

УДК 616.831.006:612.438.014

Экспрессия Fas-рецептора апоптоза на клетках медуллобластом

Орлов Ю.А., Лисянский А.Н., Шаверский А.В., Малышева Т.А.,
Черненко О.Г., Примушко Л.И.

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

На основании изучения рецептора апоптоза на поверхности клеток медуллобластом с помощью моноклональных антител к CD-95 выявлено, что экспрессия этого рецептора значительно различается, ее обнаруживают на поверхности 4–48% клеток опухоли. Количество Fas⁺ клеток мало зависело от размеров и морфологических особенностей опухоли, а больше — от возраста больных.

Инфильтрация опухоли лимфоцитами была незначительной и не влияла на количество Fas⁺ клеток в опухоли. Определение Fas-рецептора может быть вспомогательным показателем злокачественности опухоли.

Ключевые слова: медуллобластома, апоптоз, рецептор апоптоза, лимфоциты.

Апоптоз является одним из основных механизмов защиты тканей организма от опухолеиндуцируемых факторов, обуславливающих повреждение ДНК [2, 7]. Механизм апоптоза клеток запускается различными факторами через поверхностные рецепторы апоптоза, из которых наиболее изучен Fas-рецептор/APO-1 (CD-95), получивший название рецептор апоптоза или рецептор смерти [1, 9, 16]. Во многих исследованиях показано, что Fas-рецептор присутствует на клетках опухолей различного генеза, в том числе опухолей головного мозга [1, 7, 14, 16]. Установлено, что Fas-рецептор экспрессируется не на всех типах опухолей и выявляется не во всех наблюдениях, его экспрессия и чувствительность опухолей, в частности, глиобластом к Fas-опосредованному апоптозу обратно пропорционально коррелирует с экспрессией антиапоптотического гена Bcl-2 [18].

При изучении экспрессии Fas-рецептора на глиальных опухолях установлено, что этот рецептор выявляется на всех глиобластомах, в частности, на 6 из 12 астроцитом и 1 из 4 пилочитических астроцитом, что позволило связать этот рецептор со степенью злокачественности [15]. В то же время, на других опухолях мозга, относящихся к злокачественным, в частности, медуллобластомах экспрессия Fas-рецептора изучена недостаточно, хотя медуллобластомы относятся также к злокачественным рецидивирующим, метастазирующим опухолям, у которых достаточно хорошо изучены гистологическая структура, клиника и методы лечения [4, 11]. Задачей исследования было изучение наличия Fas-рецептора на клетках медуллобластом.

Материалы и методы исследования. У 21 больного изучена гистологическая структура медуллобластомы и фенотипическая характеристика клеток, полученных во время выполнения нейрохирургической операции. Возраст больных от 1 года до 19 лет, основную группу составили дети в возрасте от 3 до 5 лет. При гистологическом исследовании биопсийного

материала определяли варианты медуллобластомы в соответствии с классификацией [3]. Так, у 9 больных обнаружена опухоль классического типа, у 1 — десмопластического, у 1 — опухоль с эндимарной дифференцировкой. При гистологическом анализе опухоли учитывали следующие морфологические признаки: наличие псевдорозеток Хомера-Райта, колонарных структур бледных островков, эндимарных розеток, ганглиозных клеток, формирование пучковых структур, наличие митозов и очагов некроза, выраженность сосудистого рисунка соединительной ткани, выраженность лимфоидной инфильтрации, а также активность сосудистого эпителия. Выраженность этих признаков в опухоли определяли полуколичественным методом: 0 — отсутствие признака; (+) — признак выявляется в отдельных полях; (++) — признак выявляется в 50% просмотренных полей зрения; (+++) — признак выявляется более чем в 50% полей зрения.

Суспензию клеток опухоли получали путем механического измельчения и разволокнения препаративными иглами освобожденной от сосудов и оболочек ткани опухоли в охлажденной питательной среде 199. Полученную взвесь клеток фильтровали через 2 слоя нейлоновой сетки, подсчитывали общее количество клеток и количество жизнеспособных клеток в 0,1% растворе трипанового синего [5]. В исследование брали суспензию, в которой жизнеспособных клеток было не менее 85%.

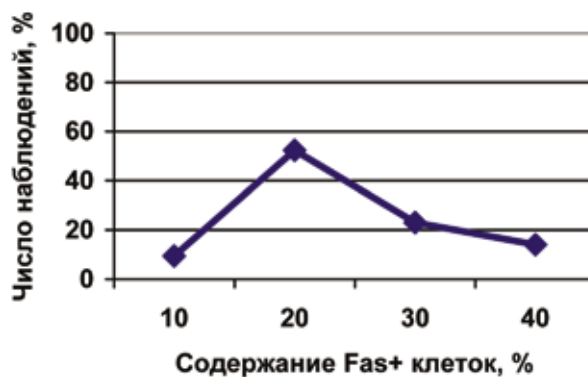
Рецептор апоптоза — Fas-рецептор на мембране живых клеток опухоли выявляли с помощью моноклональных антител к Fas-рецептору с использованием антител к CD-95 методом клеточной флуориметрии [1]. Наличие примеси Т-лимфоцитов в суспензии клеток опухоли определяли с помощью моноклональных антител к CD-3 антигену, характерному для зрелых Т-лимфоцитов, методом непрямой иммунофлуоресценции с помощью проточного цитофлуориметра Becton Diskenson по рекомен-

дации фирмы изготовителя моноклональных антител ("Сорбент", Россия).

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью пакета компьютерных программ с определением ($M \pm m$) и показателей достоверности P .

Результаты и их обсуждение. По данным гистологического исследования биопсийного материала, 19 медуллобластом относились к классическому типу, 1 — была десмопластического типа, 1 — с эпендимарной дифференцировкой, что свидетельствовало о практически однородной группе медуллобластом классического типа. В то же время, при использовании дополнительных гистоморфологических признаков выявлена неоднородность их структуры. В табл. 1 приведены данные о частоте выявления того или другого гистологического признака. В исследуемой группе выявлены характерные для медуллобластом псевдорозетки, бледные островки, колонарные структуры, которые отмечали с различной частотой и интенсивностью в большинстве наблюдений. Часто выявляли соединительную ткань, митозы, зоны некроза — редко (в 3 и 6 наблюдениях). Лимфоцитарная инфильтрация, активация сосудистого эндотелия практически не выявляются в этих опухолях, что согласуется с данными других авторов [11]. Таким образом, несмотря на классический вариант строения медуллобластом, по данным гистологического исследования выявлены различия как по строению, наличию митозов и зон некроза, так и интенсивности проявления этих признаков.

Экспрессия Fas-рецептора (CD-95) на поверхности клеток опухоли, полученных из биопсийного материала, также значительно различалась, их выявляли на поверхности 6,4–48,4%, в среднем (21,5±2,48)% клеток опухоли. Анализируя зависимость распределения медуллобластом от количества Fas-положительных (Fas+) клеток опухоли, мы установили наличие трех основных групп (см. рисунок). Наибольшее



Распределение пациентов с медуллобластомами в зависимости от количества клеток опухоли, экспрессирующих Fas-рецептор апоптоза

число (около 60%) медуллобластом содержали 10–20% Fas+ клеток; около 20% — до 30% Fas+ клеток, около 10% — 40–50% Fas+ клеток. Таким образом, можно утверждать, что медуллобластомы, как и другие опухоли [1], презентуют рецептор апоптоза. Причем, количество Fas+ клеток варьирует, что в общем коррелирует с приведенными в табл. 1 данными гистологического строения опухолей и свидетельствует о неоднородности их даже в пределах данного гистологического типа опухоли. Высокая или, наоборот, низкая презентация Fas-рецептора на клетках медуллобластом свидетельствует об их различной чувствительности к действию апоптотических сигналов, поступающих, например, от клеток иммунной системы, что должно как-то проявляться в клиническом течении заболевания, темпах роста, пролиферации опухоли.

В связи с этим сопоставлены возраст пациентов, длительность заболевания, размеры опухоли и количество Fas+ клеток в каждой исследуемой опухоли. В табл. 2 показаны результаты такого анализа. Так, в зависимости от возраста такие больные были распределены на 2 группы: дети в возрасте 8 лет (I группа) и старше 8 лет (II группа). Возраст детей I группы составлял в

Таблица 1. Основные гистологические признаки медуллобластом и частота их проявления

Признак	Интенсивность проявления				Число наблюдений	
	0	+	++	+++	абс.	%
Псевдорозетки Хомера-Райта	9	9	2	1	12	57,1
Колонарные структуры	10	6	3	2	11	52,4
Бледные островки	12	5	3	1	9	42,8
Эпендимарные клетки	16	—	2	3	5	23,8
Наличие митозов	18	3	—	—	3	14,2
Наличие очагов некроза (пор гистолизиса)	15	2	4	—	6	28,6
Выраженность соединительной ткани	12	4	1	3	9	42,8
Лимфоидная инфильтрация	21	—	—	—	0	0
Активация сосудистого эпителия	21	—	—	—	0	0
Наличие мелкоклеточного малодифференцированного типа строения	21	—	—	—	0	0

среднем 4,2 года, во II группе — 13,8 года, максимальный возраст — 19 лет. У детей I группы в опухоли определяли до $(19,56 \pm 3,93)\%$ Fas+ клеток, II группы — $(28,38 \pm 3,9)\%$ ($P < 0,05$). В литературе имеются сведения о более тяжелом течении медуллобластом у детей в возрасте до 3 лет, а также частой связи медуллобластомы с другими дисгенетическими проявлениями [4, 12, 13]. В обследованной группе было 5 детей в возрасте от 1 года до 3 лет. В среднем у них обнаружено $(15,42 \pm 2,0)\%$ Fas+ клеток, причем в 4 наблюдениях — 12–13%, у ребенка 3 лет — 26% Fas+ клеток. На основании анализа этой небольшой группы наблюдений можно сделать предположительное заключение, что, чем в более раннем возрасте образуется опухоль, тем меньше на ее клетках представлен рецептор апоптоза. Для окончательного заключения связи агрессивности течения и количества Fas+ клеток в опухоли необходимы исследования большого числа наблюдений.

При анализе зависимости количества Fas+ клеток от размеров опухоли, установленных по данным компьютерной и магниторезонансной томографии, оказалось, что в опухоли диаметром до 4 см Fas+ клеток было $(17,76 \pm 3,1)\%$, при диаметре опухоли более 4 см — $(24,76 \pm 1,1)\%$, хотя эти различия недостоверны и можно говорить лишь о тенденции, а не о закономерности связи размеров опухоли и количества Fas+ клеток в опухоли.

Одним из объяснений различного представительства на клетках опухоли рецептора апоптоза может быть то, что этот рецептор экспрессируется на мембране в определенной стадии цикла деления клетки или этапа естественного старения и гибели клеток опухоли, что в какой-то мере коррелирует с интенсивностью признака колликационного некроза, выявляемого при гистологическом исследовании опухоли, как в 4 наблюдениях (см. табл. 1) с выраженным колликационным некрозом Fas-рецептор был представлен на 20% клеток и более. По-видимому, окончательно установить роль Fas-рецептора на поверхности клеток опухоли можно лишь в культуре клеток и прямых опытах с индукцией апоптоза клеток посредством этого рецептора.

В то же время, можно сказать, что определение апоптотического рецептора на поверхности клеток медуллобластом может служить дополнительным фенотипическим признаком этих опухолей и возможной мишенью для направленного действия на клетки опухоли апоптозиндуцирующих факторов.

Также не установлена статистическая зависимость между количеством Fas+ клеток и длительностью болезни. Так, у пациентов при длительности болезни от 1 до 6 мес выявлено $(24,03 \pm 4,9)\%$ Fas+ клеток, более 6 мес — $(22,18 \pm 5,79)\%$ Fas+ клеток. У 3 пациентов, у которых по данным анамнеза продолжительность заболевания не превышала 1 мес, количество Fas+ клеток было до 15%.

Таким образом, экспрессия рецептора апоптоза на клетках опухоли не зависит от темпов роста (размеров) опухоли, длительности заболевания, только у более старших детей (8 лет и более) количество Fas+ положительных клеток больше, чем у детей младшего возраста.

На основании анализа результатов проведенных исследований можно сделать заключение, что, во-первых, экспрессия Fas-рецептора апоптоза на клетках опухоли происходит неравномерно даже в пределах одного гистологического типа, от 6 до 48% клеток (разница в 8 раз) могут иметь этот рецептор. Во-вторых, наличие рецептора не влияет на темпы роста и размеры опухоли, хотя у детей младшего возраста (до 3 лет) выявляют в 2–3 раза меньше Fas+ клеток в опухоли. У детей старше 8 лет (от 11 до 19 лет — в нашей группе наблюдений) обнаруживают наибольшее количество Fas+ клеток в опухоли (в среднем, каждая 4-я клетка несет Fas-рецептор).

Анализируя полученные данные, можно сказать, что экспрессия Fas-рецептора на клетках медуллобластом отражает либо определенную фазу клеточного цикла пролиферации, и исследуемые опухоли пребывают в различных фазах, потому выявлена такая 8-кратная разница в содержании Fas+ клеток. Возможно, что это фенотипическая характеристика таких опухолей, которая имеет отношение к гистоструктуре опухоли, злокачественности, частоте метастазирования, продолжительности жизни больных.

Одним из физиологических индукторов апоптоза являются иммунокомпетентные клетки, в частности, Т-лимфоциты. В связи с этим в суспензиях клеток опухоли было изучено содержание Т-лимфоцитов, сопоставлено с количеством Fas+ клеток. Опухоль была разделена на группы: в I группе содержалось до 20%, во II группе — более 20% Fas+ клеток. В целом, при изучении примеси Т-лимфоцитов, которые определяли с помощью моноклональных антител к общему CD-3 рецептору Т-лимфоцитов, установлено, что в среднем в опухоли

Таблица 2. Изменение экспрессии Fas-рецептора на клетках медуллобластом в зависимости от размеров опухоли, возраста пациентов, длительности заболевания

Показатель	Диаметр опухоли, см		Возраст больных, лет		Длительность заболевания, мес		
	До 4	Более 4	До 8	Старше 8	1	1–6	Более 6
Число наблюдений	8	11	11	8	4	8	7
Количество Fas+ клеток, %	17,76±3,11	24,7±4,19	19,56±3,93	28,38±3,91	15,5±1,65	24,09±4,45	22,18±5,79

(табл. 3) содержится $(73,2 \pm 1,29)\%$ лимфоцитов, что подтверждает данные литературы о слабой инфильтрации таких опухолей лимфоцитами. Возможно даже, что эти Т-лимфоциты не опухолевого, а сосудистого (капиллярного) происхождения. Тем не менее было установлено, что в взвеси клеток опухоли с небольшим количеством Fas+ клеток (до 20%) было $(7,09 \pm 2,14)\%$ Т-лимфоцитов, с большим (более 20%) — $(6,26 \pm 1,03)\%$ Т-лимфоцитов. Следовательно, интенсивность инфильтрации опухоли Т-лимфоцитами не зависит от количества Fas+ клеток в опухоли, что не позволяет объяснить небольшое количество Fas+ клеток высоким апоптотическим потенциалом этих лимфоцитов, и наоборот. Небольшое количество лимфоцитов в ткани обусловлено, вероятно, сохранением полноценного сосудистого русла в этих опухолях, что предупреждает транслокацию Т-лимфоцитов в опухоль из сосудов или, возможно, слабой иммуногенностью таких опухолей, или другими неизвестными причинами.

Следовательно, в медуллобластомах незначительная инфильтрация Т-лимфоцитами и их содержание не коррелируют с количеством Fas+ клеток в опухоли, что связано в большей мере со свойствами опухоли, ее клеточным циклом и другими факторами, вызывающими апоптоз, о чем свидетельствует частота гистолиза, выявляемого в таких опухолях.

Определение апоптотического рецептора на поверхности клеток медуллобластом может служить дополнительным критерием фенотипической характеристики таких опухолей и возможной мишенью для направленного действия на эти опухоли апоптозиндуцирующих факторов.

Проведенные исследования свидетельствуют, что медуллобластомы, как и глиальные опухоли мозга, и злокачественные опухоли другой локализации [1, 6, 18], экспрессируют на поверхности клеток Fas+ рецептор. Количество Fas+клеток в медуллобластомах различно — от 5 до 50%, что свидетельствует о разной чувствительности этих опухолей к апоптозиндуцирующим сигналам экзо- и эндогенного происхождения. Кроме того, установление факта, что у опухолей, возникающих в более позднем возрасте, количество Fas+ клеток больше, согласуется с положением, что медуллобластомы менее агрессивны и злокачественны [8, 13].

Выводы. 1. Медуллобластомы, как и другие злокачественные опухоли, экспрессируют на

своей поверхности Fas-рецептор апоптоза, что свидетельствует об их чувствительности к действию апоптозиндуцирующих факторов.

2. Количество клеток медуллобластом, экспрессирующих Fas-рецептор, различно — от 4,6 до 48% клеток содержат на поверхности этот рецептор.

3. Количество Fas+клеток не зависело от размеров опухоли, длительности заболевания, а зависело от возраста больных. У больных старшего возраста количество Fas+ клеток в опухоли больше, чем у детей младшего возраста.

4. Инфильтрация опухоли медуллобластомы Т-лимфоцитами была незначительной и не влияла на количество клеток опухоли, содержащих Fas-рецептор апоптоза.

Список литературы

1. Барышников А.Ю., Шишкин Ю.В. Иммунологические проблемы апоптоза. — М.: УРСС, 2002. — 319 с.
2. Владимирская Е.Б., Молчан А.А., Румянцев А.Г. Апоптоз и его роль в развитии опухолевого роста // Гематология и трансфузиология. — 1997. — Т.42, №5. — С.4–9.
3. Зозуля Ю.А., Верхоглядова Т.П., Шамаев М.И., Малышева Т.А. Гистологические принципы классификации опухолей нервной системы и ее клиническое значение // Укр. нейрохірург. журн. — 2001. — №1. — С.32–41.
4. Орлов Ю.А. Эпидемиология и результаты лечения опухолей головного мозга у детей // Укр. нейрохірург. журн. — 2000. — №2. — С.5–14.
5. Орлов Ю.А., Семенова В.М., Стаино Л.П. Оценка чувствительности глиальных опухолей мозга к воздействию тенодаля в диагностическом тесте // Укр. нейрохірург. журн. — 2004. — №2. — С.50–53.
6. Фильченков А.А., Стайка Р.С. Апоптоз (физиологическая смерть клетки) // Семинары по гомеопатии. — К., 1995. — 24 с.
7. Фильченков А.А., Стайка Р.С. Апоптоз: Краткая история, молекулярные механизмы, методы выявления и возможное значение в онкологии // Эсперим. онкология. — 1996. — №6. — С.435–448.
8. Abocioglu U., Uzel O. Medulloblastoma in adults: Treatment results and prognostic factors // Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. — 2202. — V.54, N3. — P.855–860.
9. Debatin K.M., Goldman C.K., Waldman T.A., Kranimer P.H. APO-1 induced apoptosis of leukemia cell from patient with adult T-cell leukemia // Blood. — 1993. — V.81. — P.2972–2977.

Таблица 3. Содержание Т-лимфоцитов в медуллобластомах в зависимости от количества Fas+ клеток в опухоли

Показатель	Всего	Количество Fas+ клеток, %		
		до 10	до 20	больше 20
Число наблюдений	19	1	10	8
Содержание Т-лимфоцитов, %	$7,32 \pm 1,29$	2,5	$7,09 \pm 2,14$	$6,28 \pm 1,03$

10. Debatin K.M., Goldman C.K., Baniford et al. Monoclonal antibody mediated apoptosis in adult T-cell-leukemia // *Lancet*. — 1990. — V.335, N6. — P.447–448.
11. Korshunov A., Sadovnikova M., Ozerov S. Immunohistochemical markers for prognosis of average-risk pediatric medulloblastomas // *J. Neurooncol.* — 2002. — V.58, N3. — P.271–279.
12. Rivera-Luna R., Lopez E., Rivera-Marguez H. et al. Survival of children under 3 years old and medulloblastoma: a study from the Mexican Cooperative Group for Childhood Malignancies // *Child's Nerv. System.* — 2001. — V.1–2. — P.38–42.
13. Sarkaz A., Promonik P., Kazak A.K. et al. Are childhood and adult medulloblastomas different? A comparative study of clinicopathological features, proliferation index, and apoptotic index // *J. Neurooncol.* — 2002. — V.59, N1. — P.49–61.
14. Tada K., Shiraishi T., Hirotsu T. The cytotoxic activity of OK-432 activate mononuclear cells against human glioma cells is partly mediated through the Fas ligand (Fas System) // *Jap. J. Cancer Res.* — 1996. — V.87, N9. — P.972–976.
15. Tachibone O., Nakazawa N., Lampe J. et al. Expression of Fas/APO-1 during the progression of astrocytomas // *Cancer Res.* — 1995. — V.55, N23. — P.5528–5530.
16. Trauth B.C., Klass C., Reters A. et al. Monoclonal antibody-mediated tumor regression by induction of apoptosis // *Science.* — 1989. — V.245, N5. — P.301–305.
17. Weller M., Frei K., Groscurth P. et al. Anti Fas/APO-1 antibody-mediated apoptosis of cultured human glioma cells induction and modulation of sensitivity by cytokines // *J. Clin. Invest.* — 1994. — V.94, N3. — P.954–965.
18. Weller M., Malipiero U., Rensing E. A. et al. Fas/APO-1 gene transfer for human malignant glioma // *Cancer Res.* — 1995. — V.55, N13. — P.2936–2944.

Експресія FAS-рецептора апоптозу на клітинах медуллобластом

Орлов Ю.О., Лісяний А.Н., Шаверський А.В., Малишева Т.А., Черненко О.Г., Примушко Л.І.

На підставі вивчення рецептора апоптозу на поверхні клітин медуллобластом за допомогою моноклональних антитіл до CD-95 виявлено, що експресія цього рецептору значно різниться, її виявляють на поверхні 4–48% клітин пухлини. Кількість Fas⁺ клітин мало залежала від розмірів і морфологічних особливостей пухлини, більше — від віку хворих.

Інфільтрація пухлин Т-лімфоцитами була незначною і не впливала на кількість Fas⁺ клітин в пухлині. Визначення Fas-рецептора може бути допоміжним показником злоякісності пухлини.

The FAS-receptors of apoptosis expression on the medulloblastomas cells

Orlov Yu.A., Lisyany A.N., Shaversky A.V., Malysheva T.A., Chernenko O.G., Primushko L.I.

The Fas-receptor of apoptosis expression on the living medulloblastomas cells was determined. Fas-receptor of apoptosis was expressed on 4–48,8% tumors cells. The histological features and size of tumors did not influence on the Fas-receptor expression, just the age of patients defined on the expression level. The medulloblastomas tissue infiltration with lymphocytes was not considerable and didn't influence on the Fas-receptor expression on the tumors cells.

Комментарій

к статье Орлова Ю.А. и соавторов “Експресія Fas-рецептора апоптоза на клетках медуллобластом”

Статья посвящена одной из важных проблем общей онкологии, в т.ч. нейроонкологии — апоптозу клеток опухоли. Апоптоз, генетически запрограммированная гибель — это универсальное свойство всех ядродержащих клеток. Механизмы индукции и реализации апоптоза многообразны и еще недостаточно изучены. Считают, что одной из причин развития опухоли является нарушение процессов апоптоза. Апоптоз на клеточном уровне реализуется через систему мембранных рецепторов, таких как APO/Fas, FHO, TPAL и др.

Наиболее изучен Fas-рецептор, который представлен на многих клетках организма, что позволяет индуцировать физиологическую гибель этих клеток посредством соответствующих сигналов от других клеток. Экспресия этого рецептора на клетках опухоли только изучается, известно, что в некоторых опухолях этот рецептор представлен хорошо, и они чувствительны к апоптозіндуцірующим факторам, в других — недостаточно, что делает их устойчивыми к действию этих факторов. Например, на доброкачественных глиомах он представлен плохо, а на глиобластомах — хорошо.

Как представлен этот рецептор на медуллобластомах, данные об этом в литературе противоречивы, потому в работе изучена експресія цього рецептора на живих свежєвїделєнных клетках медуллобластомы. Провєденные исследования показали, что Fas-рецептор может выявляться в среднем на 20% клеток, хотя имеются наблюдения, когда они выявляются лишь на поверхности 4–6% клеток и, наоборот, на более чем 40% клеток. Следовательно, медуллобластомы гетерогенны по своей чувствительности к апоптозу, и это нужно учитывать при выборе консервативного лечения, особенно химио- и лучевой терапии.

Авторами установлен также факт слабой инфильтрации медуллобластом Т-лімфоцитами, наличие или отсутствие Т-лімфоцитів в опухоли не влияет на експресію Fas-рецептора клетками, что желательно в будущем сопоставить с инфильтрацией Т-лімфоцитами глиом.

Разработанная авторами методика может быть широко применена в клинике для дополнительной оценки злокачественности медуллобластом.

*А.Я. Главацкий, доктор мед. наук,
вед. научн. сотр.*

Института нейрохирургии им. акад. А.П. Ромоданова АМН Украины