

Mechanismy poškození buňky

Autoři

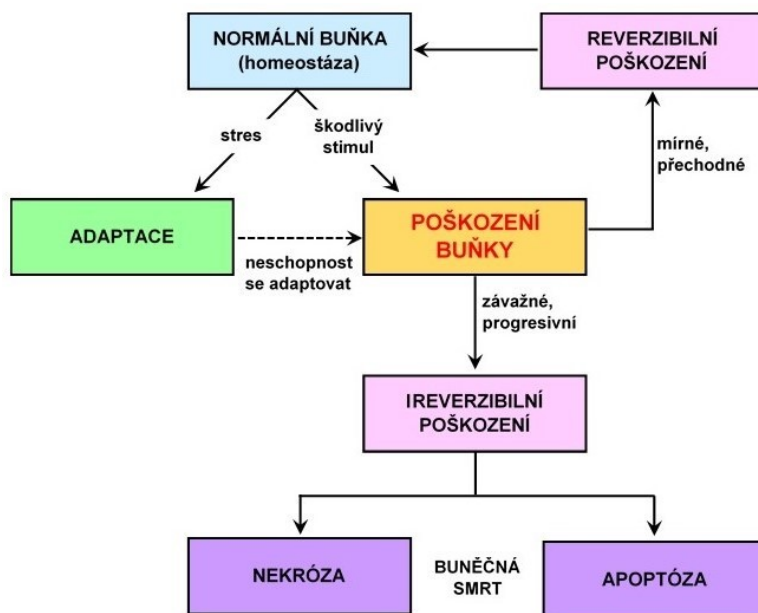
Doc. PharmDr. Iva Boušová, Ph.D., prof. MUDr. Jaroslav Dršata, CSc.

(bousova@faf.cuni.cz)

Katedra biochemických věd

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

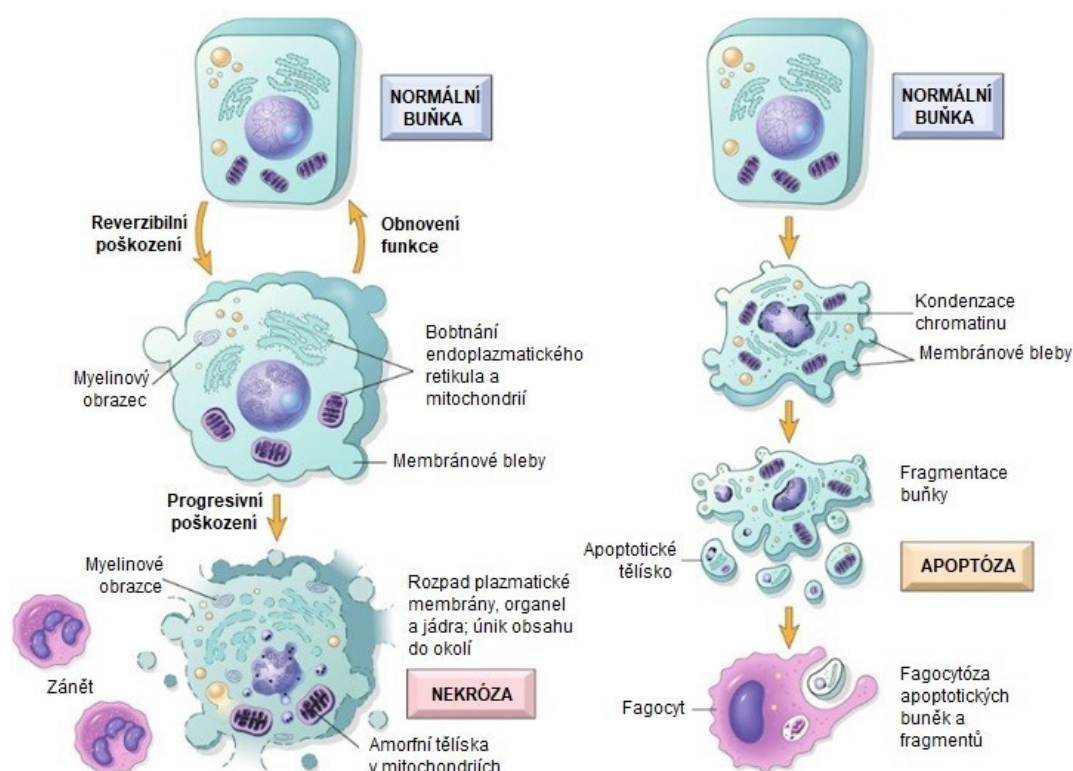
Normální buňka se nachází ve stavu dynamické rovnováhy (normální **homeostázy**), kdy reaguje na požadavky svého metabolismu, rozvíjí se podle své diference, provádí specifické funkční zaměření a reaguje na různé fyziologické podněty. Prodělává tedy určité funkční i morfologické změny, které jsou dané jejím genetickým programem. Na větší fyziologickou zátěž nebo menší patologické podněty reaguje buněčnými **adaptačními mechanismy** (tj. hypertrofie, hyperplazie, atrofie a metaplasie). Adaptaci provázejí funkční i morfologické změny, které nastaví nový rovnovážný stav. Avšak adaptivní odpověď má určité meze. Pokud je zátěž příliš velká nebo není adaptace možná, dochází k **poškození buňky**, které může být vratné (**reverzibilní**), pokud se buňka z poškození vzpamatuje, nebo nevratné (**ireverzibilní**), končící její smrtí (Obr. 1).



Obr. 1. Stádia buněčné odpovědi na poškození nebo škodlivý stimul (upraveno z Kumar a kol. 2014).



Zánik buňky může být výsledkem naprogramované buněčné smrti, vedoucí k naplánované eliminaci již nepotřebných buněk (**apoptóza**), nebo důsledkem vážného poškození buňky (**nekróza**). Tyto procesy se v řadě bodů liší (Obr. 2). V časně fázi nekrózy dochází k narušení buněčných membrán a buňky i jejich orgány začnou bobtnat, jejich vnitřní obsah uniká narušenými membránami do okolí, což navozuje zánětlivou reakci a nakonec i rozpad buňky. Apoptóza je charakterizována ztrátou fosfolipidové asymetrie buněčné membrány, kondenzací chromatinu, smrštěním jádra, štěpením internukleosomální DNA, svašťováním buňky, pukáním membrány a nakonec rozpadem buňky na apoptotická tělíska, která jsou rychle fagocytována bez vzniku zánětlivé reakce.



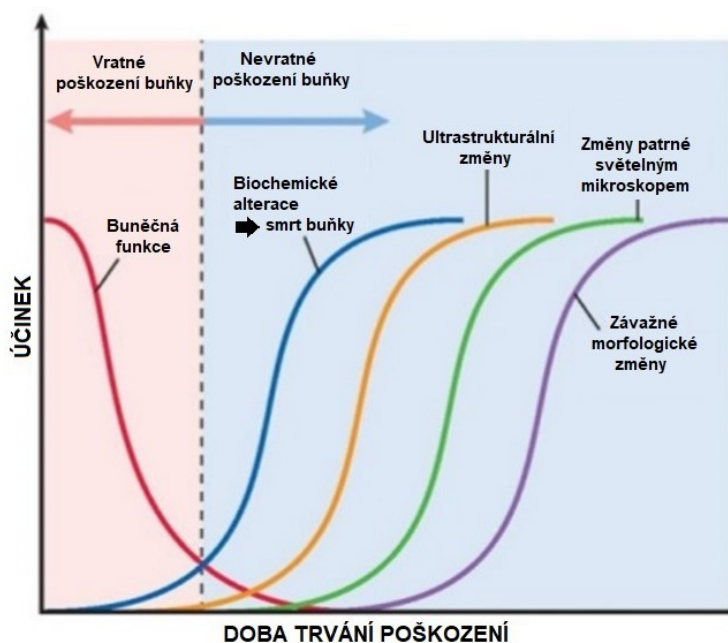
Obr. 2. Schematické zobrazení morfologických změn u buněčného poškození vedoucího k nekróze anebo apoptóze (upraveno z Kumar a kol. 2014).

Příčiny poškození zahrnují celou řadu procesů od hrubého mechanického poškození a fyzikálního poškození, přes působení infekčních agens, nutriční nerovnováhy a imunologických reakcí až po subtilní vnitřní poruchy, jakými jsou genetické defekty.



Obecné mechanismy vedoucí k poškození či smrti buňky

Mezi nejčastěji napadené buněčné systémy patří integrita buněčných membrán, aerobní respirace, proteosyntéza a integrita genetického aparátu. Je třeba mít na mysli, že biochemické a morfologické složky buňky spolu úzce souvisejí, takže prvotní atak, který poškodí určité místo, rychle vyústí do širokého spektra druhotných účinků. Příkladem může být narušení aerobní respirace, které potlačí aktivitu iontových pump v membráně (např. Na/K-ATPasa) a tím ohrozí iontovou a osmotickou rovnováhu buňky. Morfologické změny jako důsledek poškození buňky jsou průkazné mnohem později než biochemické změny; morfologické změny se rychleji manifestují u reverzibilního než ireverzibilního poškození (Obr. 3). Například morfologickou známkou vratného poškození je buněčný edém, který se objevuje během několika minut, zatímco nepochybné mikroskopické změny jsou při nekróze myokardu patrné až za 10-12 hodin. Avšak nevratné poškození myokardu nastane už za 20-60 minut po nastalé ischemii a biochemické markery (myoglobin, troponiny) jsou v krvi prokazatelné už za 1,5-2 hodiny. Reakce buňky na poškození závisí na druhu poškození, jeho trvání a závažnosti. Následky poškození jsou determinovány typem, stavem a adaptabilitou buňky, důležitý je rovněž její energetický potenciál a metabolické potřeby. Při ischemii dochází k nevratnému poškození hepatocytů za 1-2 hodiny (zásoby glykogenu), kardiomyocytů za 30-40 minut a nervových buněk za 3-5 minut.

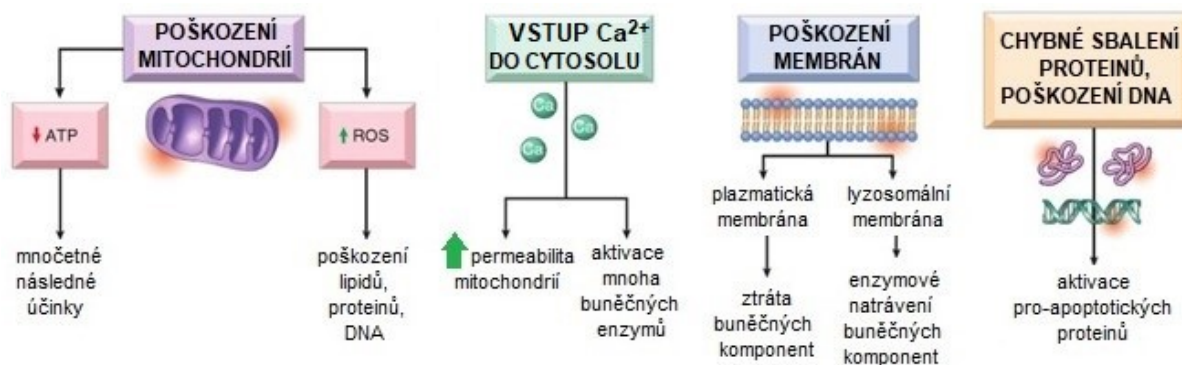


Obr. 3. Manifestace změn u reverzibilního a ireverzibilního poškození buňky (upraveno z Kumar a kol. 2014).



Hlavní biochemické mechanismy buněčného poškození

Hlavními biochemickými mediátory buněčného poškození jsou deplece ATP, poškození mitochondrií, influx kalcia a porušení kalciové homeostázy, nahromadění reaktivních forem kyslíku (ROS), defekty v membránové permeabilitě, poškození DNA a proteinů (Obr. 4).



Obr. 4. Hlavní biochemické mechanismy buněčného poškození (upraveno z Kumar a kol. 2014).

Vyčerpání ATP

Základní příčinou buněčné nekrózy je pokles hladin ATP. Deplece (vyčerpání) ATP a pokles syntézy ATP jsou obvykle vyvolány nedostatečným přívodem kyslíku a živin (hypoxie/ischemie), poškozením mitochondrií a účinkem některých chemických škodlivin (např. kyanidu). Energie ve formě ATP je vyžadována většinou syntetických i degradačních procesů v buňce (membránový transport, lipogeneze, proteosyntéza, deacylace-reacylace membránových fosfolipidů). Pokles koncentrace ATP na 5-10 % normální koncentrace má dopad na mnoho klíčových buněčných procesů. To vše výrazně ovlivňuje integritu plasmatické membrány, jejíž porucha je jednou z hlavních příčin zániku buňky.

Poškození mitochondrií

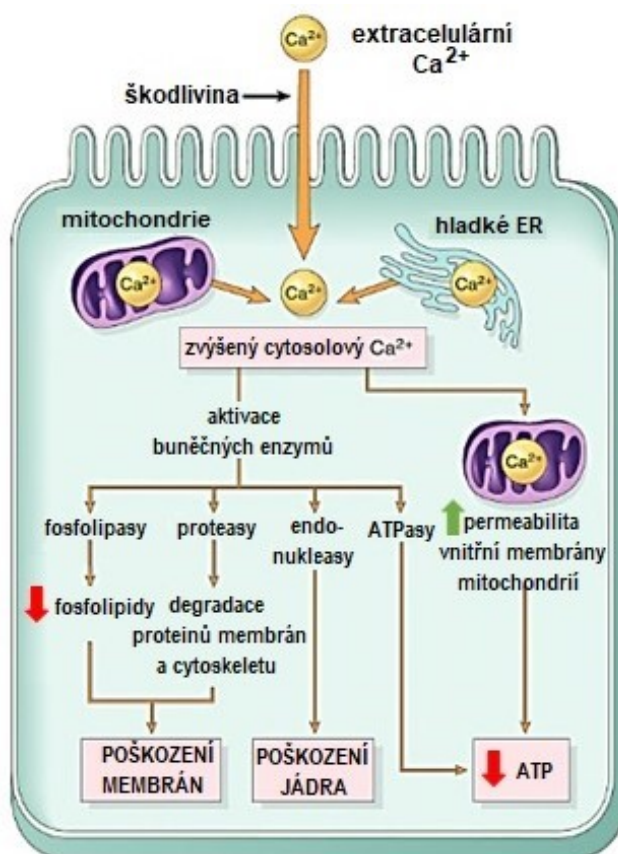
Mitochondrie hrají klíčovou úlohu ve všech typech buněčného poškození a smrti. K poškození mitochondrií dochází působením intracelulárního Ca^{2+} , ROS či nedostatkem kyslíku, takže jsou citlivé k prakticky všem typům poškození včetně hypoxie/ischemie a chemických škodlivin. Mutace v mitochondriální DNA jsou příčinou vzniku některých vrozených onemocnění. Následkem poškození mitochondrií dochází k otevření mitochondriálních kanálů MPTP („mitochondrial permeability transition pore“) a následné ztrátě membránového potenciálu, útlumu oxidační fosforylace a progresivní depleci ATP. Změny v oxidační fosforylaci



způsobují vznik ROS. Ztráta integrity mitochondriálních membrán způsobí uvolnění cytochromu c do cytosolu a následnou aktivaci prokaspas, které spouští apoptózu.

Influx Ca^{2+} a narušení kalciové homestázy

Rozdíl mezi koncentracemi Ca uvnitř buňky ($0,1 \mu\text{M}$) a v extracelulárním prostoru ($1,3 \text{ mM}$) přesahuje 4 řády. Tento koncentrační gradient, který je podmínkou životaschopnosti buňky, je umožněn sekvestrací intracelulárního Ca^{2+} do mitochondrií a ER a do extracelulárního prostoru působením Ca/Mg-ATPasy. Některé toxiny a ischemie způsobují rychlý nárůst cytosolového Ca^{2+} tokem z ER a mitochondrií a později influxem z extracelulárního prostoru a vyvolají tak nespecifické zvýšení membránové permeability a aktivaci řady enzymů poškozujících buněčnou strukturu (fosfolipasy, proteasy, ATPasy, endonukleasy). Vysoké hladiny intracelulárního Ca^{2+} spouštějí apoptózu jednak přímou aktivací kaspas a také zvýšením permeability mitochondrií. Nahromadění Ca^{2+} v mitochondriích způsobí otevření membránového póru MPTP a následné selhání syntézy ATP (Obr. 5).

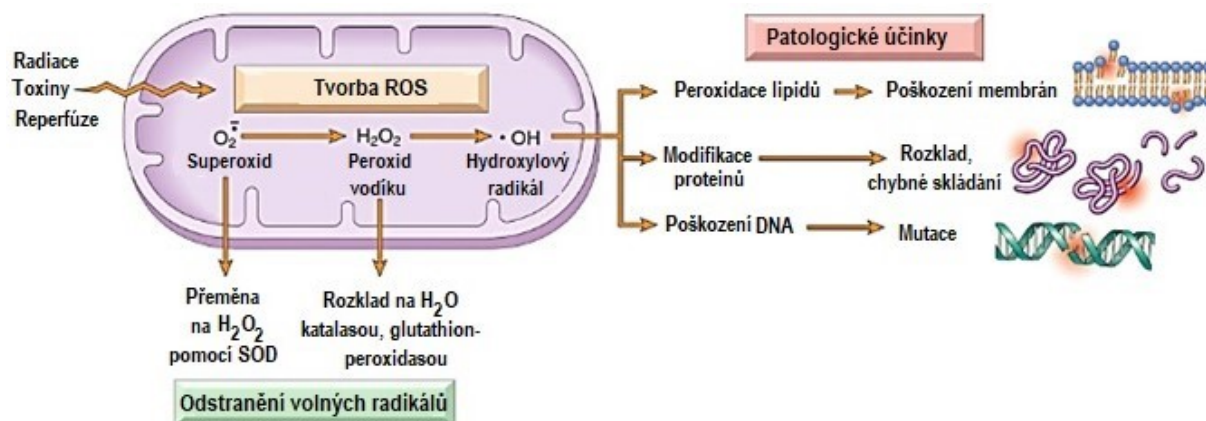


Obr. 5. Účast zvýšeného intracelulárního kalcia v buněčném poškození (upraveno z Kumar a kol. 2014).



Nahromadění ROS (oxidační stres)

Reaktivní formy kyslíku jsou mediátory buněčné smrti u řady patologických stavů. Způsobují peroxidaci lipidových komponent buňky, oxidaci proteinů a DNA, což má nepříznivý dopad na buněčnou strukturu (Obr. 6). Podrobnější informace jsou uvedeny v kapitole 2.



Obr. 6. Vznik, odstranění a úloha ROS v buněčném poškození (upraveno z Kumar a kol. 2014).

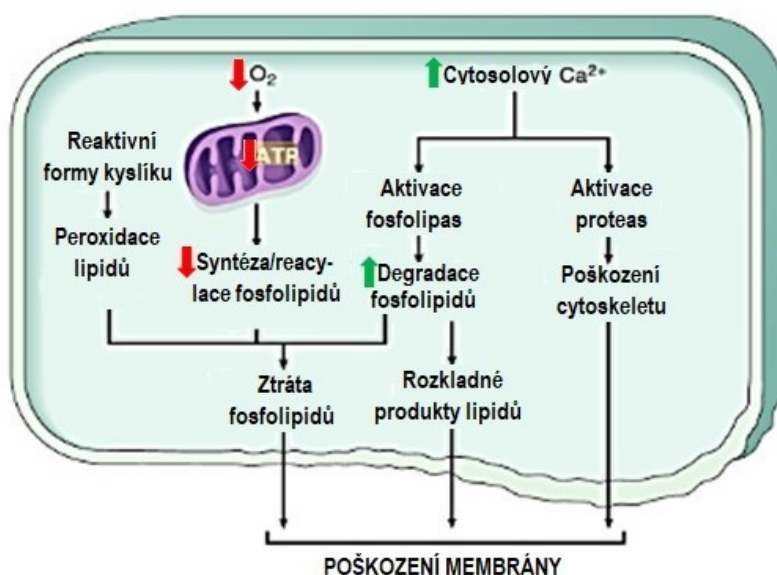
Poškození DNA a proteinů

Buňky sice disponují reparačními mechanismy pro opravu poškozené DNA, ale pokud je poškození příliš rozsáhlé (např. po vystavení DNA radiaci, oxidačnímu stresu nebo některým xenobiotikům), zahájí buňka sebevražedný program, který vede ke smrti buňky apoptózou. Podobnou reakci nastartují i chybně složené proteiny, které mohou vzniknout následkem dědičné mutace nebo působením volných radikálů.

Defekty v membránové permeabilitě

Jednou z počátečních fází poškození buňky je ztráta selektivní membránové permeability, která nakonec vede ke zjevnému poškození membrány, je společným rysem prakticky všech forem poškození buňky. Membránové defekty jsou výsledkem řady událostí, jako je deplece ATP či aktivace fosfolipas zvýšenou hladinou intracelulárního Ca^{2+} . Některé bakteriální toxiny, virové proteiny, lytické složky komplementu, perforin lymfocytů a řada fyzikálních a chemických agens způsobuje přímé poškození plasmatické membrány. K poškození membrány mohou přispět i některé biochemické mechanismy (Obr. 7).





Obr. 7. Mechanismy poškození membrány v buněčném poškození (upraveno z Kumar a kol. 2014).

Sled biochemických a morfologických změn při akutním ischemickém a hypoxickém poškození

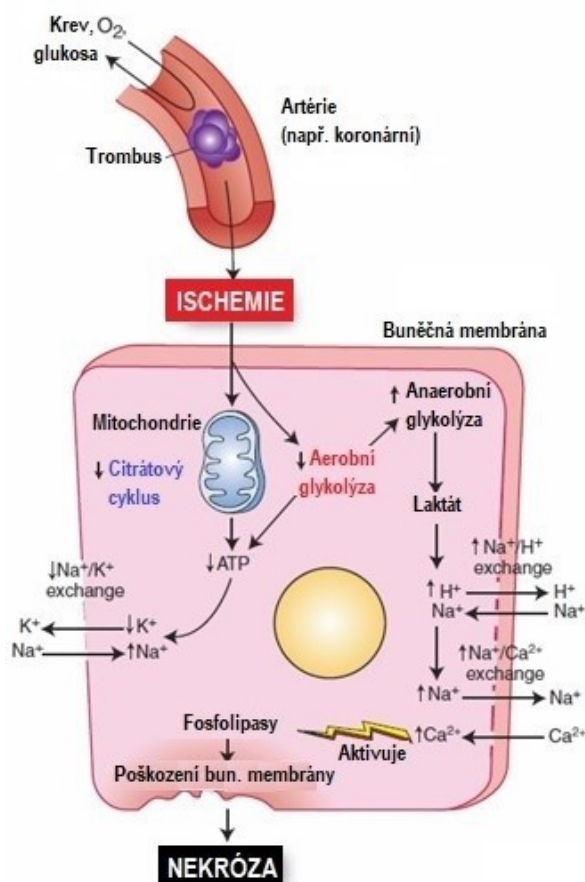
Reverzibilní poškození

Hypoxie nejprve ovlivní aerobní respiraci buňky, tedy oxidační fosforylaci v mitochondriích. Jak klesá tenze O_2 , tak se snižuje i oxidační fosforylace a tím i tvorba ATP. Pokles produkce ATP postihuje celou řadu buněčných funkcí a systémů. Kardiomyocyt ztrácí schopnost kontraktility už po 60 s po vzniku koronární okluze, ale to ještě neznamená jeho zánik. Snížení koncentrace ATP provázené vzestupem koncentrace AMP aktivuje fosfofruktokinasu a glykogenfosforylasu, což vede ke zvýšení aktivity anaerobní glykolýzy a glykogenolýzy – náhradních zdrojů ATP. Zásoby glykogenu i kreatinfosfátu jsou však rychle vyčerpány. Anaerobní glykolýzu provází hromadění laktátu, hydrolýzu vysokoenergetických fosfátových vazeb zase hromadění anorganického fosfátu, což oboje snižuje intracelulární pH. Následkem změny pH dochází v této časně fázi buněčného poškození k zaškrcování chromatinu.

Deplece ATP je zodpovědná za akutní buněčný edém, který je způsoben poruchou regulace buněčného objemu plasmatickou membránou. Nedostatek ATP vede k selhání membránového transportu iontů (Na/K-ATPasa), dochází k volné difuzi Na^+ po koncentračním spádu do buňky a K^+ z buňky. To je provázeno isoosmotickým nárůstem vody v buňce, což způsobí buněčný



edém a následně dilataci ER. Další příčinou hromadění vody v buňce je nárůst katabolitů (laktát, anorganický fosfát, purinové nukleotidy z NADH), které zvyšují intracelulární osmotickou nálož. Dochází k oddělení ribosomů od ER a disociaci polysomů na monosomy. Při pokračující hypoxii se prohlubuje membránová permeabilita a dále se snižuje aktivita mitochondrií. V této fázi bobtnají mitochondrie, celá buňka je hyperhydratovaná díky zvýšenému obsahu Na^+ , který přitahuje vodu. Vážně proteosyntéza, buňky ztrácejí ultrastrukturní rysy (např. mikrovilli), v cytoplasmě vznikají myelinové obrazce jako důsledek degenerace buněčné membrány (disociace fosfolipidů odhalí fosfatidy). Až do určitého stavu jsou všechny tyto změny vratné, pokud se obnoví přísun kyslíku (Obr. 8).



Obr. 8. Biochemické změny při ischemickém poškození buňky (upraveno ze Strayer a Rubin 2011).

Ireverzibilní poškození

Pokud ischemie přetrvává, stává se poškození buňky nevratným. Dochází k výrazné vakuolizaci mitochondrií, značnému poškození membrán a k bobtnání lysosomů.



V kardiomyocytech se tyto známky poškození objevují po 30-40 minutách ischemie. Následně dochází k masivnímu přesunu Ca^{2+} do cytosolu (hlavně v ischemických oblastech myokardu, kde již došlo k reperfuzi). Pokračuje únik proteinů, enzymů, koenzymů a RNA hyperpermeabilní membránou. Buňky ztrácejí metabolity nutné k syntéze ATP, což způsobí úplnou depleci vysokoenergetických fosfátů. V tomto stadiu praská lyzozomální membrána a hydrolytické enzymy (proteasy, fosfatasy, glykosidasy, RNAsy, DNAsy, kathepsiny) se dostávají do cytoplasmy. Kyselé prostředí cytoplasmy tyto enzymy aktivuje, a tak dochází k natrávení buněčných komponent. V konečné fázi je mrtvá buňka vyplněna fosfolipidovou hmotou, čemuž se říká myelinová degenerace.

Ireverzibilní poškození charakterizují dva jevy: neschopnost nápravy mitochondriální dysfunkce po reperfuzi/reoxygenaci a rozvoj hluboké poruchy membránových funkcí. Na poškození membrány se podílí progresivní ztráta fosfolipidů (aktivita endogenních fosfolipas, pokles reacylačních procesů a *de novo* biosyntézy fosfolipidů), abnormity cytoskeletu (svrašťování a ruptury membrány v důsledku štěpení filament cytoskeletu proteasami aktivovanými Ca^{2+}), reaktivní formy kyslíku (reperfuzní paradox), rozkladné produkty lipidů (detergentní účinek rozkladných produktů – neesterifikovaných MK, acylkarnitinu, lysofosfolipidů) a ztráta intracelulárních aminokyselin.

Chemické poškození

Chemikálie poškozují buňky buď přímo, nebo nepřímo. Při **přímém poškození** se váží na kritické biochemické molekuly nebo orgány. Jedná se o látky rozpustné ve vodě. Příkladem může být kyanid (CN^-), který reaguje s prostetickou skupinou hemoproteinů, jako je cytochrom-c-oxidasa, a tak blokuje buněčné dýchání. Chlorid rtuťnatý, resp. Hg^{2+} , se váže na thiolové skupiny membránových proteinů nebo enzymů a způsobí tak zvýšení membránové permeability nebo inhibici ATP-dependenčního transportu. Při **nepřímém poškození** je lipofilní chemikálie nejprve biotransformována na aktivní toxické produkty, které se kovalentně váží na membránové proteiny a lipidy. Příkladem může být biotransformace CCl_4 na toxický radikál $\text{CCl}_3\cdot$, který zahájí peroxidaci membránových lipidů, což vede k rychlému rozrušení struktury ER a disociaci ribosomů. Důsledkem je nahromadění lipidů v buňce (neschopnost syntetizovat lipoproteiny z TAG) a následná steatóza. Dále jsou poškozeny mitochondrie, buňky bobtná díky zvýšené permeabilitě plasmatické membrány, která je zřejmě narušena aldehydy MK, které vznikly při lipoperoxidaci ER. Následně dochází k influxu Ca^{2+} a konečnému zániku buňky.



Použitá literatura

- Kumar V, Abbas AK, Aster JC (2014) Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease. 9th edition. Elsevier, Canada, 1472 pp.
- Masopust J (2003) Patobiochemie buňky. 1. vydání. 2. LFUK, Praha, 344 s.
- Strayer DS, Rubin R (2011) Cell adaptation, cell injury, and cell death. *In*: Rubin R, Strayer DS (eds.) Rubin's Pathology: Clinicopathologic Foundations of Medicine. 6th edition. LWW, Baltimore, p. 1-46.



EVROPSKÁ UNIE
Evropské strukturální a investiční fondy
Operační program Výzkum, vývoj a vzdělávání