

В.Н.Залесский, к.м.н., О.Б.Дынник, к.м.н.

МЕХАНИЗМЫ ТОКСИКАНТ-ИНДУЦИРОВАННОГО АПОПТОЗА КЛЕТОК ПЕЧЕНИ

*Институт кардиологии им. Н.Д. Стражеско АМН Украины, г.Киев
Медицинское научно-практическое объединение "Медстрой",
г.Киев*

Длительный прием лекарственных препаратов, а также острые нарушения дезинтоксикационной функции у больных с гепатаргиями приводит к нарушению регуляции печеночного обмена, что позднее способствует развитию гепатотоксичности и гепатохронизации [1]. Процесс формирования выраженной интоксикации у человека обусловлен уникальными функциями печени: участие в сосудистых, секреторных, синтетических и метаболических реакциях. Известно, что около 75% венозной крови, содержащей значительное количество токсикантов, проходя через систему воротной вены печени, достигает органов желудочно-кишечного тракта. При этом ферменты, метаболизирующие химические соединения ("загрязнители"), детоксицируют одни ксенобиотики, но активируют токсичность других [1, 2]. В ответ на действие неблагоприятных факторов (гипоксия, ишемия, действие токсических веществ) клетки теряют жизнеспособность, и их гибель может наступить в течение нескольких минут или развиваться на протяжении многих часов. Быстрая ("случайная") гибель клеток, согласно некротическому сценарию, связана с потерей АТФ, нарушением баланса ионов, активацией гидролитических ферментов лизосом, а также с повреждением митохондрий и самих гепатоцитов. Непосредственными причинами гибели клетки в результате повреждения митохондрий являются снижение уровня АТФ и накопление внутриклеточного Ca^{++} [3,4]. Но митохондрий в клетке много, поэтому как снижение уровня АТФ, так и резкое повышение содержания кальция может произойти только, если уве-

личение проницаемости для ионов внутренней мембраны охватит большое количество митохондрий [4]. Однако, это происходит далеко не всегда. Большинство клеток обладают особым механизмом, который инициирует их гибель в ситуациях, когда большая часть компонентов клетки еще не получила необратимых повреждений. При этом наблюдают сморщивание клетки, на ее поверхности образуются выпячивания, а хроматин фрагментируется. На поверхности такой клетки появляются атрактанты для макрофагов, а сама она подлежит фагоцитозу [5]. Этот процесс, названный "запрограммированной" смертью или апоптозом, имеет существенное физиологическое значение — избавляет организм от ставших ненужными клеток. С другой стороны, обширный апоптоз наблюдается при многих заболеваниях и может оказаться основным механизмом клеточной гибели в пораженной ткани [6-8]. В последние годы было показано, что апоптоз также включает в себя нарушение барьерных свойств мембраны митохондрий с выходом цитохрома с в цитоплазму клетки [3,4].

В обзоре проанализированы имеющиеся данные об особенностях токсикант-зависимых механизмов апоптоза печеночных клеток в рамках митохондриального сценария его развития.

Особенности процессов гепатотоксичности

В печени осуществляется синтез, ретенция, секреция желчных кислот и экскреция потенциальных эндогенных токсинов, таких как билирубин [2,5]. Токсикант-индуцируемое повреждение гепатоцитов и клеток желчных протоков способствует

развитию холестаза. Холестаз, в свою очередь, вызывает внутрипеченочную аккумуляцию токсических желчных кислот и экскрецию продуктов, которые усугубляют деструктивные процессы в печени. Благодаря тому, что печень обладает практически не ограниченными способностями к регенерации, ее регенеративный потенциал снижает апоптотический и некротический типы клеточной гибели, что маскирует результаты диагностики токсикант-индуцированных повреждений. Кроме этого, способность клеток печени к активной пролиферации делает их существенной мишенью процесса канцерогенеза.

Печеночные паренхиматозные клетки, клетки Купфера, эндотелиоциты синусов печени, звездчатые клетки Ито, лейкоциты (в том числе нейтрофилы и моноциты) также включены в патогенез гепатотоксичности. Купферовские клетки и нейтрофилы являются источниками провоспалительных цитокинов, хемокинов, активных форм кислорода (АФК) и азота (АФА), которые провоцируют окислительный стресс в участках повреждения, индуцируемого токсикантами и/или ишемией/реперфузией [2]. Хорошо изучена роль клеток Купфера в этанол-зависимой гепатотоксичности [9,10]. Фенестрированный эндотелий синусоидов печени обладает высокой чувствительностью к ишемии/реперфузионной травме, обуславливая также изменения посттрансплантационных реакций отторжения и химиотерапией-обусловленных веноокклюзионных поражений. Активация клетками Ито синтеза коллагена способствует его гиперпродукции и вызывает развитие процессов печеночного фиброза и циррозообразования [1].

Холестаз-индуцированный апоптоз

Желчеобразование — одна из ведущих функций печени, а ее недостаточность обуславливает развитие холестаза. Ретенция желчи в гепатоцитах в период холестаза ассоциируется с апоптозом клеток печени [5]. Хотя механизмы холестаза тесно связаны с апоптотической гибелью гепатоцитов, гидрофобные молекулы желчных кислот обладают выраженной гепатотоксичностью и накапливаются в печени при развитии

холестаза-ассоциированных заболеваний [11]. Причем, эндогенная гепатотоксичность данных гидрофобных стерол-зависимых молекул наблюдается и у детей, страдающих наследственными нарушениями, связанными с транспортом солей желчных кислот через мембраны эпителия желчных протоков [12]. Недостаточность выделения желчных кислот с желчью характерна для печеночной травмы, цирроза и нарушений, обусловленных печеночной недостаточностью [12]. Эти заболевания сопровождаются существенной гепатотоксичностью желчных кислот у человека.

В культуре гепатоцитов гидрофобные молекулы желчных кислот (в частности, гликогенодезоксиколат, ГДОХ) в патофизиологически релевантных концентрациях (20-10 μM) индуцируют апоптоз, что подтверждено сморщиванием клеток, а также конденсацией и фрагментацией их ядер, активацией каспаз, фрагментацией ДНК, экстернализацией фосфатидилсерина [13]. По мнению авторов, данная модель обеспечивает получение информации о разграничении "нетоксических" механизмов апоптоза гепатоцитов и роли апоптоза в токсикант-индуцированном повреждении печени.

Известны два пути формирования апоптоза: 1) связанный с вовлечением в процесс рецепторов смерти; 2) рецептор-независимый — митохондриальный [14]. Определение рецептор-независимых механизмов апоптотической сигнализации, обусловленных токсическими влияниями желчных кислот у Fas-дефицитных мышей, осуществляли методом обработки ГДОХ. Рецептор 1 фактора некроза опухолей (TNF-R1) и Fas-белки, являющиеся преобладающими рецепторами клеточной гибели, экспрессированы на поверхности гепатоцитов [15]. Гепатоциты, изолированные от Fas-дефицитных мышей (линия lpr), оказались резистентными к развитию ГДОХ-индуцированного апоптоза, тогда как TNF-R1-дефицитные гепатоциты легко подвергались изменениям, согласно апоптотическому сценарию. Гепатоциты от Fas L-дефицитных мышей также обнаруживали высокую чувствительность к ГДОХ-стимулированному апоптозу [16]. Эти результаты свидетельствовали о существовании лиганд-независимого Fas-медиирован-

ного апоптотического пути развития клеточной гибели как части механизма, обусловленного токсическим влиянием желчных кислот, повреждения печени. Обнаружена присущая желчным протокам (после их перевязки у Fas-дефицитных животных) индукция экстрапеченочного холестаза. Отмечена возможность активации каспазы 8 (инициаторная, цистеин-аспартат протеаза) у интактных, но не Fas-дефицитных мышей. Перевязка желчных протоков у Fas-дефицитных животных сопровождалась снижением апоптотического индекса, торможением процесса повреждения печени и удлинением сроков их выживания по сравнению с контролем [17]. Авторы считают, что Fas-активация играет доминирующую роль в процессах инициации желчными кислотами гепатотоксичности.

Закономерен вопрос: какова причина Fas-активации токсическими желчными кислотами? Потенциальные механизмы могут включать альтерацию синтеза белков Fas-системы, Fas-компартиментацию и Fas-тримеризацию в мембране клетки [18]. Оказалось, что токсические желчные кислоты не ускоряют Fas-синтез, а промотируют быстрый транспорт Fas-везикул из цитоплазмы к плазматической мембране [18]. Апоптоз гепатоцитов, индуцированный желчными кислотами, зависит от транслокации Fas в мембрану гепатоцита. Однако, остается неясной роль Fas-транслокации для запуска спонтанной ассоциации доменов смерти Fas-рецептора. Предложенная авторами новая гипотеза токсикант-индуцируемого внутриклеточного транспорта рецепторов смерти с последующим их встраиванием в мембрану гепатоцита существенно дополняет хорошо изученный процесс в рамках сценария апоптотической клеточной гибели [6,19]. В целом, желчные кислоты, накапливаясь в печени при ухудшении канальцевого (по желчным протокам) транспорта, инициируют транслокацию Fas-белков из цитоплазмы в мембрану клетки и способствуют запуску апоптотического процесса в клетках печени.

Апоптоз, индуцированный

окислительным стрессом-

оксидативная клеточная травма

Токсичность АФК — феномен, обозначенный как "окислительный

стресс", впервые введен в научную литературу в 1985 г. Т.Зисом (цит. по [20]). Термины АФК, а в последнее время АФА, а также активные формы липидов (АФЛ), наряду с понятиями "свободные радикалы" и "окислительный стресс" и другие так прочно вошли в лексикон современной науки, что порой создается впечатление, что каждое словосочетание означает одно и то же. Поэтому возникает необходимость уточнения определения указанных терминов. К АФК обычно относят радикалы кислорода — супероксид $\cdot\text{O}_2^-$ и гидроксил-радикал $\cdot\text{OH}$, а также нерадикальные производные кислорода: перекись водорода H_2O_2 , гипохлорит ClO^- и озон O_3 [19]. Сюда же отнесен синглетный кислород, роль которого в фотобиологических процессах очевидна [21], но в темновых биохимических реакциях довольно спорна. К АФА относят монооксид азота и продукты его взаимодействия с кислородом и его активными формами, в частности пероксинитрит, образующийся в реакции нитроксида (часто называемый окисью азота) с супероксидом: $\cdot\text{NO} + \cdot\text{O}_2^- \rightarrow \text{ONOO}^-$. К АФЛ относят гидропероксиды ненасыщенных жирных кислот (LOOH) и свободные радикалы, участвующие в цепном (перекисном) окислении липидов. Это алкильные радикалы ($\text{L}\cdot$), алкоксильные ($\text{LO}\cdot$) и диоксид-радикалы ($\text{LOO}\cdot$) [20]. Свободные радикалы разделены на природные и чужеродные. Чужеродные образуются либо в результате метаболизма чужеродных соединений (ксенобиотиков), либо под действием ионизирующей/ультрафиолетовой радиации [21]. Природные радикалы разделяют на первичные (образуются в результате ферментативных реакций) и вторичные (образуются неферментативным путем из активных молекул, таких как пероксид водорода, липопероксиды или гипохлорит). К первичным радикалам относят семихиноны (убихинол $\cdot\text{QH}$), супероксид ($\cdot\text{O}_2^-$) и нитроксид ($\cdot\text{NO}$) [20]. Термин "окислительный стресс" по существу описывает дисбаланс между продукцией АФК/АФА/АФЛ и оксидативной защитой [20]. Мы предлагаем отдельный термин "оксидативное апоптоз-зависимое повреждение" клеток, которое может произойти в результате апоптоз-ассоциирован-

ного окислительного стресса. Этот термин необходим еще и потому, что понятие окислительный стресс весьма расплывчато и зависит от того, что именно мы называем про- и антиоксидантами. Чтобы окислительный стресс привел к окислительному апоптоз-зависимому повреждению клетки, необходимо превращение первичных ("полезных") радикалов в другие, более активные формы кислорода, азота, липидов, включая вторичные радикалы. Общая схема этих реакций представлена на рисунке.

В этих реакциях образуются высокоактивные вторичные радикалы.

Окислительный стресс и реакции воспаления при апоптоз-зависимой "токсической" патологии печени

Эндотоксемия токсического генеза, алкогольный гепатит, постишемическая/реперфузионная травма и эндотоксикант-индуцированная гепатотоксичность характеризуются системными и местными реакциями воспаления с миграцией макрофагов и нейтрофилов в сосудистое русло печени [24-26]. Основ-

синоиды печени не связана с молекулами клеточной адгезии (CAMs). Однако, полученные данные свидетельствуют об активации вазоконстрикции в синусоидах и сморщивании синусоидальных клеток. К тому же показано, что последующие стадии более устойчивой адгезии к эндотелию, трансмиграции и адгезии к гепатоцитам регулируются молекулами CAMs (ICAM-1 и VCAM-1) [30]. Экспрессия Е-селектина на поверхности эндотелия активирует нейтрофилы в процессе трансмиграции [27]. Адгезия и экстравазация нейтрофилов в синусоиды не затрагивает PECAM-1, Р-или L-селектины. Напротив, активация и адгезия нейтрофилов в постсинусоидальных венах зависит от Р-/L-селектинов и ICAM-1, соответственно [24,27]. Вовлеченность в эти процессы на лейкоцитарной поверхности представителей семейства β_2 (CD18)-интегринов оказалась критической для нейтрофил-медирированной травмы [24]. LFA-1 (CD11a/CD18) и Mac-1 (CD11/CD18) включены в трансмиграцию и адгезию к гепатоцитам [24]. Повышение уровня экспрессии Mac-1 является предвестником процесса нейтрофил-индуцированной цитотоксичности [25]. Прилипание нейтрофилов к клеткам-мишеням с помощью Mac-1 инициирует высвобождение протеаз и пролонгирует образование АФК. Причем, нейтрофилы приобретают повышенную цитотоксичность, когда мигрируют из синусоидов в субсинусоидальное пространство Диссе в условиях печеночного повреждения [29]. Для трансмиграционных процессов нейтрофилы используют сигналы хемотаксиса. Хемотоксины, генерируемые гепатоцитами, могут являться триггерами нейтрофил-индуцированной цитотоксичности [31]. Кроме того, продукты перекисления липидов обладают повышенной хемотаксической активностью [32] и способны обуславливать устойчивость и обширность повреждения. Недавно апоптическая гибель гепатоцитов была изучена в качестве потенциального индуктора экстравазации нейтрофилов и усилителя эндотоксин-индуцированного повреждения печеночной ткани [33,34].

При алкогольном гепатите повышенное количество апоптически измененных клеток печени и нейт-

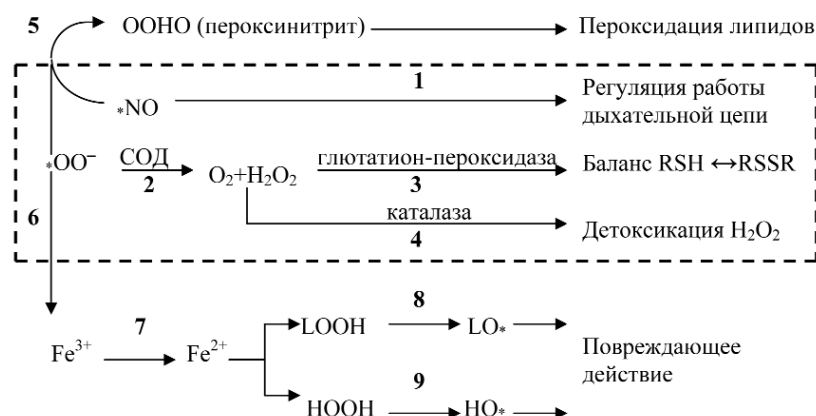


Рисунок. Механизмы действия супероксидного радикала в митохондриях [22,23].

В пунктирной рамке приведены реакции двух первичных радикалов в условиях нормального метаболизма. Окись азота участвует в регуляции интенсивности работы дыхательной цепи митохондрий (1). Супероксидный радикал под действием фермента супероксиддисмутазы (СОД) превращается в перекись водорода (2). Последняя окисляет глутатион с образованием дисульфида (3). Это влияет на редокс-потенциал цитоплазмы и способствует переходу белков тиолов в дисульфиды. Избыток перекиси водорода разлагается каталазой (4). В реакции супероксида и окиси азота образуется токсическое соединение пероксинитрит (5), способное вызывать перекисидацию липидов и необратимо нарушать работу дыхательной цепи. Супероксид может также восстанавливать трехвалентное железо (в частности, в составе железосерных комплексов) до двухвалентного. Последний обладает выраженным цитотоксическим действием благодаря реакциям с пероксидом водорода (9) и перекисями липидов (8).

ные функции этих фагоцитов -- разрушение микроорганизмов, удаление гибнущих клеток и их фрагментов и подготовка к регенерации. В результате генерации фагоцитами токсических медиаторов, окружающие здоровые клетки могут также подвергаться повреждению, что, в свою очередь, может способствовать усилению поражения печени [24, 26]. На протяжении последних 5 лет уточняется роль нейтрофилов в воспалительном поражении печеночной ткани и многих аспектов нейтрофил-медирированной цитотоксичности. Нейтрофилы мигрируют в сосуды печени в месте локального поражения тканей и генерируют хемокины и другие медиаторы воспаления, включая TNF- α ; IL-1, факторы комплемента, фактор активации тромбоцитов [27,28]. Каждый из этих медиаторов способен повышать уровни экспрессии β_2 интегринов нейтрофилов [24]. В печени нейтрофилы накапливаются в синусоидах и участвуют в процессах адгезии к венозному эндотелию [29]. Причем, миграция нейтрофилов в

рофилов коррелировало со степенью выраженности эндотоксин-индуцированного тканевого повреждения [35]. Токсическая травма эндотелия синусоидов печени может выступать как первичное звено в каскаде реакций токсикант-индуцированного повреждения печени. Авторы считают, что апоптоз гепатоцитов и экстравазация нейтрофилов является важнейшей результирующей алкогольной травмы печени. Термином "токсическая" патология печени некоторые авторы обозначают состояния, при которых гепатоциты оказываются более восприимчивыми к алкоголь-индуцированному апоптозу (цит.по[6]). Это характерно для случаев, обусловленных перегрузкой печени солями тяжелых металлов, которые часто сопровождают картину алкоголь-зависимой интоксикации. Действительно, у животных с накоплением солей тяжелых металлов в печеночной паренхиме отмечено существенное повышение количества апоптотических гепатоцитов [35]. Различные механизмы могут обуславливать развитие алкоголь-индуцированного апоптоза гепатоцитов. При этаноловой интоксикации выявлены изменения печеночной ткани вследствие развития окислительного стресса путем генерации АФК [6, 35].

Важный механизм образования свободно-радикальных форм кислорода и переокисления липидов обусловлен влиянием цитохрома P450 2E1 (CYP 2E1). Трансдукция экспрессированного CYP 2E1 гепатоцитами усиливает переокисление липидов с помощью продукции АФК и способствует последующему развитию апоптоза, возможно, в результате перенасыщения клеток арахидоновой и другими полиненасыщенными жирными кислотами (цит.по[4]). С этой изоформой гемопroteина связаны этанолюкисляющие свойства, поскольку P450 2E1 окисляет спирт до ацетальдегида. Этанол, ионы железа и полиненасыщенные желчные кислоты оказались значительно более токсичными для CYP 2E1 сверхэкспрессированных клеток (линия E9) печени, чем для клеток линии MV5 в контроле [36, 37]. Их токсичность зависела от времени и концентрации и ассоциировалась с переокислением липидов. CYP 2E1-зависимая кле-

точная гибель развивалась по апоптотическому сценарию и ассоциировалась с активацией каспазы 3 (главной эффекторной каспазой в апоптозе), блокировалась панкаспазным ингибитором [37]. Протоонкоген Bcl₂ блокировал высвобождение митохондриального цитохрома c в процессе апоптотической сигнализации, а трансфекция с помощью плазмид-содержащего Bcl₂-белка предупреждала инициацию апоптоза по митохондриальному пути развития [36]. Ионы железа и арахидоновая кислота тормозили потенциал мембраны митохондрий в CYP 2E1-сверхэкспрессированных клетках и снижали в них уровни клеточного АТФ. Звездчатые клетки печени отвечали реакцией коллагенообразования на токсигенную травму и на активацию образования АФК самими же клетками Ито [38]. В клетках линии (HepG2, E47) было обнаружено время зависимое повышение синтеза коллагена I типа после инкубации их с клетками (линия C34). Эксперименты показали, что клетки E47 генерировали АФК (H₂O₂) и инициировали высвобождение продуктов переокисления липидов, способствующих синтезу коллагена I типа клетками Ито.

Пути регуляции апоптоза: механизмы трансмембранной проницаемости митохондрий

Известно, что мембраны митохондрий играют ведущую роль в апоптозе [39-41]. Резкое изменение проницаемости мембран митохондрий при обработке ионами кальция получило название "скачок проницаемости" ("permeability transition", сокращенно РТ или МРТ) [41]. Основные показатели РТ, используемые чаще всего, это набухание митохондрий и потеря мембранного потенциала [41]. Изучение осмотического поведения митохондрий, поврежденных кальцием и фосфатом (т.е. уже набухших), показало, что в этих органеллах действительно имеется резкая граница проницаемости: она соответствует существованию пор, через которые могут проходить молекулы с молекулярной массой более 1500 Д. Эти поры называют неселективными порами внутренней митохондриальной мембраны (НСП).

В опытах с пэтч-клампом (цит. по [42]) на гигантских митохондри-

ях, полученных от крыс, содержащихся на купризовой диете, были обнаружены большие каналы в наружной мембране органелл. Ингибиторный анализ позволил предположить, что в состав каналов входит VDAC (белок порин). При этом, первоначально образованные средние каналы постепенно сливаясь формировали мегаканалы наружной мембраны митохондрий, что проявлялось в существовании нескольких уровней мембранной проводимости. Вскоре тем же методом с пэтч-клампом были получены доказательства существования больших пор и во внутренней митохондриальной мембране [42].

Причиной повреждающего действия Ca²⁺ являлась активация фосфолипазы A₂, которая содержится во внутренней мембране митохондрий. Энергизированные митохондрии (в аэробных условиях) поглощают Ca²⁺ и удаляют его из среды, тем самым защищая себя от повреждающего действия фосфолипазы A₂. В условиях аноксии и деэнергизации митохондрий Ca²⁺ выходит из органелл и активирует фосфолипазу [39]. Набухание митохондрий — это увеличение объема матрикса под действием избыточного осмотического давления внутри митохондрий по сравнению с окружающей средой. Обычно набухание объясняли образованием НСП, зависящих от кальция и осмотического давления белков матрикса. В действительности оказалось, что действие ионов Ca²⁺ обусловлено активацией фосфолипазы A₂ и последующим ростом проницаемости внутренней мембраны для катионов, которые активно накапливаются в матриксе под действием электрического поля [40]. Как отмечают авторы, это происходит до, а не после фосфорилирования белков НСП в мембране. Существует и вторая причина набухания — переокисление липидов мембран, которая приводит к окислению тиоловых групп белков и "перекисному" набуханию митохондрий по типу "p-swelling" [41].

В работе [43] набухание митохондрий в присутствии тироксина интерпретируется как обратимое образование белковых пор во внутренней мембране, а предотвращение этого набухания аденозиндифосфатом (АДФ), — как закрывание этих пор, которое обычно связывают с

взаимодействием АДФ с АТР/АДР-обменником или антипортером (ААА). Установлено [41], что белок-обменник (ААА) может формировать большие каналы в присутствии Ca^{2+} .

Важнейшим компонентом НСП считается белок наружной мембраны митохондрий — потенциал-зависимый анионный канал, VDAC ("voltage-dependent anion channel"), называемый также митохондриальным порином. Другие белки, такие как аденин нуклеозид транслокатор (ANT) — локализованный во внутренней мембране, а также кардиолипиды и циклоспорин D, обнаруженный в матриксе [41], очень тесно связаны с механизмом трансмембранной проницаемости митохондрий. Оказалось, что для образования сквозной поры в двух мембранах сначала необходимо тесное сближение их друг с другом, а для формирования дефекта в липидном слое митохондриальной мембраны определенную роль может играть также явление её "электрического пробоя" [44].

В последние годы стала очевидной центральная роль цитохрома c в развитии апоптоза. Механизм активации каспаз цитохромом c детально изучен [39]. Однако, высвобождение цитохрома c из митохондрий может быть не только пусковым фактором апоптоза, но и наоборот, следствием действия на митохондрии факторов, вызывающих апоптоз. К ним относятся белки Fas и TNF. Каскады реакций, запускаемые ими, включают активацию каспаз 8 и 1. С рецептором Fas связывается белок FADD/MORT, имеющий участок DED ("death ejector domain") [41, 45], к которому присоединяется каспаза 8 и TRADD ("TNF receptor associated protein"). При связывании Fas с рецептором происходит его агрегация и связывание каспазы 8 с DED, её превращение в активную каспазу 8, которая, в свою очередь, атакует прокаспазы 1 и 3, превращая их в активные каспазы 1 и 3 с последующим запуском всего каскада апоптотических изменений в клетке. Наряду с независимым от митохондрий путем, имеет место также путь, связанный с действием апоптогенов на мембраны митохондрий. Началом его может служить расщепление белка Bid с образованием его "усеченной" формы t-Bid [41].

Последний вызывает образование пор в мембранах митохондрий и выход цитохрома c, что приводит к активации каспазы 9 и последующему развитию каскада реакций, ведущих к апоптозу. Таким образом, выход цитохрома c может служить связующим звеном между действием апоптогенов на клетку и развитием апоптоза, а также выполнять функции так называемого "вторичного мессенджера" апоптоза [41].

Митохондриальные дисфункции при апоптоз-зависимой гепатотоксичности

Митохондриальная дисфункция является важнейшим механизмом развития неалкогольного стеатогепатита, а также цитолитического гепатита, течение которых обусловлено лекарственной гепатотоксичностью.

Неалкогольный стеатогепатит (НАГС) имеет прогрессирующее течение у больных с хронически протекающими макровезикулярным и микровезикулярным стеатозом и способствует гибели печеночных клеток, появлению телец Мелори, инфильтрации полинуклеаров, фиброзу и циррозу паренхимы печени [46]. НАГС часто встречается у больных с ожирением, а также с синдромом инсулинорезистентности, и у пациентов, находящихся на постоянном приеме кордарона, пероксилина, НПВС, антидепрессантов и др. препаратов [46]. Их катионные амфифильные молекулы накапливаются в митохондриях и тормозят их функции β -окисления и дыхания [47]. Торможение дыхательной функции индуцирует накопление АФК в митохондриях и образование продуктов перекисления липидов в жировых депо. Аналогично, злоупотребление алкоголем повышает образование АФК, продуктов перекисления липидов и способствует развитию стеатогепатита [46]. Как АФК, так и продукты перекисления липидов индуцируют высвобождение цитокинов ($\text{TGF-}\beta$, $\text{TNF-}\alpha$, IL-8), которые участвуют в прогрессировании НАГС.

Для цитолитического гепатита характерно формирование печеночных нарушений, которые могут быть обусловлены торможением митохондриального дыхания с появлением признаков печеночной недос-

точности [48,49]. Другой механизм основан на возникновении при определенных обстоятельствах стремительного роста проницаемости для ионов внутренней мембраны митохондрий (РТ). Открытие РТ-пор (каналов) способствует инициации преимущественного развития событий по некротическому или апоптотическому сценарию [46]. При этом, в тех случаях, когда большинство митохондрий в гепатоцитах вовлечено в мембранно-связанный процесс нарушения проницаемости, блокируется синтез АТФ в клетках и они гибнут по некротическому типу. И, наоборот, при незначительном вовлечении в процесс митохондрий в клетках, синтез АТФ сохранен и дальнейшие события развиваются по апоптотическому сценарию, что предупреждает развитие некроза тканей печени. В митохондриях, подвергнутых РТ, отмечается набухание матрикса, а также трансформация барьерных свойств внутренней и наружной мембран, что активирует каспазы цитозоля путем высвобождения цитохрома c [50].

Оказалось, что различные апоптогены вызывают РТ. В частности, АФК и АФА, желчные кислоты, атрактилозид, бетулиновая кислота, лонидамид могут открывать РТ-поры, в то время как салициловая и вальпроиновая кислоты способствуют только облегчению Ca^{2+} -зависимого открытия РТ-каналов [3,51]. Другие соединения из группы противоопухолевых препаратов способствуют активации экспрессии FasL в гепатоцитах и инициируют Fas- и РТ-зависимую "тотальную" клеточную гибель [52]. Более общепринятый механизм развития цитолитического гепатита предполагает цитохром P450-зависимое образование реактивных форм метаболитов, что обуславливает системную токсичность и развитие иммунных реакций. Реактивные формы метаболитов могут индуцировать повреждение ДНК и сверхэкспрессию p53 и Вах барьеров, снижение содержания глутатиона, окисление тиоловых групп белка и повышение цитозольного Ca^{2+} [53]. Вах-сверхэкспрессия, образование дисульфитов, повышение Ca^{2+} -пула в митохондриях выступают в качестве промоторов РТ и клеточной гибели. Ковалентные связи реактивных форм метаболитов с печеноч-

ными белками могут также выступать в качестве триггеров иммунного ответа [46]. И, наконец, все три механизма эффективности действия цитотоксических Т-лимфоцитов: экспрессия Fas-лиганда на клеточной поверхности, образование TNF- α и высвобождение гранзима В — могут служить инициаторами РТ при апоптоз-зависимой гибели печеночных клеток-мишеней [3,46,50].

Роль NO и пероксинитрита в процессах токсикант-индуцированного апоптоза гепатоцитов

Ранее была показана возможность инактивации образования супероксида ($\bullet\text{O}_2^-$) и монооксида ($\bullet\text{NO}_2^-$) азота при механической активации Купферовских клеток [2]. Предобработка животных (мыши, крысы) с инактивацией макрофагов декстраном, LPS или дихлорметилен дифосфонатом снижала ацетоминофеновую токсичность [54]. Индуцибельная (iNOS) синтаза экспрессировала клетки Ито и гепатоциты, в то время как ацетиминофен индуцировал iNOS в гепатоцитах крыс [55]. Экспрессию конститутивной (eNOS) синтазы обнаруживали на поверхности эндотелиоцитов сосудов печени [55].

Важную роль iNOS на примере ацетоминофеновой гепатотоксичности отметили в исследовании [54] с использованием iNOS-"нокаутированных" мышей. Хотя уровни АЛТ в плазме (биологический маркер гепатотоксичности) были низкими у iNOS-нокаутированных мышей, по сравнению с контролем, воздействие ацетиминофеном показало недостоверность морфологических отличий между группами, отличающимися по гепатотоксичности. Однако, ацетиминофен вызывал приблизительно 5-кратную индукцию синтеза NO (оцениваемую по содержанию нитратов и нитритов в плазме) у интактных животных. У iNOS-нокаутированных мышей регистрировали повышение уровней синтеза NO на фоне незначительного содержания нитротирозина. Нитротирозин у iNOS-нокаутированных мышей оказался центробулярного происхождения, что подтверждало возможную вовлечен-

ность в процесс экспрессии eNOS синтазы. Ацетоминофен не повышал перекисления липидов у интактных животных [56]. В то же время обнаружено повышение уровня малонового диальдегида у iNOS-нокаутированных мышей [59]. Авторами выдвинута гипотеза о том, что начальные этапы ацетоминофеновой гепатотоксичности включают: метаболические превращения цитохрома P450 до N-ацетил-р-бензоквинонимина ((NAPQI), истощение запасов глутатиона и образование ковалентных связей (аддуктов). У интактных животных индукция синтеза NO и генерация супероксида происходили последовательно с образованием пероксинитрита.

Обычно глутатион детоксцирует пероксинитрит [57]. После истощения запасов глутатиона и NAPQI пероксинитрит способен окислять многие макромолекулы. In vitro ацетоминофен вступает в конкурентные взаимоотношения с тирозином за реакцию с пероксинитритом, однако in vivo пероксинитрит взаимодействует с тирозином у интактных животных. У iNOS-нокаутированных мышей наблюдали повышение продукции супероксида после ацетоминофеновой нагрузки, но не синтеза NO. Супероксид был вовлечен в процесс перекисления липидов. Таким образом, ацетоминофеновая токсичность обуславливала процессы нитратообразования у интактных животных и перекисления липидов у iNOS-нокаутированных мышей. Действительно, вступая во взаимодействие с супероксидом, NO может предупреждать перекисление жиров у интактных животных [58].

Эти данные свидетельствуют о важной роли пероксинитрита в качестве медиатора гепатотоксичности и подтверждают, что NO является фактором контроля уровня супероксида в гепатоцитах. С учетом запасов глутатиона NO может запускать механизмы или токсичности, или детоксикации.

В этой связи представляет особый интерес препарат глутаргин (L-аргинин+ глютаминовая кислота), обладающий свойствами блокатора перекисления липидов в гепатоцитах, восстановителя нарушенного

желчеобразования и фактора контроля процесса хронизации.

Заклучение

Гибель клеток — необходимый этап в нормальном развитии организма, решающее звено в процессах роста, старения и развития многих заболеваний человека. Различают два механизма гибели клеток: некроз и апоптоз. Оказалось, что оба процесса связаны с повреждением митохондрий, которое включает в себя нарушение барьерных свойств митохондриальных мембран и выход цитохрома С в цитоплазму клетки.

Выяснение механизмов образования активных форм кислорода — одна из "горячих" точек современной медико-биологической науки. Решающим моментом в переключении работы дыхательной цепи митохондрий на продукцию медиаторов окислительного стресса является ингибирование дыхательной цепи продуктами перекисления липидов и активация образования избытка АФК, ведущих к высвобождению цитохрома С, апоптотической гибели клеток и развитию различных патологических состояний.

Наличие множественных механизмов инициации повреждения печеночных клеток, действующих одновременно, усугубляет тяжесть процесса тканевой деструкции. Митохондрия, в определенной степени, является селективной мишенью для гепатотоксического действия большинства токсикантов. Её дисфункция является результатом ухудшения энергетического метаболизма и развития внутриклеточного окислительного стресса с образованием чрезмерного количества токсических молекул. Индукторами дополнительной травмы печени, согласно апоптотическому и некротическому сценариям, служат CYP 2E1, желчные кислоты и многие другие эндотоксиканты. Так как существует множество основных и дополнительных механизмов токсикант-индуцированной гибели гепатоцитов — гепатотоксичность остается важной причиной изучения непереносимости и безопасности новых лекарственных соединений и их клинического применения.

1. Голиков С.Н., Саноцкий Н.В., Тиунов Л.А. Общие механизмы токсического действия. — М.: Медицина, 1986. — 279 с.
2. Winwood P.J., Arthur M.J. Kupffer cells: Their activation and role in animal models of liver injury and human liver diseases. // *Semin. Liver Dis.* — 1993. — V.13. — P.50-59.
3. Lemasters J.J. Mechanisms of hepatic toxicity. V. Necroptosis and mitochondrial permeability transition. // *Am. J. Physiol.* — 1999. — V.276. — P. G1-G6.
4. Lemasters J.J., Nieminen A.H., Qian T. et al. The mitochondrial permeability transition in cell death. // *Biochim. Biophys. Acta.* — 1998. — V.1366. — P. 177-196.
5. Patel T., Roberts L.R., Jones B.A. Dysregulation of apoptosis as a mechanism of liver disease. // *Semin. Liver Dis.* — 1998. — V.18. — P.105-114.
6. Залесский В.Н., Великая Н.В. Механизмы апоптоза при заболеваниях печени. // *Совр. пробл. токсикол.* — 2002. — №4. — С.27-32.
7. Залесский В.Н., Гавриленко Т.Н. Апоптоз при ишемии и реперфузии миокарда. // *Врач. дело.* — 2002. — №1. — С.8-15.
8. Фильченков А.А., Залесский В.Н. Апоптоз кортикальных нейронов при развитии ишемических инсультов. // *Нейрофизиология.* — 2002. — Т.34, №6. — С.468-486.
9. Freuch S.W., Shitabata P., Nash J. et al. Pathology of alcoholic liver diseases. // *Semin. Liver Dis.* — 1993. — V.13. — P.154-169.
10. Notoji S., Rust C., Stadhein L.M. et al. Hepatocyte apoptosis is a pathologic feature of human alcoholic hepatitis. // *J. Hepatol.* — 2001. — V.34. — P.248-259.
11. Rodrigues C.M.P., Fan G., Ma X. et al. A novel role for ursodeoxycholic acid in inhibiting apoptosis by modulating mitochondrial membrane perturbation. // *J. Clin. Invest.* — 1998. — V.101. — P.2790-2799.
12. Strautnieks S.S., Bull L.N., Knisely A.S. et al. A gene encoding a liver-specific ABC transporter is mutated in progressive familial intrahepatic cholestasis. // *Nat. Genet.* — 1998. — V.20. — P.233-238.
13. Patel T., Bronk S.F. and Gores G.J. Increases of intracellular magnesium promote glycodeoxycholate-induced apoptosis in rat hepatocytes. // *J. Clin. Invest.* — 1994. — V.94. — P.2183-2192.
14. Green D.R. Apoptotic pathways: The roads to ruin. // *Cell.* — 1998. — V.94. — P.695-698.
15. Faubion W.A. and Gores G.L. Death receptors in liver biology and pathobiology. — // *Hepatology.* — 1999. — V.31. — P.57-63.
16. Faubion W.A., Guicciardi M.E., Miyoshi H. et al. Toxic bile salts induce rodent hepatocyte apoptosis via activation of Fas. // *J. Clin. Invest.* — 1999. — V.103. — P.137-145.
17. Miyoshi H., Rust C., Roberts P.J. et al. Hepatocyte apoptosis after bile duct ligation in the mouse involves Fas. // *Gastroenterology.* — 1999. — V.117. — P.669-677.
18. Sodeman T., Brank S., Roberts P.J. et al. Bile salts mediate hepatocyte apoptosis by increasing cell surface trafficking of Fas. // *Amer. J. Physiol. Gastroint. Liver Physiol.* — 2002. — V.278. — P. G.992-G999.
19. Залесский В.Н., Великая Н.В. Механизмы цитотоксических эффектов активных молекул кислорода и развитие апоптоза. // *Совр. пробл. токсикол.* — 2003. — №1. — С.11-17.
20. Johnson P., Boldyrev A (Eds) Oxidative stress at molecular, cellular and organelle levels. — Trivandrum (India): Research Singpost Publ, 2002. — 142 p.
21. Залесский В.Н., Тимченко А.С., Фильченков А.А. Ультрафиолетовое облучение и апоптоз. // *Журн. АМН Украины.* — 2002. — Т.8, №2. — С.259-269.
22. Steller H. Mechanisms and genes of cellular suicide // *Science.* — 1995. — V.267. — P.1445-1449.
23. Kaplowitz N. Mechanisms of liver cell injury. // *J. Hepatol.* — 2000. — V.32 (1 Suppl). — P.39-47.
24. Jaeschke H., Smith C.W., Clemens M.G. et al. Mechanisms of inflammatory liver injury. // *Toxicol. Appl. Pharmacol.* — 1996. — V.139. — P.213-226.
25. Jaeschke H. Reactive oxygen and mechanisms of inflammatory liver injury. // *J. Gastroenterol. Hepatol.* — 2000. — V.15. — P.718-724.
26. Laskin D.L., Laskin J.D. Role of macrophages and inflammatory mediators in chemically induced toxicity. // *Toxicology.* — 2001. — V.160. — P.111-118.
27. Lawson J.A., Burns A.R., Farhood A. et al. Pathophysiological importance of E- and L-selectin for neutrophil-induced liver injury during endotoxemia in mice. // *Hepatology.* — 2000. — V.32. — P.990-998.
28. Lawson J.A., Farhood A., Hopper R.D. et al. The hepatic inflammatory response after acetaminofen overdose: Role of neutrophils. // *Toxicol. Sci.* — 2000. — V.54. — P.509-516.
29. Chosay J.G., Essani N.A., Dunn C.J. et al. Neutrophil margination and extravasation in sinusoids and venules of the liver during endotoxin-induced injury. // *Amer. J. Physiol.* — 1997. — V.272. — P. G.1195-G1200.
30. Essami N.A., Fisher M.A., Farhood A. et al. Cytokine-induced hepatic intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) messenger RNA expression its role in the pathophysiology of murine endotoxin shock and acute liver failure. // *Hepatology.* — 1995. — V.11. — P.1632-1639.
31. Maher J.J., Scott M.K., Saito J. et al. Adenovirus-mediated expression of cytokine-induced neutrophil chemoattractant in rat liver induced a neutrophilic hepatitis. // *Hepatology.* — 1997. — V.25. — P.624-630.
32. Cuzzio M., Esterbauer H., Mauro C. et al. Chemotactic activity of the lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal and homologous hydroxyaldehydes. // *Biol. Chem. Hoppe Seyler.* — 1986. — V.367. — P.321-329.
33. Jaeschke H., Fisher M.A., Lawson J.A. et al. Activation of caspase 3-like protease is essential for TNF- α -induced hepatic parenchymal cell apoptosis. // *J. Immunol.* — 1998. — V.160. — P.3480-3486.
34. Lawson J.A., Fisher M.A., Simmons C.A. et al. Parenchymal cell apoptosis as a signal for sinusoidal sequestration and transendothelial migration of neutrophils. // *Hepatology.* — 1998. — V.28. — P.761-767.
35. Ziol M., Tepper M., Lohrer M. et al. Clinical and biological relevance of hepatocyte apoptosis in alcoholic hepatitis. // *J. Hepatol.* — 2001. — V.34. — P.254-260.
36. Chen Q., Galleano M., Cederbaum A.I. Cytotoxicity and apoptosis produced by arachidonic acid in Hep G2 cells overexpressing human cytochrome P450 2E1. // *J. Biol. Chem.* — 1997. — V.272. — P.14352-14541.
37. Sakurai K., Cederbaum A.I. Oxidative stress and cytotoxicity induced by ferric-nitrosylacetate in Hep G2 cells expressing GYP2E1. // *Mol. Pharmacol.* — 1998. — V.54. — P.1024-1035.
38. Friedman S.L. Molecular regulation of hepatic fibrosis an integrated cellular response — to tissue injury. // *J. Biol. Chem.* — 2000. — V.275. — P.2247-2250.
39. Zamzami N., Kroemer G. The mitochondrion in apoptosis: how Pandora's box opens. // *Nat. Rev. Cell. Biol.* — 2001. — V.2. — P.67-71.
40. Tsujimoto Y., Shimizu S. The voltage-dependent anion channel: an essential player in apoptosis. // *Biochemie.* — 2002. — V.84. — P.187-193.
41. Mayer B., Oberbauer R. Mitochondrial regulation of apoptosis. // *News in Physiol. Sci.* — 2003. — V.18. — P.89-94.
42. Vladimirov Y.A. Physicochemical mechanisms by which the barrier function of biomembranes way by impaired in disease. — In: (Ed.) Lopukhin Y.M. Physicochemical aspects of medicine.

- Sov. Medical Reviews. — London: Harwood Acad. Publ, 1987. — P.51-127.
43. *Malkevitch V.P., Dedukhova V.I., Simonian R.A. et al.* Mitochondrial permeability transition in lethal injury of hepatocytes. // FEBS Lett. — 1997. — V.412. — P.173-178.
 44. *Пучкова Т.В.* Электронный пробой как механизм нарушения барьерной функции фосфолипидных мембран. // Автореф. дисс... канд. биол. наук. — М.: МГУ, 1991.
 45. *Cande C., Cecconi F., Dessen P.* Apoptosis-inducing factor: key to the conserved caspase — independent pathways of cell death? // Cell Sci. — 2002. — V.115. — P.4727-4734.
 46. *Pessayre D., Benson A., Fromenty B. et al.* Mitochondria in steatohepatitis. // Semin. Liver Dis. — 2001. — V.21. — P.57-69.
 47. *Berson A., De Veco V., Letterton P. et al.* Steatohepatitis-inducing drugs cause mitochondrial dysfunction and lipid peroxidation in rat hepatocytes. // Gastroenterology. — 1998. — V.114. — P.767-774.
 48. *Berson A., Renault S., Letterton P. et al.* Unconpling of rat and human mitochondria: A possible explanation for tacrine — induced liver dysfunction. // Gastroenterology. — 1996. — V.110. — P.1878-1890.
 49. *Berson A., Fan D., Fornacciari R. et al.* Mechanism for experimental buprenorphine hepatotoxicity: major role of mitochondrial dysfunction versus metabolic activation. // J. Hepatol. — 2001. — V.34. — P.261-269.
 50. *Feldmann G., Haonzi D., Morean A. et al.* Opening of the mitochondrial permeability transition pore causes matrix expansion and other membrane rupture in Fas-mediated hepatic apoptosis in mice. // Hepatology. — 2000. — V.31. — P.674-683.
 51. *Neiminen A.L., Saylor A.K., Tesfai S.A. et al.* Contribution of the mitochondrial permeability transition to lethal injury after exposure of hepatocytes to t-butylhydroperoxide. // Biochem. J. — 1995. — V.307. — P.99-106.
 52. *Muller M., Strand S., Hug H. et al.* Drug-induced apoptosis in hepatoma cells is mediated by the CD95 (APO1/Fas) receptor L system. // J. Clin. Invest. — 1997. — V.99. — P.403-413.
 53. *Haonzi D., Lekahal M., Morean A. et al.* Cytochrome P450-generated reactive metabolites cause mitochondrial permeability transition, caspase activation and apoptosis in rat hepatocytes. // Hepatology. — 2000. — V.32. — P.303-311.
 54. *Michael S.L., Pumford N.R., Mayeux P.R. et al.* Pretreatment of mice with macrophage inactivation decreases acetaminophen hepatotoxicity and formation of reactive oxygen and nitrogen species. // Hepatology. — 1999. — V.30. — P.186-195.
 55. *Muriel P.* Regulation of nitric oxide synthesis in the liver. // J. Appl. Toxicol. — 2000. — V.20. — P.189-195.
 56. *Kamiyama T., Sato C., Lin A. et al.* Role of lipid peroxidation in acetaminophen — induced hepatotoxicity. // Toxicol. Lett. — 1993. — V.66. — P.7-12.
 57. *Sies H., Sharov V., Klots L. et al.* Glutathione peroxidase products against peroxynitrite-mediated oxidation. // J. Biol. Chem. — 1997. — V.272. — P.27812-27817.
 58. *Rubbo H., Radi R., Trujillo M. et al.* Nitric oxide regulation of superoxide and peroxynitrite — dependent lipid peroxidation. // J. Biol. Chem. — 1994. — V.269. — P.26066-26075.
 59. *Michael S.L., Mayeux P.R., Bussi T.J. et al.* Acetaminophen — induced hepatotoxicity in mice lacking inducible nitric oxide synthase activity. // Nitric Oxide. — 2001. — V.5. — P.431-441.

В.М.Залеський, О.Б.Динник

МЕХАНІЗМИ ТОКСИКАНТ-ІНДУКОВАНОГО АПОПТОЗУ ПЕЧІНКОВИХ КЛІТИН

Огляд присвячено специфічним механізмам токсикант-індукованого апоптозу кооперації печінкових клітин. Оксидантний стрес призводить до апоптозу гепатоцитів через формування не-селективних пор мембрани мітохондрій (мегаканалів) за допомогою її головних білків, що супроводжується зростанням проникливості внутрішньої мембрани мітохондрій, набуханням матриксу, виходом цитохрому с. Порушення проникливості мембрани мітохондрій обумовлює появу мітохондріальної дисфункції і може сприяти розвитку некрозу або каспазо-залежного апоптозу. Мітохондріальна дисфункція є найважливішим механізмом розвитку захворювань токсико-метаболічного генезу: стеатогепатиту (неалкогольного генезу) і цитолітичного гепатиту, і супроводжується накопиченням жовчних кислот, погіршенням мітохондріального дихання і uszkodженням ДНК мітохондрій.

V.N.Zalessky, O.B.Dynnyk

MECHANISMS OF THE TOXICANT — INDUCED LIVER CELLS APOPTOSIS

This review recent advances in specific mechanisms of toxicant — induced liver cells apoptosis. Oxidative stress rise to apoptosis due to transformation of proteins (ANT3 and other) into the megacanals, pore formation in the inner membrane of mitochondria with matrix swelling and cytochrome c leakage out of mitochondria. Induction of the mitochondrial permeability transition is mechanisms causing mitochondrial failure, which can lead to necrosis from ATP depletion or caspase-dependent apoptosis. Nonalcoholic steatohepatitis and cytolytic hepatitis involve mitochondrial failure, including impairment of mitochondrial fatty, acid, inhibition of mitochondrial respiration, and damage to mitochondrial DNA.