

УДК 616.5; 616.1.577

Маслянюк Р.П., професор, **Кісера Я.В.**, професор,
Божик Л.Я., ти. викладач ©

*Львівський національний університет ветеринарної медицини та
біотехнологій імені С.З. Гжицького*

ВПЛИВ ПАТОГЕНІВ НА ПРОГРАМУ АПОПТОЗУ КЛІТИН ГОСПОДАРЯ

В огляді розглянуто дані літератури про вплив бактерій на програму апоптозу клітин господаря. Численні патогенні бактерії володіють механізмами, спрямованими на регуляцію клітинної загибелі, що дозволяє їм підтримувати оптимальні умови розвитку інфекції. Механізми індукції та пригнічення апоптозу, вироблені бактеріями за своєю суттю різновидні, вони реалізуються в результаті складних взаємодій біологічно активних бактерійних молекул з конкретними мішенями сигнальних шляхів, які ведуть до апоптозу. При внутрішньоклітинному паразитизмі антиапоптозну активність бактерії можна розглядати як один з механізмів персистенції збудника, що забезпечує розвиток хронічних інфекцій.

Ключові слова: патогени, бактерії, апоптоз, механізми, персистенція

Вивчення механізмів апоптозу – одна з найбільш інтенсивно досліджуваних галузей біології і медицини. Апоптоз чи запрограмована форма загибелі клітин, поряд з поділом, ростом, диференціацією, відіграє важливу роль у формуванні та функціонуванні всіх багатоклітинних організмів [28, 26, 32]. Актуальність вивчення механізмів апоптозу визначається взаємозв'язком порушень регуляції процесу запрограмованої загибелі клітин з більшістю захворювань [3, 4, 6]. Порушення процесу апоптозу відіграє важливу роль в розвитку СНІДу та в патогенезі з хворобами, викликаними іншими вірусами [2].

Стосовно до інфекційної патології, зумовленої бактеріальними патогенами, апоптоз виконує функцію захисту макроорганізму. Загибель інфікованих клітин з наступною елімінацією зруйнованих клітин і мікроорганізмів клітинами імунної системи дозволяє запобігти розповсюдження інфекції.

В свою чергу численні патогенні мікроорганізми виробляють досконалі механізми, які дозволяють керувати загибеллю клітин господаря. Окремі бактерії, переважно ті, що розмножуються поза еукаріотичними клітинами (ентеробактерії, стафілококи), активують програму загибелі клітин, тим самим індукують апоптоз, що є необхідним етапом викликаного ними інфекційного процесу. Факультативні внутрішньоклітинні паразити (сальмонели, лістерії та ти.) здатні також індукувати апоптоз, але в окремих випадках можуть пригнічувати його, що дозволяє їм протистояти захисним механізмам організму

або підтримувати оптимальні умови існування. Молекулярні механізми розвитку апоптозу відображені в численні кількості робіт [2, 3, 8, 15, 23, 36, 39].

Апоптоз – багато каскадний процес, який реалізується в декількох стадіях. Перша стадія – прийняття сигналу, що надходить до клітин ззовні або, що виник в надрах клітини. На другому етапі молекули – посередники передують отриманий сигнал, він досягає ядра, і в результаті запуску генетичної програми синтезуються чи активуються ферменти, здатні зруйнувати клітинні білки та нуклеїнові кислоти. На заключному етапі відбувається деградація ДНК, руйнування структурних і функціональних білків, клітина втрачає цілісність і стає “поживою” для макрофагів.

Відкрито два сигнальних шляхів активації апоптозу :зовнішній, через поверхневі рецептори, та внутрішні, через мітохондрії.

Перший шлях індукується фізіологічними факторами – індукторами апоптозу, такими як цитокіни, гормони, пептидні ростові фактори. Він починається з клітинних рецепторів, спеціально призначених для включення програми апоптозу (Fas, TNFR1, DR3, DR4 і т.д.). Це по суті трансмембранні білки, які неклітинною ділянкою взаємодіють зі специфічними лігандами – індукторами. Така взаємодія веде до зв'язування їх внутрішньоклітинних ділянок з адаптерами – цитоплазматичними білками, які можуть зв'язувати рецептори з неактивними попередниками протеаз із родини тиск н.

Каспази – цистеїнові протеази, здатні розщеплювати білки зі специфічною для апоптозу послідовністю, після аспарагінової кислоти. Каспази знаходяться в клітині у неактивному стані, їх активація відбувається в результаті протеолітичного розщеплення.

Мітохондріальний шлях активації апоптозу індукується пошкодженням ДНК, дією радіації цитотоксичними агентами, глюкокортикоїдами і т.д. Він зв'язаний з активацією білка Р. 53 та експресією генів, які кодують проапоптозні білки родини Bc 1-2, Вах I Від. Ці білки, вкликаючи пермеабілізацію мембран, мітохондрій, сприяють виходу цитохрому С, що є ключовою ланкою в подальших енергозалежних реакцій як при зовнішньому, так і внутрішньому сигнальному шляху, ведуть до активації тиск н і апоптозу.

Існує ще каспазозалежний шлях, який веде до апоптозу, що реалізується за участю білка АУФ (Apoptosis Ynducing Factor), який в результаті тиск нтозами в ядро активує протеолітичні ферменти.

Розвиток апоптозу не є фатальним, він може бути заблокований на окремих етапах проведення сигналу, а для цього в самій клітині існує механізм, який реалізується завдяки дії білків з антиапоптозною активністю.

Згідно сучасних даних “вирішення” долі клітини – жити чи померти приймається на рівні білків родини Bc 1-2. Антиапоптозна дія білків цієї родини реалізується в результаті конкурентного зв'язування з проапоптозними білками, що перешкоджає утворенню пор у мембрані мітохондрій та виходу цитохрому С [28].

Другим механізмом, спрямованим на пригнічення апоптозу, є активація транскрипційного фактору NF- κ B, який бере участь також в регуляції імунної відповіді на антиген. Відомі також ряд антиапоптозних білків, які кодуються генами, експресія котрих зростає під дією NF- κ B, що веде до зупинення загибелі клітин [37].

Відомо, що мікроорганізми отримують певну вигоду від загибелі клітин господаря. Вона полягає в тому, що індукція апоптозу макрофагів захищає збудників від фагоцитозу, сприяє їх виживанню [41]. У тому випадку, коли макрофаги захищають мукозний шар від проникнення бактерій, апоптоз макрофагів створює умови для проникнення збудників у тиск нтозам тканини і навіть у кров. Крім цього, загибель клітин шляхом апоптозу, а не некрозу, більш сприятлива для бактерій, оскільки в цьому випадку не запускаються запальні реакції.

При вивченні ролі апоптозу в патогенезі бактерильної інфекції встановлено, що підвищення рівня апоптозу Т-лімфоцитів на перших етапах інфекції є механізмом обмеження системної запальної реакції. Однак індукована загибель Т-клітин на пізніших етапах захворювань веде до послаблення імунітету, зумовлюючи тяжкість та наслідок хвороби [7].

Механізм індукції апоптозу, вироблені бактеріями, різновидні. Одна група механізмів об'єднує ті, які спрямовані на пригнічення білкового синтезу, порушення цілісності клітинної мембрани та які активуються при взаємодії окремих бактерійних компонентів (ЛПС, суперантигени) з рецепторами клітин [21].

Більш детально механізми індукції бактеріями апоптозу в результаті взаємодії з сигнальними шляхами можна розглядати на прикладі окремих патогенних бактерій. Так, бактерії *Shigella Flexneri*, за допомогою системи секреції III типу, декретують ряд білків у макрофаги, запускаючи тим самим різновидні клітинні відповіді. Зокрема білок Ipa B може зв'язуватись з тиск нто 1, активувати його і в результаті активації ефекторних тиск н настає загибель клітин. Крім цього, тиск нт 1, являючись активатором деяких цитокінів, сприяє виходу ІЛ-1 та розвитку запального процесу. Індукція апоптозу макрофагів і запальна реакція сприяє масивній інвазії та розвитку інфекційного процесу [41].

Бактерії *Staphylococcus aureus* також індукують апоптоз, проте механізм дії цього збудника ще не зовсім вивчений [21].

Наявні в даний час дані дозволяють обговорювати дві різні групи механізмів, виявлених у бактерій і спрямованих на пригнічення апоптозу клітин господаря [24].

Найбільш комплексна взаємодія між системою апоптозу та патогенними бактеріями розгортається при внутрішньоклітинному паразитизмі. За аналогією з вірусами можна припускати, що для облігатних внутрішньоклітинних бактерій загибель клітин господаря є ознакою втрати середовища для проживання, а значить контроль загибелі клітин є тиск нтозами ст стратегією цих патогенів. Для рикетсій і ешеріхій показано, що вони можуть

зупиняти апоптоз за участю транскрипційного фактору NF- κ B [26, 42]. В досліджах [12] продемонстровано, що при інфікуванні ендотеліальних клітин в умовах *in vitro* рикетсіями відбувалася активація NF- κ B та зміни експресії ряду генів, які знаходяться під його контролем.

Для інших облигатних внутрішньоклітинних паразитів основним механізмом, який перешкоджає апоптозу, служить пряма дія на сигнальні шляхи, що ведуть до апоптозу. Особливо переконливо це показано для трьох патогенних для людини представників родини Chlamydiae

Chlamydia trachomatis. В даний час відомо, що всі хламідії володіють про- і антиапоптозною активністю. *Cl. Psittaci* індукуює апоптоз епітеліальних клітин і макрофагів, але в цей же час захищає макрофаги від зовнішніх апоптоз – індукуючи сигнали [33].

В ході інфекції епітеліальних клітин і макрофагів, викликаних *Cl. Psittaci* [1, 2] (GPiG) і *Cl. Trachomatis* (LGV/1) в умовах *in vitro*, а також в клітинах епітелію *геніального* тракту мишей, інфікованих *Cl. Trachomatis* (MoPn) *in vivo*, спостерігали індукцію апоптозу [13, 18, 24, 33]. При вивченні механізму індукції клітинної загибелі на цих моделях показано, що хламідії індукували каспазонезалежний сигнальний шлях в результаті активації білка Bax і тиск нтозами його на мембрану мітохондрій. Такий механізм може розглядатися як універсальна стресорна відповідь на присутність внутрішньоклітинних паразитів, які виявляються на останніх стадіях інфекції.

При інфекції, яку викликає *Cl. тиск нто*, в епітеліальних клітинах, моноцитах і макрофагах виявлена сильна антиапоптозна активність, що захищає клітини від загибелі за дії різних факторів [9, 11, 17, 20, 25, 34]. Епітеліальні клітини, інфіковані *Cl. тиск нто* були стійкі до апоптозу [34]. Епітеліальні клітини інфіковані *Cl. тиск нто* були стійкі до апоптозу, індукованого ФНП 2 і стауроспорином [16]. Як відомо ФНП2 запускає рецепторний сигнальний шлях, в цей час коли стауроспорин індукуює вихід цитохрому С із мітохондрій. Таким чином, експериментальні дані вказують на те, що хламідії можуть блокувати як зовнішні рецептори, так і внутрішній мітохондріальний шлях, який веде до апоптозу.

Ключовою ланкою розвитку апоптозу є вихід цитохрому С із мітохондрій. Виявлення цитохрому С за допомогою моноклокальних антитіл в інфікованих хламідіях та неінфікованих клітин Нер-2.

Показано, що після індукції апоптозу як ФНП 2, так і стауроспорином, в контрольних клітинах цитохром С виявлявся дифузно в цитоплазмі, тоді як в клітинах, які містили хламідні включення, цитохром С зберігається в мітохондріях [34]. Ці дані свідчать, що *Cl. тиск нто* блокує апоптоз на етапах, які передували виходу цитохрому С із мітохондрій. Тим самим, пригнічуючи вихід цитохрому С із мітохондрій, хламідії можуть забезпечити резистентність інфікованих клітин до різних апоптозних сигналів.

Встановлено також, що хламідії блокують апоптоз ще на одному етапі сигнального шляху. В досліджах з використанням без клітинних систем введення цитохрому С у цитоплазматичні екстракти, які були отримані із інфікованих

клітин, не викликало активації тиск н [24]. Поряд з цим, є дані про те, що резистентність до апоптозу інфікованих СІ. тиск нто моноцитів зв'язана з активацією NF-КВ[14].

В окремих дослідах показано, що найбільш ефективний захист від апоптозу спостерігається в клітинах з доволі крупними включеннями що містять велику кількість ретикулярних тілець і залежать від циклу розвитку хламідій [34].

Антиапоптозною активністю володіють також і тиск нто форми хламідій, що утворюють дрібні включенні, що є метаболічноактивними формами [27].

У СІ. тиск нто, порівняно з іншими хламідіями, виявлено найбільш чіткий антиапоптозний ефект, для цього збудника характерно розвиток хронічної інфекції, що уражують не лише респіраторний тракт. Для СІ. тиск нто отримано найбільш переконливі докази причетності до розвитку серцево-судинних захворювань [10, 19, 22, 30, 31, 35, 38].

Моноцити крові в яких персистують СІ. тиск нто є ланкою, що зв'язують респіраторну та серцево-судинну інфекцію. Інфіковані моноцити можуть сприяти дисемінації збудника та колонізації ним тканин артеріальних судин. Такі інфіковані моноцити набувають стійкості до апоптозу в результаті активації NF-КВ, під контролем якого знаходиться також експресія деяких протизапальних цитокінів [40].

Таким чином, вивчення механізмів регуляції апоптозу, які хламідії реалізують в умовах хронічної інфекції *in vivo*, дає можливість намітити нові підходи до лікування хронічних інфекцій – регулювати антиапоптозну активність хламідій, тим самим допомагаючи клітинам господаря реалізувати природний механізм захисту організму проти інфекційних агентів шляхом апоптозу.

Література

1. Владимирская Е.Б. Механизмы апоптоза клеток крови / Е.Б. Владимир // Лаб. Медицина. – 2001. – №4. – С.47-54
2. Копнин Б.П. Мишени действия онкогенов и опухолевых супрессоров : Ключ к пониманию тиск н механизмов канцерогенеза / Б.П. Копнин // Биохимия. – 2000. – №65 (I). – С.5-33.
3. Мазурик В.К. Успихи в изучении механизмов регуляции клеточного цикла репарации ДНК и апоптоза при участии белка и гена p 53- перший шаг на пути к предсказываемой революции в лабораторной медицине XXI века / В.К. Мазурик // Лаб. Медицина. – 2001. – № 4. – С.33-43.
4. Маслянюк Р.П. Апоптоз імунокомпетентних клітин тварин різного віку / Р.П. Маслянюк, Ю.Р. Кравців // Наук. Вісник ЛДАВМ. – 2001. – Т. 1, № (4). – С. 157-164.
5. Фильченков А.А. Участие системы Fas/Fes-Лиганд в регуляции гомеостаза и функционировании клеток иммунной системы / А.А. Фильченков, Ю.М. Степанов //Аллергология и иммунология. – 2002. – 3(I). – С. 24-35.

6. Черных Е.Р. Апоптоз перефирических Т-клеток и его роль в патогенезе генерализованой бактериальной инфекции / Е.Р. Черных, М.Н. Норкин, О.Ю. Леплина // *Rus. J. Immunol.* – 2001. – № 6. – С. 131-146.
7. Ярилин А.А. Апоптоз. Природа феномена и его роль в целомом организме / Ярилин А.А // *Патол. Физиол. И тиск н. тиск н.* – 1998. – № 2. – С. 38-48.
8. Airenne S. Chlamydia pneumovriae infection in humanmonocyte /S. Airenne, H.M. Surcel // *Infect. Immunol.* – 2004. – V. 72. – P. 1445-1449.
9. Campbell L.A. Chlamydia pneumonia and cardiovascular disease/ L.A. Campbell, C.C. Kao, J.T.Grayston // *Emerg. Infect Dis.* – 2008. – V. 14. – P. 571-579.
10. Carratelli C.R. Chlamydia pneumoniae infections prevent the programmed celeeath / C.R. Carratelli, A. Rizzo, M.R. Cataniaetal // *Fems Microb. Lett.* – 2002. – V. 215. – P. 69-74.
11. Clifton D.R. NF-Kappa B-dependent inhibition of apoptosis is essential for host cell survival daring Rickettsia rickettsia infection / D.R. Clifton, B.A. Goss // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2003. – V. 100. – P. 4646-4651.
12. Dean D. Present Chlamydia pneumonia infection resist apoptosis stimuli / D. Dean, V.C. Povers // *Infect. Immun.* – 2001. – V. 69. – P. 2442-2447.
13. Dechen R. Chlamydia pneumonia infection of vascular smooth musele and endothelial cells activates NF-kB and inductes tissue factor and PAJ-/expression / R. Dechen, M. Maass // *Circulation.* – 2004. – V. 105. – P. 1369-1373.
14. Ernshaw W.C. Mammalian caspases structure, activation, substrates and fanction during apoptosis /W.C. Ernshaw, R.L. Martins, S.H. Kaufman // *Annu Rev.Riochem.* – 2004. – V. 73. – P. 383-424.
15. Fan T. Inhibition of apoptosis in Chlamydia-infected cells : blocade of mitochondrial cytochrome C release and caspate activation / T. Fan, H. Ln, H. Hu // *J. Exp Med.* – 1998. – V. 187. – P. 487-496.
16. Fishes S.F. Characterization of antiapoptotic activities of Chlamydia pneumonia in human cells / S.F. Fisher, C. Schwarz // *Infect. Immun.* – 2001. – V. 69. – P. 7121-7129.
17. Gao L.Y. The Modulation of host cell apoptosis by intracellular lacterial pathogens / L.Y. Gao, Y.A. Kwasis // *Trends Microbiol.* – 2000. – V. 8. – P. 306-313.
18. Gaydos C.A. Replication of Chlamydial pneumonia in vitro in macrophages, endothelial cells and aortic artery smooth muscle cells / C.A.Gaydos // *Infect. Immun.* – 2001. – V. 69. – P. 1614-1620.
19. Geng Y. Chlamydia pneumonia inhibits apoptosis in human peripheral blood mononuclear cells through induction of JL-10 / Y. Geng // *J. Immunol.* – 2000. – V. 164. – P. 5522-5529.
20. Grassme H. Molecular mechanisms of bacteria induced apoptosis / H. Grassme, V. Jendrossek // *Apoptosis.* – 2001. – P. 441-445.
21. Grayston J.T. Background and current knowledge of Chlamydia pneumonia and atherosclerosis / J.T. Grayston // *Infect. Dis.* – 2005. – V. 186. – P. 402-410.

22. Green D.R. Mitochondria and apoptosis / D.R. Green // *Science*. – 1998. – V. 281. – P. 1309-1312.
23. Hacker G. Bacterial anti-apoptotic activities / G.Hacker // *FEMS Microbiol. Lett.* – 2002. – V. 212. – P. 1-6.
24. Hilbi H. Shigella induced apoptosis is dependent on caspase- Which binds to I κ B / H. Hilli, J.E. Moss // *J. Biol.Chem.* – 1998. – V. 273. – P. 32895-32900.
25. Jacobson M.D. Programmed cell death in animal development / M.D. Jacobson, M. Well, M.C. Raff // *Cell*. – 1997. – V.88. – P. 347-354.
26. Kalman S. Comparative genomes of *Chlamydia pneumoniae* and *C.trachomatis* / S. Kalman, W. Michell, R. Marathe et al. // *Nat Genet.* – 1999. – V. 21. – P. 385-390.
27. Kelekar T. Bcl-2 family proteins / T. Kelekar, C. Thomson // *Cell. Biol.* – 1998. – V. 8. – P. 324-330.
28. Krull M. Signal Transduction pathways activated in endothelial cells following infection with *Chlamydia pneumoniae* / Krull M. // *J. Immunol.* – 1999. – V. 162. – P. 4834-2841.
29. Leinonen M. Infections and atherosclerosis / M.Leinonen, P. Saikku // *Scand. Cardiovasc.* – 2000. – V. 34. – P. 12-20.
30. Mahony J.B. *Chlamydia pneumoniae* and atherosclerosis ; does the evidence support a causal or contributory role? / J.B. Mahony, B.K. Coombes // *FEMS Microbiol. Lett.* 2001. – V. 197. – P. 1-9.
31. O'connor L. Apoptosis and cell division / L. O'connor, D.C. Hung // *Curr. Opin. Cell Biol.* – 2000. – V. 12. – P. 257-263.
32. Ojcius D.M. Apoptosis of epithelial cells and macrophages due to infection with the obligate intracellular pathogen *Chlamydia psittaci* / D.M. Ojcius // *J.Immunol.* – 1998. – V. 161. – P. 4220-4226.
33. Rajalingam K. Epithelial cells infected with *Chlamydia pneumoniae* are resistant to apoptosis / K. Rajalingam, H. Younes, A. Muller et al. // *Infect. Immun.* – 2001. – V. 69. – P. 7880-7889.
34. Saikku P.*Chlamydia pneumoniae* in atherosclerosis / P. Saikku // *I. Intern-Med.* – 2000. – V. 247. – P. 391-396.
35. Sietier H. Mechanism and genes of cellular suicide / H. Sietier // *Science.* – 1995. – V. 267. – P. 1445-1449.
36. Tato C.M. Host-pathogen interactions : subversion and utilization of the NF- κ B pathway during infection / C.M. Tato, C.A. Hunter // *Infect Immun.* – 2002. – V. 70. – P. 3311-3317.
37. Taylor-Robinson D. *Chlamydia pneumoniae* in arteries-the facts, their interpretation, and future studies / D. Taylor-Robinson, B. J.Thomas // -1998. – V. 51. – P. 793-797.
38. Vaux D.L. The molecular biology of apoptosis / D.L. Vaux, A. Strasser // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1996. – V. 93. – P. 2239-2244.
39. Wahl C. Survival of *Chlamydia pneumoniae* infected Monoclonal 6 cells dependent on NF- κ B binding activity / C. Wahl, F. Oswald // *Infect. Immun.* – 2001. – V. 69. – P. 7039-7045.

40. Wainzauch Y. The induction of apoptosis of bacterial pathogens / Y. Wainzauch // Annu Rev. Microbiol. – 2004. – V. 58. – P. 155-187.

41. Yoshife K. Intracellular infection by the human granulocytic ehrlichiosis agent inhibits human neutrophil apoptosis / K. Yoshife, H.Y. Kim // Infect. Immun. – 2000. – 68. – P. 1125-1133.

Summary

Maslianko R.P., Kiseria Ya.V., Bozhyk L.Ya

***Lviv National University of Veterinary Medicine and Biotechnology
named of S.Z.Gzickyj***

Review on the influence of pathogenic bacteria on the apoptosis program of host cells. Many pathogenic bacteria process mechanisms to control cell dieth, which makes in possible to maintain the optimum conditions for the development of infection. The mechanism of induction and suppression of apoptosis, worked out by bacteria, are very variable and realized as the result of complex interaction of biologically active bacterial molecules with concrete targets of signal paths leading to apoptosis in case of intracellular parasitism the antiapoptosis activity of bacteria maybe regarded as one of the agents, ensuring the development of chronic infections.

Рецензент – д. б. н., професор Куртяк Б.М.