

УДК 616.216.1-001: 616-081.818

ДИНАМИКА АПОПТОЗА И ЕГО РЕГУЛЯЦИЯ ПРИ ТРАВМЕ ВЕРХНЕЧЕЛЮСТНОГО СИНУСА

С.С. Едранов¹, В.Г. Цой², И.М. Хетеева³

¹ Владивостокский государственный медицинский университет (690950, г. Владивосток, пр-т Острякова, 2),

² ООО «Мобильная операционная бригада» (690078, г. Владивосток, ул. Авроровская, 17),

³ Стоматологическая клиника «Алмаз-ДВ» (690105, г. Владивосток, ул. Давыдова, 35)

Ключевые слова: апоптоз, молекулярные факторы, повреждение, регенерация.

В обзоре обобщаются результаты собственных исследований автора молекулярных механизмов апоптоза и его роли в репарации слизистой оболочки при деафферентации и механической травме верхнечелюстного синуса. Развитие апоптоза, степень наработки оксида азота, p53 и Bcl-2 в клетках слизистой оболочки представляют взаимозависимый механизм. В разные сроки после повреждения оксид азота может оказывать апоптогенное и/или антиапоптогенное действие. Эти процессы сводятся к редукции вторичного повреждения клеток путем влияния оксида азота на апоптоз, а также стимуляции трофики и регенераторных способностей слизистой оболочки. Ингибирование апоптоза может способствовать регенерации, а его стимуляция в перспективе – оказывать цитопротективное влияние при вторичном повреждении продуктами воспалительных реакций.

В спектре эндогенных и экзогенных факторов, влияющих на жизнеспособность клеток при травмирующем воздействии, апоптозу отводится решающая организующая роль. Апоптоз запускается в момент травмы как механизм отсроченного вторичного повреждения ткани и представляет собой физиологическую гибель клеток, необходимую для обновления клеточного пула, дифференцировки и развития органа [8, 10]. Апоптоз предохраняет ткани от возможных последствий при сублетальных повреждениях, недостаточных для прямого уничтожения клетки – некроза [9, 10, 28]. При таком слабом повреждении избирательное уничтожение небольших клеточных популяций способствует оздоровлению органа. Однако если незначительная альтерация охватывает обширные очаги, например при гипоксии или ишемии, то апоптоз превосходит по своей силе репарационный потенциал ткани и фактически способен «выключать» поврежденную зону или весь орган [13]. Многочисленные исследования последних лет показали, что часто именно апоптоз, а не некроз, лежит в основе инфаркта миокарда, острой почечной недостаточности, инсульта, травмы головного мозга и других заболеваний, связанных с высокой смертностью [14, 25, 27]. Апоптоз обычно развивается при действии менее сильного повреждающего фактора, который запускает внутренние энергозависимые механизмы самоуничтожения клетки [5, 7].

В неповрежденной ткани апоптоз находится под строгим генетическим контролем. Одним из участников реализации программы гибели клетки является

семейство белков Bcl-2, в состав которого входят ингибиторы и активаторы апоптоза. К числу активаторов принадлежат такие протеины, как bax, bak, bcl-xS, к числу ингибиторов – bcl-xL, bcl-2, Mcl-1 [6, 30]. Молекула Bcl-2 блокирует митохондриальный путь запуска апоптоза путем гетеродимеризации с белком bax, который при этом утрачивает свою активность [29]. Bax способствует выходу из межмембранного пространства митохондрий в цитозоль цитохрома C, что приводит к активации цистеиновых протеаз – каспаз, которые, в свою очередь, вызывают лизис клеточных белков и опосредуют фрагментацию ДНК [16].

Важнейшую роль в индукции апоптоза играет опухоле-супрессорный ген p53 [8]. Механизм p53-индуцированного апоптоза окончательно не установлен. Предполагается, что этот белок вызывает запрограммированную клеточную гибель вследствие активации и репрессии ряда генов-мишеней [15]. Так, например, существуют сведения, что p53 осуществляет на транскрипционном уровне одновременную активацию гена Bax, репрессию гена Bcl-2, повышает экспрессию генов, продукты которых вызывают оксидативный стресс и активацию киллерных рецепторов [15, 17]. В результате клетка задерживается в определенных точках клеточного цикла для возможной репарации повреждения или, при отсутствии таковой, подвергается апоптозу вследствие нарушения проницаемости митохондриальной и ядерной мембран. Такие агенты, как ионы кальция, факторы воспаления, свободные радикалы и оксид азота могут также «включать» гены, инициирующие апоптоз [7, 11, 12]. Можно полагать, что недостаточность проявлений апоптоза отражается на процессе элиминации клеток с генетическими поломками, становлении аутоотолерантности и выражается в форме разного рода дефектов развития и тканевой регенерации. В условиях физиологической нормы белок p53 не выявляется, а, например, при хроническом воспалении его мутантную форму синтезируют до 70% трансформированных клеток [29].

Согласно нашим наблюдениям, травмирование костей черепа, повреждение целостности максиллярного нерва у крыс или хронический риносинусит у человека вызывают ярко выраженную апоптотическую реакцию со стороны клеток слизистой оболочки верхнечелюстного синуса. Морфологические «портреты» таких клеток характеризуются конденсацией ядерного хроматина, сморщиванием клетки при сохранный

цитоплазматической мембране и разделением на отдельные фрагменты – апоптозные тельца, содержащие фрагменты хроматина и органеллы клетки. Однако специфика повреждающего воздействия влечет за собой появление уникального паттерна распределения апоптотических клеток [3, 4].

При односторонней перерезке верхнечелюстного нерва TUNEL-позитивные клетки превалируют в эпителиальном слое, постепенно «смещаясь» в глубокие отделы слизистой оболочки. В поздние сроки эксперимента большинство маркированных клеток локализуется в подслизистой основе, где они концентрируются главным образом в периваскулярных пространствах. Эта картина существенно дополняется распределением *p53* и *Bcl-2*, локализация которых не совпадает и зависит от срока нанесения травмы. В 1-е сутки эксперимента единичные скопления *p53*-иммунореактивных клеток выявляются в эпителиальном слое. Затем их количество начинает преобладать, достигая максимума на 14–21-й день после травмы. Однако картина распределения *Bcl-2*-иммунореактивных клеток имеет противоположную тенденцию. В 1–3-и сутки они обнаруживаются практически повсеместно, с преимущественной локализацией в эпителиальном слое и периваскулярных пространствах подслизистой основы [3, 4].

Как известно, активация *p53* дает мощный апоптогенный сигнал, в реализации которого задействованы различные механизмы стимуляции каспаз. В нормальных клетках уровень экспрессии *p53* невысок, поскольку этот белок обладает очень коротким периодом полужизни (порядка нескольких минут). Можно полагать, что экспрессия *Bcl-2* в отсроченный период деафферентации лимитирует количество апоптотических клеток, создает благоприятный фон для пролиферации, выживания и активного функционирования соответствующих слоев слизистой оболочки. Вместе с тем нельзя исключить и нейрогенные влияния, неизбежно возникающие при перерезке максиллярного нерва. Установлено, что начальный период апоптоза в этой ситуации индуцируется экспрессией фактора роста нервов, который при взаимодействии с рецептором *p75* запускает механизмы клеточной смерти [26]. Необратимую активацию этого процесса при перерезке нервов опосредуют проапоптотические ферменты – каспазы и *p53* [21]. Так, при деафферентации слухового нерва апоптоз нейронов слуховых ядер отмечается уже в первые сутки после травмы, а перерезка зрительного нерва у мышей активирует апоптоз более 90 % популяции ганглиозных нейронов сетчатки [5, 7, 26]. Менее известны механизмы программированной гибели клеток в ответ на периферическую деафферентацию.

Очевидно, нарушение баланса между клеточной пролиферацией и апоптозом может влиять на эффективность регенераторных процессов при повреждении. Прерывая контакты с нервными волокнами, клетки

лишаются трофической поддержки и погибают [18]. Согласно нашим данным, при интенсивной экспрессии *Bcl-2* в раннем периоде после травмы верхнечелюстного нерва отмечается низкая экспрессия *p53* и, соответственно, низкий апоптотический индекс. Однако в отсроченный период после травмы резко возрастает экспрессия *p53* и критически снижается экспрессия *Bcl-2*, что сопровождается интенсивным апоптозом клеток слизистой оболочки. Таким образом, деафферентация верхнечелюстного нерва инициирует апоптотическую гибель клеток слизистой оболочки максиллярной пазухи крыс, которая соотносится с балансом *p53*- и *Bcl-2*-иммунореактивности. Посттравматическая регенерация слизистой оболочки протекает одновременно с уменьшением плотности апоптотических эпителиоцитов и нарастанием апоптотического индекса в глубоких слоях слизистой оболочки на поздних сроках деафферентации.

Итак, распространенность апоптоза неодинакова на разных сроках деафферентации и коррелирует с повышением в клетках активности индуцибельной нитроксидсинтазы (NOS). Согласно нашим наблюдениям, продукция оксида азота свойственна всем тканям слизистой оболочки, однако участие отдельных типов клеток в поддержании баланса этого соединения не одинакова. Превалирующими элементами здесь выступают эпителиальные клетки, гладкие миоциты сосудов, тучные клетки и нервные волокна подслизистой основы. В первые сутки после перерезки верхнечелюстного нерва наблюдается резкое сморщивание и уплотнение эпителиального пласта на фоне избыточной активности индуцибельной NOS. Если в течение первых суток изменения, наблюдаемые на стороне, противоположной месту пересечения нерва, не отличаются от контроля, то начиная с 3-х суток эксперимента происходит динамическая перестройка активности фермента в тканях слизистой оболочки как ипси-, так контралатеральной пазухи.

Повышение активности индуцибельной NOS в слизистой оболочке может быть инициировано дегенеративными, метаболическими и ишемическими изменениями, которые неизбежно возникают вследствие деафферентации. Индукция NOS обратима и носит адаптивный характер. Как правило, с момента индукции и до начала наработки оксида азота проходит несколько часов, и именно в этот период происходит транскрипция и экспрессия белковых субъединиц энзима [2]. В свою очередь последствия индукции индуцибельной NOS связаны с деструктивными и/или протективными влияниями оксида азота на микроокружение [7]. Его включение в структуру посттравматических реакций дополняется экспрессией NOS в цитоплазме тучных клеток при участии гистамина и ряда цитокинов [12]. Значительная продукция оксида азота противостоит вазоконстрикторному действию этих молекул, затормаживает дальнейшее выделение гистамина из тучных клеток и может препятствовать

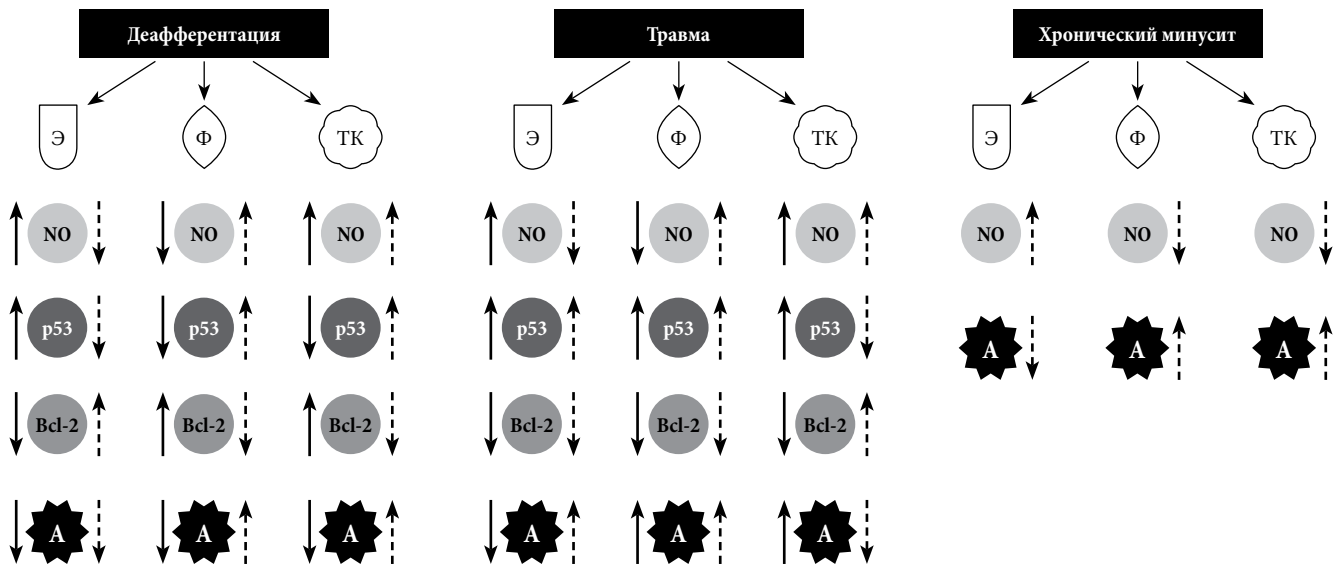


Рис. Взаимоотношение между синтезом оксида азота, наработкой про- и антиапоптотических факторов:

в эпителии (Э), фибробластах (Ф) и тучных клетках (ТК) слизистой оболочки максиллярной пазухи при травме и деафферентации у крысы и хроническом синусите у человека; интенсивность апоптоза (А) отражена на основании исследования с помощью метода TUNEL (по С.С. Едранову [1–4]).

метаболической компенсации повреждения. Для синтеза оксида азота в цитозоле тучных клеток требуется НАДФН. Этот же кофермент необходим для образования радикалов кислорода с формированием супероксид-цитотоксической макрофагальной системы. Таким образом, в результате экспрессии индуцибельной изоформы NOS уровень наработки оксида азота резко повышается, достигая критических параметров, при которых его деструктивные эффекты могут быть преобладающими. Они реализуются посредством вторичного образования токсических анион-радикалов и пероксинитритов [27].

Данные клинических и биохимических исследований показывают, что описанные механизмы модуляторного действия оксида азота сходным образом функционируют во всех тканях, где отмечается посттравматическая гибель клеток [13]. Роль оксида азота в этих процессах сводится, главным образом, к цитотоксическому действию молекулы на мишень [20]. Однако последовательность «включения» этих факторов не всегда совпадает с динамикой активности нитроксидсинтаз, что позволяет предполагать наличие альтернативных, цитопротективных и противоапоптотических, эффектов оксида азота [22, 23, 24].

При исследовании материала гайморовой пазухи лиц после реконструкции скулы верхнечелюстного комплекса или при хроническом риносинусите, нами установлена значительная редукция нитроксидсинтезирующих фибробластов и тучных клеток в глубоких слоях слизистой оболочки, однако в эпителиальном слое и подслизистой основе подобных изменений не выявлено. Возможно, наиболее важным в этой серии исследований явилось следующее наблюдение: оказалось, что снижение количества НАДФН-диафороазо-позитивных лейкоцитов и фибробластов сопровождалось нарастанием в них апоптотического

индекса. Напротив, НАДФН-диафороазопозитивные эпителиоциты остаются резистентными к повреждающим воздействиям в условиях хронического воспаления и практически не подвергаются апоптозу.

Описанные выше результаты суммированы на рисунке, где указаны также динамика наработки оксида азота, про- и антиапоптотических факторов в острый и отсроченный период посттравматической репарации и хронического воспаления [1–4]. Как следует из схемы, распространенность апоптоза коррелирует с началом активной наработки оксида азота и p53. Напротив, превалирование продукции Bcl-2 совпадает с падением синтеза оксида азота. Однако и в этом принципиальном положении есть исключения. Так, хронический синусит у человека характеризуется гетерогенным вовлечением нитроксидергических клеток в апоптоз. Фибробласты и лейкоциты здесь имеют высокий апоптотический индекс, хотя и отличаются относительно низкой активностью нитроксидсинтазы. Между тем эпителиальные клетки при массивном синтезе оксида азота подвержены апоптозу в значительно меньшей степени. Аналогичный феномен наблюдался нами среди популяции тучных клеток на 21-е сутки после экспериментальной травмы верхнечелюстной пазухи у крыс.

Причины, ведущие к изменению апоптогенного действия оксида азота на противоположное, представляются наиболее дискуссионными. Предлагается несколько сценариев развития этих событий. Оксид азота способен стимулировать апоптоз через непосредственное влияние молекулы на экспрессию p53 и цитокины [11]. Необходимо отметить, что подобные эффекты «срабатывают» только при высоких концентрациях этого соединения и массивной индукции NOS. С другой стороны, низкая активность энзима и соответствующие низкие показатели выработки

оксида азота могут активировать индукцию трофических факторов и таким образом предотвращать апоптоз [19].

Необходимо отметить, что исследования различных путей регуляции апоптоза способствуют более глубокому и полному пониманию молекулярных механизмов различных форм повреждения ткани, что в свою очередь необходимо для разработки новых подходов к коррекции этих состояний. Так, ведутся активные разработки фармакологического применения низкомолекулярных ингибиторов каспаз. Использование олигонуклеотидов-ингибиторов гена, отвечающего за выработку белка Bcl-2, уже находится на стадии клинических испытаний [13, 28]. Несомненно, исследования в области гистофизиологии апоптоза открывают широкие возможности для регуляции репаративных процессов после повреждения.

Литература

- Едранов С.С. Апоптоз как фактор организации посттравматического воспаления // Тихоокеанский медицинский журнал. 2012. № 2. С. 100–104.
- Едранов С.С. Нитроксидсинтаза тучных клеток слизистой оболочки максиллярной пазухи крыс при травме верхнечелюстного нерва // Тихоокеанский медицинский журнал. 2011. № 4. С. 53–56.
- Едранов С.С., Ковалева И.В., Крюков К.И., Коновко А.А., Анатомио-гистологическое исследование верхнечелюстного синуса белой крысы // Булл. экспер. биол. и мед. 2004. № 12. С. 680–683.
- Едранов С.С., Мотавкин П.А. Апоптоз как механизм повреждения слизистой оболочки максиллярной пазухи крыс при экспериментальной травме верхнечелюстного нерва // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2012. Т. 153, № 4. С. 518–522.
- Калиниченко С.Г., Матвеева Н.Ю. Морфологическая характеристика апоптоза и его значение в нейрогенезе // Морфология. 2007. Т. 131, № 2. С. 16–28.
- Лушников Е.Ф., Абросимов А.Ю. Гибель клетки (апоптоз). М.: Медицина, 2001. 190 с.
- Матвеева Н.Ю., Калиниченко С.Г., Пущин И.И., Мотавкин П.А. Роль оксида азота в апоптозе нейронов сетчатки плодов человека // Морфология. 2006. Т. 123, № 1. С. 40–49.
- Пальцев М.А. Молекулярные основы апоптоза // Вестник РАМН. 2002. Т. 72, № 1. С. 13–21.
- Фильченков А.А. Каспазы: регуляторы апоптоза и других клеточных функций // Биохимия. 2003. № 68. С. 453–466.
- Ярилин А.А. Апоптоз. Природа феномена и его роль в целостном организме // Патологическая физиология. 1998. № 2. С. 38–48.
- Chae I.H., Park K.W., Kim H.S., Oh B.H. Nitric oxide-induced apoptosis is mediated by Bax/Bcl-2 gene expression, transition of cytochrome c, and activation of caspase-3 in rat vascular smooth muscle cells // Clin. Chim. Acta. 2004. Vol. 341. P. 83–91.
- Chung E.Y., Kim S.J., Ma X.J. Regulation of cytokine production during phagocytosis of apoptotic cells // Cell Research. 2006. Vol. 16. P. 154–161.
- Dubikov A.I., Kalinichenko S.G. Small molecules regulating apoptosis in the synovium in rheumatoid arthritis // Scand. J. Rheumatol. 2010. Vol. 39. P. 368–372.
- Ferri K. Apoptosis control in syncytia induced by thy HIV type 1-envelope glycoprotein complex, role of mitochondria and caspase // J. Exp. Med. 2000. Vol. 192. P. 1081–1092.
- Hengarten O.M. The biochemistry of apoptosis // Nature. 2000. Vol. 407. P. 770–775.
- Ho P.K., Hawkins C.J. Mammalian initiator apoptotic caspases // FEBS J. 2005. Vol. 272. P. 5436–5453.
- Horky M., Kotala V., Anton M. et al. Nucleolus and apoptosis // Ann. N.Y. Acad. Sci. 2002. Vol. 973. P. 258–264.
- Ju E.J., Kwak D.H., Lee D.H. et al. Pathophysiological implication of ganglioside GM3 in early mouse embryonic development through apoptosis // Arch. Pharm. Res. 2005. Vol. 28. P. 1057–1064.
- Kuida K., Haydar T., Kuan C. et al. Reduced apoptosis and cytochrome c-mediated caspase activation in mice lacking caspase 9 // Cell. 1998. Vol. 94. P. 352–337.
- Meier P., Finch A., Evan G. Apoptosis in development // Nature. 2000. Vol. 407. P. 796–801.
- Moll U.M., Zaika A. Nuclear and mitochondrial apoptotic pathways of p53 // FEBS Lett. 2001. Vol. 493. P. 65–69.
- Muresanu D.F. Neurotrophic factors. Bucuresti: Libripres, 2003. 464 p.
- Neary J.T., Zimmermann H. Trophic functions of nucleotides in the central nervous system // Trends Neurosci. 2009. Vol. 32. P. 189–198.
- Niidome T., Morimoto N., Iijima S. et al. Mechanisms of cell death of neural progenitor cells caused by trophic support deprivation // Eur. J. Pharmacol. 2006. Vol. 548. P. 1–8.
- Oppenheim R.W. Programmed cell death // Fundamental Neuroscience / Zigmond M.J., Bloom F.E., Roberts J.L. et al., eds. San Diego: Academic, 1999. P. 581–609.
- Perecko T., Drabikova K., Rackova L. et al. Molecular targets of the natural antioxidant pterostilbene: effect on protein kinase C, caspase-3 and apoptosis in human neutrophils in vitro // Neuroendocrinol. Lett. 2010. Vol. 28. P. 34–38.
- Skulachev V.P., Bakeeva L.E., Chernyak B.V. et al. Thread-grain transition of mitochondrial reticulum as a step of mitoptosis and apoptosis // Molecular and Cellular Biochemistry. 2004. Vol. 256–257. P. 341–358.
- Slover R. Apoptosis: a guide for perplexed // Trends Pharmacol Sci. 2002. Vol. 23. P. 19–24.
- Van Delft M.F., Huang D.C. How the Bcl-2 family of proteins interact to regulate apoptosis // Cell Research. 2006. Vol. 16. P. 203–213.
- Yan N., Shi Y. Mechanisms of apoptosis through structural biology // Annual Review of Cell and Developmental Biology. 2005. Vol. 21. P. 35–56.

Поступила в редакцию 15.11.2012.

ESTIMATING DYNAMICS OF APOPTOSIS AND ITS REGULATION IN CASE OF MAXILLARY SINUS

S.S. Edranov¹, V.G. Tsoy², I.M. Kheteeva³

¹Vladivostok State Medical University (2 Ostryakova Av. Vladivostok 690950 Russian Federation), ²Mobile Surgical Team Co Ltd. (17 Avrorovskaya St. Vladivostok 690078 Russian Federation), ³Dental Clinic 'Almaz' (35 Davidov St. Vladivostok 690105 Russian Federation)

Summary – The paper overviews results of authors' studies into molecular mechanisms of apoptosis and its role in reparation of mucous coat after deafferentation and mechanical injury of maxillary sinus. The progression of apoptosis, extent of production of nitric oxide, p53 and Bcl-2 in mucous cells appear to be interdependent. The nitric oxide is capable of showing pro- and anti-apoptogenic effects in different periods after injury. These processes result in the reduction of secondary injury of cells due to nitric oxide effects on apoptosis and stimulation of trophic and regeneration-related capabilities of the mucous coat. The inhibition of apoptosis can facilitate the regeneration processes. The stimulation of apoptosis in future may exhibit cytoprotective effects in case of secondary injury of inflammatory products.

Key words: apoptosis, molecular factors, injury, regeneration.

Pacific Medical Journal, 2013, No. 1, p. 12–15.