

УДК 612.014.3:612.1:616-006:616.831-006.484

Дослідження процесів апоптозу у мононуклеарних лімфоцитах периферійної крові та клітинах пухлин у хворих з гліомами головного мозку*Лісяний М.І., Любич Л.Д., Главацький О.Я., Лісяний О.М.***Інститут нейрохірургії ім. акад. А.П. Ромоданова АМН України, м.Київ**

Одним з основних напрямків сучасної онкоімунології є вивчення механізмів вислизання пухлини з-під імунологічного контролю, причин імуностимуляції росту пухлин і їх супресивного впливу на клітини системи імунітету [2, 3]. Прогресування росту пухлини — складний багатадійний процес, спричинений дисбалансом між процесами проліферації, диференціювання і загибелі клітин, насамперед, апоптозу, які регулюються клітинними онкогенами (с-myc, c-fos, c-jun, bcl-2 та ін.) і генами-супресорами росту пухлин (p53, bax, Rb, p21, mdm2 та ін.) [8]. Характерною ознакою пухлини є те, що її клітини уникають апоптозу [24].

Апоптоз є загальнобіологічним механізмом, що відповідає за підтримку постійної кількості популяцій клітин, а також формування і відбракування дефектних клітин [1]. Апоптоз, або програмована загибель клітин, є переважним типом їх смерті під час нормального розвитку, регенерації, проліферації та патологічної дегенерації в ЦНС [16]. Процес апоптозу розподіляють на два типи залежно від залучення мітохондрій або біохімічних каскадів клітин. Перший, або внутрішній шлях апоптозу, ініціюють численні цитотоксичні стимули, він опосередковується викиданням цитохрому С і подальшою активацією низхідних каспаз. Зовнішній шлях апоптозу включається при зв'язуванні рецепторів смерті, зокрема, Fas, лігандів родини TNF TRAIL-R1, TRAIL-R2 (TNF-related apoptosis inducing ligand -R), TNFRp55, і опосередковується прямою активацією висхідних каспаз. Система Fas-FasL є індуктором швидкої смерті клітин, що забезпечує реалізацію клітинно-опосередкованої цитотоксичності, периферійної імунної регуляції, імунної привілейованості та «контратаки» клітин злоякісної пухлини проти імунної системи хазяїна [16].

У багатьох пухлинах інтенсивність апоптозу прямо пов'язана з прогресією, зменшенням ступеня зрілості клітин, типом пухлини. Апоптоз контролюють ті самі цитокіни, протоонкогени і гени-супресори росту пухлин, які контролюють процеси проліферації і диференціювання клітин. Всі ці процеси тісно взаємопов'язані під час прогресування росту пухлини, коли часто виявляють гіперекспресію клітинних онкогенів з мутацією генів-супресорів [8].

Методи виявлення апоптозу різноманітні. Спочатку найбільш поширеним способом визначення апоптозу був електрофорез екстрагованої фракції ДНК, який дозволяв виявити дискретність низькомолекулярної ДНК за молекулярною масою (як наслідок міжнуклеосомної деградації ДНК). За даними морфологічних досліджень для визначення розриву ДНК використовують TUNEL-метод, оснований на формуванні вставок мічених олігонуклеотидів в ділянках розриву ДНК, утворення яких каталізується ферментом TdT [9]. У нинішній час для реєстрації

апоптозу лімфоцитів все ширше застосовують методи, основані на проточній цитофлуориметрії. До цієї групи належить метод, що передбачає виявлення втрати клітинами частини ДНК (гіподиплоїдних клітин) за допомогою флуоресцентного барвника — пропідіума йодиду (PI). Апоптоз лімфоцитів можна виявити вже на ранніх його етапах за допомогою барвника Hoechst, а також міченого флуорохромом аннексину V, який зв'язується з фосфатидилсерином, що експонується на мембранах клітин, що зазнали апоптозу [7, 10]. Орієнтовне уявлення про «схильність» лімфоцитів до апоптозу можна отримати при визначенні на їх поверхні Fas-рецептора (CD-95) та в мітохондріях — протоонкогена bcl-2.

Метою роботи було дослідження процесів апоптозу у мононуклеарних лімфоцитах периферійної крові (ПК) та зразках пухлин хворих з внутрішньомозковими пухлинами.

Матеріали і методи дослідження. Матеріалом для дослідження були свіжовиділені мононуклеари периферійної крові (МНЛПК) та клітини пухлин 116 хворих, виділені під час операції з приводу пухлин мозку різної структури і ступеня анаплазії (n=20), III ступеня (n=34), IV ступеня (n=23); медулобластоми (n=39), а також здорових осіб (n=20, контрольна група).

МНЛПК виділяли шляхом центрифугування у градієнті щільності 1,077 (тріомбрат) за швидкості 1500 об./хв протягом 30 хв, двічі відмивали забуференим фізрозчином (ЗФР) з рН 7,2–7,4.

Клітини пухлини отримували з біопатів шляхом ретельного суспендування за допомогою шприця з товстою голкою, двічі відмивали ЗФР з рН 7,2–7,4. Життєздатність клітин визначали за включенням 0,2% розчину трипанового синього («Merck», Німеччина). В усіх отриманих зразках визначали клітини у стані апоптозу.

Визначення клітин, що перебувають у стані апоптозу за допомогою барвника Hoechst. Для фарбування Hoechst 33342 (Sigma, США) клітини відмивали в ЗФР шляхом центрифугування за швидкості 1500 об./хв протягом 5 хв, інкубували в розчині Hoechst 33342 (0,1 мкг/мл) протягом 30 хв при температурі (37±0,1)°С. Відмиті в ЗФР клітини суспендували в 50% розчині гліцерину і наносили на предметні скельця. Препарати вкривали покривними скельцями і запаювали. Аналіз клітин, що перебували у стані апоптозу, здійснювали за допомогою імерсійної системи мікроскопа ЛЮМАМ (Росія) при збільшенні ×900.

Визначення клітин, що перебувають у стані апоптозу, цитофлуориметричним методом з використанням PI. Дослідження проводили за загальноприйнятими рекомендаціями [9]. Для пермеабілізації клітинної мембрани МНЛПК фіксували у 400 мкл 70% етилового спирту протягом 1 год при температурі

4°C, центрифугували, відмивали ЗФР. Додавали 200 мкл розчину РІ (5мкг/мл) у фосфатно-сольовому буфері (ФСБ) з додаванням 0,1% розчину тритону X=100 та 0,1% розчину натрію цитрату. Інкубували протягом 1 год в темноті та аналізували за допомогою проточного цитофлуориметра FACSCalibur («Becton Dickinson», США) з аргонним лазером за довжини хвилі 488 нм. Оцінювали кількість клітин у фракції, розташованій в зоні гістограми, що відповідає субдиплоїдному вмісту ДНК.

Експресію антигену CD95 (FAS-рецептор) на клітинах визначали за допомогою імунофенотипування непрямим імунофлуоресцентним методом [9]. Аналіз клітин проводили за допомогою проточного цитофлуориметра.

Результати та їх обговорення. Визначення рівня апоптозу у МНЛПК хворих з внутрішньомозковими пухлинами різного генезу і ступеня злоякісності. Під час обстеження хворих з пухлинами головного мозку діапазон індивідуальних коливань кількості МНЛПК, що перебували у стані апоптозу (більшість фракції МНЛПК), становив від 0 до 50%. Життєздатність МНЛПК у тесті з трипановим синім була високою — 84,5–100%, достовірної різниці показника у контрольній та дослідних групах не було.

Кількість CD95+ клітин, що експресували рецептор готовності до апоптозу, зменшувалася у міру збільшення ступеня анаплазії гліоми від II до IV (табл. 1). При цьому у хворих з гліомами II ступеня анаплазії кількість CD95+ клітин достовірно перевищувала таку в контрольній групі та у хворих з гліомами IV ступеня анаплазії. За наявності медулобластоми кількість CD95+ клітин достовірно перевищувала таку у контрольній групі та у хворих з гліомами III і IV ступеня анаплазії.

Hoechst 33342 є ДНК-тропним барвником, який з'єднується з ДНК у місцях А-Г пар і виявляє клітини у стані апоптозу вже через 6–8 год після того, як вони отримали відповідний стимул, тобто, на ранніх стадіях каскаду апоптозу. Під час аналізу

середньої кількості Hoechst33342+ клітин у стані апоптозу серед лімфоцитів ПК у хворих з гліомами цей показник зменшувався у міру збільшення ступеня анаплазії гліоми від II до IV. Рівень апоптозу МНЛПК у хворих з гліомами II і III ступеня анаплазії перевищував такий у контрольній групі, у хворих з гліомами IV ступеня анаплазії він був меншим від контрольного.

Середня кількість Hoechst33342+ клітин у стані апоптозу серед МНЛПК у хворих з медулобластомами достовірно перевищувала цей показник у контрольній групі.

Кількість РІ+ клітин серед МНЛПК у хворих з гліомами II ступеня анаплазії була достовірно менша, ніж у контрольній групі, у хворих з гліомами III і IV ступеня анаплазії, а також з медулобластомою середня кількість РІ+ клітин перевищувала таку у контрольній групі.

Таким чином, кількість Hoechst33342+ та CD95+ клітин серед МНЛПК хворих з гліомами свідчила про однотипну тенденцію до зменшення у міру збільшення ступеня анаплазії гліоми. Такої кореляції не спостерігали при дослідженні РІ+ клітин у стані апоптозу. Навпаки, кількість РІ+ клітин мала тенденцію до збільшення у міру збільшення ступеня злоякісності гліом. Найменша кількість Hoechst33342+ та CD95+ клітин відзначена у хворих з гліобластомою, найбільша — з медулобластомою. Найбільшу кількість РІ+ клітин виявляли у хворих з медулобластомою.

Визначення рівня апоптозу клітин пухлини у хворих з внутрішньомозковими пухлинами різного генезу і ступеня анаплазії. Під час дослідження зразків клітин пухлин встановлено, що з свіжовиділених клітин пухлини кількість CD95+ клітин, що експресували рецептор готовності до апоптозу, була достовірно меншою у зразках гліобластоми, ніж гліоми III ступеня анаплазії (табл. 2), у зразках гліом III ступеня анаплазії їх кількість достовірно перевищувала таку у зразках гліоми II ступеня анаплазії та гліобластоми.

Таблиця 1. Рівень апоптозу МНЛПК у хворих з внутрішньомозковими пухлинами різного ступеня анаплазії

Вид, ступінь анаплазії пухлини		Кількість клітин у стані апоптозу			Кількість життєздатних клітин, %
		Hoechst+	% РІ+	CD95+	
Гліома II (n=20)	M±m	21,60±4,68 [*]	13,45±0,43 [*]	16,84±4,44 [^]	97,18±1,43
	Розмах варіації	13,60–31,00	12,80–14,10	9,00–25,90	92,90–99,20
Гліома III (n=34)	M±m	15,80±7,02 ^{#&*}	16,24±6,46	11,18±4,27 [#]	93,79±4,06
	Розмах варіації	1,80–33,60	3,30–22,90	6,00–19,40	85,80–100,00
Гліома IV (n=23)	M±m	5,09±2,74 ^{^#&@*}	18,53±6,54	9,41±4,15 ^{^&}	97,69±2,04
	Розмах варіації	1,00–10,30	7,70–35,30	5,70–21,60	90,30–100,00
Медулобластома (n=39)	M±m	23,63±9,08 ^{^&@}	23,36±11,63	17,63±6,80 ^{^#&}	95,33±5,56
	Розмах варіації	8,00–50,70	5,92–40,80	8,60–33,50	84,50–100,00
Контроль (n=20)	M±m	10,55±5,68	18,69±6,36	6,42±2,21	98,57±1,37
	Розмах варіації	0,00–20,00	7,30–27,43	3,40–18,80	94,10–100,00

Примітка. Різниця показників достовірна у порівнянні з такими: * — в контрольній групі; ^, #, &, @ — в інших групах. Те ж у табл. 2.

Таблиця 2. Рівень апоптозу клітин у хворих з пухлинами головного мозку різного ступеня анаплазії

Вид, ступінь анаплазії пухлини		Кількість клітин у стані апоптозу			Кількість життєздатних клітин, %
		Hoechst+	% РІ+	CD95+	
Гліома II (n=20)	M±m	34,43±14,62	67,42±2,89 ^{^#&}	8,70±0,43 [^]	54,05±17,04
	Розмах варіації	4,20–56,10	21,58–61,65	8,05–9,35	50,00–92,30
Гліома III (n=34)	M±m	22,45±12,17	37,45±17,25 [^]	16,07±2,03 ^{^#}	51,45±13,73
	Розмах варіації	4,20–40,70	3,30–60,65	12,00–19,50	50,30–88,90
Гліома IV (n=23)	M±m	29,15±12,70	27,00±10,90 [#]	6,78±0,74 [#]	65,13±10,30
	Розмах варіації	10,10–48,20	14,60–48,80	3,70–8,15	50,00–87,70
Медулобластома (n=39)	M±m	28,87±22,27	43,80±14,46 ^{&}	10,8±0,52	66,60±11,71
	Розмах варіації	6,40–74,40	15,50–71,72	8,15–11,30	50,00–96,80

З свіжовиділених клітин пухлини Hoeschst33342+ було у середньому від 22% (за наявності астрцитоми III ступеня анаплазії) до 35% (гліоми II ступеня анаплазії). З клітин гліом кількість Hoeschst33342+ клітин у стані апоптозу була найнижчою у зразках гліоми III ступеня анаплазії, дещо більшою — у зразках гліобластом, найбільшою — у зразках гліом II ступеня анаплазії. В медулобластомах виявлено у середньому 30% Hoeschst33342+ клітин у стані апоптозу.

Кількість PI+ клітин зменшувалася у міру збільшення ступеня злоякісності гліоми, у середньому з 67% — у зразках гліом II ступеня анаплазії до 27% — у зразках гліобластом. У медулобластомах містилося в середньому 44% PI+ клітин.

Таким чином, у зразках гліом IV ступеня анаплазії, порівняно з гліомами II і III ступеня анаплазії, містилася найменша кількість клітин у термінальній стадії апоптозу (PI+), найменша кількість CD95+ клітин (що несуть рецептор готовності до апоптозу) і середня кількість клітин на ранніх, або оборотних, стадіях апоптозу (Hoeschst33342+).

Слід зазначити, що життєздатність свіжовиділених клітин пухлини у тесті з трипановим синім відрізнялась у зразках різного виду пухлини та ступеня анаплазії. Найбільш життєздатними були зразки гліобластом та медулобластом, менш життєздатними — зразки гліом II і III ступеня анаплазії.

Таким чином, кількість лімфоцитів, що перебувають у стані апоптозу, у хворих з внутрішньомозковими пухлинами перевищує таку в пулі лімфоцитів в нормі.

Роль імунної системи у контролі росту і поширення пухлини залишається предметом дискусії протягом останніх десятиліть. В деяких ситуаціях імунні клітини можуть вносити вклад у захист організму від пухлини, Т-лімфоцити відіграють критичну роль у протипухлинній відповіді. Багато аспектів взаємодії між клітинами пухлини і Т-лімфоцитами не визначені. Очевидна нездатність лімфоцитів, що інфільтрують пухлину, індукувати значну загибель клітин пухлини встановлена при різних злоякісних новоутвореннях. Вважають, що мікрооточення пухлини справляє супресивний вплив на клітини імунної системи, перешкоджаючи реалізації ефективної протипухлинної відповіді [2].

Оцінюючи отримані дані визначення апоптозу у МНЛПК у здорових осіб, слід пам'ятати, що апоптоз відіграє важливу роль у тканинному гомеостазі, він є ключовим компонентом процесів формування, підтримки постійної кількості клітин в органах і цілому організмі, регуляції складу популяції клітин, видалення старих клітин тощо [13]. Апоптоз відіграє різноманітну роль також в імунних процесах: за допомогою цього механізму вибираються лімфоцити з невадо сформованими антигенрозпізнавальними рецепторами, відбираються клони лімфоцитів (видаляються аутоспецифічні клони і клітини, не здатні розпізнавати антигени у складі молекул головного комплексу гістосумісності), реалізується клітинно-опосередкований цитоліз, видаляються лімфоцити, що реалізували свої імунні функції. Тобто, апоптоз є складовою нормальних фізіологічних процесів у організмі.

За нашими даними, у контрольній групі серед МНЛПК містилося у середньому 6,5% клітин, що

експресували Fas-R (CD95+), 10,5% (від 0 до 20%) — Hoeschst33342+ клітин у стані апоптозу, 16,6% PI+ клітин. Отримані дані щодо кількості Hoeschst33342+ клітин узгоджуються з даними інших дослідників [7], які встановили, що одразу після виділення кількість Hoeschst33342+ МНЛПК у стані апоптозу у здорових осіб становила у середньому 22%, зменшуючись під час культивування у повному поживному середовищі через 24 год у середньому до 18%. Цей показник характеризує спонтанний апоптоз, за якого клітини гинуть без участі зовнішніх чинників по закінченні дії «внутрішнього годинника». Нормативна кількість гіподиплоїдних клітин (PI+), тобто клітин з частково втраченою ДНК у здорових донорів становить в середньому (7,62±1,06)% [9]. Нами отримані дещо більші значення — (16,57±5,42)%, що, ймовірно, зумовлене тим, що до контрольної групи включені умовно здорові особи, у яких не було процесів неотрансформації, проте, не виключена наявність прихованих запальних або інфекційних процесів.

У хворих з гліомами кількість CD95+ клітин, що несуть рецептор готовності до апоптозу, та Hoeschst33342+ клітин у стані апоптозу серед МНЛПК зменшувалася у міру збільшення ступеня анаплазії гліоми від II до IV. Кількість лімфоцитів у стані апоптозу у хворих з гліомами II і III ступеня анаплазії перевищувала таку у пацієнтів контрольної групи, а у хворих з гліомами IV ступеня анаплазії зменшувалася майже до контрольного рівня.

Сигнал апоптозу може бути отриманий клітиною різними шляхами. Виділяють два типи провідних сигнальних шляхів:

- пошкодження ДНК, радіація, дія токсичних агентів, глюкокортикоїдів, припинення цитокинової регуляції, вкорочення до критичного рівня теломер (при цьому активізується каспаза 9);

- проапоптотичні сигнали, що виникають під час активації рецепторів «регіону клітинної смерті» (Fas-R, TNF-R) і залучають активацію каспази 8 [1].

Передача проапоптотичного сигналу при зв'язуванні ліганду з рецепторами регіону смерті клітин відбувається за допомогою адапторних білків FADD/MORT1, N-термінальний регіон (DED) яких, в свою чергу, зв'язується з аналогічним регіоном прокаспази 8, що спричиняє її аутокаталітичну активацію. Під час активації деяких членів сім'ї TNF-рецепторів (у тому числі TNF-R1) використовується додатковий адапторний білок TRADD.

Один з рецепторів «регіону клітинної смерті» — антиген Fas/APO-1 (CD95+) експресований у людини на кортикальних тимоцитах, активованих Т- і В-лімфоцитах. Рівень експресії цього антигену підвищується з віком. Експресія Fas/APO-1-антигену з'являється на неонатальних Т- і В-лімфоцитах після їх активації фітогемалютиніном або інтерлейкіном (ІЛ)-2. Як в нормальних клітинах, так і в клітинах злоякісних пухлин експресія Fas/APO-1 підвищується після культивування з ІЛ-2 та інтерфероном-γ (ІФН-γ) [13].

Зменшення кількості Hoeschst33342+ клітин у стані апоптозу серед лімфоцитів ПК у хворих з гліомами у міру збільшення ступеня анаплазії гліоми, на перший погляд, не узгоджується з отриманими нами раніше даними про вплив супернатантів 48-годинних культур гліом на рівень апоптозу лімфоцитів здо-

рових донорів *in vitro*, згідно яких злоякісна гліома справляє більш виражений проапоптогенний вплив, ніж доброякісна [5]. Очевидно, *in vivo* циркулюючі в ПК МНЛПК у хворих з гліомами зазнають впливу значно більшої кількості чинників, ніж у змодельованій *in vitro* клітинній системі, що включає пряму дію гуморальних чинників гліоми на МНЛПК здорових осіб.

Кількість Hoechst33342+ та CD95+ клітин серед МНЛПК у хворих з гліомами мала однотипну тенденцію до зменшення у міру збільшення ступеня злоякісності гліоми, не корелюючи з вмістом PI+ клітин. Очевидно, це пояснюється тим, що барвник Hoechst33342 виявляє клітини у стадії раннього і оборотного апоптозу, експресія CD95+ свідчить лише про готовність до апоптозу, а барвник PI виявляє гіподиплоїдні клітини у термінальних стадіях апоптозу й некрозу, коли вони вже втратили частину ДНК [10]. Найменша кількість Hoechst33342+ та CD95+ клітин відзначена у МНЛПК у хворих з гліобластомами.

Кількість PI+ клітин у хворих з гліомами збільшувалася у міру збільшення ступеня злоякісності гліом. Таким чином, у міру збільшення ступеня анаплазії гліом у пулі МНЛПК зменшувалась кількість клітин на ранніх, оборотних стадіях апоптозу, і, навпаки, збільшувалася кількість клітин у необоротних, термінальних його стадіях, що може свідчити про збільшення проапоптотичного супресивного впливу пухлин гліального генезу у міру збільшення ступеня злоякісної трансформації.

Необхідно відзначити чималу кількість свідчень імуносупресивного впливу гліом. Ймовірно, багато механізмів створюють стан імуносупресії в мікрооточенні гліоми, включаючи секрецію різних цитокінів (трансформуючий фактор росту- β , ІЛ-10) або взаємодію за типом клітина-клітина (експресія Fas-ліганду клітинами гліоми) [14, 19].

Вважають, що апоптоз Т-лімфоцитів, регульований через продукцію ІФН- γ або TNF- α , відіграє важливу роль у патогенезі гліобластом [11]. Так, у хворих з гліобластомами характерне існування, як мінімум, двох імунних фенотипів: I — з ознаками вираженого імунodefіциту і II — без такого. У хворих з фенотипом I кількість CD95+ лімфоцитів у 2–3 рази перевищувала норму, з фенотипом II — цей показник не перевищував 30–60%. Такі розбіжності пов'язують з високою апоптотичною активністю Т-лімфоцитів у хворих за наявності I фенотипу, у яких механізми Fas-опосередкованого апоптозу можуть відігравати істотну роль у патогенезі пухлини. В групі I також була достовірно зменшена продукція TNF- α , ІФН- γ та ІФН- α , що корелювало з концентрацією CD95+ лімфоцитів [12].

До підтримання статусу імуносупресії у ЦНС залучається Fas-FasL система. Клітини гліальних пухлин експресують Fas (APO-1/CD95) рецептор, тоді як в нормі клітини ЦНС його не експресують [14]. За іншими даними, Fas і FasL експресуються в ЦНС у нормі, їх експресія підвищується при запаленні і дегенерації мозку [16]. Таким чином, Fas-FasL систему можна трактувати як «меч з двома лезами» в ЦНС: з одного боку, вона підтримує імуносупресивний статус у неуразраженому мозку, з іншого, індукує смерть нейрональних клітин і запалення при різних неврологічних захворюваннях [16].

Під час дослідження 42 зразків астроцитоми у дітей встановлено, що 50–100% клітин цих пухлин експресують CD95. Також доведено, що пухлини мозку продукують аутокринний FasL (ліганд) і навіть можуть переключати CD95-трансдукційний сигнал з програми загибелі клітин (апоптозу) на програму їх проліферації [14]. Таким чином, потужна експресія Fas-рецептора на клітинах астроцитом є способом, яким Т-лімфоцити можуть реалізувати свій протипухлинний ефект, проте, одночасно може бути способом уникнення імунної відповіді.

За нашими даними, кількість CD95+ клітин, що експресували рецептор готовності до апоптозу, у різних зразках гліом становила від 3 до 20% і була достовірно нижчою у зразках гліобластоми, порівняно з гліомами III ступеня анаплазії. У зразках гліом IV ступеня анаплазії, порівняно з гліомами II і III ступеня анаплазії, кількість клітин, що перебували у термінальній стадії апоптозу (PI+), була найменшою, кількість CD95+ клітин, що несуть рецептор готовності до апоптозу — також найменшою, клітин на ранніх, оборотних стадіях апоптозу (Hoechst33342+) — середньою. Кількість PI+ клітин зменшувалася у міру збільшення ступеня анаплазії гліоми. Наші дані узгоджуються з даними, отриманими іншими дослідниками [6]. Таким чином, у міру збільшення ступеня злоякісності гліоми кількість клітин пухлини, що спонтанно гинуть шляхом апоптозу, зменшується.

З використанням імуногістохімічних методів [18] було показано, що Т-лімфоцити у стані апоптозу, що експресують Fas, локалізувались у безпосередній близькості або перебували у прямому контакті з FasL-експресуючими клітинами пухлин. Клітини злоякісної гліоми людини експресують CD95-ліганд і вбивають Т-лімфоцити людини шляхом взаємодії CD95/CD95-ліганд. Апоптоз Т-лімфоцитів блокується, якщо взаємодія CD95-ліганду, експресованого на клітинах гліоми, з CD95, експресованим на Т-лімфоцитах, інгібується конкурентно розчинним CD95-протейном. Автори роблять висновок, що сприйнятливість до CD95-опосередкованого апоптозу залучає регуляторні механізми, що різняться від рівнів експресії CD95 і CD95-ліганду; численні механізми, які включають розчинні фактори (TGF- β) і клітинні сигнали (CD95-ліганд-індукований сигнал), визначають «вислизання» злоякісних пухлин головного мозку від імунної відповіді [15].

Ще одним чинником, який дозволяє гліомам уникати імунної відповіді, є CD70-опосередкований апоптоз імунних ефекторних клітин [26]. CD70 — клітинний ліганд, що належить до родини фактора некрозу пухлин, а його рецептор — CD27. Зв'язування CD27 може індукувати апоптоз. За даними скринінгу панелі ліній клітин гліом людини 11 з 12 ліній експресують CD70; за даними імуногістохімічних досліджень CD70 виявлений у 5 з 12 гліобластом і у 3 з 4 анапластичних астроцитом, тоді як експресія CD27 не виявлена в жодному спостереженні. CD70-позитивні клітини гліоми індукували апоптоз МНЛПК через CD70-залежний шлях.

У нашому дослідженні у міру збільшення ступеня анаплазії пухлини кількість CD95+/FAS-Apo-1 та Hoechst 33342+ лімфоцитів у стані апоптозу зменшувалася, це свідчило, що рівень апоптозу периферійних лімфоцитів, зумовлений як FAS/

FASL-сигнальним шляхом апоптозу, так і рецепторно-незалежними сигнальними механізмами, які контролюються генами p53 і родиною генів bcl-2, зменшується у міру збільшення ступеня анаплазії гліоми. Можливо, це зумовлене прогресуванням генетичних змін при утворенні гліом головного мозку, що потребує подальшого вивчення.

За нашими даними, найбільша кількість Hoechst33342+ та CD95+ клітин відзначена у МНЛПК у хворих з медулобластомами, вона достовірно перевищувала показник у контрольній групі. У зразках медулобластом виявлено у середньому 30% Hoechst33342+ клітин у стані апоптозу та 44% PI+ клітин.

Клітини медулобластоми містять численні кількісні і структурні хромосомні аберації. У 21% медулобластом відзначені мутації TP53, метильований P14^{ARF} або делеція INK4A/ARF [17, 21], тобто зміни у пухлинно-супресорному шляху. Мутації Shh (Sonic hedgehog signaling) рецептора *PATCHED* (*PTCH*), асоційовані з медулобластомами, порушують диференціацію гранулярних клітин мозочка і беруть участь в утворенні пухлини шляхом активації проліферації і/або зниження рівня апоптозу [23]. В клітинах медулобластом людини, пухлинах мишей *Ptc*+/- (гетерозиготних за *patched*) виявляють зниження рівня апоптозу *in vivo* [20, 23]. Втрата функції p53 може бути наслідком не тільки мутації TP53, а й ампліфікації або надекспресії гена MDM2, що спричиняє зниження апоптотичної відповіді пухлини на радіотерапію і зменшення тривалості виживання [22].

Клітини медулобластоми коекспресують CD95 і CD95L [25]. При оброблянні ліній клітин медулобластоми людини ІНФ- γ або TNF- α спостерігали посилення експресії CD95 і чутливості до CD95-опосередкованого апоптозу, тоді як інгібітори каспази блокували CD95L-індуковану цитотоксичність [25]. Вважають, що CD95 може бути перспективною мішенню для імунохіміотерапії медулобластоми людини. Показано, що в основі стійкості клітин медулобластоми до ліганд-індукованого TNF апоптозу лежить втрата експресії мРНК каспази-8 завдяки аберантному метильованню гена, асоційована з несприятливим клінічним перебігом [24].

Таким чином, кількість лімфоцитів у стані апоптозу у хворих з внутрішньомозковими пухлинами перевищує таку у здорових осіб. Це може свідчити про проапоптотичний вплив пухлин мозку на імуннокомпетентні клітини хворого за наявності пухлини. У міру збільшення ступеня анаплазії гліом у пулі МНЛПК зменшувалась кількість клітин у ранніх, оборотних стадіях апоптозу, і, навпаки, збільшувалась кількість клітин у необоротних, термінальних його стадіях, що може свідчити про наростання проапоптотичного супресивного впливу пухлин гліального генезу у міру збільшення ступеня злоякісної трансформації.

Проведене дослідження підтверджує, що процеси апоптозу у хворих з гліомами та іншими пухлинами мозку реалізуються не тільки за участю CD95/CD95L-системи, а й з залученням інших сигнальних шляхів апоптозу: рецепторно-незалежних (сигнальні шляхи активації каспази 9) і рецепторно-залежних (при активації інших рецепторів «регіона смерті клітин» TNFR1, CAR1, DR3, DR4, DR5, p75-NGF). Причому, вплив цих сигнальних шляхів апоптозу пов'язаний з

порушенням експресії генів p53 і родини генів bcl-2 та їх продуктів, що контролюють рецепторно-незалежні сигнальні шляхи апоптозу, або порушенням експресії рецепторів «регіону смерті клітин». На наш погляд, це питання потребує подальшого вивчення з використанням сучасних методів молекулярної і генетичної діагностики.

Різна кількість клітин у стані апоптозу у зразках пухлин, на нашу думку, є відображенням інтенсивності молекулярно-генетичних змін трансформації пухлин головного мозку різного гістогенезу і різного ступеня злоякісності. Досить значна кількість клітин у стані апоптозу у зразках пухлин пояснюється ще й тим, що матеріал біопсії аналізували після механічного суспендування *in vitro*, тому отримані дані можуть різнитися від даних, отриманих під час аналізу гістологічних зрізів. Зокрема, найбільша життєздатність гліобластом та медулобластом, порівняно з гліомами II і III ступеня анаплазії свідчить, що у пухлинах IV ступеня анаплазії клітини мають більший проліферативний потенціал, що узгоджується з кількісними показниками експресії ядерного антигену Ki-67 [6].

Таким чином, на основі отриманих даних та даних літератури можна припустити, що основними механізмами реалізації супресивного впливу пухлин мозку, особливо злоякісних, на клітини імунної системи хворих є продукція розчинних проапоптотичних чинників та сигнали клітин (CD95-ліганд-індукований сигнал), що справляють проапоптотичний вплив на клітини-мішені (лімфоцити).

Висновки 1. У хворих з гліальними пухлинами мозку кількість лімфоцитів, що перебувають у стані апоптозу, більша, ніж у здорових осіб.

2. Кількість Hoechst33342+ та CD95+ клітин серед МНЛПК у хворих з гліомами має однотипну тенденцію до зменшення у міру збільшення ступеня анаплазії гліоми, тоді як кількість PI+ клітин, що визначає необоротний апоптоз, збільшувалася у міру збільшення ступеня анаплазії гліоми, що може свідчити про вплив на лімфоцити різних супресорних чинників залежно від ступеня злоякісності пухлини.

3. Гліоми IV ступеня анаплазії, порівняно з гліомами II і III ступеня анаплазії, містили найменшу кількість клітин у термінальній стадії апоптозу (PI+), найменшу кількість CD95+ клітин, що несуть рецептор готовності до апоптозу, і середню кількість клітин у ранніх, оборотних стадіях апоптозу (Hoechst33342+). Кількість PI+ клітин зменшувалася у міру збільшення ступеня злоякісності гліоми.

4. У МНЛПК у хворих з медулобластомами відзначено підвищений рівень готовності до апоптозу та ступеня оборотних і необоротних змін, що визначається молекулярно-генетичними особливостями цих пухлин.

Список літератури

1. Белушкіна Н.Н., Северин С.Е. Молекулярные основы патологии апоптоза // Арх. патологии. — 2001. — Т.63, №1. — С.51–60.
2. Бережная Н.М. Роль клеток системы иммунитета в микроокружении опухоли. Клетки и цитокины — участники воспаления // Онкология. — 2009. — Т.11, №1. — С.6–16.

3. Бережная Н.М., Чехун В.Ф. Система иммунитета и рак: достижения и неудачи // Онкология. — 2003. — Т.5, №2. — С.84–89.
4. Бережная Н.М., Чехун В.Ф. Иммунология злокачественного роста. — К.: Наук. думка, 2005. — 791 с.
5. Лісяний Н.І., Любич Л.Д., Скитяк С.А., Гнедкова І.А. Исследование интенсивности апоптоза лимфоцитов периферической крови больных с глиомами и его корреляции с системой ИЛ-2 и ИФН- γ // Иммунология та алергологія. — 2003. — №4. — С.25–30.
6. Малишева Т.А., Черненко О.Г., Шамаев М.І. Проліферативна активність і апоптоз в нейроектодермальних пухлинах // Матеріали ІV з'їзду нейрохірургів України — Дніпропетровськ, 2008. — С.209–210.
7. Мамонтова Т.В., Кайдашев І.П. Спонтанний апоптоз та експресія білків bcl-2 та P53 мононуклеарних клітин периферичної крові у хворих на atopічну бронхіальну астму // Иммунология та алергологія. — 2005. — №3. — С.43–46.
8. Пальцев М.А., Демура С.А., Коган Е.А. и др. Мелкоклеточный рак и карциномы легких: морфология апоптоза и экспрессия биомолекулярных маркеров опухолевого роста // Арх. патологии. — 2000. — Т.62, №5. — С.11–17.
9. Применение проточной цитометрии для оценки функциональной активности иммунной системы человека : Пособие для врачей-лаборантов / Сост.: Б.В. Пинегин и др. — М., 2001. — С.48–53.
10. Циклаури М.В., Гогобашвили Н.В. Нарушение функции иммунной системы и апоптоз лимфоцитов при травме, осложненной стафилококком // Иммунология та алергологія. — 2003. — №4. — С.37–38.
11. Чумаков В.А., Качков И.А., Захаров А.В. и др. Иммунодефицитные состояния при глиальных опухолях головного мозга // Аллергология и иммунология. — 2005. — Т.6, №2. — С.278.
12. Чумаков В.А., Михайлов Р.В., Качков И.А. и др. Иммунодефицит, ассоциированный с глиобластомой // Аллергология и иммунология. — 2005. — Т.6, №2. — С.184.
13. Ярилин А.А., Никонова М.Ф., Ярилина А.А. и др. Апоптоз, роль в патологии и значимость его оценки при клинико-иммунологическом обследовании больных // Мед. иммунология. — 2000. — Т.2, №1. — С.7–16.
14. Bodey V., Bodey B.Jr., Siegel S.E., Kaiser H.E. Immunocytochemical detection of leukocyte-associated and apoptosis-related antigen expression in childhood brain tumors // Crit. Review Oncol. Hematol. — 2001. — V.39, N1–2. — P.3–16.
15. 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. Pharmacol. — 2007. — V.7, N5. — P.282–288.
16. Choi C., Benveniste E.N. Fas ligand/Fas system in the brain: regulator of immune and apoptotic responses // Brain Res.Reviews. — 2004. — V.44, N1. — P.65–81.
17. Cohen N., Betts D.R., Tavori U. et al. Karyotypic evolution pathways in medulloblastoma/primitive neuroectodermal tumor determined with a combination of spectral karyotyping, G-banding, and fluorescence in situ hybridization // Cancer Gen. Cytogen. — 2004. — V.149, N1. — P.44–52.
18. 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.
19. 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.
20. Eberhart C.G., Kaufman W.E., Tihan T., Burger P.C. Apoptosis, neuronal maturation, and neurotrophin expression within medulloblastoma nodules // J. Neuropathol. Exp. Neurol. — 2001. — V.60, N5. — P.462–469.
21. Frank A.J., Hernan R., Hollander A. et al. The TP53-ARF tumor suppressor pathway is frequently disrupted in large/cell anaplastic medulloblastoma // Molec. Brain Res. — 2004. — V.121, N1–2. — P.137–140.
22. Giordana M.T., Duo D., Gasverde S. et al. MDM2 overexpression is associated with short survival in adults with medulloblastoma // Neurooncology. — 2002. — V.4, N2. — P.115–122.
23. Kim J.Y.H., Nelson A.L., Algon S.A. et al. Medulloblastoma tumorigenesis diverges from cerebellar granule cell differentiation in *patched* heterozygous mice // Development. Biol. — 2003. — V.263, N1. — P.50–66.
24. Pingoud-Meier C., Lang D., Janss A.J. et al. Loss of caspase-8 protein expression correlates with unfavorable survival outcome in childhood medulloblastoma // Clin. Cancer Res. — 2003. — V.9, N17. — P.6401–6409.
25. Weller M., Schuster M., Pietsch T., Schabet M. CD95 ligand-induced apoptosis of human medulloblastoma cells // Cancer Lett. — 1998. — V.128, N2. — P.121–126.
26. 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.

Дослідження процесів апоптозу у мононуклеарних лімфоцитах периферійної крові та клітинах пухлин у хворих з гліомами головного мозку

Лісяний М.І., Любич Л.Д., Главацький О.Я., Лісяний О.М.

Інститут нейрохірургії ім. акад. А.П. Ромоданова АМН України, м. Київ

Метою дослідження було вивчення процесів апоптозу у мононуклеарних лімфоцитах (МНЛ) периферійної крові (ПК) та зразках пухлин хворих з внутрішньомозковими пухлинами. У хворих з гліальними пухлинами мозку, порівняно з здоровими особами, виявлене збільшення кількості лімфоцитів у стані апоптозу. Кількість Hoechst33342+ та CD95+ клітин серед МНЛПК у хворих з гліомами зменшувалася у міру збільшення ступеня анаплазії гліоми, кількість PI+ клітин, що визначає необоротне виникнення апоптозу, збільшувалася у міру збільшення ступеня анаплазії гліоми, що може свідчити про вплив на лімфоцити різних супресорних чинників залежно від ступеня анаплазії пухлини. У гліомах IV ступеня анаплазії, порівняно з гліомами II і III ступеня анаплазії, містилася найменша кількість клітин у термінальній стадії апоптозу (PI+), найменша кількість CD95+ клітин, що несуть рецептор готовності до апоптозу, і середня кількість клітин у ранніх, оборотних стадіях апоптозу (Hoechst33342+). Кількість PI+ клітин зменшувалася у міру збільшення ступеня анаплазії гліоми. У МНЛПК у хворих з медуллобластою відзначений підвищений рівень готовності до апоптозу та ступеня оборотних і необоротних змін, що визначається молекулярно-генетичними особливостями цих пухлин.

Ключові слова: апоптоз, мононуклеарні лімфоцити периферійної крові, гліоми, медуллобластоми.

Исследование процессов апоптоза в мононуклеарных лимфоцитах периферической крови и клетках опухолей у больных с глиомами головного мозга

Лісяний Н.І., Любич Л.Д., Главацький А.Я., Лісяний А.Н.

Інститут нейрохірургії ім. акад. А.П. Ромоданова АМН України, г. Киев

Целью исследования было изучение процессов апоптоза в мононуклеарных лимфоцитах (МНЛ) периферической крови (ПК) и образцах опухолей у больных с внутримозговыми опухолями. У больных с глиальными опухолями мозга, по сравнению с здоровыми лицами, выявлено увеличение количества лимфоцитов в состоянии апоптоза. Количество Hoechst33342+ и CD95+ клеток среди МНЛПК у больных с глиомами уменьшалась по мере увеличения степени злокачественности глиомы, тогда как содержание PI+ клеток, определяющее необратимый апоптоз, увеличивалось по мере увеличения степени анаплазии глиомы, что может свидетельствовать о влиянии на лимфоциты различных супресорных агентов в зависимости от степени злокачественности опухоли. В глиомах IV степени анаплазии по сравнению с глиомами II и III степени анаплазии располагалось минимальное количество клеток в терминальной стадии апоптоза (PI+), минимальное количество CD95+ клеток, несущих рецептор готовности к апоптозу, среднее количество клеток, находящихся в ранних, обратимых стадиях апоптоза (Hoechst33342+). Количество PI+ клеток уменьшалось по мере увеличения степени злокачественности глиомы. В МНЛПК у больных с медуллобластомами отмечено повышение уровня готовности к апоптозу и степени обратимых и необратимых изменений, что определяется молекулярно-генетическими особенностями этих опухолей.

Ключевые слова: апоптоз, мононуклеарные лимфоциты периферической крови, глиомы, медуллобластомы.

The research of apoptosis in mononuclear lymphocytes of peripheral blood and tumor cells at patients with glial brain tumors

Lisany N.I., Lyubych L.D., Glavatsky A.Ya., Lisany A.N.

Institute of neurosurgery named after acad. A.P. Romodanov
of Academy of Medical Sciences of Ukraine, Kyiv

The purpose of our research was apoptosis study in mononuclear lymphocytes of peripheral blood (MNLBP) and tumor samples from patients with intracranial brain tumors. Patients with glial tumors comparing with healthy persons demonstrated increased quantity of lymphocytes in state of apoptotic. Hoechst33342+ and CD95+ cell amount in MNLBP of patients with gliomas decreased as the anaplasia degree of glioma grew, so as PI+ cell level that determine irreversible apoptosis, increased as anaplasia degree of glioma grew, that may reflect different suppressors influence on lymphocytes in dependence of the tumor anaplasia degree. In gliomas of the IV anaplasia degree comparing to gliomas of II and III anaplasia degrees, the cells quantity in terminal stage of apoptosis (PI+) was minimal, quantity of CD95+ cells, carrying receptor for apoptosis readiness was also minimal, the level of cells at early, reversible stages of apoptosis was meddle (Hoechst33342+). The PI+ cells quantity decreased as anaplasia degree of glioma grew. In MNLBP of patients with medulloblastomas the level of readiness for apoptosis, convertible and irreversible lesions increased, that was conditioned by molecular-genetic features of these tumors.

Key words: apoptosis, mononuclear lymphocytes of peripheral blood, gliomas, medulloblastomas.

Комментарий

к статье Лисяного Н.И. и соавторов «Дослідження процесів апоптозу у мононуклеарних лімфоцитах периферійної крові та клітинах пухлин у хворих з гліомами головного мозку»

Представленная работа посвящена чрезвычайно актуальному вопросу — исследованию активности апоптоза у больных с глиальными опухолями головного мозга.

Апоптоз — запрограммированная гибель клеток — является универсальным селективным методом самоуничтожения клеток в физиологических и патологических условиях и обеспечивает гомеостаз при обновлении тканей. Основное биологическое значение апоптоза заключается в регуляции количественного и качественного состава популяций клеток в организме. Благодаря апоптозу из тканей удаляются поврежденные и атипичные клетки, а также клетки, завершившие жизненный цикл. В настоящее время фундаментальная для биологии и медицины концепция апоптоза получила интенсивное развитие и отражает новые возможности в раскрытии сущности молекулярных механизмов канцерогенеза, а также лечения и контроле за динамикой течения опухолевого процесса.

Установлено, что нарушение процессов гибели клеток является важным звеном в патогенезе многих заболеваний человека, в том числе онкологических. В современной онкологии изучению процессов апоптоза уделяется исключительно большое внимание, поскольку при опухолях происходит нарушение равновесия между размножением и гибелью клеток. В настоящее время интенсивно разрабатываются различные способы индукции апоптоза в опухолях с использованием биологически активных соединений и химиопрепаратов, в том числе путем создания условий для преодоления блокирующих апоптоз влияний, что может способствовать повышению чувствительности клеток к терапевтическому воздействию, направленному на индукцию апоптоза.

Исследование апоптоза в опухолях мозга также является предметом пристального внимания, поскольку апоптоз играет важную регуляторную роль в кинетике этих опухолей.

Во вступительной части статьи приведены основные сведения о молекулярных и биохимических механизмах апоптоза и современных методах его выявления, а также обоснована актуальность изучения апоптоза при различных опухолях, включая опухоли головного мозга. По нашему мнению, необходимо было бы хотя бы коротко привести опубликованные в литературе результаты изучения апоптоза при опухолях головного мозга, в частности, глиальных, и отметить новизну предпринятых авторами исследований.

Материал работы достаточно обширный, включает исследование активности апоптоза лимфоцитов крови, полученных у 116 нейроонкологических больных, и образцов свежеевыделенных клеток из опухолей мозга различной гистоструктуры и степени анаплазии тех же больных. Для определения уровня апоптоза в лимфоцитах и клетках опухолей авторы использовали современные иммуномолекулярные методы, характеризующие разные стороны нарушения апоптоза у больных с опухолями головного мозга различной гистоструктуры и степени злокачественности: определение клеток в состоянии апоптоза с помощью красителя Hoechst, цитофлуориметрический метод с помощью пропидиума йодида (PI), выявление экспрессии антигена CD95 (FAS-рецептора).

В результате проведенных исследований получен целый ряд количественных показателей, которые тщательно проанализированы (с проведением статистической обработки) в группах: 20 больных с глиомами II степени анаплазии, 34 — III степени анаплазии, 23 — с глиобластомами (IV степень анаплазии), 39 больных с медуллобластомами.

По данным многофакторного сравнительного анализа результатов, полученных в каждой группе больных, авторам удалось выявить ряд важных закономерностей. Прежде всего, обнаружена отчетливая направленность к постепенному снижению активности апоптоза гибели как в лимфоцитах, так и в клетках опухолей по мере увеличения степени анаплазии исходных опухолей. Этот основополагающий вывод позволяет уточнить механизмы и различия степени иммуносупрессивного влияния опухоли на состояние клеточного иммунитета у нейроонкологических больных в зависимости от гистобиологических особенностей исходных опухолей. Кроме того, эти наблюдения в определенной степени раскрывают причины высокой скорости роста злокачественных глиом III–IV степени анаплазии по сравнению с более доброкачественными вариантами. Подтверждением этому является установление прямой корреляции с результатами иммуногистохимического определения индекса апоптоза в ткани глиом различной степени анаплазии, исследованных в лаборатории нейропатоморфологии Института. Аналогичная корреляция прослеживается также при сопоставлении полученных данных с уровнем пролиферативной активности в опухолях мозга одноптипной структуры по показателю экспрессии ядерного антигена Ki-67.

В отличие от этого, по данным авторов, количество PI⁺ клеток, отражающих необратимую стадию апоптоза, прогрессивно увеличивается по мере увеличения степени анаплазии глиальных опухолей. Этот феномен авторы объясняют возможными различиями воздействия на лимфоциты супрессорных факторов при наличии опухолей различной степени злокачественности.

Большой интерес представляют результаты определения активности апоптоза в медуллобластомах, свидетельствующие о повышении уровня как готовности к апоптозу клеток опухолей, так и частоты необратимых изменений, в отличие от глиом II–IV степени анаплазии. По мнению авторов, это отражает особенности молекулярно-генетических и гистобиологических характеристик этих новообразований и может быть предметом специального обсуждения.

Таким образом, представленная для публикации статья имеет несомненную научную новизну, а также теоретическую и практическую ценность. Работа основана на исследовании достаточно большого фактического материала (лимфоциты периферической крови, опухоли мозга 116 больных) и имеет весомые перспективы для дальнейшей углубленной разработки данного научного направления. Показатели активности апоптоза нейроонкологических больных в последующем могут быть использованы для проведения мониторинга эффективности антибластической терапии и оценки тяжести клинического течения опухолевого процесса в динамике наблюдения. В связи с этим рекомендовано полученные разработки внедрить в практическую работу онкологических клиник Института.

*В.М. Семенова, доктор мед. наук
зав. лабораторией культивирования тканей
Института нейрохирургии им. акад. А.П. Ромоданова АМН Украины*