

## Оглядіві статті

---

УДК 616.831–006.484:612.014.3(048.8)

### Нарушение апоптотических процессов при глиоме головного мозга

*Лисяный Н.И., Любич Л.Д.*

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

Представлен анализ данных литературы относительно общих механизмов апоптоза: внутриклеточные сигнальные пути апоптоза, регуляция проведения сигнала продуктами генов p53 и Bcl-2, CD95(Fas/APO-1)/FasL-рецепторно-лигандная система и нарушения его процессов в клетках опухоли и лимфоцитах периферической крови при глиоме головного мозга.

**Ключевые слова:** *апоптоз, глиома, иммунная система, лимфоциты периферической крови, CD95(Fas/APO-1)/FasL-рецепторно-лигандная система.*

Патогенетические механизмы, обуславливающие возникновение и прогрессирование злокачественной глиомы — наиболее часто выявляемой высоколетальной первичной опухоли головного мозга у взрослых [21,22] — окончательно не изучены. Роль иммунной системы в контроле роста и распространения опухоли остается предметом дискуссии. В некоторых ситуациях иммунные клетки вносят вклад в защиту организма от опухоли, и Т-лимфоциты играют ведущую роль в противоопухолевом ответе. При наличии глиомы многие аспекты взаимоотношений между клетками опухоли и Т-лимфоцитами не ясны.

Канцерогенез — многоступенчатый процесс накопления мутаций и других генетических изменений, способствующих нарушению ключевых функций клеток, таких как регуляция пролиферации и дифференцировки, естественной гибели клеток (апоптоз), морфогенетических реакций клетки, неэффективному функционированию факторов специфического и неспецифического противоопухолевого иммунитета [8].

Предполагают, что рост опухоли является следствием дисбаланса между пролиферацией клеток и их запрограммированной смертью. Одним из механизмов нарушения апоптоза в клетках опухоли является мутация в генах, контролирующих этот процесс [2]. С другой стороны, важную роль в патогенезе глиобластомы, по видимому, играет апоптоз Т-лимфоцитов [16], поскольку при злокачественной глиоме установлена очевидная неспособность лимфоцитов, инфильтрирующих опухоль, индуцировать значительную гибель ее клеток.

Апоптоз представляет собой 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 тесно взаимосвязаны. 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 единого общего звена — протеинкиназы, ассоциированной с рецептором фактора роста. Однако эти пути соприкасаются также на уровнях определенных составляющих их звеньев и взаиморегулируются. Вопросам канцерогенеза, механизмам внутриклеточной передачи сигналов, действия онкогенов и опухолевых супрессоров посвящены исчерпывающие обзоры [7,8]. В настоящем обзоре мы остановимся на частном вопросе механизмов апоптоза и их нарушения при глиоме головного мозга.

**Механизмы апоптотической смерти клеток.** Все клетки многоклеточного организма и некоторых одноклеточных несут в себе генетически детерминированную программу самоуничтожения, при активации которой наступает их смерть, называемая апоптозом.

Апоптоз может быть включен множеством внутренних и внешних сигналов и направлен на освобождение от старых или наработанных в избытке клеток, а также от клеток с нарушениями дифференцировки и повреждением генетического материала, в том числе при вирусном заражении. Морфологические признаки апоптоза хорошо изучены, он является следствием контролируемого самопереваривания, проявляется сморщиванием клетки, конденсацией и фрагментацией ядра, разрушением цитоскелета,

буллезным выпячиванием клеточной мембраны. Особенностью апоптоза является то, что умирающая клетка сохраняет целостность своей мембраны до полного завершения процесса, и только разрушение ее оболочки является сигналом для расположенных вблизи фагоцитов к поглощению оставшихся фрагментов и завершению процесса ее деградации. Апоптотические клетки, не подвергшиеся немедленному фагоцитозу, превращаются в мелкие, связанные с мембраной фрагменты, называемые апоптотическими тельцами. Важной особенностью апоптоза является то, что умирающие клетки удаляются без развития воспаления. В отличие от апоптоза некроз представляет собой патологическую форму смерти клеток вследствие их острого повреждения, разрыва оболочки, высвобождения содержимого цитоплазмы и индукции воспалительного процесса.

Проявлением апоптоза на молекулярном уровне служит фрагментация ДНК: вначале образуются крупные фрагменты ДНК по 30 000–700 000 пар оснований, затем происходит межнуклеосомная деградация ДНК с формированием фрагментов, содержащих 180–190 пар оснований или кратных этим величинам. Эти фрагменты выявляют с помощью горизонтального электрофореза в агарозном геле в виде “ДНК-лестницы” — отдельных полос, соответствующих дискретности по молекулярной массе образующихся фрагментов ДНК [4].

Процесс апоптоза может быть разделен на 2 фазы [8]:

- формирование и проведение (трансдукция) апоптотических сигналов;
- демонтаж клеточных структур – эффекторная фаза.

Основными участниками эффекторной фазы апоптоза являются цистеиновые протеазы (каспазы). Каспазы расщепляют белки-мишени характерным для апоптоза образом – в местах расположения оснований аспарагина [41]. У человека идентифицированы 14 видов каспаз, которые в зависимости от функциональных особенностей можно разделить на 3 группы:

- активаторы цитокинов (каспазы 1,4,5,13);
- каспазы – индукторы активации эффекторных каспаз (каспазы 2, 8, 9, 10);
- эффекторные каспазы – исполнители апоптоза (каспазы 3, 6, 7).

Участие эффекторных каспаз в апоптозе направлено на уничтожение: разрыв связей с окружающими клетками, реорганизацию цитоскелета, снижение возможностей репарации и репликации ДНК, разрыв ядерной мембраны и разрушение ДНК, выброс сигналов, маркирующих клетку для апоптоза, расчленение клетки на апоптотические тельца [5].

**Сигнальные пути апоптоза.** Основная задача системы, регулирующей апоптоз — под-

держивать эффекторные каспазы в неактивном состоянии, но быстро переводить их в активную форму в ответ на минимальное действие соответствующих индукторов (каспазы-индукторы 8 и 9). Эти каспазы в обычном состоянии клетки неактивны, существуют в форме прокаспаз. Действие различных проапоптотических сигналов направлено на активацию каспаз 8 и 9. Выделяют два типа ведущих сигнальных путей [4, 5, 8]:

1) рецепторно-независимые — повреждение ДНК, радиация, действие токсичных агентов, глюкокортикоидов, прекращение цитокиновой регуляции, укорочение до критического уровня теломер — трансдукция сигнала способствует высвобождению цитохрома С из митохондрий, стимулирующего образование комплекса Араф-1 с прокаспазой 9. Этот путь еще называют митохондриальным;

2) рецепторно-опосредованные — проапоптотические сигналы, возникающие при активации рецепторов “региона клеточной смерти” — трансдукция сигнала приводит к рекрутированию адаптерных белков и активации прокаспазы 8 [2].

Для рецепторов “региона клеточной смерти” общей является последовательность из 80 аминокислот в цитоплазматическом домене, названная доменом смерти и необходимая для трансдукции апоптотического сигнала.

Наиболее хорошо охарактеризованы такие рецепторы смерти, как CD95(Fas/APO-1), фактор некроза опухолей TNF-RI (также называемый p55, или CD120a), CAR1, рецептор смерти 3 (также называемый DR3, Apo-3, WSL-1, TRAMP или LARD), DR4 и DR5 (также называемый Apo2, TRAIL-R2, TRICK2 KILLER), p75-рецептор фактора роста нервов (NGF) [4, 18].

**Сигнальные пути активации каспазы 9 и молекулярные механизмы регуляции.**

Сенсором повреждения ДНК и нарушений клеточного цикла является ген p53 (“хранитель или страж генома”). p53 располагается на коротком плече хромосомы 17, кодирует образование ядерного белка, состоящего из 393 аминокислот с молекулярной массой 53 кД. Тетрамер p53 функционирует как транскрипционный фактор, связываясь своим карбоксильным окончанием со специфическими регионами генов-мишеней [30]. Белок p53 находится в цитоплазме в латентном состоянии. Активация его происходит не только в ответ на поражение ДНК, но и при активации онкогенов, гипоксии, дефиците питания, старении и др. При активации белок p53 способен инициировать независимо одну от другой 2 программы:

- временную остановку клеточного цикла в G<sub>1</sub>S-фазе с помощью белка p21<sup>WAF1</sup>, ингибирующего циклинзависимые киназы;
- стимуляцию апоптоза путем активации генов Вах или Bid — проапоптотических генов

семьи Bcl-2 и/или активацию образования свободных форм кислорода, способствующих выходу цитохрома С из митохондрий.

Проведенные в последние годы экспериментальные исследования с выключением генов позволяют предположить, что приоритетной для большинства клеток является программа временной остановки митотического цикла. Программа апоптоза включается при невозможности клетки репарировать ДНК во время “ареста” при прохождении митотического цикла и/или дефиците белка p21<sup>WAF1</sup>. В некоторых клетках обусловлен приоритет программы апоптоза при активации гена p53 [5].

Основной функцией гена p53 считают включение программы апоптоза при повреждении клеточного генома как защитную реакцию организма от накопления генетически дефектных клеток. Снижение активности гена p53 или мутация в нем, приводящая к потере способности к включению апоптоза, является фактором, предрасполагающим к возникновению опухоли и развитию резистентности к химиотерапии. Мутацию гена p53 обнаруживают более чем в 50% раковых опухолей, частота ее увеличивается при длительной химиотерапии.

Таким образом, ген p53 необходим для реализации программы апоптоза при повреждении ДНК и токсичных воздействиях на клетку; следующим этапом в проведении проапоптотического сигнала по этому пути является включение семьи Bcl-2 генов.

**Семья Bcl-2** состоит из 16 генов. Белки, производные этих генов, объединяет сходный морфологический состав: каждый из них имеет хотя бы одну из четырех консервативных аминокислотных последовательностей, характерных для Bcl-2 — регионов, гомологичных Bcl-2 (BH1-BH4). Семья Bcl-2-генов состоит из антиапоптотических генов (Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub>, Bcl-w, Bcl-2o, Al, Mcl-1) и проапоптотических генов (Bax, Bak, Bok/ Mtd, Bcl-x<sub>s</sub>, Bad, Bik/Nbk, Bid, Bcl-2o, Bim/Bod). Антиапоптотические гены Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub>, Bcl-w, Bcl-2o и Mcl-1 имеют COOH-концевой гидрофобный регион, ответственный за прикрепление белков к наружной поверхности мембраны митохондрий. Проапоптотическую функцию проапоптотических генов связывают с регионом BH-3. Многие из проапоптотических белков имеют концевой гидрофобный домен, но не прикрепляются к митохондрию до получения проапоптотического сигнала.

Восприятие анти- или проапоптотических сигналов членами семьи Bcl-2 происходит как на уровне генов (белок p53 повышает экспрессию гена Bax), так и на уровне посттранскрипционных белков (действие цитокинов). При этом между самими белками наблюдают сложные взаимодействия, иногда антагонистические. В процессе этих взаимодействий про- и антиа-

поптотические протеины могут образовывать гомо- и гетеродимеры как внутри своей группы, так и с протеинами противоположной направленности действия. Решение жить или умереть клетке принимается на уровне семьи Bcl-2 на основании относительного преобладания активных супрессоров или промоторов апоптоза [39]. Про- и антиапоптотическое действие активированных белков семьи Bcl-2 реализуется главным образом через модуляцию активности митохондрий.

#### **Роль митохондрий в процессах апоптоза.**

Митохондрии — одна из ключевых фигур апоптоза [44]. Митохондрии являются источником цитохрома С, АТФ, Ca<sup>2+</sup>, апоптозиндуцирующего фактора (АИФ) — компонентов, необходимых для дальнейшего продвижения апоптотического сигнала. Выход этих факторов из митохондрии осуществляется только при взаимодействии ее мембраны с активированными белками семьи Bcl-2.

Активированные белки семьи Bcl-2 своими COOH-гидрофобными основаниями, как якорями, прикрепляются к наружной мембране митохондрий в местах сближения наружной и внутренней мембран, где, по-видимому, физиологически существуют пермеабилитационные поры, называемые мегаканалами, диаметр которых не превышает 2 нм. Проапоптотические белки семьи Bcl-2, укрепившись в наружной мембране, вступают в соединение с ANT (adenin-nucleotid-translocator), встроенным во внутреннюю мембрану в этих локусах, образуя временно более крупные мегаканалы (2,4–3 нм). По этим каналам в цитозоль клетки поступают цитохром С, АТФ, Ca<sup>2+</sup> и АИФ. Антиапоптотические белки семьи Bcl-2 не способны пермеабилитировать мембрану митохондрий, а, напротив, закрывают уже существующие каналы, прерывая продвижение проапоптотического сигнала и защищая клетку от апоптоза [37]. Цитохром С, поступивший в митохондрию, прикрепляется к внутренней поверхности мембраны и выходит в цитозоль через мегаканалы, он необходим для образования апоптосомы, где происходит активация каспазы 9, которая, в свою очередь, активирует основную киллерную каспазу 3 — так завершается сигнальный путь апоптоза, вызванный повреждением ДНК.

Апоптосома представляет собой комплекс АРАФ-1 (апоптотический протеазоактивирующий фактор), цитохрома С, каспазы 9 и АТФ [48]. До соединения с цитохромом С АРАФ-1 существует в цитозоле в неактивном состоянии. При отсутствии достаточного количества АТФ апоптосома не образуется, и гибель клетки идет по некротическому пути.

Вместе с цитохромом С и АТФ из митохондрий в цитозоль клетки выходит также АИФ, он направляется в ядро клетки, где вызывает

фрагментацию ДНК. АИФ является самостоятельным киллерным фактором, дублирует действие цитохрома С и каспаз при их блокировании.

С другой стороны, активность семьи Bcl-2 может поддерживаться и без участия митохондрий [41]: антиапоптотические белки могут образовывать в цитозоле комплекс с АРАФ-1, блокирующий его активность. При ингибции этой связи проапоптотическими членами семьи Bcl-2 высвобождается АРАФ-1 и активируется каспаза 9.

#### **Сигнальные пути активации каспазы 8.**

Передача проапоптотического сигнала при связи лиганда с рецепторами “региона клеточной смерти” происходит посредством адаптерных белков FADD / MORT1, N-терминальный регион (DED) которых, в свою очередь, связывается с аналогичным регионом прокаспазы 8, вызывая ее аутокаталитическую активацию. При активации некоторых членов семьи TNF-рецепторов (в том числе TNF-RI) используется дополнительный адаптерный белок TRADD. Для рецепторов “региона клеточной смерти” характерным является домен смерти, необходимый для трансдукции апоптотического сигнала.

Наиболее хорошо охарактеризованы такие рецепторы смерти, как CD95(Fas/APO-1), TNF-RI (также называемый р55 или CD120a), CAR1, рецептор смерти 3 (также называемый DR3, Apo-3, WSL-1, TRAMP, или LARD), DR4 и DR5 (также называемый Apo2, TRAIL-R2, TRICK2 KILLER), р75-рецептор фактора роста нервов (NGF) [4, 18].

**CD95(Fas/APO-1)/FasL-рецепторно-лигандная система.** CD95(Fas/APO-1)-антиген является членом суперсемейства рецепторов фактора некроза опухолей, включающего два типа рецепторов (TNF-RI, TNF-RII), низкоаффинный фактор роста нервов (NGF), Т-клеточный активационный антиген CD27, антиген CD30, ассоциированный с лимфогранулематозом, В-клеточный антиген CD40 и некоторые другие гомологи молекул млекопитающих и вирусов [4]. CD95(Fas/APO-1) имеет значительную гомологию с TNF-рецептором I типа в интрацеллюлярной части (около 80 аминокислот), из которых 70 необходимы и достаточны для передачи сигнала смерти. Этот консервативный участок называют “домен смерти”, так как в обеих молекулах он передает апоптотический сигнал.

Fas-лиганд является членом суперсемейства лигандов TNF, относящихся к цитокинам, и опосредует гибель клеток путем перекрестного связывания с CD95(Fas/APO-1)-рецептором в апоптозчувствительных Fas-положительных клетках. Чувствительность клеток к апоптозу контролируется семейством Bcl-2. Активированные Т- и В-лимфоциты, в отличие от поко-

ящихся, а также НК-клетки и нейтрофильные гранулоциты экспрессируют Fas-лиганд [12]. Антиген Fas/APO-1 экспрессирован у человека на кортикальных тимоцитах, активированных Т- и В-лимфоцитах, моноцитах.

Рецепторный путь клеточной смерти представляется более коротким, чем апоптотический каскад, инициированный повреждением ДНК и рассмотренный выше: посредством адаптерных молекул происходит активация каспазы 8, которая, в свою очередь, способна напрямую активировать киллерные каспазы. При этом в цепочку передачи сигнала могут вовлекаться кислая сфингомиелиназа – церамид – САР-киназа – MAP- транскрипционный фактор NF-kB; либо Jun-киназы, напрямую или косвенно активирующие NF-kB. В действительности этот путь более сложный и переплетается с другими механизмами апоптоза. Так, каспаза 8 способна активировать белок Bid, что приводит, как описано выше, к выбросу цитохрома С из митохондрий, вовлечение которых в процесс усиливает рецепториндуцированный апоптоз [18, 19].

Этот же сигнальный путь с привлечением других адаптерных белков используется и для реализации других клеточных программ. Так, сигнал, прошедший через TNF-RI, может активировать также транскрипторные факторы NF-kB и AP-1. Эти сигнальные молекулы вызывают активацию генов, обеспечивающих продукцию факторов воспаления. Таким образом, при активации TNF-R клетка должна принять решение – совершить ли самоубийство или выжить для продуцирования воспалительных цитокинов. Последнее решение лимфоциты принимают чаще, возможно, потому, что транскрипционный фактор NF-kB тормозит апоптотические пути. Таким образом, одни и те же сигнальные пути используются для реализации различных клеточных программ. Так, рецепторный путь клеточной смерти у лимфоцитов независим от семьи Bcl-2-генов и не может быть подавлен их антиапоптотической активностью. Активация же р53 может приводить в некоторых клеточных системах к трансактивации генов, кодирующих рецепторы “региона клеточной смерти”.

Таким образом, существуют различные, часто перекрещивающиеся пути и механизмы реализации апоптотической программы, зависящие от типа клеток и специфики проапоптотического сигнала. Разнообразие и многовариантность сигнальных путей апоптоза обеспечивают клетке запасные возможности для осуществления столь важной для нее программы и в то же время делают эту программу зависимой от множества внешних и внутренних воздействий.

**Нарушение контроля пролиферации в клетках глиомы через апоптоз.** Наиболее часто выявляемой первичной опухолью голо-

вного мозга у взрослых является глиобластома — высоколетальная опухоль, показатель выживаемости пациента составляет в среднем около 1 года [10, 21, 22]. Только 2–5% пациентов живут дольше 3 лет. Патогенетические механизмы возникновения и прогрессирования глиобластомы не ясны, хотя определены два различных генетических механизма, имеющих значение в патогенезе [21]: 1) в так называемой “первичной” глиобластоме, как правило, происходит амплификация гена рецептора эпидермального фактора роста, она возникает *de novo* у пациентов старшего возраста; 2) так называемая “вторичная” глиобластома обычно связана с мутациями гена p53, ее наблюдают у пациентов более молодого возраста и возникает вследствие злокачественной прогрессии из предшествовавшей астроцитомы низкой степени злокачественности.

Установлено, что у пациентов, которые жили 3 года и больше, частота ядерной экспрессии p53 была значительно выше, несмотря на отсутствие мутаций p53. У пациентов, которые жили в течение короткого времени, чаще определяли сверхэкспрессию рецептора к эпидермальному фактору роста и значительно чаще — сверхэкспрессию mdm2, что коррелировало с высоким индексом пролиферации. Таким образом, у длительно живущих пациентов с глиобластомой, вероятно, происходит сверхэкспрессия p53, у них нет сверхэкспрессии mdm2 и более низкий индекс пролиферации, чем у пациентов при коротком периоде жизни [21, 22].

Мутация гена p53 — “стража” генома — одно из наиболее частых генетических отклонений, ассоциированных со злокачественными опухолями мозга.

Ген p53 локализуется на хромосоме 17p13 и кодирует ядерный протеин, играющий важную роль в регуляции ответа клетки млекопитающих на стресс. Различные стрессогенные стимулы (повреждение ДНК, гипоксия, тепловой шок, метаболические изменения, воздействие цитокинов) активируют протеин p53, вследствие чего возникают остановка клеточного цикла или апоптоз. Протеин p53 дикого типа не определяется иммуногистохимическими методами вследствие короткого периода полужизни. С помощью иммуногистохимического способа выявляют только мутантную или ненормально стабилизированную форму p53, возможно, потому, что мутантный p53 не может активировать транскрипцию mdm2, мишенью действия которого является протеин p53. В астроцитных опухолях головного мозга гена p53 часто изменяется из-за точечных мутаций и делеций. Примерно в 30% глиобластома несет мутации гена p53, что наблюдают в астроцитных опухолях пациентов более молодого возраста [21]. По статусу гена p53 пациентов с глиальной

опухолью головного мозга может быть определена ее чувствительность к различным цитотоксическим препаратам и радиотерапии [21]. Считают, что опухоли с мутировавшим геном p53 более резистентны к радио- и химиотерапии, возможно, за счет меньшего количества клеток, вступающих в апоптоз под влиянием повреждения ДНК; однако данные различных авторов разноречивы.

Клетки глиобластомы не подвергаются апоптозу даже при экспрессии гена p53 дикого типа, в образцах биопсийного материала глиобластомы наблюдают чрезвычайно низкий уровень апоптоза. Возможно, ингибция апоптоза является важным аспектом патофизиологии глиобластомы.

p53 регулирует путем транскрипции гена-промотора гибель клеток Fas/APO-1 [38]. P21/WAF1/Cip1, регулятор клеточного цикла, сверхэкспрессирован в глиоме и метастазах в мозге [34] и определяет резистентность клеток глиомы к BCNU и цисплатину.

Анализ генетических нарушений в клетках опухоли дает представление о молекулярном патогенезе глиомы у человека. При количественном анализе уровня ключевых протеинов клеточного цикла и сигнальных протеинов установлено, что супрессорные протеины дикого типа — p53, pRB, PTEN, p14(ARF), p16(INK4) не определялись или их уровень был значительно снижен в большинстве исследованных образцов (94), тогда как рецептор EGF (эпидермального фактора роста), обратная транскриптаза теломеразы человека 2, циклинзависимая киназа 4 были сверхэкспрессированы и почти исключительно в глиобластомах. Кроме того, в 55% наблюдений была снижена экспрессия EGF-1, в 26% — повышена экспрессия циклина E. Сверхэкспрессия рецептора EGF, обратной транскриптазы теломеразы человека, циклинзависимой киназы 4 и циклина E определялась в основном в глиомах и значительно коррелировала со снижением показателя выживаемости пациентов [24].

Утрата активности p53 дикого типа предположительно является основной предпосылкой того, что различные опухоли человека не отвечают на радио- и химиотерапию. p53 может усилить химиочувствительность путем запуска апоптоза в соответствии с транскрипционно-независимым механизмом или транскрипционной активации проапоптотических генов (Bax) и транскрипционной репрессии антиапоптотических генов (bcl-2). С другой стороны, p53 может снижать химиочувствительность путем запуска p21-опосредованного и p21-независимого “ареста” роста, репарации ДНК и дифференцировки, а также усиления транскрипции антиапоптотических генов (Bcl-x).

Протеины Bcl-2 играют важную роль в ингибировании апоптоза и защите нормальных и неопластических клеток от токсичных агентов. С другой стороны, сверхэкспрессия Bcl-2 в злокачественной опухоли обуславливает устойчивость к адьювантной терапии. Так, при анапластической астроцитоме экспрессия Bcl-2 обнаружена в 48% наблюдений, при глиобластоме — в 51%. При сверхэкспрессии Bcl-2 значительно повышалась устойчивость клеток опухоли к цитотоксическим препаратам — кармустину, паклитакселю, винкристину, доксорубину, а также к гену тимидинкиназы вируса простого герпеса с дальнейшим назначением ганцикловира [20].

В клетках глиобластомы не определяется протеин Вах, являющийся членом семьи Bcl-2 и индуцирующий апоптоз при облучении. Это может быть следствием активной деградации этого протеина либо очень низким его синтезом [33].

Отмечена повышенная экспрессия протеина, ассоциированного со смертью (Dap-3), в инвазивных клетках глиомы *in vivo* и в клетках линий глиом с индуцированным мобильным фенотипом *in vitro*. При активации миграции повышается экспрессия Dap-3, и клетки становятся резистентными к апоптозу. Таким образом, хотя Dap-3 описан как проапоптотический протеин, его NH(2)-концевой фрагмент может определять защиту от программируемой гибели клеток [36].

**Апоптоз периферических лимфоцитов при глиоме.** Роль иммунной системы в контроле роста и распространения опухоли является предметом дискуссии в течение последних десятилетий. В некоторых ситуациях иммунные клетки вносят вклад в защиту организма от опухоли, Т-лимфоциты играют критическую роль в противоопухолевом ответе. При наличии глиомы взаимоотношения между клетками опухоли и Т-лимфоцитами неясны, по-видимому, многие механизмы обуславливают иммуносупрессию в микроокружении глиомы, включая секрецию различных цитокинов — трансформирующего фактора роста  $\beta$ , интерлейкина-10 (ИЛ-10) либо взаимодействие по типу клетка-клетка (экспрессия Fas-лиганда клетками глиомы) [26, 40, 42]. Отмечено, что продуцируемый глиомой ИЛ-10 снижал экспрессию DR-антигенов на моноцитах [31]; супернатанты клеток глиомы дозозависимо ингибировали пролиферацию Т-лимфоцитов и аллоцитолитическую активность лимфоцитов, из чего сделано заключение, что за дисфункцию иммунной системы у больных с глиомой отвечают ингибиторные медиаторы, продуцируемые опухолью [27, 31]. Трансформирующий фактор роста- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) экспрессируется во всех клетках организма, является полифункциональным цитокином, участвует в регуляции процессов

пролиферации, дифференцировки, миграции и апоптоза в клетках-мишенях [13–15].

Апоптоз Т-лимфоцитов, регулируемый путем продукции интерферона- $\gamma$  (ИФН- $\gamma$ ) или TNF- $\alpha$ , играет важную роль в патогенезе глиобластомы [16]. Так, у больных с глиобластомой выявлены по меньшей мере два иммунологических фенотипа: с признаками выраженного иммунодефицита (I) и без такового (II). У больных с фенотипом I содержание CD95+лимфоцитов в 2–3 раза превышало норму, с фенотипом II — этот показатель не превышал 30–60%. Авторы считают, что такое различие обусловлено высокой апоптотической активностью Т-лимфоцитов у больных с фенотипом I, у которых механизмы Fas-опосредованного апоптоза играют существенную роль в патогенезе опухоли. У таких больных была достоверно снижена продукция TNF- $\alpha$ , ИФН- $\gamma$  и ИФН- $\alpha$ , что коррелировало с количеством CD95+лимфоцитов.

Очевидная неспособность лимфоцитов, инфильтрирующих опухоль, индуцировать значительную гибель ее клеток установлена при различных злокачественных опухолях, включая злокачественную глиому. Т-супрессия у пациентов с глиомой обусловлена растворимыми иммуносупрессивными факторами, такими как TGF- $\beta$ . Однако экспрессия CD95-лиганда на клетках опухоли также индуцирует апоптоз Т-лимфоцитов [25]. Иммуногистохимическими исследованиями показано, что апоптотические Т-лимфоциты, экспрессирующие Fas, локализовались в непосредственной близости или находились в прямом контакте с FasL-экспрессирующими клетками опухоли. Клетки злокачественной глиомы человека экспрессируют CD95-лиганд и убивают Т-лимфоциты человека путем взаимодействия CD95/ CD95-лиганд. Апоптоз Т-лимфоцитов блокируется, если взаимодействие CD95-лиганда, экспрессированного на клетках глиомы, с CD95-антигеном, экспрессированным на Т-лимфоцитах, ингибируется конкурентно растворимым CD95-протеином. Хотя клетки глиомы коэкспрессируют CD95-лиганд и CD95-антиген и являются высокочувствительными к действию CD95-антител или растворимого CD95-лиганда, они никогда не подвергаются апоптозу. Следовательно: 1) восприимчивость к CD95-опосредованному апоптозу вовлекает регуляторные механизмы, отличные от уровня экспрессии CD95 и CD95-лиганда; 2) множественные механизмы, включающие растворимые факторы (TGF- $\beta$ ) и клеточные сигналы (CD95-лигандиндуцированный сигнал), опосредуют ускользание злокачественных опухолей головного мозга от иммунного ответа [23].

Еще одним фактором, позволяющим глиоме избегать иммунного ответа, является CD70-опосредованный апоптоз иммунных эффекторных клеток [46]. CD70- клеточный лиганд,

относящийся к семейству TNF, а его рецептор – CD27. Связывание CD27 может индуцировать апоптоз. При скринировании панели клеточных линий глиомы человека показано, что 11 из 12 линий экспрессируют CD70; иммуногистохимически CD70 выявлен в 5 из 12 глиобластом и в 3 из 4 анапластических астроцитом, тогда как экспрессия CD27 не выявлена ни в одном наблюдении. CD70-положительные клетки глиомы индуцировали апоптоз периферических мононуклеаров через CD70-зависимый путь. Таким образом, индукция апоптоза Т- и В-лимфоцитов путем взаимодействия CD70, экспрессированного на клетках глиомы, и CD27, экспрессированного на В- и Т-лимфоцитах, может быть еще одним механизмом ускользания злокачественной глиомы от иммунного ответа.

По нашим наблюдениям, уровень апоптоза лимфоцитов у больных с глиомой превышает число апоптотических Hoechst 33342<sup>+</sup> клеток в пуле лимфоцитов в норме [9]. После оперативного вмешательства уровень апоптотических лимфоцитов у больных с глиомой снижался, что позволяло сделать вывод о прекращении или снижении влияния проапоптогенных стимулов, оказываемых опухолью (глиомой), на иммунную систему пациента.

При изучении влияния супернатантов 48-часовых культур глиомы на интенсивность апоптоза лимфоцитов у здоровых доноров установлено более сильное проапоптогенное влияние злокачественной глиомы по сравнению с доброкачественной. Причем, проапоптогенное влияние в такой ситуации оказывали растворимые факторы, продуцируемые опухолью, предположительно, трансформирующий фактор роста- $\beta$ . На основании анализа результатов проведенного исследования представляется возможным заключить, что одним из механизмов реализации супрессивного влияния глиомы, особенно злокачественной, на клетки иммунной системы больного является продукция растворимых проапоптогенных факторов, воздействующих на клетки-мишени (лимфоциты) и нарушающих процессы их нормального созревания и дифференцировки в иммунокомпетентные клетки. Полученные нами данные об увеличении количества апоптотических лимфоцитов у больных с глиомой и преобладании их готовности к Fas-опосредованному апоптозу над готовностью к вступлению на путь пролиферации и дифференцировки коррелировали с высоким содержанием у этих больных цитокинов (ИЛ-2, ИФН- $\gamma$ ), способных влиять на экспрессию Fas/APO-1 (CD95<sup>+</sup>) антигена.

Таким образом, многочисленные данные литературы и результаты проведенных нами исследований подтверждают, что ускользание злокачественных опухолей головного мозга от иммунного ответа опосредуют многочисленные

механизмы, включающие растворимые факторы (предположительно, TGF- $\beta$ ) и клеточные сигналы (CD95-лигандиндуцированный сигнал).

#### ***Значение параметров апоптоза в диагностике онкологического процесса и оценке эффективности проводимой терапии***

Поскольку злокачественная трансформация клеток сопровождается их неконтролируемой пролиферацией и замедлением процесса апоптотической гибели, интенсивная гибель клеток опухоли должна бы ассоциироваться с лучшим прогнозом заболевания, однако так происходит не всегда [1]. В ряде случаев определение у пациентов с онкологическим заболеванием апоптотического индекса и содержания белков, ассоциированных с апоптозом, имеет значение для прогноза и оценки течения заболевания. Так, при астроглиоме высокий уровень экспрессии FasL и каспазы-1, а также увеличение содержания апоптотических клеток положительно коррелируют со степенью дифференцировки опухоли у больных с более длительным периодом жизни [28].

Прогноз онкозаболеваний и механизм действия наиболее эффективных противоопухолевых препаратов основан на интенсивности уничтожения злокачественных клеток путем индукции в них апоптоза [3]. Для выявления апоптоза применяют цитоморфологические (агрегация хроматина и цитоплазмы, фрагментация ядра, образование апоптотических телец), биохимические (фрагментация ДНК вследствие ее расщепления эндонуклеазами, повышение уровня Ca<sup>2+</sup> в цитозоле и накопление цАМФ, активация специфических протеинкиназ и изменение экспрессии генов ICE, Bcl-2, mdr-1, p53, теломеразы и др.) и цитофлуориметрические методы (регистрация изменения содержания ДНК в клетках).

Для оценки эффективности лечения определяют апоптотический индекс в ткани опухоли после проведения терапии [1, 47]. Все более широкое применение находит метод краткосрочного культивирования клеток опухоли *in vitro* в присутствии химиотерапевтических препаратов для оценки эффективности их действия в качестве индукторов апоптоза, что удобно для определения индивидуальной чувствительности клеток опухоли к химиопрепаратам.

Изучены механизмы индукции апоптоза при действии на клетки эпидермоидной карциномы человека KB цисплатины и анти-CD95-антител [17]. Исследовано возможное проапоптотическое действие различных доз лаферона (препарата ИНФ- $\alpha$ ) на культуры клеток глиомы человека [11], поскольку известно, что ИФН- $\alpha$  угнетает рост целого ряда опухолевых штаммов человека *in vitro*. Рекомбинантные препараты ИФН- $\alpha$

широко применяют в терапии гемобластоза, лимфомы, солидных опухолей [6]. Под влиянием ИФН- $\alpha$  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 относительного покоя. Установлено, что ИФН- $\alpha$  посредством Fas-лиганда усиливает апоптоз клеток опухоли [6]. На модели глиомы 261 у мышей показано, что при внутримышечной инъекции плазмидной ДНК, кодирующей ИФН- $\alpha$ , наблюдали значительное уменьшение объема опухоли и увеличение показателя выживаемости [32]. На основе этих исследований *in vitro* и клинических испытаний установлено выраженное антиглиомное действие очищенных препаратов ИФН- $\alpha$ , ИФН- $\beta$  и синтетического ИФН- $\beta$  (бетасерон) [29, 45]. При сочетанном воздействии ИФН- $\alpha$  и 13-цис-ретиноевой кислоты повышалась радиочувствительность клеток глиомы человека *in vitro* [35]. ИФН- $\alpha$  также усиливал киллинговый эффект сконструированного аденовируса, экспрессировавшего цитозинную деаминазу и тимидинкиназу, за счет возникновения апоптоза [43].

При исследовании возможного проапоптотического действия различных доз лаферона на культуры клеток глиомы человека показано, что при инкубации в течение 24 ч лаферон оказывает проапоптотическое влияние на клетки глиомы *in vitro*, причем индивидуальная чувствительность к проапоптотическому действию лаферона клеток глиомы различна [11]. Полученные данные имеют практическое значение для определения тактики лечения больных с глиомой и оценки эффективности проводимой терапии.

### Список литературы

- Абраменко И.В., Фильченков А.А. Оценка параметров апоптоза в диагностике онкологических заболеваний, их прогнозе и оптимизация схем терапии // *Вопр. онкологии.* — 2003. — Т.49, №1. — С.21–30.
- Акимов А.А., Иванов С.Д., Хансон К.П. Апоптоз и лучевая терапия злокачественных новообразований // *Вопр. онкологии.* — 2003. — Т.49, №3. — С.261–269.
- Акопян Г.Р., Сиренко А.Г., Гнатейко О.З. и др. С-анафаза как цитогенетический маркер апоптоза клеток при остром лимфобластном лейкозе у детей // *Эксперим. онкология.* — 1999. — Т.21, №2. — С.127–132.
- Барышников А.Ю., Шишкин Ю.В. Иммунологические проблемы апоптоза. — М.: Эдиториал УРСС, 2002. — 320 с.
- Владимирская Е.Б. Механизмы апоптотической смерти клеток // *Гематология и трансфузиология.* — 2002. — Т.47, №2. — С.35–40.
- Возианов А.Ф., Бутенко А.К., Зак К.П. Цитокины. Биологические и противоопухолевые свойства. — К.: Наук. думка, 1998. — 317 с.
- Галицкий В.А. Канцерогенез и механизмы внутриклеточной передачи сигналов // *Вопр. онкологии.* — 2003. — Т.49, № 3. — С.278–293.
- Копнин Б.П. Механизмы действия онкогенов и опухолевых супрессоров. — М.: РОО “Мир науки и культуры”, 2002. — 366 с.
- Лисяный Н.И., Любич Л.Д., Скитяк С.А., Гнедкова И.А. Исследование интенсивности апоптоза лимфоцитов периферической крови больных с глиомами и его корреляции с системой ИЛ-2 и ИФН- $\gamma$  // *Имунологія та алергологія.* — 2003. — №4. — С.25–30.
- Останин А.А., Центнер М.И., Хонина Н.А. и др. Антигенспецифическая иммунотерапия в комплексном лечении больных злокачественными опухолями головного мозга // *Вопр. онкологии.* — 2003. — Т.49, № 2. — С.170–175.
- Семенова В.М., Лисяный Н.И., Розуменко В.Д. и др. К вопросу о чувствительности глиальных опухолей мозга к воздействию  $\alpha$ -интерферона в эксперименте // *Матеріали ІІІ з'їзду нейрохірургів України.* — Алушта, 2003. — С.16–17.
- Степанов Ю.М., Фильченков А.А., Кушлинский Н.Е. Система FAS/FAS-лиганд: Метод. пособие. — Днепропетровск, 2000. — 48 с.
- Стойка Р.С., Фильченков А.А. Бифункциональное действие трансформирующего фактора роста  $\beta$  в регуляции пролиферации и апоптоза клеток нервной системы // *Нейрофизиология.* — 2001. — Т.33. — С.376–383.
- Стойка Р.С., Фильченков А.А. Бифункциональное действие трансформирующего фактора роста  $\beta$  в регуляции пролиферации и апоптоза клеток иммунной системы // *Имунологія и алергологія.* — 2001. — № 3. — С.5–16.
- Фильченков А.А., Залеский В.Н., Стойка Р.С. TGF $\beta$ : проатерогенный или антиатерогенный цитокин? // *Цитокины и воспаление.* — 2002. — С.17–24.
- Чумаков В.А., Биктимиров Р.Г., Качков И.А. и др. Клинико-иммунологическая оценка факторов апоптоза периферических лимфоцитов у больных с глиобластомой в предоперационном периоде // *Вторая Рос. конф. “Нейроиммунопатология”:* Тез. докл. — М., 2002. — С.85.
- Шишова Ю.В., Юрченко О.В., Хромьяк В.Н. и др. Резистентность к цисплатине, ассоциированная с гиперчувствительностью к CD95-опосредованному апоптозу клеток эпидермоидной карциномы человека сублинии KB/DDP5 // *Эксперим. онкология.* — 1999. — Т.21, № 2. — С.141–145.
- Askenazi A., Dixit V. Apoptosis control by death and decoy receptors // *Science.* — 1998. — P.1305–1308.
- Baker S., Reddy E. Modulation of life and death by the TNF receptor superfamily // *Oncogene.* — 1998. — V.17. — P.3261–3270.
- Bcl-2 expression in higher-grade human glioma: a clinical and experimental study // *J. Neurooncol.* — 2000. — V.48. — P.207–216.
- Birner P., Piribauer M., Fischer I. et al. Prognostic relevance of p53 protein expression in glioblastoma // *Oncol. Reports.* — 2002. — V.9. — P.703–707.
- Burton E.C., Lamborn K.R., Forsyth P. et al. Aberrant p53, mdm2, and proliferation differ in



- glioblastomas from long-term compared with typical survivors // *Clin. Cancer Res.* — 2002. — V.8, N1. — P.180–187.
23. CD95-dependent T-cell killing by glioma cells expressing CD95 ligand: more on tumor immune escape, the CD95 counterattack, and the immune privilege of the brain // *Intern. J. Experim. Cell. Physiol. Biochem. and Pharmacol.* — 1999. — V.7, N5. — Abstract 282.
  24. Chakravarti A., Delaney M.A., Noll E. et al. Prognostic and pathologic significance of quantitative protein expression profiling in human gliomas // *Clin. Cancer Res.* — 2001. — V.7, N8. — P.2387–2395.
  25. Didenko V.V., Ngo H.N., Minchew C., Baskin D.S. Apoptosis of T-lymphocytes invading glioblastomas multiforme: a possible tumor defense mechanism // *J. Neurosurg.* — 2002. — V.96, N3. — P.580–584.
  26. Dietrich P.Y., Tribolet N. Brain tumors: the time has come to amplify research // *Neurosurg.Focus.* — 1997. — V.3, N5. — P.254–259.
  27. Dix A.R., Brooks W.H., Roszman T.L., Morford L.A. Immune defects observed in patients with primary malignant brain tumors // *J.Neuroimmunol.* — 1999. — V.100, N1–2. — P.216–232.
  28. Ehrmann J., Rihakova P., Hlobikova A. et al. The expression of apoptosis-related proteins and the apoptosis rate in glial tumors of the brain // *Neoplasma.* — 2000. — V.47. — P.151–155.
  29. 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.
  30. Hansen R., Oren M. P53: from inductive signal to cellular effect // *Curr. Opin. Genet.* — 1997. — V.7. — P.46–51.
  31. Hishii M., Nitta T., Ishida H. et al. Human glioma-derived interleukin-10 inhibits antitumor immune responses in vitro // *Neurosurgery.* — 1995. — V.37, N6. — P.1160–1166.
  32. 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.
  33. Hwang A. BAX protein metabolism: a novel mechanism for therapeutic resistance in glioblastoma multiforme // *Amer. Brain Tumor Assoc. Message Line Newsletter* — Spring, 2000.
  34. Jung J.M., Bruner J.M., Ruan S. - B. et al. Increased levels of p21WAF1/Cip1 in human brain tumors // *Oncogene.* — 1995. — V.11. — P.2021–2028.
  35. Malone C., Schiltz P.M., Nayak S.K. et al. Combination interferon-alpha2a and 13-cis-retinoic acid enhances radiocentization of human malignant glioma cells in vitro // *Clin. Cancer Res.* — 1999. — V.5, N2. — P.417–423.
  36. Mariani L., Beaudry C., McDonough W.S. et al. Death-associated protein 3 (Dap-3) is overexpressed in invasive glioblastoma cell lines with induced motility phenotype in vitro // *Clin. Cancer Res.* — 2001. — V.7, N8. — P.2480–2489.
  37. Marzo I. The permeability transition pore complex // *J. Exp. Med.* — 1998. — V.187. — P.1261–1271.
  38. Owen-Schaub L.B., Zhang W., Cusack L.S. et al. Wild-type and a temperature-sensitive mutant of human p53 induce Fas/APO-1 expression // *Mol. Cell. Biol.* — 1997. — V.15. — P.3032–3040.
  39. Puthalakath H., Huang D., O'Reilly L. et al. The proapoptotic activity of the Bcl-2 family Bim // *Mol. Cell.* — 1999. — V.3. — P.287–296.
  40. Saas P., Walker P.R., Hahne M. et al. Fas ligand expression by astrocytoma in vivo: maintaining immune privilege in the brain? // *J.Clin.Invest.* — 1997. — V. 99. — P.1173–1178.
  41. Thorberry N.A., Lazebnik Y. Caspases: enemies within // *Science.* — 1998. — V.281. — P.12–16.
  42. Walker P.R., Saas P., Dietrich P.Y. The role of Fas ligand (CD95L) in immune escape: the tumor cell strikes back // *J. Immunol.* — 1997. — V.158. — P.4521–4524.
  43. Wang Z.H., Zagzag D., Zeng B. et al. In vivo and in vitro glioma cell killing induced by an adenovirus expressing both cytosine deaminase and thymidine kinase and its association with interferon-alpha // *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* — 1999. — V.58, N8. — P.847–858.
  44. Waterhouse N., Green D. Mitochondria and apoptosis // *J. Clin. Immunol.* — 1999. — V.19. — P.378–386.
  45. 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.
  46. Wischhusen J., Jung G., Radovanovic I. et al. Identification of CD70-mediated apoptosis of immune effector cells as a novel immune escape pathway of human glioblastoma // *Cancer Res.* — 2002. — V.62, N9. — P.2592–2599.
  47. Yakymovych M.Ya., Yakymovych I.Ya., Tryndiak V.P., Stoika R.S. Hypertermia differentially induces apoptosis in murine L1210 leukemia cells sensitive and resistant to cisplatin // *Experim. Oncol.* — 1999. — V.21. — P.154–156.
  48. Zou H., Li Y., Wang X. An APAF-1 cytochrome-C multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9 // *J. Biol. Chem.* — 1999. — V.274. — P.11549–11556.

### Порушення апоптотичних процесів

#### при гліомі головного мозку

*Лісяний М.І., Любич Л.Д.*

Представлений аналіз даних літератури щодо загальних механізмів апоптозу: внутрішньоклітинні сигнальні шляхи апоптозу, регуляція проведення сигналу продуктами генів p53 та Bcl-2, CD95(Fas/APO-1)/FasL-рецепторно-лігандна система та порушення його процесів у клітинах пухлини та лімфоцитах периферичної крові при гліомі головного мозку.

### Apoptosis disturbances in brain gliomas

*Lisyanyn N.I., Lyubych L.D.*

The general mechanisms of apoptosis: intracellular transduction of apoptotic signal, regulation by p53 and Bcl-2 gen products, CD95(Fas/APO-1)/FasL-system and apoptosis disturbances in cancer cells and peripheral blood lymphocytes in patients with brain glioma are analysed.