

УДК 612.67.014.3:576.3

**ЯБЛОНСЬКИЙ В.А.**, д-р біол. наук

*Національний університет біоресурсів і природокористування України*

**ЖЕЛАВСЬКИЙ М.М.**, д-р вет. наук

*Подільський державний аграрно-технічний університет*

e-mail: docgmm@mail.ru

## **АПОПТОЗ ТА ЙОГО ЗНАЧЕННЯ В РЕГУЛЯЦІЇ ІМУННОГО ГОМЕОСТАЗУ ОРГАНІЗМУ ТВАРИН (огляд літератури та власних досліджень)**

У статті висвітлено сучасні імунобіологічні аспекти апоптозу імунокомпетентних клітин, детально розкрито дію різноманітних факторів і механізмів, які впливають на індукцію та гальмування апоптозного процесу. Авторами показано наукові паралелі цієї проблематики із власними експериментальними дослідженнями, здійснено інтерпретацію та узагальнення сучасних теоретичних концепцій, а також визначена роль апоптозу у формуванні імуногомеостазу тварин.

**Ключові слова:** апоптоз, імуна система, імунокомпетентні клітини, механізми регуляції, гомеостаз.

**Постановка проблеми.** Останнім часом значну увагу серед вітчизняних та закордонних дослідників привернув апоптоз (від грецької *apo* – «відділення» та *ptosis* – «падіння»), під яким нині розуміють генетично контрольований процес фізіологічної загибелі клітин, що відбувається у період ембріонального та постнатального розвитку всіх живих істот та є основою гомео-стазу в організмі [1–5]. Процес апоптозу характерний для усіх клітинних систем, проте особливе значення він має у формуванні функціональної активності клітин імуноної системи – саме цей процес є фактором клітинної селекції на всіх етапах диференціації та проліферації.

Феномен старіння та загибелі клітин був описаний ще в працях Р. Вірхова (1859), А. Вейсана (1864), В. Флемінга (1885), проте згодом цьому питанню дослідники не надавали належної уваги. І лише у 1972 р. J. Kerr et al. у наукову номенклатуру було внесено термін «апоптоз» [6–7].

У 2002 році колектив авторів (С. Бреннер, Д. Салтсон та Р. Харвиц) отримали Нобелівську премію за цикл робіт, присвячених проблемі апоптозу, тобто програмованій клітинній загибелі. Апоптоз – це активний процес, що зумовлений фізіологічними сигналами, які через мембранні рецептори надходять до ядра клітини [6, 8, 9]. Така форма загибелі виникає внаслідок складних внутрішньоклітинних процесів, які супроводжуються зморщуванням ядра і фрагментацією клітинного хроматину, ущільненням мембрани клітини (але без запалення). Апоптоз, як генетично запрограмована форма заміни клітинних поколінь, властивий всім органам і тканинам організму, проте особливу роль він виконує в клітинах імуноної системи (лімфоцитах, моноцитах, нейтрофілах тощо) [8–11]. Сучасна клінічна імунологія щорічно поповнюється новими методами, що потребує від науковців розширення знань цієї галузі та новітнього технологічного переозброєння спеціалізованих лабораторій.

**Мета дослідження** – проаналізувати сучасні наукові концепції щодо дослідження апоптозу імунокомпетентних клітин.

Феномен апоптозу є результатом дії різних чинників, що призводять до загибелі клітини. Це можуть бути неспецифічні чинники: температура, токсичні агенти, оксиданти, вільні радикали,  $\gamma$ - і ультрафіолетове опромінення, бактерійні токсини тощо. В усіх цих випадках відбувається індукція апоптозу, але у разі збільшення впливу відповідного агента ініціюється некротичний розпад клітини [12–14], а це викликає підвищений інтерес дослідників, перш за все, щодо гормональної регуляції апоптозу [15–17].

Експериментальними дослідженнями доведено, що в динаміці розвитку маститу корів індукція апоптозу нейтрофільних гранулоцитів відбувалась на тлі активації метаболічної реактивності фагоцитів. Встановлено, що в зоні патологічного процесу відбувається скопичення величезної кількості активних форм кисню, а також інших метаболітів запалення, які спричиняють не лише деструктивну дію на клітини, але й є специфічними активаторами їх апоптозу [8].

Ініціація апоптозу спричиняється фізіологічними сигналами-індукторами, які сприймаються спеціалізованими клітинними рецепторами, що запускають каскад послідовних внутрішньоклітинних біохімічних процесів [14, 16]. Цими сигналами можуть виступати різноманітні чинники: біологічно активні речовини, дисгормональні зрушення, антигенні переважанення, наявність в організмі специфічних антитіл до рецепторів клітин, цитокіни тощо [15–17]. Характер відповіді клітин на сигнали є неоднозначним і залежить від цілої низки

чинників, що впливають на функціональний стан клітин, стадію їх активації і диференціації. Сприйняття сигналів клітинами здійснюється через мембранні рецептори [14, 17].

Нині розрізняють чотири послідовні етапи апоптозу: 1) сприйняття клітинами апоптичних стимулів; 2) передача сигналів на внутрішньоклітинні регуляторні елементи; 3) взаємодія регуляторних елементів клітин-мішеней і «прийняття рішення» – «жити чи померати»; 4) деструкція життєво важливих молекул клітин-мішеней ефекторними елементами апоптичного шляху [15–19]. *Перший етап* розпочинається з процесу активації клітиною потенційно летальних для неї стимулів, які можуть бути як патологічними, так і фізіологічними, що спричиняє олігомеризацію внутрішньоклітинних доменів рецепторів, які в свою чергу активують інші субстрати, що індукують апоптоз. На *другому етапі* відбувається передача апоптичних сигналів іншим регуляторним білкам клітин-мішеней. Серед сигнальних білків апоптозу важливу роль виконують протеолітичні ензими – *каспази*. Достеменно відомо, що *каспаза-8* відіграє ключову роль у деструкції клітинних білків під час апоптозу [20, 21].

Серед механізмів біологічної загибелі клітин найбільш універсальним є вплив специфічних рецепторів *Fas (Fas, R2, Apo1, Cd95)*, які експресуються на поверхні більшості клітин, зокрема вони містяться на мембрані активованих Т- і В-лімфоцитів, антигенпрезентувальних клітин, фібробластів, кератиноцитів, на клітинах, які трансформувались у процесі репродукції вірусів тощо [22]. *Fas рецептор*, як і фактор некрозу пухлини (*ФНП; TNF – tumor necrosis factor*) має гомологічну структуру. *Третій етап* апоптозу охоплює процеси, які відбуваються головним чином у мітохондріях. *Четвертий етап* апоптозу розпочинається з активації *прокаспази-9*, після чого вона набуває здатності активувати інші внутрішньоклітинні субстрати, зокрема *прокаспази-3*, ініціюючи каспазний каскад. Руйнуються гени багатьох життєво важливих білків клітини, у тому числі гени супресорів апоптозу, що врешті-решт призводить до загибелі клітини (апоптозу) [20–23]. Ця група протеаз існує відокремлено і функціонує як медіатор сигналу смерті. Нині в різних клітинах ссавців виявлено 10 каспаз, які створюють ферментативний каскад, подібно до ферментативного каскаду системи згортання крові чи системи комплементу [8–12, 17]. Наслідком цих біохімічних метаморфозів є ущільнення хроматину, що, як відомо, є найважливішою складовою внутрішньоядерного компоненту, який містить ДНК і білки. В каскаді біохімічних реакцій проходить розпад ядра на фрагменти із подальшим утворенням хроматинових тілець та руйнуванням цитоплазми [23].

Так зокрема, нами встановлено, що в патогенезі субклінічного маститу корів апоптозний процес імунокомпетентних клітин (ІКК) проявлявся не лише збільшенням кількості спотворених клітин, а й їх відповідними змінами – в них виявляли зморщення, вакуолізацією та фрагментацію ядра. Особливо збільшувалась кількість поліморфноядерних клітин із вакуолізацією ядра та цитоплазми, токсичною зернистістю цитоплазми. Часто в мікропрепаратах виявляли ознаки цитолізу (плазмолізу) імунокомпетентних клітин секрету молочної залози, який диференціюється за наявними рештками ядра, що є типовим для зрілої клітини. За мікроскопії препаратів у різних полях зору також виявляли клітини з непорушеною цілістю, проте в них чітко вирізнялося зменшення цитометричних розмірів (тобто зморщення). Часто такі зміни проходять разом із метаморфозами ядра (пікноз, рексис, вакуолізація), цитоплазми (зморщення), коли клітини втрачають свою специфічну зернистість [8, 25, 28].

Апоптоз може відбуватися і без участі каспаз в разі надлишкового синтезу білків – промоутерів апоптозу типу *Bax* і *Bak*. Білки цього типу належать або до індукторів апоптозу (*Bad, Bax, Bcl-Xs, Bik, Bid, Bak*), або до інгібіторів (*Bcl-2, BCL-XL*) [3, 6, 17, 22]. У мембрані мітохондрій також локалізовані протеїни ядерних генів *Ced9/bcl-2*, одні з яких (*Bcl-2, Bcl-xa*) інгібують апоптоз, інші – *Bax, Bak*, навпаки – стимулюють.

Доведено [14, 18], що ген *p53* відповідає за синтез протеїну *p53*, який локалізується в ядрі клітини і регулює експресію генів, що блокують клітинний цикл поділу. Білок *p53* спричиняє зупинку поділу клітин та попереджує появу клітин-мутантів [14, 24]. Вирішальним моментом в запуску апоптозу є гетеродимеризація білків *Bcl-2* – індукторів та інгібіторів апоптозу [26]. Нещодавні дослідження показали, що вирішальним чинником індукції цього процесу в родині *Bcl-2* є *цитохром С* та протеаза. Вивільнення цих факторів призводить до розпаду комплексу *Bcl-2/Araf-1* і до активації каспази-9 [19, 22]. Інший механізм регуляції функціонального стану білків типу *Bcl-2* також пов'язаний з фосфорилуванням/дефосфорилуванням білків-індукторів апоптозу за допомогою *кінази Raf-1* [8, 9].

До останнього часу вважалося [14], що ушкодження ДНК призводять до клітинної загибелі в результаті порушення функцій всіх біохімічних систем через неможливість повноцінної транскрипції генів, що містять дефекти в матриці ДНК. Проте дослідження останніх років [18, 19] показали, що механізм загибелі клітин з пошкодженнями ДНК відбувається за певною генетичною

програмою, в індукції якої важлива роль належить білку *p53*. Підвищена експресія цього білка призводить до активації експресії гена *p53*. Блок клітинного циклу у фазах G1 і G2 до реплікації ДНК і мітозу відповідно робить можливою репарацію пошкодженої ДНК і запобігає тим самим появі клітин мутантів [18, 26]. Мутації гена *p53* дозволяють зберігати життєздатність у мітозі клітинам, що піддалися пухлинній трансформації [14].

*Значення апоптозу в регуляції імунної системи організму.* Запрограмована загибель клітин, як зазначено вище, відіграє особливу роль у функціонуванні імунної системи. На всіх етапах клітинного розвитку – проліферації і диференціювання – вона є методом відбору імунокомпетентних клітин (ІКК), регулює їхню відповідь на антигенні сигнали, визначає характер імунної відповіді чи формування імунологічної толерантності [4, 6, 10]. На ранніх етапах кровотворення регулювальну функцію у відборі ІКК виконує *фактор стовбурових клітин (SCF)*. Надалі, під час диференціювання клітин, спрацьовує низка інших чинників, що виконують роль індуктора, або ж є фактором їх виживання [11, 15, 19].

Більшість дослідників нині [1, 6, 17] поділяють думку, що існують дві альтернативні форми відповіді різних популяцій клітин імунної системи на антигенну стимуляцію – проліферація чи апоптоз. Апоптоз є активною формою реакції ІКК як на несприятливі, так і фізіологічні та активуючі (антигени, мітогени) фактори впливу. Апоптоз ІКК зумовлений взаємодією рецептора *Fas (CD 95/Apo 1)* і його ліганда *FAS-L*, які експресуються на них. Експресія *Fas* зростає під впливом  $\gamma$ -інтерферону і *IL-2*. Індукція *FAS-L* настає за антигенної стимуляції. Відомо, що понад 95 % тимоцитів, що потрапляють у вилочкоподібну залозу (тимус), знешкоджуються через апоптоз у процесі їх селекції і навчання [14]. Попри це існують й мембранні молекули, здатні модифікувати активаційний сигнал (*CD4, CD8*). Їх перехресна взаємодія активує апоптоз через *TCR-CD3*. Захист клітин від активаційного апоптозу забезпечується мембранними молекулами (В-лімфоцитів – *CD40*; Т-лімфоцитів – *CD28*) [11, 18]. Іншими важливими фізіологічними регуляторами апоптозу є цитокіни – велика група білків, які мають специфічні рецептори на клітинах-мішенях [16, 20].

Важлива роль у регуляції апоптозу клітин імунної системи належить іншим цитокінам – *інтерлейкінам (ІЛ)*, інтерферонам. Доведено [22], що вони є індукторами апоптозу як у здорових, так і онкологічних клітин та клітинних ліній. Наприклад, ІЛ-12 індуктує апоптоз натуральних кілерів, ІЛ-4 і ІЛ-10 – периферичних моноцитів людини, ІЛ-10 – Т-лімфоцитів. Проте не менш вираженим є ефект стосовно запобігання апоптозу: один і той же ІЛ може бути як індуктором апоптозу, так і його інгібітором [20].

Численними експериментальними дослідженнями нами доведено, що за субклінічного маститу корів відбувається активна міграція із кровоносного русла до зони патологічного процесу нейтрофілів, які активно знищують патогенні мікроорганізми і, піддаючись впливу медіаторів запалення, цитокінів, мікробних токсинів та ряду інших речовин, зазнають супресії протимікробного потенціалу [25, 28].

Неоднозначна і роль інтерферонів (ІФ) за впливом на клітини. В одних випадках ІФ спричиняє апоптоз клітини кісткового мозку, в інших є інгібітором апоптогенного сигналу (периферичні моноцити людини). Є переконливі повідомлення [13, 18] про те, що фактори росту запобігають розвитку апоптозу в клітинах. Видалення чинників зростання з культури клітин призводить до типових апоптотичних проявів.

Таким чином, апоптоз є тим механізмом, який зумовлює елімінацію клітин із певною специфічністю рецепторів. Наявність в організмі фізіологічних чинників – індукторів та інгібіторів апоптозу дозволяє зробити висновок, що запрограмована загибель клітини залежить від співвідношення чинників, що спричиняють апоптоз, і тих, що запобігають йому, а також від регуляторних внутрішньоклітинних механізмів.

Зважаючи на те, що апоптоз є загальнобіологічним механізмом регуляції, який відповідає за підтримання фізіологічного балансу клітинних популяцій, а також за знищення спотворених, мутованих і дефектних клітин, розглядаються нові підходи в лікуванні та профілактиці захворювань [11, 18, 24].

Загальновідомо, що порушення регуляції апоптозу призводить до виникнення різних захворювань, тому вивчення механізмів цього явища дозволить певним чином впливати на його окремі етапи, як з метою регуляції, так і корекції. У сучасних підходах до лікування все більшого значення набувають принципи клітинної терапії, основним з яких є: якщо клітина гине від апоптозу, то це є підставою до терапевтичного втручання. У тому ж випадку, коли виникає незворотний некроз, репаративний вплив є неможливим [1, 17, 27].

Враховуючи зазначене, у терапевтичній практиці з'явилась ціла низка нових препаратів, які регулюють процес клітинного розвитку. Так, наприклад, принцип рецептор-опосередкованої регуляції апоптозу клітин є перспективним у терапії гормонозалежних новоутворень [14, 21]. Відтак, успішно застосовується в медичній практиці принцип андроген-блокуючої терапії за лікування чоловіків з раком простати. Успішні результати отримано і в разі лікування жінок, хворих на рак молочної залози, із застосуванням антагоністів естрогенних рецепторів [14, 27]. Вивчення і детальне обґрунтування механізмів апоптозу є одним з найбільш актуальних напрямів сучасної біології і медицини. Багатообіцяючою в цьому аспекті є генна та клітинна терапія [16, 21, 24, 26].

**Висновки.** Імунологічна реактивність, що здійснюється системою клітинних та гуморальних реакцій, забезпечує регуляцію динамічного гомеостазу. Всі фізіологічні процеси в організмі перебувають під контролем імунної системи, тому в сучасних наукових дослідженнях важливе значення надається вивченню функціонального стану ланок імунітету. Апоптоз імунокомпетентних клітин необхідно розглядати як закономірно запрограмований біологічний процес, який визначає функціональну здатність імунної системи за норми та розвитку патології.

#### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Neutrophil apoptosis: impact of granulocyte macrophage colony stimulating factor on cell survival and viability in chronic kidney disease and hemodialysis patients / N. Zahran, A. Sayed, I. William [et al.] // Arch. Med. Sci. – 2013. – Dec. 30. – Vol. 9 (6). – P. 984–993.
2. MLK3-MKK3/6-P38MAPK cascades following N-methyl-D-aspartate receptor activation contributes to amyloid- $\beta$  peptide-induced apoptosis in SH-SY5Y cells / F. Zhou, Y. Xu, X. Y. Hou // J. Neurosci. Res. – 2014. – Jan. 31. – Vol. 10. – P. 1002–1017.
3. Mangiavini L. TUNEL Assay on Skeletal Tissue Sections to Detect Cell Death / L. Mangiavini, E. Schipani // Methods. Mol. Biol. – 2014. – Vol. 5. – P. 1130–1378.
4. A rapid detection method for apoptosis and necrosis measurement using the Cellometer imaging cytometry / L.L. Chan, N. Lai, E. Wang [et al.] // Apoptosis. – 2011. – Dec. 16 (12). – P. 1295–1398.
5. Accurate measurement of peripheral blood mononuclear cell concentration using image cytometry to eliminate RBC-induced counting error / L. L. Chan, D. J. Laverty, T. Smith [et al.] // J. Immunol. Methods. – 2013. – Feb. 28. – Vol. 388(1–2). – P. 25–32.
6. Walt D. R. Optical methods for single molecule detection and analysis / D. R. Walt // Analytical Chem. – 2013. – Feb. 5. – Vol. 85 (3). – P. 1258–1263.
7. Рекомендації щодо цитологічної діагностики та візуалізації апоптозу імунокомпетентних клітин секрету молочної залози корів : науково-методичні рекомендації / [Яблонський В. А., Любецький В. Й., Желавський М. М., Боднар О.О.]. – Київ, 2012. – 23 с.
8. Яблонський В.А. Апоптоз імунокомпетентних клітин крові корів у період лактації / В. А. Яблонський, М. М. Желавський // Наук. вісник Націон. аграр. ун-ту. – К., 2008. – Вип. 126. – С. 233–236.
9. Development of new photon-counting detectors for single-molecule fluorescence microscopy / [X. Michalet, R. A. Colyer, G. Scalia et al.] // Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. – 2012. – Dec. 24. – Vol. 368 (1611). – P. 2012–2047.
10. Breaking the concentration limit of optical single-molecule detection / [P. Holzmeister, G.P. Acuna, D. Grohmann et al.] // Chem. Soc. Rev. – 2014. – Feb. 21, Vol. 43 (4). – P. 1014–1028.
11. Yoshie T. Optical microcavity: sensing down to single molecules and atoms / T. Yoshie, L. Tang, S.Y. Su // Sensors (Basel). – 2011. – Vol. 11 (2). – P. 1972–1791.
12. *Staphylococcal protein A*, Pantone-Valentine leukocidin and coagulase aggravate the bone loss and bone destruction in osteomyelitis / T. Jin, Y.L. Zhu, J. Li, J. Shi [et al.] // Cell. Physiol. Biochem. – 2013. – Vol. 32 (2). – P. 322–333.
13. Oberoi-Khanuja T.K. Ubiquitination of Rac1 by Inhibitors of Apoptosis (IAPs) / T.K. Oberoi-Khanuja, K. Rajalingam // Methods Mol. Biol. – 2014. – Vol. 1120. – P. 43–54.
14. Фільченков О.О. Апоптоз і рак: від теорії до практики / О.О. Фільченков, Р.С. Стойка. – Тернопіль: Терн. держ. мед. ун-т, 2006. – 524 с.
15. Comparative analysis of apoptotic changes in peripheral immune organs and lungs following experimental infection of piglets with highly pathogenic and classical porcine reproductive and respiratory syndrome virus / W. Gang, H. Yuli, T. Yabin [et al.] // Virol J. – 2014. – Vol. 12. – P. 111–117.
16. Feig C. How apoptosis got the immune system in shape / C. Feig, M. Peter // Eur. J. Immunol. – 2007. – Vol. 37. – P. 61–70.
17. Immune Response and Apoptosis – Introduction / J. Charles, H. Azizul, A. Nancy [et al.] // J. Clin. Cell. Immunol [Electronic resource]. – Mode of access: <http://www.omicsonline.org/2155-9899/2155-9899-S3-e001.php.aid=3585>.
18. CDK6 kinase activity is required for thymocyte development / M.G. Hu, A. Deshpande, N. Schlichting [et al.] // Blood. – 2011. – Vol. 117. – P. 6120–6131.
19. Akt1 and Akt2 are required for  $\alpha\beta$  thymocyte survival and differentiation / M.M. Juntilla, J.A. Wofford, M.J. Birnbaum [et al.] // Proc Natl. Acad. Sci. USA. – 2007. – Vol. 104. – P. 12105–12110.
20. Hernandez J.B. Life and death in the thymus – cell death signaling during T cell development / J.B. Hernandez, R.H. Newton, C.M. Walsh // Curr. Opin. Cell. Biol. – 2010. – Vol. 22. – P. 865–871.
21. The Wnt antagonist Dkk1 regulates intestinal epithelial homeostasis and wound repair / [S. Koch, S. Nava, C. Addis et al.] // Gastroenterology. – 2011. – Vol. 141. – P. 259–268.
22. An emerging player in adaptive immune response: microRNA-146a is a modulator of IL-2 expression and activation-induced cell death in T lymphocytes / G. Curtale, F. Citarella, C. Carissimi [et al.] // Blood. – 2010. – Vol. 115. – P. 265–273.
23. Commensal *Escherichia coli* Reduces epithelial apoptosis through induction of IFN- $\alpha$  mediated guanylate binding protein-1 in human and murine models of developing intestine / J. Mirpuri, J.C. Brazil, A.J. Berardinelli [et al.] // J. Immunol. – 2010. – Vol. 184. – P. 7186–7195.

24. Guanylate-binding protein-1 is expressed at tight junctions of intestinal epithelial cells in response to interferon- $\gamma$  and regulates barrier function through effects on apoptosis / M. Schnoor, A. Betanzos, D. A Weber [et al.] // *Mucosal. Immunol.* – 2009. – Vol. 2. – P. 33–42.

25. Яблонский В.А. Локальный иммунитет и апоптоз иммунокомпетентных клеток при субклиническом мастите коров / В.А. Яблонский, Н.Н. Желавский // *Современные проблемы ветеринарного обеспечения репродуктивного здоровья животных: Материалы Междун. науч.-практич. конф., посвященной 100-летию со дня рождения профессора В. А. Акатова (Воронеж, 27-29 мая 2009 г.)*. – Воронеж: Истоки, 2009. – С. 393–397.

26. Malemud C. J. Pearlman E Targeting JAK/STAT signaling pathway in inflammatory diseases / C.J. Malemud, E. Pearlman // *Curr Signal Transduct Ther.* – 2009. – Vol. 4. – P. 201–221.

27. Vallabhapurapu S. Regulation and function of NF- $\kappa$ B transcription factors in the immune system / S. Vallabhapurapu, M. Karin // *Annu. Rev. Immunol.* – 2009. – Vol. 27. – P. 693–733.

28. Яблонський В.А. Дослідження апоптозу клітин імунної системи у період лактації / В.А. Яблонський, М.М. Желавський // *Вісник Білоцерків. держ. аграр. ун-ту: Збірник наукових праць*. – Біла Церква, 2008. – Вип. 57. – С. 166–169.

**Апоптоз и его значение в регуляции иммунного гомеостаза организма животных (обзор литературы и собственных исследований)**

**В.А. Яблонский, Н.Н. Желавский**

В статье освещены современные иммунобиологические аспекты апоптоза иммунокомпетентных клеток, подробно раскрыто действие различных факторов и механизмов, влияющих на индукцию и торможение апоптозного процесса. Авторами проведены научные параллели изучаемой проблематики с собственными экспериментальными исследованиями, даны интерпретация и обобщение современных теоретических концепций, а также определена роль апоптоза в формировании иммунного гомеостаза животных.

**Ключевые слова:** апоптоз, иммунная система, иммунокомпетентные клетки, механизмы регуляции, гомеостаз.