ISSN 0233-7657. Биополимеры и клетка. 1997. Т. 13. № 5

Чому і як відмирають клітини тканин і органів?

Р. С. Стойка, О. О. Фільченков[1], Б. Р. Стойка[2]

Відділення регуляторних систем клітини Інституту біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України
290005, Львів, вул. Драгоманова, 14/16

[1]Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р. Є. Кавецького НАН України
252022, Київ, вул. Васильківська, 45

[2]Львівський медичний університет
290010, Львів, вул. Пекарська, 69

В огляді охарактеризовано основні причини відмирання клітин тварин і людини, яке відбувається двома принципово відмінними шляхами, такими як апоптоз та некроз. Головну увагу звернено на механізми запрограмованої самоліквідації клітин шляхом апоптозу. Наведено дані про найважливіші гени, що керують апоптозом. Зроблено висновок про перспективність вивчення молекулярних механізмів апоптозу з метою розробки нового покоління медичних препаратів для впливу на процеси клітинної загибелі, що має місце під час різних захворювань.

Вступ. Відмирання клітин тканин і органів тварин і людини відбувається за допомогою двох різних механізмів — шляхом апоптозу або некрозу. Крім того, є підстави вважати, що загибель клітин, яка зумовлена дією цитотоксичних Т-лімфоцитів та клітин природних кілерів, поєднує риси як некрозу, так і апоптозу.

Некроз звичайно починається з пошкодження плазматичної мембрани, що веде до порушення здатності клітини підтримувати свій гомеостаз (набряк мітохондрій та цілої клітини) і, як наслідок, до руйнування клітини шляхом лізису. *In vivo* некротична смерть клітини супроводжується суттєвими пошкодженнями тканини, що призводять до активного запального процесу. Некроз має місце, коли клітини піддаються дії екстремальних чинників (наприклад, гіпоксія, гіпертермія, токсини, комплемент, літичні віруси і т. п.) (цит. по [1]).

На відміну від некрозу відмирання клітини шляхом апоптозу звичайно відбувається і за фізіологічних умов, причому клітина бере активну участь у власній загибелі («самогубство клітини»). Апоптоз виявляється під час підтримання нормального тканинного гомеостазу клітинного складу, ембріогенезу, індукції та збереження імунної толерантності, розвитку нервової системи та тканинної атрофії, зумовленої проявом ендокринних функцій. Найхарактернішими рисами апоптозу є агрегація хроматину, конденсація ядра та цитоплазми, а також фрагментація ядра та цитоплазми на оточені плазматичною мембраною везикули (апоптичні тільця), які містять конденсований ядерний матеріал, морфологічно інтактні мітохондрії та рибосоми. *In vivo* апоптичні тільця швидко впізнаються і фагоцитуються сусідніми епітеліальними клітинами або макрофагами. Це усунення апоптичних клітин *in vivo* не супроводжується запальним процесом (цит. по [1]).

Останні досягнення у вивченні молекулярних механізмів апоптозу (виявлення генів, які запобігають апоптозу, наприклад, ген *bcl-2*, та генів, які сприяють клітинній смерті, зокрема, ген *ICE*) відкривають нові перспективи у розробці медичних препаратів для лікування різних захворювань, таких як рак, нейродегенеративні розлади, СНІД, а також автоімунні та запальні процеси [2].

Що стосується смерті клітин, опосередкованої цитотоксичними клітинами імунної системи (цитотоксичні Т-клітини, клітини природних кілерів та кілерні клітини, що активуються лімфокінами), то їй притаманні властивості як апоптозу, так і некрозу. Апоптичний механізм виявляється під час індукції ефекторною імунною клітиною каскаду ав-

© Р. С. СТОЙКА, О. О. ФІЛЬЧЕНКОВ, Б. Р. СТОЙКА, 1997

толітичних процесів, зокрема, прелітичної фрагментації геномної ДНК у клітині-мішені. Під час дії некротичного механізму ефекторна імунна клітина виділяє літичні молекули, наприклад перфорин, який полімеризується у позаклітинному середовищі, утворюючи літичні пори в плазматичній мембрані клітини-мішені (цит. по [1]).

В огляді наведено характеристику головних механізмів загибелі клітин, причому особливу увагу приділяється механізмам апоптозу та його ролі у патологічних станах людини, оскільки є підстави вважати, що цим процесом можна керувати.

Коротка історія питання. Підтримання клітинного гомеостазу в тканинах і органах багатоклітинних організмів забезпечується складною динамічною рівновагою між процесами проліферації, диференціювання, старіння та відмирання клітин. Протягом останніх десятиліть головні зусилля дослідників у різних галузях біології та медицини були зосереджені на вивченні процесів проліферації та диференціювання клітин і в меншій мірі — на з'ясуванні механізмів їх старіння. Дослідження процесу відмирання клітин ще до недавнього часу були рідкістю, оскільки загибель окремих клітин розглядалася як результат процесу її випадкового пошкодження або старіння.

Можна припустити, що зацікавленість вчених у дослідженні механізмів відмирання клітин виникла при вивченні процесів, що відбуваються під час ембріогенезу багатоклітинних організмів. Адже в цей період має місце масова загибель клітин. Тому, очевидно, не випадково, що одне з перших повідомлень про можливість запрограмованої загибелі клітин було зроблене у роботі [3], де вивчалися ранні етапи онтогенезу у хребетних тварин. Автор вважає, що в період морфогенезу активується спеціальний адаптивний механізм, який сприяє видаленню «надлишкових» і/чи функціонально аномальних клітин.

Результати наступних досліджень підтвердили це припущення. Було встановлено, що запрограмована загибель клітин є досить поширеним явищем, необхідним для фізіологічної підтримки оптимальної кількості клітин у тканинах та органах тварин і людини [4]. Показано також, що апоптоз є філогенетично давнім процесом, який має місце не лише у хребетних, але й у безхребетних тварин [5], а також у рослин [6].

Ультраструктурні зміни, що відбуваються у клітині під час її запрограмованої загибелі, були вперше детально описані в 1972 р. Керром та співавт. [4]. Вони систематизували дані, що стосуються цього явища, та запропонували термін «апоптоз» для позначення процесу, протилежного до мітозу (в перекладі з грецької «апоптоз» дослівно означає «опадання», наприклад, пелюстків квітки). Апоптоз може відбуватися у нормальних та патологічно змінених тканинах.

Хоча терміни «запрограмована загибель клітини» та «апоптоз» часто вживаються як синоніми, між ними існує певна відмінність. Вперше термін «запрограмована загибель клітини» був використаний у роботі [7], присвяченій відмиранню м'язових клітин личинки комах під час її метаморфозу до дорослого метелика. Отже, під запрограмованою загибеллю клітини розуміли такий механізм її елімінації, який активується у рамках програми розвитку під час формування органів, тканин та цілого організму в період ембріо- та морфогенезу. У той самий час протягом апоптозу загибель клітини не обов'язково є запрограмованою і, навпаки, запрограмована загибель клітин не завжди здійснюється шляхом апоптозу [2]. Тому треба з певною пересторогою вживати різні синоніми терміну «апоптоз», що зустрічаються у літературі.

Основні принципи методів виявлення відмирання клітин. Більшість сучасних методів виявлення загибелі клітин у клітинній популяції базується на двох головних підходах: 1) врахування наслідків змін у проникності плазматичної мембрани та викликаному цими змінами вивільненні клітинних компонентів у позаклітинний простір чи поглинанні барвників, які нормально виключаються живими клітинами; можна визначати вивільнення з клітин як її природних складників, наприклад, цитоплазматичного ферменту лактатдегідрогенази, так і попередньо поглинених клітиною речовин, наприклад, радіоактивного тимідину [1]; 2) детекція фрагментації ДНК клітин, що відмирають (електрофорез ДНК в агарозному гелі з метою виявлення позаядерної низькомолекулярної ДНК [8], цитофлуориметричний аналіз клітинної ДНК після обробки клітин флуорохромами, які дозволяють виявити фрагментовану ДНК [9], та молекулярно-біологічні методи виявлення пошкодженої ДНК, наприклад, гібридизацією *in situ* з компонентами, які виявляють пошкоджену ДНК). Звичайно для того, щоб зробити остаточне заключення про той чи інший механізм клітинної загибелі, необхідно застосувати декілька різних методів.

Молекулярні та клітинні механізми відмирання клітин. Некроз клітин можна ще характеризувати як її патологічну загибель внаслідок дії різних екстремальних чинників, що знаходяться поза фізіологічними умовами, наприклад, висока температура, нестача кисню, токсичні речовини, тощо (цит. по [1]). Як уже відзначалося вище, клітинний некроз, як правило, починається з по-

шкодження плазматичної мембрани, що веде до втрати здатності підтримувати гомеостаз. При цьому до клітини надходить надлишок води та іонів з позаклітинного середовища. Це призводить до набряку клітини та деяких її органел, у першу чергу мітохондрій, та руйнування клітини шляхом лізису. Внаслідок розриву плазматичної мембрани вміст цитоплазми, включаючи ферменти лізосом, потрапляє у позаклітинний простір, що викликає значні пошкодження тканини та запальний процес.

Біохімічні процеси, які відбуваються під час некрозу клітини, не вимагають енергії і тому вони виявляються навіть за низьких температур (4 °С) (цит. по [1]). Клітина є пасивним учасником свого некрозу. Що стосується змін у ядрі некротичної клітини, то на морфологічному рівні вони виявляються не так швидко, як під час апоптозу. Електрофоретичний аналіз ДНК некротичних клітин свідчить про її масові розриви у випадкових точках внаслідок неспецифічної дії нуклеаз. На електрофореграмі така ДНК виглядає великою розмитою плямою, що містить фрагменти нуклеїнової кислоти різної довжини.

На відміну від некрозу, апоптоз зустрічається не лише в патологічно змінених, але і в нормальних тканинах. Найвідомішими прикладами апоптозу під час нормального розвитку хребетних тварин є регресія хвоста у пуголовків при їх метаморфозі до дорослих жаб і зникнення тканинних перетинок при розвитку кінцівок в ембріогенезі ссавців [2]. У дорослих особин ссавців апоптоз виявляється як у тканинах з повільною проліферацією клітин (епітелій протоків печінки, простати, надниркових), так і в тканинах, клітини яких постійно оновлюються (епітелій ворсинок кишечника, клітини крові, сперматогонії, що диференціюються). Апоптична смерть клітин характерна також для періоду формування гормонозалежних органів (наприклад, молочна залоза та яєчник), інволюції волосяних фолікулів, реверсії молочної залози після завершення лактації, інволюції матки після припинення вагітності [2].

Апоптоз відіграє дуже важливу роль у функціонуванні імунної системи [10]. Яскравим прикладом тут може служити елімінація авторсактивних Т-клітин у тимусі та селекція В-клітин у лімфоїдних фолікулах. За допомогою апоптозу усуваються старіючі нейтрофільні лейкоцити і мегакаріоцити, які втратили більшу частину своєї цитоплазми при утворенні тромбоцитів.

Необхідно зазначити, що апоптоз, на відміну від некрозу, є імунологічно інертним процесом [10, 11]. Тобто клітини, які гинуть внаслідок апоптозу, підлягають фагоцитозу сусідніми епітеліальними клітинами чи макрофагами, але це не викликає розвитку запальної реакції. У протилежному випадку в організмі мало б місце хронічне запалення, оскільки апоптозу підлягає велика кількість клітин в усіх тканинах та органах. У таблиці наведено порівняльну характеристику різних змін, що відбу-

Порівняльна характеристика та значення некрозу і апоптозу клітин (цит. по [1])

Некроз	Апоптоз
Морфологічні властивості	
— Втрата цілісності плазматичної мембрани	— Утворення мембранних пухирців без втрати цілісності мембрани
— Флоккуляція хроматину	— Агрегація хроматину поблизу ядерної мембрани
— Набряк та лізис клітини	— Конденсація (зморщування) клітини
— Повний лізис без утворення везикул	— Утворення везикул, оточених мембраною (апоптичні тільця)
— Набряк та дезінтеграція органел	— Органели залишаються морфологічно інтактними
Біохімічні властивості	
— Втрата регуляції іонного гомеостазу	— Регульований процес, що включає активацію та ензиматичні реакції
— Не вимагає енергії (пасивний процес, може відбуватися при 4 °С)	— Енерго(АТФ)-залежний процес (активний, вимагає фізіологічної температури)
— Розщеплення ДНК у випадкових точках (розмита пляма ДНК при електрофорезі в агарозному гелі)	— Специфічне розщеплення ДНК до моно- та олігонуклеосом («драбина» ДНК при електрофорезі в агарозному гелі)
—Післялітична фрагментація ДНК (пізній процес відмирання)	Прелітична фрагментація ДНК (ранній процес відмирання)
Фізіологічне значення	
— Відмирання груп клітин	— Відмирання одиночних клітин
— Ініціюється нефізіологічними чинниками	— Ініціюється як фізіологічними, так і нефізіологічними чинниками
— Фагоцитоз макрофагами	— Фагоцитоз сусідніми клітинами чи макрофагами
— Викликає сильний запальний процес	— Не викликає запального процесу

ваються в некротичних та апоптичних клітинах (цит. по [1]).

В окремих випадках відмінності в імунологічних реакціях, що викликаються апоптозом чи некрозом, не такі однозначні. Так, в апоптозі, що зумовлений дією на клітини бактеріальних токсинів, як правило, беруть участь нейтрофіли, макрофаги і лімфоцити. Останні необхідні не лише для ліквідації пошкоджених клітин, але й для руйнування бактеріального патогена [11].

Апоптоз спонтанно виникає практично в усіх злоякісних пухлинах, хоча фактори, які його викликають, можуть бути різними: цитотоксичні Т-лімфоцити, деякі цитокіни та ін. [2, 11]. У солідних пухлинах можуть одночасно відбуватися процеси апоптозу і некрозу. Якщо некротичні зони зосереджені переважно в центрі пухлинних вузлів, то апоптичні клітини розташовані окремо у різних ділянках пухлинної тканини [2].

Вже відзначалося, що апоптична загибель клітин є генетично запрограмованим процесом. Проте існують докази на користь участі деяких позаклітинних факторів у процесі загибелі клітин [2]. Встановлено, що апоптоз може індукуватися не лише за фізіологічних умов, але й під впливом деяких фізичних, хімічних, біологічних чинників, таких як іонізуюче випромінювання, гіпертермія, гіпоксія, дефіцит чи, навпаки, дія певних гормонів та цитокінів, активація спеціальних антигенів і ін.

Досліди з індукції апоптозу ультрафіолетовими променями [12] чи цитотоксичними препаратами [13, 14] показали, що шлях загибелі клітини (апоптоз чи некроз) визначається рівнем і тривалістю впливу агентів, які її викликають, і в значно меншій мірі — їх природою. Крім цього, важливе значення в індукції апоптозу мають такі фактори, як фаза клітинного циклу, метаболічна активність клітини, стадія диференціювання, вік організму.

Багато зусиль дослідники докладають для з'ясування молекулярних механізмів, які регулюють процеси, що відбуваються у клітинах під час їх активної загибелі. Найкраще вивчено зміни внутрішньоклітинних сигнальних систем під час апоптозу, зокрема, підвищення рівня Ca^{2+} в цитозолі, накопичення цАМФ, активація протеїнкіназ (типи А і С), продукція цераміду та ін. [15, 16].

Така різноманітність біохімічних процесів, задіяних в апоптозі, в певній мірі є відображенням великої різноманітності факторів, здатних індукувати апоптоз. Ми коротко зупинимося лише на ролі окремих генів, продукти яких можуть ініціювати або, навпаки, пригнічувати процеси апоптозу.

Ген ced-3 та його гомологи. Значного прогресу у з'ясуванні молекулярних механізмів апоптозу було досягнено під час використання такої експериментальної моделі, як примітивний плоский черв *Caenorhabditis elegans* [17]. Тіло цього мікроскопічного (1 мм) організму побудоване приблизно з 1000 соматичних клітин, причому зараз вже точно відомий шлях появи та наступна доля кожної з цих клітин, починаючи від заплідненої яйцеклітини і до тканин зрілого організму. Встановлено, що під час морфогенезу природним шляхом (внаслідок апоптозу) гине 131 клітина. Ідентифіковано гени *ced-3* і *ced-4*, продукти яких необхідні для індукції запрограмованої загибелі клітин. Показано також, що активація іншого гена — *ced-9* — перешкоджає смерті клітин ембріона [17].

Значним досягненням біологічної науки стало виявлення гена, гомологічного *ced-3*, у ссавців [18]. Встановлено, що білковий продукт цього гена подібний до цистеїнової протеїнази, яка розщеплює молекулу попередника інтерлейкіну-1β з утворенням більш низькомолекулярної зрілої форми цього цитокіна. Враховуючи таку специфічність дії, згаданий ген було названо *ICE* (interleukin-1β-converting enzyme).

Відомо, що інтерлейкін-1β є одним з головних посередників у біологічній відповіді клітин на мікробну інфекцію, запальний процес, імунологічні реакції та пошкодження тканин. Не виключено, що попередник згаданого цитокіна не є єдиним субстратом даної протеїнази. Експериментальним підтвердженням такого припущення можуть служити результати, отримані авторами [19], стосовно онкобілка MDM2 (murine double minute 2) з молекулярною масою близько 90 кДа, який зв'язується з диким типом білка *p53* (див. нижче) і негативно регулює функції останнього під час процесів транскрипції, зупинки клітинного циклу та апоптозу. Тому ген *mdm2* можна вважати онкогеном. Встановлено також, що цей ген часто ампліфікований у саркомних клітинах людини, а його продукт підлягає протеолітичному розщепленню під час апоптозу, опосередкованого p53 [19]. В іншій роботі [20] показано, що гіперекспресія білка MDM2 сприяє проліферації та перешкоджає апоптозу клітин множинної мієломи.

Припускають, що в процесі еволюції виник спеціальний механізм самоліквідації клітин шляхом апоптозу у відповідь на їх вірусне інфікування [18]. Отже, клітина, очевидно, запрограмована на те, щоб після вірусного інфікування самоліквідуватися разом з вірусними частинками, а не давати можливість поширенню інфекції на інші клітини організму.

У 1995 р. було виявлено ще один ген, гомо-

логічний гену *ced-3* нематоди та *ICE* ссавців [21]. Показано, що продукт цього гена — білок апопаїн також є цистеїновою протеїназою, мішенню для дії якої служить полі(ADP-рибозо)-полімераза. Вважається що згаданий фермент може відігравати важливу роль у процесах репарації ДНК. Крім того, під його впливом пригнічується активність Ca^{2+}/Mg^{2+}-ендонуклеази, яка забезпечує міжнуклеосомне розщеплення ДНК, що, як вказувалося вище, є одним з центральних механізмів апоптозу [21]. До речі, наслідком такого специфічного розщеплення є характерний поділ ДНК на фрагменти, кратні приблизно 190 парам нуклеотидів (відповідає одній нуклеосомі). Отже, отримані результати дозволяють вважати, що фермент апопаїн відіграє важливу роль у забезпеченні апоптичної загибелі клітин ссавців [21].

В останні роки виявлено, що існує ціла родина білків, подібних (за структурою і функціями) до CED-3/ICE протеїназ. Ці ферменти було названо каспазами (див. [22]). Каспази синтезуються у вигляді проформ, які протеолітично розщеплюються та активуються під час апоптозу. Показано, що каспаза-2 (член родини ICE) активується за умов апоптозу каспазою-3. Інгібіторний аналіз, проведений з використанням N-acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-альдегіду (специфічний пептидний інгібітор каспази-3), показав, що перший етап протеолітичного розщеплення каспази-2 здійснюється додатковою протсазою, подібною до каспази-3, але відмінною від неї за чутливістю до названого інгібітора [23].

Отже, подібно до того, як існує каскадне фосфорилювання у трансдукції регуляторного мітогенного сигналу, очевидно, може існувати каскадне протеолітичне розщеплення у механізмах передачі сигналу до апоптозу. У зв'язку з цим виникає проблема ідентифікації справжніх внутрішньоклітинних білкових мішеней для дії каспаз, задіяних в апоптозі, так само, як існує проблема ідентифікації істинних мішеней для дії специфічних протеїнкіназ, задіяних у мітогенезі.

Відомо, що різні типи мітоген-активованих протеїн(МАР)-кіназних каскадів швидко активуються у відповідь на різні зовнішньоклітинні стимули, такі як цитокіни або екстремальні чинники оточуючого середовища. Ідентифіковано нову кіназу — МАР-кіназа кіназа кіназа (MAPKKK), позначену ASK1 (apoptosis signal regulatory kinase) [24]. Показано, що гіперекспресія ASK1 індукує апоптичну загибель клітин. Цей ензим активується фактором некрозу пухлин типу α та різними екстремальними чинниками. Отримані результати дозволяють припустити, що, крім апоптичного механізму, який регулюється специфічними протеїназами, існує альтернативний апоптичний механізм, керований специфічними протеїнкіназами. Останній, зокрема ензим ASK1, очевидно, є ключовим елементом у механізмах стрес- та цитокін-індукованого апоптозу. Не виключена взаємодія цих двох (протеїназний та протеїнкіназний) механізмів у клітинах під час індукції апоптозу.

Ген bcl-2 та його гомологи. Ген *bcl-2* був відкритий у 1985 р. і отримав свою назву від В-клітинної лімфоми/лейкемії (B-cell lymphoma/leukemia), під час якої спостерігається його гіперекспресія [25]. У людини цей ген локалізований у 18-й хромосомі в ділянці 18q21. Показано, що він може піддаватися транслокації з частотою 1 на 10^6 клітин у 14-ту хромосому (ділянка 14q32), де знаходяться високоактивні енхансерні елементи генів важких ланцюгів IgH. Внаслідок такої мутації відбувається трансформація В-клітин, яка є причиною 33—54 % випадків доброякісної фолікулярної гіпертрофії лімфатичних вузлів під час розвитку інфекційного процесу. Оскільки активація гена *bcl-2* може індукувати й злоякісну трансформацію клітин, то ген *bcl-2* вважається потенційним онкогеном.

У спеціальних дослідженнях показано, що за допомогою гіперекспресії гена *bcl-2* можна запобігти апоптичній загибелі клітин щура лінії Rat-1, викликаній гіперекспресією у цих клітинах гена *ICE* [26]. До речі, структура гена *bcl-2* ссавців на 23 % гомологічна до структури гена *ced-9* нематоди [26]. Встановлено також, що експресія гена *bcl-2* людини в клітинах нематоди здатна перешкоджати їх апоптичній загибелі. Це вказує на високий ступінь функціональної консервативності цього гена [27].

Отримано й інші експериментальні докази антиапоптичної дії гена *bcl-2*. Так, трансфекція цим геном мієлоїдних та лімфоїдних клітин, ріст яких залежить від дії інтерлейкіна-3, перешкоджає апоптозу у відсутності цього цитокіна [28]. Інший приклад — симпатичні нейрони, які піддаються апоптозу у відсутності фактора росту нервової тканини, але виживають після експресії в них гена *bcl-2* [11].

Білок BCL-2 не подібний до жодного іншого і завдяки наявності в ньому ділянки, що складається з 19 гідрофобних амінокислот, може перебувати в складі плазматичної мембрани клітини, зокрема, на зовнішній стороні мітохондріальної мембрани [11]. До речі, перед апоптичною загибеллю клітин спостерігається значна втрата Ca^{2+} з їх ендоплазматичного ретикулуму. Така локалізація передбачає також його можливу роль у процесах окисного фосфорилювання. Встановлено, що клітини з висо-

ким вмістом білка BCL-2 характеризуються підвищеним потенціалом мітохондріальної мембрани, хоча невідомо, чим це викликано — зміною вмісту АТР чи поглинанням кисню.

Ген mdr-1. Множинна лікарська стійкість (multidrug resistance, MDR) — це явище, при якому пухлинні клітини, які піддаються дії одного цитостатика, набувають стійкості до дії інших структурно та функціонально несхожих хіміотерапевтичних препаратів. Відповідальним за цю властивість клітин є продукт гена *mdr-1*. Відомо, що продукт цього гена забезпечує зниження внутрішньоклітинної концентрації вищезгаданих цитотоксичних речовин. Тому є підстави вважати, що, впливаючи на експресію гена *mdr-1*, можна посилити апоптичні явища у злоякісних новоутвореннях, які не піддаються іншим методам лікування [29]. Недавно отримані дані, які свідчать на користь вірності цього припущення. Зокрема, показано, що гіперекспресія білка MDR, відповідального за появу множинної лікарської стійкості, суттєво гальмує апоптичні процеси у фібробластах яєчників китайського хом'ячка [30].

Ген p53. Білок p53, що є продуктом однойменного гена, постійно синтезується клітинами тварин і людини, але при цьому піддається дуже швидкій деградації. Проте коли в клітині відбувається пошкодження ДНК (внаслідок дії канцерогена чи іонізуючого випромінювання), то деградація p53 гальмується і він починає функціонувати. Якщо має місце масштабне пошкодження структури ДНК, то індукується синтез білків, здатних руйнувати клітини шляхом апоптозу. Коли ж порушення структури ДНК незначне, то індукується синтез спеціального білка, який «зупиняє» клітинний цикл, блокуючи дію циклінів — білків, що регулюють перебіг клітинного циклу. Вважають, що протягом такого «перепочинку» від мітозів клітина має час і можливість відновити пошкоджену структуру ДНК [21].

Білковий продукт мутованого гена *p53* є нездатним зупиняти клітинний цикл і, таким чином, володіє властивостями онкобілка. Встановлено, що клітини більшості злоякісних пухлин містять мутований ген *p53* і це є однією з причин їх трансформації. Тому, наприклад, гіперекспресія *p53* дикого типу у клітинах EJ карциноми сечового міхура веде до зупинки росту цих пухлинних клітин та їх апоптозу [31]. Цей ефект супроводжується індукцією білка p21 та репресією мітотичних циклінів (типів A і B) і білка CDC2. Зупинка росту клітин у відповідь на індукцію експресії *p53* стає незворотньою через 48—72 год.

Отримано дані, які свідчать, що лише *p53* без участі інших генів не здатний викликати апоптоз клітин карциноми прямої кишки. Крім того, показано, що експресія *p53* дикого типу гальмує розвиток багатьох доброякісних аденом прямої кишки у злоякісні карциноми за допомогою механізмів, які не включають апоптозу [32].

Є підстави вважати, що апоптоз-індукуюча та ріст-інгібуюча активності білка p53 визначаються різними доменами його структури [33]. Крім того, встановлено, що апоптоз може відбуватися не лише у клітинах, які експресують *p53*, але й у клітинах, які не експресують цього пухлинного супресора [34, 35]. Отже, крім p53-опосередкованого механізму індукції апоптозу, очевидно, існує ще й *p53*-незалежний механізм.

Відомо, що ретровіруси, які інфікують клітини, здатні розмножуватися лише під час клітинного поділу. Припускають, що зупинка клітинного поділу під час вірусної інфекції зумовлена саме функціонуванням нормального білка p53, який блокує дію регуляторів клітинного циклу — циклінів [11, 36]. Далі такі інфіковані клітини, очевидно, будуть піддаватися апоптозу.

Fas-система. Встановлено, що у функціонуванні імунної системи тварин і людини дуже важливу роль відіграє система Fas-ліганд—рецептор Fas [34—43]. Відомо, що Т-лімфоцити взаємодіють з різними чужорідними антигенами і не реагують на наявність власних клітинних компонентів. «Навчання» та селекція Т-лімфоцитів, що реагують лише на чужі антигени, відбувається за таким сценарієм. Попередники Т-клітин утворюються у кістковому мозку і тоді мігрують до тимусу. Тут незрілі Т-лімфоцити, які впізнають автоантигени, знищуються негативною селекцією за допомогою апоптозу, причому в тимусі гине понад 95 % незрілих Т-клітин. Залишаються зрілі цитотоксичні Т-клітини, які разом з природними кілерними клітинами та кілерними клітинами, що активуються лімфокінами, забезпечують імунний захист організму під час вірусної та паразитарної інфекції, неопластичної трансформації, а також при автоімунних захворюваннях та відторгненні тканинних трансплантатів [38, 39].

Селекція Т-клітин відбувається шляхом апоптозу за безпосередньою участю Fas-системи, яку ще називають системою APO-1 [40, 41]. Fas-ліганд був виявлений у плазматичній мембрані цитотоксичних Т-лімфоцитів, що зазнали апоптозу [42]. Вірусні та пухлинні антигени клітин-мішеней активують ефекторні клітини (цитотоксичні Т-лімфоцити), індукуючи в них експресію Fas-ліганда. Останній зв'язується зі своїм Fas-рецептором на клітинах-мішенях і при цьому індукується процес

активної загибелі клітин. Fas-рецептор за своєю структурою нагадує рецептор фактора некрозу пухлин [38]. Він експресується мієлоїдними клітинами, Т-лімфобластними клітинами та диплоїдними фібробластами в тимусі, печінці, серці та яєчниках. Гіперекспресія Fas-рецептора має місце в активованих зрілих лімфоцитах та лімфоцитах, трансформованих вірусами Т-клітинної лейкемії, імунодефіциту людини чи Епштейна-Барр [40, 41]. Мутації в гені Fas-рецептора викликають розвиток лімфоаденопатії та аутоімунних захворювань [38]. Можна припустити, що вивчення механізмів взаємодії Fas-ліганда з Fas-рецептором матиме важливе значення не лише для кращого розуміння принципів функціонування імунної системи, але й для з'ясування більш загальних питань, зокрема, пов'язаних з роллю апоптозу в процесах розвитку та в підтриманні клітинного гомеостазу в організмі ссавців.

Теломераза та її ген. Відомо, що кожна хромосома має на своїх закінченнях особливу структуру, що називається теломерою [44, 45]. Це — ділянка ДНК, яка складається з великої кількості (понад 1000 одиниць) нуклеотидних повторів TTAGGG. Оскільки під час реплікації ДНК фермент ДНК-полімераза не здатен забезпечувати реплікації кінцевих нуклеотидів у нитці ДНК, то з кожним наступним поділом клітини довжина хромосоми стає коротшою приблизно на 10—20 теломерних фрагментів. Після досягнення певної критичної довжини теломери останння втрачає здатність підтримувати цілісність хромосоми і в ній може відбуватися порушення структури ДНК, несумісне з нормальним існуванням клітини.

Теломераза —це клітинний ензим рибонуклеопротеїнової будови, який забезпечує відновлення довжини теломерної ділянки хромосомної ДНК [44, 45]. У більшості клітин нормальних тканин тварин і людини теломераза є неактивною. Звичайно, ці клітини піддаються апоптозу через 50—100 мітотичних поділів, починаючи від їх утворення з клітини-попередниці. Отже, якщо 1000 теломер на одному кінці хромосоми розділити на 10—20 теломер, які втрачаються під час одного клітинного циклу, то це означає, що нормальна клітина здатна пережити лише близько 50—100 мітотичних поділів.

У клітинах злоякісних пухлин ген теломерази є активним. Тому, незважаючи на свою «старість» (по кількості пройдених клітиною мітозів) та накопичення великої кількості мутаційних змін у структурі ДНК, тривалість життя злоякісних клітин практично не обмежена.

Ген теломерази постійно експресується у простих еукаріотичних одноклітинних організмів, клітини яких за сприятливих умов можуть ділитися безкінечно довго. У людини теломераза функціонує лише в ембріональних клітинах та сім'яниках, які можуть виробляти статеві клітини протягом усього життя. Отже довжину теломери можна вважати своєрідним годинником, який визначає вік клітини, вважаючи за одиницю часу один клітинний цикл.

До речі, виявлення активної теломерази в пухлинних клітинах дозволяє припустити можливість розвитку нового напрямку у розробці протипухлинних препаратів. Якщо раніше більшість таких препаратів була націлена проти злоякісних клітин, які швидко діляться (при цьому пошкоджувалися й клітини імунної системи, кісткового мозку, кишечника), то антителомеразні препарати повинні атакувати лише пухлинні клітини, оскільки їх мішень (теломераза) відсутня у нормальних клітинах. Тому не виключено, що антителомеразні препарати будуть одними з небагатьох ефективних протипухлинних засобів, що володіють мінімальною побічною дією на нормальні клітини організму.

Запропоновано кілька підходів для інгібування активності теломерази у пухлинних клітинах. Встановлено, що активність цього ензиму різко знижується під час термінального диференціювання промієлоцитарних лейкемічних клітин (лінія HL-60) людини до клітин моноцитарних та гранулоцитарних ліній [46]. Такий ефект виявлявся під дією трьох різних індукторів диференціювання, не зачіпав експресію РНК-компонента теломерази і не залежав від апоптозу, індукованого диференціюванням клітин. Зниження активності теломерази спостерігалося під час диференціювання двох ліній мишачих клітин — F9 тератокарциноми та C2C12 міобластів, але був відсутнім у випадку мишачих клітин лінії P19 ембріональної карциноми та клітин нейробластоми лінії Neuro 2a [46].

Інший підхід полягав у використанні олігонуклеотида, подібного за структурою до теломери ссавців — 5′-d(TTAGGG)-3′ [47]. Показано, що цей гексануклеотид інгібував активність теломерази у лізатах клітин, отриманих з лімфоми Беркіта. Таку ж дію виявляли і полімери цього олігонуклеотиду. Його активність перевірено також *in vivo* у безтимусних мишей, яким було імплантовано пухлинні клітини людини. Після формування пухлини тваринам вводили 5′-d(TTAGGG)-3′ або, як контроль, 5′-d(TGTGAG)-3′ протягом 14 діб за допомогою мініатюрного підшкірного насосу. Встановлено, що лише у випадку введення олігонуклеотида (50 мкг на тварину за добу), який інгібує теломеру, відбувається суттєве зниження

розмірів пухлин. Цей протипухлинний ефект залежав від дози олігонуклеотида і був специфічним лише для нього, але не інших подібних олігонуклеотидів.

Виявлено тісний взаємозв'язок між експресією антиапоптичного фактора BCL-2 та активністю теломерази. Зокрема показано, що стабільна гіперекспресія BCL-2 в пухлинних клітинах людини супроводжується підвищенням рівня активності теломерази [48]. І, навпаки, індуковане зниження експресії BCL-2 супроводжується інгібуванням активності теломерази (без помітного апоптозу) та накопиченням клітин у фазі G_0/G_1 клітинного циклу. Отримані дані свідчать про можливість використання комплексних підходів у стратегії протипухлинної терапії, коли вплив на один фактор, який викликає апоптоз, може одночасно модулювати експресію іншого фактора, від якого залежить апоптоз.

Мітохондріальна система цитодеструкцій. Як уже відзначалося, деполяризація внутрішньої мітохондріальної мембрани є одним з найбільш ранніх проявів апоптозу. Показано, що деполяризації цієї мембрани та апоптозу можна запобігти за допомогою інгібіторів, які перешкоджають утворенню пор у мембрані [49]. Вважають, що пороутворенню сприяє фермент циклофілін, інгібітором якого є циклоспорин А [50]. Участь мітохондрій та роль мітохондріальних пор в апоптозі з'ясував Кремер та співавт. [49, 51]. Використовуючи модельну систему, яка складається з мітохондрій та ядер, ці дослідники показали, що ізольовані мітохондрії апоптичних клітин викликають апоптичні зміни в ядрах контрольних клітин. Такий самий ефект досягався після додавання до нормальних мітохондрій органічного гідроперекису, мітохондріального роз'єднувача чи будь-якого іншого агента, здатного викликати утворення мітохондріальних пор. У той самий час інгібітори пороутворення — циклоспорин А та білок BCL-2 запобігали появі апоптичного ефекту. Оскільки цей ефект спостерігався також під час набрякання мітохондрій в гіпотонічному розчині чи дії детергента дигітоніна, коли порушується цілісність зовнішньої мітохондріальної мембрани, то автори припустили, що з мітохондрій може звільнятися фактор, який викликає апоптичні зміни в клітинному ядрі. Експериментальна перевірка цього припущення дозволила виявити білок з молекулярною масою 50 кДа, розміщений у міжмембранному просторі мітохондрій і здатний індукувати апоптоз. Додавання цього білка в очищеному стані до клітинних ядер викликало в них характерні апоптичні зміни.

Подальшого прогресу у з'ясуванні молекулярних механізмів апоптозу було досягнуто завдяки виявленню специфічного інгібітора білка p50. Ним виявився N-бензилоксикарбоксил-Val-Ala-Asp-фторметилкетон, який одночасно є інгібітором протеази, що бере участь у процесінгу попередника інтерлейкіну-1β [52]. Про цю протеазу вже йшла мова вище, коли розглядалися властивості гена *ced-3* та його гомологів. Показано, що структура мітохондріального білка p50 кодується ядерною ДНК і це цілком зрозуміло, враховуючи функції даного білка в апоптозі [53].

У роботі [54] припускається, що порушення цілісності мітохондріальної мембрани під час апоптозу пов'язане з утворенням цитотоксичних продуктів одноелектронного відновлення кисню, таких як супероксид O_2. Отже, апоптоз може відігравати певну роль у знищенні клітин, які стали на шлях масового утворення подібних токсичних речовин. Звичайно, цей механізм не охоплює всіх можливих причин апоптозу, але він, очевидно, є їх важливою складовою частиною.

Звичайно, цим не обмежується перелік біохімічних механізмів, задіяних під час активного відмирання клітин. Але й наведені дані дозволяють зробити висновок про те, що генетично детерміноване відмирання клітин реалізується лише за умов порушення нормального балансу між дією апоптичних та антиапоптичних механізмів. Апоптичні чинники діють через одні ефекторні системи (наприклад, продукти генів *ICE*, *p53* і ін.), а антиапоптичні чинники — через інші ефекторні системи (наприклад, продукти генів *bcl-2*, *mdr-1*, теломерази тощо). Важливо відзначити, що перешкодити апоптозу можна також, порушивши нормальне функціонування ефекторних систем апоптозу, як це має місце у випадку з мутаційним пошкодженням гена *p53*. Зупинка клітинного циклу дає нормальній клітині додатковий час для відновлення пошкодженої структури ДНК і цим допомагає їй уникнути апоптозу.

Американське товариство клінічної онкології визначило головними цілями у розвитку сучасної протипухлинної хіміотерапії створення таких препаратів, як (цит. по [55]):

— інгібітори шляхів передачі регуляторних сигналів у клітинах;

— індуктори апоптозу і/чи диференціювання;

—агенти, які безпосередньо чи опосередковано діють на ДНК;

— інгібітори теломерази;

— агенти, які впливають на цитоплазматичні мікроорганели;

— інгібітори цитоплазматичного метаболізму;

— модулятори множинної лікарської стійкості;

— невідомі та комплексні мішені для дії протипухлинних препаратів.

Аналіз цього списку потенційних протипухлинних препаратів з урахуванням даних, наведених в нашому огляді, свідчить про те, що більшість препаратів прямо чи опосередковано зачіпає механізми апоптозу.

Узагальнення. Відмирання клітин тканин і органів тварин і людини відіграє дуже важливу роль в організмі не лише під час нормального морфогенезу, але й при реакції організму на патогенні інфекції та різні клітинні пошкодження, що не підлягають відновленню. Активна загибель клітин шляхом апоптозу, що відбувається у невідповідний період часу чи/і у невідповідному місці організму, очевидно, може лежати в основі багатьох захворювань людини, тоді як втрата здатності клітин до апоптозу може сприяти їх злоякісній трансформації. З іншого боку, самоліквідація клітин шляхом апоптозу запобігає збереженню злоякісно трансформованих клітин. Крім того, опосередковане імунними клітинами відмирання клітин має важливе значення у функціонуванні імунної системи. Все це робить пошук шляхів регулювання відмирання клітин надзвичайно важливим під час створення різноманітних терапевтичних препаратів, необхідних для лікування цілого ряду захворювань, і в першу чергу — онкологічних (див., наприклад, [56]).

Р. С. Стойка, А. А. Фильченков, Б. Р. Стойка

Почему и как отмирают клетки тканей и органов?

Резюме

В обзоре сделан анализ основных причин отмирания клеток тканей и органов животных и человека путем апоптоза и некроза. Главное внимание уделено механизмам запрограммированной самоликвидации клеток путем апоптоза. Приведены данные о наиболее важных генах, регулирующих процесс апоптоза. Сделан вывод о перспективности изучения молекулярных механизмов апоптоза для разработки медицинских препаратов нового поколения, которые могли бы оказывать влияние на процессы гибели клеток, имеющей место при различных заболеваниях.

R. S. Stoika, A. A. Phylchenkov, B. R. Stoika

Why and how do cells die?

Summary

Review gives characteristics of the main causes of cell death in tissues and organs of animals and man — apoptosis and necrosis. The main attention is paid to the mechanisms of programmed cellular suicide by apoptosis. The data are provided about the most important genes which are engaged in the regulation of apoptosis. It is concluded that study of molecular mechanisms of apoptosis can be useful in the elaboration of new generation of drugs for effecting the processes of cell death occurring during different diseases.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. *Trauth B. C., Keesey J.* Cell death // Guide to cell proliferation and apoptosis methods.—Boehringer Mannheim,1995.—P. 34—62.
2. *Kerr J. F. R., Winterford C. M., Harmon B. V.* Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy // Cancer.—1994.—73.—P. 2013—2026.
3. *Glucksmann A.* Cell death in normal and vertebrate ontogeny // Biol. Rev.—1951.—26.—P. 59—86.
4. *Kerr J. F. R., Wyllie A. H., Currie A. R.* Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics // Br. J. Cancer.—1972.—26.—P. 239—257.
5. *Saunders J. W.* Death in embryonic systems. Death of cells is the usual accompaniment of embryonic growth and differentiation // Science.—1966.—154.—P. 604—612.
6. *Greenberg J. T., Guo A. L., Klessig D. F., Ausubel F. M.* Programmed cell death in plants: a pathogen-triggered response activated coordinately with multiple defense functions // Cell.—1994.—77.—P. 551—563.
7. *Lockshin R. A., Williams C. M.* Programmed cell death. IV. The influence of drugs on the breakdown of the intersegmental muscles of silkmoths // J. Insect. Physiol.—1965.—11.—P. 803—809.
8. *Кудрявец Ю. И., Фильченков А. А., Абраменко И. В. и др.* Динамика апоптических событий, индуцированных фактором некроза опухолей в лейкозных клетках U-937 // Эксперим. онкология.—1996.—18.—С. 353—365.
9. *Kudryavets Yu. I., Phylchenkov A. A., Slukvin I. I. et al.* Transferrin receptor expression in human leukemia U-937 cells under TNF-induced apoptosis // Med. and Biol. Environ.—1996.—24.—P. 71—79.
10. *Cohen J. J.* Programmed cell death in the immune system // Adv. Immunol.—1991.—50.—P. 55—85.
11. *Reed J. C. Bcl-2* and the regulation of programmed cell death // J. Cell. Biol.—1994.—124.—P. 1—6.
12. *Martin S. J., Cotter T. G.* Ultraviolet B irradiation of human leukemia HL-60 cells *in vitro* induces apoptosis // Int. J. Radiat. Biol.—1991.—59.—P. 1001—1016.
13. *Matsubara K., Kubota M., Kuwakado K. et al.* Induction of apoptosis in childhood acute leukemia by chemotherapeutic agents: failure to detect evidence of apoptosis *in vivo* // Eur. J. Haematol.—1994.—52.—P. 47—52.
14. *Begleiter A., Lee K., Israels L. G. et al.* Chlorambucil induced apoptosis in chronic leukocytic leukemia (CLL) and its relationship to clinical efficacy // Leukemia.—1994.—8.—P. 103—106.
15. *Leist M., Nicotera P.* The shape of cell death // Biochem. and Biophys. Res. Communs.—1997.—236.—P. 1—9.
16. *McGill G., Fisher D. E.* Apoptosis in tumorigenesis and cancer therapy // Front. Biosci.—1997.—2.—P. 353—379.
17. *Horvitz H. R.* Genetic control of programmed cell death in the nematode *Caenorhabditis elegans* // Apoptosis / Eds E. Minich, R. T. Schimke.—New York: Plenum press, 1994.—P. 1—12.
18. *Yuan J., Shaham S., Ledoux S. et al.* The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1β-converting enzyme // Cell.—1993.—76.—P. 641—652.
19. *Chen L., Marechal V., Moreau J. et al.* Proteolytic cleavage of the *mdm2* oncoprotein during apoptosis // J. Biol. Chem.—1997.—272.—P. 22966—22973.
20. *Teoh G., Urashima M., Agata A. et al. MDM2* protein overexpression promotes proliferation and survival of multiple myeloma cells // Blood.—1997.—90.—P. 1982—1992.
21. *Nicholson D. W., Ali A., Thornberry N. A.* Identification and

inhibition of the *ICE/CED-3* protease necessary for mammalian apoptosis // Nature.—1995.—**376**.—P. 37—43.
22. *Cohen G. M.* Caspases: the executioners of apoptosis // Biochem. J.—1997.—**326**.—P. 1—16.
23. *Li H., Bergeron L., Cryns V. et al.* Activation of caspase-2 in apoptosis // J. Biol. Chem.—1997.—**272**.—P. 21010—21017.
24. *Ichijo H.* Induction of apoptosis by ASK-1, a mammalian MAPKKK that activates SAPK/JNK and *p38* signaling pathways // Science.—1997.—**275**.—P. 90—97.
25. *Cleary M. L., Sklar J.* Nucleotide sequence of t(14;18) chromosomal breakpoint in follicular lymphoma and demonstration of a breakpoint cluster region near a transcriptionally active locus on chromosome 18 // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1985.—**82**.—P. 7439—7443.
26. *Hengartner H. O., Horvitz H. R. C. elegans* cell survival gene *ced-9* encodes a functional homologue of the mammalian proto-oncogene *bcl-2* // Cell.—1994.—**76**.—P. 665—676.
27. *Vaux D. L., Weissman I. L., Kim S. K.* Prevention of programmed cell death in *Caenorhabditis elegans* by human *bcl-2* // Science.—1992.—**258**.—P. 1955—1957.
28. *Vaux D. L., Cory S., Adams J. M. Bcl-2* gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with *c-myc* to immortalize pre-B cells // Nature.—1988.—**335**.—P. 440—442.
29. *Simon S. M., Schindler M.* Cell biological mechanisms of multidrug resistance in tumors // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1994.—**91**.—P. 3497—3504.
30. *Robinson L. J., Roberts W. K., Ling T. T. et al.* Human *MDR 1* protein overexpression delays the apoptotic cascade in Chinese hamster ovary fibroblasts // Biochemistry.—1997.—**36**.—P. 11169—11178.
31. *Surgue M. M., Shin D. Y., Lee S. W., Aaronson S. A.* Wild-type *p53* triggers a rapid senescence program in human tumor cells lacking functional *p53* // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1997.—**94**.—P. 9648—9653.
32. *Fazeli A., Steen R. G., Dickinson S. L. et al.* Effect of *p53* mutations on apoptosis in mouse intestinal and human colonic adenomas // Ibid.—P. 10199—10204.
33. *Sakamuro D., Sabbatini P., White E., Prendergast G. C.* The polyproline region of *p53* is required to activate apoptosis but not growth arrest // Oncogene.—1997.—**15**.—P. 887—898.
34. *Lotem J., Sachs L.* Cytokine suppression of protease activation in wild-type *p53*-dependent and *p53*-independent apoptosis // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1997.—**94**.—P. 9349—9353.
35. *Hipp M. L., Bauer G.* Intercellular induction of apoptosis in transformed cells does not dependent on *p53* // Oncogene.—1997.—**15**.—P. 791—797.
36. *Hooper M. L.* The role of the *p53* and *Rb-1* genes in cancer, developments and apoptosis // J. Cell. Sci.—1995.—**108**, suppl. 18.—P. 13—18.
37. *Takahashi T., Tanaka M., Brannan C. I. et al.* Generalized lymphoproliferative disease in mice, caused by a point mutation in the Fas ligand // Cell.—1994.—**76**.—P. 969—976.
38. *Gruss H.-J., Dower S. K.* Tumor necrosis factor ligand superfamily: involvement in the pathology of malignant lymphomas // Blood.—1995.—**85**.—P. 3378—3404.
39. *Trauth B. C., Klas C., Peters A. M. J. et al.* Monoclonal antibody-mediated tumor regression by induction of apoptosis // Science.—1989.—**245**.—P. 301—305.
40. *Debatin K.-M., FahrigFaissner A., EnenkelStoodt B. et al.* High expression of APO-1 (CD95) on T lymphocytes from human immunodeficiency virus-1-infected children // Blood.—1994.—**83**.—P. 3101—3104.
41. *Falk M. H., Trauth B. C., Debatin K.-M. et al.* Expression of the APO-1 antigen in Burkitt lymphoma cell lines correlates with a shift towards a lymphoblastoid phenotype // Ibid.—1992.—**79**.—P. 3300—3306.
42. *Suda T., Nagata S.* Purification and characterization of the Fas-ligand that induces apoptosis // J. Exp. Med.—1994.—**179**.—P. 873—878.
43. *Suda T., Takahashi T., Golstein P., Nagata S.* Molecular cloning and expression of the Fas ligand: a novel member of the tumor necrosis factor family // Cell.—1993.—**75**.—P. 1169—1178.
44. *Мойзис Р. К.* Теломера человека // В мире науки.—1991.—№ 10.—С. 24—31.
45. *Rhyu M. S.* Telomeres, telomerase, and immortality // J. Nat. Cancer Inst.—1995.—**87**.—P. 884—894.
46. *Bestilny L. J., Brown C. B., Miura Y. et al.* Selective inhibition of telomerase activity during terminal differentiation of immortal cell lines // Cancer Res.—1996.—**56**.—P. 3796—3802.
47. *Mata J. E., Joshi S. S., Palen B. et al.* A hexameric phosphorothioate oligonucleotide telomerase inhibitor arrests growth of Burkitt's lymphoma cells *in vitro* and *in vivo* // Toxicol and Appl. Pharmacol.—1997.—**144**.—P. 189—197.
48. *Mandal M., Kumar R. Bcl-2* modulates telomerase activity // J. Biol. Chem.—1997.—**272**.—P. 14183—14187.
49. *Zanzami N., Marchetti P., Castedo M. et al.* Inhibitors of permeability transition interfere with the disruption of the mitochondrial transmembrane potential during apoptosis // FEBS Lett.—1996.—**384**.—P. 53—57.
50. *Zoratti M., Szabo I.* The mitochondrial permeability transition // Biochim. et biophys. acta.—1995.—**1241**.—P. 139—176.
51. *Marchetti P., Susin S. A., Decaudin D. et al.* Apoptosis-associated derangement of mitochondrial function in cells lacking mitochondrial DNA // Cancer Res.—1996.—**56**.—P. 2033—2038.
52. *Thornberry N. A., Molineaux S. M.* Interleukin-1 beta converting enzyme: a novel cysteine protease required for IL-1 beta production and implicated in programmed cell death // Protein Sci.—1995.—**4**.—P. 3—12.
53. *Zamzami N., Susin S. A., Marchetti P. et al.* Mitochondrial control of nuclear apoptosis // J. Exp. Med.—1996.—**183**.—P. 1533—1544.
54. *Скулачев В. П.* В своем межклеточном пространстве митохондрия таит «белок самоубийства», который, выйдя в цитозоль, вызывает апоптоз // Биохимия.—1996.—**61**.—С. 2060—2063.
55. *Inoue S.* Novel targets for cancer chemotherapy // Gan. To. Kagaku Ryoho.—1996.—**23**.—P. 191—201.
56. *Tang D. G., Porter A. T.* Target to apoptosis: a hopeful weapon for prostate cancer. Prostate.—1997.—**32**.—P. 284—293.

Надійшла до редакції 03.02.97