

Биофизические основы патологии клетки

Свободные радикалы и болезни человека

Ю.А. Владимиров, А.Н. Осипов
2018

Молекулярные и клеточные механизмы апоптоза

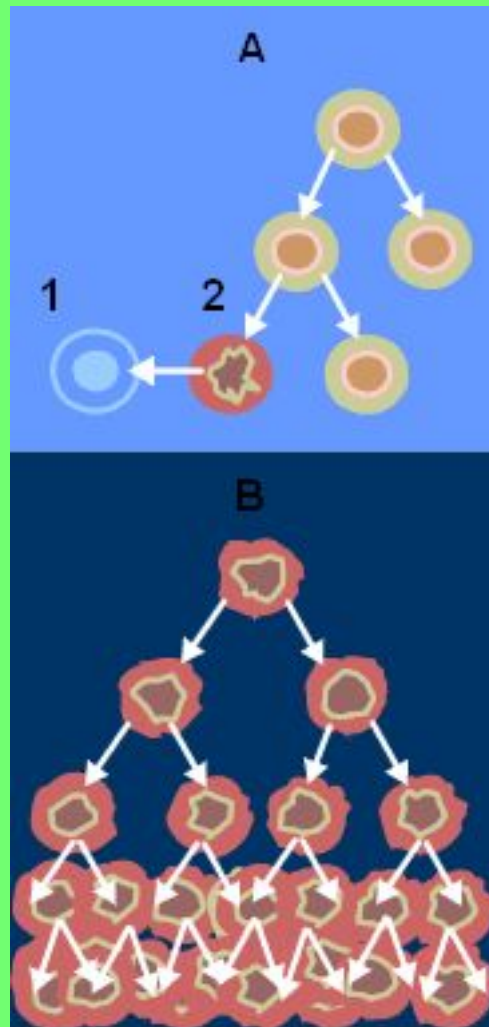
Апоптоз – это процесс запрограммированной смерти клеток, включающий серию согласованных биохимических реакций и имеющий специфические морфологические признаки. В отличие от **некроза** фрагменты клетки, образующиеся в процессе апоптоза, утилизируются **без развития воспаления**.

Апоптоз является естественным физиологическим процессом. У взрослого человека путем апоптоза ежедневно удаляется 50-70 миллиардов клеток. Нарушения в апоптотических реакциях могут приводить к патологиям развития или индукции опухолевого роста.

Макроскопические проявления нарушения апоптотических процессов

Селекция иммунных клеток

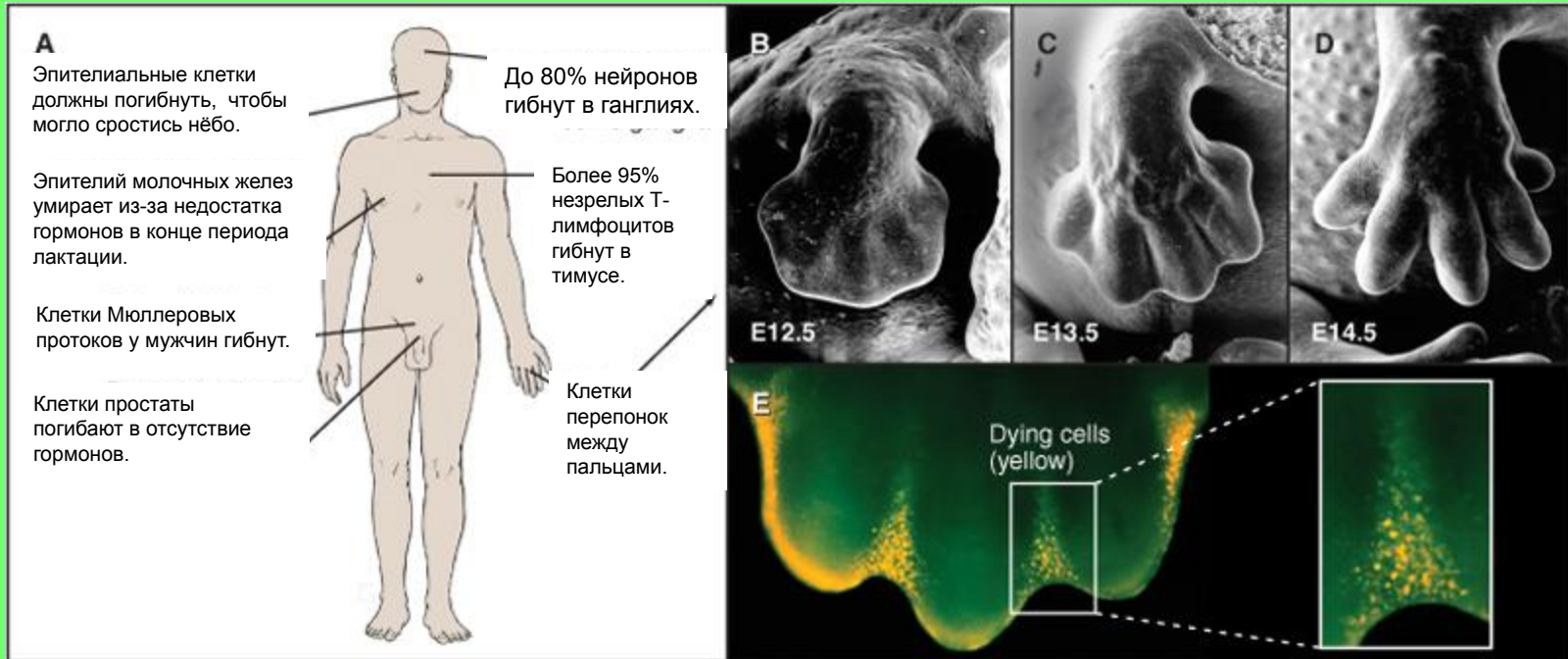
Формообразование органов при развитии и росте (торможение апоптоза привело к сращиванию пальцев ноги)



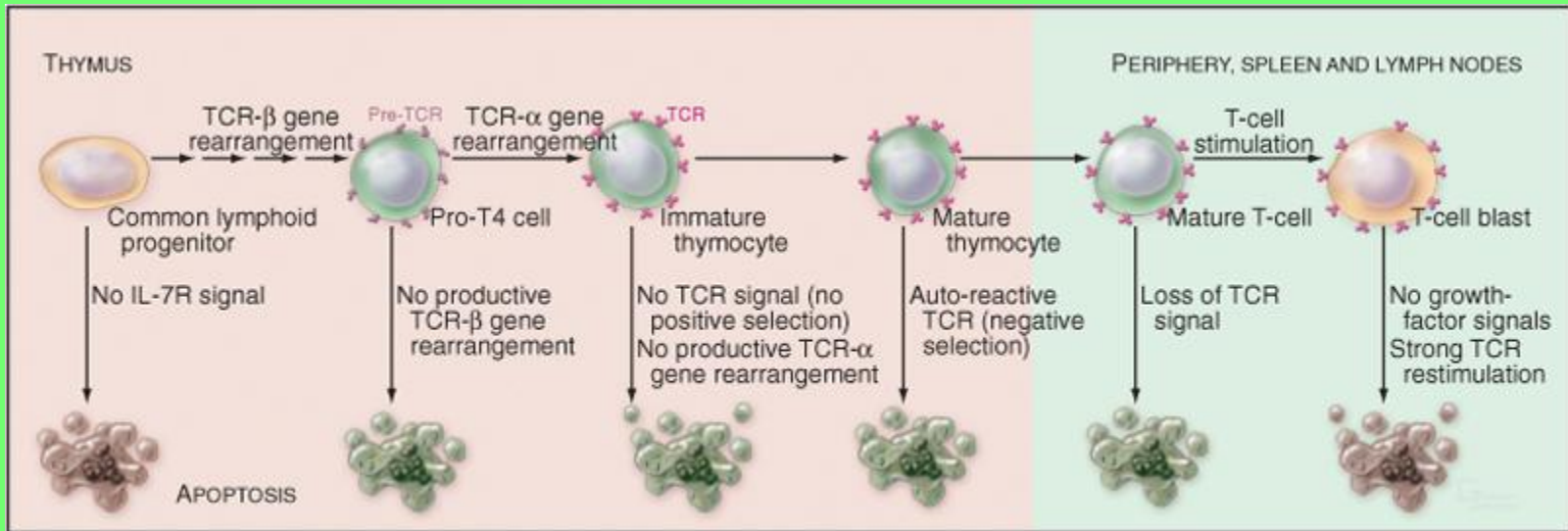
Опухолевой рост
(рак молочной
железы)



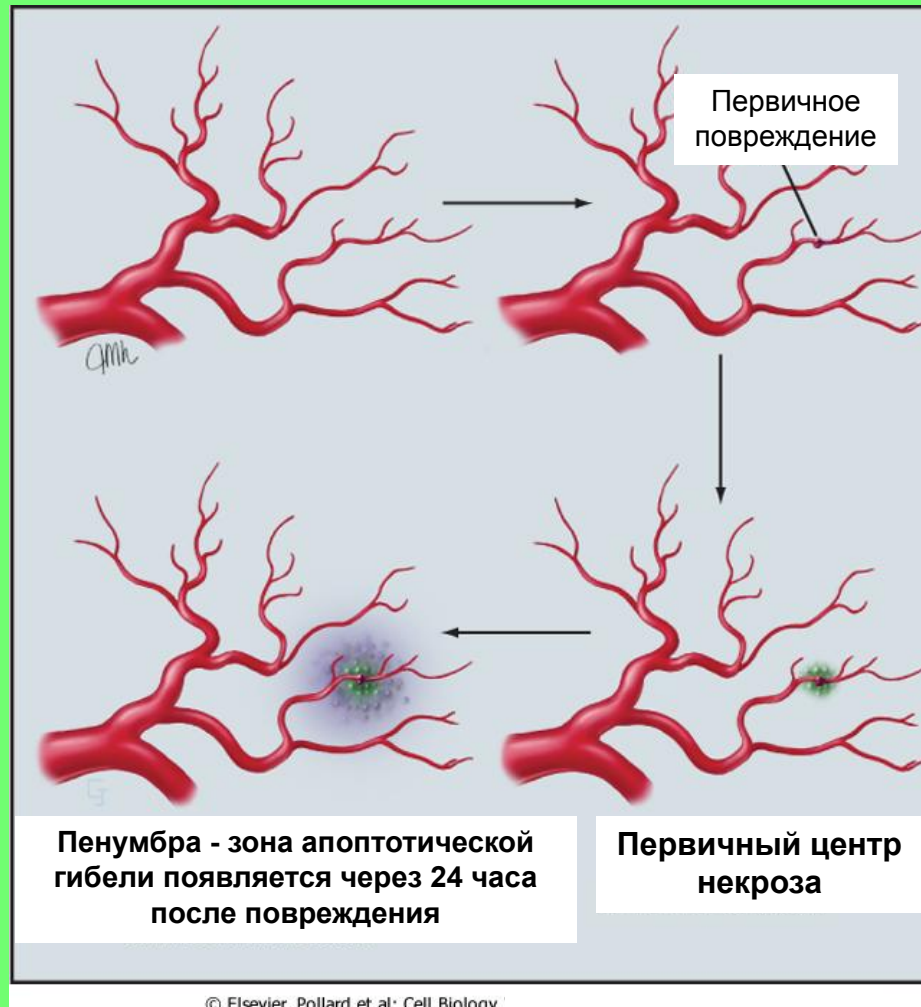
Развитие органов и тканей идет с участием апоптоза



Развитие **ИММУННОГО ОТВЕТА** идет с участием апоптоза



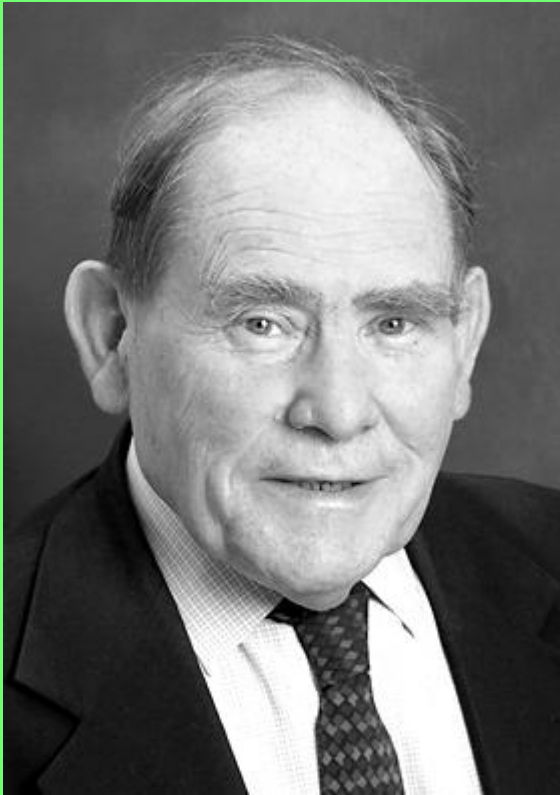
Развитие повреждения тканей в результате ИШЕМИИ идет с участием апоптоза



Нобелевская премия по физиологии и медицине за 2002 год



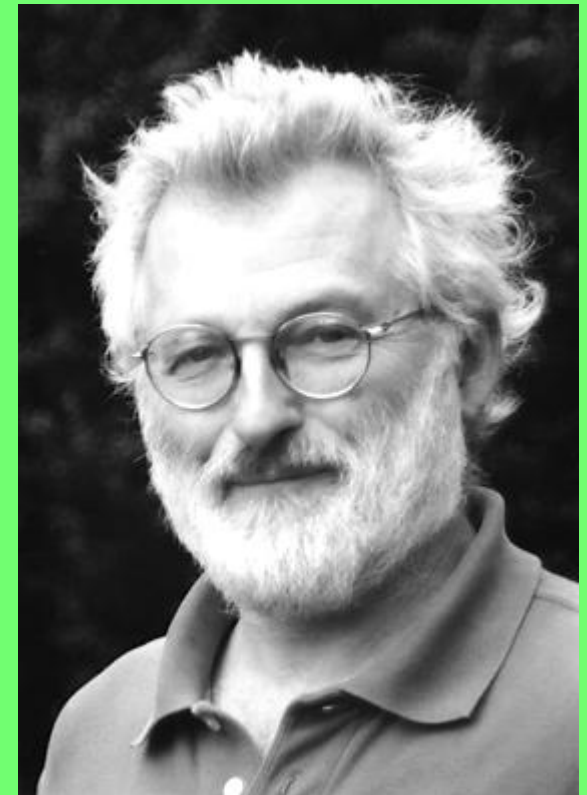
«...за открытия, касающиеся генетической регуляции развития органов и запрограммированной клеточной гибели»



Сидней Бреннер, Институт молекулярных наук, Беркли, Калифорния, США

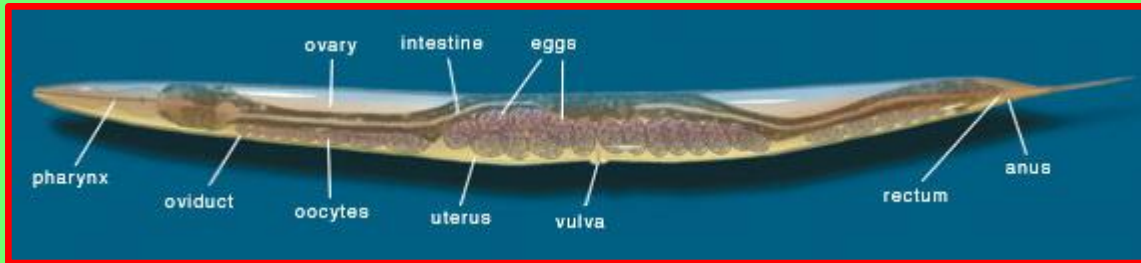


Роберт Хорвиц, Массачусетский технологический институт, Кембридж, США

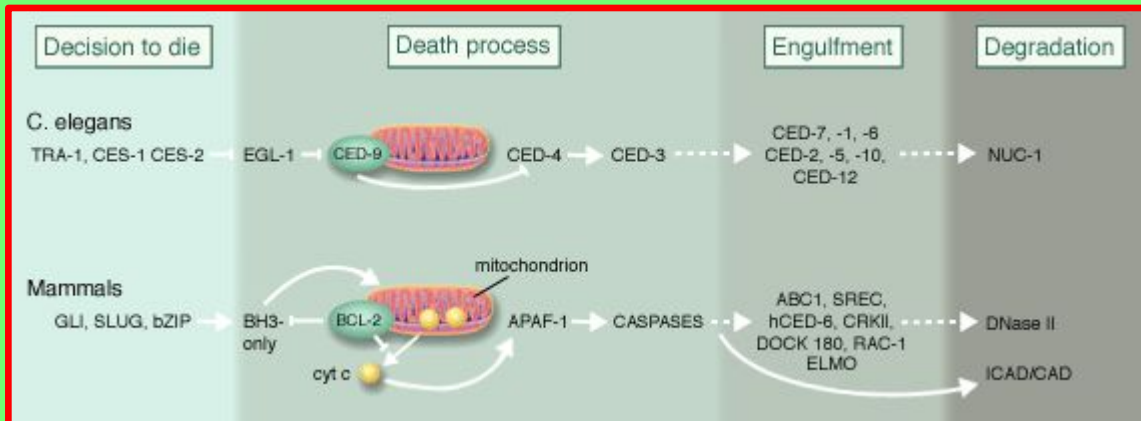


Джон Салстон, Институт Веллком траст имени Сангера, Кембридж, Великобритания

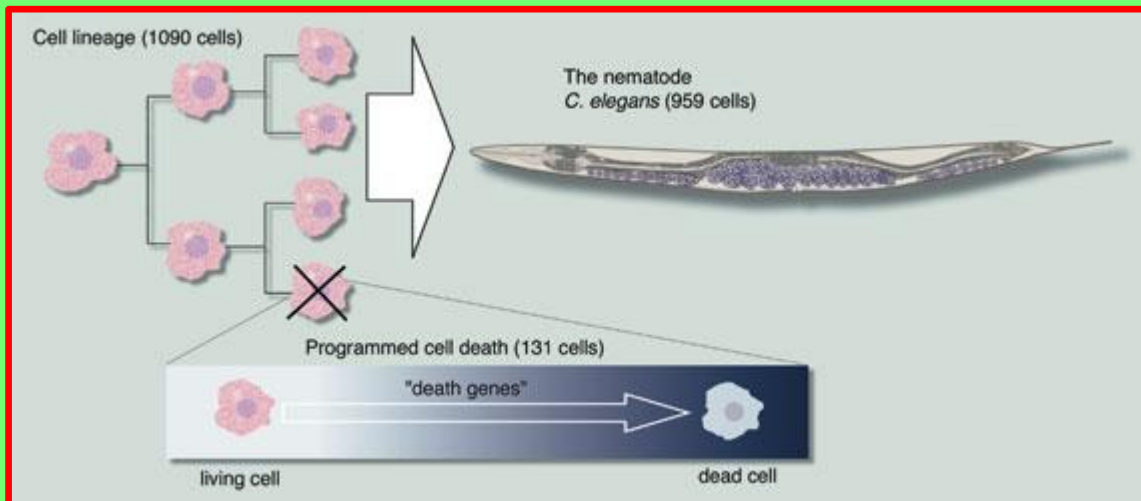
Описание открытия



С. Бреннер в 60х годах 20 века предложил использовать нематоду *Caenorhabditis elegans* как испытанную модель для изучения апоптоза.

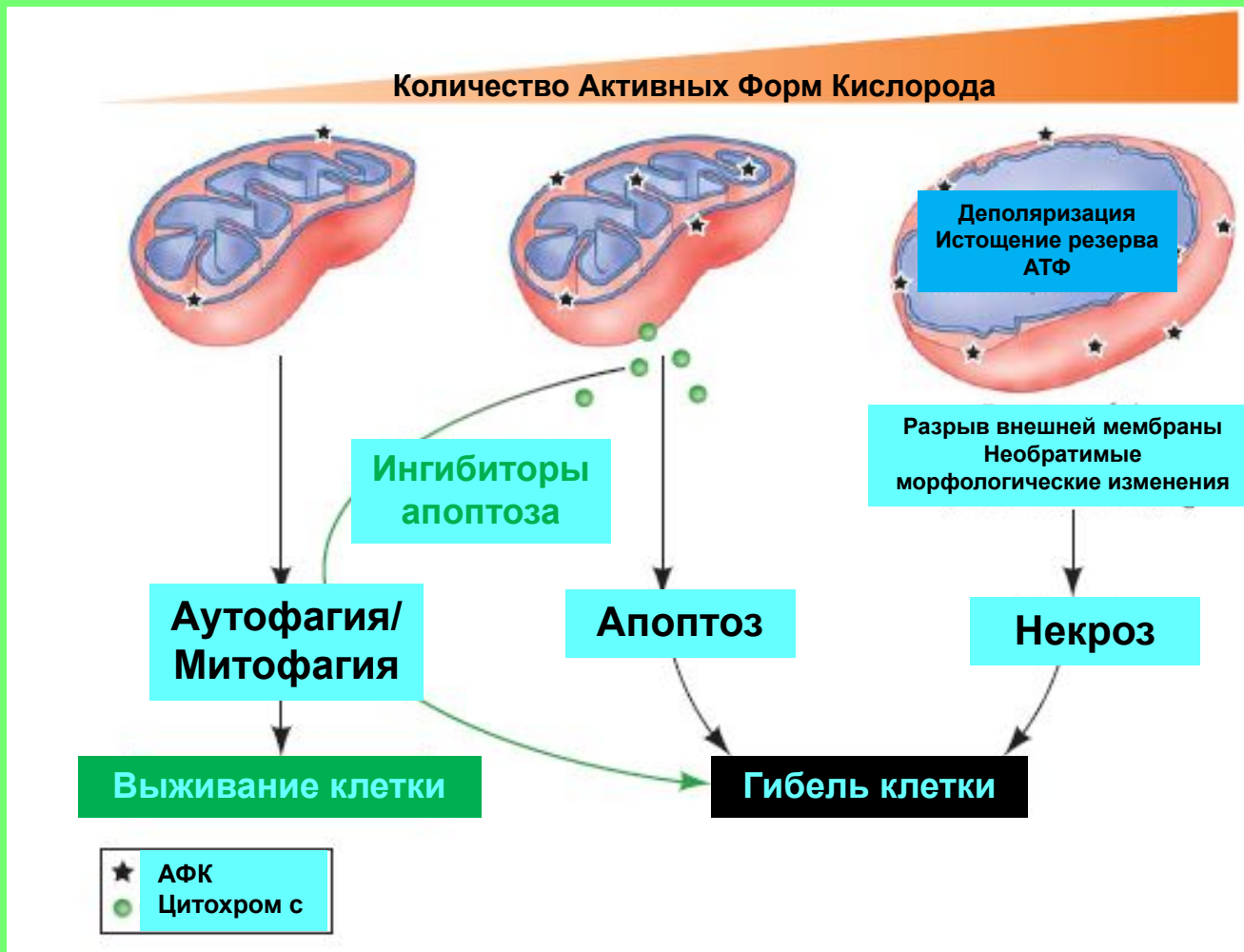


Р. Хорвиц идентифицировал гены нематоды, которые управляют запрограммированной гибелью клеток при ее эмбриональном развитии. Аналогичные гены есть и у млекопитающих.

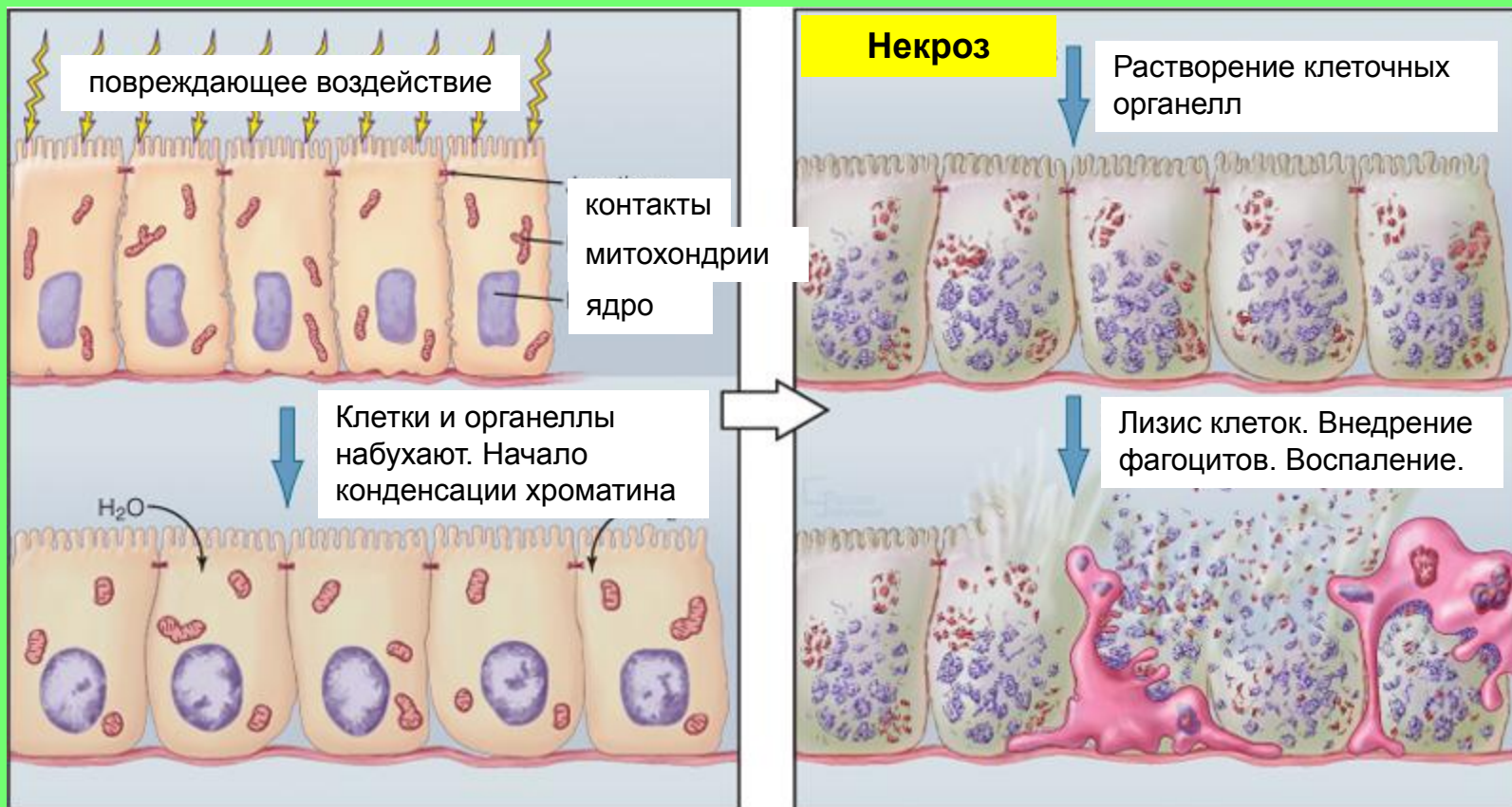


Д. Салстон составил генеалогическое дерево клеток нематоды и указал какие клетки подвергаются запрограммированной гибели.

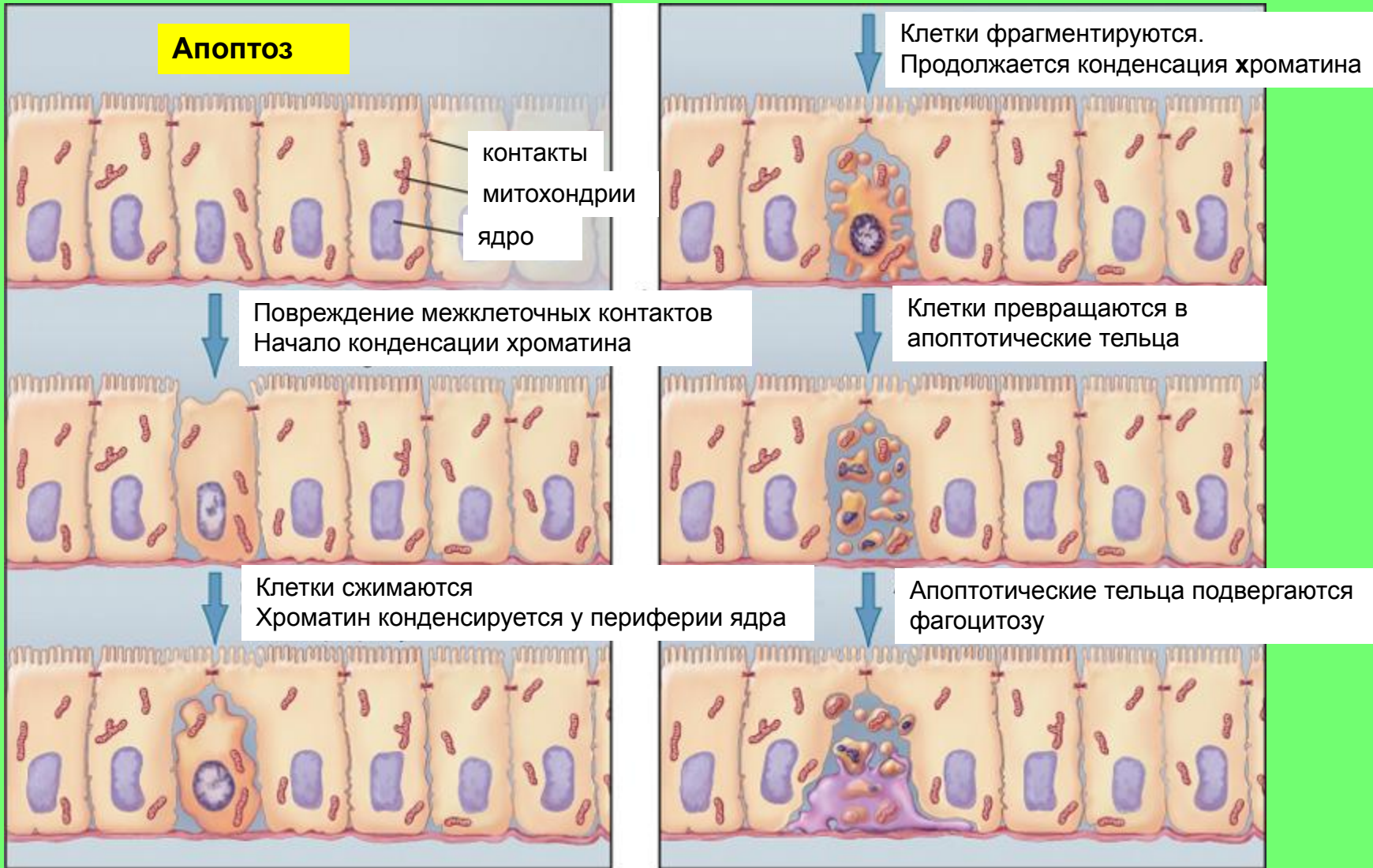
Влияние АФК на развитие процессов в клетке



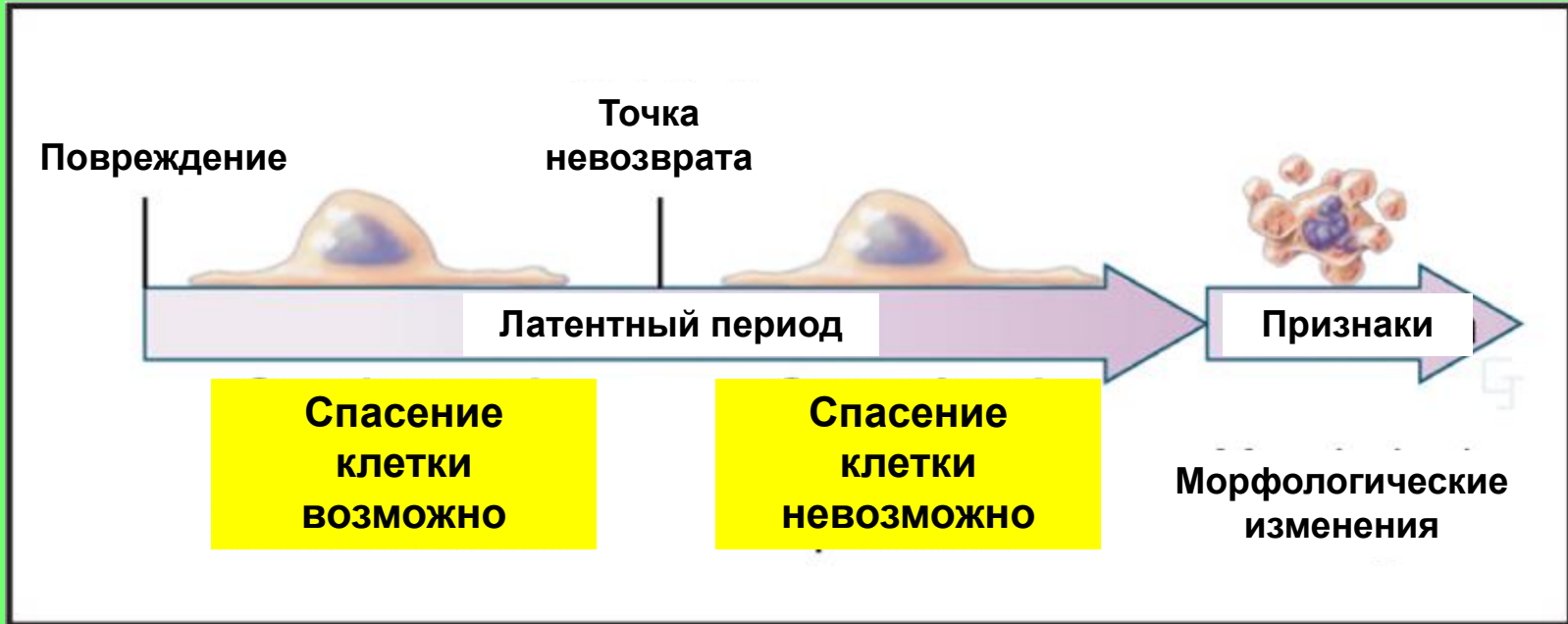
Этапы развития некроза



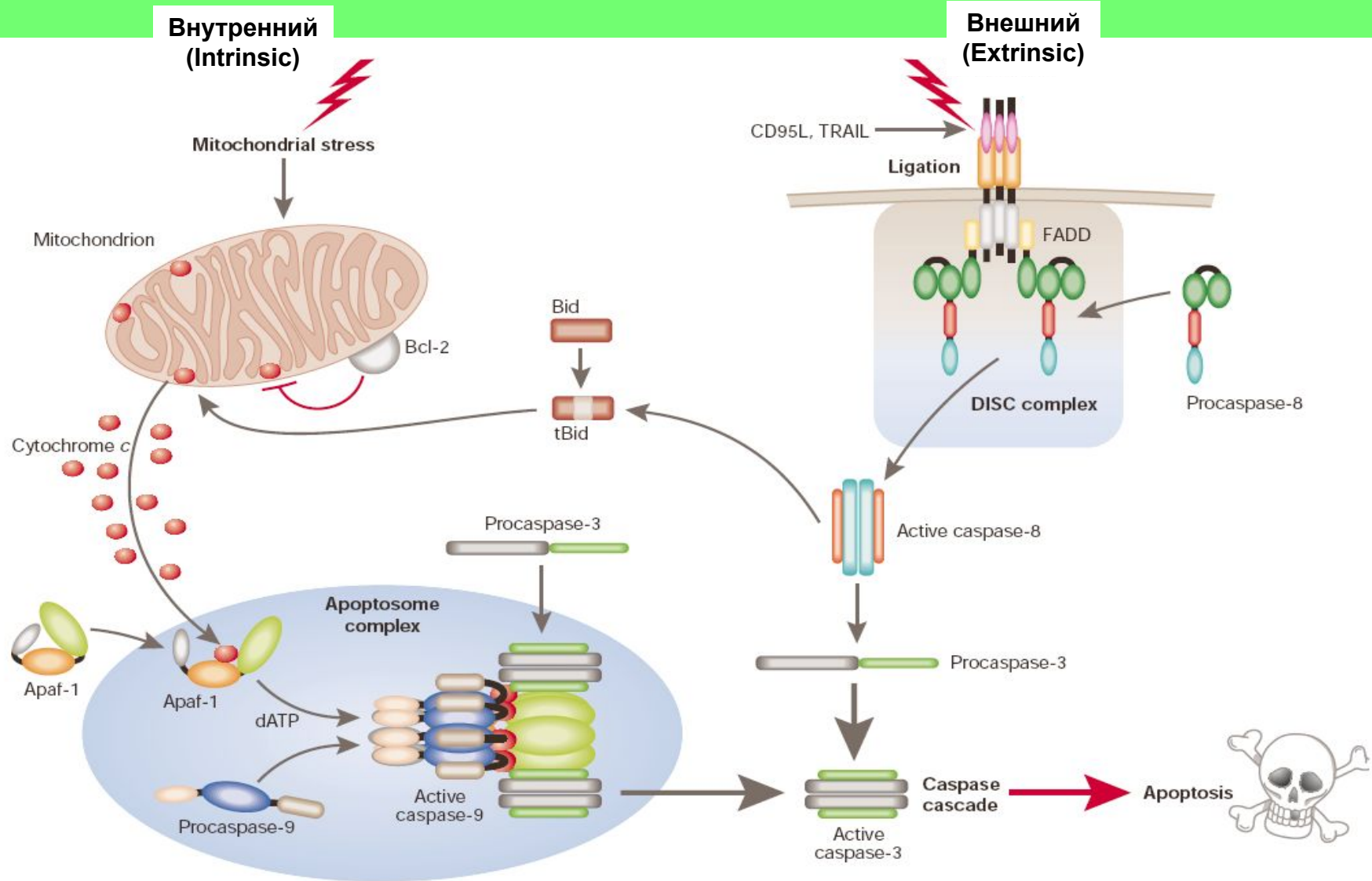
Этапы развития апоптоза



Этапы развития апоптоза



Общая схема апоптотических реакций

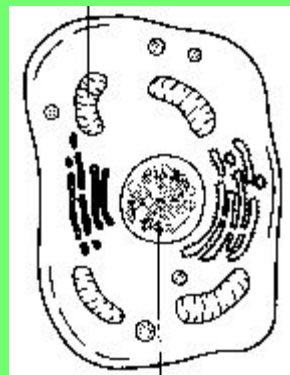


НЕКРОЗ



Митохондрии изменены

Разрыв мембран



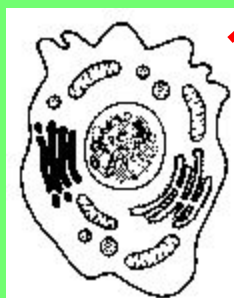
Сохранена форма хроматина



*Обратимое
набухание*

*Необратимое
набухание*

Дезинтеграция



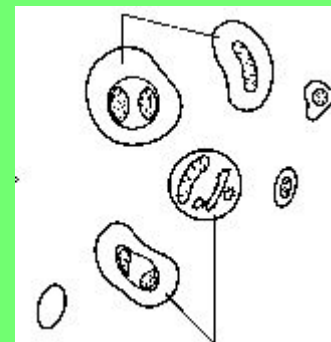
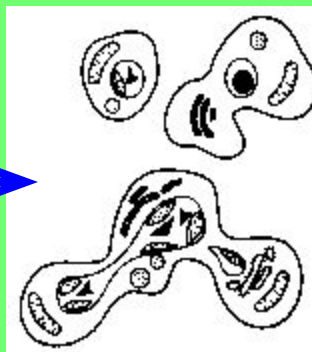
Сохранена структура митохондрий

АПОПТОЗ



Ядро изменено

Интakтные мембраны

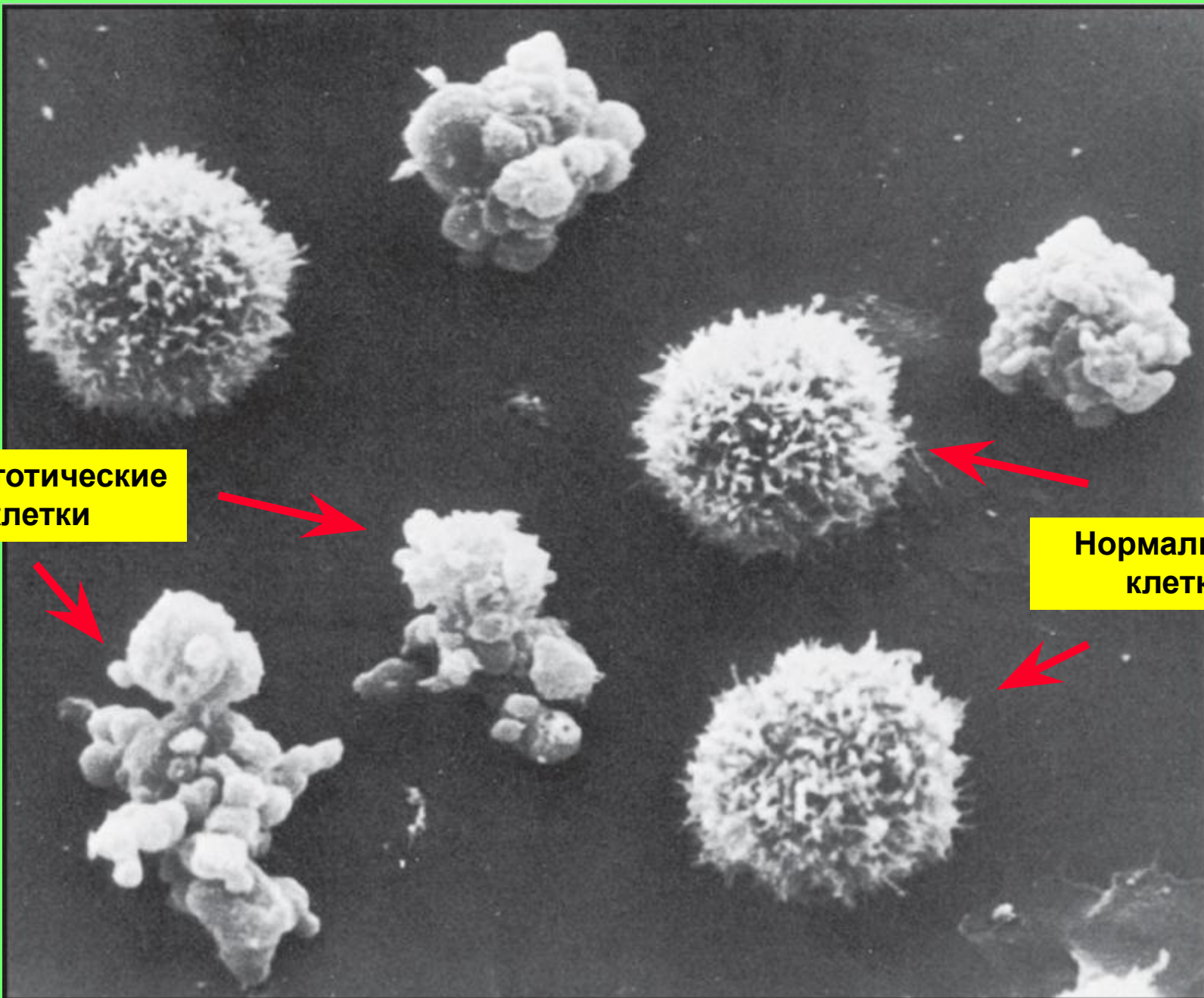


Апоптотические тельца

Конденсация

Фрагментация

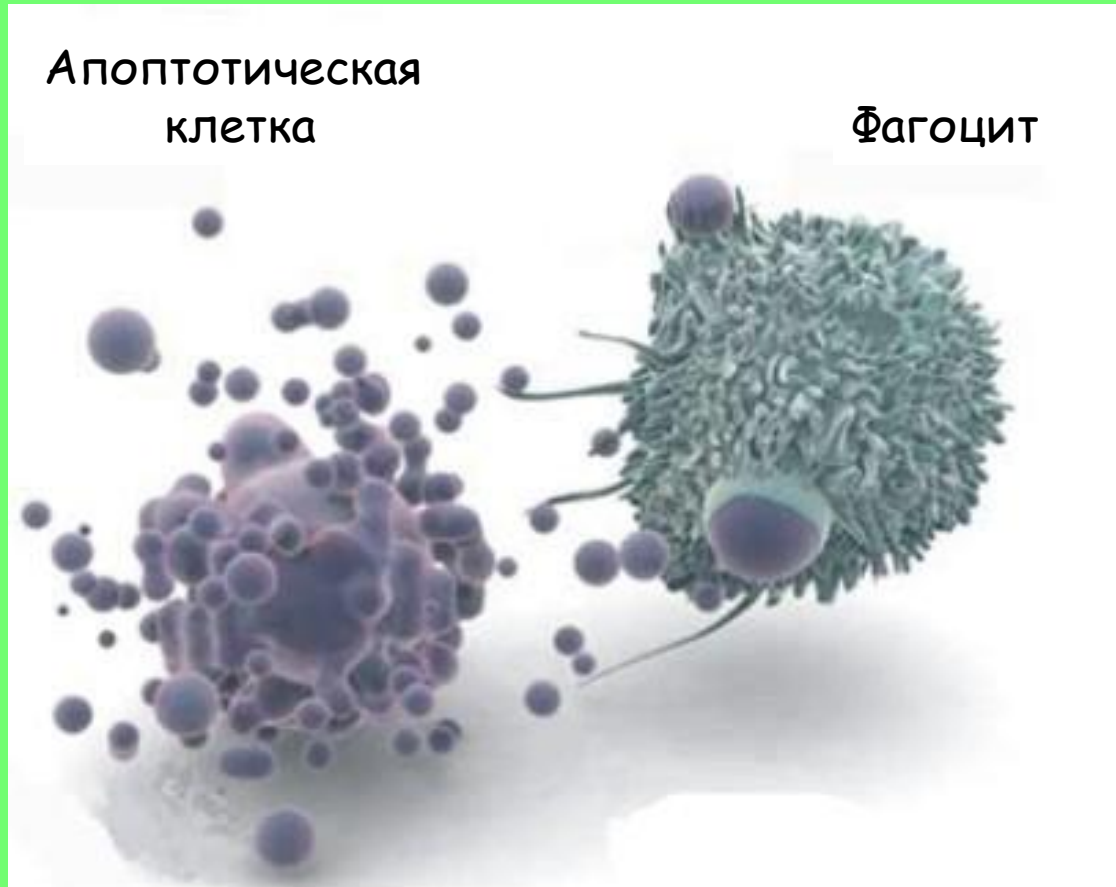
*Образование
телец*



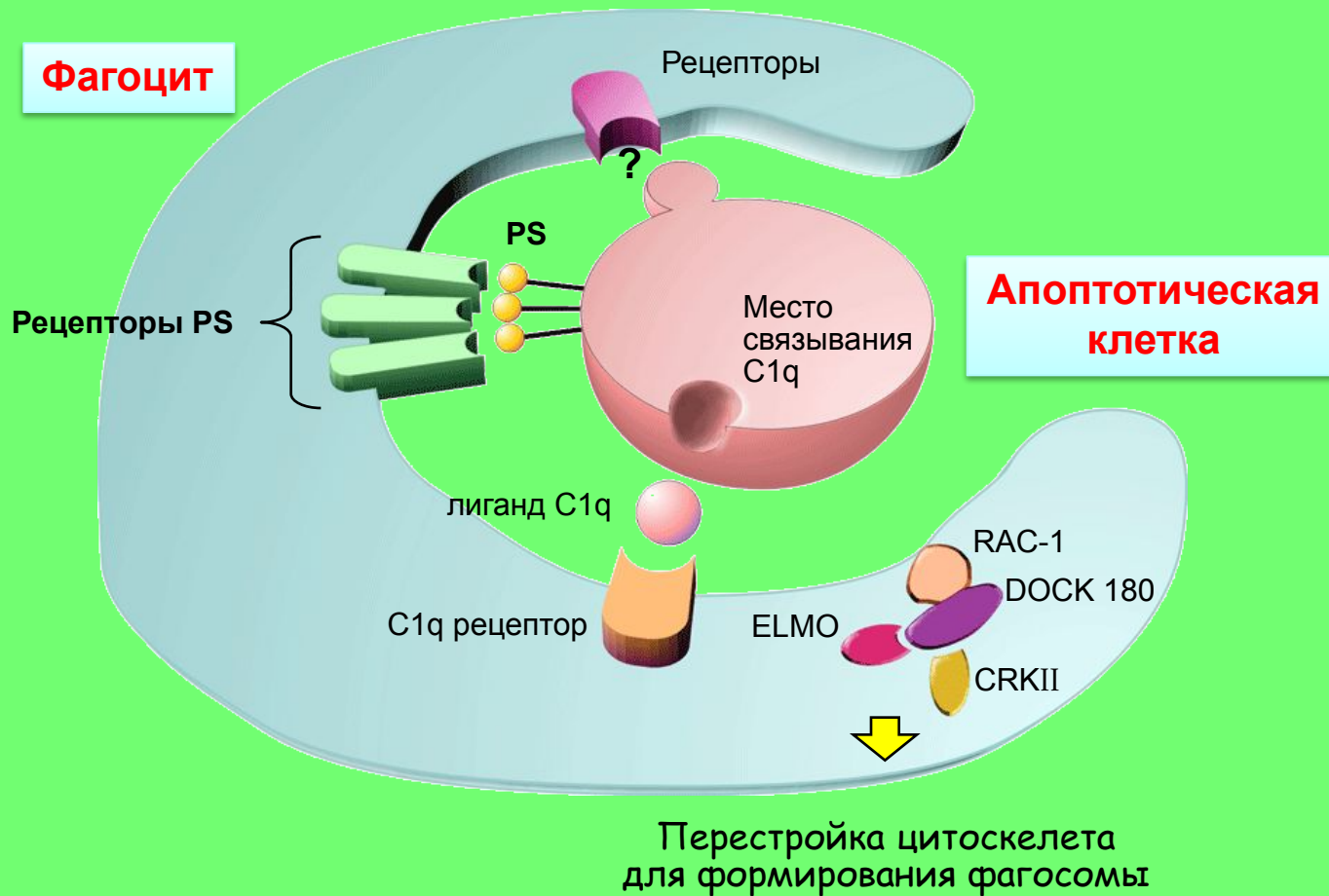
**Апоптотические
клетки**

**Нормальные
клетки**

Завершающей стадией апоптоза является фагоцитоз апоптотической клетки



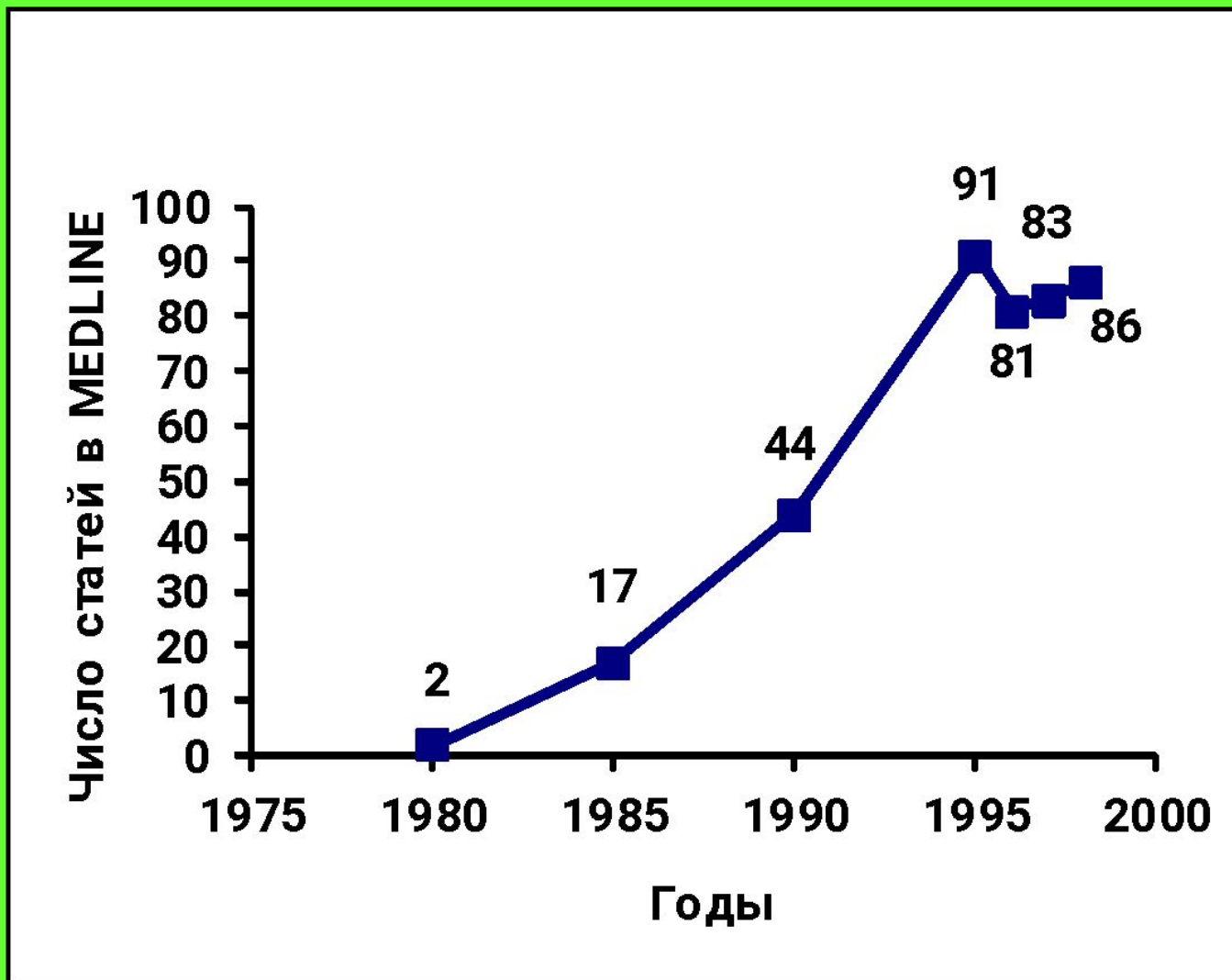
Механизм фагоцитоза при апоптозе



Фагоциты распознают на поверхности апоптотической клетки сигнал «съешь меня», формируемый фосфатидилсерином (PS) на внешней мембране клетки. Этот сигнал запускает процесс фагоцитоза апоптотической клетки.

Патологии, связанные со свободнорадикальными процессами

Обзорные статьи в базе MEDLINE по теме Radicals AND Human diseases



Обзорные статьи в базе MEDLINE по теме Radicals AND *** за 2001-2010 гг

Перевод

| | | |
|-----------------|-----|------------------|
| Brain disease | 120 | Болезни мозга |
| Cancer | 100 | Рак |
| Aging | 94 | Старение |
| Immune system | 84 | Иммунная система |
| Inflammation | 84 | Воспаление |
| Heart disease | 83 | Болезни сердца |
| Atherosclerosis | 67 | Атеросклероз |
| Diabetes | 44 | Диабет |
| Lung disease | 36 | Болезни легких |
| Liver disease | 29 | Болезни печени |
| Kidney disease | 15 | Болезни почек |
| Eye disease | 11 | Глазные болезни |
| Blood disease | 5 | Болезни крови |

Последствия оксидативного стресса

В зависимости от типа клеток и интенсивности оксидативного стресса ответ организма может включать:

1.
пролиферация

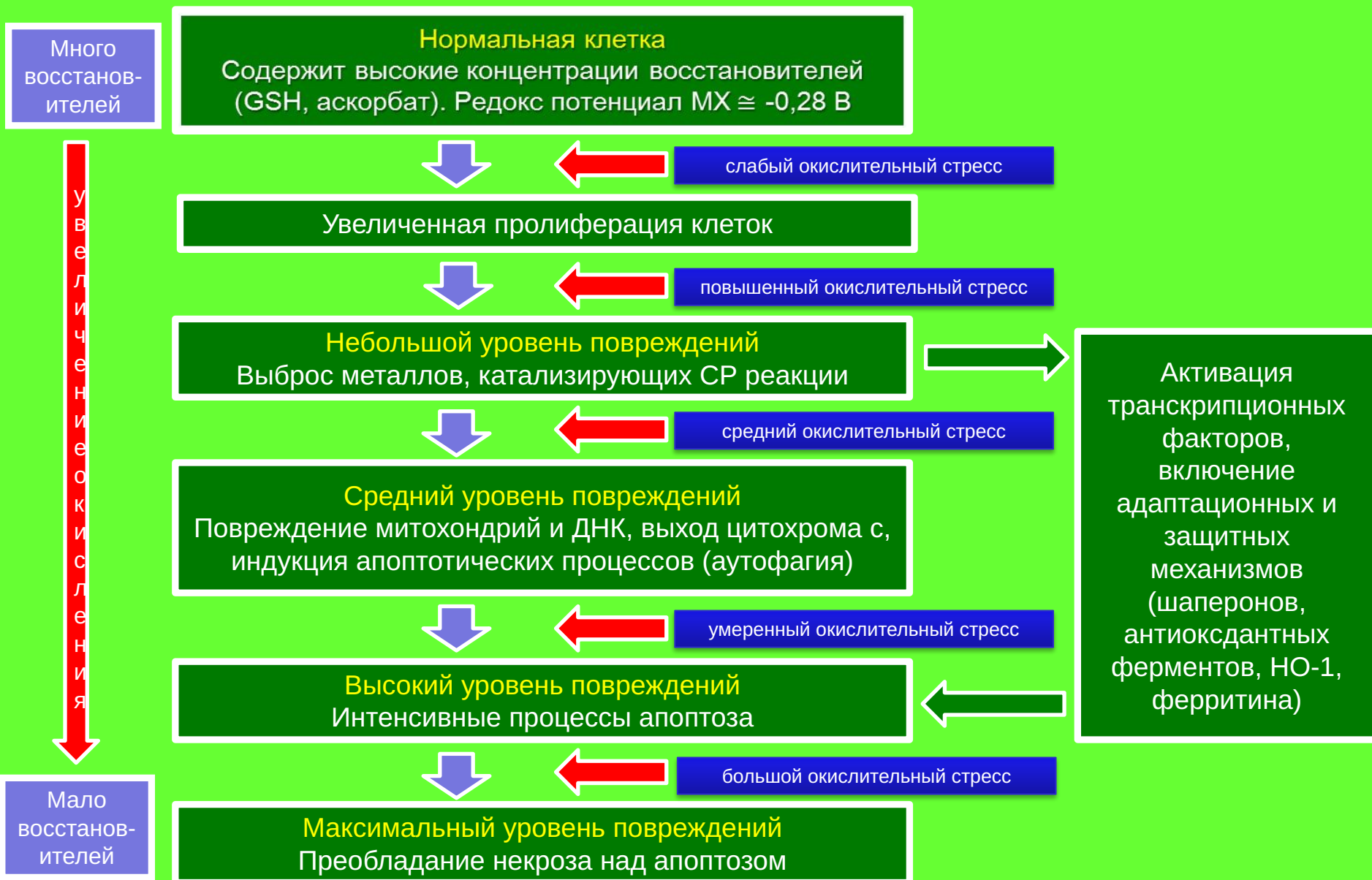
2.
адаптация

3.
восстановление
разрушений

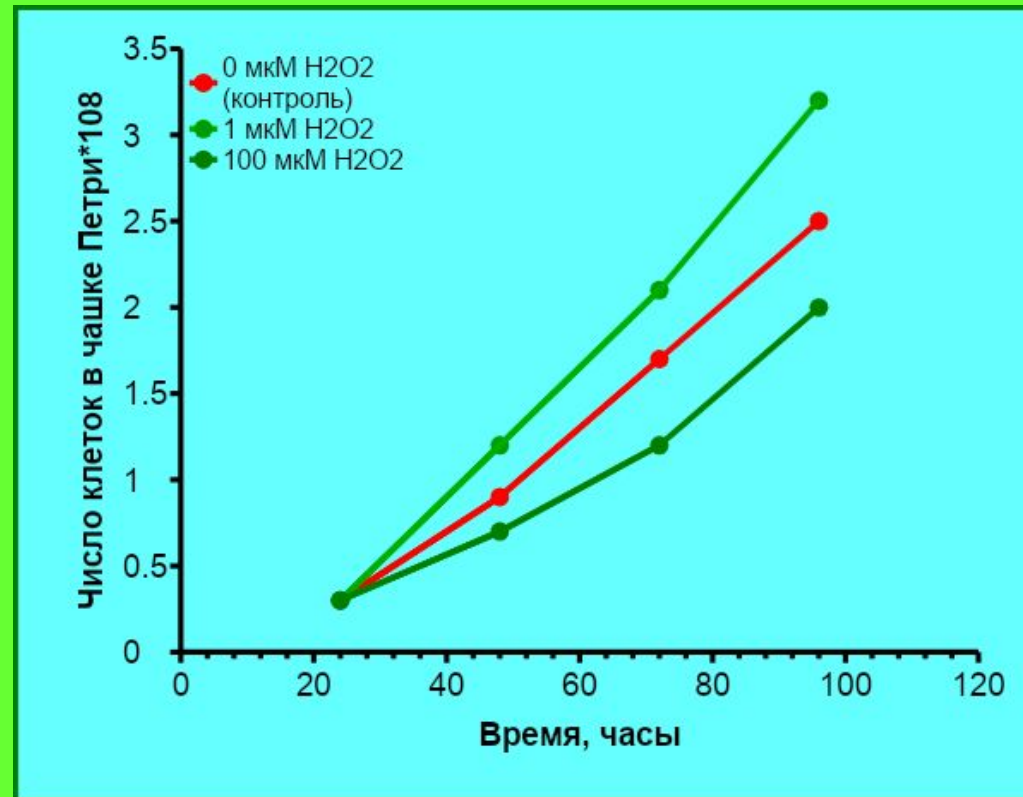
4.
ускоренное
старение

5.
смерть

Последствия оксидативного стресса



Последствия оксидативного стресса



При низких концентрациях H₂O₂ (1 мкМ) наблюдается ускорение пролиферации, а при высоких (100 мкМ) – наоборот торможение. Эксперименты проводились на суточной культуре клеток фибробластов почек китайского хомячка.

Последствия оксидативного стресса

Адаптация

При однократной кратковременной ишемии/реперфузии сердце свиней долго возвращается к нормальной сократительной активности, а при многократных процедурах ишемии/реперфузии процесс сокращения восстанавливается значительно быстрее

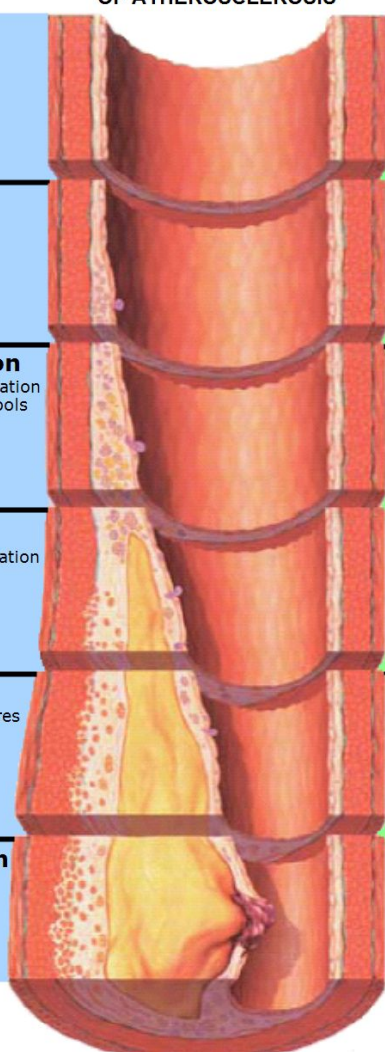
Культура клеток HeLa обычно не может жить даже при небольшом избытке кислорода, но постепенное повышение концентрации кислорода (на протяжении 21 месяца) позволяет получить культуру клеток живущую в атмосфере 80% кислорода

Повреждения и ускоренное старение

Небольшой оксидативный стресс приводит к замедлению пролиферации клеток, нарушая механизм, регулирующий клеточный цикл.

Остановка пролиферации возможна при воздействии высоких концентраций АФК. При инкубации фибробластов в H_2O_2 в концентрациях 100-300 мкМ у клеток появляется старческий фенотип, с увеличенной секрецией белков, ингибирующих клеточный цикл.

Свободные Радикалы и атеросклероз

| | NOMANCLATURE AND MAIN HISTOLOGY | SEQUENCES IN PROGRESSION OF ATHEROSCLEROSIS | EARLIEST ONSET | MAIN GROWTH MECHANISM | CLINICAL COLLELRLATION |
|------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|--------------------|-----------------------------------------------|----------------------------|
| ↓ ENDOTHELIAL DYSFUNCTION | Initial lesion <ul style="list-style-type: none"> • histologically "normal" • macrophage infiltration • isolated foam cells |  | from first decade | growth mainly by lipid addition | clinically silent |
| | Fatty streak mainly intracellular lipid accumulation | | | | |
| | Intermediate lesion <ul style="list-style-type: none"> • intracellular lipid accumulation • small extracellular lipid pools | | from third decade | increased smooth muscle and collagen increase | clinically silent or overt |
| | Atheroma <ul style="list-style-type: none"> • intracellular lipid accumulation • core of extracellular lipid | | | | |
| | Fibroatheroma <ul style="list-style-type: none"> • single or multiple lipid cores • fibrotic/calcific layers | | from fourth decade | thrombosis and/or hematoma | |
| | Complicated lesion <ul style="list-style-type: none"> • surface defect • hematoma-hemorrhage • thrombosis | | | | |

Атеросклероз – заболевание при котором происходит утолщение сосудистой стенки как результат накопления жиров (холестерина и триглицеридов). При атеросклерозе возникает синдром нарушения кровообращения в артериальной части системы, сопровождающийся хроническим воспалением с накоплением в стенке сосудов лейкоцитов макрофагального ряда и **липопротеинов низкой плотности (LDL)**, содержащих холестерин и триглицериды, и **липопротеинов высокой плотности (HDL)**, неспособных удалять холестерин и другие жиры. Эти процессы приводят к уплотнению стенки и образованию бляшек.

Свободные Радикалы и атеросклероз

свободные радикалы, вирусы, ксенобиотики, копоненты табачных смол, глюкоза, гомоцистеин



Свободные Радикалы и диабет

Диабет (Diabetes mellitus)

заболевание, характеризующееся высоким уровнем глюкозы в крови и в моче, а также целым комплексом полиурия, полидипсия, полифагия и т.н. «сосудистыми симптомами» (нарушение зрения)

Классификация диабета:

1 типа - заболевание, связанное с неспособностью поджелудочной железы **продуцировать** инсулин

2 типа - заболевание, связанное с неспособностью клеток и тканей организма **использовать** инсулин

диабет беременных – может предшествовать диабету 2 типа. Часто проходит после родов.

У животных, у которых развивается спонтанный диабет, применение антиоксидантов (токоферола, СОД, десферриоксамина) ослабляет симптоматику и отдаляет появление симптомов болезни. При диабете оксидативный стресс является медиатором многих явлений.

Свободные Радикалы и диабет

Диабет

повышенное содержание
глюкозы в плазме

1. избыточный синтез
NADH

6. подавление
активности тиоредоксин
редуктазной системы

2. усиленная работа
комплекса I митохондрий
и продукция им $O_2^{\cdot -}$

5. превращение лактат
дегидрогеназы в NADH-
оксидазу и продукция ею $O_2^{\cdot -}$

3. окисление
МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ
ЛИПИДОВ

4. нарушение функций
митохондрий за счет АФК



СР и Острый Респираторный Дистресс Синдром

ОРДС

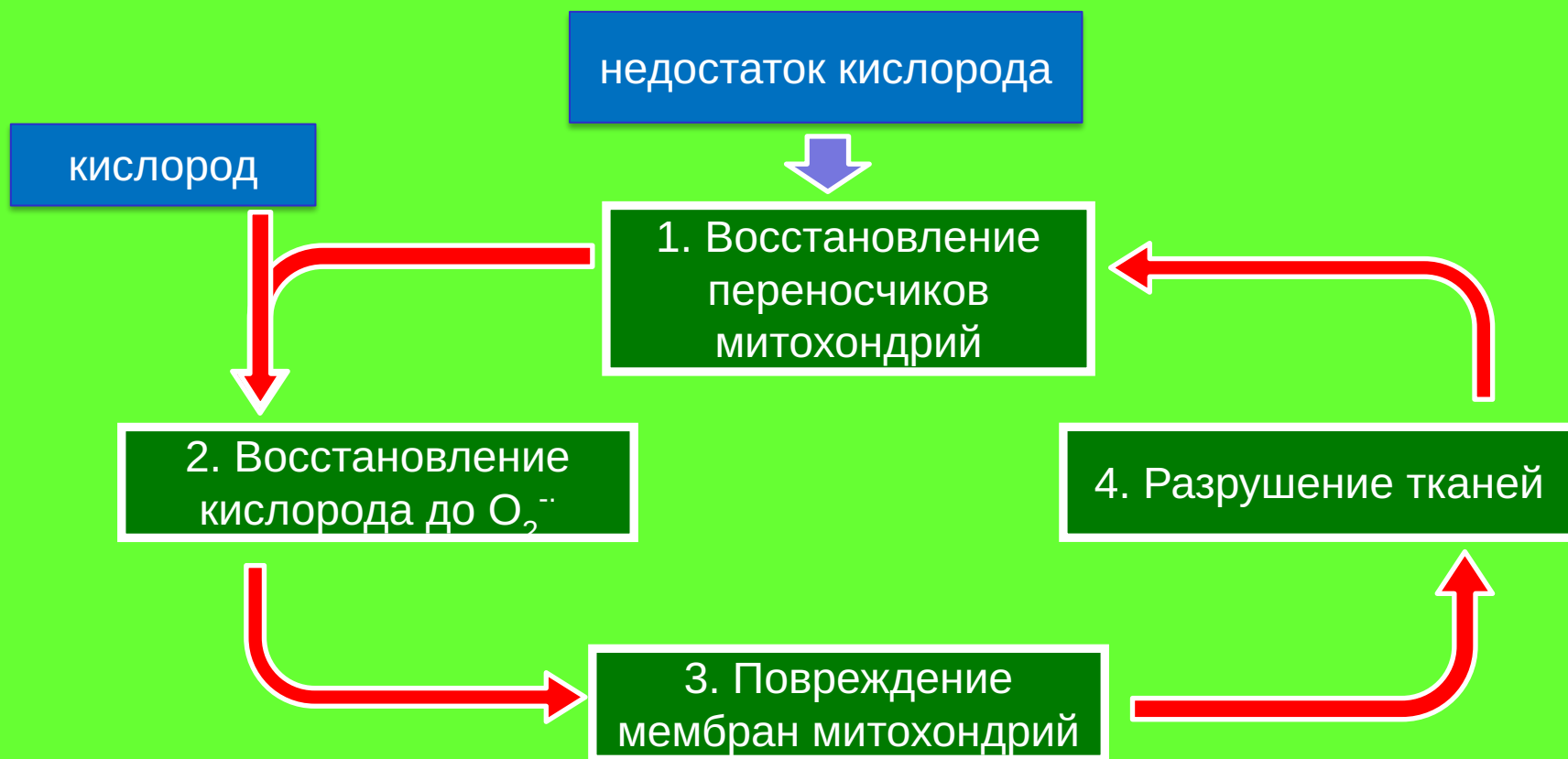
Определяется как синдром острой интенсивной гипоксии, которая не купируется подачей кислорода и вызывается отеком легких. Может быть следствием геморрагического или эндотоксического шока.



Это состояние частично снимается СОД

СР и трансплантация и хранение органов

при трансплантации и хранении органов основным механизмом повреждения тканей является механизм **гипоксии-реоксигенации**



Это состояние частично снимается добавками СОД, глутатиона и токоферола

СР и онкологические заболевания

Онкологические
заболевания



известные также, как злокачественные новообразования
- группа заболеваний, характеризующихся
неконтролируемым размножением и ростом клеток и
пронизывающих окружающие ткани



СР и онкологические заболевания

Повреждения ДНК:

Химические изменения в пуриновых и пиримидиновых основаниях, сахарах, хроматине

Конформационные изменения в пуриновых и пиримидиновых основаниях, хроматине

Увеличение мутагенности

Неверное образование Н связей

Остановка репликации

Неверная репликация

Увеличение числа мутаций

Злокачественное перерождение

Свободные радикалы

Повреждение белков

Повреждение НК

Перекисное окисление липидов

Повреждение митохондрий

Увеличение продукции радикалов

Снижение синтеза АТФ

Апоптоз

Некроз

Изменение клеточного состава

Снижение функций

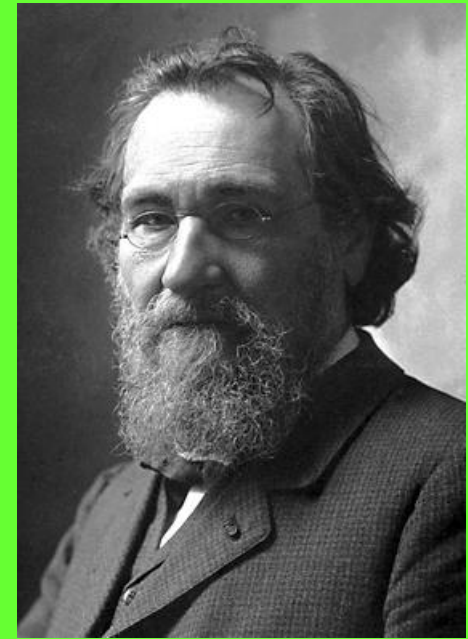
Свободнорадикальная теория старения

геронтология (от греч. *geron*, род. п. *gerontos* — старик и ...логия) — наука, изучающая старение живых организмов.

Термин “геронтология” впервые ввел И.И. Мечников в 1903 г. и он означает научное изучение процесса старения.

Мечников считал, что старость и смерть наступают у человека преждевременно из-за микробов кишечной флоры, отравляющих организм своими токсинами.

Он полагал, что старость можно лечить, как и всякую болезнь режимом питания и гигиеническими средствами.



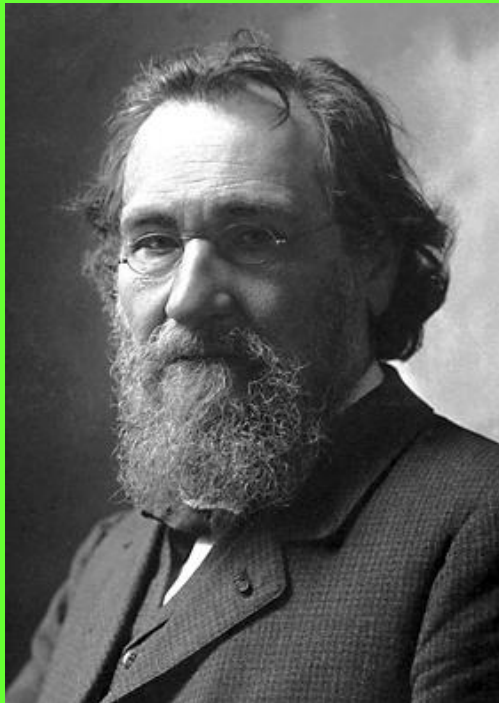
Мечников
Илья Ильич
(1845-1916)

Аутоинтоксикация –самоотравление гнилостными бактериями, паразитирующими в наших толстых кишках. И Мечников решил бороться с ними с помощью молочнокислых бактерий, которые вырабатывают молочную кислоту и изгоняют диких, ядовитых бактерий. 20 с лишним лет Мечников жил, строго, следуя предписаниям своей новой теории. Он не пил алкогольных напитков и не курил, хлеб ему приносили в особых стерилизованных бумажных пакетиках, предохраняющих от загрязнения «дикими» бактериями. Умер он на 71 году жизни.

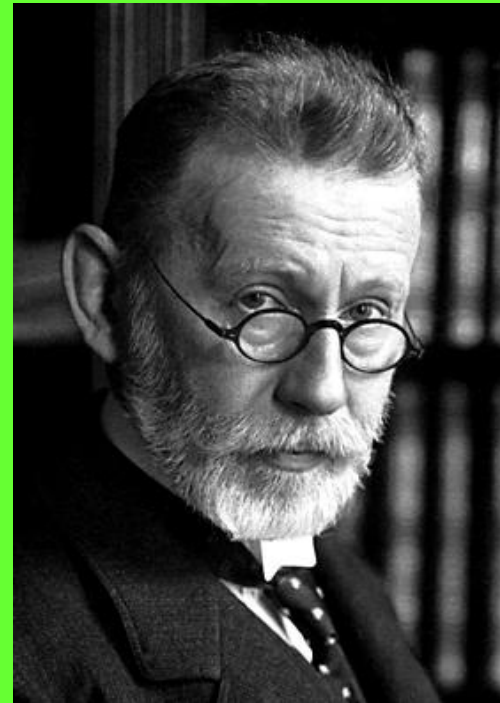


Нобелевская премия по физиологии и медицине
за 1908 год

вручена за «... исследования клеточной и гуморальной природы иммунитета»

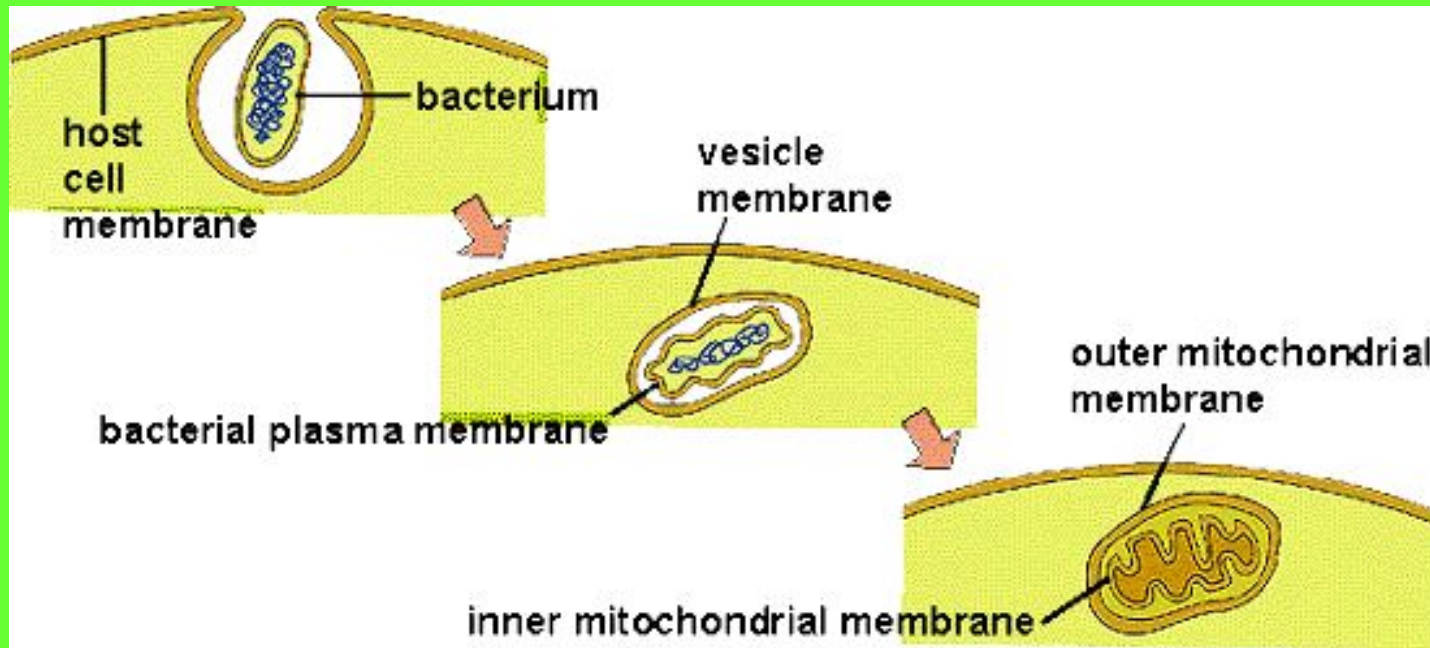


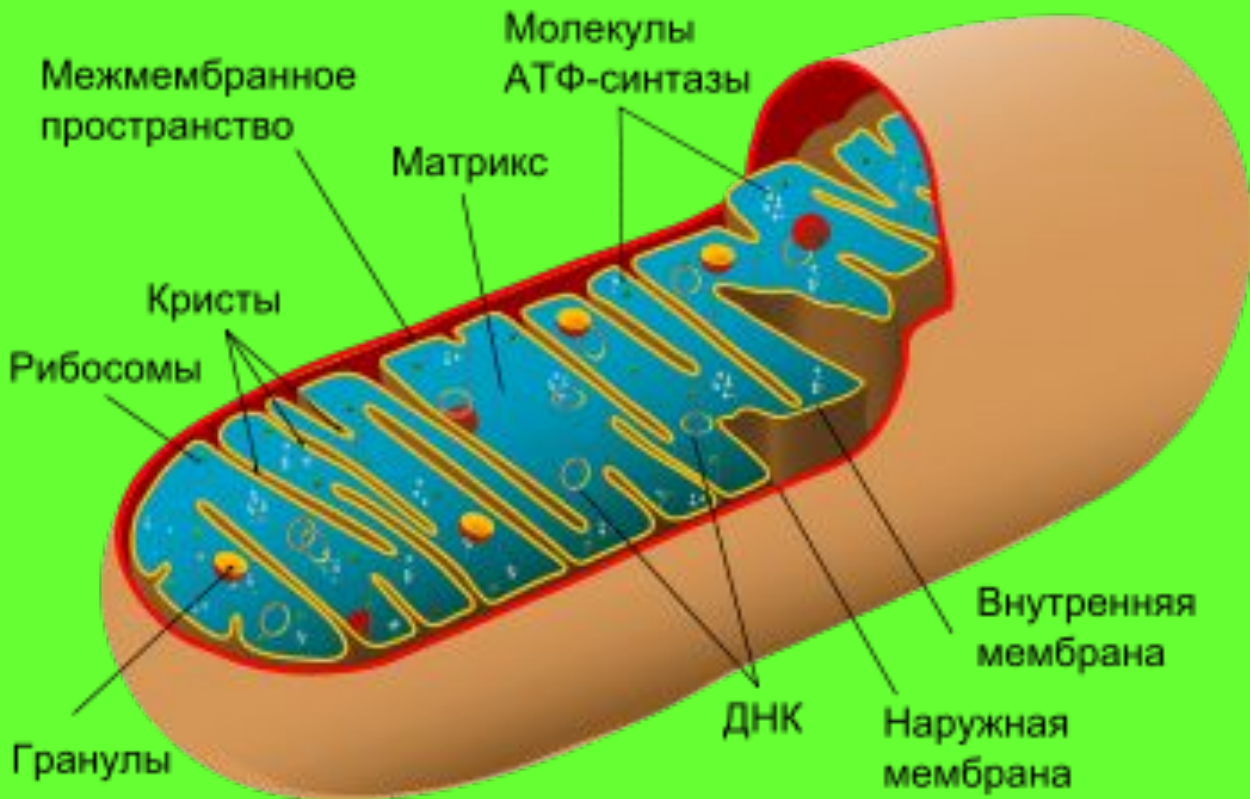
Илья Ильич Мечников,
Институт Пастера, Париж, Франция



Пауль Эрлих,
Бад Хомбург, Германия

Основоположник геронтологии И.И. Мечников предполагал, что в основе старения лежат токсины, вырабатываемые бактериями нашего организма. Гипотеза Мечникова трансформировалась в 20-ом веке в **митохондриальную теорию старения**, предполагающую, что старение во многом обусловлено активными формами кислорода (АФК), вырабатываемыми митохондриями, которые произошли от симбиотических бактерий, поселившихся в эукариотических клетках





Митохондрии взрослого человека среднего роста и веса перекачивают через свои мембраны около **500 г ионов водорода** в день, образуя мембранный потенциал. За это же время H^+ -АТФ-синтаза производит около **40 кг АТФ** из АДФ и фосфата, а использующие АТФ процессы гидролизуют всю массу АТФ назад в АДФ и фосфат.



ДНК митохондрий кольцевая, в 100 тысяч раз меньшая, чем ядерная.

Свободнорадикальная теория старения

Согласно этой теории в качестве главной причины старения рассматривается повреждение свободными радикалами кислорода основных молекулярных структур клетки: липидов, белков и нуклеиновых кислот. Предположение о том, что возрастные изменения – результат накопления повреждений, вызываемых свободными радикалами, исходно базировалась на сходстве проявлений лучевого поражения и естественного старения.

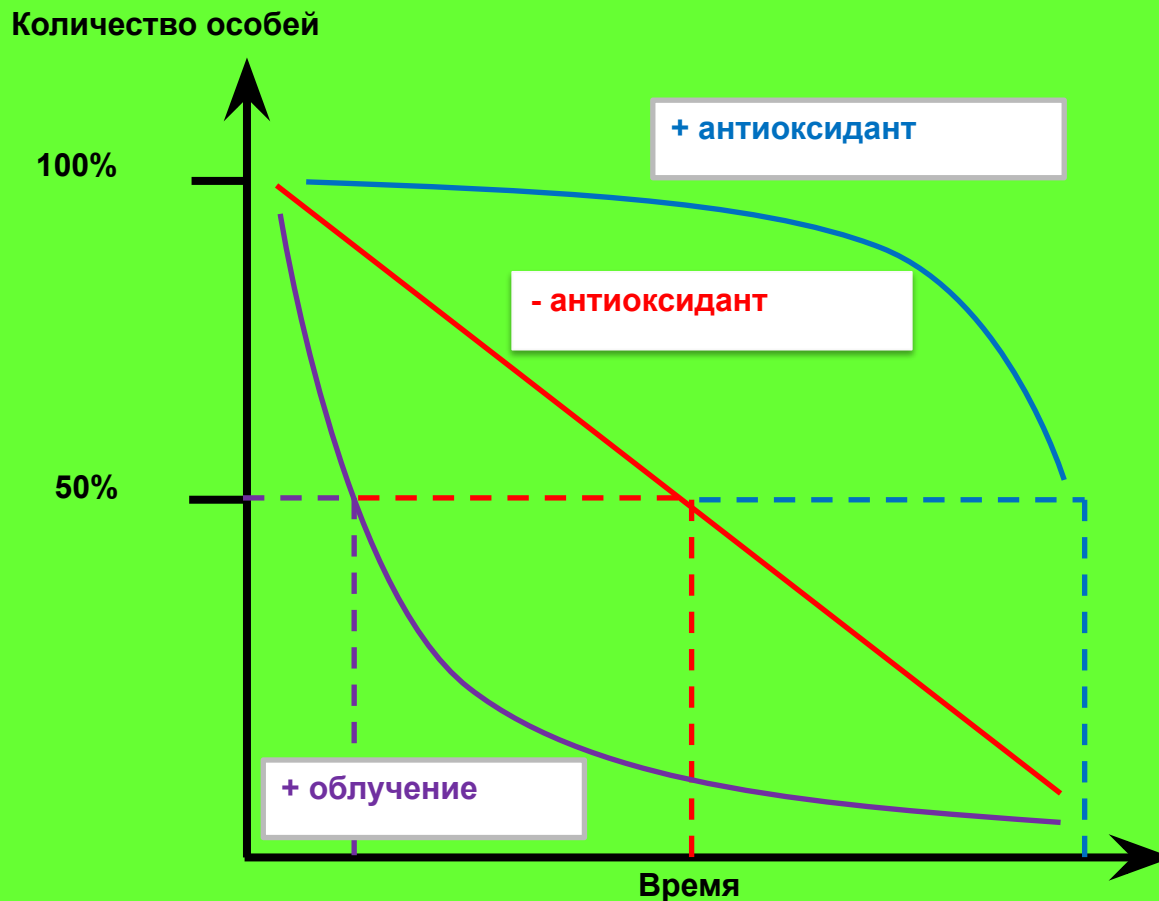


Дэнем Харман, основатель
свободно-радикальной
теории старения

Harman, D. "Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry" *J Gerontol.* 1956,11: 298-300.

Предшественники и коллеги: Gershman, R., Gilbert, D.L., Nye, S.W. and Dwyer, P. (1954) Oxygen poisoning and X-irradiation: a mechanism in common. *Science* **119**, 623-626.

Увеличение средней продолжительности жизни при кормлении антиоксидантами



Основные вехи в развитии свободнорадикальной теории старения:

1. обнаружение в клетках всех аэробных организмов источников супероксидных анион-радикалов кислорода и ферментов, защищающих субклеточные структуры от этих радикалов ;
2. выяснение роли митохондрий в генерации супероксид анион-радикалов кислорода ;
3. изучение механизмов и последствий ПОЛ, свободнорадикального повреждения белков и нуклеиновых кислот;
4. доказательство участия свободных радикалов в мутагенезе и патогенезе болезней, характерных для людей пожилого и старческого возраста;
5. применение геропротекторов, созданных на основе естественных и синтетических антиоксидантов

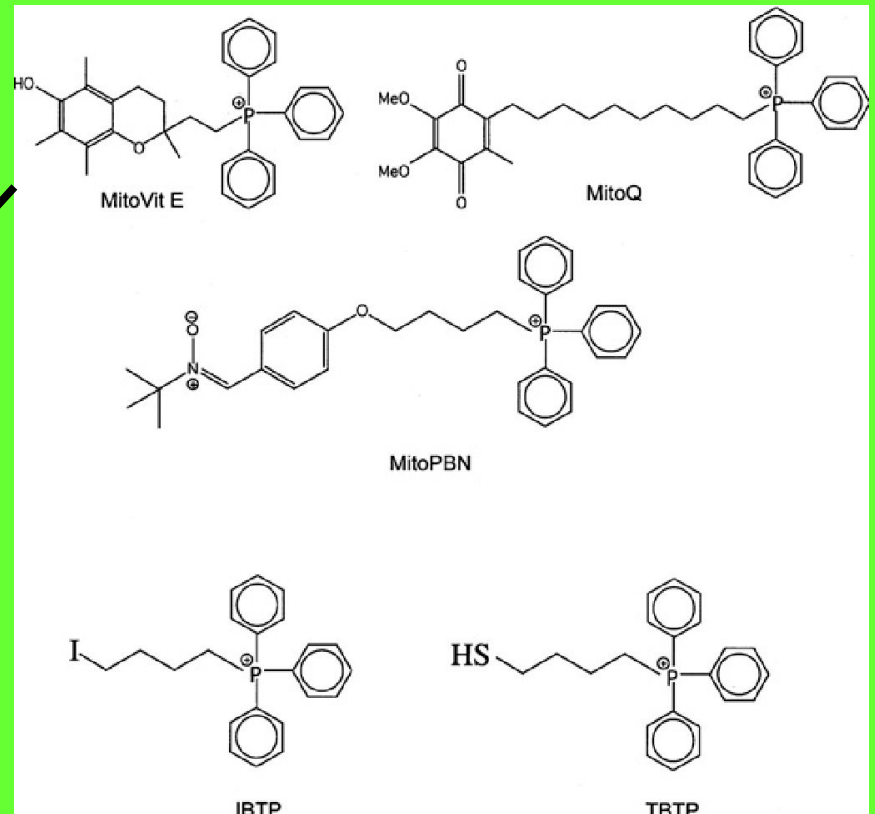
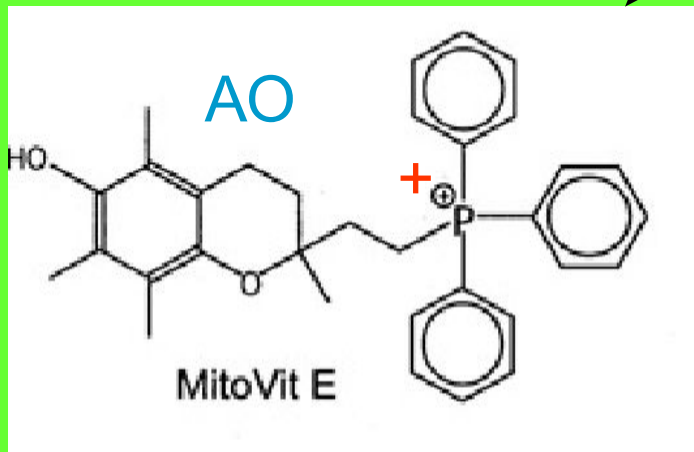
Связь окислительного стресса и мутаций мтДНК со смертью клеток и старением тканей



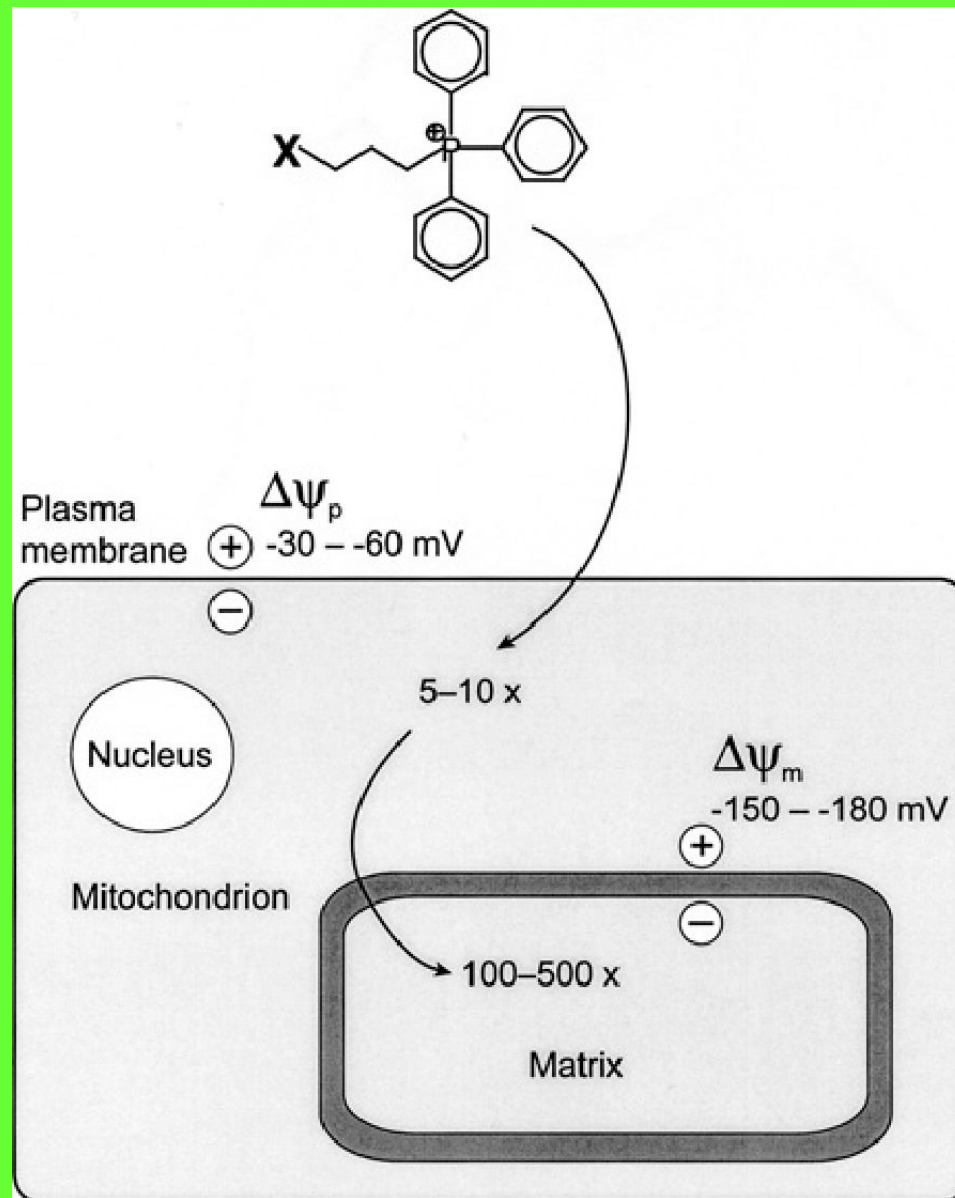


Dr. Mike Murphy
Cambridge

«Самонаводящиеся» митохондриальные
антиоксиданты
(«*selectively targeting bioactive molecules to mitochondria*»
- избирательно направленные на митохондрии
биоактивные молекулы)



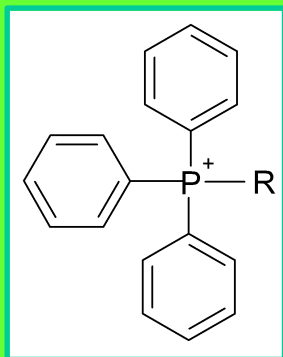
Идея Мэрфи состояла в том, чтобы соединить такие проникающие ионы с антиоксидантами, что позволяло резко увеличить концентрацию антиоксидантов именно в митохондриях, основном генераторе свободных радикалов. Согласно расчётам при разности потенциалов $-150 \div -180$ мВ концентрация антиоксиданта внутри митохондрий возрастает в сотни раз по сравнению с соответствующей концентрацией вещества в среде



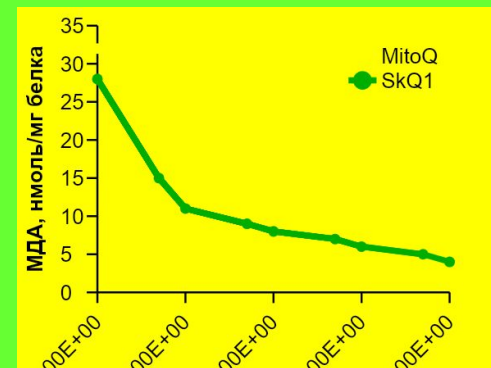
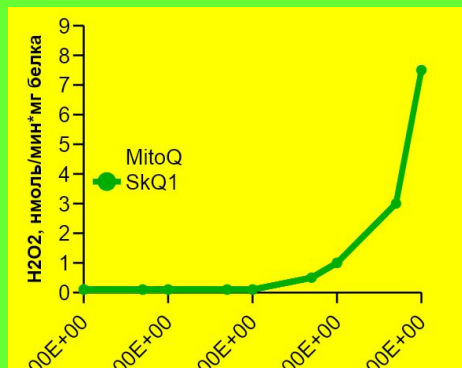
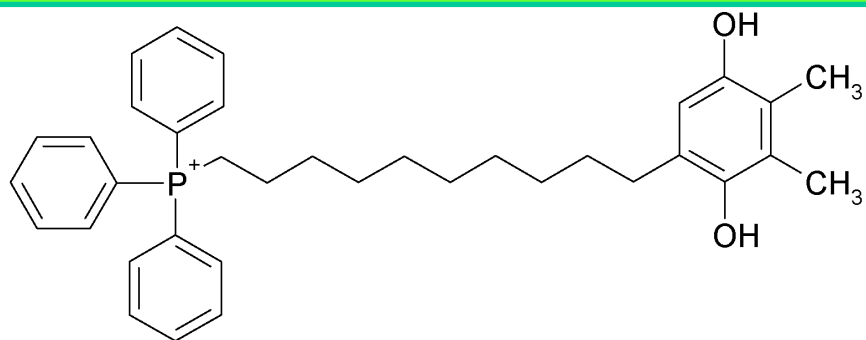
В институте физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского академиком РАН В.П. Скулачёвым были синтезированы похожие вещества, которые оказались еще более эффективным антиоксидантом, чем у Мэрфи



В.П.Скулачёв

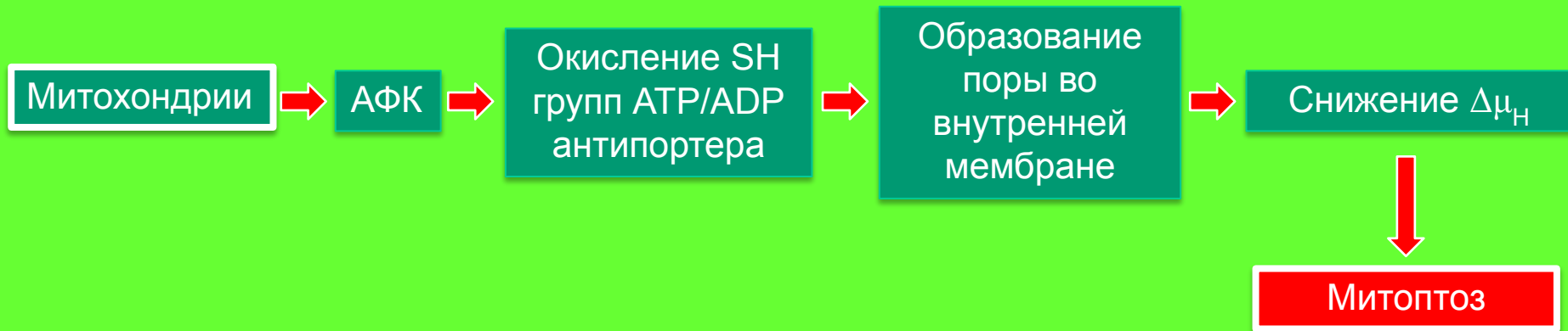


радикал трифенилфосфония работает как «локомотив», быстро проникая внутрь митохондрий



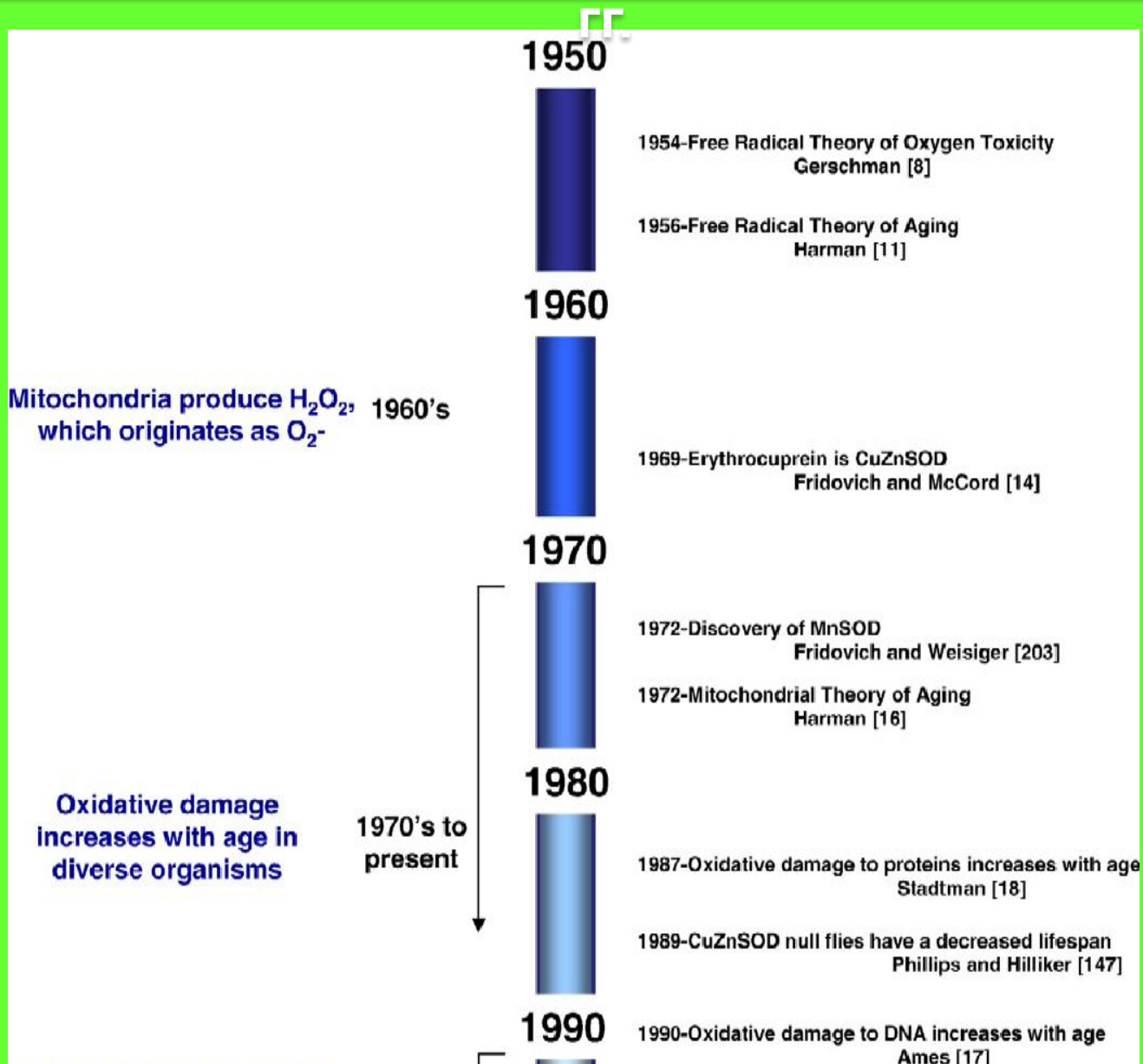
катион пласто-хинолил-децил-трифенил-фосфония (он же SkQ1 ион) – митохондриально-адресованного антиоксиданта

Схема митоптоза

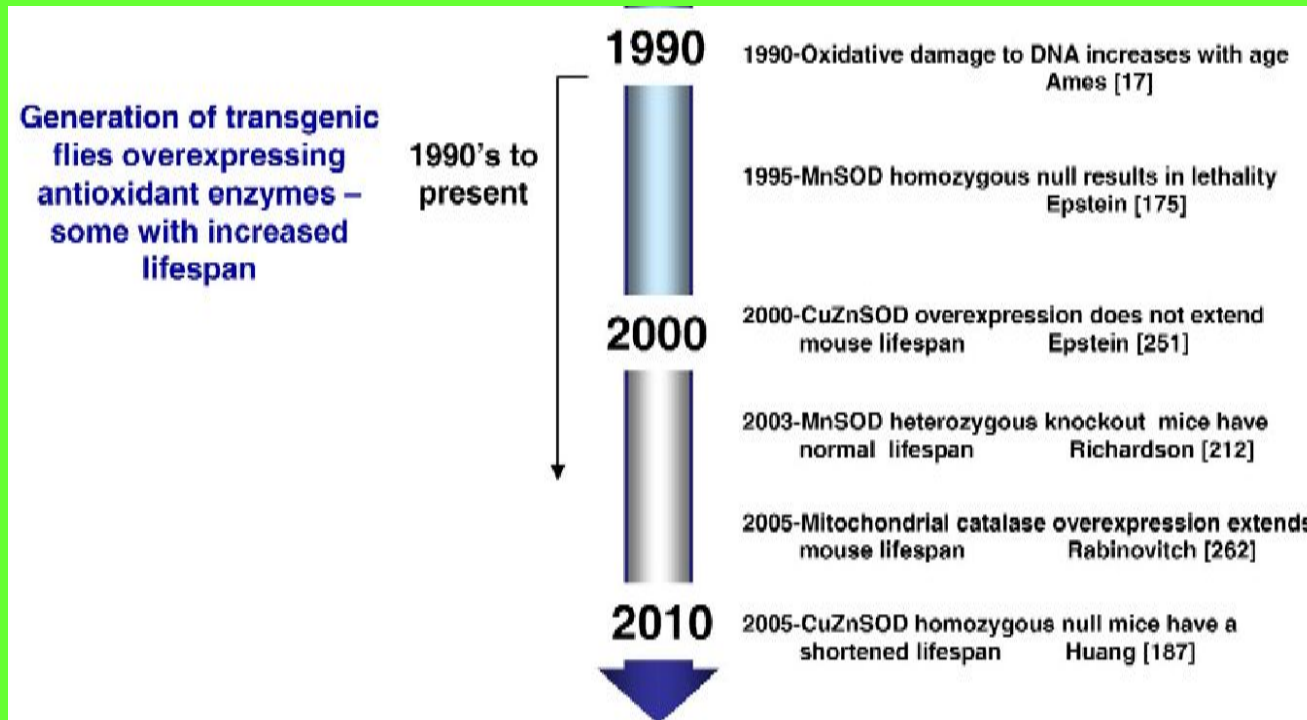


Если поврежденных митохондрий очень много, то **МИТОПТОЗ** переходит в **аПОПТОЗ** (запрограммированную гибель клеток)

МИТОХОНДРИАЛЬНАЯ ТЕОРИЯ СТАРЕНИЯ 1950-1990



МИТОХОНДРИАЛЬНАЯ ТЕОРИЯ СТАРЕНИЯ 1990-2010 гг.



Выведение линий мышей с увеличенной экспрессией антиоксидантных ферментов (каталазы) увеличивало продолжительность жизни.

Но в отношении других антиоксидантных ферментов не было получено таких отчётливых результатов, что требует

дальнейших исследований ведущей роли свободных радикалов в старении