



Апоптоз, или запрограммированная клеточная гибель, является универсальным физиологическим процессом, который в комплексе с клеточной дифференцировкой и пролиферацией поддерживает гомеостаз на тканевом и соматическом уровнях. Морфологически апоптоз характеризуется конденсацией хроматина, втягиванием клеточной мембраны, расширением эндоплазматического ретикулума, сморщиванием цитоплазматических гранул и самих клеток, фрагментацией ядра с образованием апоптотических телец, попадающих во внеклеточное пространство. Вслед за этим происходит достаточно быстрая элиминация апоптотической клетки или ее фрагментов фагоцитирующими клетками.

Апоптоз является процессом, контролируемым и тонко регулируемым многочисленными факторами. К их числу относятся сигнальные молекулы, запускающие апоптоз (FAS, TNF, некоторые цитокины), рецепторы этих молекул (FasR, TNFR1, TCR-CD3), внутриклеточные мессенджеры полученного сигнала (FADD, TRADD, RIP), онкосупрессоры (p53, p21, pRB), протеинкиназы, протеинтирозинкиназы, фосфатазы, сериновые протеазы (семейства ICE и Mch), стимуляторы апоптоза (Bax, Bcl-xs, Bad, Bak), ингибиторы апоптоза (Bcl-2, Bcl-xl и другие), эндонуклеазы.

Важным этапом запрограммированной гибели клеток является характерное расщепление ДНК на олигонуклеосомные фрагменты. Одним из наиболее исследованных ферментов, участвующих в межнуклеосомной фрагментации ДНК, является семейство $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -зависимых эндонуклеаз (СМЭ), изменения активности которых выявлены при различных физиологических и патологических процессах в организме, в связи с чем степень деградации ДНК до олигонуклеосомных фрагментов, осуществляемая СМЭ, считается одним из биологических маркеров интенсивности апоптоза.

В норме апоптоз наряду с участием в органогенезе, формообразовании и поддержании постоянства клеточного состава служит для удаления клеток, претерпевших неопластическую трансформацию либо имеющих генетические или иные нарушения, способные привести к развитию рака. Однако известны патологические состояния, при которых механизм запрограммированной клеточной гибели оказывается заблокированным, что приводит к бурной пролиферации раковых клеток, не сдерживаемой конкурирующим процессом апоптоза. В частности, это относится к развитию предраковых процессов и рака шейки матки, в которых, как доказано в последние годы, ведущую роль играет папилломавирусная инфекция. Выявление

наличия вируса папилломы в половых путях в последние годы стало возможным благодаря внедрению современных технологий молекулярной биологии, таких как ДНК-гибридизация, полимеразная цепная реакция (ПЦР) и др. Активно внедряется в практику высокочувствительный метод Hybrid Capture, который был разработан фирмой "Digene". Он заключается в ДНК-гибридизации в растворе с последующей сорбцией на полистероловой планшете. Благодаря таким методам практический врач получил возможность определять наличие высокоонкогенных типов вируса папилломы человека (ВПЧ) в половых путях женщины, что помогает осуществить правильную тактику лечения и наблюдения каждой конкретной пациентки с патологией шейки матки и избежать нередко ненужных травмирующих манипуляций.

Апоптоз в диагностике предраковых и раковых заболеваний шейки матки

По данным многочисленных публикаций, одним из ключевых моментов трансформации клеточного роста является взаимодействие белков высокоонкогенных типов ВПЧ (в первую очередь, Е6) с онкосупрессором р53, что приводит к ингибированию последнего. Так, L. Rapp и J. Chen наблюдали деградацию р53, наступающую в результате связывания с ним белка Е6. Полагают, что Е6 подавляет активность защитного белка р53, стимулируя его деградацию путем протеолиза, в который вовлечен ассоциированный с Е6 белок Е6АР. Любопытно, что данная функция Е6АР была характерна только для образцов цервикальной карциномы, но не для нормального эпителия.

Аналогичные данные представлены в работе M. Thomas и соавт., исследовавших особенности взаимодействия белка Е6 с молекулами-мишенями, выявляемыми в образцах цервикальной карциномы. Показано, что в отличие от многих других опухолей в клетках цервикальной карциномы экспрессируется "дикий" (без мутаций) тип р53, а инактивирующая роль белка Е6 сопоставима с мутацией р53. В то же время известно, что в клетках человека существуют молекулы, способные связываться с Е6, снижая таким образом его антиапоптотический потенциал и защищая клетки эпителия от пролиферации. Так, один из наиболее вероятных кандидатов на роль блокатора Е6 был идентифицирован D. Pim и L. Banks. Было выявлено, что белок Е6-I (ингибитор белка Е6), взаимодействуя с нативным Е6 ВПЧ 18 типа, препятствовал деградации р53, опосредованной Е6, и блокировал пролиферацию линии цервикальных раковых клеток. В то же время ингибирование белком Е6-I трансформированного клеточного роста коррелировало с его способностью индуцировать апоптоз по р53-зависимому пути.

Второй основной онкопротеин вируса папилломы человека - Е7, являющийся наряду с Е6 фактором развития цервикального рака, оказывает свой эффект посредством связывания с онкосупрессором белка ретинобластомы (Rb) и его инактивации. S. Seavey и соавт. показали, что такая специализация Е7 наблюдается при наличии Е6, инактивирующего р53. Однако в искусственно созданной клеточной системе, в которой Е6 не было, Е7 связывался с р53, стабилизируя его, что сохраняло его функцию как индуктора транскрипции и активировало продолжительное клеточное деление и утрату клетками чувствительности к индукции апоптоза ультрафиолетовым излучением. Напротив, данные M. Iglesias и соавт. о повышении продукции интерлейкина-1 нормальными цервикальными кератиноцитами при апоптозе и корреляции между уровнями экспрессии генов ИЛ-1 и Е7 ВПЧ 16-го и 18-го типов свидетельствуют о том, что белок Е7 повышает чувствительность кератиноцитов к апоптозу [18]. Похожий эффект наблюдали G. Kilic и соавт. при исследовании путей регуляции апоптоза в

культурах клеток рака цервикального канала (линия клеток С33а), мутантных по генам р53 и ретинобластомы, инфицированных и не инфицированных онкопротеинами Е6 и Е7. Было показано, что различные индукторы апоптоза (митомицин, стауроспорин, гамма-излучение) вызывают апоптоз во всех исследуемых случаях. При этом наличие в клетках С33а онкопротеина Е7 коррелирует с повышением уровня апоптоза в ответ на воздействие индукторов. Эти данные свидетельствуют о наличии независимого от р53 и ретинобластомы пути регуляции апоптоза. В пользу этого вывода высказывается также N.Prabhu и соавт., обнаружившие, что аналог р53 онкосупрессор р73-бета не подвергается деградации в культуре клеток цервикальной карциномы с высоким уровнем продукции Е6 и не утрачивает своей протективной функции в отличие от р53.

Наряду с исследованием механизмов онкогенного воздействия на клетки эпителия шейки матки белков ВПЧ активно изучается роль собственных клеточных факторов организма-хозяина, ингибирующих апоптоз, и их сложного взаимодействия с индукторами апоптоза. Понимание этих механизмов могло бы создать систему защиты эпителия шейки матки от развития злокачественной пролиферации.

Так, в экспериментах *in vitro* показано, что экспрессия протоонкогена bcl-2 может блокировать апоптоз, опосредованный р53, в образцах клеточной аденокарциномы влагалища и цервикального канала. С целью проверки этого наблюдения в системе *in situ* было проведено исследование S.Waggoner и соавт. Во всех образцах, в которых предварительно было показано наличие гена р53, иммуногистохимически был выявлен белок bcl-2, причем в 18 из 21 случая его количество варьировало от умеренного до высокого. Несмотря на присутствие дикого типа р53, только в 4 образцах была отмечена фрагментация ДНК, свидетельствующая об апоптозе. По мнению авторов, несмотря на то, что в результате повреждения ДНК при трансформации нормальных цервикальных клеток в раковые наблюдается суперэкспрессия гена р53, его онкопротективный эффект в большинстве случаев блокируется одновременной экспрессией bcl-2. Таким образом, очевидно, что при карциноме влагалища и шейки матки существует механизм, способный препятствовать развитию апоптоза без мутационных повреждений гена р53. Ранее X. Liang и соавт. показали, что ни в одной из клеточных линий цервикальной карциномы с активной экспрессией bcl-2 (в отличие от нормальных кератиноцитов) не определяется функционально активный белок р53, либо представленный мутантным типом, либо инактивированный путем связывания с белком Е6 ВПЧ. Одновременное повышение уровня экспрессии bcl-2 и снижение уровня продукции или активности р53 на фоне папилломавирусной инфекции могут служить важной предпосылкой развития предраковых процессов и рака цервикального канала. В то же время повышение экспрессии bcl-2, возможно, играет роль не во всех типах рака шейки матки. Так, в работе K. Kikawa и соавт. иммуногистохимическим методом в образцах инвазивной плоскоклеточной карциномы (ИПКК) и инвазивной эндоцервикальной карциномы (ИЭК) белок bcl-2 не был выявлен. Незначительная продукция гена Вах, являющегося индуктором апоптоза, была зарегистрирована в отдельных клинических образцах при ИПКК, в то время как во всех случаях инвазивной эндоцервикальной карциномы уровень экспрессии этого гена был высоким, часто сочетаясь с активным апоптозом. Корреляционный анализ полученных данных позволил авторам сделать вывод о том, что апоптоз развивается в раковых клетках инвазивной аденокарциномы цервикального канала в случае высокого уровня экспрессии гена Вах, что подтверждается результатами других исследователей.

Представленные результаты свидетельствуют о разнообразии путей опосредованного апоптозом блокирования пролиферации трансформированных клеток эпителия шейки матки. В то же время частота случаев цервикального рака довольно высока, и переход нормального роста клеток в неопластический и раковый нередко непредсказуем. В этой связи большое значение приобретают статистические исследования, к которым относится работа С. Isacson и соавт., посвященная оценке корреляционной зависимости между активностью пролиферативных процессов, интенсивностью апоптоза и онкогенностью ВПЧ в образцах цервикальной неоплазии. Было показано, что активность пролиферации клеток возрастает по мере повышения степени CIN; одновременно с этим увеличивается и количество клеток, подвергшихся апоптозу. Апоптотические клетки выявлялись в единичных случаях в образцах CIN I степени и отсутствовали в нормальном эпителии. Статистически значимой зависимости уровня пролиферации и апоптоза от степени онкогенности ВПЧ показано не было. О повышении апоптотического индекса по мере прогрессии CIN от низкой до высокой степени свидетельствуют также данные Y. Shoji и соавт., которые, кроме того, не выявили корреляции между уровнем апоптоза и наличием папилломавирусной инфекции. Позднее в работе K. Kikawa и соавт. была исследована зависимость между уровнем апоптоза и гистологическим типом клеток при инвазивной цервикальной карциноме. Ткани были получены от 19 пациенток с ИПКК, 9 пациенток с инвазивной эндоцервикальной карциномой (ИЭК) и 15 пациенток с миомой матки. Было показано, что в образцах нормального цервикального эпителия и ИПКК ДНК в основном не разрушается. Интенсивная специфическая деградация ДНК была выявлена только при ИЭК. Тем не менее в образцах как ИПКК, так и ИЭК уровень деградации был значительно выше, чем в нормальном цервикальном эпителии. В экспериментах *in situ* авторами было показано, что клетки, подвергшиеся апоптозу, преобладали среди неопластических клеток при ИЭК. Однако в образцах ИПКК "апоптотических" клеток не было найдено, за исключением единичных экземпляров, локализованных в центрах активной пролиферации раковых клеток. Вероятно, эти данные могут свидетельствовать о различиях в исходе того или иного клинического случая в зависимости от морфологической принадлежности опухоли и уровня апоптоза. Возможно, оценка роли этих факторов помогла бы предсказать пути прогрессии заболевания, поскольку известно, что в 60-62% случаях CIN III степени регрессирует без лечения и только не более чем в 10% случаев прогрессирует в карциному.

Использование апоптоза в терапии предраковых и раковых заболеваний шейки матки

В настоящее время практически не вызывает сомнения, что терапевтический эффект на предраковые процессы и рак шейки матки можно было бы оказать, предотвращая пролиферацию трансформированных клеток и индуцируя или активируя процесс апоптоза. В работе Y. Tsao и соавт. была оценена возможность использования в генной терапии цервикального рака белкового фактора p21, способного блокировать клеточный рост путем ингибирования циклин-зависимой киназы. В клеточные линии рака шейки матки, инфицированные и не инфицированные ВПЧ, вводили рекомбинантный аденовирус, в который была клонирована нуклеотидная последовательность кДНК p21; при этом было показано подавление клеточного роста путем программированной гибели раковых клеток, оцененной по уровню фрагментации ДНК.

В работе V. Giandomenico и соавт. была проведена оценка антипролиферативного эффекта, оказываемого на две клеточные линии плоскоклеточной цервикальной

карциномы - ME180 и SiHa тремя способами: 1) рекомбинантным интерфероном (ИФН) b; 2) ИФНb в сочетании с ретиноевой кислотой (РК); ИФНа. Результаты исследования показали, что ИФНb оказывает более выраженное воздействие на обе клеточные линии, чем ИФНа2b. При этом применение РК оказывало синергичный с обоими типами ИФН эффект при воздействии на ME180. Было показано, что антипролиферативный эффект коррелирует с индукцией апоптоза. Авторы полагают, что действие ИФН на раковые клетки опосредовано ИФН-регулирующим фактором-1 и ингибитором циклин-зависимой киназы фактором p21, которые вовлечены в подавление клеточного роста и в индукцию апоптоза.

Наряду с описанными подходами к терапии рака шейки матки и профилактики его развития на фоне CIN и других заболеваний, вызванных папилломавирусной инфекцией, с использованием p21, ИФНа, ИФНb и РК предлагаются другие методы (часто отработанные только на клеточных моделях), основанные на применении в качестве лекарственного средства препаратов, влияющих на процессы апоптоза: оксида мышьяка As₂O₃, N-(4-гидроксифенил)-ретинамида, атрактилозида, 5-фторурацила, TGF- β 1, ингибиторов циклинзависимых киназ AG 1478 и AG 555 и других факторов. При этом, несмотря на различия как природы указанных препаратов, так и механизмов их действия, все они оказывают терапевтический эффект, индуцируя апоптоз в трансформированных ВПЧ кератиноцитах, неопластических и раковых клетках.

По-видимому, уровень апоптоза, достаточный для поддержания баланса между пролиферацией и элиминацией клеток в нормальной ткани, значительно снижается при раковой трансформации, что и приводит к развитию опухоли. Очевидно, что эффективность терапевтического воздействия зависит от своевременного определения нарушений механизмов программированной клеточной гибели, которые предшествуют формированию цервикальной карциномы. Наряду с морфологическим исследованием оценить эти нарушения можно либо путем определения многочисленных регуляторных факторов апоптоза (при этом результат анализа нередко не поддается интерпретации), либо путем определения активности осуществляющих деградацию клетки эффекторных молекул, которая прямо коррелирует с интенсивностью апоптоза. К числу последних относятся эндонуклеазы, ферментативная активность которых повышается при усилении апоптоза, что приводит к межнуклеосомной деградации ДНК. Одним из наиболее информативных современных методов оценки деградации ДНК является предложенный впервые в 1992 г. Y. Gavrieli и соавт. метод TUNEL (от англ. "terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated biotin-dUTP nick-end labeling"), суть которого заключается в визуализации путем световой микроскопии специфической окраски ядер в клетках с фрагментированным хроматином.

Резюмируя представленную в настоящей публикации информацию, следует отметить, что, несмотря на сложность регуляции процессов пролиферации и гибели клеток, а также на существующую на сегодняшний день неопределенность исхода ассоциированных с ВПЧ патологических процессов в шейке матки, уже предложены надежные методы их определения и возможной терапии, основанные на оценке и индукции процесса апоптоза, разработка и использование которых в ближайшем будущем позволят значительно снизить количество неблагоприятных исходов CIN и рака шейки матки.

Литература:

1. Ярилин А.А. Апоптоз. Природа феномена и его роль в целостном организме. //

Патол.физиол.эксп. терап. 1998; 2: 38-48.

2. Wyllie A.H. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. // Nature 1980; 284: 555-6.

3. Wyllie A.H., Morris R.G., Smith A.L., Dunlop D. Chromatin cleavage in apoptosis: association with condensed chromatin morphology and dependence on macromolecular synthesis. // J Pathol 1984; 142: 67-77.

4. Khodarev N.N. and Ashwell J.D. An inducible lymphocyte nuclear Ca/Mg-dependent endonuclease associated with apoptosis.// J Immunol 1996; 156: 922-31.

5. Krueger E., Sokolova I., Kamradt M., Khodarev N.N., Vaughan A.T. Multiple forms of endonuclease activity linked with radiation induced apoptosis in C4-1 cervical carcinoma cells. // Anticancer Res 1998; 18(2A): 983-8.

6. Woo K.R., Shu W.P., Kong L., Liu B.C. Tumor necrosis factor mediates apoptosis via Ca^{++}/Mg^{++} dependent endonuclease with protein kinase C as a possible mechanism for cytokine resistance in human tenal carcinoma cells.// J Urol 1996; 155(5): 1779-83.

7. Basnak'ian A.G., Topol' L.Z., Kirsanova I.D., Votrin I.I., Kiselev F.L. Activity of topoisomerase I and endonucleases in cells transfected by a ras oncogene. // Mol.Biol.(Mosk) 1989; 23(3): 750-7.

8. Cuende E., Ales-Martinez J.E., Ding L., Gonzales-Garcia M., Martinez A.C., Nunez G. Programmed cell death by bcl-2 dependent and independent mechanisms in B lymphoma cells.// EMBO J 1993; 12: 1555-60.

9. Hale A.J., Smith C.A., Sutherland L.C., Stoneman V.E.A., Longthorne V.L., Culhane A.C., Williams G.T. Apoptosis: molecular regulation of cell death. // Eur J Biochem 1996; 236 (1): -26.

10. Pillai M.R., Halabi S., McKalip A., Jayaprakash P.G., Rajalekshmi T.N., Nair M.K., Herman B. The presence of human papillomavirus-16/-18 E6, p53, and bcl-2 protein in cervicovaginal smears from patients with invasive cervical cancer. // Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 1996; 5(5): 329-35.

11. Sheets E.E., Yeh J. The role of apoptosis in gynaecological malignancies. // Ann Med 1997; 29(2): 121-6.

12. Nair P., Nair K.M., Jayaprakash P.G., Pillai M.R. Decreased programmed cell death in the uterine cervix associated with high risk human papillomavirus infection. // Pathol Oncol Res 1999; 5(2): 95-103.

13. Rapp L., Chen J.J. The papillomavirus E6 proteins. // Biochim Biophys Acta 1998; 1378(1): 1-19.

14. Beer-Romero P., Glass S., Rolfe M. Antisense targeting of E6AP elevates p53 in HPV-infected cells but not in normal cells. // Oncogene 1997; 14(5): 595-602.

15. Thomas M., Pim D., Banks L. The role of the E6-p53 interaction in the molecular pathogenesis of HPV. // Oncogene 1999; 18(53): 7690-700.

16. Pim D., Banks L. HPV-18 E6^I protein modulates the E6-directed degradation of p53 by binding to full-length HPV-18 E6. // Oncogene 1999; 18(52): 7403-8.

17. Seavey S.E., Holubar M., Saucedo L.J., Perry M.E. The E7 oncoprotein of human papillomavirus type 16 stabilizes p53 through a mechanism independent of p19 (ARF). // J Virol 1999; 73(9): 7590-8.

18. Human papillomavirus type 16 E7 protein sensitizes cervical keratinocytes to apoptosis and release of interleukin-1alpha. / Iglesias M., Yen K., Gaiotti D., Hildesheim A., Stoler M.H., Woodworth C.D. // Oncogene 1998; 17(10): 1195-205.

19. Kilic G., Cardillo M., Ozdemirli M., Arun B. Human papillomavirus 18 oncoproteins E6 and

E7 enhance irradiation- and chemotherapeutic agent-induced apoptosis in p53 and Rb mutated cervical cancer cell lines. // *Eur J Gynaecol Oncol* 1999; 20(3): 167-71.

20. Prabhu N.S., Somasundaram K., Satyamoorthy K., Herlyn M., El-Deiry W.S. p73beta, unlike p53, suppresses growth and induces apoptosis of human papillomavirus E6-expressing cancer cells. // *Int J Oncol* 1998; 13(1): 5-9.

21. Waggoner S.E., Baunoch D.A., Anderson S.A., Leigh F., Zagaja V.G. Bcl-2 protein expression associated with resistance to apoptosis in clear cell adenocarcinomas of the vagina and cervix expressing wild-type p53. // *Ann Surg Oncol* 1998; 5(6): 544-7.

22. Liang X.H., Mungal S., Ayscue A., Meissner J.D., Wodnicki P., Hockenbery D., Lockett S., Herman B. Bcl-2 protooncogene expression in cervical carcinoma cell lines containing inactive p53. // *J Cell Biochem* 1995; 57(3): 509-21.

23. Kokawa K., Shikone T., Otani T., Nakano R. Apoptosis and the expression of Bax and bcl-2 in squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the uterine cervix. // *Cancer* 1999; 85(8): 1799-809.

24. Isacson C., Kesis T.D., Hedrick L., Cho K.R. Both cell proliferation and apoptosis increase with lesion grade in cervical neoplasia but do not correlate with human papillomavirus type. // *Cancer Res* 1996; 56(4): 669-74.

25. Shoji Y., Saegusa M., Takano Y., Ohbu M., Okayasu I. Correlation of apoptosis with tumour cell differentiation, progression, and HPV infection in cervical carcinoma. // *J Clin Pathol* 1996; 49(2): 134-8.

26. Tsao Y.P., Huang S.J., Chang J.L., Hsieh J.T., Pong R.C., Chen S.L. Adenovirus-mediated p21((WAF1/SDI1/CIP1)) gene transfer induces apoptosis of human cervical cancer cell lines. // *J Virol* 1999; 73(6): 4983-90.

27. Giandomenico V., Vaccari G., Fiorucci G., Percario Z., Vannuchi S., Matarrese P., Malorni W., Romeo G., Affabris G.R. Apoptosis and growth inhibition of squamous carcinoma cells treated with interferon-alpha, IFN-beta and retinoic acid are associated with induction of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21. // *Eur Cytokine Netw* 1998; 9(4): 619-31.

28. Zheng J., Deng Y.P., Lin C., Fu M., Xiao P.G., Wu M. Arsenic trioxide induces apoptosis of HPV16 DNA-immortalized human cervical epithelial cells and selectively inhibits viral gene expression. // *Int J Cancer* 1999; 82(2): 286-92.

29. Oridate N., Suzuki S., Higuchi M., Mitchell M.F., Hong W.K., Lotan R. Involvement of reactive oxygen species in N-(4-hydroxyphenyl)-retinamide-induced apoptosis in cervical carcinoma cells. // *J Natl Cancer Inst* 1997; 89(16): 1191-8.

30. Brown J., Higo H., McKalip A., Herman B. Human papillomavirus (HPV) 16 E6 sensitizes cells to atractyloside-induced apoptosis: role of p53, ICE-like proteases and the mitochondrial permeability transition. // *J Cell Biochem* 1997; 66(2): 245-55.

31. Ueda M., Kumagai K., Ueki K., Inoki C., Orino I., Ueki M. Growth inhibition and apoptotic cell death in uterine cervical carcinoma cells induced by 5-fluorouracil. // *Int J Cancer* 1997; 71(4): 668-74.

32. Rorke E.A., Jacobberger J.W. Transforming growth factor-beta 1 (TGF beta 1) enhances apoptosis in human papillomavirus type 16-immortalized human ectocervical epithelial cells. // *Exp Cell Res* 1995; 216(1): 65-72.

33. Ben-Bassat H., Rosenbaum-Mitrani S., Hartzstark Z., Shlomai Z., Kleinberger-Doron N., Gazit A., Plowman G., Levitzki R., Tsvieli R., Levitzki A. Inhibitors of epidermal growth factor receptor kinase and of cyclin-dependent kinase 2 activation induce growth arrest, differentiation, and apoptosis of human papilloma virus 16-immortalized human keratinocytes. // *Cancer Res*

Автор: Administrator
26.06.2008 16:32 -

1997; 57(17): 3741-50.

34. Gavrieli Y., Sherman Y., Ben-Sasson S.A. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. // J Cell Biol 1992; 119(3): 4