

УДК 612.014:576.385

ВНУТРИКЛЕТОЧНЫЙ ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ СТРЕСС И АПОПТОЗ© 1999 г. Н. К. Зенков¹, Е. Б. Меньщикова¹, Н. Н. Вольский², В. А. Козлов²¹ Научно-исследовательский институт общей патологии и экологии человека СО РАМН, г. Новосибирск² Научно-исследовательский институт клинической иммунологии СО РАМН, г. Новосибирск

Проведен анализ особенностей развития окислительного стресса при индукции запрограммированной гибели клеток – апоптоза. Показано, что цитокины, стероидные гормоны и другие соединения, индуцирующие апоптоз, стимулируют продукцию клетками активированных кислородных метаболитов или снижают содержание клеточных антиоксидантов, что приводит к повреждению ДНК, нарушению функций митохондрий и изменению липидного состава мембран в результате активации радикальных окислительных процессов. Развитие окислительного стресса позволяет объяснить причины фрагментации ДНК и повышения ригидности мембран при апоптозе. Ключевым звеном цитотоксического действия активированных кислородных метаболитов является образование гидроперекисей и пероксинитрита, которые служат источниками генерации в клетках высокорезактивных форм активированных кислородных метаболитов.

ВВЕДЕНИЕ

Апоптоз (от греческого “apoptosis” – опадание лепестков цветка или листьев деревьев) представляет собой запрограммированную форму клеточной гибели, посредством которой в организме происходит удаление определенных клонов дифференцирующихся клеток или “излишков” биологического материала [3, 5]. Термин “запрограммированная гибель клеток” появился в середине 60-х годов [45], когда было показано, что для индуцированной гормонами цитодеструкции необходим синтез РНК и белка. Чтобы подчеркнуть физиологическое значение данной формы клеточной гибели, в отличие от некроза, в 1972 г. был предложен термин “апоптоз” [53]. Апоптоз выражается в деградации ДНК, заканчивается он распадом клетки на фрагменты, сохраняющие целостность внешней мембраны, и поэтому, в отличие от некроза, не сопровождается развитием воспаления и не вызывает поражения других клеток и тканей организма [3, 9]. Основные морфологические признаки апоптоза – вакуолизация и конденсация цитоплазмы и хроматина с последующей клеточной фрагментацией на апоптотические тельца, содержащие остатки ДНК и клеточные органеллы [3, 97]. На биохимическом уровне апоптоз сопровождается угнетением включения в клетки глюкозы и нуклеозидов; снижением синтеза липидов, белков и АТФ; фрагментацией ДНК в результате активации эндонуклеаз. Так как разрезание ДНК идет по межнуклеосомным участкам, то по длине фрагменты кратны 180–200 парам оснований, что при электрофорезе в агарозном геле дает характерную картину в виде “лестницы” [8].

Филогенетически апоптоз прослеживается от эукариот, начиная с амёб и нематод, до растений,

насекомых и животных. Типичный феномен запрограммированной гибели клеток характерен главным образом для многоклеточных организмов, однако в настоящее время он обнаружен и у четырех одноклеточных организмов, появившихся между 2 и 1 млн. лет назад и принадлежащих трем расходящимся ветвям филогенетического дерева эукариот: кинетопластидные паразиты *Trypanosoma cruzi* и *Trypanosoma brucei shodensiense*, свободноживущие миксомицеты *Dictyostelium discoideum* и реснитчатые *Tetrahymena thermophila* [11]. У некоторых прокариот зафиксированы проявления адаптации к стрессорным воздействиям, напоминающие процесс апоптоза в эукариотных организмах (фрагментация ДНК, сморщивание клеток, деградация РНК, протеолиз и синтез новых белков): скучивание клеток у *Caulobacter caryophyllus*, споруляция у *Bacillus* и *Streptomyces*, образование гетероцист у *Anabaena*, развитие бактериоидов у *Rhizobium*, образование многоклеточных агрегированных телец у *Mycobacteria*, некультивируемых, но жизнеспособных клеток у различных грамотрицательных бактерий и, что наиболее важно, способность фотосинтетических бактерий *Rhodobacter capsulatus* выделять нуклеопротеиновые частицы, представляющие все участки генома [11, 48]. Очевидно, эти реакции, названные “проапоптозом”, являются филогенетическим предшественником запрограммированной гибели клеток эукариот [48].

Несомненно, апоптоз важен не только для формирования структуры многоклеточного организма в онтогенезе (отмирание хвоста у головастика или человеческого эмбриона), но и для сохранения этой структуры, ибо даже в нормальных условиях взрослый человек сталкивается с проблемой ежедневной “утилизации” около

10^{11} полиморфноядерных лейкоцитов, которые, с одной стороны, необходимы для защиты от бактериальной агрессии, а с другой – могут эффективно поражать органы и ткани собственного организма. Запрограммированная гибель клеток важна для противоопухолевой и противовирусной защиты организма, высокая устойчивость лимфоцитов к индуцированному апоптозу может лежать в основе развития аутоиммунных патологий [9, 14]. Наблюдаемая у людей с генетическими дефектами НАДФН-оксидазы сниженная способность нейтрофилов к запрограммированной гибели [52] служит причиной незавершенности воспалительного процесса и формирования хронических гранулем. Апоптоз играет важную роль в клеточной защите от вирусных инфекций: инфицированные клетки, совершая суицид, уменьшают общую популяцию вирусов. При этом необходимо отметить, что апоптоз – достаточно быстрый процесс, весь цикл изменений клетка может пройти меньше чем за 1 ч [25]. В целях предотвращения гибели клеток некоторые вирусы способны индуцировать гены, ингибирующие апоптоз [103], что позволяет переводить инфекцию из острой литической формы в персистирующую латентную форму, при которой средняя продуктивность вируса выше [3].

Таким образом, апоптоз представляет собой физиологический процесс, необходимый для жизнедеятельности многоклеточных организмов [3, 9]. Вместе с тем показано, что гибель инсулин-продуцирующих β -клеток поджелудочной железы при сахарном диабете [32, 61], уменьшение популяции Т-хелперных лимфоцитов при СПИДе [34], гибель макрофагов, фибробластов и гладкомышечных клеток в области атеросклеротической бляшки [18], клеток синовиальной полости при ревматоидном артрите [76], нейронов при некоторых нейродегенеративных патологиях [74] происходят посредством апоптоза. Множественность физиологических и патологических проявлений апоптоза и универсальность его развития в разных клетках и тканях послужила причиной разворачивания широкого фронта исследований, направленных на изучение молекулярных механизмов развития запрограммированной гибели клеток.

Особое внимание в последние годы уделяется изучению роли активированных кислородных метаболитов (АКМ: O_2^- , O_2^1 , H_2O_2 , NO^\bullet и др.) в развитии апоптоза [26, 97]. Это связано с тем, что высокорекреационные АКМ образуются во всех аэробных клетках. В физиологических условиях их деструктивное действие сдерживается многоуровневой системой антиоксидантов; нарушение баланса в системе “АКМ–антиоксиданты” может привести к гибели клетки. Индуцированный глюкокортикоидами апоптоз тимоцитов значительно

снижался в условиях гипоксии (при содержании кислорода в атмосфере <5%) [95]. Прямое действие H_2O_2 [31], NO^\bullet [32], пероксинитрита ($ONOO^-$) [64], а также радиации, ультрафиолетового излучения [73], токсичных лекарственных препаратов [43], индуцирующих образование АКМ, вызывает апоптоз. При разных формах индуцированного апоптоза выявлены снижения активности элементов антиоксидантной защиты клеток [19, 93]. Клетки, имеющие дефекты антиоксидантной защиты, наиболее чувствительны к воздействиям, вызывающим их запрограммированную гибель [39, 86]. Кроме того, в многочисленных исследованиях показан защитный эффект антиоксидантов в этом процессе [19]. Несмотря на очевидную взаимосвязь окислительного стресса с апоптозом, роль конкретных форм АКМ в саморазрушении клеток и механизмы реализации цитотоксичности неясны. Более того, нет однозначного ответа на вопрос, чем является окислительный стресс, – следствием или индуктором функциональных изменений, сопровождающих развитие запрограммированной гибели клеток.

АПОПТОЗ ПРИ ВОСПАЛЕНИИ

Апоптоз – форма саморегуляции клеточного состава организма, он запускается в делящихся аутореактивных клонах Т-лимфоцитов тимуса, в стареющих нейтрофилах, в активно пролиферирующих клетках костного мозга в отсутствие ростовых факторов. Основная функция гранулоцитов человека и животных заключается в защите от бактериальной агрессии, для чего они имеют целый арсенал цитотоксических соединений, среди которых особое место занимают АКМ [4]. По способности нарабатывать АКМ гранулоциты превосходят все другие клетки организма, что делает их опасными не только для экзогенных бактерий и микроорганизмов, но и для тканей собственного организма. В основе таких патологических процессов, как острый респираторный дистресс-синдром – основная причина смертности послеоперационных больных – или недавно описанный аутоиммунный синдром Х, при котором происходит повреждение кровеносных сосудов, лежит высокая метаболическая активность гранулоцитов. Полиморфноядерные лейкоциты имеют три ферментативные системы генерации АКМ: мембраносвязанную НАДФН-оксидазу, пероксидазы – миелопероксидаза (МПО) в нейтрофилах и эозинофильная пероксидаза (ЭПО) в эозинофилах – и NO-синтазу. Продукция АКМ в гранулоцитах активируется в ответ на растворимые (хемотаксические пептиды, цитокины, бактериальные липополисахариды и др.) или корпускулярные (зимозан, латекс, бактерии и др.) стимулы.

Зрелые гранулоциты, циркулирующие в крови, уже имеют начальные морфологические признаки апоптоза (фрагментация ядра, конденсация хроматина), процесс их гибели развивается необратимо в течение 2–3 сут, поэтому иногда их называют “клетками-камикадзе”. Гранулоциты первыми поступают в очаг воспаления, где активируются и после гибели (преимущественно посредством апоптоза) удаляются макрофагами. Усиление продукции АКМ и развитие окислительного стресса предшествует апоптозу гранулоцитов. По-видимому, активность НАДФН-оксидазы может в значительной степени определять как спонтанное, так и индуцированное антителами, стимулирующими Fas-рецепторы, саморазрушение нейтрофилов.

В условиях гипоксии, а также при генетических нарушениях способности генерации АКМ НАДФН-оксидазой (больные хроническим гранулематозом) запрограммированная гибель клеток замедляется [52]. Короткое облучение УФ-светом [102] или добавление экзогенных O_2^- и H_2O_2 , образующихся в реакциях с ксантинооксидазой и глюкозооксидазой [82], значительно усиливали спонтанный апоптоз нейтрофилов. Напротив, каталаза и Mn-супероксиддисмутаза (Mn-SOD), но не Cu,Zn-SOD [52, 78], а также хелаторы ионов железа (дефероксамин и гидроксibenзилэтилендиамин) [82] снижали спонтанное саморазрушение выделенных нейтрофилов. Провоспалительные цитокины – интерлейкин-1 (ИЛ-1), ИЛ-2, фактор некроза опухоли- α (ФНО- α) и др. – преактивируют гранулоциты, усиливают продукцию АКМ и апоптоз клеток. В то же время ИЛ-8 в концентрации 100 нМ, напротив, активирует гранулоциты, но существенно (в среднем в 2–3 раза) снижает спонтанный и ФНО-индуцированный апоптоз нейтрофилов человека [54]; гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор ингибирует апоптоз эозинофилов, что лежит в основе развития тканевой эозинофилии. Как повышенная, так и сниженная способность гранулоцитов к генерации АКМ и саморазрушению может служить причиной хронизации воспалительного процесса, в первом случае экссудативно-деструктивного типа [4], во втором – мононуклеарного [52].

Воспалительный процесс в тканях сопровождается значительной локальной продукцией АКМ, и прежде всего – гидроперекисей [4]. Среди разных типов лимфоцитов наименее чувствительны к цитотоксическому действию перекиси водорода Т-хелперы ($CD4^+$ -Т-лимфоциты), что служит причиной увеличения соотношения Т-хелперы/Т-супрессоры в очаге воспаления при действии активированных нейтрофилов [115]. У ВИЧ-инфицированных людей отмечается уменьшение содержания Т-хелперов в результате их апоптоза. Исследова-

ния инфицированных вирусом клеток показали, что в них на 50% снижено содержание каталазы [85], а также содержание другого ингибирующего H_2O_2 белка, тиоредоксина [68]. При этом клетки становятся чувствительными к действию H_2O_2 , их саморазрушение начинается при концентрации перекиси в культуральной среде больше 10 мкМ. Апоптоз лимфоцитов ВИЧ-инфицированных людей также индуцируется стимулированными бактериями моноцитами и АКМ, возникающими в системе “гипоксантин–ксантинооксидаза”, при этом ингибирование АКМ снижает гибель клеток [34]. В бессывороточной среде инфицированные вирусом клетки не размножаются, однако их деление восстанавливается при добавлении в среду каталазы или тиоредоксина [85]. В ВИЧ-инфицированных Т-лимфоцитах снижено содержание Mn-SOD, которая индуцируется в ответ на ФНО, что делает их чувствительными к ФНО-индуцированной токсичности [58]. Таким образом, ослабление антиоксидантной защиты против H_2O_2 в Т-хелперных лимфоцитах при ВИЧ-инфекции приводит к уменьшению размеров их популяции и развитию иммунодефицитного состояния. Аналогичная повышенная способность Т-хелперов к апоптозу выявлена у людей, инфицированных вирусом герпеса [114].

ИНДУЦИРОВАННЫЙ ГОРМОНАМИ АПОПТОЗ

В организме в качестве физиологических индукторов апоптоза выступают цитокины и стероидные гормоны. Действие гормонов опосредуется через внутриклеточные рецепторные белки-факторы транскрипции, апоптоз может индуцироваться активацией или ингибированием транскрипции определенных генов, таких как c-jun, c-fos, c-myc, p53 [8]. Моделями регулируемой гормонами запрограммированной гибели клеток служит регрессия ткани простаты в ответ на удаление андрогенов и саморазрушение незрелых Т-лимфоцитов под действием повышения уровня глюкокортикоидов, которые обладают противовоспалительным и иммуносупрессирующим действием. С помощью метода РНК-гибридизации показано, что индуцированный стероидными гормонами апоптоз клеток простаты крыс [19] и клеток культуральных линий (WEN17.2 и S49.1), полученных из тимуса мышей [38], связан с активацией синтеза глутатион-S-трансферазы (КФ 2.5.1.18), которая стимулируется повышением образования АКМ. Еще в 1968 г. было отмечено сходство действия на ядра лимфоцитов кортизола и радиации, индуцирующих апоптоз [108].

Одна из главных причин развития окислительного стресса под действием стероидных гормонов – снижение уровня ферментативных антиоксидантов. Так, после 24 ч инкубации клеток WEN17.2 в

среде с дексаметазоном (1 мкМ) содержание в них каталазы и тиоредоксина снижалось до 20% от начального уровня, Mn-SOD – до 30%, Cu,Zn-SOD – до 50%, концентрация восстановленного глутатиона уменьшалась до 80% [19]. В гомогенатах обработанных глюкокортикоидами тимоцитов содержание восстановленного глутатиона снижалось параллельно возрастанию фрагментации ДНК, концентрация окисленного глутатиона также падала, так что соотношение GSH/GSSG сохранялось [25, 93]. По-видимому, аномально низкий уровень антиоксидантов может служить причиной возникновения дисбаланса в системе “АКМ–антиоксиданты”, так как анализ продукции H_2O_2 в тимоцитах при индуцированном дексаметазоном или метилпреднизолоном апоптозе показал, что содержание перекиси в первые 1–6 ч инкубации не изменяется или даже снижается [25, 107]. Вместе с тем в тимоцитах, обработанных метилпреднизолоном, апоптоз сопровождался повышением количества гидроперекисей липидов [92].

АПОПТОЗ И ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ СТРЕСС ПРИ ДЕЙСТВИИ ФНО

Как *in vivo*, так и *in vitro* многие цитокины могут индуцировать и ингибировать апоптоз. В этом плане наиболее исследованным цитокином является ФНО, впервые выделенный из сыворотки больных с бактериальными инфекциями, у которых наблюдалась регрессия опухолей [27]. ФНО представляет собой тример, состоящий из субъединиц массой 17 кДа, и действует через специфические рецепторы на поверхности клетки. Синтез ФНО осуществляется моноцитами и макрофагами в ответ на бактериальный эндотоксин. В различных типах клеток стимуляция рецепторов для ФНО вызывает быстрое возрастание внутриклеточного уровня АКМ. Так, посредством измерения образования метана в присутствии диметилсульфоксида было показано, что ФНО индуцирует продукцию ОН-радикалов в трансформированных фибробластах мыши [112], при этом образование метана увеличивалось с ростом цитотоксичности, определяемой по окраске метиленовым синим, оба показателя достигали максимальных значений после 18 ч инкубации. Обработка ФНО первичных культур человеческих фибробластов повышала продукцию O_2^- и H_2O_2 (по восстановлению нитросинего тетразолия или цитохрома *c*, а также окислению скополетина) [70].

Такие известные антиоксиданты, как тиоредоксин и N-ацетилцистеин, ингибируют ФНО-индуцированный апоптоз [26], так же как хелаторы ионов железа. Чувствительность или резистентность клеток к действию ФНО коррелирует со сниженным или повышенным уровнем супероксиддисмутазы в этих клетках. Ингибиторы проте-

инкиназы С (стауроспорин и другие) усиливают ФНО-индуцированный апоптоз фибробластов; при этом количество и аффинность рецепторов к ФНО не изменяются, но снижается экспрессия Mn-SOD (конститутивно высокая в этих клетках) [59].

Один из возможных механизмов образования АКМ при действии ФНО – нарушение функции митохондриальной цитохром-*c*-оксидазы, что проявляется в ингибировании конечного IV комплекса цепи переноса электронов с одновременным стимулированием активности сукцинатдегидрогеназы, переносящей электроны на коэнзим Q, который, в свою очередь, реагирует с O_2 с образованием O_2^- [62]. Такой энергетический дисбаланс в митохондриях, приводящий к снижению синтеза АТФ, усилению генерации АКМ и развитию окислительного стресса, вызывает радикальные нарушения мембран клеток и ДНК и, как следствие, заканчивается их гибелью. Индуцированный ФНО- α совместно с актиномицином Д апоптоз клеток линии L979 сопровождался усилением продукции АКМ в митохондриях и существенно подавлялся ингибиторами митохондриальной цепи переноса электронов ротеноном и актиномицином А, которые также снижали продукцию АКМ [91]. Во многих клетках митохондрии служат главным источником O_2^- , однако это не значит, что супероксид-анион отвечает за гибель клетки, так как в нормальных условиях 80% внутриклеточного O_2^- преобразуется в H_2O_2 в результате катализируемой СОД реакции дисмутации. Как показали эксперименты по специфическому ингибированию АКМ, H_2O_2 более эффективна, чем O_2^- , в отношении индукции апоптоза Т-лимфоцитов [34], нейтрофилов [52] и клеток опухолевой линии HL-60 [43].

Митохондрии представляют собой не только источник, но и основную мишень воздействия АКМ, при этом сохранение мембранного потенциала митохондрий, определяющего синтез АТФ, во многих случаях предотвращает апоптоз клеток [81, 87]. Часовая инкубация вирус-трансформированных фибробластов с H_2O_2 (200 мкМ) вызывала в 3 раза больше повреждений в митохондриальной ДНК по сравнению с равным фрагментом ядерной ДНК, при этом репарация митохондриальной ДНК проходила значительно медленней [111].

В условиях окислительного стресса O_2^- активирует фосфолипазу А2, что приводит к изменению липидного состава мембран митохондрий [67]. Было показано, что в межмембранном пространстве митохондрий содержится “белок самоубийства” с молекулярной массой около 50 кДа, по свойствам напоминающий протеазу, превращающую

проинтерлейкин-1 β в ИЛ-1 β . Высвобождение белка из митохондрий индуцируется O_2^- , органическими гидроперекисями, некоторыми детергентами и разобщителями окислительного фосфорилирования [6]. Возможно, что индуцированное АКМ открытие пор в митохондриях и выход "белка-самоубийцы" является одним из путей, ведущих к апоптозу.

Основную защитную функцию в митохондриях выполняет индуцируемая Mn-SOD, синтез которой усиливается в ответ на образование O_2^- . Воздействие ФНО повышает образование Mn-SOD [109], при этом клетки устойчивых к токсическому действию ФНО культуральных линий отвечают значительно большей продукцией SOD, чем чувствительные клетки. Способность ФНО и фтороболовых эфиров индуцировать синтез Mn-SOD приводит к тому, что предобработка данными соединениями эндотелиоцитов в последующем повышает их устойчивость к апоптозу, индуцированному змеиным ядом [101]. Резистентность к действию ФНО также определяется индукцией белков класса bcl-2, обладающих антиоксидантным действием и ингибирующих процессы перекисного окисления липидов в цитоплазматических и митохондриальных мембранах [22, 49].

Апоптоз может быть вызван стимуляцией Fas-белков (APO-1, CD95), экспрессируемых на лимфоцитах и других типах клеток и принадлежащих к тому же суперсемейству трансмембранных белков, в которое входят рецепторы для ФНО. Показано, что обработка анти-Fas-антителами моноцитов, экспрессирующих этот белок после их активации ИЛ-1 или ФНО, приводила к возрастанию внутриклеточного уровня АКМ (регистрируемых по флуоресценции продуктов окисления дихлорофлуоресцеина) и апоптозу, который ингибировался добавлением N-ацетилцистеина или восстановленного глутатиона. Кроме того, было также установлено, что самого по себе взаимодействия специфических антител с Fas недостаточно для индукции апоптоза: если экспрессию Fas на клетках индуцировали липополисахаридами (ЛПС), то анти-Fas-антитела не вызывали роста АКМ и апоптоза [105]. Чувствительность клеток к Fas-индуцированному саморазрушению также зависит от уровня внутриклеточных антиоксидантов. Исследование клеток мутантного клона лейкозной T-клеточной линии, устойчивых к Fas-индуцированному апоптозу, показало, что уровень в них глутатиона и активность γ -глутамилцистеинсинтетазы (ключевого фермента синтеза глутатиона) были на 150% больше, чем в клетках исходной линии, чувствительной к Fas-индуцированному апоптозу [60]. Участие АКМ в Fas-индуцированной аутодеструкции подтверждается также защитным эффектом N-ацетилцистеина,

хелатора ионов железа (дефероксамин) и спино-вых ловушек свободных радикалов [16].

NO-РАДИКАЛЫ И ЦИТОКИНЫ В ИНДУКЦИИ АПОПТОЗА

Эффективным индуктором апоптоза является ИЛ-1 β , который сам по себе или в комбинации с другими цитокинами (интерферон- γ , ФНО) активирует синтез в клетках индуцируемой NO-синтазы, что значительно усиливает продукцию NO-радикалов. В нормальных условиях NO \cdot служит важным физиологическим регулятором, действующим через цГМФ-зависимый механизм. В патологических условиях (например, при воспалении) образование NO \cdot может возрасти в десятки и сотни раз, в этом случае радикалы становятся токсичными для разных типов клеток [4]. Так, экзогенные или эндогенные NO-радикалы индуцируют запрограммированную гибель макрофагов [10] и клеток макрофагальной линии RAW264.7 [23, 71], β -клеток поджелудочной железы [32, 24], гладкомышечных клеток [75]. NO \cdot индуцирует апоптоз опухолевых клеток, поэтому генерация радикалов макрофагами, эндотелиоцитами и гладкомышечными клетками является важным элементом противоопухолевой защиты организма [42]. Предполагается, что индукция NO-синтазы служит причиной саморазрушения макрофагов в области инфаркта миокарда, вызванного в сердце кролика перевязкой левой передней нисходящей артерии [100]. Вместе с тем индуцированный дексаметазоном апоптоз нейтрофилов крыс, выделенных из перитонеальной полости после стимуляции каррагенаном, не зависел от ингибирования или индукции NO-синтазы в клетках [37]. Апоптоз гладкомышечных клеток, индуцированный экзогенными донорами NO \cdot , зависел от активности протеинкиназ C и A [75].

Механизмы противоопухолевого и антимикробного действия NO-радикалов не совсем ясны. Так, NO-радикалы могут прямо ингибировать жизненно важные ферменты клеток (НАДН-убихиноноксидоредуктаза, сукцинатубихиноноксидоредуктаза, аконитаза и др.) и тем самым вызывать их гибель или действовать через другие пути [4, 42], в частности, при взаимодействии NO \cdot с кислородом образуются окислы азота (NO $_2^-$, NO $_3^-$), которые ингибируют ДНК-лигазу, необходимую для восстановления целостности ДНК [44]. Сильный окислитель пероксинитрит (ONOO $^-$) образуется при взаимодействии NO \cdot с O_2^- : NO \cdot + O_2^- \rightarrow ONOO $^-$, константа скорости этой реакции превышает 10^9 моль $^{-1}$ с $^{-1}$. Пероксинитрит

способен окислять NH- и SH-группы белков, что приводит, в частности, к инактивации α_1 -ингибитора протеиназы, тканевого ингибитора металлопротеиназы-1, Mn- и Fe-СОД. В клетках ONOO⁻ индуцирует процессы перекисного окисления липидов в мембранах [80] и вызывает однонитевые разрывы в ДНК [84]. Существенный вклад в цитотоксическое действие пероксинитрита вносит образующийся из него OH-радикал: $\text{ONOO}^- + \text{H}^+ \longrightarrow \text{ONOOH} \longrightarrow \text{HO}^\bullet + \text{NO}_2$. Так как данная реакция не требует участия металлов переменной валентности, содержание которых в клетках в свободном виде мало, то она может быть одной из основных, приводящих к образованию гидроксильных радикалов. Пероксинитрит также вызывает образование в клетках O_2^- , что проявляется в усилении люцигенинзависимой хемилюминесценции [64].

Под действием ONOO⁻ (1–100 мМ) посредством апоптоза элиминируются опухолевые клетки линий HL-60 и U-937, но не нормальные моноциты и эндотелиоциты. Экзогенная СОД усиливала, а каталаза и N-ацетилцистеин ингибировали фрагментацию ДНК и саморазрушение клеток HL-60, индуцированное пероксинитритом [64]. Запрограммированная гибель нейрональных клеток РС12, в которых репрессирована Cu,Zn-СОД [104], и гладкомышечных клеток после 24-ч инкубации с бактериальным липополисахаридом и интерфероном- γ [77] также связывается с образованием больших количеств эндогенного ONOO⁻.

Важную роль NO-индуцированный апоптоз играет в повреждении β -клеток поджелудочной железы, отвечающих за синтез инсулина, и в развитии инсулинзависимого диабета. В экспериментах у животных диабет возникает в ответ на различные агенты (аллоксан, стрептозотозин и др.), которые индуцируют воспаление в области поджелудочной железы или около нее. В области воспаления активированные макрофаги вырабатывают большие количества NO-радикалов, ИЛ-1 β и других цитокинов. Цитокины индуцируют синтез NO[•] в эндотелиоцитах и β -клетках поджелудочной железы. Исследования *in vitro* показали, что инкубация островков Лангерганса или инсулинпродуцирующих клеток HIT-T15, полученных от крыс или человека, с ИЛ-1 β в течение 1–3 ч усиливала стимулированную глюкозой секрецию инсулина, в дальнейшем продукция инсулина снижалась; увеличение срока инкубации с ИЛ-1 β до 2 сут и более приводило к деструкции β -клеток, при этом ингибиторы NO-синтазы (N^G-мометил-L-аргинин и N^G-нитро-L-аргинин) предотвращали их повреждение, вызванное как интерлейкином, так и макрофагами [32, 61, 88]. При инкубации с цитокинами (ИЛ-1 β или ИЛ-1 β в комбинации с интерфероном- γ и ФНО) в клетках островков Лан-

герганса наблюдалось снижение активности аконитазы и синтеза белка, при этом через 36 ч инкубации ингибирование метаболической и секреторной функций клеток становилось необратимым [88]. Стрептозотозин, выступающий источником образования радикалов в клетках, также индуцировал апоптоз панкреатических клеток в культурах (HIT-T15 и RINm5F) [72].

Экзогенные и эндогенные NO-радикалы и пероксинитрит индуцируют апоптоз β -клеток, которые оказались чрезвычайно чувствительными к действию данных соединений [32, 61]. Мишенью воздействия NO-радикалов в клетках является гуанилатциклаза, активация которой приводит к синтезу цГМФ. Экзогенные доноры NO[•] индуцировали как гибель инсулинпродуцирующих клеток, так и продукцию цГМФ, при этом прямое воздействие аналогов цГМФ на клетки также вызывало апоптоз [66], что свидетельствует об участии гуанилатциклазы в индукции апоптоза. Сравнение влияния цитокинов и разных АКМ-продуцирующих систем на секретирующие инсулин клетки показало, что эффект цитокинов сходен с действием морфолиносиднонимина (SIN-1), при разложении которого в равных частях образуется NO[•] и O_2^- [32].

АПОПТОЗ, ИНДУЦИРОВАННЫЙ ОКИСЛЕННЫМИ ЛНП

Многие продукты радикальных окислительных реакций могут также индуцировать апоптоз. В развитии атеросклероза ключевую роль играют окисленные липопротеины низкой плотности (ЛНП), захват которых моноцитами и макрофагами через скэвенджер-рецепторы приводит к образованию пенных клеток и лежит в основе формирования атеросклеротической бляшки [2]. С помощью электронной микроскопии и определения фрагментации ДНК (TUNEL-метод) по краям атеросклеротической бляшки выявляются макрофаги и гладкомышечные клетки, погибающие посредством как апоптоза, так и некроза [47]. Окисленные в присутствии ионов меди или облучением УФ-светом ЛНП вызывали запрограммированную гибель человеческих моноцитов, макрофагов [18, 46], гладкомышечных клеток [51], эндотелиоцитов [36], а также нейрональных клеток дорсального ганглия крыс [79]. Индуцированный окисленными ЛНП апоптоз гладкомышечных клеток усиливался цитокинами (ФНО- α и интерферон- γ) [51]. Саморазрушение эндотелиоцитов человека, вызванное окисленными ЛНП, представляет собой кальцийзависимый процесс, ингибируется хелаторами ионов кальция, блокаторами кальциевых каналов (нифедипин, нисолдипин) и ингибитором эндонуклеаз – ауринтрикарбонной кислотой [36]. Липопротеины высокой

плотности и апопротеин А-I снижают апоптоз [99]. В то же время ингибирование $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -зависимых эндонуклеаз в моноцитах и макрофагах не влияло на цитотоксичность окисленных ЛНП [46].

Процесс окисления ЛНП сопровождается накоплением в липопротеиновых частицах разнообразных биологически активных и цитотоксичных продуктов, таких как гидроперекиси липидов, альдегиды, оксистеролы [2], которые могут индуцировать апоптоз. Так, 7-кетохолестерин в концентрациях 5–80 мкг/мл после 48 ч инкубирования с эндотелиоцитами человека или быка вызывал апоптоз [65]; 25-гидроксихолестерин в концентрации 5 мкг/мл индуцировал апоптоз гладкомышечных клеток человека после 24 ч инкубации [12]. В качестве цитотоксического компонента в окисленных ЛНП могут выступать гидроперекиси липидов. Прямое действие липидных гидроперекисей вызывало апоптоз в Т-лимфоцитах ВИЧ-инфицированных людей, в которых снижена активность глутатионпероксидазы [86], а также в нейрональных клетках [87]. При этом выявлен защитный эффект α -токоферола [39], который ингибирует перекисные радикалы в липидной фазе мембран. Кроме того, гидроперекиси в окисленных ЛНП могут служить источником образования ОН-радикалов [110], они также открывают поры во внутренней мембране митохондрий и инициируют выход ионов кальция [7]. Интересно отметить, что чувствительность митохондрий опухолевых клеток к действию гидроперекиси кумола более чем в 100 раз выше, чем чувствительность митохондрий печени [7]. Если учесть, что миелоидные клетки при остром миелолейкозе имеют достаточное содержание скэвенджер-рецепторов, то в этом случае окисленные ЛНП могут использоваться для направленной терапии данной патологии [106]. Захват макрофагами окисленных и гликозилированных ЛНП усиливает клеточную продукцию O_2^- [57]. Возможно, что деструктивный эффект окисленных ЛНП опосредован NO-синтазой [113] или протеиназами, которые активируются высвобождением ионов кальция [36]. Вместе с тем токсичность окисленных ЛНП в отношении эндотелиальных клеток из аорты быка ингибировалась донорами NO-радикалов [98].

Если сильно окисленные облучением УФ-светом или ионами Cu^{2+} ЛНП индуцировали апоптоз гладкомышечных клеток, макрофагов и фибробластов, то слабоокисленные ЛНП стимулировали пролиферацию клеток [15, 18]. Индукция пролиферации или гибели клеток – важные звенья атерогенеза, определяющие формирование и развитие атеросклеротической бляшки. Исследование действия O_2^- и H_2O_2 , образующихся в реакции ги-

поксантин–ксантинооксидаза, на гладкомышечные клетки [63] и фибробласты человека [40] показало, что супероксидный анион-радикал в низких концентрациях усиливает пролиферацию клеток, а в высоких концентрациях индуцирует апоптоз, при этом гибель клеток, по-видимому, связана с продукцией H_2O_2 и ингибируется каталазой, но не зависит от СОД. Экспозиция эндотелиоцитов из аорты быка с низкими концентрациями перекиси водорода (0.005–0.05 ммоль/л) через 24 ч приводила к их запрограммированной гибели [31]. Прямое действие низких концентраций H_2O_2 (200 мкмоль/л), гидроперекиси фосфатидилхолина (10 мкмоль/л) или окисленных ЛНП на гладкомышечные клетки усиливало синтез ДНК, в то время как высокие концентрации данных соединений и оксистеролы ингибировали синтез ДНК [96]. Пролиферативный и митогенный эффекты слабоокисленных ЛНП могут реализоваться через усиление гидролиза сфингомиелина в церамид [13].

КЛЕТОЧНАЯ ПРОЛИФЕРАЦИЯ И АПОПТОЗ

В 1947 г. появилась первая публикация, показывающая, что добавление внешних прооксидантов стимулирует рост клеток [20]. В настоящее время накопилось много данных, свидетельствующих об участии АКМ и радикальных окислительных реакций в клеточной пролиферации, опухолевой трансформации клеток и их запрограммированной гибели [4, 26]. Считается, что окислительный стресс средней интенсивности, вызванный O_2^- и H_2O_2 , стимулирует пролиферацию, в то время как высокие концентрации АКМ индуцируют гибель клеток [1, 63, 69]. В этом плане апоптоз является способом ограничения клеточной пролиферации. Многие противоопухолевые препараты, так же как рентгеновское облучение или проведение фотодинамической терапии, индуцируют образование АКМ, что вызывает апоптоз опухолевых клеток [35]. Преинкубация клеток HL-60 с каталазой (500 ЕД/мл) ингибировала их саморазрушение, вызванное облучением УФ-светом и токсичными лекарственными препаратами, в то же время экзогенная СОД (400 ЕД/мл) была эффективна только в отношении УФ-индуцированного апоптоза [43].

Биологические эффекты АКМ, как правило, реализуются через каскад окислительных реакций [4], поэтому существенно зависят от соотношения продукции разных форм АКМ, наличия в среде ионов металлов переменной валентности и восстанавливающих их соединений, а также антиоксидантов. Этим можно объяснить неоднозначность действия O_2^- , NO-радикалов, H_2O_2 в отноше-

нии индукции клеточной пролиферации и апоптоза. Так, NO-радикалы обладают иммуносупрессирующим и антипролиферативным действием, ингибируют антигениндуцированный апоптоз В-лимфоцитов, каким-то образом воздействуя на синтез протоонкогенов bcl-2 [41]. Экзогенные и эндогенные NO-радикалы ингибируют вызванный удалением ростовых факторов или добавлением ФНО- α апоптоз в гепатоцитах, возможно, через стимуляцию белка теплового шока hsp70 [55] или ингибирование каспазы-3 [56]; индуцированный ангиотензином II апоптоз человеческих эндотелиоцитов также сопровождается снижением продукции NO с одновременным ингибированием каспазы-3 [33]. Предполагается, что азид и гидроксилламин подавляют саморазрушение выделенных из крови человека эозинофилов, усиливая образование NO [17]; ИЛ-1 β ингибирует запрограммированную гибель фолликулов яичника также посредством индукции синтеза NO-радикалов [29]. Условия, приводящие к увеличению внутриклеточной концентрации O_2^- , делают лимфоциты устойчивыми к Fas-индуцированному апоптозу, и наоборот – снижение уровня O_2^- увеличивает чувствительность клеток к сигналам, передаваемым через Fas-рецепторы [30]. Пероксинитрит защищает макрофаги от апоптоза, индуцированного липополисахаридом в комбинации с интерфероном- γ [89].

H_2O_2 совместно с ионами Fe^{2+} вызывала запрограммированную гибель гладкомышечных клеток, одновременно наблюдалась индукция онкогенов bcl-2 и c-fos [63]. В эндотелиоцитах перекись водорода (125–1000 мкМ) стимулирует активность NO-синтазы, которая включается в окислительное повреждение клеток [90]. Ферментативные антиоксиданты (каталаза, глутатионпероксидаза), а также α -токоферол ингибируют апоптоз, однако аскорбиновая и галловая кислоты усиливают H_2O_2 -индуцированное саморазрушение клеток [83]. Многие антиоксиданты, в том числе витамин Е, обладают выраженным антипролиферативным действием [28]. У животных (морские свинки), содержащихся на рационе с дефицитом витамина С, на 50% снижено содержание аскорбата в альвеолоцитах II типа, при этом значительно усиливается H_2O_2 -индуцированный апоптоз [21]. В то же время в присутствии ионов металлов переменной валентности аскорбиновая кислота проявляет прооксидантные свойства и усиливает окислительное повреждение клеток [94]. Анализ защитных эффектов антиоксидантов свидетельствует об особой роли в запрограммированной гибели клеток гидроперекисей липидов (LOOH) и H_2O_2 , которые служат источниками высокорекционных форм АКМ (ОН-радикалы) [43, 63, 96].

Апоптоз представляет собой актуальнейшую проблему современной биологии. Несомненно, что АКМ и окислительные реакции с их участием в той или иной степени участвуют в этом процессе. Предполагается, что в результате апоптоза выбраковываются клетки с аномально высоким уровнем продукции АКМ [6]. Вместе с тем вопрос участия АКМ в процессе апоптоза нельзя считать решенным, так как показано, что в некоторых случаях процесс протекает даже в анаэробных условиях, для которых характерно существенное снижение продукции АКМ [50]. Казалось бы, этот факт может служить прямым доказательством дополняющей (вторичной) роли окислительного стресса в индукции апоптоза. Однако нефизиологичность условий культивирования аэробных клеток в бескислородных условиях не позволяет принять данный факт за безусловный. Во многих работах не проводится глубокого анализа всех механизмов продукции АКМ и активности антиоксидантных систем. Поэтому утверждение о ведущей роли окислительного стресса в индукции апоптоза клеток не может быть отвергнуто, а требует более детального изучения.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 97-04-49356).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Вольский Н.Н., Кашлакова Н.В., Козлов В.А. // Цитология. 1988. Т. 30. № 7. С. 898.
2. Зенков Н.К., Меньщикова Е.Б. // Успехи современной биологии. 1996. Т. 116. Вып. 6. С. 729.
3. Маянский А.Н., Маянский Н.А., Абаджиди М.А., Заславская М.И. // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 1997. № 2. С. 88.
4. Меньщикова Е.Б., Зенков Н.К. // Успехи современной биологии. 1997. Т. 117. Вып. 2. С. 155.
5. Сергеев П.В., Духанин А.С., Патрашев Д.В., Никитин В.Б. // Иммунология. 1998. № 1. С. 18.
6. Скулачев В.П. // Биохимия. 1996. Т. 61. № 11. С. 2060.
7. Теплова В.В., Кудрин А.П., Евтодиенко Ю.В. // Биол. мембраны. 1997. Т. 14. С. 520.
8. Уманский С.Р. // Молекуляр. биология. 1996. Т. 30. С. 487.
9. Ярилин А.А. // Иммунология. 1996. № 6. С. 10.
10. Albina J.E., Cui S., Mateo R.B., Reichner J.S. // J. Immunol. 1993. V. 150. P. 5080.
11. Ameisen J.C. // Science. 1996. V. 272. P. 1278.
12. Ares M.P.S., Pornares M.I., Thyberg J., Junttiberggren L., Berggren P.O., Diczfalusy U., Kallin B., Bjorkhem I., Orrenius S., Nilsson J. // J. Lipid Res. 1997. V. 38. P. 2049.
13. Auge N., Andrieu N., Negresalvayre A., Thiers J.C., Levade T., Salvayre R. // J. Biol. Chem. 1996. V. 271. P. 19251.

14. *Baixeras E., Bosca L., Stauber C., Gonzalez A., Carrera A.C., Gonzalo J.A., Martinez C.* // *Immunol. Rev.* 1994. V. 142. P. 53.
15. *Balagopalakrishna C., Bhunia A.K., Rifkind J.M., Chatterjee S.* // *Mol. and Cell. Biochem.* 1997. V. 170. P. 85.
16. *Banki K., Hutter E., Colombo E., Gonchoroff N.J., Perl A.* // *J. Biol. Chem.* 1996. V. 271. P. 32994.
17. *Beauvais F., Michel L., Dubertret L.* // *FEBS Letts.* 1995. V. 361. P. 229.
18. *Bjorkerud B., Bjorkerud S.* // *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vasc. Biol.* 1996. V. 16. P. 416.
19. *Briehl M.M., Cotgreave I.A., Powis G.* // *Cell Death and Differentiation.* 1995. V. 2. P. 41.
20. *Brooks M.M.* // *Science.* 1947. V. 106. P. 320.
21. *Brown L.A.S., Harris F.L., Jones D.P.* // *Amer. J. Physiol. Lung.* 1997. V. 17. P. L782.
22. *Brucekeller A.J., Begley J.G., Fu W.M., Butterfield D.A., Bredesen D.E., Hutchins J.B., Hensley K., Mattson M.P.* // *J. Neurochem.* 1998. V. 70. P. 31.
23. *Brune B., Golkel C., von Knethen A.* // *Biochem. and Biophys. Res. Communs.* 1996. V. 229. P. 396.
24. *Brune B., Messmer U.K., Sandau K.* // *Toxicol. Letts.* 1995. V. 82. P. 233.
25. *Bustamante J., Tovar A., Montero G., Boveris A.* // *Arch. Biochem. and Biophys.* 1997. V. 337. P. 121.
26. *Buttke T.M., Sadström P.A.* // *Immunol. Today.* 1994. V. 15. P. 7.
27. *Carswell E.A., Old L.J., Kassel R.L., Green S., Fiore N., Williamson B.* // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 1975. V. 72. P. 3666.
28. *Chan W.* // *Nutr. Res.* 1996. V. 16. P. 427.
29. *Chun S.Y., Eisenhauer K.M., Kubo M., Hsueh A.J.W.* // *Endocrinology.* 1995. V. 136. P. 3120.
30. *Clement M.V., Stamenkovic I.* // *EMBO J.* 1996. V. 15. P. 216.
31. *Debono D.P., Yang W.D.* // *Atherosclerosis.* 1995. V. 114. P. 235.
32. *Dimatteo M.A., Loweth A.C., Thomas S., Mabley J.G., Morgan N.G., Thorpe J.R., Green I.C.* // *Apoptosis.* 1997. V. 2. P. 164.
33. *Dimmeler S., Rippmann V., Weiland U., Haendeler J., Zeiher A.M.* // *Circulat. Res.* 1997. V. 81. P. 970.
34. *Dobmeyer T.S., Findhammer S., Dobmeyer J.M., Klein S.A., Raffel B., Hoelzer D., Helm E.B., Kabelitz D., Rossol R.* // *Free Radical Biol. and Med.* 1997. V. 22. P. 775.
35. *Dougherty T.J., Marcus S.L.* // *Europ. J. Cancer.* 1992. V. 28A. P. 1734.
36. *Escargueilblanc I., Meilhac O., Pieraggi M.T., Arnal J.E., Salvayre R., Negresalvayre A.* // *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vasc. Biol.* 1997. V. 17. P. 331.
37. *Fierro I.M., Barjafidalgo C., Canedo R.M., Cunha F.Q., Ferreira S.H.* // *Mediators Inflamm.* 1995. V. 4. P. 222.
38. *Flomerfelt F.A., Briehl M.M., Dowd D.R., Dieken E.S., Miesfeld R.L.* // *J. Cell. Physiol.* 1993. V. 154. P. 573.
39. *Fryer M.J.* // *Redox Rept.* 1995. V. 1. P. 159.
40. *Gansauge S., Gansauge F., Gause H., Poch B., Schoenberg M.H., Beger H.G.* // *FEBS Letts.* 1997. V. 404. P. 6.
41. *Genaro A.M., Hortelano S., Alvares A., Martinez C., Bosca L.* // *J. Clin. Invest.* 1995. V. 95. P. 1884.
42. *Geng Y.J., Hellstrand K., Wennmalm A., Hansson G.K.* // *Cancer Res.* 1996. V. 56. P. 866.
43. *Gorman A., McGowan A., Cotter T.G.* // *FEBS Letts.* 1997. V. 404. P. 27.
44. *Graziewicz M., Wink D.A., Laval F.* // *Carcinogenesis.* 1996. V. 17. P. 2501.
45. *Hacker G., Vaux D.L.* // *Apoptosis.* 1997. V. 2. P. 247.
46. *Hardwick S.J., Hegyi L., Clare K., Law N.S., Carpenter K.L.H., Mitchinson M.J., Skepper J.N.* // *J. Pathol.* 1996. V. 179. P. 294.
47. *Hegyi L., Skepper J.N., Cary N.R.B., Mitchinson M.J.* // *J. Pathol.* 1996. V. 180. P. 423.
48. *Hochman A.* // *Crit. Rev. Microbiol.* 1997. V. 23. P. 207.
49. *Hockenberry D.M., Oltvai Z.N., Yin X.-M., Millman C.L., Korsmeyer S.J.* // *Cell.* 1993. V. 75. P. 241.
50. *Jacobson M.D., Raff M.C.* // *Nature.* 1995. V. 374. P. 814.
51. *Jovinge S., Crisby M., Thyberg J., Nilsson J.* // *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vasc. Biol.* 1997. V. 17. P. 2225.
52. *Kasahara Y., Iwai K., Yachie A., Ohta K., Konno A., Seki H., Miyawaki T., Taniguchi N.* // *Blood.* 1997. V. 89. P. 1748.
53. *Kerr J.F., Wyllie A.H., Currie A.R.* // *Brit. J. Cancer.* 1972. V. 26. P. 239.
54. *Kettritz R., Gaido M.L., Haller H., Luft F.C., Jennette C.J., Falk R.J.* // *Kidney Int.* 1998. V. 53. P. 84.
55. *Kim Y.M., Devera M.E., Watkins S.C., Billiar T.R.* // *J. Biol. Chem.* 1997. V. 272. P. 1402.
56. *Kim Y.M., Talanian R.V., Billiar T.R.* // *J. Biol. Chem.* 1997. V. 272. P. 31138.
57. *Kimura H., Minakami H., Kimura S., Sakurai T., Nakamura T., Kurashige S., Nakano M., Shoji A.* // *Atherosclerosis.* 1995. V. 118. P. 1.
58. *Kobayashi N., Hamamoto Y., Yamamoto N., Ishii A., Yonehara M., Yonehara S.* // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 1990. V. 87. P. 9620.
59. *Kobayashi D., Watanabe N., Yamauchi N., Tsuji N., Sato T., Sasaki H., Okamoto T., Niitsu Y.* // *Chemotherapy.* 1997. V. 43. P. 415.
60. *Kohno T., Yamada Y., Hata T., Mori H., Yamamura M., Tomonaga M., Urata Y., Goto S., Kondo T.* // *J. Immunol.* 1996. V. 156. P. 4722.
61. *Kröncke K.-D., Brenner H.H., Rodriguez M.L., Etzkorn K., Kolb H., Kolbachofen V.* // *Biochim. et biophys. acta.* 1993. V. 1182. P. 221.
62. *Larrick J.W., Wright S.C.* // *FASEB J.* 1990. V. 4. P. 3215.
63. *Li P.F., Dietz R., Vonharsdorf R.* // *Circulation.* 1997. V. 10. P. 3602.
64. *Lin K.T., Xue J.Y., Sun F.F., Wong P.Y.K.* // *Biochem. and Biophys. Res. Communs.* 1997. V. 230. P. 115.
65. *Lizard G., Moisant M., Cordelet C., Monier S., Gambert P., Lagrost L.* // *J. Pathol.* 1997. V. 183. P. 330.

66. Loweth A.C., Williams G.T., Scarpello J.H.B., Morgan N.G. // FEBS Letts. 1997. V. 400. P. 285.
67. Madesh M., Balasubramanian K.A. // Arch. Biochem. and Biophys. 1997. V. 346. P. 187.
68. Masutani H., Naito M., Takahashi K., Hattori T., Koito A., Takatsuki K., Go T., Nakamura H., Fujii S., Yoshida Y., Okuma M., Yodoi J. // AIDS Res. and Human Retroviruses. 1992. V. 8. P. 1707.
69. McCord J.M. // Proc. Soc. Exptl Biol. and Med. 1995. V. 209. P. 112.
70. Meier B., Radeke H.H., Selle S., Younes M., Sies H., Resch K., Habermehl G.G. // Biochem. J. 1989. V. 263. P. 539.
71. Messmer U.K., Lapetina E.G., Brune B. // Mol. Pharmacol. 1995. V. 47. P. 757.
72. Morgan G., Cable H.C., Newcombe N.R., Williams G.T. // Biosci. Repts. 1994. V. 14. P. 243.
73. Morita A., Werfel T., Stege H., Ahrens C., Karmann K., Grewe M., Gretherbeck S., Ruzicka T., Kapp A., Klotz L.O., Sies H., Krutmann J. // J. Exptl Med. 1997. V. 186. P. 1763.
74. Nicotera P., Bonfoco E., Brune B. // Adv. Neuroimmunol. 1995. V. 5. P. 411.
75. Nishio E., Watanabe Y. // Europ. J. Pharmacol. 1997. V. 339. P. 245.
76. Nishioka K., Hasunuma T., Kato T., Sumida T., Kobata T. // Arthritis and Rheum. 1998. V. 41. P. 1.
77. O'Connor M., Salzman A.L., Szabo C. // Shock. 1997. V. 8. P. 439.
78. Oishi K., Machida K. // Scand. J. Immunol. 1997. V. 45. P. 21.
79. Papassotiropoulos A., Ludwig M., Naib-Majani W., Rao G.S. // Neurosci. Letts. 1996. V. 209. P. 33.
80. Radi R., Beckman J.S., Bush K.M., Freeman B.A. // Arch. Biochem. and Biophys. 1991. V. 288. P. 481.
81. Richter C., Schweizer M., Cossarizza A., Franceschi C. // FEBS Letts. 1996. V. 378. P. 107.
82. Rolletlabelle E., Grange M.J., Elbim C., Marquetty C., Gougerotpocidallo M.A., Pasquier C. // Free Radical Biol. and Med. 1998. V. 24. P. 563.
83. Sakagami H., Satoh K. // Anticancer Res. 1997. V. 17. P. 221.
84. Salgo M.G., Stone K., Squadrito G.L., Battista J.R., Pryor W.A. // Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1995. V. 210. P. 1025.
85. Sandstrom P.A., Roberts B., Folks T.M., Buttke T.M. // AIDS Res. and Human Retroviruses. 1993. V. 9. P. 1107.
86. Sandstrom P.A., Tebbey P.W., Cleave S.V., Buttke T.M. // J. Biol. Chem. 1994. V. 269. P. 798.
87. Satoh T., Enokido Y., Aoshima H., Uchiyama Y., Hatanaka H. // J. Neurosci. Res. 1997. V. 50. P. 413.
88. Scarim A.L., Heitmeier M.R., Corbett J.A. // Endocrinology. 1997. V. 138. P. 5301.
89. Scivittaro V., Boggs S., Mohr S., Lapetina E.G. // Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1997. V. 241. P. 37.
90. Shimizu S., Nomoto M., Naito S., Yamamoto T., Momose K. // Biochem. Pharmacol. 1998. V. 55. P. 77.
91. Shoji Y., Uedono Y., Ishikura H., Takeyama N., Nanka T. // Immunology. 1995. V. 84. P. 543.
92. Slater A.F.G., Nobel C.S.I., Maellaro E., Bustamante J., Kimland M., Orrenius S. // Biochem. J. 1995. V. 306. P. 771.
93. Slater A.F.G., Stefan C., Nobel I. // Cell Death and Differentiation. 1996. V. 3. P. 57.
94. Stadtman E.R. // Amer. J. Klin. Nutr. 1991. V. 54. P. S1125.
95. Stefanelli C., Stanic I., Bonavita F., Muscari C., Pignatti C., Rossoni C., Caldera C.M. // Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1995. V. 212. P. 300.
96. Stiko A., Regnstrom J., Shah P.K., Cercek B., Nilsson J. // Arteriosclerosis, Thrombosis and Vasc. Biol. 1996. V. 16. P. 194.
97. Stoian I., Oros A., Moldoveanu E. // Biochem. and Mol. Med. 1996. V. 59. P. 93.
98. Struck A.T., Hogg N., Thomas J.P., Kalyanaraman B. // FEBS Letts. 1995. V. 361. P. 291.
99. Suc I., Escargueiblan I., Trolly M., Salvayre R., Negre-salvayre A. // Arteriosclerosis, Thrombosis and Vasc. Biol. 1997. V. 17. P. 2158.
100. Suzuki H., Wildhirt S.M., Dudek R.R., Narayan K.S., Bailey A.H., Bing R.J. // Tissue and Cell. 1996. V. 28. P. 89.
101. Suzuki K., Nakamura M., Hatanaka Y., Kayanoki Y., Tatsumi H., Taniguchi N. // J. Biochem. Tokyo. 1997. V. 122. P. 1260.
102. Sweeney J.F., Nguyen P.K., Omann G.M., Hinshaw D.B. // J. Leukocyte Biol. 1997. V. 62. P. 517.
103. Tollefson A.E., Ryerse J.S., Scaria A. // Virology. 1996. V. 220. P. 152.
104. Troy C.M., Derossi D., Prochiantz A., Creene L.A., Shelanski M.L. // J. Neurosci. 1996. V. 16. P. 253.
105. Um H.D., Orenstein J.M., Wahl S.M. // J. Immunol. 1996. V. 156. P. 3469.
106. Vahremwald F., Galka K., Jurgens G., Bruchelt G., Girgert R., Schweizer P. // Leukemia Res. 1997. V. 21. P. 1071.
107. Wang J.F., Jerrells T.R., Spitzer J.J. // Free Radical Biol. and Med. 1996. V. 20. P. 533.
108. Whitfield J., Perris A., Youdale T. // Exptl Cell Res. 1968. V. 52. P. 349.
109. Wong G.H.W., Elwell J.H., Oberley L.W., Goeddel D.V. // Cell. 1989. V. 58. P. 923.
110. Yagi K., Kommura S., Ishida N., Nagata N., Kohno M., Oishi N. // Biochem. and Biophys Res. Commun. 1993. V. 190. P. 386.
111. Yakes F.M., Vanhouten B. // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1997. V. 94. P. 514.
112. Yamauchi N., Kuriyama H., Watanabe H., Neda H., Maeda M., Niitsu Y. // Cancer Res. 1989. V. 49. P. 1671.
113. Yang X.C., Galeno N.F., Szabolcs M., Sciacca R.R., Cannon P.J. // J. Nutrition. 1996. V. 126. P. S1072.
114. Yasukawa M., Inoue Y., Ohminami H., Terada K., Fujita S. // J. Gen. Virol. 1998. V. 79. P. 143.
115. Zoschke D.C., Staite N.D. // Clin. Immunol. and Immunopathol. 1987. V. 42. P. 160.

Intracellular Oxidative Stress and Apoptosis

N. K. Zenkov¹, E. B. Menshchikova¹, N. N. Volsky², V. A. Kozlov²

¹ *Institute of General Pathology and Human Ecology, Siberian Division, Russian Academy of Medical Sciences, Novosibirsk, Russia*

² *Research Institute of Clinical Immunology, Siberian Division, Russian Academy of Medical Sciences, Novosibirsk, Russia*

Specific features of developing an oxidative stress, when the programmed cell death (apoptosis) is induced, are analyzed. Cytokines, steroid hormones and other inducers of apoptosis are shown to stimulate generation of reactive oxygen metabolites (ROM) by cells or decrease the cellular antioxidant content leading to DNA destruction, alteration of both mitochondria functions and membrane lipid composition as a result of intensifying radical oxidative processes. The development of oxidative stress is believed to be a cause of DNA fragmentation and that of increasing membrane stability in apoptosis. Generation of hydroperoxide and peroxynitrite (sources of ROM species generation in cells) seems to be the key event in ROM cytotoxicity.