

УДК 616-092.9.259-091.8:616.831-006.484

Экспериментально-морфологическая оценка чувствительности глиом головного мозга к α -интерферону

Семенова В.М., Лисяный Н.И., Любич Л.Д., Стайно Л.П.

Институт нейрохирургии им.акад. А.П. Ромоданова АМН Украины, г. Киев, Украина

При исследовании эффективности прямого действия α -интерферона (α -ИФН) на клетки глиом ($n=62$) *in vitro* установлена их разная чувствительность к цитокину в зависимости от его концентрации. Выявлено снижение чувствительности глиом к цитотоксическому действию α -ИФН по мере увеличения степени их злокачественности. Высокочувствительные к α -ИФН глиомы составляют 45% — среди доброкачественных астроцитом, 30 и 27,3% — среди астроцитом III и IV степени анаплазии. Наиболее низкая чувствительность опухолевых клеток к действию α -ИФН выявлена в 36,3% глиобластом, 25% анапластических астроцитом III степени злокачественности и 15% астроцитом II степени злокачественности.

Ключевые слова: α -интерферон, противоопухолевые свойства, цитотоксическое действие, апоптоз, глиомы головного мозга.

Одним из перспективных путей повышения эффективности комплексного лечения опухолей головного мозга является разработка методов использования препаратов интерферонов (ИФН). ИФН (α , β , γ) относятся к группе цитокинов, проявляющих противовирусное, антипролиферативное, иммуномодулирующее действие и др. Благодаря многообразию физиологических функций ИФН играют контрольно-регулирующую роль в поддержании гомеостаза [8]. Механизм противоопухолевого действия ИФН многосторонний, включает прямой цитолиз клеток опухоли, подавление их подвижности, угнетение ангиогенеза и экспрессии онкогенов в опухолях, а также активацию генов-супрессоров опухолевого роста. Кроме того, ИФН способны активировать гены, обладающие проапоптотическим действием, и регулировать дифференцировку клеток опухоли [5].

В общей онкологии препараты ИФН широко применяют в качестве дополнительной биотерапии и рассматривают как важный элемент оптимизации комплексного лечения больных с различными злокачественными опухолями [8]. В отличие от этого, данные о применении интерферонотерапии при опухолях мозга малочисленны, ее результаты неоднозначны [29].

В связи с этим в настоящее время продолжают клинические исследования антипролиферативной активности очищенных рекомбинантных препаратов α -ИФН и синтетического β -ИФН в отношении опухолей мозга, в которых показано их угнетающее действие на рост злокачественных глиом [19, 28]. Изучены также возможности лечения глиом с помощью гена β -ИФН, терапевтический эффект которого обусловлен участием в иммунном ответе натуральных киллеров [25, 27].

По данным японских авторов, у 35 больных, которым внутривенно вводили α -ИФН, изменился фенотип лимфоцитов периферической крови: через 24 ч уменьшалось количество лимфоцитов-супрессоров ($CD_4^+Leu_8^-$) и увеличивалось количество лимфоцитов-хелперов ($CD_4^+Leu_8^+$). Однако трактовка этого феномена в работе не приведена [22].

Многочисленное (16 раз) введение 1×10^6 ед α -ИФН в ложе удаленных CO_2 -лазером глиобластом у 35 больных не влияло на показатель их выживаемости по сравнению с таковым при использовании общепринятых методов лечения [24].

Недостаточная эффективность одной интерферонотерапии у нейроонкологических больных обусловлена особенностями трансдукции антигенного сигнала в клетках глиом. Предполагают, что применение низкомолекулярного индуктора α -ИФН амиксина при опухолях мозга целесообразно только в составе комбинированного лечения больных с учетом исходного количества лимфоцитов в периферической крови, которое должно быть не менее 21% [7].

Представляют интерес результаты экспериментальных исследований антипролиферативной активности ИФН *in vitro*. На линейных и первичных культурах различных опухолей мозга установлено повреждающее действие β -ИФН на клетки глиом в концентрации 30–3000 мкг/мл при их инкубации с цитокином в течение 2–6 сут [17].

Препараты α/β ИФН в культуре глиомы С-26 мышей в течение 1–4 сут вызывали ингибицию ее роста вследствие накопления клеток опухоли в S-фазе клеточного цикла, что сопровождалось повышением экспрессии глиального кислого фибриллярного белка в 3 раза и, следо-

вательно, изменением фенотипа клеток опухоли в сторону их дифференцировки [23].

В культуре нейробластомы IMR 32 ИФН- α -2b в концентрации 600 МЕ/мл после инкубации в течение 24 ч ингибировал пролиферацию и индуцировал дифференцировку около 50% клеток, морфологические признаки которой увеличивались в течение 48 ч [13].

Таким образом, несмотря на то, что использование препаратов ИФН в клинической нейроонкологии недостаточно эффективно, в условиях *in vitro* отмечена чувствительность к ИФН некоторых экспериментальных глиом и опухолей мозга человека. Это обосновывает целесообразность дальнейшего изучения реакции клеток глиом на прямое антибластическое действие новых препаратов ИФН и поиск наиболее эффективной их концентрации.

Целью работы явилось изучение влияния α -ИФН на клетки глиальных опухолей мозга различной степени злокачественности в клеточных культурах. ИФН- α (тип I, лейкоцитарный, анти-вирусный протеин с молекулярной массой 16–20 кД) имеет три субкласса — а, b, с. Наибольшее физиологическое и фармакологическое значение имеют ИФН- α -2a (содержащий в позиции 23 аминокислоту лизин) и ИФН- α -2b (содержащий в позиции 23 аминокислоту аргинин), которые получены в виде рекомбинантных препаратов. ИФН- α -2b у человека составляет 95% всех ИФН. В связи с этим в работе исследовано влияние препарата лаферона — рекомбинантного α -2b-ИФН человека [3].

Материалы и методы исследования. Чувствительность опухолей мозга (n=62) к воздействию препарата α -ИФН (лаферона — лекарственной формы рекомбинантного α -2b-ИФН человека, высокоочищенного препарата с удельной активностью $1-2 \times 10^8$ МЕ/мг белка) определяли в краткосрочных культурах клеток, приготовленных стандартным способом [2]. В таких культурах способность к росту не требуется, разрастание клеток стромы и клональный отбор отсутствуют, а результаты могут быть получены через 48 ч. Ограничением применения метода является небольшая продолжительность опыта, что исключает возможность длительного действия препарата — в течение одного или нескольких клеточных циклов.

При гистологическом исследовании биопсийного материала, в соответствии с принятой в институте гистобиологической классификацией опухолей центральной нервной системы [9], в 20 наблюдениях диагностирована астроцитомы II степени злокачественности, в 20 — астроцитомы III степени злокачественности, в 22 — глиобластома IV степени злокачественности.

Культуры клеток опухолей инкубировали с лафероном в возрастающей концентрации 500 МЕ/мл, 10^3 МЕ/мл, 10^4 МЕ/мл, 10^5 МЕ/мл в течение 24 ч. Выбор такого спектра концентраций лаферона обоснован в аналогичных экспериментах на культурах опухолей различного гистогенеза [4, 11, 14, 15]. Цитотоксическую активность лаферона оценивали в стандартном тесте с трипановым синим с подсчетом количества жизнеспособных клеток. Чувствительность клеток опухоли к лаферону оценивали как отрицательную — при уменьшении количества живых клеток до 20%, слабую — при снижении на 21–40%, умеренную — на 41–60%, высокую — выше 60%. Изучен также эффект прямого действия лаферона на клетки опухоли глиом в эксплантационных культурах.

Для уточнения одного из возможных механизмов реализации цитотоксического эффекта лаферона на клетки глиом (n=6) исследовали апоптотические клетки после прединкубации клеток опухоли с α -ИФН (лафероном) в различной концентрации. С этой целью использован ДНК-тропный краситель Hoechst 33342 (Sigma), соединяющийся с ДНК в местах А-Г-пар и выявляющий долю апоптотических клеток через 6–8 ч после получения ими апоптотического стимула. Для этого клетки опухоли отмывали в забуференном физиологическом растворе (ЗФР) путем центрифугирования при скорости 1500 об./мин в течение 5 мин, инкубировали с красителем Hoechst 33342 (0,1 мкг/мл) в течение 30 мин при температуре 37°C, отмывали в ЗФР, суспендировали в 50% растворе глицерина, наносили на предметные стекла, накрывали покровными стеклами и запаивали. Препараты просматривали с использованием иммерсионной системы под микроскопом ЛЮМАМ (Россия) при увеличении 900. Количество Hoechst-положительных клеток подсчитывали на 100 клеток каждой пробы, результат выражали в процентах.

Результаты и их обсуждение. При гистологическом исследовании биопсийного материала отмечена характерная структура глиом в соответствии со степенью их злокачественности. В 2 наблюдениях особенностью анапластической астроцитомы III степени злокачественности было наличие участков олигодендроглиомы, в связи с чем диагностирована анапластическая олигодендроглиома. В одном наблюдении в материале, взятом после повторной операции, отмечены признаки лечебного патоморфоза после предшествовавшей антибластической терапии. В ткани одной глиобласты выявлены протяженные участки соединительнотканых разрастаний с признаками малигнизации, что

явилось обоснованием для гистологического диагноза “глиосаркома”.

В соответствии с принятой нами количественной градацией чувствительности клеток глиом к лаферону по уровню цитотоксичности отмечена различная противоопухолевая активность препарата в суспензионных культурах анапластической астроцитомы II степени злокачественности. Так, после инкубации с лафероном в культурах клеток опухоли в 9 (45%) наблюдениях астроцитомы II степени злокачественности отмечено уменьшение количества жизнеспособных клеток на 57–90,3%. При этом в 5 наблюдениях такая реакция на лаферон не зависела от концентрации препарата, в 4 — количество жизнеспособных клеток уменьшалось дозозависимо.

В 6 (30%) наблюдениях прямое действие лаферона на клетки астроцитомы II степени злокачественности оказалось менее эффективным. Ни в одном из образцов количество жизнеспособных клеток не уменьшилось более чем на 60%, даже под влиянием наиболее высокой концентрации цитокина: в 2 пробах этот показатель дозозависимо увеличился от 19,2 до 45,1%, в 3 пробах — от 38,7 до 49,7%, в 1 пробе — остался в пределах от 52 до 57,2%, независимо от концентрации цитокина. Таким образом, чувствительность к лаферону астроцитом этой группы оценена как умеренно выраженная.

В 3 (15%) наблюдениях цитотоксичность клеток опухоли после инкубации с лафероном составляла от 19 до 38,5%. Лишь в одной пробе этот показатель составил 44% после воздействия максимальной концентрации лаферона (10^5 МЕ/мл). Эти астроцитомы отнесены к группе слабо чувствительных к лаферону.

В 2 (10%) наблюдениях цитотоксичность была еще более низкой — 13,6–18,2%, что с наибольшей вероятностью характеризует эти опухоли как устойчивые к прямому воздействию лаферона.

Высокая чувствительность к лаферону в суспензионных культурах отмечена в 6 (30%) наблюдениях анапластической астроцитомы III степени злокачественности. В 2 из них после инкубации с цитокином количество жизнеспособных клеток эффективно снижалось на 69,8–75%, независимо от его концентрации; в 4 — этот показатель пропорционально увеличивался по мере повышения концентрации лаферона. Наиболее высокая цитотоксичность (84,7–94%) достигнута после воздействия лаферона в высокой концентрации (10^4 – 10^5 МЕ/мл). При более низкой концентрации цитокина (10^2 – 10^3 МЕ/мл) степень снижения количества жизнеспособных клеток была меньше (57,9–79,5%). Таким образом, эти опухоли характеризуются

высокой чувствительностью к прямому воздействию лаферона в суспензионных культурах.

В 8 (40%) наблюдениях клеточные культуры астроцитомы III степени злокачественности в цитотоксическом тесте были менее чувствительны к воздействию лаферона: после инкубации с лафероном в высокой концентрации (10^5 – 10^4 МЕ/мл) количество живых клеток уменьшалась на 45–56%, в одном наблюдении — на 60%. С уменьшением концентрации цитокина этот показатель отчетливо снижался с 38,4 до 22%.

Клетки 5 (25%) образцов анапластической астроцитомы в культурах оказались слабо чувствительными к прямому воздействию лаферона при отсутствии четкой дозозависимости противоопухолевого эффекта. Максимальное уменьшение количества жизнеспособных клеток после инкубации с лафероном в наибольшей концентрации составило 29,7–39,1%. В одном наблюдении клетки астроцитомы оказались устойчивыми к прямому воздействию цитокина.

При аналогичном анализе группы из 22 глиобластом в 27,2% наблюдений отмечена высокая, в 27,2% — умеренная, в 36,3% — слабая чувствительность к прямому воздействию лаферона.

При этом в большинстве наблюдений выявлено дозозависимое увеличение цитотоксического действия цитокина на клетки опухоли. Резистентными к действию лаферона были 2 (9%) глиобластомы.

В одном наблюдении чувствительность клеток опухоли к лаферону в цитотоксическом тесте удалось сравнить на материале первой и повторной операций. При первичном тестировании клетки глиобластомы были высокочувствительными к действию лаферона: цитотоксичность увеличивалась дозозависимо и достигла 92,8% — при максимальной концентрации лаферона (10^5 МЕ/мл). При повторном тестировании через 1 год обнаружено крайне незначительное уменьшение количества живых клеток (2,5–6,2%) независимо от концентрации лаферона, что свидетельствовало о резком снижении чувствительности клеток опухоли к противоопухолевому действию этого цитокина в процессе продолженного роста.

Распределение глиом различной степени злокачественности в зависимости от их чувствительности к прямому действию α -ИФН в суспензионных культурах представлено в табл. 1.

Во всех группах преобладали опухоли с высокой и умеренной чувствительностью к прямому действию α -ИФН. Наиболее чувствительными были астроцитомы II и III степени злокачественности (70–75%), наименее — глиоб-

Таблица 1. Распределение глиом по степени чувствительности к α -ИФН

| Гистоструктура, степень злокачественности | Число наблюдений | Число наблюдений при степени чувствительности к α -ИФН | | | | | | | |
|---|------------------|---|------|--------------|------|----------|------|-----------------|------|
| | | высокой +++ | | умеренной ++ | | слабой + | | отрицательной - | |
| | | абс. | % | абс. | % | абс. | % | абс. | % |
| Астроцитомы, II | 20 | 9 | 45 | 6 | 30 | 3 | 15 | 2 | 10 |
| Астроцитомы, III | 20 | 6 | 30 | 8 | 40 | 5 | 25 | 1 | 5 |
| Глиобластомы, IV | 22 | 6 | 27,3 | 6 | 27,3 | 8 | 36,3 | 2 | 9 |
| Глиома | 62 | 21 | 33,9 | 20 | 32,2 | 16 | 25,8 | 5 | 16,1 |

ластомы (54,6%). Глиобластомы наиболее часто были чувствительными к прямому воздействию α -ИФН. При этом отмечены различия индивидуальной чувствительности большинства глиом к той или иной концентрации лаферона. Однако пропорциональность повышения цитотоксичности лаферона была непостоянной и не зависела от степени анаплазии опухоли.

Результаты определения количества доли апоптотических клеток в культурах глиом после воздействия лаферона представлены в табл. 2. После инкубации в течение 24 ч этот цитокин оказывал проапоптотическое влияние на клетки глиом *in vitro*. При этом значимый эффект наблюдали уже после воздействия лаферона в концентрации 10^2 МЕ/мл; при повышении концентрации цитокина эффект был примерно таким же, что обусловлено насыщением потенциальных мест связывания молекул цитокина с соответствующими рецепторами на поверхности клеток опухоли.

При сравнительном анализе динамики количества жизнеспособных клеток глиом и апоптотических Hoechst-положительных клеток в зависимости от концентрации лаферона в индивидуальных наблюдениях обнаружены различные соотношения этих показателей. Так, в глиобластомах при наибольшей степени уменьшения живых клеток (на 67,5%) после воздействия лаферона (10^3 МЕ/мл) количество апоптотических клеток было максимальным (68,7%). Однако количество апоптотических

клеток оказалось значительным и после воздействия лаферона в меньшей концентрации (1 МЕ/мл, 10^2 МЕ/мл, 10^3 МЕ/мл) — соответственно 62,2, 75, 57,7%.

Аналогичная динамика показателей цитотоксичности лаферона отмечена и при злокачественной глиоме: после воздействия на клетки опухоли лаферона в высокой концентрации (10^3 – 10^5 МЕ/мл) количество апоптотических клеток составило 68,1–93,9% при уменьшении количества жизнеспособных клеток на 55,6–74,5%.

Таким образом, при определении чувствительности злокачественных глиом к лаферону в суспензионных культурах установлен определенный параллелизм повышения эффекта повреждаемости клеток опухоли в ответ на прямое воздействие лаферона, индуцирующего их гибель по механизму апоптоза.

В культурах анапластической астроцитомы III степени злокачественности также наблюдали отчетливую тенденцию к дозозависимому эффекту цитотоксичности клеток опухоли после воздействия α -ИФН (лаферона). При этом оба показателя в большинстве проб имели близкие значения. Такая же тенденция отмечена при тестировании клеток астроцитомы II степени злокачественности.

Усредненно количество апоптотических клеток в суспензионных культурах глиом после инкубации в течение 24 ч с лафероном в различной концентрации представлено в табл. 2.

Таблица 2. Количество Hoechst-положительных клеток в суспензионных культурах клеток опухоли после инкубации с лафероном в различной концентрации

| Опухоль, степень злокачественности | Количество клеток после инкубации с интерфероном в концентрации, МЕ/мл | | | | | | |
|-------------------------------------|--|-----------------|-----------------|-----------------|----------------|-----------------|----------------|
| | в контроле | 1 | 10 | 10^2 | 10^3 | 10^4 | 10^5 |
| Астроцитомы, II | 80,0 | 83,4 | 70,2 | 92,0 | 60,9 | 94,5 | 77,8 |
| Олигодендроглиома, II–III | 8,2 | 14,5 | — | 17,8 | — | 31,6 | — |
| Анапластическая астроцитомы, II–III | 40,2 | 53,9 | 40,4 | 80,9 | 57,0 | 61,4 | — |
| Анапластическая астроцитомы, III | 10,0 | 41,6 | 45,7 | 88,0 | 76,3 | 58,1 | — |
| Анапластическая глиома, III–IV | 57,0 | 57,2 | 67,6 | 65,0 | 68,1 | 93,9 | 88,9 |
| Глиобластома, IV | 73,9 | 62,2 | 75,0 | 57,7 | 68,7 | 57,7 | — |
| Усредненные данные (M \pm m) | 44,9 \pm 28,3 | 52,2 \pm 20,8 | 59,8 \pm 13,9 | 66,9 \pm 25,1 | 66,2 \pm 6,7 | 64,9 \pm 24,2 | 83,4 \pm 5,6 |

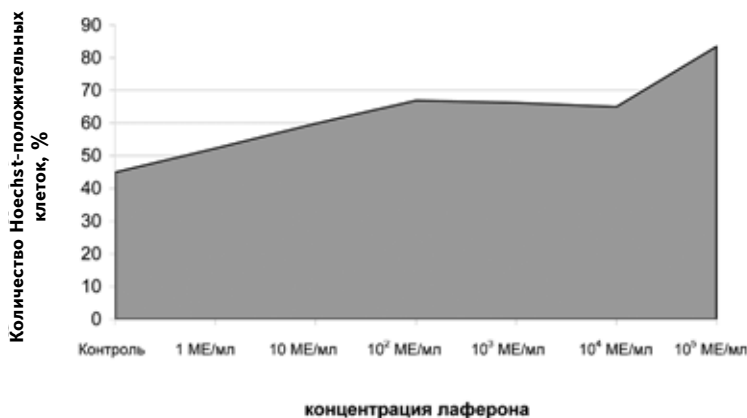


Рис.1. Влияние 24-часовой инкубации с лафероном на клетки анапластической глиомы человека *in vitro*

На рис. 1 показана динамика количества апоптотических клеток в культуре анапластической астроцитомы III степени злокачественности.

Таким образом, полученные результаты дают основание предположить, что лаферон может оказывать проапоптотический эффект на клетки глиом, при этом количество апоптотических клеток при воздействии лаферона в концентрации 10^4 – 10^5 МЕ/мл увеличивается на 30%.

Реакция опухолей мозга на воздействие α -ИФН в эксплантационных культурах.

Исследование противоопухолевой активности α -ИФН в эксплантационных культурах глиом дает возможность изучить влияние цитокина на архитектуру зоны роста культур в целом и характер индуцированных изменений структуры клеток опухоли.

При сопоставлении реакции клеток глиом на прямое действие α -ИФН в эксплантационных культурах и цитотоксическом тесте обнаружены сходные результаты. Оказалось, что глиомы, слабо чувствительные к α -ИФН в краткосрочных суспензионных культурах, так же слабо реагируют на его воздействие и в эксплантационных культурах. Так, в зоне роста культур глиобластомы α -ИФН индуцировал необратимое повреждение 20% клеток. В суспензионных культурах этой же опухоли показатель цитотоксичности составлял 15,2–27,4%, независимо от концентрации цитокина. В то же время в глиомах, чувствительных к повышающейся концентрации α -ИФН в цитотоксическом тесте, отмечен нарастающий дозозависимый эффект цитодеструкции и в эксплантационных культурах: поле инкубации в течение 24 ч этих культур с лафероном в разных концентрациях отмечены дисконфлексация и разрежение зоны роста, разрывы пластов клеток, дозозависимое снижение плотности клеток, а также некробиотические изменения клеток опухоли, прикрепленных к подложке (рис. 2).

В гистологических препаратах таких культур определяли различные типы дистрофических и некробиотических изменений в клетках опухоли, элиминацию пролиферирующей фракции клеток (отсутствие митозов), а также появление фигур апоптоза. При этом отмечена устойчивость к воздействию α -ИФН высокодифференцированной фракции клеток опухоли — длинноотростчатых опухолевых астроцитов. В цитотоксическом тесте чувствительность клеток этой глиомы к лаферону оценена как умеренная, поскольку количество жизнеспособных клеток уменьшалось дозозависимо от 34,6 до 53,1%. Подобная тенденция выявлена и в остальных наблюдениях параллельного тестирования чувствительности глиом к лаферону в суспензионных и эксплантационных культурах.

Таким образом, различия индивидуальной чувствительности клеток глиом к прямому воздействию α -ИФН в различных концентрациях моделируются как в цитотоксическом тесте на суспензионных культурах, так и в более длительных эксплантационных культурах. Исследования антибластического воздействия α -ИФН на клетки эксплантационных культур глиом позволяют наблюдать структурную реакцию клеток опухоли, что существенно дополняет результаты тестирования его активности в цитотоксическом тесте на краткосрочных клеточных культурах.

Заключение. Результаты проведенных исследований показали широкий диапазон противоопухолевого влияния α -ИФН на клетки глиом различной степени злокачественности.

При суммарной оценке распределения глиом различной степени злокачественности в соответствии с их градацией по динамике уменьшения количества жизнеспособных клеток после инкубации с лафероном установлено, что среди астроцитом (II–III степени злокачественности) преобладают опухоли с высокой и умеренной

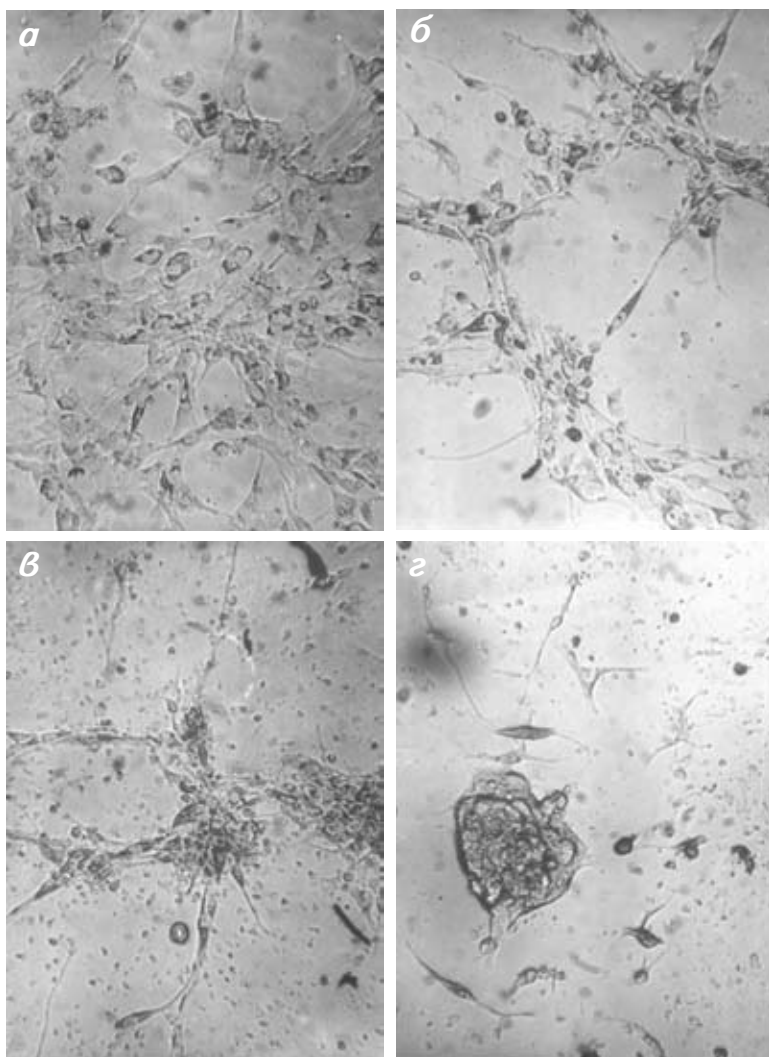


Рис.2. Эффект прямого воздействия α -ИФН на эксплантационную культуру анапластической астроцитомы III степени анаплазии

а — контрольная живая культура. Плотноклеточная зона роста эксплантата с признаками полиморфизма клеток. Ув. $\times 100$.

б — разрежение и дисконплекса-ция зоны роста после инкубации с α -ИФН в концентрации 10^2 МЕ/мл. Ув. $\times 100$.

в — уменьшение плотности клеток в зоне роста культуры после инкубации с α -ИФН в концентрации 10^3 МЕ/мл. Ув. $\times 100$.

г — сохранение небольшого количества клеток опухоли в культуре после инкубации с α -ИФН в концентрации 10^4 МЕ/мл. Ув. $\times 100$.

Динамика структурных изменений в зоне роста культуры астроцитомы после инкубации с α -ИФН в течение 24 ч в возрастающей концентрации свидетельствует о нарастающем уменьшении количества сохраненных опухолевых клеток вследствие элиминации части из них из-за гибели и десквамации.

чувствительностью к цитокину. Среди глиобластом (IV степени злокачественности) количество высокочувствительных опухолей не превышает 27,3%.

В образцах глиом с умеренно выраженной чувствительностью в ответ на прямое воздействие α -ИФН наиболее чувствительными оказались анапластические астроцитомы III степени злокачественности (40%). Кроме того, доля опухолей со слабой чувствительностью к α -ИФН несколько выше, чем среди астроцитом II степени злокачественности и глиобластом.

В образцах глиом с наиболее низкой чувствительностью наибольшая доля глиобластом (36,3%), наименьшая — астроцитом II степени злокачественности (15%).

Таким образом, установлена обратная зависимость между степенью злокачественности глиом и их чувствительностью к противоопухолевому воздействию лаферона. Можно предположить, что процесс озлокачествления клеток глиом сопровождается частичной утратой их рецепторов к α -ИФН, а следовательно, снижением их чувствительности к цитокину.

При рассмотрении эффекта дозозависимости противоопухолевого действия α -ИФН на клетки опухолей установлено, что только в 15 наблюдениях выявлена прямо пропорциональная зависимость количества жизнеспособных клеток по мере повышения концентрации цитокина. В большинстве наблюдений такая закономерность не прослеживается или слабо выражена. Отмечены незначительные колебания цитотоксичности независимо от концентрации лаферона. Это можно объяснить насыщением рецепторных зон связывания α -ИФН с экспрессированными к нему рецепторами при воздействии первоначально эффективной концентрации цитокина, которая может быть различной для разных опухолей. Поэтому дальнейшее повышение концентрации лаферона существенно не влияет на показатели цитотоксичности. С одной стороны, это может свидетельствовать о гетерогенности клеточного состава в разных пробах одной и той же опухоли, с другой, отражать различия в содержании рецепторов к α -ИФН на клетках различных опухолей. Это положение обосновывает необходимость предварительного инди-

видуального подбора эффективной концентрации лаферона с использованием стандартного цитотоксического теста в каждом конкретном наблюдении.

В трактовке механизмов противоопухолевого действия α -ИФН на клетки глиом решающее значение имеют результаты определения количества проапоптотических клеток с использованием специфического красителя Hoechst, который соединяется с ДНК в местах А-Г пар и выявляет апоптотические клетки уже через 6–8 ч после того, как они получили апоптотический стимул. При сопоставлении динамики количества Hoechst-положительных клеток и уменьшения уровня жизнеспособных клеток в образцах одной и той же опухоли установлены односторонние дозозависимые изменения — параллельное увеличение этих показателей после воздействия на клетки лаферона.

Исходя из этого, инкубация в течение 24 ч с лафероном оказывает проапоптотическое влияние на клетки глиомы *in vitro*. Обсуждая возможные механизмы такого влияния α -ИФН, необходимо обратить внимание на несколько аспектов проблемы.

Считают, что канцерогенез — многоступенчатый процесс накопления мутаций и других генетических изменений, обуславливающих нарушения ключевых клеточных функций, таких как регуляция пролиферации и дифференцировки, естественную гибель клеток (апоптоз), морфогенетические реакции клетки, неэффективное функционирование факторов специфического и неспецифического противоопухолевого иммунитета [10].

Предполагают, что рост опухоли является следствием дисбаланса между пролиферацией клеток и их запрограммированной смертью. Одним из механизмов нарушения апоптоза в клетках опухоли являются мутации в генах, контролирующих этот процесс [1].

Апоптоз представляет активный процесс, требующий экспрессии ряда специфических генов, которые запускают сигнальный каскад реакций с участием протеинкиназ, протеаз и эндонуклеаз. Внутриклеточные пути передачи дифференцирующих, пролиферативных, про- и антиапоптотических сигналов взаимосвязаны, тесно переплетаются и взаимоперекрещиваются. Внутриклеточные сигнальные каскады передачи дифференцирующего сигнала, путь передачи пролиферативного сигнала, включающий протеинкиназу С и каскад MAP-протеинкиназ, путь, зависимый от протеинкиназы В, Jun-киназный и p38-MAPK-киназный пути берут начало от общего звена — протеинкиназы, ассоциированной с рецептором фактора роста. Однако эти пути соприкасаются также и на уровне определенных составляющих их звеньев и взаиморегулируются [6].

ИФН взаимодействуют с клетками-мишенями посредством мембранных рецепторов (ИФН- α Р, ИФН- β Р, ИФН- γ Р). Связывание рецептора ИФН ведет к индукции синтеза протеинкиназы, которая фосфорилирует один из иницирующих факторов трансляции. Фосфорилированный фактор не может обеспечить образование иницирующего комплекса. Происходит либо избирательное подавление трансляции матриц, либо специфическое выключение трансляции в клетках. Под влиянием α -ИФН нарушается транскрипция более 30 ядерных белков, а также ингибирование синтеза РНК и протеинов, необходимых для синтеза ДНК, что способствует замедлению клеточного цикла с переходом клетки опухоли в фазу покоя, чем обусловлено влияние α -ИФН на пролиферацию злокачественных клеток. Влияние α -ИФН на дифференцировку клеток заключается в стимулировании созревания недифференцированных клеток опухоли, при этом восстанавливается сдерживающий контроль за процессами пролиферации, существующий в здоровом организме [3, 8]. Кроме того, в обработанных ИФН клетках индуцируется синтез 2'-5'-аденилатсинтетазы — ключевого фермента антивирусной активности, синтезирующего 2'-5' олигоадениловую кислоту [20], которая способствует активации латентных нуклеаз, разрушающих свободные иРНК, вследствие чего блокируются стадия инициации трансляции и разрушение иРНК [8].

α -ИФН быстро и эффективно индуцировал апоптоз в клетках ряда линий (H9, И-266) злокачественных лимфоидных опухолей и останавливал рост клеток линии Daudi [18]. Важно подчеркнуть, что апоптоз, вызванный α -ИФН, возникал в любой фазе клеточного цикла. При этом влияние α -ИФН на белки Bcl-2, Bax и p53 не выявлено.

Полагают, что α -ИФН может ингибировать некоторые онкогены (c-myc, c-src, cHa-ras) и таким образом участвовать в механизмах, контролирующих процессы малигнизации и прогрессирования новообразований [3].

С другой стороны, ИФН не является прямым индуктором апоптоза, но может модулировать апоптоз, вызванный в клетках опухоли индукторами различной природы: α -ИФН усиливает действие цитотоксических агентов (фактора некроза опухолей, винбластина) на клетки различных опухолевых линий (И-937, Her-2, K-562, LL, MM-4 и др.). По данным морфологического и молекулярно-биологического анализа, в основе этого эффекта лежит способность ИФН усиливать апоптоз: именно в его присутствии усиливается олигонуклеосомальная фрагментация ядерной ДНК и увеличивается количество апоптотических клеток. Проапоптотический эффект ИФН зависит от особенностей клеток опухоли: в одних ситуациях достаточно предобработки клеток ИФН, в других — требуется

постоянное присутствие цитокина вместе с индуктором апоптоза. Обнаруженный феномен раскрывает новую грань в механизме противоопухолевого действия ИФН [12].

Обсуждая механизмы противоопухолевых свойств ИФН, некоторые авторы полагают, что при прямом действии этого цитокина антипролиферативный эффект обусловлен снижением биосинтеза триптофана и полиамина, а также индуцированием в опухоли выработки белков цитоплазмы, обладающих антипролиферативным эффектом (2–3 синтетаза, протеинкиназа С) [16]. Кроме того, имеют значение дифференцирующее влияние ИФН на клетки опухоли, удлинение всех фаз клеточного цикла (период удвоения массы опухоли увеличивается в 2–3 раза), модуляция экспрессии онкогенов (*c-myc*, *ras*, *c-fos*), а также прямой цитотоксический эффект. Непрямой противоопухолевый эффект ИФН реализуется путем: усиления экспрессии молекул ГКГС обоих классов, опухольассоциированных антигенов, Fc γ -рецепторов и молекул ICAM-1 на клетках опухоли; повышения цитотоксичности естественных клеток-киллеров и макрофагов; повышения антителозависимой цитотоксичности, а также ингибирования ангиогенеза в опухоли.

На культурах клеток экспериментальной глиомы мыши С-26, которые подвергали воздействию α/β -ИФН в течение 1–4 сут, установлено торможение их роста вследствие накопления в S-фазе клеточного цикла. Это сопровождалось усилением экспрессии глиального кислого фибриллярного белка в 3 раза, то есть изменением фенотипа клеток опухоли в сторону дифференцировки [23]. На модели глиомы 261 мыши показано, что после внутримышечной инъекции плазмидной ДНК, кодирующей α -ИФН мыши, отмечали значительное уменьшение объема опухоли и увеличение показателя выживаемости животных [21].

В культуре клеток нейробластомы IMR 32 показано, что ИФН- $\alpha 2b$ (лаферон) в концентрации 600 МЕ/мл тормозил пролиферацию и индуцировал дифференцировку 50% клеток (при инкубации в течение 24 ч) [13].

В наших исследованиях по выявлению апоптотических клеток значимый повреждающий эффект наблюдали уже при концентрации лаферона 10^2 МЕ/мл. Лаферон в более высокой дозе оказывал примерно такой же эффект, что, по-видимому, обусловлено насыщением потенциальных мест связывания молекул цитокина с соответствующими рецепторами на клетках опухоли и конкурентной ингибцией связывания α -ИФН с рецепторами при его высокой концентрации, поскольку связывание меченых α -ИФН и β -ИФН с клетками глиомы EFC-2 конкурентно ингибировалось при увеличении концентрации обоих цитокинов [26].

Выводы. 1. Прямое воздействие α -ИФН на клетки первичных глиом в суспензионных культурах *in vitro* оказывает различный противоопухолевый эффект — цитотоксическое повреждение, торможение пролиферации и усиление апоптоза.

2. Доля высокочувствительных к цитотоксическому действию лаферона глиом составляет: среди доброкачественных астроцитов — 45%, астроцитом III степени злокачественности и глиобластом — соответственно 30 и 27,3%.

3. Наиболее низкая чувствительность клеток опухоли к действию лаферона отмечена в 36,3% глиобластом, 25% — анапластических астроцитов III степени злокачественности и 15% астроцитом II степени злокачественности, что свидетельствует о снижении чувствительности глиом к α -ИФН с нарастанием их малигнизации, а также о наличии резистентных к действию ИФН дифференцированных астроцитом II степени злокачественности.

4. Дозозависимая гибель клеток глиом после прямого воздействия лаферона установлена только в 24% наблюдений.

5. Различные реакции клеток глиом разной степени злокачественности на прямое воздействие α -ИФН обосновывают целесообразность тестирования биоптатов глиом на определение их индивидуальной чувствительности к этому цитокину для последующей разработки рациональных схем терапии у каждого конкретного больного.

Список литературы

1. Акимов А.А., Иванов С.Д., Хансон К.П. Апоптоз и лучевая терапия злокачественных новообразований // *Вопр. онкологии.* — 2003. — Т.49, №3. — С.261–269.
2. Вилсон Э. Тесты на цитотоксичность и жизнеспособность // *Культура животных клеток. Методы* / Под. ред. Р. Фрешни. — М.: Мир, 1989. — С.256–302.
3. Возианов А.Ф., Бутенко А.К., Зак К.П. Цитокины. Биологические и противоопухолевые свойства. — К.: Наук. думка, 1998. — 317 с.
4. Воронцова А.Л. Роль интерферона в притивоопухолевой резистентности // *Эксперим. онкология.* — 1989. — Т.11, №6. — С.49–54.
5. Воронцова А.Л., Кудрявец Ю.И. Интерферон как важный элемент оптимизации лечения онкологических больных // *Онкология.* — 2000. — Т.2, №1–2. — С.16–20.
6. Галицкий В.А. Канцерогенез и механизмы внутриклеточной передачи сигналов // *Вопр. онкологии.* — 2003. — Т.49, №3. — С.278–293.
7. Гнедкова И.А. Проблемы иммунотерапии глиом головного мозга // *Укр. нейрохирург. журн.* — 2002. — №2. — С.57–65.
8. Ершов Ф.И. Медицинская значимость интерферонов и их индукторов // *Вестн. РАМН.* — 2004. — № 2. — С.9–13.

9. Зозуля Ю.А., Верхоглядова Т.П., Шамаев М.И., Малышева Т.А. К вопросу о классификации опухолей нервной системы // Укр. мед. часопис. — 2000. — №3–4. — С.5–8.
10. Копнин Б.П. Механизмы действия онкогенов и опухолевых супрессоров. — РОО: Мир науки и культуры, 2002. — ISSN 1684–9876.
11. Кудрявец Ю.И. Интерферон та фактор некрозу пухлин як модифікатори метастазування злоякісних новоутворень: Автореф. дис. ... д-ра біол. наук. — К., 1999. — 36 с.
12. Кудрявцев Б.И. Интерферон-альфа способствует индукции апоптогической гибели опухолевых клеток под действием различных факторов: Тез докл. 2-го съезда онкологов стран СНГ (Киев, 23–26 мая, 2000 г.) // Эксперим. онкология. — 2000. — №22. — С.42.
13. Магура И.С., Мацука Г.Х., Романова О.М. и др. Индукция морфологической дифференцировки и модуляции транспорта ионов натрия рекомбинантным интерфероном- α -2b (лаферон) в клетках нейробластомы человека // Материалы междунар. науч. конф. (Гродно, 28–29 сент., 2000 г.). — Гродно, 2000. — Ч.2. — С.14–17.
14. Мкртчян Л.Н. Антипролиферативная активность различных препаратов α -интерферона in vitro // Журн. эксперим. и клин. медицины. — 1984. — Т.24, №1. — С.36–41.
15. Николаева Т.Г. Действие интерферона на распределение по фазам клеточного цикла культивируемых опухолевых клеток человека // Эксперим. онкология. — 1984. — Т.5, №4. — С.52–55.
16. Орлова Р.В. Клиническое использование интерферонов в онкологии // Материалы междунар. науч.-практ. конф. "Цитокины. Воспаление. Иммунитет". — СПб, 2002. — Т.1, №2. — С.163–164.
17. Cook A.W. Human brain tumor-derived cell lines: growth rate reduced by human fibroblast interferon // Science. — 1983. — V.219, N4586. — P.881–883.
18. Erickson S., Sangfelt O., Castro J. et al. Induction of apoptosis and inhibition of cell growth are independent responses to interferon- α : Abstr. Int. Conf. "Life and Death Cell" (Fribourg, 17–18 Sept., 1998. // Anticancer Res. — 1998. — V.18, N6a. — P.4528–4529.
19. Fine H.A., Wen P.Y., Robertson M. et al. A phase I trial of a new recombinant human beta-interferon (BG9015) for the treatment of patients with recurrent gliomas // Clin. Cancer Res. — 1997. — V.3, N3. — P.381–387.
20. Floyd-Smith G., Wang Q., Sen G.C. Transcriptional induction of the p69 isoform of 2',5'-oligoadenylate synthetase by interferon-beta and interferon-gamma involves three regulatory elements and interferon-stimulated gene factor 3 // Exp. Cell. Res. — 1999. — V.24691. — P.138–147.
21. Horton H.M., Anderson D., Hernandez P. et al. A gene therapy for cancer using intramuscular injection of plasmid DNA encoding interferon alpha // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1999. — V.96, N4. — P.1553–1558.
22. Katakura R., Yoshimoyo T. Epidemiology and statistical analysis of gliomas. Treatment of gliomas. — Tokyo: Springer-Verlag, 1988. — P.2–20.
23. Naidu K.A., Wiranowska M., Phuphanich S., Prockop L. Modulation of glioma cell growth and 5-lipoxygenase expression by interferon // Anticancer Res. — 1996. — V.16, N6. — P.3475–3482.
24. Nakamura H., Shitara H., Wada T. Local adoptive immunotherapy for malignant brain tumor // 9th Intern. Congr. Neurol. Surg. — New Dehli, India, 1989. — P.23.
25. Mizuno M., Yoshida J. Effect of human interferon beta gene transfer upon human glioma, transplanted into nude mouse brain, involves induced natural killer cells // Cancer Immunol. Immunother. — 1998. — V.47, N4. — P.227–232.
26. Rosenblum M.G., Yung W.K., Kelleher P.J. et al. Growth inhibitory effects of interferon-beta but not interferon-alpha on human glioma cells: correlation of receptor binding, 2',5'-oligoadenylate synthetase and protein kinase activity // J. Interferon Res. — 1990. — V.10, N2. — P.141–151.
27. Yagi K., Ohishi N., Hamada A. et al. Basic study on gene therapy of human malignant glioma by use of the cationic multilamellar liposome-entrapped human interferon beta gene // Hum. Gene. Ther. — 1999. — V.10, N12. — P.1975–1982.
28. Wiranowska M., Tresser N., Saporta S. The effect of interferon and anti-CD44 antibody on mouse glioma invasiveness in vitro // Anticancer Res. — 1998. — V.18, N5A. — P.3331–3338.
29. Zou J.P., Morford L.A., Chougnet C. et al. Current perspectives in immunotherapy // Amer. Thorac. Surg. — 1999. — V.162. — P.28–33.

**Експериментально-морфологічна оцінка
чутливості гліом головного мозку
до α -інтерферону**
Семенова В.М., Лисяний М.І., Любич Л.Д.,
Стайно Л.П.

Під час дослідження ефективності прямої дії α -інтерферону (α -ІФН) на клітини гліом (n=62) in vitro встановлено їх різну чутливість до цитокину залежно від його концентрації. Виявлене зниження чутливості гліом до цитотоксичної дії α -ІФН у міру збільшення ступеня їх злоякісності. Високочутливі до α -ІФН гліоми становлять 45% серед доброякісних астроцитом, 30 і 27,3% — серед астроцитом III і IV ступеня анаплазії. Найбільш низька чутливість пухлинних клітин до дії α -ІФН виявлена у 36,3% гліобластом, 25% анапластичних астроцитом III ступеня злоякісності та 15% астроцитом II ступеня злоякісності.

**Experimental-morphological evaluation of the
brain glioma's sensitivity to the α -interferon**
Semenyova V.M., Lysyany N.I., Lyubych L.D.,
Stayno L.P.

This study revealed different sensitivity of brain glioma cells (n=62) to the α -interferon (α -IFN) straight action in vitro depending on cytokine's concentration. The glioma's sensitivity to the cytotoxic α -IFN action was reduced according to the growth of the tumor malignancy level. 45% of the benign astrocytomas, 30% of III anaplastic degree astrocytomas and 27,3% of IV anaplastic degree astrocytomas demonstrated the high sensitivity to α -IFN. Minimal tumor cells sensitivity to the α -IFN antitumor action was observed in 36,3% of glioblastomas, 25% of III anaplastic degree astrocytomas and 15% II anaplastic degree astrocytomas.