекции:** учебное пособие. В 2 ч. Ч. 1. / Л.В. Спирина
[и др.]. – Томск: Изд-во СибГМУ, 2023. – 150 с.

Учебное пособие состоит из двух частей, содержащих лекции по актуальным проблемам медицинской биохимии, нацеленной на изучение особенностей патологических биохимических процессов на клеточном уровне. На примере отдельных заболеваний показана значимость биохимических и молекулярных особенностей процессов программируемой, регулируемой клеточной гибели, активности ферментов лизосом, митохондриального окисления, особенностей синтеза и созревания белков. Представлены методические подходы, используемые в экспериментальной биохимии.

Материал пособия способствует формированию профессиональных компетенций: проведению и оценке результатов лабораторных исследований в целях распознавания состояния или установления факта наличия или отсутствия заболевания.

Пособие подготовлено в соответствии с Федеральным государственным образовательным стандартом высшего образования по специальности 30.05.01 – Медицинская биохимия: Биохимия злокачественного роста.

Издание предназначено для контроля знаний и самостоятельной подготовки к практическим занятиям по Медицинской биохимии для студентов медико-биологического факультета, для дополнительного контроля полученных знаний по биохимии студентов врачебных факультетов, а также для подготовки к процедуре аккредитации специалистов.

УДК 577.1:616-098](075.8)
ББК 52.57я73+52.526я73

Рецензент:

Иванов Владимир Владимирович – руководитель центра доклинических исследований, кандидат биологических наук, доцент кафедры биохимии и молекулярной биологии с курсом клинической лабораторной диагностики.

Учебное пособие утверждено и рекомендовано к печати Методической комиссией по группе специальностей в области лабораторной медицины МБФ ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России (протокол №3 от 27.10.2022 г.).

© Л.В. Спирина, Д.И. Кузьменко, М.Н. Стахеева, Г.В. Какурина, 2023
© Издательство СибГМУ, 2023

СОДЕРЖАНИЕ

Список сокращений	4
Лекция 1. КЛЕТКА. ПАТОЛОГИЯ КЛЕТКИ (Л.В. Спирина)	6
Лекция 2. АПОПТОЗ И КАСПАЗЫ. ПРОГРАММИРУЕМАЯ И РЕГУЛИРУЕМАЯ КЛЕТОЧНАЯ ГИБЕЛЬ (Л.В. Спирина)	19
Лекция 3. АКТИВНЫЕ ФОРМЫ КИСЛОРОДА И СВОБОДНОРАДИАЛЬНОЕ ОКИСЛЕНИЕ БИОМОЛЕКУЛ. АНТИОКСИДАНТНАЯ ЗАЩИТА КЛЕТОК (Д.И. Кузьменко)	36
Лекция 4. ЭНДОПЛАЗМАТИЧЕСКИЙ РЕТИКУЛУМ. МИКРОСОМАЛЬНОЕ ОКИСЛЕНИЕ МИКРОСОМЫ. СТРЕСС ЭНДОПЛАЗМАТИЧЕСКОГО РЕТИКУЛУМА (Л.В. Спирина)	85
Лекция 5. ЛОКАЛИЗАЦИЯ ФЕРМЕНТОВ В КЛЕТКЕ. ДЕГРАДОМ ВНУТРИКЛЕТОЧНЫЙ, ТРАНСМЕМБРАННЫЙ И ВНЕКЛЕТОЧНЫЙ (Г.В. Какурина)	105
Лекция 6. ЛИЗОСОМЫ. АУТОФАГИЯ (Л.В. Спирина)	127
Рекомендуемая литература	148

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АДФ	– аденозиндифосфорная кислота
АО	– антиоксидант
АОЗ	– антиоксидантная защита
АТФ	– аденозинтрифосфорная кислота
АФК	– активные формы кислорода
АФОА	– активная форма оксида азота
ГПО	– глутатионпероксидаза
ГПО-ФЛ	– глутатионпероксидаза фосфолипидов
ГР	– глутатионредуктаза
ГТФ	– гуанозинтрифосфорная кислота
ДНК	– дезоксирибонуклеиновая кислота
ЛПВП	– липопротеины высокой плотности
ЛПНП	– липопротеины низкой плотности
ЛПОНП	– липопротеины очень низкой плотности
МДА	– малоновый диальдегид
МПО	– миелопероксидаза
НАДН ⁺ Н ⁺	– никотинамидадениндинуклеотид восстановленный
НАДФН	– никотинамидадениндинуклеотидфосфат восстановленный
НВЛ, англ. NETs	– нейтрофильные внеклеточные ловушки
ПОЛ	– перекисное окисление липидов
ПОС	– пероксисомы
РНК	– рибонуклеиновая кислота
СОД	– супероксиддисмутаза
СР	– свободные радикалы
СРО	– свободнорадикальное окисление
ТФ	– токоферол
ФЛ	– фосфолипиды
цАМФ	– циклический аденозинмонофосфат
цГМФ	– циклический гуанозинмонофосфат
ЦНС	– центральная нервная система
ШО	– шиффовы основания (основания Шиффа)
ШЭР (rER)	– шероховатый ЭР
ЭПР	– эндоплазматический ретикулум

ЭР (ER)	– эндоплазматический ретикулум
Apaf-1	– apoptotic protease activating factor-1 или апоптотический фактор активации протеазы-1
Bak–Bcl-2	– homologous antagonist / killer
Bcl-2	– B-cell lymphoma 2
Bcl-XL	– B-cell lymphoma-extra large
Bcl-XS	– B-cell lymphoma-extra
Bax	– Bcl-2-associated X protein
DISC	– death-inducing signaling complex, или комплекс, индуцирующий клеточную смерть
eNOS	– эндотелиальная изоформа NO-синтазы (NOS)
FADD	– Fas-associated death domain
GSH	– глутатион восстановленный
GSSG	– глутатион окисленный
IAP	– белковый ингибитор апоптоза
ICE	– interleukin converting enzyme
iNOS	– индуцибельная изоформа NO-синтазы (NOS)
JNK	– c-Jun N-terminal kinase, N-концевая киназа JUN
LAMP2	– лизосом-ассоциированный белок
LC3	– cytosolic-associated protein light chain 3
NCCD	– Комитет по номенклатуре клеточной смерти
NETоз	– нетоз
nNOS	– нейрональная изоформа NO-синтазы (NOS)
NOS	– синтаза оксида (монооксида) азота
PAR	– поли(АДФ-рибозы)
PCD	– programmed cell death /запрограммированная клеточная гибель
RCD	– Regulated cell death регулируемая клеточная гибель
PRRs	– Pattern recognition receptors
RIPK3	– receptor-interacting protein kinase 3
TNF α	– фактор некроза опухоли
TRADD	– TNF-receptor death domain
ULK1	– serine/threonine-proteinkinase ULK1
UPR	– (unfolded protein response) ответ развернутого белка
VEGF	– фактор роста эндотелия сосудов
Vps34	– vacuolar sorting protein 34

Лекция 1

КЛЕТКА. ПАТОЛОГИЯ КЛЕТКИ

Основная единица живого – клетка. Она представляет собой некую физическую сущность. Такие свойства живого, как способность размножаться, видоизменяться и реагировать на раздражение, в более мелких единицах материи не проявляются. Путем центрифугирования можно выделять клеточные органеллы. При этом оказывается, что фрагменты клетки способны в течение некоторого времени выполнять многие из её функций: поглощать кислород, сбраживать сахара и даже синтезировать белки и нуклеиновые кислоты. Однако, сами по себе эти функции не составляют жизни. Разрушенная клетка уже не способна существовать неопределенно долго. Поэтому мы делаем вывод, что клетка – это самая элементарная единица, способная поддерживать жизнь.

Чтобы узнать, каким образом построена клетка и как она работает, необходимо прибегнуть к языку биохимии. Клетку называют биохимической «машиной», и биохимия позволяет изучать механизмы функционирования клетки на уровне молекул, входящих в её состав – белков, жиров, углеводов.

ИЗУЧЕНИЕ КЛЕТКИ

Мы не можем наблюдать клетки визуально. Для того, чтобы войти в мир клетки мы должны уподобить себя до размеров бактерий и вирусов, т.е. уменьшиться примерно в миллион раз во всех трех измерениях. Если мы останемся такими как есть, тогда мы должны увеличить клетку в миллион раз и клетка вырастет до размеров аудитории. Теперь мы можем остановиться на любой части клетки, привлекающей наше внимание, и различить отдельную её деталь, вплоть до молекулы.

В течение длительного времени клетки изучали в основном путем наблюдения за ними. Но по мере развития экспериментального метода в естественных науках к нему начали прибегать и при исследовании живых организмов. Это в значительной степени облегчалось мощным взрывом биомедицинских исследований, проводимых во второй половине прошлого столетия. Физиология, фармакология, генетика, бактериология, иммунология – все эти науки помогли и помогают проникнуть в мир живой клетки и лучше узнать его.

Наиболее значительные события произошли в 1945 г. Именно тогда, в конце второй мировой войны, благодаря удивительному стечению обстоятельств почти в одно и то же время наука обогатилась целым рядом новых мощных инструментов и методов исследования.

Созданный ещё в 30-е годы, электронный микроскоп обладал достаточной разрешающей способностью, позволяющей проникнуть в ранее неизвестное пространство клетки. В свою очередь биохимия также обогатилась целым рядом принципиально новых приборов и методов. К таким методам, прежде всего, относится хроматография, открытая в 1904 г. Михаилом Семеновичем Цветом – русским физиологом и биохимиком растений. М.С. Цвет умер относительно молодым, и потенциальные возможности его замечательного метода долгое время, вплоть до 40-х годов, оставались неиспользованными. Близким к хроматографии является электрофорез в геле. Благодаря этим методам на следовых количествах смеси веществ можно без особых усилий провести анализ материала.

Вторым методом, радикально изменившим химическое исследование живых клеток, был радиоизотопный метод. Преимущество исследований с помощью изотопов заключается в том, что они используются для специфического мечения определенных молекул, так что эти молекулы можно узнать и отличить от родственных им молекул почти без нарушения общей структуры. Хотя и морфология, и биохимия, обогащенные новыми методиками, постоянно совершенствовались, все же для ликвидации существующего между ними разрыва по-прежнему испытывалась необходимость в создании мостика. Этот разрыв становился все меньше по мере развития методов разделения клетки на фракции таким образом, что каждую из них можно было полностью изучить. Методы дифференциального центрифугирования, используемые сейчас в любой биохимической лаборатории, также стали использоваться в середине 40-х годов.

Самым значительным среди всех событий было открытие структуры двойной спирали ДНК Ф. Криком и Д. Уотсоном с помощью методов рентгеноструктурного анализа.

ПАТОЛОГИЯ КЛЕТКИ

Наряду с изучением строения клетки в науке постоянно рассматривались проблемы роста, размножения и гибели клеток.

В силу ряда необратимых процессов, например, протеолиза, клетка подвергается физиологической гибели. Гибель системы может

быть обусловлена и воздействием факторов, которые своими количественными или качественными воздействиями приводят в начале к обратимым, а затем необратимым сдвигам в клетке. Результатом воздействия будет или гибель системы, или восстановление её стационарного состояния, как правило на более низком уровне, чем ранее.

Факторы, вызывающие обратимые изменения можно охарактеризовать как «физиологические», а факторы, дающие необратимые сдвиги, приводящие к возникновению заболеваний, являются «патологическими». Совокупность этих факторов приводит к более или менее известным изменениям в течении биологических процессов.

Впервые клеточную теорию в патологии развил Р. Вирхов, о чем свидетельствует название его книги «Клеточная патология», опубликованной в 1858 г. Все многообразие функций клетки является настолько сложным, что ни с помощью химических уравнений, ни с помощью математических формул невозможно описать их полностью. Ещё более сложно обстоит дело с клеткой, функционирующей в условиях патологического процесса.

Изучение молекулярных основ патогенеза болезней требует знания механизмов взаимодействия отдельных, клеточных органелл и механизмов регуляции метаболизма клетки. Общие и специальные биохимические знания должны применяться для расшифровки явлений или процессов, характеризующих течение заболевания, т.е. патологических процессов.

Исследования патологических процессов в клетках, как правило, проводятся на животных, в экспериментальных условиях. Биохимическое обследование человека, как вы понимаете, весьма ограничено, в основном оно возможно при исследовании биологических жидкостей: крови, мочи, слюны и спинномозговой жидкости. Взятие же биопсийных проб возможно лишь в экстренных случаях, когда это необходимо сделать в интересах больного по жизненным показаниям. В связи с этим, важным моментом изучения патохимии клетки является создание экспериментальных моделей, адекватно отражающих изменения, происходящие в организме человека.

Одной из таких моделей является экспериментальный гепатит, вызываемый при введении четыреххлористого углерода крысам. Эту моделью пользуются при изучении биохимических изменений, характерных для гепатоцитов при токсическом гепатите.

Для чего необходимо изучать молекулярные механизмы патогенеза болезней? Познание механизмов развития патологии помогает

определить стратегию лечения. Это особенно важно, когда причиной заболевания является молекулярная патология, которая развивается в результате нарушения структуры отдельных метаболитов. Примерами применения данных патохимии клетки является заместительная терапия: использование инсулина при недостаточной выработке его клетками поджелудочной железы при сахарном диабете и гормонов щитовидной железы при тиреоидном кретинизме.

Ещё одним примером является использование липосом в качестве переносчиков лекарств в клетку. Известно, что в клетках, подвергнутых злокачественному перерождению, т.е. раковых клетках, значительно снижается уровень циклического АМФ (цАМФ), одного из посредников между химическими сигналами, поступающими в клетку (гормонами и другими биологически активными веществами) и непосредственными метаболическими реакциями клетки. Очевидно, что, повысив уровень цАМФ, можно подавить рост раковых клеток. Но лечить с помощью цАМФ нельзя, так как цАМФ в клетку не проникает. Выход был найден на основании изучения структуры мембран клетки. Было выяснено, что липосомы, известные первоначально как модельные мембраны в биофизических исследованиях, способны служить эффективными носителями для введения в клетку биологически активных веществ. Мембраны липосом представляют собой липидный бислой, сходный с липидным бислоем природных мембран.

С помощью липосом можно вводить в клетку гидрофобные (холестерол) и гидрофильные (цАМФ) вещества, полностью сохраняя физико-химические свойства вводимых препаратов. Итак, было показано, что цАМФ, включенный в матрикс липосом, тормозит размножение опухолевых клеток.

Для того, чтобы выявить биохимические изменения клеток при патологии, рассмотрим функции плазматической мембраны клетки, митохондрий, пероксисом, лизосом и эндоплазматического ретикула в норме и при патологии, типы повреждения клеток.

ТИПЫ ПОВРЕЖДЕНИЙ КЛЕТОК

В зависимости от вида повреждающего агента соотношения специфических и неспецифических повреждений клетки может быть различным. Эти повреждения мы частично рассмотрели при изучении общего адаптационного синдрома. Имеется также классификация повреждений клетки в зависимости от участия в них клеточных орга-

нелл. Выделяют следующие типы повреждений: перекисный, гипоксический, токсический и апластический.

1. *ПЕРЕКИСНЫЙ* тип характеризуется стимуляцией образования гидроперекисей, изменением активности антиокислительных систем, повреждением мембран клетки.

2. *ГИПОКСИЧЕСКИЙ* тип характеризуется снижением энергопродукции, нарушением функции митохондрий, подавлением биосинтетических процессов.

3. *ТОКСИЧЕСКИЙ* тип связан с непосредственным влиянием продуктов на метаболизм. Для этого типа характерна активация микросомального окисления чужеродных веществ с помощью цитохромов P-450 и b5.

4. *АПЛАСТИЧЕСКИЙ* тип связан с недостатком питания, активацией лизосомального аппарата и распадом эндогенных клеточных структур. Значительная роль в осуществлении апластического типа повреждения клетки принадлежит лизосомам. Иначе его ещё называют лизосомный тип.

ТИПЫ ГИБЕЛИ КЛЕТОК

Существует 2 типа гибели клеток – некроз и апоптоз. *НЕКРОЗ* обычно ассоциируется с действием экстремальных факторов, нарушением целостности мембраны, увеличением размеров клеток, набуханием органелл. Появление очагов некроза сопровождается воспалением. При некрозе происходит лизис внутриклеточных структур, разрыв их мембран. Некроз рассматривается как метаболическая катастрофа, вызванная тяжелыми структурными повреждениями. Примеры некроза: гибель клеток от гипоксии, токсинов, комплемент-зависимый цитолиз (табл. 1).

АПОПТОЗ – гораздо более распространенное явление, чем некроз. При апоптозе происходит сморщивание клеток, уменьшение их объема, уплотнение гранул. Основным признаком апоптоза является изменение состояния ДНК. В ДНК образуются одно- и двунитиевые разрывы, формируются сначала крупные, затем мелкие фрагменты ДНК. В отличие от некроза, апоптоз зависит от нарушения энергетических процессов в клетке. Апоптоз является иммунологически инертным событием, гибнущие клетки подвергаются фагоцитозу макрофагами, но это не вызывает развития воспалительной реакции.

Характеристика некроза и апоптоза

Некроз	Апоптоз
Набухание, увеличение размеров клетки Лизис гранул, разрыв мембран Набухание ядра Неупорядоченная деградация ДНК Без затрат энергии	Сморщивание, уменьшение размеров клетки Конденсация цитоплазмы, уплотнение гранул Пикноз, фрагментация ядра Фрагментация ДНК, наличие «лестницы» при ЭФ Энергозависимость
Примеры	
Гибель клеток от гипоксии Действие токсинов Повреждение мембраны Комплементзависимый цитолиз	Селекция Т- и В-лимфоцитов Глюкокортикоид-индуцированная гибель тимоцитов Интерфазная гибель клеток Гибель клеток при отсутствии ростовых факторов

ПРОЦЕСС ПОВРЕЖДЕНИЯ КЛЕТКИ ПРИ НЕКРОЗЕ

Среди многих причин, вызывающих гибель клеток по некротическому типу, на первом месте стоит *ИШЕМИЯ*. Первично она развивается на фоне сердечно-сосудистых заболеваний и травм, а в ряде других случаев, она является ведущим типом повреждения клеток.

Ишемию обычно определяют, как снижение притока крови к тканям, что сопровождается снижением концентрации кислорода и субстратов окисления. По степени выраженности ишемия может быть полной или частичной. В эксперименте полную ишемию моделировать не удастся в связи с системой коллатерального кровообращения, да и на практике она проявляется не так уж часто.

Процесс повреждения и гибели клеток в условиях ишемии был исследован на тканях трех типов: на миокарде, почках и в печени, для которых эта патология имеет существенное значение.

С биохимической точки зрения у клеток чаще всего исследуют:

- фазу начальных изменений;
- фазу обратимых изменений;
- фазу необратимых изменений;
- фазу появления некроза.

Рассмотрим эти стадии гибели клетки.

ФАЗА НАЧАЛЬНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ

В случае ишемии ситуация более или менее ясна: речь идет о прекращении поступления кислорода и субстратов и о замедлении выведения продуктов обмена веществ. Все это в начальной фазе не сопровождается структурными изменениями, и проявляется в виде нарушений обмена энергии, что и является основным типом функциональных нарушений клетки как в этой стадии, так и в последующей.

В физиологических условиях кислород, как известно, проникает внутрь митохондрий путем свободной диффузии, где и становится конечным акцептором электронов в системе транспорта электронов по дыхательной цепи. Транспорт электронов в системе обеспечивает векторный перенос протонов через внутреннюю митохондриальную мембрану. Возникший градиент протонов становится кладовой энергии, находящейся в двух формах: 1) в форме градиента концентрации, созданного разницей концентрации протонов (H^+) и, следовательно, разными значениями рН по обеим сторонам внутренней митохондриальной мембраны; 2) в форме электрического градиента, обусловленного разной концентрацией зарядов. Концентрационный градиент обеспечивает энергией образование АТФ, АДФ, неорганического фосфата и, кроме того, способствует транспорту Ca^{2+} из цитоплазмы в митохондрии, связанного с Na^+/H^+ обменом. В физиологических условиях протоны никаким другим способом не могут пройти через внутреннюю митохондриальную мембрану.

В случае снижения или даже прекращения притока кислорода происходит следующее: прекращается транспорт электронов по дыхательной цепи, так как отсутствует конечный акцептор. В результате этого прекращается создание градиента протонов. В дальнейшем прекращается транспорт Ca^{2+} внутрь митохондрий и, более того, отмечается обратное направленное движение этих ионов, так как обычно концентрация Ca^{2+} в митохондриях значительно превышает их содержание в цитоплазме. Прекращается выход Na^+ из митохондрий и замедляется или останавливается синтез АТФ. В дальнейшем:

- изменяется соотношение концентрации адениловых нуклеотидов
 $[АТФ] / [АДФ] + [АМФ]$;
- активируется гликолиз, увеличивается концентрация лактата;
- снижается концентрация субстратов цикла трикарбоновых кислот.

Однако, активность ферментов дыхательной цепи не изменяется на протяжении всего периода обратимого поражения клетки. Их обратимость и обусловлена, тем, что после восстановления притока кислорода и субстратов транспорт электронов и образование АТФ восстанавливается в полном объеме.

ФАЗА ОБРАТИМЫХ ИЗМЕНЕНИЙ

Среди субклеточных структур изменения чаще всего встречаются в митохондриях. По мере снижения образования АТФ наблюдается конденсация матрикса митохондрий. Эта ситуация напоминает физиологическую стадию перехода от состояния покоя митохондрий к активному дыханию, которая регулируется содержанием АДФ. В физиологических условиях при избытке АДФ матрикс приобретает «конденсированную форму», но в присутствии кислорода моментально увеличивается транспорт электронов, усиливается окислительное фосфорилирование, и матрикс вновь принимает «ортодоксальную форму».

Конденсация матрикса митохондрий осуществляется за счет изменения конформации структур матрикса. Кроме того, в матриксе начинают накапливаться ионы натрия и вода за счет усиления проницаемости внутренней митохондриальной мембраны. Матрикс постепенно приобретает вид, очень похожий на «ортодоксальный», но затем он увеличивается в объеме, что проявляется увеличением объема всей митохондрии и деформацией крист. Постепенное снижение рН матрикса митохондрии приводит к частичной денатурации находящихся в нем белков, что проявляется наличием мелких хлопьевидных структур, содержащих, как правило, Ca^{2+} . И все-таки до этого момента все структурные изменения митохондрий обратимы.

Мембранные структуры эндоплазматического ретикулума (ЭПР) вначале не подвергаются никаким изменениям, но их проницаемость увеличивается.

Ядро клетки с самого начала возникновения гипоксии подвергается ряду изменений, прогрессивно усугубляющихся, но ещё обратимых. Прежде всего, это относится к перераспределению хроматина в ядре, что зависит от постоянного снижения рН среды и представляет собой основу для прекращения синтеза РНК.

В стадии обратимого повреждения клетки возможно восстановление гомеостаза при увеличении кровотока и притока кислорода, структурные изменения клетки и её органелл при этом исчезают.

ФАЗА НЕОБРАТИМЫХ ИЗМЕНЕНИЙ

Характеризуется углублением метаболических и структурных изменений. Клетка, на этой стадии, теряет способность поддерживать механизмы гомеостаза. В результате этого стимулируются процессы катаболизма, связанные, прежде всего, с лизосомами. Отмечается перераспределение ионов между цитоплазмой клетки и окружающей средой, что в конечном итоге приводит к выравниванию их концентраций внутри и снаружи клетки. Происходит набухание митохондрий, они теряют способность к синтезу АТФ. Из митохондриальных мембран исчезают молекулы фосфатидилхолина и фосфатидилсерина и возникают мультимембранные структуры, похожие на липосомы, что, очевидно, обусловлено взаимодействием фосфатидных кислот, возникающих в результате расщепления фосфолипидов. Рибосомы отделяются от мембран ЭПР, а плазматические мембраны становятся проницаемыми для макромолекул (белки, ферменты).

Можно наблюдать первые признаки фрагментации мембран, сопровождающихся проникновением витальных красителей внутрь клетки. Лизосомы начинают увеличиваться в объеме.

ФАЗА ПОЯВЛЕНИЯ ЗОН НЕКРОЗА

Характеризуется прогрессирующей дезинтеграцией клеточных структур. Происходит расщепление молекул ДНК, РНК и белков, наблюдается увеличение неорганического фосфата и аминокислот в клетке.

Особая роль в процессе деградации макромолекул отводится гидролазам, выходящим из лизосом и активируемых кислой реакцией среды. Разрушается структура ядра, образуются фрагменты мембран митохондрий, ЭПР. Происходит снижение рН среды до 4,0–5,0. В опытах на почках крыс, проведенных при 0 °С, нормальные значения всех ключевых метаболитов и ультраструктурных характеристик отмечались на протяжении 2 ч после начала ишемии. При 37 °С этот период для клеток почек составлял 25–40 мин.

В зависимости от факторов, вызывающих указанные изменения, и интенсивности их воздействия они сказываются только на скорости указанных процессов, но ни в коей мере на их последовательности. В ряде случаев, например, при тяжелом ожоге, необратимые изменения происходят мгновенно и некроз является первым признаком поражения клеток.

ТЕПЛОВОЙ ОЖОГ КАК ПРИМЕР ПОВРЕЖДЕНИЯ КЛЕТОК ПРИ НЕКРОЗЕ

Местом приложения действия теплового ожога являются молекулы белков, которые подвергаются структурным изменениям различного характера: от обратимой денатурации до минерализации с освобождением углерода при обугливании. Местом проявления действия теплового ожога в первую очередь становятся молекулы белков мембран эндотелиальных клеток капилляров кожи. В результате повреждения повышается проницаемость эндотелия, и плазма крови (главным образом, альбумин) выходит в интерстиций. В интерстициальном пространстве накапливается содержащая альбумин жидкость, наблюдается отек. Увеличению объема ткани в месте повреждения способствует и нарушение транспортных процессов в мембранах клеток пораженной области. Скопление жидкости в интерстиции приводит к повышению притока крови к пораженному участку. В очаге некроза происходит снижение рН, активируются протеолитические ферменты. В результате этого образуются биологически активные вещества, прежде всего, брадикинин. Брадикинин усиливает проницаемость, вызывает дилатацию сосудов, стимулирует образование простагландина E₂. Важным свойством брадикинина является его стимулирующее действие на деление лимфоцитов, связанное с модификацией иммунного ответа.

При обратимых изменениях мембран и транспортных механизмов постепенно восстанавливается исходное состояние, а отек исчезает. В противном случае, поврежденные клетки постепенно погибают. До сих пор неизвестно никакого химического метода, с помощью которого можно было бы в данной ситуации отличить обратимые и необратимые изменения мембран.

При очень сильном тепловом воздействии часть клеток погибает уже в момент его приложения и продукты их распада покрывают большую или меньшую часть поверхности (некрозы). Так как участки некроза лишены каких-либо защитных свойств, они становятся благоприятной почвой для микробов самых разных видов.

Так как с момента ожога пораженный организм постоянно и длительно находится под влиянием катехоламинов (адреналина), высвобождающихся в результате центрального влияния, что вызвано стрессом (боль, страх и т.п.), он в течение первых часов после травмы может обеспечить себе необходимый уровень глюкозы за счет расщепления гликогена в печени (переход фосфоорилазы b в фосфоорилазу

а). Однако, запасы гликогена в печени (около 200 г) будут исчерпаны в течение нескольких часов.

Для создания необходимого уровня глюкозы в крови будут включаться дополнительные механизмы, в том числе активация глюконеогенеза. Глюкоза в этом случае образуется из аминокислот с разветвленной цепью – валина, изолейцина, лейцина, высвобождающихся в результате внутриклеточного гидролиза. После переаминирования и декарбоксилирования они через сукцинил-КоА превращаются в оксалоацетат и пируват. Пируват, с помощью той же трансаминазы, превращается в аланин, который с кровью переносится в печень, где дезаминируется. Пируват в процессе глюконеогенеза в печени превращается в глюкозу.

В течение первых дней после повреждения этим путем разрушается до 75 г мышечных белков ежедневно. Затем это количество снижается. Расщепление белков сопровождается выходом K^+ из клеток и его повышенным выведением из организма. Потеря 1 г азота с мочой обычно сопровождается потерей 2,5–3,0 молей K^+ .

Ускоряется разрушение жиров и жирных кислот путем окисления в гепатоцитах, что приводит к увеличению содержания ацетил-КоА. Возникает относительная недостаточность пирувата, следовательно, и оксалоацетата, который мог бы возникнуть из пирувата в результате реакций карбоксилирования. Поэтому избыток ацетил-КоА не может быть превращен в цитрат и затем окислен в цикле трикарбоновых кислот. Он становится источником кетоновых тел (ацетоацетата и β -гидроксибутирата), которые вместе с лактатом способствуют возникновению метаболического ацидоза.

Было показано, что при обширных ожогах повышенное испарение воды с раневой поверхности, видимо, не является первичной причиной повышения обмена веществ, как предполагалось раньше. Очевидно, стимуляция метаболизма осуществляется в результате усиленного продуцирования адреналина. Под влиянием адреналина происходит разобщение окислительного фосфорилирования и усиленное выделение тепла. Наряду с этим усиливается гидролиз АТФ, следствием чего является повышение температуры тела. Поэтому всегда нужно стараться снизить образование или ослабить действие адреналина. После коррекции параметров внутренней среды нужно обеспечить достаточный приток энергии, возместить потерю белков и обеспечить достаточный перенос кислорода к пораженным клеткам.

АПОПТОЗ

Феномен апоптоза известен как физиологическая, запрограммированная гибель клеток, а в переводе с греческого он означает «опадание» (листьев с деревьев, лепестков с цветов). Термин был введен J. Kerr в 1972 г. для обозначения процесса противоположного митозу. *Апоптоз* – это гибель клеток путем самоликвидации, происходящая в нормальных и патологически измененных тканях. Синонимами термина апоптоз являются «активная гибель клетки», «физиологическая гибель клетки».

Гибель клеток обнаруживается на самых ранних стадиях эмбриогенеза: при формировании органов, замене одних тканей на другие, резорбции временных органов. Во взрослом организме клеточная гибель необходима для регуляции популяций клеток. Апоптоз составляет основу таких важных процессов как позитивная и негативная селекция Т- и В-лимфоцитов, гибель лимфоцитов, индуцированная глюкокортикоидами, интерфазная гибель тимоцитов при облучении, гибель при дефиците ростовых факторов.

Благодаря апоптозу организм защищен от вирусных инфекций. В свою очередь многие вирусы содержат гены, кодирующие белки с антиапоптотической активностью. Иммунодефицит при ВИЧ-инфекции определяется нарушениями в контроле апоптоза. Многие противоопухолевые препараты индуцируют этот процесс. Массовая апоптотическая гибель клеток является причиной спонтанного исчезновения опухоли, наблюдаемого иногда в клинике.

На биохимическом уровне для апоптоза характерна энзиматическая межнуклеосомная фрагментация ядерной ДНК. Сначала происходит образование крупных фрагментов ДНК, содержащих 700, 200–250, 50–70 тысяч пар оснований (т.п.о.), несколько позже 30–50 т.п.о. Уже на этой стадии регистрируются конденсация хроматина и выпячивание ядерной мембраны, характерные для апоптоза.

При электрофорезе ДНК апоптотических клеток выявляется характерная «лесенка». Этот показатель широко используется для идентификации апоптоза. Анализ электрофореграмм при некрозе, развивающемся как следствие нарушения целостности клетки свидетельствует о «размазанном» характере зоны миграции ДНК. Наличие «лестницы» при электрофорезе ДНК характеризует процессы: 1) межнуклеосомной дегградации ДНК и 2) появление двунитевых разрывов между нуклеосомами с формированием фрагментов, содержащих

180–190 т.п.о., соответствующих протяженности нитей ДНК в нуклеосоме. Именно эти фрагменты выявляются в виде «лестницы».

Деградация ДНК происходит при участии ферментов. Межнуклеосомная деградация ДНК при апоптозе обусловлена активацией ядерной Ca^{2+} , Mg^{2+} -зависимой эндонуклеазы. Некоторые авторы предполагают участие в этом процессе ДНКаз I или II.

Существуют морфологические и биохимические методы изучения апоптотической гибели клетки. Наиболее важным маркером апоптоза является фрагментация ДНК при электрофоретическом разделении в агарозном геле (табл. 2).

Таблица 2

Показатели апоптоза

Морфологические	Конденсация ядерного материала, образование апоптотических телец
Электрофоретические	Фрагментация ДНК, наличие «лестницы»
Проточная цитофлуориметрия	Уменьшение размеров клеток, уменьшение окрашиваемости ДНК-тропными красителями
Биохимические	ICE (interleukin converting enzyme) CPP-32 (сериновая протеиназа) Ca-зависимая транслугаминаза (тип II)

ТИПЫ АПОПТОЗА

В зависимости от характера сигнала выделяют следующие типы апоптоза:

- 1) активационный;
- 2) вызванный глюкокортикоидами;
- 3) связанный с дефицитом факторов роста.

Примерами активационного апоптоза являются отрицательная селекция тимоцитов при активации антигенами, цитокинами, Fas-лигандом, элиминация аутореактивных Т-клеток в тимусе, селекция В-клеток в лимфоидных фолликулах.

Известно также удаление с помощью апоптоза стареющих нейтрофильных лейкоцитов и мегакариоцитов, потерявших большую часть своей цитоплазмы при образовании тромбоцитов. Под влиянием глюкокортикоидов гибнут популяции Т-клеток, локализованных в коре тимуса, и Т1-лимфоцитов крови. Популяции Т2-лимфоцитов и В-лимфоцитов не чувствительны к действию глюкокортикоидов.

Лекция 2

АПОПТОЗ И КАСПАЗЫ. ПРОГРАММИРУЕМАЯ И РЕГУЛИРУЕМАЯ КЛЕТочНАЯ ГИБЕЛЬ

Апоптотическая гибель представляется как запрограммированное событие, в этом процессе участвуют внеклеточные факторы – индукторы апоптоза. Согласно общепринятого мнения, пусковые сигналы и начальные механизмы его развития могут быть довольно разнообразными и лишь на определенном этапе они вливаются в единый путь, реализуются в виде стандартного механизма. Наиболее известные индукторы и ингибиторы апоптоза представлены в таблице 3.

Таблица 3

Индукторы и ингибиторы апоптоза

Индукторы	Ингибиторы
Глюкокортикоиды	Bcl-2 (bcl-x, BAX)
антигены	теломераза
цитокины	мутация p53
УФ и γ -излучение	p35
Ca^{2+}	Zn^{2+}
Fas / APO-1 (CD95)	ингибиторы синтеза РНК и белка
ced-3, ced-4	ингибиторы протеиназ
ФНО	интерферон- γ
ICE	
Церамид	
Ca^{2+} -зависимая трансглутаминаза (тип II)	
Фосфатидилсерин	
p53	
c-myc	

Fas-система (APO-1, CD 95). Наиболее хорошо изучены *Fas-лиганд (Fas L)* и *Fas-рецептор*, для которых пока неизвестны иные функции, чем индукция апоптоза.

Fas L может рассматриваться как цитокин, связанный с мембраной. Fas L экспрессируется на ограниченном числе клеточных типов (в случае Т-клеток – только на активированных формах). Гомологами Fas-системы являются TNF α (фактор некроза опухоли), CD 40, CD 27, TNF-RI. Следует подчеркнуть, что гомологи Fas и Fas L также имеют прямое отношение к апоптозу: TNF α является наиболее апоп-

тогенным из цитокинов. Fas-опосредуемый апоптоз участвует в элиминации дефектных и «отработавших» клеток и в предупреждении аутоиммунных и лимфопролиферативных процессов. Fas-система играет важную роль в развитии Т-клеток, цитотоксичности, удалении незрелых Т-клеток, реагирующих с аутоантигенами.

У мышей с мутациями CD95 развивается лимфоаденопатия и аутоиммунная патология, аналогичная системной красной волчанке. Недавно получены данные о том, что снижение CD4⁺ Т-клеток при СПИДе также связано с CD95-опосредованным апоптозом.

Выявлено целое семейство факторов CD95, куда входят рецептор и фактор роста нервов, В-клеточный антиген CD40, маркер активации Т-лимфоцитов CD27. CD95 и его гомолог TNF-RI имеют гомологичную последовательность во внеклеточной части молекул. Этот «домен смерти» абсолютно необходим для индукции цитотоксического сигнала. Цитоплазматический С-конец CD95 содержит «домен спасения», удаление которого усиливает цитотоксическую активность рецептора. «Домен смерти» TNF-RI взаимодействует с серин / треониновой протеинкиназой и запускает сигнальный механизм апоптоза. К вторичным (внутриклеточным) мессенджерам относят церамид, который включает последующие этапы апоптоза.

Ионы Ca²⁺. Роль ионов Ca²⁺ в осуществлении межнуклеосомной деградации ДНК и развитии апоптоза связывают с активацией Ca²⁺, Mg²⁺ -зависимой эндонуклеазы. Повышение внутриклеточной концентрации Ca²⁺ регистрируется при действии многих, но не всех индукторов апоптоза (например, глюкокортикоидов, антител к рецепторному комплексу TCD-CD3). Препараты, повышающие уровень Ca²⁺ (ионофоры) вызывают апоптоз тимоцитов, но не зрелых Т-клеток. Дело в том, что для активации апоптоза Т-клеток необходимо сочетанное действие ионофора Ca²⁺ и активатора протеинкиназы С (обычно для этой цели используют фоболмиристат), тогда как для включения апоптоза тимоцитов достаточно действия одного ионофора.

Ключевые механизмы на поздних этапах передачи сигнала связаны с экспрессией генов апоптоза и проявлением активности цистеиновых протеиназ семейства ICE (interleukin converting enzyme), а также сериновых протеиназ – гранзимов и цитолизиннов. ICE расщепляет предшественник ИЛ-1β.

К семейству цистеиновых протеиназ типа ICE относятся также CPP32, Nedd2 (Ich-I), которые принимают участие в деградации внут-

рикеточных белков, таких как ламин В, топоизомераза I, гистон РI, фосфолипаза А2, протеинкиназа С. Полагают, что эффект этих протеиназ является ключевым как для относительно ранних (формирование крупных фрагментов ДНК), так и заключительных этапов апоптоза, общих для всех его разновидностей.

Ca²⁺-зависимая трансглутаминаза (тип II). Активация этого фермента является обязательным и характерным биохимическим признаком апоптоза (маркер апоптоза). Этот фермент участвует в перекрестном сшивании мембранных белков, что в дальнейшем приводит к сморщиванию цитоплазматических гранул, формированию устойчивого к действию детергентов покрова, уплотнению и деформации наружной и внутренней мембран.

Асимметрия фосфолипидов. При апоптозе изменяется характер упаковки фосфолипидов. При этом устраняется асимметрия фосфолипидов мембраны. Так, фосфатидилсерин, находящийся во внутренней части мембраны, оказывается экспрессированным на наружной поверхности. Фосфатидилсерин является одним из мембранных маркеров апоптотических клеток, который распознается макрофагами. Это обеспечивает высокую эффективность фагоцитоза апоптотических клеток.

Белок р53. В 1982 г. С.Р. Уманским была предложена гипотеза о существовании в эукариотических клетках программы клеточной гибели. Предполагалось, что одной из функций программы является элиминация постоянно возникающих клеток с онкогенными свойствами. Подтверждением этой гипотезы является открытие белка р53, индуктора апоптоза и опухолевого супрессора.

Белок р53 является регулятором транскрипции, способным узнавать специфические последовательности ДНК. Ген р53 активирует несколько генов (WAF1 / Cip1, ингибитор циклин-зависимой киназы, ген остановки роста, р26-ген, вызывающий развитие рабдомиосаркомы), которые задерживают деление клеток в фазе G1. После действия факторов, вызывающих повреждение ДНК (радиация, +УФ-облучение) экспрессия гена р53 в клетках существенно усиливается. Под влиянием р53 клетки, имеющие множественные разрывы ДНК, задерживаются в фазе G1, а если входят в S-фазу (например, в случае опухолевой трансформации), то подвергаются апоптозу.

Мутация гена р53 позволяет клеткам с поврежденной ДНК завершать митоз, сохраняет клетки, подвергшиеся опухолевой трансформации, при этом клетки оказываются резистентными к лучевой и

химиотерапии. Мутантная форма белка p53 не обладает способностью останавливать клеточный цикл.

Среди ингибиторов апоптоза большое внимание уделяется ферменту теломеразе. Его считают ферментом «бессмертия». Сенсацией наших дней является информация об открытии фермента, позволяющего продлить жизнь человека до 150–200 лет. Теломераза – это клеточный фермент, обеспечивающий восстановление длины теломерного (концевого) участка хромосомной ДНК. Известно, что каждая хромосома имеет на всех своих окончания особую структуру, называемую теломерой. Этот участок содержит свыше тысячи нуклеотидных повторов T-T-G-G-G-G. ДНК-полимераза неспособна обеспечить репликацию концевых нуклеотидов в нити ДНК и с каждым последующим делением длина хромосомы становится короче на 10–20 теломерных фрагментов. После достижения определенной критической длины теломеры теряют способность поддерживать целостность хромосомы, и в ней может происходить нарушение структуры ДНК, несовместимое с нормальным существованием клетки.

В большинстве клеток нормальных тканей человека теломераза неактивна и поэтому клетки подвергаются апоптозу через 50–100 делений, считая от их образования из клетки-предшественницы (тысяча теломер на одном конце хромосомы / 10–20 теломер в одном клеточном цикле = 50–100 клеточных циклов). В клетках злокачественных опухолей ген теломеразы активен. Поэтому, несмотря на свою «старость» по количеству пройденных клеточных циклов и накопление большого количества мутационных изменений в структуре ДНК, продолжительность жизни злокачественных клеток в принципе почти не ограничена.

У человека теломераза функционирует только в эмбриональных клетках и семенниках, вырабатывающих сперматозоиды в течение всей жизни. Таким образом, длину теломеры можно образно сравнить с часами, определяющими возраст клетки, считая за единицу времени один клеточный цикл.

Обнаружение активной теломеразы в опухолевых клетках предполагает развитие нового направления в разработке противоопухолевых препаратов. Если раньше большинство таких препаратов использовали против быстро делящихся злокачественных клеток (при этом повреждались и клетки иммунной системы, костного мозга, кишечника), то антителомеразные препараты должны атаковать только опу-

холевые клетки, поскольку их мишень (теломераза) отсутствует в нормальных клетках.

Таким образом, наиболее характерные события происходят в ядре и выражаются в конденсации и фрагментации хроматина, деградации ДНК. В цитоплазме и мембранах клетки происходит активация сериновых и цистеиновых протеиназ, а также трансглутаминазы. Наиболее распространенными сигналами запуска являются индукторы апоптоза, к которым относятся глюкокортикоиды, цитокины, Fas-система, ионы кальция, белок p53. Антиапоптотической активностью обладают ингибиторы протеиназ, ионы цинка, теломераза – фермент «бессмертия клеток».

Роль апоптоза в регуляции физиологических процессов:

- обеспечивает запрограммированное уничтожение клеток при имплантации, эмбриогенезе, органогенезе;
- преобладает при некоторых гормонально зависимых физиологических изменениях;
- реализует гибель активно пролиферирующих в норме клеток, например, эпителия крипт тонкой кишки;
- играет главную роль в возрастной атрофии тимуса.

Роль апоптоза при патологических процессах:

- принимает участие в атрофии гормонзависимых тканей;
- лежит в основе атрофии паренхиматозных органов после перекрытия протока;
- определяет гибель В- и Т-лимфоцитов при завершении иммунных реакций, смерть клеток, при отторжении трансплантата;
- апоптоз клеток воспалительного инфильтрата наблюдается в очагах иммунного и гнойного воспаления;
- развивается при вирусных заболеваниях (при вирусном гепатите апоптоз гепатоцитов – тельца Каунсильмена);
- вызывает гибель клеток в опухолях, что может быть использовано при лечении новообразований.

Стадии апоптоза

Процесс гибели клетки путем апоптоза состоит из четырех отдельных стадий: начальной, эффекторной, стадии деградации и поглощения. Если проапоптотические сигналы в начальной стадии преобладают над антиапоптотическими, то клетка автоматически переходит в эффекторную стадию, в которой запускаются каспазы. Стадия деградации представляется типичными морфологическими и биохимиче-

скими изменениями, является неуправляемой и необратимой. В конечной стадии активированные фагоциты поглощают апоптозные тельца. Нарушение регуляции каждой фазы может привести к развитию патологического процесса.

Два механизма запуска апоптоза

Рецепторный механизм запуска апоптоза реализуется с участием мембранных рецепторных молекул, цитоплазматическая часть которых представлена доменом смерти (death domain), содержащим около 80 остатков. Эти молекулы относят к семейству рецепторов TNF α . Известно 6 таких рецепторов: Fas-рецептор (APO-1, CD95, DR2), TNF-R1 (p55, CD120a, DR1), DR3, DR4, DR5, DR6. Их лиганды – Fas-лиганд (FasL, CD178 – для Fas-рецептора), цитокин TNF α (для TNFR1), TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand – для DR4 и DR5), TL1A (для DR3 и DR6). Все лиганды организованы в виде тримеров. Их взаимодействие с рецепторами приводит к тримеризации последних, что запускает сигнальный каскад. При этом домены смерти приобретают способность взаимодействовать с аналогичными доменами адапторных белков FADD (Fas-associated death domain) и TRADD (TNF-receptor death domain). FADD распознает домены смерти в составе прокаспазы 8 и, взаимодействуя с ними, вызывает активацию каспазы 8 (см. далее). Результат действия TRADD аналогичен, но он реализуется посредством FADD. Формирующиеся в результате указанных взаимодействий молекулярные комплексы называют DISC (Death-inducing signaling complex).

Митохондриальный механизм запуска апоптоза реализуется при повреждении функций митохондрий, приводящем к нарушению проницаемости их мембраны. Решающую роль в этом пути запуска апоптоза играют белки семейства Bcl-2. Их разделяют на проапоптотические (Bid, Bax, Bak, Bcl-XS и др.) и антиапоптотические (Bcl-2, Bcl-XL, Mcl-1 и др.). Запуск сигналов к апоптозу связан с проапоптотическими белками, содержащими 1 домен BH (Bcl-2 homology) – BH3. Белки этой группы блокируют апоптотические факторы типа Bcl-2, образуя с ними димеры. Кроме того, в результате олигомеризации Bax и Bak они формируют трансмембранные поры. В норме олигомеризация этих факторов подавляется антиапоптотическими факторами. Через поры в мембране митохондрий в цитозоль выходят цитохром с и фактор Araf-1 (Apoptose protease activation factor 1). Araf-1 и цитохром с в присутствии АТФ образуют комплекс с неактивной

каспазой – прокаспазой 9. Этот комплекс называют апоптосомой. В ней происходит активация каспазы 9.

КАСПАЗЫ, ТИПЫ КАСПАЗ. РОЛЬ В РАЗВИТИИ АПОПТОЗА

Протеазы, называемые «каспазами», подразделяются на три группы: инициаторные, эффекторные и участвующие в воспалении. Два первых типа каспаз связаны с апоптозом. Морфологические и биохимические особенности апоптотических клеток обуславливаются действием эффекторных каспаз на соответствующие субстраты. Обнаружено много субстратов каспаз, и в некоторых случаях известно, какие клеточные эффекты вызваны их расщеплением.

Каспазы – цистеин содержащие специфические протеазы, атакующие (расщепляющие) субстраты после аспартата, регулируют многие клеточные и биохимические изменения в погибающих апоптотических клетках. В большинстве клеток млекопитающих каспазы находятся в виде неактивных зимогенов; и при активации апоптоза нового их синтеза не происходит. Существует три основных типа каспаз, обладающих в клетке различными функциями: эффекторные, инициаторные и участвующие в воспалении. Эффекторные каспазы (в основном, каспазы-3 и -7 позвоночных) ответственны за расщепление многих различных белков, чтобы осуществить апоптоз.

Наблюдаемая при апоптозе фрагментация ДНК является результатом расщепления одного из субстратов каспаз. Одна из клеточных ДНКаз (CAD = orspase-dependent DNase) находится в клетке в виде комплекса с ингибитором, iCAD. Фактически, при действии ингибитора CAD свернута в комплекс, и ее активность проявляется только, когда iCAD расщепляется эффекторной каспазой. Активная CAD начинает расщеплять ДНК по наиболее доступным местам между нуклеосомами, что и приводит к характерной ее деградации, в виде «лесенки», наблюдаемой при апоптозе. Клетки, у которых отсутствует либо CAD, либо iCAD, при развитии апоптоза не обнаруживают такого характера расщепления ДНК.

Механизмы активации каспаз апоптоза

Для активации эффекторных каспаз необходимым и достаточным является их расщепление по специфическим сайтам, которое обычно происходит с участием инициаторных каспаз. В активации инициаторных каспаз участвуют адаптерные белки, содержащие до-

мены, называемые складками смерти, и способные взаимодействовать с другими белками Эффекторные каспазы млекопитающих, каспазы-3 и -7, а также еще одна каспаза-6 присутствуют в клетках в форме зимогенов, представляющих собой неактивные димеры. Активация эффекторных каспаз происходит при расщеплении зимогенов по специфическим сайтам, содержащим остатки аспартата. Между этими сайтами находится большая субъединица (содержащая димер цистеин-гистидин, являющаяся активным сайтом), и малая субъединица (содержащая область, определяющую специфичность фермента) зрелой, активной каспазы. При расщеплении зимогена каталитический димер цистеин-гистидин, необходимый для протеазной активности, сближается с областью, которая временно связывает субстрат. Остаток аргинина, помеченный буквой «R» на рисунке ниже, необходим для связывания с аспартатом в субстрате и для осуществления протеолитического расщепления.

Таким образом, расщепление эффекторной каспазы позволяет сформировать активный сайт в зрелом, активном ферменте. Одна из протеаз, способных к активирующему расщеплению эффекторных каспаз, называется гранзим В. Она находится в гранулах цитотоксических лимфоцитов (цитотоксических Т-клеток и природных киллеров). При атаке клетки-мишени (например, клеток инфицированных вирусом) цитотоксическими лимфоцитами гранзим В высвобождается в ее цитоплазму. Гранзим В может непосредственно активировать эффекторную каспазу и вызывать апоптоз в клетке-мишени. Однако, такой путь не является единственным при индукции апоптоза с участием этой протеазы. Аналогичным образом, при расщеплении активными каспазами-3 и -7. При апоптозе активируется каспаза-6. Это пока оставляет проблему, каким образом обычно активируются каспазы-3 и -7. В большинстве случаев апоптоза расщепление этих эффекторных каспаз происходит под действием еще одного набора протеаз, «инициаторных» каспаз.

Активация эффекторных каспаз под действием инициаторных каспаз определяет характер различных путей апоптоза и координирует их. В отличие от эффекторных, инициаторные каспазы (каспазы-2, -8, -9, и -10 у млекопитающих) находятся в клетках в форме неактивных мономеров. При расщеплении этих мономеров активные сайты в протеазах не формируются. Вместо этого активация инициаторных каспаз происходит при объединении двух мономеров в димер, в котором затем формируются активные сайты. Когда димер образовался,

последующее расщепление по сайтам, содержащим остатки аспартата, вызывает его стабилизацию. Такой механизм активации за счет димеризации называется индуцированное сближение.

Инициаторные каспазы содержат большие продомены, в которых присутствуют последовательности, характерные для белок-белковых взаимодействий. Они включают домен мобилизации каспаз (CARD), эффекторный домен смерти (DED) и пириновый домен (PYR). (Последний отсутствует в продоме инициаторных каспаз млекопитающих, но обнаружен в одной инициаторной каспазе рыб, а также в других белках.) Все вместе они называются «складки смерти» и структурно близки друг к другу. Продомен специфической инициаторной каспазы взаимодействует со специфической адаптерной молекулой. Это определяет характер пути апоптоза. Обычно взаимодействие происходит с подобным доменом (например, CARD-CARD, DED-DED). Подробно исследованы два таких пути апоптоза: через рецепторы клеточной гибели и по митохондриальному пути.

Функции белкового ингибитора апоптоза (IAP)

К белковым ингибиторам апоптоза относится группа белков, обладающих различными функциями; некоторые из них связываются с каспазами, ингибируя их. Они также индуцируют деградацию каспаз протеосомами. Эффекторные каспазы активируются при расщеплении, и поскольку они способны расщеплять и активировать друг друга, любая внутриклеточная протеолитическая активность каспаз способна быстро усиливаться, вызывая апоптоз. Поэтому важно, что существуют механизмы, ограничивающие потенциальную опасность «случайной» активации каспаз в клетках, не получивших сигнала к гибели.

Первый белковый ингибитор апоптоза (IAP) был обнаружен в вирусе насекомых (бакуловирусе); он предотвращал апоптоз в инфицированных клетках. В дальнейшем гомологичные по составу белки были обнаружены в других организмах, включая млекопитающих. Многие из этих белков, несмотря на название и доменную организацию, обладают функциями, не имеющими отношения к регуляции апоптоза. Тем не менее некоторые IAP, включая X-связанный IAP (XIAP), обнаруженный у млекопитающих, являются мощными ингибиторами каспаз, особенно инициаторной каспазы-9 и эффекторных каспаз-3 и -7. Структура XIAP связана с каспазой-3. В молекуле IAP присутствуют домены, называемые IAP-повторы бакуловируса (BIR), и также обычно характерный домен RING пальцев. IAP, содержащие

домен RING, включая XIAP, также функционируют как убиквитин E3 лигазы, и XIAP может эффективно убиквитинилировать себя и свои мишени каспазы, после чего деградировать их в протеосомах. Поэтому активация каспазы необязательно приводит к апоптозу, если ее активность заингибирована, и фермент в конце концов разрушается под действием IAP. Однако, несмотря на мощную антикаспазную активность XIAP, мыши дефектные по этому белку-ингибитору развиваются нормально и не обнаруживают дефектов, связанных с апоптозом. Поэтому значение XIAP в контроле апоптоза (и его регуляторная роль) остается неясными.

Каспазы участвующие в воспалении и обмене цитокинов

Наряду с группами каспаз, выполняющих эффекторную и иницирующую роли в апоптозе, существует еще одна группа этого семейства протеаз, которая в этом процессе не участвует. Эти каспазы осуществляют метаболические превращения цитокинов.

Некоторые каспазы, вероятно, не играют существенной роли в реализации большинства форм апоптоза, а, главным образом, принимают участие в процессе воспаления. Фактически первая каспаза была идентифицирована не как регулятор апоптоза, а как белок, необходимый для процессинга и секреции одного из цитокинов, интерлейкина-1 β . Эта протеаза, каспаза-1 (первоначально названная интерлейкин-1 β -превращающий фермент или ICE), также необходима для процессинга и секреции интерлейкина-18. Для активации каспазы-1 необходимо образование комплекса, состоящего из другой каспазы (каспазы-5 у человека и каспазы-11 у грызунов) и двух адаптерных молекул, NALP и ASC. У мышей, дефектных по каспазе-1, каспазе-11 или по ASC интерлейкин-1 или -18 не секретируются, однако у них не обнаруживаются дефектов развития или апоптоза. Напротив, у людей с активирующей мутацией по NALP-1 проявляются признаки воспалительного синдрома, связанного с повышенной секрецией цитокина. Две других протеазы, очень близких к каспазам-1 и -5 и обнаруживающих гомологию с другими представителями этого семейства, представляют собой каспазы-4 и -12. Функции каспазы-4 остаются не вполне ясными. Интересно, что у большинства людей из-за наличия преждевременного стоп-кодона каспаза-12 не экспрессируется. Показан подобный эффект для 10% африканцев. В настоящее время функции этой каспазы у человека неясны.

ПРОГРАММИРУЕМАЯ И РЕГУЛИРУЕМАЯ КЛЕТОЧНАЯ ГИБЕЛЬ

Современные представления о видах гибели клеток связаны с работой Комитета по номенклатуре клеточной смерти (NCCD), который разработал руководящие принципы для определения и интерпретации клеточной смерти с морфологической, биохимической и функциональной точек зрения. Поскольку область продолжает расширяться, и раскрываются новые механизмы, которые управляют несколькими путями гибели клеток, мы предлагаем обновленную классификацию подпрограмм гибели клеток, уделяя особое внимание механистическим и существенным (в отличие от коррелятивных и необязательных) аспектам процесса.

В настоящее время доминируют молекулярно ориентированные определения терминов, включая внутренний апоптоз, внешний апоптоз, некроз, обусловленный изменением митохондриальной проницаемости (МРТ), некроптоз, ферроптоз, пироптоз, партанатоз, энтоцитическую гибель клеток, нетотическую гибель клеток, лизосом-зависимую гибель клеток, аутофагию-зависимую гибель клеток, иммуногенную гибель клеток, клеточное старение, и митотической катастрофы.

Морфологические изменения гибели клеток представлены в виде трех типов: (1) гибель клеток I типа или апоптоз, проявляющийся конденсацией цитоплазмы, конденсацией хроматина (пикноз), фрагментацией ядра (кариорексис) и блеббингом («пузырение») цитоплазматической мембраны с сохранением ее целостности вплоть до финальных процессов; кульминацией является образование интактных мелких пузырьков (апоптотических телец), которые эффективно захватываются соседними клетками с фагоцитарной активностью (путем эффероцитоза) и разрушаются внутри лизосом; (2) гибель клеток II типа или аутофагия, проявляющиеся обширной цитоплазматической вакуолизацией и, сходным образом заканчивающиеся фагоцитарным поглощением и последующей лизосомальной деградацией, и (3) гибель клеток III типа или некроз.

В целом, с учетом молекулярных механизмов, все типы гибели клеток могут быть разделены на регулируемые и запрограммированные подтипы. **Регулируемая гибель клеток** (RCD – Regulated cell death) – форма гибели клеток, возникающая в результате активации одного или нескольких модулей передачи сигнала, и, следовательно, может быть фармакологически или генетически модулирована (по

крайней мере, кинетически и в некоторой степени). **Запрограммированная гибель клеток** (PCD – Programmed cell death). Особая форма RCD, которая возникает в строго физиологических сценариях, т.е. не связана с нарушениями гомеостаза и, следовательно, не возникает в контексте недостаточной адаптации к стрессу.

Регулируемая гибель клеток включает в себя множество подтипов, выполнение которых приводит к различным морфологическим изменениям и иммунологическим последствиям. Механизмы клеточной смерти могут встречаться в «чистой» форме или в смешанных вариантах, в которых появляются различные летальные субпрограммы, действующие параллельно, а иногда и по типу иерархического каскада.

Внутренний апоптоз инициируется сигналами внеклеточного микроокружения или внутриклеточной регуляции, характеризуется пермеабиллизацией (изменением проницаемости) наружной мембраны митохондрий и блокируется каспазными ингибиторами (главным образом CASP3).

Внешний апоптоз инициируется сигналами внеклеточного микроокружения, детектируется рецепторами плазматической мембраны, поддерживается активностью CASP8 и тормозится ингибитором каспаз (CASP3).

Некроптоз – вид регулируемой гибели клетки, сопровождающийся активацией, взаимодействующей с рецептором протеинкиназы-3 (англ. receptor-interacting protein kinase 3, RIPK3, RIP3). На молекулярном уровне при некроптозе происходит строго регулируемая сборка внутриклеточного комплекса, известного как некросома, запускаемая рецепторами смерти (TNFR1), рецепторами лигандов FasL и TRAIL), поверхностными Toll-подобными рецепторами, а также механизмами, распознающими присутствие в цитоплазме вирусных РНК.

Последние данные свидетельствуют о новой роли передачи сигналов sFasL в программе кодирования индуцированного TNF-а в нейтрофилах во время COVID-19 и потенциальной терапевтической цели для сдерживания воспаления и, таким образом, влияния на тяжесть и исход заболевания.

Пироптоз – вид регулируемой гибели клетки, при котором происходит нарушение целостности плазматической мембраны и быстрое высвобождение наружу содержимого клетки. Характерной чертой пироптоза является зависимое от каспазы 1 активное выделение клет-

кой интерлейкинов IL-1 β и IL-18, что приводит к воспалению. Пироптоз служит защитным механизмом врождённого иммунитета. В ходе процесса происходит активация CASP1, CASP3 и GSDMD и дальнейшее GSDMD-N-индуцированное порообразование; высвобождение IL-1b.

Пироптоз является воспалительной формой запрограммированной гибели клеток, которая обычно наблюдается при цитопатической вирусной инфекции. Это вероятный триггер для последующего воспалительного ответа, наблюдаемого в ходе острых и хронических воспалительных заболеваний человека. Во время инфекции SARS-CoV-2 повышается уровень IL-1 β , важного цитокина, высвобождаемого вовремя пироптоза. Используя различные паттерн-распознающие рецепторы (PRR), альвеолярные эпителиальные клетки и альвеолярные макрофаги обнаруживают высвобожденные патоген-ассоциированные молекулярные структуры (PAMP), такие как вирусная РНК, и связанные с повреждением молекулярные структуры (DAMP), включая АТФ, ДНК и ASC олигомеры. Возникает волна локального воспаления, стимулирующая повышенную секрецию провоспалительных цитокинов и хемокинов IL-6, IFN γ , MCP1 и IP-10 в кровь, что играет важную роль в развитии пироптоза.

Ферроптоз – это тип регулируемой окислительной гибели клетки, характерной особенностью которого является железо-зависимое перекисное окисление липидов. Ферроптоз выявлен в раковых клетках и фибробластах млекопитающих. Накопление ионов железа, сопровождаемое активацией перекисного окисления липидов, является ключевым событием, что завершается изменением трансмембранного потенциала митохондрий и переходом MAP1LC3B-1 в MAP1LC3B-II, белков аутофагосом.

Парнатоз – это форма регулируемой гибели клеток, вызванная накоплением Поли(АДФ-рибозы) (PAR) и ядерной транслокацией апоптоз индуцирующего фактора (AIF) из митохондрий. Парнатоз также известен как зависящая от PARP-1 гибель клеток. Известно, что чрезмерная активация PARP1 приводит к инициации каспазоне-зависимого механизма, сопровождаемого истощением NAD⁺ и АТФ; накоплением поли-АДФ-рибозных полимеров; миграция AIFM1 из митохондрий в ядро. Роль данного механизма клеточной гибели наблюдается при болезни Паркинсона, инсульте, сахарном диабете 2 типа.

Энтоз – вид регулируемой клеточной гибели, при котором одна эпителиальная клетка поглощается другой эпителиальной клеткой и впоследствии умирает в вакуоли или лизосоме поглотившей клетки. Энтоз часто наблюдается в опухолях, потому что он запускается при утрате контактов клетки с внеклеточным матриксом, что наиболее часто наблюдается у раковых клеток. Активация белков адгезии и актомиозина, инициация LC3-ассоциированного фагоцитоза является ключевым молекулярным событием. Показано, что энтоз играет важную роль в эмбриональном развитии млекопитающих.

НЕТоз (нетоз) – это вид регулируемой клеточной гибели, происходящей у нейтрофилов. Она сопровождается выбрасыванием из погибающих нейтрофилов нитей, состоящих в основном из ДНК. Формирование сетей, высвобождение и миграция гранулярных ферментов нейтрофильных внеклеточных ловушек, цитруллинирование гистонов и деконденсация хроматина сопровождают развитие гибели клеток. Благодаря нетозу нейтрофилы убивают внеклеточных патогенов, минимизируя вред для других клеток. Нейтрофильные внеклеточные ловушки (НВЛ, англ. NETs) представляют собой ячеистую сеть хроматина, гистоновых и негистоновых белков, а также микробицидных агентов, которая распространяется за пределы клетки в результате серии событий, затрагивающих ядро и цитоплазму. Эти события в совокупности получили название нетоз. Нетоз, первоначально считавшийся защитным / апоптотическим механизмом, теперь рассматривается как способ защиты в экстремальных ситуациях, который в отдельных случаях оказывает сильные неблагоприятные эффекты на физиологию тканей, усугубляя патологию. Примером может служить опосредованное НВЛ повреждение органов у пациентов с COVID-19. Положительное влияние НВЛ на заживление ран связывают с их антимикробной активностью, в то время как неблагоприятные эффекты чаще встречаются при патологических состояниях (таких как диабет) и связаны с усилением нетоза. Новые данные позволяют предположить, что у НВЛ существуют другие положительные эффекты при заживлении ран, которые заслуживают более глубокого изучения.

Зависимая от лизосом клеточная гибель связана с изменением проницаемости лизосомальной мембраны, высвобождением лизосомальных гидролитических ферментов и сопровождаемое лизосомальным железо-индуцированным окислительным стрессом.

Зависимая от аутофагии клеточная гибель связана с аутофагической вакуолизацией цитоплазмы, с преобразованием MAP1LC3B-1 в MAP1LC3B-II; увеличением аутофагической и лизосомальной активности.

Алкалиптоз – некрозоподобный морфотип гибели клетки. В механизмах развития лежит подщелачивание внутриклеточной среды, сопровождаемой активацией NF- κ B без участия каспаз.

Оксеиптоз – апоптозоподобный морфотип, индуцируется кислородным радикалом с последующей активацией пути KEAP1-PGAM5-AIFM1; не зависит от апоптотических или пироптотических каспаз, некроптоза, аутофагии и ферроптоза; характерно отсутствие ядерной транслокации AIFM1.

Immunogenic cell death (damage associated molecular pattern).
Иммунологическая гибель клеток. Форма запрограммированной гибели клеток в результате развития иммунного ответа при воздействии эндогенных (клеточных) и экзогенных (вирусы) антигенов. Эта форма гибели развивается под влиянием ограниченного числа стимулов, в том числе антрациклинов, бортезомиба, радиации и фотодинамической терапии. Эти агенты способны стимулировать своевременное высвобождение серии DAMPs, распознавание которых PRRs (Pattern recognition receptors), экспрессируемыми врожденными и адаптивными компонентами иммунной системы, предупреждает организм об опасной ситуации, что приводит к возникновению иммунного ответа, обычно связанного с установлением иммунологической памяти.

Non-lethal processes. Не летальные процессы. Молекулярный механизм данных процессов участвует в нескольких процессах, которые за последние десятилетия ошибочно рассматривались как истинные случаи гибели клеток, включая клеточное старение, митотическую катастрофу и многочисленные случаи терминальной дифференцировки.

Термин «клеточное старение» относится к патофизиологическому процессу, посредством которого клетки постоянно теряют свою пролиферативную способность, оставаясь жизнеспособными и метаболически активными. Клетки проявляют специфические морфологические признаки, включая уплощение, внутриклеточную вакуолизацию, клеточное (ядерное) расширение и измененную структуру хроматина.

На биохимическом уровне клеточное старение часто характеризуется: повышенной активностью лизосомальной галактозидазы бета 1 (GLB1); ингибированием множества сигнальных модулей в контроле циклинзависимых киназ клеточной гибели (CDK) и последующее дефосфорилирование различных членов семейства белков ретинобластомы (RB) при усилении регуляции ингибитора циклинзависимой киназы 1A (CDKN1A; наиболее известный как p21) [и / или продуктов CDKN2A p16 (мощный ингибитор CDK4 и CDK6) [и ARF (активатор p53); отсутствием маркеров пролиферации, таких как маркер пролиферации Ki-67 (MKI67); активацией механизма доменов смерти (DDR), как правило, в результате эрозии теломер; наличием так называемых «гетерохроматических очагов, связанных со старением» (SAHF).

Митотическая катастрофа – регулируемый онкосупрессивный механизм, связанный с неспособностью клеток к пролиферации при наличии значительных повреждений ДНК. Митотическая катастрофа морфологически определяется уникальными ядерными изменениями, включая многоядерную и макроядерную (два потенциальных последствия хромосомной миссегрегации), а также микроядерную (возможно, в результате сохранения отстающих или ацентрических хромосом).

Митотические дефекты могут возникать в результате действия экзогенных факторов, включая большую группу ксенобиотиков, которые изменяют репликацию ДНК, контрольные точки клеточного цикла, сегрегацию хромосом и / или динамику микротрубочек. К эндогенным факторам относят окислительный стресс при репликации ДНК или митотическом стрессе, вызванный aberrантной плоидностью и дисрегуляцией экспрессии факторов, участвующих в репликации ДНК.

Конечная дифференцировка (кератинизация, корнификация) встречается в большинстве клеток: нейронах, мегакариоцитах, эритроблестах, гранулоцитах, остеокластах, спермоцитах, клеток мышц. Встречается при кератинизации эпителия. Множество сигнальных каскадов, обеспечивающих процессы развития программированной гибели клеток, проявляются и в этом процессе. Кератинизация или корнификация обеспечивается каспазой 14 и многочисленными формами трансклутаминазы.

Таким образом, с одной стороны, RDC представляет собой первичную этиологическую детерминанту при заболеваниях, связанных

с необратимой потерей постмитотических тканей (например, инфаркт миокарда, нейродегенерация). С другой стороны, дефекты в сигнальных каскадах, которые провоцируют RDC, связаны с патологиями, характеризующимися неконтролируемым расширением или накоплением клеток (например, некоторые аутоиммунные заболевания, рак).

Лекция 3

АКТИВНЫЕ ФОРМЫ КИСЛОРОДА И СВОБОДНОРАДИКАЛЬНОЕ ОКИСЛЕНИЕ БИОМОЛЕКУЛ. АНТИОКСИДАНТНАЯ ЗАЩИТА КЛЕТОК

Для организмов, живущих в аэробных условиях, контакт с кислородом и его активными формами (АФК) является абсолютно неизбежным. АФК постоянно образуются внутри клетки в ходе ряда процессов, как побочный продукт нормального аэробного метаболизма. В большом количестве АФК могут поступать в организм извне в готовом виде. Это происходит, когда организм оказывается в неблагоприятных условиях существования.

АФК являются активными инициаторами цепных реакций свободнорадикального окисления (СРО). В результате этих реакций в организме с высокой скоростью образуются свободные радикалы (СР) различного строения, гидроперекиси органической и неорганической природы. Они выступают в качестве катализаторов (аутокатализаторов) цепных реакций СРО, которые их же и породили.

Когда темпы генерирования АФК, СР и гидроперекисей в клетке, органе, организме превышают функциональные возможности защитной антиоксидантной системы, формируется особое состояние – **окислительный стресс (oxidative stress)**. В результате этого иницируются различные механизмы повреждения клетки. Свободнорадикальному окислению подвергаются липиды, белки, углеводы и нуклеиновые кислоты, что приводит к нарушению структуры и функций биологических мембран, инактивируются ферменты, меняется нативная структура важнейших биомолекул. В далеко зашедших случаях страдает жизнеспособность как отдельных клеток и органов, так и всего организма. Окислительный стресс является этиопатогенетическим фактором многих социально значимых заболеваний, таких, как: атеросклероз, диабеты 1 и 2 типов, многих нейродегенеративных патологий, фиброза легких, артритов, а также является значимым фактором старения организма, определяя его темпы.

Необходимым условием полноценного существования аэробных организмов является поддержание в их внутренней среде физиологического (относительно низкого) уровня активности процессов СРО. Регуляция скорости реакций СРО осуществляется многокомпонент-

ной и многоуровневой системой антиоксидантной защиты (АОЗ). Эта высокоэффективная система обеспечивает связывание, модификацию и разрушение АФК, СР и различных гидроперекисей, предупреждая их образование в количествах, опасных для жизнедеятельности.

Формирование системы АОЗ шло в неразрывной связи с эволюцией аэробного типа метаболизма, возникшего в ответ на появление в атмосфере Земли свободного молекулярного кислорода. По мере постепенного нарастания его содержания в изначально бескислородной атмосфере, клетки первобытных аэробных организмов усложняли и развивали систему АОЗ, доведя ее до совершенства.

В состав системы АОЗ входят, с одной стороны, целый ряд антиоксидантных ферментов и, с другой стороны, ещё более многочисленная группа различных соединений неферментативной природы – антиоксидантов (АО). Соотношение интенсивности процессов СРО и функциональной активности системы АОЗ определяет антиоксидантный статус клетки, ткани и организма в целом, являясь важнейшим элементом гомеостаза его внутренней среды.

ФОТОСИНТЕЗИРУЮЩИЕ ПРОКАРИОТЫ И ГИПОТЕЗА О ПРОИСХОЖДЕНИИ КИСЛОРОДА В ЗЕМНОЙ АТМОСФЕРЕ

Ранняя атмосфера Земли кислорода не содержала. Наиболее вероятные ее компоненты: H_2 , CH_4 , H_2S , NH_3 , CO , CO_2 , водяные пары. Следовые количества кислорода могли образовываться, например, в результате распада молекул воды, содержащихся в верхних слоях атмосферы в форме паров, под влиянием ультрафиолета солнечного излучения.

Для самых древних анаэробных форм жизни процессы брожения были единственным источником свободной энергии. Эволюция сбраживающих анаэробных организмов позволила им сформировать все более эффективные ферментные системы для извлечения химической энергии из окружающей среды, что способствовало росту их биомассы. По-видимому, на определенном этапе сложилась критическая ситуация: живая материя значительно истощила питающую её среду. Полагают, что эти обстоятельства послужили толчком для нового витка эволюции жизни. Благодаря ему появились фотосинтезирующие анаэробы – сине-зелёные водоросли, организмы, научившиеся использовать новый, дополнительный и практически неистощимый источник свободной энергии – энергию квантов солнечного света.

В ходе фотосинтетического процесса, образование собственных углеводов в клетках происходило путем усвоения водорода, углерода из воды и углекислого газа. Одновременно в атмосферу выделялся молекулярный кислород. Таким образом, сине-зелёные водоросли были первыми организмами, начавшими выделять свободный кислород в атмосферу, которая до того была бескислородной. Очевидно и то, что эти прокариотические водоросли были также первыми организмами, сумевшими выработать систему АОЗ от такого агрессивного элемента – окислителя, каким является кислород, и положить начало всей последующей эволюции механизмов толерантности живых систем к кислороду атмосферы.

Процессы трансформации бескислородной атмосферы Земли в кислородсодержащую начались по абсолютному исчислению около 3,5 млрд лет назад и завершились 2,6±0,1 млрд лет назад. Средняя продолжительность этих процессов составила свыше 900 млн лет и ознаменовала собой архейскую эпоху геологической истории. Трансформация состава земной атмосферы из бескислородной в кислородсодержащую стала движущим фактором появления новых форм жизни на планете. На рисунке 1 представлен газовый состав современной земной атмосферы.



Рис. 1. Газовый состав современной атмосферы Земли

Аэробные организмы составляют основную биомассу нашей планеты. Эволюционное преимущество они получили благодаря интенсивному и высокоэффективному обмену веществ, в ходе которого

свободная энергия из нутриентов извлекается полностью – окисление происходит до H_2O и CO_2 .

Стационарные концентрации O_2 и CO_2 в земной атмосфере не соответствуют простому химическому равновесию. Именно живые организмы оказали решающее влияние на состав атмосферы в отношении кислорода, азота и двуокиси углерода. Влияние на концентрацию O_2 в атмосфере других факторов (в том числе антропогенных) пока несущественны. Сложившийся баланс O_2 и CO_2 определяется процессами, происходящим исключительно в биосфере. Они же являются мощным фактором, поддерживающий этот гомеостаз.

КРАТКИЙ ОЧЕРК РАЗВИТИЯ НАУЧНЫХ ПРЕДСТАВЛЕНИЙ О РОЛИ СВОБОДНОРАДИКАЛЬНОГО ОКИСЛЕНИЯ В БИОСИСТЕМАХ

Исследования, осуществленные в первой половине XX в. Ф. Бателли и Л. Стерн (1912), О. Варбурга (1928) и Л. Михаэлиса (1946), показали, что при одноэлектронном восстановлении молекулярного кислорода образуется интермедиат свободнорадикальной природы – супероксидный анион-радикал кислорода (супероксид, $^*\text{O}_2^-$), а также сопутствующие ему радикал перекиси водорода ($^*\text{O}_2\text{H}$) и радикал гидроксила ($^*\text{OH}$). Ф. Хабер и Дж. Вейсс в 1934 г. описали реакцию образования гидроксил-радикала в процессе неферментативного разложения перекиси водорода, катализируемого ионами металлов с переменной валентностью ($\text{Fe}^{2+} \leftrightarrow \text{Fe}^{3+}$; $\text{Cu}^{2+} \leftrightarrow \text{Cu}^+$). Уравнение реакции в общем виде:



Позже реакцию назвали **реакцией Хабер–Вейсса**. В целом, эти данные позволили сформировать мнение о том, что упомянутые формы кислорода каким-то образом обязательно участвуют в жизнедеятельности клетки.

Систематические исследования по выяснению биоэффектов реакций СРО начались лишь со второй половины 40-х годов XX в. К сожалению, именно атомные бомбардировки городов Хиросимы и Нагасаки стали решающим фактором, который побудил научный мир начать широкомасштабные фундаментальные исследования биологических эффектов ионизирующего излучения, а также круговорота радиоактивных изотопов в биогеоценозе.

Одним из важных итогов первого десятилетия пристального внимания ученых к биоэффектам реакций СРО стала «свободнорадикальная» теория старения, которую в 1956 г. сформулировал Д. Хермен. В рамках теории автор впервые высказал гипотезу о том, что *in vivo* радикалы кислорода могут появляться в качестве побочных продуктов в процессе некоторых ферментативных реакций. Он указал на возможность участия свободных радикалов в повреждении клеток, мутагенезе и онкогенезе, а также в нейродегенеративных процессах, сопровождающих биологическое старение. Согласно теории Д. Хермена, нарастание активности реакций СРО в организме с возрастом – основной фактор, определяющий темпы старения. Правильность этого положения была подтверждена фактами, свидетельствующими о том, что в процессе старения имеют место прогрессирующие нарушения регуляторных процессов. В их основе лежат опосредованные радикалами альтерации экспрессии генов.

В 50-х годах XX столетия, академиком Б.Н. Тарусовым была определена роль тканевых ненасыщенных липидов, как одного из субстратов цепных реакций СРО. В 1961 г. Б.Н. Тарусовым было открыто явление спонтанного непрерывного сверхслабого свечения тканей и биологических сред в видимой области спектра. Оказалось, что в основе этого феномена лежат процессы СРО липидов (перекисного окисления липидов, ПОЛ), а усиление спонтанного свечения всегда сопровождается активацию этих процессов, поскольку источником свечения являются реакции рекомбинации липидных радикалов. Это открытие было положено в основу разработки метода изучения активности реакций СРО – метода регистрации интенсивности хемилюминесценции биообъектов.

Важнейшей вехой на пути изучения биологической роли свободных радикалов стало открытие в 1969 г. И. Фридович и Дж. МакКордом фермента *супероксиддисмутазы (СОД)*. Энзим с абсолютной субстратной специфичностью катализирует реакцию диспропорционирования (дисмутации) между двумя супероксидами:



Образующаяся перекись водорода, в свою очередь, разрушается ферментом *каталазой* до безвредных для организма воды и молекулярного кислорода.

В настоящее время общепризнано, что *СОД* – важнейший АО фермент, изоформы которого обнаружены не только во всех внутриклеточных компартментах, но и во внеклеточном пространстве. *СОД* образует «первую линию» защиты клетки от цитотоксического действия избытка различных АФК, родоначальником которых является супероксид ($*O_2^-$).

Современный этап изучения эффектов АФК и роли реакций СРО в биосистемах берет свое начало в конце 70-х годов прошлого столетия. В этот период работы Миттал и Марерд (1977), Рот и Дрёге (1987), Кейс и Тирелл (1989), Шторц (1990), Шрек и Бюерл (1991) позволили получить новые данные, свидетельствовавшие о полезных биологических эффектах АФК и гидроперекисей липидов *in vivo*. Оказалось, что характер эффектов АФК зависит от их концентрации, механизма и темпов образования. Показано, что некоторые АФК и гидроперекиси липидов способны модулировать активность многих ключевых метаболических и иммунологических процессов. Оказалось, что существует «регуляторные» и «повреждающие» концентрации АФК. Например, для перекиси водорода эта «точка переключения» соответствует концентрации 1 мкмоль/л.

Таким образом, в понимании природы биоэффектов АФК и реакций СРО произошла закономерная трансформация взглядов. Первоначально реакции СРО, инициируемые АФК, рассматривались только как неизбежная «дань» аэробному метаболизму. Согласно первоначальным представлениям выход активности процессов СРО из-под контроля системы АОЗ имел только один результат – окислительный стресс, который мог вызвать гибель клетки. Сегодня мы знаем, что в определенных условиях АФК способны выполнять регуляторно-модулирующие функции, действуя в качестве своеобразных вторичных мессенджеров.

ОКСИДАНТЫ, ХАРАКТЕРИСТИКИ ЦЕПНЫХ РЕАКЦИЙ СВОБОДНОРАДИКАЛЬНОГО ОКИСЛЕНИЯ И КЛАССИФИКАЦИЯ СВОБОДНЫХ РАДИКАЛОВ

Оксиданты (прооксиданты) – химические соединения естественного или синтетического происхождения, обладающие выраженными свойствами окислителей. К категории оксидантов также относятся металлы с переменной валентностью. Общим свойством оксидантов является их способность инициировать и поддерживать реакции СРО биомолекул:

- Активные формы кислорода
- Активные формы оксида азота
- Гидроперекиси липидов
- Свободные радикалы гидроперекисей липидов
- Свободные радикалы других химических соединений
- Металлы с переменной валентностью, прежде всего: железо и медь

Оксидантным эффектом обладают также некоторые физические факторы, воздействующие на биологические системы, и определенные условия, в которых биосистемы могут оказаться:

- «Жесткий» поддиапазон электромагнитного спектра ультрафиолетового излучения (длина волны 200–280 нм)
- Ионизирующие излучения
- Ультразвук высокой интенсивности
- Гипероксия и гипоксия живых тканей

Реакции СРО биомолекул относятся к категории цепных химических реакций, инициируемых и поддерживаемых с помощью СР. В типичной цепной реакции СРО различают три подтипа реакций:

- реакцию инициирования или зарождения цепи;
- реакцию продолжения цепи;
- реакцию обрыва или терминации цепи.

Обязательная черта реакции продолжения цепи – соблюдение принципа «неуничтожимости свободной валентности». Его суть состоит в том, что в ходе реакции продолжения цепи обязательно образуются новые СР, которые реагируют со всё новыми молекулами-субстратами. Катализаторами этих реакций являются конечные и промежуточные продукты. По этой причине цепные реакции СРО биомолекул называют **аутокаталитическими реакциями**.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПОНЯТИЯ «СВОБОДНЫЙ РАДИКАЛ»

Свободные радикалы (СР) – молекулы или атомы, имеющие на внешней электронной оболочке один или два неспаренных электрона. Неспаренный электрон занимает атомную орбиталь в одиночку. Процессы появления СР обычно происходят в результате реакций окисления или восстановления. Образование СР из устойчивых молекул обусловлено:

- появлением на свободной, валентной орбитали нового электрона;
- удалением одного электрона из электронной пары.

Кроме того, если электроны принадлежат разным атомам и образуют между ними химическую связь, то разъединение этих электронов, то есть разрыв химической связи, может также приводить к образованию СР.

СР относительно стабильны, но обладают повышенной реакционной способностью, что является причиной очень низкой их стационарной концентрации в клетках и тканях.

Единой классификации СР нет. Согласно классификации, предложенной академиком Ю.А. Владимировым, большинство радикалов, образующихся в организме человека, можно разделить на **природные** и **чужеродные**.

Природные радикалы можно, в свою очередь, разделить на **первичные**, **вторичные** (повреждающие) и **третичные** (радикалы антиоксидантов). Образование первичных радикалов осуществляется при участии определенных ферментных систем. Эти системы будут подробно охарактеризованы ниже.

Природные радикалы

Природные первичные радикалы: семихиноны, супероксидный анион-радикал кислорода и оксид азота или монооксид азота (II).

Природные вторичные радикалы: гидроксильный радикал, радикал липидов и радикал гидроперекиси липидов.

Природные третичные радикалы: радикалы антиоксидантов. В общем виде реакцию с участием антиоксидантов можно представить, как:



InH – молекула антиоксиданта (антиоксиданты – всегда восстановители);

R* – свободный радикал;

RH – молекулярный продукт реакции восстановления свободного радикала;

In* – радикал антиоксиданта.

Радикал антиоксиданта (**In***) стабилен и обладает крайне низкой энергией, что не позволяет ему инициировать и поддерживать новые реакции СРО.

Чужеродные радикалы и их источники: *ионизирующее излучение:* радикалы воды и биомолекул; *«жесткое» ультрафиолетовое излучение:* радикалы молекул хромофоров; *детоксикация ксенобиотиков* (микросомальные монооксигеназы): радикалы молекул ксенобиотиков.

В таблицах 4 и 5 охарактеризованы важнейшие природные радикалы, образующиеся в организме человека (по Ю.А. Владимирову). Из данных таблиц следует, что **первичные радикалы** постоянно образуются в процессе жизнедеятельности организма и могут быть использованы в качестве средств защиты от бактерий, вирусов и переродившихся (малигнизированных) клеток. Эту функцию выполняют фагоцитирующие клетки. При этом фагоциты сначала поглощают большое количество кислорода («дыхательный взрыв»), а затем превращают его в активные формы кислорода, которые выделяются внутрь фагосом, убивая фагоцитированные клетки. **Вторичные радикалы**, в подавляющем большинстве случаев, оказывают разрушающее воздействие на клеточные структуры, поскольку возбуждают СРО биомолекул, в результате чего нарушается их структура и функции.

Таблица 4

Первичные радикалы

Радикал	Структура радикала	Ферментная система образования радикала	Биологическая функция
Супероксид*	$\cdot\text{OO}^-$	НАДФН-оксидаза	Антимикробная защита
Нитроксид	$\cdot\text{NO}$	NO-синтаза	Фактор расслабления сосудов
Семихиноны: коэнзим Q, флавосемихиноны	HQ^\cdot	Цепь переноса электронов	Переносчики электронов

Таблица 5

Вторичные радикалы

	Структура	Образуется в реакции
Радикал гидроксила	$\cdot\text{OH}$	$\text{Fe}^{2+} + \text{HOON} \longrightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{HO}^- + \cdot\text{OH}$ $\text{Fe}^{2+} + \text{ClO}^- \longrightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{Cl}^- + \cdot\text{OH}$
Липидные радикалы	LO^\cdot L^\cdot LOO^\cdot	$\text{Fe}^{2+} + \text{LOON} \longrightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{HO}^- + \text{LO}^\cdot$ $\text{LO}^\cdot + \text{LH} \longrightarrow \text{LH} + \text{L}^\cdot$ $\text{L}^\cdot + \text{O}_2 \longrightarrow \text{LOO}^\cdot$
Супероксид	$\cdot\text{OO}^-$	$\cdot\text{QH} + \text{O}_2 \longrightarrow \text{Q} + \cdot\text{OO}^-$

Примечание: L – ненасыщенная жирная кислота (липид).

На рисунке 2 представлена классификация природных свободных радикалов в виде схемы.

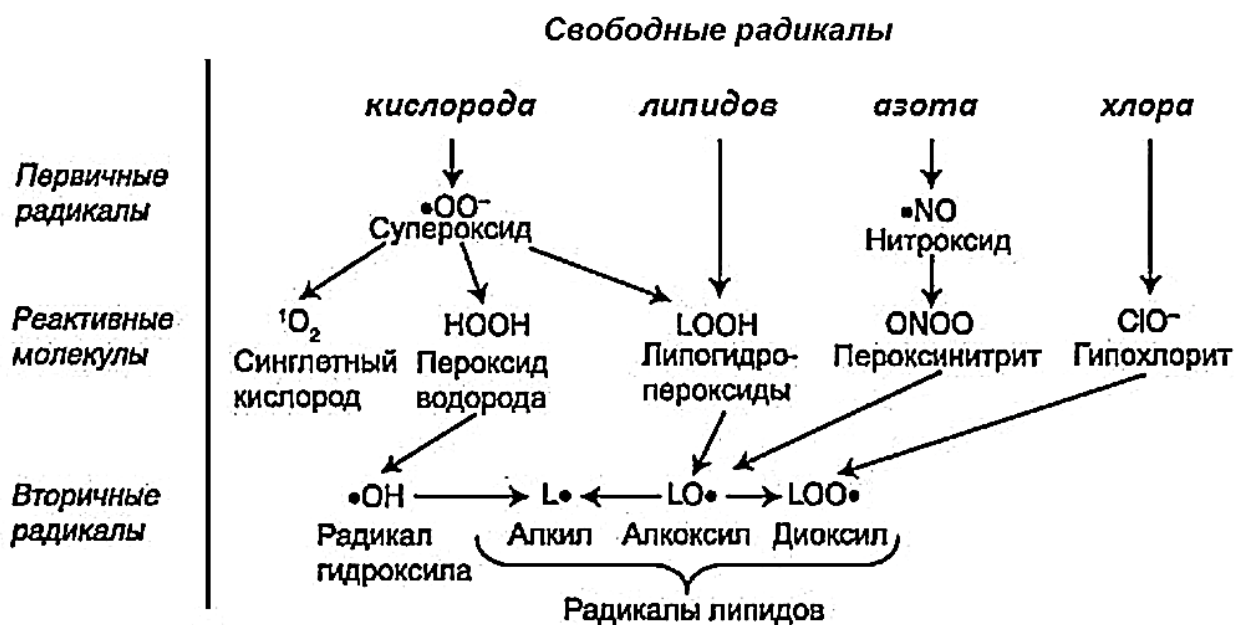
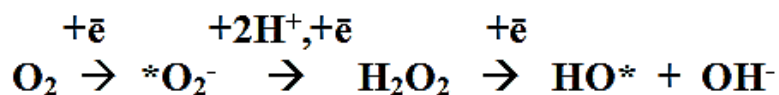


Рис. 2. Схема классификации природных свободных радикалов.
(L-ненасыщенный липид)

От 2 до 5% молекулярного кислорода участвует в реакциях одно-, двух- и трехэлектронного восстановления с образованием различных активных форм кислорода (АФК). Обобщённое уравнение этих реакций можно представить, как:



Уравнение иллюстрирует следующие факты:

- при восстановлении супероксида вторым электроном (\bar{e}), сначала образуется пероксильный анион (на схеме не показан), который быстро протонируется, превращаясь в перекись водорода (2-й этап реакции);
- восстановление перекиси водорода третьим \bar{e} (3-й этап реакции) приводит к образованию гидроксильного радикала ($\text{HO}\bullet$) и гидроксильного аниона (OH^-).

В биосистемах наиболее значимыми донорами электронов являются многие метаболические процессы. Например, это реакции транспорта электронов по дыхательной цепи митохондрий и по коротким электротранспортным цепям микросомальных монооксигеназ на цит. Р-450, реакция, катализируемая *ксантиноксидоредуктазой*

(ксантинооксидазой) и др., а также с участием металлов с переменной валентностью: железа и меди.

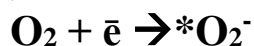
Кислород – элемент II периода таблицы Д.И.Менделеева. Химические элементы этого периода, имеют два электронных слоя: К- и L-слои. L-слой является внешним слоем и содержит валентные электроны. В состав L-слоя входят два энергетических подуровня: $2s$ подуровень (одна орбиталь, содержащая $2\bar{e}$) и $2p$ подуровень. Этот подуровень содержит три орбитали: $2p_x$, $2p_y$ и $2p_z$, на которых в сумме находятся четыре электрона (рис. 3).

Из схемы (рис. 3) следует, что на $2p$ подуровне X-орбиталь полностью заполнена электронами. Оба электрона имеют противоположный спин в соответствии с принципом Паули. Y- и Z-орбитали содержат по одному электрону, имеющие одинаковый спин. Именно эти неспаренные электроны определяют валентность кислорода.



Рис. 3. Схема строения энергетических подуровней атома кислорода

Супероксидный анион-радикал кислорода (супероксид). Супероксид ($*O_2^-$) образуется в реакции одноэлектронного восстановления молекулярного кислорода:



Время жизни супероксида в водной среде составляет 10^{-6} с.

В результате реакции:

- а) электрон заполняет $2p_y$ орбиталь, сообщая молекуле один дополнительный отрицательный электрический заряд (анион);
- б) на $2p_z$ орбитали остаётся один неспаренный электрон (радикал).

Структура $2p$ энергетического подуровня супероксида приобретает вид (рис. 4).

2p4 - подуровень

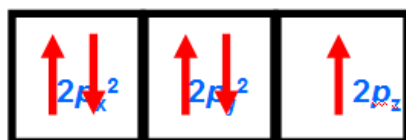


Рис. 4. Строение 2p энергетического подуровня в молекуле супероксида

Реакцию одноэлектронного восстановления молекулярного кислорода с образованием супероксида можно представить также в виде следующего уравнения (рис. 5).

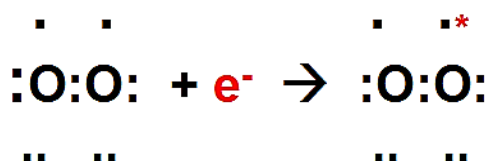


Рис. 5. Реакция образования супероксида при одноэлектронном восстановлении молекулярного кислорода и схема его электронной конфигурации

На схеме красным цветом обозначен дополнительно присоединяемый электрон (*). Таким образом, внешний L-слой молекулы содержит один неспаренный электрон, что превращает молекулу в свободный радикал.

Супероксидные анион-радикалы способны дисмутировать двумя путями:

а) спонтанная дисмутация (диспропорционирование):



б) в реакции, катализируемой ферментом *супероксиддисмутазой* (СОД):



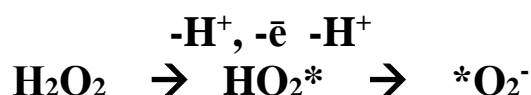
Различия между обеими реакциями состоит:

- В скоростях: скорость ферментативной реакции приблизительно на четыре порядка выше, чем спонтанной.
- В том, что при спонтанной реакции дисмутации одним из первоначально возникающих продуктов является синглетный кислород (1O_2), в то время как при ферментативной реакции образующийся кислород находится в основном триплетном состоянии (O_2).

В водной среде организма супероксид может протонироваться с образованием перекиси водорода:

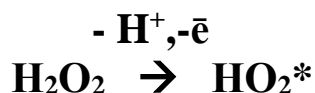


Супероксид, помимо реакции одноэлектронного восстановления молекулярного кислорода, может образовываться также в результате одноэлектронного окисления перекиси водорода:



Перекись водорода (пероксид водорода) и гидропероксидный радикал. В биологических системах любые реакции, продуцирующие супероксид, служат также источником перекиси водорода (H_2O_2). Это происходит в результате протонирования супероксида. В отличие от супероксида, перекись водорода не является свободным радикалом, то есть не имеет на $2p$ -подуровне неспаренного электрона.

Гидропероксидный радикал (радикал пероксида водорода) образуется в результате одноэлектронного окисления перекиси водорода:



Электронное строение молекул H_2O_2 и HO_2^* показано рисунке 6.

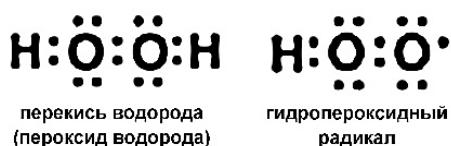


Рис. 6. Электронное строение молекул перекиси водорода и гидропероксидного радикала

В физиологических условиях, тканевая концентрация H_2O_2 остаётся низкой, поскольку она зависит не столько от скорости образования, сколько от скорости разложения H_2O_2 . Так, в печени концентрация H_2O_2 находится в диапазоне от 1 до 10 нМ. В хрусталике глаза, где активность каталазы не была обнаружена, концентрация перекиси водорода может составлять десятки мкМ. Особенно высока концен-

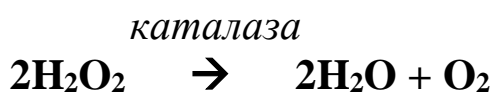
трация H_2O_2 в очаге воспаления, благодаря активности фагоцитирующих клеток: макрофагов, нейтрофилов и моноцитов.

Разложение перекиси водорода происходит двумя путями:

- в неферментативной реакции Фентона с участием металлов с переменной валентностью. Эта реакция является основным источником гидроксильных радикалов ($\cdot\text{OH}$) в биосистемах:



- в реакции, катализируемой ферментом *каталазой*:



Каталаза – один из АО ферментов, благодаря которому из цитотоксичной перекиси водорода образуются безвредные для клетки продукты – вода и молекулярный кислород. Помимо *каталазы*, обладающей абсолютной субстратной специфичностью, H_2O_2 разрушается также с участием ферментов семейства *пероксидаз*, демонстрирующих групповую субстратную специфичность.

Перекись водорода является окислителем умеренной силы, то есть обладает умеренной цитотоксичностью. Такое действие H_2O_2 обусловлено, в основном, тем, что она является источником гидроксильных радикалов $\cdot\text{OH}$, которые являются сильными окислителями и чрезвычайно цитотоксичны. Этот процесс происходит в результате неферментативного разложения H_2O_2 в двух реакция:

- реакция Фентона (основной источник $\cdot\text{OH}$ в биосистемах):



- реакция Хабер–Вейсса:



Молекула перекиси водорода относительно стабильна и не несет электрического заряда. Благодаря этим свойствам молекула H_2O_2 легко проникает через биомембраны, в отличие от $\cdot\text{O}_2^-$ и $\cdot\text{OH}$. После проникновения внутрь клетки, H_2O_2 может взаимодействовать с

ионами железа или меди (металлы с переменной валентностью) и разлагаться с образованием гидроксильных радикалов.

Гидроксильный радикал. Гидроксильный радикал (*ОН) появляется, если на 2р-подуровне молекулы перекиси водорода появляется один дополнительный электрон. В результате молекула перекиси разрушается с образованием *ОН и ОН⁻. Это происходит в реакциях Фентона и в меньшей степени – Хабер–Вейсса, где донорами электрона являются Fe²⁺ и супероксид, соответственно (см. выше). Электронное строение гидроксильного радикала представлено на рисунке 7.



Рис. 7. Электронное строение молекулы гидроксильного радикала

*ОН чрезвычайно химически активен и является сильным окислителем, повреждающим структуру биомолекул. Типичные реакции, в которых участвует *ОН:

- Взаимодействие с ненасыщенными жирными кислотами в молекулах липидов. Это одна из основных реакций инициирования СРО липидов или перекисного окисления липидов (ПОЛ) в мембранах. В ходе цепной, разветвлённой реакции СРО липидов, последние окисляются до короткоцепочечных углеводородных фрагментов.

- Взаимодействие с рибозой и дезоксирибозой, входящих в состав нуклеиновых кислот. Эта реакция лежит в основе мутагенного эффекта *ОН.

- Взаимодействие с пуриновыми и пиримидиновыми основаниями нуклеиновых кислот. Так, присоединение *ОН к молекуле тимина приводит к нарушению комплементарности азотистых оснований в цепи ДНК и, в конечном счете, вызывает мутацию и даже гибель клетки.

Известно, что вследствие высокой химической активности *ОН, его время жизни составляет около 100 мкс, а расстояние, которое этот радикал может пройти от места образования до места встречи с молекулой-мишенью, не превышает 100 нм. Иными словами, точка образования радикала и точка, где он вступает во взаимодействия с молекулами-мишенями, лежат в непосредственной близости друг от друга. На этом свойстве *ОН основано использование эффекта «сайт-специфического» образования гидроксильного радикала. Суть подхо-

да основано на том, что место образования *ОН (а, значит, и место реакции) можно задать путём «фиксации» ионов металлов с переменной валентностью, например, Fe. Добавление H₂O₂ в такую систему приведет к тому, что вблизи ионов железа начнется реакция Фентона с образованием *ОН. Такой механизм образования *ОН используется при применении некоторых антибиотиков для химиотерапии опухолей. Антибиотик должен иметь сродство к нуклеиновым кислотам и одновременно хелатировать (связывать) ионы железа, оставляя их в каталитически активной форме. Этим требованиям отвечает антибиотик блеомицин. Введенный в организм блеомицин, прочно связывается с нуклеиновой кислотой и хелатирует как эндогенное, так и экзогенное железо. Добавленная H₂O₂ легко преодалевает мембраны, и вблизи молекул блеомицина начинают образовываться радикалы *ОН, которые разрывают молекулы ДНК, что тормозит деление малигнизированных клеток.

Синглетный кислород. Синглетный кислород (¹O₂) одно из метастабильных возбужденных состояний молекулярного кислорода (O₂), который находится в основном, триплетном состоянии. Метастабильным состоянием называют термодинамически устойчивое состояние неустойчивого равновесия какой-либо физической микросистемы. Для конфигурации электронных орбиталей ¹O₂ характерно наличие одной неподелённой пары электронов (рис. 8).

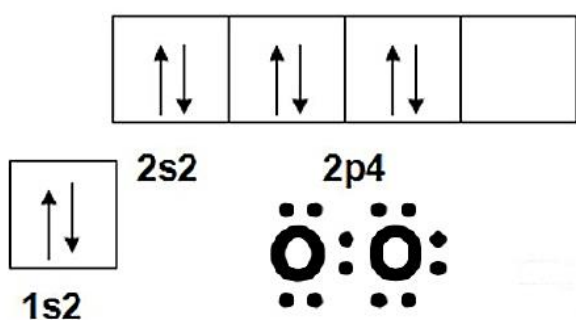


Рис. 8. Конфигурация электронных орбиталей в молекуле синглетного кислорода

Таким образом, строение синглетного кислорода обеспечивает ему более высокую энергию, по сравнению с триплетным (невозбужденным) состоянием молекулярного кислорода. Разница энергий составляет 22,5 ккал/моль. В связи с этим, ¹O₂ имеет более высокую реакционную способность. Кроме того, время жизни синглетного кислорода в водной среде аномально высоко и составляет 10⁻⁵ с.

Синглетный кислород может образоваться под влиянием квантов солнечного света, в результате спонтанной дисмутации суперок-

сидных анион-радикалов кислорода, а также при воздействии на организм ионизирующего излучения.

$^1\text{O}_2$ способен вызывать окислительную деградацию мембранных фосфолипидов. В результате липидная фаза мембраны становится более ригидной. Это означает, что подвижность цепей жирных кислот в составе фосфолипидов снижается. В итоге «текучесть» фосфолипидного бислоя мембраны уменьшается, что начинает ограничивать конформационную подвижность полипептидных цепей интегральных белков. Это явление лежит в основе снижения функциональной активности мембранных рецепторов, встроенных в мембрану ферментов и ионных каналов. Помимо этих эффектов синглетный кислород способен непосредственно окислять сульфгидрильные группы в активных центрах ферментов, что лежит в основе их ингибирования.

Оксид азота и его активная форма. В физиологических условиях в определенных типах клеток организма синтезируется оксид азота (NO), который, с химической точки зрения, правильнее называть монооксидом азота (II). NO является свободным радикалом, поскольку содержит неспаренный электрон в атоме азота. На этом основании оксид азота можно обозначить, как $^*\text{NO}$. Электронная структура его молекулы представлена на рисунке 9.



Рис. 9. Электронная структура молекулы оксида азота, или монооксида азота (II)

Синтез NO из аминокислоты L-аргинина катализирует гем-содержащий фермент *NO-синтаза (NOS)*. В норме в организме функционируют только конститутивные *eNOS*, *nNOS* и *mNOS* – эндотелиальная, нейрональная и макрофагальная изоформы синтазы. Продукцируемый в этих условиях NO выполняет регуляторные функции и рассматривается как один из вторичных мессенджеров. Регуляторные функции $^*\text{NO}$ были открыты в 1986 г. Р. Фарчготт и Л. Завадским.

$^*\text{NO}$, как свободный радикал, имеет высокую реакционную способность и сравнительно большое время жизни – до 10 с. Он может действовать как аутокринно (на уровне той же клетки, где был синтезирован), так и паракринно – на соседние клетки, благодаря способности диффундировать на относительно большие расстояния и легко проникать через клеточные мембраны., то есть, влиять на функциональное состояние клеток без посредничества рецепторов. В норме

мишенью NO является растворимая (цитоплазматическая) *гуанилатциклаза*. Этот фермент, активируемый NO, синтезирует другой вторичный мессенджер – циклический гуанозинмонофосфат (цГМФ). В свою очередь, цГМФ аллостерически активирует представителей семейства серин-треониновых *протеинкиназ G*. Таким образом, в физиологических условиях NO, являясь вторичным мессенджером, оказывает множество регуляторных эффектов. Например, расслабляет гладкие мышцы стенок сосудов (поддержание сердечно-сосудистого гомеостаза), участвует в регуляции пресинаптического высвобождения нейромедиаторов в нервной системе, модулирует активность фагоцитоза (иммунная система), модулирует морфогенез и многие другие процессы жизнедеятельности.

В условиях широко круга патологических процессов, в патогенез которых важный вклад вносят реакции воспаления и нарушения функционирования иммунной системы, во множестве типов клеток начинает экспрессироваться *индуцибельная NOS (iNOS)*. Сигналами к индукции её синтеза становятся: адреналин, норадреналин, ацетилхолин, гистамин, брадикинин, АДФ, серотонин, тромбин, эндотелин и др. В итоге в самых различных тканях существенно повышается концентрация *NO. При этом оксид азота перестает выполнять функции вторичного мессенджера. В условиях патологии повышение тканевой концентрации *NO всегда сочетается с высокими концентрациями супероксидного анион-радикала кислорода. Оба соединения, обладающие большой реакционной способностью, начинают с высокой скоростью неферментативно взаимодействовать друг с другом, образуя чрезвычайно цитотоксический продукт – пероксинитрит. Он уже не является свободным радикалом, поскольку неспаренные электроны в молекулах *O₂⁻ и в *NO образуют новую химическую связь. Электронная структура пероксинитрита представлена на рисунке 10.



Рис. 10. Электронная структура молекулы пероксинитрита, который способен давать анион пероксинитрита (ONOO⁻)

Стабильность пероксинитрита в водных растворах, во многом определяет его высокую цитотоксичность. Стабильность молекулы позволяет пероксинитриту диффундировать на сравнительно большие расстояния и взаимодействовать с широким кругом внутрикле-

точных молекул-мишеней. Пероксинитрит – сильный окислитель, который способен:

- окислять железосерные центры и тиолы белков;
- стимулировать СРО липидов биомембран и липидного компонента сывороточных липопротеинов;
- окислять азотистые основания в ДНК, а также вызывать разрывы цепи нуклеиновых кислот, приводя к мутациям;
- участвовать в реакциях, катализируемых металлами переменной валентности, а также с металлами, входящими в состав молекул СOD и др. В результате такой реакции образуются гидроксильный анион и ион нитрониума (NO_2^+). Последний атакует остатки тирозина в белках с образованием нитротирозина. В последнем случае происходит нитрование белков, что нарушает их нативную конформацию и функции. Показано также, что нитрование белков цитоскелета лежит в основе формирования различных патологических состояний;
- разлагаться с образованием высоко цитотоксичного гидроксильного радикала (*ОН, см. выше):



На основании этих эффектов, пероксинитрит получил название **активной формы оксида азота (АФОА)**. Повышение тканевой концентрации пероксинитрита и цитотоксичного продукта его разложения (*ОН) вызывает формирование эндотоксинового шока, который по аналогии с окислительным стрессом, получил название **нитрозативного стресса**.

Очевидно, что окислительный и нитрозативный стрессы не существуют отдельно друг от друга. По своей сути, это две стороны одного и того же явления, в ходе которого на биомолекулы одновременно негативно воздействуют АФК и АФОА. Их суммарный эффект не только лежит в основе формирования многих патологических состояний, но, в определенных условиях, способен вызывать гибель как отдельных клеток, так и всего организма.

ОСНОВНЫЕ ИСТОЧНИКИ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА В КЛЕТКЕ

АФК в клетке образуются в физиологических условиях в ходе множества окислительно-восстановительных реакций как ферментативного, так и неферментативного характера.

Образование активных форм кислорода в дыхательной цепи митохондрий

В дыхательной цепи митохондрий существуют следующие источники АФК:

Комплексы I и III дыхательной цепи. В состав этих комплексов входят несколько Fe-S-кластеров, с которых в физиологических условиях происходит незначительная спонтанная «утечка» электронов. Хотя это явление носит случайный характер, «потерявшиеся» таким образом электроны способны обеспечивать одноэлектронное восстановление молекулярного кислорода, что приводит к продукции супероксида ($*O_2^-$).

Коэнзим Q (КоQ) или убинон. Гидрофобные молекулы КоQ в большом количестве растворены в липидной фазе внутренней мембраны митохондрий, где служит «коллектором» электронов, поступающих из комплексов I и II дыхательной цепи. Молекула КоQ акцептирует пару электронов в два этапа. На первом этапе убинон принимает один из двух электронов, превращаясь в семихинон. Семихинон является свободным радикалом, поскольку содержит один неспаренный электрон. С определённой долей вероятности этот электрон может покинуть молекулу семихинона (ещё одна возможность «утечки» электрона) и взаимодействовать с молекулярным кислородом, осуществляя его одноэлектронное восстановление до супероксидного анион-радикала кислорода (рис. 11).

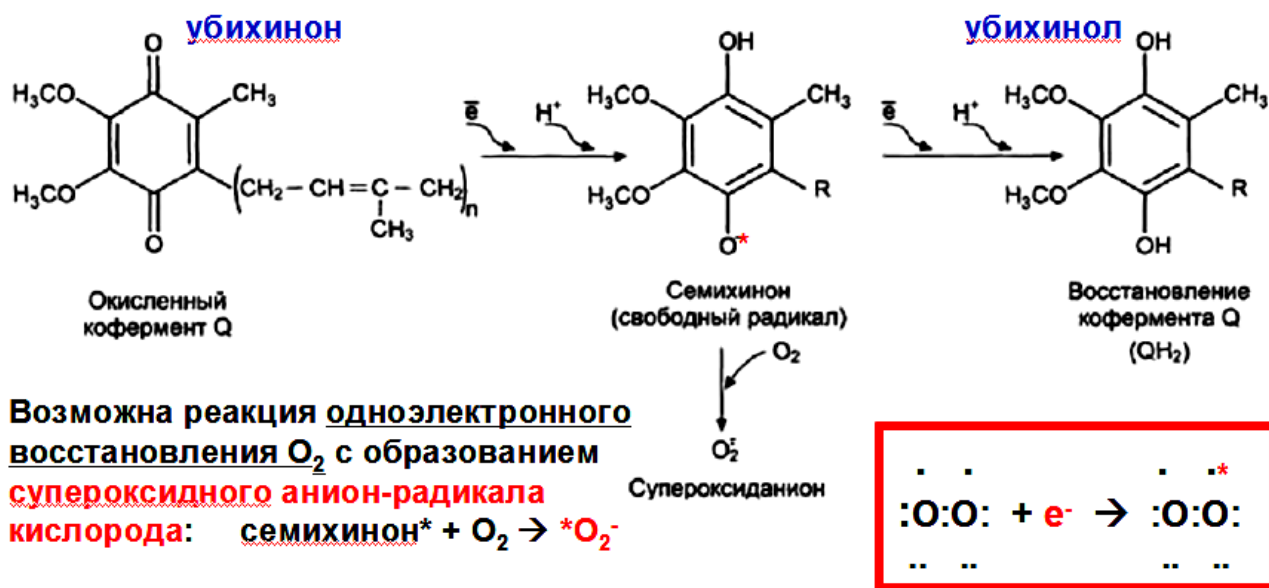


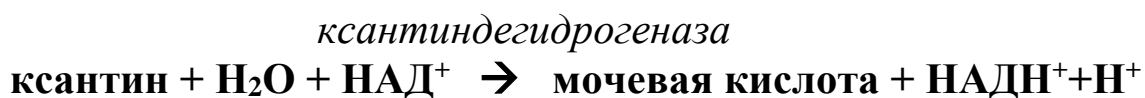
Рис. 11. Реакция восстановления убинона в убинол

Реакция включает стадию образования семихинона, который способен быть донором электрона (\bar{e}) для одноэлектронного восстановления молекулярного кислорода с образованием супероксида.

В норме спонтанная «утечка» электронов из семихинонов и I, и III комплексов относительно невелика. Антиоксидантные ферменты СОД (митохондриальный и цитоплазматический изоферменты), а также *каталаза*, снижают концентрации $*O_2^-$ и H_2O_2 до безопасных для клетки уровней. Это предотвращает избыточное генерирование свободных радикалов и повреждение биомолекул.

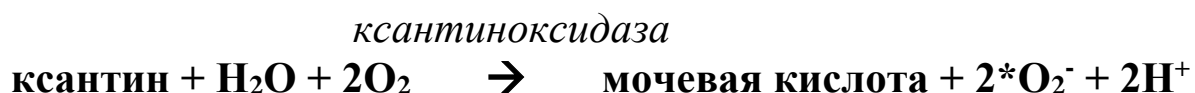
Образование активных форм кислорода в ксантиноксидазной реакции

В условиях нормоксии *ксантиндегидрогеназа* катализирует окисление ксантина с участием $НАД^+$. В этой реакции молекулярный кислород в качестве акцептора электронов не участвует:



При нарушении кровоснабжения органа, или его части, в зоне ишемии быстро развиваются следующие события:

- вследствие усиления распада адениновых нуклеотидов накапливаются субстраты реакции – ксантин и гипоксантин;
- подавляется синтез АТФ, что приводит к частичной деполяризации клеточной мембраны. В результате в цитоплазме клеток быстро нарастает концентрация Ca^{2+} . Одним из следствий этого является активация Ca^{2+} -зависимых протеаз. С их участием *ксантиндегидрогеназа* подвергается частичному протеолизу с отщеплением короткого пептида, в результате чего фермент необратимо трансформируется в *ксантиноксидазу*. Акцептором электронов в ксантиноксидазной реакции становится молекулярный кислород, а продуктом – супероксид:



Так, в условиях гипоксии (ишемии) ткани, *ксантиноксидаза* становится основным источником $*O_2^-$. Механизм этой трансформации был открыт в 80-х годах прошлого века. Он позволил объяснить, на первый взгляд, парадоксальный феномен активации реакций СРО

биомолекул в ишемизированной ткани (дефицит кислорода), в то время как реакции СРО зависят от кислорода.

Образование активных форм кислорода в микросомальной системе биотрансформации ксенобиотиков

В мембране гладкого эндоплазматического ретикула (ЭПР) встроена монооксигеназная система, которая осуществляет первую фазу биотрансформации гидрофобных ксенобиотиков. Эта система также участвует в биосинтезе стероидных гормонов, желчных кислот и простагландинов.

Центральную роль в монооксигеназной системе играет гемопро-теид цитохром P-450 (цит. P-450) и Fe-S кластер, который входит в состав ФАД-содержащей НАДФН: цит. P-450-редуктазы. В ходе реакции один атом кислорода включается в состав молекулы окисляемого соединения (RH), в результате чего в его молекуле образуется гидроксильная группа. Другой атом кислорода восстанавливается до H₂O. Основным источником H⁺ и электронов является НАДФН (рис. 12).

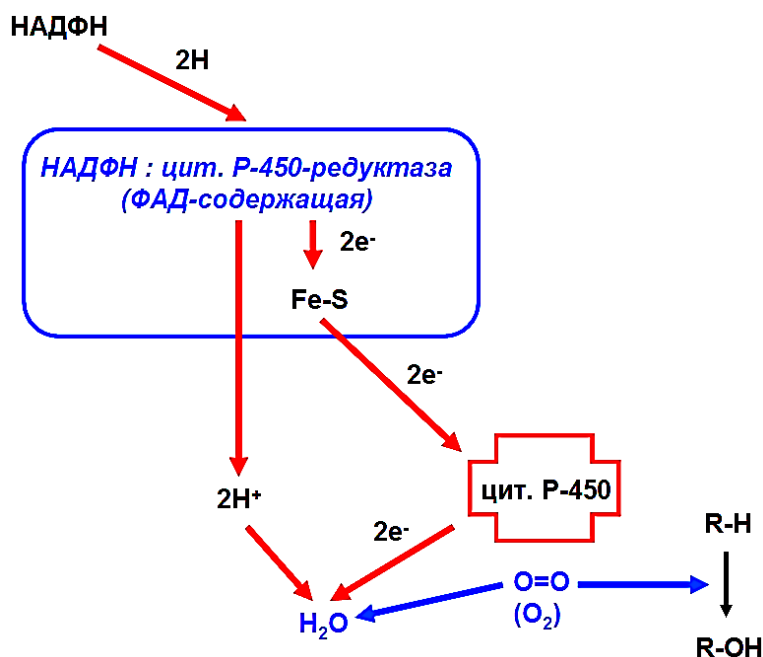


Рис. 12. Монооксигеназная НАФН-зависимая система биотрансформации ксенобиотиков в мембране эндоплазматического ретикула

«Утечка» электронов (\bar{e}) может спонтанно происходить на Fe-S-кластере. Эти электроны способны взаимодействовать с молекулярным кислородом (O₂). Одноэлектронное восстановление O₂ приводит к образованию супероксида (*O₂⁻).

Образование активных форм кислорода в пероксисомах

Пероксисомы (ПОС) – внутриклеточные органеллы, выполняющие широкий круг функций в рамках промежуточного обмена. Ряд метаболических процессов, катализируемых ферментами ПОС, сопровождаются образованием H_2O_2 , как одного из нормальных продуктов этих превращений.

К числу H_2O_2 -продуцирующих ферментов ПОС относятся:

- *оксидаза жирных кислот* с очень длинной ацильной цепью ($\text{C}_{22:0}$ – тетракозановая кислота, $\text{C}_{26:0}$ – гексакозановая кислота). Эта ФАД-зависимая *ацил-КоА-оксидаза* (1-я реакция в цепи окисления жирных кислот в ПОС) передаёт электроны непосредственно на O_2 с образованием H_2O_2 .

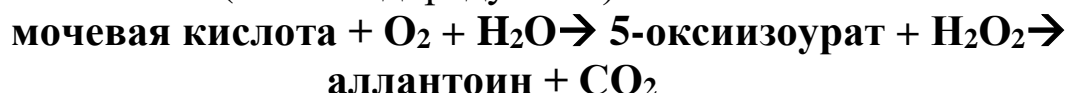
- *гликолатоксидаза* (флавинмононуклеотид):



- *оксидаза D-аминокислот* (ФАД-содержащий флавопротеин):



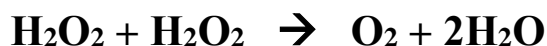
- *уратоксидаза* (Cu-оксидоредуктаза):



Таким образом, в ходе нормального функционирования ПОС образуется значительное количество H_2O_2 . Однако окислительный стресс не развивается в связи с тем, что в ПОС содержится ~ 50% клеточной активности *каталазы*.

Каталаза разрушает H_2O_2 до H_2O и O_2 :

каталаза



Гипохлорит-ион. К активным формам кислорода часто относят и **гипохлорит-ион** (OCl^-). В азурофильных гранулах нейтрофилов, моноцитов и тканевых макрофагов содержится гемопротеиновый фермент *миелопероксидаза* (МПО) или *H_2O_2 -оксилоредуктаза*. Фермент катализирует реакцию:

МПО



Первичным продуктом, образующимся в ходе реакции окисления хлоридов с участием МПО, является хлорноватистая кислота (HOCl), которая находится в равновесии с гипохлорит-ионом (OCl^-):



При активации фагоцитов происходит их дегрануляция, которая отражает секрецию *МПО* в фагосомы или во внеклеточный матрикс, где происходит образование больших количеств гипохлорит-ионов. Эти ионы чрезвычайно активны и являются сильными окислителями. Если гипохлорит-ионы образуются внутри фагосом, то их мембрана предохраняет собственные клеточные структуры макрофагов от повреждающего воздействия OCl^- . Внутри фагосом гипохлорит-ион разрушает стенку бактериальной клетки и тем самым убивает бактерии.

При взаимодействии гипохлорит-ионов с белками, в первую очередь, происходит окисление их сульфгидрильных и тиоэфирных групп, что подавляет функциональную активность белков. OCl^- окисляют железосерные и гемовые простетические группы ферментов и ингибируют их. Показано, что гипохлорит-ионы способны легко проникать в поверхностный фосфолипидный слой сывороточных липопротеинов низкой плотности. В результате инициируется СРО фосфолипидного компонента липопротеиновых частиц, что способствует захвату окисленных липопротеинов макрофагами посредством скавэнджер-рецепторов.

Кроме того, в работах А.Н. Осипова было показано, что высокоцитотоксичные радикалы гидроксила ($*\text{OH}$) могут образовываться при взаимодействии гипохлорит-ионов с ионами железа (Fe^{2+}). При этом выход радикала гидроксила существенно больше, чем в реакции Фентона (см. выше):



Эта реакция усиливает неспецифический цитотоксический эффект гипохлорит-ионов.

На рисунке 13 приведены основные источники активных форм кислорода в клетке и её антиоксидантные ферменты.

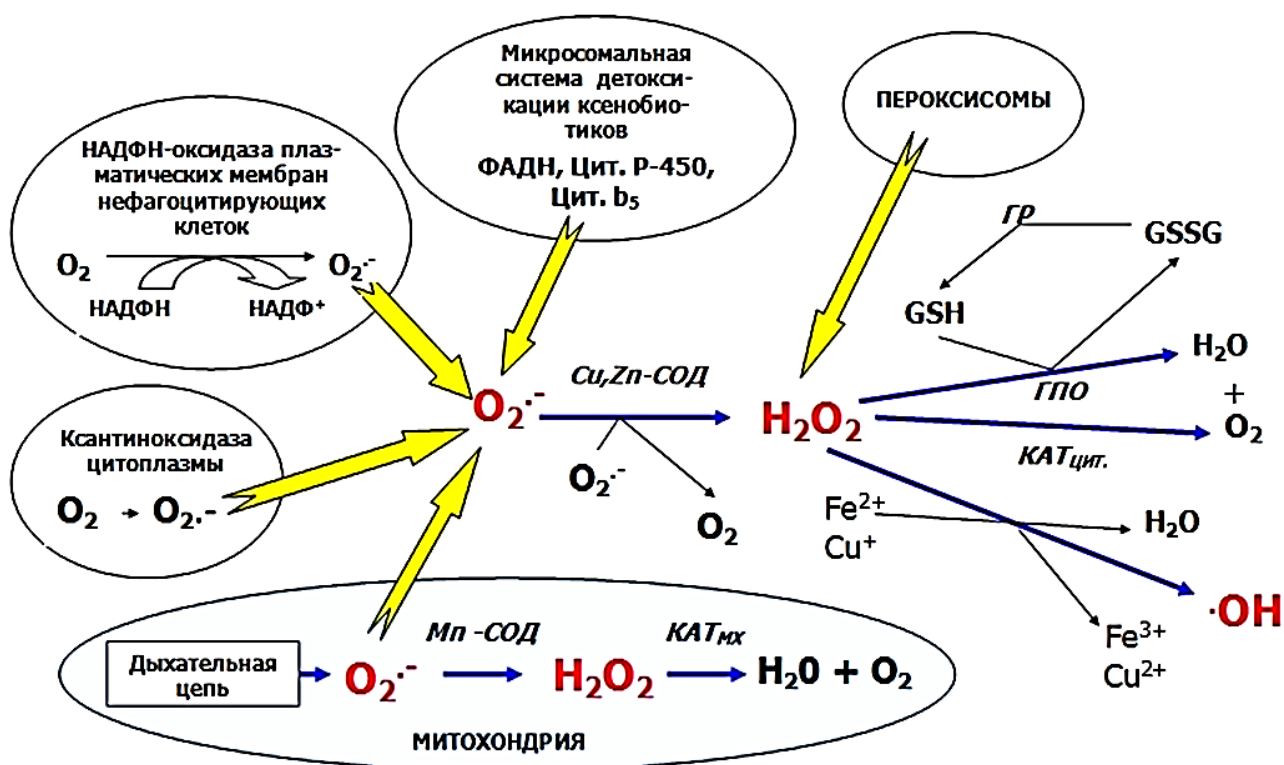


Рис. 13. Основные источники активных форм кислорода в клетке и её антиоксидантные ферменты

Cu, Zn-SOD и Mn-SOD – цитоплазматический и митохондриальный изоферменты супероксиддисмутазы, соответственно. KATцит. и KATмх – цитоплазматический и митохондриальный изоферменты каталазы, соответственно. GSH и GSSG – восстановленный и окисленный глутатион. GP – глутатионредуктаза. GPO – глутатионпероксидаза.

СВОБОДНОРАДИКАЛЬНОЕ ОКИСЛЕНИЕ БИОМОЛЕКУЛ

Свободнорадикальному окислению подвержены все классы биомолекул: белки, нуклеиновые кислоты, а также ненасыщенные липиды клеточных мембран и липидный компонент сывороточных липопротеинов. Окислительная модификация белков и нуклеиновых кислот рассмотрена во второй части настоящего пособия.

Свободнорадикальное (перекисное) окисление липидов. Процессы СРО липидов, наряду с путями α -, β - и ω -окисления жирных кислот, одно из естественных направлений окислительного превращения липидов, обусловленное аэробным характером метаболизма. СРО липидов носит универсальный характер.

По мнению академика Ю.А. Владимирова, реакции СРО липидов и путь β -окисления жирных кислот находятся в организме в своеобразных конкурентных отношениях. Так, гиперпродукция гидроперекисей липидов тормозит транспорт электронов по дыхательной це-

пи митохондрий и ингибирует β -окисление жирных кислот. Природные же антиоксиданты (АО), подавляя активность реакций СРО, способны сместить баланс в пользу β -окисления.

Во всех клетках аэробных организмов всегда имеются оба условия, необходимые для инициации и протекания СРО липидов.

Во-первых, это АФК, которые являются инициаторами цепных реакций СРО липидов.

Во-вторых, наличие субстратов для реакций СРО. Субстратами являются ненасыщенные жирные кислоты, как свободные (неэстерифицированные), так и входящие в структуру молекул различных классов липидов, прежде всего фосфолипидов.

Подверженность ненасыщенных жирных кислот перекисному окислению пропорциональна числу имеющихся в ее молекуле двойных связей. В свою очередь, к наиболее легко окисляемым фосфолипидов, относятся: фосфатидилэтаноламин, фосфатидилсерин и фосфатидилинозит. Любые изменения метаболизма фосфолипидов, приводящие к обогащению мембран легко окисляемыми фосфолипидами (увеличение доли ненасыщенных жирных кислот в составе молекул), делает их более легко окисляемыми и является фактором, стимулирующим реакции СРО липидов. Относительно устойчивы к перекисному окислению фосфатидилхолин и сфингомиелин.

Помимо ненасыщенных жирных кислот и фосфолипидов в реакциях СРО участвуют:

- ненасыщенные алифатические спирты (сфингозин и др.),
- ненасыщенные углеводороды (сквален, каротины),
- полициклические ненасыщенные спирты гидроароматического ряда (стерины, витамины группы D),
- ненасыщенные циклические одноатомные спирты (ретинолы).

В физиологических условиях концентрация гидроперекисей в тканях животных и человека невелика и лежит в диапазоне от 1 до 10 нмоль на 1 мг липидов.

Вовлечение липидов в реакции СРО необратимо нарушает их структуру. Одним из многочисленных примеров этого может служить СРО жирных кислот в составе фосфолипидов (ФЛ), образующих основу бислоя биологических мембран. Повышенная по сравнению с физиологическими условиями активность СРО мембранных ФЛ приводит к повреждению липидного бислоя, его структурной дезорганизации и к появлению патологической проницаемости мембран. Прямыми следствиями этого становятся ингибирование встроенных в

мембрану ферментов, блокировка ионных каналов и снижение аффинности рецепторов. Эти явления вызывают множественные дисфункции клеток, включая необратимые нарушения.

Механизмы свободнорадикального (перекисного) окисления липидов. Перед инициацией цепной реакции СРО ненасыщенной жирной кислоты, требуется её активация. Реакция активации заключается в дегидрировании, то есть в отрыве атома водорода от С-атома жирной кислоты, который находится в α -положении по отношению к двойной связи. Если жирная кислота содержит две и более двойных связей, то и α -С-атомов будет несколько. В этом случае дегидрированию **с равной вероятностью** может подвергнуться любой из этих α -С-атомов. «Выбор» именно α -С-атома обусловлен тем, что для отрыва от него атома водорода потребуется затратить минимальную энергию, всего 77 ккал/моль, в то время как для С-атомов, расположенных дальше от двойной связи, уже 89–93 ккал/моль. На рисунке 14 показаны положения двух α -С-атомов в молекуле олеиновой кислоты (С_{18:1}).

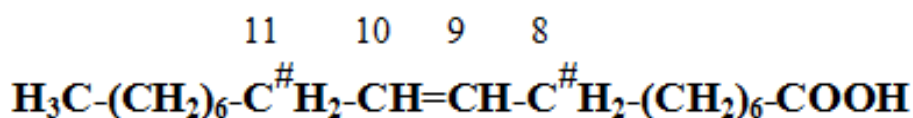


Рис. 14. Положение α -углеродных атомов в молекуле олеиновой кислоты

α -углеродные атомы обозначены символом #. Сверху пронумерованы 8, 9, 10 и 11 атомы углерода. Очевидно, что α -углеродные атомы имеют порядковые номера 8 и 11.

Таких α -углеродных атомов будет содержаться: в линолевой (С_{18:2}) – 3, линоленовой (С_{18:3}) – 4 и в арахидоновой (С_{20:4}) – 5. Это объясняется тем, что в жирных кислотах, содержащих от 2-х и более двойных связей, между двойными связями всегда располагается метиленовый мостик -СН₂- или (-СН=СН-СН₂-СН=СН-).

Общая схема СРО ненасыщенной жирной кислоты на примере линолевой кислоты представлена на рисунке 15.

Рассмотрим случай, когда отрыв атома водорода происходит от α -С-атома олеиновой кислоты, находящегося в положении 11 (рис. 15, этап I). В результате появляется неспаренный электрон – свободная валентность, которая **делокализуется**, охватывая пять С-атомов: С₉–С₁₃. На схеме эта валентность обозначена пунктиром. В итоге образуется **пентадиенальный радикал** жирной кислоты (L*). Далее,

на этапе II, быстро происходит реакция изомеризации, в результате которой смещение позиции одной из двух двойной связи приводит к образованию системы **сопряженных** двойных связей – **диеновый конъюгат**, в котором между двойными связями уже нет метиленового мостика. **Этап III:** происходит взаимодействие АФК с диеновым конъюгатом. Реакция равновероятно может произойти как по С-9, так и по С-13. В рассматриваемом примере это происходит по С-9, в результате чего образуется **9-гидроперекисный радикал линолевой кислоты (LOO*.)** На этапе IV перекисный радикал может взаимодействовать с новой, ещё не окисленной, ненасыщенной жирной кислотой (LH), в результате чего радикал гидроперекиси превращается в **9-гидроперекись линолевой кислоты**, а жирная кислота (LH) – в новый радикал L*. В ходе этой реакции происходит «регенерирование» свободного радикала – реализуется принцип «неуничтожимости свободной валентности». Это типичная реакция продолжения цепной реакции СРО липидов. Если бы на этапе III АФК прореагировала с С-13 атомом, то в итоге образовалась бы **13-гидроперекись линолевой кислоты**. По этим причинам при окислении линолевой кислоты образуется смесь 9- и 13-гидроперекисей.

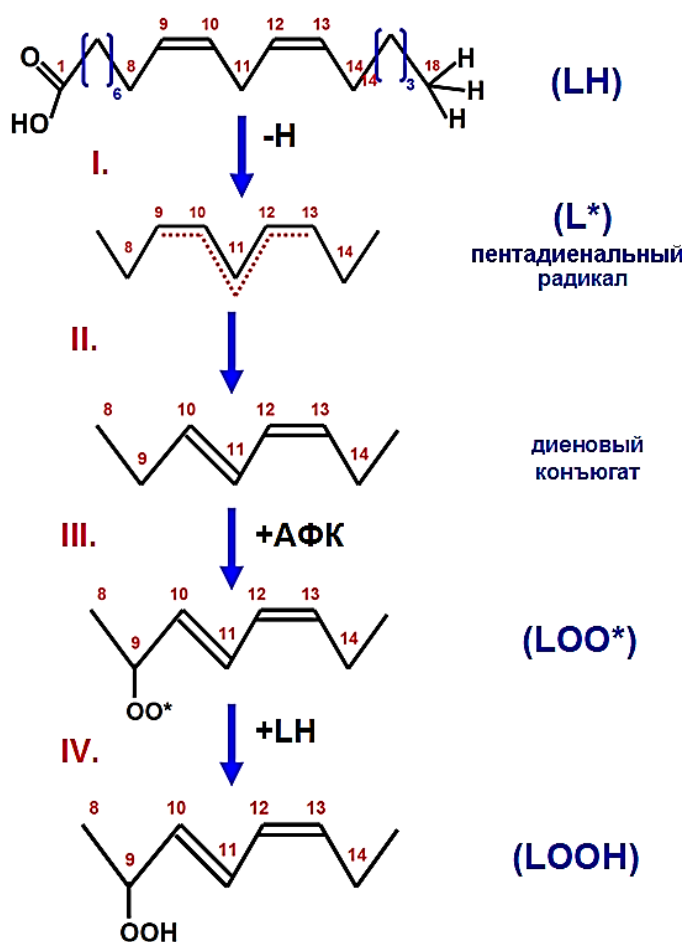


Рис. 15. Схема основных этапов свободнорадикального (перекисного) окисления линоленовой кислоты (C_{18:2})

LH – ненасыщенная линолевая кислота (*L* – липид).
*L** – алкильный радикал линолевой кислоты.

*LOO** – гидроксильный радикал линолевой кислоты.
LOOH – гидроперекись линолевой кислоты.

Если окисляются жирные кислоты с бóльшим, чем у линолевой кислоты количеством двойных связей, то основные закономерности процесса будут такими же. Однако, ввиду содержания в их молекулах бóльшего количества α -углеродных атомов, будет соответственно увеличиваться и число изомеров гидроперекисей в смеси продуктов.

На рисунке 16 представлена общая схема СРО ненасыщенной жирной кислоты и указаны четыре типа реакций, протекающих при этом.

Из схемы на рисунке 16 следует, что:

- Типичным фактором, **инициирующим реакции СРО**, является гидроксильный радикал ($*\text{OH}$), взаимодействующий с ненасыщенной жирной кислотой (LH). В свою очередь, $*\text{OH}$ образуется в реакции Фентона.

- В **реакциях продолжения цепи** происходит чередование «блока» трех реакций:



В результате этих превращений происходит «регенерирование» алкоксильного радикала жирной кислоты (L^*), который вовлекает в реакции СРО всё новые и новые молекулы ненасыщенных жирных кислот (LH). Для реакций продолжения цепи в стационарных условиях постоянной величиной будет сумма радикалов: $\text{LO}_2^* + \text{L}^*$.

- **Реакции разветвления цепи** происходят на этапе реакций продолжения цепи. Это становится возможным, поскольку один из продуктов реакции продолжения цепи – гидроперекись жирной кислоты (LOOH) - способна взаимодействовать с Fe^{2+} , в результате чего появляются радикалы жирной кислоты (L^* , LOO^*), способные инициировать новые ответвления реакций СРО ненасыщенных жирных кислот. Для реакций СРО очень характерно образование множественных разветвлений цепных реакций. По мнению Ю.А. Владимирова, скорость процесса СРО липидов в целом, будет определяться скоростью образования новых точек ответвлений цепей реакций.

- **Реакции торможения (обрыва) цепей реакций СРО** происходят с участием молекул антиоксидантов (InH). При этом гидроперекисные радикалы и гидроперекиси жирных кислот превращаются в безвредные для клеток органические спирты (LOH). Молекула InH трансформируется в радикал антиоксиданта (In^*). Благодаря чрезвычайно низкой энергии In^* не могут инициировать новые реакции СРО.

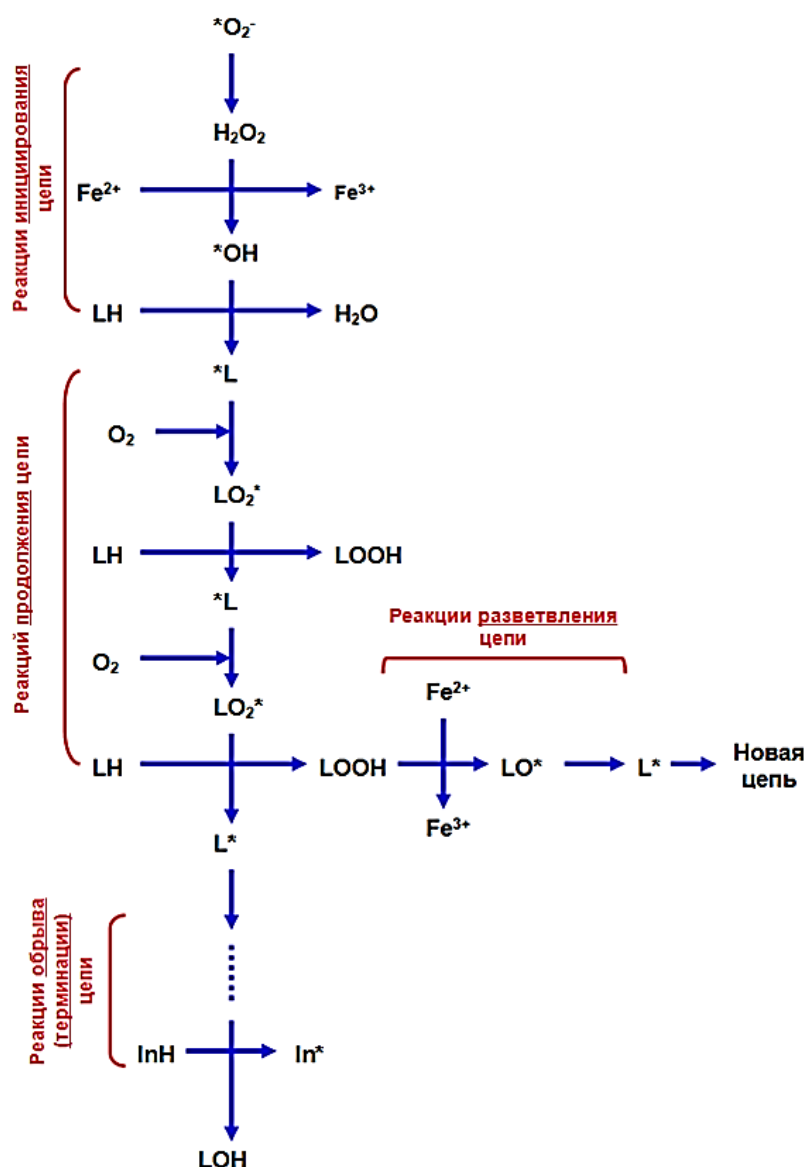


Рис. 16. Схема цепных реакций свободнорадикального окисления липидов

LH – ненасыщенная линолевая кислота (*L* – липид). *L** – алкильный радикал линолевой кислоты. *LOO** – гидроксильный радикал линолевой кислоты. *LOOH* – гидроперекись линолевой кислоты.

Продукты реакций свободнорадикального окисления липидов. Продукты реакций СРО липидов представляют собой чрезвычайно гетерогенную группу, состоящую из молекул, которые относятся к разным типам химических соединений. In vivo конкретный спектр продуктов определяется биохимическим строением окисляемых липидов, в том числе входящими в их состав жирных кислот. Продукты реакций СРО липидов принято делить на две группы:

- продукты, образующиеся на начальных этапах реакций СРО;
- продукты, образующиеся на конечных этапах реакций СРО.

Их называют также первичными продуктами, поскольку они образуются при взаимодействии высокоактивных продуктов начальных этапах реакций с широким кругом биомолекул, содержащихся в ткани.

Основные представители этих групп представлены на рисунке 17.



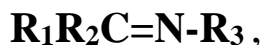
Рис. 17. Основные продукты реакций свободнорадикального окисления липидов *in vivo*

Установлено, что алкоксильные радикалы (LO*) и алкильные радикалы (L*) в присутствии молекулярного кислорода быстро превращаются в гидроксильные (алкилперекисные) радикалы (LOO*), в связи с чем на более поздних стадиях реакций СРО липидов, преобладать будут радикалы LOO*.

К числу типичных продуктов, образующиеся на конечных этапах разветвленной цепи реакций СРО липидов, помимо упомянутых на рисунке 17 альдегидов, относятся также органические спирты, кетоны, эпоксиды и другие соединения. Среди альдегидов, большая часть приходится на малоновый диальдегид (МДА):



При взаимодействии МДА со свободными аминогруппами белков и нуклеиновых кислот образуются шиффовы основания (ШО) или основания Шиффа. ШО – соединения с высокой химической активностью. Они представляют собой N-замещенные имины с общей формулой:



где R_3 – арильная или алкильная группы.

Как МДА, так и ШО способны независимо друг от друга взаимодействовать с нативными белками, что приводит к образованию ковалентных сшивок – конъюгатов. Эти конъюгаты по своему размеру могут превосходить исходные биомолекулы. Прочность ковалентных связей позволяет конъюгатам быть весьма устойчивыми к действию ферментов лизосом и со временем накапливаться в клетке.

Помимо этого, ШО способны вступать в реакции полимеризации и поликонденсации. В результате таких взаимодействий нарушается нативная структура молекул белков, и они частично или полностью теряют свои функциональные свойства. Доказано, что негативные последствия взаимодействий МДА и ШО с белками и нуклеиновыми кислотами вносят существенный вклад в нарушения жизнедеятельности клетки в условиях окислительного стресса.

В конечном итоге, вышеупомянутые конъюгаты и полимеры участвуют в образовании «пигмента старения» – липофусцина (церида). Этот пигмент был обнаружен еще в 1894 г. в нейронах пожилых людей. В начале 50-х годов XX столетия, было доказано, что образование липофусцина связано с гиперактивным СРО ненасыщенных липидов клеточных мембран. В начале 60-х годов прошлого века было установлено, что липофусцин образуется с участием МДА, который выступает в качестве агента, образующего межбелковые сшивки. Накопление липофусцина в клетках всегда является признаком функциональной недостаточности системы АОЗ в организме.

К главным газообразным продуктам процессов СРО липидов являются этан и пентан, а также, в меньшей степени, другие газообразные низшие алифатические углеводороды. Они содержатся в составе выдыхаемого воздуха. Показано, что СРО линолевой кислоты даёт на выходе этан, арахидоновой кислоты – пентан. Эти две жирные кислоты преобладают в организме человека. СРО линоленовой кислоты даёт этан, олеиновой кислоты – октан, миристоолеиновой кислоты –

пентан и бутан, вакценовой кислоты – гептан и гексан. Установлено, что повышение содержания этана и пентана в выдыхаемом воздухе является специфическим и чувствительным индикатором активации процессов СРО липидов в организме.

АНТИОКСИДАНТЫ (АНТИОКИСЛИТЕЛИ). СИСТЕМА АНТИОКСИДАНТНОЙ ЗАЩИТЫ КЛЕТКИ

На протяжении всей жизни любой биосистемы, обитающей в аэробных условиях, в ней постоянно поддерживается динамическое равновесие между интенсивностью реакций, продуцирующих СР, и синтезом, и расходом антиоксидантов (АО). Это жизненно необходимое равновесие поддерживается благодаря функционированию системы антиоксидантной защиты (АОЗ). Эволюция системы АОЗ проходила в неразрывном единстве с эволюцией аэробного метаболизма живых систем. В итоге сформировалась высокоэффективная и многоуровневая система АОЗ клеток. Систему образуют две функционально дополняющих друг друга составные части: *антиоксидантные ферменты и неферментативные (низкомолекулярные) вещества – антиоксиданты или антиокислители.*

В физиологических условиях, благодаря работе функционально полноценной системы АОЗ, во всех тканях организма поддерживается очень низкая стационарная концентрация эндогенных гидроперекисей и СР любой природы: она не превышает значений 10^{-9} – 10^{-10} гэкв на 1 мг липидов.

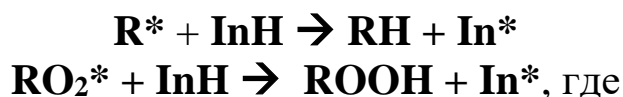
Система АОЗ не только предотвращает потенциально возможную избыточную активацию реакций СРО биомолекул в организме, но и является важным элементом сохранения гомеостаза его внутренней среды. Надёжность защиты обусловлена тем, что антиоксидантные ферменты и неферментативные элементы, составляющие систему АОЗ, локализуются как во внутриклеточном, так и во внеклеточном пространствах организма.

Антиоксиданты – вещества различного химического строения, как правило, низкомолекулярные, обладающие свойствами восстановителей. Они способны замедлять или останавливать реакции СРО биомолекул, путем связывания, модификации и разрушения СР и гидроперекисей. Характерным является то, что АО присутствуют в концентрации существенно меньшей, чем молекулы-субстраты реакций СРО. Благодаря АО, тканевая концентрация СР поддерживается на уровне, безопасном для жизнедеятельности биосистемы.

Каждая ткань организма обладает индивидуальным «резервом» функциональной мощности системы АОЗ. Существуют ткани, которые в силу особенностей своей функциональной специализации, проявляют высокую чувствительность к повреждающим эффектам СР. Ведущей причиной этому является малый «резерв» системы их АОЗ. К таким тканям относятся: центральная нервная система (ЦНС), сетчатая оболочка глаз и ткань легких.

В любой аэробной биосистеме идет постоянная конкуренция между процессами СРО и реакциями ферментативного окислительного метаболизма. Академик А.И. Журавлев (1975) подчеркивал: *«Биологический механизм действия биоантиокислителей сводится к смещению конкурентного отношения свободнорадикального и ферментативного окисления в пользу ферментативного. Тем самым биоантиокислители регулируют степень подавляющего влияния свободнорадикального окисления на большинство метаболических процессов. Конечным итогом действия биоантиокислителей является создание оптимальных условий для метаболизма и обеспечение нормального роста клеток и тканей».*

В общем виде реакции, в которых участвуют АО, можно представить, как



$\mathbf{R^*}$ и $\mathbf{RO_2^*}$ – свободные радикалы; \mathbf{InH} – молекула АО; $\mathbf{In^*}$ – радикал АО.

В результате взаимодействия свободных радикалов и АО образуется малоактивный радикал АО ($\mathbf{In^*}$), который обладает низкой энергией и уже не способен взаимодействовать с новыми молекулами-субстратами СРО, что приводит к **обрыву цепей** реакций СРО.

Отдельно следует остановиться на представлении о **«структурном АО эффекте»** или **«структурном АО»**. Под этим подразумевают высокую плотность «упаковки» остатков жирных кислот, принадлежащих молекулам фосфолипидов, которые образуют гидрофобную сердцевину мембранного бислоя. Чем плотнее упаковка, тем труднее молекулам АФК или СР различной природы диффундировать вглубь этой зоны и атаковать двойные связи жирных кислот, инициируя там реакции СРО. В экспериментах доказано, что нарушать «структурный АО» способны химические соединения-хаотропы, которые «разрых-

ляют» липидный бислой, а также лизо-фосфолипиды и свободные (неэстерифицированные) жирные кислоты, обладающие детергентным действием. В настоящее время общепринято, что «структурный АО»:

- действует эффективнее любого индивидуального АО
- является неспецифическим фактором регуляции активности реакций СРО.
- функционирует как на стадии инициации цепных реакций СРО, так и на стадии их обрыва (терминации).

По механизму действия АО можно разделить на две группы:

1. Превинтивные АО. Снижают активность уже протекающих реакций СРО, обрывая реакции продолжения и разветвления цепей. Эти АО легко отдают свои \dot{e} свободным радикалам (СР) и превращают их в химически малоактивные молекулярные продукты.

2. АО прямого действия («ловушки» СР). АО этой группы связывают СР, снижая их концентрацию в клетках. Это подавляет инициацию цепных реакций СРО. Среди АО – «ловушек» выделяют такие, которые обладают высоким сродством к определённым СР, например, ловушки гидроксил-радикалов (*ОН), синглетного кислорода (1O_2) и др.

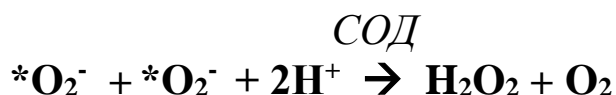
Характерной особенностью взаимодействия молекул неферментативных АО со СР является расходувание АО. Только при достаточном количестве АО в клетке происходит полная трансформация СР в стабильные продукты и реакции СРО ингибируются. Если содержание АО ниже «критической» для данного типа клетки или ткани, то реакции СРО лишь замедляются, сохраняя способность к аутокатализу.

В аэробных клетках обязательно функционирует особая категория ферментов – АО ферменты. Они катализируют реакции прямого обезвреживания АФК, гидроперекисей и их радикалов, а также реакцию, в ходе которой регенерируется важнейший клеточный неферментативный АО – восстановленный глутатион. Продуктами этих реакций являются соединения, не обладающие цитотоксическим действием: не запускают и не поддерживают реакции СРО.

АНТИОКСИДАНТНЫЕ ФЕРМЕНТЫ

Супероксиддисмутаза (СОД). Фермент был открыт в 1969 г. И. Фридович и Дж. МакКордом. СОД, проявляя абсолютную субстратную специфичность, катализирует реакцию диспропорциониро-

вания (дисмутации) между двумя супероксидными анион-радикалами кислорода ($*O_2^-$):



СОД обнаружена во всех аэробных организмах, а также в клетках аэротолерантных анаэробов и в некоторых облигатных анаэробов. Наличие относительно невысокой *СОД*-активности у некоторых анаэробов может отражать эволюционный ответ, обеспечивающий их выживание в условиях эпизодических контактов с кислородом. Обнаружены анаэробы, способные к индукции *СОД* в ответ на воздействие низких концентраций кислорода.

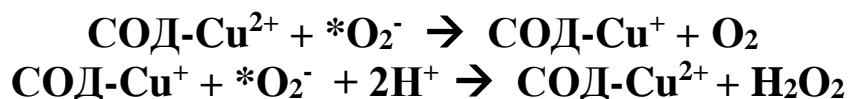
К числу типичных факторов, вызывающих индуцирующую синтеза *СОД* у эукариотов, относятся:

- увеличение концентрации O_2 в воздухе;
- повышение темпов образования $*O_2^-$;
- повышение биодоступности металлов для активного центра.

По общему признанию, *СОД* – важнейший АО фермент, который образует «первую линию защиты» клеток и тканей, обезвреживая супероксида ($*O_2^-$), из которого, в свою очередь, образуются остальные АФК. Благодаря работе *СОД* в клетке поддерживается низкая стационарная концентрация супероксида (10^{-12} – 10^{-11} М). Этим обеспечивается защита клеточных структур от действия как самих $*O_2^-$, так и от появления гидроксильных радикалов ($*OH$), которые могут образовываться из $*O_2^-$ и H_2O_2 .

СОД – представитель семейства металлоферментов. В цитоплазме клеток эукариот локализована *Cu,Zn-содержащая СОД* (*Cu,Zn-СОД*), а в матриксе митохондрий – *Mn-содержащая СОД* (*Mn-СОД*). Обе изоформы *СОД* являются гомодимерами и относятся к термостабильным глобулярным белкам.

Реакция дисмутации, катализируемая *Cu,Zn-СОД*, протекает в две стадии:



В ходе ферментативной реакции происходит перенос электрона с одного радикала $*O_2^-$ на другой. Промежуточным акцептором этого электрона служит атом меди, который входит в состав активного цен-

тра фермента. Zn^{2+} не участвует непосредственно в каталитическом цикле.

Константа скорости (k) неферментативной дисмутации супероксидов составляет около $5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$. В присутствии Cu , Zn -СОД, k увеличивается более чем в 3000 раз ($1,6 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$). Cu, Zn -СОД обладает наибольшей активностью по сравнению с Mn -СОД. Активность Cu, Zn -СОД не зависит от рН среды в диапазоне от 5,3 до 9, в то время как активность Mn -СОД уменьшается при значениях рН ниже нейтральных. Цианид ингибирует активность только Cu, Zn -СОД.

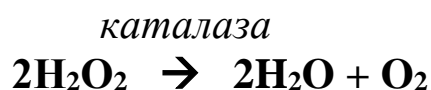
В 1982 г. в плазме крови человека была обнаружена относительно невысокая, по сравнению с внутриклеточным пространством, активность СОД. Эта изоформа СОД была названа *внеклеточной СОД* (*вк-СОД*). *Вк-СОД* оказалась термостабильным, богатым углеводами тетрамером, содержащим в каталитическом центре атомы Cu и Zn , но отличающимся от цитоплазматической Cu, Zn -СОД по аминокислотному составу. *Вк-СОД* обладает высокой чувствительностью к действию цианида и H_2O_2 . Показано, что *вк-СОД* может находиться в связанном с поверхностью эндотелия сосудов состоянии и формировать «защитный слой» на поверхности клеток. Полагают, что более низкая активность *вк-СОД* по сравнению с внутриклеточными изоферментами обусловлена наличием во внеклеточном пространстве неких низкомолекулярных пептидных ингибиторов.

Органы животных и человека в десятки раз отличаются по активности СОД. Наибольшая удельная активность СОД обнаружена в печени и эритроцитах.

Немотря на то, что в ходе реакции, катализируемой СОД, происходит уничтожение супероксида, но АО защита обеспечивается не полностью, поскольку в качестве продукта образуется одна из АФК - H_2O_2 , которая заметно уступает по цитотоксичности $*O_2^-$.

Каталаза. Энзим был обнаружен в 1900 г. О. Лоу, который и дал ему название. В 1937 г. Дж. Самнер и А. Даунс получили *каталазу* в кристаллическом виде и спустя год определили её молекулярную массу. Аминокислотная последовательность бычьей *каталазы* была определена в 1969 г., а трехмерная структура – в 1981 г.

Каталаза относится к семейству гем-содержащих ферментов. Простетическая группа *каталазы* сходна по строению с геминовой частью молекулы гемоглобина и содержит атом железа. Молекула *каталазы* состоит из четырех субъединиц. В общем виде действие *каталазы* можно описать уравнением:



Благодаря исследованиям Б. Чанса и его лаборатории удалось частично выяснить механизм реакции, катализируемой *каталазой*, которая протекает в две стадии:



Соединение-1 – мезомерная форма Fe в молекулы фермента.

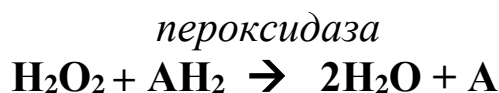
Формальная валентность Fe в составе *соединении-1* равна +5.

Каталаза – высокоактивный фермент и содержится во всех тканях организма в сравнительно большом количестве. Однако, наиболее высоко её содержание в эритроцитах (защита гемоглобина от АФК), а также в пероксисомах печени и почках. Пероксисомы содержат бóльшую часть внутриклеточной *каталазы*, что очевидно связано с образованием H_2O_2 во многих метаболических процессах, происходящих в пероксисомах в физиологических условиях.

Активность каталазы подавляется цианидами (CN^-) и азидами (N_3^-), которые необратимо связывают железо. Самый эффективный ингибитор каталазы – аминотриазол (3-амино-1,2,4-триазол), который блокирует первую стадию реакции, связываясь с соединением-1.

Пероксидазы. Они образуют группу АО-ферментов, которые различаются по субстратам окисления и строению активного центра.

Пероксидазы, как и *каталаза*, способны разрушать H_2O_2 с образованием воды. Однако, в отличие от *каталазы*, *пероксидазы* окисляют не две молекулы перекиси водорода, а одну молекулу H_2O_2 и одну молекулу какого-либо другого субстрата (AH_2). В общем виде реакцию можно представить, как:

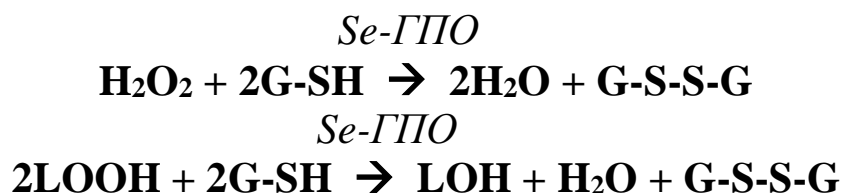


Важнейшими представителями семейства *пероксидаз*, являются *селеновая глутатионпероксидаза* и *глутатионпероксидаза фосфлипидов*.

Глутатионпероксидаза селеновая, (Se-ГПО). *Se-ГПО* была открыта в 1957 г. как фермент, защищающий гемоглобин эритроцитов

от окислительной дегградации. Однако фундаментальная роль *Se-ГПО* была выяснена несколькими годами позже благодаря работам Дж. Коэна и П. Хохштена (1963). Они выяснили, что гемоглобин эритроцитов окисляется перекисью водорода только после полного истощения внутриклеточного пула, восстановленного глутатиона, но не в результате ингибирования *каталазы* с помощью азидов.

Присутствие атома селена в активном центре фермента было установлено в 1973 г. Согласно современным представлениям, *Se-ГПО* – негемовая, селен-содержащая пероксидаза, состоящая из четырёх субъединиц. В каждой из них содержится атом селена в виде *Se*-цистеина, то есть аминокислоты цистеина, у которой атом серы замещён на атом селена. *Se-ГПО* катализирует реакцию окисления восстановленного глутатиона (G-SH) перекисью водорода или гидроперекисью жирной кислоты (LOOH):



Продуктами реакций являются соединения, не обладающие цитотоксическими свойствами: вода, органические спирты и окисленный глутатион, соответственно.

Около 70% фермента локализовано в цитоплазме клеток и около 30% в матриксе митохондрий.

В отношении субстратов *Se-ГПО* проявляет групповую субстратную специфичность. Характерными субстратами являются:

- перекись водорода,
- гидроперекись этила,
- гидроперекись кумола,
- гидроперекись трет-бутила,
- гидроперекись линоленовой кислоты,
- гидроперекись октадекадиеноата холестерина,
- простагландин G₂,
- ДНК, подвергшейся окислительной модификации.

Вместе с тем, *Se-ГПО* не активна в отношении гидроперекисей жирных кислот в составе молекул фосфолипидов мембранного бислоя. Ограничение обусловлено стерическими препятствиями.

Глутатионпероксидаза фосфолипидов (ГПО-ФЛ). Благодаря исследованиям Ф. Урсини и его коллег, осуществленным в период с 1982 по 1985 годы, было установлено, что в организме млекопитающих, гидроперекиси фосфолипидов, образующиеся непосредственно в мембранном бислое, могут восстанавливаться с участием другой селен-содержащей ГПО. Фермент получил название *глутатионпероксидазы гидроперекисей фосфолипидов* или *глутатионпероксидазы фосфолипидов (ГПО-ФЛ)*.

До гомогенной формы очищена ГПО-ФЛ из печени и сердца свиньи. Как и в *Se-ГПО*, в ГПО-ФЛ в акте катализа участвует селен в форме селеноцистеина. Групповая субстратная специфичность у ГПО-ФЛ проявляется в отношении:

- перекись водорода,
- гидроперекись кумола,
- гидроперекись трет-бутила,
- гидроперекись линолеиновой кислоты,
- фосфатидилхолин,
- фосфатидилэтаноламин,
- кардиолипин (1,3-бис-(sn-3'-фосфатидил-sn-глиерол),
- фосфатидная кислота.

Таким образом, концентрация гидроперекисей в немембранном компартменте клетки контролирует *Se-ГПО*, в то время как в мембранной фракции – ГПО-ФЛ. Эти факты могут свидетельствовать об отличиях в структуре активных центров *Se-ГПО* и ГПО-ФЛ.

Глутатионредуктаза (ГР). СОД, каталазу, *Se-ГПО* и ГПО-ФЛ относят к **эссенциальным АО ферментам**. Наряду с этими ферментами, существует «вспомогательный» антиоксидантный фермент – *глутатионредуктаза (ГР)*. ГР «регенерирует» восстановленный глутатион (GSH) путем восстановления окисленного глутатиона (GSSG) в реакции:



Окисление значительной части глутатиона (GSH → GSSG) может происходить, в том числе, в условиях гиперактивации реакций СРО. GSH, *Se-ГПО* и ГР образуют «глутатионовую антиоксидантную систему», в которой восстановленный глутатион не только защищает

клетку от избытка АФК и СР, но и является основным стабилизатором физиологического редокс-статуса внутриклеточной среды.

ГР была очищена в 1955 г. Э. Рэкером, который также идентифицировал НАДФН как первичный донор электронов для ферментативной реакции. Молекула *ГР* состоит из 2 одинаковых субъединиц, пространство между которыми в ходе реакции занимает молекула GSSG. В каждой из субъединиц расположен кофермент флавинадениндинуклеотид и находится участок, связывающий молекулу НАДФН. Таким образом, реакция восстановления, окисленного глутатиона, катализируемая *ГР*, играет одну из ключевых ролей в функционировании системы АОЗ клетки.

НЕФЕРМЕНТАТИВНЫЕ АНТИОКСИДАНТЫ

Способность этих соединений защищать организм от повреждающего действия избытка АФК и СР различной природы основывается на том, что все они имеют высокую константу скорости взаимодействия со СР. В результате такого взаимодействия образуются малоактивные и нетоксичные молекулярные продукты.

Аскорбиновая кислота. L-аскорбиновая кислота (водорастворимый витамин С) по химическому строению является γ -лактоном гексуроновой кислоты. Она сравнительно легко окисляется, превращаясь в дегидроаскорбиновую кислоту, которая является её биологически неактивной формой (рис. 18).



Рис. 18. Структура биологически активной (витамин С) и биологически неактивной форм аскорбиновой кислоты

За антиоксидантную активность аскорбиновой кислоты ответственны гидроксильные группы у С2 и С3 атомов: они являются донорами двух электронов при взаимодействии аскорбиновой кислоты со СР. Аскорбиновая кислота является «ловушкой» СР, действуя в водной фазе клеток. Константа скорости взаимодействия аскорбино-

ним липидными монослоями. Эти области слабо обмениваются молекулами АО. Молекула α -токоферола располагается в мембране так, что его хромановое кольцо (особенно метильная группа в 6-положении гетероцикла) находится у самой поверхности монослоя, обращенного в водную фазу. Результатом взаимодействия боковой цепи α -токоферола и углеводородных цепей жирных кислот фосфолипидов является повышение степени упорядоченности жидкокристаллической структуры липидного бислоя мембраны. В итоге упаковка углеводородных цепей гидрофобной зоны становится более плотной.

В гидрофобной зоне липидного бислоя мембран и липидной фазе липопротеидов сыворотки именно α -токоферол обеспечивает основную АО защиту липидов от СРО. Механизм АО действия α -токоферола (α -ТФ-ОН) обусловлен его способностью легко отдавать атом водорода гидроксильной группы радикалу гидроперекиси:



α -токоферол непосредственно взаимодействует также с АФК, с другими радикалами ненасыщенных жирных кислот (LO^*), а также с гидроперекисями жирных кислот. Образующийся в результате такого взаимодействия токоферил-радикал (α -ТФ-О *) стабилен и практически не взаимодействует с новыми молекулами гидроперекисей жирных кислот. В результате цепь реакций СРО прерывается. Восстановление (регенерация) токоферил-радикала происходит, в основном, с участием водорастворимого редуцтанта – аскорбиновой кислоты. В этом проявляется синергизм антиоксидантных эффектов аскорбата и α -токоферола.

Следует также отметить ключевую роль, которую играет α -токоферол в защите мембранных фосфолипидов с помощью ГПО-ФЛ (см. выше). Известно, что СР, генерируемые в мембране, улавливаются α -токоферолом, который в результате этого процесса окисляется до радикала токоферила и далее до токоферилхинона. Если восстанавливающие агенты присутствуют в достаточном количестве, то с их помощью происходит восстановление токоферила до нативного α -токоферола. Однако, если скорость процесса образования СР существенно превышает таковую для восстановления радикала токоферола, то пул α -токоферола быстро и необратимо истощается. В 80-х годах прошлого столетия было установлено, что ГПО-ФЛ, за-

щищая от перекисления фосфолипиды мембран, участвует также в восстановлении радикалов токоферила, тем самым, предотвращая истощение запасов α -токоферола. Так действует функциональный «тандем» ГПО-ФЛ - α -токоферол.

Таким образом α -токоферол выполняет двоякую функцию: во-первых, является антиоксидантом – «ловушкой» СР, обрывающим цепи реакций СРО; во-вторых, активно участвует в реализации «структурного АО эффекта», делая полиненасыщенные жирные кислоты фосфолипидов менее доступными для атаки АФК и СР различной природы – стерически ограничивает воздействие оксидантов.

Глутатион. Восстановленный глутатион (**L- γ -глутамил-L-цистеинилглицин, GSH**) представляет собой цистеинсодержащий трипептид. Это главный и наиболее распространенный небелковый тиол клеток млекопитающих. Внутриклеточная концентрация восстановленного глутатиона (GSH) сравнительно велика и лежит в миллимоларном диапазоне.

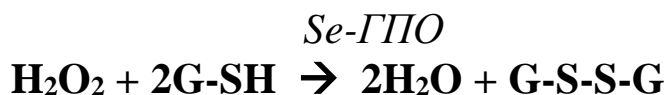
В физиологических условиях около 90% клеточного глутатиона находится в восстановленном состоянии, поэтому величина отношения концентраций 2GSH/GSSG в норме чрезвычайно высока. Таким образом, пара 2GSH/GSSG не только является основным неферментативным АО клетки, но и образует главный редокс-«буфер», присутствующий во всех компартментах клетки. Он вносит наибольший вклад в стабилизацию окислительно-восстановительного статуса клетки в узком диапазоне физиологических значений её редокс-потенциала (Eh^o). В норме усредненный Eh^o внутри клетки составляет около -320 mV, то есть редокс-статус обладает восстановительными свойствами, что определяется преобладанием молекул-восстановителей – доноров электронов.

Защитный АО эффект GSH реализуется благодаря его способности участвовать в следующих реакциях:

- Взаимодействие со СР различной природы, выполняя функции их «ловушки», например, с гидроксильным радикалом:



- В составе функционального «тандема» с *Se-ГПО* разрушать H_2O_2 и гидроперекиси жирных кислот (см. выше).



Se-ГПО



Решающее значение для поддержания максимально высокого отношения GSH/GSSG в клетке играет механизм «регенерирования» GSH из окисленного глутатиона (GSSG) в реакции, катализируемой ферментом *ГР*, о чем подробно было сказано выше.

АНТИОКСИДАНТНАЯ СИСТЕМА ПЛАЗМЫ КРОВИ

В плазме крови имеются все условия для протекания реакций СРО биомолекул. Избыточная активность этих реакций приводит к повреждению мембран клеток крови, окислительной модификации сывороточных липопротеинов и к нарушению структуры биомолекул, функционирующих в этом компартменте организма. Роль АО системы плазмы крови в обеспечении нормального функционирования организма велика и заслуживает отдельного рассмотрения.

В 60-е годы прошлого столетия были получены веские доказательства того, что плазма крови обладает сравнительно высокой АО активностью и представлена как АО ферментами, так и неферментативными элементами АО защиты. В плазме крови обнаружены активности следующих АО ферментов: *Вк-СОД*, *каталазы* и *ГПО*. Оказалось, что, во-первых, их активность в целом несколько ниже, чем у внутриклеточных АО ферментов, и, во-вторых, основной вклад в систему АОЗ плазмы крови вносят определенные белки плазмы, способные связывать ионы металлов с переменной валентностью, прежде всего, ионы Fe^{2+} , которые являются сильными оксидантами – инициаторами реакций СРО. Ведущие роли в этих явлениях играют трансферрин и церулоплазмин. Эти белки плазмы крови образуют своеобразный «функциональный тандем».

Трансферрин. Трансферрин – белок, основной переносчик железа по кровяному руслу, относится к β -глобулиновой фракции белков крови. В плазме крови его концентрации составляют около 2,5 мг/мл. Молекула трансферрина имеет два участка связывания железа, которое транспортируется в трехвалентной форме – комплекс **трансферрин- Fe^{3+}** . Железо пищи всасывается в тонком кишечнике в форме Fe^{2+} . Уже в крови с участием **церулоплазмينا** Fe^{2+} быстро окисляется, после чего Fe^{3+} связывается с трансферрином. Существует три пути появления Fe^{2+} в плазму крови:

- всасывание Fe^{2+} в кровь из тонкого кишечника,

- выход Fe^{2+} в кровь из разрушившихся клеток,
- Fe^{2+} освобождается из комплекса ферритин- Fe^{3+} : восстановление Fe^{3+} идет с участием активированных иммунокомпетентных клеток. Этот путь характерен для ряда патологических состояний.

Антиоксидантное действие трансферрина носит неспецифический характер, поскольку этот белок связывает и транспортирует железо в его «безопасной» трёхвалентной форме (Fe^{3+}).

Церулоплазмин. Церулоплазмин – гликопротеид острой фазы воспаления, входящий в α_2 -глобулиновую фракцию белков плазмы крови. В плазме крови концентрации составляют около 500 мкг/мл. Традиционно церулоплазмин рассматривался как белок-транспортёр меди (в форме Cu^{2+}) по кровяному руслу. С церулоплазмином связано до 96% меди плазмы. Церулоплазмин синтезируется в печени и доставляет медь по крови в другие ткани, где медь включается в состав синтезируемых там ферментов – оксидоредуктаз. В 70-е годы прошлого века было доказано, что церулоплазмин, помимо транспорта меди, является важным компонентом системы АОЗ плазмы крови.

Специфическое антиоксидантное действие церулоплазмина обусловлено наличием у него:

- феррооксидазной активности, благодаря которой, как было сказано выше, церулоплазмин окисляет «опасные» ионы Fe^{2+} : ($\text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{Fe}^{3+}$). «Безопасные» Fe^{3+} образуют комплекс с трансферрином и переносятся по кровяному руслу. Важно, что при окислении Fe^{2+} церулоплазмином не образуются $*\text{O}_2^-$.

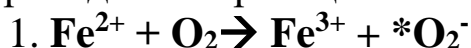
- способности к дисмутации супероксидов ($*\text{O}_2^-$). Хотя дисмутазная активность церулоплазмина оказалась на два порядка ниже, чем у СОД, при взаимодействии церулоплазмина с $*\text{O}_2^-$ не происходит образования H_2O_2 .

Неспецифическая антиоксидантная активность церулоплазмина связана с тем, что его комплекс с медью чрезвычайно прочен, что препятствует участию меди (металла с переменной валентностью) в реакции Хабер–Вейсса (см. выше).

Благодаря относительно высокой концентрации церулоплазмина в крови (220–610 мг/л), этот белок способен обеспечить 40–50% антиоксидантной активности плазмы.

Таким образом, благодаря взаимодополняющим функциям трансферрина и церулоплазмина, в плазме крови в норме поддерживается низкая, не цитотоксическая концентрация ионов Fe^{2+} . Результатом ослабления АОЗ плазмы крови неизбежно становится повыше-

ние концентрации ионов Fe^{2+} , которые, являясь сильными оксидантами, будут оказывать цитотоксический эффект. Повреждение мембран клеток крови, окислительная модификация биомолекул и липопротеидных частиц плазмы крови происходит под влиянием свободных радикалов, образующихся с участием именно ионов Fe^{2+} в одной из нижеприведенных реакций:



Реакция взаимодействия ионов Fe^{2+} с молекулярным кислородом обычно лимитирует скорость реакций СРО.



В случае одновременного присутствия ионов Fe^{2+} и перекиси водорода доминирующей будет **реакция Фентона**. Её продукт – гидроксильный радикал ($*\text{OH}$) обладает мощным цитотоксическим действием.



Эта реакция, отражает путь окислительного повреждения биомолекул, обусловленный появлением новых свободных радикалов в реакции между ионами Fe^{2+} и гидроперекисями липидов (LOOH). Продукт реакции неферментативного разложения гидроперекиси липида – радикал LO^* дает начало новой цепи СРО молекул липидов.

Лактоферрин. Лактоферрин является поливалентным белком, секретируется в плазму крови нейтрофилами. АО эффект лактоферрина обусловлен его способностью связывать ионы железа и меди. Лактоферрин содержится в плазме крови в относительно малом количестве – около 1 мкг/мл, вследствие чего он уступает трансферрину и церулоплазмину в АО действии и в транспорте ионов металлов с переменной валентностью.

Гаптоглобин и гемопексин. Гаптоглобин специфически связывает молекулы гемоглобина, **гемопексин** – молекулы гема. Связывание свободных гемоглобина и гема соответствующими белками существенно снижает активность реакций СРО. Механизм их антиоксидантного действия состоит в том, что гемоглобин и гем, при контакте с перекисью водорода или с другими гидроперекисями, высвобождают ионы железа (Fe^{2+}), которые становятся инициаторами реакций СРО. О серьезном вкладе этих белков в АО статус плазмы кров свидетельствует факт, согласно которому при гипогаптоглобинемии происходит серьезное нарушение работы головного мозга, который очень чувствителен к стимулируемому железом СРО. Это хорошо со-

гласуется с тем, что в цереброспинальном ликворе обнаружена относительно низкая концентрация трансферрина.

Альбумин. Белок способен неспецифически связывать ионы меди и участвовать тем самым в ингибировании реакций СРО, тормозя образование радикалов *ОН. В физиологических условиях, большая, если не вся, доля, не связанной с церулоплазмином меди, существует в виде комплекса с альбумином. Показано, что связывание ионов меди молекулой альбумина может приводить к его окислительной модификации, в том случае, если *O₂⁻ или H₂O₂ будут присутствовать в микроокружении альбумина. Учитывая высокую концентрацию альбумина в плазме крови и его быструю обновляемость, такая модификация, по-видимому, не будет иметь существенных негативных последствий.

Альбумин транспортирует по плазме неэстерифицированные жирные кислоты и неконъюгированный билирубин. Известна способность билирубина тормозить реакции СРО, поскольку он является активной «ловушкой» некоторых АФК в плазме крови. Возможно, *in vivo* неконъюгированный билирубин таким образом защищает транспортируемые жирные кислоты от СРО.

α-Токоферол. В плазме крови этот жирорастворимый витамин также выполняет важную АО функцию. По кровяному руслу подавляющая часть α-токоферола транспортируется в составе сывороточных липопротеидов, локализуясь в липидном компоненте частиц. У мужчин доля витамина Е, транспортируемого в составе ЛПНП и ЛПВП, составляет 45 и 41% от его общего содержания в крови, соответственно. У женщин эта доля составляет 41 и 50%. Коэффициент линейной корреляции (r) между концентрацией витамина Е в липопротеидных фракциях и содержанием в них общих липидов составляет у мужчин и женщин: 0,93 для ЛПОНП; 0,86 для ЛПНП и 0,73 для ЛПВП.

Мочевая кислота. Мочевая кислота оказывает АО-эффект путем:

- связывания ионов железа и меди, в результате чего они теряют возможность инициировать реакции СРО;
- связывания синглетного кислорода и пероксильных радикалов.

Такой АО механизм подтверждается тем, что в организме пациентов с ревматоидным артритом или в условиях перегрузки организма железом, обнаружены большие количества продуктов деградации мочевой кислоты. В результате взаимодействия мочевой кислоты со

СР образуются радикалы мочевой кислоты, которые сами способны оказывать повреждающие эффекты. Однако, радикалы мочевой кислоты успешно восстанавливаются с помощью аскорбиновой кислоты.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

АФК постоянно образуются в клетке в ходе ряда процессов, как побочный продукт нормального аэробного метаболизма. Регуляция скорости реакций СРО осуществляется многокомпонентной и многоуровневой системой АОЗ. Эта высокоэффективная система обеспечивает связывание, модификацию и разрушение АФК, СР и различных гидроперекисей, предупреждая их образование в количествах, опасных для жизнедеятельности.

Реакции СРО биомолекул относятся к категории цепных химических реакций, инициируемых и поддерживаемых с помощью СР. Основными источниками АФК в клетке являются:

- дыхательная цепь митохондрий,
- ксантиноксидазная реакция,
- микросомальная система биотрансформации ксенобиотиков,
- пероксисомальная система окисления жирных кислот.

Среди реакций, участвующих в свободнорадикальном (перекисном) окислении ненасыщенных липидов, выделяют следующие: инициирующие реакции, реакции продолжения цепи, реакции разветвления цепи и реакции торможения (обрыва) цепи реакций. Продукты реакций СРО, образующиеся на начальных этапах процесса, участвуют, главным образом, в продолжении и разветвлении цепных реакций. Продукты конечных этапов реакций выполняют функции модификаторов белков и нуклеиновых кислот, тем самым, нарушая их структуру и подавляя функции.

Высокоэффективная система антиоксидантной защиты клеток состоит из двух функционально взаимодополняющих частей: ферментативных или низкомолекулярных соединений – АО, являющихся сильными восстановителями, и целой группой антиоксидантных ферментов.

Лекция 4

ЭНДОПЛАЗМАТИЧЕСКИЙ РЕТИКУЛУМ. МИКРОСОМАЛЬНОЕ ОКИСЛЕНИЕ МИКРОСОМЫ. СТРЕСС ЭНДОПЛАЗМАТИЧЕСКОГО РЕТИКУЛУМА

Эндоплазматический ретикулум (ЭР, ER) – протяженная замкнутая мембранная структура, построенная из сообщающихся трубнообразных полостей и мешочков, называемых цистернами, представленная в виде двух видов: шероховатого и гладкого. Мембраны шероховатого ЭР усеяны множеством рибосом. Гладкий ЭР не имеет связанных рибосом, содержит ферменты микросомального окисления и носит название микросомы.

МИКРОСОМЫ

Мембраны эндоплазматического ретикулума составляют более половины внутриклеточных мембран. С помощью эндоплазматического ретикулума в клетке происходит разделение новосинтезированных молекул между цитозолем и остальными компартментами, в нем осуществляется биосинтез макромолекул, используемых для сборки мембран других клеточных органелл. Липиды, белки, сложные углеводы, транспортируемые в аппарат Гольджи, плазматическую мембрану, лизосомы или во внеклеточное пространство синтезируются в эндоплазматическом ретикулуме. Шероховатый эндоплазматический ретикулум содержит рибосомы, ответственные за синтез белков в клетке, а гладкий эндоплазматический ретикулум содержит ферменты, катализирующие реакции детоксикации, в результате которых обезвреживаются лекарственные вещества и вредные соединения, образующиеся в процессе метаболизма.

Чтобы изучить функции и биохимические свойства эндоплазматического ретикулума, необходимо сначала выделить его из клетки. В процессе гомогенизации тканей и клеток выделяются фрагменты эндоплазматического ретикулума, которые были названы микросомами. При центрифугировании в градиенте плотности сахарозы микросомы оседают в виде микросомальной фракции при 105000 g в течение 1 часа. К микросомам относят две подфракции: 1) осаждаемую при высокой концентрации сахарозы (шероховатые микросомы) и 2) осаждаемую при низкой концентрации сахарозы (гладкие микросомы). Шероховатые микросомы являются препаратом эндоплазматического

ретикулума, способного к синтезу белка, гликозилированию и синтезу мембран. Гладкие микросомы содержат ферменты цепи переноса электронов, осуществляют процесс микросомального окисления и метаболизм ксенобиотиков.

При изучении микросом основное внимание уделяют метаболизму ксенобиотиков. Значение проблемы ксенобиотиков связано со всё возрастающим поступлением в организм лекарственных и других химических веществ. Для обеспечения гомеостаза клеток в процессе эволюции в организме выработались защитные системы, основная функция которых заключается в удалении ксенобиотиков (чужеродных для организма веществ). Чужеродные соединения и метаболиты, попадающие в организм извне, плохо выводятся из организма, если представляют собой жирорастворимые и высокомолекулярные агенты. Жирорастворимые соединения, как известно, легко проникают в клеточные мембраны и связываются с липидными компонентами. Водорастворимые вещества выводятся из организма путем фильтрации через почки, в то время как липидорастворимые вещества предварительно проходят этап метаболизма в мембранах эндоплазматического ретикулума печени, где они претерпевают ферментативную конверсию в водорастворимые метаболиты. Химическую модификацию ксенобиотиков, в том числе лекарственных, выполняет *монооксигеназная система* микросомального окисления.

В состав микросомальных ферментов, наряду с монооксигеназными системами, входят эстеразы (глюкозо-6-фосфатаза, Mg^{2+} -зависимые нуклеозиддифосфатазы, неспецифические эстеразы), которые также как оксидоредуктазы используются в качестве контрольных ферментных тестов при изучении гетерогенных мембран эндоплазматического ретикулума. Первое место как маркер ЭПР занимает глюкозо-6-фосфатаза, которая имеет непосредственное отношение к переносу глюкозы через гидрофобную зону. Следует также отметить ферменты, катализирующие реакции конъюгации: глюкуронозилтрансферазу, сульфотрансферазу, глутатионтрансферазу, участвующие в механизмах детоксикации. Реакции конъюгации составляют вторую фазу биотрансформации липидорастворимых веществ после их взаимодействия с микросомальными монооксигеназами.

Микросомальная система окисления представляет собой полиферментный комплекс, зависящих от НАДФН и НАДН, цепей переноса электронов. Общим звеном этих цепей является цитохром Р-

450. В состав этого комплекса входят: цитохром b_5 , НАДФН – цитохром Р-450-редуктаза и НАДНцитохром b_5 -редуктаза (рис. 20).

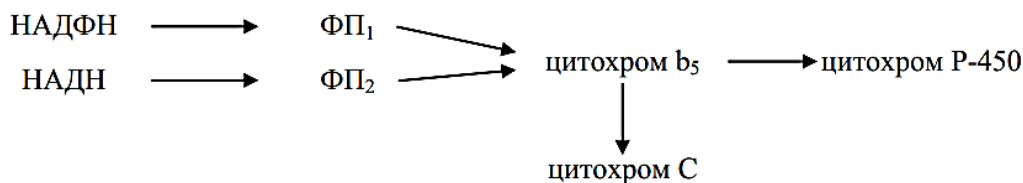
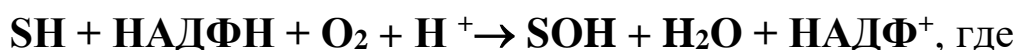


Рис. 20. Схема микросомального окисления

НАДФН и НАДН являются донорами электронов для процессов гидроксилирования, осуществляемых цитохромами b_5 и Р-450. ФП₁ и ФП₂, являются переносчиками электронов, флавопротеинами. ФП₁ представляет собой НАДФН-цитохром Р-450- редуктазу, а ФП₂ является НАДН-цитохром b_5 -редуктазой. С ФП₁ и ФП₂ возможен перенос электронов на цитохром С – основной компонент дыхательной цепи митохондрий. В результате осуществляется межмембранный перенос электронов.

Наиболее важной реакцией микросомального окисления является гидроксилирование, сущность которого заключается во внедрении одного атома активированного кислорода в окисляемое вещество, в то время как другой его атом идет на образование воды, т.е. гидроксилирование протекает по монооксигеназному типу:



SH – окисляемый субстрат, **НАДФН** – донор электронов, **SOH** – гидроксилированный продукт.

Превращение атомов кислорода в молекулу воды и гидроксильную группу окисляемого субстрата осуществляет цитохром Р-450. В некоторых клетках эта система включает ещё дополнительный промежуточный переносчик электронов между редуктазой и цитохромом Р-450. *Цитохром Р-450* представляет собой комплекс белка с гемом (фосфолипидпротогем-сульфидпротеиновый комплекс). Этот гемопротейн получил такое название в связи с тем, что в восстановленной форме, присоединяя СО, образует спектральный комплекс с максимумом поглощения при длине волны 450 нм. По высоте этого пика поглощения определяют его содержание в исследуемых образцах. В эндоплазматическом ретикулуме гепатоцитов имеется много изоформ Р-450 с молекулярной массой в пределах 45–55 кДа. Цитохром Р-450

представляет собой очень гидрофобный белок, локализованный внутри мембраны. Простетическая группа по типу гема протопорфирина IX содержит ион Fe^{3+} . Простетическая группа помещается в гидрофобной полости, активном центре цитохрома P-450. Fe^{3+} в поле лиганда сильно искажено, что регистрируется необычным для него спектром поглощения в области 450 нм. Чем больше цитохрома P-450 содержится в мембране, тем в лучшем состоянии она находится. Стареющие мембраны имеют цитохром P-420 (неактивная форма).

Среди различных форм цитохрома P-450 существенную роль играет цитохром P-448. Они отличаются друг от друга первичной последовательностью аминокислот и формой взаимодействия гема с белком. Цитохром P-448 служит терминальной оксидазой в системе арилгидроксилаз, обеспечивающих, в частности, метаболизм полициклических углеводов. Наличие многих изоформ позволяет монооксигеназным системам осуществлять биотрансформацию разных липотропных ксенобиотиков.

Цитохром b_5 представляет собой гемопроteid с молекулярной массой 11–13 кДа, содержит 1 моль Fe^{3+} протопорфирина IX на 1 моль апофермента. В окисленной форме цитохром b_5 обладает максимумом поглощения при 412–426 нм. В отличие от цитохрома P-450, расположенного в глубоких слоях мембраны, цитохром b_5 локализован на поверхности эндоплазматического ретикулума. Цитохромы P-450 и b_5 функционально тесно связаны. Они могут образовывать сложные гемопротеиновые комплексы, тем самым повышая скорость катализируемых ими реакций. Локализация цитохромов и флавопротеидов показана на рисунке 21.

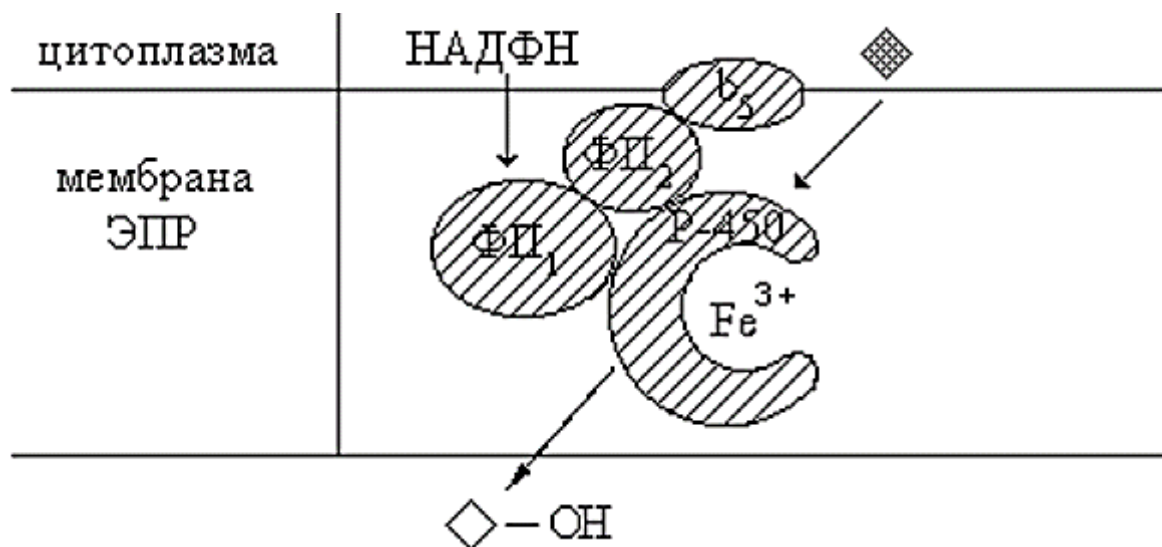


Рис. 21. Локализация цитохромов в мембране ЭПР

МЕХАНИЗМ ГИДРОКСИЛИРОВАНИЯ

Существует несколько схем действия микросомальных оксигеназ. Наиболее распространенной является схема Эстабура. В соответствии с ней в механизме гидроксилирования (рис. 22) выделяют пять стадий:

- 1) связывание окисленной формы цитохрома P-450 с субстратом ($\text{Fe}^{3+} - \text{S}$);
- 2) восстановление образовавшегося комплекса в НАДФН-специфичной цепи переноса электронов ($\text{Fe}^{2+} - \text{S}$);
- 3) образование тройного комплекса: восстановленная форма цитохрома P-450 – $\text{S} - \text{O}_2$;
- 4) активирование молекулярного кислорода в этом комплексе путем его восстановления ($\text{Fe}^{2+} - \text{S} - \text{O}_2^{\bullet -}$);
- 5) распад комплекса на окисленный цитохром P-450, окисленный субстрат и гидроксил Fe^{3+} , SOH , OH^- .

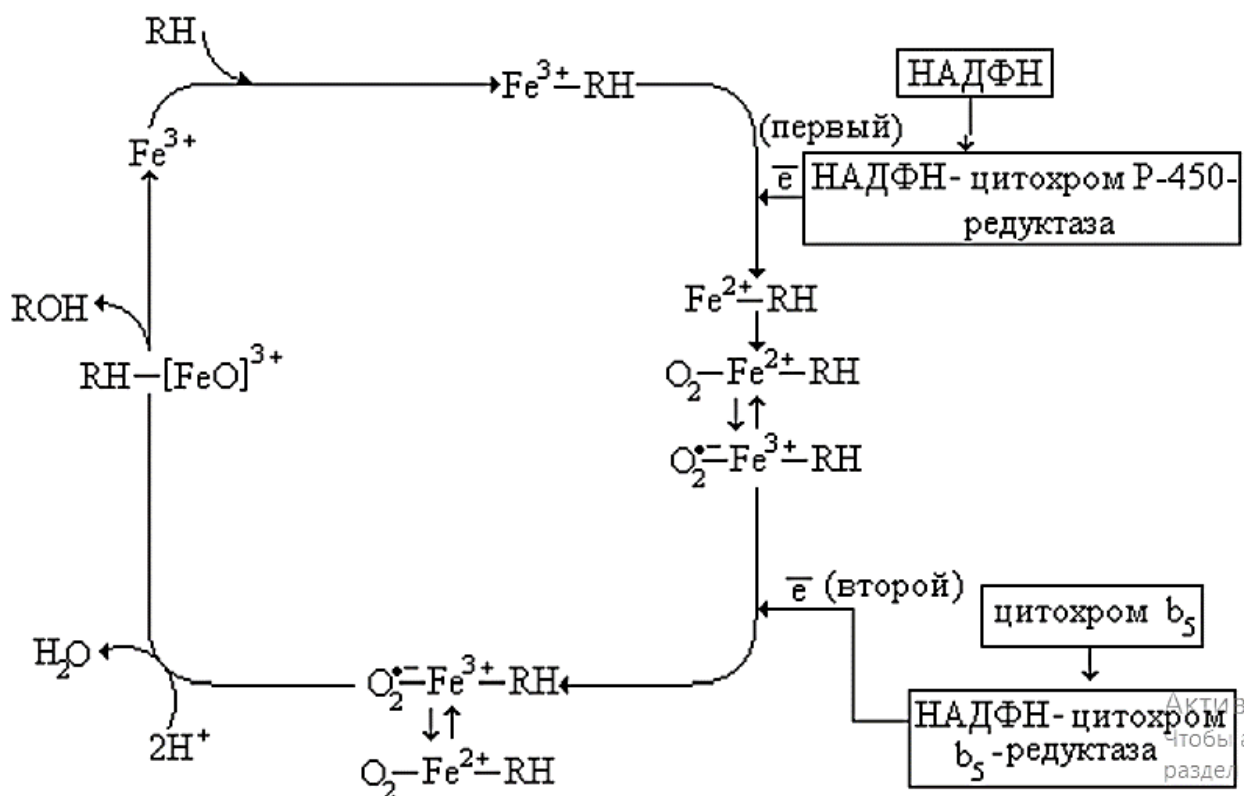


Рис. 22. Механизм гидроксилирования в монооксигеназной системе

Схема Эстабура хорошо раскрывает механизм биотрансформации химических веществ при участии цитохромов и флавопротеидов, используя в качестве доноров электронов НАДФН и НАДН. Первый

электрон, поступающий из НАДФН-зависимой цепи, участвует в восстановлении Fe^{2+} (вторая стадия). Вторым электрон поступает из НАДФН-зависимой цепи и расходуется на образование активированного комплекса в четвертой стадии процесса гидроксилирования. Стехиометрия окисления НАДФН, потребления кислорода и выхода, гидроксилированного продукта в большинстве случаев равна 1.

Недостатком этой схемы является отсутствие учета генерации свободных радикалов и в первую очередь супероксидного аниона ($O_2^{\bullet -}$) при функционировании микросомальных оксигеназ. Дело в том, что тройной фермент – субстрат – кислород комплекс (3 этап) до восстановления вторым электроном (4 этап) может вступить в обратимую реакцию превращения в окисленный фермент – субстратный комплекс $Fe^{2+} - S - O_2 \leftrightarrow Fe^{3+} - S - O_2^{\bullet -}$, при этом генерируется супероксидный радикал, дающий в дальнейшем перекись водорода.

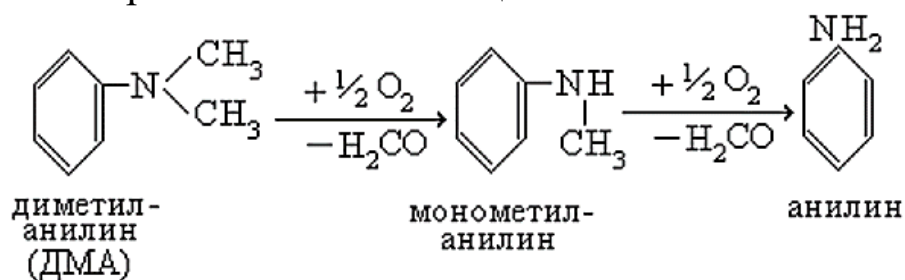
Установленные закономерности функционирования микросомальных оксигеназ получены при исследовании печени. В ней подвергается метаболизму две трети от общего количества экзогенных химических веществ, поступающих в организм. Микросомальные монооксигеназы обнаружены также в коже, легких, тонком кишечнике, почках, головном мозге и лимфоцитах. В клетках этих органов микросомальное окисление протекает менее интенсивно, однако имеет существенное значение при выполнении их специфических функций. В отличие от печени, цитохром P-450 коры надпочечников находится в митохондриальной мембране, где происходит расщепление боковой цепи холестерина до прегненолона, а также гидроксилирование различных стероидов в положении 11β.

МЕТАБОЛИЗМ ЧУЖЕРОДНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

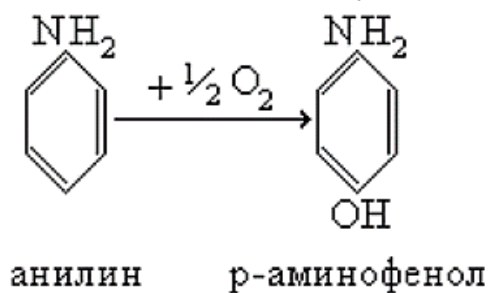
Ферментная система окисления ксенобиотиков в печени является местом обезвреживания самых разнообразных по своей природе химических соединений. К их числу относятся большинство чужеродных для организма соединений; ряд эндогенных субстратов, среди которых следует отметить прежде всего насыщенные и ненасыщенные жирные кислоты; стероидные гормоны, холестерол, желчные кислоты и простагландины.

К наиболее важным реакциям, протекающим в мембранах ЭПР при участии цитохрома P-450, относятся как гидроксилирование, так и ряд других, которые будут рассмотрены ниже.

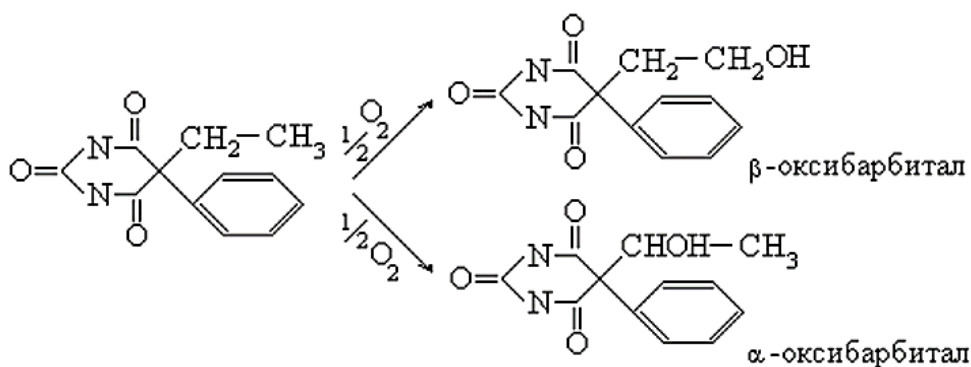
1. Деалкилирование алкилзамещенных аминов:



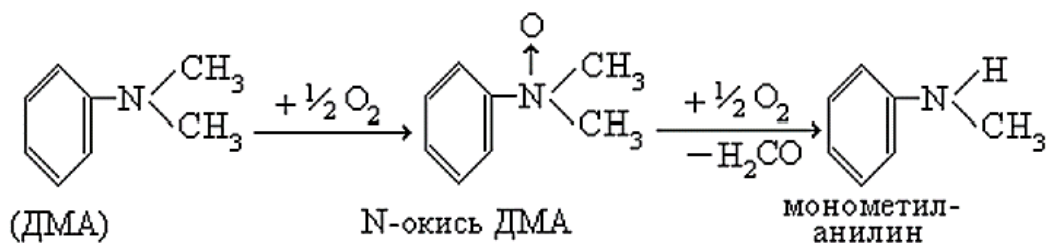
2. Гидроксилирование циклических углеводородов:



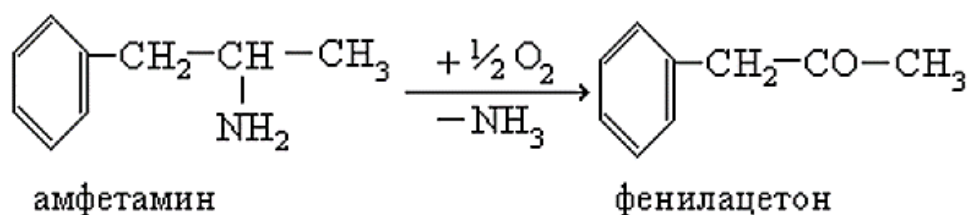
3. Гидроксилирование алифатических соединений:



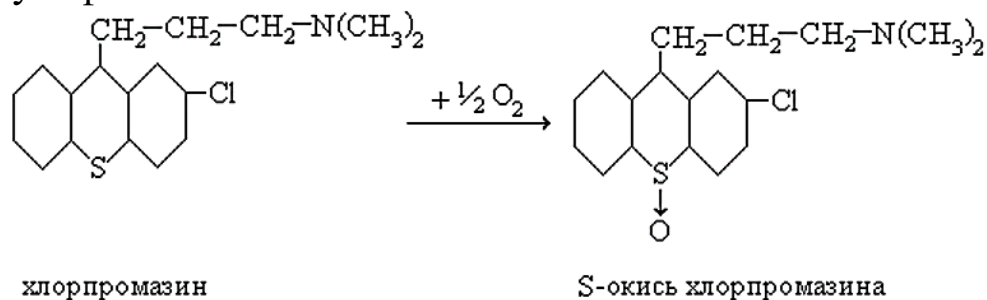
4. N-окисление:



5. Окислительное дезаминирование:

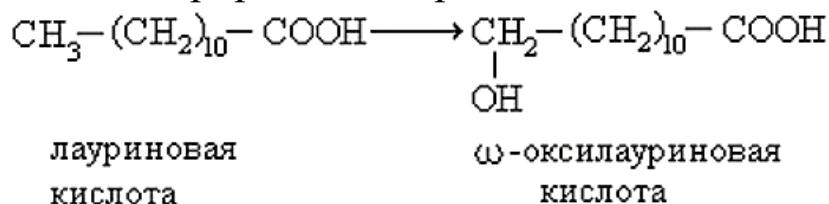


6. Сульфоокисление:



ОКИСЛЕНИЕ ПРИРОДНЫХ СУБСТРАТОВ

1. ω -окисление природных жирных кислот:



2. Гидроксилирование стероидных гормонов, холестерина и гема. Ферментная система ЭПР печени гидроксилирует стероидные гормоны в 2 β -, 6 β -, 7 α - и 16 α -положениях. Гидроксилирование холестерина протекает преимущественно в 7 α -положении. 7 α -гидроксилаза является, по-видимому, начальным звеном, лимитирующим скорость превращения стероидов и холестерина в желчные кислоты. Гемоксигеназа принимает участие в процессах окисления гема в билирубин. В реакции используются НАДФН и O₂: один из метеновых мостиков тетрапиррольной структуры гема окисляется, при этом от гема отщепляется железо, образуется биливердин, который затем восстанавливается в билирубин.

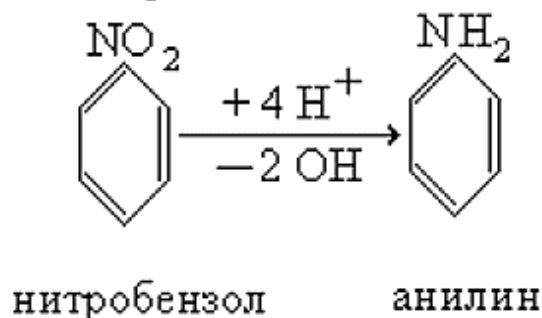
3. Перекисное окисление ненасыщенных жирных кислот осуществляется в НАДФН-специфичной цепи. Эта редокс-цепь является местом биосинтеза простагландинов. Роль её в этом процессе сводится к образованию эндопероксидов, являющихся промежуточными соединениями образования простагландинов.

РЕАКЦИИ ВОССТАНОВЛЕНИЯ

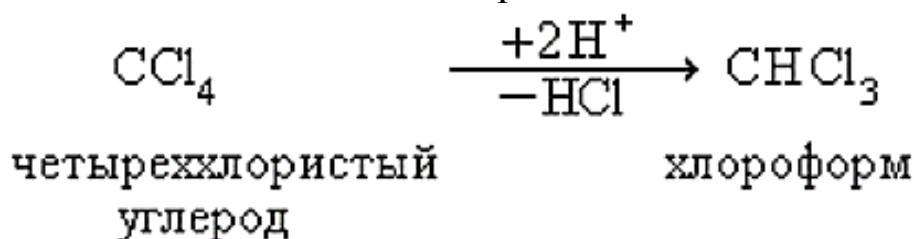
При участии цитохрома P-450 микросомы способны восстанавливать азокрасители и нитросоединения. В цепи окисления НАДФН, по-видимому, существуют два пункта сопряжения с реакциями восстановления: на уровне флавопротеида и на уровне цитохрома P-450.

Особое внимание эти реакции привлекают в связи с высокой канцерогенной активностью продуктов восстановления.

1. Восстановление нитросоединений:



2. Восстановительное дегалогидирование:



НАДН-ЗАВИСИМЫЕ РЕАКЦИИ

1. При участии НАДН-цитохром b_5 -редуктазы происходит реакция десатурации насыщенных жирных кислот с отщеплением одной молекулы воды и образованием двойной связи. Таким путем идет образование олеиновой кислоты из стеариновой.

2. Эта же система может быть использована для окисления-восстановления аскорбиновой кислоты, причем реакция резко сдвинута в сторону восстановления семидегидроаскорбата в аскорбат.

3. Реакции гидроксилирования. Цитохром b_5 участвует в реакциях гидроксилирования кинуренина, фенолов, анилина.

РЕАКЦИИ КОНЬЮГАЦИИ

Все рассмотренные реакции составляют первую фазу биотрансформации липидорастворимых ксенобиотиков. Вторую стадию обезвреживания ксенобиотиков составляют реакции конъюгации, в результате которых гидроксилированные соединения связываются с глюкуроновой и серной кислотами, глутатионом, глутамином и аминокислотами, подвергаются метилированию и ацетилированию. Вещество в целом становится более растворимым в воде, что облегчает его выведение из организма. Химическая модификация токсических веществ, как правило, снижает их токсичность.

ИНДУКТОРЫ И ИНГИБИТОРЫ МИКРОСОМАЛЬНЫХ МОНООКСИГЕНАЗ

При введении многих лекарственных веществ наблюдается увеличение активности цитохрома Р-450. Самым распространенным индуктором цитохрома Р450 является фенобарбитал. При его введении (50–80 мг/кг массы) активность цитохрома Р-450 увеличивается в 4 раза через 4 дня, при этом наблюдается бурный рост ЭПР печени.

К числу индукторов относятся различные лекарственные средства: анальгетики (амидопирин), противовоспалительные средства (бутадион), гипогликемические препараты (букарбан), антигистаминные (димедрол), антитуберкулезные средства (рифампицин), транквилизаторы (седуксен), стероиды (тестостерон, гидрокортизон, преднизолон). К индукторам относятся также инсектициды и канцерогены. Все индукторы являются субстратами гидроксилирования. По характеру действия различают индукторы широкого и узкого спектра действия. К первой группе относятся фенобарбитал и другие барбитураты, хлорированные углеводороды, в том числе ДДТ. Индукторы этой группы обладают способностью увеличивать содержание цитохрома Р-450 и активность НАДФН-цитохром Р-450-редуктазы, стимулировать процессы окисления, восстановления и реакции глюкуронидной конъюгации. К индукторам второй группы относится метилхолантрен. Этот вид индукторов вызывает появление в микросомальной фракции цитохрома Р-448. Комбинированное действие индукторов, например, фенобарбитала и антипирина, дает более выраженный эффект, нежели раздельное применение этих соединений. Однако такие сочетания не всегда дают суммирование эффектов. Так, при введении фенобарбитала и эстрадиола не наблюдается дополнительной активации цитохрома Р-450. Однако введение гормона через некоторое время после введения фенобарбитала также дает суммирование эффектов. Причиной этому являются, по-видимому, конкурентные отношения между ними.

При связывании с цитохромом Р-450 субстраты гидроксилирования изменяют дифференциальный спектр поглощения. В соответствии с типами субстратов сдвиг спектра может быть двух типов:

1. Субстраты 1 типа, к которым относятся гексобарбитал, амидопирин, фенобарбитал, дают спектр с максимумом поглощения при 390 нм и минимумом 420–425 нм.

2. Второй тип спектральных изменений наблюдается при взаимодействии с субстратами второго типа с максимумом при

425–435 нм и минимумом 390–400 нм. К ним относятся анилин, метилхолантрен.

К числу ингибиторов относятся:

- 1) обратимые ингибиторы прямого действия: эфиры, спирты, кетоны, антиоксиданты;
- 2) обратимые ингибиторы непрямого действия: производные бензола, ариламины, алкиламины;
- 3) необратимые ингибиторы: алканы, олефины, меркаптиды;
- 4) тормозящие синтез или ускоряющие распад цитохрома Р-450: ионы металлов, ингибиторы белкового синтеза.

Так, четыреххлористый углерод относится к необратимым ингибиторам, уменьшает содержание цитохрома Р-450 и тормозит процесс гидроксирования. При взаимодействии с цитохромом Р-450 CCl_4 образуется радикал CCl_3^{\bullet} , который вызывает деструкцию цитохрома

Р-450. Действие ионов металлов направлено, в основном, на гем цитохрома Р-450. При включении ионов кобальта в протопорфирин образуется неактивное соединение, лишенное каталитических свойств цитохрома Р-450.

ТОКСИФИКАЦИЯ И ДЕТОКСИКАЦИЯ

В процессе биотрансформации ксенобиотиков происходит их модификация, в результате которой продукты гидроксирования могут быть более токсичными, чем исходные субстраты (токсификация) или они становятся менее токсичными (детоксикация). Токсификация очень часто является причиной химического канцерогенеза, примером которого является рак кожи у трубочистов. Этот факт объясняется постоянным контактом с каменноугольной смолой и сажей. В 30-х годах из смолы был выделен бензантрацен и другие полициклические углеводороды.

Бензантрацен в организме подвергается гидроксированию на цитохроме Р-450, в качестве промежуточного соединения, при этом образуется эпоксид бензантрацена. Эпоксиддегидратаза, локализованная рядом с цитохромом Р-450, превращает его в бензантрацендиол.

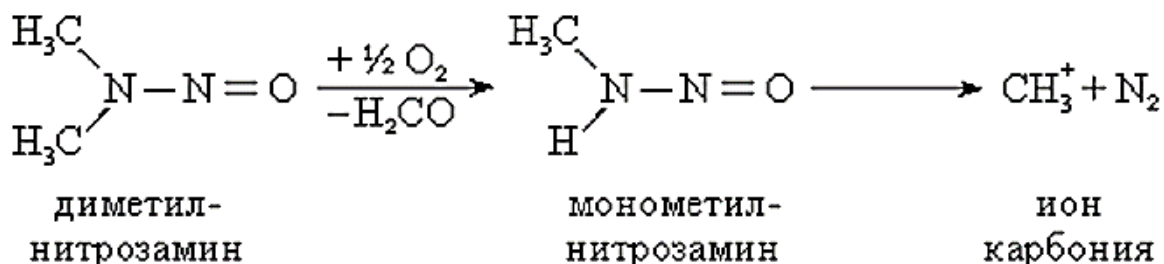
Бензантрацендиол является более полярным веществом, оно всплывает из гидрофобной области, вновь вступает во взаимодействие с цитохромом Р-450 и вторичный метаболит является более активным канцерогеном, чем сам бензантрацен.



К канцерогенам, подвергающимся гидроксилированию, могут быть отнесены производные бензпирена, нафтохиноны, ароматические амины. Это так называемые суицидные субстраты (несущие смерть).

Афлатоксины – продукты плесневого гриба *Aspergillus flavus* наиболее сильные из известных канцерогенов: даже однократное введение их вызывает рак печени у экспериментальных животных. Канцерогеном является эпоксид афлатоксина, образующийся в печени. Эпоксиды обладают высокой химической активностью и алкилируют ДНК, РНК, белки.

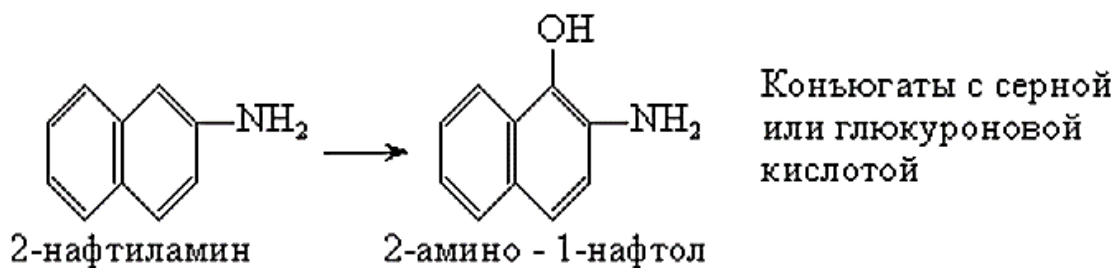
Метаболизм нитрозаминов в микросомальной системе окисления приводит к образованию высокоактивного иона карбония:



Ион карбония может метилировать нуклеиновые кислоты и белки.

Нитрозамины индуцируют злокачественные опухоли в печени, почках, легких, желудке, пищеводе. Индукция развития опухоли происходит, как правило, при длительном и неоднократном контакте с канцерогеном.

Система детоксикации включает в себя не только механизмы первой фазы биотрансформации, в результате которой образуются реакционноспособные метаболиты различной токсичности, но и механизмы второй фазы, объединяющие реакции конъюгации. Часто реакции конъюгации обезвреживают продукты гидроксилирования. Так, ароматические амины, используемые в производстве анилиновых красителей, являются преканцерогенами.



При гидроксилировании 2-нафтиламина в печени образуется 2-амино-1-нафтол, являющийся канцерогеном. Взаимодействие канцерогена с серной или глюкуроновой кислотой во второй фазе биотрансформации дает безвредные конъюгаты, которые выводятся с мочой. Однако, при повторяющихся контактах человека с нафтиламином и при производстве красителей может развиваться рак мочевого пузыря. Причиной этого является расщепление конъюгатов гидролазами, содержащимися в небольшом количестве в моче, и образование вновь 2-амино-1-нафтола, который при постоянном контакте вызывает раковое перерождение клеток мочевого пузыря.

ТОКСИЧЕСКИЙ ТИП ПОВРЕЖДЕНИЯ КЛЕТКИ

Процесс химического канцерогенеза является примером токсического повреждения клетки. В ряде случаев под влиянием индукторов микросомального окисления, когда образуются нетоксичные продукты гидроксилирования, усиливается генерация активных форм кислорода и образование перекиси водорода, тогда продукты перекисного окисления определяют исход токсического действия. К этим веществам относится аллоксан, образующий через диалуровую кислоту, в качестве промежуточного вещества, семихиноны и супероксидные радикалы, обуславливающие его цитотоксическое действие, гербициды, антибиотики антрациклинового ряда, доксорубицин, нитросоединения, входящие в состав лаков и красок. Свободные радикалы, сопровождающие процессы взаимодействия этих веществ с цитохромом P-450, вызывают повреждение ДНК, оказывают цитостатическое, мутагенное или канцерогенное действие.

Механизм токсического действия четыреххлористого углерода связан с его непосредственным действием на микросомальные оксигеназы. Введенный в организм CCl_4 растворяется во всех мембранных элементах печеночной клетки. Решающее значение имеет связывание тетрахлорметана с цитохромом P-450. Быстро протекающая реакция восстановления приводит к образованию радикала CCl_3^\bullet , что является

пусковым звеном в механизме токсического действия CCl_4 . Соединения, индуцирующие активность НАДФН-специфичной цепи (ДДТ, фенобарбитал, бензпирен) резко усиливают токсическое действие тетрахлорметана. Стимулирование процессов перекисного окисления при образовании $CCl_3\cdot$ приводит к повреждению мембран ЭПР. Возможно, что страдают также мембраны других внутриклеточных структур, в частности лизосом. В мембранах эндоплазматической сети нарушаются процессы синтеза белка и липопротеинов, инактивируется глюкозо-6-фосфатаза. «Мембранный эффект», возникающий при этом, играет решающую роль в гибели гепатоцитов. Механизм повреждения цитохрома Р-450 при действии CCl_4 А.И. Арчаков назвал «летальным распадом». Итак, токсический тип повреждения клетки связан с процессами превращения чужеродных веществ в мембранах ЭПР с участием монооксигеназных систем (рис. 23).

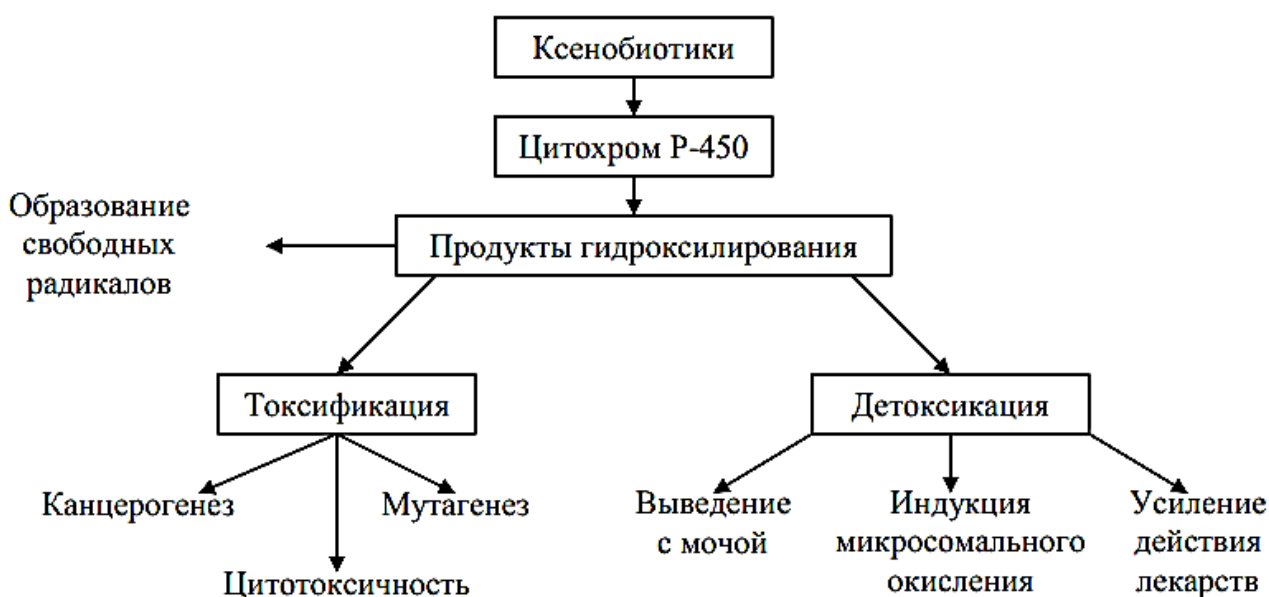


Рис. 23. Токсический тип повреждения клетки

МИКРОСОМАЛЬНОЕ ОКИСЛЕНИЕ И ИММУННАЯ СИСТЕМА

Изучение механизмов инактивации ксенобиотиков выявило связь иммунной системы и микросомального окисления. В лаборатории И.Е. Ковалева было показано, что индукция цитохрома Р-450, связанная с возрастанием синтеза ферментативного белка, происходит только с помощью соединений, не имеющих в организме (химических, лекарственных веществ). Активация цитохрома Р-450 при повторном введении индуктора осуществляется более интенсивно.

Если изменить структуру индуктора цитохрома Р-450, например, введя в молекулу алкилирующий агент, то такие ксенобиотики уже не смогут взаимодействовать с активным центром цитохрома Р-450, они становятся «добычей» иммунной системы. И.Е. Ковалеву удалось выработать антитела к альбумину, связанному с каким-либо гаптенем (измененный субстрат гидроксилирования). Такой образовавшийся в организме конъюгированный антиген индуцирует иммунный ответ и обеспечивает дополнительную защиту от низкомолекулярного потенциально опасного вещества. Клетки печени, которые очень интенсивно окисляют ксенобиотики, синтезируют альбумин. Хорошо известно, что именно альбумин играет роль детоксицирующего белка, связывающего различные соединения. Комплекс альбумина с измененным субстратом гидроксилирования представляет антиген. По мнению П.В. Сергеева печень и лимфоидная ткань осуществляют детоксикацию в тесном взаимодействии. В мембранах ЭПР печени осуществляется обезвреживание низкомолекулярных ксенобиотиков, лимфоциты участвуют в защите от высокомолекулярных соединений. Кроме того, лимфоидная ткань сама содержит монооксигеназную систему и ферменты второго этапа биотрансформации. Следовательно, иммунокомпетентные клетки могут одновременно обеспечивать элиминацию из организма высоко- и низкомолекулярных чужеродных соединений.

МИКРОСОМЫ И ЦИТОХРОМ Р-450 В МЕХАНИЗМАХ БИОТРАНСФОРМАЦИИ ЭНДОГЕННЫХ И ЭКЗОГЕННЫХ ВЕЩЕСТВ

Цитохром Р-450 имеет более 1 000 изоферментов, 5 из которых (СУР3А4, СУР2D6, СУР2С9, СУР2С19 и СУР1А2) метаболизируют до 90% всех ЛС. Для изоферментов цитохрома Р-450 характерна субстратная специфичность, т.е. способность связываться и трансформировать молекулы определённой формы, заряда, гидрофильных / гидрофобных характеристик.

Для многих изоферментов цитохрома Р-450 характерен полиморфизм генов, что может обуславливать межиндивидуальные различия в скорости биотрансформации ЛС и некоторые межлекарственные взаимодействия.

Наличие однонуклеотидных полиморфизмов в гене, кодирующем определённый изофермент, может приводить к синтезу фермен-

тов с изменённой активностью, что приведёт к изменению фармакокинетики метаболизируемых данным изоферментом ЛС.

В клинической практике для некоторых ЛС возможно проведение фармакогенетического тестирования с целью выявления генетических полиморфизмов, что позволяет прогнозировать фармакологический ответ на данные ЛС, повысить эффективность и безопасность фармакотерапии.

ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНОВ ЦИТОХРОМА Р-450 ПРИ НАЗНАЧЕНИИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ, НА ПРИМЕРЕ ВАРФАРИНА

Варфарин – антикоагулянт непрямого действия, производное кумарина. Подавляет синтез витамин К-зависимых факторов свертывания крови (II, VII, IX и X) и антикоагулянтных протеинов С и S в печени.

Варфарин назначают пациентам с повышенной склонностью к тромбозам, а также для первичной профилактики лицам, имеющим риск тромбоза или эмболии, или в качестве вторичной профилактики (предотвращение последующих эпизодов) лицам, у которых уже образовывался тромб.

Генетические факторы наравне с клиническими являются значимыми в подборе индивидуальных доз Варфарина. Они определяют до 53–54% вариабельности дозы. Наиболее значимые гены, определяющие индивидуальную реакцию на терапию Варфарином: CYP2C9, CYP4F2, VKORC1. Цитохромы CYP2C9 и CYP4F2 принимают участие в обмене в основном S-изомера «Варфарина», являющегося в 5 раз более активным, чем R-изомер, и потому имеющий большее клиническое значение. VKORC1 – это субъединица 1 комплекса эпоксидредуктаза–витамин К, ключевого фермента цикла витамина К.

Известно, что существует индивидуальная чувствительность к варфарину, которая обусловлена, в частности, полиморфизмом гена P450 CYP2C9 – ключевого фермента, метаболизирующего варфарин, а точнее, его S-энантиомера, в организме человека. Каталитическая активность этого фермента является решающим фактором, определяющим концентрацию варфарина в крови. Установлено, что мутация C416T в 3-й экзоне, приводящая к аминокислотной замене Arg144Cys (*2-я аллель), и мутация C1061A в 7-й экзоне, приводящая к аминокислотной замене Ile359Leu (*3-я аллель), вызывают снижение ско-

рости метаболизма варфарина, повышение его концентрации в крови, что способствует многократному увеличению вероятности возникновения кровотечения. Эти аллельные варианты характерны в основном для представителей белой расы. По мнению многих исследователей, определение данных полиморфизмов полезно для оценки возможного ответа на антикоагулянтную терапию.

РОЛЬ НАРУШЕНИЕ МИКРОСОМАЛЬНОГО ОКИСЛЕНИЯ В РАЗВИТИИ АУТОИММУННОГО ГЕПАТИТА

Аутоиммунный гепатит представляет собой хроническое воспалительное заболевание печени, характеризующееся наличием типичных аутоантител, повышением уровня гамма-глобулинов и хорошим ответом на иммуносупрессивную терапию.

Аутоиммунный гепатит впервые был описан в 1951 г. в качестве хронического гепатита у молодых женщин, сопровождающегося гипергаммаглобулинемией, который улучшается на фоне адренокортикотропной терапии. В 1956 г. выявлена связь между АИГ и наличием антинуклеарных антител (АНА) в крови, в связи с чем заболевание получило название «Волчаночного гепатита». Диагностика основана на определении специфических аутоантител и исключении других причин гепатита. Анти-ЛКМ – это гетерогенная группа аутоантител, характерных для аутоиммунного гепатита. Свое название (от англ. anti-liver kidney microsomal) они получили благодаря тому, что способны взаимодействовать с ферментами микросомальной системы окисления печени и почек.

СТРЕСС ЭНДОПЛАЗМАТИЧЕСКОГО РЕТИКУЛУМА (ER STRESS)

Шероховатый эндоплазматический ретикулум (ШЭР (rER)) – место активного биосинтеза белков. Именно здесь синтезируются белки, которые будут функционировать в составе мембран, лизосом или секретироваться из клетки. Остальные белки синтезируются в цитоплазме на рибосомах, не связанных с мембранами ЭР. Именно ЭР обеспечивает синтез и созревание белков, предназначенных для секреции или экспозиции на поверхности клеточной мембраны. Созревание любой белковой молекулы предполагает ее «фолдинг» (от англ. to fold – «укладывать, сворачивать») – самопроизвольное приобретение единственно правильного трехмерного строения (конформации). Гликозилирование, фосфорилирование, гидроксилирование и

другие модификации исходной белковой молекулы делают ее более стабильной во внеклеточной среде, но малоприспособленной для свободного пребывания внутри клетки. Поэтому созревание таких молекул должно происходить в контролируемых условиях, приближенных к характеристикам внеклеточной среды. Созревшие (модифицированные) белки переносятся везикулами в различные отделы клетки, такие, как лизосомы, цитоплазматическая мембрана или секреторные пузырьки

Для нормального созревания белка необходимо выверенное соответствие между биосинтетической нагрузкой и функциональной вместимостью ЭР. Накопление неправильно свернутых белковых цепочек является патофизиологическим ядром «стресса ЭР» – общебиологического феномена функциональной перегрузки аппарата секреции белка. Нарушение созревания белковых молекул (проявляющееся стрессом ЭР) ведет к прекращению нормального функционирования клетки и угрожает ей гибелью.

СТРЕСС ER

ЭР чувствителен ко многим формам нарушения гомеостаза. Вследствие этого популяции его белков могут принимать ошибочную пространственную организацию, теряя свою нормальную функцию и формируя угрозу жизни клетки.

Стресс ЭР может развиваться в силу следующих причин: относительная или абсолютная нехватка шаперонов; дефицит энергии для поддержания работы шаперонов; истощение депо Ca^{++} , присутствие которого необходимо для правильной работы шаперонов; нарушение окислительно-восстановительных параметров внутренней среды ЭР; белковые мутации, исключают нормальную работу механизмов надзора за созреванием белка.

Независимо от причины, нарушение физиологии ЭР приводит к накоплению внутри его просвета белков с нарушенной конформацией и запуску специфического ответа на мисфолдинг UPR (unfolded protein response). Задачей UPR является компенсация стресса ЭР, восстановление гомеостаза и, в конечном счете, предотвращение гибели клетки. Для достижения этих целей UPR использует несколько скоординированных мер: снижение поступления вновь синтезированного белка в полость ЭР; расширение функциональной емкости ЭР путем увеличения количества шаперонов; усиление изгнания из ЭР и последующей утилизации белков с необратимо нарушенной конформацией.

При усугублении стресса ER, сигнальные пути UPR переключаются на запуск апоптоза. Стресс эндоплазматического ретикулула срабатывает, когда накопление не сложенных и неправильно сложенных белков регистрируется сенсорными белками, такими как PERK, IRE1 и ATF6. Это, так называемый, «ответ не сложенного, развернутого белка» (unfolded protein response, UPR). В условиях стресса эндоплазматического ретикулула общий синтез белка ослабляется посредством PERK-опосредованного фосфорилирования eIF2-alpha и транскрипционной индукции шаперонов эндоплазматического ретикулула, активированными в свою очередь ATF6 и IRE1-опосредуемым XBP1, что в конечном итоге приводит к сворачиванию не сложенных белков. UPR также приводит к элиминации неправильно сложенных белков посредством деградации, ассоциированной с эндоплазматическим ретикулулом (ERAD).

Стресс ER связан с различными патогенными процессами, включая онкологическую прогрессию, диабет, воспалительные заболевания и нейродегенеративные расстройства. Участие стресса ER показано в развитии многих патофизиологических процессах. Например, мутантный вариант белка пресенилина-1, участвующий в развитии болезни Альцгеймера, подавляет функцию PERK, IRE1 α и ATF6. Аналогичным образом, мутация белка паркина ведет к нарушению функции протеосом и перегрузке ЭР, что вызывает накопление цитотоксичных фибрилл и патологическую агрегацию белка. Паркином богаты мезэнцефальные дофаминергические нейроны, утрата которых ведет к развитию болезни Паркинсона.

Предполагается, что нарушения фолдинга играют важную роль и в других онкологических процессах. Последние данные указывают на участие UPR в развитии рака простаты и молочной железы в связи с активацией гена липокалина-1, являющегося медиатором опухолевой прогрессии злокачественных новообразований эпителиального происхождения.

Рак легких выделяется в плеяде злокачественных опухолевых заболеваний наличием известного этиологического фактора. В последние годы довольно оригинальные исследования были посвящены влиянию компонентов табачного дыма на индукцию стресса ЭР и его роли в злокачественном перерождении ткани легкого (а также в развитии идиопатического фиброза и ХОБЛ).

Стресс ЭР имеет особое значение для сахарного диабета. Инсулин – белковый гормон, поэтому при поступлении в организм угле-

водов резко возрастает нагрузка на ЭР β -клеток и создаются условия для их апоптоза. В стадии развернутой клинической картины сахарного диабета глюко- и липотоксичность также нарушают компенсацию стресса ER. Помимо снижения секреции инсулина из-за сокращения популяции β -клеток, стресс ER играет важную роль в формировании ожирения и инсулинорезистентности жировой, печеночной и мышечной ткани.

Лекция 5

ЛОКАЛИЗАЦИЯ ФЕРМЕНТОВ В КЛЕТКЕ. ДЕГРАДОМ ВНУТРИКЛЕТОЧНЫЙ, ТРАНСМЕМБРАННЫЙ И ВНЕКЛЕТОЧНЫЙ

В норме протеазы участвуют во многих физиологических процессах: процессинге белков, метаболизме, коагуляции, ремоделировании тканей, гомеостазе, апоптозе и аутофагии, презентации антигена и иммунном ответе. До появления различных «омиксных» технологий в молекулярной и клеточной биологии протеазы в основном рассматривались как ферменты лизирующие белок, необходимые для поддержания клеточного гомеостаза. С появлением высокотехнологичных и высокоспецифичных методик эта точка зрения пересмотрена. Накоплено множество фактов о том, что протеазы функционируют как обширная многовекторная сеть протеолитических взаимодействий, которая участвует в регуляции жизнедеятельности клетки и развитии различных патологических реакций. Дисбаланс в системе протеолиза наблюдается при ряде патологий, таких как сердечно-сосудистые заболевания, нейродегенеративные заболевания, воспалительные и опухолевые процессы.

Комплекс протеаз или протеолитическая сеть, которая участвует на всех этапах развития клетки, в том числе в модуляции микроокружения носит название – *деградом клетки*. Состав деградума строго координируется на всех молекулярно-генетических уровнях и представлен по крайней мере 569 протеазами пяти каталитических классов. Металлосодержащие и сериновые протеазы составляют основную часть протеолитических ферментов человека, и, возможно, поэтому изучение деградума при различных заболеваниях чаще всего касается этих протеаз.

На клеточном уровне существуют несколько локализаций протеолитических систем, которые осуществляют: Внутриклеточный протеолиз; Трансмембранный (мембран-ассоциированный) протеолиз; Внутриклеточный протеолиз (рис. 24).

ВНУТРИКЛЕТОЧНЫЙ ПРОТЕОЛИЗ

Основными компонентами внутриклеточного протеолиза являются протеасомная, лизосомальная и кальпаиновая системы. К внутриклеточным протеолитическим системам также относят каспазы,

нелизосомальные катепсины и другие протеазы. Все процессы внутриклеточного протеолиза жестко регулируются и необходимы для реализации множества базовых клеточных функций. Система внутриклеточного протеолиза вовлечена в регуляцию клеточной пролиферации и дифференциации, реакции на стресс и репарации ДНК.

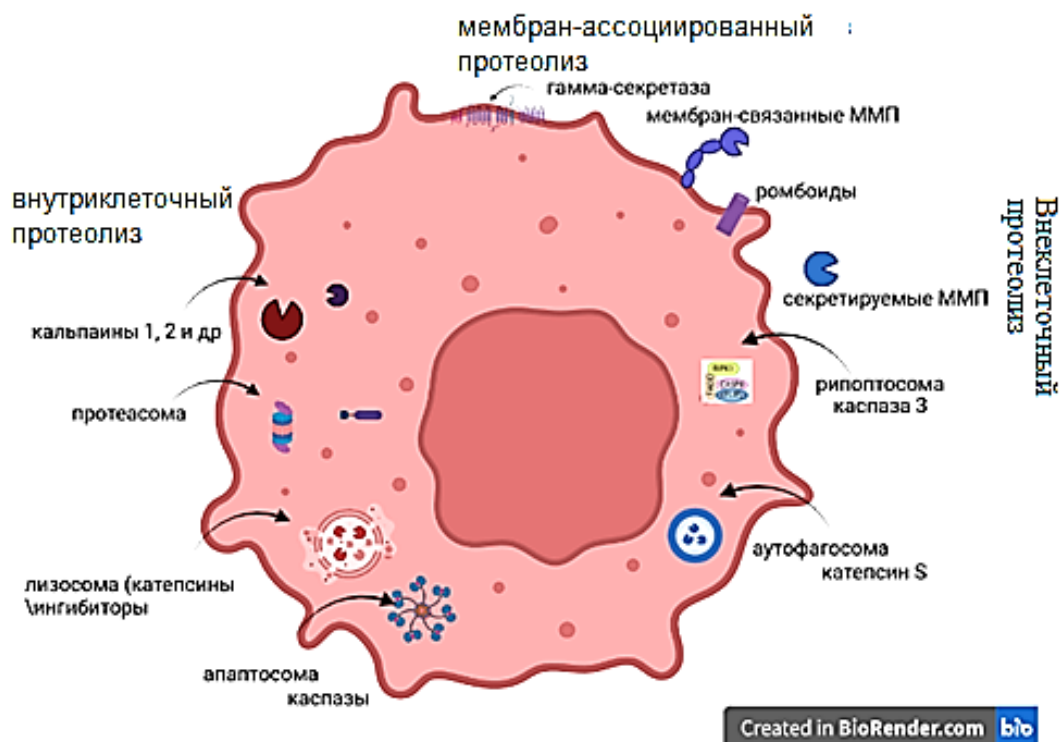


Рис. 24. Схематическое представление протеолиза на клеточном уровне: внутриклеточный протеолиз, внеклеточный и мембран-ассоциированный (рисунок создан в программе *biorender.com*)

Существенную роль в деградации внутриклеточных белков играет протеасомная система, которая участвует в поддержании функциональной активности клеток, в частности в регуляции сигнальных систем. **Протеасомы**, обладая трипсиноподобной, химотрипсиноподобной и каспазной активностями, имеют большой спектр субстратов. Деградация и процессинг белков, участвующих в контроле клеточного цикла, апоптозе и неоангиогенезе, обозначает протеасомы в качестве терапевтической цели: активно исследуются ингибиторы протеасом (бортезомиб, карфилзомиб, NPI-0052 и др.) при лечении различных опухолей (www.clinicaltrials.gov). К сожалению, на данный момент, препараты, ингибирующие протеасомы, имеют мощные побочные эффекты: токсическое поражение почек, сердечно-сосудистой системы и нейротоксичность. Убиквитин-протеасомная система участвует в контроле экспрессии транскрипционных и ростовых фак-

торов IGF-I, HIF-1 и NF-κB (p50). Также известно, что протеасомы участвуют в посттрансляционной модификации полипептида p105 – предшественника NF-κappaBp50, что ведет к появлению активных форм транскрипционного фактора NF-κappaB. Выявлена связь между содержанием транскрипционного фактора NF-κappaB и уровнем продукции фактора HIF-1, что, возможно, обеспечивает косвенное участие NF-κappaBp50 в регуляции уровня ростового фактора VEGF и процесса неоангиогенеза. Есть данные, что протеасомная деградация HIF1 (энхансер филаментации 1) с участием протеинфосфатазы PP2A ведет к нарушению адгезивных контактов с ЭКМ *in vitro*.

Особый интерес сейчас представляет процесс убиквитирования-деубиквитирования. Пул белков, предназначенных для деградации через убиквитирование, называют нагрузкой на протеасому. Поддержание баланса емкости (способность к деградации) протеасомы и рабочей нагрузки на нее может иметь значение для определения эффекта протеасомной деградации белков. Деубиквитирование специфичными ферментами деубиквитидазами вносит важный вклад в обеспечение ряда клеточных функций, включая регуляцию иммуногенности опухоли, стабилизацию противовоспалительных рецепторов и регуляцию противовоспалительных цитокинов, активацию сигналов, связанных со стволовостью, которые имеют прямую корреляцию с иммуносупрессией, метастазированием, химиорезистентностью. Исследование механизмов деубиквитирования становятся более актуальными на фоне разработок синергетической иммунотерапии. Терапевтические эффекты ингибиторов деубиквитидаз, таких как USP1, USP4, USP7, USP14 и USP33, были подтверждены при различных локализациях рака. Таким образом, на сегодняшний день идут разработки альтернативы ингибиторам протеасом на основе стратегий направленной деградации белка.

Кальпаины – кальций-зависимые цитозольные цистеиновые протеиназы. В настоящее время известно 15 протеаз, из которых наиболее изучены кальпаин-1 и -2, и их специфический ингибитор кальпаистатин. Протеолиз, осуществляемый кальпаинами, является частичным, не деградирующим белок, в результате которого «моделируется» структура белка-мишени. Кальпаины участвуют в модуляции активности белков апоптоза, пролиферации и миграции клеток, например - p53, Bcl-2, Bcl-x1, Bid, Bax, каспазы-3, -7, -8, -9 и -12, NF-κB. Мутации гена CAPN3 (p94) связаны с развитием мышечной дистрофии - кальпаинопатии. CAPN3 связывается с многочисленными

ми мышечными белками, в том числе с тропомиозином и тайтином (коннектином) в саркомере, что ведет к развитию тяжелой мышечных дистрофий и снижению жизнеспособности. CAPN1-2 участвует в деградации E-кадгерина, β -катенина, p-120 и талина-1, что ведет к нарушению клеточной адгезии. CAPN2-опосредованная активация киназы-1 LIM (LIMK1) с последующим фосфорилированием кофилина CFL1 приводит к абберрантному митозу и многоядерности клеток. Несмотря на то, что многочисленные исследования подтверждают участие кальпаиновой системы в опухолевом росте, вклад этих протеиназ в патогенетические механизмы до сих пор изучается. Недавние исследования показали, что кальпаиновая система может играть существенную роль в реализации эпителиально-мезенхимального перехода (ЭМП). Однако ингибирование кальпаинов не вызвало значительного изменения экспрессии генов, связанных с ЭМП. Поэтому необходимы дальнейшие исследования связи между активацией кальпаинов и экспрессией генов, связанных с ЭМП.

Определяют два основных механизма внутриклеточной деградации белков: убиквитин-протеасомная система, описанная выше, и лизосомальный путь. Лизосомальное поглощение осуществляется посредством трех различных процессов: фагоцитоза, эндоцитоза и аутофагии. Среди множества ферментов, содержащихся в лизосомах, катепсины представляют собой семейство лизосомальных протеаз с широким спектром функций. **Катепсины** делятся в соответствии со структурой каталитического центра на три подгруппы: цистеиновые (папаины (B, C, H, F, K, L, O, S, V, W и X/Z)), аспарагиновые (D, E), сериновые (A, G). Кроме этого катепсины можно по их локализации протеолитической активности на эндопептидазы (S, K, V, F, L) и на секретируемые (экзопептидазы (B, H, Z/X, C)). Нарушение регуляции синтеза и активности катепсинов связано с рядом заболеваний, включая метаболический синдром, сердечно-сосудистые заболевания, канцерогенез, воспалительные неврологические заболевания и др. Так, физиологическими субстратами катепсина D (CatD, CTSD) в мозге являются амилоидный предшественник (APP), тау-белок (MAPT), липопигмент липофусцин, апоЕ, пресинаптический белок α -синуклеин (SNCA) и гентингтин (HTT). И если CatD не функционально не активен, то накопление вышеперечисленных белков ведет к нейродегенеративным заболеваниям, включая болезни Паркинсона и Гентингтона (хорея Гентингтона). Здесь можно добавить, что, напри-

мер, НТТ может расщепляться каспазами, при этом образуются еще более нейротоксичные продукты. Экспериментальные данные указывают на то, что активность CatD связана с метаболизмом холестерина и гликозаминогликанов, что объясняет его участие в пластичности нейронов. Катепсин S участвует в жировом обмене, и сверх экспрессия его гена CTSS связана с ожирением. Доказано, что катепсины, тесно связаны с инвазией и прогрессией опухоли. При этом считается, что катепсины при опухолевых заболеваниях в основном секретируются во внеклеточное пространство через периферические лизосомы. Достаточно хорошо описано участие катепсинов в канцерогенезе. Считается, что эти протеазы участвуют в апоптозе, аутофагии, ангиогенезе, миграции и инвазии опухолевых клеток. Например, катепсин S участвует в регуляции процессов аутофагии: в клетках глиобластомы человека ингибирование CTSS индуцирует аутофагию и внутренний путь апоптоза и последующие подавление передачи сигналов PI3K/AKT/mTOR и активацию передачи сигналов JNK.

Кроме того, ингибирование CatS также может вызывать аутофагию путем активации сигнального пути ERK/MAPK, связанного с рецептором EGF. Катепсин L способствует ангиогенезу при раке желудка, регулируя путь CDP/Cux/VEGF-D. В литературе четко указывается, что именно баланс между катепсинами и их ингибиторами имеет значение как для диагностики, так и для прогноза опухолевой прогрессии. Существуют четыре основные группы ингибиторов катепсинов: стефины, цистатины, кининогены и неингибирующие гомологи цистатинов, такие как фетуины. Таким образом, катепсины, как центральные участники сложной серии биологических эффектов, обладают исключительным потенциалом для терапевтического воздействия или в качестве диагностических / прогностических критериев.

Каспазы – внутриклеточные цистеиновые аспартатспецифичные протеазы, участвуют в процессах апоптоза, некроза и воспалительных процессах. Для каждого типа клеток характерны уникальные каспазозависимые сигнальные пути. Регуляция сигнальных путей апоптоза и некроза с участием каспаз изучена достаточно полно. Показано, что в опухолевых клетках могут нарушаться механизмы каспаза-опосредованного каскада приводящее к блокированию запуска апоптотической гибели, что способствует прогрессии злокачественного процесса, а также развитию резистентности к противоопухолевой терапии (рис. 25).

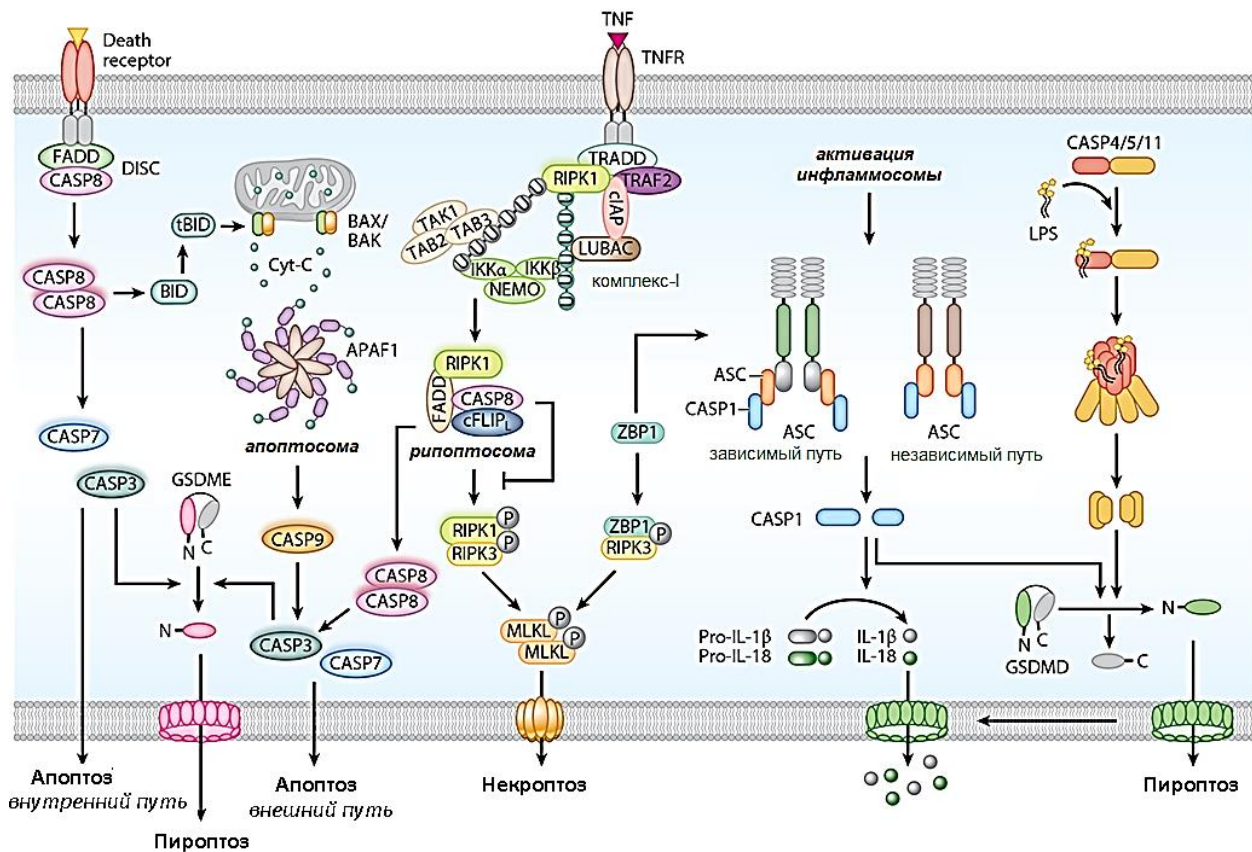


Рис. 25. Пути и механизмы активации каспаз и реализация каспаз-зависимой клеточной гибели (на основе Kesavardhana S, et all. *Caspases in Cell Death, Inflammation, and Pyroptosis. Annu Rev Immunol.* 2020, 38:567-595)

Итак, в литературе представлен достаточно большой пласт по изучению роли внутриклеточного протеолиза в прогрессии злокачественных новообразований. Однако, благодаря новым современным технологиям появляются все новые данные по оценке внутриклеточных протеаз в опухолевой прогрессии, расширяются знания о механизмах и функции вышеописанных протеаз. Эти новые знания, несомненно, будут полезны для создания новых более точных диагностических инструментов и мишеней противоопухолевых препаратов.

ТРАНСМЕМБРАННЫЙ ПРОТЕОЛИЗ

Мембран-ассоциированный или трансмембранный протеолиз в последнее время рассматривается как один из важных механизмов регуляции клеточных процессов. Внутримембранные или трансмембранные протеазы представляют собой интегральные мембранные белки с несколькими трансмембранными доменами. Субстраты этих протеаз, как правило, трансмембранные белки, выполняющие широкий спектр биологически важных функций. Интегрированные в мем-

брану протеазы участвуют не только в деградации мембранных белков, но и в создании посредников, сигнальных молекул различных базовых клеточных процессов.

К внутримембранным (мембран-ассоциированным) протеазам относят: мембранные и заякоренные сериновые протеиназы (TTSP (type II transmembrane serine proteases), матриптаза и др.), белки семейства металлопротеаз-дизинтегринов ADAM, внутримембранные аспарагиновые протеазы SPP (SPPL2B, SPPL2BA), протеазы из семейства внутримембранных металлопротеаз: двухсайтовая протеаза (S2P), матриксные металлопротеиназы ММП14, ММП17 и др., ромбовидные сериновые протеазы (ромбоиды), β -секретаза (BACE1) и γ -секретаза.

Матриптаза – сериновая протеаза мембранного типа II (МП-SP1, TADG-15, epithin, ST14, TMPRSS6) синтезируется в виде неактивного, одноцепочечного зимогена, широко экспрессируется в различных эпителиальных клетках и вовлечена в ангиогенез, деградацию внеклеточного матрикса, участвует в регуляции активатора плазминогена урокиназного типа и, возможно, активации калликреинового каскада. Фермент является членом семейства трансмембранных сериновых протеаз II типа (TTSP), к которому относятся еще гепсин (HPN, TMPRSS1, TMPRSS), трансмембранная сериновая протеаза 11E (TMPRSS11E, DESC1, TMPRSS11E2) и корин (ATC2, CRN, Lrp4, PRSC, TMPRSS10). Гепсин предлагается в качестве прогностических онкомаркеров при раке почки (благоприятный), и DESC1 – при раке легкого (неблагоприятный). Итак, 3 члена из семейства TTSP являются потенциальными онкомаркерами при раке эпителиального происхождения (<https://www.proteinatlas.org>). Кроме этого, показано, что TMPRSS6 играет важную роль в регуляции гомеостаза железа. Различные мутации TMPRSS6 приводят к неадекватно высокой выработке гепсидина, вызывая железорезистентную железодефицитную анемию (IRIDA), заболевание, характеризующееся микроцитарной гипохромной анемией. Механизм опосредованного TMPRSS6-ингибирования синтеза гепсидина до конца не ясен. Однако есть данные о том, что белок кодируемый геном TMPRSS6 расщепляет мембранный гемоювелин (HJV, глюкозофосфоинозит-связанный белок клеточной поверхности, ко-рецептор белков костного мозга (BMP)), тем самым ингибируя передачу сигналов BMP-SMAD и транскрипцию гепсидина. Активация матриптазы индуцируется кислой средой клеточного микроокружения. В физиологических условиях ингиби-

тором матриптазы является ингибитор активатора фактора роста гепатоцитов -1 (HAI-1). Показано, что экспрессия матриптазы увеличена во многих типах опухолевых клеток. Также есть данные о том, что матриптаза участвует в развитии кишечной недостаточности в результате потери функции HAI-2 во время эмбриогенеза *in vivo*. При этом наблюдается снижение уровней EpcAM и клаудина 7 в ткани кишечника. Матриптаза проявляет трипсиноподобную активность, посредством расщепления по Arg или Lys, участвует в терминальной дифференцировке кератиноцитов посредством активации простазина (PRSS8) и процессинга филаггрина (FLG). PRSS8 – внеклеточная сериновая протеаза с трипсиноподобной активностью, которая выполняет протеолитическую активацию натриевого канала эпителиоцитов (ENaC), является важным регулятором баланса натрия в клетке. Простазин экспрессируется в основном в эпителиальных тканях предстательной железы, почек, легких и толстой кишки млекопитающих в виде заякоренного на гликозилфосфатидил-инозитоле (GPI-) белка массой 40 кДа. По данным базы <https://www.proteinatlas.org> это секретуемая мембранная протеаза. Роль PRSS8 в развитии различных патологических состояний до конца неясна и изучается до сих пор. Есть данные о вовлеченности PRSS8 в патогенез при раке различных локализаций, в том числе в развитии химиорезистентности опухоли. Есть данные об участии PRSS8 в протеолитической активации внеклеточного домена рецептора эпителиального фактора роста (EGFR). Мутации в PRSS8 связаны с изменением чувствительности к некоторым препаратам [база данных COSMIC, <https://cancer.sanger.ac.uk>]. Научный интерес представляют обе мембран-связанные протеазы - простазин и матриптаза, так как они имеют большое значение в морфогенезе эпителия. Так, избыточная экспрессия матриптазы в опухолевых клетках коррелирует с плохим прогнозом. *In vivo* показано, что нерегулируемая экспрессия матриптазы в эпидермальных кератиноцитах оказывает онкогенные эффекты через MET-АКТ-mTOR сигнальный путь, а именно через матриптаза-опосредованную HGF/SF активацию сигнального пути PI3K/АКТ/mTOR, который отвечает за уход от апоптоза, рост, пролиферацию клеток, активацию метаболизма. Такой протеаза-опосредованный сигнальный путь может иметь отношение к большому числу различных патологических изменений эпителия. В ткани кишечника, отсутствие матриптазы приводит к нарушению целостности эпителия, что в конечном итоге способствует развитию инвазивной аденокарциномы. Субстратами для мат-

риптазы могут быть про-HGF (фактор роста гепатоцитов), рецептор PAR-2, про-простазин и про-MSP. Однако, изучение механизмов участия матриптазы в патогенезе заболеваний остается на уровне клеточных культур и экспериментах на животных.

Из трансмембранных протеаз наиболее изучены белки семейства металлопротеаз-дизинтегринов АДАМ, которые вовлечены в протеолиз цитокинов, молекул клеточной адгезии, факторов роста и шеддинг их рецепторов, в том числе ключевого рецептора сигнальной трансдукции Notch. АДАМ-опосредованное расщепление Notch представляет собой первый шаг регулируемого внутримембранного протеолиза (риппинга) рецептора, что ведет к активации сигналинга Notch (рис. 26). Классическая модель АДАМ-опосредованной протеолитической активации Notch – обязательный шаг перед последующим γ -секретаза-опосредованным процессингом этого рецептора. Протеолитический процессинг Notch лигандов модулирует силу и продолжительность Notch сигналов, приводит к генерации растворимых внутриклеточных доменов лигандов, и может поддерживать двунаправленную передачу сигналов между клетками. В частности, шеддинг внеклеточного домена Notch с помощью АДАМ17 и АДАМ10 способствует активации процессов неангиогенеза. Также семейство адамализинов участвует в шеддинге PD-L1 (CD274, B7-H1), который выступает как негативный регулятор противоопухолевого иммунитета. Блокада взаимодействия PD-1 с его лигандом PD-L1 может использоваться для восстановления и повышения функции Т-клеток.

АДАМ-10-опосредованный шеддинг Е-кадгерина способствует уменьшению межклеточной адгезии и миграции эпителиальных клеток в клеточной культуре. Отмечена положительная корреляция между уровнем экспрессии белков АДАМ12 и HER2, рецептора эпидермального фактора роста-2 человека (ErbB2/Neu), который играет важную роль в развитии и прогрессии злокачественных новообразований. Так же есть данные о возможном использовании АДАМ12 как биомаркера недоношенности и задержке роста плода. АДАМ12 участвует в процессинге трансмембранного гликопротеина из суперсемейства иммуноглобулинов басыгина, (CD147, EMMPRIN (индуктор внеклеточных матриксных металлопротеиназ)). В свою очередь CD147 регулирует продукцию ММП, экспрессию VEGF и PLGF (плацентарного фактора роста), экспрессию и локализацию на клеточной поверхности переносчиков лактата (MCT1 и MCT4), таким

образом, участвуя и в аэробном гликолизе. Нужно отметить, что научный интерес к протеазам семейства АДАМ в последнее время связан с их существенной ролью в некроптозе, который участвует в защите клеток от вирусных, бактериальных, грибковых и паразитарных инфекций, поддерживает гомеостаз взрослых Т-клеток и способствует элиминации потенциально дефектного плода.

Мультисубъединичный внутримембранный протеазный комплекс γ -секретаза состоит из четырех белков: пресенилин, никастрин, АРН-1 и РЕН-2. Учитывая, что субстратов для γ -секретазы определено достаточно большое количество, то изучение ее экспрессии в качестве показателя прогрессии опухолевого процесса представляется очень интересным. Известно, что γ -секретаза участвует в шеддинге различных рецепторов в том числе VEGFR-1, ErbB-4 (семейство нейрегулинов), IGF1-R, и вовлечена в регуляцию сигнального пути Notch. Протеолиз рецепторов Notch γ -секретазой, в частности компонентом комплекса пресенилином, требуется для выхода мембранного компонента NICD в клетку, с последующим перемещением к ядру. NICD регулирует транскрипцию генов, участвующих в реализации программ дифференцировки, пролиферации и апоптоза (ES1, HEY, Cyclin D1, NRARP, NF- κ B, p21, p53, pre-Ta, c-мус, IGF1-R, сурвивин, Slug, Nanog). Ингибиторы γ -секретазы находятся активно исследуются в качестве таргетной терапии различных заболеваний, включая рак и болезнь Альгеймера [<https://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=secretase>]. В доклинических исследованиях таргетинг γ -секретазы значимой клинической пользы при большинстве солидных опухолей не выявлено, за исключением злокачественных новообразований ЦНС и десмоидных опухолей. В связи с этим на сегодняшний день возникают важные вопросы, на которые еще предстоит ответить. Во-первых, каким образом и как таргетирование γ -секретазы может отражаться на иммунитете, в том числе и противоопухолевом? Во-вторых, потребуется ли одновременное вмешательство во внутренние компенсаторные сигнальные пути, например, для лечения Notch-зависимых опухолей (рис. 26.)?

Первым этапом процессинга сигнального пути Notch является АДАМ-опосредованный протеолиз для высвобождения внеклеточной части рецептора (рис. 26). Второй этап – γ -секретаза катализирует высвобождение NICD во внутриклеточное пространство. Затем NICD может взаимодействовать с другими сигнальными путями, независимыми от транскрипционной активности, посредством некано-

нической передачи сигналов. Также NICD может транслоцироваться в ядро, связываться с факторами транскрипции CSL и коактиватором транскрипции MAML и способствовать экспрессии генов-мишеней посредством канонической передачи сигналов.

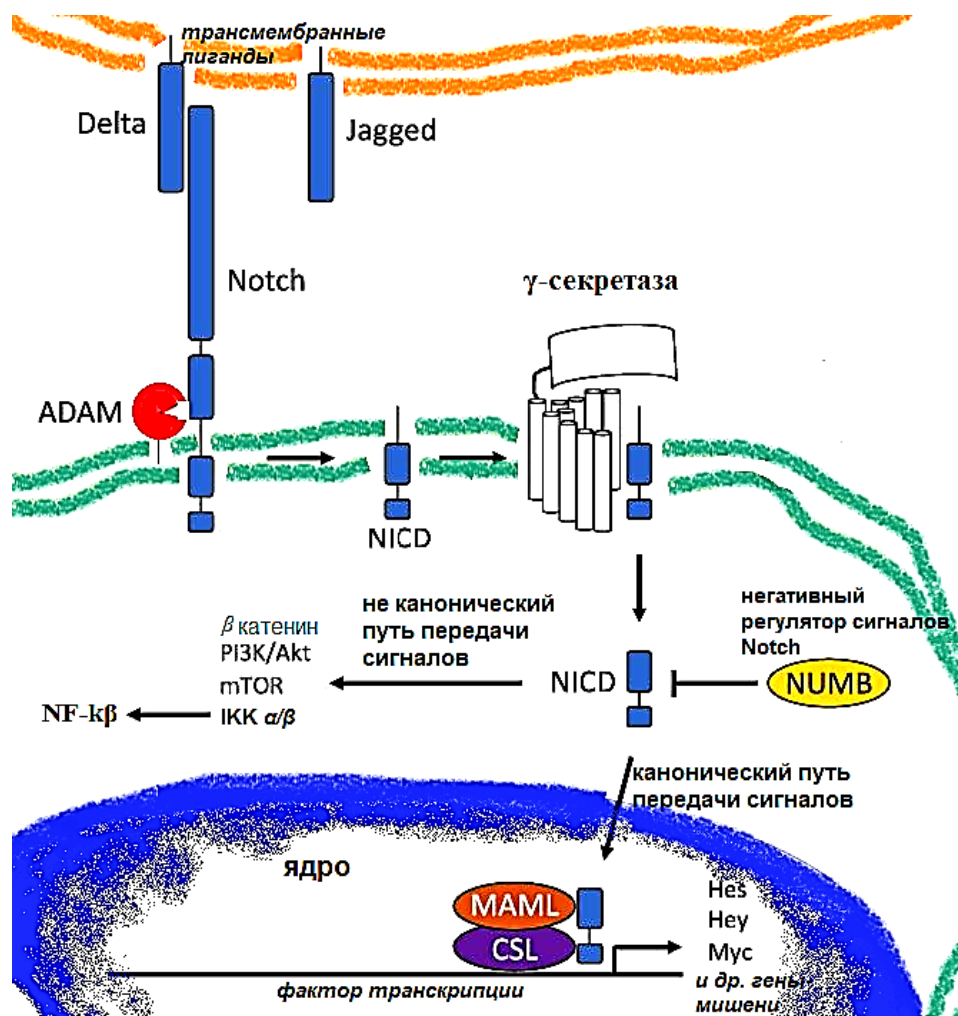


Рис. 26. Схематическое изображение сигнального пути Notch и его ингибирование посредством таргетинга γ -секретазы (на основе McCaw TR et al. *Gamma Secretase Inhibitors in Cancer: A Current Perspective on Clinical Performance. Oncologist. 2021/26(4): e608-e621*)

Notch, трансмембранный рецептор одной клетки, связывается с трансмембранными лигандами Delta или Jagged, принадлежащими соседней клетке – транс-взаимодействие. Взаимодействие между рецептором Notch и лигандами Delta или Jagged той же клетки (цис-взаимодействие) приводит к деградации как рецептора, так и лиганда.

Примечание: GSI – ингибитор гамма-секретазы; MAML – белки семейства коактиваторов транскрипции; NICD – внутриклеточный домен Notch. NICD (Notch Intracellular Domain) – внутриклеточный домен Notch.

Семейство трансмембранных матриксных металлопротеиназ **ММП-МТ** включает несколько членов: MMP14, MMP15, MMP16, MMP17, MMP23A, MMP23B, MMP24, MMP25. ММП-МТ имеют общую доменную структуру с растворимыми (секретируемыми) ММП, наиболее изученными в экспериментальной и клинической онкологии. Домен SP-Pro-Cat-Hinge-Hrx связан с плазматической мембраной либо через трансмембранный домен, за которым следует короткий цитоплазматический хвост (СТ) (MT1-, MT2-, MT3- и MT5-ММП), либо через гликозилфосфатидинозитол – (GPI-) якорь (MT4-, MT6-ММП) на С-конце. В литературе для МТ-ММП были описаны различные функции: в качестве рецепторов, активаторов для других ММП и для локального протеолиза внеклеточного матрикса в околочлесточной области. Показано, что ММП-14 связана с рекрутированием лейкоцитов при регенерации печени и высоко экспрессируется при гепатоцеллюлярной карциноме. Одним из механизмов участия ММП-14 в опухолевой прогрессии можно отнести непосредственное ее участие в эндопротеолитической модификации поверхностных рецепторов клетки, включая CD44, тканевой трансглутаминазы, и $\alpha\upsilon\beta3$ интегрина, что позволяет опухолевой клетке регулировать рецепторный профиль в непрерывно изменяющейся окружающей среде ЭКМ. Координация экспрессии $\alpha\upsilon\beta3$ интегрина и различных ММП показана на многих клеточных линиях, что говорит о возможном протеолитическом процессинге интегринового рецептора для нужд опухолевой клетки и поддержания метастатического потенциала. Также было показано, что МТ1-ММП расщепляет белок, подобный рецептору липопротеинов низкой плотности, контролируя активность ММП-2 и других протеиназ. К внутриклеточным субстратам ММП-14 относятся, в частности, белки цитоскелета, такие как α -актинины -1 и -4, регуляторный белок актина CAP-G (кепирующий актиновый белок, гельзолиноподобный, родственник актину белок (Arg)-2, кофилин-1, эзрин, филамины -А, -В и -С, гельсолин, моэзин, плектин-1, профилин-1, тубулин- α/β и виментин. ММП-16 (ММП-МТ3) в основном экспрессируется при гепатите, а также при циррозе и гепатоцеллюлярной карциноме. ММП-25, ММП мембранного типа (МТ6-ММП), прикреплена к плазматической мембране через гликозилфосфатидил-инозитольную связь, участвует в опухолевой инвазии, рассеянном склерозе. При воспалении ММП-25 ингибирует альфа-1 протеиназный ингибитор, секретируемый активированными нейтрофилами, облегчая трансэндотелиальную миграцию нейтрофи-

лов в воспалительные участки. MMP-25 участвует в активации NF-κB, через убиквитинирование TRAF6, тем самым участвуя в регуляции врожденного иммунитета.

Кроме выше перечисленного показано, что ММП являются компонентами внеклеточных везикул (ВВ), которые рассматриваются как источники биомаркеров и как потенциально высоко эффективные средства доставки терапевтических средств. ММП ассоциированные с ВВ контролируют ремоделирование ЭКМ и шеддинг рецепторов, расположенных либо на мембранах ВВ, либо на поверхности клеток-мишеней. На сегодняшний день активно изучаются механизмы и основные пути везикулярного транспорта МТ1-ММП и места ее высвобождения / секретирования.

Двухсайтовая протеаза (S2P), гидрофобная интегральная мембранная металлоэндопептидаза, участвует в жировом обмене, вовлечена в риппинг белков (SREBPs), транскрипционных факторов вовлеченных в биосинтез холестерина. S2P может функционировать в качестве антиоксиданта, что может быть связано с регуляцией активности НАДФН-оксидазы и экспрессии PON-2 (параоксаназа-2), внутриклеточного антиоксидантного фермента из семейства гидролаз, повышение экспрессии которого является одним из защитных механизмов клетки от повреждающего действия свободных радикалов. S2P участвует в контроле биосинтеза холестерина и жирных кислот и стресс-реакций эндоплазматического ретикулума (ER) посредством расщепления мембран-связанных факторов транскрипции. Мутации в гене S2P, ведущие к снижению активности этой протеазы, ведут к различным патологическим состояниям, начиная от дефектов кожного покрова и заканчивая неврологическими аномалиями. Ингибирование активности этой протеазы ведет к накоплению белка SREBP-1 и фактора активации транскрипции (ATF6), что индуцирует каспаза-опосредованный апоптоз в клетках липосаркомы. S2P предлагается в качестве диагностического маркера и терапевтической мишени при раке поджелудочной железы [патент «Targeting www.ssmu.ru-2 protease (s2p) for the treatment of pancreatic cancer». WO 2004078934 A2]. Таким образом, знания о биологической роли, активности и функции S2P при физиологических и патологических состояниях недостаточно полны и требуют дальнейшего изучения.

Уникальным семейством считаются **ромбоиды** (RHBDF1, RHBDF2, митохондриальная Pcp1) – внутримембранные сериновые протеазы, которые распределены в пределах плоскости мембраны, и

подвергают гидролизу субстраты, находящиеся внутри или около трансмембранных областей. Недавно показано, что ромбоиды участвуют в регуляции многих важных клеточных функций, что дает веское обоснование для изучения механизмов этих ферментов в развитии различных патологий. Так, на эпителиальных клетках человека MDA-MB-231 было показано, что избыточная экспрессия ромбоида RHBDL2 приводит к усилению пролиферации клеток, снижению адгезии и подавлению апоптоза. *In vitro* показано, что ромбоид RHBDF1 является важным компонентом механизма, ответственного за продукцию активированных EGFR-лигандов. На моделях *in vivo* и *in vitro* показано, что RHBDF1 играют решающую роль в активации опухоли-ассоциированных макрофагов и стимулировании фиброза в опухолевой строме, участвует в активации сигнального пути JNK. Есть данные, что RHBDF1 и RHBDF2 во время эмбриогенеза участвует в регуляции ADAM17-зависимой передачи сигналов EGFR, и нокаут ромбоидов приводит к полиорганному дефекту и перинатальной гибели плода. Сайленсинг гена RHBDF2 приводит к подавлению иммуносупрессивного белка контрольной точки PD-L1. RHBDF2 предлагается как биомаркер опухолевой прогрессии и мишень для таргетной терапии. Учитывая, что все исследования проведены *in vitro* / *in vivo* эти результаты требуют валидации. Тем не менее есть попытки таргетирования ромбоидов микроРНК с целью противоопухолевой терапии. Так авторы на клеточных линиях и образцах опухоли, взятых от больных немелкоклеточным раком легких, показали, что miR-924 блокирует прогрессирование опухоли путем подавления экспрессии RHBDD1. Обнаруженная «ось» miR-924/RHBDD1 может стать новой терапевтической мишенью для лечения НМРЛ. А *in vivo* выявлено, что сверхэкспрессия miR-924 снижает рост ксенотрансплантата посредством ингибирования сигнального пути RHBDD1/Wnt/ β -катенина. Учитывая, что этот класс протеаз открыт сравнительно недавно, то уточнение каталитических механизмов, субстратной специфичности и конкретных механизмов участия в патогенезе различных заболеваний будет способствовать развитию новых знаний в медицине в целом.

Таким образом, литературные данные свидетельствуют о бесспорно важном и существенном вкладе трансмембранного (мембран-ассоциированного) протеолиза в патогенезе различных заболеваний, и в ближайшем будущем это направление исследований будет, несомненно, пополняться новыми данными.

ВНЕКЛЕТОЧНЫЙ ПРОТЕОЛИЗ

Регулируемый внеклеточный протеолиз имеет решающее значение для физиологических процессов, включая ремоделирование тканей, заживление ран и эмбриогенез. В механизмах патофизиологических процессов, таких как канцерогенез, сердечно-сосудистые заболевания, воспалительные процессы, болезни дыхательной системы и пародонта внеклеточный протеолиз также занимает одно из ведущих мест. Известно, что метастазирующие клетки и опухоль-ассоциированные фибробласты для разрушения базальных мембран и межклеточного матрикса секретируют целый ряд ферментов: коллагеназы, расщепляющие коллаген ЭКМ; гепараза, участвующая в гидролизе гепарансульфата, основного протеогликана базальной мембраны; катепсины – цистеиновые протеазы, которые в нормальных клетках локализуются перинуклеарно в лизосомах, а у метастазирующих – на базальной поверхности клеток, что ассоциировано с инвазивным фронтом опухоли; плазмин, который участвует в деградации ЭКМ путем разрушения таких белков как ламинин, фибронектин, тромбоспондин и др.; матриксные металлопротеазы (ММП-1,2,3,9 и т.д.), участвующие в разрушении почти всех компонентов межклеточного матрикса.

Сериновые протеазы (активатор плазминогена урокиназного типа, трипсин) достаточно широко исследованы во взаимосвязи с опухолевой инвазией и метастазированием рака различных локализаций. Активатор плазминогена урокиназного типа (uPA, урокиназа (КФ 3.4.21.31)), рецептор к урокиназе (uPAR) и два эндогенных ингибитора (PAI-1 и PAI-2) составляют uPA-систему, которая участвует в регуляции таких важных клеточных процессов как инвазия, метастазирование, пролиферация, апоптоз, адгезия, хемотаксис и миграция клеток в нормальных и патологических условиях. uPA-система также может быть вовлечена в реализацию ЭМП и экспрессию генов ЭМП. Каталитически активный uPA узкоспецифичен, осуществляет процессинг плазмينا в перицеллюлярном пространстве. В свою очередь плазмин обеспечивает деструкцию ЭКМ, посредством гидролиза фибронектина, витронектина, ламинина и тромбоспондина. Кроме этого, секретируемые металлопротеиназы (ММП-1,2,3,9 и т.д.) активируются за счет плазмин-опосредованных протеолитических каскадов, которые в свою очередь гидролизуют все основные компоненты ЭКМ и базальных мембран. В результате этих протеолитических каскадов происходит активация факторов роста и других биологически

активных молекул, таких как VEGF, bFGF, IGF, EGF, TGF- β , TNF- α , интерлейкинов, кадгеринов, селектинов.

Известно, что трипсин расщепляет большое количество компонентов ЭКМ и вызывает каскадную активацию других протеаз, которые также участвуют в различных патологических процессах. Несмотря на большое количество работ по исследованию трипсина, интерес к этой протеазе не угасает. Также, интерес представляют ингибиторы трипсина. Например, опухоли-ассоциированный ингибитор трипсина (ТАТИ), также известный как панкреатический секреторный ингибитор трипсина (PSTI), впервые обнаруженный в моче пациентки с гинекологическим раком (ингибитор сериновой пептидазы Казала 1 типа. 1 (SPINK1) способствует канцерогенезу, активируя рецепторы эпидермального фактора роста (EGFR). ТАТИ экспрессируется при различных видах рака, включая колоректальный рак, рак поджелудочной железы, яичников, мочевого пузыря, почки, рак простаты, легких, молочной железы и печени, и представляется полезным как для диагностических, так и для прогностических целей. На основе механизмов действия ингибиторов сериновых протеаз был создан препарат растительного происхождения – ингибитор ВБИ (Bowman–Birk inhibitor), который показал мощный антиканцерогенный эффект *in vivo*. Однако, при клиническом испытании в IIb фазе этот ингибитор не был эффективен у больных с лейкоплакией слизистой полости рта по сравнению с плацебо. Тем не менее, применение ВБИ в лечении различных заболеваний, связанных с нарушением регуляции протеолитической активности, включая метаболические и воспалительные нарушения, все еще находится на стадии изучения.

К важнейшим протеазам, участвующим в деградации компонентов ЭКМ и поддержании гомеостаза нормальной ткани относят группу матриксных металлопротеиназ (ММП), являющееся мультигенным семейством, состоящим из более 20 секретируемых и мембран-связанных цинк-зависимых эндопептидаз. Важнейшими представителями семейства ММП являются различные неспецифические коллагеназы, желатиназы, стромелизины, матрилизины, трансмембранные типы I, трансмембранные типы II, гликозилфосфатидилинозитол-заякоренные (GPI-заякоренные) и другие ММП. Активность ММП регулируется специфическими ингибиторами тканевых металлопротеиназ ТИМП, из них три секретируются в растворимой форме (ТИМП-1, -2 и -4), а ТИМП-3 связан с ЭКМ. Некоторые из секретируемых ММП с уже доказанной существенной ролью в реализации

программы ЭМП: ММП -1, -2, -3, -7, -9, -14 и -28. Нарушение баланса между ММП и их ингибиторами приводит к усиленной деградации тканей, способствуя возникновению различных заболеваний, включая артрит, преэклампсию беременных и т.д. Например, ММП2 участвует в миграции и инвазии трофобластов, и таким образом, в развитии преэклампсии при беременности. Подавление активности ММП2 может быть терапевтической целью при данной патологии. Экспрессия гена ММП-9 индуцируется в ответ на воспаление, а активность протеазы способствует прогрессированию атеросклеротического поражения сосудов. *In vivo* показано, что экспрессия ММП-9 влияет на экспрессию мРНК некоторых генов метаболизма липидов и на метаболизм холестерина, возможно через конкурентное связывание с рецептором эндоцитоза LRP1. И нарушение регуляции активности ММП-9 (и системы ММП-ТИМП в целом) может приводить к развитию атеросклероза и ишемической болезни сердца. И по последним данным у пациентов с COVID-19 наблюдается повышение уровня ММП, нарушение регуляции ремоделирования внеклеточного матрикса в легких, связанное с повышенной клеточной экспрессией, активностью и экскрецией ММП. Есть гипотеза, что изменение протеолитической активности ММП, приводящие к повышению уровня TNF- α , может приводить к дезактивации АМР-активируемой протеинкиназы (АМРК) и последующему нарушению регуляции многих нижестоящих ферментов, необходимых для обеспечения энергетического метаболизма клеток. Активированная АМРК стимулирует катаболизм и ингибирует биосинтез жирных кислот, глюкозы и белка. Активация АМРК подавляет экспрессию ММП-2, -9, -13 и -14 в жировой ткани и эмбриональных фибробластах. Секретируемая ММП-3 активирует другие ММП, включая ММП-2 и ММП-9, что является наиболее существенной причиной протеолитической деградации хрящевой ткани и развития ревматоидного артрита. ММП-3 осуществляет протеолиз протеогликанов, фибронектина, ламинина, коллагена; белков клеточной поверхности (Е-кадгерин) и другие молекулы не-ЭКМ, влияющие на пролиферацию и дифференцировку клеток.

Субстратами для ММП могут быть не только компоненты ЭКМ, но и другие протеазы, а также хемотаксические молекулы, латентные формы факторов роста, растворимые и мембранно-ассоциированные белки, связывающие факторы роста, вследствие чего ММП регулируют различные процессы, включая ангиогенез, пролиферацию, апоптоз. Количество вновь синтезируемых ММП регулируется в ос-

новном на уровне транскрипции, а протеолитическая активность существующих ММП контролируется как активацией проферментов, так и ингибированием активных ферментов эндогенными ингибиторами, $\alpha 2$ -макроглобулином и тканевыми ингибиторами металлопротеиназ (ТИМП). Работы по исследованию участия системы ММП-ТИМП в патогенетических механизмах достаточно многочисленны. Однако, интерес к этой протеолитической системе продолжает оставаться на высоком уровне, так как функция ММП не ограничивается деградацией молекул ЭКМ, поскольку некоторые субстраты и продукты расщепления ММП регулируют рост, дифференцировку и апоптоз клеток, а также хемотаксис, миграцию и ангиогенез.

Учитывая существенный вклад семейства ММП в ремоделирование и деградацию ЭКМ, эти протеазы активно изучаются и при опухолевом росте. Известно, что один из этапов опухолевой прогрессии это приобретение клетками опухоли свойства отделяться от исходной клеточной массы, преодолевая адгезивные взаимодействия, и мигрировать к месту метастазирования. В эпителиальных клетках основными белками, ответственным за адгезивные свойства, являются Е-кадгерин и катенины, а за связывание клеток с коллагеном отвечают интегрины, которые участвуют также в передаче экстраклеточных сигналов до белков цитоскелета. Связывание клеток с другими компонентами ЭКМ и базальными мембранами осуществляется с помощью фибро-нектина и ламининов. В последнее время выясняется, что участие интегринов в прогрессии опухолей тесно связано с экспрессией ММП на переднем крае мигрирующих клеток. Один из механизмов деградации Е-кадгерина включает каскад активации EGFR протеазой АДМ-10, который приводит к активации MMP-9, который в свою очередь деградирует Е-кадгерин. Шеддинг Е-кадгерина приводит к перемещению β -катенина к ядру и ведет к усилению клеточной пролиферации. Сверхэкспрессия MMP-3 вызывает каскад событий, включая расщепление Е-кадгерина, ведущих к инициации ЭМП. В процессе опухолевой трансформации опухолевая клетка приобретает фибробластоподобную морфологию, что позволяет цитоскелету организовываться в протрузии и ламеллоподии. Протеазы участвующие в процессе созревания подосомы и инвадоподии принадлежат к трем основным классам: матриксные металлопротеиназы (MMP2, MMP9, MMP-14, АДМ), катепсины, сепсаза (поверхностно-экспрессируемая сериновая протеаза), и урокиназный активатор плазминогена. Экспрессия MMP-9 эпителиальными клетками дыха-

тельных путей связана с экспрессией САР1, актин-связывающего белка семейства аденилилциклаза-ассоциированных протеинов (САР), который участвует в образовании различных мембранных выступов у мигрирующих клеток. Предполагаемый механизм участия САР1 в регуляции подвижности клеток – комплексообразование с талином, белком, прикрепляющим актин к мембране, и киназой фокальных контактов ФАК, активность которой сопряжена с увеличением синтеза ММП.

Таким образом, обсуждение роли внеклеточных протеиназ в развитии различных патологических процессов остается актуальным до сих пор. Выявление новых биологических функций ММП и идентификация новых субстратов, в том числе, выходящее за пределы классической роли разрушения ЭКМ, имеет немаловажное значение для понимания многих механизмов развития воспалительных процессов, опухолевого роста и т.д.

ПРОТЕОЛИТИЧЕСКАЯ СЕТЬ

На сегодняшний день накоплено достаточно данных, чтобы с уверенностью сказать о существовании тесной связи между протеолитическими системами (рис. 27). Так, например, есть данные об одностороннем изменении внутриклеточного и внеклеточного протеолиза, в частности протеасомной активности и активности ММП. В экспериментальных работах на кардиофибробластах стимуляция ММП была связана с активацией NFκB, которая эффективно снижалась путем предварительной обработки клеток ингибиторами протеасом. Ингибирование протеасом в культуре клеток вело к ингибированию экспрессии ММП -2 и ММП-9. В то же время, по некоторым данным, применение ингибиторов протеасом, напротив, повышает уровень ММП-2. Предполагается, что с помощью ингибиторов протеасом возможно избирательно регулировать синтез и биологическую активность некоторых металлопротеиназ. Также экспериментально показано, что существует взаимосвязь внутриклеточного протеолиза с участием кальпаиновой системы и системы ММП: в клетках лимфоциты человека линии ТНР-1 угнетение кальпаиновой системы ее специфическим ингибитором СР1В снижало экспрессию металлопротеиназ 2 и 9. Работы по связи мембран-ассоциированного протеолиза с экстраклеточным протеолизом носят экспериментальный характер. Ученые из лаборатории клеточной биологии университета Йокогамы Jin X., с соавторами (2006 г.) на клеточной линии рака желудка

AZ521 показали, что матриптаза активирует MMP-3. При этом активированная матриптазой MMP-3, также, как и прямое действие матриптазы, поддерживает рост опухоли и ангиогенез, способствует деградации ЭКМ микроокружения опухолевой клетки. Также показано, что матриптаза участвует в процессинге активатора плазминогена урокиназного типа (pro-uPA), фактора роста гепатоцитов (pro-HGF/SF) и рецептора PAR-2, индуцирует экспрессию генов MMP-1, MMP-3, и MMP-13 при остеоартрозе. На клеточных линиях HSC-4 было показано, что MT1-MMP (ММП-14) вызывает шеддинг белка HAI-1, который активирует матриптазу, при этом клетки HSC-4 показали характерный инвазивный рост в геле.

Способность протеаз модифицировать структуру и активность всех белков представляет их как важные регуляторные «ключи» многочисленных биологических механизмов. Нарушение регуляции протеазной активности и дисбаланс в тонкой протеолитической архитектуре клетки является общей характеристикой многих заболеваний. Однако, поиск и разработка таргетных препаратов для регуляции протеолиза осложняется неполным пониманием биологии протеаз. Существенная недостающая часть в этой схеме – взаимодействие между протеазами. Так, например, известно, что некоторые протеазы активируют другие протеазы, например, как выше указывалось ММП-14 активирует ММП-2 и матриптазу. Некоторые серпины могут ингибировать катепсины, а некоторые цистатины могут ингибировать металлопротеиназы. Кальпайны участвуют в модуляции активности каспаз-3, -7, -8, -9 и -12. Сериновая эндопептидаза фурин участвует в активации мембран-связанных и секретируемых ММП.

Интерес представляет и роль протеаз в появлении, жизнеобеспечении и распространении клеток опухоли, которые вышли в периферическое кровообращение - циркулирующих опухолевых клеток. Так, например, *in vivo* две NET (нейтрофильные внеклеточные ловушки) – ассоциированные протеазы нейтрофильная эластаза и MMP9, концентрируются на ламинине, расщепляют его, генерируя эпитоп, который индуцирует пробуждение покоящихся раковых клеток за счет активации интегрина и передачи сигналов FAK/ERK/MLCK/YAP (рис. 27).

Многогранность функций и сложность взаимосвязей протеолитических систем выдвигает на первый план важность изучения участия всех компонентов деградама в развитии различных заболеваний, что поможет получить новые мишени для диагностики и терапевти-

ческих вмешательств. В этом плане мало изучена взаимосвязь мембран-ассоциированного протеолиза с внутриклеточным и внеклеточным протеолизом.

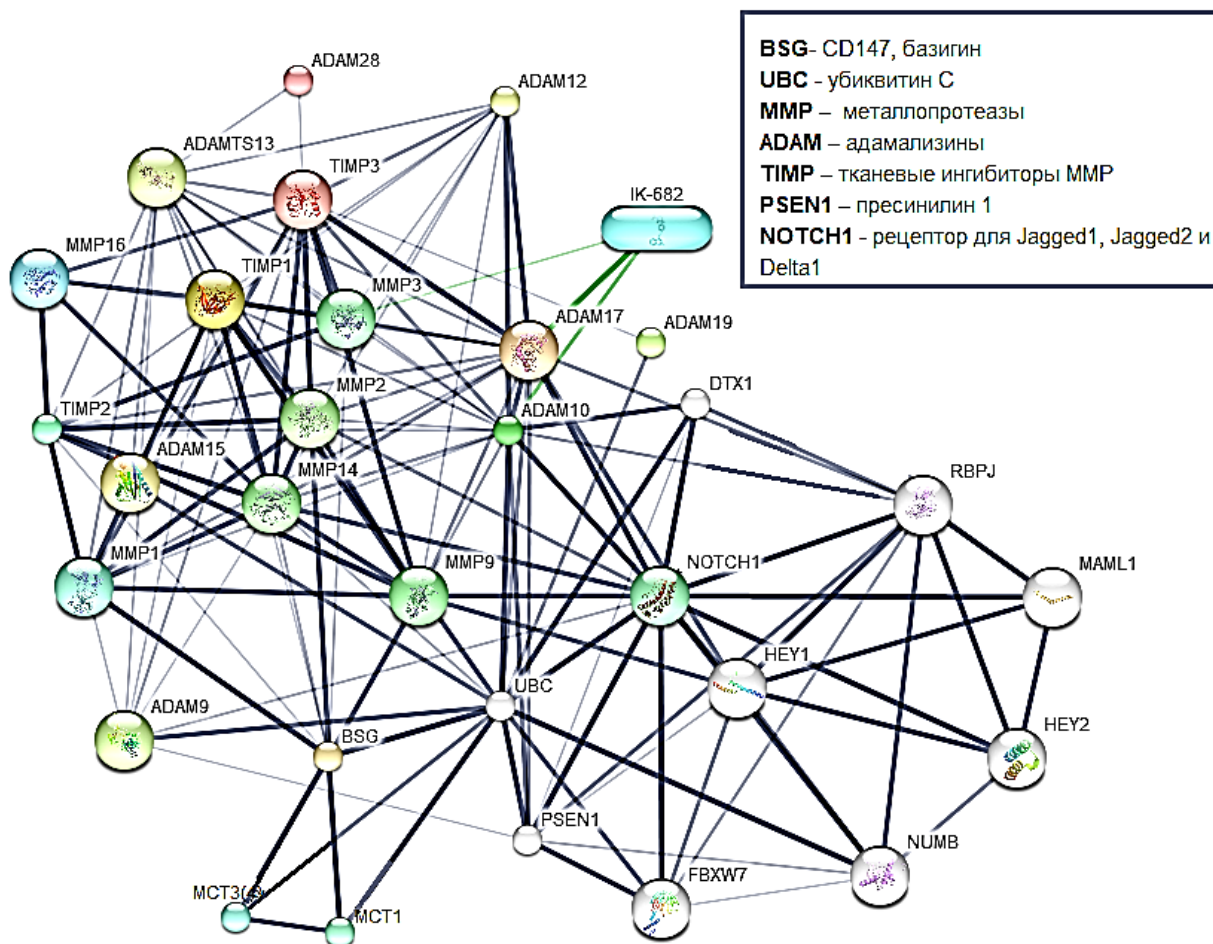


Рис. 27. Схематичное представление известных и предсказанных взаимодействий между протеазами семейства адамализинов, металлопротеаз, компонентов протеасомной системы и гамма-секретазы (<http://stitch.embl.de>, база данных STITCH)

Примечание: указанные взаимодействия включают прямые (физические) и косвенные (функциональные) ассоциации, данные о которых извлечены из других (первичных) баз данных, таких как PubChem, Ensembl, Intact, RefSeq, PubMed, KEGG, и др.

Изучение и понимание деталей молекулярных основ той или иной патологии становится платформой для клинической профилактической медицины. Накопленные факты, свидетельствующие, что повышенная экспрессия и активность, изменение локализации проте-

аз из различных классов, секреция некоторых специфических протеаз, достаточно многочисленны, но не дают полной уверенности для использования компонентов деградама для точного и индивидуального прогноза заболевания. Например, концепция использования ингибиторов протеаз для лечения онкозаболеваний, в конечном итоге, оказалась достаточно сложной, так как составляющие компоненты опухолевой прогрессии не ограничиваются лишь протеолитической активностью протеаз, и развитие опухоли – это сложный мультистадийный процесс. И на сегодняшний день остаются открытыми многие вопросы, в том числе равноценна ли доля вклада в патогенез внутриклеточных, внутримембранных и внеклеточных протеолитических систем, существует ли баланс между этими системами и имеет ли место нарушение этого баланса? Выяснение этих вопросов может прояснить сложные многозвеньевые механизмы развития различных заболеваний. А изучение протеазного профиля клетки с разной тканевой и клеточной локализацией, его взаимосвязи с сигнальными системами, может быть полезным источником в поиске новых диагностических целей и новых подходов в терапии.

Лекция 6

ЛИЗОСОМЫ. АУТОФАГИЯ

В организме синтезируется большое количество высокомолекулярных соединений. Какой-то определенный период времени все они выполняют свои специфические функции в организме, затем распадаются. Распад эндогенно синтезированных веществ осуществляется в специализированных органеллах клетки – лизосомах. *Лизосомы* – гетерогенная вакуольная система цитоплазматических мембран клетки с диаметром 0,5 мкм. Они идентифицированы в 1949 г. Кристианом де Дювом. За их открытие Кристиан де Дюв в 1974 г. удостоен Нобелевской премии.

Открытие лизосом было сделано биохимиками при изучении локализации ферментов в гепатоцитах. В экспериментах было замечено несколько необычное поведение *кислой фосфатазы*. При выделении фракций из гомогената тканей используется раствор сахарозы, позволяющий сохранить структуру субклеточных органелл. В выделенных из гомогената фракциях, также, как и в целых гомогенатах, активность кислой фосфатазы была почти в 10 раз выше, чем в водных растворах. В старых препаратах, через 5 дней хранения активность фермента в этих фракциях возросла в 10 раз, причем наиболее резко в гомогенате и митохондриях. На основании этого было высказано предположение, что кислая фосфатаза в гепатоцитах локализована в специфических гранулах и находится в латентном состоянии. Вскоре появились такие же сообщения, касающиеся других гидролитических ферментов. Активность ферментов проявляется лишь после разрушения этих гранул с помощью какого-либо повреждающего воздействия (гипотоническая среда, замораживание и оттаивание, обработка детергентами, гомогенизация в жестких условиях) и выхода фермента в раствор.

Основные характеристики лизосом:

- 1) лизосомы ограничены одинарной липопротеиновой мембраной, которая придает заключенным в лизосомах ферментам свойство латентности;
- 2) лизосомы содержат кислые гидролазы;
- 3) лизосомы морфологически крайне неоднородны и обладают необычайной ферментной гетерогенностью.

Мембрана лизосом выполняет особую роль. Она ограничивает сферу действия гидролаз и, следовательно, предотвращает безудержный распад субстратов гидролаз, которыми являются белки, липиды, нуклеиновые кислоты и углеводы клетки. Повреждение мембраны, вызванное осмотическим лизисом или её старением, приводит к высвобождению этих ферментов из лизосом и деградации клетки. неповрежденная мембрана лизосом представляет собой достаточно надежную преграду, препятствующую выходу ферментов в клетку. В силу малой проницаемости мембраны в лизосомах удерживаются не только ферменты, но и макромолекулярные субстраты, подвергающиеся деградации. Только низкомолекулярные продукты распада (свободные аминокислоты, сахара, нуклеотиды) способны проходить сквозь мембрану лизосом и далее могут быть использованы клеткой в качестве питательных веществ. Таким образом, лизосомы способны участвовать в реутилизации макромолекул.

Мембрана лизосом способствует поддержанию условий среды внутри лизосом, которые оптимальны для проявления активности лизосомальных ферментов в области низких рН среды. Благодаря мембране, в лизосомах удерживается большое количество отрицательно заряженных высокомолекулярных соединений, таких как гликопротеины, с отрицательно заряженными остатками нейраминовой кислоты и отрицательно заряженными фосфолипидами. С этим сопряжено накопление внутри лизосом одновалентных катионов и, в первую очередь, протонов. Кислые гидролазы обладают наибольшей активностью при значении рН 3–5. Именно такое значение рН среды поддерживается внутри лизосом. Некоторые молекулы малых размеров проходят сквозь мембрану лизосом в незаряженном виде, а затем заряжаются, присоединив протон в кислой среде матрикса. В результате такие молекулы становятся более гидрофильными и не могут проникнуть обратно через липидный бислой. Следовательно, они входят в лизосомы быстрее, чем выходят из неё, и таким образом накапливаются внутри. Примером вещества подобного рода служит антималярийный препарат хлорокин, добавление которого к интактным клеткам приводит к повышению рН в лизосомах, что дает возможность использовать хлорокин в качестве ингибитора лизосомальных ферментов.

ТИПЫ ЛИЗОСОМ

По сравнению со всеми другими клеточными органеллами лизосомы представляют морфологически гетерогенную фракцию. Гетеро-

генность связана с разнообразными функциями лизосом, участвующих в деградации внутриклеточных структур, а также поступающих путем эндоцитоза внеклеточных веществ. В связи с этим различают два основных типа лизосом:

- первичные, которые содержат лизосомальные ферменты, но лишены субстратов;
- вторичные, содержащие субстраты и гидролитические ферменты.

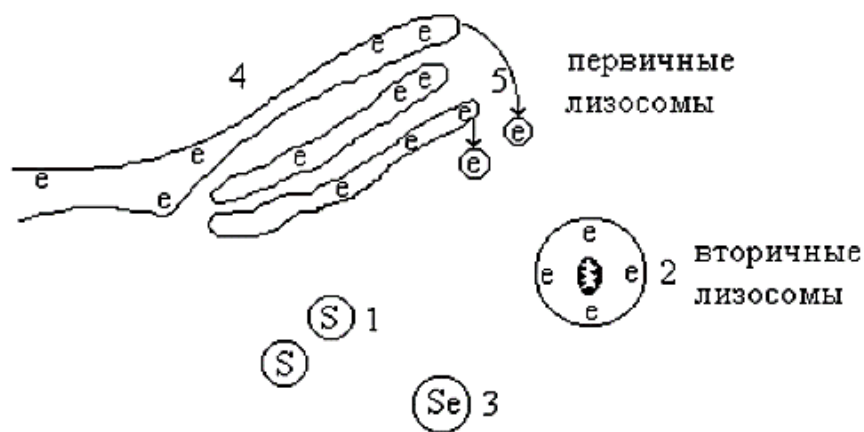
Кроме того, выделяют прелизосомы, к которым относятся пиноцитарные пузырьки, фагоцитарные вакуоли, аутофагосомы, внутри которых содержатся субстраты, но нет лизосомальных ферментов. Общим для клеток является постоянный обмен лизосомальной системы.

Синтез гидролитических ферментов лизосом осуществляется рибосомами шероховатого ЭПР. Далее ферменты транспортируются в цистерны ЭПР, где к ним присоединяются углеводные компоненты с конечным звеном N-ацетилнейраминовой кислоты или фукозы. В аппарате Гольджи, куда транспортируются ферменты, происходит упаковка ферментов в липопротеиновую мембрану и отшнуровка первичных лизосом. Первичные лизосомы легко сливаются с другими, а иногда и с плазматической мембраной. Структуры, образующиеся при слиянии первичных лизосом с другими структурами, являются вторичными лизосомами. Они отличаются от первичных тем, что в них обязательно содержатся субстраты внелизосомного происхождения. Вторичные лизосомы обладают такой же способностью к слиянию с другими везикулами, как и первичные (рис. 28).

Следовательно, все лизосомы; фактически связаны друг с другом посредством процесса слияния и, потому любые новые частицы, попавшие в лизосому, быстро распространяются по системе лизосом.

В нормальной спокойной клетке лизосом мало, в основном это первичные лизосомы. Однако, в процессе аутофагии и эндоцитоза образуется большое количество вторичных лизосом. В результате образуются гетерофагосомы и аутофагосомы:

- **гетерофагосомы** – пузырьки с материалом, образуются при эндоцитозе, в результате слияния с первичной лизосомой. В момент слияния активируются ферменты лизосом;
- **аутофагосомы** – содержат эндогенный материал самой клетки.



- 1 - прелизосомы 4 - ЭПР
 2 - аутолизосомы 5 - аппарат Гольджи
 3 - гетерофагосома
 S - субстрат, подвергаемый гидролизу
 e - ферменты лизосом

Рис. 28. Типы лизосом

ФУНКЦИИ ЛИЗОСОМ

Основная функция лизосом – катаболическая, которая связана с процессом кислого гидролиза. Она осуществляется путем эндоцитоза, аутофагии и экзоцитоза.

Эндоцитоз – процесс, посредством которого внеклеточные компоненты попадают внутрь клетки в виде включений в пузырьки, образованные плазматической мембраной. Эндоцитоз подразделяется на фагоцитоз и пиноцитоз. В случае фагоцитоза клетка поглощает в основном твердые частицы, например, бактерии, при этом образуются фагосомы. При пиноцитозе происходит поглощение мелких коллоидных частиц, а также веществ, связывающихся с рецепторами плазматической мембраны. Образуются пиноцитарные пузырьки.

Аутофагия – процесс распада внутриклеточных структур. В классическом случае остатки внутриклеточных органелл оказывается окруженными одной или двумя мембранами, отделившимися от ЭПР. Образовавшаяся вакуоль сливается с лизосомами, а содержащаяся в ней структура подвергается перевариванию. Возможна также аутофагия самих лизосом, протекающая следующим образом: сначала происходит инвагинация лизосомальной мембраны, в результате формируется лизосома, в которой содержится внутренняя мембрана, окруженная наружной.

Экзоцитоз. Клетки некоторых типов способны выделять лизосомальные ферменты, при этом лизосомная система теряет часть сво-

их мембран вследствие их слияния с плазматической мембраной клетки. В экзоцитозе участвуют фагоцитирующие лейкоциты, скапливающиеся в участках инфицирования. Нейтрофильные лейкоциты реагируют на присутствие инородных частиц или на иммунологические стимулы очень быстрым выделением значительной части содержащихся в них лизосомальных ферментов. В отличие от нейтрофилов моноциты, которые скапливаясь в участках инфицирования, превращаются в макрофаги, могут секретировать лизосомальные ферменты в течение очень длительного времени. Из ферментов, секретлируемых макрофагами, значительный процент составляют нейтральные протеиназы, гликозидазы, фосфомоноэстеразы.

Следует также рассмотреть физиологическую роль лизосом в организме. В этом плане необходимо подчеркнуть следующие процессы с участием лизосом.

1. ПОГЛОЩЕНИЕ И ПЕРЕВАРИВАНИЕ БИОПОЛИМЕРОВ

Основной процесс, происходящий в лизосомах, состоит в гидролитическом превращении высокомолекулярных соединений, поступающих в клетку извне и формирующих внутриклеточные структуры. Лизосомы, следовательно, выполняют функции внутриклеточного пищеварения. В норме обычно количество экзогенных и эндогенных веществ, подвергаемых перевариванию невелико, но оно резко увеличивается, когда клетка нуждается в пластическом и энергетическом материале. Процессы эндогенного питания усиливаются при репарации и регенерации тканей, действии экстремальных физических нагрузок, при беременности. Путь эндогенного питания включается клеткой при голодании, когда происходит резкое угнетение биосинтетических процессов и активация катаболизма. При голодании происходит активация процессов аутофагии, резко увеличивается активность катепсинов, арилсульфатаз А и В и группы гликозидаз, как в первичных, так и во вторичных лизосомах.

Заслуживает внимания реконструктивная функция лизосом, связанная с процессом молекулярного обновления клетки. Каждая составная часть клетки имеет свою собственную продолжительность жизни. Молекулы белка, например, в зависимости от их структуры живут от нескольких часов до нескольких дней. То же характерно для большинства других клеточных компонентов, за исключением ДНК, которая полностью не заменяется. Возможность замены молекул необходима для того, чтобы клетка оставалась неповрежденной. Лизосомы участвуют в переваривании не только отдельных молекул,

подвергаемых замене, но и целых участков цитоплазмы, митохондрий, фрагментов мембран, отделившихся от эндоплазматического ретикулума.

Лизосомы участвуют в регуляции уровня секреции гормонов гипофиза и щитовидной железы. В аденогипофизе осуществляется синтез пептидных гормонов: кортикотропного, тиреотропного, фолликулостимулирующего, лютеинизирующего, соматотропного гормонов, пролактина. Основной функцией лизосом клеток аденогипофиза является удаление излишних количеств синтезированных гормонов. Процесс переваривания секреторных гранул называется кринофагией, который заключается в поглощении части секреторных гранул при их избытке или в отсутствие стимула.

В фолликулах щитовидной железы накапливается тиреоглобулин, предшественник тироксина и трийодтиронина. Образование этих гормонов щитовидной железы происходит при участии лизосом эпителиальных клеток фолликулов. Тиреоглобулин поступает в эпителиальные клетки путем эндоцитоза, связывается с первичными лизосомами, в них тиреоглобулин подвергается гидролизу, при этом образуются тироксин и трийодтиронин, они диффундируют через мембрану эпителиальных клеток фолликула и поступают в кровоток. Белковая часть тиреоглобулина под действием лизосомальных протеиназ подвергается гидролизу до аминокислот.

2. ЗАЩИТНАЯ ФУНКЦИЯ ЛИЗОСОМ заключается, прежде всего, в лизисе микроорганизмов и вирусов. Наиболее активны в обезвреживании бактерий макрофаги, активность лизосомальных ферментов которых в несколько раз выше, чем у паренхиматозных клеток. В экскреции лизосомальных ферментов решающая роль принадлежит триггерной функции мембранных рецепторов. Стимулами для выделения лизосомальных гидролаз макрофагами являются как бактерии, так и полисахарид зимозан, иммунные комплексы, продукты активации лимфоцитов. Если фагоцитируются микроорганизмы, то в макрофагах резко активируются процессы окисления, приводящие к появлению H_2O_2 , $O_2^{\bullet-}$ и O_2 , которые разрушают микробные тельца. В других случаях макромолекулы фагоцитированной частицы распадаются на более простые компоненты (аминокислоты, моносахариды, жирные кислоты), которые после их резорбции клеткой используются в процессе метаболизма.

Активация внутриклеточных процессов, происходящая под действием гидролитических ферментов, может приводить к изменению

функционального состояния иммунокомпетентных клеток. Протеолитические ферменты (катепсин D, трипсин, проназа) способны индуцировать бласттрансформацию, синтез ДНК, вызывать экспрессию некоторых аллоантигенов, увеличивая их антигенность. Активация лимфоцитов под действием протеиназ может осуществляться несколькими путями: 1) с помощью ограниченного протеолиза рецепторных молекул иммунокомпетентных клеток и «раскрытия» рецепторов, находящихся в скрытом состоянии; 2) через активацию протеинкиназ (например, Ca^{2+} -зависимая протеиназа активирует протеинкиназу C) и воздействия на клеточный метаболизм; 3) через продукты протеолиза (например, брадикинин, являясь продуктом активации кининовой системы стимулирует деление лимфоцитов путем увеличения активности мембранных ферментов и образования внутриклеточных эффекторов, таких как цАМФ, ионы Ca^{2+} , аденозин).

Участие лизосом в иммунном ответе может проявляться в расщеплении антигенов при участии гидролитических ферментов. После образования комплекса антиген–антитело лизосомы могут участвовать в расщеплении комплекса, защищая ткань от его патологического воздействия.

Таким образом, защитная функция лизосом многогранна. Они могут непосредственно участвовать в лизисе чужеродного материала путем секреции гидролитических ферментов, а также стимулировать различные механизмы иммунитета.

РЕАКЦИИ ЛИЗОСОМ ПРИ АДАПТАЦИИ

Переход организма в состояние повышенного функционального перенапряжения приводит к активации лизосомального аппарата. При стрессе увеличивается количество вторичных лизосом, происходит активация гидролитических ферментов, усиливаются процессы гетеро- и аутофагоцитоза. При действии на организм стрессорных факторов умеренной интенсивности происходит активация лизосомальных ферментов без повреждения структуры лизосом. До определенного момента эти изменения носят адаптивный характер и не приводят к повреждению клетки. Однако, с увеличением силы или длительности воздействия отмечаются нарушения структуры лизосомальных мембран и выход кислых гидролаз в цитоплазму с последующим развитием цитолитических процессов и повреждением тканей.

Увеличение продукции глюкокортикоидов при стрессе сопровождается усилением катаболических процессов в мышечной, лим-

фоидной, жировой тканях. В печени, напротив, происходит активация метаболических процессов, наблюдается увеличение активности ферментов, таких как тирозинаминотрасфераза и триптофанпирролаза. Индукция этих ферментов под влиянием глюкокортикоидов обусловлена усилением их синтеза и увеличением количества. С прекращением действия глюкокортикоидов эти ферменты подвергаются деградации в лизосомах при участии катепсинов.

Известно, что в адаптивную реакцию включаются процессы пролиферации и внутриклеточной регенерации. Важный вклад в активацию пролиферативных процессов вносят лизосомы. На ранних стадиях стимуляции деления клеток количество лизосом увеличивается, они начинают группироваться вокруг ядра. Под влиянием лизосомальных протеиназ происходит разрыхление ядерной мембраны, вследствие чего лизосомальные ферменты попадают в ядро. В лизосомах были найдены протеиназы, активные при pH 7,0, которые способны расщеплять гистоны, вызывать дерепрессию хроматина, стимулировать синтез ДНК и белка.

ФЕРМЕНТЫ ЛИЗОСОМ

Первоначально общий план строения лизосом представляли достаточно примитивно. Полагали, что лизосомы состоят из несодержащих ферменты фосфолипидных мембран, окружающих лизосомальный матрикс, представляющий раствор кислых гидролаз. Де Дюв сравнивал лизосомы с мешками, заполненными ферментами. Предназначение лизосом видели в осуществлении аутолиза поврежденных клеток и называли их «оружием самоубийства клеток». Более глубокие исследования, проведенные в последующий период, позволили получить ряд фактов, существенно изменяющих первоначальное представление о лизосомах. К их числу следует отнести:

- 1) открытие новых лизосомальных ферментов. На схеме де Дюва в 1955 г. к числу лизосомальных были отнесены лишь 5 ферментов: кислая фосфатаза, ДНК-аза, РНК-аза, катепсины и β -глюкуронидаза. В настоящее время их известно около ста;
- 2) обнаружение ферментной гетерогенности лизосом;
- 3) выявление ферментов, связанных с лизосомальной мембраной;
- 4) обнаружение изоферментов (например, кислой фосфатазы).

Ферментный комплекс лизосом хорошо адаптирован к задачам расщепления большинства сложных веществ и биополимеров, встречающихся в организме, включая белки, пептиды, нуклеиновые кисло-

ты, пирофосфатные соединения, полисахариды, олигосахариды, триглицериды, фосфатиды, сфингомиелины, эфиры холестерина. Общее свойство лизосомальных ферментов – достаточно низкое значение оптимальных рН, при которых они проявляют максимальную активность. Характерно, что большая часть ферментных белков в составе лизосом (около 80%) находится в растворенном неструктурированном состоянии и только 20% связаны с мембраной. К наиболее изученным ферментам относится кислая фосфатаза, которая считается типичным маркерным ферментом лизосом. Оптимум рН для кислой фосфатазы – 5,2.

В связи с определяющей ролью фосфолипидов в структуре мембран и их выраженным влиянием на активность мембранно-связанных ферментов особого внимания заслуживает рассмотрение лизосомальных фосфолипаз. Отличительной особенностью лизосомальных фосфолипаз является низкие значения оптимума рН (4,2–4,5), в связи с чем их активность в 40 раз превышает активность митохондриальной и микросомальной фосфолипаз. Имеются также липазы, расщепляющие триглицериды и лизосомальная гидролаза, расщепляющая эфиры холестерина (холестеролэстераза).

Кислые нуклеазы (ДНК-азы и РНК-азы) обладают малой специфичностью. Однако, по механизму действия ДНК-аза II локализованная в лизосомах, сильно отличается от ДНК-азы I панкреатического сока. Лизосомальный фермент был назван диплотомическим (расщепляет обе нити спирали ДНК), в отличие от гаплотомического действия панкреатической ДНК-азы, ведущей гидролиз одной нити.

Гиалуронидаза расщепляет $\beta(1 \rightarrow 4)$ – N-ацетилглюкозамидные связи в гиалуроновой кислоте (рН 3,5 – 4,1), нейраминидаза расщепляет α -гликозидные связи (1 \rightarrow 2) сиаловой кислоты в составе гликолипидов. Эти ферменты имеются во многих тканях: печени, почках, селезенке, легких. В лизосомах представлена группа β -гликозидаз, гетерогенно распределенных между фракциями первичных и вторичных лизосом. Среди этих ферментов наиболее прочно связаны с лизосомальной мембраной: β -ксилозидаза, β -глюкозидаза, β -цетилглюкозаминидаза. Известно, что при взаимодействии с аутофагосомой в первую очередь активируются мембранные ферменты, а затем ферменты матрикса, которые гидролизуют субстрат.

К протеиназам лизосом относится группа ферментов со специфическим названием – катепсины (А, В, С, D, Е), отличающихся по субстратной специфичности. Наиболее хорошо изучен катепсин D,

который является маркерным ферментом деградации белков в лизосомах. Особенность катепсина D, по сравнению с другими, заключается в том, что он не взаимодействует с субстратами, имеющими низкую молекулярную массу и обладает специфичностью по отношению к гемоглобину. Катепсин D расщепляет белки до пептидов при pH 3,0–3,5. Для катепсина D не обнаружено внутриклеточных ингибиторов и активаторов.

АУТОФАГИЯ

Термин «аутофагия» для способа доставки цитоплазматического материала клетки в лизосомы с целью последующей деградации ввел в 1963 г. бельгийский биохимик Кристиан де Дюв, первооткрыватель лизосом. Лизосомы – это клеточные органеллы, содержащие множество гидролитических ферментов, работающих в кислой среде. Впоследствии было обнаружено, что в процессе аутофагии в цитоплазме сначала образуются аутофагосомы – пузырьки, окруженные двухслойной мембраной, содержащие часть цитоплазмы и клеточные органеллы (митохондрии, рибосомы, фрагменты эндоплазматического ретикулума). Аутофагосомы далее сливаются с лизосомами, в образовавшихся при этом аутолизосомах происходит деградация макромолекул и органелл в результате действия лизосомных ферментов – гидролаз. Де Дюв получил Нобелевскую премию в 1974 г. «за открытия, касающиеся структурной и функциональной организации клетки».

Аутофагия является естественным, регулируемым механизмом клетки, который разбирает ненужные или дисфункциональные компоненты. При аутофагическом типе клеточной гибели все органеллы клетки перевариваются, оставляя лишь клеточный дебрис, который поглощается макрофагами.

Различают три типа аутофагии: микроаутофагию, макроаутофагию и шапероновую аутофагию.

При микроаутофагии макромолекулы и обломки клеточных мембран просто захватываются лизосомой. Таким путём клетка может переваривать белки при нехватке энергии или строительного материала (например, при голодании). Но процессы микроаутофагии происходят и при нормальных условиях и в целом неизбежны.

При макроаутофагии участок цитоплазмы (часто содержащий какие-либо органоиды) окружается мембранным компартментом, похожим на цистерну эндоплазматической сети. В результате этот уча-

сток отделяется от остальной цитоплазмы двумя мембранами. Такие двухмембранные органеллы, окружающие удаляемые органеллы и цитоплазму, называются аутофагосомы. Аутофагосомы соединяются с лизосомами, образуя аутофаголизосомы, в которых органеллы и остальное содержимое аутофагосом перевариваются.

Третий тип аутофагии – шапероновая. При этом способе происходит направленный транспорт частично денатурировавших белков из цитоплазмы сквозь мембрану лизосомы в её полость, где они перевариваются. Этот тип аутофагии, описанный только для млекопитающих, индуцируется стрессом (например, при голодании или физических нагрузках).

Аутофагия подразделяется на селективную и неселективную. Неселективная аутофагия происходит постоянно, в основном она индуцируется стрессом, в частности голодом. Селективная аутофагия специфических классов субстрата – протеиновых агрегатов, цитоплазматических органелл, вирусов и бактерий, включает специфические адапторы, распознающие субстрат и присоединяющие его к ATG-8/LC3, расположенному на мембране аутофагосомы.

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ, ВОВЛЕЧЕННЫЕ В РАЗВИТИЕ АУТОФАГИИ

Активация аутофагии, в целом, происходит как при участии mTOR-зависимых сигнальных путей, так и каскадов, не связанных с mTOR. Развитие явления «самопоедания» клетки опосредовано комплексом Atg белков, в которые входят ULK1 (Serine/threonine-proteinkinase ULK1), Atg13, Atg17, способные интегрировать сигналы, получаемые от протеинкиназы mTOR в комплексе mTORC1. В формировании аутофагосомы различают этапы инициации, элонгации и завершения синтеза мембраны аутофагосом. Дефосфорилирование ULK1 и ATG13 сопровождается ингибированием комплекса mTORC1, что приводит к запуску данного процесса с активацией вакуолеобразующего белка Vps34 (vacuolar sorting protein 34) с Beclin 1 (белком аутофагосом). В дальнейшем, это явление продолжается ростом мембраны за счет образования ковалентного комплекса из убиквитиноподобных белков Atg12 и Atg5, а также Atg16, катализирующего модификацию белка LC3 (cytosolic-associated protein light chain 3) фосфатидилэтаноламином (таким образом, LC3 переходит в мембранно-связанную форму LC3-II). LC3-II встраивается в мембрану при участии Atg7 и Atg3. Созданный комплекс сопровождает даль-

нейшее созревание аутофагосомы до ее слияния с лизосомой, являясь маркером аутофагии. Завершается процесс смыканием краев фагофоры с образованием аутофагосомы, ограниченной двуслойной мембраной. Финальным событием процесса аутофагии является слияние аутофагосомы с лизосомой с образованием аутолизосомы, что требует участия малых ГТФаз Rab и лизосом-ассоциированного белка (LAMP2).

Существует несколько подходов к регуляции данного явления. Известны вещества, способные модифицировать активность процесса аутофагии. К ним относят целый ряд веществ, снижающих активность процесса аутофагии, однако обладающих низкой специфичностью. Подробное описание представлено в обзоре Pasquier V. и соавторов (2016). Одни из них способны снижать активность внутриклеточных сигнальных каскадов, а также влиять на процессы инициации данного явления, другие – влияют на функции лизосом. Соединения 3-метиладенин, вортманин, LY294002, PT210, GSK-2126458 регулируют активность фосфатидил-инозитол-3-киназы (PI3K). Известен низкомолекулярный ингибитор аутофагии спаутин-1 (spautin-1), ингибирующий пептидазы USP10 и USP13, расщепляющие Beclin-1, что приводит к разрушению комплекса Vps34. Аналогично ему действуют SAR405, compound 31, VPS34-INI, PIK-III. Активность ULK связана со следующими ингибиторами: compound 6, MRT68921, SBI-0206965. На лизосомы влияют кломипрамин, лукантон, хлорохин, гидроксихлорохин, Lys05, ARN5187.

Активаторами аутофагии являются следующие вещества: BRD5631, сперминидин, трехалоза, а также витамин Д3 и другие. Считается, что их действие сопряжено с активацией иммунной системы за счет изменения состояния АКТ/mTOR сигнального пути. Yun S. и соавторы также подробно описали влияние рапамицина и его аналогов, метформина, обатоклакса (GX15-070), линзинина, а также мапротилина и флуоксетина в гибели трансформированных клеток за счет активации аутофагии.

Регуляция аутофагии связана с комплексом молекулярных каскадов. Центральное место в этом занимает протеинкиназа mTOR, входящая в состав сигнального комплекса mTORC1 и влияющая на биосинтез белка. К компонентам сигнальных каскадов значение относят регулирующую энергетическое обеспечение клетки 5'АМФ-активируемую протеинкиназу (АМПК); регулирующие пролиферацию и выживаемость клеток митоген-активированные киназы

(MAPK), JNK (c-Jun N-terminalkinase), ERK (extracellular signal-regulated kinase), p38, а также JAK-STAT, WNT/ β -catenin.

РОЛЬ ЛИЗОСОМ В ПАТОЛОГИИ

Участие лизосом в развитии патологических процессов рассматривается в двух аспектах:

1) в плане развития общих патологических процессов, таких как воспаление, некроз, гипоксия, и голод. Во всех этих процессах вовлечение лизосом носит вторичный характер;

2) в плане нарушения структуры самих лизосом, дефицита лизосомальных ферментов. В этих случаях повреждения лизосом бывают первичными и являются пусковыми механизмами в развитии патологических реакций.

Участие лизосом в воспалении связано с гиперфункцией лизосом. Существование этой функции лизосомального аппарата было предсказано задолго до их открытия великим русским ученым И.И. Мечниковым. Представления об участии в воспалении особых ферментных тел – цитаз, полностью подтвердились после открытия лизосом. Сейчас можно с уверенностью сказать, что явления воспаления, где бы они не возникали, сопровождаются защитной реакцией макрофагов, практически всегда связанной с активацией лизосомального аппарата и входящего в его состав комплекса кислых гидролаз. Лизосомы при воспалении поглощают попадающие во внутреннюю среду организма чужеродные белки, полисахариды, липиды и расщепляют их до составных компонентов. Кроме того, они активно участвуют в ликвидации аварийных состояний при травматических повреждениях, осуществляя процессы ферментной очистки ран от утративших свое значение некротизированных фрагментов тканей.

Из патологических состояний, связанных с повреждением лизосомальных мембран, наиболее изучены болезни суставов. Предполагают, что в патогенезе воспалительных реакций при таких заболеваниях суставов как острый артрит, ревматизм, подагра, важная роль принадлежит комплексу освобождающихся лизосомальных ферментов, участвующих в деградации гликозамингликанов и протеогликанов. В эксперименте было показано, что очищенная фракция лизосом лейкоцитов при инъекциях в область суставов и кожу, способна вызывать острые воспалительные реакции. Основной воспалительный процесс при этом связан с активацией кислых протеаз, типа катепси-

на D, глюкуронидазы, коллагеназы, способных разрушать гликопротеиновые структуры хряща.

АПЛАСТИЧЕСКИЙ ТИП ПОВРЕЖДЕНИЯ КЛЕТОК

Повреждение лизосомальных мембран и усиление процессов аутофагии являются основными процессами, характерными для апластического (лизосомального) типа повреждения клеток. Активация лизосом наблюдается при некрозе, гипоксических состояниях, воспалении, когда происходит снижение рН среды и выход гидролитических ферментов в клетку. Такой эффект ярко проявляется при действии афлатоксинов на клетку. Афлатоксины способны избирательно повреждать мембраны лизосом, вызывая резкое усиление активности лизосомальных ферментов. Предполагается, что активированные лизосомальные гидролазы нарушают структуру ядерной мембраны, вызывают дезорганизацию метаболических процессов, приводящую к повреждению генома клетки и, как следствие, к появлению канцерогенных эффектов.

Другие химические канцерогены и коканцерогены: пестициды, фосфорорганические соединения, нитрозометилмочевина, анилин, также вызывают высвобождение и активацию кислых гидролитических ферментов лизосом. В любом из этих случаев повреждение лизосом и высвобождение их ферментов приводит к дезорганизации метаболизма клеток.

ЛИЗОСОМНЫЕ БОЛЕЗНИ НАКОПЛЕНИЯ

Значение лизосомальных ферментов в расщеплении большого количества субстратов отчетливо проявляется при болезнях накопления, когда генетически обусловленная недостаточность всего лишь одного из этих ферментов вызывает тяжелые расстройства, обычно приводящие к смерти в раннем возрасте. При такой ферментной недостаточности лизосомы теряют способность расщеплять определенные субстраты, которые и накапливаются в них. Отличительный признак этих болезней – образование в клетках множества вакуолей, которые придают им пенистый вид. Большинство лизосомных болезней передаются по аутосомнорецессивному типу наследования и поэтому у супругов с отягощенной наследственностью при каждой беременности риск рождения больного ребенка составляет 25%. Лизосомные болезни пока неизлечимы, в связи с этим важно предотвратить рождение больного ребенка, диагностировать болезнь у плода.

Характерные симптомы болезней накопления: задержка психического развития, неврологические нарушения, повышение сухожильных рефлексов, судороги, атаксия, а также дефекты зрения (помутнение роговицы и катаракта, изменения глазного дна типа «вишневой косточки»), патология слуха, костей, миокарда, гепатоспленомегалии. Некоторые симптомы и их сочетания типичны для определенных болезней. Так, гепатоспленомегалия и характерные клетки в пунктате костного мозга обычны при болезни Гоше, «пенистые клетки» – при болезни Нимана–Пика, изменение черт лица и аномалии костной системы бывают при мукополисахаридозах, выделение с мочой маннозосодержащих олигосахаридов характерно для маннозидоза. Точный диагноз лизосомного заболевания может быть поставлен только при выявлении ферментного дефекта.

Лизосомные болезни стали известны с 60-х годов, хотя клиническое описание известно с 1981 г., когда Тей (англичанин) и Сакс (американец) описали детей с нарушением интеллекта, признаками изменения глазного дна типа «вишневой косточки». Впоследствии стало известно, что болезнь Тея–Сакса связана с отсутствием гексозаминидазы А и накоплением ганглиозидов. Симптомы болезни Тея–Сакса обычно проявляются у ребенка в возрасте до одного года. К характерным ранним симптомам относятся слабость, отставание в развитии, затруднения при кормлении. Через несколько месяцев наступает слепота, на сетчатке видны отчетливые вишнево-красные пятна. Летальный исход обычно наступает до 3-х лет.

Бельгийский ученый Херс из Лувенского университета впервые ввел термин и описал характерные признаки болезней накопления в 1962 г. Он показал, что накопление гликогена при гликогенозе связано с отсутствием кислой α -гликозидазы в лизосомах печени.

Лизосомные болезни классифицируют по продуктам накопления: гликолипидозы; гликопротеинозы; мукополисахаридозы. Имеются также другие классификации, основанные на названиях продуктов накопления (гликогенозы), или на названиях отсутствующих ферментов (гликозидозы). До сих пор не известны болезни накопления, при которых наблюдалась бы недостаточность протеиназ и в лизосомах накапливались бы белки. Это объясняется, по-видимому тем, что такое состояние приводит к смерти плода, тогда как при других болезнях накопления смертельный исход наступает позже, в детском возрасте.

Гликолипидозы. Чаще всего такие болезни связаны с дефектом гликозидаз, ферментов, расщепляющих гетерополисахариды. Известно несколько десятков гликозидаз, гидролизующих разные гликозидные связи в гетерополисахаридах.

Гликолипидозы часто проявляются с первых недель жизни и обычно связаны с резким нарушением развития ребенка. Например, болезнь Гоше поражает, прежде всего, клетки костного мозга и селезенки, печени. При недостаточности фермента в клетках центральной нервной системы болезнь может иметь смертельный исход. Болезнь Краббе является нейродегенеративным заболеванием, при котором в детстве повреждаются клетки центральной нервной системы, что приводит к глухоте, слепоте и к смерти в течение двух лет.

Гликопротеинозы. К этим заболеваниям относятся фукозидоз, связанный с недостаточностью фукозидазы, и маннозидоз, зависящий от дефицита маннозидазы. Расстройства гликопротеинового обмена проявляются в повреждении фрагментов гликопротеинов. Известен случай, когда при α -фукозидозе отсутствовала терморегуляция и больной 15 лет жил в кондиционируемом помещении.

Мукополисахаридозы связаны с повышением количества гликозамингликанов в моче, слюне (ранее гликозамингликаны назывались мукополисахаридами). Мукополисахаридозы – тяжелые заболевания, проявляющиеся в резком нарушении развития ребенка и уменьшении продолжительности жизни. Сюда относятся болезни Хюрлера, Хюнтера, связанные с дефицитом идуронидазы и идуронатсульфатазы, соответственно. Дети с синдромом Хюрлера рождаются без внешних изменений, иногда с большой массой тела. В первые месяцы жизни черты лица становятся грубыми, характерны: запавшая переносица, помутнение роговицы, гепатоспленомегалия. Позже появляются признаки поражения сердца, шум, кардиомегалия. Развиваются глухота, слепота.

При I-клеточной болезни наблюдается множественная ферментная недостаточность. Это нарушение функции лизосом характеризуется сильной задержкой психомоторного развития и деформацией скелета. Лизосомы в соединительной ткани больных содержат крупные включения (inclusion – включение) непереваренных гликозамингликанов и гликолипидов. Наличие этих включений обусловлено отсутствием в лизосомах больных по меньшей мере восьми ферментов, необходимых для их расщепления. В то же время огромные количества этих ферментов обнаруживаются в моче и крови больных. Сле-

довательно, синтез активных ферментов при болезни I-клеток происходит, но вместо того, чтобы находиться в лизосомах, они экспортируются из клетки.

РОЛЬ АУТОФАГИИ В РАЗВИТИИ ПАТОЛОГИЧЕСКИХ СОСТОЯНИЙ ЧЕЛОВЕКА

«Самопоедание» является естественным механизмом клетки, позволяющим ей избавляться от ненужных или аномальных белков, органелл. Ключевыми индукторами процессов аутофагии в клетках являются: дефицит питательных веществ, повреждение внутриклеточных органелл, частичная денатурация белков. Кроме того, молекулярные механизмы «самопоедания» клеток могут провоцироваться окислительным или токсическим стрессом, что, в большей степени, связано с влиянием противоопухолевой терапии. Роль аутофагии отмечена при развитии злокачественных новообразований на всех этапах онкогенеза: от инициации до опухолевой прогрессии и исхода. Центральную роль в развитии аутофагии играет протеинкиназа mTOR в составе комплекса TORC1, которая, будучи перекрестом значимых сигнальных каскадов, регулирует важнейшие клеточные процессы, а именно пролиферацию и гибель клеток.

АУТОФАГИЯ И РАЗВИТИЕ БОЛЕЗНЕЙ, АССОЦИИРОВАННЫХ СО СТАРЕНИЕМ

В большинстве случаев, аутофагия способствует выживанию клеток путем адаптации клеток к условиям стресса. Метаболически обусловленное накопление поврежденных митохондрий и агрегатов окисленных белков при старении и при патологиях говорит о дисбалансе между действием протеотоксических факторов и протеолитических путей, уничтожающими поврежденные органеллы и белковые агрегаты. Аутофагия является главным механизмом деградации, при котором аутофагосомы поглощают поврежденные компоненты клетки и способствуют их деградации посредством слияния с лизосомами, содержащими гидралазу.

Однако, аутофагия может сопровождать смерть клетки с формированием аутофаговых вакуолей. В самом деле, отношения между аутофагией и апоптозом являются сложными, и именно то, что определяет, погибнет ли клетка путем апоптоза или по другому механизму по-прежнему остаётся неясным. В некоторых клеточных системах, аутофагия является единственным механизмом гибели, действуя в

качестве резервного механизма исполнение смертного приговора, когда апоптоз в клетке просто заингибирован. И, наоборот, если в процессе клеточного голодания заблокировать процесс аутофагии (например, при помощи малых интерферирующих РНК), то инициируется программа апоптоза.

В стареющих и постмитотических клетках, аутофагия служит в качестве механизма адаптации к стрессу. Было показано, что аутофагосомы накапливаются в стареющих фибробластах в целях содействия обновлению веществ цитоплазмы и её органелл. Точно также в кардиомиоцитах, оптимальное функционирование митохондрий зависит от макро-аутофагии. Работа одного типа аутофагии – СМА снижается с возрастом, что увеличивает риск дегенерации нейронов, связанный с накоплением подверженных к агрегации мутантных белков. Следует отметить, что нейродегенеративные заболевания, связанные с возрастом, имеют схожие характеристики с патологиями, вызванных нокаутом генов, связанных с аутофагией (atg) в головном мозге, такими как накопление убиквитинированных белков и телец включения в цитоплазме, увеличение апоптоза в нейронах, и постепенная потеря нейрональных клеток. Недостаток питательных веществ является наиболее часто используемым способом индуцирования аутофагии в культивируемых клетках, и действительно аутофагия это механизм, с помощью которого одноклеточные организмы (например, дрожжевые клетки), а также клетки млекопитающих могут адаптироваться к истощающимся ресурсам. В ходе деградации макромолекул высвобождается АТФ, что позволяет скомпенсировать отсутствие внешних источников питания. Важно отметить, что эта способность аутофагии может участвовать в продлении жизни организма за счёт ограничения в калорийности питания. Голодание или диетическое ограничение являются одним из сильнейших стимулов для запуска аутофагии по всему организму у мышей и нематод *C. Elegans*.

В интересном исследовании было показано, что выключение atg генов в *C. Elegans* отменили эффекты противостарения, которые наблюдались у особей в ходе ограничения калорий. Точный механизм, посредством которого аутофагия уменьшает старение, далеко не ясен. Тем не менее, можно предположить, что регулярное обновление цитоплазматических структур и молекул «очищает» и тем самым омолаживает клетки. Кроме того, аутофагия играет важную роль в поддержании стабильности генома посредством механизмов, которые еще не изучены. Таким образом, общее увеличение уровня ауто-

фагии может помочь избежать долгосрочных последствий повреждений ДНК, гипотеза, которая требует дальнейшего изучения. Аутофагия важна для нормальной физиологии клеток и организма, а как увеличение, так и уменьшение аутофагии связано с отклонением от состояния нормального течения гомеостатических процессов. В частности, интенсивность течения аутофагии меняется в процессе старения клеток и организма. Есть предположения, что аутофагия защищает от возраст-ассоциированных болезней, таких как диабет типа 2 или метаболический синдром, нейродегенеративные расстройства, типа болезни Альцгеймера, болезни Паркинсона или болезни Хантингтона, иммунных/воспалительных заболеваний, и наконец, от рака, опосредуя свое влияние через как врожденные, так и адаптивные иммунные ответы.

Соответственно, есть основания полагать, что модуляция аутофагии может иметь терапевтический потенциал при таких нарушениях и состояниях. В то же время если, как признано, аутофагия полноценно регулирует клеточный гомеостаз во время развития и в молодости, то появляется все больше свидетельств того, что аутофагия становится дисфункциональной в позднем возрасте. Так, результаты работ на *Caenorhabditiselegans* даже дают основания предполагать, что дисфункциональная аутофагия в позднем возрасте имеет пагубные последствия, которые и приводят собственно к процессу ускорения старения. Другие исследования связывают повышенную аутофагию с долголетием и отсутствием возраст ассоциированных болезней. Нобелевская премия профессору Yoshinori Ohsumi в 2016 году за работу по пониманию механизмов аутофагии подчеркивает признание этого процесса для физиологии и медицины. Действительно, преднамеренное манипулирование аутофагами (стимуляция и подавление), было предложено для многих различных заболеваний, а продолжающиеся клинические испытания (более 50 клинических исследований) в основном сосредоточены на попытке воздействия на аутофагию при лечении рака. Кроме того, известно, что многие из препаратов, которые используются в современной фармакотерапии, могут влиять на аутофагию, индуцируя или ингибируя течение аутофагии.

ГОЛОДАНИЕ И АУТОФАГИЯ

Аутофагия – процесс утилизации клеточных органелл и макромолекул. У млекопитающих аутофагия наблюдается во многих физиологических процессах: избавлении от долгоживущих белков и по-

врежденных органелл, реакции на голодание, контролировании роста клетки, процессах врожденного иммунитета и защите от старения. Недостаток питательных веществ (голодание) является универсальным и наиболее быстрым активатором аутофагии.

Аутофагия является важным катаболическим процессом, индуцируемым для обеспечения клеточных источников энергии в ответ на ограничение питательных веществ посредством активации киназ, таких как АМР-активируемая протеинкиназа (АМПК) и ULK1. Считается, что недостаток глюкозы может инициировать аутофагию.

mTOR, рапамицин чувствительная киназа mTOR, также известная как мишень рапамицина для млекопитающих, играет решающую роль в поддержании баланса между клеточным анаболизмом и катаболизмом. Комплекс mTOR 1 (mTORC1) был представлен как главный регулятор аутофагии, поскольку ингибирование mTORC1 требовалось для инициации процесса аутофагии. В последние годы появились данные, указывающие на то, что mTORC1 также непосредственно регулирует последующие этапы процесса аутофагии, включая зарождение, удлинение аутофагосом, созревание и прекращение аутофагосом. Путем фосфорилирования выбранных белков-мишеней основного механизма аутофагии и/или их регуляторов mTORC1 может изменять их функции, усиливая их.

ГИПОКСИЯ И АУТОФАГИЯ

Неспецифическая аутофагия активируется в ответ на голодание или гипоксию и захватывает широкий спектр внутриклеточных компонентов. В последнее время предпринимаются усилия для выяснения взаимосвязи между аутофагией, вызванной гипоксией, и метаболизмом раковых клеток. Хотя были идентифицированы новые типы селективной аутофагии, в том числе митофагия, пексофагия, липофагия, эрфагия и нуклеофагия, среди прочих, их потенциальная связь с механизмами реакции на гипоксию остается недостаточно изученной.

Активация аутофагии облегчает удаление поврежденных клеточных компартментов и переработку компонентов, тем самым способствуя выживанию клеток. Важно отметить, что опухолевые клетки полагаются на аутофагию для поддержки самопролиферации и метастазирования; характеристики, связанные с плохим прогнозом заболевания. Следовательно, более глубокое понимание молекулярных перекрестных помех между механизмами реакции на гипоксию и

аутофагией может дать важную информацию, имеющую отношение к раку и патологиям, связанным с гипоксией.

При многих патологических состояниях, в частности хронических воспалительных заболеваниях легких, легочном фиброзе, хронической дыхательной недостаточности и др., нарушается баланс между потребностью клеток в кислороде и его доставкой, что осложняет течение заболеваний и часто становится потенцирующим фактором их прогрессирования. Дефицит кислорода, конечного акцептора электронов в митохондриальной электронтранспортной дыхательной цепи, приводит к подавлению биоэнергетической функции митохондрий, снижению продукции макроэргических молекул аденозинтрифосфата (АТФ) и нарушению обеспечения энергией многочисленных физиологических процессов. Микроокружение в участках воспаления часто приобретает гипоксический характер (так называемая воспалительная гипоксия). Потребление кислорода возрастает в очагах воспаления из-за высокой метаболической потребности мигрирующих воспалительных клеток (нейтрофилов, моноцитов), локальной клеточной пролиферации и активации экспрессии множества оксигеназ. Патологическая гипоксия может стимулировать дисфункцию ткани и развитие заболевания посредством дисрегуляции иммунных клеток. Недавно стало ясно, что гипоксия, являясь следствием воспаления, в свою очередь, сама может активно воздействовать на воспалительные процессы посредством регуляции чувствительных к кислороду сигнальных путей во множественных подтипах иммунных клеток.

Основным регулятором клеточного ответа на дефицит кислорода считается семейство индуцируемых гипоксией факторов (*hypoxia inducible factors*, HIFs). Открытие HIF-опосредованного молекулярного механизма клеточной адаптации к недостатку кислорода послужило основанием для присуждения трем исследователям (W.G. Kaelin, G.L. Semenza, P.J. Ratcliffe) Нобелевской премии в области физиологии и медицины за 2019 г. Формирование долгосрочной адаптации к недостаточному снабжению клеток кислородом генетически детерминировано и сопряжено с экспрессией специфического белкового фактора HIF, который выполняет функцию активатора транскрипции и ключевого регулятора различных клеточных и системных ответов на гипоксию.

РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Биохимия: учебник для студентов медицинских вузов; под ред. Е.С. Северина. – 5-е изд., испр. и доп. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2009. – 786 с.
2. Кольман, Я. Наглядная биохимия: пер с англ. / Я. Кольман, К.-Г. Рём. – М.: БИНОМ. «Лаборатория знаний», 2011. – 469 с.
3. Литвинова, Н.А. Патогенные точечные мутации митохондриальной ДНК. / Н.А. Литвинова, А.С. Воронкова, В.С. Сухоруков // Российский вестник перинатологии и педиатрии. – 2014. – № 2. – С. 29–34.
4. Нельсон, Д. Основы биохимии Ленинджера: в 3 т.: пер с англ. / Д. Нельсон, М. Кокс. – М.: БИНОМ. «Лаборатория знаний», 2011. – Т.1. – 694 с.
5. Нельсон, Д. Основы биохимии Ленинджера: в 3 т.: пер с англ. / Д. Нельсон, М. Кокс. – М.: БИНОМ. «Лаборатория знаний», 2011. – Т.2. – 636 с.
6. Нельсон, Д. Основы биохимии Ленинджера: в 3 т.: пер с англ. / Д. Нельсон, М. Кокс. – М.: БИНОМ. «Лаборатория знаний», 2011. – Т.3. – 448 с.
7. Стахеева, М.Н. Моноциты при злокачественных новообразованиях: перспективы и точки приложения для диагностики и терапии / М.Р. Патышева [и др.]. // Бюллетень сибирской медицины. – 2019. – №18 (1). – 76–83.
8. Угольник, Т.С. Наследственные митохондриальные заболевания: учеб.-метод. пособие для студентов 3 курса медико-диагностического факультета медицинских вузов / Т.С. Угольник, И.В. Манаенкова. – Гомель, 2012. – 28 с.
9. Gifford V, Itoh Y. MT1-MMP-dependent cell migration: proteolytic and non-proteolytic mechanisms. *Biochem Soc Trans.* 2019 Jun 28;47(3):811-826. doi: 10.1042/BST20180363. Epub 2019 May 7. PMID: 31064864; PMCID: PMC6599156.
10. Gridley T. Notch signaling in vascular development and physiology. *Development.* 2007; 134 (15): 2709–2718.
11. Itoh Y. Membrane-type matrix metalloproteinases: Their functions and regulations. *Matrix Biol.* 2015 May-Jul;44-46:207-23. doi: 10.1016/j.matbio.2015.03.004. Epub 2015 Mar 17. PMID: 25794647.
12. McCaw TR, Inga E, Chen H, Jaskula-Sztul R, Dudeja V, Bibb JA, Ren B, Rose JB. Gamma Secretase Inhibitors in Cancer: A Current Per-

spective on Clinical Performance. *Oncologist*. 2021 Apr;26(4):e608-e621. doi: 10.1002/onco.13627. Epub 2021 Jan 2. PMID: 33284507; PMCID: PMC8018325.

13. Schauer D., P., Reiter C., Jahn N., Zajc P., Buchberger E., Bachleitner-Hofmann T., Bergmann M., Stift A., Gruenberger T., Brostjan C. Intermediate monocytes but not TIE2-expressing monocytes are a sensitive diagnostic indicator for colorectal cancer. *PLoS One*. 2012; 7 (9): e44450. DOI: 10.1371/journal.pone.0044450.

14. Srivastava M., Jung S., Wilhelm J., Fink L., Bühling F., Welte T., Bohle R.M., Seeger W., Lohmeyer J., Maus U.A. The inflammatory versus constitutive trafficking of mononuclear phagocytes into the alveolar space of mice is associated with drastic changes in their gene expression profiles. *J. Immunol*. 2005; 175 (3): 1884–1893. DOI: 10.4049/jimmunol.175.3.1884

15. Thuault S, Ghossoub R, David G, Zimmermann P. A Journey on Extracellular Vesicles for Matrix Metalloproteinases: A Mechanistic Perspective. *Front Cell Dev Biol*. 2022 May 20;10:886381. doi: 10.3389/fcell.2022.886381. PMID: 35669514; PMCID: PMC9163832.

16. D'Arcy MS. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biol Int*. 2019 Jun;43(6):582-592. doi: 10.1002/cbin.11137. Epub 2019 Apr 25. PMID: 30958602.

17. Shi Z, Yuan S, Shi L, Li J, Ning G, Kong X, Feng S. Programmed cell death in spinal cord injury pathogenesis and therapy. *Cell Prolif*. 2021 Mar;54(3):e12992. doi: 10.1111/cpr.12992. Epub 2021 Jan 27. PMID: 33506613; PMCID: PMC7941236.

18. Kim C, Kim B. Anti-Cancer Natural Products and Their Bioactive Compounds Inducing ER Stress-Mediated Apoptosis: A Review. *Nutrients*. 2018 Aug 4;10(8):1021. doi: 10.3390/nu10081021. PMID: 30081573; PMCID: PMC6115829.

Учебное издание

**Людмила Викторовна Спирина,
Дмитрий Иванович Кузьменко,
Марина Николаевна Стахеева,
Гелена Валерьевна Какурина,**

МЕДИЦИНСКАЯ БИОХИМИЯ: ПАТОХИМИЯ, ДИАГНОСТИКА

ИЗБРАННЫЕ ЛЕКЦИИ

В 2-х частях. Часть 1

УЧЕБНОЕ ПОСОБИЕ

Редактор Коломийцев А.Ю.
Технический редактор Коломийцева О.В.
Обложка Кузьменко Д.И.

Издательство СибГМУ
634050, г. Томск, пр. Ленина, 107
тел. +7 (3822) 901–101, доб. 1760
E-mail: otd.redaktor@ssmu.ru

Подписано в печать 31.01.2023

Формат 60x84 $\frac{1}{16}$. Бумага офсетная.

Печать цифровая. Гарнитура «Times». Печ. л. 9,4. Авт. л. 7,1.

Тираж 100 экз. Заказ № 3

Отпечатано в Издательстве СибГМУ
634050, Томск, ул. Московский тракт, 2
E-mail: lab.poligrafii@ssmu.ru