

А.Ю.Барышников
Ю.В.Шишкин

Иммунологические
проблемы
АПОПТОЗА



УРСС



Настоящее издание осуществлено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 98-04-62105)

Барышников Анатолий Юрьевич, Шишкин Юрий Владимирович

Иммунологические проблемы апоптоза. — М.: Эдиториал УРСС, 2002. — 320 с.

ISBN 5-8360-0328-9

Последнее десятилетие ознаменовалось бурным изучением процесса программированной клеточной смерти (апоптоза). Были открыты поверхностные клеточные рецепторы и их лиганды, опосредующие апоптоз. Наиболее изучен из них антиген CD95(Fas/APO-1) и его лиганд. Изучая CD95-опосредованный апоптоз, ученые обнаружили целостную систему передачи сигнала смерти и реализации клеточной смерти. Были открыты гены, регулирующие апоптоз: ген-супрессор *p53* и семейство протоонкогенов *Bcl-2*. Была выявлена роль нарушений регуляции апоптоза в развитии многих заболеваний человека и лабораторных животных. Особо важную роль играет апоптоз при контроле функционирования иммунной системы. Нарушение апоптоза в этой системе приводит к аутоиммунным заболеваниям и опухолевому росту. Выявлено прогностическое значение экспрессии антигена CD95(Fas/APO-1) при миело- и лимфопролиферативных заболеваниях человека и роль лекарственно-индуцированного апоптоза при терапии этих заболеваний. Всем этим проблемам посвящена настоящая монография.

Монография рассчитана на широкий круг онкологов, гематологов, врачей и биологов, интересующихся проблемами апоптоза.

Издательство «Эдиториал УРСС». 113208, г. Москва, ул. Чертановская, д. 2/11.
Лицензия ИД № 03216 от 10.11.2000 г. Гигиенический сертификат на выпуск книжной продукции № 77.ФЦ.8.953.П.270.3.99 от 30.03.99 г. Подписано к печати 25.12.2001 г. Формат 60×88/16. Тираж 1000 экз. Печ. л. 20. Зак. № 1.

Отпечатано в АООТ «Политех-4». 129110, г. Москва, ул. Б. Перенская, 46.

ISBN 5-8360-0328-9



© Эдиториал УРСС, 2002

Оглавление

Предисловие	9
Введение	11
Глава 1. CD95(Fas/APO-1)-антиген — молекула, опосредующая апоптоз	15
§ 1.1. Антиген CD95(Fas/APO-1)	15
§ 1.2. Fas-лиганд	18
§ 1.3. Экспрессия CD95(Fas/APO-1)-антигена у здоровых людей	22
§ 1.4. Индукция апоптоза моноклональными антителами .	29
§ 1.5. Регуляция CD95(Fas/APO-1)-рецептором других поверхностных клеточных молекул	34
§ 1.6. Регуляция индукции CD95(Fas/APO-1)-опосредованного апоптоза	34
§ 1.7. Время индукции апоптоза	37
Глава 2. Трансдукция сигнала апоптоза	38
Глава 3. Молекулярные механизмы регуляции апоптоза	50
§ 3.1. Белок p53 — элемент системы контроля за апоптозом	50
§ 3.2. Семейство <i>Bcl-2</i> -белков, регулирующих апоптоз . . .	51
§ 3.3. Регуляция экспрессии CD95(Fas/APO-1)-рецептора другими клеточными рецепторами	58
§ 3.4. Регуляция апоптоза цитокинами	59
Глава 4. Получение и характеристика моноклональных антител ICO-160 против CD95(Fas/APO-1)-антигена	61
§ 4.1. Получение моноклональных антител ICO-160	62

§ 4.2. Реактивность МКА ICO-160 с клетками периферической крови здоровых доноров	63
§ 4.3. Реакция моноклональных антител ICO-160 с перевиваемыми линиями клеток	69
§ 4.4. Сравнение МКА ICO-160 с МКА UB2 против CD95(Fas/APO-1)-антигена	73
4.4.1. Реактивность МКА ICO-160 и МКА UB2 с клетками перевиваемых клеточных линий . .	73
4.4.2. Реактивность МКА ICO-160 и UB2 с лимфоцитами периферической крови здоровых доноров	73
4.4.3. Реактивность МКА ICO-160 и UB2 с гранулоцитами	74
4.4.4. Реактивность МКА ICO-160 и UB2 с моноцитами	75
4.4.5. Реактивность МКА ICO-160 и UB2 с NK-клетками	75
§ 4.5. Исследование МКА ICO-160 методом двойной метки	75
4.5.1. Сравнение МКА ICO-160 с МКА IPO-4 против CD95(Fas/APO-1)-антигена	75
4.5.2. Сравнение МКА ICO-160 с МКА 7C11 против CD95(Fas/APO-1)-антигена	77
4.5.3. Сравнение МКА ICO-160 и МКА UB2 против CD95(Fas/APO-1)-антигена методом двойного окрашивания	78
§ 4.6. Исследование МКА методом конкурентной ингибиции	82
§ 4.7. Определение молекулярной массы антигена, выявляемого МКА ICO-160	89
§ 4.8. Эпитопная характеристика МКА ICO-160	89
Глава 5. Моноклональные антитела против CD95(Fas/APO-1)-антигена	102
§ 5.1. Моноклональные антитела anti-Fas	102

§ 5.2. Моноклональные антитела APO-1	105
§ 5.3. Моноклональные антитела IPO-4	108
§ 5.4. Моноклональные антитела к мышинному Fas-антигену	110
§ 5.5. Характеристика МКА, отнесенных в CD95 кластер дифференцировки, на V Международном рабочем совещании по дифференцировочным антигенам лимфоцитов человека	113
§ 5.6. Моноклональные антитела 7C11	114
§ 5.7. Моноклональные антитела против Fas/APO-1-антигена IgG1-класса	117
5.7.1. Панель моноклональных антител против Fas/APO-1-антигена M1, M2, M3, M23, M24, M31, M33, M35, M38	117
5.7.2. Панель моноклональных антител против Fas/APO-1-антигена VB3, WB3, ZB4, CBE . . .	119
§ 5.8. Моноклональные антитела против цитоплазматического домена Fas-антигена	121
5.8.1. Характеристика CD95(Fas/APO-1) МКА на VI Международном рабочем совещании по дифференцировочным антигенам лимфоцитов человека	122
Глава 6. Апоптоз в иммунной системе	126
§ 6.1. Экспрессия и функция CD95(Fas/APO-1)-антигена на иммунокомпетентных клетках	127
§ 6.2. Апоптоз, опосредованный CD3-рецептором	133
§ 6.3. Th1-CD4-положительные Т-клетки	135
§ 6.4. CD2-опосредованный апоптоз	138
Глава 7. CD95(Fas/APO-1)-опосредованный апоптоз в дифференцировке гемопоэтических клеток человека .	140
§ 7.1. Экспрессия и функция CD95(Fas/APO-1)-антигена в миелоидном ряду дифференцировки	141

7.1.1. Иммунологические маркеры полипотентной стволовой клетки	141
7.1.2. Иммунологические маркеры миелобластов	145
7.1.3. Экспрессия CD95(Fas/APO-1)-антигена на CD34+-клетках	147
7.1.4. Экспрессия CD95(Fas/APO-1)-антигена на CD33+-и CD13+-клетках	152
7.1.5. Экспрессия CD95(Fas/APO-1)-антигена на CD11b+-и CD15+-блестах	153
7.1.6. Экспрессия CD95(Fas/APO-1)-антигена на зрелых гранулоцитах	153
7.1.7. Экспрессия CD95(Fas/APO-1)-антигена на моноцитах	154
§ 7.2. Экспрессия и функция CD95(Fas/APO-1)-антигена в лимфоидном ряду дифференцировки	155
7.2.1. Этапы дифференцировки Т-лимфоцитов	155
7.2.2. Экспрессия и функция CD95(Fas/APO-1)-антигена на тимоцитах	157
7.2.3. Экспрессия и функция CD95(Fas/APO-1)-антигена на Т-лимфоцитах	163
7.2.4. Экспрессия CD95(Fas/APO-1)-антигена на этапах дифференцировки В-лимфоцитов	164
Глава 8. Экспрессия антигена CD95(Fas/APO-1) при остром лимфобластном лейкозе у детей	169
§ 8.1. Сравнение CD95-положительной и CD95-отрицательной подгрупп ОЛЛ	174
§ 8.2. Ретроспективный анализ результатов экспрессии антигена CD95(Fas/APO-1) детей с острым лимфобластным лейкозом, обследованных в 1987–1988 гг.	180
§ 8.3. Результаты анализа детей, больных острым лейкозом, обследованных в 1994–1996 гг.	184

Глава 9. Экспрессия антигена CD95(Fas/APO-1) при хроническом миелолейкозе	191
§ 9.1. Экспрессия антигена CD95(Fas/APO-1) на лимфоидных клетках периферической крови больных ХМЛ	193
§ 9.2. Экспрессия антигена CD95(Fas/APO-1) на мононуклеарах костного мозга больных ХМЛ в хронической фазе	198
§ 9.3. Связь субпопуляций лимфоидных клеток периферической крови и костного мозга	200
§ 9.4. Изучение экспрессии антигена CD95(Fas/APO-1) на бластных клетках у больных ХМЛ в стадии бластного криза	203
Глава 10. Экспрессия антигена CD95(Fas/APO-1) при миелодиспластическом синдроме	213
Глава 11. Экспрессия и функция антигена CD95(Fas/APO-1) при хроническом лимфолейкозе	226
Глава 12. Экспрессия эпитопов CD95 на лимфоидных и плазматических клетках при множественной миеломе	244
§ 12.1. Экспрессия эпитопов молекулы CD95 на лимфоидных клетках крови больных множественной миеломой	245
§ 12.2. Экспрессия эпитопов CD95 на лимфоидных клетках костного мозга больных ММ	256
§ 12.3. Экспрессия антигена CD95 на злокачественных плазматических клетках больных множественной миеломой	261
Глава 13. CD95(Fas/APO-1)-опосредованный апоптоз при соматических заболеваниях человека	263

§ 13.1. Экспрессия и функция CD95(Fas/APO-1)-опосредованного апоптоза при СПИДе	263
§ 13.2. Роль CD95(Fas/APO-1)-рецептора при аутоиммунных заболеваниях	267
§ 13.3. Экспрессия CD95(Fas/APO-1)-рецептора при инфекциях	270
§ 13.4. Экспрессия CD95(Fas/APO-1)-антигена при других заболеваниях	271
Глава 14. Экспрессия и функция антигена CD95(Fas/APO-1) в солидных опухолях	275
Заключение	285
Литература	287

Предисловие

Последнее десятилетие отмечено постоянным нарастанием интереса широких кругов исследователей к открытому около 40 лет назад явлению, названному «программированная клеточная смерть» или «апоптоз».

Поддержание гомеостаза, в том числе и клеточного, является одним из основных свойств всего живого. Оно осуществляется при уравнивании процессов клеточной пролиферации и клеточной гибели. Изучению пролиферации посвящены многие исследования, и этот процесс во многом уже, учитывая успехи цитокинетики, не является тайным. Значительно меньший интерес существовал в отношении клеточной гибели, которая воспринималась достаточно просто — как реакция на какое-либо повреждение или на старение клетки.

Широкое внедрение в биологию термина «апоптоз», а главное — связанных с ним понятий, перевернуло сложившиеся годами представления о динамическом равновесии в организме. Многие ученые ставят открытие апоптоза в один ряд с открытием клеточного цикла. Изучение апоптоза в нормальных тканях позволило накопить сведения о развитии этого явления и в дальнейшем правильно трактовать полученные данные. Вскоре стало ясно, что с позиции апоптоза можно объяснить развитие многих патологических процессов, и в первую очередь — злокачественный рост. Можно признать, что после выяснения ряда этиологических моментов в развитии рака, используя представления об апоптозе, исследователи могут объяснить многие патогенетические аспекты опухолевой трансформации.

В любой клетке организма заложена генетически обусловленная программа, позволяющая при возникновении патологической мутации включить самоликвидацию. Уже установлены многие, наиболее важные этапы развития программированной клеточной

гибели, а главное — те молекулярные механизмы, которые контролируют апоптоз.

Раньше онкологи ставили вопрос: «Почему после лечения опухолевая клетка остается жить?» Теперь же, после открытия апоптоза, акцент смещен в противоположную сторону: «Почему данная опухолевая клетка ответила гибелью на наше лечение, и что лежит в основе механизма ее гибели?» Большинство исследователей в области онкологии верят, что понимание молекулярного, биохимического и иммунологического аспектов контроля над апоптозом является центральной проблемой возникновения и контроля над опухолевым ростом.

Проблема апоптоза многогранна, и авторы решили осветить лишь иммунологические аспекты этого явления. Доказано, что экспрессия на клеточной поверхности антигена CD95(Fas/APO-1), протеина по своей структуре, характеризует способность клетки вступать в апоптоз. Пусковым моментом в этом процессе могут являться активированные лимфоциты, несущие функцию иммунного надзора, или специфические к этому антигену моноклональные антитела (МКА). Один из авторов является пионером в создании отечественных МКА, применяемых для диагностики как гемобластозов, так и солидных опухолей. В этой работе он представляет новые МКА ІКО-160, примененные для изучения апоптоза у онкологических больных.

Представляемая монография является определенным этапом исследований по изучению апоптоза в Российском онкологическом научном центре им. Н. Н. Блохина РАМН. На основании анализа большого количества литературы и собственных данных авторы предлагают ознакомиться с их взглядами на роль программированной клеточной смерти в онкологической патологии, преимущественно — гемобластозов.

Настоящая книга предназначена для онкологов, гематологов, иммунологов, биологов.

Директор РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН
академик Н. Н. Трапезников

Введение

Основной закон нашей Вселенной — все рождается, живет и умирает. Биологическая жизнь всегда сопровождается и заканчивается смертью. Гомеостаз у млекопитающих контролируется не только клеточной пролиферацией и дифференцировкой, но также с помощью клеточной смерти. Клеточная смерть является важным компонентом в биологическом процессе. Наиболее часто встречающейся формой клеточной смерти является некроз, который вызывается повреждением клетки прямой травмой, токсическими агентами, такими как активные мембранные вещества и токсины, гипоксией, ишемией и т. д. Однако около тридцати лет назад была описана другая форма клеточной смерти, названная программированной клеточной смертью, или апоптозом, которая отличается от некроза как по биохимическим, так и по морфологическим признакам [Kerr Y. et. al., 1972]. В переводе с греческого апоптоз означает опадание листьев, т. е. листопад. Апоптоз, в сущности, представляет собой самоубийство клетки, поскольку он осуществляется вследствие срабатывания собственных внутренних механизмов клеток.

Морфологически апоптоз характеризуется последовательными изменениями в ядре клетки, связанными с перевариванием хроматина и приводящими к фрагментации ДНК на части по 180 пар оснований [Arends M. Y. et. al., 1990]. Морфологическими проявлениями апоптоза являются сморщивание клетки и уменьшение ее размера, конденсация хроматина по периферии ядерной мембраны, распад ядра на несколько ядрышек. Эти ядрышки покрываются цитоплазматической мембраной, и клетка распадается на несколько апоптотических телец. Эти тельца затем фагоцитируются макрофагами. В цитоплазме происходят конденсация и сморщивание гранул, расширение эндоплазматического ретикулума. Мембрана теряет микроворсинки и нормальную складчатость, образует пузырьвидные вздутия. Целостность мембраны нарушается позже.

В отличие от некроза, апоптоз проявляется в разбросанных отдельных клетках асинхронно и не ассоциирован с воспалением. Апоптотические тельца фагоцитируются очень быстро, так как на их поверхности экспрессируются молекулы, распознаваемые фагоцитирующими клетками: тромбоспондин, фосфолипиды, содержащие фосфосерин, гликоконъюгаты, содержащие концевой β -D-N-ацетилглюкозамин.

Некроз характеризуется увеличением объема клетки, нарушением целостности мембраны, лизисом гранул и выходом содержимого клетки в межклеточное пространство с повреждением соседних клеток. Некроз всегда сопровождается воспалительной реакцией.

Проявлением апоптоза на молекулярном уровне служит фрагментация ДНК. Сначала образуются крупные фрагменты ДНК по 30 000–700 000 пар оснований. Затем происходит межнуклеосомная деградация ДНК, т. е. ее расщепление в результате формирования разрывов между нуклеосомами с формированием фрагментов, содержащих 180–190 пар оснований или кратных этим величинам. Эти фрагменты выявляются при горизонтальном электрофорезе в агарозном геле в виде «ДНК-овой лестницы» — отдельных полос, соответствующих дискретности по молекулярной массе образующихся фрагментов ДНК.

Деградация хроматина является активным процессом и зависит от температуры, блокируется азидом натрия, требует синтеза РНК и белка *de novo*, ингибируется при связывании ионов Ca^{2+} и действии ионов Zn^{2+} .

Апоптоз является фундаментальным биологическим процессом, необходимым для удаления поврежденных, старых и инфицированных клеток. Он играет важную роль в цикле развития различных организмов, включая гельминтов, насекомых, амфибий, птиц, рыб и млекопитающих. Апоптоз занимает ведущее место в эмбриогенезе и инволюции тканей, в поддержании гомеостаза, в сохранении клеточного баланса в физиологических условиях, при удалении клеток с генетическими повреждениями, при лучевых поражениях, росте и терминальной дифференцировке. Он играет роль удаления избытка клеток, особенно в нервной и иммунной

системе. В настоящее время стало ясно, что программированная клеточная смерть является важным механизмом поддержания корректного числа клеток в многоклеточном организме [Simon H.-U., 1996].

Апоптоз вовлечен в механизм развития большого количества заболеваний у человека. Предполагается, что развитие лейкоза и опухолевый рост являются результатом дисбаланса между пролиферацией клеток и программированной клеточной смертью [Sagar C. et. al., 1986].

Апоптоз является одним из основных механизмов регулирования иммунной системы. В наиболее массовой форме апоптоз в лимфоцитах происходит в процессе их развития. При дифференцировке Т-клеток апоптоз происходит в кортикальных тимоцитах. При дифференцировке В-клеток наибольший апоптоз происходит в костном мозге. В иммунной системе реализуются три формы апоптоза: гибель клеток вследствие дефицита факторов роста; апоптоз, вызванный глюкокортикоидами и другими агентами со сходным действием; активационный апоптоз. Активационный апоптоз происходит в зрелых активированных лимфоцитах и развивается в результате дисбаланса активационных сигналов или вследствие связывания различных рецепторов для индукторов апоптоза.

Процесс апоптоза может быть структурно разделен на три независимые фазы: инициация, эффекторная фаза и деградация [Kroemer G. et. al., 1995; Marchetti P. et. al., 1996]. Фаза инициации может быть достигнута различными путями: удалением факторов роста и метаболизма, гипоксией, гипероксией, субнекротическим поражением химическими реагентами, физическими агентами, перекрестным связыванием соответствующих рецепторов, нарушением сигналов клеточного цикла и т. д. В течение эффекторной фазы различные иницирующие пути конвертируются в один (или несколько) общий путь апоптоза. Фаза деградации — также общая для всех иницирующих путей.

Около десяти лет назад был открыт на цитоплазматической мембране клеток первый специализированный рецептор для индукции апоптоза — CD95(Fas/APO-1). Связывание с рецептором моноклональных антител (МКА) или специфического лиганда

CD95L/FasL индуцирует в чувствительных клетках апоптоз. Молекулярная масса этого рецептора — 48 кДа (килодальтон). CD95-рецептор принадлежит к суперсемейству фактора некроза опухолей/фактора роста нервов. С CD95(Fas/APO-1)-рецептором связано большое количество исследований, сделано множество принципиальных открытий и ему, в основном, будет посвящена настоящая монография.

CD95(Fas/APO-1)-антиген — молекула, опосредующая апоптоз

§ 1.1. Антиген CD95(Fas/APO-1)

Природа апоптотического сигнала активно изучается в различных лабораториях мира. Оказалось, что в основе апоптоза нормальных и злокачественных клеток лежит CD95(Fas/APO-1)/FasL-рецепторно/лигандная система [Trauth B. C. et. al., 1989; Debatin K. M. et. al., 1989; 1993; Krammer P. H. et. al., 1994].

В 1989 г. две исследовательские группы независимо друг от друга сообщили о моноклональных антителах (МКА) anti-Fas и anti-APO-1, которые после связывания с поверхностным клеточным рецептором индуцировали в клетках программированную клеточную смерть [Yonehira S. et. al., 1989; Trauth B. C. et. al., 1989]. МКА anti-APO-1 были получены против В-клеток, трансформированных вирусом Эпштейна–Барр. Нанogramмовые количества этих антител индуцировали программированную клеточную смерть в различных типах клеток. МКА anti-Fas, обладающие аналогичным свойством, были получены против фибробластов линии FS-7. МКА anti-Fas распознают поверхностные белки с молекулярной массой 200 кДа, а МКА anti-APO-1 — с молекулярной массой 48 кДа. Однако выделение комплементарной ДНК, кодирующей эти два белка, показало их идентичность, несмотря на различия в молекулярной массе [Oehm A. et. al., 1993; Iton N. et. al., 1991]. Полагают, что МКА anti-Fas преимущественно распознает мультимерный комплекс Fas/APO-1 протеина. Более того, было показано, что единственная инъекция МКА anti-APO-1 вызывала регрессию человеческой В-клеточной лимфомы, растущей у голых мышей [Krammer P. et. al., 1991]. Противоопухолевая

активность МКА anti-APO-1 не требовала комплемента и не была антителозависимой опосредованной клетками цитотоксичностью, что позволяло их считать перспективными для противораковой терапии.

На V Международном рабочем совещании по дифференцировочным антигенам лимфоцитов человека МКА против антигена Fas/APO-1 были отнесены в кластер CD95. Там же было показано, что МКА IPO-4, полученные киевскими учеными, также распознают этот антиген [Сидоренко С. П. и др., 1990].

Ген, кодирующий CD95(Fas/APO-1)-антиген, локализован в 10 хромосоме у человека [Behrmann I. et. al., 1994]. Из библиотеки кДНК Т-клеточной лимфомы были изолированы кДНК, кодирующие Fas-антиген [Iton N. et. al., 1991]. COS-клетки, трансфекцированные Fas кДНК, подвергались апоптозу после обработки их МКА. Для APO-1 кДНК были клонированы путем гибридизации олигонуклеотидов, полученных из пептидных последовательностей очищенного антигена, и были идентичны с Fas кДНК [Oehm A. et. al., 1993]. Fas/APO-1 кДНК кодирует гликозилированный трансмембранный протеин с молекулярной массой 45 кДа с тремя характерными обогащенными цистеином внеклеточными доменами. Эта структурная организация делает Fas/APO-1 членом суперсемейства рецепторных молекул, включающих два типа рецепторов опухоленекротического фактора (TNF-RI и TNF-RII), низкоаффинный фактор роста нервов (NGF), Т-клеточный активационный антиген CD27, антиген CD30, ассоциированный с лимфогранулематозом, В-клеточный антиген CD40 и некоторые иные гомологи молекул млекопитающих и вирусов [Trauth B. C. et. al., 1989; Yonehara S. et. al., 1989; Itoh N. et. al., 1991; Oehm A. et. al., 1992; Dhein J. et. al., 1995].

Антиген CD95(Fas/APO-1) состоит из 3 экстрацеллюлярных обогащенных цистеином доменов (157 аминокислот), 17 трансмембранных аминокислот и одного цитоплазматического домена (145 аминокислот) [Itoh N. et. al., 1991; Oehm A. et. al., 1993]. Гомология между членами суперсемейства рецепторов TNF/NGF обычно ограничена внеклеточным доменом. CD95(Fas/APO-1) дополнительно имеет значительную гомологию с TNF-рецептором

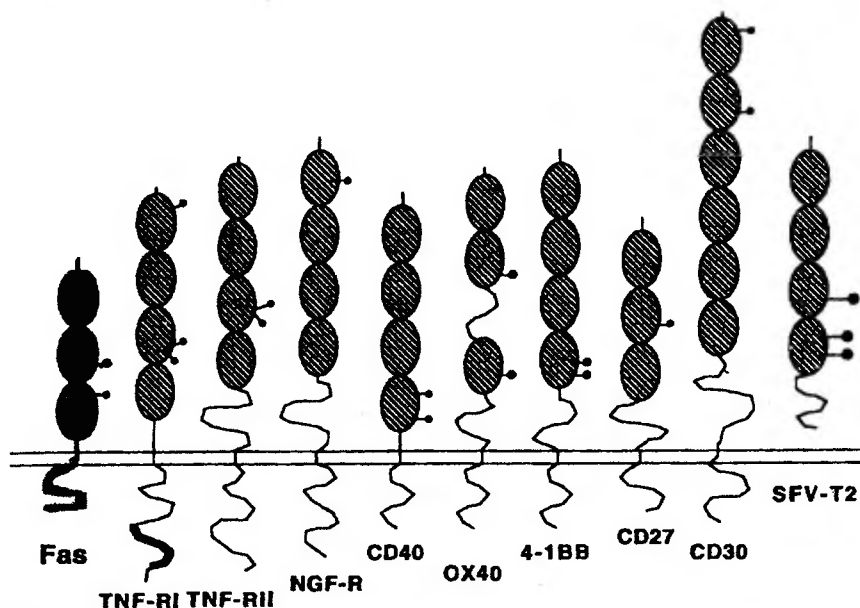


Рис. 1.1. Суперсемейство рецепторов опухоли-некротического фактора и факторов роста нервов

I типа в интрацеллюлярной части (около 80 аминокислот). 70 аминокислот в интрацеллюлярной области необходимы и достаточны для передачи сигнала смерти. Мутационный анализ подтвердил, что эта консервативная область является существенной для CD95(Fas/APO-1) и TNF при передаче сигнала смерти. Этот домен называют «домен смерти», так как в обеих молекулах он передает сигнал смерти [Itoh N. et al., 1991; Tartaglia L. A. et al., 1993]. Удаление 15 С-терминальных аминокислот в цитоплазматической части CD95(Fas/APO-1)-молекулы приводит к усилению цитотоксической активности. Возможно, эта область молекулы действует как ингибиторный домен [Itoh N. et al., 1991].

Существует растворимая форма CD95(Fas/APO-1)-антигена [Kobayashi S., Koike T., 1996]. Описано три функциональные растворимые формы CD95(Fas/APO-1)-рецептора, которые продуцируются при альтернативном сплайсинге [Cascino I. et al., 1995].

Растворимый CD95(Fas/APO-1)-рецептор утрачивает интрацеллюлярные и трансмембранные области [Cheng J. et. al., 1994]. Этот растворимый белок конкурирует с мембранно-локализованным рецептором CD95(Fas/APO-1) в связывании лиганда и может ингибировать CD95(Fas/APO-1)-опосредованный апоптоз *in vitro* [Cheng J. et. al., 1994]. Подъем уровня растворимого CD95(Fas/APO-1) может поэтому играть роль в патогенезе системной красной волчанки и других аутоиммунных заболеваний. Повышение сывороточного уровня растворимого CD95(Fas/APO-1)-рецептора обнаружено также при определенных В- и Т-клеточных лейкозах [Knipping E. et. al., 1995].

Растворимая форма CD95(Fas/APO-1)-антигена обнаружена в супернатантах В- и Т-клеточных линий [Knipping E. et. al., 1995].

Эти и другие находки указывают на то, что растворимый CD95 (Fas/APO-1)-белок ответственен за патогенез аутоиммунных нарушений, а также за ускользание от иммунологического надзора и развитие опухолей [Schulze-Osthoff K., 1994].

§ 1.2. Fas-лиганд

Природа CD95(Fas/APO-1)-апоптотического сигнала активно изучается в различных лабораториях. Было сделано предположение о существовании природного лиганда CD95(Fas/APO-1)-рецептора, вероятно, мимикрируемого связывающимися МКА против CD95(Fas/APO-1)-антигена [Suda T. et. al., 1993]. Такой лиганд мог быть или растворимым, или ассоциированным с клеточной поверхностью. Действительно, E. Rouvieu и соавт. (1993) показали, что цитотоксическая гибридная Т-клеточная линия РС60 может лизировать клетки-мишени, несущие Fas/APO-1-рецептор, но не клетки, утратившие его. Для выделения субпопуляции клеток, продуцирующих Fas/APO-1-лиганд, использовали химерный белок, состоящий из мышинового Fas/APO-1 и Fc-фрагмента иммуноглобулина, с помощью которого клонировали ген, кодирующий Fas/APO-1-лиганд. Ген кодирует трансмембранный белок II типа с молекулярной массой 40 кДа [Suda T. et. al., 1993; Suda T., Nagata S., 1994; Tamaka M. et. al., 1995; Vignaux F. E. et. al., 1995].

Fas-лиганд является членом суперсемейства лигандов TNF, которые относятся к цитокинам [Cosman D., 1994; Squier M. K., Cohen J. J., 1994; Dhei J. et. al., 1995; Brunner T. et. al., 1995; Ju S. T. et. al., 1995; Anderson M. R. et. al., 1995; Suda T. et. al., 1993; Lynch D. H. et. al., 1995; Peitsch M. C. et. al., 1995; Gruss H. J. et. al., 1996].

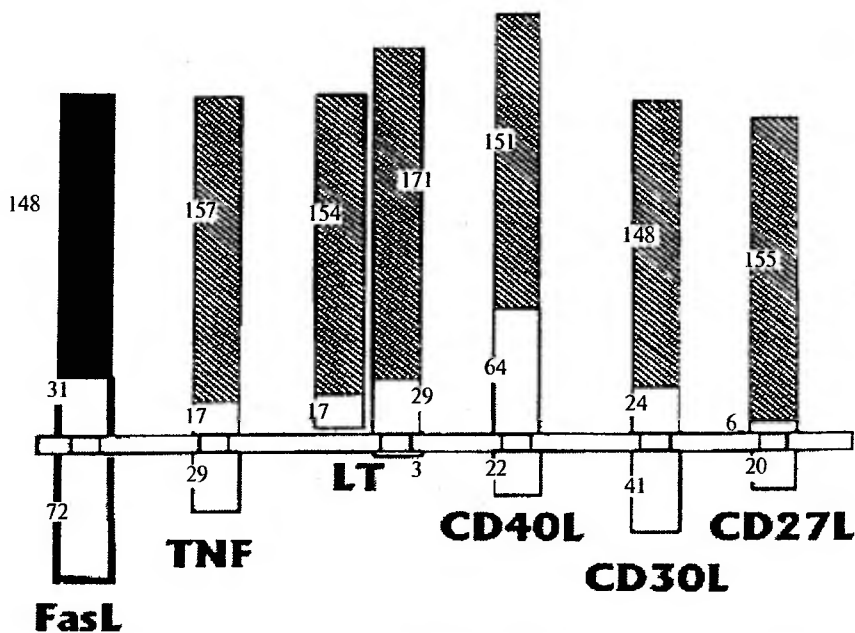


Рис. 1.2. Строение семейства лигандов опухоли-некротического фактора

Члены суперсемейства TNF-рецептора являются мембранными гликопротеидами I типа с ограниченной гомологией (общая гомология 25–30 %) в экстрацеллюлярном домене, содержащем варибельное количество обогащенных цистеином последовательностей. В противоположность этому, члены суперсемейства TNF-лиганда (за исключением LT-α) являются мембранными гликопротеидами II типа с ограниченной гомологией к TNF (общая гомология 20 %) во внеклеточной области. TNF и LT-α являются тримерными белками и образуют антипараллельный

β -складчатый сандвич. Гомология областей β -нитей членов суперсемейства TNF-лигандов подтверждает схожесть тримерных и мультимерных комплексов для других членов суперсемейства. Была выявлена генетическая связь этих молекул. Хромосомным кластером для CD30, CD120b, 4-1BB и OX40 является 1p36; для CD27, CD120a и TNFR-RP — 12p13; для TNF, LT- α и LT- β — 6p21; для CD27L и 4-1BBL — 19q13; для CD95L и OX40L — 1q25. Одни члены суперсемейства, такие, как TNF, LT- α , LT- β , CD120a, CD120b, TNFR-RP, взаимодействуют как комплексы, другие — по принципу связи один лиганд/один рецептор. Сигналы могут передаваться через один лиганд. Суперсемейство TNF-лигандов вовлечено в индукцию секреции цитокинов, регуляцию повышения экспрессии молекул адгезии, активационных антигенов и костимулирующих белков, а также всех известных усиливающих и регулирующих сигналов, которые появляются во время иммунного ответа. Различия в распределении, кинетике индукции и требованиях для индукции подтверждают необходимость всех этих лигандов в иммунном ответе.

Fas-лиганд опосредует гибель клеток путем перекрестного связывания с CD95(Fas/APO-1)-рецептором в апоптоз-чувствительных Fas-положительных клетках [Lynch D. H. et al., 1995; Dhein J. H. et al., 1995; Brunner T. R. et al., 1995]. Чувствительность клеток к апоптозу контролируется семейством гомологов *Bcl-2*. Повышенная экспрессия *Bcl-2* и его гомолога *Bcl-xL*, получающегося альтернативным сплайсингом, повышает выживаемость клеток, индуцированных к апоптозу [Boise L. H. et al., 1993; Nanez G. R. et al., 1994]. В противоположность, протоонкоген *Bax*, гомодимерный или гетеродимерный с *Bcl-2* или *Bcl-xL*, отменяет анти-апоптотическое действие и усиливает апоптоз [Oltvai Z. N. et al., 1993; Hunter J. J., Parlow T. G., 1996].

Покоящиеся Т-лимфоциты не экспрессируют Fas-лиганд. Он в изобилии экспрессирован на активированных Т- и В-лимфоцитах [Hahne M. et al., 1996; Tanaka M. T. et al., 1995; Suda T. et al., 1995; Vignaux F. E. et al., 1995; Aggwal S., Gupta S., 1998]. Есть сведения об экспрессии Fas L на NK-клетках и нейтрофилах. Другие гемопоэтические клетки не имеют Fas-лиганда [Tanaka M. et al.,

1995; Suda T. et. al., 1995]. Fas-лиганд также обнаружен в клетках яичек, тонкого кишечника, почек и легких [Suda T. et. al., 1993].

Подобно TNF-лиганду, Fas/APO-1-лиганд может освобождаться с клеточной поверхности и быть физиологически активным в растворенной форме. Растворимая форма Fas-лиганда может быть результатом секреции (подобно альфа-лимфотоксину), или протеолиза (подобно опухоли-некротическому фактору-альфа), или может действовать аутокринным или паракринным образом [Dhen J. et. al., 1995]. Имеются убедительные данные о том, что растворенная форма Fas-лиганда является результатом протеолитического расщепления металлопротеазами [Mariani S. M. et. al., 1995; Kayagaki A. et. al., 1995]. Человеческий CD95(Fas/APO-1)-рецептор связывает мышинный Fas-лиганд [Suda T. et. al., 1993].

Для Fas/APO-1-лиганда мРНК обнаружили на высоком уровне в яичках крысы, тогда как в почках, тонком кишечнике и легких был умеренный уровень [Suda T. et. al., 1993]. Лиганд присутствует в селезенке и на низком уровне — в тимусе. Его экспрессия повышается после обработки клеток конканавалином А, форболовым эфиром совместно с Ca^{2+} -ионофорами [Wu M. X. et. al., 1996].

Fas-лиганд определяют с помощью антисывороток в реакции поверхностной иммунофлуоресценции. В связи с тем, что он постоянно sluшивается с клеточной поверхности, его невозможно определить на лимфоцитах периферической крови. Для его тестирования лимфоциты периферической крови активируют фитогемагглютинином (5 мкг/мл) и интерлейкином-2 (10 нг/мл) в течение 2 дней, а затем клетки стимулируются РМА (10 нг/мл) и иономицином (500 нг/мл) в течение 16 ч в присутствии ингибиторов металлопротеаз, которые блокируют освобождение лиганда с клеточной поверхности. После такой активации Fas-лиганд определяется на 10–30 % CD4- и CD8-положительных клеток периферической крови здоровых доноров [Aggarwal S., Gupta S., 1998].

Таким образом, индивидуальные активированные Т-клетки экспрессируют на своей поверхности все элементы, требуемые для самоуничтожения: CD95(Fas/APO-1)-рецептор и Fas-лиганд. Почему же все CD95(Fas/APO-1)-положительные клетки не погибают? Предполагают, что Fas-лиганд имеет короткую полу-жизнь

или может действовать на очень короткой дистанции при достаточно высокой концентрации [Dhen J. et. al., 1995]. Более того, растворимый Fas-лиганд может преимущественно индуцировать апоптоз в активированных Т-клетках, которые имеют чувствительный к апоптозу фенотип [Klass C. et. al., 1993].

§ 1.3. Экспрессия CD95(Fas/APO-1)-антигена у здоровых людей

Антиген Fas/APO-1 экспрессирован у человека на кортикальных тимоцитах, активированных Т- и В-клетках, моноцитах [Debatin K.-M. et. al., 1990; Miyawaki T. et. al., 1992]. Предполагают, что молекула Fas/APO-1 участвует в регуляции дифференцировки кортикальных тимоцитов в медуллярные тимоциты. В присутствии избытка антигена Fas/APO-1-положительные тимоциты погибают вследствие апоптоза [Kishi S. et. al., 1993]. CD95(Fas/APO-1)-рецептор играет важную роль в сохранении периферической толерантности [Dhein J. et. al., 1995; Brunner T. et. al., 1995; Ju S.-T. et. al., 1995].

Сведения об экспрессии CD95(Fas/APO-1)-антигена на лимфоцитах периферической крови весьма противоречивы. Одни исследователи не обнаруживают антиген на покоемщихся лимфоцитах, другие его выявляют. Так, H. Lecher и соавт. (1996) сообщили о том, что покоемщиеся Т-клетки не экспрессируют CD95(Fas/APO-1)-антиген [Lecher H. et. al., 1996]. Однако большинство исследователей выявляют антиген на покоемщихся Т-клетках. По данным M. Massaia и соавт. (1995), у здоровых взрослых людей Fas-антиген экспрессирован на $23,8 \pm 16$ % Т-клеток периферической крови [Massaia M. et. al., 1995]. По сведениям А. Ю. Барышникова и соавт. (1996) антиген присутствует на $25,1 \pm 1,4$ % лимфоцитов периферической крови здоровых людей.

Антиген CD95(Fas/APO-1) экспрессирован на CD4+- и CD8+-субпопуляциях лимфоцитов человека. S. Aggarwai и S. Gupta (1997), используя МКА UB2, обнаружили CD95(Fas/APO-1)-антиген на 29 ± 5 % CD4-положительных лимфоцитах и на 35 ± 5 %

CD8-положительных лимфоцитах периферической крови. Е. Р. Полосукина и соавт. (1996), используя МКА ICO-160, IPO-4 и UB2, выявили экспрессию антигена на 30% CD4+- и на 43% CD8+- клетках периферической крови.

На нормальных лимфоцитах взрослых людей экспрессия Fas/APO-1-антигена регулируется интерлейкином-2, гамма-интерфероном или *S. aureus* штамма Cowan I [Owen-Schaub L. B. et. al., 1992; Moller P. et. al., 1993]. Экспрессия антигена повышается при активации Т-клеток МКА против CD3-антигена [Lecher H. et. al. 1996].

Антиген CD95(Fas/APO-1) экспрессирован на CD45RO+- клетках памяти как у здоровых людей, так и больных инфекционным мононуклеозом [Iwai K. et. al., 1994; Miyawaki T. et. al., 1992].

CD95(Fas/APO-1)-рецептор также экспрессирован на клетках лимфатических узлов. Клетки зародышевых центров лимфатических узлов сильно экспрессируют CD95(Fas/APO-1)-антиген и не имеют *Bcl-2*-белка. Эти клетки высоко чувствительны к Fas-опосредованному апоптозу. В-клетки мантийной зоны, напротив, слабо экспрессируют CD95(Fas/APO-1)-антиген и сильно экспрессируют белок *Bcl-2*. Эти клетки резистентны к Fas-опосредованному апоптозу [Yoshino T. et. al., 1994]. Обратная экспрессия CD95(Fas/APO-1) и *Bcl-2* была показана этими исследователями и на активированных лимфоцитах из периферической крови. Активированные лимфоциты подвергались апоптозу в присутствии МКА анти-Fas дозо-зависимым образом, однако покоящиеся лимфоциты, экспрессирующие как *Bcl-2*, так и CD95(Fas/APO-1)-антиген, не подвергались апоптозу.

CD95(Fas/APO-1)-антиген сильно экспрессирован на Т-лимфоцитах, выделенных из смывов легких здоровых людей и больных саркоидозом [Herry I. et. al., 1996]. Эти Т-клетки были более чувствительны к апоптозу, чем Т-лимфоциты периферической крови.

На эозинофилах периферической крови CD95(Fas/APO-1)-антиген экспрессирован на низком уровне [Liles W. C. et. al., 1996]. Уровень самого антигена и его мРНК повышается *in vitro* при уменьшении цитокинов [Druilhe A. et. al., 1996]. Было показано, что CD95(Fas/APO-1)-рецептор вовлечен в регуляцию апо-

птоза в эозинофилах. МКА анти-Fas вызывали время-зависимое и дозо-зависимое повышение числа клеток с морфологическими проявлениями апоптоза [Druilhe A. et al., 1996; Matsumoto K. et al., 1995], заканчивающееся фагоцитозом этих клеток макрофагами, произошедшими из моноцитов [Druilhe A. et al., 1996]. CD95(Fas/APO-1)-опосредованный апоптоз не отменялся высокими дозами интерлейкина-5 [Druilhe A. et al., 1996]. Эозинофилы высоко чувствительны к апоптозу, индуцированному МКА против CD95(Fas/APO-1)-рецептора. Возможно, это связано с отсутствием экспрессии в этих клетках продукта *Bcl-2*-гена [Oltvai Z. et al., 1993].

Нейтрофилы также экспрессируют относительно низкий уровень CD95(Fas/APO-1)-антигена по сравнению с другими клетками [Iwai K. et al., 1994; Dawson G. et al., 1996; Molica S. et al., 1996; Liles W. C. et al., 1996]. МКА против CD95(Fas/APO-1) индуцируют апоптоз в нейтрофилах [Iwai K. et al., 1994; Matsumoto K. et al., 1995].

CD95(Fas/APO-1)-антиген экспрессирован на моноцитах [Iwai K. et al., 1994; Liles W. C. et al., 1996]. Хотя экспрессия CD95-антигена обнаружена на нейтрофилах, моноцитах и эозинофилах, постоянная экспрессия Fas-лиганда ограничена только нейтрофилами. Эти три типа клеток по-разному чувствительны к апоптозу, индуцированному МКА CH-11 против CD95-антигена. Только нейтрофилы были высоко чувствительны к Fas-опосредованному апоптозу. Fas-опосредованный апоптоз нейтрофилов угнетается инкубацией с G-CSF, GM-CSF, INF- γ , TNF- α , дексаметазоном, а также ингибиторами тирозин киназы — гербимицином А и генистином [Liles W. C. et al., 1996].

Вне иммунной системы, CD95(Fas/APO-1) определен в различных типах нормальных человеческих клеток, включая диплоидные фибробласты, гепатоциты, кератиноциты, миелоидные клетки, некоторые типы эпителия, и мезенхимальные клетки. Антиген CD95(Fas/APO-1) экспрессирован в яичнике и сердце [Kondo H. et al., 1996].

CD95(Fas/APO-1)-антиген экспрессирован на 40 % тимоцитов. Экспрессия антигена повышается при культивировании клеток

в присутствии интерлейкина-1 и гамма-интерферона [Sumimoto S. et. al., 1994; Kawakami A. et. al., 1996]. Fas-антиген обнаружен в сердце у мышей [Alexander D. Z. et. al., 1996].

Антиген CD95(Fas/APO-1) также экспрессирован на клетках кожи [Oishi M. et. al., 1994; Sayama K. et. al., 1994]. Антиген обнаружен на кератиноцитах в нижнем слое эпидермиса, эпидермальных дендритических клетках, эндотелиальных клетках, фибробластах, апокринных железах, других железах, некоторых нормальных меланоцитах и инфильтрирующих лимфоцитах.

Обнаружен CD95(Fas/APO-1)-антиген на клетках эндометрия [Tobibzadeh S. et. al., 1995]. Апоптоз в человеческом эндометриальном эпителии повышается от ранней до поздней секреторно/менструальной фазы. CD95(Fas/APO-1)-антиген экспрессирован на эндометриальном эпителии на протяжении всего менструального цикла.

CD95(Fas/APO-1)-антиген экспрессирован на мышечных фибриллах II типа [Yamada H. et. al., 1995; Sahashi K. et. al., 1995].

CD95(Fas/APO-1)-антиген экспрессирован на эпителиальных клетках радужной оболочки глаза, но эти клетки не отвечают на Fas-опосредованный апоптоз [Esser P. et. al., 1995].

У мышей Fas/APO-1 мРНК была обнаружена в печени, сердце, яичниках, мышцах и тимусе, но не в мозге, костном мозге и селезенке [Trauth B. C. et. al., 1989].

В последние годы активно изучаются возрастные закономерности CD95(Fas/APO-1)-опосредованного апоптоза. Старение ассоциируется с лимфопенией и прогрессивным снижением функции Т-клеток, включая снижение ответа на митогены, растворимые антигены, ауто- и аллоантигены, продукцию интерлейкина-2, экспрессию рецептора интерлейкина-2, снижением наивных Т-клеток и повышением клеток памяти, арестом клеточного цикла и дефектами путей сигнализации [Miller K. A., 1996; Nagel J. E. et. al., 1996; Proust J. J. et. al., 1987; Philosophie B., Miller R. A., 1989; Thomas M. L., Weigle W. O., 1989; Gupta S., 1989]. Однако механизм этих нарушений не ясен. Предполагается, что в этот процесс вовлечен апоптоз, так как в лимфоцитах апоптоз играет важную роль

в поддержании Т-клеточного репертуара и удалении аутореактивных Т- и В-клеток, а также в ограничении иммунного ответа.

Уровень CD95(Fas/APO-1)-антигена на лимфоцитах периферической крови зависит от возраста людей. У новорожденных антиген экспрессирован очень слабо, у старших детей и здоровых взрослых людей продемонстрировано повышение экспрессии антигена, который затем прогрессивно повышается с возрастом [Miyawaki T. et. al., 1992; Lechner H. et. al., 1996]. Экспрессия Fas/APO-1-антигена появлялась на Fas/APO-1-негативных неонатальных Т- и В-лимфоцитах после их активации фитогемагглютинином или интерлейкином в сочетании с суперантигеном [Miyawaki T. et. al., 1992]. Экспрессия CD95(Fas/APO-1)-антигена у пожилых людей повышается как на субпопуляции CD4-положительных хелперных клеток, так и на CD8-положительных супрессорных/цитотоксических клетках. S. Aggarwal и S. Gupta (1998) показали, что молодые люди (возраст 20–29 лет) экспрессируют значительно слабее антиген CD95(Fas/APO-1) по сравнению с пожилыми (возраст 65–95) лет. У молодых людей на CD4+-клетках антиген CD95 был представлен на 29 ± 5 % клеток, а у пожилых — на 45 ± 7 %. Аналогичным образом, у пожилых людей повышается экспрессия антигена CD95 на CD8+-лимфоцитах с 35 ± 5 % до 56 ± 7 %. Следует подчеркнуть, что экспрессия антигена CD95(Fas/APO-1) на CD8-положительных клетках была выше в обеих возрастных группах по сравнению с CD4-положительными клетками. Авторы также обнаружили повышение уровня мРНК CD95(Fas/APO-1) в лимфоцитах в группе пожилых людей, определенное методом RT-PCR. Клетки памяти (CD45RO) экспрессируют больше CD95-антигена по сравнению с наивными (CD45RA)-клетками. Это касается как CD4-субпопуляции, так и CD8-субпопуляции лимфоцитов. Процент CD95+-клеток среди наивных CD4+-лимфоцитов повышается с 6 ± 2 % у молодых до 17 ± 2 % у пожилых. Процент CD95+-клеток среди CD4+-клеток памяти (CD45RO) повышается с 25 ± 3 % у молодых до 40 ± 4 % у пожилых. Процент CD95+-клеток среди CD8+-наивных клеток повышается с 7 ± 2 % у молодых до 20 ± 3 % у пожилых. Количество CD95+-клеток среди CD8+-клеток-памяти

повышается с $19 \pm 4\%$ до $35 \pm 4\%$. Экспрессия Fas-лиганда на активированных *in vitro* Т-клетках у молодых людей была 10 % как на CD4+-, так и на CD8+-клетках, а у пожилых людей на 25 % этих клеток.

Аналогичным образом с возрастом изменяется восприимчивость клеток к Fas-опосредованному апоптозу. S. Aggarwal и S. Gupta (1998) показали, что после активации *in vitro* МКА против CD3 в течение 2 дней и интерлейкином-2 в течение 6 дней у молодых людей удастся индуцировать апоптоз с помощью МКА CH11 против CD95 в CD4+-субпопуляции в $26 \pm 5\%$ клеток, а у пожилых людей — в $55 \pm 2\%$ клеток. Среди CD8+-клеток у молодых людей МКА индуцировали апоптоз в $18 \pm 4\%$ лимфоцитов, а у пожилых — в $50 \pm 3\%$. Аналогичные результаты получили при оценке апоптоза по окрашиванию пропидиум йодидом и TUNEL методом. CD4+-клетки более чувствительны к Fas-опосредованному апоптозу по сравнению с CD8+-субпопуляцией. CD4+-клоны также более чувствительны к Fas-опосредованному апоптозу по сравнению с CD8+-клонами Т-клеток [Zheng L. et. al., 1995].

Сама по себе активация Т-клеток у пожилых людей с помощью МКА против CD3-антигена также приводит к апоптозу. Однако количество апоптотирующих клеток невелико [Aggarwal S., Gupta S., 1998]. У молодых людей МКА анти-CD3 слабо индуцируют апоптоз в Т-клетках.

Повышает чувствительность лимфоцитов к Fas-опосредованному апоптозу активация клеток сверхфармакологическими концентрациями РМА и иономицина [Phelouzat M. A. et. al., 1996]. При этом апоптоз более выражен у пожилых людей по сравнению с молодыми.

Культивирование *in vitro* свежевыделенных лимфоцитов от пожилых людей приводит к повышению апоптоза в наивных CD3+CD45RO- Т-клетках [Herndon F. J. et. al., 1997].

С возрастом изменяется активность протоонкогена *Bcl-2*, блокирующего апоптоз. *Bcl-2* является связанным с мембраной митохондрий белком, экспрессированным почти на всех CD4+- и CD8+-клетках [Aggarwai S., Gupta S., 1998; Hochkenberg D. G. et. al., 1990]. Определяют изменения уровня экспрессии этого белка

по изменению среднего канала интенсивности иммунофлуоресценции методом проточной цитофлуорометрии и Вестерн блоттингом. S. Aggarwai и S. Gupta, а также S. Shinohara и соавт. (1995) показали снижение плотности *Bcl-2* в лимфоцитах пожилых людей по сравнению с молодыми. Это касается CD4- и CD8-положительных клеток, а также наивных Т-клеток и клеток-памяти. Используя активированные митогеном Т-клетки, K. Iwai и соавт. (1994) и T. Yoshino и соавт. (1994) показали, что *Bcl-2* блокирует Fas-опосредованный апоптоз, индуцированный МКА. Напротив, другие авторы не обнаружили влияния *Bcl-2* на Fas-опосредованный апоптоз [Strasser A. et. al., 1996; Debatin K. M. et. al., 1995]. Однако убедительно показано, что активация *in vitro* Т-клеток ассоциирована с уменьшением регуляции *Bcl-2* и повышением регуляции CD95(Fas/APO-1)-рецепторно-лигандной системы [Suda T. et. al., 1995; Vignaux F. et. al., 1995; Gill B. et. al., 1994; Akbar A. et. al., 1993].

Bcl-2 и *Bcl-xL* вовлечены в пролонгацию жизни клеток, подвергаемых апоптозу вследствие различных стимулов [Boise L. N. et. al., 1993; Nuncz G. R. et. al., 1994; Oltvai Z. N. et. al., 1994], тогда как *Bax* аннулирует действие этих антиапоптотических генов [Oltvai Z. N. et. al., 1994; Hunter J. J. et. al., 1996]. Уровень экспрессии *Bax* у пожилых людей значительно выше по сравнению с молодыми.

Однако у мышей уровень экспрессии Fas-антигена с возрастом снижается [Nagata S., 1994]. Причины различий в возрастной экспрессии Fas-антигена у людей и мышей неизвестны. Противоречивы сведения и о Fas-опосредованном апоптозе в лимфоцитах у старых мышей. Так, F. Chest и соавт. (1995) продемонстрировали повышение апоптоза у находящихся в фазе G₀ Т-клеток из селезенки старых мышей линии C57BL/6 после стимуляции МКА анти-CD3. В противоположность этому, T. Zhou и соавт. (1995) показали снижение Fas-опосредованного апоптоза в Т-клетках лимфатических узлов у старых мышей линии CD1. Эти различия могут быть связаны с различиями в штаммах, источнике клеток (селезенка и лимфатический узел) или в методах стимуляции (анти-CD3 и Fas-лиганд).

§ 1.4. Индукция апоптоза моноклональными антителами

В различных типах клеток происходит спонтанный апоптоз. Особенно он выражен при кратковременном культивировании клеток периферической крови *in vitro* без добавления в культуральную среду каких-либо гуморальных факторов [Iwai K. et. al., 1994]. Лимфоциты периферической крови не подвергаются спонтанному апоптозу при культивировании в течение 24 ч. С другой стороны, все нейтрофилы входят в апоптоз, который регистрируется различными методами [Iwai K. et. al., 1994; Tamari Y. et. al., 1993]. Среди моноцитов погибает только малая часть клеток.

Способность клеток входить в апоптоз под действием МКА против CD95(Fas/APO-1) является разновидностью Fas-опосредованного апоптоза. Моноклональные антитела против CD95(Fas/APO-1)-антигена индуцируют апоптоз только в CD95+-клетках [Yonehara S. et. al., 1989; Trauth B. C. et. al., 1989; Watanabe-Fukunaga R. et. al., 1992; Cohen P. L. et. al., 1992]. Однако в разных ситуациях и на разных моделях МКА могут или индуцировать апоптоз, или стимулировать пролиферацию клеток, или не оказывать никакого влияния [Uehara T. et. al., 1993].

Покоящиеся лимфоциты периферической крови, экспрессирующие CD95(Fas/APO-1)-антиген, не отвечают на Fas-опосредованный апоптоз. В лимфоцитах периферической крови можно индуцировать апоптоз только при их активации. Культивирование лимфоцитов периферической крови в течение 3 дней с митогеном PWM приводило к активации 40–70 % лимфоцитов. МКА против Fas-антигена индуцировали апоптоз в 48 % активированных клеток по сравнению с 9 % неактивированных клеток [Yoshino T. et. al., 1994]. Активация В-клеток антителами против IgM и интерлейкином-4 или митогеном PWM в течение 3 дней также давала возможность МКА анти-Fas индуцировать апоптоз в 40 % активированных клеток [Yoshino T. et. al., 1994]. МКА против CD95(Fas/APO-1)-антигена индуцировали апоптоз в 30–40 % Т-клеток, активированных МКА против CD3 и интерлейкином-2 или сочетанием ФГА и РМА [Yoshino T. et. al., 1994]. Следует

подчеркнуть, что МКА против CD95 индуцировали апоптоз дозозависимым образом.

Моноциты периферической крови и нейтрофилы также участвуют в Fas-опосредованном апоптозе. Fas-опосредованный апоптоз в моноцитах периферической крови определяется через 24 ч морфологически, дифениламиновым методом и электрофорезом в агарозном геле [Iwai K. et. al., 1994]. При инкубации моноцитов с МКА против CD95-антигена в 10 % моноцитов регистрируется апоптоз по сравнению с 5 % спонтанного апоптоза. Более сильно индуцируется апоптоз в прикрепленных макрофагах [Richardson B. C. et. al., 1994].

В нейтрофилах, высоко чувствительных к Fas-опосредованному апоптозу, МКА против CD95-антигена индуцируют апоптоз в 58 % клеток по сравнению с 44 % при спонтанном апоптозе [Iwai K. et. al., 1994]. Fas-опосредованный апоптоз нейтрофилов угнетается инкубацией с G-CSF, GM-CSF, гамма-интерфероном, альфа-TNF, дексаметазоном, а также ингибиторами тирозин киназы — гербимицином А и генистином [Liles W. C. et. al., 1996]. Спонтанный апоптоз нейтрофилов частично угнетался гибридным белком Fas-Ig или антагонистичными МКА ZB4 IgG1-изотипа против Fas-антигена. Нейтрофилы освобождают растворимый фактор, индуцирующий апоптоз в Fas-чувствительных клетках линии Jurkat [Liles W. C. et. al., 1996]. В свежеизолированных нейтрофилах и в культуральной среде выявили Fas-лиганд. Полагают, что нейтрофилы могут служить источником растворимого Fas-лиганда [Liles W. C. et. al., 1996].

F(ab')₂ фрагменты МКА против CD95(Fas/APO-1)-рецептора не индуцируют апоптоз, так как для индукции необходимо перекрестное связывание рецептора [Dhein J. et. al., 1992; 1995]. Кроме того, на способность МКА индуцировать апоптоз влияет изотип Ig. Так, МКА IgM-изотипа, например, CH11, индуцируют апоптоз, а МКА IgG1-изотипа, например, МКА UB2, не индуцируют, так как не активируют домен смерти Fas-рецептора [Silvestris F. et. al., 1996].

МКА M3 против CD95(Fas/APO-1)-антигена блокируют Fas-опосредованный апоптоз [Montel A. H. et. al., 1995]. МКА против

CD95(Fas/APO-1)-антигена различаются по способности индуцировать апоптоз в жидкой и твердой фазах: одни МКА индуцируют апоптоз в жидкой фазе, другие — только в твердой фазе [Alderson M. R. et. al., 1994].

Клеточные линии широко используются для изучения CD95(Fas/APO-1)-опосредованного апоптоза. Наиболее популярными являются линии клеток Jurkat и HL-60. Клетки линии Jurkat произошли из клеток Т-клеточного острого лимфобластного лейкоза, а клетки линии HL-60 из гистиоцитарной лимфомы. Линия клеток Jurkat высокочувствительна к Fas-опосредованному апоптозу, а линия клеток HL-60 — резистентна. Линия клеток HL-60 служит моделью миелоидной дифференцировки, которая может быть индуцирована в этих клетках или по гранулоцитарному, или по моноцитарному пути, в зависимости от внешнего стимула. Недифференцированные клетки линии HL-60 имеют иммунологический фенотип промиелоцитарного лейкоза. Различные препараты, например, ингибитор топоизомеразы камптотецин, индуцируют в клетках апоптоз [Shellhaas J. L., Zuckerman S. H., 1995]. Другие клеточные линии также по-разному чувствительны к Fas-индуцированному апоптозу. Человеческая В-лимфобластоидная линия SKW6.4 и человеческие Т-лимфомные клеточные линии Jurkat, CEM-6, H-9 и Molt-4 чувствительны к Fas-опосредованному апоптозу, тогда как человеческая промиелоцитарная линия HL-60 — резистентна [Tatsura T. et. al., 1996]. Исследование этой особенности показало, что в чувствительных к апоптозу клетках сильно экспрессирована мРНК ICE, и ICE-подобная активность повышается в течение апоптоза. Напротив, в резистентных к апоптозу клетках линии HL-60 повышена активность интерлейкин-1 β (ИЛ-1 β)-конвертирующего фермента. Трансфекция в клетки SKW6.4 предшественника ИЛ-1 β делала эти клетки резистентными к апоптозу. Эти результаты показали, что ИЛ-1 β является эндогенным ингибитором CD95(Fas/APO-1)-опосредованного апоптоза, а чувствительность клеток к апоптозу зависит от статуса ИЛ-1 β в клетке.

Определенные Т- и В-клеточные линии в ответ на активационный сигнал, поступающий через рецептор антигена (CD3/TcR

на Т-клетках, IgM-рецептор на В-клетках), входят в апоптоз. В Т-клетках индуктором апоптоза служит экспрессия Fas-лиганда. М. Peter и соавт. (1995) исследовали возможность индукции апоптоза в ответ на активационные сигналы другими путями. Они генерировали субклоны в чувствительной к апоптозу линии клеток Jurkat. Эти субклоны (JurkatR) отличались от чувствительных к апоптозу субклонов (JurkatS) по одному признаку — они не экспрессировали CD95(Fas/APO-1)-белок. В ответ на стимуляцию МКА анти-CD3-антигена, JurkatR-клетки экспрессировали Fas-лиганд, но не вступали в апоптоз, так как не имели CD95(Fas/APO-1)-рецептора. Авторы заключили, что в клетках линии Jurkat Fas-опосредованный апоптоз является главным и единственным механизмом гибели клеток. Однако в В-клеточной линии BL-60, высокочувствительной к анти-IgM-индуцированному апоптозу, не используется CD95-рецептор-лигандная система, так как они не экспрессируют мРНК Fas-лиганда (М. Peter et. al., 1995).

ИЛ-1 β блокирует также CD95(Fas/APO-1)-опосредованный апоптоз в нормальных лимфоцитах [Moreno M. B. et. al., 1996].

Растворимые молекулы HLA I класса индуцируют апоптоз в аллореактивных цитотоксических Т-лимфоцитах [Zavazava N., Kronke M., 1996]. Растворимые молекулы антигенов гистосовместимости I класса обнаруживаются в сыворотке больных с воспалительными заболеваниями, аллотрансплантатами, аутоиммунными заболеваниями и у здоровых доноров [Борозденкова С. П. и др., 1996]. Их биологическое значение не установлено. Первичные аллореактивные CD8-положительные Т-клетки после взаимодействия с растворимыми молекулами антигенов гистосовместимости I класса подвергаются апоптозу без вторичного стимула. Изучение этого феномена показало, что растворимые молекулы индуцируют экспрессию Fas-лиганда, который и индуцирует апоптоз. МКА против Fas-лиганда блокируют индукцию апоптоза растворимыми HLA-I молекулами [Zavazara N., Kronke M., 1996]. Лигация рецептора CD28 позволяет Т-клеткам избегать апоптоза, индуцированного растворимыми молекулами.

Макрофаги, моноциты и эндотелиальные клетки экспрессируют CD95(Fas/APO-1)-антиген. При культивировании МКА против

Fas-антигена макрофаги и моноциты погибают вследствие развившегося апоптоза. В противоположность макрофагам, эндотелиальные клетки экспрессируют CD95(Fas/APO-1)-антиген и Fas-лиганд, но не отвечают на анти-Fas МКА Fas-опосредованным апоптозом [Richardson B. C. et. al., 1994]. Эти результаты говорят о различной регуляторной роли CD95(Fas/APO-1)/CD95L в ретикулоэндотелиальной системе.

B. Fadeel и соавт. (1995) картировали линейные места на молекуле CD95(Fas/APO-1), на которые воздействуют МКА, индуцирующие Fas-опосредованный апоптоз. Они сообщили, что прототипы МКА (клон СН-11) анти-человеческого Fas-антигена индуцируют апоптоз, связываясь с внеклеточным доменом белка CD95(Fas/APO-1). Синтетические пептиды, соответствующие этому эпитопу, блокируют апоптотический эффект антител в чувствительной к апоптозу линии клеток Jurkat. Основываясь на структурной схожести между белком CD95(Fas/APO-1) и недавно кристаллизированным растворимым TNF-рецептором типа I, авторы генерировали молекулярную модель белка CD95(Fas/APO-1). Их компьютерная модель показала, что МКА связываются с областью, образующей на поверхности белка CD95(Fas/APO-1) шпилькообразную петлю.

H. Kikuchi и соавт. (1995) показали, что телячья эмбриональная сыворотка содержит новый анти-апоптотический сывороточный фактор. МКА против CD95(Fas/APO-1)-антигена в присутствии телячьей эмбриональной сыворотки не индуцируют апоптоз в чувствительных к апоптозу клетках линии Jurkat. Они назвали этот фактор SAF (Serum Anti-Apoptosis Factor). Апоптотическая клеточная смерть в клетках Jurkat, индуцируемая МКА, усиливалась после удаления телячьей эмбриональной сыворотки. Апоптоз-ингибирующая активность не содержалась в сыворотке новорожденных телят или в бычьей сыворотке. Это подтверждает, что активность SAF регулируется в процессе развития организма. Авторы пытались выделить SAF-гель фильтрационной хроматографией, но без успеха. Затем они очистили фактор из телячьей эмбриональной сыворотки и получили против него кроличью антисыворотку. Эта

сыворотка ингибировала активность SAF. Эти факты необходимо учитывать при изучении Fas-опосредованного апоптоза.

§ 1.5. Регуляция CD95(Fas/APO-1)-рецептором других поверхностных клеточных молекул

Параллельно изучению индукции апоптоза посредством CD95(Fas/APO-1)-рецептора интенсивно исследуется регуляция этим рецептором других поверхностных клеточных рецепторов.

В. Kovacs и G. C. Tsokos (1995) изучали влияние перекрестного связывания CD95(Fas/APO-1)-рецептора на передачу сигнала, опосредованного CD3-рецептором, на IL-2 зависимых Т-клеточных линиях. Раннее сигнализирование определяли на старых 10-дневных Т-клеточных линиях. Обнаружили, что обработка клеток МКА против CD95-рецептора в концентрации 10 мкг/мл ингибировала опосредованный анти-CD3 МКА приток Ca^{2+} . Ингибция зависила от концентрации МКА. Перекрестное связывание CD95(Fas/APO-1)-рецептора также вызывало снижение индуцированной МКА против CD3-антигена продукции инозитол 1,4,5-трифосфата.

Перекрестное связывание МКА с CD95(Fas/APO-1)-рецептором в течение 6 ч не влияло на экспрессию на поверхности Т-клеток CD3-рецептора.

§ 1.6. Регуляция индукции CD95(Fas/APO-1)-опосредованного апоптоза

Активно изучаются факторы, усиливающие или ингибирующие CD95(Fas/APO-1)-опосредованный апоптоз [Takahashi H. et al., 1995]. Было обнаружено, что гамма-интерферон значительно усиливает экспрессию CD95(Fas/APO-1)-антигена. После обработки клеток гамма-интерфероном усиливается апоптоз, индуцируемый МКА против Fas-антигена. Апоптоз, индуцируемый гамма-интерфероном и МКА, наблюдается через 3 ч, а максимальный ответ

был отмечен через 12 ч. Процесс апоптоза значительно усиливается при обработке клеток ТРА в концентрации 10 нг/мл, хотя один ТРА не влияет ни на экспрессию Fas-антигена, ни на апоптоз [Takahashi H. et al., 1995]. Протеин киназа С также усиливает процесс апоптоза, индуцированный гамма-интерфероном и МКА анти-Fas.

Связывание антигена CD40 на поверхности В-клеток с его лигандом CD40L, экспрессированным на Т-лимфоцитах, индуцирует экспрессию CD95(Fas/APO-1)-антигена на В-клетках [Schattner E. J. et al., 1995; 1996]. Антиген CD40 предоставляет В-лимфоцитам активационный и способствующий выживанию сигнал после контакта с лигандом. МКА против антигена CD95(Fas/APO-1) индуцируют апоптоз в CD40-активированных человеческих В-лимфоцитах [Garrone P. et al., 1995]. Следует подчеркнуть, что МКА СН11 против Fas-антигена ингибируют последнюю фазу индуцированной CD40-активации. Триггер В-клеточного рецептора антигена иммобилизованными МКА против каппа или лямбда цепей не влиял на экспрессию Fas-антигена [Garrone P. et al., 1995].

Молекулы HLA II класса играют ключевую роль в презентации антигена, связь с которым индуцирует трансдукцию сигнала. Т. Yoshino и соавт. (1995) изучали влияние лигации молекул HLA II класса на CD95(Fas/APO-1)-опосредованный апоптоз. Они исследовали 15 В-клеточных линий и 3 Т-клеточные линии клеток. Все 5 незрелых В-клеточных линий были чувствительны к Fas-индуцированному апоптозу, и лигация молекул HLA II класса усиливала апоптоз. 7 В-лимфобластоидных линий, 2 линии, происшедшие из лимфомы Бёркитта, были резистентны к CD95-опосредованному апоптозу, несмотря на высокую экспрессию CD95-антигена. В 3 из 5 небёркиттовских В-лимфобластоидных линиях CD95-опосредованный апоптоз усиливался МКА против антигенов HLA II класса, тогда как две другие линии клеток, не экспрессирующие CD95, были резистентны к CD95-опосредованному апоптозу. Из трех плазмоцитомных линий клеток только в одной было получено усиление CD95-опосредованного апоптоза с помощью МКА анти-HLA II класса. С другой стороны, в Т-клеточных линиях МКА против антигенов HLA II класса не усиливали апоптоз. Лигация молекул HLA II

класса не изменяла экспрессию антигена CD95. Таким образом, это исследование показало, что лигация молекул HLA II класса усиливает CD95-опосредованный апоптоз в незрелых В-клетках и в небёркиттовских В-блестах. Это показывает важную роль молекул HLA II класса в CD95(Fas/APO-1)-опосредованном апоптозе, который может быть вовлечен в быстрый клиренс функционально неспособных клеток из иммунной системы и в негативную селекцию В-клеток.

МКА против CD3-антигена быстро усиливают экспрессию CD95 (Fas/APO-1)-антигена, которая затем, по мере затухания реакции, снижается [Lecher H. et al., 1996]. Повышение экспрессии проходит медленнее и менее сильно у пожилых людей по сравнению с молодыми. В долговременных культурах клеток, полученных из крови молодых и пожилых людей, экспрессия CD95(Fas/APO-1)-антигена не снижается, а клетки становятся чувствительными в Fas-опосредованному апоптозу. При этом культуры клеток, полученные от пожилых людей, более чувствительны к апоптозу [Lecher H. et al., 1996].

МКА против общелейкоцитарного антигена CD45, являющегося тирозин фосфатазой, также индуцируют апоптоз [Klaus S. J. et al., 1996]. Лигация CD45 индуцирует апоптоз в нормальных Т-клетках. Апоптоз заметно усиливался при перекрестном связывании с CD3-антигеном. МКА против CD45 в твердой фазе индуцировали апоптоз в нормальных В-клетках, Т- и В-клеточных линиях. Индуцированная анти-CD45 клеточная смерть блокировалась ингибиторами тирозин киназы и тирозин фосфатазы, но не ингибиторами РНК или белкового синтеза, или циклоспорином А. Морфологически CD45-индуцированная смерть напоминала смерть, индуцированную через CD95(Fas/APO-1)-рецептор: имели место конденсация ядра и осветление мембраны, но не было фрагментации ДНК в олигонуклеосомы. Колигация CD45 и CD95 или усиливала, или ингибировала CD45-опосредованный апоптоз, в зависимости от степени перекрестного связывания CD45 и CD95.

Fas-рецептор экспрессирован на большинстве тимоцитов и покоящихся периферических Т-лимфоцитах [Tucek-Szabo C. L. et al., 1996]. Однако перекрестное связывание Fas-рецептора может

индуцировать апоптоз только в 5 % этих клеток. В противоположность низкой апрегуляции CD95-рецептора *in vitro*, *in vivo* быстрая апрегуляция CD95-рецептора регистрируется после добавления МКА против CD3-антигена или суперантигена [Tucek-Szabo C. L. et. al., 1996]. Эта апрегуляция идет параллельно кинетике активационно-индуцированного апоптоза Т-клеток в лимфатических узлах.

§ 1.7. Время индукции апоптоза

Время максимальной индукции апоптоза варьирует для разных клеток и зависит, по-видимому, от их чувствительности к апоптотическому сигналу, а также от метода тестирования апоптоза. Так, например, свежeweделенные гепатоциты высокочувствительны к CD95(Fas/APO-1)-опосредованному сигналу. 95 % их погибает через 4–7,5 ч после добавления МКА против Fas-антигена [Galle P. R. et. al., 1995].

М. Weis и соавт. (1995) изучали апоптоз на модели клеток линии Jurkat, происшедшей из Т-клеточного острого лимфобластного лейкоза. Лигация CD95(Fas/APO-1)-рецептора МКА против антигена CD95 IgM-изотипа вызывала быструю индукцию апоптоза через 3 ч. Осветление цитоплазмы, конденсация хроматина, образование высокомолекулярных фрагментов ДНК были обнаружены уже через 45 мин. Затем появлялась фрагментация ДНК, регистрируемая по образованию ДНК-овой лестницы, и апоптотические тельца. В противоположность другим модельным системам, апоптоз в клетках Jurkat после связывания с МКА анти-CD95 не требовал присутствия экстрацеллюлярного Ca^{2+} или Mg^{2+} и только частично ингибировался Zn^{2+} . В дополнение, Fas-опосредованный апоптоз был эффективен в присутствии ингибиторов протеин фосфатазы, протеин киназы.

Глава 2

Трансдукция сигнала апоптоза*

В настоящее время выделяют два основных сигнальных пути апоптоза — рецептор-зависимый сигнальный путь с участием рецепторов гибели клетки (суперсемейства TNF-рецепторов) и митохондриальный путь (рис. 2.1). CD95(Fas/APO-1)-рецептор был первым среди семейства TNF-рецепторов, для которого была описана и определена роль в апоптозе. Цитоплазматический домен CD95 содержит последовательность из 80 аминокислот, названную доменом смерти, которая является общей для рецепторов смерти клетки и необходимой для трансдукции апоптотического сигнала [Iton N. et. al., 1993]. Наиболее хорошо охарактеризованы такие рецепторы смерти, как CD95(Fas/APO-1) и TNFR1 (также называемый p55 или CD120a). К дополнительным относятся CAR1, рецептор смерти 3 (DR3, также называемый Apo-3, WSL-1, TRAMP или LARD), DR4 и DR5 (также называемый Apo2, TRAIL-R2, TRICK2 или KILLER). p75-рецептор фактора роста нервов (NGF) также содержит домен смерти [Ashkenazi A. et. al., 1998].

CD95-рецептор опосредует апоптоз, когда связывается с агонистическими антителами или с лигандом, который экспрессируется на клеточных мембранах или присутствует в растворенной форме [Peter M. E. et. al., 1998]. К ключевым дистальным механизмам реализации апоптоза относят активацию семейства каспаз цистеиновых протеаз. Однако до открытия участия каспаз в CD95-рецептор-опосредованном апоптозе были описаны и другие сигнальные пути, которые активируются при связывании рецептора CD95. Одним из первых описанных путей, куда были вовлечены рецепторы CD95 и TNFR1, была активация кислой сфингомиелиназы (aSMase) и образование церамида как медиатора апоптоза.

* Авторы — Е. Р. Полосухина, А. А. Соколовская.

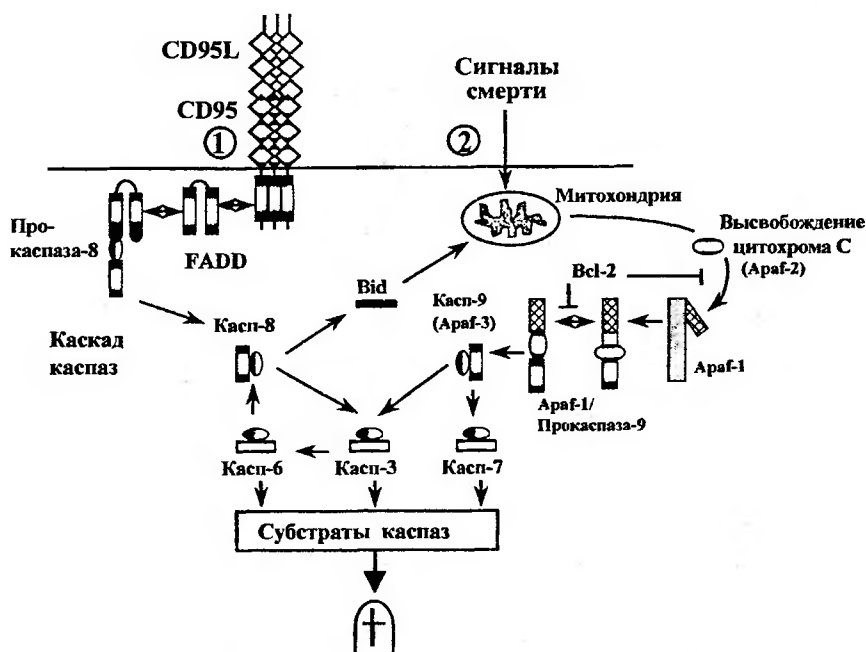


Рис. 2.1. Пути трансдукции сигнала апоптоза. Один путь (1) приводит к связыванию рецепторов гибели клетки (например, CD95) со своим лигандом, что вызывает рекрутирование адаптерных белков (например, FADD) и прокаспазы-8. Другой путь (2) приводит к высвобождению цитохрома С из митохондрий, стимулирующему образование комплекса Araf-1 с прокаспазой-9. Активированная каспаза-9 активирует эффекторные каспазы-3 или -7, которые, в свою очередь, вызывают расщепление своих субстратов

Кислая SMase проявляет свою ферментативную активность при pH-5.0, зависит от диацилглицерола и, в основном, присутствует в лизосомах [Jayadev S. et. al., 1995; Mizushima N. et. al., 1996; Lenczowski J. M. et. al., 1997]. Церамид, являясь вторичным мессенджером, стимулирует церамид-активированный белок киназы (CAP kinase) и церамид-активированный белок фосфатазы к трансдукции цитокинового сигнала через митоген-активированные белки (MAP) и активацию транскрипционного фактора NF-кappa-B (nuclear factor regulating expression of kappa light-chain immunoglob-

ulin) [Kolesnick R. et. al., 1994; Gulbins E. et. al., 1995; Watts J. D. et. al., 1999]. Исследования коллектива авторов De Maria R. с соавт. (1997, 1998) показали, что кислая SMase очень важна для образования GD3-ганглиозида — другого медиатора клеточной смерти. Однако, по мнению Peter M. E. с соавт. (1998), рассмотрение гипотезы о церамиде как ключевом медиаторе апоптоза является в настоящее время неоднозначным в связи с тем, что, во-первых, при низких его концентрациях индукция апоптоза происходит не прямо, а через гиперэкспрессию лиганда для CD95 [Herr I. et. al., 1997] и, во-вторых, несколькими группами исследователей было показано, что церамид образуется независимо от активации каспаз, которые являются необходимыми активаторами апоптоза [Tepper A. D., 1998; Watts J. D. et. al., 1997; Gamen S. et. al., 1998]. О минорной роли кислой SMase свидетельствуют также данные Boesen de Cock J. G. с соавт. (1998), которые показали, что у клеточной линии, полученной от больного синдромом Niemann-Pick с дефектом гена кислой SMase, не выявлено каких-либо отклонений в CD95-опосредованном апоптозе. Приведенные факты, вместе с данными Tepper A. D. с соавт. (1998), выявившими, что церамид образуется поздно в процессе CD95-опосредованного апоптоза, позволяют предположить, что этот путь не является определяющим для трансдукции сигнала апоптоза.

Другим путем, вовлеченным в процесс трансдукции сигнала апоптоза, является активация Jun киназ (Jun N-terminale kinase/stress-activated proteine kinase) [Liu et. al., 1996]. Эти стресс-активированные белки, подобно ультрафиолетовому облучению, могут индуцировать другие киназы и вызывать апоптоз, но сигнальные элементы, ведущие к каскаду протеаз, неизвестны [Verheij M., 1998; Natoli G. et. al., 1997; Liu Z. G. et. al., 1996; Schievela A. R. et. al., 1997; Cahill M. A. et. al., 1996; Juo P. et. al., 1997; Huang S. et. al., 1997]. С другой стороны, Jun может напрямую или косвенно индуцировать активацию транскрипционного фактора NF-каппа-B, который контролирует экспрессию антиапоптотических генов, а также может ингибировать функцию белка Bcl-2 [Hsu H. et. al., 1996; Liu X. et. al., 1996]. Данные литературы,

таким образом, подтверждают неоднозначность пути через Jun киназы в трансдукции сигнала апоптоза.

Более подробно остановимся на описании сигнала трансдукции апоптоза через каспаз-зависимый путь. Каспазы — от английского слова CASPASES (cysteine proteases which cleave proteins after an aspartic acid residue) — цистеиновые протеазы, которые расщепляют белки после остатка аспарагиновой кислоты (таблица 2.1) [Alnemri E. S. et. al., 1996]. В имени этого семейства буква «С» напоминает о цистеиновой протеазе, а «aspase» отражает способность этих ферментов расщеплять остатки аспарагиновой кислоты. Индивидуальное имя каждого члена семейства отражает порядок первой публикации. Таким образом, первый обнаруженный член семейства ICE получил название caspase-1.

Важность каспаз была продемонстрирована при изучении запрограммированной клеточной смерти у нематоды *Caenorhabditis elegans*. Генетический анализ показал, что апоптоз в процессе развития *C. elegans* контролируется набором генов, которые были названы CED (cell death-defective), и включает Ced-3, Ced-4 и Ced-5 как основные регуляторы [Ellis R. E. et. al., 1991; Hengartner M. O. et. al., 1994]. В дальнейшем было выявлено, что гены, названные Ced-3 и Ced-4, необходимы для выполнения программы апоптоза во всех соматических клетках [Ellis R. E. et. al., 1991; Nicholson D. W. et. al., 1995]. А Ced-9, так же как и гомологичный ему протоонкоген *Bcl-2*, найденный у млекопитающих, препятствуют запрограммированной клеточной гибели [Hengartner M. O. et. al., 1992]. Молекулярное клонирование гена Ced-3 показало, что он кодирует белок, который имеет гомологичность с протеазой ICE (interleukin-1 α converting enzyme) или каспазой-1 [Yuan J. et. al., 1993; Thornberry N. A. et. al., 1992]. И хотя каспаза-1 не играет очевидной роли в клеточной смерти, она стала первым идентифицированным членом большого семейства протеаз, члены которого имеют вполне определенные роли в процессах воспаления и апоптоза [Smith D. J. et. al., 1997; Thornberry N. A. et. al., 1998]. Каспазы показали сходство в аминокислотной последовательности, структуре и субстратной специфичности [Nicholson D. W. et. al., 1997]. Все они экспрессируются как проэнзимы с молекулярной массой

Таблица 2.1

Суперсемейство каспаз

Протеазы	Альтернативные имена	Субстраты
<u>Каспаза-1</u>	ICE	про-IL1 β , прокаспазы-3 и -4
Каспаза-4	ICE <i>rel</i> -II, TX, ICH-2	
Каспаза-5	ICE <i>rel</i> -III, TY, ICH-3,	
Каспаза-13	ERICE	
Каспаза-11	мышинная	
Каспаза-12	мышинная	
<u>Каспаза-3</u>	CPP32, Apopain, Yama	PARP, DNA-PK, SRE/BP, rho GDI, гелсолин, фодрин, ламин В
Каспаза-6	Mch2	ламин А
Каспаза-7	Mch3, ICE-LAP3, CMH-1	PARP, прокаспазы-6
<u>Каспаза-8</u>	FLICE, MACH, Mch5, ICE-LAP5	
<u>Каспаза-9</u>	ICE-LAP6, Mch6	PARP
Каспаза-10	MCH4, ICE-LAP4, FLICE2 ICH-1, Nedd2	
<u>Каспаза-2</u>	ICE-LAP6	PARP

от 30 до 50 кДа, которые содержат три домена (NH₂-терминальный домен, большую и малую субъединицы). Активация вызывает протеолитический процессинг между доменами, а затем ассоциацию большой и малой субъединиц с образованием активного гетеродимера [Walker N. P. C. et. al., 1994; Wilson K. P. et. al., 1994; Thornberry N. A. et. al., 1998]. Каспазы являются очень специфичными протеазами и разрезают свои белковые мишени в участке после аспарагиновой аминокислоты [Salvesen G. S. et. al., 1997]. У млекопитающих идентифицировано 13 каспаз (табл. 2.1).

На основе своей структуры и предназначения при передаче сигнала клеточной смерти, каспазы подразделяются на инициаторные и эффекторные. Эффекторные каспазы обычно содержат только маленький продомен и расщепляют разнообразные субстраты,

тогда как инициаторные каспазы содержат длинный продомен и играют роль регуляторов, активируя низлежащие эффекторные каспазы. Активация инициаторных каспаз зависит от связывания адаптерных молекул с основным белком в продоменах каспаз. Также каспазы могут быть разделены на три группы в зависимости от выполняемых функций и основываясь на их специфике. К первой относятся каспазы-1, -4 и -5; ко второй — каспазы-3, -7 и -2 и к третьей — каспазы-6, -8 и -9 [Thornberry N. A. et. al., 1997]. Каспазы могут активироваться с помощью двух механизмов. Первый заключается в раскрытии их до активированной молекулы. Этот «каспазный каскад» используется клетками для активации эффекторных каспаз, таких как каспаза-3, каспаза-6 и каспаза-7. Второй механизм связан с каспазой-8 (также называемой FLICE или MACH), иницирующей каспазой, которая действует после рецептора смерти CD95(Fas/APO-1) и играет центральную роль в CD95-индуцированном апоптозе. Она расположена ближе всех каспаз и прямо активируется гибель-индуцирующим сигнальным комплексом [Medema J. P. et. al., 1997]. После связывания с anti-CD95-антителами или лигандом, Fas-рецептор агрегируется с образованием мультимолекулярного комплекса протеинов, который получил название гибель-индуцирующего сигнального комплекса, или DISC. Этот сигнальный комплекс активирует через рецептор-связанный адаптерный протеин FADD (Fas Receptor Associated Death Domain), также называемый Mort) несколько молекул прокаспазы-8, приводящей к высокой концентрации прокаспазы-8 [Simon H.-U., 1996, Rowan S. et. al., 1997]. После выполнения этих условий низкая протеазная активность, свойственная прокаспазам, становится достаточной для активации прокаспазы-8 [Henegartner M., 1998], которая, олигомеризуясь, переходит в активную форму. Таким образом, DISC включает, во-первых, олигомеризованный, а точнее, тримеризованный CD95, во-вторых, адаптерный протеин FADD [Kischkel F. C. et. al., 1995; Boldin M. P. et. al., 1995; Chinnaiyan A. M. et. al., 1995], в-третьих, две изоформы каспазы-8 (caspase-8a/FLICE/Mach- α 1/Mch5 β) [Muzio M. et. al., 1996; Scaffidi C. et. al., 1997; Boldin M. P. et. al., 1996; Fernandes-Alnemri T. et. al., 1996] и caspase-8b/Mach- α 2 [Scaffidi C. et. al., 1997;

Boldin M. P. et. al., 1996] и, в-четвертых, САРЗ (cytotoxicity-dependent АРО-1-associated protein 3) [Muzio M. et. al., 1996] — молекулу, которая содержит amino-терминальные эффекторные домены смерти каспазы-8 и неохарактеризованный карбоксильный конец. Активная каспаза-8 активирует многие другие низлежащие каспазы, которые вызывают такие биохимические изменения, как изменение проницаемости митохондриальной мембраны, фрагментацию ДНК, расщепление ядерного белка ламина и появление фосфодиэтилсерина (PS) на внешней поверхности клеточной мембраны. Каспаза-8 активирует каспазу-3 и каспазу-7. Каспаза-3, в свою очередь, может активировать каспазу-6, которая расщепляет белок ядерного митотического аппарата (NuMA) и, таким образом, опосредует сжатие и фрагментацию ядра [Hirata H. et. al., 1998]. Таким образом, фрагментация ДНК является маркером ядерного апоптоза, запущенного по нисходящему пути от каспазы-3 [Earnshaw W. C., 1995]. Показано, что каспаза-3 действует на ДНК, расщепляя фактор фрагментации ДНК (DFF) индуцируя, тем самым, образование лестницы ДНК [Liu X. S., 1997]. Расщепление активного фрагмента РКС δ (protein kinase C δ) каспазой-3, но не каспазами -6 и -7, индуцирует апоптотические изменения ядра, включая конденсацию хроматина [Ghayur T., 1996]. Каспаза-3 играет роль и во внеклеточных событиях апоптоза. Фосфодиэтилсерин, появляясь на поверхности клеточной мембраны, узнается макрофагами и становится мишенью для поглощения апоптотических телец фагоцитами [Fadok V. A. et. al., 1992]. Исследованиями Hirata H. с соавт. (1998) показано, что каспаза-3 является медиатором образования апоптотических телец, активизируя РАК2 (p21-activated kinase) в CD95- и TNF-зависимом апоптозе. Интересен тот факт, что блокирование РАК2 предотвращает формирование апоптотических телец. Каспаза-8 может также прямо активироваться гранзимом В, высвобождающимся из цитолитических Т-лимфоцитов для запуска апоптотического каскада каспаз [Medema J. P. et. al., 1997]. Недавно было показано, что активированная каспаза-8 индуцирует также высвобождение цитохрома С через ее субстраты ВІD (*Bcl-2-interacting protein*) [Chou J. J. et. al., 1999.; Li H. et. al., 1998.; Luo X. et. al., 1998]. ВІD несет только один ВНЗ-домен, гомологичный

другим представителям семейства *Bcl-2* в его аминокислотной последовательности. После расщепления каспазой-8, COOH -концевая часть BID транслоцируется к митохондрии с последующим запуском высвобождения цитохрома C из митохондрий. Интересные данные были получены Kirsh D. G. с соавт (1999), которые на модельных клеточных системах *in vitro* показали специфическое расщепление *Bcl-2* активированной каспазой-3. Интересно, что фрагмент *Bcl-2*, расщепленный проапоптотической каспазой-3, трансфецированный в почечные клетки хомяка, локализовался в митохондрии и вызывал высвобождение цитохрома C в цитозоль. Таким образом, каспаз-3-зависимое расщепление *Bcl-2* или каспаз-8-расщепление BID, являются добавочными стимулами активации каспаз и клеточной смерти через митохондриальный путь.

Активированные сигналом апоптоза, каспазы расщепляют белки, которые были идентифицированы как субстраты каспаз [Martin S. J. et. al., 1995]. Мишенями активированных каспаз или их субстратами являются сигнальные протеины (cPLA2, cbl, Raf-1, Akt-1, D4-GDI, MEKK-1, PAK2/hPAK65, PITSLRE киназа, PKC δ , Mst1, pp125-FAK, p21-GAP и т. п.) [Kaufmann S. H., 1993; Althaus F. R. et. al., 1987; Lazebnik Y. A. et. al., 1994; Graves J. D. et. al., 1998; Lee N. et. al., 1997; Levkau B. et. al., 1998; Wen L. P. et. al., 1997]; регуляторы транскрипции или ДНК-репликации (MDM2, Rb, SREBP1/2 и т. п.) [Tan X. et. al., 1998]; протеины, которые регулируют ДНК/РНК-метаболизм (DNA-PK, hnRNP-C, PARP, DSEB/RF-C140, U1snRNP и т. п.) [Tan X. et. al., 1998; Ubeda M. et. al., 1997; Rheaume E. et. al., 1997] и другие протеины разнообразных функций (циклины A2 и другие). Протеолизу подвергаются также ядерные белки ламины, поддерживающие хромосомы в упорядоченном состоянии и необходимые для сложной архитектуры ядра. Протеолиз ламин может быть вызван, по крайней мере, двумя различными протеазами, одна из которых принадлежит к семейству каспаз, но должна быть при этом транслоцирована из цитоплазмы в ядро, другая протеаза локализована в ядре и активируется ионами Ca^{2+} [Zhivotovsky B. et. al., 1997]. Было показано, что ламин А служит мишенью для каспазы-6 [Takahashi A. et. al., 1996]. Важными субстратами каспаз являются и структурные белки, такие как Gas2,

гелсолин, β -катенин, кератин 18 и фодрин [Tan X. et. al., 1998; Widmann C. et. al., 1998; Kothakota S. et. al., 1997; Caul'n C. et. al., 1997]. Таким образом, протеазы, активированные апоптотическими сигналами, расщепляют клеточные субстраты, которые вызывают морфологические изменения клетки и деградацию хромосомной ДНК.

Какова же роль каспаз при апоптозе? Одна роль каспаз заключается в инактивации протеинов, которые защищают клетки от апоптоза. Пример — расщепление CAD/DFF45, ингибитора нуклеазы, ответственного за ДНК-фрагментацию. К негативным регуляторам апоптоза, расщепляемым каспазами, относятся также *Bcl-2* протеины. С другой стороны, каспазы участвуют в апоптозе через прямое разрушение клеточных структур, что иллюстрируется при деструкции ядерных ламин — белков, которые лежат в основе ядерных мембран и участвуют в организации хроматина. Каспазы также участвуют в реорганизации клеточных структур непрямым путем через расщепление протеинов, участвующих в регуляции цитоскелета, таких как гелсолин, FAK (focal adhesion kinase), PAK2 (p21-activated kinase-2). Другая функция каспаз — диссоциация регуляторных и эффекторных доменов (инактивация протеинов, участвующих в репарации ДНК, мРНК-сплайсинга и ДНК-репликации) [Thornberry N. A. et. al., 1998].

Многочисленные исследования последних лет были направлены на изучение роли митохондрий в апоптозе. Совсем недавно была определена вторая функция митохондрий, в дополнение к известной роли энерго-продуцирующей органеллы: митохондрии являются важными регуляторами апоптоза. Главным образом, благодаря работам Kroemer G. с соавт. (1997), митохондрии находятся сейчас в центре внимания исследователей апоптоза. Вовлечение митохондрий в апоптотический путь было продемонстрировано на CD95-зависимом апоптозе [Shimuzi S. et. al., 1996]. В настоящее время известны, по крайней мере, три основных механизма, благодаря которым митохондрии могут контролировать клеточную жизнь и смерть. Во-первых, — это нарушение транспорта электронов, окислительного фосфорилирования и продукции АТФ; во-вторых, — это высвобождение белков, которые активируют каскад каспаз и, в-третьих, — это изменение потенциала

кислородаактивных радикалов [Green D. R. et. al., 1998]. Идентификация нового адаптерного человеческого белка Araf-1 (apoptotic protease activating factor-1), гомологичного белку CED-4 *C.elegans*, позволила предположить митохондриально-зависимый путь апоптоза, контролируемый Araf-1 [Zou et. al., 1997; Li P. et. al., 1997; Adachi S. et. al., 1998; Mignotte B. et. al., 1998; Bossy-Wetzel E., 1999]. Известно, что почти сразу после индукции апоптоза потеря трансмембранного потенциала ($\Delta\Psi_m$) может формировать поры с измененной проницаемостью. Почти в то же время инактивированный цитохром С (Araf-2) высвобождается в цитоплазму. Связывание цитохрома С (Araf-2) с Araf-1 приводит к активации Araf-3 (каспаза-9), которая, в свою очередь, расщепляет каспазу-3 [Li P. et. al., 1997; Alnemri E. S. 1996; Duan et. al., 1996; Liu et al., 1996; Li P. et. al., 1997; Kirsch D. G. et. al., 1999]. Данный путь прохождения апоптотического сигнала через митохондрии не зависит от активации FADD/каспазы-8 и может ингибироваться антиапоптотическим белком *Bcl-2* через прямое взаимодействие между Araf-1 и каспазой-9 [Hu Y. et. al., 1998; Pan G. et. al., 1998].

Как отмечают Peter M. E. и Krammer P. H. (1998) в обзорной статье, посвященной механизмам CD95(Fas/APO-1)-опосредованного апоптоза, все апоптогенные активности митохондрий могут быть блокированы гиперэкспрессией как *Bcl-2*, так и *Bcl-xL*. В процессе CD95-опосредованного апоптоза образование гибель-индуцирующего комплекса приводит к активации митохондрий. Этот процесс требует активации каспаз, однако каспазы, активирующие митохондрии, до сих пор полностью не идентифицированы. Потенциальным кандидатом является каспаза-4, которая активируется между каспазой-8 и каспазой-3 в процессе CD95-опосредованного апоптоза [Kamada S. et. al., 1997; Kamada S. et. al., 1997]. Известно, что *Bcl-2* является важным регулятором высвобождения из митохондрий цитохрома С, ингибируя его высвобождение в цитозоль [Kluck R. M. et. al., 1997; Adachi S. et. al., 1997; Adachi S. et. al., 1998; Shimizu S. et. al., 1999]. Механизмы высвобождения цитохрома С и его ингибции *Bcl-2* не совсем ясны. Однако известно, что некоторые члены семейства *Bcl-2* (*Bcl-2*,

Bcl-xL, *Bax*, *Bad*) могут образовывать поро-формирующие каналы в синтетическом липидном бислое с различной селективностью и тем самым регулировать проницаемость мембраны и внешнее высвобождение цитохрома С в процессе апоптоза [Schendel S. L., 1997; 1997; Minn A. J. et. al., 1997; Vander Heiden M. G. et. al., 1997; Shimizi S. et. al., 1999]. Таким образом, *Bcl-2* может ингибировать апоптоз в тех клетках, где выполнение программы апоптоза зависит от цитохрома С и Араф-1-активированных каспаз. Были охарактеризованы два типа клеток и, соответственно, два различных сигнальных пути CD95-зависимого апоптоза [Scaffidi C. et. al., 1998; Scaffidi C. et. al., 1999]. В клетках I типа активируется большое количество активной каспазы-8 с последующим формированием DISC и дальнейшим расщеплением каспазы-3. Этот процесс не зависит от активации митохондрий и не блокируется гиперэкспрессией *Bcl-2*. В противоположность этому, в клетках II типа формируется очень небольшое количество активной каспазы-8 в DISC, и апоптоз в этих клетках зависит от активации митохондрий. И только после активации митохондрий активируются каспазы-3 и -8. Только в этих клетках гиперэкспрессия *Bcl-2* и *Bcl-xL* полностью блокирует активацию каспаз. Исследования Scaffidi C. и соавт (1998) показали, что каспаза-8 может действовать как иницирующая, так и как эффекторная каспаза. Цитохром С играет важную роль в передаче сигнала апоптоза [Zou H. et. al., 1997; Li P. et. al., 1997]. Полагают, что высвобождение цитохрома С необходимо для активации каспаз, которая происходит после активации митохондрий, и микроинъекция цитохрома С в различные клетки вызывает апоптоз [Zhivotovsky B. et. al., 1998]. Кроме цитохрома С в активации каспаз в митохондриальном пути принимает участие недавно охарактеризованный цитозольный компонент AIF (Apoptosis Inducing Factor (AIF). Индуцированный изменением проницаемости митохондриальной мембраны и потерей мембранного потенциала ($\Delta\Psi_m$), AIF высвобождается из митохондрий и активирует проэнзиматические протеазы. AIF индуцирует апоптотические изменения в ядрах *in vitro*, возможно, в отсутствие цитоплазматических факторов, а также прямым активированием каскада каспаз. Кроме того, апоптоз, вызванный AIF и цитохромом

C, может ингибироваться семейством *Bcl-2*. В отличие от этого, запуски каскада протеаз каспазой-2 или каспазой-8, активированные взаимодействием с CD95 или TNFR1, не ингибируются *Bcl-2* [Susisn S. A. et. al., 1996; Susisn S. A. et. al., 1997]. Таким образом, активация каспазы-9 в митохондриальном пути активирует эффекторные каспазы-3, -6 и -7 которые, расщепляя свои субстраты, приводят к характерным изменениям ядра и клетки, типичным для апоптоза.

Глава 3

Молекулярные механизмы регуляции апоптоза

Накопившиеся в литературе данные показывают, что молекулярные механизмы, ответственные за апоптоз, консервативны среди организмов [Horvitz N. R. et. al., 1996]. Для примера: нематодный ген *ced-9*, который предохраняет от апоптоза в *C. elegans*, похож на человеческий протоонкоген *Bcl-2*, который предохраняет от самоубийства многие клетки. В дополнение к этому, нематодный ген *ced-3*, который вызывает клеточную смерть у *C. elegans*, похож на человеческий ген ICE. Более того, нематодный ген *ces-2*, который вовлечен в регуляцию апоптоза в специфических нейронах, структурно похож на человеческий транскрипционный фактор HLF (hepatic leukaemia factor). Таким образом, механизмы апоптоза могут быть консервативны как среди простейших, так и среди сложных видов. Однако эволюция внесла некоторые новые механизмы передачи сигнала в предсуществующий каскад программированной клеточной смерти [Goldstein P. et. al., 1996].

§ 3.1. Белок p-53 — элемент системы контроля за апоптозом

Центральным компонентом системы контроля за апоптозом является белок p53. Именно на p53 сходятся многообразные сигналы, сообщающие о возникновении «нештатной» ситуации [Чумаков П. М., 2000]. При этом происходит быстрое увеличение экспрессии p53 и переход в функционально активное состояние. p-53 запускает ряд внутриклеточных процессов, ведущих к самоограничению или к самоубийству клетки [Чумаков П. М., 2000].

Дикий (т.е. нормальный) тип гена *p53* (wt *p-53*) индуцирует апоптоз, а протоонкогены *Bcl-2* и *Bcl-x* его блокируют. В результате мутации гена дикого типа образуется мутантный тип гена *p53* (mt *p-53*) и клетка теряет способность к естественной смерти (апоптозу), следствием чего является возникновение опухоли. Дикий тип гена *p-53* является геном-супрессором, ингибирующим трансформацию клеток, мутантный ген *p-53* является онкогеном, который, наряду с другими онкогенами, участвует в механизмах канцерогенеза. Дикий ген *p-53* не только индуцирует апоптоз, но также блокирует клеточный цикл, возможно, совместно с *c-myc*-геном, на стадии G1 или перехода фазы G1 в S-фазу. Дикий тип человеческого гена *p53* и температуро-чувствительные мутанты индуцируют экспрессию CD95(Fas/APO-1)-антигена [Owen-Schaub L. B. et. al., 1995]. Когда клетки линий H358, H460 и K562 трансфецировали температуро-чувствительными мутантами, то экспрессия CD95(Fas/APO-1)-антигена повышалась в 4–6 раз. Таким образом, онкоген вызывает в клетках два эффекта: он останавливает клетки в G1/S фазе клеточного цикла и является триггером апоптоза.

Подробную информацию о *p53* читатель найдет в обзорах П. М. Чумакова и Б. П. Копнина [2000].

§ 3.2. Семейство *Bcl-2*-белков, регулирующих апоптоз

***Bcl-2*.** Первым обнаруженным белком, регулирующим апоптоз, был *Bcl-2*, кодируемый протоонкогеном *Bcl-2*. Транслокация гена приводила к развитию фолликулярной лимфомы у человека [Bakhsi A. et. al., 1985; 1987; Cleary M. L., Sklar J., 1985; Tsujimoto Y. et. al., 1985]. Затем было выявлено целое семейство *Bcl-2*-генов, контролирующих апоптоз. На сегодняшний день уже клонировано девять гомологов *Bcl-2* у млекопитающих и два вирусных гомолога. Эволюционный анализ показал, что будут открыты еще новые гомологи *Bcl-2*. В табл. 3.1 представлена топология белка *Bcl-2* и домены семейства *Bcl-2* [Yin X. M. et. al., 1994; Cory S., 1995; Farrow S. N. et. al., 1995; Gillet G. et. al., 1995; Evans D. L., Mansel R. E., 1995; Zha H. et. al., 1996; Yang E. Korsmeyer S. J., 1996].

Таблица 3.1

Топология белка *Bcl-2* и распределение гомологичных доменов
в *Bcl-2*-семействе

Ген	Домены				
	S1 BH4	BH3	S2 BH1	S3 BH2	Гидрофобный трансмембранный домен
<i>Bcl-2</i>	+	+	+	+	+
<i>Bcl-xL</i>	+	+	+	+	+
<i>Ced-9</i>	+	×	+	+	+
<i>Mcl-1</i>	+	+	+	+	+
<i>A1</i>	+	×	+	+	+
<i>Bcl-xS</i>	+	+	×	×	+
<i>Bax</i>	×	+	+	+	+
<i>Bad</i>	×	×	+	+	+
<i>Bak</i>	×	+	+	+	+
<i>Bik</i>	×	+	×	×	+
<i>NR-13</i>	+	×	+	+	+
<i>BHRF1</i>	×	×	+	+	
<i>LMWS-HL</i>	×	×	+	+	

Члены семейства протеинов *Bcl-2*, или подобно *Bcl-2*, угнетают апоптоз, или, подобно *Bax*, индуцируют апоптоз [Oltvai Z. et. al., 1993; Boise L. H. et. al., 1993]. В табл. 3.2 показано влияние белков семейства *Bcl-2* на апоптоз.

Ранние работы показали, что *Bcl-2* функционирует как центральная репрессорная молекула апоптоза. Протоонкоген *Bcl-2* впервые был описан как результат хромосомной транслокации t(14;18) в 85 % В-клеточных фолликулярных лимфом человека [Tsujimoto Y. et. al., 1985]. Эта транслокация переносит *Bcl-2* из его нормальной позиции в 18q21 в локус Н-цепи Ig в 14q32. Это приводит к транскрипционной дисрегуляции гена *Bcl-2* и гиперэкспрессии белка *Bcl-2* в лимфомных клетках. Белок, кодируемый *Bcl-2*, является интегральным мембранным протеином с молекулярной массой 25 кДа, который локализован в митохондриальной

Таблица 3.2

Влияние членов семейства *Bcl-2* на апоптоз

Гены	Влияние на апоптоз	Ссылки
<i>Bcl-2</i>	Угнетает	Vaux D. L. et. al., 1988
<i>Bcl-xL</i>	Угнетает	Boise L. H. et. al., 1995
<i>C. elegans ced-9</i>	Угнетает	Hengartner M., Horvitz H., 1994
<i>C. briggsiae ced-9</i>	Угнетает	Hengartner M., Horvitz H., 1994
<i>BHRF1</i>	Угнетает	Henderson S. et. al., 1993
<i>LMW5-HL</i>	Неизвестно	Neilan J. G. et. al., 1993
<i>Mcl-1</i>	Неизвестно	Kozopas K. M. et. al., 1993
<i>A1</i>	Неизвестно	Lin E. Y. et. al., 1993
<i>Bcl-xS</i>	Усиливает	Boise L. H. et. al., 1995
<i>Bax</i>	Усиливает	Otha et. al., 1995
<i>Bad</i>	Усиливает	Yang E. et. al., 1995
<i>Bak</i>	Усиливает	Farrow S. et. al., 1995
<i>Bik</i>	Усиливает	Boyd J. et. al., 1995
<i>NR-13</i>	Неизвестно	Gillet G. et. al., 1995
<i>BHRF1</i>	Угнетает	Henderson M. et. al., 1993
<i>LMW5-HL</i>	Угнетает	Neilan J. et. al., 1993

мембране, околядерной мембране и гладком эндоплазматическом ретикулуме. Этот белок защищает клетки от запрограммированной клеточной смерти в некоторых экспериментальных системах и имеет онкогенный эффект, так как снижает апоптоз [Cuende E. et. al., 1993; Korsmeyer S. J., 1992]. *Bcl-2* рассматривается как важный регулятор процесса апоптоза [Nuñez G. et. al., 1990].

В настоящее время активно изучается механизм действия *Bcl-2*. Была выявлена многогранность функции белка *Bcl-2*. Интенсивные исследования биохимического базиса действия протоонкогена *Bcl-2* показали, что он обладает двойным действием: может функционировать как ионный канал, а также как адапторный белок [Reed J. C., 1997].

Белки семейства *Bcl-2* не имеют гомологичных аминокислотных последовательностей с другими белками. Однако, трехмерная структура *Bcl-xL* похожа на трехмерную структуру порообразующих доменов некоторых бактериальных токсинов, которые

действуют как каналы для ионов или белков [Machmore S. W. et al., 1996]. Близкими по структуре к *Bcl-xL* являются дифтерийный токсин, который транспортирует фрагменты токсина через клеточную мембрану, и бактериальные порообразующие коллицины, которые убивают *E. coli* путем образования неселективных ионовых каналов. Исходя из этой близости, предположили, что семейство белков *Bcl-2* может функционировать как каналы для ионов и белков. Действительно, за последние годы накопились веские доказательства, полученные из экспериментов на трансфицированных клетках, а также на синтетических липидных мембранах, о том, что *Bcl-2* может иметь мембранную транспортную функцию, такую как перекачивание ионов Ca^{2+} и перенос белков через внутриклеточные мембраны, на которых *Bcl-2* и его гомологи локализованы, а именно, на митохондриальной мембране, эндоплазматическом ретикулеме и ядерной мембране [Baffy G. et al., 1993; Lam M. et al., 1994; Ryan J. I. et al., 1994; Minn A. J. et al., 1997]. Механизм, с помощью которого *Bcl-2* и *Bcl-xL* открывают каналы в мембранах, в деталях не выяснен, но предварительные результаты говорят о том, что процесс может быть похож на механизм действия бактериальных токсинов. По аналогии с другими природными и синтетическими каналами альфа-хеликсного типа, две или больше молекул *Bcl-2/Bcl-xL* образуют кольцо, проходящее через мембрану. Сколько молекул участвует в образовании кольца, неизвестно [Minn A. J. et al., 1997; Shendel S. L., 1997].

Повышенная экспрессия *Bcl-2* ингибирует транзит веществ из митохондрий, тогда как сверхэкспрессия *Bax* индуцирует транзит [Susin S. A. et al., 1996; Xiang J. et al., 1996]. Подобно другим белкам, регулирующим мегапоры на мембране, *Bcl-2* и *Bax* могут модулировать мегапоры или участвовать в образовании мегапор, возможно, контролируя поток ионов, закрывая или открывая мегапоры. Блокирующее действие на апоптоз *Bcl-2* может заключаться в блокаде транспорта из митохондрий цитохрома C, являющегося важнейшим звеном в каскаде реализации сигнала смерти [Kluck R. M. et al., 1997; Yang I. et al., 1997].

Хотя вновь обнаруженная канальная активность белков семейства *Bcl-2* может быть решающей в их функции регуляции

жизни и смерти, эти протеины обладают другим путем контроля над апоптозом. *Bcl-2* и *Bcl-xL* связываются с 11 белками, участвующими в передаче сигнала апоптоза: с протеин-киназой Raf-1, с протеин-фосфатаза кальциенеурином, с GTP-азами R-Ras и H-Ras, с p53-связывающим белком p53-BP2, с прион-протеином Pr-1 и некоторыми другими белками с неизвестной функцией, включая CED-4, BAG-1, NIP-1, NIP-2, NIP-3. Функция этих белков была описана в разделе «Передача сигнала апоптоза». По схеме, предложенной J. Reed, (1997) главная роль в контроле за апоптозом отводится белку CED-4, посредством которого *Bcl-2* воздействует на каскад протеаз (Caspases), реализующих апоптоз. На рисунке представлена схема функций *Bcl-2* и топология человеческого *Bcl-2*. О взаимодействии *Bcl-2* с другими белками известно крайне мало. Таким образом, *Bcl-2* и *Bcl-xL* действуют, с одной стороны, как канальная система, а с другой стороны, как адаптерный белок, регулирующий апоптоз.

Bcl-2 экспрессирован во многих тканях во время дифференцировки и во взрослом организме [Hockenbery D. M. et. al., 1991; Merz D. E. et. al., 1994; Novak D. V., Korsmeyer S. J., 1994; LeBrun D. P. et. al., 1993; 1993a]. *Bcl-2* отсутствует на примитивных зрелых гемопоэтических предшественниках, но экспрессирован на высоком уровне в незрелых предшественниках Т- и В-клеток [Park J. R. et. al., 1995]. *Bcl-2* отсутствует в течение фазы перестройки генов рецептора антигена, но, по мере созревания Т- и В-клеток, его экспрессия усиливается [Merino R. et. al., 1994]. Покоящиеся лимфоциты периферической крови сильно экспрессируют *Bcl-2*, а также CD95(Fas/APO-1)-антиген. Однако они резистентны к Fas-опосредованному апоптозу. В В-клетках зародышевых центров лимфатических узлов, в которых происходит соматическая мутация и селекция для высокоаффинного связывания, экспрессия *Bcl-2* снижается. В активированных *in vitro* или *in vivo* Т-лимфоцитах экспрессия *Bcl-2* снижается [Akbar A. N. et. al., 1993].

Таким образом, количество *Bcl-2* коррелирует с чувствительностью клеток к апоптозу: в процессе селекции он экспрессирован на низком уровне, а после созревания его экспрессия повышается.

Bcl-2 отсутствует в нейтрофилах периферической крови. Однако, нейтрофилы экспрессируют CD95(Fas/APO-1)-антиген и, в отличие от лимфоцитов, чувствительны к Fas-опосредованному апоптозу [Iwai K. et. al., 1994].

Моноциты периферической крови слабо экспрессируют *Bcl-2* [Iwai K. et. al., 1994].

Так как *Bcl-2* является эффективным ингибитором клеточной смерти в различных клеточных типах, включая Т- и В-клетки, модуляция эндогенного уровня *Bcl-2* может быть физиологическим механизмом, контролирующим переживание и смерть лимфоцитов [Simon H.-U., 1996]. Сведения о регулирующей роли *Bcl-2* в цитотоксических действиях Т-лимфоцитов довольно противоречивы. Особенно это касается блокады цитотоксических Т-лимфоцитов, осуществляющих лизис клеток путем передачи клеткам-мишеням перфоринов и гранзимов, и Th1+CD4+-Т-лимфоцитов, осуществляющих свое действие путем презентации Fas-лиганда и индукции Fas-опосредованного апоптоза. По данным M. Schroter и соавт. (1995), *Bcl-2* регулирует цитолитическую активность как Th1-клеток, так и цитотоксических Т-лимфоцитов, осуществляющих лизис клеток-мишеней с помощью перфоринов/гранзимов [Schroter M. et. al., 1995]. Сверхэкспрессия *Bcl-2* угнетает оба пути уничтожения клеток-мишеней. Напротив, V. Chiu и соавт. (1995) показали, что *Bcl-2* контролирует только цитотоксическое действие Т-лимфоцитов, опосредованное гранзимами и перфорином, но не Fas-опосредованный апоптоз. Опыты на трансфектантах показали, что введение в Fas-чувствительные клеточные гены *Bcl-2* ингибирует Fas-опосредованный апоптоз [Jaattela M. et. al., 1995; Weller M. et. al., 1995]. Это было показано на линиях рака молочной железы и глиомной линии клеток. В Fas-трансфектированных клетках рака молочной железы линии MCF-7 *Bcl-2* и *Bcl-x* ингибировали Fas-опосредованный апоптоз [Jaattela M. et. al., 1995]. Введение в Fas-чувствительную линию глиомных клеток гена *Bcl-2* ингибировало Fas-опосредованный апоптоз [Weller M. et. al., 1995].

Гиперэкспрессия белка *Bcl-2* приводит к неопластическому росту клеток. Исследования лейкозных больных показали, что,

действительно, подъем уровня экспрессии *Bcl-2* ассоциировал с резистентностью к различным химиотерапевтическим агентам [Loten J., Sachs L., 1993]. Однако у больных раком молочной железы, где белок *Bcl-2* экспрессирован в 80 % случаев, наоборот, утрата экспрессии *Bcl-2* коррелирует с плохим прогнозом рака молочной железы [Gasparini G. et al., 1995]. При этой патологии экспрессия белка *Bcl-2* коррелирует с экспрессией рецепторов к эстрогену и прогестерону. Эти различия могут быть связаны с тем, что в разных типах опухолей проявляется разная роль *Bcl-2*.

Лейкозные клетки больных ХМЛ резистентны к индукции апоптоза химиопрепаратами вследствие гиперэкспрессии *Bcl-2*, однако чувствительны к апоптотическому лизису Т-лимфоцитами [Fuchs E. J. et al., 1995].

Вак. *Вак* впервые был изолирован путем совместной иммунопреципитации с *Bcl-2* [Oltvai Z. N. et al., 1995]. *Вак* снижает способность *Bcl-2* и *Bcl-x* угнетать апоптоз, но сам по себе не дает сигнал клеточной смерти. Полагают, что для регуляции ответа клетки на сигналы смерти, такие, как, например, удаление факторов роста [Oltvai Z. P. et al., 1995], скорее всего, имеют значение соотношения про- и анти-апоптотических белков. Если преобладает *Вак*, то клетки в ответ на сигнал смерти погибают, а если преобладает *Bcl-2* или *Bcl-x*, то клетки игнорируют сигнал смерти. В лимфоидных органах *Вак* обнаружен в мононуклеарах периферической крови, нейтрофилах, миндалинах, селезенке и тимусе, в Т- и В-клетках, НК-клетках и моноцитах человека. Экспрессия *Вак* повышается с дифференцировкой Т- и В-клеток [Otha K. et al., 1995].

Bcl-x. Ген *Bcl-x* кодирует два полипептида. *Bcl-xS* белок обнаружен только на низком уровне в трубах яичника и не найден в других тканях [Krajewski S. et al., 1994]. *Bcl-xL* протеин, который ингибирует апоптоз, обнаружен во многих органах и тканях, включая иммунную систему. *Bcl-xL* экспрессирован в течение эмбриогенеза и присутствует у взрослых в мозге, почках, тимусе и костном мозге [Gonzales-Garcia M. et al., 1994]. В отличие от *Bcl-2*, *Bcl-xL* преимущественно экспрессирован в незрелых Т- и В-клетках, включая ранних CD34⁺/lin-гемопоэтических пред-

шественников [Ohta K. et. al., 1995; Ma A. et. al., 1995]. Его уровень снижается в процессе дифференцировки клеток. Он слабо определяется в зрелых Т-клетках, но его активность повышается в процессе активации [Ohta K. et. al., 1995; Boise L. H. et. al., 1993]. В отличие от *Bcl-2*, *Bcl-x* индуцируется при активации Т-клеток МКА против CD28-антигена [Boise L. H. et. al., 1995].

§ 3.3. Регуляция экспрессии CD95(Fas/APO-1)-рецептора другими клеточными рецепторами

Моноклональные антитела (МКА) против поверхностных клеточных рецепторов вызывают регуляцию экспрессии CD95(Fas/APO-1)-рецептора [Oyaizu N. et. al., 1994]. Перекрестное связывание МКА против CD4 или оболочечного протеина gp160 человеческого вируса иммунодефицита с нефракционированными мононуклеарами периферической крови индуцирует апоптоз [Oyaizu N. et. al., 1994]. Однако механизм индукции апоптоза с помощью МКА анти-CD4 неясен. Связывание МКА анти-CD4 или протеина gp160 индуцирует в клетках повышение экспрессии CD95(Fas/APO-1)-антигена и мРНК этого антигена. Добавление тирозин протеин киназы генистина или иммунодепрессанта циклоспорина А отменяло этот эффект. Повышение экспрессии CD95(Fas/APO-1)-антигена коррелировало с повышением апоптоза. В дополнение, перекрестное связывание с анти-CD4 индуцировало продукцию гамма-интерферона и TNF- α в отсутствии секреции интерлейкина-2 и интерлейкина-4. МКА κ -гамма-интерферон и TNF- α блокировали апрегуляцию (повышение экспрессии) CD95(Fas/APO-1)-рецептора.

МКА против CD95(Fas/APO-1)-антигена также вызывают изменение экспрессии других клеточных молекул [Kabelitz D. et. al., 1996]. Инкубация клеток линии Jurkat с МКА против CD95(Fas/APO-1)-антигена вызывала быструю (через 4 ч) даунрегуляцию (снижение экспрессии) L-селектина (CD62L) и CD7, но не CD3 или CD71. Не обнаружили даунрегуляции на Fas-экспрессирующ-

щей, но нечувствительной к Fas-опосредованному апоптозу сублинии Jurkat 4321. На активированных ФГА, чувствительных к Fas-опосредованному апоптозу Т-клеточных бластах, МКА против Fas-антигена быстро индуцировали даунрегуляцию различных антигенов, включая CD2, CD4, CD8, CD7, CD44, LFA- α , LFA- β , CD62L, но не CD3, CD4 и CD62L. Эти результаты показывают, что быстрая даунрегуляция избирательных молекул является ранним ответом на перекрестное связывание Fas-рецептора на нормальных и трансформированных клетках.

Т-зависимая активация В-клеток зародышевых центров вызывает даунрегуляцию антигенов CD10, CD38, CD77 и апрегуляцию молекул CD44 и CD62-L. Последние два антигена экспрессированы на В-клетках памяти. Более того, эта активация проявляется в очень сильной индукции экспрессии антигена CD5 и повышении экспрессии антигена CD95(Fas/APO-1).

§ 3.4. Регуляция апоптоза цитокинами

Одним из центральных аспектов иммунологии является вопрос о том, как завершается однажды начавшийся иммунный ответ. Одним из важных механизмов регуляции Т-клеток является апоптоз, который является важным компонентом большинства иммунных ответов и приводит к элиминации реактивных клеток без освобождения потенциально токсичных обломков клеток. Т-клетки подвергаются апоптозу с помощью двух различных механизмов. С одной стороны, активационно индуцированная смерть возникает после связывания Т-клеточного рецептора антигена (TCR) с антигеном в присутствии интерлейкина-2 [Russell J. H. et. al., 1991; Lenardo M., 1991; Kneitz B. et. al., 1995; Radvanyi L. G. et. al., 1993], а с другой стороны, клеточная смерть может вызываться потерей стимуляции или цитокинов [van Parijs L. et. al., 1996], т. е. цитокины также регулируют апоптоз [Mainou-Fouler T., Prentice A. G., 1996].

Апоптоз в предшественниках гемопоэтических клеток регулируют гемопоэтические факторы роста: SCF, IL-3, GM-CSF, G-CCF, гамма-интерферон, альфа-TNF и Epo [Hagafuji K. et. al., 1995].

Гамма-интерферон и альфа-TNF хорошо известны как негативные гемопозитические регуляторы, индуцирующие сильную экспрессию функционально активного CD95(Fas/APO-1)-рецептора. Установлено, что TNF- α через p55 TNF- α -рецептор может опосредовать даунрегуляцию G-CSF-рецептора и c-kit и апрегулировать интерлейкин-3 и GM-CSF рецепторы [Elbaz O. et. al., 1991; Delwel R. et. al., 1992; Khoury E., 1994].

Глава 4

Получение и характеристика моноклональных антител ISO-160 против CD95(Fas/APO-1)-антигена

За два десятилетия развития гибридомной технологии были разработаны четкие критерии характеристики моноклональных антител (МКА) против дифференцировочных антигенов лейкоцитов человека, которые включают пять последовательных этапов. Первый этап — сравнение гистограмм распределения клеток, окрашенных исследуемыми МКА и референтными МКА, полученными на проточном цитофлюориметре. Второй этап — двойное окрашивание, при котором одно антитело мечено FITC, а второе — фикоэритрином. При этом, если оба МКА реагируют с той же самой клеткой, то она окрашивается этими двумя красителями. Третий этап — конкурентная ингибция. Клетки инкубируются с избытком холодных исследуемых МКА, а затем с мечеными референтными МКА. Если оба МКА выявляют тот же самый или близко расположенный эпитоп, то меченые референтные МКА с клеткой не связываются и свечение клеток отсутствует. Четвертый этап — модуляция антигена. Он применяется только в том случае, если антиген модулирует, т.е. исчезает с поверхности клетки после соединения с МКА. При этом клетки сначала инкубируются с исследуемыми МКА в течение 3–18 ч, а затем — с референтными МКА. Если реакция с референтными МКА отсутствует, то это свидетельствует о том, что оба МКА реагируют с той же самой молекулой. Пятый этап — определение молекулярной массы антигена. С развитием технологии клонирования генов и получения трансфектированных клеток работа по характеристике несколько упростилась. Если МКА реагируют с трансфектированными клетками, то это указывает на их специфичность. По этим критериям

оценивались МКА ICO-160, полученные в лаборатории экспериментальной диагностики и биотерапии опухолей Российского онкологического научного центра им. Н. Н. Блохина РАМН.

§ 4.1. Получение моноклональных антител ICO-160

Гибридому ICO-160 получили при иммунизации мыши линии BALB/с моноклеарами периферической крови донора, активированными фитогемагглютинином. С этой целью, у здорового донора взяли из локтевой вены 50,0 мл крови в пробирку с гепарином (50 ед/мл). Кровь развели средой RPMI-1640 без сыворотки и наслоили на градиент фиколл/верографин. Клетки центрифугировали 30 мин при 1600 об/мин. Затем собрали из интерфазы моноклеары и 3 раза отмыли средой RPMI-1640. Моноклеары поместили в пластиковый флакон в концентрации 1×10^6 клеток/мл и инкубировали 3 дня при 37°C в присутствии фитогемагглютинина (ФГА) в концентрации 1 мкг/мл. Клетки три раза отмыли раствором PBS и ввели в хвостовую вену мыши в концентрации 1×10^7 в объеме 1 мл. Мышь получила 3 инъекции с интервалом в 2 недели. Через 5 дней после последней иммунизации из селезенки выделили спленоциты гомогенизированием в гомогенизаторе Поттера. Спленоциты слили с клетками миеломной клеточной линии NS1 в соотношении 5 : 1; слияние проводили с помощью 50 % полиэтиленгликоля с молекулярной массой 1500 Д. После этого клетки поместили в три 96-луночных плоскодонных плато в селективную среду HAT. Через 7 дней в лунках стали видны колонии. Продукцию антител определяли в непрямой реакции поверхностной иммунофлюоресценции (РИФ), которую учитывали на проточном цитофлюориметре FACScan (Becton Dickinson). Скрининг антител проводили на активированных фитогемагглютинином моноклеарах периферической крови. Гибридомные клетки одной из колоний, продуцирующие МКА и реагирующие с активированными моноклеарами крови, дважды клонировали методом лимитирующих разведений. С этой целью делали серийные двукратные разведения и клетки помещали на фидер из спленоцитов

и тимоцитов мыши линии BALB/c. Колонии возникали через 1 неделю, их снова тестировали на продукцию антител, взаимодействующих в РИФ с активированными мононуклеарами крови. При первом клонировании колонии выросли в 43 % лунок, а при втором — в 30 % лунок, что указывает на моноклональность полученных антител [Барышников А. Ю. и др., 1989]. Полученный клон гибридомных клеток, стабильно продуцирующий антитела IgG2a-изотипа, назвали ICO-160, а МКА — ICO-160. Гибридомные клетки депонировали в Банке клеток РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН.

§ 4.2. Реактивность МКА ICO-160 с клетками периферической крови здоровых доноров

Полученные МКА ICO-160 тестировали на клетках периферической крови 106 здоровых доноров, клетках нормального костного мозга и перевиваемых клеточных линиях.

МКА ICO-160 реагировали с покоящимися лимфоцитами здоровых доноров, с активированными ФГА или МКА против CD3-антигена лимфоцитами здоровых доноров, и не взаимодействовали с гранулоцитами, эритроцитами и тромбоцитами (табл. 4.1)

На первом этапе характеристики МКА ICO-160 сравнивали гистограммы иммунофлуоресценции клеток, окрашенных этими

Таблица 4.1

Реактивность МКА ICO-160 с клетками периферической крови здоровых доноров

Тип клеток	Количество тестируемых случаев	Количество положительных случаев	Процент антиген- положительных клеток
Лимфоциты	106	106	$26,8 \pm 15,6$
Гранулоциты	59	0	0
Моноциты	10	10	100
Эритроциты	10	0	0
Тромбоциты	3	0	0

МКА, с гистограммами иммунофлюоресценции клеток, окрашенных другими стандартными МКА против уже известных антигенов. Было отмечено, что гистограммы иммунофлюоресценции клеток периферической крови больных лейкозами, окрашенных МКА ICO-160, были очень похожи на гистограммы лимфоцитов, окрашенных МКА IPO-4 против антигена CD95(Fas/APO-1), полученных С. П. Сидоренко и соавт. (1990) и охарактеризованных на V Международном рабочем совещании по дифференцировочным антигенам лимфоцитов человека (Бостон, 1994 г.) (рис. 4.1).

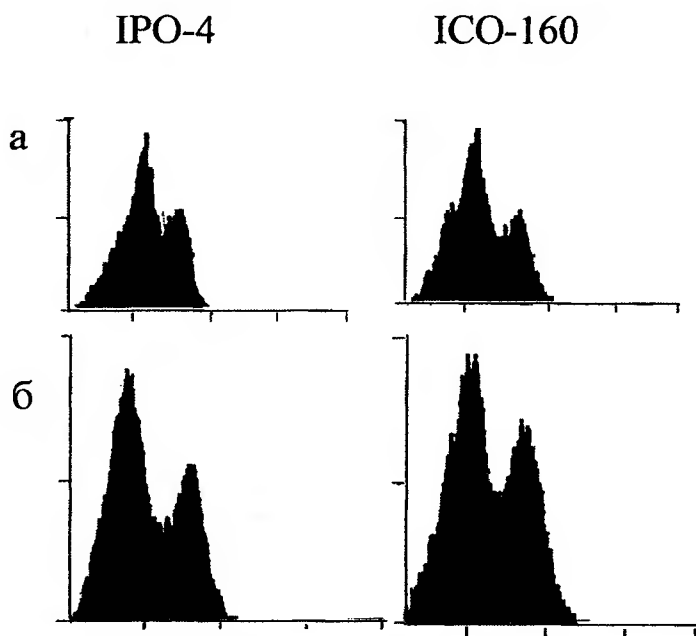


Рис. 4.1. Профили флюоресценции клеток, окрашенных моноклональными антителами ICO-160 и IPO-4.

а — бластные клетки больного К., диагноз: ХМЛ в стадии бластного криза;
б — лейкозные клетки больной Х., диагноз: острый лимфобластный лейкоз

На VI Международном рабочем совещании по лейкоцитарным дифференцировочным антигенам установлено существование трех эпитопов на молекуле CD95: А, В и С. Эти эпитопы

характеризуются различным отношением к функции молекулы. Связывание эпитопа А с помощью МКА индуцирует апоптоз, связывание эпитопа С не приводит к апоптозу клеток, роль эпитопа В в индукции апоптоза изучена недостаточно. Охарактеризованные в ходе рабочего совещания в Бостоне (1993) МКА IPO-4, APO-1, Fas и 7C11 обнаруживают один и тот же эпитоп («А» в случае 7C11) или близко расположенные эпитопы (данные Robertson и Ritz, 1998).

Процент антиген-положительных лимфоцитов здоровых доноров, выявляемых МКА ICO-160, был близок к значениям, полученным при использовании МКА IPO-4: МКА ICO-160 реагировали в непрямой РИФ с $28,04 \pm 14,5$ % лимфоцитов ($N=106$), а МКА IPO-4 — с $22,3 + 12,6$ % ($N=56$). МКА ICO-160 и МКА IPO-4 не реагировали с гранулоцитами, тромбоцитами и эритроцитами периферической крови здоровых доноров. Процент антиген-положительных лимфоцитов колебался от 1 до 75 %.

Тестирование МКА ICO-160 на тимоцитах детей выявило $19,1 + 10,7$ % антиген-положительных клеток ($N = 20$). МКА IPO-4 окрашивали $13,6 + 9,7$ % ($N = 21$) тех же клеток.

Анализ реактивности МКА ICO-160 на клетках перевиваемых клеточных линий показал, что они реагируют с Т-клеточными линиями Jurkat, CEM, YT, Molt-4, В-клеточными линиями Raji, Daudi, Ramos, моноцитоидной ТНР-1, миеломоноцитарной линией HL-60, стволово-клеточной линией KG1 и не взаимодействуют с монобластоидной U937 и эритробластоидной K562 (табл. 4.2).

Сведения об экспрессии антигена CD95 на клетках периферической крови здоровых людей весьма противоречивы. Одни исследователи обнаруживают высокий уровень экспрессии, а другие — низкий. Это может быть связано с различными методами определения экспрессии антигена, а также с качеством реагентов. Учитывая принципиальное значение определения истинного уровня экспрессии CD95(Fas/APO-1)-антигена, мы предприняли исследование влияния качества реагентов на определение уровня CD95+-клеток. Для выяснения этого вопроса было проведено сравнение нескольких типов вторых антител против мышиных иммуноглобулинов и нескольких партий МКА ICO-160, напрямую меченых FITC. При этом, прямо конъюгированные МКА

Таблица 4.2

Реактивность МКА ICO-160 с клетками перевиваемых клеточных линий

Название линии	Происхождение	Реактивность МКА
Jurkat	Т-лимфобластоидная	+
CEM	—"	+
YT	—"	+
Molt-4	—"	+
Raji	В-клеточная	+
Daudi	—"	+
Ramos	—"	+
THPI	Моноцитоидная	+
HL-60	Промиелоцитарная	+
KG1a	Миелобластная	+
U937	Монобластоидная	—
K-562	Эритробластоидная	—

ICO-160 различались по количеству молекул FITC, связанных с 1 молекулой антител, в результате чего в одном образце МКА — ICO-160F(I) — содержалось 1,8 молекулы FITC на 1 молекулу антител, а во втором — ICO-160F(II) — 3,2 молекулы FITC на 1 молекулу антител. Вследствие этого, МКА ICO-160F(I) реагировали с меньшей интенсивностью флуоресценции, чем МКА ICO-160(II). Антимышинные сыворотки также различались по количеству молекул FITC на 1 молекулу Ig: баранья антисыворотка против иммуноглобулинов мыши, производства НПЦ «МедБио-Спектр», на 1 молекулу Ig имеет более 5 молекул FITC, а козья антисыворотка против Ig мыши, производства Hundai Pharm., содержит только 3 молекулы FITC на 1 молекулу антител. В исследование также была включена козья антимышинная антисыворотка, меченая FITC, производства Becton Dickinson. Однако соотношение Ig/FITC в ней нам неизвестно.

Было обнаружено, что гистограммы иммунофлуоресценции лимфоцитов периферической крови, окрашенных разными партиями МКА ICO-160 и разными вторыми антисыворотками, мечеными FITC, существенно различаются (рис. 4.2). При одинаковом

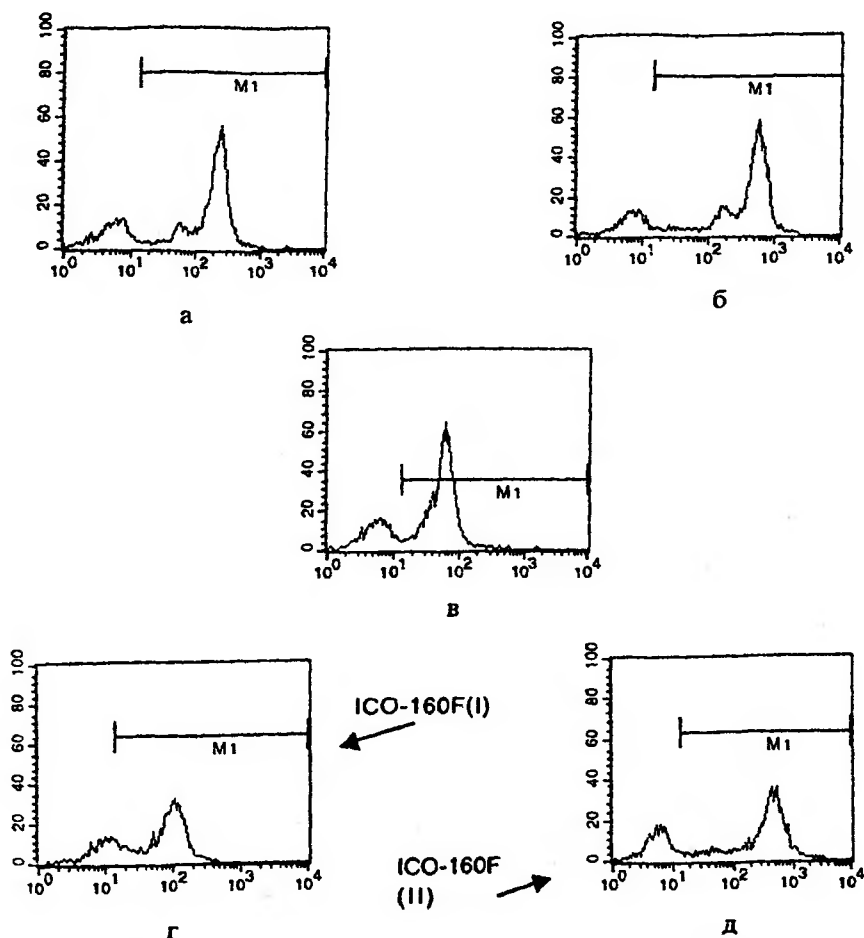


Рис. 4.2. Сравнение интенсивности иммунофлуоресценции лимфоцитов крови здорового донора, окрашенных МКА ICO-160 с различными антисыворотками, мечеными FITC МКА ICO-160.

а — ICO-160+анти-IgF (МБС); б — ICO-160+анти-IgF (BD); в — ICO-160+анти-IgF (HPh); г — ICO-160F(I); д — ICO-160F(II)

проценте антиген-положительных клеток у данного конкретного человека, интенсивность реакции была разная. МКА ICO-160 со вторыми антителами, производства Becton Dickinson, дают наиболее интенсивную реакцию. Средняя интенсивность иммунофлюоресценции (mean) была равна 457,7, а пик канала — 538 (табл. 4.3).

Таблица 4.3

Интенсивность иммунофлюоресценции лимфоцитов здорового донора, окрашенных МКА ICO-160 и разными «вторыми» антителами, мечеными FITC

Антитела	Процент антиген-положительных клеток	Средняя интенсивность	Пик канала
ICO-160+анти-мышь BD*	83,2	457,7	538
ICO-160+анти-мышь МБС	80,1	198,2	233
ICO-160+анти-мышь HPh	77,8	57,7	59
ICO-160F (I)	79,3	85,1	101
ICO-160F (II)	73,8	389,0	428

Примечание: * — BD — Антисыворотка производства Becton Dickinson, МБС — производства «МедБиоСпектр», а HPh — Hundai-Pharm.

МКА ICO-160 со вторыми антителами производства НПЦ «Мед-БиоСпектр» выявляют такой же процент антиген-положительных клеток, но средняя интенсивность флюоресценции (mean) более чем в два раза ниже — 198,2. Пик канала также в два раза ниже — 233. МКА ICO-160 с козьей антисывороткой, меченой FITC, производства Hundai-Pharm, дает более слабую реакцию: средняя интенсивность флюоресценции всего 57,7, а пик канала в 10 раз ниже, чем с сывороткой, производства Becton Dickinson — 59,0. Аналогичным образом изменялась интенсивность иммунофлюоресценции при окрашивании этих же лимфоцитов прямо конъюгированными с FITC МКА ICO-160. МКА ICO-160F(I) давали более слабую интенсивность иммунофлюоресценции по сравнению с МКА ICO-160F(II): у МКА ICO-160F(I) средняя интенсивность иммунофлюоресценции была равна 85,1, а у ICO-160F(II) —

389,0. Пик канала был 101,0 и 428,0, соответственно. При сильной экспрессии антигена интенсивность иммунофлюоресценции не имеет принципиального значения, однако при слабой экспрессии антигена на клеточной поверхности различия выглядят более существенными. Так, на клетках линии Raji отсутствует реакция прямо конъюгированных с FITC МКА ICO-160 и непрямая реакция с использованием вторых антител производства Hundai-Pharm. С другой стороны, в непрямой реакции иммунофлюоресценции с применением вторых антител производства НПЦ «МедБиоСпектр» или Becton Dickinson, МКА ICO-160 выявляли 70,6 % и 70,8 % клеток линии Raji, соответственно.

На рисунке 4.3 изображена реактивность МКА ICO-160 с клетками линии KG1a. МКА ICO-160 со вторыми антителами производства «МедБиоСпектр» выявляли 68 % антиген-положительных клеток, а при использовании вторых антител фирмы Hundai-Pharm, МКА ICO-160 с клетками KG1a не реагировали. При применении вторых антител фирмы Becton Dickinson, МКА ICO-160 выявляли 79,5 % антиген-положительных клеток. Прямо конъюгированные с FITC МКА — ICO-160F(I) и ICO-160F(II) — определяли 15,5 и 26,6 % антиген-положительных клеток, соответственно. С линиями клеток Daudi и Jurkat все образцы МКА ICO-160F и МКА со вторыми антителами фирмы Hundai реагировали одинаково.

Таким образом, можно заключить, что МКА ICO-160 выявляют около 40–70 % лимфоцитов периферической крови, а ранняя низкая выявляемость экспрессии антигена была связана с низким титром МКА ICO-160.

§ 4.3. Реакция моноклональных антител ICO-160 с перевиваемыми линиями клеток

Для характеристики МКА обычно используют перевиваемые клеточные линии разного происхождения [Барышников А. Ю. и др., 1989]. С целью дальнейшей характеристики МКА нами было проведено исследование экспрессии антигена, выявляемого МКА ICO-160 на клетках линий Daudi, HL-60, Molt-4, THP-1, Raji и Jurkat, KG1a (табл. 4.4).

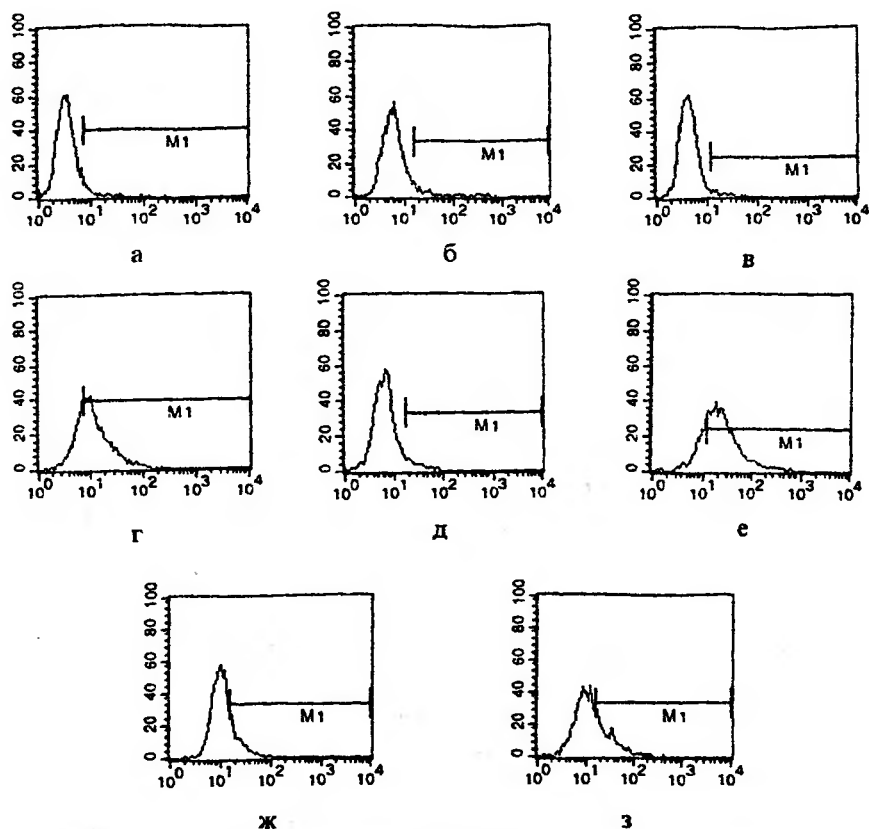


Рис. 4.3. Сравнение интенсивности иммунофлуоресценции клеток линии KG1a, окрашенных МКА ICO-160 с различными антисыворотками, мечеными FITC, и разными партиями прямо конъюгированных FITC МКА ICO-160.

а, б, в — отрицательные контроли для антимышинных антител, меченых FITC, производства НЦП «МедБиоСпекстр» (МБС), Hyundai-Pharm (HPh) и Becton Dickinson (BD), соответственно, г — ICO-160+анти-IgF (МБС); д — ICO-160+анти-IgF (HPh); е — ICO-160+анти-IgF (BD); ж — ICO-160(FI); з — ICO-160(FII)

МКА ICO-160 реагировали со всеми тестируемыми линиями клеток: В-лимфобластоидными линиями Daudi и Raji, Т-лимфобластоидными линиями Jurkat и Molt-4, промиелоцитарной линией HL-60, моноцитоидной линией THP-1, стволовочклеточной

Таблица 4.4

Реактивность моноклональных антител ICO-160
с перевиваемыми клеточными линиями

МКА KG1a	Линии клеток						Процент анти- ген-положи- тельных клеток
	Daudi	HL-60	Molt-4	THP-1	Raji	Jurkat	
Контроль МБС	3	0	2	0	2	0	4
Контроль BD	8	0	18	2	4	1	1
Контроль HPh	7	0	3	1	0	1	4
ICO160+МБС	99	46	28	99	69	72	68
ICO160+BD	98	79	53	98	76	90	79
ICO160+HPh	89	35	29	96	5	58	4
ICO160F(I)	96	7	43	98	0	49	15
ICO160F(II)	99	39	48	99	0	51	26

линией KG1a. Однако линии клеток различались по проценту антиген-положительных клеток. Клетки линий Daudi и THP-1 экспрессировали антиген почти на 100 % клеток. Линия клеток Molt-4 экспрессировала антиген на половине клеток. Линии клеток HL-60, Raji, KG1a и Jurkat экспрессировали антиген на большинстве, но не на всех клетках (табл. 4.4).

Процент антиген-положительных клеток, выявляемых МКА ICO-160, зависел от качества реагентов. Наибольший процент антиген-положительных клеток выявлялся при использовании вторых козых антимышиных антител против иммуноглобулинов мыши, меченных FITC, производства Becton Dickinson (BD). Затем следовали реакции МКА ICO-160 со вторыми мечеными FITC бараньими антителами производства НПЦ «МедБиоСпектр» (МБС). Различия в проценте антиген-положительных клеток составили около 20 %. Однако следует подчеркнуть, что козы МКА против мышиных иммуноглобулинов производства Becton Dickinson, дают высокий процент неспецифического связывания как с некоторыми клеточными линиями, так и с клетками периферической крови. Как видно из табл. 4.4, эти антитела в негативном контроле (NC) неспецифически связывались с 18 % клеток линии Molt-4.

Однако на других клеточных линиях, при хороших контролях, они выявляли больший процент антиген-положительных клеток. Козья антисыворотка против мышинных иммуноглобулинов, меченая FITC, производства HPh, давала наименьший процент антиген-положительных клеток со всеми линиями клеток, а с клетками линии Raji и KG1a вовсе не реагировала (табл. 4.4).

Прямо меченые МКА ICO-160F давали результаты, сопоставимые со вторыми антителами, производства Hundai Pharm (HPh) (табл. 4.4). Они выявляли меньший процент клеток, не реагировали с клетками линии Raji и слабо реагировали с клетками линии KG1a. МКА ICO-160F(I) из первой партии, имевшие соотношение FITC/Ig, равное 3 : 1, также не реагировали с клетками линии линии HL-60. Эта проблема обсуждалась нами выше.

Клеточные линии также различались по интенсивности иммунофлюоресценции (mean), являющейся показателем плотности антигена на клеточной поверхности (табл. 4.5). Клетки линий HL-60 и Molt-4 имели наименьший mean. В обзоре литературы подчеркивалось, что клетки линии HL-60 являются нечувствительными к Fas-опосредованному апоптозу. Более «сильные» антитела давали больший mean.

Таблица 4.5

Степень интенсивности иммунофлюоресценции (mean)
на различных клеточных линиях

МКА KG1a	Линии клеток						Процент антиген-положительных клеток
	Daudi	HL-60	Molt-4	THP-1	Raji	Jurkat	
NC МБС	9	8	3	68	20	11	13
NC BD	8	24	4	6	36	12	18
NC HPh	11	9	3	9	26	12	86
ICO-160+МБС	29	5	4	26	13	22	16
ICO-160+BD	56	6	5	55	12	14	31
ICO-160+HPh	21	4	4	15	9	16	23
ICO-160F(I)	11	4	4	13	10	9	23
ICO-160F(II)	18	4	4	35	28	13	30

§ 4.4. Сравнение МКА ICO-160 с МКА UB2 против CD95(Fas/APO-1)-антигена

Для получения дальнейшего подтверждения направленности МКА ICO-160 против антигена CD95(Fas/APO-1) их сравнивали с коммерческими МКА UB2 против антигена CD95(Fas/APO-1) [Yonehara S. et. al., 1989; Kobayashi N. et. al., 1990; Itoh N. et. al., 1991; Watanabe-Fukunaga R., 1992].

Коммерческий препарат МКА UB2 представляет собой F(ab')₂ фрагменты IgG1, конъюгированные с фикоэритрином (PE). Эти МКА отличаются от других известных МКА против CD95(Fas/APO-1)-антигена тем, что они не индуцируют апоптоз при взаимодействии с Fas-рецептором и не вызывают модуляцию этого антигена, а лишь показывают истинное значение его наличия на поверхностной клеточной мембране. Кроме того, конъюгация МКА с PE усиливает сигнал флюоресценции и позволяет выявлять антиген-положительные клетки среди популяции клеток со слабой экспрессией сигнала.

4.4.1. Реактивность МКА ICO-160 и МКА UB2 с клетками перевиваемых клеточных линий

Сравнение реактивности МКА ICO-160 с МКА UB2 показало, что они не различаются по реактивности с перевиваемыми клеточными линиями и по проценту выявляемых антиген-положительных клеток, но отличаются по интенсивности иммунофлюоресценции. Интенсивность иммунофлюоресценции клеток перевиваемых клеточных линий, окрашенных МКА UB2, конъюгированных с PE, была выше, чем у этих же клеток, окрашенных FITC. Это можно объяснить большей интенсивностью иммунофлюоресценции антител, конъюгированных с PE. МКА UB2 сохраняли реактивность даже при разведении 1:100.

4.4.2. Реактивность МКА ICO-160 и UB2 с лимфоцитами периферической крови здоровых доноров

В то же время нами было отмечено, что реактивность МКА UB2 с лимфоцитами периферической крови была более слабой,

чем у МКА ICO-160, меченых FITC. Более того, МКА UB2 в разведении 1 : 10 уже не реагировали. Исходя из этого, можно сделать вывод, что плотность эпитопа, выявляемого МКА UB2, на клетках перевиваемых линий выше, чем плотность на лимфоцитах периферической крови. С другой стороны, плотность эпитопа, выявляемого МКА ICO-160, на перевиваемых клеточных линиях ниже, чем на лимфоцитах периферической крови. Аналогичная закономерность также выявлена на клетках нормального костного мозга.

4.4.3. Реактивность МКА ICO-160 и UB2 с гранулоцитами

В литературе имеются противоречивые сведения об экспрессии антигена CD95(Fas/APO-1) на гранулоцитах. Одни авторы постоянно выявляют антиген, другие — его не определяют.

В своей работе мы выделяли гранулоциты методом седиментации в 1 % растворе желатина. При этом ни в одном из 50 исследованных случаев гранулоциты периферической крови не реагировали с МКА ICO-160 и IPO-4, направленными против антигена CD95(Fas/APO-1).

Однако при использовании метода постановки реакции на цельной крови, рекомендуемого Vестон Dickinson, во всех 10 из 10 исследованных образцов крови от здоровых доноров МКА ICO-160 и UB2PE выявляли 100 % нейтрофилов.

Причина этого феномена пока не ясна. При постановке реакции на цельной крови после установки маркера по отрицательному контролю выявляется 100 %-ная экспрессия антигена, выявляемого МКА ICO-160. Однако при более жестких контролях можно добиться отрицательного результата. Возможно, на гранулоцитах CD95(Fas/APO-1)-антиген сорбирован и при инкубации с желатином освобождается с клеточной поверхности. С целью проверки этой гипотезы, в опытах с цельной кровью мы использовали пятикратную отмывку клеток до постановки реакции или такую же отмывку после инкубации с МКА ICO-160. Было обнаружено, что многочисленная отмывка клеток не приводила к исчезновению реакции с МКА. 5-кратная отмывка клеток раствором PBS после сепарации с 1 % желатином также не привела к появлению

реакции. Во всяком случае, этот феномен требует дальнейшего исследования.

4.4.4. Реактивность МКА ICO-160 и UB2 с моноцитами

Экспрессию антигена CD95 на моноцитах изучали на цельной крови, выделяя на проточном цитофлюориметре гейт моноцитов. Было обнаружено, что МКА ICO-160 и UB2 реагировали практически со всеми моноцитами периферической крови в 10 из 10 исследованных случаев.

4.4.5. Реактивность МКА ICO-160 и UB2 с НК-клетками

НК-клетки определяли по гейту больших гранулярных лимфоцитов. Большинство клеток этого гейта реагировали с МКА ICO-160, направленными против антигена CD16, являющегося специфическим маркером НК-клеток [Барышников А. Ю. и др., 1994]. МКА ICO-160F(II) реагировали с 60 %, а МКА UB2 — с 90 % НК-клеток в 10 из 10 исследованных случаев.

§ 4.5. Исследование МКА ICO-160 методом двойной метки

4.5.1. Сравнение МКА ICO-160 с МКА IPO-4 против CD95(Fas/APO-1)-антигена

Метод двойного окрашивания применяется для того, чтобы показать, что два исследуемых антитела реагируют с той же самой клеткой. С этой целью одно МКА конъюгируется с фикоэритрином (PE), дающим красную окраску, а другое — с FITC (зеленая окраска). Исследуемые клетки инкубируют с первым МКА 30 мин при +4°С, отмываются один раз и инкубируют в тех же условиях со вторым МКА. Если оба МКА реагируют с одной и той же клеткой, то на ней одновременно обнаруживается зеленая и красная флуоресценция. Если же МКА распознают различные антигены, локализованные на разных клетках, то одновременное свечение на них отсутствует. Анализ реакции иммунофлуоресценции проводят на проточном цитофлюориметре.

В опытах по сравнению МКА ICO-160 и IPO-4 методом двойной метки у нас отсутствовали прямо конъюгированные с PE и FITC МКА ICO-160 и IPO-4. В связи с этим мы использовали 4-этапную реакцию. МКА ICO-160 биотинилировали сукцин-биотином. На первом этапе реакции лимфоциты периферической крови больных множественной миеломой или здоровых доноров, экспрессирующих повышенный уровень антигена CD95(Fas/APO-1), инкубировали с биотинилированными МКА ICO-160 (ICO-160b). Инкубацию проводили при 4°C в течение 30 мин. После двукратной отмывки раствором PBS клетки инкубировали со стрептавидин-фикоэритрином в тех же условиях. После двукратной отмывки PBS клетки инкубировали с МКА IPO-4 в течение 30 мин при 4°C. После однократной отмывки клетки инкубировали с изотип-специфической сывороткой против IgM, меченной FITC (МКА IPO-4 имеют IgM-изотип). После двукратной отмывки раствором PBS клетки анализировали на проточном цитофлюориметре.

Как видно из рис. 4.4, все окрашенные клетки локализованы в квадранте 2. Это свидетельствует о том, что оба МКА реагировали с одной и той же клеткой. Отсутствовали клетки, окрашенные только МКА ICO-160 (квадрант 1), а также клетки, окрашенные только МКА IPO-4 (квадрант 4). Не окрашенные обоими МКА клетки локализованы в квадранте 3.

Из вышеприведенного можно сделать заключение, что МКА ICO-160 и IPO-4 реагируют с одними и теми же клетками среди лимфоцитов периферической крови как больных множественной миеломой, так и здоровых доноров. Таким образом, можно подтвердить, что оба МКА реагируют с той же самой молекулой.

Селективная экспрессия эпитопов на лимфоцитах не обнаружена. Более того, при обработке клеток МКА ICO-160 не происходило блокирования реакции МКА IPO-4. Это свидетельствует о том, что МКА ICO-160 направлены, возможно, не к эпитопу «А» молекулы CD95. Для дальнейшего установления отношения эпитопа, выявляемого МКА ICO-160, к эпитопам «А» молекулы CD95 мы предприняли исследование с использованием МКА 7C11, полученными нами в рамках работы VI Международного совещания

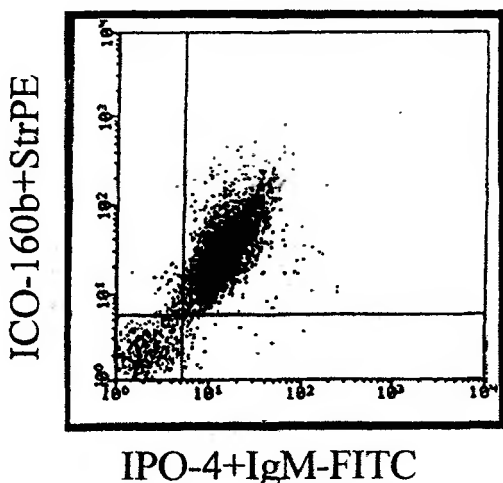


Рис. 4.4. Двойное окрашивание лимфоцитов больного множественной миеломой моноклональными антителами ICO-160 и IPO-4

по дифференцировочным антигенам лейкоцитов человека (г. Кобе, Япония).

4.5.2. Сравнение МКА ICO-160 с МКА 7C11 против CD95(Fas/APO-1)-антигена

Затем мы предприняли сравнение МКА ICO-160 с МКА 7C11, полученными нами для исследования в рамках работы VI Международного рабочего совещания по дифференцировочным антигенам лимфоцитов человека.

В связи с тем, что МКА 7C11 были неконъюгированными, мы также выполняли исследование в 4-этапной реакции иммуофлюоресценции. В ходе проведенных исследований было обнаружено, что оба МКА связывались с одними и теми же клетками периферической крови здорового донора (рис. 4.5).

Следовательно, распределение на клетках крови и типов (уровней) экспрессии эпитопа CD95, выявляемого МКА ICO-160, и эпитопа «А», выявляемого МКА IPO-4 и 7C11, были одинаковыми. Экспрессия тех и других эпитопов была более низкой на бластных клетках больных острым лейкозом и клетках лимфобластоидных

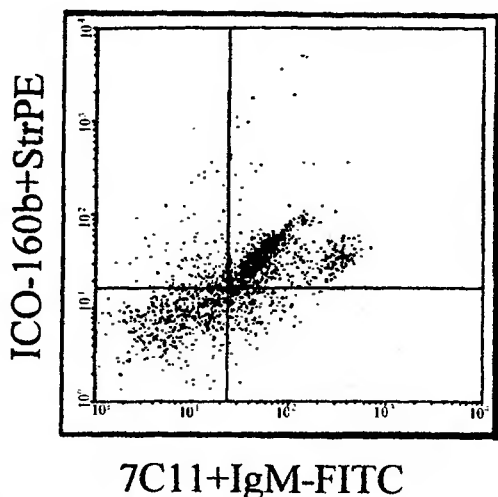


Рис. 4.5. Двойное окрашивание лимфоцитов здорового донора моноклональными антителами ICO-160 и 7C11

линий в сравнении с лимфоцитами периферической крови человека. Вместе с тем, МКА ICO-160 направлены, вероятно, не к эпитопу «А» молекулы CD95. Функциональные свойства МКА ICO-160 будут охарактеризованы в последующих разделах. Здесь же уместно отметить, что согласно данным VI Международного совещания по лейкоцитарным антигенам эпитоп группы А — это наиболее функционально активный эпитоп, связывание которого ведет к полному каскаду апоптотических событий в клетке, завершающихся фрагментацией ДНК.

4.5.3. Сравнение МКА ICO-160 и МКА UB2 против CD95(Fas/APO-1)-антигена методом двойного окрашивания

Дальнейшее изучение распределения эпитопов CD95 на гемопоэтических клетках проведено с помощью МКА ICO-160 против антигена CD95(Fas/APO-1) в сравнении с коммерческими МКА UB2 против антигена CD95(Fas/APO-1) [Yonehara S. et al., 1989; Kobayashi N. et al., 1990; Itoh N. et al., 1991; Watanabe-Fukunaga R.,

1992]. Отличительной чертой этих МКА против CD95(Fas/APO-1) антигена является то, что они не индуцируют апоптоз при взаимодействии с Fas-рецептором и не вызывают модуляцию этого антигена, а лишь определяют его наличие на поверхностной клеточной мембране. Подобными свойствами характеризуются МКА к эпитопу «С» молекулы CD95.

Четырехэтапная постановка реакции двойного окрашивания клеток создает массу трудностей. Во-первых, необходимо ставить множество контролей, во-вторых, требуются дефицитные хорошие изотип-специфические сыворотки, не дающие перекрестов с другими изотипами мышинных иммуноглобулинов. В связи с этим мы прямо конъюгировали МКА ICO-160 с FITC. Кроме того, использовали в своей работе коммерческие МКА UB2 против антигена CD95(Fas/APO-1), меченые фикоэритрином (PE).

Исследование проводили на клетках линий Jurkat, Molt-4, Raji, Daudi и HL-60. С этой целью 5×10^5 клеток инкубировали с 20 мкл МКА ICO-160, окрашенных FITC, при 4°C в течение 30 мин. После двукратного отмывания PBS к клеткам добавляли 20 мкл МКА UB2, меченых PE. Клетки снова инкубировали 30 мин в холодильнике и два раза отмывали PBS. Затем клетки ресуспендировали в 300 мкл PBS, содержащего 1 % формальдегид. Контролями служили неокрашенные клетки и клетки, окрашенные только одними из МКА.

Реакцию анализировали на проточном цитофлуориметре FACScalibur в программе DotPlot, где по оси абсцисс (FL1) располагались клетки, окрашенные FITC, а по оси ординат (FL2) — клетки, окрашенные PE. Маркер устанавливали по интенсивности флуоресценции клеток, окрашенных только одними МКА. Подсчет проводили по системе квадрантной статистики для этих приборов. При этом в квадранте 1 располагались клетки, окрашенные только PE, в квадранте 2 — клетки, одновременно окрашенные FITC и PE, в квадранте 3 — неокрашенные клетки, а в квадранте 4 — клетки, окрашенные FITC. Клетки квадранта 2 указывали на реакцию двух МКА с одной и той же клеткой. Локализация клеток в квадрантах 1 и 4 указывала на то, что оба МКА реагируют с разными клетками.

Результаты опытов при использовании обоих МКА ICO-160F и UB2PE в концентрациях по 20 мкл были неожиданными. Все окрашенные клетки располагались в квадранте 1, т.е. были окрашены только МКА UB2PE. Полностью отсутствовала реакция МКА ICO-160F, хотя в контроле, где к клеткам добавлялись только одни МКА ICO-160F, реакция была. Отсутствовали также клетки в квадранте 2 (одновременно 2 метки). Эта картина наблюдалась при постановке реакции на всех клеточных линиях — HL-60, Jurkat, Molt-4, Daudi. В контрольных образцах, окрашенных только МКА ICO-160F, реакция была нормальной, т.е. окрашенные клетки находились в квадранте 4. Результаты опытов могли быть легко объяснимы, если бы первыми вносились МКА UB2. Если оба МКА выявляют один и тот же эпитоп, то первые МКА блокируют связывание вторых. Результаты реакции объяснимы для клеток линии Raji, на которой прямо конъюгированные с FITC МКА ICO-160F не реагируют.

Было высказано предположение, что оба МКА распознают один и тот же эпитоп, но МКА UB2 обладают большей аффинностью и вытесняют связавшиеся первыми МКА ICO-160F. Были поставлены опыты по определению равновесного состояния, когда ненасыщающее количество МКА UB2 оставляет свободные сайты для связывания МКА ICO-160F. С этой целью, после инкубации клеток с 20 мкл МКА ICO-160F и последующей двукратной отмывки к клеткам добавлялись различные количества МКА UB2PE (разведения 1/4, 1/10, 1/50, 1/100). Действительно, оказалось, что при разведении МКА UB2PE в 50 или 100 раз, клетки переместились в квадрант 2, т.е. были окрашены обоими МКА (рис. 4.6). Однако, как подчеркивалось выше, клеточные линии различались по степени экспрессии антигена на своей поверхности и, следовательно, для каждого вида клеток необходимо было подбирать ненасыщающее количество МКА. В табл. 4.6 представлена зависимость процентов антиген-положительных клеток, окрашенных двумя МКА, от разведения МКА UB2. При увеличении разведения увеличивается процент клеток с двойной меткой.

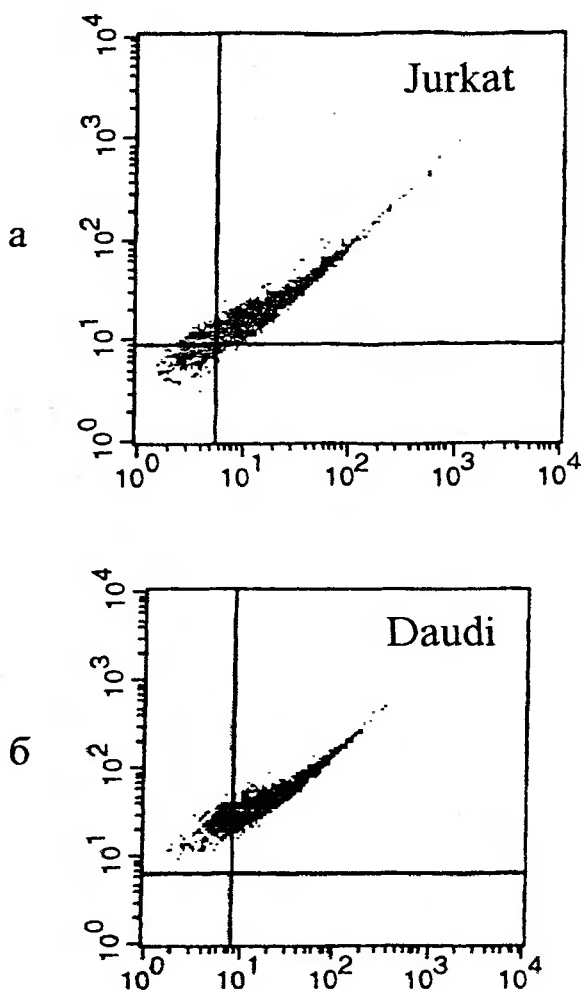


Рис. 4.6. Двойная окраска клеток перевиваемых клеточных линий Jurkat и Daudi МКА ICO-160F и UB2 PE.

a — ось абсцисс — интенсивность флуоресценции клеток, окрашенных МКА ICO-160F, *б* — ось ординат — интенсивность флуоресценции клеток, окрашенных МКА UB2 PE (1/100)

Таблица 4.6

Зависимость количества клеток, окрашенных МКА ICO-160F и UB2PE, от разведения МКА UB2PE

Клетки	Разведение МКА UB2	Процент клеток, окрашенных:		
		UB2	ICO-160	UB2+ICO-160
Jurkat	1 : 50	26,9	4,2	68,8
Jurkat	1 : 100	8,3	1,5	79,5

Затем двойное окрашивание клеток поставили в другой модификации — в один этап. 5×10^5 лимфоцитов периферической крови здорового донора инкубировали одновременно с двумя МКА, одно из которых (ICO-160) было мечено FITC, а второе — UB2PE. МКА ICO-160F были добавлены в объеме 20 мкл, а UB2 в разведении 1/100 в объеме 10 мкл. Объем МКА и разведение были подобраны, исходя из результатов предыдущих опытов. Инкубацию проводили при 4°C в течение 15 мин. Затем клетки два раза отмывали раствором PBS и ресуспандировали в PBS, содержащем 1 % формальдегид. Было обнаружено, что при такой постановке реакции оба МКА реагируют с 68 % лимфоцитов (рис. 4.7), 17 % клеток окрашивались только МКА UB2, а МКА ICO-160 не реагировали (квадрант 4). 15 % клеток не окрашивались МКА.

Таким образом, исходя из выше приведенных результатов, можно сделать вывод о том, что оба МКА распознают один и тот же или близкородственные эпитопы CD95, но МКА UB2 обладают большей аффинностью и вытесняют МКА ICO-160 с клеточной поверхности.

§ 4.6. Исследование МКА методом конкурентной ингибиции

Доказательством эпитопной идентичности двух МКА является блокада связывания МКА в опытах по конкурентной ингибиции.

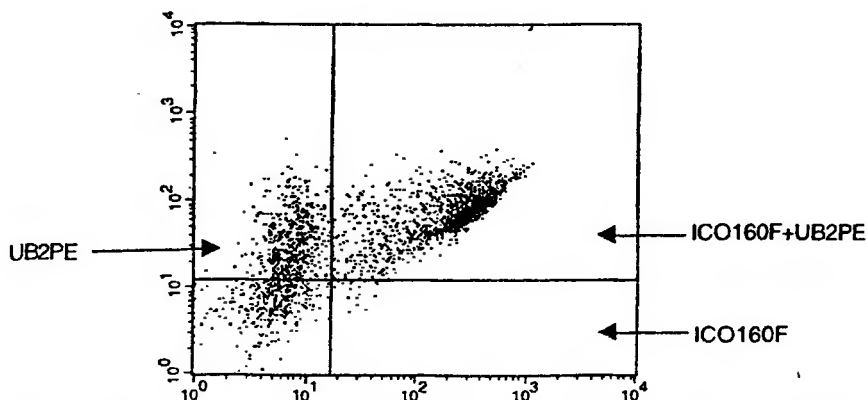


Рис. 4.7. Двойная окраска лимфоцитов периферической крови здорового донора МКА ICO-160F (20 мкл) и UB2 (1/100, 10 мкл) при одновременной инкубации двух МКА в течение 15 минут

Предварительным этапом в этой работе явилось определение блокирующей дозы МКА ICO-160, так как добавление недостаточного количества МКА может привести к отрицательному результату — остается возможность связывания другого МКА. Эти исследования выполняли на перевиваемых клеточных линиях. Различия в интенсивности экспрессии антигена CD95(Fas/APO-1) на перевиваемых клеточных линиях были также продемонстрированы нами в опытах по блокаде связывания немечеными МКА ICO-160 конъюгированных с FITC МКА ICO-160. Кроме того, исследовался температурный режим блокады и время инкубации.

1×10^5 клеток различных перевиваемых клеточных линий инкубировали 30 мин, 2 ч, 18 ч, 72 ч при комнатной температуре или при 37°C с различными концентрациями очищенных МКА ICO-160. Затем клетки отмывали 2 раза раствором PBS и инкубировали с мечеными FITC МКА ICO-160. Интенсивность ингибирования определяли наложением профилей иммунофлуоресценции друг на друга по программе Overlay и определением достоверности различий по Колмогорову—Смирнову.

Было обнаружено, что преинкубация клеток линии Jurkat с 20 мкг МКА ICO-160 в течение 30 мин приводила к полной

статистически значимой блокаде реактивности меченых FITC МКА ICO-160. На рис. 4.8 представлены результаты блокады связывания меченых МКА ICO-160 немечеными МКА ICO-160. После преинкубации клеток линии Jurkat с немечеными МКА ICO-160 интенсивность флюоресценции сместилась влево в зону негативного контроля. На рис. 4.8б продемонстрирована статистическая обработка данных по Колмогорову—Смирнову. Меньшие концентрации МКА ICO-160 не вызывали полную блокаду связывания меченых FITC МКА ICO-160.

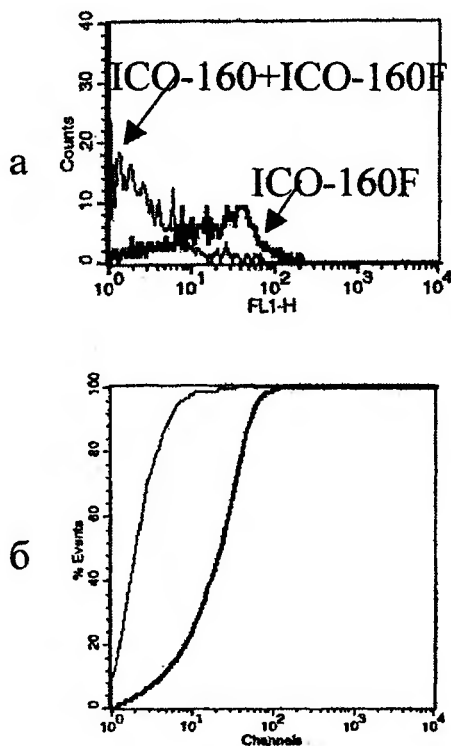


Рис. 4.8. Блокада связывания МКА ICO-160FITC немечеными МКА ICO-160 на клетках линии Jurkat.

a — профили флюоресценции МКА ICO-160, *б* — обработка кривых по Колмогорову—Смирнову

Аналогичные данные были получены с клетками линии HL-60. Преинкубация клеток с 20 мкг немеченых МКА ICO-160 в течение 30 мин полностью блокировала связывание с клетками меченых МКА ICO-160.

Напротив, преинкубация клеток линии Molt-4 или Daudi с той же самой концентрацией МКА в течение 30 мин, 2, 18 или 72 ч при комнатной температуре вызывала лишь частичную, но статистически значимую блокаду (рис. 4.9). Из рисунка видно, что после преинкубации с немечеными МКА ICO-160 интенсивность флюоресценции снижалась, но не достигала негативного уровня. Анализ по Колмогорову—Смирнову показал достоверность блокады. Еще слабее была блокада немечеными МКА ICO-160 на клетках линии THP1. Однако она также была статистически значима.

Увеличение дозы немеченых МКА ICO-160 с 20 до 100 мкг/мл приводило к полной блокаде связывания меченых МКА на клетках линии Daudi, но не на клетках линии THP1.

Таким образом, способность блокировать связывание меченых МКА ICO-160F немечеными МКА ICO-160 зависела от линии клеток и была оптимальной на клетках линии Jurkat и HL-60 в дозе 20 мкг. На клетках линии Molt-4 и Daudi полную блокаду МКА вызывали в дозе 100 мкг. Блокирующая способность не зависела от времени инкубации.

После обнаружения блокирующей дозы немеченых МКА ICO-160 мы перешли к основному опыту — блокаде связывания МКА UB2 против антигена CD95(Fas/APO-1).

Сначала мы инкубировали клетки линии Jurkat с 20 мкл МКА UB2, конъюгированными с фикоэритрином в течение 30 мин при 4°C, затем, после двукратного отмывания PBS, к клеткам добавляли 20 мкл меченых FITC МКА ICO-160. (По сути, та же двойная метка, но анализ проводили по гистограмме зеленой флюоресценции.) Было обнаружено, что МКА UB2 в столь малой концентрации полностью блокируют эпитоп, и МКА ICO-160 с клетками не связывались. Это свидетельствует о том, что оба МКА распознают тот же самый или близко расположенный эпитоп.

Затем мы выполнили ту же самую реакцию, но на первом этапе добавили блокирующую дозу немеченых МКА ICO-160, а затем

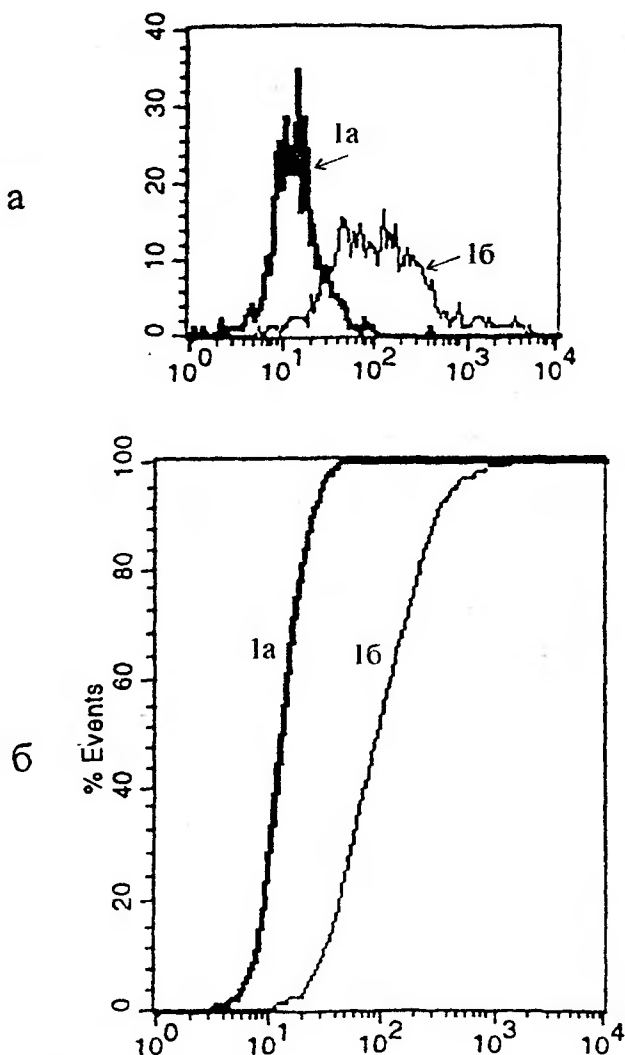


Рис. 4.9. Блокада связывания меченых FITC МКА ICO-160 немечеными МКА ICO-160 на клетках линии Daudi.

а: 1а — реакция МКА ICO-160FITC, 1б — преинкубация МКА ICO-160 и окраска ICO-160FITC; *б* — обработка кривой по Колмогорову—Смирнову, кривые те же

МКА UB2PE. Оказалось, что блокирующая доза МКА ICO-160 не блокировала полностью связывание МКА UB2PE, а вызывала лишь частичную блокаду связывания МКА UB2. Интересно отметить, что даже на клетках линии Raji, экспрессирующей меньшее количество антигена, не удалось получить полной блокады. С целью получения полной блокады мы начали увеличивать дозу блокирующих МКА. Было обнаружено, что даже инкубация 1×10^6 клеток с 2000 мкг МКА ICO-160 не приводила к полной блокаде. Результаты этих опытов свидетельствуют о том, что МКА UB2 обладают большей аффинностью и вытесняют из реакции МКА ICO-160.

Таким образом, можно сделать заключение о том, что различия в экспрессии антигена CD95(Fas/APO-1), выявляемые в разных лабораториях с помощью различных МКА, могут быть связаны, во-первых, с разной экспрессией антигена клетками, а во-вторых, с разной степенью интенсивности реакции иммунофлюоресценции, вызванной разным количеством молекул FITC, присоединившихся к одной молекуле антител. При большой концентрации FITC ($> 5 : 1$) сигнал сильнее, и прямо меченые МКА или МКА совместно со вторыми антителами выявляют больший процент антиген-положительных клеток, чем при меньшей концентрации FITC на молекуле антитела. Наибольший процент антиген-положительных клеток дают МКА, конъюгированные с фикоэритрином. Опыты по сравнению МКА ICO-160 с МКА UB2 показали, что они обладают одинаковой направленностью к антигену CD95(Fas/APO-1), выявляют тот же самый или близко расположенный эпитоп.

Совокупность данных, полученных при сопоставлении МКА ICO-160 и UB2, позволяет сделать ряд обобщений. Эпитопы, распознаваемые МКА, по-разному распределены на нормальных гемопоэтических клетках и лимфобластоидных клеточных линиях. Эпитоп антигена CD95, выявляемый МКА UB2, сильнее экспрессирован на клеточных линиях, чем на нормальных гемопоэтических клетках, а эпитоп, определяемый МКА ICO-160, более выражен на нормальных клетках, чем на клеточных линиях. Судить о том, представлены ли оба эпитопа только совместно на клетке,

или же есть клетки, экспрессирующие только эпитоп UB2, представляется затруднительным в силу более высокого аффинитета МКА UB2.

Суммируя результаты конкурентного ингибирования МКА UB2 и ICO-160, можно отметить, что ингибирование носит нереципрочный характер. МКА UB2 блокируют связывание ICO-160, а ICO-160 не блокируют UB2. В системе эпитопов молекулы CD95, детально охарактеризованной в ходе VI Международного совещания по лейкоцитарным антигенам, подобные нереципрочные взаимоотношения имеют место только между эпитопами «С» и «В». По данным литературы, МКА к эпитопу «С» (B-D29) полностью блокируют взаимодействие с клетками МКА к эпитопу «В» (B-G30 и B-L25). Однако МКА к эпитопу «В» не блокируют связывание с клетками МКА к эпитопу «С». МКА к эпитопу «С» характеризуются отсутствием способности к индукции апоптоза, что также характерно для использованных в нашей работе МКА UB2. Данные по однонаправленной конкурентной ингибиции, характерные только для МКА к эпитопу «С» молекулы CD95, дают дополнительное подтверждение того, что UB2 распознают эпитоп «С», а МКА ICO-160 — эпитоп «В».

Полученные нами данные дают новую информацию о взаимоотношении между эпитопами «В» и «С» молекулы CD95. Использование FITC-меченных МКА ICO-160 позволило показать, что эти МКА не только не блокируют связывание UB2, но и вытесняются с поверхности клетки этими МКА. Подобные данные о взаимоотношении МКА к эпитомам «В» и «С» установлены нами впервые, так как до настоящего времени для блокирования связывания тех или иных МКА к CD95 на первом этапе использовались немеченные МКА, и судить о том, что происходит с ними при последующем добавлении МКА к другому эпитопу, не представлялось возможным.

Физиологический смысл того, что предпочтение отдается связыванию функционально не активных эпитопов, следует, по-видимому, искать в особенностях дифференцировки и функциональной активности клеток. В этой связи заслуживает внимания тот факт, что функционально не активные (не способные

индуцировать апоптоз) эпитопы «С», судя по реакции МКА UB2, более сильно экспрессированы на незрелых лимфобластоидных клеточных линиях в сравнении с лимфоцитами. Это хорошо согласуется с общеизвестными данными о том, что апоптоз не играет сколь-либо значительной роли в дифференцировке незрелых лимфоидных предшественников и, напротив, является главным механизмом контроля активированных периферических лимфоцитов. Регуляция уровней экспрессии функционально не активных эпитопов может являться одним из механизмов реализации данного феномена.

§ 4.7. Определение молекулярной массы антигена, выявляемого МКА ICO-160

Очередным этапом характеристики МКА ICO-160 было определение молекулярной массы антигена, выявляемого этими МКА. С этой целью использовали новый безызотопный метод. Было обнаружено, что МКА ICO-160 иммунопреципитировали антиген с молекулярной массой 45 кДа который соответствует молекулярной массе антигена CD95(Fas/APO-1) (рис. 4.10).

Таким образом, по этому признаку МКА ICO-160 можно отнести к антителам, направленным к антигену CD95(Fas/APO-1).

§ 4.8. Эпитопная характеристика МКА ICO-160

На VI Международном рабочем совещании по лейкоцитарным дифференцировочным антигенам установлено существование трех эпитопов на молекуле CD95: А, В и С. Эти эпитопы характеризуются различным отношением к функции молекулы. Связывание с помощью МКА эпитопов А индуцирует апоптоз, связывание эпитопов С не ведет к апоптозу клеток, роль эпитопов В в индукции апоптоза изучена недостаточно. Охарактеризованные в ходе V Международного рабочего совещания (Бостон, 1993) МКА IPO-4, APO-1, Fas и 7C11 выявляют один и тот же эпитоп А (в случае

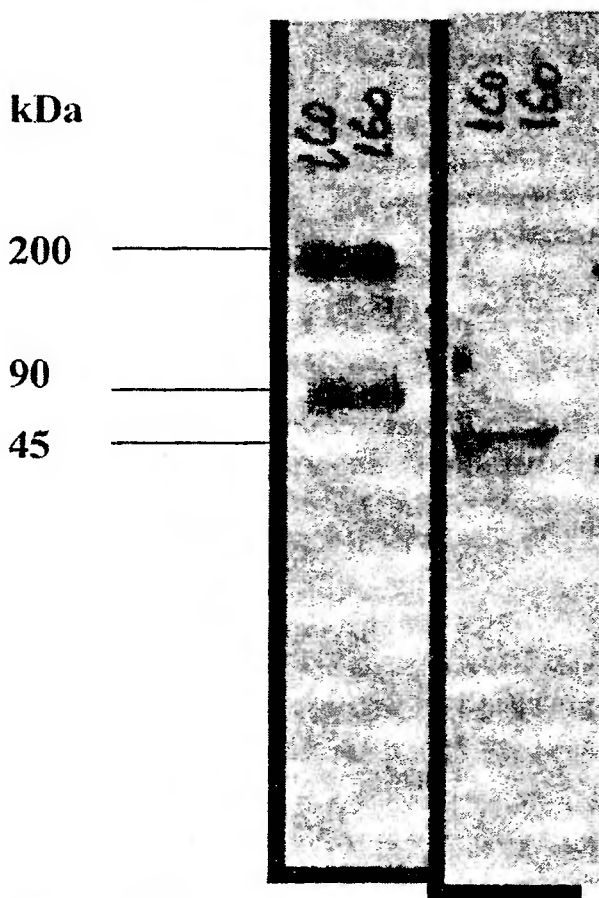


Рис. 4.10. Молекулярная масса антигена CD95(Fas/APO-1): не редуцирующие условия — 90 кДа, редуцирующие — 45 кДа

7C11) или очень близко родственные эпитопы [Robertson and Ritz, 1998]. По данным этих авторов МКА DX2 также распознают структуру, близкородственную эпитопу А.

Vermot-Desroches и соавт. (1998) установили, что МКА к CD95, представленные на VI Международном рабочем совещании по лимфоцитарным антигенам, имеют следующую эпитопную специфичность:

- эпитоп А: В-G27, В-E28;
- эпитоп А/В: В-G30, В-L25;
- эпитоп В: СН11;
- эпитоп С: В-G34, В-D29, В-K14.

До точного понимания эпитопной организации молекулы CD95 еще далеко, однако все исследователи сходятся в том, что эпитопы группы «С» не относятся к числу триггерных участков, воздействие на которые может инициировать процессы апоптоза.

Для определения эпитопной характеристики антигена, выявляемого МКА ICO-160, использовали МКА, стандартизованные в рамках Международных рабочих совещаний по дифференцировочным антигенам лимфоцитов человека, а также коммерческие МКА UB2.

Ввиду того, что МКА к различным эпитопам антигена CD95(Fas/APO-1) существенным образом не различаются по проценту выявляемых клеток, по гистограммам распределения флюоресценции, то основным признаком для определения эпитопной специфичности является способность индуцировать апоптоз в CD95-положительных клетках. В связи с этим была сравнена способность индуцировать апоптоз МКА ICO-160 и других МКА против вышеуказанного антигена.

Активация эндонуклеаз считается типичной при апоптотической гибели клеток и приводит к формированию фрагментов ДНК различного размера. Расщепление хроматина является многостадийным процессом. Первоначально в достаточно короткие промежутки времени образуются фрагменты ДНК в 300 кпо (килопар оснований, или килобаз) в виде гексамерной петли, названной розеткой. В этом процессе принимает участие топоизомераза II, расположенная вдоль хроматина с периодичностью 300 кпо. Последующее формирование фрагментов по 50 кпо и межнуклеосомальное расщепление ДНК происходят с участием СаХЬ²⁺-зависимых механизмов. Этот этап является критическим как для расщепления хроматина, так и для формирования апоптозных тел. В нем принимают участие как эндонуклеазы, так и протеазы.

При этом предотвращение формирования фрагментов по 50 кпо приводит к блокированию расщепления ДНК и апоптоза.

Деградация ДНК до олигонуклеосомных фрагментов, связанная с активацией эндонуклеаз, используется в настоящее время как один из биологических маркеров апоптоза. Вместе с тем неизвестны цели и механизмы фрагментации ДНК при данном процессе.

Существует ряд прямых и косвенных методов оценки фрагментации ДНК и расщепления ядерного хроматина в процессе апоптоза.

1. Электрофорез ДНК. Метод позволяет определить расщепление ДНК на дискретные фрагменты — так называемая ДНК-овая лестница.

2. Метод TUNEL. Принцип его состоит в флуоресцентном энзиматическом мечении фрагментов ДНК в местах разрывов. Результаты оцениваются цитофлуориметрически.

3. Окраска клеток пропидиумом иодидом. Отражает потерю части хроматина при образовании апоптотических телец, что выявляется в виде появления фракции гиподиплоидных клеток при цитофлуориметрическом исследовании.

Метод TUNEL является современным методом, позволяющим наиболее точно оценить сам факт фрагментации ДНК, при этом появление характерных для апоптоза дискретных фрагментов находит отражение в виде пиков флуоресцентного сигнала. Интенсивность флуоресценции обратно пропорциональна величине фрагментов ДНК: при полном расщеплении на фрагменты по 180–200 пб сигнал будет наиболее ярким, так как количество разрывов ДНК в этом случае максимальное.

Методом TUNEL оценка фрагментации ДНК в процессе апоптоза, индуцированного МКА против антигена *CD95(Fas/APO-1)*, проведена на линии клеток Jurkat. Согласно данным VI Международного рабочего совещания по дифференцировочным антигенам лимфоцитов, линия Jurkat является оптимальной моделью для изучения *CD95*-индуцированного апоптоза. Сравнили влияние связывания различных эпитопов *CD95* на фрагментацию ДНК клеток. В качестве стандарта использовали МКА IPO-4 к эпитопу «А» молекулы *CD95*. Известно, что связывание эпитопов этой

группы активно индуцирует апоптоз, опосредованный CD95. МКА ICO-160 и IPO-4 использованы нами в одинаковых концентрациях (0,1 мкг/мл), сравнение влияния на фрагментацию ДНК линии Jurkat МКА IPO-4 и ICO-160 проводилось в одни и те же сроки.

Результаты исследования продемонстрировали существование принципиальных отличий влияния на фрагментацию ДНК индукции апоптоза посредством связывания эпитопа «А». МКА к эпитопу «А» вызывали расщепление ДНК на достаточно мелкие гомогенные фрагменты, дающие при анализе на проточном цитометре FACScan яркий симметричный пик флуоресценции (рис. 4.11б). Эти данные подтверждают, что апоптоз, индуцированный через эпитоп «А» молекулы CD95, является завершенным и протекает до конечных этапов расщепления ДНК на мелкие фрагменты.

В опытах с применением МКА ICO-160 отсутствовал флуоресцентный пик, соответствующий флуоресцентно-меченым мелким фрагментам ДНК. Вместе с тем, внимательное изучение гистограмм флуоресценции, полученных при индукции апоптоза с помощью МКА ICO-160 (рис. 4.11в), показало их существенное отличие от контрольных (рис. 4.11а). Отличие состояло в том, что, в сравнении с контролем, пик флуоресценции переместился в зону положительных значений и приобрел как бы расщепленный характер. Подобная картина может наблюдаться лишь в случае расщепления ДНК на крупные фрагменты, что имеет место на этапе действия на ДНК топоизомеразы II. Характерной особенностью гистограмм флуоресценции при использовании метода TUNEL для оценки действия ICO-160 является полное отсутствие пика клеток, имеющих интактную ДНК (без разрывов). Следовательно, под действием МКА ICO-160 происходит фрагментация ДНК во всех клетках, однако размеры фрагментов соответствуют обратной фазе апоптоза. В большинстве клеток апоптоз, по-видимому, приостанавливается на этой фазе. И лишь сравнительно небольшая фракция клеток (чем определяется ее величина, на сегодняшний день неясно) подвергается процессам апоптоза до терминальных этапов. Пропорция этой фракции, судя по данным морфологического исследования с использованием ICO-160, составляет около 20 %. С этим, в определенной степени, согласуется и тенденция

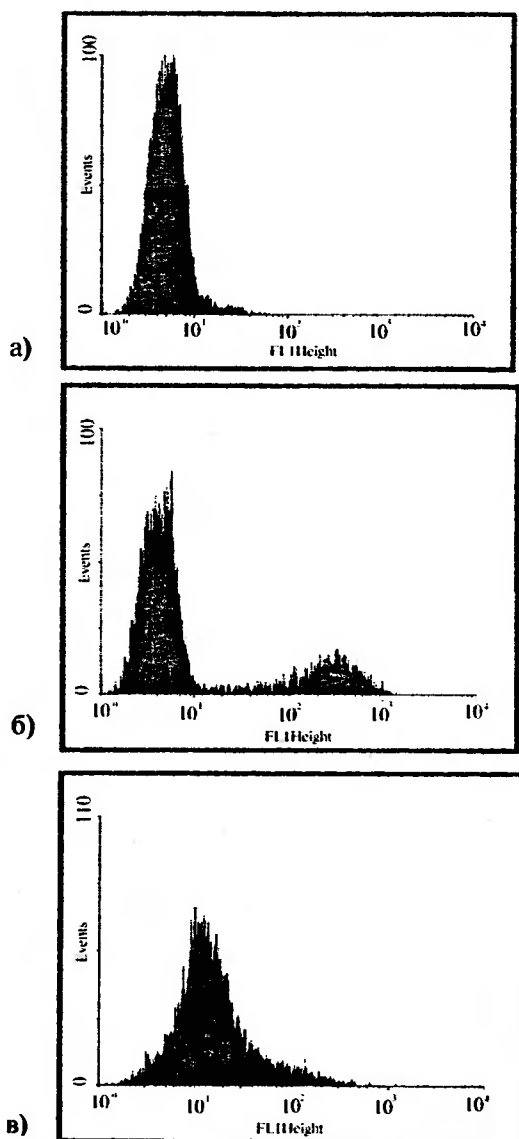


Рис. 4.11. Индукция апоптоза в клетках линии Jurkat (оценка методом TUNEL).

а — контроль, б — МКА IPO-4 (0,1 мкг/мл), в — МКА ICO-160 (0,1 мкг/мл),

к формированию небольшого пика клеток с более интенсивной флуоресценцией (более мелкие фрагменты ДНК, рис. 4.11б).

Этот интересный феномен, несомненно, нуждается в дальнейшем изучении. Полученные результаты дают основание предполагать различное отношение к функции у трех эпитопов молекулы CD95:

- эффективный апоптоз (эпитоп «А»);
- абортивный апоптоз (эпитоп «В»);
- отсутствие апоптоза (эпитоп «С»).

На основании этих опытов можно предположить, что МКА ICO-160 направлены против эпитопа В антигена CD95(Fas/APO-1).

Для подтверждения высказанного предположения использован иной методический подход — горизонтальный электрофорез ДНК в 3 % агарозном геле. Этот метод также широко применяется для изучения фрагментации ДНК при апоптозе. Опыты проведены на тимоцитах человека и на клетках линии Jurkat.

5 млн тимоцитов инкубировали с различными концентрациями очищенных МКА ICO-160 (100 мкг/мл, 50 мкг/мл, 10 мкг/мл или 1 мкг/мл) в течение 24, 48 или 72 ч при 37° С. Затем в клетках определяли фрагментацию ДНК в горизонтальном электрофорезе в 3 % агарозном геле. В качестве положительного контроля использовали индукцию апоптоза в тимоцитах глюкокортикоидами и МКА IPO-4.

Было обнаружено, что ни в одном из 6 опытов МКА ICO-160 не давали четкой «ДНК-овой лестницы» в электрофорезе. С другой стороны, глюкокортикоиды индуцировали апоптоз. МКА IPO-4 также четко не индуцировали апоптоз в тимоцитах. Мы так и не смогли получить четкой и однозначной картины. Возможно, это связано с достаточно низкой экспрессией эпитопов «А» и «В» на тимоцитах, а также с тем, что в физиологических условиях апоптоз не играет решающей роли в процессах негативной селекции незрелых Т-клеток. В то же время наши данные подтверждают сильное апоптотическое действие глюкокортикоидов на апоптоз тимоцитов. Эти процессы апоптоза не являются опосредованными

через CD95 и не зависят от уровней экспрессии эпитопов молекулы CD95(Fas/APO-1).

Более адекватной моделью для изучения CD95-опосредованного апоптоза являются клетки линии Jurkat. Мы индуцировали апоптоз в клетках линии Jurkat с помощью вышеуказанных концентраций МКА ICO-160 и IPO-4 в течение 24 ч. В качестве положительного контроля использовали индукцию апоптоза доксорубицином. Было обнаружено, что доксорубин вызывал образование ДНК-овой лестницы. Действие МКА было не столь однозначным. МКА IPO-4 вели к формированию четких дискретных низкомолекулярных фрагментов ДНК, а МКА ICO-160 подобным действием не характеризовались. Исключить фрагментацию ДНК до размера в 300 или более кпа в данном методе, однако, не представляется возможным, так как при электрофорезе в 3 % агарозе крупные молекулы могут задерживаться в месте их внесения в гель. Более пригодной для изучения начальных этапов фрагментации ДНК явилась бы 0,8 % агароза, однако мы рассчитывали на изучение терминальных этапов расщепления ДНК, для которых 3 % агароза вполне пригодна. В целом, полученные данные подтверждают результаты метода TUNEL и свидетельствуют о том, что под действием ICO-160 в ходе апоптоза ДНК в клетках Jurkat не расщепляется на мелкие фрагменты.

Конечным проявлением апоптоза является фрагментация клетки или потеря ею части хроматина, что может быть зарегистрировано в виде появления фракции гиподиплоидных клеток. Это может быть зарегистрировано цитофлуориметрически при окраске фиксированных клеток пропидиумом йодидом.

С целью отработки оптимальных условий индукции апоптоза мы исследовали время определения апоптоза, чувствительность разных клеточных линий к Fas-опосредованному апоптозу, зависимость от дозы и индукцию в жидкой и твердой фазе. Апоптоз регистрировали на проточном цитофлюориметре по окраске клеток пропидиумом йодидом. Использовали клеточные линии Jurkat, Daudi, KG1a, Molt-4, Raji, THP-1 и HL-60. Апоптоз определяли через 4, 18, 24, 48 и 72 ч после индукции МКА ICO-160. МКА исследовали в дозах 1 мкг/мл, 10 мкг/мл, 50 мкг/мл и 100 мкг/мл. Для

индукции апоптоза в твердой фазе пластиковые плато сорбировали 100 мкг/мл МКА ICO-160 в течение ночи. Адсорбцию МКА контролировали в ELISA.

Было обнаружено, что МКА ICO-160 индуцировали апоптоз в клетках линий Jurkat, Daudi, RG1a, Molt-4 и Raji приблизительно в 10 % клеток уже через 4 ч после начала инкубации. Разница при использовании жидкой или твердой фаз не была обнаружена. В этот срок МКА не индуцировали апоптоз в клетках линии HL-60, но через 18, 24, 48 и 72 ч после начала индукции регистрировали апоптоз также приблизительно в 10 % клеток. В отдельных экспериментах апоптоз проявлялся в 30–40 % клеток. Не обнаружилась зависимость от дозы МКА, используемой для индукции. Степень индукции апоптоза не зависела от «возраста» культуры.

Мы сравнили возможность индукции апоптоза в клетках переливаемой Т-клеточной линии Jurkat с помощью МКА ICO-160 и МКА IPO-4 при регистрации эффекта на проточном цитофлуориметре FACScan после окраски клеток пропидиумом иодиодом. Апоптоз регистрировали по появлению гиподиплоидного набора хромосом. Было показано, что инкубация клеток линии Jurkat в присутствии МКА IPO-4 в концентрации 0,1 мкг/мл приводила к апоптозу в 55 % клеток (рис. 4.12). В контрольных интактных клетках спонтанный апоптоз был в 13 % клеток (рис. 4.12). Результаты, полученные с помощью МКА ICO-160, лишь незначительно превышали контрольные цифры — апоптоз в 16 % клеток (рис. 6.20в). Исходя из исследований диапазона концентраций МКА ICO-160, вызывающих апоптоз в различных клеточных линиях, можно заключить, что концентрация 0,1 мкг/мл является субоптимальной для ICO-160 и оптимальной для IPO-4. Представленные ранее данные свидетельствуют о том, что действие МКА в этом концентрационном диапазоне можно установить только методом TUNEL.

Таким образом, можно заключить, что МКА выявляют «В» эпитоп антигена CD95(Fas/APO-1).

В рамках работы VI Международного рабочего совещания по дифференцировочным антигенам лимфоцитов человека провели сравнение способности индуцировать апоптоз МКА ICO-160

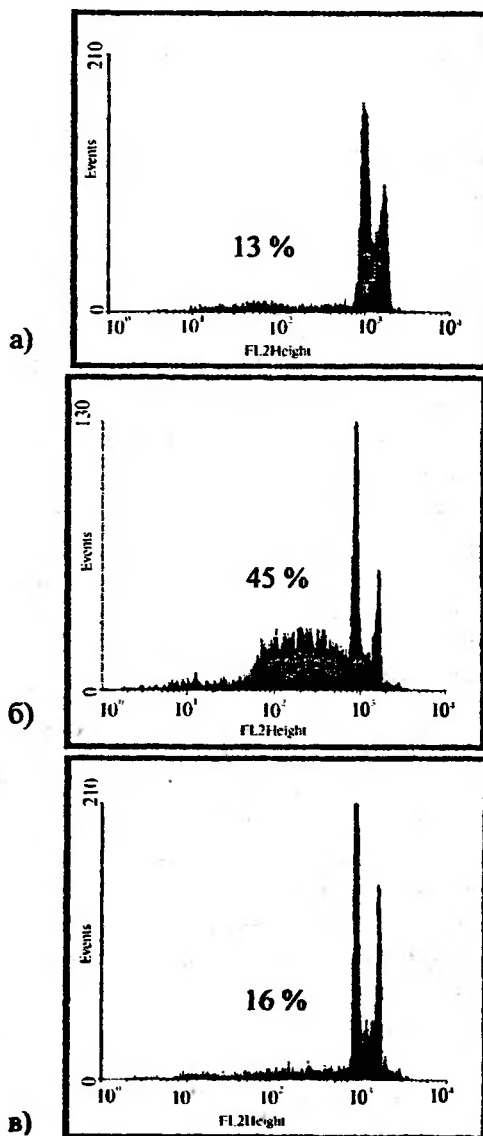


Рис. 4.12. Индукция апоптоза в клетках линии Jurkat (окрашивание пропидиумом йодидом).

а — контроль; *б* — МКА IPO-4 (0,1 мкг/мл); *в* — МКА IPO-160 (0,1 мкг/мл)

Таблица 4.6

Индукция апоптоза в клетках перевиваемых клеточных линиях
с помощью МКА против CD95(Fas/APO-1)-антигена

МКА	Raji	CEM	K30	THP-1	Jurkat
Контроль	14,0	2,0	2,7	9,5	1,8
C78	28,9	41,9	64,4	59,6	42,6
C101	9,2	4,1	7,5	12,8	8,0
C102	2,1	7,1	28,4	21,0	20,0
C103	7,2	4,2	7,9	16,1	5,0
C104	30,9	29,3	43,4	29,2	39,0
C105	6,9	2,6	3,7	5,0	4,0
C106	5,7	6,0	4,4	3,7	9,0
C107	12,5	1,3	15,5	15,0	14,0
ICO-160	19,5	2,5	2,7	6,4	3,0

и других МКА против этого антигена. Апоптоз оценивался по окрашиванию пропидиум йодидом. Как видно из табл. 4.7, только два из исследованных МКА индуцировали апоптоз во всех перевиваемых клеточных линиях (C78 и C104). Два других МКА (C102 и C107) индуцировали апоптоз только в некоторых линиях и в меньшем проценте клеток. МКА ICO-160 не индуцировали апоптоз.

Таким образом, представленные данные свидетельствуют о весьма сложной структурной и функциональной организации мембранной молекулы CD95 на нормальных и злокачественных гемопоэтических клетках. Спектр экспрессии эпитопов CD95 характеризуется определенными закономерностями. Клеточное распределение эпитопов «А» и «В» существенно не различается. Это — одна из причин, по которой ряд эпитопов группы «В» носит название «А/В». Эти эпитопы в равной степени экспрессированы на нормальных и злокачественных гемопоэтических клетках. Принадлежность МКА IPO-4 и 7C11 к эпитопу «А» хорошо известна. Так же хорошо известна и способность МКА к эпитопу «А» перекрестно блокировать друг друга. По этой причине опыты с двойной флуоресцентной меткой, при которых последовательное

нанесение и визуализация антител свидетельствуют о возможности одновременного обнаружения двух антигенов на мембране, противоречат специфичности ICO-160 к эпитопу «А» молекулы CD95. Вместе с тем, идентичность клеточной экспрессии эпитопа «А» и ICO-160 в норме и, что особенно важно, идентичность на бластных клетках, свидетельствуют о том, что МКА к двум эпитопам являются взаимозаменяемыми в иммунофенотипических исследованиях. Более того, наши исследования убедительно показали, что слабая экспрессия эпитопов CD95 на бластных клетках может выявляться в непрямой РИФ при использовании вторых антител с высоким отношением FITC/Ig.

Исследование МКА ICO-160 в параллели с МКА UB2 позволило уточнить специфичность обоих антител. Уникальный тип нересипрочных взаимоотношений между этими МКА был характерен для эпитопов «С» и «В» молекулы CD95. Характер клеточной экспрессии эпитопов «С» (UB2) и «В» (ICO-160) был различен, и эти МКА нельзя назвать взаимозаменяемыми. Высокие уровни экспрессии UB2 на лимфобластоидных клеточных линиях делают их, возможно, наиболее перспективными для исследований экспрессии CD95 при лейкозах. Однако здесь остается важный и не решенный вопрос, насколько полезно для клинической практики определение функционально неактивного (не способного индуцировать апоптоз) эпитопа.

В настоящее время убедительно доказано, что различные эпитопы CD95 по-разному влияют на индукцию апоптоза в клетках. Связывание эпитопа «А» приводит к апоптозу, связывание эпитопа «С» — нет. Результаты нашего исследования позволили установить особую, уникальную роль в индукции апоптоза эпитопа «В» молекулы CD95. МКА к эпитопу «В» (ICO-160) индуцируют апоптоз в небольшом проценте клеток: от 10 % до 30 % при цитофлуориметрическом анализе на гиподиплоидность и примерно в 20 % клеток по морфологическим данным. Вариабельность пропорции клеток, достигших терминальных стадий апоптоза после воздействия МКА ICO-160, регулируется на уровне процессов в ядре клетки после расщепления ДНК на крупные фрагменты. Первоначальные же процессы дезинтеграции ДНК затрагивают всю

популяцию CD95-положительных клеток, что было убедительно подтверждено методом TUNEL. Механизмы выбора клеткой программы выживания или апоптоза после воздействия на нее МКА к эпитопу «В» молекулы CD95 на сегодняшний день неясны.

Полученные данные хорошо согласуются с общей концепцией апоптоза, согласно которой изменения в ядре носят вторичный характер, и фрагментация ДНК не является обязательной для апоптотической гибели клетки. Более того, они согласуются и с тем, что дезинтеграция ДНК на крупные фрагменты не служит абсолютным подтверждением того, что клетка погибнет апоптозом: на этом этапе процесс еще является обратимым. Вместе с тем, только эпитопное картирование молекулы CD95 и определение роли различных эпитопов в индукции апоптоза позволили с количественных позиций подойти к механизмам регуляции данного явления. Отечественные МКА ICO-160 к эпитопу «В» представляют уникальный инструмент индукции незавершенного (абортивного) апоптоза и позволяют изучать терминальные стадии программированной гибели клеток.

Глава 5

Моноклональные антитела против CD95(Fas/APO-1)-антигена*

К настоящему времени описано около двух десятков моноклональных антител (МКА) против антигена CD95(Fas/APO-1). Приводим характеристики наиболее известных МКА.

§ 5.1. Моноклональные антитела anti-Fas

Моноклональные антитела anti-Fas (клон CH-11) IgM-класса получены Yonehara et. al. в 1989 г. В качестве иммуногена была использована клеточная линия человеческих диплоидных фибробластов FS-7. Одна гибридома из 20 000 гибридомных клонов, полученная в результате стандартной гибридомной технологии при слиянии спленоцитов иммунизированной мыши линии BALB/c и миеломных клеток линии NS-1, продуцировала МКА, которые имели цитолитическое действие на различные человеческие клеточные линии. Клонирование методом лимитирующих разведений проводили два раза. Цитолитическая активность полученных МКА anti-Fas была неотличима от цитолитической активности TNF. И более того, цитолитическая активность как anti-Fas, так и TNF усиливалась, когда клетки-мишени обрабатывали гамма-интерфероном, метаболическими ингибиторами (митомицин С, актиномицин D, циклогексимид) или когда их инкубировали с перечисленными факторами при высокой температуре (39° С). При этом человеческие клетки, чувствительные к цитолитической активности TNF, были чувствительны и к anti-Fas МКА, и цитолитическая активность как TNF, так и anti-Fas усиливалась при

* Автор — Е. Р. Полосухина.

обработке гамма-интерфероном (U937, HL-60, рабдомиосаркома A673, MOLT4B). Также авторы отмечают синергизм в цитолитической активности вышеперечисленных МКА по отношению к нечувствительной человеческой клеточной линии HT29 (карцинома толстой кишки), когда обработка гамма-интерфероном делала клетки чувствительными и к TNF, и к anti-Fas. Но, с другой стороны, клетки, чувствительные к anti-Fas, не обязательно чувствительны к цитолитическому действию TNF (клеточные линии диплоидных фибробластов FS-7 и TM-11). Также авторы с помощью вестерн-блоттинга на фракции плазматических мембран U937 клеток показали, что anti-Fas-специфическая полоса соответствует молекулярной массе Fas-антигена в 200 кДа, что отличает его от молекулярной массы TNF-R, равной 65 ± 32 кДа. Таким образом, Fas-антиген не идентичен TNF-R, хотя действие anti-Fas сходно с TNF в цитолитической активности. И поэтому авторы предположили, что клеточно-киллерная активность TNF опосредуется Fas-антигеном, ассоциированным с TNF-R. Далее Iton N. et al. (1991) поставили задачу показать, что цитолитическая активность anti-Fas-антител связана с Fas-антигеном. Anti-Fas МКА не реагировали с мышинными клетками. Поэтому, чтобы показать, что полипептид, кодируемый кДНК Fas-антигена, может опосредовать цитолитическую активность anti-Fas МКА, рекомбинантная человеческая кДНК была трансфектирована в мышинные клетки Т клеточной лимфомы WR19L и мышинные фибробласты L929. Отобранные трансфектированные клоны WR19L, экспрессирующие рекомбинантный Fas-протеин, инкубировали с различными концентрациями anti-Fas МКА (0–1 мкг/мл) при 37° С в течение 24 ч. Авторы показали, что МКА действуют в дозовой зависимости, полностью убивая клетки при инкубации в течение 24 ч и концентрации МКА 1 мкг/мл. МКА anti-Fas индуцируют апоптоз в Fas+ -клетках, что было показано с помощью электрофореза в агарозном геле, когда МКА в концентрации 300 нг/мл индуцировали фрагментацию хромосомной ДНК в WR19L-трансфектированных клетках. Фрагментированная ДНК была разделена на лестничные фрагменты с минимальным размером в 180 нуклеотидных пар, при этом ДНК-лестница была видна уже через 1 ч инкубации

с МКА, и более чем 60 % хромосомной ДНК были фрагментированы через 3 ч инкубации. В родительской же WR19L хромосомная ДНК сохранялась как высокомолекулярная форма после такой же инкубации с МКА. Также авторами была произведена оценка морфологических изменений в трансформированных L929 клетках с помощью электронного микроскопа. Поверхностные выпячивания мембраны становились видны уже через 3,5 ч инкубации с 1 мкг/мл anti-Fas МКА, что наблюдалось и в других апоптотических системах [Wyllie et. al., 1980]. Также коллективом авторов [Iton N. et. al., 1991] была уточнена молекулярная масса Fas-антигена. С помощью вестерн-блоттинга ими показано, что МКА anti-Fas выявляют антиген с молекулярной массой 43 кДа, что соответствовало вычисленной по аминокислотной последовательности молекулярной массе Fas-антигена (Мг 36 кДа). Различие может быть объяснено присоединением сахаров к двум N-гликозилированным сайтам, обнаруженным во внеклеточном домене Fas-антигена. Однако эта молекулярная масса, полученная при использовании мембранных фракций 3-х клеточных линий (КТ-3, трансформированного WR19L клона и F58-12а клона), значительно меньше, чем Мг в 200 кДа, которая была получена в Western блоттинге на фракции клеточной линии U-937 [Yonehara et. al., 1989].

В дальнейшем, используя МКА anti-Fas CH-11 как МКА-агонисты для рецептора, Fadeel B et. al. (1995) показали, что эпитоп, к которому они направлены, является линейным доменом, соответствующим аминокислотам 126–135 внеклеточного региона Fas/APO-1-антигена. Синтетические пептиды, направленные к этому домену, ингибировали апоптотическое действие anti-Fas МКА в чувствительной клеточной линии Jurkat. Компьютерное моделирование Fas/APO-1 показало, что этот анти-телосвязывающий эпитоп соответствует петле-шпильке, расположенной между вторым и третьим цистеин-обогащенными доменами Fas/APO-1. Эта узкая шпилька имеет довольно жесткую структуру из-за ограничений по гибкости дисульфидных мостиков и легко доступна для связывания антител. И поэтому отсутствие эффекта anti-Fas МКА на различные негемопоэтические Fas/APO-1-экспрессирующие опухоли авторы связывают

с мутациями в аминокислотной последовательности, необходимой для связывания антител, а не с дефектами внутриклеточной передачи сигнала.

Kobayashi N. et. al. (1990) показали, что клетки, инфицированные человеческим вирусом иммунодефицита, более чувствительны к цитолитическому действию anti-Fas МКА, чем неинфицированные клетки. Показано, что экспрессия Fas-антигена повышалась при действии интерферона-гамма (ITF- γ) в мышинной макрофагальной линии ВМ3 и мышинных фибробластах L929 или человеческой аденокарциноме HT-29, или в комбинации ITF-гамма и TNF- α в человеческих тонзиллярных В-клетках [Nagata S., 1995]. С помощью anti-Fas МКА СН-11 Effert T. et. al. (1996) показали, что индукция апоптоза МКА СН-11 связана с истощением содержания клеточного глутатиона, которое связывают с образованием свободных радикалов и последующими ДНК-нитевыми разрывами. Эта гипотеза, что anti-Fas МКА СН-11 вызывает клеточную смерть путем радикал-индуцированных ДНК-разрывов, по мнению авторов, соотносится со сходными результатами, полученными с TNF.

§ 5.2. Моноклональные антитела АРО-1

МКА АРО-1 получены Trauth B. C. et. al. в 1989 г. для характеристики клеточно-поверхностных молекул, вовлеченных в контролирование роста злокачественных лимфоцитов. В качестве иммуногена была использована человеческая В-лимфобластоидная клеточная линия SKW6.4. Было получено одно МКА, названное anti-APO-1, которое блокировало рост и индуцировало апоптоз в SKW6.4-клетках. Anti-Apo-1 МКА относятся к IgG3-классу, к-цепь, $KD = 1,9 \times 10^{-10}$. Anti-Apo-1 МКА связывают приблизительно 4×10^4 сайтов на поверхности SKW6.4-клеток. Они специфически иммунопреципитировали антиген АРО-1 из SKW6.4-клеток, который, при редуцирующих условиях, был выявлен при электрофорезе в SDS-полиакриламидном геле (SDS-PAGE) как полоса с молекулярной массой 52 кДа. Раздельно от актина (43 кДа), который неспецифически преципитируется с IgG3, anti-APO-1 специфически иммунопреципитировали минорную полосу в 25 кДа.

Этот 25 кДа протеин может представлять продукт деградации или быть нековалентно связанным с 52-кДа белком. Действие МКА anti-APO-1 имеет характерные для апоптоза черты, а именно, вызывает конденсацию цитоплазмы и выпячивание мембраны и эндонуклеазо-индуцированную ДНК-фрагментацию на участки, примерно в 180 нуклеотидных пар. Клеточная смерть, индуцированная anti-APO-1-антителами, является комплемент-независимой и запускается в бессывороточной среде или в культуральной среде с инактивированной сывороткой при 56° С через 30 мин. Она отличается от комплемент-зависимого лизиса морфологически и образованием ДНК-лестницы, а также независимостью от экзогенного Ca^{2+} . Авторы показали, что APO-1 экспрессируется на различных человеческих В- и Т-клеточных линиях (В-клеточные — SKW6.4, CESS, BJAB; Т-клеточные — Jurkat, Molt-4, CCRF-CEM), и не является на обезьяньей MLA-144 или мышиной Т-клеточной линии EL4 и на человеческой моноцитоидной линии. Anti-APO-1 МКА блокируют пролиферацию APO-1-позитивных вышеперечисленных клеточных линий через индукцию апоптоза, при этом образование ДНК-лестницы регистрировалось в каждом случае.

Известно, что МКА anti-Fas — IgM класса и, благодаря их мультивалентности, они перекрестно связывают Fas-антиген более эффективно [Robertson M. J. and Rütz J., 1994]. МКА anti-APO-1 IgG3-класса обладают присущей расположенностью к самоаггрегации через Fc-Fc-взаимодействия [Fadell B., et. al., 1996]. Эти исследования наводят на мысль, что натуральный лиганд для Fas/APO-1 может также быть функционально мультивалентным [Cohen P. L. et. al., 1995]. А факт, что Fas-лиганд является TNF-родственной молекулой, которая существует как тример [Smith and Baglioni, 1987], согласуется с этой гипотезой.

APO-1-антиген выявляется и на свежевыделенных лейкозных клетках больных Т-ОЛЛ [Trauth et. al., 1989]. APO-1-антиген не выявлен авторами на покоящихся В-лимфоцитах, однако экспрессируется на активированных В-клетках, и IgM-секреция уменьшалась при 3-х дневной обработке клеток anti-APO-1 МКА. Также APO-1 не выявлен и на покоящихся Т-лимфоцитах, хотя активированные Т-лимфоциты экспрессируют APO-1 и anti-APO-1, индуцируют

апоптоз и ингибирование роста этих клеток. Таким образом, авторы делают вывод, что АРО-1 является видоспецифичным антигеном, экспрессируемым на активированных и злокачественных лимфоцитах. Авторами также была проведена оценка действия anti-APO-1 МКА на опухолевый рост *in vivo*. Они выбрали Эпштейн-Барр-негативную, Беркитт-подобную лимфому ВJAB. Хотя она была наименее чувствительна к обработке anti-Fas МКА, но образовывала большую опухолевую массу в необлученных пу/пу/ мышах. Через 5 недель после инъекции ВJAB клеток мышам у них образовались опухоли диаметром от 1 до 2,5 см. Одна внутривенная инъекция АРО-1 в количестве 500 мкг/мышь привела к регрессии опухоли у 10 из 11 мышей менее, чем через 14 дней. Гистология срезов опухоли показала наличие морфологических изменений, характерных для апоптоза. Так как экспрессия АРО-1 на опухолевых клеточных линиях и тканях сделала для коллектива авторов явным потенциальную клиническую полезность применения МКА anti-APO-1 для регрессии опухоли на мышинной модели, то понимая проблематичность использования в терапии человека мышинных МКА, приводящих к выработке человеческих анти-мышинных антител, они опубликовали в 1994 г. очень интересную работу о получении химерных мышь-человек anti-APO-1 МКА (IgG3, каппа) [Coney L. R., Daniel P. T., Sanborn D., et. al., 1994]. Химерные МКА были получены в результате электропорации векторов, содержащих кодирующие последовательности вариабельных участков тяжелых и легких цепей anti-APO-1, в миеломные клетки SP2/0. В результате получены химерные МКА, имеющие постоянную область человеческого IgG3. Аффинность полученных МКА была сходна с мышинными anti-APO-1 МКА. Химерные МКА показали такую же способность ингибировать рост SKW6.4 В-лимфобластоидной клеточной линии, как и мышинные anti-APO-1. Хотя известно, что человеческие МКА IgG3-изотипа могут опосредовать антитело-зависимую клеточную цитотоксичность и фиксацию комплемента, ингибирование роста опухолевых клеток было отмечено в присутствии инактивированной сыворотки и в отсутствии эффекторных клеток, и поэтому ингибирование роста опухолевых клеток не зависело от перечисленных выше механизмов. В дополнение,

химерные МКА индуцировали образование ДНК-лестницы, что характерно для клеточной смерти путем апоптоза. Таким образом, химерные МКА сохраняли как связывающую, так и эффекторную функции, сходные с таковыми у мышинных МКА. И, кроме того, как химерные, так и мышинные anti-APO-1 МКА, были в равной степени способны опосредовать полную опухолевую регрессию SKW6.4 ксенотрансплантата в SCID-мышь путем индукции апоптоза. И индукция апоптоза была единственным механизмом опухолевой регрессии, так как ни мышинные, ни химерные anti-APO-1 МКА не показали противоопухолевой активности против ксенотрансплантатов солидной H53 опухоли (anti-APO-1-резистентной). Поэтому авторы сделали вывод, что химерные МКА anti-APO-1 способны эффективно индуцировать апоптоз и, вследствие этого, должна быть оценена их полезная способность вызывать регрессию опухолей, экспрессирующих APO-1-антиген. Однако химерные МКА могут использоваться как терапевтическое средство тогда, когда МКА направлены специфически к опухолевым клеткам, минуя нормальные интактные ткани (печень, почки), поэтому, чтобы увеличить специфичность, авторы предлагают использовать биспецифические МКА, направленные против Fas-антигена и подходящего опухолевого антигена.

§ 5.3. Моноклональные антитела IPO-4

Гбридома, продуцирующая МКА IPO-4, получена в результате соматической гибридизации клеток селезенки мыши линии BALB/с и миеломы P3-X63-Ag8.653 [С. П. Сидоренко и соавт.; Институт экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии им. Р. Е. Кавецкого НАН Украины]. Для иммунизации мыши использовали линию клеток RPMI-1788 [Сидоренко С. П. и др., 1990; Сидоренко С. П. и др., 1992]. Гибридизацию проводили в монослое с помощью 50 % полиэтиленгликоля с молекулярной массой 1500 Д (Loba Chemie, Австрия). В результате селекции гибридных клеток в ГАТ-ГТ-среде, клонирования и реклонирования методом лимитирующих разведений, получен штамм гибридных клеток E8,

продуцирующий антитела, обозначенные IPO-4 (IgM). Специфичность МКА изучали на 18 линиях клеток человека различного происхождения. Показано, что антиген, определяемый МКА IPO-4, экспрессирован на поверхностных мембранах клеток линии В-клеточного происхождения (RPMI-1788, PHS, GRO-B-лимфоциты человека, трансформированные вирусом Эпштейн-Барр, Naimalva, Ramos, Raji, EB-3 — лимфома Беркитта), Т-клеточного происхождения (CCRF-HSB2, Jurkat, CEM) и не выявлен на клетках линий MOLT-4, H9, MT-4, Daudi, RPMI-8226. Наиболее высокое содержание антиген-положительных клеток отмечено на клетках Jurkat (61 %). Менее дифференцированные Т-клеточные линии CEM и CCRF-HSB2 экспрессируют Fas-антиген на 10–20 % клеток. МКА IPO-4 не реагировали с линиями клеток нелимфоидной природы — K-562, MeWo, A-431. Установлено, что антиген, определяемый МКА IPO-4, имеет низкую плотность на 5–10 % Т-, В-, NK-клеток и моноцитов и преимущественно реагирует с CD2+CD3+CD45RO+ Т-клетками или Т-клетками памяти. Показано увеличение относительного содержания клеток, экспрессирующих антиген, выявляемый IPO-4, при стимуляции мононуклеаров периферической крови следующими митогенами: РНА, ConA, LPS, PWM и антителами к CD3 и CD28. Индукция IPO-4-антигена на В-клетках через IgM или CD20 не давала увеличения уровня IPO-4-антигена, в то время как активация через CD40 или анти-IgM была эффективной [Шалапская Л. Н. и др., 1996]. Таким образом, МКА IPO-4 выявляют активационный антиген, появляющийся при антигенной и митогенной стимуляции на Т- и В-клетках. По данным авторов антиген, определяемый МКА IPO-4, выявляется в единичных случаях на клетках периферической крови больных ХЛЛ и миеломной болезнью, в 30 % случаев при ОЛЛ. Антиген, распознаваемый МКА IPO-4, присутствует на поверхности клеток больных волосато-клеточным лейкозом и не определяется при ОМЛ. При исследовании биопсийного материала лимфатических узлов больных лимфогранулематозом выявлена локализация IPO-4-позитивных клеток в сохранившихся фолликулах. В фибробластах и эндотелиальных клетках антиген выявлен в цитоплазме, а также в миндалинах и регионарных лимфатических

узлах, удаленных у больных с опухолями нелимфоидной природы. По данным авторов, при использовании В-клеточных линий Ramos, REH, CESS и Т-клеточных линий MT-4, CEM, Jurkat для изучения индуцированного апоптоза установлено, что МКА IPO-4 подавляют пролиферативную активность и жизнеспособность Т- и В-лимфоцитов. Недавние исследования экспрессии Fas-антигена с помощью МКА IPO-4 показали, что 6 клеточных линий карциномы простаты (ALVA31, DU145, JCA1, LNCaP, NDI, PC3) экспрессируют Fas-антиген [Rokhlin OW., et al., 1997]. При этом МКА IPO-4 индуцировали апоптоз в 2 из 6 исследованных линий (PC3 и ALVA31). В цитоплазме 2-х резистентных клеточных линий (DU145 и NDI) с помощью вестерн-блотт анализа обнаружена значительная экспрессия p53, которая не выявлена у чувствительных линий. Авторы также показали, что Fas-резистентные линии DU145, NDI и JCA1 экспрессируют антиген CD40, который отсутствовал у Fas-чувствительных линий. А циклогексимид изменял фенотип резистентных клеточных линий от Fas-резистентности к Fas-чувствительности. Поэтому авторы подчеркивают, что апоптотический механизм существует в Fas-резистентных клеточных линиях и, таким образом, Fas-опосредованный апоптоз может быть целью для терапевтического вмешательства.

§ 5.4. Моноклональные антитела к мышиному Fas-антигену

В 1993 г. коллектив авторов Ogasawara J., Watanabe-Fukunaga R., Adachi M., Matsuzawa A., Kasugai T., Kitamura Y., Iton N., Suda T., Nagata S. сообщили о получении хомячковых МКА anti-Fas против мышинного Fas-антигена. Armenian хомячков иммунизировали клетками W4, которые представляют собой трансфецированные комплементарной мышиному Fas-антигену ДНК клетки линии WR19L. Гибридомные клетки получили в результате слияния клеток селезенки иммунизированной мыши с клетками мышинной миломы. Полученные клоны тестировали на FACS по связыванию МКА с трансформированной человеческой линией Jurkat, экспрессирующей мышинный Fas-антиген. Была отобрана одна гибридома

(Jo2), продуцирующая МКА IgG-класса. Эти МКА специфически распознавали Fas-антиген и иммунопреципитировали из лизата W4-клеток полосу в 45 кДа, а также оказывали цитолитическое действие на клеточные линии, экспрессирующие мышиный Fas-антиген (клетки W4 в дозовой зависимости). Авторы сообщали, что окрашивание мышинных тимоцитов этими МКА показало, что тимоциты мышей дикого типа и lpr *cg* экспрессируют Fas-антиген, в то время как лишь незначительная экспрессия Fas-антигена была выявлена у lpr-мышей. Когда эти МКА вводили интраперитонеально мышам, то через 6 ч погибали мыши, получившие 100 мкг МКА, а через 8 ч — половина мышей, получивших 10 мкг МКА. Когда МКА вводили мышам MRL+/+, MRL-lpr/lpr и MRL-lpr *cg*/lpr *cg*, то мыши MRL-lpr/lpr и MRL-lpr *cg*/lpr *cg* были резистентны к введенным МКА, в то время как MRL+/+ погибали так же быстро, как и BALB/c. Эти результаты показывают, что летальный эффект anti-Fas МКА зависит от связывания МКА и функционирующего Fas-антигена в тканях. Тот факт, что lpr *cg*-мыши, экспрессирующие нефункционирующий Fas-антиген, были резистентны к летальной дозе МКА, доказывает лишь незначительное вовлечение системы комплемента в этот процесс. Биохимический анализ сыворотки показал специфическое, значительное и быстрое увеличение уровня глутамат оксалоацетат трансминазы (GOT) и глутамат пируват трансминазы (GPT) после инъекции МКА, что говорило о повреждении печени. Гистологический анализ показал фокальное кровотечение и некроз в печени через 2 ч после инъекции МКА, в то время как электронная микроскопия гепатоцитов указывала на морфологические характеристики апоптоза. Эти результаты доказывали, что гепатоциты погибали вследствие апоптоза, хотя этот процесс происходил так быстро и широко, что гранулоциты и макрофаги не могли фагоцитировать апоптотические клетки, и в тканях развивался вторичный некроз.

В 1995 г. Nishimura Y., Ishii A., Kobayashi Y. et al. сообщили о получении хомячковых и крысиных МКА, направленных к мышиному Fas-антигену. Armenian-хомячки и Lewis-крысы были иммунизированы очищенным рекомбинантным растворимым химерным протеином mFas-AIC2A, и гибридомы были получены

при слиянии иммунных спленоцитов с мышинной миеломной линией NS-1. В результате были получены 8 продуцирующих клонов: 4 хомячковых клона С6-1, Р4-4, RK-8 и SK-8 и 4 крысиных клона RMF2 (IgG1), RMF6 (IgG2a), RMF9 (IgG2a) и RMF13 (IgM). Используя клеточные лизаты L5178Y/mFas (трансфектат), родительские клетки L5178Y, тимоциты BALB/с-мышей, тимоциты MRL+/-+-мышей, тимоциты MRL lpr/lpr-мышей, авторы показали, что МКА С6-1 иммунопреципитируют специфическую полосу, соответствующую молекулярной массе 48 кДа в L5178Y/mFas, BALB/с-timoцитах и MRL+/-+-timoцитах и не выявляют Fas-антиген в Fas-негативных L5178Y-клетках и MRL lpr/lpr-timoцитах. МКА RK-8 и RMF2 индуцировали апоптоз в Fas-экспрессирующих клетках в дозовой зависимости. При этом МКА RK-8 имели значительно более выраженный цитолитический эффект на мышинные тимоциты и клетки L5178Y/mFas, чем МКА Jo2. Мышинные тимоциты, сильно позитивные по Fas-антигену, одинаково погибали при действии RK-8 в отсутствии циклогексимида, хотя циклогексимид был необходим для апоптоз-активирующей активности МКА Jo2 на мышинные тимоциты. По мнению авторов, различная биологическая активность RK-8 и Jo2 связана с тем, что они распознают различные эпитопы Fas-антигена (RK-8 являются специфичными для аллотипа Fas на BALB/с- и MRL-мышях, в то время как Jo2 не являются аллотип-специфичными) [Nishimura Y. et. al., 1997]. Далее авторы показали, что проточная цитометрия мышинных клеток костного мозга, тимуса и спленоцитов выявила, что Т-клетки, за исключением костномозговых, экспрессируют Fas-антиген на своей поверхности. CD4-CD8-недифференцированные тимоциты экспрессируют Fas-антиген на низком уровне, в то время как незрелые CD4+CD8+-timoциты и зрелые CD4+CD8- и CD4-CD8+-timoциты показывают высокие уровни экспрессии Fas-антигена. CD4+CD8+-timoциты и CD4+CD8- тимоциты специфически чувствительны к anti-Fas индуцируемому апоптозу, а CD4-CD8- и CD4-CD8+-timoциты — резистентны. Также авторы показали, что уровень экспрессии и апоптоз-индуцируемая активность Fas-антигена на периферических Т-клетках прямо связана со стимуляцией через TCR in vivo. Известно, что введение

стафилококкового энтеротоксина В (SEB) BALB/с-мышам, экспрессирующим V β 8 Т-клеточный рецептор, вызывает массивную стимуляцию V β 8-положительных Т-клеток, которые специфически реагируют с SEB, и последующую их гибель от апоптоза. Такая клональная делеция селезеночных V β 8-положительных Т-клеток была сильно супрессирована у Irg-мышей, имеющих дефект в гене, кодирующем Fas-антиген. С другой стороны, у V β 8-положительных Т-клеток BALB/с-мышей, которым введен SEB, экспрессия Fas-антигена сильно повышалась именно на V β 8-положительных Т-клетках, но не на V β 6-положительных Т-клетках, которые не реагировали с SEB. И более того, V β 8-положительных Т-клетки были чувствительны к действию anti-Fas-антител, а V β 6-положительных Т-клетки — резистентны. Клетки селезенки резистентны к anti-Fas *in vitro*, хотя они экспрессируют Fas [Nishimura Y. et al., 1995]. *In vivo* действие RK-8 на селезеночные Т-клетки отличалось от действия *in vitro*. Введение RK-8 уменьшало количество Т-клеток селезенки до 1/3 по сравнению с количеством клеток у контрольной мыши и CD4+-селезеночные Т-клетки были более чувствительными к апоптоз-индуцирующей активности anti-Fas МКА, чем CD8-положительных Т-клетки. Таким образом, Fas ответственен за гибель активированных CD4-положительных зрелых Т-клеток *in vivo*.

§ 5.5. Характеристика МКА, отнесенных в CD95 кластер дифференцировки, на V Международном рабочем совещании по дифференцировочным антигенам лимфоцитов человека

На V Международном рабочем совещании по дифференцировочным антигенам лимфоцитов человека в Бостоне (1994 г.) получили характеристику следующие МКА, отнесенные в кластер CD95: anti-APO-1 (Krammer), anti-Fas (Yonehara), 7C11 (Robertson) и IPO-4 (Sidorenko). Обзорная статья по кластеру CD95 написана Robertson M. J. и Ritz J. (1994). В ней отмечено, что МКА Anti-APO-1, anti-Fas, 7C11 и IPO-4 специфично реагировали с мышинными

300-19 клетками, трансфектированными кДНК, кодирующим человеческий CD95-антиген, и не реагировали с нетрансфектированными клетками. Далее проведен анализ конкурентного ингибирования для того, чтобы определить, к каким эпитопам направлены исследуемые МКА. Преинкубация CD95+ -человеческих клеточных линий или Fas-трансфектированных мышинных клеток с неко- ньюгированными anti-APO-1, anti-Fas, 7C11 или IPO-4 фактически отменяла последующее окрашивание биотилилированными 7C11 МКА. Таким образом, anti-APO-1, anti-Fas, 7C11 или IPO-4, по-видимому, распознают один и тот же или рядом расположен- ные эпитопы CD95-антигена. Ультразонные исследования и анализ ДНК показали, что anti-APO-1, anti-Fas и 7C11 могут активировать программированную клеточную смерть. Хотя индук- ция апоптоза не была прямо показана МКА IPO-4, IPO-4 сильно ингибировали пролиферацию РНА (фитогемагглютинин) blastov, клеток SKW6.4 и клеток линии Jurkat. Как отмечают Robertson M. J. и Ritz J. (1994), экспрессия CD95 на тимоцитах окончательно не выяснена. Anti-Fas и IPO-4 МКА не реагируют с тимоцитами, тогда как МКА 7C11 показывают очень низкую реактивность. Хотя некоторые покоящиеся лимфоциты и моноциты экспрес- сируют CD95-антиген, на их жизнеспособность не влияют CD95 МКА. В противоположность, инкубация с МКА CD95 вызывает апоптоз в активированных Т-клетках, В-клетках, НК-клетках и ти- моцитах. Многие гемопоэтические клетки как лимфоидной, так и миелоидной природы, подвергаются программированной кле- точной смерти после инкубации с CD95 МКА. Морфологические изменения, характерные для апоптоза, заметны при электронной микроскопии клеток, обработанных МКА anti-APO-1 уже через 15–30 мин. А ДНК-лестница определяется через 2 ч после инкуба- ции чувствительных клеток с МКА anti-APO-1, anti-Fas или 7C11.

§ 5.6. Моноклональные антитела 7C11

В 1995 г. Robertson M. J. et. al. опубликовали данные по харак- теристике МКА 7C11. Методика получения МКА 7C11 заключается

в следующем: CD56-положительные NK-клетки выделяли из обогащенной NK-популяции PBL (обогащенную NK-популяцию получали из неприлипающих PBL с помощью негативной селекции, используя иммуномагнитные шарики) с помощью проточной цитометрии и культивировали с 20 % кондиционированной лейкоцитарной средой (LCM) и 1 мМ иономицина. После культивирования в течение 14–28 дней активированные NK-клетки собирали, ресуспендировали в стерильном PBS и вводили внутривентально 5-недельным самкам BALB/c-мышей. Спленоциты иммунизированной мыши сливали с миеломными клетками NS-1/1-Ag4-1, используя полиэтиленгликоль. Супернатанты нескольких гибридом сильно реагировали с LCM и иономицин-активированными NK-клетками и очень слабо реагировали или совсем не реагировали с покоящимися NK-клетками. Было определено, что супернатант одной такой гибридомы 7C11-0991-2 сильно ингибирует пролиферацию активированных NK-клеток. Эта гибридома была субклонирована дважды путем лимитирующих разведений, и был определен IgM-изотип. С помощью иммуноблота на выделенных мембранах клеток LAZ 388 В-лимфобластоидной клеточной линии с помощью МКА 7C11 получена специфическая полоса, соответствующая молекулярной массе 42 кДа, что согласуется с соответствующей молекулярной массой антигена APO-1 или Fas. Как anti-APO-1 МКА и anti-Fas, МКА 7C11 реагируют с мышинными клетками, трансфицированными кДНК, кодирующей человеческий Fas-антиген, и не реагируют с нетрансфицированными клетками. С помощью конкурентного ингибирования показано, что преинкубация YT-клеток с неконъюгированными 7C11 МКА полностью отменяет последующее окрашивание anti-APO-1. Преинкубация YT-клеток с anti-APO-1 МКА блокирует последующее окрашивание МКА 7C11. А окрашивание Fas-трансфицированных мышинных клеток биотинилированными 7C11 было заблокировано так же хорошо как anti-Fas МКА или неконъюгированными 7C11. Таким образом, авторы показали, что МКА 7C11, как и APO-1 и anti-Fas распознают один и тот же или рядом расположенные эпитопы APO-1/Fas-антигена. С помощью проточной цитометрии была определена экспрессия APO-1/Fas-антигена на нормальных и опухолевых

гемопозитических клетках с использованием МКА 7C11 IgM-класса. APO-1/Fas-антиген экспрессировался на 30–40 % покоящихся Т-клеток периферической крови, В клетках и моноцитах и примерно 5 % покоящихся НК-клеток и тимоцитов. Он не был обнаружен на гранулоцитах, эритроцитах и тромбоцитах. 80–90 % активированных Т-лимфоцитов, В-лимфоцитов и тимоцитов экспрессируют APO-1/Fas, как и большинство активированных НК-клеток. Обработка МКА 7C11 покоящихся лимфоцитов и моноцитов не оказывает влияния на их жизнеспособность. А активированные Т-клетки и НК-клетки подвергаются апоптозу уже через 3 ч обработки МКА 7C11. Так же как нормальные активированные лимфоциты, лейкозные и лимфомные клетки, экспрессирующие APO-1/Fas-антиген, подвергаются апоптозу *in vitro* после инкубации с МКА 7C11. В дальнейшем с помощью МКА 7C11 Kabelitz D. et. al. (1996) исследовали модуляцию поверхностных антигенов на трансформированных и нормальных Т-лимфоцитах как показатель раннего ответа на связывание Fas-антигена. Инкубация с агонистическими МКА 7C11 в жидкой фазе CD95-чувствительных клеток клеточной линии Jurkat вызывала значительное снижение экспрессии антигена CD62L, значительную модуляцию антигена CD7 и незначительное изменение в экспрессии антигена CD2. На экспрессию антигенов CD71 и CD3 инкубация с МКА 7C11 не влияла. При этом модуляция CD62L и CD7 регистрировалась через 60 мин. и достигала максимума через 4 ч. Чтобы показать, что для такой быстрой модуляции требуется функционирующий Fas-механизм, авторы получили Fas-резистентные варианты клеток Jurkat при культивировании родительских клеток в присутствии МКА 7C11. В резистентных клетках МКА 7C11 не индуцировали модуляцию CD62L и CD7. Исследование экспрессии антигенов на Т-бластах (PHA-активация) показало, что МКА 7C11 вызывают модуляцию CD2, CD4, CD8, CD7, CD44, CD11a(LFA1a), CD18(LFA1b) антигенов, наибольшую — в случае L-селекина (CD62L) и минимальную — в случае CD3. CD8-модуляция имеет место только на фракции CD8+-клеток. Экспрессия же антигенов CD25, CD26 и HLA-DR не изменялась при действии 7C11, таким образом, подтверждая, что модуляция поверхностных антигенов не является

неспецифическим следствием Fas-связывания. И, так как поверхностные антигены, модулирующие при действии МКА 7C11, в первую очередь вовлечены в межклеточные взаимодействия и адгезию, то можно предположить, что их редуцированная экспрессия отменяет способность Т-клеток к взаимодействию с соседними клетками и, таким образом, поддерживает процесс клеточной смерти.

§ 5.7. Моноклональные антитела против Fas/APO-1-антигена IgG1-класса

5.7.1. Панель моноклональных антител против Fas/APO-1-антигена M1, M2, M3, M23, M24, M31, M33, M35, M38

Для исследования дополнительных биологических функций Fas-антигена, кроме способности опосредовать программированную клеточную гибель, Alderson M. R., Armitage R. J., Maraskovsky E. et al. (1993) получили панель МКА против внеклеточной части человеческого Fas-антигена. BALB/с-мышь была иммунизирована очищенным белком, состоящим из внеклеточного домена человеческого Fas, соединенного с константной частью человеческого IgG1 (huFas.Fc), в адъюванте Фрейнда 7 раз, а затем селезеночные клетки были слиты с мышинной миеломой 8.653 в присутствии 50 % полиэтиленгликоля и 10 % DMSO с последующим культивированием в DMEM/НАТ- и DMEM/НТ-селективной среде. Супернатанты из позитивных лунок были протестированы по их способности связывать биотинилированный huFas.Fc в ELISA и по их реактивности с huFas.Fc в вестерн- и дот-блоттах. Гибридомы, продуцирующие МКА, которые связывались с huFas.Fc, но не с человеческим IgG1, были клонированы 3 раза методом лимитирующих разведений. В результате были отобраны 9 гибридом, продуцирующих МКА: M1, M2, M3, M23, M24, M31, M33, M35 и M38. Все полученные МКА были IgG1-изотипа. С помощью проточной цитометрии было показано, что все МКА реагировали с Fas-рецептором,

экспрессированным на клетках Jurkat и EBV-трансформированной В-клеточной линии МР-1. Однако добавление к Jurkat и МР-1 в растворе только huFas(M2) вызывало лизис в 17 %, клеток, по сравнению с 78 % при добавлении МКА СН-11, при сопоставимых концентрациях (1 мкг/мл). Однако при иммобилизации на культуральных платах у некоторых (M1, M2, M24), но не у всех МКА, которые были не способны индуцировать апоптоз в растворе, регистрировалась сильная способность к лизису. А в случае МКА huFas (M3), активность в твердой фазе становилась эквивалентной активности МКА СН-11 в жидкой фазе [Alderson M. R. et. al., 1994]. Была также оценена способность полученных МКА в растворе ингибировать лизис клеток Jurkat, индуцированный МКА СН-11. МКА M3 и M38 эффективно блокировали лизис, в то время как другие были или неспособны ингибировать процесс (M23, M31, M33), или показывали среднюю способность ингибирования (M1, M2, M24, M35). С другой стороны, МКА M38 были неспособны блокировать связывание СН-11 при регистрации с помощью проточной цитометрии, что говорит о том, что M38 направлены к эпитопу, отличному от распознаваемого МКА СН-11. Alderson M. R. et. al. (1993) также показали, что некоторые МКА (huFasM38) способны костимулировать пролиферацию Т-клеток в присутствии иммобилизованных CD3 МКА, при этом значительно усиливалась экспрессия раннего активационного антигена CD69 и р55 низкоаффинной цепи рецептора IL-2 (CD25), по сравнению со стимуляцией анти-CD3 МКА. Связывание Fas с иммобилизованными huFasM38 в присутствии CD3 МКА также индуцировало увеличение экспрессии молекул адгезии CD11a (LFA-1), CD18 и CD54 (ICAM-1). Человеческие тимоциты аналогично были костимулированы к пролиферации иммобилизованными huFas МКА в присутствии CD3 МКА. Таким образом, Fas-антиген способен не только индуцировать апоптоз в трансформированных клеточных линиях, но в нормальных клетках может быть вовлечен в клеточную активацию. Таким образом, перевод Fas-опосредованных сигналов от активации до апоптоза может быть частью процесса трансформации и может представлять безопасный

механизм иммунной системы для элиминации трансформированных клеток при стимуляции через Fas. Кроме того, этот перевод может происходить при повторяющейся антигенной стимуляции и, таким образом, представлять нормальный механизм контроля аккумуляции лимфоцитов *in vivo*, что наблюдается *in vitro* в хронически стимулированных CD4-положительных Т-клонах, которые лизируются, при культивации с иммобилизованными Fas МКА.

5.7.2. Панель моноклональных антител против Fas/APO-1-антигена VB3, WB3, ZB4, CBE

В 1997 г. Fadeel B., Thorpe C. J. et. al. опубликовали работу о получении МКА anti-Fas VB3, WB3, ZB4 и CBE в результате слияния мышинной миеломы NS-1 со спленоцитами мыши, иммунизированной фракцией плазматических мембран мышинных клеток WR19L12a (Т-лимфома), трансфецированных человеческой кДНК Fas-антигена. Гибридомные клетки отбирали по связыванию с трансфецированными клетками и отсутствию реакции с родительскими клетками WR19L и клонировали методом лимитирующих разведений. Все полученные МКА были IgG1-изотипа. Далее авторы проанализировали свойства панели МКА *in vitro*, а также провели эпитопную характеристику МКА. Было показано, что одно из исследованных МКА VB3 было высокоэффективным индуктором апоптоза в Fas/APO-1-экспрессирующей линии Jurkat. Инкубация его в жидкой фазе с клетками Jurkat приводила к образованию ДНК-лестницы через 6 ч, однако 40 % апоптотических клеток регистрировалось через 24 ч. В качестве положительного контроля были использованы МКА клона CH-11 anti-Fas. При этом следует отметить, что апоптоз, индуцированный VB3 МКА, задерживался примерно на 10 ч по сравнению с МКА CH-11. Авторы показали усиление цитолитического эффекта МКА VB3 при инкубации с вторичными антителами, которые добавляли к Jurkat-клеткам, предварительно инкубированным 2 ч с МКА anti-Fas IgG1-класса. Таким образом, полученные МКА VB3 оказались лучшими индукторами, чем описанные ранее [Dhein J. et. al., 1992].

Однако, как отмечали авторы, представленные результаты не подразумевали, что перекрестное связывание Fas/APO-1 на клеточной поверхности является ненужным. В соответствии с работой Dhein J. et. al., 1992, F(ab')₂-фрагменты МКА СН-11 были неактивны, пока не связывались с вторичными антителами, показывая, что бивалентности недостаточно для индукции апоптоза. В свете полученных результатов о пролонгированной кинетике апоптоза в случае с МКА VB3, можно сказать, что определенный lag-период необходим для того, чтобы произошла эффективная самоагрегация и перекрестное связывание. Другое МКА ZB4, распознающее тот же эпитоп, что и МКА СН-11, обладало способностью ингибировать СН-11-индуцированный апоптоз. Это говорит о том, что МКА IgG1-класса могут захватывать антителосвязывающий сайт Fas/APO-1-молекулы и поэтому не допускать связывания anti-Fas IgM-класса. Исследование эпитопа, к которому направлены МКА СН-11, показало, что им является линейный сайт, расположенный между вторым и третьим цистеин-обогащенными доменами внеклеточного домена Fas/APO-1-антигена [Fadeel B. et. al., 1995]. В этом исследовании авторы показали, что все МКА IgG1-класса распознают тот же линейный сайт, что и МКА СН-11, независимо от того индуцируют ли они (как VB3 МКА), ингибируют (как ZB4 МКА) или не оказывают эффекта (как WB3 и CBE МКА). Объяснение данной ситуации авторы видят в различной аффинности МКА, направленных к одному эпитопу: очень сильное связывание ведет к проявлению антагонистических свойств (как у ZB4), оптимальная аффинность МКА к эпитопу связана с апоптотическим эффектом (как в случае МКА СН-11 и VB3) и слабая аффинность МКА к эпитопу недостаточна для опосредования любых биологических эффектов (как у МКА WB3). Авторы также отмечают, что панель anti-Fas МКА реагирует не только с эпитопом I (аминокислоты 126–135), но также и с другим сайтом, который удален от первого и не имеет с ним гомологичной последовательности, хотя имеет структурную. И перекрестное связывание МКА может зависеть от структурного сходства эпитопа, который не участвует в передаче сигнала.

§ 5.8. Моноклональные антитела против цитоплазматического домена Fas-антигена

Цитоплазматический домен CD95(Fas/APO-1)-антигена является необходимым для передачи сигнала смерти, и за его роль в индукции клеточной смерти ему присвоили название домена смерти. МКА против этого домена получены в результате слияния спленоцитов мыши BALB/c, иммунизированной цитоплазматическим доменом человеческого Fas-антигена, и клеток мышинной миеломы Sp2/0-Ag14. Гибридные клетки культивировали на селективной среде, содержащей гипоксантин, аминоптерин и тимидин. Скрининг гибридомных клонов проводили с помощью блоттинга, используя GST-Fas-CD (fusion-белок), иммобилизованный на поливинилидиновой мембране Immobilon-P. Из 620 проверенных супернатантов были отобраны 15 позитивных клонов, которые были субклонированы дважды без фидерных клеток методом лимитирующих разведений. В процессе клонирования получен один клон (3D5), стабильно продуцирующий МКА IgG1 к изотипа [Kamitani T., Nguyen H. P. and Yeh E. T. H., 1997]. МКА распознавали эпитоп домена смерти Fas-антигена и, более того, клон 3D5 не реагировал перекрестно с доменами смерти таких протеинов, как FADD/MORT1, CD40 и TNFR1. Количество Fas-антигена, определяемого в вестерн-блот-анализе с помощью МКА 3D5, очень сходно с количеством, определяемым МКА против внеклеточного домена методом проточной цитометрии. В дальнейшем полученные МКА использовались для исследования биохимических событий, происходящих после стимуляции Fas-антигена анти-Fas МКА. В исследование были включены 3 Fas-экспрессирующие клеточные линии BJAB, Raji и Jurkat. Все три линии показали сходные образцы изменений вслед за активацией. Перекрестное связывание Fas-антигена МКА CH-11 приводило к образованию Fas-агрегатов с большей молекулярной массой, которые были стабильны в SDS и 5% b-меркаптоэтаноле. Их молекулярная масса была более 200 кДа, и они определялись через 10 мин. после инкубации с МКА CH-11 с максимумом через 120 мин., в то время как Fas-мономеры исчезали во времени. В Jurkat-клетках

мономеры становились неопределяемыми через 120 мин. В дополнение к Fas-агрегатам и мономерам, определялась также полоса в 97 (p97) кДа. В предыдущих исследованиях эта полоса не определялась, так как использовались только МКА против внеклеточного домена. p97 определялась в вестерн-блотте с помощью МКА 3D5 и МКА против С-терминального домена, показывая, что p97 находится в составе домена смерти Fas-антигена. При этом, несмотря на гетерогенность в молекулярной массе Fas-мономеров в различных клеточных линиях, p97 имеет постоянную молекулярную массу во всех клеточных линиях. Наилучшим объяснением является то, что p97 образуется при удалении внеклеточного домена Fas-агрегатов. При удалении различно гликозилированного внеклеточного домена, обработанные Fas-агрегаты из различных клеточных линий будут иметь единую молекулярную массу. То, что отщепление внеклеточных доменов Fas происходит, видно из наблюдения, что p97 не преципитируется анти-N-терминальными МКА. Далее авторы показали, что протеазы, такие, как протеазомы, калпаины, лизосомальные цистеиновые протеазы и члены семейства ICE, не принимают участия в образовании p97, а p97 образуется с помощью протеаз другой специфичности вслед за активацией Fas-рецептора. Биологическая роль p97 требует дальнейшего исследования. Современная концепция Fas-индуцированного апоптоза обращается к образованию смерть-индуцированного комплекса, который включает Fas-агрегаты, FADD/MORT1 и FLISE/MACH. p97 может принимать участие в передаче сигнала апоптоза. С другой стороны, образование p97 может down-регулировать сигналы клеточной смерти.

5.8.1. Характеристика CD95(Fas/APO-1) МКА на VI Международном рабочем совещании по дифференцировочным антигенам лимфоцитов человека

На VI Международном рабочем совещании по дифференцировочным антигенам лимфоцитов человека в цитокиновой секции были представлены на рассмотрение следующие МКА к CD95(Fas/APO-1)-антигену: С-62 (клон 7C11), С-64 (клон DX2), С-78 (клон

CH11), C-101 (клон B-D29), C-102 (клон -E28), C-103 (клон B-E27), C-104 (клон B-G30), C-105 (клон B-G34), C-106 (клон B-K14), C-107 (клон B-L25). Подтверждение их направленности было дано Y. Nakamachi and S. Yonehara, использовавшим клетки WR19L-12a, трансфецированные человеческой кДНК Fas-антигена, а также другими коллективами исследователей (Cattin M.-H. et. al., Varchetta S. et. al., Want D. et. al.), получившими аналогичные результаты. Показано, что все МКА реагируют с CD95/Fas, а два из них, C-78 и C-104, убивают WR19L-12a путем апоптоза, причем специфическая активность C-104 была в 100 раз меньше по сравнению с очищенными C-78 (CH-11). Другие 4 МКА (C-62, C-64, C-103, C-107) показали очень слабую активность по отношению к WR19L-12a клеткам. [Yonehara S. and Nakamachi Y., 1996]. Также проведено исследование способности представленных МКА индуцировать апоптоз на ряде других клеточных линий: человеческих Т-клетках (MT2, H9) и В-лимфоидных (Ramos, Bjab, Raji) [Meroni L. et. al., 1996]. Были протестированы все МКА, за исключением C-62 и C-64. Количество апоптотических клеток оценивали с помощью флуоресцентного микроскопа, используя в качестве красителя Hoechst 33342. Авторы показали, что клеточные линии MT2, H9, Raji и Bjab были высокочувствительны к Fas-опосредованному апоптозу, и способность МКА индуцировать апоптоз авторы связывали со специфическим связыванием МКА и мембранным Fas-антигеном. Наибольшую активность в индукции апоптоза показали МКА C-78 (CH-11), МКА C-105 и C-106 были неспособны индуцировать программированную клеточную смерть, а МКА C-103, которые показали наибольшую реактивность, индуцировали апоптоз лишь в небольшом количестве клеток. Другой авторский коллектив [Oberberg H.-H. et. al., 1996] исследовал способность панели CD95 МКА индуцировать активационно-индуцируемую клеточную смерть в клональной или поликлональной Т-клеточной популяции. Для этой цели Т-клеточные популяции инкубировали 1 ч с МКА, отмывали, а затем культивировали в течение ночи в платах, покрытых коза-анти-мышь (IgG+M) в присутствии или отсутствии anti-CD3 МКА ОКТ3. Т-клеточные популяции, анализируемые

в таких экспериментальных условиях, включали аллореактивные поликлональные CD4+- и CD8+-Т-клетки, также анализировали Fas-чувствительные трансформированные, CD4+-клетки Jurkat и *Staphylococcus aureus enterotoxin A* (SEA)-чувствительный клон CD4+ D894/25. Среди CD95-специфических МКА, МКА С-62 (7C11) и С-78 (CH-11) индуцировали апоптоз в поликлональных аллореактивных CD4+- и CD8+-линиях, а также в трансформированных клетках Jurkat и SEA-реактивном клоне D894/25. МКА С-103 также индуцировали апоптоз в поликлональных CD4-положительных Т-клетках, Jurkat и клоне D894/25, однако не индуцировали в поликлональных CD8+-клетках. Остальные МКА не индуцировали активационно-индуцируемую клеточную гибель при таких экспериментальных условиях. По мнению авторов, это связано с тем, что МКА, которые не индуцируют апоптоз, все — IgG1-класса, в то время как апоптоз-индуцируемые МКА — либо IgM-класса (С-62, С-78), либо IgG2а-класса (С-103). Эпитопная характеристика CD95-антигена дана двумя коллективами авторов Vermot-Deauroches C. et. al. и Robertson M. J. et. al. (1996). Robertson M. J., Ritz J. and Wang D. продолжили исследование CD95-кластера, получившего утверждение в рамках V Международное рабочее совещание, где Robertson M. J. and Ritz J. показали, что МКА APO-1, anti-Fas (CH-11), 7C11 и IPO-4, по-видимому, реагируют с одним и тем же или рядом расположенными эпитопами CD95-антигена. Исследования конкурентного ингибирования, проведенного в рамках VI Международного рабочего совещания, на В-лимфобластоидной линии JY показало, что МКА С-62(7C11), С-78(CH-11), С-103(B-G27) и С-104(B-G30) реагируют с одним и тем же или рядом расположенными эпитопами (названными «эпитоп А») CD95-антигена. МКА С-64, С-101 и С-107 могут реагировать с эпитопом, расположенным недалеко от А-эпитопа, а МКА С-102, С-105 и С-106, по-видимому, реагируют с эпитопом, который находится далеко от А-эпитопа, хотя С-102 может реагировать и с эпитопом рядом с А. Далее авторами проведено исследование способности МКА индуцировать апоптоз. МКА С-62, С-78, С-103 и С-104 показывают значительный апоптоз в JY-клетках при инкубации в течение ночи. Апоптоз также после-

довательно индуцируется, но с меньшим процентом МКА С-64, С-102 и С-107. МКА С-101, С-105 и С-106 не индуцируют апоптоз. Таким образом, МКА С-62, С-78, С-103 и С-104 являются сильно агонистическими, МКА С-64, С-102 и С-107 — слабо агонистическими и МКА С-101, С-105 и С-106 — неагонистическими. Сходное заключение было получено Vermot-Deauroches С. et. al., которые с помощью проточной цитометрии на В-клеточной линии SKW6.4 показали, что представленные МКА направлены к 3 эпитопам CD95-антигена: МКА С-102, С-103, С-104 и С-107 направлены к эпитопу А, МКА С-78, С-104 и С-107 — к эпитопу В и МКА С-101, С-105 и С-106 — к эпитопу С. Для выяснения роли различных эпитопов была исследована способность МКА индуцировать Fas-опосредованный апоптоз в SKW6.4-клетках. Процент апоптотических клеток определяли с помощью окрашивания пропидиум йодидом на проточном флюориметре. МКА С-64 (IgG1), С-78 (IgM), С-102 (IgG1), С-103 (IgG2a), С-104 (IgG1) и С-107 (IgG1) индуцировали апоптоз в SKW6.4-клетках, в то время как МКА С-101 (IgG1), С-105 (IgG1) и С-106 (IgG1) не индуцировали апоптоз. Таким образом, МКА, распознающие эпитоп А и эпитоп В, были агонистическими антителами. Как отмечают авторы, индукция бивалентными МКА программированной клеточной смерти была неожиданной, так как только мультивалентные IgM или агрегированные IgG3 CD95 МКА индуцируют апоптоз [Dhein J. et. al., 1992, Robertson M. J. and Ritz J., 1995]. Далее была исследована активность F(ab')₂-фрагментов МКА С-103 (IgG2a) и С-104 (IgG1). F(ab')₂-фрагменты МКА С-103 и С-104, тем не менее, индуцировали апоптоз, показывая, что Fc-фрагменты необязательны. С другой стороны, Fab-фрагменты МКА С-104 не индуцировали апоптоз, а Fab-фрагменты МКА С-103 могли запускать этот процесс. При связывании Fab-фрагментов С-104 с коза-анти-мышь антителами на клеточной линии SKW6.4 индуцировался апоптоз. Таким образом, на основании полученных результатов авторы делают вывод, что агрегация CD95 не является единственным ключом в инициации сигнала трансдукции, приводящего к апоптозу.

Глава 6

Апоптоз в иммунной системе

Апоптоз является процессом, который специфически удаляет ненужные или поврежденные клетки из организма, т. е. осуществляет контроль за гомеостазом. Во всех тканях апоптоз играет большую роль в процессе развития, поддерживает контроль за количеством клеток в органе и защищает от внутриклеточных патогенозов. Он также играет огромную роль в иммунной системе. Большинство развивающихся лимфоцитов погибает до созревания. Зрелые Т- и В-клетки также должны быть селектированы для удаления тех из них, которые распознают собственные антигены. Тонкий контроль за количеством лимфоцитов должен осуществляться для сохранения клеток, направленных против специфических антигенов, для поддержания клеток памяти и элиминации активированных клеток в конце иммунного ответа.

В процессе развития Т- и В-клеток перестраиваются гены рецептора антигена для развития репертуара рецепторов, способных связываться с широким спектром чужеродных антигенов. В большинстве клеток перестройка генов не образует генов, способных продуцировать функциональные рецепторы антигенов, и эти клетки погибают путем апоптоза. В процессе позитивной селекции Т-клетки, которые продуцируют рецепторы, не связывающиеся с собственными антигенами гистосовместимости, также элиминируются. Большинство лимфоцитов погибает на этой стадии созревания [Shortman K. et. al., 1990; Osmond D. C., 1991]. Клетки, которые распознают собственные антигены, тоже удаляются. Этот процесс назван негативной селекцией. Он также осуществляется путем апоптоза [Robey E. A. et. al., 1992; Surh C. D., Sprent J., 1994; Smith C. A. et. al., 1994; Nossal G. J., 1994].

В отсутствие болезни количество зрелых лимфоцитов в периферической крови остается постоянным. Как только новые лимфоциты продуцируются путем митоза, равное количество лимфоцитов погибает вследствие апоптоза. Механизм контроля за этим гомеостазом неизвестен. Возможно, он контролируется факторами роста.

Апоптоз также используется для удаления зрелых лимфоцитов более специфическим образом. Аффинное созревание антигенового ответа происходит в зародышевых центрах лимфоидных фолликулов. Только те В-клетки, которые в результате соматической мутации приобретают рецепторы с достаточной аффинностью даже для небольшого количества антигена, выживают в этом процессе. Клетки, несущие низкоаффинный рецептор, умирают путем апоптоза. В результате этого только немного высокоаффинных В-клеток остается в конце иммунного ответа, часть из которых затем персистирует как клетки памяти.

В Т-клеточном ряду зрелые клетки, которые постоянно активируются высоким уровнем антигена, подвергаются апоптозу. Специфические цитотоксические Т-лимфоциты способны индуцировать апоптоз в других клетках, если необходимо их удалить вследствие инфицированности.

Тонкие механизмы контроля и индукции апоптоза в иммунокомпетентных клетках до конца неизвестны. Это может осуществляться путем изменения уровня цитокинов, вследствие изменения микроокружения, в результате контроля через Fas-рецепторно/лигандную систему, при контроле онкогенами, регулирующими апоптоз и др. Мы рассмотрим только некоторые из механизмов регуляции апоптоза в иммунной системе и, в первую очередь, CD95(Fas/APO-1)-рецепторно/лигандную систему.

§ 6.1. Экспрессия и функция CD95(Fas/APO-1)-антигена на иммунокомпетентных клетках

Антиген CD95(Fas/APO-1) экспрессирован у человека на кортикальных тимоцитах, активированных Т- и В-клетках, моноцитах [Debatin K.-M. et al., 1990; Miyawaki T. et al., 1992].

Антиген CD95 дифференцированно экспрессирован на субпопуляциях тимоцитов. Экспрессия антигена CD95 на тимоцитах возрастает параллельно приобретению антигенов CD4 и CD8 [Andjelic S. et. al., 1994]. Наивысшая экспрессия антигена — на двупозитивных CD4+CD8+-timoцитах, а на более зрелых стадиях дифференцировки тимоцитов она снижается [Mariani S. M. et. al., 1994; Dappa J. et. al., 1993; Andjelic S. et. al., 1994; Debatin K. M. et. al., 1994]. Так как двупозитивная субпопуляция тимоцитов CD4+CD8+ описана как мишень для негативной селекции, высокий уровень экспрессии CD95 дает возможность предположить, что CD95-опосредованный апоптоз является механизмом негативной селекции. В самом деле, оказалось, что двупозитивные тимоциты погибают в результате апоптоза при их инкубации с мышинными фибробластами, трансфецированными CD95-лигандом или с МКА против антигена CD95 [Muller K. P. et. al., 1995; Ogasawara J. et. al., 1995]. Однако блокада CD95-опосредованного апоптоза не оказывает влияния на антиген-специфическую делецию двупозитивных тимоцитов *in vitro* [Muller K. P. et. al., 1995]. Это исследование показало, что CD95-система не вовлечена в антиген-специфическую делецию двупозитивных тимоцитов, ограниченную антигенами гистосовместимости 1 класса *in vitro*. Это же подтверждает факт, что клональная делеция тимоцитов, специфичных к эндогенному вирусному суперантигену, проходит нормально у мышей, лишенных (knock-out) CD95 [Adachi M. et. al., 1996]. У мышей, лишенных CD95-системы, тимоциты развиваются и не отличаются от тимоцитов нормальных мышей ни по количеству, ни по распределению [Adachi M. et. al., 1995; 1996]. В связи с этим, вопрос о возможной функции системы CD95 в тимусе остается открытым, а поиск других дилатационных систем или CD95-опосредованных функций в тимусе является весьма актуальным.

Сведения об экспрессии CD95(Fas/APO-1)-антигена на лимфоцитах периферической крови весьма противоречивы. Одни исследователи не обнаруживают антиген на покоемщихся лимфоцитах, другие его выявляют. Так, Н. Lecher и соавт. (1996) сообщили о том, что покоемщиеся Т-клетки не экспрессируют CD95(Fas/APO-1)-

антиген [Lecher H. et al., 1996]. Однако большинство исследователей выявляют антиген на покоеющихся Т-клетках. По данным М. Massaia и соавт. (1995), у здоровых взрослых людей Fas-антиген экспрессирован на $23,8 \pm 16$ % Т-клеток периферической крови [Massaia M. et al., 1995]. По сведениям А. Ю. Барышникова и соавт. (1996), антиген присутствует на $25,1 \pm 1,4$ % лимфоцитов периферической крови здоровых людей.

Т. Н. Заботиной и соавт. (1996) методом двойного окрашивания была изучена экспрессия антигена CD95(Fas/APO-1) на CD3+-лимфоцитах здоровых доноров. Как видно из рис. 6.1а, CD3-положительные клетки локализованы в квадрантах 1 и 2. При этом в квадранте 1 находились клетки, окрашенные только МКА ICO-90, а в квадранте 2 — клетки, окрашенные двумя метками. В приведенном случае у донора в периферической крови имелось 57 % Т-клеток. 45,3 % этих клеток также экспрессировали антиген CD95(Fas/APO-1), а 12,7 % содержали только антиген CD3. В 3 квадранте содержалось 30,7 % лимфоцитов, которые не реагировали с исследуемыми МКА. При исследовании 10 доноров среднее содержание CD95(Fas/APO-1)-антиген-положительных клеток среди CD3-положительных Т-клеток было равно $84,4 \pm 5,9$ %.

Антиген CD95(Fas/APO-1) экспрессирован на CD4- и CD8-субпопуляциях лимфоцитов человека. S. Aggarwai и S. Gupta (1997), используя МКА UB2, обнаружили CD95(Fas/APO-1)-антиген на 29 ± 5 % CD4-положительных лимфоцитах и на 35 ± 5 % CD8-положительных лимфоцитах периферической крови.

Заботина Т. Н. и соавт. (1996), используя МКА ICO-160, IPO-4 и UB2, выявили экспрессию антигена на части CD4+- и CD8+-клетках периферической крови. На рисунке 6.1б представлены результаты окрашивания лимфоцитов того же самого донора МКА ICO-86 против антигена CD4, меченых PE, и МКА ICO-160, меченых FITC. Как видно из рисунка, большинство, но не все CD4-положительные Т-клетки экспрессировали антиген CD95. В периферической крови этого донора было 43 % Т-хелперов. 8,5 % лимфоцитов экспрессировали только антиген CD4, а 34,4 % — оба антигена, т. е. 79 % Т-хелперов экспрессировали Fas-антиген.

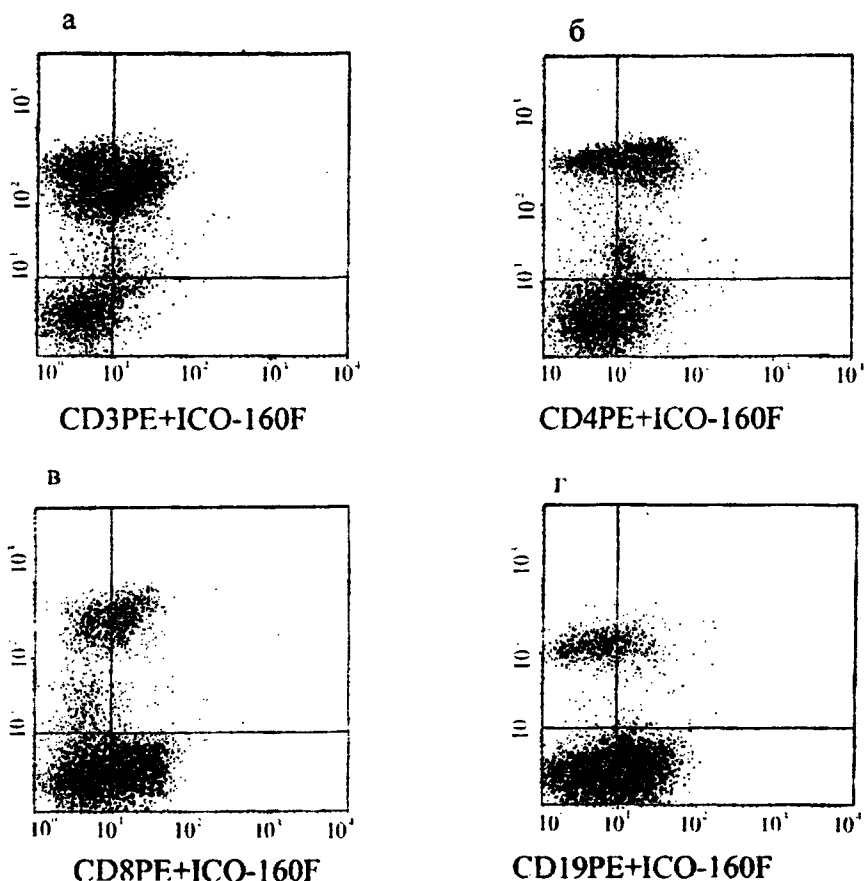


Рис. 6.1. Экспрессия антигена CD95(Fas/APO-1) на лимфоцитах периферической крови здоровых доноров

20,8 % лимфоцитов не экспрессировали оба антигена, а 36,2 % — только CD95 антиген.

Аналогичные результаты получили при анализе CD8-положительной Т-супрессорной/цитотоксической популяции (рис. 6.1 в). У донора было 29,2 % CD8+ -клеток. 8,2 % лимфоцитов экспрессировали только антиген CD8, а 21 % — оба антигена. Расчет показал, что 71,9 % Т-супрессоров экспрессирует антиген CD95(Fas/APO-1).

На рисунке 6.1 г представлены результаты окрашивания лимфоцитов донора МКА ICO-160 и МКА анти-CD19.

Как подчеркивалось выше, CD95(Fas/APO-1)-антиген экспрессирован на активированных Т-лимфоцитах. Маркером активации Т-клеток являются антигены CD25 (рецептор интерлейкина-2), CD71 (рецептор трансферрина) и антиген гистосовместимости II класса (HLA-DR). Среди лимфоцитов периферической крови анализируемого донора было только 5 % CD3 клеток, экспрессирующих HLA-DR антиген. Двойное окрашивание МКА UB2PE против CD95-антигена и ICO-1 против HLA-DR антигена показало, что все HLA-DR-положительные лимфоциты экспрессировали антиген. Таких клеток было 14 %. Следует подчеркнуть, что HLA-DR антигены экспрессированы на активированных Т-клетках и на всех В-лимфоцитах. Как показано выше, активированных Т-клеток было 5 %, а В-клеток — 10,5 %. Активированных лимфоцитов, тестируемых по рецептору трансферрина (CD71+) было 6 %, и все они имели CD95(Fas/APO-1)-антиген. Аналогичным образом, все CD25+ -лимфоциты экспрессировали CD95-антиген. Таким образом, можно сделать заключение, что все активированные Т-клетки экспрессируют CD95(Fas/APO-1)-антиген.

Т-лимфоциты подразделяют на две большие субпопуляции, в зависимости от контакта с антигеном — на наивные клетки и клетки-памяти. Маркером наивных клеток является антиген CD45RA, а маркером клеток памяти — антиген CD45RO. Наивные клетки или не экспрессируют CD95(Fas/APO-1)-антиген, или слабо экспрессируют [Lynch D. H. et. al., 1995; Miyawaki T. et. al., 1992; Klass C. et. al., 1995; Shinohara S. et. al., 1995]. По данным S. Aggarwal и S. Gupta (1998), среди наивных CD45RA+CD4+-хелперных клеток 6 ± 2 % экспрессируют антиген CD95(Fas/APO-1). С другой стороны, экспрессия антигена на CD45RO+CD4+-клетках-памяти была значительно выше — 25 ± 3 %. Антиген CD95(Fas/APO-1) был выявлен на 7 ± 2 % наивных CD8-положительных клеток и на 19 ± 4 % CD8-положительных клеток памяти. Экспрессию CD95(Fas/APO-1)-антигена на CD45RO-клетках также обнаружили T. Miyawaki и соавт. (1992) и Shinohara S. и соавт. (1995).

На нормальных лимфоцитах взрослых людей экспрессия Fas/APO-1-антигена регулируется экспозицией с интерлейкином-2, гамма-интерфероном или *S. aureus* штамма Cowan 1 [Owen-Schaub L. B. et. al., 1992; Moller P. et. al., 1993]. Экспрессия антигена повышается при активации Т-клеток МКА против CD3-антигена [Lecher H. et. al. 1996].

Свежеизолированные Т-клетки резистентны к апоптозу, индуцированному МКА против CD95(Fas/APO-1)-антигена [Owen-Schaub L. B. et. al., 1992; Aggarwai S., Gupta S., 1998]. Однако они приобретают чувствительность к Fas-опосредованному апоптозу после продолжительной активации *in vitro*.

Предполагают, что в покое лимфоцитах первичной функцией Fas-молекулы может быть необязательно апоптоз. Fas может быть аксессуарной молекулой, усиливающей клеточную активацию [Alderson M. R. et. al., 1993]. Обратимость Fas-опосредованного сигналирования от активации до апоптоза может быть механизмом регуляции пролонгированной Т-клеточной активации, индуцируемой повторной антигенной стимуляцией [Alderson M. R. et. al., 1993].

CD95(Fas/APO-1)-рецептор также экспрессирован на клетках лимфатических узлов. Т. Yoshino и соавт. (1994) изучали экспрессию CD95 (Fas/APO-1)-рецептора и *Bcl-2* в реактивных лимфатических узлах, в покое лимфоцитах периферической крови и лимфоцитах, активированных интерлейкином-4+анти-IgM-антителами, интерлейкином-2+анти-CD3-антителами, фитагемагглютинином+фарболовым эфиром. Клетки зародышевых центров экспрессировали большое количество Fas-антигена. В противоположность, *Bcl-2* отсутствовал в этих клетках. С другой стороны, лимфоциты мантийной зоны экспрессировали высокий уровень белка *Bcl-2* и мало CD95(Fas/APO-1)-антигена. Эта обратная экспрессия CD95(Fas/APO-1) и *Bcl-2* была показана исследователями и на активированных лимфоцитах из периферической крови. Активированные лимфоциты подвергались апоптозу в присутствии МКА анти-Fas дозо-зависимым образом, однако покоящиеся лимфоциты, экспрессирующие как *Bcl-2*, так и CD95(Fas/APO-1)-антиген, не подвергались апоптозу.

§ 6.2. Апоптоз, опосредованный CD3-рецептором

Связывание Т-клеточного рецептора антигена с моноклональными антителами (МКА) против антигена CD3 индуцирует в этих клетках апоптоз [Ashwell J. D. et. al., 1987; Shi Y. et. al., 1989; Ucker D. S. et. al., 1989; Shi Y. et. al., 1992; Liu Z.-D. et. al., 1994; Woronitz I. D. et. al., 1994; Ju S.-T. et. al., 1995; Vignaux F. et. al., 1995]. Однако появление продуктов гена, передающих «сигнал смерти», не обнаружено [Shi Y. et. al., 1992; Liu Z.-G. et. al., 1994; Waranitz I. D. et. al., 1994]. Периферические активированные Т-клетки от лимфопролиферативных мутантных мышей *lpr/lpr*, которые экспрессируют редуцированное количество CD95(Fas/APO-1)-рецептора, имеют дефект в апоптозе, индуцированном через Т-клеточный рецептор антигена (TcR) [Watanabe-Pukunega et. al., 1992; Russell J. H. et. al., 1993]. Этот факт навел исследователей на мысль о том, что в TcR-индуцированный апоптоз вовлечен CD95(Fas/APO-1)-рецептор [Dhein J. et. al., 1995; Brunner T. et. al., 1995].

Апоптоз, индуцированный МКА против CD95(Fas/APO-1)-рецептора, отличается от апоптоза, индуцированного МКА против CD3/TcR-комплекса, по следующим параметрам: кинетика анти-Fas апоптоза быстрее и не ингибируется циклоспорином А, циклогексимидом или актиномицином Д [Dhein J. et. al., 1995]. Эти различия могут быть вызваны прямым и косвенным путями индукции апоптоза. Активационно-индуцированный апоптоз в Т-клетках зависит от синтеза макромолекул [Ucker D. S. et. al., 1989; Shi Y. et. al., 1989; Green P. O. et. al., 1992], постоянно необходимого для синтеза *de novo* CD95(Fas/APO-1)-рецептора и Fas-лиганда. Он ингибируется циклоспорином [Shi Y. et. al., 1989; Mersed M. et. al., 1989], глюкокортикоидами [Zackarctuk C. M. et. al., 1990; Iwata M. et. al., 1991], ретиноидами [Iwata M. et. al., 1991; Yang Y. et. al., 1993], которые могут блокировать экспрессию молекул после активации. Активационно-индуцированный апоптоз также зависит от Мус/Max-гетеродимера [Shi Y. et. al., 1992; Bissanneta R. P. et. al., 1994] и Nur77-стероидного рецептора [Liu Z.-D. et. al., 1994; Wagonicz S. O. et. al., 1994], которые являются транскрипционными

регуляторами и могут регулировать экспрессию CD95(Fas/APO-1)-рецептора и Fas-лиганда в процессе активации.

Проведенные J. Dhein и соавторами (1995) эксперименты показали, что после связывания МКА анти-CD3 с комплексом CD3/TcR происходит индукция на поверхностной мембране Т-лимфоцитов Fas-лиганда, который, взаимодействуя с собственным CD95(Fas/APO-1)-рецептором, индуцирует в этих клетках самоубийство. Аналогичные результаты в другой системе получили Brunner T. и соавт. (1995). Эти исследования также были подтверждены фактом, что TcR-индуцированный апоптоз ослаблен в периферических активированных Т-клетках от мышей-мутантов с генерализованной лимфопролиферативной болезнью (gld/gld), которые экспрессируют нефункциональный Fas-лиганд [Russell J. H., Wang R., 1993; Ramsdell F. et. al., 1994; Takahashi T. et. al., 1994; Lunch D. et. al., 1994; Gillette-Ferguson I., Sidman C. L., 1994].

TcR-индуцированный апоптоз и роль в его реализации Fas-лиганда были продемонстрированы на уровне одной клетки [Dhein J. et. al., 1995].

Таким образом, реализация TcR-индуцированного апоптоза в Т-лимфоцитах происходит посредством активации CD95(Fas/APO-1)-рецептора и Fas-лиганда, а в целом процесс требует олиомеризации [Klass C. et. al., 1993; Kischkel F. C. et. al., 1995; Baumber C. B. et. al., 1996].

После экспозиции некоторых типов антигенов (суперантигенов) количество покоящихся Т-клеток быстро возрастает, а затем так же быстро снижается. Этот феномен называется «периферическая делеция». Этот процесс может играть роль в ограничении аутоиммунных реакций и в поддержании иммунного гомеостаза [R. J. Mogul et. al., 1995]. Активационно-индуцированная клеточная смерть также вовлечена в клональную делецию [Ju S.-T. et. al., 1995; Munn D. H. et. al., 1996; Noble A. et. al., 1998]. Высокоаффинное взаимодействие между Т-клеточным рецептором антигена (TcR) и пептидами главного локуса совместимости (МНС) реализуется в сильной коэкспрессии CD95(Fas/APO-1) и Fas-лиганда. Программированная смерть генерируется путем CD95(Fas/APO-1)/FasL-взаимодействия на активированных клет-

ках или между конъюгированными клетками. Этот механизм клеточной гибели требует участия продуктов двух генов смерти (два гена необходимы для одного сигнала смерти). Дефект в одном из них приводит к нарушению активационно-индуцированной клеточной смерти [Ju S.-T. et. al., 1995]. Неспособность периферических Т-клеток мышей *lpr* и *gld* подвергаться активационно-индуцированной клеточной смерти подтверждает решающую роль CD95(Fas/APO-1) и FasL в молекулярном взаимодействии и толерантности периферических Т-клеток [Russell J. H. et. al., 1993].

Как известно, МКА анти-CD3 мимикрируют действие фитогемагглютинина (ФГА), и распознающая антиген область МКА аналогична ФГА. Оказалось, что ФГА тоже может индуцировать апоптоз в TcR $\alpha\beta$ -положительной Т-клеточной линии L-KAW [Minegishi M. et. al., 1995].

Недавние исследования показали, что некоторые опухоли (меланома, аденокарцинома толстой кишки и рак печени) экспрессируют Fas-лиганд, который индуцирует апоптоз в CD95(Fas/APO-1)-положительных Т-лимфоцитах. Это может быть новым механизмом ускользания опухоли от иммунологического надзора.

Вопрос о вовлечении механизма CD95(Fas/APO-1)-опосредованного апоптоза в цитотоксическое действие НК-клеток остается открытым. А. Н. Montel и соавт. (1995) показали, что свежеезолированные человеческие НК-клетки (CD56+) и человеческая НК-подобная клеточная линия YT-INDY способны использовать CD95(Fas/APO-1)-опосредованный литический путь. Более того, они же показали, что в этой клеточной линии молекулы CD28/B7 и LFA-1/ICAM оказывают влияние на этот процесс. Y. Oshimi и соавт. (1996) также показали, что CD16+НК-клетки индуцируют Fas-опосредованный апоптоз.

§ 6.3. Th1-CD4-положительные Т-клетки

Опосредованная Т-клетками цитотоксичность является важной в резистентности против вирусов, в отторжении трансплантатов и опухолей. Т-клетки вовлечены в большое количество

различных эффекторных механизмов, включая секрецию перфоринов, гранзимов, АТР или поверхностных молекул, таких как TNFa и CD95L. Цитотоксические Т-лимфоциты убивают клетки-мишени двумя независимыми цитотоксическими механизмами [Lowin B. et. al., 1996; Berke G., 1995]. Один путь зависит от поляризованной секреции гранул, содержащих перфорины или гранзимы, вызывающие клеточную смерть через повреждение мембраны или ДНК. Он осуществляется CD8+-цитотоксическими/супрессорными клетками. Перфорины образуют поры в клетках-мишенях, а гранзимы являются сериновыми протеазами, содержащимися в гранулах клеток, которые попадают через поры в клетку-мишень. Один из гранзимов, гранзим В, индуцирует деградацию ДНК, ассоциированную с апоптозом [Shresta S. et. al., 1995]. Гранзим В может активировать апоптотическую цистеин протеазу CPP32 [Darmon A. J. et. al., 1995].

Однако недавно бы открыт другой механизм цитотоксического действия Т-клеток. Среди CD4+-хелперных/индукторных Т-лимфоцитов обнаружили субпопуляцию клеток, проявляющую киллерное действие в отношении клеток-мишеней [Gillette-Ferguson 1994; Stalder et. al., 1994; Ju S. T. et. al., 1994; Ramsdell F. et. al., 1994; Stalder T. et. al., 1994]. В отличие от CD8+-цитотоксических Т-лимфоцитов (ЦТЛ), которые убивают клетки-мишени посредством перфоринов или гранзимов, CD4+-киллеры убивают свои мишени по механизму апоптоза, т. е. передают сигнал апоптоза [Stalder T. et. al., 1994]. Исследование этих клеток показало, что они имеют цитокиновый фенотип Th1 CD4+-клеток, т. е. продуцируют интерлейкин-2 и гамма-интерферон, в отличие от Th2-клеток, которые продуцируют интерлейкин-1, интерлейкин-3, интерлейкин-4 и интерлейкин-12.

В последующем оказалось, что Th1+-клетки сильно экспрессируют на своей поверхности Fas-лиганд, тогда как Th2-клетки — очень слабо [Ramsdell F et. al., 1994]. Th1+- и Th2+-клетки различаются по чувствительности к активационно-индуцированной клеточной смерти (АИКС) [Ramsdell F. et. al., 1994]. Th1+-клетки чувствительны к АИКС, а Th2+-клетки — резистентны. Однако, Th2+-клетки становятся чувствительными к АИКС в присутствии Th1+-клеток.

Таким образом, соединяясь с CD95(Fas/APO-1)+клетками-мишенями, Th1-лимфоциты посредством Fas-лиганда передают им сигнал апоптоза. Таким путем иммунные Т-клетки удаляют лишние CD95(Fas/APO-1)+-клетки.

Экспрессии Fas-рецептора и Fas-лиганда на Th1- и Th2-хелперах прямо противоположны: если экспрессирован Fas-рецептор, то отсутствует Fas-лиганд, и наоборот [Hahn S. et. al., 1995].

Fas-лиганд-положительные клетки были обнаружены среди цитотоксических мононуклеарных клеток периферической крови, активированных иммуномодулятором ОК-432, используемым в протоколе адаптивной иммунотерапии злокачественных опухолей головного мозга [Toda K. et. al., 1996]. Эти клетки экспрессировали мРНК Fas-лиганда и индуцировали апоптоз в CD95+-глиомной клеточной линии T98G. Исследователи предполагают, что адаптивная иммунотерапия с использованием Fas-лиганд/Fas-рецепторной системы может быть новым терапевтическим подходом для терапии человеческих злокачественных опухолей головного мозга. Аналогичные результаты получили Y. Tomita и соавт. (1996) при исследовании регуляции CD95(Fas/APO-1)-опосредованного апоптоза при карциноме почки.

На мышинной модели показали, что NK-клетки имеют Fas-лиганд и способны убивать клетки-мишени по механизму апоптоза [Arase H. et. al., 1995].

Недавно был описан новый механизм регулирования Th1-клеток в процессе активационно-индуцированного апоптоза, индуцированного суперантигеном (стафилококковый энтеротоксин А). Активированные CD8+-клетки угнетают активированные Th1+CD4+-клетки по механизму Fas-опосредованного апоптоза [Noble A. et. al., 1998]. Эти активированные CD8+-клетки экспрессировали Fas-лиганд и убивали CD95(Fas/APO-1)-положительные Th1+CD4+, но не Th2-положительные Т-клетки, хотя сами были резистентны к Fas-индуцированному апоптозу, несмотря на экспрессию CD95(Fas/APO-1)-антигена.

CD95-рецепторно-лигандная система вовлечена в защиту от иммунологических реакций в иммунологически привилегированных тканях — в глазу, яичке и в центральной нервной системе

[Parihis L., Abbas A. K., 1997]. Раньше считалось, что эти ткани защищены от иммунных реакций, так как они изолированы от организма. Однако для глаз и яичек это оказалось неверным. Недавно было показано, что в роговице, сосудах и сетчатке глаза, а также в клетках Сертоли в яичке все клетки постоянно экспрессируют высокий уровень лиганда CD95. D. Bellgrau и соавт. (1995) показали, что аллотрансплантаты яичек от нормальных мышей не отторгаются у нормальных мышей, но трансплантаты от мышей *gld*, мутантных по CD95-лиганду — отторгаются. Гистологический анализ подтвердил, что нормальные клетки в трансплантате выживают благодаря тому, что они индуцируют апоптоз в инфильтрирующих лимфоцитах. T. S. Griffith и соавт. (1995) обнаружили, что герпес-вирус вызывает умеренную инфекцию в глазу у нормальных мышей, но вызывает деструктивное воспаление в глазах у *gld*- или *lpr*-гомозиготных мышей. Опять же, лимфоциты, инфильтрирующие глаз, подвергались апоптотической смерти и это сдерживало локальный иммунный ответ.

§ 6.4. CD2-опосредованный апоптоз

Антиген CD2 является неополлимофным рецептором с молекулярной массой 50 кДа, лигандами которого являются антигены CD58, CD59 и CD48 [Dustin M. L. et. al., 1987; Deckert M. J. et. al., 1992; Hann W. C. et. al., 1992; Arulanandam A. R. et. al., 1993]. CD2 участвует в активации Т-клеток как адгезионная и костимулирующая молекула [Bierer B. E. et. al., 1989]. Антиген CD2 также рассматривается как альтернативный CD3/TCR-активационный путь Т-клеток, так как определенная комбинация МКА против CD2 усиливает продукцию интерлейкина-2 *in vitro* и пролиферацию человеческих Т-клеток [Meuer S. C. et. al., 1984].

Преинкубация Т-лимфоцитов периферической крови человека с МКА против CD2-антигена индуцирует в них апоптоз. В покоящихся Т-клетках МКА анти-CD2 не индуцируют апоптоз [Mollereau B. et. al., 1996]. CD2-опосредованный апоптоз отличается от CD3-опосредованного и Fas-опосредованного апоптозов. Как описано выше, CD3-опосредованный апоптоз блокируется

реагентами, которые блокируют Fas-рецепторно-лигандную систему. Эти реагенты не блокируют CD2-опосредованный апоптоз. Для CD2-опосредованного апоптоза не требуются ни синтез новых белков, ни активация кальциенина. Это указывает на то, что латентная цитоплазматическая молекула смерти синтезируется при активации Т-клеток [Mollereau B. et. al., 1996].

CD95(Fas/APO-1)-опосредованный апоптоз в дифференцировке гемопоэтических клеток человека

Гемопоэтические клетки развиваются из самоподдерживающейся стволовой клетки и в процессе созревания проходят длинный путь дифференцировки. В процессе дифференцировки меняется как морфология клетки, так и ее цитохимические и иммунологические характеристики. В процессе дифференцировки выделяются дискретные этапы, которые четко отделяют один этап дифференцировки от другого. Морфологическими признаками этих этапов является бластная форма клеток и зрелая форма клеток. Для миелоидного ряда по морфологическим признакам можно еще выделить промежуточные этапы в процессе созревания нейтрофилов. Иммунологические методы позволяют определить гетерогенность в пределах морфологически однородной популяции клеток. С помощью моноклональных антител (МКА) выявлены дискретные этапы дифференцировки в пределах Т- и В-клеточного ряда. Процесс дифференцировки гемопоэтических клеток нехаотичен. В норме созревает столько клеток, сколько их необходимо для сохранения гомеостаза. На определенных этапах дифференцировки перед клеткой стоит вопрос: дифференцироваться или нет. Воспринимая сигналы извне от других клеток или посредством цитокинов, клетка или продолжает дифференцировку, или останавливается на некоторое время в дифференцировке, или погибает. До недавнего времени был неясен механизм передачи сигнала смерти извне. Затем было показано, что CD95(Fas/APO-1)-антиген, опосредующий апоптоз, может участвовать в механизме передачи в клетке сигнала самоуничтожения в процессе дифференцировки. Его роль в регуляции иммунного ответа уже достаточно хорошо известна. Можно

предположить, что и в процессе дифференцировки CD95(Fas/APO-1)-рецептор играет основную роль в самоубийстве «нежелательных» клеток, воспринимая сигнал от других клеток посредством Fas-лиганда.

§ 7.1. Экспрессия и функция CD95(Fas/APO-1)-антигена в миелоидном ряду дифференцировки

7.1.1. Иммунологические маркеры полипотентной стволовой клетки

Человеческий костный мозг состоит из гетерогенной популяции гемопоэтических предшественников. Эти клетки с различным фенотипом и функциональными свойствами происходят из примитивных гемопоэтических клеток, названных стволовыми клетками. Исследование гемопоэтических клеток-предшественников затруднялось из-за их небольшого процентного содержания среди клеток костного мозга. Гибридная технология создала удобный инструмент для изучения стволовых и коммитированных клеток — моноклональные антитела (МКА). С их помощью удастся обогатить и исследовать маленькие субпопуляции клеток. Наличием МКА против антигенов ранних этапов дифференцировки гемопоэтических клеток во многом определен прогресс в изучении стволовой клетки человека. Основными маркерами стволовой клетки человека являются антигены: CD34, CD90(Thy-1), CD38, HLA-DR, CD71, CD109 [Sutherland D. R. et al., 1996].

Антиген CD34

Антиген CD34 является высокогликозилированной муциноподобной структурой с молекулярной массой 115 кДа и с неизвестной функцией [Civin C. et al., 1989; Sutherland D. R., Keating A. 1992]. Он экспрессирован на 1–3 % клеток нормального костного мозга и на 0,01–0,1 % клеток периферической крови [Sutherland D. R. et al., 1996]. Антиген-положительные клетки включают почти

все унипотентные клетки-предшественники (эритроидные бурст-образующие единицы, BFU-E; гранулоцитарно-макрофагальные колониеобразующие единицы, CFUGM; мегакариоцитарные колониеобразующие единицы, CFU-Meg) и мультипотентные предшественники (гранулоцитарные, эритроидные, макрофагальные, мегакариоцитарные колониеобразующие единицы, CFU-GEMM), а также пре-колониеобразующие единицы (preCFU). Хотя зрелые лимфоидные колониеобразующие клетки не экспрессируют антиген CD34, предполагаемые предшественники В-лимфоидных клеток с ядерной TdT экспрессируют его [Ryan D. et. al., 1986]. CD34+-клетки изолированы из человеческого тимуса. Эти клетки способны образовывать как Т-клеточные, так и миелоэритроидные колонии [Kurtzberg I. et. al., 1989]. Несмотря на то, что антиген CD34 дополнительно экспрессирован на стромальных клетках костного мозга [Simmons P., Torok-Storb B., 1991] и на эндотелиальных клетках [Fina L. et. al., 1990], он всеми признан как антиген человеческой стволовой клетки. Очищенные CD34+-клетки способны полностью реконструировать гемопоэтическую систему у облученных приматов и людей [Berenson R. et. al., 1988; Shpall E.J. et. al., 1994; Andrews R. G. et. al., 1992]. Исследования по клонированию ядерных клеток продемонстрировали, что высокоочищенные CD34+-клетки, которые утрачивают миелоидные, Т- и В-клеточные антигены, способны генерировать отдельные типы колоний, когда растут среди облученных стромальных клеток *in vitro* [Andrews R. et. al., 1990].

Антиген CD90(Thy-1)

Недавно к антигенам стволовой клетки причислен антиген Thy-1. Thy-1-антиген экспрессирован на Т-лимфоцитах мышей, на Т- и В-клетках крыс, крупного рогатого скота. У человека он определяется на тимических бластах. С. М. Baum и соавт. идентифицировали редкие (0,05–0,1 %) Thy-1+CD34+-клетки в человеческом эмбриональном костном мозге, которые были обогащены плюрипотентными предшественниками миелоэритроидных В- и Т-клеток и способными инициировать долговременные культуры

костного мозга. CD34-Thy1-клетки не содержали предшественников и не инициировали долговременные культуры клеток костного мозга. Thy-1+ -клетки не захватывали родамин-123, что характерно для стволовой клетки. L. Mugau и соавт. (1995) показали, что примитивные стволовые клетки периферической крови экспрессируют Thy-1-антиген.

Антиген CD38

Антиген CD38 экспрессирован на 99 % CD34+-клеток костного мозга. Только 1 % CD34+-клеток костного мозга его не содержат. Эти клетки составляют 0,01 % от ядерных клеток костного мозга. CD34+CD38-популяция не содержит никаких дифференцировочных антигенов, и по морфологическим признакам клетки являются гомогенными примитивными бластными клетками. При клонировании этих клеток в течение 28–34 дней возникают примитивные колонии. В противоположность, CD34+CD38+-популяция клеток гетерогенна по морфологии и состоит из миелобластов, эритробластов и лимфобластов. По мере снижения интенсивности экспрессии антигена CD34, возрастает экспрессия антигена CD38. Предполагают, что CD34+CD38-клетки являются примитивными стволовыми клетками. L. Tersappen и соавт. считают, что антиген CD38 является наиболее перспективным маркером для идентификации многолинейных коммитированных CD34+-клеток костного мозга. Эти авторы, используя МКА против антигенов CD34, CD38, CD71, CD33, CD10 и CD5, выделили несколько дискретных стадий дифференцировки стволовой клетки. Наиболее примитивные клетки-предшественники имеют фенотип CD34++CD38-CD71-CD33-CD10-CD5-. На следующем этапе дифференцировки клетки имеют фенотип: CD34++/+CD38+/++ CD71-CD33-CD10-CD5-. На последующих этапах дифференцировки антиген CD34 экспрессирован слабо, антиген CD38 — очень сильно, и появляется экспрессия одного из антигенов, характеризующих линейную направленность клеток-предшественников. Антиген CD71 характеризует эритроидных предшественников, антиген CD33 — миелоидных, антиген CD10 — В-клеточных и антиген CD5 — Т-клеточных предшественников.

*Антигены гистосовместимости**II класса (HLA-DR)*

Антигены гистосовместимости II класса — HLA-DR — относятся к пан-В-клеточному маркеру. Они экспрессированы на всех этапах дифференцировки В-клеток, за исключением плазмочитов, на большинстве моноцитов и активированных Т-клетках [Барышников А. Ю. и др., 1984]. Они также представлены на определенном этапе дифференцировки миелобластов и отсутствуют на зрелых гранулоцитах. HLA-DR-антигены обнаружены на части CFU-GM [Барышников А. Ю. и др., 1989]. Исследование экспрессии HLA-DR-антигенов на полипотентной стволовой клетке в долговременной культуре костного мозга показало, что примитивные гемопоэтические предшественники экспрессируют антиген CD34, но не содержат HLA-DR-антигены. Более дифференцированные предшественники экспрессируют как CD34, так и HLA-DR-антигены [Verfaillie C. et. al., 1992, 1990; Sutherland H. I. et. al., 1989].

Антиген CD71

Антиген CD71 является рецептором трансферрина и представлен на высокопролиферирующих клетках. Он также коэкспрессирован с антигеном CD34 на части клеток костного мозга. CD34+CD71+-клетки костного мозга инициируют долговременные культуры клеток костного мозга, из чего заключили, что антиген CD71 экспрессирован на стволовой клетке. Высокий уровень экспрессии антигена CD71 характерен для CD34-положительных эритроидных предшественников. P. Lansdorp и W. Dragowska обнаружили, что клетки, инициирующие долговременную культуру костного мозга, экспрессируют антиген CD45RA. Ранее эти же исследователи обнаружили на клетках, инициирующих долговременную культуру костного мозга, экспрессию общелейкоцитарного антигена CD45RO. Эти клетки коэкспрессируют антигены CD34 и CD71 и являются предшественниками миеломоноцитарных и эритроидных клеток.

Р-гликопротеид

Маркером нормальных стволовых клеток является также Р-гликопротеид (Pgp170), кодируемый геном MDR1 множественной лекарственной устойчивости. P170 выполняет функцию насоса, выкачивающего из клетки токсические вещества. Используя МКА против P170, Р. М. Chaudhary и I. Roninson показали, что на всех предшественниках гемопоэтических клеток человека, включая клетки, иницирующие долговременные культуры, P170 коэкспрессирован с антигеном CD34. Исследователи полагают, что экспрессия MDR1 гена на стволовой клетке служит для ее защиты от токсических веществ.

Таким образом, иммунологическим фенотипом стволовых клеток костного мозга и периферической крови является CD34hiThy-1+CD109+CD38loCD71loPgP170lo.

7.1.2. Иммунологические маркеры миелобластов

Иммунологическими маркерами миелобластов являются антигены CD33, CD7 и CD15.

Антиген CD33

Антиген CD33 является поверхностным гомодимерным гликопротеидом с молекулярной массой 140 кДа, кодируемым геном в 35 Kb, локализованном в длинном плече человеческой хромосомы 19 [Peiper S. C. et. al., 1988]. Функция антигена в миелоидных клетках неизвестна. Наиболее ранние колониеобразующие единицы (CFU-Blast, pre-CFU) не имеют антигена CD33, хотя содержат антиген CD34 [Brandt J. et. al., 1990; Zsebo K. M. et. al., 1990; Andrews R. G. et. al., 1989; Gabbianelli M. et. al., 1990]. Он экспрессирован на нормальных коммитированных клетках-предшественниках, включая CFU-GEMM, CFU-GM и BFU-E [Andrews R. D. et. al., 1989; Griffin J. D. et. al., 1984; Neame P. B. et. al., 1986; Civin C. I., 1990]. Экспрессия антигена усиливается по мере дифференцировки клеток. Антиген CD33 экспрессирован на лейкозных бластных клетках приблизительно у 80 % ОМЛ [Griffin C. I. et. al., 1984; Neame P. B. et. al., 1986; Schwarzinger I. et. al., 1990;

Robertson M. J. et. al., 1992]. Антген CD33 присутствует на 50 % BFU-E, 50 % CFU-GEMM [Anrews R. G. et. al., 1989; Griffin J. D. et. al., 1984]. МКА My9 против антигена CD33 применяют для очистки аутологичного костного мозга перед аутотрансплантацией, так как МКА не влияют существенным образом на восстановление кроветворения [Robertson M. J. et. al., 1992]. В отличие от антигенов CD14 и CD15, которые также являются мишенями для очистки костного мозга от лейкозных клеток при аутотрансплантации при ОМЛ [Ball E. D. et. al., 1990], антиген CD33 более интенсивно экспрессирован на клоногенных лейкозных клетках, чем вообще на бластных клетках [Kabrai A. et. al., 1988]. Антген CD33 содержит миелоидные предшественники, а предшественники В-клеток его не экспрессируют [Baum C. M. et. al., 1992].

Антген CD7

Антген CD7 является гликопротеидом с молекулярной массой 40 кДа, преимущественно экспрессированным на Т-лимфоцитах и Т-клеточных линиях [Sutherland H. J. et. al., 1989]. В течение Т-клеточного онтогенеза он появляется на клеточной поверхности на ранних стадиях дифференцировки и утрачивается только на поздних стадиях Т-клеточного развития [Haynes B. F. et. al., 1988]. Это уникальное свойство экспрессии нашло клиническое применение при очистке костного мозга [Тоневидский А. Г. и др., 1991; Preijers F. et. al., 1989]. Функциональная роль молекулы CD7 неизвестна, хотя есть одно сообщение о том, что она может быть рецептором для Fc-фрагмента IgM. В последние годы появились сообщения об экспрессии антигена CD7 на бластных клетках больных ОМЛ. Более того, имеются доказательства коэкспрессии антигена CD7 и антигена CD34 на стволовой клетке. В дополнение, экспрессия антигена CD7 была документирована у больных с миелоидной морфологией бластных клеток. Больные, у которых коэкспрессированы Т-клеточный антиген CD7 и миелоидные антигены, имеют плохой прогноз. Коэкспрессия антигенов CD7 и CD34 на лейкозных клетках может быть атрибутом дисрегуляции экспрессии гена или представлять амплификацию популяции нормальных клеток костного мозга. Если последнее верно, то двойная

позитивная субпопуляция клеток представляет интерес, так как коэкспрессия лимфоидного антигена с миелоидными антигенами может идентифицировать бипотентную, если не полипотентную клетку. CD7+CD34+-клетки изолированы из человеческого тимуса, и эта субпопуляция способна образовывать как Т-клеточные, так и миело-эритроидные колонии. В человеческом костном мозге присутствует субпопуляция клеток, коэкспрессирующая антигены CD7 и CD34. CD7+/CD34+-клетки содержат коммитированные миелоидные предшественники, образующие CFU в полужидком агаре и способные продуцировать гранулоциты в долговременной культуре костного мозга. Экспрессия антигена CD7 на миелоидных предшественниках также подтверждена в комплемент-зависимом цитотоксическом тесте. Более того, МКА убивали только часть 14-дневных CFU-GM, что говорит о низком уровне экспрессии антигена CD7 или об его экспрессии только на части коммитированных предшественников. S. D. Gore и соавт. показали, что 5 % мононуклеаров костного мозга, которые экспрессируют TdT, также экспрессируют антиген CD7 и 40–50 % из них коэкспрессируют антиген CD34. Так как только около 1 % мононуклеарных клеток костного мозга являются TdT+, TdT+CD7+CD34+-клетки имеют частоту приблизительно $2,5 \times 10^{-4}$. Таким образом, антиген CD7 экспрессирован на предшественниках гемопоэтических клеток в норме. Его экспрессия на лейкозных клетках при миелоидных лейкозах, а тем более в сочетании с антигеном CD34, свидетельствует о нахождении клеток на ранних этапах дифференцировки.

Таким образом, в настоящее время обнаружено достаточно большое количество иммунологических маркеров ранних гемопоэтических клеток-предшественников.

7.1.3. Экспрессия CD95(Fas/APO-1)-антигена на CD34+-клетках

А. Ю. Барышников и соавт. (1998) в качестве модели для исследования экспрессии CD95(Fas/APO-1)-антигена на полипотентной стволовой клетки использовали бластные клетки больных хроническим миелолейкозом (ХМЛ) в стадии бластного криза, бластные клетки которых экспрессируют антиген CD34, а также

Таблица 7.1

Экспрессия CD95(Fas/APO-1)- и CD34- антигенов на клетках крови больных ХМЛ в стадии бластного криза

Антиген	Больные	Положительные случаи	Экспрессия (%)
CD34	35	17	49
CD95(Fas/APO-1)	35	12	34

CD34+-острые миелобластные лейкозы (ОМЛ). Экспрессию антигена определяли в реакции непрямой иммунофлюоресценции, которую учитывали на проточном цитофлуориметре FACScan. В работе использовали МКА АРО-1, IPO-4 и ICO-160.

Экспрессию CD95(Fas/APO-1)-антигена определяли на бластных клетках периферической крови 35 больных бластным кризом ХМЛ (табл. 7.1). Антиген был представлен на бластных клетках периферической крови у 12 пациентов, что составило 34 %. На бластных клетках костного мозга CD95(Fas/APO-1)-антиген был экспрессирован у 5 (45 %) из 11 больных.

Антиген CD34 был экспрессирован на бластных клетках 17 из 35 больных бластным кризом ХМЛ, что составило 49 % (табл. 7.1). Была обнаружена положительная корреляция между процентом CD34+- и CD95(Fas/APO-1)+-клеток ($r = 0,44$, $p = 0,05$) в периферической крови и в костном мозге ($r = 0,83$, $p < 0,05$). Методом двойного окрашивания показано, что оба антигена локализованы на одних и тех же клетках.

Бластные клетки при остром миелобластном лейкозе (ОМЛ) также экспрессируют антиген CD34. А. Ю. Барышниковым и соавт. (1998) был исследован иммунологический фенотип бластных клеток периферической крови и костного мозга у 15 больных ОМЛ. CD95(Fas/APO-1)-антиген был экспрессирован на $45,5 \pm 22,8$ % клеток у 6 (45 %) из 15 больных. Была обнаружена значительная корреляция между экспрессией антигенов CD34 и CD95(Fas/APO-1) как в периферической крови ($r = 0,56$, $p < 0,05$), так и в костном мозге ($r = 0,85$, $p < 0,01$).

Таким образом, наши исследования показали, что на бластных клетках больных бластным кризом ХМЛ и ОМЛ одновременно экспрессированы антиген полипотентной стволовой клетки CD34 и антиген CD95(Fas/APO-1)-опосредующий апоптоз. Можно сделать предположение, что на нормальной полипотентной стволовой клетке также экспрессирован и функционирует антиген CD95(Fas/APO-1), который осуществляет механизм регулировки самоподдержания и дифференцировки стволовой клетки.

А. Ю. Барышниковым и соавт. (1998) была предпринята попытка определить функциональное состояние CD95(Fas/APO-1)-клеток на бластных клетках больных бластным кризом ХМЛ и ОМЛ. С этой целью бластные клетки больных инкубировали с МКА IPO-4, APO-1 или ICO-160 в жидкой или твердой фазе в течение различного времени и определяли апоптоз электрофорезом в агарозном геле или по определению субдиплоидного набора хромосом по окрашиванию пропидиум йодидом.

Было обнаружено, что культивация бластных клеток с 10 $\mu\text{g}/\text{мл}$ МКА в течение 24 ч индуцирует апоптоз в 6 из 7 CD95(Fas/APO-1)-положительных случаях бластного криза ХМЛ. Апоптоз был отмечен в 17–60 % клеток и у 3 из 3 больных ОМЛ. Таким образом, можно сделать вывод о том, что CD95(Fas/APO-1)-антиген на бластных клетках находится в функциональном состоянии.

J. P. Maciejewski и соавт. (1995) исследовали экспрессию CD95(Fas/APO-1)-антигена на CD34+-клетках костного мозга у здоровых людей и больных с апластической анемией. У здоровых доноров немного CD34+-клеток экспрессировало антиген CD95(Fas/APO-1). Авторы выявили низкую чувствительность клеток костного мозга здоровых людей к Fas-опосредованному угнетению колониеобразования. В противоположность этому, CD34+-клетки костного мозга больных апластической анемией сильно экспрессировали антиген CD95(Fas/APO-1). Эта экспрессия коррелировала с повышенной чувствительностью клеток костного мозга к индуцированию апоптоза с помощью МКА, что проявлялось в угнетении колониеобразования. Гамма-интерферон и опухоле-некротический фактор альфа, потенциальные ингибиторы

гемопоеза, усиливали экспрессию CD95(Fas/APO-1)-антигена на CD34+-клетках костного мозга. Оба цитокина повышали чувствительность клеток костного мозга к Fas-опосредованному апоптозу.

Напротив, K. Nagafuji и соавт. (1995; 1996) не обнаружили на свежевыделенных CD34+-клетках костного мозга экспрессию CD95 (Fas/APO-1)-антигена и мРНК этого антигена. Однако, гамма-интерферон и опухоле-некротический фактор альфа индуцировали через 48 ч в CD34+-клетках mRNA CD95(Fas/APO-1)-антигена и сам CD95 (Fas/APO-1)-антиген. Оба цитокина оказывали синергическое действие на индукцию CD95(Fas/APO-1)-антигена, когда одновременно добавлялись в культуру клеток. Культивированные только в среде CD34+-клетки или в присутствии стволово-клеточного фактора, они слабо экспрессировали CD95(Fas/APO-1)-антиген. Добавление к CD34+-клеткам после индукции CD95(Fas/APO-1)-антигена МКА против CD95(Fas/APO-1)-антигена индуцировало апоптоз в этих клетках. Апоптоз был документирован снижением количества живых клеток, морфологическими изменениями, индукцией фрагментации ДНК, а также снижением колониеобразования гранулоцитарно-макрофагальных колоний и бурс-образующих эритроидных единиц. Ионизирующая радиация дозо-зависимым образом повышает экспрессию CD95(Fas/APO-1)-антигена в CD34+-клетках [Nagafuji K. et al., 1996]. Человеческие CD34+-стволовые клетки при культивировании в течение 7 дней в присутствии цитокинов начинают экспрессировать CD95-антиген, и в них снижается экспрессия *Bcl-2* [Nagafuji K. et al., 1996].

K. Takenaka и соавт. (1996) также не выявили на свежевыделенных CD34+-стволовых клетках костного мозга экспрессию CD95(Fas/APO-1)-антигена. Около половины CD34+-клеток экспрессировали *Bcl-2*. Экспрессия CD95(Fas/APO-1)-антигена появлялась при культивировании клеток в присутствии цитокинов. Одновременно с повышением экспрессии CD95(Fas/APO-1)-антигена происходила утрата *Bcl-2*. МКА анти-Fas в концентрации 1мкг/мл индуцировали апоптоз в CD34+- CD95+-стволовых клетках. Авторы заключили, что CD95(Fas/APO-1)-антиген и *Bcl-2*

играют важную роль в регуляции дифференцировки гемопоэтических клеток.

А. Варсена и соавт. (1996) исследовали экспрессию CD95-антигена на примитивных гемопоэтических клетках, выделенных из человеческой эмбриональной ткани. Иммунофенотипически эти клетки разделили на две субпопуляции: CD34++CD38- и CD34++CD38++. Большинство незрелых предшественников с фенотипом CD34++CD38- экспрессировали высокий уровень антигена CD95, тогда как более зрелые предшественники с фенотипом CD34++CD38++ экспрессировали низкий уровень CD95-антигена. МКА против CD95-антигена индуцировали в гемопоэтических предшественниках апоптоз, оцененный по угнетению колониеобразования.

Ј. Park и соавт. (1995) исследовали экспрессию протоонкогенов *Bcl-2* и *Bcl-x*, регулирующих апоптоз, на примитивных гемопоэтических предшественниках. Они не обнаружили экспрессию *Bcl-2* на примитивных CD34+Lin-клетках, хотя более дифференцированные CD34+-клетки экспрессируют *Bcl-2*. Напротив, белок *Bcl-x* представлен на большинстве примитивных стволовых клеток.

Анализируя литературные данные, можно сделать вывод о том, что не все CD34+-клетки экспрессируют CD95(Fas/APO-1)-антиген. Учитывая тот факт, что стволовые полипотентные клетки делятся на примитивные (поздние) и ранние стволовые клетки, можно предположить, что примитивные стволовые клетки, экспрессирующие только CD34-антиген, не имеют CD95(Fas/APO-1)-антигена, а более дифференцированные стволовые клетки (ранние) его экспрессируют. Как указывалось выше, примитивные стволовые клетки не экспрессируют никакие другие дифференцировочные антигены, за исключением CD34. С другой стороны, ранние стволовые клетки экспрессируют, помимо CD34-антигена, также CD33, CD7, HLA-DR, CD19 и ряд линии-неограниченных антигенов. А. Ю. Барышников и Ю. В. Шишкин (1999) проанализировали антигенный профиль CD95(Fas/APO-1)+-бластных клеток больных ХМЛ в стадии бластного криза. Было обнаружено, что во всех CD34+-случаях бластные клетки экспрессировали другие иммунологические маркеры, что свидетельствует о том, что

ни в одном случае не было обнаружено иммунологического фенотипа примитивной стволовой клетки, и все CD34+ -бластные клетки по своим иммунологическим маркерам соответствовали фенотипу ранних стволовых клеток. Таким образом, можно сделать заключение, что примитивная стволовая клетка, экспрессирующая только CD34-антиген и дающая поздние колониеобразующие единицы, не имеет CD95(Fas/APO-1)-антигена. Он появляется на более поздних стволовых клетках, дающих ранние колониеобразующие единицы и экспрессирующие другие дифференцировочные антигены. CD95(Fas/APO-1)-антиген на этих клетках находится в функциональном состоянии, что позволяет предположить его участие в регуляции стволовой клетки на этом этапе. Потенциальные ингибиторы гемопоэза, такие как гамма-интерферон и опухоль-некротический фактор альфа, индуцируют экспрессию CD95(Fas/APO-1)-антигена и, вероятно, их действие опосредуется через Fas-индуцированный апоптоз.

7.1.4. Экспрессия CD95(Fas/APO-1)-антигена на CD33+- и CD13+-клетках

Следующий этап дифференцировки миелоидных клеток характеризуется экспрессией антигена CD33. Эти клетки еще называют комитированными миелоидными стволовыми клетками. А. Ю. Барышников и соавт. (1999) исследовали экспрессию CD95(Fas/APO-1)-антигена на CD33+-клетках на модели ОМЛ и ХМЛ в стадии бластного криза и обнаружили положительную корреляцию между экспрессией CD33 антигена и CD95(Fas/APO-1)-антигена ($r = 0,58$).

Представителями очередного дискретного этапа дифференцировки миелоидных клеток являются миелобласты, экспрессирующие антиген CD13. Экспрессию CD95(Fas/APO-1)-антигена на CD13+-клетках изучали на модели бластного криза ХМЛ и ОМЛ. Было обнаружено, что CD13-положительные бласты экспрессировали CD95(Fas/APO-1)-антиген, и была отмечена положительная корреляция ($r = 0,55$) между экспрессией обоих антигенов. Таким образом, CD13+-бластные клетки также экспрессируют

CD95(Fas/APO-1)-антиген и, вероятно, на этом этапе дифференцировки миелоидных клеток Fas-опосредованный апоптоз также участвует в регулировке созревания клеток. Как указывалось выше (J. P. Maciejewski и соавт., 1995; K. Nagafuji и соавт., 1995), стволово-клеточный фактор роста индуцирует экспрессию CD95(Fas/APO-1)-антигена в CD34+-клетках костного мозга. Длительное культивирование миелобластов больных ОМЛ в присутствии рекомбинантного стволово-клеточного фактора (rhG-CSF) приводит к индукции апоптоза в этих клетках, появляющегося после экспрессии CD95(Fas/APO-1)-антигена (Wano Y. et al., 1995).

7.1.5. Экспрессия CD95(Fas/APO-1)-антигена на CD11b+- и CD15+-блестах

На последующих этапах дифференцировки миелобластов на их поверхности экспрессированы антигены CD15 и CD11b. Бластные клетки с таким иммунологическим фенотипом встречаются приблизительно в 30 % случаев ОМЛ [Крыжанов М. А. и др., 1985]. А. Ю. Барышниковым и соавт (1999) была исследована корреляционная связь экспрессии CD95(Fas/APO-1)-антигена и антигенов CD11b и CD15, но не было обнаружено корреляционной связи между экспрессией этих молекул ни при ОМЛ, ни при бластном кризе ХМЛ. Таким образом, можно сделать заключение, что CD11b+CD15+-бластные клетки не экспрессируют CD95(Fas/APO-1)-антиген, т. е. на этом этапе дифференцировки клетки не нуждаются в Fas-опосредованном контроле за дифференцировкой.

7.1.6. Экспрессия CD95(Fas/APO-1)-антигена на зрелых гранулоцитах

Конечным этапом дифференцировки миелоидных клеток являются полиморфноядерные нейтрофилы. Эти клетки экспрессируют миелоидные антигены CD11b и CD15 [Барышников А. Ю. и др., 1989]. Очищенные человеческие эозинофилы экспрессируют низкий, но постоянно определяемый уровень CD95(Fas/APO-1)-

антигена [Matsumoto K. et al., 1995; Hebstreit H. et al., 1996]. Культивирование очищенных эозинофилов с 10 нг/мл интерлейкина-5 пролонгирует выживание эозинофилов [Matsumoto K. et al., 1995; Hebstreit H. et al., 1996]. МКА против CD95(Fas/APO-1)-антигена в концентрации от 1 до 1000 нг/мл индуцируют апоптоз в обработанных интерлейкином-5 эозинофилах. Апоптоз в эозинофилах контролируется фибронектином [Higashimoto I. et al., 1996]. По данным других авторов, нейтрофилы экспрессируют относительно низкий уровень CD95-антигена [Dawson G. et al., 1996; Molica S. et al., 1996]. M. J. Robertson и соавт. (1995) не обнаружили экспрессию CD95(Fas/APO-1)-антигена на гранулоцитах и эритроцитах. J. DiGiuseppe и соавт. (1996) разработали мультипараметрический проточно-флуориметрический метод определения плотности экспрессии CD95(Fas/APO-1)-антигена на гемопоэтических предшественниках. Они показали, что *Bcl-2* высоко экспрессирован на миелобластах $(29 \pm 9) \times 10^3$ молекул, эквивалентных растворимому флуорохрому, и был не определяем на гранулоцитах и эритроцитах. Наоборот, экспрессия CD95(Fas/APO-1)-антигена повышалась с дифференцировкой гранулоцитов и моноцитов. Миелобласты экспрессировали $(8 \pm 2) \times 10^3$ молекул, тогда как гранулоциты — $(15 \pm 2) \times 10^3$ эквивалентов, а моноциты — $(28 \pm 5) \times 10^3$. Эти же клетки более ярко окрашивались МКА анти-Fas-антигена. Однако у некоторых доноров эозинофилы периферической крови и тканевые эозинофилы не экспрессируют функциональный Fas-рецептор [Hebstreit H. et al., 1996].

Таким образом, можно сделать вывод, что антиген CD95(Fas/APO-1) экспрессирован на CD34⁺-, CD33⁺-, CD13⁺-клетках, но не CD11b⁺ и CD15⁺-клетках, т. е. на определенных этапах дифференцировки. Более того, антиген CD95(Fas/APO-1) функционален, и МКА против него индуцируют апоптоз.

7.1.7. Экспрессия CD95(Fas/APO-1)-антигена на моноцитах

Моноциты также экспрессируют CD95(Fas/APO-1)-антиген. Ashany D. и соавт. (1995) на мышинной модели методом двойного

окрашивания показали, что покоящиеся макрофаги экспрессируют CD95(Fas/APO-1)-антиген. Более того, Th1CD4+- Т-клетки индуцируют апоптоз в Fas+-макрофагах путем презентации Fas-лиганда. Полагают, что Fas-опосредованный апоптоз макрофагов служит для делеции макрофагов, представляющих собственные антигены.

§ 7.2. Экспрессия и функция CD95(Fas/APO-1)-антигена в лимфоидном ряду дифференцировки

Лимфоидные клетки также развиваются из CD34+-полипотентной стволовой клетки. Коммитированные лимфоидные клетки экспрессируют ранние лимфоидные маркеры, такие как CD90(Thy-1), CD7, CD19. Дифференцируясь, лимфоидные клетки разделяются на две линии — Т-клеточную и В-клеточную. Эти клетки экспрессируют различные иммунологические маркеры, позволяющие идентифицировать отдельные этапы дифференцировки друг от друга.

7.2.1. Этапы дифференцировки Т-лимфоцитов

Предшественники Т-лимфоцитов происходят из CD34+-клеток костного мозга. На ранних предшественниках Т-клеток экспрессированы общие — Т-клеточные антигены — CD5, CD7 и Thy-1 (CD90). Костно-мозговые предшественники Т-клеток мигрируют из костного мозга в тимус, где в присутствии тимического окружения дифференцируются в зрелые Т-клетки. При этом они проходят три дискретные стадии дифференцировки, выявляемые МКА: тимические бласты, кортикальные тимоциты и медулярные тимоциты.

Тимические бласты локализованы в субкапсулярной зоне тимуса. Их маркерами являются антигены: CD5, CD2, CD7 и Thy-1 (CD90). По морфологическим признакам — это бластные клетки.

Затем тимические бласты мигрируют в кортикальную зону тимуса. По морфологии это — тимоциты. Их основным специфическим маркером является антиген CD1, который делится

на CD1a, CD1b и CD1c. На этих клетках также экспрессированы обще-Т-клеточные антигены: CD2, CD5, CD6, CD7. На кортикальных тимоцитах появляются маркеры CD4+-Т-хелперов/индукторов и CD8+-Т-супрессорных/цитотоксических клеток. Однако оба этих антигена экспрессированы на одной и той же клетке.

По мере созревания кортикальные тимоциты перемещаются в медуллярную зону тимуса. Морфологически это — медуллярные тимоциты, иммунологически — зрелые CD3+-timoциты. На их поверхности отсутствуют антигены CD1a, CD1b, CD1c, характерные кортикальным тимоцитам. Антигены CD4 и CD8 располагаются на разных субпопуляциях тимоцитов. Основным их признаком является экспрессия комплекса CD3-антигена/Т-клеточного рецептора антигена (CD3/TcR).

Однако не все кортикальные тимоциты дифференцируются в медуллярные. На этом этапе дифференцировки происходит элиминация аутореактивных клонов Т-клеток. Предполагается, что механизмом элиминации «лишних» тимоцитов является апоптоз [King L. B., Ashura I. D., 1994].

Из тимуса созревшие Т-клетки мигрируют в иммунологические органы (селезенку, лимфатические узлы) или циркулируют в периферической крови. После контакта с чужеродным антигеном они активируются, образуется клон иммунокомпетентных клеток, принимающих активное участие в реализации иммунного ответа. По мере затухания иммунного ответа эти клетки становятся лишними и должны погибнуть. Маркером зрелых Т-клеток является антиген CD3. Он представлен на всех Т-клетках периферической крови, селезенки и лимфатических узлов. На этих же клетках экспрессированы обще-Т-клеточные антигены CD2, CD5, CD6, CD7. На субпопуляции клеток-помощников представлен антиген CD4, а на цитотоксических/супрессорных клетках — антиген CD8. На активированных Т-клетках экспрессированы активационные антигены — CD25 (рецептор интерлейкина-2), CD71 (рецептор трансферрина), CD26 (диаминопептидаза IV) и HLA-DR антигены.

7.2.2. Экспрессия и функция CD95(Fas/APO-1)-антигена на тимоцитах

Апоптоз также играет решающую роль в процессе созревания тимоцитов. В Т-клеточном ряду большинство предшественников погибает на стадии CD4+CD8+-кортикальных тимоцитов, если в них отсутствует перестройка гена Т-клеточного рецептора антигена (TCR). CD4+CD8+-timoциты подвергаются дальнейшей селекции, основанной на взаимодействии между TCR и главным комплексом гистосовместимости (HLA-I). Тимоциты, которые экспрессируют функциональный HLA-реструктурированный TCR, выживают (положительная селекция), тогда как тимоциты, несущие TCR, утративший связь с HLA комплексом, погибают путем апоптоза. Затем в течении созревания CD4+CD8+-Т-клетки являются объектом дальнейшей селекции, являющейся критической для установления самоотолерантности. С помощью этого процесса CD4+CD8+-timoциты, несущие рецепторы против своих антигенов элиминируются (клональная делеция) или функционально инактивируются после взаимодействия с антигеном [McConkey D. J. et. al., 1991]. Апоптоз в тимоцитах также индуцирует обработка клеток кортикостероидом дексаметазоном, кадаиловой кислотой или активация Т-клеточного рецептора антигена через CD3 [Gerschenson L. E., Rotell R. J., 1992; Garcia-Welsh A. et. al., 1994].

Как указывалось выше, в тимусе идет интенсивная селекция аутореактивных клонов Т-клеток. Как взаимодействие CD95(Fas/APO-1)-рецептора и Fas-лиганда участвует в негативной селекции тимоцитов, остается неисследованным [Kazin R. L. et. al., 1988; Singer P. A. et. al., 1989; Sidman L. et. al., 1992; Zhou T. et. al., 1991]. Циклоспорин А и 9-циз-ретиноидная кислота являются ингибиторами индуцированной активации клеточной смерти [Shi Y. et. al., 1989; Ucker D. S. et. al., 1989; Yang Y. et. al., 1994], и оба реагента блокируют негативную селекцию тимоцитов [Yang Y. et a., 1994; Gao E.-K. et a., 1988; Jenkins M. K. et. al., 1988]. Оба реагента также ингибируют продукцию Fas-лиганда в Т-клеточных гибридах. Эти результаты указывают на то, что сигналы, контролируемые

негативную селекцию в тимусе, могут действовать путем модуляции CD95(Fas/APO-1)/FasL-экспрессии [Ju S.-T. et. al., 1995].

Экспрессия CD95(Fas/APO-1)-антигена на тимоцитах

В литературе имеются противоречивые сведения об экспрессии CD95(Fas/APO-1)-антигена на тимоцитах и о CD95(Fas/APO-1)-опосредованном апоптозе в тимоцитах. Так, Debatin K. M. и соавт. (1994) сообщили, что CD95(Fas/APO-1)-антиген, выявляемый МКА APO-1, постоянно экспрессирован на большинстве человеческих тимоцитов. Его экспрессия снижается на зрелых стадиях развития тимоцитов (TcR(hi)). Эта стадия развития характеризуется фенотипом: CD28hi, CD44hi, CD69hi и повышенном экспрессии белка *Bcl-2*. Авторы описали новую субпопуляцию тимоцитов, которая экспрессирует высокий уровень APO-1 и промежуточный уровень Т-клеточного рецептора антигена (TcR(im)/APO-1hi). TcR(im)/APO-1hi-популяция содержит большое количество мертвых клеток. Это подтверждает, что CD95(Fas/APO-1)-опосредованный апоптоз вовлечен в негативную селекцию, по крайней мере, во фракции тимоцитов после внутриклеточной активации. Спустя год эта же группа авторов сообщила о постоянной экспрессии CD95(Fas/APO-1) на двупозитивных (CD4+CD8+)-timoцитах [Muller K. P. et. al., 1995].

S. Yonchara и соавт. (1994) обнаружили низкое, но определяемое проточной цитофлуориметрией количество Fas-антигена на человеческих тимоцитах. Антиген был экспрессирован как на CD4+CD8+-, так и CD4-CD8--недифференцированных тимоцитах. В противоположность, медуллярные CD3+- не экспрессировали Fas-антиген. Около 1–2% тимоцитов, сильно экспрессирующих Fas-антиген с иммунологическим фенотипом CD3hi, CD4hi и CD8low, были на стадии дифференцировки поздних двойных положительных клеток. Иммуногистологический анализ показал, что сильно экспрессирующие Fas-антиген клетки находились по краю медуллы. Стимуляция TcR-рецептора МКА анти-CD3 индуцировала экспрессию Fas-антигена на тимоцитах на поздней двойной позитивной стадии. Пролонгированная стимуляция тимоцитов через TcR-комплекс делала Fas-положительные клетки чувствительными

к Fas-опосредованному апоптозу. Для определения вовлечения Fas-системы в негативную селекцию/клональную делецию тимоцитов авторы культивировали кусочки человеческого тимуса в системе органных культур в присутствии суперантигена стафилококкового энтеротоксина В и антагонистичных анти-Fas МКА, которые блокируют Fas-опосредованный апоптоз оригинальных анти-Fas-антител. TcR-комплекс на тимоцитах исчезал при контакте с суперантигеном, а суперантиген-реактивные клоны уничтожались путем апоптоза, который ингибировался антагонистическими антителами. Это показало, что Fas-антиген вовлечен в негативную селекцию/клональную делецию суперантиген-реактивных тимоцитов.

М. Nakkaido (1994) изучал экспрессию CD95(Fas/APO-1)-антигена на тимоцитах, фракционированных в 5-ступенчатом градиенте БСА. Тимоциты разделены на 3 стадии соответственно их дифференцировке. Первая популяция тимоцитов, содержащаяся во фракции I, экспрессировала альфа-цепи рецептора интерлейкина-2 и пролиферировала без присутствия рекомбинантного интерлейкина-2. Вторая, содержащая тимоциты из II и III фракций, экспрессировала альфа-цепь рецептора интерлейкина-2, но не пролиферировала в отсутствие интерлейкина-2. Третья популяция, содержащая тимоциты из фракций IV и V, не содержала рецептор интерлейкина-2 и не пролиферировала ни при каких условиях. Эта фракция включала 90 % тимоцитов. Тимоциты из фракции I экспрессировали гены TcR и Fas-рецептора, а тимоциты из фракции V их не имели.

S. Andjelic и соавт. (1994) исследовали экспрессию CD95(Fas/APO-1)-антигена на эмбриональных и взрослых мышиных тимоцитах. Авторы обнаружили два различия. Во-первых, 90 % гамма/дельта позитивных эмбриональных тимоцитов (CD4+CD8+) экспрессируют CD95(Fas/APO-1)-антиген, тогда как во взрослом тимусе только < 7 % таких клеток являются CD95-позитивными. Во-вторых, почти все взрослые CD4+CD8+-timoциты были Fas-позитивными, тогда как 75 % эмбриональных тимоцитов были Fas-негативными. Напротив, J. Ogasawara и соавт. (1995) обнаружили экспрессию CD95(Fas/APO-1)-антигена как на двух-позитивных тимоцитах, также как и в одно-позитивных CD4+- и CD8+-

тимоцитах. Слабая экспрессия антигена была в CD4-CD8- популяции тимоцитов. В противоположность апоптозу тимоцитов, индуцированному глюкокортикоидами или Т-клеточными активаторами, Fas-опосредованный апоптоз усиливался ингибиторами метаболизма, такими как циклогексимид.

М. J. Robertson и соавт. (1995) обнаружили экспрессию CD95(Fas/APO-1)-антигена только на 5 % покоящихся тимоцитов. Однако приблизительно 80–90 % активированных тимоцитов экспрессировали CD95(Fas/APO-1)-антиген.

Fas-рецептор экспрессирован на большинстве тимических эмигрантов и покоящихся периферических Т-лимфоцитов [Tucek-Szabo C.L. et. al., 1996]. Перекрестное связывание Fas-рецептора может индуцировать апоптоз только в 5 % этих клеток. Однако, в противоположность низкому снижению экспрессии CD95-рецептора *in vitro*, *in vivo* идет быстрое снижение экспрессии CD95-рецептора после введения МКА против CD3-антигена или суперантигена [Tucek-Szabo C. L. et. al., 1996]. Это снижение экспрессии идет параллельно кинетике активационно-индуцированного апоптоза Т-клеток в лимфатических узлах.

На мышинной модели показано, что недифференцированные CD4-/CD8-тимоциты слабо экспрессируют Fas-антиген [Nishimura Y. et. al., 1995]. Кортикальные CD4+/CD8+-тимоциты и зрелые, медуллярные CD4+/CD8-- или CD4-/CD8+-тимоциты экспрессируют высокий уровень Fas-антигена.

Ю. В. Шишкин и соавт. (1998) изучали экспрессию CD95(Fas/APO-1)-антигена на тимоцитах детей, полученных во время открытых операций на сердце, и индуцировали апоптоз в тимоцитах с помощью МКА против CD95(Fas/APO-1)-рецептора, МКА против CD3-антигена и глюкокортикоидами. Экспрессию антигена определяли с помощью МКА ICO-160, IPO-4 и другими МКА, полученными в рамках VI Международного рабочего совещания по дифференцировочным антигенам лимфоцитов человека. Индукцию апоптоза оценивали электрофорезом в 3 % агарозном геле и по изменению иммунологического фенотипа клеток в различные сроки после начала индукции. Тимоциты слабо экспрессировали CD95(Fas/APO-1)-антиген.

Индукция апоптоза в тимоцитах

Ю. В. Шишкин и соавт. (1998) показали, что глюкокортикоид дексаметазон индуцировал апоптоз в тимоцитах, регистрируемый по образованию «ДНК-овой лестницы». Апоптоз выявлялся через 18 ч после начала индукции. Индукцию апоптоза с помощью МКА против антигенов CD95(Fas/APO-1) и CD3-осуществляли в жидкой фазе. МКА IPO-4, направленные против антигена CD95(Fas/APO-1), не регулярно индуцировали апоптоз, выявляемый по фрагментации ДНК. Время обнаружения нуклеосом варьировало от опыта к опыту и колебалось от 24 ч до 72 ч. МКА ICO-90 против CD3-антигена также индуцируют апоптоз. Нуклеосомы были обнаружены через 24–72 ч после триггера. Авторы пытались регистрировать апоптоз по изменению процента антиген-положительных клеток после индукции апоптоза. С этой целью определяли иммунологический фенотип тимоцитов до индукции апоптоза и в различные сроки после начала индукции. Иммунологический фенотип тимоцитов до индукции апоптоза характеризовался экспрессией антигенов: CD1a, CD1b, CD1c-маркеров кортикальных тимоцитов — на 85 % клеток, CD4-маркера хелперной/индукторной субпопуляции — на 85 % клеток, CD8-маркера супрессорных цитотоксических лимфоцитов — на 85 % клеток, CD3-маркера зрелых Т-клеток и медуллярных тимоцитов — на 50 % клеток. После индукции апоптоза иммунологический фенотип тимоцитов несколько изменился. Это вызвано тем, что одни клетки погибают, тогда как количество других клеток возрастает. По изменению соотношения маркеров можно предположить, какие именно клетки погибают. Используя этот подход, Ю. В. Шишкин и соавт. (1998) попытались выяснить уровень дифференцировки тимоцитов, на котором Fas-опосредованный апоптоз может участвовать в регуляции дифференцировки клеток.

Однако не было отмечено существенных изменений в иммунологическом фенотипе клеток. Это может быть связано, во-первых, с тем, что апоптозу подвергаются в одинаковой степени и кортикальные, и медуллярные тимоциты, а во-вторых, с малым процен-

том тимоцитов, подвергающихся апоптозу. Необходимо отметить, что и другим авторам, в других модельных системах не удается регистрировать Fas-опосредованный и CD3-опосредованный апоптоз в большом количестве клеток. Так, например, С. В. Baumler и соавт. (1996) изучали CD95(Fas/APO-1)-опосредованный апоптоз в CD4⁺- и CD8⁺-лимфоцитах больных СПИДом. Апоптоз оценивали по проценту гранулированных клеток, выявляемых на проточном цитофлюориметре. Из результатов этих авторов видно, что процент апоптотирующих клеток не превышал 10 % в популяции CD4⁺-клеток и 20 % среди субпопуляции CD8⁺-лимфоцитов. Оценка апоптоза электрофорезом в агарозном геле не позволяет определить процент апоптотирующих клеток и, вообще, хорошо определяется при массовом апоптозе клеток, например, как в случае с глюкокортикоидами.

D. Kabelitz и соавт. (1996) также изучали модуляцию дифференцировочных антигенов при индукции апоптоза в Fas-чувствительных клетках линии Jurkat и в Fas-резистентном субклоне этой линии 4321. Однако иммунологический фенотип лимфоцитов они определяли через 4 ч после индукции апоптоза МКА против CD95(Fas/APO-1)-антигена или Fas-лигандом. Инкубация клеток линии Jurkat с МКА против CD95(Fas/APO-1)-антигена приводила к быстрой даунрегуляции L-селектина (CD62L) и CD7, но не влияла на экспрессию антигенов CD3 и CD71. Не обнаружена модуляция на Fas-экспрессирующих, но Fas-резистентных клетках линии 4321. На активированных фитогемагглютинином Fas-чувствительных Т-клетках МКА анти-Fas вызывали даунрегуляцию различных антигенов, включая CD2, CD4, CD8, CD7, CD44, CD11a, CD11b и CD62L, но не CD3, CD25 или CD26. МКА анти-CD3 не вызывали даунрегуляцию всех этих антигенов, за исключением CD3. Форболовый эфир (PMA) вызывал модуляцию только CD3, CD4 и CD62L.

G. Fisher и соавт. (1996), показали, что ни МКА против CD95(Fas/APO-1)-антигена, ни МКА против CD3-антигена сами по себе не индуцируют апоптоз в мышинных тимоцитах, тогда как удается индуцировать апоптоз при их сочетанном применении. МКА против TCR/CD3-эпсилон индуцируют апоптоз только при

введении *in vivo* или в органной культуре. В противоположность, очищенные тимоциты в суспензионной культуре являются резистентными к апоптозу, индуцированному через TCR/CD3-эпсилон-рецептор. Однако при комбинации сигнализирования через CD3 и CD95 удается индуцировать апоптоз в суспензионной культуре. Одни МКА против CD95-антигена также не индуцировали апоптоз. Однако, МКА против Fas-антигена могли индуцировать апоптоз в суспензии тимоцитов, если они применялись в комбинации с ингибиторами метаболизма или актиномицином D. Более того, синергизм действия двух МКА не был связан с повышением экспрессии Fas-антигена, а влиял на проводимость сигнала смерти. К апоптозу, вызванному комбинацией вышеуказанных МКА, чувствительны как двупозитивные тимоциты (CD4+CD8+), так и одно-позитивные (CD4+/CD8- или CD4-/CD8+), т. е. и кортикальные тимоциты и медуллярные.

7.2.3. Экспрессия и функция CD95(Fas/APO-1)-антигена на Т-лимфоцитах

Зрелые Т-лимфоциты происходят из медуллярных тимоцитов и по иммунологическим маркерам от них не отличаются. Покоящиеся лимфоциты на экспрессируют CD95(Fas/APO-1)-антиген. Т-клетки активируются, когда их Т-клеточный рецептор антигена (TcR) связывается с лигандом на поверхности антиген-презентирующих клеток. Природный лиганд является комплексом пептида, связанного с молекулами главного комплекса гистосовместимости. Т-клетки также могут быть активированы бактериальными суперантигенами или моноклональными антителами (МКА) против CD3/TcR-комплекса. В процессе активации на поверхности Т-клеток появляются активационные антигены и среди них — CD95(Fas/APO-1). Когда иммунологическая реакция затухает, все клетки, участвующие в иммунном процессе, погибают по механизму апоптоза. Экспрессия и функция CD95(Fas/APO-1)-антигена на Т-клетках периферической крови описана в предыдущей главе.

7.2.4. Экспрессия CD95(Fas/APO-1)-антигена на этапах дифференцировки В-лимфоцитов

Большинство В-клеточных предшественников погибает на стадии дифференцировки поздних про-В и пре-В-клеток. Апоптоз появляется в этих клетках в том случае, если не происходит перестройка генов иммуноглобулинов (Ig). Поскольку сборка Ig является рандомным процессом, то около 95 % предшественников В-клеток погибают посредством апоптоза. В течение дальнейшей дифференцировки незрелые IgM+IgD-В-клетки подвергаются дальнейшей селекции, являющейся критической для установления аутоотолерантности. В результате этого процесса IgM+IgD-В-клетки, несущие рецепторы к своим антигенам, удаляются (клональная делеция). Затем зрелые В-клетки подвергаются дальнейшей селекции в зародышевых центрах лимфатических узлов. После встречи с антигеном наивные В-клетки мигрируют в первичные фолликулы, пролиферируют, образуют зародышевые центры и подвергаются интенсивной соматической мутации в перестройке генов тяжелой и легких цепей Ig. В-клетки, имеющие высокоаффинный рецептор Ig, преимущественно селектируются, тогда как В-клетки с низким аффинитетом подвергаются апоптозу. Таким образом, по крайней мере три раза апоптоз регулирует процесс дифференцировки В-клеток [Nuñez G. et al., 1994].

Сигнал для клональной пролиферации В-клетки получают от CD4+-Т-лимфоцитов. Этот сигнал индуцирует в В-клетках два противоположных процесса: клональную пролиферацию В-клеток и клональную делецию соответствующих В-клеток, которые связываются с собственными антигенами [Rathmell J. C. et al., 1996]. Эта судьба В-клеток зависит от двух поверхностных клеточных антигенов на активированных Т-лимфоцитах — CD40-лиганда и Fas-лиганда. Чужеродные антигены стимулируют В-клеточный рецептор антигена (BCR) и пролиферацию клона В-клеток. Клональную делецию CD40- и Fas-лиганды вызывают тогда, когда BCR становится нечувствительным вследствие хронической стимуляции собственными антигенами или когда BCR не связывается с антигеном. Полагают, что МКА к антигену CD40 мимикрируют

действие активационного сигнала, который они получают от активированных Т-клеток [Lagresle C. et. al., 1995]. Активированные таким образом В-клетки поступают из периферической крови в лимфатический узел и образуют зародышевые центры, в которых происходит дифференцировка В-клеток в антителопродуцирующие плазматические клетки. Активированные CD40L В-клетки чувствительны к апоптозу, индуцированному TH1+CD4-лимфоцитами [Foote L. C. et. al., 1996].

Для образования зародышевых центров необходимо взаимодействие между антигеном CD40 на В-клетках и CD40L-лигандом на Т-лимфоцитах [Zang X. et. al., 1996]. Было показано, что лиганд CD40L индуцирует экспрессию CD95(Fas/APO-1)-рецептора и чувствительность к Fas-индуцированному апоптозу в В-клетках. МКА анти-Ig частично помогают избегать Fas-опосредованный апоптоз. Активация наивных В-клеток с помощью CD40-лиганда индуцирует транзитную экспрессию *Bcl-xL*. Когда уровень *Bcl-xL* снижается, клетки становятся чувствительными к Fas-опосредованному апоптозу, индуцируемому МКА анти-CD95. Сигналирование через CD40/CD40L-систему блокирует CD95(Fas/APO-1)-опосредованный апоптоз в CD38+-активированных В-клетках миндалин и соответствующих им перевиваемых клеточных линиях [Cleary A. M. et. al., 1995].

МКА анти-Ig не изменяют экспрессию Fas-рецептора, *Bcl-*, *Bax-* и *Mcl-1*. Таким образом, *Bcl-xL* регулирует в CD40+-В-клетках Fas-опосредованный апоптоз.

CD95(Fas/APO-1)-антиген экспрессирован на В-клетках памяти в миндалинах, но не на наивных В-клетках [Lagresle C. et. al., 1996].

Человеческие IgD+CD38+-В-клетки миндалин экспрессируют маркеры, ассоциированные с В-клетками зародышевых центров: CD10, CD38, CD75, CD77, CD95(Fas/APO-1). Эта популяция клеток гетерогенна. Большинство IgD+CD38+-В-клеток быстро и спонтанно подвергаются апоптозу *in vitro*. Небольшая субпопуляция IgD+CD38+-клеток не способна переключать изотип Ig, преимущественно секретирует IgM после стимуляции *in vitro* [Billian G. et. al., 1996].

В-клетки периферической крови, активированные PWM, становятся чувствительными к CD95(Fas/APO-1)-опосредованному апоптозу [Daniel P. T., Krammer P. H., 1994].

Таким образом, В-клетки на всех этапах дифференцировки экспрессируют CD95(Fas/APO-1). На клетках зародышевых центров экспрессия CD95(Fas/APO-1)-антигена повышается [Mandik L. et. al., 1995]. Покоящиеся В-клетки миндалин, не экспрессирующие антиген CD38, не чувствительны к Fas-индуцируемому апоптозу. С другой стороны, активированные CD38+-клетки миндалин экспрессируют антиген CD95(Fas/APO-1) и чувствительны к апоптозу, индуцированному МКА анти-Fas [Cleary A. M. et. al., 1995].

Мышьиные CD5+-В-лимфоциты не экспрессируют CD95(Fas/APO-1)-антиген. На этих клетках экспрессия этого антигена появляется после их активации [Mandik L. et. al., 1995]. У человека CD5+-В-лимфоциты появляются при хроническом лимфолейкозе [Барышников А. Ю. и др., 1989]. CD5+-В-лимфоциты в норме появляются на стадии дифференцировки В-клеток, когда они выходят из зародышевых центров и перемещаются в медуллярные тяжи. Иммуногистологически их локализуют по периферии зародышевых центров. Затем этот антиген исчезает с поверхности В-клеток. В норме он экспрессирован приблизительно на 20 % В-лимфоцитов периферической крови [Барышников А. Ю. и др., 1989].

Исследование экспрессии CD95(Fas/APO-1)-антигена на клеточных линиях, различающихся по степени дифференцировки, показало, что пре-пре-В-клеточные линии не экспрессировали антиген, а пре-В-клеточные линии экспрессировали антиген на низком уровне [Nishiuchi R. et. al., 1996]. Все плазмочитарные линии клеток экспрессировали антиген на низком или умеренном уровне. Некоторые клеточные линии с фенотипом периферических В-клеток экспрессировали CD95-антиген. Почти все исследованные линии были чувствительны к Fas-опосредованному апоптозу [Nishiuchi R. et. al., 1996].

А. Ю. Барышников и П. К. Иванов тестировали с помощью МКА ICO-160 экспрессию антигена CD95(Fas/APO-1) на В-клеточных линиях, различающихся по степени дифференцировки:

Raji, Daudi, JY, U266, RPMI-8626 и Eskol. На В-лимфобластных линиях Raji, Daudi и JY, происшедших из лимфомы Бюркитта, CD95-антиген был экспрессирован на 100 % клеток, хотя плотность антигена на клетках Raji была низкой. На пре-В-клеточных линиях U266 и RPMI-8626 антиген CD95 был представлен на низком проценте клеток (5 и 13 соответственно). Пре-плазматическая линия Eskol, полученная из волосато-клеточного лейкоза, также слабо экспрессирует антиген CD95 — около 10 % антиген-положительных клеток. Таким образом, менее дифференцированные клеточные линии экспрессируют антиген CD95(Fas/APO-1), а по мере дифференцировки В-клеток антиген исчезает.

Конечным этапом дифференцировки В-клеток является плазматическая клетка. Большинство плазматических клеток живут во вторичных лимфоидных тканях несколько дней, тогда как в ламина проприа в слизистой и в костном мозге они живут несколько недель. Тонзиллярные плазматические клетки экспрессируют антигены CD9, CD19, CD24, CD37, CD40, CD74, HLA-DR, но не содержат CD10, HLA-DQ, CD28, CD56, CD95(Fas/APO-1) [Merville P. et al., 1996]. Они также экспрессируют *Bcl-2*. Плазматические клетки миндалин подвергаются апоптозу *in vitro*, но не отвечают на триггер МКА против CD40-антигена. Костномозговые фибробласты защищают плазматические клетки от апоптоза [Merville P. et al., 1996].

D. M. Hockenberry и соавт. (1991) анализировали экспрессию протоонкогена *Bcl-2*, регулирующего апоптоз, в В-клеточном ряду дифференцировки в фолликулах лимфатических узлов. Этот ген обнаружен во многих типах фолликулярных В-клеточных лимфом [Tsujimoto Y. et al., 1985]. В норме ген локализован в хромосоме 18, а в фолликулярных лимфомах он транслоцирован в область гена тяжелой цепи иммуноглобулина в хромосоме 14. Белок *Bcl-2* сильно экспрессирован в В-клетках мантийной зоны фолликулов по сравнению с зрелыми В-клетками с фенотипом IgM+/IgD+. Экспрессия *Bcl-2* также наблюдалась в апикальной светлой зоне фолликулов, которая содержит активированные В-клетки. Эти клетки дифференцируются в плазматические клетки или В-клетки памяти. В противоположность этому.

белок *Bcl-2* полностью отсутствовал в темной зоне фолликула и базальной светлой зоне, в которых centrocytes экспрессируют антиген CD95(Fas/APO-1) и погибают в результате апоптоза. Активированные В-клетки из апикальной светлой зоны фолликула, которые экспрессируют как *Bcl-2*, так и CD95, резистентны к апоптозу.

Экспрессия антигена CD95(Fas/APO-1) при остром лимфобластном лейкозе у детей

Острые лейкозы занимают ведущее место в структуре заболеваемости гемобластозами, а острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ) является одним из самых распространенных (около 30 %) опухолевых заболеваний детского возраста. На его долю приходится 75–80 % среди острых лейкозов у детей. В последние годы интенсивно исследовалась иммунологическая неоднородность ОЛЛ. Было показано, что большая подгруппа ОЛЛ у детей и взрослых с благоприятным прогнозом идентифицируется с помощью антигена CD10, который был описан в 1975 г. Janossy и соавторами в комбинации с HLA-DR-антигеном. С помощью антисыворотки против CD10-антигена было показано, что 60–80 % больных и Т-, и В-ОЛЛ имеют специфический антиген и более благоприятное течение заболевания, что позволило к концу 70-х г. выделить общий подвариант ОЛЛ, имеющий лучшие прогностические черты [Барышников А. Ю. и др., 1989].

Предпринимались попытки определить экспрессию и функцию CD95(Fas/APO-1)-антигена при ОЛЛ. Т. Kotani и соавт. (1994) анализировали экспрессию CD95(Fas/APO-1)-антигена методом проточной цитофлюориметрии на мононуклеарах периферической крови 12 взрослых больных Т-клеточным лейкозом. В этих клетках определяли индукцию апоптоза с помощью МКА против Fas-антигена, а также экспрессию активационных антигенов CD25 и CD26. Было обнаружено, что клетки больных значительно больше экспрессируют CD95(Fas/APO-1)-антигена, чем клетки здоровых людей. Интенсивность флуоресценции также была выше у больных Т-ОЛЛ. У большинства больных лейкозные клетки

отвечали апоптозом на МКА против Fas-антигена. Не обнаружили различий в экспрессии Fas-антигена у больных с фенотипом бластных клеток: CD4+/CD8-; CD4-/CD8-; CD4+/CD8+, а также с клиническим подтипом ОЛЛ. Кроме того, обнаружили отрицательную корреляцию между экспрессией CD95- и CD26-антигенов.

К. М. Lucking-Famira и соавт. (1994) на модельной системе пытались использовать МКА анти-APO-1 для лечения Т-ОЛЛ. Человеческие лейкозные клетки трансплантировали иммунодефицитным мышам линии SCID и вводили МКА анти-APO-1. Лейкозные клетки, полученные от мышей, были чувствительны к CD95(Fas/APO-1)-опосредованному апоптозу *in vitro*. Терапия мышей *in vivo* с помощью МКА индуцировала апоптоз в большинстве лейкозных клеток, что приводило к увеличению продолжительности жизни мышей. Однако анти-APO-1-терапия полностью не элиминировала опухолевые клетки. Предполагают, что это связано с резистентностью части лейкозных клеток к Fas-опосредованному апоптозу.

К.-М. Debatin и Р. Н. Krammer (1995) обнаружили экспрессию APO-1-антигена на бластных клетках 21 из 30 детей, больных Т-ОЛЛ, и 6 клеточных линий, происшедших из Т-ОЛЛ. Плотность экспрессии антигена была похожей на клетках больных и линиях В-клеток и не зависела от экспрессии антигена CD3 зрелых Т-клеток. Большинство клеток Т-ОЛЛ были резистентны к апоптотическому действию МКА анти-APO-1. В чувствительных клетках апоптоз появлялся через 6 ч после инкубации с 1 нг/мл МКА. Не было корреляции между интенсивностью экспрессии антигена APO-1 и чувствительностью к апоптозу как в Т-клеточных культурах, так и в клетках больных. Авторы предположили, что резистентность к апоптозу может быть связана либо с экспрессией aberrантной молекулы APO-1, либо с гиперэкспрессией протоонкогена *Bcl-2*. Однако определение *Bcl-2* не показало такой зависимости. Протоонкоген *Bcl-2* был одинаково экспрессирован как в чувствительных к апоптозу клетках, так и в резистентных. Резистентность к индукции апоптоза снималась циклогексимидом дозо-зависимым образом. Т-бласты больных взрослым

Таблица 8.1

Частота встречаемости иммунологических
подвариантов ОЛЛ

Иммунологический вариант	Количество больных	Частота встречаем. варианта (%)
про-В	6	15,8
пре-пре-В	22	57,9
пре-В	2	5,3
В	1	2,6
Т	5	13,1
О	2	5,3
Всего	38	

Т-клеточным лейкозом высокочувствительны к АРО-1-опосредованному апоптозу [Debatin et. al., 1990, 1993].

Сравнение частоты встречаемости различных подвариантов ОЛЛ у обследованных 38 больных представлено в табл. 8.1, из которой видно, что наиболее часто представлен пре-пре-В-ОЛЛ (57,8 %), имеющий благоприятный прогноз.

Далее авторы анализировали частоту экспрессии CD95-антигена в каждом из иммунологических подвариантов, что отражено в табл. 8.2. В общей группе CD95-позитивных детей, больных ОЛЛ, антиген был экспрессирован на $37,2 \pm 7,8$ % бластах костного мозга. Сравнение частоты встречаемости этого антигена при различных иммунологических подвариантах показало, что наиболее часто (63,6 %) экспрессия определялась при клинически наиболее благоприятном пре-пре-В подварианте ОЛЛ.

Далее было проведено сравнение экспрессии антигена CD95(Fas/APO-1) с другими дифференцировочными антигенами.

Антиген CD10 присутствовал у 22 больных из 35, частота экспрессии составляла 62,8 %. В костном мозге антиген CD10 был представлен на $72,5 \pm 5,1$ % бластных клеток. Корреляционная связь между CD10 и CD95 была средней степени ($r = 0,34$), а коэффициент достоверности был статистически значимым $0,02 < p < 0,05$.

Таблица 8.2

Частота встречаемости CD95(Fas/APO)-антигена при различных иммунологических подвариантах ОЛЛ у детей

Иммуно-логический вариант	Количество исследуемых больных	Количество CD95-положит. случаев	Процент CD95-положит. случаев	Кол-во антиген-положит. бластов ($M \pm m$)
про-В	6	1	16,6	21
пре-пре-В	22	14	63,6	$38,8 \pm 9,7$
пре-В	2	0	0	0
В	1	1	100	74,1
Т	5	2	40	$84,5 \pm 10,5$
О	2	1	50	11
Всего	38	19	50	$37,2 \pm 7,8$

Антиген CD19 был обнаружен у 18 из исследованных 28 больных (частота экспрессии — 64,28 %). В антиген-положительных случаях процент клеток, найденных с помощью МКА против антигена CD19, был равен $58,5 \pm 5,4$ %. Однако, в отличие от антигена CD10, не было выявлено статистически значимой связи между экспрессией антигенов CD95 и CD19.

Антиген CD22 был найден у 6 из 14 исследованных пациентов (частота экспрессии — 42,9 %). В антиген-положительных случаях процент клеток, выявленных при использовании МКА против вышеуказанного антигена, составил $39,9 \pm 7$ %. Не было выявлено статистически значимой связи между экспрессией антигенов CD95 и CD22.

Антиген CD23 не был найден ни у одного из 9 исследованных больных. Поверхностные иммуноглобулины М-изотипа были обнаружены у 1 больного.

Цитоплазматические иммуноглобулины М-изотипа были обнаружены только у 2 из 22 пациентов (9,1 %), включенных на основании этого в подгруппу пре-В-ОЛЛ. сyIgM присутствовали в 70 % и 80 % костномозговых клеток. Не было выявлено статистически значимой связи между экспрессией антигенов CD95 и сyIgM.

Антиген гистосовместимости HLA-DR был экспрессирован у 29 больных из 35 (частота экспрессии — 82,8 %). В антиген-положительных случаях процент клеток, выявленных МКА против этого антигена, был равен $69,3 \pm 4,5$. Корреляционная связь с антигеном CD95 не была найдена.

Т-клеточные антигены CD1a и CD8 не были экспрессированы.

Антиген CD5 был отмечен только у 2 из 34 больных (частота экспрессии — 5,8 %). Количество бластных клеток, экспрессирующих данный антиген, было в 2 положительных случаях — 40 и 22,5 %. Не было обнаружено статистически значимой связи между экспрессией маркеров CD95 и CD5.

Т-клеточный антиген CD7 был найден только у 3 больных из 36 (частота экспрессии — 8,33 %). В антиген-положительных случаях процент клеток, обнаруженных при помощи МКА против антигена CD7, составлял $46,2 \pm 13,4$ %. Корреляции с антигеном CD95 не было.

Частота экспрессии антигена CD38 была 27,3 %. Антиген был экспрессирован только у 6 из 22 больных. У антиген-положительных пациентов процент клеток был равен $62,8 \pm 12,8$ %. Статистически значимой связи между экспрессией антигенов CD95 и CD38 не было.

Антиген CD34 был экспрессирован у 7 из 14 тестированных больных (частота экспрессии — 50 %). В антиген-положительных случаях процент клеток, обнаруженных при помощи МКА против CD34, составил $61,4 \pm 4,5$ %. Корреляция с антигеном CD95 отсутствовала.

Антиген CD11b был найден у 8 из 36 детей (частота экспрессии — 22,2 %). Он был экспрессирован на $11,98 \pm 2,7$ % клеток костного мозга. Не было выявлено статистически значимой связи между экспрессией антигенов CD95 и CD11b.

Антиген CD11a присутствовал у 6 из 21 ребенка (частота экспрессии — 28,6 %). В антиген-положительных случаях процент клеток, выявленных МКА против CD11a, составил $45,6 \pm 13,8$ %. Корреляционная связь с антигеном CD95 была статистически недостоверной.

Рецептор трансферрина (антиген CD71) был экспрессирован на клетках у 3 из 12 тестируемых больных (частота экспрессии — 25 %). В антиген-позитивных случаях процент клеток, выявленных с помощью МКА против этого антигена, составлял $24,2 \pm 1,6$ %. Корреляционная связь с антигеном CD95 не была найдена.

Затем была исследована корреляционная зависимость экспрессии дифференцировочных антигенов и антигена CD95 при различных иммунологических подвариантах ОЛЛ. Однако, в результате малочисленности подгрупп была выявлена только одна закономерность: была корреляция в группе пре-пре-В-ОЛЛ между экспрессией CD10-антигена и экспрессией CD95 ($r = 0,54$, $p < 0,05$).

Таким образом, исследование корреляционной связи экспрессии антигена CD95 и других дифференцировочных антигенов на бластных клетках костного мозга детей больных ОЛЛ выявило статистически значимую связь только для антигена CD10, являющегося благоприятным прогностическим признаком.

§ 8.1. Сравнение CD95-положительной и CD95-отрицательной подгрупп ОЛЛ

В связи с наличием или отсутствием антигена CD95 на поверхности бластов костного мозга, больных можно разделить на 2 подгруппы: CD95-позитивные и CD95-негативные. Группу из 38 детей, больных острым лимфобластным лейкозом, авторы [Барышников А. Ю. и соавт., 1999] условно разделили на две подгруппы: CD95+ и CD95-. За CD95-положительный случай считали больных, у которых при иммунофенотипировании количество CD95-положительных клеток было равно или больше 10 %. В CD95+-подгруппе был 21 ребенок, из них 10 мальчиков и 11 девочек; а в CD95--подгруппе было 17 детей, из них 12 мальчиков и 5 девочек.

CD95+-группа объединяла следующих больных: 1 ребенок с про-В-подвариантом, 14 — с пре-пре-В-ОЛЛ, 1 больной с В-ОЛЛ, 2 больных с Т-ОЛЛ, 1 больной с «О»-подвариантом ОЛЛ.

CD95-негативная группа включала 5 детей с про-В-ОЛЛ, 8 — с пре-пре-В-ОЛЛ, 2 больных с пре-В-ОЛЛ, 3 — с Т-вариантом ОЛЛ и 1 — с «О»-подвариантом ОЛЛ.

Эти две подгруппы сравнили по экспрессии дифференцировочных антигенов на бластных клетках костного мозга, а также по клинико-гематологическим показателям.

При анализе экспрессии маркеров было обнаружено, что антиген CD10 присутствует у 14 из 20 CD95+-детей (частота экспрессии — 70 %), тогда как среди CD95--детей данный антиген был найден у 8 из 15 (частота экспрессии — 53,3 %). Однако различия статистически не значимы. Среднее число CD10-положительных клеток составляло у CD95-положительных больных $50,4 \pm 8,7$ %. Значения экспрессии колебались в интервале 0–100 %. Однако в этой подгруппе в антиген-положительных случаях процент клеток, выявленных МКА против антигена CD10, составлял $71,1 \pm 7$ %. В CD95-отрицательной подгруппе $40,7 \pm 10,5$ % бластных клеток экспрессировали антиген CD10. Процент клеток в антиген-положительных случаях был $75 \pm 7,4$ %. Коэффициент достоверности по Стьюденту оказался $p > 0,05$. Степень достоверности по χ -квадрат была $p > 0,05$, т. е. различия в проценте антиген-положительных клеток между группами статистически незначимы. Была найдена прямая корреляционная связь средней степени ($r = 0,41$) экспрессии антигена CD10 с антигеном CD95 в положительной подгруппе ($p > 0,05$).

Частота экспрессии антигена CD19 оказалась сходной в двух подгруппах: 64,7 % и 63,6 %. Антиген был экспрессирован у 11 из 17 CD95-положительных пациентов ($37,57 \pm 6,9$ % антиген-положительных клеток) и у 7 из 11 CD95-отрицательных больных ($44,7 \pm 10,5$ % антиген-положительных клеток). Процент CD19+-клеток в антиген-позитивных случаях составлял $53,2 \pm 6,9$ % в CD95-положительной подгруппе и $66,6 \pm 8,4$ % — в CD95-негативной. Корреляционная связь с антигеном CD95 не была найдена.

Была выявлена существенная разница в частоте экспрессии антигена CD22 в подгруппах CD95+ и CD95-. Антиген CD22 был выявлен только у 1 (12,5 %) из 8 CD95+-больных, тогда как в CD95--подгруппе бластные клетки 5 (83,3 %) из 6 детей

экспрессировали этот антиген. Число антиген-положительных клеток составило $32,2 \pm 9,0$ % ($p < 0,05$). Различия в частоте экспрессии антигена также были статистически значимы ($p < 0,05$). Антиген CD22 является маркером зрелых этапов дифференцировки В-клеток. Следовательно, можно сделать предположение, что CD95-отрицательные бласты являются иммунологически более зрелыми по сравнению с CD95-положительными. Следует подчеркнуть, что больные с иммунологически менее зрелыми бластными клетками имеют более благоприятный прогноз [Барышников А. Ю. и др., 1989].

Частота экспрессии антигена гистосовместимости HLA-DR была 90 % (18 детей из 20), число антиген-положительных клеток было $62,23 \pm 6,7$ % для CD95+-подгруппы и 73,33 % (11 больных из 15) в CD95--подгруппе, число костномозговых клеток, реагирующих с антигеном, составляло $54,79 \pm 9,0$ %. В CD95-положительной подгруппе процент клеток антиген-положительных составлял $67,9 \pm 6$ %. В CD95-отрицательной подгруппе этот процент составлял $71,5 \pm 6,9$ %. Различия статистически незначимы.

Частота экспрессии Т-клеточных маркеров была сходной или одинаковой в двух подгруппах. Антиген CD5 был экспрессирован только у одного из 20 больных в CD95-позитивной группе (частота экспрессии — 5%). Число антиген-положительных клеток у данного больного составляло 22,5 %. В CD95-отрицательной подгруппе бластные клетки 1 больного из 14 обследованных экспрессировали антиген CD5 (частота экспрессии — 7,14 %). Число антиген-положительных клеток составляло 40 %. Антиген CD90 не был обнаружен в CD95+-подгруппе и был выявлен у 1 из 10 больных в CD95--подгруппе. Антигены CD7, CD4 CD8 не были экспрессированы на клетках костного мозга у больных в обеих подгруппах.

Антиген CD38 был экспрессирован у 3 (25 %) из 12 детей CD95-положительной подгруппе. Число антиген-положительных костномозговых клеток составляло $20,7 \pm 9,6$ %. В CD38+-случаях процент клеток, экспрессирующих данный антиген, был равен $68,3 \pm 21,7$ %. В CD95-отрицательной подгруппе 3 (30 %) ребенка из 10 детей экспрессировали антиген CD38. Число антиген-

положительных клеток было $20,8 \pm 9,4$ %. В CD38+-случаях процент клеток составлял $57,3 \pm 17,9$ %. Результаты статистически незначимы.

Рецептор трансферрина (CD71) практически отсутствовал на клетках костного мозга больных обеих подгрупп.

Частота экспрессии антигена CD34 (маркера полипотентной стволовой клетки) была одинаковой (50 %) в обеих подгруппах. Антиген был найден у 4 из 8 CD95+-детей на $30,5 \pm 10,6$ % клеток костного мозга и у 3 из 6 детей CD95--пациентов на $35,5 \pm 4,3$ % бластных клеток.

Сходные результаты показало изучение экспрессии маркеров CD11a и CD11b: частота экспрессии для первого антигена составляла 27,3 % и 30 %, соответственно, а для второго — 20 % и 18,8 %, соответственно. Антиген CD11a экспрессировался у 3 из 11 CD95+-больных ($14,7 \pm 4,2$ %). Была найдена прямая корреляционная связь средней степени ($r = 0,57$) между CD96(Fas/APO-1)-антигеном и CD11a в CD95-положительной подгруппе ($p < 0,05$). Процент клеток CD11a+ составлял $44,5 \pm 10,3$ % в CD95+-подгруппе и $32 \pm 5,6$ % в CD95--подгруппе; доверительный коэффициент был $t = 0,93$.

Таким образом, сравнение экспрессии дифференцировочных антигенов лейкоцитов человека на клетках костного мозга детей больных ОЛЛ, в зависимости от экспрессии антигена CD95(Fas/APO-1), показало, что в CD95+-подгруппе была найдена прямая корреляционная связь средней степени ($r = 0,41$) экспрессии антигена CD10 с антигеном CD95 ($p > 0,05$); в CD95+-подгруппе статистически значимо реже экспрессирован зрелый В-клеточный антиген CD22 (12,5 % против 83,3 %).

А. Ю. Барышников и соавт. (1998) сравнили выживаемость больных ОЛЛ детей, в зависимости от экспрессии клетками костного мозга антигена CD95. Для изучения выживаемости детей, больных ОЛЛ, был использован тест Mantel-Haenszel (критерий logrank), являющийся одним из наиболее чувствительных методов статистического анализа. Для подсчета общей выживаемости детей, больных ОЛЛ, (38 пациентов) в течение 60 месяцев (5 лет), были сопоставлены CD95-позитивная и CD95-негативная подгруппы.

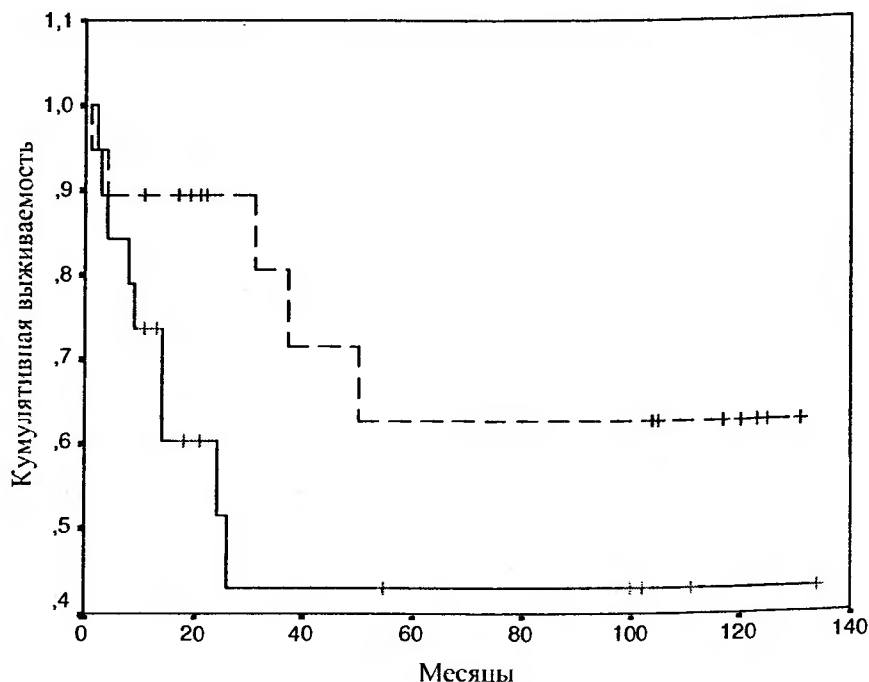


Рис. 8.1. Сравнение общей выживаемости в CD95-положительной и CD95-отрицательных группах.

Обозначения на рисунке: (---) — CD95-положительная группа;
(—) — CD95-отрицательная группа

Количество CD95+—детей было 21, из них умерли 5; в CD95—подгруппе было 17 пациентов, из них погибли 9 больных.

Медиана общей выживаемости для CD95-отрицательной выборки составила 18 месяцев. Для CD95-положительной подгруппы медиана общей выживаемости не достигнута, поскольку 65,8 % детей до сих пор живы (рис. 8.1).

Частота рецидивов в CD95+—группе наблюдалась у 17,6 % больных, а ремиссия достигнута у 82,3 % детей. Медиана безрецидивной выживаемости не достигнута, так как более 50 % детей в группе находятся в ремиссии. У 25 % больных длительность ремиссии составила 23,7 мес. Напротив, в CD95—группе медиана

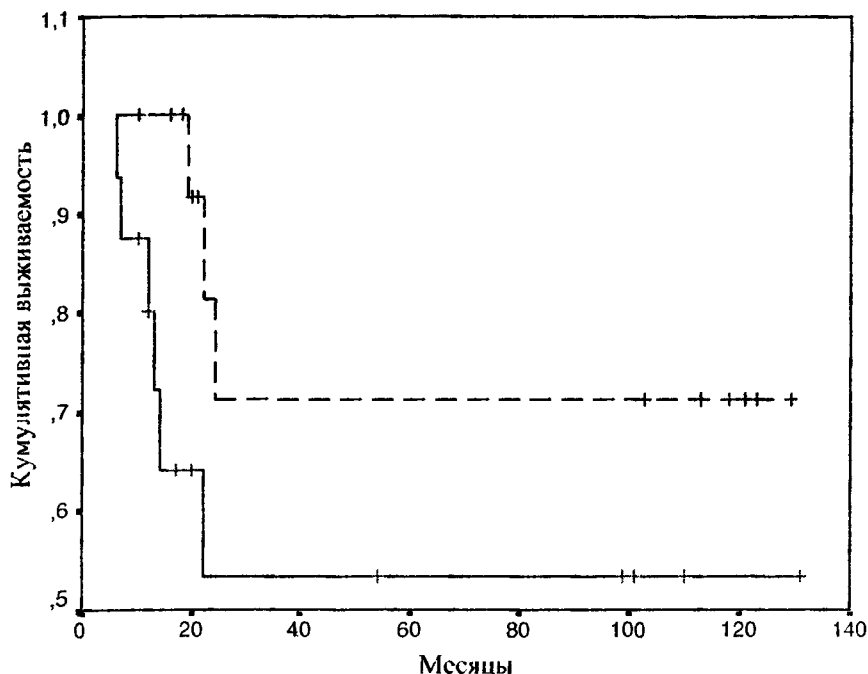


Рис. 8.2. Сравнение безрецидивной выживаемости в CD95-положительной и CD95-отрицательной подгруппах.

Обозначения на рисунке: (---) — CD95-положительная группа;
(—) — CD95-отрицательная группа

безрецидивной выживаемости составляет 19,5 мес., наблюдается увеличение частоты рецидивов до 37,5 %. У 25 % больных в этой группе длительность ремиссии составила 7 мес. (рис. 8.2). Далее важно отметить, что различия в безрецидивной выживаемости между CD95+ и CD95- являются достоверными, что было оценено с помощью следующих методов статистической обработки данных: при применении Gehan's Wilcoxon-test $p = 0,02$; F-test $p = 0,05$; Cox's test $p = 0,05$.

На следующем этапе работы исследователи провели корреляционный анализ связи экспрессии антигена CD95 и клинико-лабораторными характеристиками больных этой группы. Результаты

этой работы показали, что отсутствует статистически значимая корреляционная связь между экспрессией антигена CD95 и иммунологическим подвариантом ОЛЛ, полом больных, степенью риска, размерами селезенки и лимфатических узлов, нарушением костной структуры. В то же время, обнаружили статистически значимую корреляционную связь между экспрессией на поверхности бластных клеток костного мозга антигена CD95 и лимфоцитозом ($r = 0,38$, $p < 0,02$), а также геморрагическим синдромом ($r = 0,36$, $p < 0,05$).

Таким образом, безрецидивная выживаемость и общая выживаемость в течение 60 месяцев у детей, чьи бластные клетки экспрессировали антиген CD95, были статистически значимо лучше, чем в группе детей без CD95-положительных бластных клеток в костном мозге.

§ 8.2. Ретроспективный анализ результатов экспрессии антигена CD95(Fas/APO-1) детей с острым лимфобластным лейкозом, обследованных в 1987–1988 гг.

В 1987–1988 гг. в лаборатории клинической радиоиммунологии РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН с помощью МКА IPO-4 были исследованы клетки костного мозга 22 детей с острым лимфобластным лейкозом. Уникальность заключается в том, что антиген CD95(Fas/APO-1) был открыт и описан в 1989 г. одновременно и независимо друг от друга в двух лабораториях Японии и США [Yonehara S., Ishii A., Yonehara M.; Trauth B. C. et. al.] и получил свое название по имени антител. На V Международном рабочем совещании по дифференцировочным антигенам лимфоцитов человека этот антиген получил название CD95. Однако МКА с такой же специфичностью были получены уже в 1986 г. в Киевском Институте Проблем онкологии им. Р. Е. Кавецкого С. П. Сидоренко и соавторами. МКА IPO-4 были получены против В-клеточной линии и выявляли, по мнению авторов, активационный антиген [Сидоренко С. П. и др, 1992].

Впоследствии, в Бостоне, на V Международном рабочем совещании по дифференцировочным антигенам лимфоцитов человека МКА IPO-4 были отнесены в кластер дифференцировки CD95. В 1986 г. С. П. Сидоренко передала МКА IPO-4 в лабораторию клинической радиоиммунологии ОНЦ РАМН для исследования на клетках больных различными формами лейкоза и лимфомы. Эти МКА были включены в панель антител для иммунофенотипирования лейкозов и лимфом. За период с 1987 по 1988 г. было проиммунофенотипировано 22 ребенка, больных ОЛЛ. В связи с этим была уникальная возможность проанализировать 10-летнюю выживаемость больных и оценить клиническую значимость экспрессии антигена CD95(Fas/APO-1) [Барышников А. Ю. и др., 1999].

В 1987–1988 г. были исследованы клетки костного мозга 22 детей, больных ОЛЛ, в непрямой реакции поверхностной иммунофлюоресценции, которую учитывали на микроскопе «Oplon». Положительной считалась реакция, выявляющая $\geq 10\%$ антиген-положительных клеток. Среди 22 больных детей было 12 мальчиков и 10 девочек. Диагноз ОЛЛ был поставлен при помощи морфологического исследования и цитохимии, а также иммунологически на основании выявления в костном мозге клеток, экспрессирующих следующие антигены: CD10, CD19, HLA-DR, slg M, cyIgM, CD90, CD5, CD7, CD38, CD11a, CD11b, CD58, CD15, HAE3, HAE9.

Антиген CD95 был экспрессирован у 12 (54,5 %) из 22 больных. Число антиген-положительных клеток составляло $21,0 \pm 7,0\%$. Значение экспрессии антигена CD95 колебалось от 0 до 100 %. Однако у 12 больных бластные клетки костного мозга экспрессировали более 10 % антиген-положительных клеток. В антиген-положительных случаях процент клеток, выявленных МКА против антигена CD95, был равен $38,1 \pm 10,7\%$.

Авторы проанализировали связь экспрессии антигена CD95 с другими дифференцировочными антигенами, экспрессированными на бластных клетках костного мозга этих больных. МКА против антигена CD10 реагировали с $41,9 \pm 9,6\%$ клеток костного мозга у 11 (55 %) больных из 20 пациентов. Экспрессия антигена

CD10 колебалась от 0 до 100 %. В антиген-положительных случаях процент клеток, выявленных МКА против вышеуказанного антигена, был равен $75,3 \pm 8,6$ %. Обнаружена прямая корреляционная связь средней степени ($r = 0,59$) с антигеном CD10. Коэффициент достоверности был $p < 0,01$, что говорит о существенной статистической значимости результата.

Обще-В-клеточный антиген CD19 присутствовал на бластных клетках у 7 (53,9 %) из 13 детей. Количество клеток костного мозга, реагирующих с МКА против CD19, было $29,7 \pm 7,5$ %. Экспрессия данного антигена колебалась от 2 до 90 %. В антиген-положительных случаях процент клеток составил $47,1 \pm 9,9$ %. Корреляция между экспрессией антигенов CD95 и CD19 была тоже прямой и средней степени, составляя 0,59, а коэффициент достоверности $0,02 < p < 0,05$ подтверждает статистическую значимость корреляционной связи.

Антиген HLA-DR был обнаружен у 16 (72,7 %) из 22 больных. Число HLA-DR-положительных клеток было $45,4 \pm 6,8$ %. В антиген-положительных случаях процент клеток был равен $58,9 \pm 6,7$ %. Корреляция CD95 с маркером гистосовместимости HLA-DR была средней степени ($r = 0,34$), однако коэффициент достоверности был статистически незначимым.

Обще-Т-клеточный антиген CD5 экспрессирован был у 2 (9 %) из 22 детей. МКА против антигена CD5 реагировали с $5,6 \pm 2,0$ % клеток костного мозга. Значения экспрессии находились в интервале от 0 до 40 %. В двух антиген-положительных случаях антиген CD5 был представлен на 40 и 22,5 % клеток костного мозга, что указывает на Т-клеточный вариант ОЛЛ. Экспрессия этого антигена не коррелировала с экспрессией антигена CD95. Другой обще-Т-клеточный антиген CD7 был экспрессирован у 1 (4,7 %) из 21 на 60 % клеток костного мозга.

Антиген CD38 был экспрессирован у 6 (27,3 %) из 22 больных детей. Значения экспрессии антигена колебались от 0 до 90 %. В антиген-положительных случаях процент клеток составлял $62,8 \pm 12,8$ %. Экспрессия этого антигена не коррелировала с экспрессией антигена CD95. Антиген CD90 (Thy-1) присутствовал только

у 1 (4,5 %) из 22 пациентов. В положительном случае было 21 % CD90+-клеток.

Антиген CD11b выявлялся у 6 (27,3 %) из 22 больных и $16,1 \pm 4,0$ % лейкозных клеток были антиген-положительными. Значения экспрессии антигена включались в интервале 0–69 %. У антиген-положительных пациентов процент клеток, реагирующих с МКА против данного антигена, был равен $42,2 \pm 8$ %. Достоверность корреляции с антигеном CD95 была статистически незначимой.

Результаты корреляционного анализа связи между экспрессией антигена CD95 и клинико-лабораторными характеристиками больных этой группы показали, что отсутствует статистически значимая корреляционная связь между экспрессией антигена CD95 и иммунологическим подвариантом ОЛЛ, полом больных, степенью риска, размерами печени и селезенки, нарушением костной структуры. В то же время обнаружили статистически значимую корреляционную связь между экспрессией на поверхности бластных клеток костного мозга антигена CD95 и лейкопенией ($r = 0,69$, $p < 0,01$), blastsозом ($r = 0,49$, $p < 0,05$) и геморрагическим синдромом ($r = 0,41$, $p = 0,05$).

А. Ю. Барышников и соавт. (1998) сравнили выживаемость детей в этих двух группах больных. Больных лечили по программе I и II. С этой целью был использован тест Mantel-Haenszel. В CD95--позитивной подгруппе было 12 детей, из них погибли 4 пациента. В CD95-негативную группу входило 10 детей, из них 7 умерли. В качестве временного интервала был избран год. Оценивалась общая выживаемость в течение 10 лет. Коэффициент летальности в первой выборке был 0,57. Медиана общей выживаемости для детей CD95 отрицательной подгруппы составляло 17 месяцев. Для пациентов CD95-положительной подгруппы медиана общей выживаемости не достигнута, так как 66,7 % детей находятся в ремиссии.

Таким образом, экспрессия антигена CD95(Fas/APO-1) является благоприятным прогностическим признаком ОЛЛ у детей при лечении по программам I и II.

§ 8.3. Результаты анализа детей, больных острым лейкозом, обследованных в 1994–1996 гг.

Вторая группа, состоящая из 16 детей с острым лимфобластным лейкозом, была обследована А. Ю. Барышниковым и соавт. (1999) в 1994–1996 гг. Группа состояла из 10 мальчиков и 6 девочек. Острый лимфобластный лейкоз был диагностирован с помощью морфологического и цитохимического исследований, а также иммунологически по обнаружению следующих антигенов на лейкозных клетках костного мозга: CD10, CD19, CD22, CD23, cyIgM, CD1a, CD5, CD7, CD8, CD34, HAE9, CD11b, CD71.

Для изучения экспрессии CD95(Fas/APO-1)-антигена были использованы МКА IPO-4 и ICO-160 против CD95-антигена. Положительной также считалась реакция, выявляющая $\geq 10\%$ антиген-положительных клеток. Иммунофенотипирование проводилось с помощью проточного цитофлуориметра «FACScan».

CD95(Fas/APO-1)-антиген был обнаружен у 9 (56,2 %) из 16 больных. У 9 больных антиген был экспрессирован на клетках костного мозга более чем на 10 %. Число костномозговых клеток, реагирующих МКА против антигена CD95(Fas/APO-1), составляло $16,4 \pm 5,5\%$. Интервал экспрессии находился в пределах 0,4–74,1 %. В антиген-положительных случаях процент выявленных клеток составил $26,8 \pm 8,4\%$. Антиген CD10 был экспрессирован у 11 (73,3 %) из 15 больных на $69,8 \pm 5,9\%$. Отсутствовала статистически значимая корреляционная связь между экспрессией антигена CD95 и CD10. Обще-В-клеточный антиген CD19 был обнаружен у 11 (73,3 %) из 15 детей на $65,7 \pm 5,6\%$ клеток костного мозга. В-клеточный антиген CD22, в норме экспрессированный на зрелых этапах дифференцировки В-клеток, был найден у 6 (42,9 %) из 14 больных на $39,9 \pm 7\%$ клеток костного мозга. Антиген CD23 зрелых активированных В-клеток не обнаружился ни у одного из 9 тестируемых больных. Антиген гистосовместимости HLA-DR был экспрессирован у всех 13 тестируемых больных на $82,0 \pm 3,4\%$ клеток костного мозга. Значения экспрессии находились в интервале 60,5–97,3 %. Не было статистически значимой

корреляционной связи между экспрессией антигена CD95 и HLA-DR-антигеном. С помощью МКА против CD1a, CD5, CD7, CD4, CD8 были исследованы Т-клеточные антигены. Антигены CD1a, CD4, CD5 и CD8 отсутствовали. Антиген CD7 был обнаружен только у 1 (6,7%) из 15 детей на 19,6% опухолевых клеток костного мозга. Антиген клеток-предшественников CD34 присутствовал у 7 (50%) из 14 больных на $61,4 \pm 4,52\%$ клеток костного мозга. Статистически значимая корреляционная связь между экспрессией антигена CD95 и CD34 отсутствовала. Антиген CD11b был найден только у 1 (7,1%) из 14 тестированных больных на 21,2% клеток костного мозга. Рецептор трансферрина (антиген CD71) был обнаружен у 3 (25%) из 12 пациентов. Интервал экспрессии антигена был от 0,9 до 26,1%. У антиген-позитивных детей процент клеток, найденных при помощи МКА против данного антигена, был равен $24,2 \pm 1,6\%$. Статистически значимая корреляционная связь между экспрессией антигена CD95 и CD71 не была найдена.

Корреляционный анализ связи между экспрессией антигена CD95 и клинико-лабораторными характеристиками больных этой группы показал, что отсутствует статистически значимая корреляционная связь между экспрессией антигена CD95 и иммунологическим подвариантом ОЛЛ, полом больных, степенью риска, размерами печени, селезенки и лимфатических узлов, геморрагическим синдромом. В то же время мы обнаружили полную прямую корреляционную связь между экспрессией CD95(Fas/APO-1)-антигена и возрастом больных ($r = 1,0$, $p < 0,01$). Таким образом, результаты корреляционного анализа, проведенные на 16 больных, совпадали с результатами, выполненными на 22 пациентах, но не были статистически значимыми, вероятно, в силу малочисленности группы.

Принципиальным различием в этих двух группах больных был подход к терапии ОЛЛ, который сейчас сильно отличается от подхода десятилетней давности. В течение последних 15 лет в отделении лейкозов отдела гемобластозов НИИ детской онкологии и гематологии РОНЦ им. Н. Н. Блохина применялись последовательно 4 программы лечения, которые были различны по интенсивности полихимиотерапии. Все программы включали в себя 4 этапа

лечения: индукцию ремиссии, консолидацию ремиссии, химио-лучевую профилактику нейролейкоза и поддерживающее лечение в периоде ремиссии. С 1988 г. по 1994 г. изменились схемы терапии детей больных ОЛЛ. В 1988 г. использовались программы I и II, а в 1994–1996 гг. — программа БМФ-90.

В связи с этим, Р. М. Тенюта (1999) сравнила частоту безрецидивного выживания при лечении больных по разным программам. I программа применялась с 1982 по 1986 гг. В индукцию ремиссии назначался преднизолон 40 мг/кв. м в день винкристин 1,5 мг/кв. м в неделю, рубомицин 30 мг/кв. м в неделю, эндолюмбально метотрексат 10 мг в течение 4–6 недель. По достижении ремиссии после индукционного курса проводилась консолидация ремиссии: цитозар 100 мг/кв. м в течение 3–5 дней, затем L-аспаргиназа 10 000 МЕ/кв. м в течение 4 дней или циклофосфан 400 мг/кв. м. По окончании курсов полихимиотерапии с целью профилактики нейролейкоза всем больным проводилось облучение головного мозга в суммарной дозе 24 Гр. На протяжении 5 лет осуществлялась поддерживающая терапия препаратами 6-меркаптопурин 50 мг/кв. м ежедневно и метотрексат 20 мг/кв. м еженедельно, а также применялись курсы реиндукций: 1 раз в 2–3 месяца винкристин 1,5 мг/кв. м с рубомицином 30 мг/кв. м 1 раз в неделю 2 недели подряд; 1 раз в 6 месяцев цитозар 100 мг/кв. м 5 раз с L-аспаргиназой 10 000 МЕ/кв. м 7 раз.

II программа проводилась в период с 1986 по 1988 г. В данной программе были соблюдены все те же принципы, что и в I программе. Проводилась индукция и консолидация ремиссии, химио-лучевая профилактика нейролейкоза, противорецидивное (поддерживающее) лечение в периоде ремиссии в течение 5 лет. Особенностью явилось введение в программу индукции ремиссии L-аспаргиназы (10 000 МЕ/кв. м 8 раз — 12, 15, 18, 21, 24 и 27 дни) и циклофосфана (1000 мг/кв. м на 36 и 64 дни), эндолюмбально метотрексат вводили 5 раз, в дозах в зависимости от возраста, от 6 до 12 мг. Консолидация ремиссии состояла из протокола М, т. е. из введения повышенных доз метотрексата (500–1000 мг/кв. м 3 раза) 1 раз в 7–10 дней. Препарат вводился внутривенно капельно 1/10 дозы за 1 час, 9/10 дозы за 24 часа. С введением метотрексата

применялся лейковорин 15 мг/кв. м внутривенно через 36 и 42 часа от введения метотрексата. Одновременно метотрексат вводился и эндолюмбально в возрастной дозировке. В дальнейшем проводилась лучевая терапия на область головного мозга в СОД 18–24 Гр (в зависимости от возраста и степени риска заболевания). Поддерживающая терапия не отличалась от проводимой ранее.

IV программа — адаптированная для СНГ, была названа ОЛЛ-БФМ-90, и разработана группой авторов из Берлина, Франкфурта, Мюнстера. В отделении лейкозов данную программу начали использовать, начиная с 1991 г. Она состоит из протокола 1, протокола М, протокола 2 и химио-лучевой профилактики нейролейкоза. Особенностью модифицированной программы является использование в протоколе М метотрексата в дозе 1000 мг/кв. м, а не 5000 мг/кв. м.

Протокол 1 проводится в течение 64 дней и состоит из двух фаз. В первую фазу назначается преднизолон 60 мг/кв. м в день с 1 по 28 дни с отменой в 2–3 дня, винкристин 1,5 мг/кв. м в день с 1 по 28 день с отменой на 2–3 дня, винкристин 1,5 мг/кв. м с рубомицином 30 мг/кв. м — 8, 15, 22, 29 дни, L-аспаргиназа 10000 МЕ/кв. м — 12, 15, 18, 21, 24, 27 дни и эндолюмбально метотрексат 5 раз, в зависимости от возраста, от 6 до 12 мг. Во второй фазе протокола 1 назначается 6-меркаптопурин 60 мг/кв. м в день (36–63 дни) и цитозар 75 мг/кв. м в день (4 цикла по 4 дня). Также вводится циклофосфан 1000 мг/кв. м на 36 и 64 дни.

Протокол М состоит из четырехкратного (8, 22, 36, 50 дни) введения метотрексата 1000 мг/кв. м (1 / 10 дозы за 30 мин., 9/10 за 36 часов) в сопровождении лейковорина 15 мг/кв. м через 42, 48, 54 часа от начала инфузии метотрексата. Одновременно метотрексат вводится эндолюмбально в возрастной дозировке. В течение всего протокола М применяется 6-меркаптопурин 25 мг/кв. м в день (1–56 дни).

Протокол 2 продолжается в течение 49 дней и включает в себя назначение дексаметазона 10 мг/кв. м в день (1–21 дни), винкристина 1,5 мг/кв. м с рубомицином 30 мг/кв. м 4 раза (8, 15, 22, 29 дни), L-аспаргиназы 10000 МЕ/кв. м на 8, 11, 15, 18 дни и циклофосфан 1000 мг/кв. м на 36 день. В дальнейшем применялся

6-меркаптопурин 60 мг/кв. м в день (36–49 дни) и цитозар 75 мг/кв. м в день 2 цикла по 4 дня (38–41 и 45–48 дни). Заключаящей фазой лечения была лучевая терапия области головного мозга в СОД 12–16 Гр, в зависимости от степени риска развития рецидива, который вычисляется по специальной нормограмме при постановке диагноза.

Поддерживающая терапия 6-меркаптопурин 50 мг/кв. м в день и метотрексат 20 мг/кв. м в неделю (доза корректируется в зависимости от абсолютного количества гранулоцитов в периферической крови) в периоде ремиссии проводится в течение 104 недель.

Р. М. Тенюта (1999) были сравнены общая выживаемость больных детей, леченых по программе I и II и по протоколу ВФМ-90. В 1994–96 гг. было обследовано 16 детей, больных острым лимфобластным лейкозом. У 9 пациентов бластные клетки костного мозга экспрессировали антиген CD95, у 7 больных бластные клетки были негативными по экспрессии этого антигена. Из 9 больных в CD95-положительной подгруппе 1 ребенок погиб. В CD95-отрицательной подгруппе умерли 2 из 7 больных. Различия между подгруппами статистически незначимы. При анализе в качестве временного интервала выбрали месяц. Общая выживаемость больных была оценена в течение 24 месяцев (рис. 8.3).

Изучая общую выживаемость детей, обследованных в 1989–1988 гг., обнаружили, что в конце 24-ого месяца еще были живы 91,7 % позитивных по экспрессии антигена CD95 детей, и только 33,3 % детей, чьи бластные клетки не экспрессировали этот антиген. Медиана общей выживаемости для CD95-положительной подгруппы не достигнута, а для CD95-негативной подгруппы составляет 15,5 месяцев (рис. 8.3). На основании этого анализа был сделан вывод, что экспрессия антигена CD95 имеет прогностическое значение у детей больных острым лимфобластным лейкозом лишь при использовании неинтенсивных программ терапии, а при лечении более современными интенсивными протоколами прогностическая значимость экспрессии антигена CD95 утрачивается.

У этих же больных была сравнена безрецидивная выживаемость в зависимости от экспрессии антигена CD95 и интенсивности программ терапии. Анализировалась безрецидивная

выживаемость в течение 24 месяцев. Медиана безрецидивной выживаемости при применении более эффективной программы полихимиотерапии БФМ-90 не была достигнута в CD95-отрицательной и CD95-положительной подгруппах. При лечении больных по программе I и II в CD95-положительной подгруппе медиана безрецидивной выживаемости не достигнута, в CD95-отрицательной подгруппе составила 18 месяцев (рис. 8.3). Этот анализ подтверждает вышесказанный вывод.

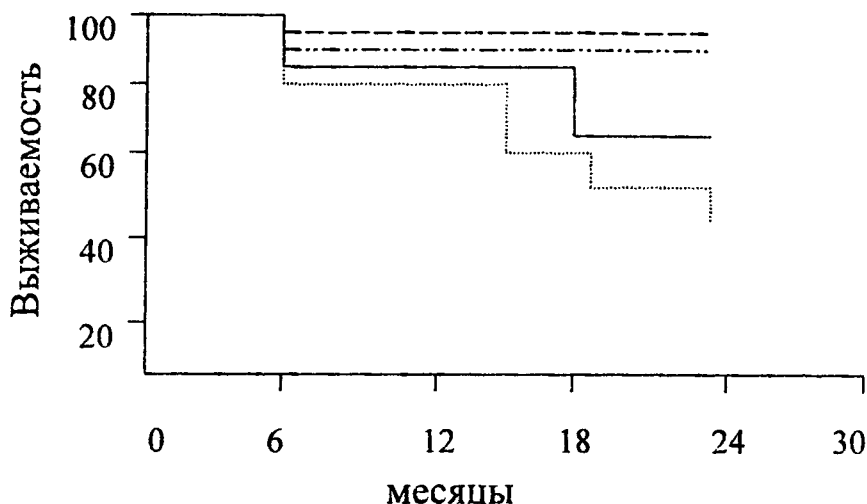


Рис. 8.3. Двухлетняя выживаемость детей, больных острым лимфобластным лейкозом, в зависимости от проводимой программы химиотерапии:

- (---) — CD95-позитивная группа (х/т 1986–1988);
- (.....) — CD95-негативная группа (х/т 1986–1988);
- (- · - · -) — CD95-позитивная группа (BFM90);
- (—) — CD95-негативная группа (BFM90)

Сравнение безрецидивной выживаемости в течение 24 мес. у CD95-положительных и CD95-отрицательных больных, леченных в 1978–88 гг. и в 1994–95 гг.

Наличие экспрессии CD95-антигена можно отнести к факторам благоприятного прогноза и на основании выявленных недавно С. Friesep и соав. механизма действия основных цитостатических

препаратов, применяемых для индукции и консолидации ремиссий ОЛЛ-доксорубин и метотрексат. Они показали, что цитостатические препараты в терапевтических дозах в лейкозных клетках могут действовать через взаимодействие CD95-рецептора/CD95-лиганда. Доксорубин индуцирует на поверхности клеток экспрессию CD95-лиганда, который затем связывается с CD95-рецептором, локализованным на поверхности этих же клеток, что приводит к передаче сигнала смерти. Этот механизм был ранее обнаружен при исследовании апоптоза в Т-клетках, индуцированного МКА против CD3/TCR-комплекса Т-клеточного рецептора антигена (см. главу 2). На примере Т-клеточной линии СЕМ было показано, что доксорубин в терапевтических дозах стимулирует экспрессию CD95-лиганд мРНК. Метотрексат также стимулирует экспрессию CD95-лиганда в концентрациях, применяемых *in vivo* в процессе терапии. По-видимому, с помощью данной гипотезы, можно объяснить и полученные А. Ю. Барышниковым и соавт. (1999) результаты по индукции апоптоза в процессе химиотерапии в CD95⁺-бластах костного мозга детей и более благоприятный прогноз у больных, чьи бластные клетки экспрессируют CD95-рецептор.

Таким образом, в свете исследований, проведенных в РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН по изучению экспрессии CD95-антигена на бластах костного мозга детей, больных ОЛЛ, можно сделать вывод, что экспрессия CD95(Fas/APO-1)-антигена достоверно влияла на увеличение как безрецидивной, так и общей выживаемости детей с ОЛЛ. Хотя на данный момент достоверно не известен механизм, посредством которого больные из CD95⁺- и CD95⁻-групп различаются по уровню выживаемости, полученные результаты четко показывают, что экспрессия CD95 имеет первостепенное значение в прогнозе этого заболевания. Таким образом, CD95-антиген можно охарактеризовать как новый прогностический маркер ОЛЛ.

Глава 9

Экспрессия антигена CD95(Fas/APO-1) при хроническом миелолейкозе

Хронический миелоидный лейкоз (ХМЛ) — клональное миелопролиферативное заболевание, возникающее из неопластически трансформированной плюрипотентной стволовой клетки [Falkow P. J. et. al., 1977; Koeffler H. P., 1981]. Это заболевание характеризуется присутствием Ph-хромосомы, которая появляется в результате транслокации t(9; 22) [Rowley J. D. et. al., 1973]. На молекулярном уровне происходит транслокация abl-онкогена из хромосомы 9 в breakpoint-кластерную область (bcr) гена на хромосоме 22 [Heisterkamp N. et. al., 1983; Shtivelman E. et. al., 1985]. Химерный bcr-abl транскрипт кодирует белок, который, возможно, является критическим в патогенезе ХМЛ. ХМЛ — это заболевание стволовой клетки. Малигнизированная стволовая клетка дает потомство всем росткам кроветворения. Признаком трансформированных клеток является Ph-хромосома. Она обнаруживается во всех клетках, включая В-лимфоциты. Лишь в Т-клетках она не определяется. Уникальность заболевания в том, что течение ХМЛ состоит из двух периодов: хронической фазы и кратковременной стадии бластного криза. В хронической фазе заболевания лейкозные клетки дозревают до зрелых гранулоцитов. По морфотехимическим характеристикам они не отличаются от нормальных нейтрофилов, в то же время по иммунологическим признакам они отличаются, так как слабее экспрессируют антигены, характерные для зрелых гранулоцитов, и наоборот, экспрессируют антигены ранних этапов дифференцировки [Крыжанов М. А. и др., 1985]. После хронической фазы, которая иногда достигает 25 лет, развивается короткая терминальная фаза. Признаком бластного криза является быстрое накопление в костном мозге и периферической

крови бластных клеток. Бластные клетки больных ХМЛ неоднородны по цитохимическим и иммунологическим характеристикам. Их относят к миелоидным, моноцитарным, эритроидным, мегакариоцитарным и лимфоидным предшественникам. Хроническая фаза заболевания рефрактерна к терапии. Лейкозные гранулоциты устойчивы к химиотерапии. Полагают, что это связано с гиперэкспрессией протоонкогена *Bcl-2*, который блокирует апоптоз. В то же время эти клетки чувствительны к апоптозу, индуцированному цитотоксическими Т-лимфоцитами. Этим объясняется успех применения гамма-интерферона в терапии ХМЛ. В стадии бластного криза опухолевые клетки по разному чувствительны к проводимой терапии. Лимфоидный вариант бластного криза ХМЛ более благоприятный и поддается терапии, включающей винкристин и преднизолон [Барышников А. Ю. и др., 1989].

Механизм бластной трансформации при ХМЛ не ясен. Многочисленные попытки выяснить механизм нарушения дифференцировки лейкозных клеток и «замораживания» их на стадии бластов не известен. Мы предположили, что, возможно, в процесс вовлечен апоптоз. Было показано, что на определенном уровне дифференцировки часть клеток погибает вследствие апоптоза, а резистентные к терапии бластные клетки накапливаются в организме больного [Логачева Н. П., 1998].

Для изучения этой гипотезы мы предприняли исследование Fas-опосредованного апоптоза при хроническом миелолейкозе. С этой целью были изучена экспрессию CD95(Fas/APO-1)-антигена на лейкозных клетках в хронической фазе заболевания и на бластных клетках в стадии бластного криза. Кроме того, определяли функциональное состояние рецептора путем индукции апоптоза с помощью МКА против CD95(Fas/APO-1)-антигена.

Экспрессию CD95(Fas/APO-1)-антигена на лейкозных клетках в хронической фазе заболевания исследовали у 44 больных с помощью МКА IPO-4 и ICO-160. Антиген определяли в непрямой реакции поверхностной иммунофлюоресценции на гранулоцитах периферической крови на проточном цитофлуориметре в гейте «гранулоциты». Ни в одном случае лейкозные клетки не экспрессировали антиген CD95(Fas/APO-1). Таким образом, можно

однозначно сделать вывод о том, что гранулоциты больных ХМЛ в хронической фазе не экспрессируют антиген CD95(Fas/APO-1).

§ 9.1. Экспрессия антигена CD95(Fas/APO-1) на лимфоидных клетках периферической крови больных ХМЛ

Особый интерес представляет проведенное нами исследование лимфоидных клеток периферической крови и костного мозга у больных ХМЛ в хронической фазе. Клетки крови были изучены у 42 больных, клетки костного мозга — у 35. Из числа этих исследований параллельно кровь и костный мозг были изучены у 31 больного.

Сам факт того, что именно лимфоциты крови и костного мозга могут являться ключом к пониманию патогенетических особенностей заболевания, не нов. Однако в последние годы появились новые методы изучения гемопоэза в норме и при воздействии на него различными биологическими факторами, в частности, так называемыми колониестимулирующими факторами. Под их влиянием в крови резко возрастает число лейкоцитов (до 60–80 тыс./мкл и более), отмечается сдвиг влево и, что особенно интересно, в кровь поступают стволовые гемопоэтические клетки из костного мозга. Феномен получил название мобилизации. Причем в процессе применения колониестимулирующих факторов, бластные клетки в периферическую кровь не поступают, и стволовые клетки имеют внешний вид лимфоцитов.

Нас заинтересовало проведение аналогии между ростом лейкоцитоза при ХМЛ и таковым под влиянием колониестимулирующих факторов.

При изучении лимфоцитарной клеточной фракции крови было отмечено, что в большинстве случаев среди лимфоцитов присутствовали стволовые гемопоэтические клетки (CD34+). Их среднее содержание составило $19,1 \pm 4,3$ % (разброс от 0,1 до 75 %, количество изученных образцов крови 41). В норме количество этих клеток значительно менее 1 %. Даже если учесть, что при

исследовании лимфоцитов крови был применен метод непрямой иммунофлуоресценции, ошибка в пределах которого, в зависимости от уровней неспецифического связывания, может достигать 2–3 %, то и в этом случае процент больных с экспрессией CD34 на лимфоцитах был очень высок: в 20 из 41 (48, 7 %) наблюдений отмечено более 5 % CD34+-клеток в периферической крови. У 17 (41,5 %) больных присутствовало более 10 % стволовых клеток в периферической крови. Данный факт не может остаться незамеченным, ведь, по существу, обнаруженное нами явление говорит о том, что, наряду с дифференцирующимися морфологически распознаваемыми клеточными элементами гранулоцитарного ряда, в периферической крови больных ХМЛ в хронической фазе циркулируют незрелые гемопоэтические предшественники по иммунофенотипу, более ранние, чем нормальные миелобласты. Анализ выявленного явления проведен нами по ряду показателей, в частности, оценено, как соотносится выход в кровь стволовых клеток с экспрессией на лимфоидных клетках антигена CD95(Fas/APO-1).

В целом по группе, среднее содержание в крови клеток, экспрессирующих CD95(Fas/APO-1), составило $30,9 \pm 4,7$ % (32 случая) с диапазоном значений от 0,1 до 85,7 %. Корреляция количества клеток, экспрессирующих CD95 с CD34-положительными лимфоцитами, была положительной, но недостоверной ($r = 0,25$). Повышенные уровни экспрессии CD95 на лимфоцитах больных ХМЛ в хронической фазе наблюдались нечасто. В 10 из 32 случаев экспрессия CD95 была выше нормальных значений (> 40 %). Это составило 31,2 % от всех больных. Однако данный факт не подтверждает, но и не отвергает присутствия CD95 на лимфоцитах крови больных ХМЛ в хронической фазе заболевания в повышенных количествах. Более того, в 40,6 % (13/32) значения CD95 были снижены (< 20 %). Таким образом, средние значения CD95 и количество случаев снижения или повышения CD95 не давали основания говорить о закономерном изменении экспрессии этого антигена на лимфоцитах периферической крови в хронической фазе ХМЛ.

Экспрессия CD95 на клетках крови больных ХМЛ была достоверно связана (коррелировала) с CD22, CD24, CD25, CD4,

CD7, CD8, CD72, а также с HLA-DR. Существование этих ассоциаций само по себе еще не является информативным. Однако обращает на себя внимание следующий факт — практически все В-клеточные маркеры были в среднем незначительно повышены (CD22-19,2; CD24; 13,9; HLA-DR-29,7; CD72-16,6), а Т-клеточные — снижены (CD7-41,3; CD3-31,9; CD4-31,8). Уровни активированных (CD25+) клеток были несколько повышенными (в среднем — 14,5 %).

Представляет большой научный интерес выяснение роли Fas-опосредованного апоптоза в регуляции мобилизации стволовых гемопоэтических клеток из костного мозга в кровь. Иными словами, исследовалось, насколько экспрессия антигена CD95 на лимфоидных клетках периферической крови ассоциирована с высокими уровнями CD34. Для ответа на этот вопрос мы провели 2 рода сопоставлений: 1) сравнили процентное содержание CD34+-клеток в случаях с повышенными и неповышенными уровнями CD95-лимфоцитов в периферической крови; 2) оценили экспрессию Fas-антигена в CD34+- и CD34- группам.

При количестве CD95+-лимфоцитов не менее 40 % (10 больных) уровни CD34+-клеток крови были вдвое более высокими (29,3 % против 14,3 %) в сравнении с уровнями CD34+-клеток больных (21 пациент), у которых процент CD95-клеток не превышал нормальных пределов (< 40 %); однако различия статистически недостоверны ($p = 0,1$). Это, по-видимому, обусловлено, во-первых, разной численностью групп, а, во-вторых, отсутствием обязательной ассоциации повышения процента CD95+-лимфоцитов с выходом в периферическое русло стволовых клеток при ХМЛ. В качестве примеров можно привести полярные наблюдения: 6-ной № 9 — CD95 — 70,8 %, CD34 — 66,7 %; 6-ной № 27 — CD95 — 85,7 %, CD34 — 5,4 %. В большинстве же случаев при повышенных уровнях CD95 отмечалось нарастание и CD34. Вместе с тем, в двух наблюдениях с самым высоким количеством CD95+-клеток (> 80 %) уровни CD34 были низкими (2,7 % и 5,4 %). То есть реципрокные взаимоотношения между CD34- и CD95-лимфоцитами характерны лишь для случаев гиперэкспрессии CD95,

в остальных наблюдениях повышение CD95, напротив, коррелировало с поступлением стволовых клеток в кровь.

Почти аналогичные данные получены нами и при сравнительном анализе процента CD95-клеток в CD34+- (не менее 5 %) и CD34-- (менее 5 %) группах. Существенное преобладание CD95+-клеток в CD34+-группе (39 % против 23 %) было близко к достоверному ($p = 0,09$).

Анализ взаимосвязи экспрессии антигенов по таблицам сопряженности признаков показал, что в случаях экспрессии CD34 частота повышенных уровней CD95+-лимфоцитов значительно выше, чем в CD34--случаях (47 % и 19 %), а в группе с повышением процента CD95+-лимфоцитов чаще встречается экспрессия антигена CD34 (70 % и 38 %). Однако различия не носят достоверного характера ($p = 0,09$).

Таким образом, повышение уровней CD95+-клеток до определенного уровня (не более 80 %) ассоциировано с выходом в периферическое русло стволовых гемопоэтических клеток. Однако сказанное отражает лишь общую тенденцию и не раскрывает механизмов Fas-опосредованного апоптоза при ХМЛ в хронической фазе. Сам факт присутствия CD95 на стволовых клетках периферической крови больных ХМЛ в хронической фазе был с уверенностью документирован нами лишь в двух наблюдениях, в которых оба антигена присутствовали на более чем 70 % лимфоидных клеток. Заслуживает внимания и такой факт — ассоциация экспрессии CD95 и CD34 наблюдалась лишь в определенном диапазоне значений (для CD95+-лимфоцитов — 40–80 %). Если взять случаи явного снижения количества CD95+-клеток (ниже 20 %) и сравнить по уровням CD34 группы CD95- (<20 %) и CD95+ (≥ 20 %), то всякие различия исчезают: средние значения составляют $17,4 \pm 6,6$ % и $20,5 \pm 5,8$ %, $p = 0,73$. Это также очень важный вывод — ведь при снижении CD95 (как отражении возможного нарушения Fas-опосредованного апоптоза) можно было бы ожидать более активного (по иммунологическим параметрам) течения лейкозного процесса с выходом незрелых стволовых гемопоэтических клеток-предшественников в периферическое русло. Но этого не происходит.

Разумеется, анализ данных по экспрессии CD95 на лимфоцитах больных ХМЛ в хронической фазе и соотнесение этих показателей с CD34+-клетками в значительной степени затруднен тем, что антиген в норме представлен в больших количествах на Т- и В-клетках, НК- и активированных клетках. То, что эти связи сохраняются и при ХМЛ, подтверждается существованием выраженной корреляции CD95 с маркерами В-клеток (CD22, CD24, CD72, HLA-DR), Т-клеток (CD7, CD4, CD8) и активированных клеток (CD25). Вместе с тем, внимательное рассмотрение данного вопроса указывает на одну примечательную деталь: наиболее сильные корреляционные связи CD95 ($p < 0,01$) отмечены с теми антигенами Т- и В-линии, которые наиболее рано появляются в ряду лимфоидной дифференцировки и могут присутствовать на стволовых гемопоэтических клетках (CD7, CD24, CD72, HLA-DR).

Сам по себе факт присутствия стволовых гемопоэтических клеток, коммитированных по лимфоидной линии, в периферической крови больных ХМЛ в хронической фазе подтверждается целым рядом аргументов. Существует прямая корреляционная связь между CD34 и самым ранним лимфоидным антигеном CD10 ($R = 0,611$). Уровни экспрессии антигена CD10 были достаточно высокими в изучаемой группе — $18,8 \pm 3,6$ % (при норме менее 2 %). Особенно высокой экспрессия CD10 была в CD95+-группе ($25,1 \pm 6,9$ %) в сравнении с CD95--группой ($14,7 \pm 3,9$ %), различия недостоверны ($p = 0,2$). Косвенным подтверждением связи пан-В-клеточных маркеров со стволовыми клетками является достоверная корреляционная связь с CD34 (для CD72 $R = 0,844$; для HLA-DR $R = 0,597$).

Таким образом, повышенные уровни CD95+-лимфоцитов крови у больных ХМЛ ассоциируются с выходом в периферическое русло стволовых гемопоэтических клеток-предшественников и, в частности, В-линейных предшественников, экспрессирующих антиген CD10.

В отличие от мобилизованных колониестимулирующими факторами стволовых гемопоэтических клеток крови, при ХМЛ мы не получили подтверждения коммитированности CD34+-лимфо-

цитов по миелоидной линии. Содержание CD13+-клеток, которые в норме в лимфоидном гейте практически отсутствуют, у больных ХМЛ в хронической фазе было повышенным — $23,7 \pm 5,5$ %. Однако корреляции с CD34 не отмечено ($R = 0,12$). По-видимому, миелоидная коммитированность клеток с высоким пролиферативным потенциалом (о чем свидетельствует высокая корреляция CD13 с CD71, $R = 0,667$) сопровождается утратой CD34-антигена на гемопоэтических предшественниках при ХМЛ. Интересно отметить, что, возможно, именно на этапе коммитированности стволовых клеток по миелоидной линии начинает функционировать ген множественной лекарственной устойчивости MDR1, о чем свидетельствует высокая корреляция CD13 с pgp170 ($R = 0,706$).

Экспрессия CD95 не коррелировала с показателем спонтанного апоптоза (процентом клеток в гиподиплоидной фракции при окрашивании пропидиумом иодидом). Количество гиподиплоидных клеток не было взаимосвязано ни с одним из дифференцировочных антигенов лейкоцитов крови. Исключение составили зрелые Т-клетки (CD3+), содержание которых находилось в обратной корреляционной связи с процентом спонтанного апоптоза. Интересно отметить, что снижение уровней CD95+-клеток, отмеченное у части больных ХМЛ, происходило не за счет снижения CD3+-лимфоцитов (на которых, как известно, в норме антиген CD95 присутствует). При гиперэкспрессии CD95 (> 40 %) содержание CD3-лимфоцитов было даже несколько более высоким, чем в прочих случаях: $36,2 \pm 7,3$ % и $29,3 \pm 5,9$ %.

§ 9.2. Экспрессия антигена CD95(Fas/APO-1) на мононуклеарах костного мозга больных ХМЛ в хронической фазе

Исследование CD95 на лимфоцитах костного мозга в хронической фазе ХМЛ проведено у 24 больных. Средние уровни экспрессии антигена составили $25,7 \pm 3,5$ %, разброс 2,2–68,3 %.

CD95+-лимфоциты коррелировали с экспрессией на клетках костного мозга антигенов CD10 ($R = 0,776$), CD16 ($R = 0,81$) и

CD22 ($R = 0,487$), CD24 ($R = 0,543$), CD25 ($R = 0,483$), CD4 ($R = 0,564$), CD71 ($R = 0,587$), CD72 ($R = 0,76$), CD7 ($R = 0,511$). То есть, как и в периферической крови наблюдалась ассоциация CD95 с лимфоидными антигенами Т- и В-линии, а также с активационными антигенами. Отличием от периферической крови явилось наличие связей с антигенами CD10, CD71 и CD16.

Для выявления различий между CD95-позитивной и негативной группами мы, как и при анализе клеток периферической крови, использовали уровень CD95, равный 40 %. Хотя при таком уровне выявлялось всего 3 случая гиперэкспрессии CD95, тем не менее, в этих наблюдениях отмечался достоверно более высокий процент в костномозговом пунктате клеток, экспрессировавших следующие антигены: CD10 ($p = 0,046$), CD16 ($p = 0,000$), CD25 ($p = 0,001$), CD4 ($p = 0,037$), CD71 ($p = 0,042$), CD72 ($p = 0,005$). В связи с малочисленностью группы с гиперэкспрессией CD95, мы сопоставили по уровням дифференцировочных антигенов группу низких значений CD95 ($< 20\%$) с группой более высоких CD95-случаев ($\geq 20\%$). При низких уровнях экспрессии CD95 отмечено достоверное снижение средних значений следующих популяций лимфоцитов: CD13, CD22, CD24, CD3, CD4, CD71, CD72, CD7. При этом группы сравнения были численно почти одинаковыми: CD95- — 10 больных, CD95+ — 14 больных.

Следовательно, анализ средних значений антиген-позитивных лимфоцитов костного мозга и их корреляционных связей с CD95 свидетельствуют о том, что антиген взаимосвязан с популяциями лимфоидных Т-, В-, НК и активированных клеток. Отсутствует ассоциация со стволовыми клетками костного мозга. При низких значениях CD95 ($< 20\%$) практически отсутствует экспрессия CD13 на клетках лимфоидного гейта: 6 % против 23 %, $p = 0,039$.

Очевидно, что для анализа роли экспрессии CD95 на лимфоцитах костного мозга недостаточно изучения только процентного содержания этих клеток и проведения корреляционного анализа с другими популяциями лимфоцитов. Необходима разработка функциональных тестов, способных пролить свет на патогенетическую роль CD95 в прогрессии заболевания.

§ 9.3. Связь субпопуляций лимфоидных клеток периферической крови и костного мозга

В развернутой хронической фазе ХМЛ клеточный состав периферической крови характеризуется присутствием незрелых миелоидных элементов, в норме представленных только в костном мозге. Как было показано нами в предыдущем разделе, субпопуляции лимфоцитов крови также видоизменены, причем наиболее явным отличием от нормы является выход в периферическое русло стволовых клеток (CD34+), незрелых лимфоидных предшественников (CD10+) и клеток с миелоантигенами CD13. Процесс этот в определенной степени связан с нарастанием уровней CD95-позитивных лимфоцитов крови.

Нас заинтересовал вопрос, насколько субпопуляции лимфоцитов крови и костного мозга взаимосвязаны между собой, и какова роль экспрессии CD95 в «периферизации» костномозговых гемопоэтических клеток.

В процессе проведения этих сопоставлений выявились весьма интересные закономерности (табл. 9.1). Циркулирующие в крови зрелые Т-клетки и их субпопуляции, активированные лимфоциты и клетки, экспрессирующие линейно не рестриктированные антигены, то есть те клеточные типы, формирование репертуара которых происходит в периферических лимфоидных органах, не взаимосвязаны с аналогичными субпопуляциями, представленными в костном мозге. Эти клеточные типы поступают в костный мозг с током крови, и их количество в костном мозге при хроническом миелолейкозе (как и в норме) не зависит от концентрации аналогичных субпопуляций в крови.

Совершенно иная ситуация отмечена для незрелых гемопоэтических предшественников (CD34+), миелоидно-коммитированных клеток (CD13+), ранних (CD10+) и общих (CD72+, CD24+) В-клеток. Пул этих клеточных типов формируется в костном мозге и оттуда поступает в периферическое русло крови. Для этих клеток отмечена прямо пропорциональная высокодостоверная зависимость поступления в кровь от концентрации в костном мозге.

Таблица 9.1

Связь субпопуляций лимфоцитов крови и костного мозга
в хронической фазе ХМЛ

Сравниваемая пара	Коэфф. корреляции	Число наблюдений*	Достоверность, p^*
CD10	0,523	18	0,026
CD11b	0,19		
CD13	0,571	13	0,042
CD16	0,494	18	0,037
CD22	0,312		
CD24	0,647	20	0,002
CD25	-0,075		
CD3	0,106		
CD34	0,542	21	0,011
CD4	0,485	17	0,049
CD7	0,338		
CD71	-0,056		
CD72	0,708	15	0,003
CD8	0,264		
CD95	0,254		
HLA-DR	0,215		
PGP170	0,331		

* Указаны значения при достоверных корреляциях.

Как уже было отмечено, явной прямой корреляции экспрессии Fas/APO-1-антигена на лимфоцитах крови с содержанием в крови незрелых предшественников (CD34) нами установлено не было. Вместе с тем, определенная взаимосвязь между этими маркерами существует, так же как и случаи документированной коэкспрессии молекул CD34 и CD95 на мембране одной лимфоидной клетки крови при ХМЛ. Конечно, установить корреляционную связь CD34 с CD95 при анализе клеток крови непросто. Спектр экспрессии CD95 значительно шире, чем спектр экспрессии CD34, поэтому, в действительности, отсутствие корреляции между маркерами отнюдь не исключает присутствия CD95 на стволовых клетках.

Для опровержения или подтверждения этого факта нужны прямые доказательства, опыты с двойной флуоресцентной меткой.

Важно понимать возможную роль экспрессии CD95-антигена на стволовых клетках при ХМЛ. Теоретически, как и в других быстро пролиферирующих системах, например в тимусе, в светлых центрах фолликулов, экспрессия CD95 является необходимой для удаления избыточной части клеток механизмом Fas-опосредованного апоптоза. Логично предположить, что и при ХМЛ Fas-опосредованный апоптоз злокачественных стволовых клеток может регулировать величину общего пула лейкоцитов и препятствовать их безудержной экспансии. С этих позиций интересно рассмотреть, насколько уровни экспрессии CD95 на клетках костного мозга (в число этих клеток входят и CD95-позитивные стволовые клетки) отражается на пуле стволовых клеток периферической крови. Теоретически можно было бы предполагать, что чем выше процессы Fas-опосредованного апоптоза в костном мозге, тем меньшее количество стволовых клеток поступает в кровоток. В действительности, все оказалось наоборот. Отмечена прямая корреляция между экспрессией CD95 на костномозговых элементах и содержанием стволовых клеток в крови: $R = 0,549$, $n = 24$, $p = 0,01$. Следовательно, повышение процента клеток, экспрессирующих Fas-антиген, в костном мозге ассоциировано с возрастанием стволовых гемопоэтических клеток в периферической крови. Это может косвенно свидетельствовать о неэффективности Fas-опосредованного апоптоза в костном мозге как механизма предупреждения выхода стволовых клеток в кровь. Для доказательства этого факта необходима прямая экспериментальная проверка и установление коэкспрессии CD95 и CD34 на клетках костного мозга.

Таким образом, в хронической фазе ХМЛ в периферическую кровь больных поступают стволовые гемопоэтические клетки (CD34+), незрелые лимфоидные предшественники (CD10+), миелоиднокоммитированные клетки (CD13+), повышается общее количество В-лимфоцитов. Содержание стволовых клеток периферической крови является значительно более высоким (практически вдвое) в случаях повышенной экспрессии CD95 на лимфоцитах.

В лимфоидной популяции клеток костного мозга при ХМЛ в хронической фазе антиген CD95 коррелирует с процентным содержанием CD10 и CD71. При низких уровнях CD95 в костном мозге практически отсутствуют миелоидно-коммитированные стволовые клетки (CD13+).

Пул лимфоцитов периферической крови, формирующихся в периферических лимфоидных органах, не связан с соответствующими по маркерам популяциями клеток костного мозга. Напротив, выход в кровяное русло гемопоэтических предшественников (CD34+), ранних В-клеток (CD10+) и миелоидных клеток (CD13+) пропорционален содержанию этих клеток в костном мозге. Нарастание периферических стволовых клеток в крови больных ХМЛ в хронической фазе происходит параллельно увеличению CD95 на клетках костного мозга.

Следовательно, основной вывод, который можно сделать на основании анализа данного фрагмента работы, состоит в том, что повышение экспрессии CD95 на клетках костного мозга и крови у больных ХМЛ в хронической фазе связано с омоложением лимфоидной фракции клеток крови за счет выхода в периферическое русло стволовых клеток и незрелых лимфоидных предшественников.

§ 9.4. Изучение экспрессии антигена CD95(Fas/APO-1) на бластных клетках у больных ХМЛ в стадии бластного криза

Исследование экспрессии антигена CD95(Fas/APO-1) на бластных клетках у больных ХМЛ в стадии бластного криза проводили у 37 больных. Содержание бластных клеток в периферической крови было более 20 %. Исследовали гейт лимфоцитов, в котором эти бластные клетки локализовались. Было обнаружено, что у 14 пациентов (38 %) бластные клетки экспрессировали антиген CD95(Fas/APO-1). Процент экспрессии антигена не коррелировал с процентом бластных клеток ($r > 0,05$). Не все бластные клетки экспрессировали антиген.

Гранулоциты больных ХМЛ в стадии бластного криза, так же как гранулоциты в хронической фазе, антиген CD95(Fas/APO-1) не экспрессировали.

Таким образом, можно сделать заключение, что при хроническом миелоидном лейкозе в хронической фазе лейкозные гранулоциты не экспрессируют антиген CD95(Fas/APO-1), а бластные клетки больных ХМЛ в стадии бластного криза содержат этот антиген. Более того, гранулоциты больных ХМЛ в стадии бластного криза являются CD95-отрицательными.

Нами был проведен корреляционный анализ экспрессии антигена CD95(Fas/APO-1) с другими дифференцировочными антигенами, экспрессированными на бластных клетках при ХМЛ — CD10 (антиген лимфобластов), CD11b (антиген миело-моноцитарных клеток), CD13 (антиген предшественников миелоидных и моноцитарных клеток), CD14 (антиген моноцитов), CD15 (антиген гранулоцитов), CD16 (антиген NK-клеток и гранулоцитов), CD19 (общее В-клеточный антиген), CD22 (антиген В-клеток), CD33 (антиген коммитированных миелоидных клеток), CD34 (антиген стволовой клетки), CD38 (антиген гемопоэтических предшественников), HLA-DR (антигены гистосовместимости II класса, экспрессированные на предшественниках, моноцитах и В-лимфоцитах).

Была обнаружена корреляция экспрессии антигена CD95(Fas/APO-1) с антигеном CD34, маркером стволовой клетки. Корреляционная зависимость между экспрессией антигенов CD34 и CD95 составила на бластных клетках периферической крови ($r = 0,44$, $p = 0,05$) и в костном мозге ($r = 0,83$, $p < 0,05$) у первично диагностированных больных.

Более детальное исследование показало четкую корреляцию экспрессии антигенов CD34 и CD95 в периферической крови у CD10- нелеченных больных ($r = 0,70$, $p < 0,01$). Кроме CD34, антиген CD95 также коррелирован с антигенами CD13 и CD14 ($r = 0,48$ и $r = 0,47$, $p < 0,05$), но не коррелирован с антигенами CD15 и CD11b. Мы также показали четкую положительную корреляцию между экспрессией антигенов CD95 и CD10 в костном мозге (но не в периферической крови) у первичных больных ($r = 0,82$, $p < 0,05$). У больных, получивших полихимиотерапию, не бы-

ло корреляции экспрессии антигенов CD95 и CD10 ($r = -0,47$, $p > 0,05$).

Следовательно, истинные взаимоотношения между экспрессией Fas-антигена и CD34, а также ранними маркерами лимфоидной (CD10) и миелоидной (CD13) линий, обнаруживаются при изучении гомогенных бластных популяций лейкозных клеток. И эти данные дают ключ к пониманию обнаруженных нами в хронической фазе заболевания достаточно сложных взаимодействий между указанными клеточными популяциями.

Методом двойного окрашивания было продемонстрировано, что часть CD34+-бластных клеток также экспрессирует антиген CD95(Fas/APO-1) (рис. 9.1). На рисунке эти клетки локализованы в квадранте 2. Клетки, экспрессирующие только антиген CD34, локализованы в первом квадранте, а бластные клетки, экспрессирующие только антиген CD95(Fas/APO-1), отсутствуют. Данный пример убедительно иллюстрирует экспрессию CD95 именно на стволовых (то есть родоначальных для лейкозного клона) клетках, но не на более зрелых клеточных элементах.

Так как иммунологический фенотип бластных клеток отражает иммунологический фенотип нормальных клеток, то было сделано предположение, что нормальные стволовые клетки экспрессируют CD95(Fas/APO-1)-антиген. Для выяснения этого предположения, определяли в нормальном костном мозге в гейте «бластов» экспрессию CD95(Fas/APO-1)-антигена. В нормальном костном мозге здоровых людей содержится около 3 % CD34-положительных клеток. Содержание таких клеток в гейте «бластов» — около 8 %. Исследование экспрессии CD95(Fas/APO-1) показало 100 % экспрессию антигена на клетках, локализованных в этом гейте. Методом двойного окрашивания было показано, что в нормальном костном мозге все CD34+-бластные клетки экспрессируют антиген CD95(Fas/APO-1).

В литературе имеется только одно сообщение об экспрессии антигена CD95(Fas/APO-1) на клетках костного мозга у здоровых людей. J. P. Maciejewski и соавт. (1995) показали, что в норме не все CD34+-клетки экспрессируют антиген CD95(Fas/APO-1), и что клетки нормального костного мозга слабо чувствительны

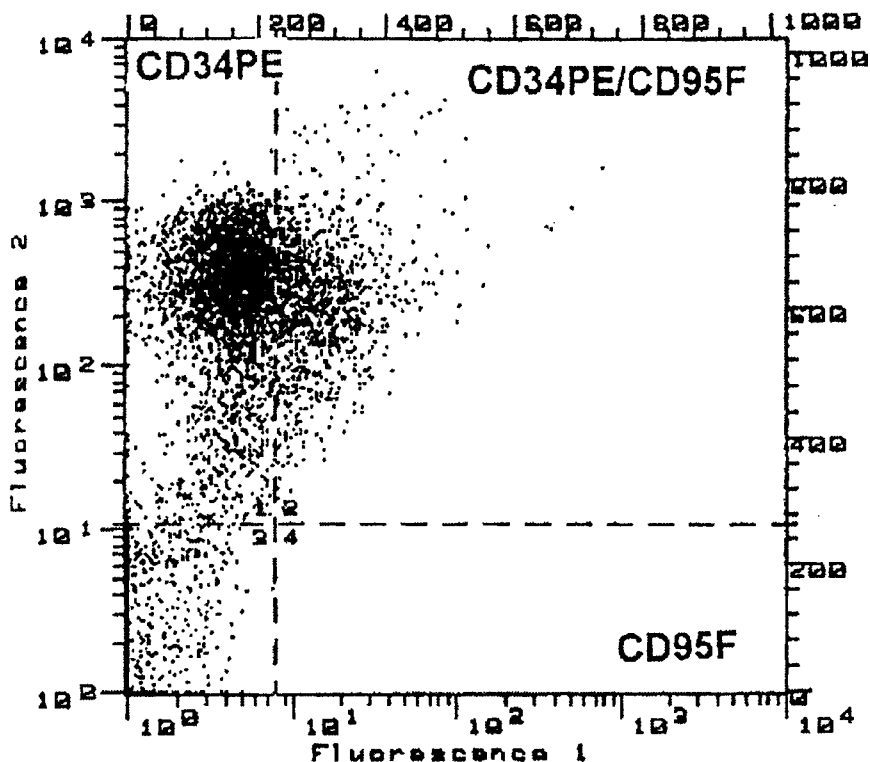


Рис. 9.1. Двойное окрашивание бластных клеток костного мозга больного ХМЛ в стадии бластного криза МКА CD34 и ICO-160, направленных против антигена CD95(Fas/APO-1)

к Fas-индуцированному апоптозу. Гамма-интерферон и опухоле-некротический фактор усиливают экспрессию антигена CD95 на CD34+-клетках, и это усиление коррелирует с чувствительностью CD34+-клеток к апоптозу, индуцированному МКА против CD95(Fas/APO-1)-антигена.

Как указывалось выше, антиген CD95(Fas/APO-1) был экспрессирован у 14 (38 %) из 37 больных ХМЛ в стадии бластного криза. Это могло означать, что антиген представлен при каком-либо иммунологическом варианте бластного криза. Как показали А. Ю. Барышников и соавт. (1982, 1989, 1993, 1995), бластный

криз ХМЛ является гетерогенным заболеванием. По иммунологическому фенотипу бластных клеток бластный криз ХМЛ можно разделить на 7 подвариантов: миелоидный, моноцитарный, лимфоидный, эритроидный, примитивный, недифференцированный и смешанный.

Была изучена роль экспрессии CD95(Fas/APO-1)-антигена при различных иммунологических подвариантах бластного криза ХМЛ. Критерием выделения миелоидного варианта бластного криза служила экспрессия антигенов CD34, CD15, CD33, CD13, CD11b в отсутствии антигенов лимфоидных, моноцитарных клеток. Больных с таким фенотипом было 15 (40,5 %). Критерием выделения моноцитарного варианта была экспрессия антигенов CD34, CD33, CD13 и CD14 в отсутствии миелоидного антигена CD15 и лимфоидных антигенов. Среди исследованных 37 пациентов больных с таким фенотипом бластных клеток не оказалось. К лимфоидному варианту бластного криза ХМЛ относили больных, чьи бластные клетки экспрессировали лимфоидные антигены CD10, CD19 и CD22 в отсутствии миеломоноцитарных маркеров. Таких больных было 5 (13,5 %). К эритроидному варианту бластного криза ХМЛ относили больных с бластными клетками эритроидной природы (экспрессия гликофорина А и эритробластного антигена НАЕ-9). В исследуемой когорте таких больных не оказалось. К примитивному варианту бластного криза ХМЛ относили больных, бластные клетки которых экспрессировали только антиген CD34. По иммунологическому фенотипу бластные клетки соответствовали нормальным стволовым клеткам. Таких больных было 3 (8,1 %). К недифференцированному варианту бластного криза ХМЛ отнесли больных с бластными клетками не экспрессирующими никаких антигенов. Таких больных обнаружили 3 (10,8 %). Наконец, к смешанному варианту бластного криза ХМЛ отнесли больных, бластные клетки которых экспрессировали маркеры лимфоидных и миелоидных клеток. Больных с таким фенотипом было 10 (27 %).

Было обнаружено, что экспрессия CD95(Fas/APO-1)-антигена при различных иммунологических подвариантах была различной (табл. 9.2).

Таблица 9.2

Экспрессия CD95(Fas/APO-1)-антигена при различных иммунологических вариантах бластного криза ХМЛ

Варианты, частота	Кол-во CD95+-случаев	Кол-во больных в группе (%)	
Миелоидный	6	15	40
Лимфоидный	1	5	20
Смешанный	6	10	60
Примитивный	1	3	33
Недифференцированный	0	4	0

Наиболее часто (60 %) антиген CD95(Fas/APO-1) встречался при смешанном варианте бластного криза ХМЛ, а также при миелоидном (40 %). При других вариантах он встречался реже. Обращает на себя внимание различие в экспрессии CD95(Fas/APO-1) при миелоидном, смешанном и лимфоидном вариантах. При первых двух вариантах антиген CD34 экспрессирован в 100 % случаев, а при лимфоидном — лишь у 57 % больных. Возможно, на миелобластах антиген CD95(Fas/APO-1) встречается чаще, чем на лимфобластах.

Между хронической фазой ХМЛ и стадией бластного криза (трансформации) существует переходная фаза — фаза акселерации. Она характеризуется появлением в периферической крови бластных клеток до 20 % и ухудшением клинико-гематологических показателей. Нами были исследованы образцы периферической крови 9 больных ХМЛ в стадии акселерации. Было обнаружено, что у 5 (56 %) из 9 больных на бластных клетках был представлен антиген CD95(Fas/APO-1).

Нами было оценено функциональное состояние CD95(Fas/APO-1)-рецептора. С помощью МКА IPO-4 и ICO-160 индуцировали апоптоз в бластных клетках больных ХМЛ. Апоптоз оценивали по образованию «ДНК-овой лестницы» или по окраске пропидиум иодидом.

Таблица 9.3

Ответ на лечение больных ХМЛ БК в зависимости от экспрессии
дифференцировочных антигенов

Вариант	Больные	Ремиссии	Медиана продолжительности		
		полные/ частичные	ХФ	ФА	БК
CD10+	11	3/2	22,0	0,0*	8,0*
CD10-	17	0/0	30,0	3,0	3,0
CD34+	16	2/1	27,5	2,0	4,0
CD34-	12	1/0	12,0	1,0	3,0
CD95+	10	0/0	30,0	4,0	4,0
CD95-	18	3/2	22,0	1,0	3,0
CD13+	6	0/0	10,0*	0,5	2,0**
CD13-	16	2/1	25,0	3,0	3,0
CD10+ CD95-	6	3/2	24,0	0,0	9,0
CD10+ CD95+	4	0/0	15,5	2,0	8,0

Примечание: * — различия статистически значимы; ** — медиана не достигнута.

Процент клеток, погибших от апоптоза, при индукции МКА в количестве 10 мкг/мл в течении 24 час., составил 17–60 % у 6 из 7 исследованных больных ХМЛ БК.

В CD95-отрицательных случаях МКА не индуцировали апоптоз.

Была оценена клиническая значимость экспрессии антигена CD95 (Fas/APO-1) на бластных клетках у 28 больных ХМЛ в стадии бластного криза. Оценивались: достижение ремиссии и медиана продолжительности хронической фазы, фазы акселерации и бластного криза (табл. 9.3.).

Ремиссии у больных ХМЛ в стадии бластного криза достигаются редко. Было обнаружено, что ни у одного из 10 больных, бластные клетки которых экспрессировали антиген, не были достигнуты ни полные, ни частичные ремиссии. С другой стороны, у 3 из 18 CD95-отрицательных больных были достигнуты частичные

ремиссии и у 2 пациентов — полные (табл. 9.3). Однако, несмотря на это, медиана продолжительности хронической фазы заболевания у CD95-положительных больных была значительно длиннее — 30 мес., по сравнению с 22 мес. у CD95-отрицательных пациентов. Однако различия статистически незначимы. Продолжительность фазы акселерации также была большей у CD95-положительных больных (табл. 9.3).

Как видно из вышеизложенного, антиген CD95(Fas/APO-1) был реже экспрессирован при лимфоидном варианте, чем при миелоидном, а лимфоидный бластный криз протекает более благоприятно [Барышников А. Ю. и др., 1989]. В связи с этим, мы оценили ответ на лечение у больных, бластные клетки которых экспрессировали или не экспрессировали антиген лимфобластов CD10 (табл. 9.3). Наше предположение подтвердилось, так как, действительно, в CD10-положительной группе частота полных и частичных ремиссий, а также продолжительность хронической фазы, совпали. Медиана продолжительности бластного криза у CD10-положительных больных была статистически значимо больше (8 против 3 мес.).

Группу CD10-положительных больных мы разбили на 2 подгруппы с фенотипами бластных клеток CD10+CD95+ и CD10+CD95- (табл. 9.3.). Было выявлено, что у 5 из 6 больных с иммунофенотипом бластных клеток CD10+CD95- были достигнуты ремиссии, тогда как ни у одного больного с фенотипом CD10+CD95+ ремиссий не было. Однако в этих группах не было существенных различий в медианах продолжительности фаз (табл. 9.3).

Так как были выявлены корреляционные связи между экспрессией на бластных клетках антигенов CD95 и CD34, а также CD95 и CD13, то мы проанализировали продолжительность жизни у больных с этими антигенами (табл. 9.3). У больных с CD34-положительными бластными клетками была большая продолжительность хронической фазы, но все различия статистически незначимы. Однако при экспрессии на бластных клетках антигена CD13 хроническая фаза заболевания статистически была значимо более короткой.

У больных ХМЛ, бластные клетки которых экспрессировали антиген CD95(Fas/APO-1), была более длительная хроническая фаза, но они не достигали ремиссии в стадии бластного криза. У больных с CD95-отрицательными бластами была короче хроническая фаза, но в стадии бластного криза были достигнуты ремиссии, и эти больные имели лимфоидный или смешанный вариант бластного криза. Продолжительность хронической фазы заболевания была короче, если больные содержали бласты с маркерами более поздних этапов дифференцировки (CD10 и CD13).

Таким образом, можно сделать заключение, что антиген CD95(Fas/APO-1) экспрессирован на бластных клетках части больных в стадии бластного криза и в ряде случаев присутствует на стволовых гемопоэтических клетках периферической крови в хронической фазе заболевания. Экспрессия антигена коррелирует с экспрессией антигена CD34. Антиген CD95(Fas/APO-1) находится в функциональном состоянии и с помощью МКА против CD95(Fas/APO-1)-антигена можно индуцировать апоптоз в бластных клетках.

Функциональная роль экспрессии антигена CD95, выявляемого на бластных клетках больных ХМЛ в стадии бластного криза, по-видимому, на сегодняшний день не может быть оценена однозначно. Наши данные убедительно свидетельствуют о том, что лейкозный клон, циркулирующий в периферической крови больных в хронической фазе ХМЛ, включает не только морфологически распознаваемые клетки гранулоцитарного ряда, но и стволовые гемопоэтические клетки (CD34+), на световом уровне не отличимые от лимфоидных элементов. В части случаев эти клетки (CD34+) коэкспрессируют антиген CD95, что, по-видимому, и является базисом формирования в дальнейшем CD95+-примитивных или стволовоклеточных подвариантов бластного криза ХМЛ. В свете этих данных становится понятным, что на предбластных стадиях ХМЛ появление CD95 на стволовых гемопоэтических клетках носит защитный характер, препятствующий прогрессии заболевания. Об этом свидетельствует большая длительность хронической фазы и фазы акселерации больных, дающих впоследствии CD95-позитивные бластные кризы.

Есть все основания полагать, что в основе развития резистентных к Fas-опосредованному апоптозу при ХМЛ, лежат не процессы, связанные с нарушением экспрессии CD95, а более глубинные повреждения передачи сигнала внутри клетки, общие для апоптотического процесса в целом. Именно этим можно объяснить тот факт, что CD95+–бластные клетки ХМЛ являются абсолютно резистентными к полихимиотерапии, даже в случае применения препаратов, способных стимулировать и оказывать противоопухолевое действие через механизм апоптоза.

Следовательно, изучение экспрессии CD95 на клетках крови и костного мозга больных ХМЛ в хронической фазе и в фазе бластного криза свидетельствует о важной роли этого рецептора в прогрессии заболевания и развитии резистентности к терапии.

Глава 10

Экспрессия антигена CD95(Fas/APO-1) при миелодиспластическом синдроме

По современным взглядам термином «миелодиспластические синдромы» (МДС) охватывается гетерогенная группа заболеваний, характеризующаяся нарушением процессов клеточной пролиферации и дифференцировки. Основными проявлениями патологического состояния является наличие цитопенических изменений в периферической крови при нормо- или даже гиперклеточном состоянии костного мозга [Глузман Д. Ф. с соавт., 1998].

В соответствии с классификацией ФАБ, разработанной для МДС исследователями и клиницистами Франции, США и Великобритании, выделяется 5 основных подтипов: 1) рефрактерная анемия (РА); 2) рефрактерная анемия с кольцевыми сидеробластами (РАКС); 3) рефрактерная анемия с избытком бластов (РАИБ); 4) рефрактерная анемия с избытком бластов в стадии трансформации (РАИБ-т); 5) хронический миеломоноцитарный лейкоз (ХММЛ) [Bennett J. M. et. al., 1982; 1985].

Причиной МДС в настоящее время признается клональная трансформация полипотентной стволовой кроветворной клетки [Воробьев А. И., 1985; Глузман Д. Ф. с соавт., 1998]. Учитывая, что проявления заболевания являются нарушениями как всего гемопоэза, так и отдельных его ростков, обсуждается вопрос о разнородном поражении в ряду клеток-предшественников, включая даже лимфоидную ветвь, то есть дисплазия может быть мультилинейной. Описываемые состояния часто предшествуют манифестации острого лейкоза, чаще всего — миелобластного, на основании чего МДС рассматриваются как «предлейкозы».

Могут наблюдаться вторичные МДС, связанные с воздействием малых доз ионизирующей радиации, как это показали

Иванов В. Е. с соавторами (1999), опубликовавшие данные по Гомельской и Могилевской областям Белоруссии.

Выраженная цитопения при МДС вследствие неэффективного гемопоэза объясняется высоким уровнем преждевременной гибели клеток [Yoshida Y. et al., 1994; Fenaux P., 1998]. Новиков В. С. с соавторами (1996) относит, в частности, РАИБ и РАИБт к состояниям, имеющим разобщенный характер апоптоза, то есть усиление апоптоза вызывает анемию с неэффективным эритропоэзом, а ослабление — избыток бластов и бластную трансформацию).

В изученной нами литературе имеются работы по изучению процесса программированной клеточной смерти при миелодисплазиях, однако исследований экспрессии антигена CD95(Fas/APO-1) выполнено мало. Возможность трансформации МДС в лейкоз делает изучение данного вопроса важным не только с теоретических, но и с практических позиций.

Роль Fas-системы оценивали путем изучения пролиферации и апоптоза клеток в культуре от 16 больных с МДС. Среднее количество клеток в апоптозе при МДС было 4 % с дальнейшим ростом на 350 % (4 день) и 650 % (7 день), в то время как у доноров этот показатель возрос от начальных 0,5 % до 4 % (7 день). МКА СН-11 ингибировали апоптоз на уровне CD34+ -клеток, чем доказана медиаторная функция Fas-системы для развития апоптоза при МДС [Hellstrom-Lindberg E. et al., 1998]. P. Lepelley и соавт. (1996) также подтвердили заключение о том, что кратковременное культивирование в половине случаев миелодисплазии повышает апоптоз.

Raza A. с соавторами (1995) показали, что МДС характеризует наличие как высокого уровня апоптоза, так и достаточно высокой пролиферации. Достаточно часто после выхода клетки из деления (фаза М) уже в фазе S она могла подвергаться апоптозу. Вопросу об изменении уровня апоптоза в процессе лейкозной трансформации был поставлен в работе Ricciardi M. R. с соавторами (1998). У 12 больных с РАИБ и у 11 больных с РАИБт определяли уровень спонтанного апоптоза. Оказалось, что этот показатель при РАИБ был выше (14,6 %), чем при РАИБт (3,95 %); отдельно в группе CD34+, соответственно, 1,78 % и 0,46 %. Сделано заключение, что при лейкозной трансформации РАИБ теряется механизм управления

ростом патологического клона. Сходный вывод на основании изучения онкобелков p53, *Bcl-2* и *ras* был сделан Invernizzi R. и соавт. (1998) при сравнении МДС и ОМЛ.

Увеличение частоты апоптоза в клетках костного мозга больных МДС отмечали в своих работах многие авторы [Bogdanovic A. D. et al., 1996; Gersuk G. M. et al., 1996; Bouscary D. et al., 1997]. При выделении из клеток костного мозга популяции CD34+ она имела наивысшую экспрессию CD95 [Gersuk G. M. et al., 1996].

Оценка прогностического значения «индекса апоптоза» (ИА) была проведена в группе 27 больных МДС по клеткам костного мозга. Установлена лучшая выживаемость при низких показателях ИА, предложено считать значение «3 %» как пограничное при выделении больных с лучшим и худшим прогнозом [Bogdanovic A. D. et al., 1996]. Противоположные данные получили Brada S. J. L. с соавт. (1998): в группе больных РА и РАКС (низкий риск по ФАБ) показатель ИА был выше, чем в группе РАИБ + РАИБт (высокий риск). В работе же Bouscary D. с соавт. (1997) вообще не установлена корреляция антигена CD95 с классификацией ФАБ.

При изучении клеточной линии Р39, полученной из лейкоза, возникшего после МДС, показано снижение экспрессии CD95 только на подвергнутых обработке химиопрепаратами клетках [Hassan Z. et al., 1998]. J. P. Maciejewski и соавт. (1995) исследовали экспрессию антигена CD95 на CD34+ -клетках костного мозга у больных с апластической анемией и миелодисплазией. Они показали, что потенциальные ингибиторы гемопоэза — гамма-интерферон и опухоли-некротический фактор альфа — усиливают экспрессию CD95-антигена на костно-мозговых CD34+ -клетках. Количество CD95+ -клеток снижалось при выздоровлении больных. В сыворотке больных миелодисплазией не было найдено растворимого антигена CD95 [Munker R. et al., 1995].

Таким образом, несмотря на несколько противоречивые данные, следует признать, что МДС является следствием нарушения регуляции апоптоза. Однако роль CD95-рецепторно/лигандной системы в развитии МДС исследована недостаточно.

В Российском онкологическом научном центре им. Н. Н. Блохина РАМН совместно с Гематологическим научным центром РАМН проведена работа по изучению антигена CD95 на клетках костного мозга 47 больных МДС. В эту группу попали 18 больных с рефракторной анемией (РА), 18 больных с РАИБ, 2 больных с РАКС, а у остальных 9 пациентов был диагностирован хронический миеломоноцитарный лейкоз (ХММЛ).

Антиген CD95(Fas/APO-1) был экспрессирован на $37,2 \pm 1,9\%$ клеток костного мозга.

В табл. 10.1 представлен иммунологический фенотип клеток костного мозга, оцененный на клетках лимфоцитарного гейта.

Обращает на себя внимание повышенная экспрессия маркера стволовой клетки антигена CD34 у 28 (62 %) из 45 тестированных больных по сравнению с нормой, низкая экспрессия миелоидных антигенов CD33 и CD13, в норме представленных на комитированных миелоидных клетках-предшественниках, а также активационных антигенов CD25 (рецептор интерлейкина-2) и CD71 (рецептор трансферрина). Кроме того, была выявлена повышенная экспрессия гликопротеида Pgp170, ответственного за множественную лекарственную устойчивость, у 8 (36,4 %), повышенный процент клеток в спонтанном апоптозе (PI) у 13 (56,5 %) из 23 больных.

Для анализа связи повышения уровня вышеуказанных молекул с экспрессией антигена CD95(Fas/APO-1) больных разделили на две группы, в зависимости от экспрессии этого антигена. В CD95-положительную группу вошел 21 пациент (более 20 % антиген-положительных клеток костного мозга). В CD95-отрицательной группе было 26 больных, чьи бластные клетки не содержали антиген CD95.

Как видно из табл. 10.2, клетки костного мозга в обеих подгруппах различались по иммунологическому фенотипу. В CD95-положительной подгруппе было повышенное содержание CD13-положительных клеток, CD11b+, CD5+, тогда как в CD95-отрицательной подгруппе был выше процент CD8+-Т-клеток, CD38+. Это указывает на то, что субпопуляционный состав клеток костного мозга у больных МДС зависит от экспрессии антигена CD95. Кроме того, в CD95-положительной группе больных был

Таблица 10.1

Частота экспрессии антигенов на клетках костного мозга больных
миелодиспластическими состояниями

Маркеры	Количество тестируемых больных	Количество положитель- ных случаев	Частота экспрессии (в %)	Число АГ+ клеток (М ± m)
CD95	47	21	44,7	37,24 ± 1,88
CD34	45	28	62,2	16,31 ± 2,68
CD33	27	14	51,9	3,49 ± 0,68
CD13	34	24	70,7	9,62 ± 3,71
CD14	28	19	67,9	3,70 ± 0,69
CD15	24	14	58,3	3,21 ± 0,99
HLA-DR	43	33	76,7	22,27 ± 2,75
CD11b	33	27	81,8	35,67 ± 3,70
CD10	18	7	38,8	15,25 ± 1,46
CD5	22	22	100	47,11 ± 3,62
CD7	29	29	100	47,17 ± 3,76
CD3	39	19	48,7	62,88 ± 1,84
CD4	34	22	64,7	30,72 ± 1,76
CD8	34	13	38,2	43,38 ± 3,46
CD38	18	16	88,8	51,29 ± 4,97
CD16	27	20	74,1	26,10 ± 1,69
CD19	23	3	13,0	11,53 ± 1,43
CD20	25	10	40,0	13,41 ± 1,33
CD21	19	9	47,3	22,33 ± 4,19
CD22	12	5	41,6	13,44 ± 1,78
CD24	7	3	42,8	20,80 ± 5,54
CD72	7	1	14,3	11,9
CD71	33	25	75,7	22,87 ± 2,60
CD25	9	4	44,4	35,42 ± 17,28
Pgp	22	8	36,4	21,11 ± 0,73
Bcl-2	15	7	46,6	16,76 ± 9,41
p-53	16	4	25,0	9,35 ± 1,22
Ki67	16	8	50,0	15,43 ± 4,10
Bax	8	3	37,5	9,30 ± 1,96

Таблица 10.2

Иммунологический фенотип клеток костного мозга больных
в группах CD95+ и CD95- при МДС

Маркеры	CD95+		CD95-	
	Количество положитель- ных случаев	Число АГ+ клеток M±m	Количество положитель- ных случаев	Число АГ+ клеток M±m
CD95	21		26	
CD34	15	19,8 ± 4,77	13	12,3 ± 1,36
CD33	8	2,78 ± 0,41	6	4,44 ± 1,47
CD13	11	14,59 ± 7,76	13	5,42 ± 1,75
CD14	6	1,41 ± 0,18	13	4,76 ± 0,85
CD15	5	1,92 ± 0,5	9	3,9 ± 1,48
HLA-DR	12	20,12 ± 6,36	21	23,5 ± 2,47
CD11B	11	43,5 ± 7,13	16	30,29 ± 3,48
CD10	3	12,63 ± 0,78	4	17,23 ± 2,02
CD5	9	54 ± 4,89	13	42,34 ± 4,82
CD7	12	54,09 ± 5,12	17	42,29 ± 5,15
CD3	10	63,79 ± 2,41	9	61,89 ± 2,95
CD4	12	33,81 ± 2,85	10	27,01 ± 1,15
CD8	10	38,68 ± 1,87	3	59,1 ± 9,96
CD38	5	44,8 ± 5,22	11	54,24 ± 6,79
CD16	11	27,77 ± 2,63	9	24,01 ± 1,89
CD19	1	10	2	12,3 ± 2,1
CD20	5	12,84 ± 0,81	5	13,98 ± 2,68
CD21	4	23,88 ± 8,76	5	21,1 ± 4,05
CD22	1	11,1	4	14,03 ± 2,18
CD24	1	17,1	2	22,65 ± 9,05
CD72	1	11,9	0	0
CD71	12	20,38 ± 2,71	13	25,17 ± 3,04
CD25	1	86	3	18,56 ± 5,36
CD50	0	0	1	86,9
PGP	8	20,89 ± 4,76	5	12,92 ± 0,86
BCL2	1	11,76	4	9,32 ± 1,56
P53	3	19,13 ± 8,98	2	8,93 ± 2,17
KI67	0	0	4	14,42 ± 5,52
BAX	0	0	3	9,3 ± 1,96

Таблица 10.3

Экспрессия антигенов на клетках костного мозга при РА и РАИБ

Маркеры	РА			РАИБ		
	Кол-во тестируемых больных	Кол-во положительных случаев	Число АГ+ клеток М±м	Кол-во тестируемых больных	Кол-во положительных случаев	Число АГ+ клеток М±м
CD95	18	9	38,23 ± 2,6	18	8	34,59 ± 3,07
CD34	17	10	10,45 ± 1,32	17	11	14,56 ± 2,88
CD33	9	5	3,54 ± 1,33	12	7	3,93 ± 0,99
CD13	11	10	3,37 ± 0,72	14	9	14,68 ± 8,82
CD14	10	8	3,17 ± 0,91	13	7	2,8 ± 0,8
CD15	9	4	7,15 ± 2,7	11	7	1,6 ± 0,21
HLA-DR	15	12	17,25 ± 1,66	18	12	22,9 ± 3,9
CD11B	14	12	38,8 ± 6,21	15	13	34,76 ± 5,1
CD10	10	5	14,3 ± 1,29	7	1	22,1
CD5	8	8	46,85 ± 5,6	10	10	48,88 ± 5,64
CD7	11	11	44,15 ± 5,47	13	13	50,19 ± 5,65
CD3	16	11	61,58 ± 1,94	16	6	63,21 ± 4,08
CD4	14	11	33,33 ± 3,11	15	10	27,59 ± 1,5
CD8	14	5	39,2 ± 2,13	15	7	41,45 ± 3,39
CD38	5	5	38,56 ± 5,64	8	8	51,33 ± 7,07
CD16	11	9	26,35 ± 2,79	13	8	25,85 ± 2,77
CD19	8	1	10±	11	2	12,3 ± 2,1
CD20	9	4	13,95 ± 0,65	12	5	10,8 ± 0,25
CD21	6	2	12,8 ± 0,5	10	6	25,14 ± 5,86
CD22	6	3	15,23 ± 2,57	5	2	10,75 ± 0,35
CD24	3	1	13,6±	3	1	17,1
CD72	3	1	11,9±	3	0	
CD71	13	10	21,93 ± 3,35	14	12	22,1±, 53
CD25	4	2	49,65 ± 36,35	3	0	
CD50	1	1	86,9±	0	0	
PGP	7	3	13,16 ± 0,93	11	4	11,36 ± 1,27
BCL2	3	1	7,74±	7	5	20,15 ± 11,78
P53	3	1	11,76±	8	1	7,8
K167	3	1	9,73±	8	6	15,94 ± 5,48
BAX	1	1	13,1±	5	2	7,4 ± 0,84

выше процент клеток, экспрессирующих Pgp170 и, что наиболее важно в понимании патогенеза МДС, в CD95-положительной подгруппе в несколько раз выше был процент клеток, находящихся в апоптозе. Хотя небольшое количество исследований не позволяет говорить об этом столь однозначно.

Как указывалось выше, МДС — гетерогенное заболевание, включающее РА, РАИБ, РАКС и ХМЛ. Наиболее презентабельные группы — РА и РАИБ. В связи с этим, был проведен анализ экспрессии антигена CD95(Fas/APO-1) на клетках костного мозга отдельно у больных РА и РАИБ.

Диагноз РАИБ был установлен у 18 больных, и РА также был диагностирован у 18 пациентов (табл. 10.3). Антиген CD95(Fas/APO-1) был представлен на клетках в 9 (50 %) из 18 случаев РАИБ. МКА выявляли $34,6 \pm 3,1$ % антиген-положительных клеток. Анализ экспрессии дифференцировочных антигенов на клетках костного мозга больных РАИБ выявил следующее. У 65 % (11 из 17) пациентов было повышено содержание полипотентных стволовых клеток (CD34+). У этих же больных было повышено содержание CD13+-клеток, при нормальном уровне CD33+-клеток.

На клетках костного мозга больных РА антиген CD95(Fas/APO-1) был также представлен в 9 (50 %) из 18 случаев. МКА выявляли $38,2 \pm 2,6$ % антиген-положительных клеток. Антиген CD34 был повышен у 10 (59 %) из 17 больных. В отличие от РАИБ, антиген CD13 отсутствовал, как и другие миелоидные антигены. Экспрессия лимфоидных антигенов не отличалась от нормы и у больных РАИБ. В тоже время показатель спонтанного апоптоза у больных РА был выше, чем у больных РАИБ: $20,9 \pm 4,1$ % против $13,2 \pm 1,2$ %.

Таким образом, различие иммунологического фенотипа между РА и РАИБ состоит в достоверно более высокой экспрессии при РАИБ ранних антигенов гемопоэтических клеток CD13, CD38 и HLA-DR. Напротив, экспрессия маркеров более поздних этапов дифференцировки (CD15, CD4, CD22 и др.) при РАИБ достоверно ниже, чем при РА. Интересен также факт повышенного по сравнению с РАИБ уровня спонтанного апоптоза лимфоидных и незрелых миелоидных элементов при РА.

Таблица 10.4

Корреляционные связи антигена CD95 с дифференцировочными антигенами гемопоэтических клеток в CD95+-позитивных случаях при РА и РАИБ

Маркеры	РА CD95+			РАИБ CD95+		
	N	Коэфф. коррел.	P	N	Коэфф. коррел.	P
CD34	8	0,167	0,663	8	0,81	0,019
CD33	4	-0,8		6	0,257	> 0,05
CD13	6	-0,943	> 0,05	7	0,152	0,721
CD14				6	-0,829	> 0,05
CD15	4	0,2		6	-0,443	> 0,05
HLA-DR	6	-0,6	> 0,05	8	-0,071	0,839
CD11B	6	-0,371	> 0,05	7	0,464	0,266
CD10	5	-0,6	> 0,05			
CD5				5	0,5	> 0,05
CD7				7	0,563	0,194
CD3	7	-0,571	0,163	7	0,429	0,306
CD4	6	-0,771	> 0,05	8	-0,262	0,501
CD8	7	-0,393	0,349	8	0,357	0,359
CD16	5	-0,3	> 0,05	8	0,619	0,097
CD19				5	-0,3	> 0,05
CD20				6	0,486	> 0,05
CD21				6	-0,086	> 0,05
CD71	7	0,143	0,721	8	0	0,977
CD25						
PGP				6	0,314	> 0,05

Оценка корреляционных связей молекулы CD95 с дифференцировочными антигенами лимфоидных и миелоидных клеток в CD95+-позитивных случаях РА и РАИБ представлены в табл. 10.4.

Полученные данные подтверждают независимость экспрессии CD95 от других дифференцировочных антигенов. Кроме того, высокая корреляционная связь CD95 с CD34, отмеченная при РАИБ, косвенно подтверждает ассоциацию этих маркеров именно при бластной морфологии стволовых гемопоэтических клеток.

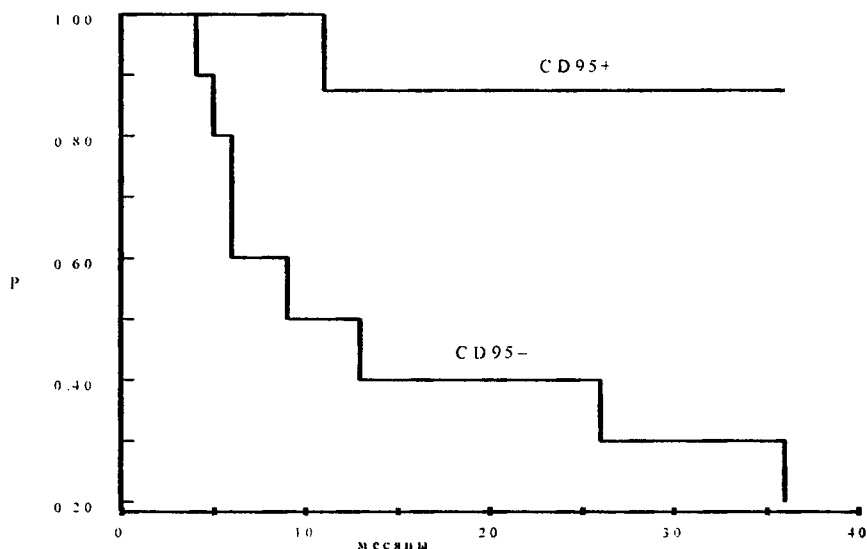


Рис. 10.1. Выживаемость больных МДС7, в зависимости от экспрессии антигена CD95(Fas/APO-1)

Данные иммунологические различия, по всей видимости, отражают различия в клиническом течении заболевания. Для анализа клинических различий А. Ю. Барышников и Ю. В. Шишкин (2000) взяли один единственный показатель — частоту смертности при этих заболеваниях, в зависимости от экспрессии антигена CD95(Fas/APO-1). Было обнаружено, что среди больных РА никто не умер, тогда как среди больных РАИБ погибло 8 (44 %) пациентов. Более того, у погибших, больных РАИБ, клетки костного мозга не экспрессировали антиген CD95(Fas/APO-1).

Таким образом, прослеживается четкая связь между способностью к апоптозу, клиникой МДС и смертностью. У больных РА повышен спонтанный апоптоз в клетках костного мозга. Отсутствие миелоидных предшественников указывает на апоптоз в коммитированных миелоидных клетках. Рецептор CD95(Fas/APO-1), по-видимому, не имеет никакого значения. Напротив, у больных РАИБ в костном мозге присутствуют коммитированные миелоидные предшественники (CD13+), и, в меньшей степени, проявляется

спонтанный апоптоз. В то же время, если клетки костного мозга не экспрессируют антиген CD95, то продолжительность жизни больных короче.

Сравнение иммунологического фенотипа клеток костного мозга больных РАИБ в группах CD95+ и CD95- представлено в табл. 10.5.

Резких различий в иммунофенотипе не отмечено, однако группа CD95- характеризовалась преобладанием зрелых Т-клеток (CD3, CD8), некоторым снижением NK-клеток (CD16) и более высоким уровнем В-лимфоцитов. Достоверные различия получены лишь по двум маркерам — CD11b и HLA-DR, что указывает на нарастание миелоидных предшественников при CD95- -РАИБ.

Аналогичный анализ проведен нами и при РА (табл. 10.6). В случае отсутствия антигена CD95, клетки экспрессировали повышенные уровни HLA-DR, отмечалось повышение CD4 Т-клеток, общего числа В-клеток (CD21+), а также двукратное повышение экспрессии рецептора трансферрина (CD71). Важным с точки зрения установления патогенетической роли CD95 при РА явилось резкое повышение уровней спонтанного апоптоза лимфоцитов и незрелых миелоидных коммитированных клеток при наличии экспрессии молекулы CD95.

Следовательно, исследованиями при МДС нами продемонстрирована независимость экспрессии антигена CD95(Fas/APO-1) от других дифференцировочных лейкоцитарных антигенов клеток костного мозга, что подтверждает корреляционный анализ и сравнение CD95+- и CD95--групп. Вместе с тем, экспрессия антигена сочеталась с высоким уровнем спонтанного апоптоза костномозговых клеток и лучшими показателями выживаемости больных. Благоприятная прогностическая роль экспрессии CD95 особенно показательна при РАИБ, о чем свидетельствует значительно большее число неблагоприятных исходов в случае отсутствия антигена.

Таким образом, нами показана значимость исследования экспрессии антигена CD95(Fas/APO-1) у больных МДС, позволяющая составить представление о роли программированной клеточной смерти в патогенезе данного заболевания.

Таблица 10.5

Иммунологический фенотип клеток костного мозга больных
в группах CD95+ и CD95- при РАИБ

Маркеры	CD95+			CD95-		
	Кол-во тести- руе- мых боль- ных	Число АГ+ клеток M±m	Станд. откл.	Кол-во тести- руе- мых боль- ных	Число АГ+ клеток M±m	Станд. откл.
CD95	8	33,69 ± 3,41	9,65	10	7,71 ± 1,53	4,85
CD34	8	11,69 ± 4,51	12,75	9	8,51 ± 2,36	7,06
CD33	6	2,8 ± 0,64	1,56	6	2,13 ± 1,47	3,61
CD13	7	14,02 ± 11,66	30,85	7	5,28 ± 2,55	6,75
CD14	6	0,58 ± 0,22	0,53	7	2,57 ± 0,89	2,35
CD15	6	0,88 ± 0,32	0,78	5	1,38 ± 0,4	0,9
HLA-DR	8	11,09 ± 1,87	5,29	10	22,74 ± 5,04	15,94
CD11B	7	3,51 ± 8,15	21,57	8	30,55 ± 19,45	6,88
CD10	2	2,9 ± 0,1	0,14	5	6,8 ± 3,86	8,63
CD5	5	55,68 ± 5,59	12,52	5	42,08 ± 9,43	21,08
CD7	7	56,59 ± 4,14	10,94	6	42,73 ± 11,02	27
CD3	7	50,74 ± 6,37	16,84	9	35,11 ± 7	21,02
CD4	8	23,38 ± 3,69	10,46	7	20,99 ± 3,25	8,6
CD8	8	35,89 ± 3,09	8,73	7	20,33 ± 6,06	16,03
CD38	3	58 ± 9,08	15,73	6	51,96 ± 9,62	23,56
CD16	8	22,36 ± 4,31	12,18	5	14,76 ± 3,47	7,76
CD19	5	5,42 ± 0,91	2,03	6	7,51 ± 1,67	4,09
CD20	6	7,82 ± 1,14	2,79	6	8,29 ± 1,2	2,95
CD21	6	17,76 ± 6,67	16,35	4	19,4 ± 5,58	11,16
CD22	2	6,9 ± 4,2	5,94	3	5,7 ± 2,53	4,39
CD24	2	11,75 ± 5,35	7,57			
CD72	2	2 ± 1	1,41			
CD71	8	22,04 ± 3,66	10,35	6	17,01 ± 3,86	9,46
CD25	2	5,05 ± 0,05	0,07			
PGP	6	3,42 ± 1,36	3,05	5	8,94 ± 2,17	4,85
BCL2	2	33,6 ± 33,36	47,19	4	7,39 ± 2,55	5,09
P53	3	0,7 ± 0,41	0,72	4	2,47 ± 0,86	1,73
KI67	3	16,49 ± 10,61	18,37	4	11,1 ± 5,77	11,55
BAX	2	0,7 ± 0,4	0,57	4	7,41 ± 0,85	1,19

Таблица 10.6

Иммунологический фенотип клеток костного мозга больных в группах CD95+ и CD95- при РА

Маркеры	CD95+			CD95-		
	Кол-во тестируемых больных	Число АГ+ клеток $M \pm m$	Станд. откл.	Кол-во тестируемых больных	Число АГ+ клеток $M \pm m$	Станд. откл.
CD95	8	$37,3 \pm 2,91$	8,23	10	$8,86 \pm 1,66$	5,25
CD34	8	$6,55 \pm 1,25$	3,55	9	$7,39 \pm 2,29$	6,87
CD33	4	$1,35 \pm 0,47$	0,93	5	$2,94 \pm 1,51$	3,37
CD13	6	$3,28 \pm 1,38$	3,38	6	$2,07 \pm 0,52$	1,26
CD14						
CD15	4	$1,35 \pm 1,73$	0,86	5	$4,79 \pm 2,84$	6,36
HLA-DR	6	$10,32 \pm 1,8$	4,41	9	$17,71 \pm 2,45$	7,36
CD11B	6	$39,45 \pm 14,36$	35,17	8	$25,45 \pm 4,77$	13,48
CD10	5	$9,7 \pm 1,85$	4,14	5	$8,32 \pm 3,54$	7,92
CD5	3	$52 \pm 13,42$	23,25	5	$42,82 \pm 7,11$	15,9
CD7	4	$49,9 \pm 14,82$	29,64	7	$39,55 \pm 4,76$	12,58
CD3	7	$55,1 \pm 8,24$	21,81	9	$46,08 \pm 5,04$	15,12
CD4	6	$36,37 \pm 5$	12,25	8	$24,31 \pm 3,76$	10,64
CD8	7	$28 \pm 5,39$	14,26	7	$26,72 \pm 3,31$	8,77
CD38	2	$40,1 \pm 14,8$	20,39	3	$22,97 \pm 11,32$	19,6
CD16	5	$28,46 \pm 4,38$	9,78	6	$20,2 \pm 3,05$	7,48
CD19	3	$5,57 \pm 1,69$	2,93	5	$3,45 \pm 0,76$	1,71
CD20	4	$10,57 \pm 2,38$	4,76	5	$6,75 \pm 2,14$	4,79
CD21	3	$7,43 \pm 1,31$	2,27	3	$6,4 \pm 3$	5,19
CD22	3	$7,63 \pm 0,67$	1,17	3	$15,23 \pm 2,57$	4,46
CD24	2	$5 \pm 2,8$	3,96			
CD72	2	$8,5 \pm 3,4$	4,81			
CD71	7	$11,34 \pm 3,32$	8,79	6	$23,51 \pm 4,04$	9,89
CD25				2	$9 \pm 4,3$	6,08
PGP	3	$5,03 \pm 3,35$	5,79	4	$9,07 \pm 3,05$	6,09
BCL2	2	$4,45 \pm 3,29$	4,65			
P53	2	$7,06 \pm 4,69$	6,64			
KI67	2	$5,77 \pm 3,96$	5,59			

Экспрессия и функция антигена CD95(Fas/APO-1) при хроническом лимфолейкозе

Хронический лимфолейкоз (ХЛЛ) является наиболее частой формой лейкозов, встречающихся у взрослого населения [Воробьев А. И., Бриллиант М. Д., 1985]. ХЛЛ является в настоящее время, как и практически все онкогематологические заболевания, неизлечимой болезнью. В типичных случаях опухолевые клетки при этом заболевании представлены зрелыми В-лимфоцитами, которые экспрессируют антигены CD5 и CD23, имеют низкие уровни мембранных Ig [Барышников А. Ю. и др., 1989; Асцатуров И. А., 1997; Kipps N. et. al., 1997]. Лишь только в 1–3 % случаев клетки при ХЛЛ имеют Т-клеточную характеристику [Барышников А. Ю. и др., 1989]. Даже в запущенных случаях большинство клеток В-ХЛЛ являются покоящимися неделящимися лимфоцитами, которые накапливаются в организме больного, в первую очередь, из-за неспособности подвергаться нормальной программированной клеточной смерти (апоптозу), а не из-за быстрого клеточного деления [Reed J., 1998]. Дефекты механизмов апоптоза вместе с низкой фракцией растущих опухолевых клеток, вероятно, обуславливают общие сложности в лечении больных В-ХЛЛ. Хотя уровень лейкоцитов периферической крови часто может контролироваться в течение нескольких лет с использованием пуриновых нуклеозидов или алкилирующих агентов с/без глюкокортикоидов, остаточная болезнь обязательно сохраняется, и с течением времени обычно наступает прогрессирование в агрессивную летальную болезнь [O'Brien et. al., 1995]. Следовательно, актуальными остаются попытки поиска новой терапии В-ХЛЛ [Byrd R. et. al., 1998]. Пролиферация, выживаемость и антиген-презентирующая активность

нормальных В-клеток зависят, главным образом, от сигналов, передаваемых через их *slg*-рецепторы для антигена — CD95 и CD40 [Banchereau O. et. al., 1992].

Поверхностные рецепторы CD40, CD95 и В-клеточный рецепторный комплекс (BCR) регулируют жизнедеятельность В-клеток в норме. Повреждения сигнала через эти рецепторы могут играть роль в возникновении В-клеточных опухолей.

В этой связи представляется чрезвычайно важным изучение экспрессии рецептора CD95 на клетках В-ХЛЛ. Именно нарушение нормальных процессов апоптоза может вести к повышению числа лимфоцитов периферической крови при В-ХЛЛ.

Работ по изучению CD95(Fas/APO-1)-опосредованного апоптоза мало. S. Molica и соавт. (1996) показали, что у больных ХЛЛ обнаруживается высокая экспрессия *Bcl-2* и низкая экспрессия CD95(Fas/APO-1)-антигена. Mainou-Fowler T. и соавт. (1995) не обнаружили в реакции иммунофлюоресценции экспрессии антигена CD95(Fas/APO-1) на лейкозных клетках больных В-ХЛЛ. Однако несмотря на это, авторы исследовали возможность индукции апоптоза с помощью МКА. Было обнаружено, что МКА индуцировали апоптоз в этих клетках. Это указывает на то, что антиген CD95(Fas/APO-1) присутствует на лейкозных клетках, но в низкой плотности, что не позволило авторам в их системе определить экспрессию антигена. При культивировании в течение 24 ч количество апоптотических клеток повышалось до 27 % (колебания: 21–38 %) в половине исследованных случаев. Но во всех 12 исследованных случаев через 48 ч МКА индуцировали апоптоз в 72 % клеток. Через 72 ч средний процент был равен 69 %, с колебаниями от 31 до 91 % в 6 из 7 случаев. Эффект зависел от концентрации МКА анти-APO-1. ИЛ-4 защищал клетки от APO-1-индуцированного апоптоза на 53 % (колебания: 28–76 %). Экспрессия протеина *Bcl-2* в не обработанных МКА клетках незначительно отличалась от экспрессии на клетках инкубированных в присутствии МКА. Авторы заключили, что Fas-индуцированный апоптоз в лимфоцитах больных ХЛЛ не зависит от экспрессии *Bcl-2* и частично блокируется ИЛ-4.

Совершенно противоположные результаты получили Р. Panayiotidis и соавт. (1995), которые изучали экспрессию и функцию CD95(Fas/APO-1)-антигена у 21 пациента с ХЛЛ и 4 больных с волосатоклеточным лейкозом. CD95(Fas/APO-1)-антиген был экспрессирован у 10 из 21 больного на 5–41 % клеток, в среднем — на 15,6 %. Культивирование с альфа-интерфероном в течение 2 дней индуцировало экспрессию Fas-антигена у 15 из 19 больных до 15–74 % (среднее — 34 %). Интерлейкин-4 и интерлейкин-10, которые ингибируют или усиливают апоптоз в клетках больных ХЛЛ, соответственно, не модифицировали экспрессию CD95(Fas/APO-1) антигена. В этой работе авторы не сумели показать индукцию апоптоза в Fas⁺-клетках больных ХЛЛ с помощью анти-Fas МКА. Все 4 случая волосатоклеточного лейкоза экспрессировали CD95(Fas/APO-1)-антиген и были резистентны к Fas-индуцированному апоптозу.

Большую работу по изучению экспрессии CD95(Fas/APO-1)-антигена на лейкозных клетках больных В-ХЛЛ выполнили в Российском онкологическом научном центре им. Н. Н. Блохина РАМН. В лаборатории экспериментальной диагностики и биотерапии опухолей, совместно с сотрудниками отделения гематологии МОНИКИ, были изучены клетки крови от 50 больных ХЛЛ.

Авторами работы было проведено детальное исследование как субпопуляций резидуальных Т-клеток, так и злокачественных В-лимфоцитов крови больных ХЛЛ. Эти данные суммированы в табл. 11.1.

Как видно из представленной таблицы, иммунологический фенотип клеток данной группы больных соответствует В-ХЛЛ: абсолютный В-клеточный лимфоцитоз, экспрессия антигена CD5 при крайне низком содержании клеток, экспрессирующих Т-клеточные антигены CD3 (и еще меньше — CD4 и CD8). Поверхностные иммуноглобулины слабо экспрессированы на мембране В-лимфоцитов у больных ХЛЛ [Асцатуров И. А. и др., 1996]. У обследованных больных также выявили слабую экспрессию легких цепей иммуноглобулинов в 73,3 % случаев на 24–26 % лимфоцитов. IgM и IgG встречались чаще, но на низком проценте клеток крови.

Таблица 11.1

Иммунологическая характеристика клеток В-ХЛЛ

Антиген	Количество обследованных больных	Количество антиген-положительных клеток (%) $M \pm m$
CD95	50	$19,3 \pm 3,2$
CD19	25	$77,8 \pm 5,1$
CD5	46	$51,0 \pm 4,3$
CD20	39	$52,0 \pm 4,3$
CD22	15	$12,5 \pm 2,3$
CD23	20	$50,6 \pm 6,9$
CD24	26	$50,9 \pm 5,4$
CD72	14	$30,0 \pm 8,2$
CD25	28	$11,6 \pm 2,7$
CD3	48	$15,6 \pm 2,4$
CD11b	24	$19,6 \pm 4,9$
HLA-DR	46	$65,1 \pm 3,4$

Антиген CD95 был экспрессирован с средним на 19 % лейкозных клеток. Процент клеток, определяемых МКА к CD95, колебался в широких пределах от 0 до 78 %, причем высокие уровни экспрессии Fas/APO-1 были достаточно редкими. Не обнаружили различий в определении антигена МКА IPO-4 или ICO-160.

Большая проблема в иммунофенотипировании — пороговый уровень экспрессии, с которого можно считать случай положительным. Как правило, таким считается уровень 20 %. Однако если антиген представлен на маленькой популяции клеток, то эти клетки будут считаться негативными, хотя они позитивные по экспрессии изучаемого антигена. В качестве примера можно привести экспрессию антигена полипотентной стволовой клетки CD34, который в периферической крови экспрессирован на 0,6 % клеток. В связи с этим был проведен анализ критериев установления уровней CD95, начиная с которых лейкоз можно считать Fas-позитивным. Если же использовать достаточно низкий пороговый уровень в 10 %, то частота CD95-позитивных лейкозов

составила 52 % и средние уровни в антиген-положительной группе были $32,3 \pm 6,5$ %. При пороговом уровне 20 % и 30 % частота CD95-положительных В-ХЛЛ была приблизительно одинаковой: 28 % (14 из 50) и 24 % (12 из 50), т. е. с увеличением порогового уровня уменьшается частота положительных случаев.

При фенотипировании лейкозных клеток использовали два МКА — ICO-160 и IPO-4. Параллельное тестирование двух МКА против CD95-антигена — ICO-160 и IPO-4 — проведено в 12 случаях. В основном, отмечалось совпадение реакций. Качественные различия типов реакции МКА были лишь в 2 случаях: в обоих на основании МКА ICO-160 ХЛЛ был расценен как антиген-позитивный, а на основании МКА IPO-4 — как антиген-негативный. Эти данные показывают, что функционально активные эпитопы молекулы CD95 реже визуализируются с помощью МКА, и более полное представление о частоте экспрессии антигена при В-ХЛЛ дают МКА ICO-160. Поскольку в большинстве случаев для определения антигена CD95 был использован лишь один тип МКА, то при анализе материала данные относительно различных эпитопов молекулы не учитывались, и оперировали термином «экспрессия CD95» вне зависимости от того, какими МКА был выявлен антиген.

В изучаемой группе ХЛЛ, диагностированного на основании клинико-гематологических проявлений, обнаружены взаимосвязи между рядом клеточных субпопуляций, идентифицируемых на основании экспрессии дифференцировочных лейкоцитарных антигенов. Достоверная корреляция отмечена для CD11b и CD24 ($R = 0,55$; $p = 0,03$; $n = 15$); CD11b и Pgp170 ($R = 0,99$; $p = 0,007$; $n = 4$); CD19 и CD20 ($R = 0,74$; $p = 0,00$; $n = 20$); CD19 и HLA-DR ($R = 0,42$; $p = 0,04$; $n = 24$); CD24 и HLA-DR ($R = 0,51$; $p = 0,009$; $n = 25$); CD24 и CD72 ($R = 0,63$; $p = 0,05$; $n = 10$); CD25 и CD72 ($R = 0,798$; $p = 0,018$; $n = 8$). Близкая к достоверной корреляция отмечена для CD95 и CD5 ($R = 0,27$; $p = 0,07$; $n = 46$). Кроме того, CD95 позитивно коррелировал с HLA-DR ($R = 0,364$; $p = 0,13$; $n = 46$). Подобные ассоциации очевидны, так как отражают связь между разными маркерами, указывающими на В-клеточную природу ХЛЛ. Корреляции

экспрессии антигена CD95 с антигенами CD5+ и HLA-DR+ указывает на то, что антиген CD95(Fas/APO-1) представлен на определенном этапе дифференцировки В-клеток у больных В-ХЛЛ. Ранее было показано, что лейкозные В-клетки у больных ХЛЛ находятся на двух последовательных этапах дифференцировки, и с помощью индукторов дифференцировки можно менее зрелые В-клетки превратить в более зрелые. CD5-положительные клетки являются менее зрелыми (эти же клетки образуют М-розетки с эритроцитами мыши) и с помощью индукторов дифференцировки они превращаются в CD5-отрицательные клетки [Барышников А. Ю. и др., 1989]. Из вышесказанного можно заключить, что антиген CD95(Fas/APO-1) представлен на менее зрелых лейкозных В-клетках.

Для ответа на вопрос, насколько сопоставимы уровни CD95-позитивных клеток с другими популяциями клеток, экспрессирующими маркеры В-ХЛЛ, исследователи сравнили средние проценты различных клеток крови. Данные представлены в табл. 11.2.

Как видно из данных, представленных в таблице, уровни CD95+-клеток в крови больных В-ХЛЛ были значительно ниже, чем содержание клеток с маркерами В-ХЛЛ (CD19, CD20, CD24, CD5, HLA-DR, CD23). Исключение составили антигены CD22 и CD72, по которым различия не были достоверными. Если в случае CD22 полученные данные вполне объяснимы исходя из того, что данный маркер не считается типичным для В-ХЛЛ и в большинстве случаев отсутствует, то относительно CD72 трактовка данных затруднена. Дело в том, что CD72 является пан-В-клеточным антигеном, и то, что процент антиген-позитивных клеток был низким, в определенном смысле является неожиданным. По-видимому, объяснение следует искать в особенностях реактивности использованных нами отечественных МКА ICO-153.

Отсутствие различий в уровнях CD95+- и CD11b+-клеток, по-видимому, не имеет биологической основы, так как антигены экспрессированы на разных (хотя и частично перекрывающихся) популяциях клеток, содержание которых в крови больных В-ХЛЛ не взаимосвязано друг с другом.

Таблица 11.2

Сравнение относительного (процентного) содержания CD95-лимфоцитов и других популяций лимфоидных клеток крови

Сравниваемая пара	Среднее	Ст. ошибка средней	Число наблюдений	Достоверность различий (p)
CD11b CD95	19,7 22,8	4,9 5,1	24 24	0,635
CD20 CD95	52,0 20,6	4,3 3,9	39 39	0,000
CD22 CD95	12,5 8,3	2,3 2,2	15 15	0,107
CD23 CD95	50,6 22,9	6,9 5,7	20 20	0,002
CD24 CD95	50,9 18,4	5,4 4,0	26 26	0,000
CD25 CD95	11,7 22,7	2,7 4,7	28 28	0,053
CD5 CD95	51,1 19,2	4,4 3,2	46 46	0,000
HLA-DR CD95	65,2 19,8	3,4 3,5	46 46	0,000
CD72 CD95	30,1 12,9	8,2 3,1	14 14	0,44
CD19 CD95	77,9 21,0	5,1 4,7	25 25	0,000

Интересен факт почти достоверного преобладания CD95+ лимфоцитов над CD25+ лимфоцитами. Оба маркера идентифицируют активированные лимфоциты, и полученные данные говорят о том, что экспрессия CD95 не ограничивается активированными

клетками при В-ХЛЛ, а является значительно более широкой. Отсутствие связи между этими маркерами подтверждено и тем, что указанные антиген-позитивные популяции лимфоцитов крови больных В-ХЛЛ не находятся в корреляционных взаимосвязях.

Обобщая полученные данные, можно заключить, что антиген CD95 экспрессирован не на большинстве лейкозных клеток при В-ХЛЛ (примерно на трети клеток) и пропорционально нарастает по мере увеличения доли HLA-DR+- и CD24+-клеток. Нельзя не обратить внимание на такой факт: экспрессия CD19 несколько преобладала над экспрессией HLA-DR. Вместе с тем, при сравнении средних, эти различия не были достоверными: $81,0 \pm 4,3 \%$ и $73,8 \pm 3,9 \%$, $p = 0,12$, $n = 24$. Аналогичным образом, различия в экспрессии HLA-DR и CD24 также не были достоверными — в этом случае преобладали HLA-DR+-клетки: $59,3 \pm 4,7 \%$ и $49,6 \pm 5,5 \%$, $p = 0,06$; $n = 25$.

Частота CD95-позитивных случаев В-ХЛЛ колебалась в зависимости от порогового уровня CD95+-клеток. Следует отметить, что в отличие от множественной миеломы, при которой опухолевый субстрат (злокачественные плазматические клетки) в периферической крови практически отсутствует, при В-ХЛЛ более 80–90 % клеток периферической крови были представлены опухолевыми лимфоцитами. По этой причине определение уровня CD95+-лимфоцитов, начиная с которого В-ХЛЛ можно считать антигенпозитивным, представляется очень важным. Ведь даже при наличии 10 % CD95+-лимфоцитов их абсолютное число может быть очень высоким. При использовании указанного порогового уровня частота CD95+-В-ХЛЛ составила 52 % (26 из 50 случаев). При пороговом уровне в 20 % и 30 % частота CD95+-В-ХЛЛ была примерно равной — 28 % (14 из 50) и 24 % (12 из 50), а при повышении пороговых значений до 40 % частота CD95+-В-ХЛЛ равнялась 16 % (8 из 50).

Сравнение уровней экспрессии различных лейкоцитарных дифференцировочных антигенов в CD95+- и CD95--группах дано в табл. 11.3.

Как видно из представленных данных, количество клеток с маркерами В-ХЛЛ преобладало в CD95+-группе, причем по CD24

Таблица 11.3

Уровни экспрессии дифференцировочных антигенов
при CD95+ и CD95- ХЛЛ

Антиген	CD95+ (>10 %) ХЛЛ	CD95- (<10 %) ХЛЛ	Достоверность различий (p)
CD20	54,9 ± 6,2 (21)	48,6 ± 5,9 (18)	0,47
CD22	14,5 ± 5,8 (5)	11,6 ± 2,3 (10)	0,66
CD23	52,3 ± 8,4 (12)	48,1 ± 12,7 (8)	0,79
CD24	62,2 ± 6,6 (14)	37,7 ± 7,5 (12)	0,02
CD25	13,0 ± 3,8 (15)	10,2 ± 4,1 (13)	0,63
CD3	17,5 ± 3,4 (25)	13,5 ± 3,5 (23)	0,42
CD5	54,6 ± 6,0 (25)	46,9 ± 6,5 (21)	0,39
CD72	40,9 ± 11,8 (8)	15,6 ± 8,7 (6)	0,11
HLA-DR	72,5 ± 3,5 (25)	56,4 ± 5,8 (21)	0,02

и HLA-DR различия были статистически достоверными. То есть, экспрессия CD95 как мишени для элиминации опухолевых клеток механизмом Fas-опосредованного апоптоза отнюдь не означает меньших иммунологических проявлений заболевания у больных.

Что же касается гематологических проявлений В-ХЛЛ (уровень лейкоцитов крови, процент лимфоцитов в крови и костном мозге), то различия по этим показателям между CD95+- и CD95-- группами были недостоверными: лейкоциты — $(56,9 \pm 16,2) \times 10^9/\text{л}$ ($n = 11$) и $(59,2 \pm 17,4) \times 10^9/\text{л}$ ($n = 12$); процент лимфоцитов крови — $80,6 \pm 3,8$ (11) и $81,1 \pm 3,9$ (12); процент лимфоцитов в костномозговом пунктате — $65,6 \pm 8,4$ (9) и $78,5 \pm 5,5$ (9). Выраженность гематологических проявлений болезни была меньшей (хотя показатели и не различаются достоверно) в группе CD95-позитивного ХЛЛ. Это вполне согласуется с концепцией благоприятной роли экспрессии CD95 как молекулы, способной передавать апоптотический сигнал и тем самым обеспечивать гибель опухолевых клеток.

В дальнейшем было проведено сравнение абсолютного содержания клеток В-ХЛЛ в мкл крови больного. Поскольку наиболее информативным критерием, связанным с CD95, явился антиген HLA-DR, то авторы сопоставили абсолютное число HLA-DR+-

Таблица 11.4

Взаимосвязь абсолютного содержания
HLA-DR+-клеток крови больных В-ХЛЛ
с уровнями CD95+-лейкозных клеток

Пороговые уровни CD95	Количество наблюдений	Количество HLA-DR+-клеток в мкл $M \pm m$	Достоверность различий (p)
< 10 % > 10 %	10 11	$28,4 \pm 12,6$ $40,5 \pm 12,9$	0,51
< 20 % > 20 %	15 6	$24,5 \pm 8,9$ $60,5 \pm 19,4$	0,06
< 30 % > 30 %	16 5	$30,6 \pm 10,4$ $48,1 \pm 18,3$	0,43
< 40 % > 40 %	17 4	$34,1 (10,4)$ $37,5 (19,2)$	0,88

клеток/мкл в CD95+- и CD95--группах, используя различные пороговые уровни экспрессии Fas-антигена для идентификации CD95+-группы В-ХЛЛ (табл. 11.4).

При любых пороговых уровнях CD95 абсолютное число HLA-DR+-клеток в мкл крови в группе CD95+-В-ХЛЛ было выше, чем в CD95-группе. При уровне CD95 более 20 % эти различия близки к достоверным, $p = 0,06$.

Обращает на себя внимание диапазон экспрессии антигена CD5 (маркера, без которого достоверный диагноз ХЛЛ с позиций критериев диагностики сегодняшнего дня и, в частности, критериев REAL-классификации, не может быть установлен). Этот диапазон захватывает ряд значений ниже 20 % (обычного критерия для суждения об антигенпозитивности). Кроме того, к сожалению, длительный период исполнения работы, разумеется, включает эпизоды, где маркер CD5 не изучался (по различным причинам). Исключив все случаи недостаточно документированного В-ХЛЛ (CD5 не изучался или был ниже 20 %), авторы смогли отобрать

35 случаев В-ХЛЛ, при которых диагноз с точки зрения иммунофенотипа не вызывал сомнений.

В этой группе больных распределение CD95-позитивных случаев по частоте встречаемости существенно не отличалось от общей группы больных В-ХЛЛ.

Особый интерес представило изучение корреляционных связей молекулы CD95 с дифференцировочными антигенами лейкоцитов, представленными на клетках В-ХЛЛ. Эти данные суммированы в табл. 11.5.

Представленные данные однозначно показывают, что антиген CD95 при иммунологически документированном В-ХЛЛ не имеет корреляционных связей ни с одним из изученных клеточных маркеров. Это может служить еще одним подтверждением того, что CD95 не взаимосвязан с линейной и стадийной принадлежностью клеток В-ХЛЛ.

Данное наблюдение, хотя и является, казалось бы, очевидным, тем не менее лишний раз иллюстрирует одну важную особенность антигена CD95. Дело в том, что В-ХЛЛ является достаточно гомогенным по иммунологическому фенотипу опухолевым заболеванием крови. Это малигнизированные В-клетки, остановленные в своем развитии на очень узком этапе дифференцировки (наивные В-клетки). Ни линейная принадлежность, ни стадия дифференцировки клеток В-ХЛЛ не дают понимания и объяснения клинико-гематологической гетерогенности заболевания и его чувствительности к терапии. Ответ на эти вопросы, как полагают, кроется в функциональных особенностях злокачественных клеток и, в частности, в нарушении процессов программированной клеточной гибели. С этих позиций разнородность экспрессии CD95 и отсутствие связи этого маркера с иммунологическими и гематологическими параметрами могут во многом объяснить вариабельность течения лейкоза на основании дисрегуляции апоптотического процесса.

При оценке корреляционных связей между клетками, экспрессирующими различные дифференцировочные антигены, были изучены следующие маркеры: CD11b, CD19, CD20, CD22, CD23, CD24, CD25, CD3, CD5, CD72, CD95, HLA-DR, Pgp170. Проанализировано также наличие корреляционных связей этих

Таблица 11.5

Корреляционные связи молекулы
CD95 при иммунологически
верифицированном В-ХЛЛ

Сравниваемая пара	Число наблюдений	Коэфф. корреляции	Достоверность связи
CD95-CD19	20	-0,21	0,38
CD95-CD20	27	0,13	0,53
CD95-CD22	7	0,15	0,75
CD95-CD23	16	0,29	0,29
CD95-CD24	15	0,39	0,15
CD95-CD25	20	-0,033	0,89
CD95-CD3	35	0,036	0,84
CD95-CD5	35	0,26	0,13
CD95-CD72	7	0,25	0,59
CD95-CD11b	18	0,13	0,62
CD95-HLA-DR	32	0,32	0,07
CD95-Лейкоциты крови	17	0,13	0,63
CD95-Лимфоциты крови	17	0,16	0,53
CD95-Лимфоциты костного мозга	13	-0,39	0,18
CD95-Pgp170	15	-0,16	0,58

маркеров с уровнями лейкоцитов крови, относительным лимфоцитозом крови и костного мозга. Отмечены корреляционные связи в экспрессии дифференцировочных антигенов В-клеток CD19 и CD20 ($R=0,7$; $p=0,04$; $n=15$). Связи CD19 с другими маркерами В-лимфоцитов были умеренными и не носили достоверного характера, что в ряде случаев могло быть объяснено недостаточным числом наблюдений в сравниваемых парах. Соответствующие значения коэффициента корреляции (R) CD19 с другими маркерами составили: с CD22 — 0,34; с CD23 — 0,45. Интересен факт отсутствия корреляции CD19 с CD5 ($R = 0,08$), с CD24 ($R = -0,11$) и с HLA-DR ($R = 0,15$).

Как и следовало ожидать, отмечена отрицательная корреляционная связь между количествами Т-лимфоцитов (CD3) и В-лимфоцитов (CD19) крови: $R = -0,47$; $p = 0,04$; $n = 20$. Аналогичным образом, один из наиболее специфичных маркеров В-ХЛЛ (CD23) отрицательно коррелировал с содержанием Т-клеток (CD3): $R = -0,55$; $p = 0,029$; $n = 16$. Интересно отметить, что CD22 и HLA-DR находились в реципрокных взаимоотношениях: $R = -0,92$; $p = 0,009$; $n = 6$. Вместе с тем, CD5 достоверно коррелировал с содержанием HLA-DR+-клеток: $R = 0,42$; $p = 0,017$; $n = 35$. Гликопротеид Pgp170, ответственный за лекарственную резистентность, достоверно коррелировал с CD3 и CD11b, то есть был, вероятно, экспрессирован не на лейкозных клетках. Других корреляций между иммунологическими маркерами не отмечено.

Что касается взаимосвязей иммунологических маркеров В-ХЛЛ с гематологическими проявлениями заболевания, то они отмечены лишь для антигена HLA-DR. Уровни HLA-DR+-лимфоцитов положительно коррелировали с лейкоцитозом крови ($R = 0,69$; $p = 0,005$; $n = 15$) и с процентным содержанием лимфоцитов в крови ($R = 0,49$; $p = 0,06$; $n = 15$). Взаимосвязи с лимфоцитозом костного мозга не отмечено ($R = -0,18$).

Затем авторы сравнили группы CD95+- и CD95--В-ХЛЛ по выраженности экспрессии антигенов различных линий (процент антиген-положительных клеток в периферической крови). CD95-позитивными считали В-ХЛЛ с наличием более 10 % CD95 лимфоцитов. CD95+- и CD95--группы не различались достоверно по уровням Т-клеток (CD3), В-клеток (CD19, CD20, CD22, CD23, CD72), активационных антигенов CD25 и т. д. Количество CD24+-лимфоцитов было более высоким (недостоверно) в CD95+-группе (62,7 % и 39,6 %, $p = 0,098$). Число HLA-DR+-лимфоцитов также недостоверно преобладало при CD95+-В-ХЛЛ: 72,1 % и 60,3 %, $p = 0,17$.

Дополнительными подтверждениями роли CD95 в патогенезе заболевания могло бы служить наличие определенных ассоциаций экспрессии CD95 с признаками, указывающими на нарастание или уменьшение опухолевой массы. Экспрессия CD95 при В-ХЛЛ не является постоянной и, в зависимости от критерия оценки,

наблюдается в диапазоне от 20 % до 54 % случаев. Так, при пороговом уровне антиген-позитивности в 10 % CD95+-клеток, 19 из 35 случаев (54,3 %) В-ХЛЛ были антиген-положительны. Для других уровней антигенпозитивности аналогичные цифры составили: 20 % — 28,6; 30 % — 25,7; 40 % — 20. То есть, принятие традиционного уровня антиген-позитивности в 20 %, по-видимому, является оптимальным, так как дальнейшее повышение уровней CD95+-клеток, принимаемых за пороговые, не ведет к существенному изменению частоты экспрессии CD95 на клетках В-ХЛЛ.

В качестве основного маркера В-ХЛЛ, отражающего в определенной степени величину опухолевой массы, нами использован антиген CD5. При этом все случаи В-ХЛЛ были разделены на таковые с выраженной экспрессией CD5 (более 60 % клеток) и с умеренной или низкой экспрессией CD5 (не более 60 % клеток). Эти группы оказались численно весьма сходными (20 и 15 случаев, соответственно), что важно при проведении статистического анализа.

Интересно отметить, что при анализе связи выраженности экспрессии CD5 и CD95 на клетках В-ХЛЛ отмечена определенная взаимозависимость маркеров, табл. 11.6.

Важным наблюдением, которое можно сделать, исходя из этих сопоставлений, является то, что число случаев с выраженной экспрессией CD5 наблюдается значительно чаще при CD95-позитивном В-ХЛЛ. Так, при пороговом уровне CD95 в 20 %, соответствующие значения составили 48 и 80 %, различия близки к достоверным ($p < 0,1$). Справедливо и обратное: в случаях с выраженным CD5-лимфоцитозом (более 60 %) частота CD95-позитивных В-ХЛЛ значительно выше, чем в случаях с умеренным (менее 60 %) количеством CD5+-клеток. Создается парадоксальная, на первый взгляд, ситуация: при нарастании экспрессии CD95 происходит увеличение процента лейкозных CD5+-В-лимфоцитов. То есть, механизм CD95-опосредованного апоптоза не является эффективным и достаточным инструментом элиминации злокачественных клеток В-ХЛЛ.

Учитывая ассоциацию выраженности иммунологических проявлений В-ХЛЛ с высокими уровнями экспрессии CD95, исследо-

Таблица 11.6

Взаимосвязь экспрессии CD95 (различные пороговые уровни)
с выраженным CD95+-лимфоцитозом

CD95	CD5 (< 60 %)	CD5 (> 60 %)	<i>p</i>
- (< 10 %)	7	9 (56 %)	0,6
+ (> 10 %)	8	11 (58 %)	
- (< 20 %)	13	12 (48 %)	0,087
+ (> 20 %)	2	8 (80 %)	
- (< 30 %)	13	13 (50 %)	0,14
+ (> 30 %)	2	7 (78 %)	
- (< 40 %)	13	15 (54 %)	0,34
+ (> 40 %)	2	5 (71 %)	

Примечание: указано число случаев, в скобках в строке процент.

ватели сравнили средние показатели содержания различных типов клеток в крови больных В-ХЛЛ по мере увеличения порогового значения Fas-антигена, используемого для идентификации CD95-позитивной группы.

При уровнях 20 % и 30 % отмечено достоверное преобладание процента HLA-DR+-лимфоцитов в CD95+-группе ($p = 0,004$ и $p = 0,012$, соответственно). Для других маркеров различия не были статистически значимыми. Группы не различались по уровням лейкоцитов в периферической крови, а также по процентному содержанию лимфоцитов крови и костного мозга.

Использование порогового уровня в 40 % обнаружило некоторые новые взаимосвязи. CD95+- и CD95--группы по-прежнему не различались по уровням CD19+-клеток (в среднем 75 %), CD5+-клеток (в среднем 60 %), количеству MDR1+-лимфоцитов (по 12 %), CD3+- и CD25+-клеток. Отмечено некоторое (недостоверное) преобладание CD11b+-, CD20+-, CD24+-клеток в CD95+-группе. Как и при более низких пороговых уровнях, CD95-клетки, экспрессирующие HLA-DR, преобладали в CD95+-группе (80 % и 63 %, $p = 0,01$). Интересно отметить, что CD95+-

Таблица 11.7

Взаимосвязь уровней
CD95-лимфоцитов с абсолютным
HLA-DR+-лимфоцитозом при В-ХЛЛ

Уровень CD95	Количество	Абсолютное кол-во HLA-DR+-клеток в мкл М (SEM) $\times 10^3$	Достоверность различий (p)
< 10 %	5	33,9 (22,3)	0,7
> 10 %	10	44,3 (13,7)	
< 20 %	10	25,3 (11,9)	0,049
> 20 %	5	72,0 (19,1)	
< 30 %	11	31,1 (13,9)	0,31
> 30 %	4	59,5 (18,5)	
< 40 %	12	38,8 (13,6)	0,7
> 40 %	3	49,1 (21,7)	

группа характеризовалась более высокими уровнями CD23 (71 % и 40 %, $p = 0,009$). Различия в уровнях лейкоцитов крови, процентном содержании лимфоцитов крови и костного мозга отсутствовали.

Таким образом, полученные данные вновь иллюстрируют взаимосвязь CD95 с более выраженными иммунологическими проявлениями В-ХЛЛ (маркер CD23 при наличии на клетках CD5 является наиболее специфическим признаком В-ХЛЛ) и позволяют рассматривать Fas/APO-1 как показатель опухолевой прогрессии.

Сказанное в полной мере иллюстрируется достоверно более высоким абсолютным HLA-DR+-лимфоцитозом в CD95+-подгруппе В-ХЛЛ (табл. 11.7).

Как видно из таблицы, в случаях типичного CD5-позитивного В-ХЛЛ абсолютное содержание HLA-DR+-лимфоцитов крови выше у больных, на лейкозных клетках которых экспрессирован ан-

Таблица 11.8

Сравнение экспрессии CD95(Fas/APO-1)-антигена
на лейкозных клетках крови
в зависимости от ответа на терапию

Маркер	Отвечающие больные	Не отвечаю- щие больные	<i>p</i>
CD95(Fas/APO-1)	21,4 ± 7,0*	1,9 ± 1,2	< 0,05
Pgp170	9,4 ± 6,2	13,9 ± 6,9	> 0,05
<i>Bcl-2</i>	38,4 ± 16,1	41,6 ± 18,8	> 0,05
Лейкоцитоз	40,5 ± 15,3	158,2 ± 52,5	< 0,05

Примечание: * — процент антиген-положительных клеток.

тиген CD95 (вне зависимости от уровня антигена, использованного для идентификации CD95-позитивной группы). Достоверное преобладание HLA-DR+ -лимфоцитов отмечено у больных, более 20 % клеток которых экспрессируют CD95(Fas/APO-1)-антиген.

Сопоставляя результаты наших исследований с данными литературы, можно согласиться с наблюдениями S. Molica et. al. (1996) о достаточно низкой экспрессии Fas/APO-1 на клетках В-ХЛЛ (выраженные уровни CD95+ -клеток в лейкозной популяции отмечены лишь у 7 больных В-ХЛЛ), а также с заключением P. Panayiotidis и соавт. (1995) о возможной неэффективности Fas-опосредованного апоптоза при В-ХЛЛ.

Профессор А. К. Голенков проанализировал экспрессию антигена CD95(Fas/APO-1), Pgp170, *Bcl-2* в зависимости от клинического течения заболевания (табл. 11.8). Как видно из таблицы, у всех 10 ответивших на терапию больных был экспрессирован антиген CD95(Fas/APO-1) на 21,4 ± 7,0 % клеток крови. Следует подчеркнуть, что у резистентных к терапии больных этот антиген вовсе отсутствовал. Количество лейкоцитов в периферической крови было в четыре раза ниже, чем у устойчивых к терапии больных. В то же время, больные статистически значимо не различались по экспрессии на лейкозных клетках Pgp170 и *Bcl-2*.

Таким образом, можно сделать заключение, что антиген CD95 экспрессирован на лейкозных В-клетках больных ХЛЛ на стадии CD5+-дифференцировки. Экспрессия антигена CD95(Fas/APO-1) является прогностически благоприятным фактором, так как отвечающие на терапию больные экспрессируют этот антиген. Возможно, химиопрепараты, используемые в протоколах лечения В-ХЛЛ, действуют через CD95-рецепторно/лигандную систему.

Экспрессия эпитопов CD95 на лимфоидных и плазматических клетках при множественной миеломе

Множественная миелома (ММ) — это онкогематологическое заболевание, заключающееся в моноклональной пролиферации плазматических клеток. Первоначально накапливаясь в костном мозге, опухолевые клетки ведут к деструкции костной ткани, нарастанию концентрации патологических Ig в сыворотке крови и секреции их легких цепей (белков Бенс-Джонса) с мочой, а на поздних стадиях заболевания приобретают способность расти в любых органах и тканях вне костного мозга. В структуре онкогематологической патологии ММ составляет около 10 % [Андреева Н. Е., 1985].

В 1953 г. с помощью иммуноэлектрофореза была установлена моноклоновая природа М-протеина, а в 70-х годах была доказана В-клеточная природа плазматических клеток. Исследования последних двух десятилетий доказали, что плазматические клетки являются последним этапом дифференцировки В-клеточной линии лимфоцитов.

Опухолевый субстрат при множественной миеломе — злокачественные плазмциты — не столь доступен для исследования, как при острых и хронических лейкозах: даже при развернутой клинике болезни содержание плазмцитов в костном мозге может составлять лишь несколько процентов (в отличие от весьма гомогенных, часто мономорфных популяций лейкозных клеток). Кроме того, идентификация злокачественных плазматических клеток иммунологическими методами чрезвычайно затруднена в связи с тем, что на них утрачивается большинство В-клеточных антигенов, молекулы HLA-DR, мембранные иммуноглобулины и даже

экспрессия общелейкоцитарного антигена CD45 практически отсутствует, в то время как характерной является высокая экспрессия CD38 [Кадагидзе З. Г. и соавт., 1990]. Маркер CD38 может встречаться как на миелоидных, так и на нормальных плазматических клетках. Самым же специфическим маркером клеток при ММ считается молекула сендекан-1 (CD138), однако этот новый маркер еще не нашел широкого применения в практике.

По указанным выше причинам исследование биологических и иммунофенотипических особенностей клеток множественной миеломы изучено недостаточно. Основной прогресс в этой области достигнут на модели миеломных клеточных линий. Клинических исследований на опухолевых клетках больных крайне мало.

§ 12.1. Экспрессия эпитопов молекулы CD95 на лимфоидных клетках крови больных множественной миеломой

Целью данного раздела работы явилась оценка возможности использования МКА к различным эпитопам молекулы CD95 для рутинного иммунофенотипирования лимфоцитов периферической крови и костного мозга больных множественной миеломой. Основанием для подобной постановки вопроса явилось следующее. Как было показано в главе 4.8, МКА IPO-4 и ICO-160 распознают различные эпитопы молекулы CD95. Более того, функциональная роль эпитопов CD95, распознаваемых МКА IPO-4 и ICO-160, также различна. Молекула CD95 является трансмембранным гликопротеином, воздействие на внеклеточные домены которого активирует целый каскад интрацеллюлярных событий, приводящих к апоптотической гибели клетки. Хорошо известно, что активация трансдуцерных молекул (например, трансдуцера gp130-цитокинов) изменяет третичную структуру молекулы и «маскирует» некоторые функционально активные эпитопы [Tupitsyn N. N. et. al., 1998]. Перераспределение эпитопов CD95 в процессе активации изучено недостаточно. По этой причине можно считать, что МКА IPO-4 и ICO-160 с почти одинаковой вероятностью могут являться либо взаимозаменяющими, либо взаимодополняющими при изучении

CD95 на лимфоцитах крови и костного мозга больных множественной миеломой.

Экспрессия Fas/APO-1-антигена изучена нами у 64 больных ММ. В 38 случаях проводили исследование клеток костного мозга, в 55 — лимфоцитов периферической крови. Больные имели различную продолжительность заболевания (как правило, первичные или с анамнезом болезни до 3 лет, лишь в 1 случае — 7 лет). Исследование проводилось в период обследования или при диагностике до назначения очередного (или первого) курса полихимиотерапии.

Исследование лимфоидных клеток проведено комплексно с использованием широкой панели отечественных и зарубежных МКА, позволяющих судить о соотношениях субпопуляций Т- и В-лимфоцитов, степени их активации и т. п. Данные по периферической крови суммированы в табл. 12.1.

Как видно из таблицы, процент CD3-положительных Т-лимфоцитов у 33 обследованных пациентов был равен $68,9 \pm 2,9\%$ и не отличался от аналогичной величины здоровых доноров — 65%. У 4 больных количество Т-клеток было снижено до 31–37%. При этом уровень CD95-положительных клеток у этих 4 больных также был снижен.

Процент CD4-положительных Т-хелперных/индукторных клеток был равен $34,3 \pm 2,5\%$, а CD8-положительных супрессорных/цитотоксических клеток — $36,2 \pm 2,29\%$. Иммуnoreгуляторный индекс составил 0,94. Однако, в 12 случаях иммуnoreгуляторный индекс составил 0,63, так как был резко повышен процент CD8-положительных клеток — $48,0 \pm 1,7\%$, на фоне снижения CD4-положительных клеток у 10 пациентов. У всех этих больных был низкий уровень CD95-положительных клеток. Уровень CD95+-лимфоцитов положительно коррелировал с CD4+-клетками: $R = 0,57$; $p < 0,01$.

Количество CD38+-лимфоцитов в анализируемой группе составило $37,3 \pm 3,5\%$. Эта популяция находилась в прямой корреляционной связи с CD95+-лимфоцитами: $R = 0,4$; $p < 0,05$.

Уровень В-клеток определяли у 23 больных с помощью МКА против антигенов CD19, CD20, CD22 и CD24. В 16 случаях было повышение экспрессии хотя бы одного маркера выше 12%

Таблица 12.1

Иммунологический фенотип лимфоцитов периферической крови
у больных множественной миеломой

Антиген	МКА	Кол-во исследований	Антигенположительные клетки ($M \pm m \%$)
CD95	ICO-160	40	$31,7 \pm 15,1$
CD95	IPO-4	58	$28,7 \pm 16,7$
CD3	ICO-90	33	$69,9 \pm 2,9$
CD4	ICO-86	32	$34,3 \pm 2,5$
CD8	ICO-31	32	$36,2 \pm 2,3$
CD5	ICO-80	8	$67,6 \pm 2,7$
HLA-DR	ICO-1	23	$20,2 \pm 2,3$
CD19		10	$10,6 \pm 1,8$
CD20	B-20	13	$20,4 \pm 3,1$
CD22	ICO-91	21	$17,0 \pm 2,2$
CD11b	ICO-GM1	39	$32,3 \pm 3,8$
CD24	ICO-150	12	$15,8 \pm 2,9$
CD18	ICO-108	37	$71,8 \pm 4,4$
CD25	ICO-105	18	$20,0 \pm 2,1$
CD71	ICO-92	17	$20,7 \pm 2,1$
CD50	ICO-60	30	$63,0 \pm 5,4$
CD38	ICO-20	27	$37,3 \pm 3,5$
λ -цепь	ICO-106	22	$19,4 \pm 2,7$
κ -цепь	ICO-107	22	$28,4 \pm 3,2$
IgM	ICO-30	11	$17,5 \pm 2,5$
IgG	ICO-97	11	$17,1 \pm 4,8$

(верхняя граница нормы). Это согласуется с гипотезой о циркуляции в периферической крови клона В-клеток — предшественников злокачественных плазматиков. Процент CD95-положительных клеток был повышен (более 30 %) у 5 из 16 больных.

Процент CD22-положительных клеток был равен $17,0 \pm 2,2 \%$. У 7 из 21 тестированных больных был повышенный уровень антиген-положительных клеток ($28,4 \pm 3,7 \%$). Уровень CD20-положительных клеток был равен $20,4 \pm 3,5 \%$. В 7 из 13 случаев экспрессия антигена была повышена. Содержание CD24-

положительных клеток было равно $15,8 \pm 2,9 \%$, и в 3 из 12 случаев экспрессия была повышенной ($29,0 \pm 4,5 \%$).

Процент HLA-DR-положительных клеток был равен $20,2 \pm 2,3 \%$. В 13 из 23 случаев уровень экспрессии на лимфоцитах периферической крови был выше нормального — 9–12 %. Это повышение может быть связано с повышением уровня В-клеток, как это показано выше, с экспрессией на активированных Т-клетках, а также с включением моноцитов в гейт «лимфоциты».

Экспрессия антигена CD11b, в норме представленная на моноцитах и NK-клетках, была на уровне $32,3 \pm 3,8 \%$. Антиген CD11b коррелировал с CD95: $R = 0,41$; $p < 0,02$.

Экспрессия иммуноглобулинов IgM и IgG, а также λ - и κ -цепей была повышена в большинстве случаев. Это, однако, связано с неспецифической адсорбцией иммуноглобулинов на поверхностной мембране лимфоцитов, так как в этой серии экспериментов не проводилась их элюция.

Экспрессия антигена CD18 (β -цепь антигенов CD11a, CD11b и CD11c) была снижена в 16 из 37 случаев (в среднем $71,8 \pm 4,4 \%$). Уровни CD18⁺-лимфоцитов коррелировали с уровнями CD95⁺-клеток: $R = 0,5$; $p < 0,01$.

Молекула адгезии CD50 была снижена в 18 из 30 случаев (в среднем до $63,0 \pm 5,4 \%$).

С другой стороны, была повышена экспрессия активационных антигенов CD25 (рецептор интерлейкина-2) и CD71 (рецептор трансферрина). Средний уровень экспрессии рецептора интерлейкина-2 был равен $20,0 \pm 2,1 \%$, а в 16 случаев из 18 он был выше нормы. Антиген CD71 был представлен на $20,7 \pm 3,1 \%$ лимфоцитов. В 13 из 17 случаев экспрессия была повышенной.

Таким образом, представленные результаты показывают нарушение иммунного статуса у больных ММ. С одной стороны, у больных повышена субпопуляция супрессорных/цитотоксических клеток, а с другой — повышена экспрессия активационных маркеров.

МКА IPO-4 выявляли в среднем 29 % (3,1 %–76,5 %) лимфоцитов крови у больных ММ, а МКА ICO-160 — 32 % (5,1 %–65,4 %). При анализе по спаренному Т-тесту для 42 образцов крови,

изученных параллельно с применением обоих антител, различия не были достоверными по этой выборке, $p = 0,44$ (средние для IPO-4 и ICO-160 составили 31,3 % и 32,6 %, соответственно). По проценту CD95-положительных лимфоцитов клетки крови больных ММ существенно не отличались от клеток крови здоровых доноров (25 %–28 %). Однако более чем у половины больных (58 %) уровни CD95+-лимфоцитов были повышены (среднее у этих больных $39,8 \pm 1,7$ %), причем в 5 наблюдениях — более 50 %. У здоровых людей повышение экспрессии антигена наблюдается значительно реже (примерно в 25 % случаев). У остальных больных ММ уровни CD95 лимфоцитов были нормальными или сниженными (среднее по этой группе $11,7 \pm 1,6$ %).

Повышенное содержание в периферической крови больных ММ по сравнению с нормой количества CD95(Fas/APO-1) положительных клеток обнаружили и другие исследователи. Фенотипический анализ этих клеток показал их активационное состояние. Так, М. Massaia и соавт. (1994) обнаружили в периферической крови больных ММ присутствие активированных Т-клеток, экспрессирующих HLA-DR антигены и, как было найдено, продуцировавших большое количество интерлейкина-2 и γ -интерферона. После стимуляции *in vitro* эти клетки проявляли цитотоксическую активность против плазматических клеток. Активированные Т-клетки были высокочувствительны к апоптозу, индуцированному МКА против Fas-антигена. Далее авторы сравнили в активированных Т-клетках от больных множественной миеломой уровень антигенов CD95(Fas/APO-1) и *Bcl-2*. Количество CD95-положительных клеток было больше, а *Bcl-2*+-клеток было меньше у больных ММ, по сравнению с контролем. Больные, лимфоциты которых сильно экспрессировали HLA-DR-антигены, имели наивысший уровень антигена CD95 и наиминимальную экспрессию *Bcl-2*. Методом двойного окрашивания на уровне индивидуальных клеток показали, что HLA-DR-положительные клетки экспрессировали CD95-антиген и не содержали *Bcl-2*.

Была оценена чувствительность Т-клеток к апоптозу у больных ММ в зависимости от экспрессии антигенов CD95(Fas/APO-1) и *Bcl-2*. Процент апоптотических клеток после инкубации в одной

среде (спонтанный апоптоз) или в присутствии метилпреднизолона, или с анти-Fas МКА (триггерный апоптоз) был значительно выше у больных ММ и, главным образом, был рестриктирован HLA-DR+-клетками. Спонтанный апоптоз прекращался экзогенным *Bcl-2*. Таким образом, Т-лимфоциты у больных ММ имеют дисрегуляторную экспрессию антигенов CD95 и *Bcl-2*, которые ассоциированы с усилением чувствительности к апоптозу. Эти данные могут объяснить механизм появления активированных Т-клеток у больных множественной миеломой с ослабленной противоопухолевой эффективностью.

Данные по параллельной оценке экспрессии эпитопов CD95, выявляемых МКА IPO-4 и ICO-160, представлены в табл. 12.2. Анализ подверглись результаты исследований 42 больных, у которых экспрессия CD95 изучалась с помощью МКА IPO-4 и ICO-160 одномоментно, причем, как видно из таблицы, в 37 изученных случаях из 42 (89 %) отмечалось практически полное совпадение результатов.

Таблица 12.2

Сопоставление уровней антиген-положительных клеток крови, выявляемых МКА к эпитопам CD95

Условные номера исследованных больных	Экспрессия IPO-4	Экспрессия ICO-160	ICO-160 vs IPO-4
1	40,5	30	=
2	22,3	56	↑
4	15,3	25,2	=
5	12	28,1	↑
6	25,4	33	=
7	30,1	29,3	=
8	43,5	40	=
9	57,4	56,7	=
10	23	37,3	=
11	39,2	34,3	=
12	38,4	42	=
13	33,2	33,6	=
14	34,2	36,6	=

Продолжение таблицы 12.2

Условные номера исследованных больных	Экспрессия IPO-4	Экспрессия ICO-160	ICO-160 vs IPO-4
15	34,7	33,6	=
16	24,7	24,3	=
17	34,5	30,6	=
18	40,4	35,9	=
19	40,2	40,4	=
20	37,4	32,4	=
21	23,8	30,3	=
22	76,5	63	=
23	3,1	6,8	=
24	29	28,8	=
25	15,2	27,7	=
26	20,9	20	=
37	28,9	32,2	=
38	56,2	51,2	=
39	43,4	65,4	↑
40	45	38,5	=
41	12	15,6	=
42	9,8	40,7	↑
43	24	24	=
44	51,1	52,3	=
45	5	8,4	=
46	38,4	31,2	=
47	42,2	30,9	=
48	39,4	24,7	=
49	5,3	12,3	=
50	18,1	12,4	=
51	54	60	=
54	21,9	5,2	↓
55	21,7	8,4	=

Обозначения: ↑ — более высокое значение МКА ICO-160; ↓ — более высокое значение МКА IPO-4; = — примерно равные значения экспрессии.

Практически полное совпадение результатов изучения экспрессии CD95 с помощью двух МКА к различным эпитопам молекулы свидетельствует о взаимозаменяемости этих МКА. Подтверждением практически полной идентичности экспрессии эпитопов CD95 является также высокий коэффициент корреляции между процентом IPO-4+- и ICO-160+-лимфоцитов крови больных ММ: $R = 0,75$; $p = 0,000$.

Полученные данные позволяют считать МКА IPO-4 и ICO-160 взаимозаменяемыми при изучении лимфоцитов крови в 90 % случаев ММ.

Вместе с тем, внимательный анализ данных табл. 12.2 позволяет выделить 4 случая (9,7 %), при которых нормальные и даже повышенные уровни CD95+-лимфоцитов (судя по экспрессии ICO-160) ассоциировали со значительно более низкими значениями IPO-4+-лимфоцитов (особенно 3 случая: № 2 — 56 % и 22 %, № 5 — 28 % и 12 %, № 42 — 41 % и 9,8 %). Важно отметить, что в этих наблюдениях, несмотря на достаточно высокое содержание CD95+-клеток в крови (по ICO-160 не ниже нормы), оценка Fas-положительных лимфоцитов по IPO-4 могла бы привести к заключению о практически полном отсутствии этих клеток. Факта, что примерно у 10 % больных ММ наблюдается дискордантная экспрессия CD95, нельзя не принимать во внимание. Особое значение это наблюдение приобретает в свете показанной нами различной функциональной роли эпитопов молекулы CD95, распознаваемых МКА IPO-4 и ICO-160. Через эпитоп IPO-4 реализуется полноценный, а через ICO-160 — незавершенный апоптоз. В физиологических условиях апоптоз Fas-позитивных лимфоцитов может осуществляться посредством Fas-лиганда (Fas-L), экспрессируемого на клетках (в том числе миеломных) или растворимого, циркулирующего в сыворотке крови. Это — механизм элиминации иммунных лимфоцитов и, следовательно, ускользания опухоли от иммунного надзора. В большинстве случаев он приводит к апоптотической гибели Fas-позитивных Т-клеток. Механизм воздействия Fas-L и агонистичных (вызывающих апоптоз) МКА в чем-то сходен — он заключается в олигомеризации молекулы CD95 на первом этапе передачи апоптотического сигнала. И, хотя на сегодняшний день

нет достаточных данных о том, что агонистичные МКА и Fas-L взаимодействуют с одними и теми же или близко расположенными участками молекулы CD95, вероятность этого достаточно велика. Следовательно, наиболее вероятным кандидатом, блокирующим реактивность МКА IPO-4 с молекулой CD95, является растворимая форма Fas-L [Klass C. et. al., 1993; Dhein J. et. al., 1995], так как другие естественные молекулы, взаимодействующие с CD95 в функционально активной области, просто неизвестны.

Другим условием, в результате выполнения которого может быть нарушен апоптозный каскад, является наличие растворимого Fas-антигена. Его присутствие может подавлять апоптоз, индуцированный агонистическими моноклональными антителами против CD95 из-за его конкуренции с мембраносвязанным Fas-антигеном за связывание лиганда [Cheng J. et. al., 1994; Обушева М. Н., 1999].

Если подобные предположения верны, (а они, несомненно, нуждаются в серьезной экспериментальной проверке), то в случаях дискордантной экспрессии эпитопов CD95 (IPO-4 – ICO-160+) можно было бы рассматривать CD95+-лимфоциты как находящиеся на ранних стадиях Fas-опосредованного апоптоза. Иными словами, дискордантность экспрессии эпитопов CD95 может служить показателем зрелости и функциональной активности Fas-антигена.

Учитывая, в основном, идентичную экспрессию эпитопов CD95 на лимфоцитах крови больных ММ, мы сочли возможным объединить данные по IPO-4 и ICO-160 и разделить пациентов, в зависимости от экспрессии CD95, на две группы:

1) случаи с близкими к средним или несколько повышенными уровнями CD95+-клеток (не менее 20 % с любым из МКА к эпитопам CD95). Эта группа обозначена как CD95+;

2) случаи с явным снижением процента CD95+-клеток (менее 20 %), обозначены как CD95-.

В результате распределения к группе «CD95+» отнесены 43 пациента (23 мужчины, 20 женщин), к группе «CD95-» — 12 больных (4 мужчины, 8 женщин), которые не различались по возрасту: $56,4 \pm 1,9$ и $58,4 \pm 1,8$ лет, соответственно.

Эти две группы мы сопоставили по уровням экспрессии Т- и В-клеток, активированных клеток и лимфоцитов, экспрессирующих линейно не рестриктированные антигены в табл. 12.3.

По результатам анализа данных было обнаружено достоверное отличие двух групп по антигену CD38. Следовательно, низкие уровни Fas/Apo-1-позитивных лимфоцитов крови у больных ММ ассоциированы с достоверно более низкими уровнями CD38-позитивных лимфоцитов. Это наблюдение является важным по двум аспектам. Во-первых, оба маркера могут быть представлены на плазматических клетках, более того, выраженная экспрессия CD38 является достаточно специфичной для плазмочитов [Барышников А. Ю. с соавт., 1989]. Во-вторых, оба маркера (CD95 и CD38) считаются активационными антигенами, однако спектр их экспрессии, в отличие от спектра истинных активационных антигенов, является значительно более широким и включает не только активированные лимфоциты, но и часть покоящихся Т- и В-клеток.

Полученные данные свидетельствуют о существовании определенной взаимосвязи между содержанием CD95-позитивных лимфоцитов в крови больных ММ и субпопуляциями иммунокомпетентных клеток. В первую очередь это касается Т-хелперных клеток (CD4+), количество которых в случаях явного снижения CD95+-лимфоцитов является достоверно более низким, чем при умеренном и повышенном содержании CD95+-лимфоцитов. Возможно, именно с дисбалансом Т-хелперных клеток связано и уменьшение CD38-фракции в CD95-негативных случаях. Это тем более вероятно, поскольку различий в количестве В-лимфоцитов ни по одному из изученных маркеров (CD19, CD20, CD21, CD22), в зависимости от экспрессии CD95, нами не установлено (по этим причинам несколько повышенную экспрессию мембранных легких цепей Ig нельзя принимать во внимание, так как она может быть обусловлена неспецифической сорбцией за счет Fc-рецептора). Снижение уровней CD11b-позитивных лимфоцитов при низких уровнях CD95, по-видимому, следует объяснять не за счет дисбаланса Т-клеток (обычно CD11b более свойствен CD8 лимфоцитам), а за счет НК-клеточных популяций, которым также присущ этот антиген.

Таблица 12.3

Средние значения экспрессии дифференцировочных антигенов в группах, при пороговых значениях антигена CD95 больше и меньше 20 %

Антиген	Группа CD95+ (>20 % CD95+- лимфоцитов), %	Группа CD95- (<20 % CD95+- лимфоцитов), %	Достоверность отличия
CD95	38,22 ± 1,9	9,79 ± 1,3	$t = 2,08; p < 0,05$
CD38	41,07 ± 4,6	22,67 ± 7,0	
HLA-DR	20,63 ± 3,3	18,72 ± 4,4	$t = 0,28; p > 0,05$
CD3	71,09 ± 3,5	63,89 ± 5,5	$t = 1,05; p > 0,05$
CD4	37,02 ± 2,9	21,39 ± 4,1	$t = 2,88; p < 0,05$
CD8	34,53 ± 2,4	38,11 ± 5,8	$t = 0,68; p > 0,05$
CD5	69,94 ± 2,8	46,35 ± 13,7	$t = 2,94; p < 0,05$
CD25	19,48 ± 2,4	19,73 ± 1,7	$t = 0,04; p > 0,05$
CD11b	37,26 ± 3,5	13,54 ± 2,4	$t = 3,34; p < 0,01$
CD71	18,36 ± 2,5	28,93 ± 15,7	$t = 1,26; p > 0,05$
CD18	74,28 ± 5,7	44,3 ± 9,9	$t = 2,35; p < 0,05$
CD19	5,10 ± 2,3	11,46 ± 2,9	$t = 1,72; p > 0,05$
CD20	19,3 ± 4,23	12,4 ± 4,3	$t = 0,66; p > 0,05$
CD22	21,24 ± 3,6	14,64 ± 3,9	$t = 1,21; p > 0,05$
CD24	23,4 ± 8,1	18,2 ± 6,5	$t = 1,11; p > 0,05$
CD50	68,15 ± 5,0	92,2 ± 5,3	$t = 1,52; p > 0,05$
λ-цепь Ig	24,85 ± 3,6	10,81 ± 3,3	$t = 2,59; p < 0,05$
κ-цепь Ig	36,39 ± 3,4	15,76 ± 4,3	$t = 3,67; p < 0,01$
IgM	16,41 ± 2,2	14,9 ± 9,5	$t = 0,25; p > 0,05$
IgG	17,88 ± 5,8	16,6 ± 7,9	$t = 0,1; p > 0,05$

Деплеция клеток, экспрессирующих CD18 в случаях снижения CD95-лимфоцитов, трудно объяснима. По существу, этот общелейкоцитарный антиген был экспрессирован в среднем лишь на 44 % лимфоцитов крови у больных, дефицитных по экспрессии CD95. Можно предполагать, что взаимодействие CD95 с естественным лигандом ведет к избирательному нарушению биосинтетических процессов в клетке, и одним из наиболее уязвимых маркеров является CD18. Сказанное, по-видимому, справедливо не только для CD18, так как для большинства изученных нами антигенов,

взаимосвязанных с CD95, отмечено снижение экспрессии по мере уменьшения количества CD95-лимфоцитов.

Лишь один маркер находился в реципрокных взаимоотношениях с CD95 — это pgp170. При низких уровнях CD95+-лимфоцитов отмечена повышенная экспрессия pgp170. Подобное наблюдение не является неожиданным, так как хорошо известно, что приобретение клеткой резистентности к химиопрепаратам сопровождается утратой CD95 и потерей механизма индукции Fas-опосредованного апоптоза. Это положение справедливо и в отношении миеломных клеток, что уместно отметить, так данная глава посвящена ММ.

§ 12.2. Экспрессия эпитопов CD95 на лимфоидных клетках костного мозга больных ММ

Аналогичные исследования по сопоставлению экспрессии эпитопов IPO-4 и ICO-160 молекулы CD95 проведены нами на лимфоцитах костного мозга больных ММ. Экспрессия Fas/Apo-1 изучена на клетках 38 больных (IPO-4—27, ICO-160—35, одновременно оба маркера — на клетках 27 человек).

Наряду с экспрессией CD95, подробно изучен иммунологический фенотип субпопуляций лимфоидных клеток костного мозга. Внимание обращено на существование корреляций в экспрессии CD95 с другими иммунологическими маркерами (табл. 12.4).

Можно отметить, что экспрессия антигена CD95 (при этом анализе взят максимальный из показателей IPO-4 или ICO-160) на клетках костного мозга не коррелировала с маркерами лимфоидной или Т- и В-линейной принадлежности клеток. Напротив, достоверные корреляционные связи отмечены с маркерами, представленными на ранних предшественниках и активированных клетках (HLA-DR, CD38) или только на ранних гемопоэтических предшественниках (CD34). Подобные ассоциации лишней раз подтверждают уникальный характер экспрессии CD95, не связанный ни линейной коммитированностью, ни стадией дифференцировки клеток, и позволяют рассматривать его

Таблица 12.4

Экспрессия иммунологических маркеров на лимфоидных клетках
больных множественной миеломой

Маркер	Кол-во наблю- дений	Средний процент клеток $M \pm m$	Разброс показате- лей	Корреляция с CD95
CD95 (ICO-160)	35	$23,3 \pm 16,9$	0,1–70,9	$R = 0,53; p = 0,05$ $R = 0,92; p < 0,01$
CD95 (IPO-4)	27	$23 \pm 15,3$	0,3–65	
CD38	14	$40,8 \pm 7,6$	0,2–79,5	
CD34	7	$18,7 \pm 5,1$	3,8–42	
CD71	3	$43,5 \pm 13,6$	21,9–57,1	—
Pgp170	15	$9,8 \pm 2,7$	0,1–31	—
CD3	6	$57,3 \pm 3,7$	40,7–66,7	—
CD4	5	$17,8 \pm 2,2$	10–22,2	—
CD8	5	$44,8 \pm 11,5$	22–89,1	—
CD18	12	$69,6 \pm 19,6$	7,7–84,5	—
CD25	4	$19,2 \pm 10,4$	2,3–45,8	—
HLA-DR	7	$36,4 \pm 7,7$	0,1–73,1	$R = 0,82; p < 0,05$
CD11b	12	$29,1 \pm 4,8$	7,1–56,7	—
CD20	5	$26,8 \pm 8,3$	1,5–48,8	—
sIgM	4	$31 \pm 10,4$	1,2–49,1	—
sIgG	4	$15,8 \pm 7,2$	2,2–35,4	—
sIgK	5	$27,9 \pm 10,5$	6,2–60,1	—
sIgλ	5	$16,3 \pm 9,4$	0,6–45,8	—
CD50	12	$29 \pm 6,8$	3,1–87,7	—

Примечание: «—» — отсутствие корреляционной связи, $p > 0,05$.

как функциональный маркер для широкого спектра клеточных типов.

Ассоциация экспрессии CD95 с молекулой CD38, по-видимо-
му, имеет при множественной миеломе особое значение, поскольку
известно, что выраженная экспрессия CD38 является весьма спе-
цифичным маркером плазматических клеток. Так, Harada Н. с со-
авторами (1993) указывали, что все миеломные клетки в костном
мозге определялись среди мононуклеаров в экспрессией CD38.

Среднее содержание IPO-4+-клеток в анализируемой группе составило $23,0 \pm 15,3 \%$ (диапазон 0,3–65 %), ICO-160 — $23,3 \pm 16,9 \%$ (диапазон 0,1–70,9 %). При сравнении средних по группе больных, обследованных с помощью двух антител одновременно, средние значения антиген-положительных лимфоцитов, установленные с помощью IPO-4 и ICO-160, составили 23 % и 26 %, соответственно. Различия $p > 0,05$.

Коэффициент корреляции между уровнями IPO-4+- и ICO-160+-лимфоцитов костного мозга был даже более высоким, чем аналогичный показатель периферической крови — $R = 0,853$ ($p = 0,000$).

Все это свидетельствует о практически полной идентичности данных, получаемых с помощью двух различных антител.

Применительно к изучению костного мозга для выявления случаев расхождения данных нами использован уровень различий в 15 %. Выявлены лишь 2 случая расхождений (7,1 %), что почти аналогично данным, полученным по периферической крови. В обоих случаях (как и в крови) преобладала экспрессия ICO-160: № 17 — 32 % и 16,7 %; № 32 — 70,9 % и 38 %. Интересно отметить, что у пациента № 17 преобладание уровней экспрессии эпитопа ICO-160 над эпитопом IPO-4 отмечено как на лимфоцитах крови, так и на клетках костного мозга. Эти данные представлены в табл. 12.5.

Следовательно, результаты сравнения МКА IPO-4 и ICO-160 свидетельствуют, что, как и при исследовании периферической крови, эти МКА являются взаимозаменяемыми не менее чем в 90 % случаев. Эти данные не позволяют исключить существование небольшой группы больных с дискордантной экспрессией эпитопов, что, возможно, отражает лимфоцитарную популяцию на ранних стадиях апоптоза.

Следующим этапом нашей работы явилось сопоставление данных, полученных при исследовании лимфоцитов периферической крови и лимфоцитов костного мозга. Взятие костного мозга и крови у больных осуществлялось в один и тот же день.

Сопоставление уровней экспрессии эпитопа ICO-160 на лимфоцитах крови и костного мозга проведено при параллельном

Таблица 12.5

Сопоставление уровней экспрессии эпитопов CD95 на клетках костного мозга больных множественной миеломой

Услов. номера исследованных больных	Экспрессия IPO-4	Экспрессия ICO-160	ICO-160 vs IPO-4
1	41,6	46,4	=
2	20,6	33,9	=
3	30,1	29,3	=
5	40,9	45,9	=
6	22,8	18,6	=
7	45,0	38,4	=
8	22,0	29,0	=
9	20,0	15,6	=
10	21,0	31,4	=
11	31,3	25,1	=
12	20,5	31,2	=
13	15,6	12,7	=
14	35,1	30,1	=
15	65,0	67,0	=
16	11,9	10,7	=
17	16,7	32,0	↑
18	0,3	0,7	=
19	24,1	12,0	=
20	33,5	35,5	=
21	13,9	16,1	=
22	29,4	24,7	=
23	14,5	17,9	=
24	7,1	9,2	=
32	38,0	70,9	↑
33	1,9	2,7	=
34	5,4	6,1	=
35	9,6	20,6	=

исследовании клеток у 29 больных. В этой выборке процент ICO-160+-лимфоцитов крови ($29,4 \pm 15,9$) существенно преобладал над содержанием аналогичных клеток в костном мозге ($24,1 \pm 15,0$),

$p = 0,04$. При этом количество ICO-160+-лимфоцитов крови достоверно коррелировало с аналогичными параметрами клеток костного мозга: $R = 0,62$; $p = 0,000$.

Сходные данные получены у 26 больных и для эпитопа IPO-4. Количество этих клеток в крови ($30,8 \% \pm 14,8 \%$) было достоверно более высоким, чем в костном мозге ($22,4 \% \pm 15,3 \%$), $p = 0,008$. Отмечена достоверная корреляция в содержании IPO-4+-клеток крови и костного мозга: $R = 0,502$; $p = 0,009$.

Полученные на основании исследований данные позволяют сделать некоторые обобщения.

— МКА к эпитопам CD95 (ICO-160, IPO-4) являются взаимозаменяемыми при исследовании лимфоцитов крови и костного мозга больных ММ, так как проценты клеток по указанным антигенам не различаются, и оба показателя высоко коррелируют.

— Содержание CD95+-лимфоцитов крови и костного мозга взаимосвязано, что подтверждается достоверной корреляцией по обоим эпитопам.

— Количество CD95+-клеток крови достоверно выше, чем количество CD95+-клеток костного мозга (по обоим эпитопам).

Полученные данные не позволяют исключить существование у небольшого числа больных ММ (менее 10 %) субпопуляции лимфоцитов с фенотипом IPO-4-ICO-160+, находящейся, возможно, на ранних стадиях Fas-опосредованного апоптоза.

Нами предпринята попытка сравнения уровней экспрессии различных дифференцировочных антигенов в зависимости от содержания CD95 клеток в костном мозге (использовали уровень эпитопа, выявляющегося на большем числе лимфоцитов). Сравнили группу с низким количеством CD95 клеток (менее 20 %, условно — CD95-) и группу с умеренным/повышенным содержанием CD95 клеток (20 % и более, условно — CD95+). В CD95+-подгруппе было 20 пациентов (13 мужчин, 7 женщин); в подгруппе CD95- было 15 больных (5 мужчин, 10 женщин). Группы CD95+ и CD95- не различались по возрасту: $54,7 \pm 2,6$ и 56 ± 10 , соответственно. Антиген CD95 в CD95+-подгруппе был экспрессирован на $35,8 \pm 3 \%$ клеток, а в CD95--подгруппе — на $9,4 \pm 1,5 \%$ клеток.

Отмечено достоверное преобладание CD38+-лимфоцитов в CD95+-группе: $55,9 \pm 6,2 \%$ и $20,6 \pm 11,5 \%$, соответственно ($t = 2,9$; $p < 0,02$).

Достоверных различий в содержании HLA-DR+-клеток в CD95+- и CD95--группах не установлено: $48,3 \pm 14,4 \%$ и $27,5 \pm 6,6 \%$ ($p > 0,05$).

Для ряда других маркеров (CD3, CD4, CD8, CD25, CD11b, CD20, CD50, sIgG, sIgM, sIgK, sIgλ) группы сравнения были крайне малочисленными, что не позволяло провести статистический анализ. Этот вопрос нуждается в дополнительном изучении на большем числе больных.

§ 12.3. Экспрессия антигена CD95 на злокачественных плазматических клетках больных множественной миеломой

При проведении исследований роли молекулы CD95 при ММ нами было обращено внимание не только на экспрессию антигена на лимфоидных клетках крови и костного мозга больных, но и на обнаружение антигена на злокачественных плазматических клетках.

Поскольку в большинстве изученных нами случаев ММ уровни экспрессии CD95 на клетках костного мозга равнялись в среднем 23 % (вне зависимости от типа использованных МКА IPO-4 или ICO-160), то даже при достаточно высоком содержании плазмоцитов в костном мозге (вплоть до 20 %) было сложно однозначно сказать, экспрессирован ли рецептор Fas/APO-1 на лимфоидных или на собственно плазматических клетках. Корреляция между уровнями CD95+-клеток и процентом плазмоцитов в костном мозге отсутствовала: для IPO-4 — $R = -0,068$, $p = 0,86$; для ICO-160 — $R = 0,026$, $p = 0,94$. При попарном сравнении процентного содержания CD95+-клеток и плазмоцитов в костном мозге также не получено достоверных различий: для IPO-4 — $p = 0,46$; для IPO-160 — $p = 0,39$. Эти данные еще раз иллюстрируют сложности

Таблица 12.6

Экспрессия эпитопов CD95 злокачественных плазматических клетках
костного мозга больных множественной миеломой

Условные номера исследованных больных	Процент плазмоби- тов	Процент ICO-160+- клеток	Процент IPO-4+- клеток	Процент CD95 vs процент плазмацитов
1	50	46,4	41,6	=
5	41,6	45,9	40,9	=
6	74	18,6	22,8	↓
8	80	29	22	↓
17	50,6	32	16,7	↓
27	42,2	0,1	н. о.	↓

Обозначения: ↓ — снижение процента CD95+-клеток в сравнении с процентом плазмацитов в костном мозге; = — примерно равные количества указанных типов клеток; н. о. — не определяли.

исследования иммунофенотипа злокачественных плазматических клеток, необходимость использования двух- и трехцветного флуоресцентного анализа для точной констатации экспрессии CD95 на опухолевом клеточном субстрате при множественной миеломе.

Вместе с тем, именно факт наличия или отсутствия CD95 на злокачественных плазмацитах приобретает первостепенное значение. Ответ на этот вопрос даже более важен, чем анализ CD95 как активационного маркера лимфоидных клеток при множественной миеломе.

В связи с изложенным, мы изучили уровни CD95 на клетках костного мозга в тех случаях, когда большинство клеток в лимфоидном гейте было представлено плазмацитами. У этих больных (6 наблюдений, табл. 12.6) процент плазматических клеток в костном мозге по данным миелограммы был выше 40 %.

Глава 13

CD95(Fas/APO-1)-опосредованный апоптоз при соматических заболеваниях человека

Накопившиеся за последние годы новые данные о биологии жизни и смерти клеток показали, что нарушения в регуляции этих процессов являются патогенезом многих заболеваний человека, включая рак, вирусные инфекции, аутоиммунные нарушения, нейродегенеративные заболевания и СПИД.

Различные факторы могут быть ингибиторами или индукторами апоптоза (табл. 13.1 и 13.2). В организме они могут или усиливать пролиферацию клеток, или индуцировать апоптоз, создавая тем самым определенную симптоматику заболевания.

Целый ряд заболеваний ассоциирован с ингибцией апоптоза и, напротив, ряд заболеваний ассоциирован с повышением апоптоза (табл. 13.3 и 13.4).

В этой главе рассмотрим влияние CD95(Fas/APO-1)-антигена при некоторых заболеваниях.

§ 13.1. Экспрессия и функция CD95(Fas/APO-1)-опосредованного апоптоза при СПИДе

Синдром приобретенного иммунодефицита, индуцированного вирусом человеческого иммунодефицита 1 типа (HIV-1), характеризуется прогрессивной утратой CD4+-Т-лимфоцитов [Levy J., 1993]. Клеточная делеция может быть вызвана прямыми или непрямыми механизмами, индуцированными этим вирусом [Ho D. D.

et. al., 1995; Wei K. et. al., 1995]. Было обнаружено повышение апоптоза как в инфицированных, так и в неинфицированных клетках от больных СПИДом [Gougeon M. L., 1995; Finkel T. H. et. al., 1995; McCloskey T. W. et. al., 1995; Oyaizu N. et. al., 1995]. Это подтверждает, что непрямой механизм вовлечен в апоптоз, так как количество HIV-1-инфицированных клеток в периферической крови и в лимфоидных органах невелико и недостаточно для массивной потери Т-лимфоцитов у больных СПИДом [Gougeon M. L., 1995; Finkel T. H. et. al., 1995]. У взрослых и детей больных СПИДом повышена экспрессия CD95(Fas/APO-1)-антигена [Lu Y. Y. et. al., 1994; Katsikis P. D. et. al., 1995; Estaquier J. et. al., 1995; Debatin K. M. et. al., 1994; Aries S. P. et. al., 1995; Silvestris F. et. al., 1996]. Экспрессия CD95(Fas/APO-1)-антигена на CD4+-лимфоцитах больных СПИДом повышается с прогрессированием заболевания [Aries S. P. et. al., 1995; Gehri R. et. al., 1996]. У HIV-положительных больных $85,8 \pm 14,9\%$ CD4+-

Таблица 13.1

Ингибиторы апоптоза

Физиологические ингибиторы	Вирусные гены	Фармакологические агенты
1. Факторы роста	1. Аденовирус E1B	1. Ингибиторы калпаина
2. Внеклеточный матрикс	2. Бакуловирус p35	2. Ингибиторы цистеин-протеазы
3. Лиганд CD40	3. Бакуловирус IAP	3. Опухолевые промотеры
4. Нейтральные аминокислоты	4. Соврох вирус cgmA	4. РМА
5. Цинк	5. Вирус Эпштейн-Барр <i>BHRF1</i> , <i>LMP-1</i>	5. Фенобарбитал
6. Эстроген	6. Вирус лихорадки африканских свиней <i>LMWS-HL</i>	6. α -гексахлор-циклогексан
7. Андрогены	7. Герпесвирус ul 34.5	

Таблица 13.2

Индукторы апоптоза

Физиологические активаторы	<ol style="list-style-type: none"> 1. Семейство TNF Fas-лиганд TNF 2. Бета-трансформирующий фактор роста 3. Нейромедиаторы: Глутамат Допамин N-метил-D-аспартат 4. Удаление факторов роста 5. Утрата связи с матриксом 6. Кальций 7. Глюкокортикоиды
Повреждающие индукторы	<ol style="list-style-type: none"> 1. Тепловой шок 2. Вирусные инфекции 3. Бактериальные токсины 4. Онкогены <i>myc, rel, E1A</i> 5. Опухолевый супрессор <i>p-53</i> 6. Цитолитические Т-клетки 7. Оксиданты 8. Свободные радикалы 9. Антиметаболиты
Терапевтические агенты	<ol style="list-style-type: none"> 1. Химиотерапевтические агенты: цисплатин, доксорубин, блеомицин, цитозин, арабинозид, метотрексат, винкристин 2. γ-облучение 3. Ультрафиолетовое облучение
Токсины	<ol style="list-style-type: none"> 1. Этанол 2. β-амилоидные пептиды

клеток экспрессировали CD95(Fas/APO-1)-антиген по сравнению с $64,2 \pm 7,6 \%$ в HIV-отрицательной группе [Aries S. P. et. al., 1995].

С. В. Baumler и соавт. (1996) высказали гипотезу, что инфекция HIV-1 вызывает нарушение регуляции CD95/CD95L системы, приводящее к прогрессированию заболевания. В подтверждение этой гипотезы авторы продемонстрировали сильное

Таблица 13.3

Заболевания, ассоциированные с доказанной ингибцией апоптоза

1. Опухоли:	<ul style="list-style-type: none"> — фолликулярная лимфома; — карциномы с мутацией p-53; — гормоно-зависимые опухоли: рак молочной железы; рак простаты; рак яичника.
2. Аутоиммунные заболевания:	<ul style="list-style-type: none"> — системная красная волчанка; — аутоиммунный гломерулонефрит.
3. Вирусные инфекции:	<ul style="list-style-type: none"> — вирус герпеса; — вирусы осповакцины; — аденовирусные инфекции.

Таблица 13.4

Болезни, ассоциированные с доказанным повышением апоптоза

1. СПИД	
2. Нейродегенеративные заболевания:	<ul style="list-style-type: none"> — болезнь Альцгеймера; — болезнь Паркинсона; — боковой амиотрофический склероз; — мозжечковая дегенерация.
3. Мислодиспластические синдромы	
4. Апластическая анемия	
5. Ишемические повреждения:	<ul style="list-style-type: none"> — инфаркт миокарда; — релерфузионные повреждения
6. Индуцированные токсинами повреждения печени:	— алкоголь.

повышение CD95(Fas/APO-1)-экспрессии на Т-клетках детей, инфицированных HIV-1 [Debatin K. M. et. al., 1994]. В дополнение, эти исследователи показали, что HIV-1 Tat повышает опосредованную CD95 TcR-триггерную активационно-индуцированную

клеточную смерть путем повышения экспрессии Fas-лиганда [Westendorp M. O. et al., 1995]. Экспрессия CD95(Fas/APO-1)-антигена у больных СПИДом повышена как на CD45RO+-клетках памяти, так и на наивных CD45RA+-Т-клетках. Экспрессия CD95(Fas/APO-1)-антигена была повышена на CD4- и CD8+-клетках по сравнению со здоровыми детьми. У больных СПИДом детей был повышен спонтанный апоптоз в CD4+- и CD8+-клетках. В CD8+-клетках спонтанный апоптоз был выше, чем в CD4+-клетках. Добавление в культуру клеток интерлейкина-2 уменьшало спонтанный апоптоз, преимущественно в CD8+-клетках. Апоптоз, индуцированный МКА против CD95(Fas/APO-1)-антигена, был выше в CD4+- и CD8+-клетках больных СПИДом по сравнению со здоровыми детьми. Интерлейкин-2 не влиял на CD95-опосредованный апоптоз. ТсR-индуцированный апоптоз с помощью МКА анти-CD3 также был выше у больных по сравнению с нормой. Эта форма апоптоза сильнее проявлялась в CD8+-клетках по сравнению с CD4+-лимфоцитами. Фрагменты МКА против CD95(Fas/APO-1)-антигена ингибировали анти-CD3 индуцированный апоптоз. Это показывает роль CD95(Fas/APO-1)-рецептора в индукции ТсR-опосредованного апоптоза у больных СПИД. Наконец, в Т-клетках детей, больных СПИДом, обнаружили повышенный уровень мРНК Fas-лиганда [Baumler C. B. et al., 1996].

У серопозитивных лиц повышена экспрессия Fas-лиганда в CD4+-клетках, а инфицирование Т-клеток вирусом ВИЧ *in vitro* повышает экспрессию Fas-лиганда на CD4+-Т-клетках [Mitra D. et al., 1996].

§ 13.2. Роль CD95(Fas/APO-1)-рецептора при аутоиммунных заболеваниях

Общим признаком аутоиммунных заболеваний человека является дисбаланс между продукцией и дезрегуляцией различных типов клеток иммунной системы, включая лимфоциты при системной красной волчанке, синовиальные клетки при ревматоидном артрите, фибробласты при склеродермии [Mounitz J. D. et al., 1994].

Предполагают, что в основе развития аутоиммунных заболеваний лежит нарушение функции CD95(Fas/APO-1)-молекулы и ее лиганда [Singer G. G. et. al., 1994; Sobel E. S., 1996; Mountz J. D. et. al., 1996]. Поликлональная активация В-клеток и продукция антител против различных аутоантигенов является признаком системной красной волчанки. Аутореактивные В-клетки также обнаруживаются у здоровых людей, но в ограниченном количестве. Они погибают от апоптоза в отсутствие пролиферативного стимула. Постулируется, что у больных системной красной волчанкой в результате дисфункции апоптоза накапливаются аутореактивные В-клетки, вследствие чего уровень аутоантител достигает патологического уровня [Rose L. M. et. al., 1994; Ohsako S. et. al., 1994; Mysler E. et. al., 1994]. R. Watanabe-Fukunaga и соавт. (1992) продемонстрировали утрату функции Fas/APO-1 у мышей с лимфопролиферативным заболеванием. lpr/lpr-дефект, который похож у людей на системную красную волчанку, характеризуется аберрантным накоплением CD4--CD8--Т-клеток в периферических лимфатических узлах и продукцией широкого спектра аутоантител. Описано два типа генетических мутаций в Fas/APO-1, которые появляются у мышей lpr. Мыши, экспрессирующие lpr-дефект, имеют нефункциональный поверхностный Fas/APO-1, появляющийся после единственной точечной мутации, а мыши lpr/lpr вообще не имеют на поверхности клеток Fas/APO-1-антиген [Watanabe-Fukunaga R. et. al., 1992]. Предполагается, что утрата лиганда Fas/APO-1 у мышей gld также лежит в основе патогенеза развития генерализованного лимфопролиферативного заболевания [Allen R. D. et. al., 1990]. В настоящее время еще не описаны дефекты генов Fas/APO-1 и его лиганда у человека.

При различных аутоиммунных заболеваниях обнаруживается растворимая форма CD95(Fas/APO-1)-рецептора [Goel N. et. al., 1995]. Обнаружено, что у больных системной красной волчанкой растворимый Fas/APO-1-рецептор утрачивает интрацеллюлярные и трансмембранные области [Cheng J. et. al., 1994]. Этот растворимый белок конкурирует с мембранно-локализованным рецептором CD95(Fas/APO-1) в связывании лиганда и может ингибировать CD95(Fas/APO-1)-опосредованный апоптоз *in vitro*. Некоторые

авторы предполагают, что подъем уровня растворимого CD95(Fas/APO-1) может поэтому играть роль в патогенезе системной красной волчанки и других аутоиммунных заболеваний [Elken K. V., 1994; Mountz J. D. et. al., 1994]. Однако это повышение сывороточного уровня CD95(Fas/APO-1)-рецептора неспецифично для системной красной волчанки или ревматоидного артрита [Knipring E. et. al., 1995]. Повышение сывороточного уровня растворимого CD95(Fas/APO-1)-рецептора обнаружено также при определенных В- и Т-клеточных лейкозах. Эти и другие находки указывают на то, что растворимый CD95(Fas/APO-1)-белок может быть вовлечен в патогенез аутоиммунных нарушений, а также на ускользание от иммунологического надзора и развитие опухолей [Sculze-Osthoff K., 1994]. Однако N. Goel и соавт. (1995) показали, что растворимая форма CD95(Fas/APO-1)-рецептора не имеет никакого клинического значения и не играет роли в патогенезе аутоиммунных заболеваний.

Нарушение CD95(Fas/APO-1)-опосредованного апоптоза обнаружено при синдроме Сапае-Smith [Drappa J. et. al., 1996]. Это детское заболевание характеризуется лимфоаденопатией и аутоиммунитетом. Симптоматика этого заболевания похожа на лимфо-пролиферативную болезнь мышей gld. Больные дети имели в периферической крови повышенное содержание двойных негативных клеток (> 20 %) и ослабление Fas-опосредованного апоптоза в активированных Т-клетках. У этих больных выявили три новые Fas-мутации. У большинства больных развились различные опухоли.

Подъем уровня CD95(Fas/APO-1)-антигена и Fas-лиганда обнаружен в мозге больных множественным склерозом [Dowling P. et. al., 1996].

У больных системной красной волчанкой повышена экспрессия CD95(Fas/APO-1)-антигена на CD4⁺ и CD8⁺-лимфоцитах по сравнению со здоровыми донорами и больными ревматоидным артритом [Amasaki Y. et. al., 1995; Suzuki N., Sakane T., 1996]. Усиление плотности экспрессии антигена было в CD45RO⁺-Т-клетках памяти от больных системной красной волчанкой. У этих же больных была повышена экспрессия CD95(Fas/APO-1)-антигена на наивных CD45RO⁻-Т-клетках. CD4⁺CD45RO⁻-Т-клетки этих

пациентов коэкспрессировали ранние промежуточные активационные антигены CD25 и CD71 и поздний активационный антиген HLA-DR. Такая повышенная регуляция экспрессии Fas-антигена имеет клиническое значение, т. е. средняя интенсивность флюоресценции антигена на CD4+-Т-субпопуляции лимфоцитов обратно коррелировала с абсолютным количеством CD4+4--популяции в периферической крови больных. Эти результаты подтверждают, что Т-клетки с повышенной экспрессией CD95(Fas/APO-1)-антигена могут быть высокочувствительными к апоптозу, что может быть возможным механизмом развития лимфопении у больных системной красной волчанкой. На лимфоцитах больных системной красной волчанкой повышена экспрессия Fas-лиганда, а в сыворотке определяются аутоантитела к Fas-лиганду [Suzuki N., Sakane T., 1996].

CD95(Fas/APO-1)-антиген обнаружен в коже у больных системной красной волчанкой и atopическими дерматитами [Oishi M. et. al., 1994].

Уровень CD95(Fas/APO-1)-антигена повышен у больных общим переменным иммунодефицитом в 4,5–250 раз. Молекула CD38, очень важная для предотвращения апоптоза В-клеток зародышевых центров отсутствовала на В-клетках этих больных. Наблюдался повышенный спонтанный апоптоз в В-клетках (23 %) и Т-клетках (10 %) по сравнению со здоровыми людьми (13 и 3 % соответственно) [Saxon A. et. al., 1995].

§ 13.3. Экспрессия CD95(Fas/APO-1)-рецептора при инфекциях

Функцию уничтожения инфицированных клеток осуществляют CD8+4-Т-лимфоциты. После выздоровления организма от инфекции CD8+4-клетки должны погибнуть, так как они могут поражать собственные клетки. Постулируют, что погибают они по механизму апоптоза [Bortwick N. I. et. al., 1996]. Периферические CD8+-Т-лимфоциты от больных с острой вирусной инфекцией становятся высокочувствительными к апоптозу после кратковременного культивирования *in vitro*. Этот спонтанный апоптоз

устранялся интерлейкином-2 и был связан со снижением экспрессии *Bcl-2*.

Fas-APO-1-рецептор интенсивно экспрессирован на различных инфицированных клетках, таких, как EBV-инфицированных В-клетках или HTLV-1-трансформированных Т-клетках [Debatin K. M. et. al., 1990; Falk M. H. et. al., 1992]. Индуцированный Fas/APO-1 апоптоз в течение вирусной инфекции может служить как защитный механизм элиминации вирус-инфицированных клеток.

Экспрессия CD95(Fas/APO-1)-антигена повышается на клетках кожи при различных заболеваниях, включая эритему, контактный дерматит, опоясывающий лишай и др. [Sayamia K. et. al., 1994].

Повышенную экспрессию CD95(Fas/APO-1)-антигена обнаружили на гепатоцитах больных хроническим гепатитом [Mochimuki K. et. al., 1996]. Полагают, что инфицированные вирусом гепатита В-клетки элиминируются цитотоксическими Т-лимфоцитами, экспрессирующими Fas-лиганд. CD95-опосредованный апоптоз вовлечен в апоптоз гепатоцитов, поврежденных алкоголем [Galle P. R. et. al., 1995].

На лимфоцитах больных, серопозитивных для цитомегаловируса и вируса герпеса, значительно повышается экспрессия CD95(Fas/APO-1)-антигена на CD45RO+-популяции лимфоцитов после культивирования мононуклеаров крови с этими вирусами [Ito M. et. al., 1995]. Наоборот, экспрессия *Bcl-2* снижалась. МКА против CD95(Fas/APO-1)-антигена индуцировали в этих клетках апоптоз.

В сыворотке инфекционных больных обнаружен повышенный уровень растворимого CD95(Fas/APO-1)-антигена [Munker P. et. al., 1996].

§ 13.4. Экспрессия CD95(Fas/APO-1)-антигена при других заболеваниях

Экспрессия CD95(Fas/APO-1)-антигена исследовалась при различных соматических заболеваниях. Takemura T. и соавт. (1995) изучали экспрессию антигена CD95(Fas/APO-1) и *Bcl-2* при

гломерулонефрите. Они сравнили 5 образцов нормальной почки с образцами 80 тканей от больных с различными типами гломерулонефрита. С помощью реакции иммунофлюоресценции смогли обнаружить экспрессию антигена в гломерулах. При гломерулонефрите экспрессия CD95(Fas/APO-1)-антигена повышалась. Методом двойного окрашивания показали, что антиген экспрессировали мезателиальные клетки и инфильтрирующие лейкоциты. Гибридизацией *in situ* обнаружили в гломерулах мРНК *Bcl-2*. Одновременно с экспрессией CD95(Fas/APO-1)-антигена обнаружили фрагментацию ДНК в интрагломерулярных клетках. Электронной микроскопией показали наличие апоптотических телец. Таким образом, это исследование показало, что CD95(Fas/APO-1)-антиген и *Bcl-2* регулируют некоторые типы заболеваний почки у человека.

Y. Matsumoto и соавт. (1995) исследовали CD95(Fas/APO-1)-апоптоз при хронической почечной недостаточности. Хроническая почечная недостаточность обычно осложняется лимфопенией. Авторы высказали гипотезу, что лимфопения у этих больных является результатом апоптоза Т-клеток *in vivo*. Они анализировали экспрессию Fas-антигена у уремичных больных с гемодиализом и без диализа. Т-клетки от уремичных больных значительно больше экспрессировали Fas-антиген, чем Т-клетки здоровых людей. Более того, Т-клетки подвергались усиленному апоптозу при культивировании *in vitro*, что коррелировало с экспрессией CD95(Fas/APO-1)-антигена.

Длительное время считалось, что такие высоко и окончательно дифференцированные клетки, как кардиомиоциты, не подвержены апоптозу, и лишь в последние годы в экспериментальных работах было показано, что такие факторы, как гипоксия, ишемия, перегрузка клетки кальцием, воспаление и токсическое действие, могут инициировать апоптоз кардиомиоцитов. CD95(Fas/APO-1)-антиген был обнаружен в человеческом миокарде. Около 1–2 % миоцитов экспрессировали антиген. У больных острым инфарктом миокарда обнаружены клетки с фрагментированной ДНК, свидетельствующие о процессе апоптоза. В центре пораженной ткани выявлялись все признаки некроза, тогда как по периферии — апоптоза. Роль апоптоза в развитии острого инфаркта миокарда

предстоит еще выяснить. Хотя, экстраполируя данные по перевиваемым клеточным линиям, можно предполагать, что хроническая гипоксия может делать миокард чувствительным к апоптотическим сигналам, возможно, даже с участием Fas-опосредованного апоптоза. Возможно, апоптоз вовлечен в развитие идиопатической дилатационной миокардиопатии [Liu Y. et. al., 1995]. В экспериментах на собаках показали, что на 1 миллион миоцитов 11 000 клеток находятся в апоптозе. Столько же миоцитов экспрессирует Fas-антиген.

CD95(Fas/APO-1)-антиген постоянно экспрессирован в сингенных и аллогенных мышинных трансплантатах сердца. Fas-лиганд регулировал апоптоз только в аллотрансплантатах. Однако в отсутствии пути Fas/FasL темпы отторжения трансплантата не изменялись. Это показывает, что Fas/FasL-взаимодействие не является незаменимым при отторжении трансплантата [Larsen C. P. et. al., 1995].

Вероятно, CD95(Fas/APO-1)-опосредованный апоптоз вовлечен в патогенез инсулин-зависимого диабета. С. Giordano и соавт. (1995) изучали экспрессию CD95(Fas/APO-1)-антигена на лимфоцитах периферической крови больных сахарным диабетом. Они обнаружили значительное снижение экспрессии антигена на лимфоцитах ($p < 0,001$) у вновь диагностированных больных, долго болеющих больных и лиц с высоким риском заболевания диабетом. Моноциты этих больных экспрессировали нормальный уровень антигена. Ослабление экспрессии касалось CD3+CD4+-клеток и CD3+CD8+-лимфоцитов. Более того, после активации лимфоцитов периферической крови МКА анти-CD3, экспрессия CD95(Fas/APO-1)-антигена была значительно снижена по сравнению с экспрессией здоровых доноров. Авторы высказали гипотезу, что дефектная экспрессия CD95(Fas/APO-1)-антигена ослабляет способность аутореактивных лимфоцитов подвергаться CD95-опосредованному апоптозу, что приводит к утрате контроля за Т-и В-клеточными клонами, специфичными для β -клеток.

CD95(Fas/APO-1)-опосредованный апоптоз вовлечен в различные заболевания печени [Galle P. R. et. al., 1995]. МКА против CD95(Fas/APO-1)-антигена индуцируют апоптоз в 95 % свежее-

золированных гепатоцитов через 4–7,5 ч после начала индукции. Иммуногистохимически показали, что ткани нормальной печени и при алкогольном циррозе экспрессировали низкий уровень Fas-антигена. Высокий уровень экспрессии выявлен при циррозе, связанным с вирусом гепатита В и при острых поражениях печени. Fas-лиганд отсутствовал в нормальной печени, но появлялся при различных ее поражениях [Gale P. R. et. al., 1995].

CD95(Fas/APO-1)-антиген обнаружен на синовиоцитах при ревматоидном артрите [Nakjima T. et. al., 1995; Asahara H. et. al., 1996]. МКА против Fas-антигена индуцируют апоптоз в синовиальных клетках от больных ревматоидным артритом. В синовиальной ткани Fas-лиганд экспрессирован на лимфоцитах с фенотипом: CD45RO, CD4, CD8 или CD56, т. е. на Т-хелперах, цитотоксических Т-клетках и NK-клетках. Эти клетки способны индуцировать апоптоз в Fas-положительных синовиальных клетках, количество которых у больных ревматоидным артритом колеблется от 10 до 30 % [Asahara H. et. al., 1996].

CD95(Fas/APO-1)-опосредованный апоптоз вовлечен в патогенез язвенного колита [Iwamoto M. et. al., 1996]. Язвенный колит характеризуется утратой эпителия и воспалением в ламина propria. В нормальной кишке эпителиальные клетки элиминируются путем апоптоза посредством Fas/FasL-взаимодействия. При язвенном колите усилен процесс Fas-опосредованного апоптоза. Среди клеток желудочно-кишечного тракта только клетки Paneth экспрессируют Fas-лиганд. Полагают, что секретируемый этими клетками Fas-лиганд индуцирует поражение слизистой при язвенном колите [Moller P. et. al., 1996].

Экспрессия и функция антигена CD95(Fas/APO-1) в солидных опухолях

Основная функция апоптоза в период возникновения опухоли — защита ткани от воздействия канцерогенного фактора путем уничтожения клеток, содержащих поврежденные ДНК [Фильченков А. А., Стойка Р. С., 1995; Владимирская Е. Б. с соавт. 1997], причем с помощью математической модели было рассчитано, что могут погибать до 80 % клеток [Schulte-Herman R. et al., 1997].

Многочисленными исследованиями показано, что CD95-антиген широко экспрессирован на опухолевых клетках как негемопоетической, так и гемопоетической природы, включая Т- и В-клеточные лейкозы и лимфомы [Владимирская Е. Б. с соавт. 1997; Фильченков А. А., 1998; Yonehara S. et al., 1994; Trauth B. C. et al., 1989; Miyawaki T. et al., 1992; Falk M. H. et al., 1992; Owen-Schaub L. B. et al., 1992; Debatin K. M. et al., 1990; Marpara M. Y. et al., 1993; Oishi M. et al., 1994], рабдомиосаркому [Yonehara S. et al., 1993], плоскоклеточную карциному желудка [Itoh N. et al., 1991], карциному толстой кишки [Yonehara S. et al., 1989; Iton N. et al., 1991; Owen-Schoub L. B. et al., 1994; Hashimoto S. et al., 1996], меланому, глиобластоме [Weller M. et al., 1994; Toda K. et al., 1996], рак простатальной железы [Martikainen P. et al., 1991], поджелудочной железы, эпидермоидную карциному [Owen-Schonib L. B. et al., 1992], рак тела матки и яичников [Метелица И. С., 1996], гепатоцеллюлярную карциному [Oka M. et al., 1996; Jodo S et al., 1998]. В то же время, в некоторых опухолях Fas/APO-1-антиген не был обнаружен: это — клеточные линии, происшедшие из вирусных EBV+- и EBV-лимфом [Falk M. H. et al., 1992], линия клеток HeLa, происшедшая из рака шейки матки [Itoh N. et al., 1993], свежеизолированные

Т- и В-клеточные лимфомы [Owen-Schaub L. B. et. al., 1993], некоторые меланомы и базальноклеточные эпителиомы [Oishi M. et. al., 1994]. Так же как и в нормальных, в злокачественных клетках экспрессия CD95(Fas/APO-1) повышается после их культивирования с гамма-интерфероном, высокомолекулярным В-клеточным фактором роста или интерлейкином-2 [Yonehara S. et. al., 1989; Iton N. et. al., 1991; Owen-Schaub L. B. et. al., 1994; Mapara M. Y. et. al., 1993].

В качестве одного из критериев оценки эффективности апоптоза при злокачественных новообразованиях Holdenrieder S. et. al. (1999) предлагают использовать подсчет концентрации циркулирующих в крови нуклеосом.

Если у 78 % больных с опухолями и у 77 % больных, имевших какое-либо воспаление, был выявлен высокий уровень этого показателя (> 100 AU), то у 98 % здоровых лиц этот уровень был низким (< 100 AU). Авторы предлагают использовать этот новый чувствительный показатель клеточной смерти для мониторинга эффективности лечения [Holdenrieder S. et. al., 1999].

В сыворотке крови большинства больных солидными опухолями выявляется растворимая форма CD95(Fas/APO-1)-антигена, образующаяся в результате альтернативного сплайсинга мРНК, и являющаяся антагонистом мембранного антигена при развитии апоптоза. Растворимый Fas-антиген в сыворотке крови выявлялся чаще у больных доброкачественными и злокачественными новообразованиями яичников по сравнению с практически здоровыми женщинами, причем его концентрация не зависела от стадии заболевания, гистологической структуры и степени дифференцировки опухоли, наличия асцита, а зависела только от размеров опухоли [Обушева М. Н., 1999].

В литературе, посвященной изучению апоптоза при солидных злокачественных новообразованиях, практически одинаково описывается механизм ухода опухоли из-под иммунологического контроля. Это касается исследований как биопсийного материала, так и опухолевых клеточных линий. Все авторы признают возможность экспрессии, причем, в довольно значительном количестве, CD95-лиганда на опухолевых клетках. Лимфоидная инфильтрация,

состоящая преимущественно из Т-лимфоцитов (CD4+), является нормальным иммунологическим ответом на появление злокачественных клеток. Однако наличие на их поверхности Fas-лиганда приводит к вступлению в апоптоз эффекторных клеток, что подтверждается морфологическими и иммуногистохимическими методами.

Н. Koizumi и соавт. (1995) изучали апоптоз у больных нейробластомой и его корреляцию с регрессией опухоли. Гистологически, опухолевые клетки имели все признаки апоптоза: сморщивание, конденсацию хроматина, фрагментацию нуклеол, эозинофилию цитоплазмы и отсутствие воспаления. В 4 из 6 опухолей продемонстрировали с помощью электрофореза в агарозном геле «ДНК-овую лестницу». Гибридизацией *in situ* обнаружили фрагментацию ДНК в 26 из 35 образцов опухоли (74 %). В прогрессирующих опухолях обнаружили экспрессию белка Bcl-2, тогда как в спонтанно регрессирующих опухолях он отсутствовал. Полагают, что Bcl-2 и Fas-рецептор контролируют спонтанный апоптоз в клетках нейробластомы. Опухолевые клетки экспрессировали CD95(Fas/APO-1)-антиген [Fulda S. et al., 1997].

Несколько групп исследователей изучали экспрессию и функцию CD95(Fas/APO-1)-антигена на клетках больных глиобластомой и клеточных линиях, из нее происшедших [Tachibana O. et al., 1995; Weller M. et al., 1994]. Злокачественные глиомные клетки очень чувствительны к CD95-индуцированному апоптозу [Weller M. et al., 1995]. М. Weller и соавт. (1994) изучали CD95(Fas/APO-1)-опосредованный апоптоз на 7 человеческих глиомных линиях клеток. Чувствительность к Fas-опосредованному апоптозу коррелировала с поверхностной экспрессией CD95-антигена. Экспрессия антигена, а также чувствительность клеток к Fas-опосредованному апоптозу усиливалась экспозицией клеток с гамма-интерфероном или TNF. Эти же авторы [Weller M. et al., 1995] изучали влияние Bcl-2 на Fas-опосредованный апоптоз в глиомной линии и отметили, что чувствительность глиомных линий к Fas-опосредованному апоптозу обратно коррелировала с экспрессией антиапоптотического протоонкогена Bcl-2, а экспрессия Bcl-2 коррелировала со степенью злокачественности

опухоли. Fas-чувствительные человеческие глиомные линии клеток, трансфектированные мышинным cDNA *Bcl-2*, становились резистентными к апоптозу, индуцируемому МКА против CD95(Fas/APO-1)-антигена. Преэкспозиция этих клеток с гамма-интерфероном или альфа-TNF, которые повышают чувствительность к апоптозу, частично препятствовала белку *Bcl-2* позволять клеткам избегать апоптоза. О. Tachibara и соавт. (1995) обнаружили экспрессию CD95(Fas/APO-1) на клетках всех 9 исследованных глиобластом, в 1 из 4 случаев ювенильной пилоцитической астроцитомы и в 6 из 12 случаев анапластических астроцитом. Исследователи заключили, что экспрессия CD95-антигена коррелирует со степенью злокачественности астроцитомы.

R. Bargou и соавт. (1995) изучали экспрессию CD95(Fas/APO-1)-антигена, генов *Bcl-2*, *Bcl-x*, *Bax* при раке молочной железы (РМЖ) у человека. Они сравнивали экспрессию этих генов в опухолевой ткани, в клетках перевиваемых линий РМЖ и в нормальной ткани молочной железы. Не было обнаружено различий в экспрессии *Bcl-2* и *Bcl-xL* между эпителием нормальной молочной железы и опухолевой тканью. В противоположность этому, *Bax*, который усиливает апоптоз, сильно экспрессирован в нормальных клеточных линиях и нормальной ткани молочной железы и слабо экспрессирован или вовсе отсутствовал на клетках опухолевых линий и в раковой ткани. В противоположность злокачественным линиям клеток, которые экспрессируют низкий уровень *Bax-α*, линии клеток, происшедшие из нормального эпителия, обладают высоким уровнем *Bcl* и высокочувствительны к CD95-опосредованному апоптозу.

M. Keane и соавт. (1996) изучали экспрессию и функцию CD95 (Fas/APO-1)-антигена в клеточных линиях, происшедших из нормальной и злокачественной тканей молочной железы. Они обнаружили, что в первом случае обнаруживается высокий уровень экспрессии мРНК Fas-антигена и сам антиген, в то время как во втором только одна из 7 линий экспрессировала высокий уровень CD95-антигена, и все опухолевые линии, за исключением этой одной, были резистентны к Fas-опосредованному апоптозу. Резистентные линии клеток становились чувствительными после

обработки гамма-интерфероном, так как он несколько повышал экспрессию CD95-антигена.

В работе Gutierrez L. S. с соавт. (1999) было описано явление инфильтрации опухоли лимфоцитами, которые гибли путем апоптоза, вступая в контакт с Fas-лигандом, экспрессированном на опухолевых клетках рака молочной железы. Лиганд был обнаружен и на изученных клетках при гиперпластических состояниях (мастопатиях), что, по мнению авторов, свидетельствует о возможности опухолевой трансформации и усилении пролиферации. O'Connell с соавт. (1999) приходит к тем же выводам. Кроме того, гистохимически было выявлено одновременное независимое окрашивание на Fas и Fas-лиганд, что может свидетельствовать об отсутствии взаимного реагирования из-за какого-то внутриклеточного дефекта. Иммунологические вопросы лимфоидной инфильтрации опухоли у больных раком молочной железы и ее связь с чувствительностью к терапии также представлены в работе Слонимской Е. М. (1999).

Sbuh-Lammali F. с соавторами исследовали экспрессию антигенов CD95 и CD40 при EBV+-раке носоглотки. Величина обоих показателей была высокой в 15 из 16 случаев. В двух случаях с EBV- экспрессия CD95 обнаружена не была. Клетки опухоли были чрезвычайно восприимчивы к CD95-опосредованному апоптозу, несмотря на выраженность экспрессии *Bcl-2*. Лимфоциты, инфильтрирующие опухоль, продуцировали CD40-лиганд, чем могли увеличить выживаемость злокачественных клеток и стимулировать их рост [Sbuh-Lammali F. et al., 1999].

Изучалась экспрессия Fas-рецептора у 15 больных с плоскоклеточным раком легкого у 10 здоровых лиц. Антиген был обнаружен во всех случаях рака и отсутствовал в контроле. После проведения лучевого лечения Fas-антиген обнаружен не был. Отсутствовала корреляция экспрессии Fas и клинико-морфологических данных [Hellquist H. B. et al., 1997]. С другой стороны, при исследовании 164 больных раком легкого получены более высокие показатели выживаемости у Fas+-больных по сравнению с Fas-- больными. Присутствие лиганда не влияло на эту закономерность.

Больные с отсутствием рецептора и лиганда чаще имели массивное вовлечение в процесс лимфоузлов [Koomugi R., Volm M., 1999].

Основанием неэффективности апоптоза при раке легкого Lee S. H. с соавторами (1999) считают существование мутации гена Fas, что и было найдено у 5 из 63 больных раком легкого. Нарушения найдены в зоне «домена смерти» у 4 больных и в транс-мембранной части — у одного.

С помощью МКА гистохимически определяли антиген Fas при плоскоклеточном раке полости рта, который во всей исследованной группе обнаружен у 68 % (26/38), однако при высокодифференцированных формах антиген был определен в 22 случаях из 24, при умереннодифференцированных — в 4 из 11 и при низкой степени дифференцировки — не был обнаружен (3 больных). Сделан вывод о связи экспрессии Fas со степенью опухолевой дифференцировки [Muraki Y. et al., 1999].

P. Molleg и соавт. (1994) изучали иммуногистохимически экспрессию антигена CD95 на нормальной слизистой толстой кишки, при 20 аденомах, 258 случаях рака толстой кишки и 10 случаях метастазов рака толстой кишки в печень. Антиген CD95 был регулярно экспрессирован на базолатеральной мембране нормального эпителия толстой кишки. У небольшой части аденом толстой кишки и в 39,1 % карцином антиген был экспрессирован слабо, а в 48,1 % карцином, преимущественно немучинозного типа, он полностью отсутствовал. Нормальный уровень экспрессии CD95(Fas/APO-1)-антигена коррелировал с муцинозным типом опухоли. Угнетение экспрессии или утрата антигена были более частыми при ректальной карциноме. Полная утрата антигена была в метастазирующих опухолях. Экспрессия антигена в печеночных метастазах соответствовала первичной опухоли и коррелировала с антигенами HLA-A,B,C и HLA-DR. Авторы заключили, что злокачественная трансформация ведет к утрате высокого физиологического уровня экспрессии CD95(Fas/APO-1)-антигена.

S. Hashimoto и соавт. (1996) обнаружили экспрессию CD95(Fas/APO-1)-антигена лишь в трети исследованных случаев колоректального рака человека. При сравнении нормальной слизистой толстой кишки здоровых лиц с опухолевыми клетками

больных раком выявлено значительное уменьшение антигена или его отсутствие в последнем случае, что свидетельствует о резистентности к апоптозу. Экспрессия CD95 увеличивалась при введении интерферона [Van Reyher U. et al., 1998]. Peduto E. L. с соавторами (1999) обнаружили гиперэкспрессию Fas-лиганда на злокачественных клетках и на гладкомышечных клетках сосудов при опухолях толстой кишки и почки, чем и объясняют стимуляцию апоптоза CD4+-активированных лимфоцитов. Аналогичный вывод был сделан при исследовании рака толстой кишки Uslu R. с соавторами (1997). Анализ 30 случаев рака желудка показал отсутствие корреляции Fas-лиганда и стадии заболевания [Bennett M. W. et al., 1999]. Количество эффекторных клеток может достигать значительного уровня, приводящего к нарушению соотношения CD4+/CD8+, которое может становиться даже меньше 1 (при норме 1,2–2,2), как было установлено авторами при исследовании опухолей желудка [Kume T. et al., 1999].

Взаимоотношение пролиферации и показателей программированной клеточной смерти изучалось с помощью сопоставления митотического и апоптотического индексов при метастазах колоректального рака в печень у 21 человека. Установлено, что при величине этого соотношения большей, чем 4, у больных наблюдался плохой ответ на химиотерапию [Zaloudik J. et al., 1998].

У 18 больных раком пищевода найдено достоверное повышение значений апоптотического индекса после проведения химиолучевого лечения в группах высоко- и среднendifференцированного рака пищевода, в то время как в группе низкодифференцированного рака пищевода динамики после лечения не отмечено. Сделан вывод о прогностическом значении этого показателя [Sunagava M. et al., 1998].

При сравнении болезни Баррета, считающейся предраковым состоянием пищевода, и аденокарциномы пищевода гистохимически, было установлено значительное уменьшение экспрессии антигена Fas (в 30,5 % слабая окраска и в 69,5 % — отсутствие) при опухолевом состоянии [Hughes S. J. et al., 1997]. На клетках рака пищевода обнаружена экспрессия Fas-лиганда как доказательство

возможности ускользания опухоли из-под воздействия иммунной системы [O'Connell J. et. al., 1999].

При исследовании клеточных линий гепатомы человека был обнаружен факт увеличения экспрессии антигена CD95 при воздействии на культуру блеомицином. Авторы объясняют это временной аккумуляцией дикой формы *p-53*, так как при обнаружении мутантной формы экспрессия CD95 после воздействия блеомицина не нарастала [Muller M. et. al., 1997].

В работе С. Gutieres-Steil с соавторами (1998) изучался базально-клеточный рак (базалиома), на клетках которой была обнаружена экспрессия Fas-лиганда, а также разрушенные Т-лимфоциты в околоопухолевой зоне. При культивировании кератиноцитов, полученных из опухолевой ткани, обнаружен эффект увеличения экспрессии лиганда после воздействия на культуру ультрафиолетового облучения, что было расценено авторами как доказательство патогенетического действия инсоляции на возникновение рака кожи. В другой работе внутриопухолевое введение гамма-интерферона вызывает увеличение вокруг опухоли количества CD4+-лимфоидных элементов, несущих CD95, и в этой ситуации клетки базалиомы гибнут от развития апоптоза, активированного собственным лигандом [Buecher S. A. et. al., 1997]. Ugurel S. С соавторами (1999) при изучении 11 меланомных клеточных линий также установил, что именно гамма-интерферон (а не альфа-интерферон) увеличивает чувствительность культуральных клеток к апоптозу и может индуцировать ее при резистентных формах. Чувствительность к апоптозу имела обратную корреляцию с уровнем экспрессии протоонкогенов *Bcl-2* и *Bcl-x*.

В работе Shin M. S. с соавт. (1999) неэффективность апоптоза объясняется патологией гена Fas, отвечающего за образование Fas-рецептора на поверхности клетки. При изучении биопсийного материала от 44 больных меланомой у 3 из них (6,8 %) была обнаружена мутация в зоне кодирования «домена смерти».

CD95(Fas/APO-1)-антиген экспрессирован на клетках Березовского-Штенберга при лимфогранулематозе. На этих же клетках экспрессированы другие рецепторы и лиганды суперсемейства TNF, такие как TNF, CD27L, CD30L, CD30, CD40, CD120a,

CD120b, 4-1BB, но не обнаруживался CD40L [Gruss H. J. et. al., 1996]. Все эти рецепторы и лиганды находятся в функциональном состоянии и могут влиять на рост опухолевых клеток.

Л. Хет и соавт. (1995) исследовали экспрессию CD95(Fas/APO-1)-антигена на CD30+-клетках злокачественных лимфопролиферативных заболеваниях, включая 27 случаев лимфогранулематоза и 8 крупноклеточных лимфом. Контролем служили 27 В-клеточных не-Ходжкинских лимфом, 14 Т-клеточных не-ходжкинских лимфом, 4 реактивных лимфоаденита и нелимфоидные ткани. Исследование проводили иммуногистологически на замороженных срезах. CD95(Fas/APO-1)-антиген экспрессировали клетки Березовского-Штенберга в 25 из 27 (92 %) случаев. Во всех 8 случаях анапластических крупноклеточных лимфом 50–100 % опухолевых клеток экспрессировали этот антиген. В противоположность, положительное иммуноокрашивание обнаружили только в 22 из 41 (53 %) случаев CD30-негативных не-ходжкинских лимфом.

М. Aftabuddin и соавт. (1995) изучали корреляцию количества апоптотических клеток с экспрессией CD95(Fas/APO-1)-антигена на опухолевых клетках 56 больных не-ходжкинской лимфомой и в 10 реактивных лимфатических узлах. Количество апоптотических клеток при фолликулярных лимфомах было значительно меньше, чем при диффузной лимфоме. Их распределение при фолликулярной лимфоме было обратны распределению в реактивных лимфатических узлах. При фолликулярной лимфоме количество апоптотических клеток было ниже, чем при интерфолликулярной лимфоме. В противоположность, в реактивных лимфатических узлах количество клеток в апоптозе в фолликулах было выше, чем в интерфолликулярной зоне. Le(y)-положительные лимфомы содержали более высокое количество апоптотических клеток, чем негативные. Однако для *Bcl-2*-позитивных и негативных случаев количество апоптотических клеток не различалось.

М. J. Robertson и соавт. (1995) обнаружили экспрессию CD95(Fas/APO-1)-антигена на опухолевых клетках только у 3 из 21 больного лимфомой.

Таким образом, CD95-рецепторно-лигандная система является важным элементом в регуляции жизни и смерти клеток. При

ее нарушении развиваются различные заболевания, в том числе и онкологические. Уже сложились основные представления о причинах ухода опухоли из-под контроля иммунной системы, из которых выделяют две основных: 1) нефункционирующий антиген, дефектный в связи с мутацией; 2) функционально-активный лиганд, экспрессированный на опухолевых клетках, вызывает апоптоз эффекторных лимфоидных клеток.

Заключение

Одним из крупнейших достижений последних лет явилось обнаружение целостной системы, обеспечивающей экстренное удаление поврежденных или опасных для организма клеток. Функция этой системы заключается в отслеживании разнообразных повреждений и сбоев, а также стрессорных состояний, которые приводят к наследуемым изменениям генетического аппарата, и в выборе «мер пресечения» для вовлеченных в эти процессы клеток [П. М. Чумаков]. Одним из ключевых механизмов уничтожения поврежденных или измененных клеток является CD95(Fas/APO-1)-рецепторно/лигандная система. Уникальность этой системы заключается в том, что клетка воспринимает сигнал гибели от других клеток посредством лиганда, а также способна продуцировать собственный лиганд в ответ на поражение различными веществами. Как видно из содержания книги, нормальное функционирование CD95-рецепторно/лигандной системы поддерживает гомеостаз во многих системах организма, а при нарушении функции этой системы развиваются многочисленные заболевания.

Существует несколько путей реализации накопленных знаний по экспрессии и функции CD95(Fas/APO-1)-рецептора. Первый из них — прогнозирование терапии на основе определения лекарственно-индуцированного апоптоза. Простые тесты по определению *in vitro* апоптоза в опухолевых клетках при инкубации с химиопрепаратами позволяют индивидуализировать терапию онкологических заболеваний.

Второй — использование МКА против антигена CD95(Fas/APO-1) для терапии опухолей. Однако токсическое действие на печень позволяет их применять только при локальном введении.

Третий — использование того факта, что гены, регулирующие апоптоз, являются мишенью для генотерапии опухолей.

Четвертый путь учитывает, что регуляция апоптоза может привести к излечиванию некоторых аутоиммунных заболеваний.

Исследования CD95-рецепторно/лигандной системы выявили новый механизм ускользания опухоли от иммунологического надзора. Опухоли, экспрессирующие Fas-лиганд, убивают иммунокомпетентные клетки и защищаются от их киллерного действия.

Значение экспрессии антигена CD95 на солидных опухолях еще недостаточно изучено и требует дальнейшего исследования. Понимание механизмов апоптоза будет иметь важное значение в различных областях биологии и медицины.

Литература

1. *Аббасова С. Г.* Создание тест-системы для количественного определения растворимого Fas-антигена в сыворотке крови человека. Автореф. дисс... канд. биол. наук. М., 1999. 29 с.
2. *Абелев Г. И.* Механизмы дифференцировки и опухолевый рост // Биохимия, 2000. Т. 65. № 1. С. 127–138.
3. *Андреева Н. Е.* Миеломная болезнь. В кн. «Руководство по гематологии». Т. 2. Под ред. А. И. Воробьева. М., Медицина, 1985. С. 292–308.
4. *Асцатуров И. А.* Иммунофенотипирование в диагностике хронических лимфопролиферативных заболеваний. Автореф. дисс... канд. мед. наук. М., 1997. 29 с.
5. *Барышников А. Ю., Кадагидзе З. Г., Махонова Л. А., Тулицын Н. Н.* Иммунологический фенотип лейкозной клетки. М., Медицина, 1989. 240 с.
6. *Владимирская Е. Б., Масчан А. А., Румянцев А. Г.* Апоптоз и его роль в развитии опухолевого роста // Гематол. и трансфузиол., 1997. Т. 42. № 5. С. 4–9.
7. *Глузман Д. Ф., Абраменко И. В., Скляренко Л. М., Надгорная В. А.* Лабораторная диагностика онкогематологических заболеваний. Киев, «Марион», 1998. 336 с.
8. *Зенков Н. К., Меньшикова Е. Б., Вольский Н. Н., Козлов В. А.* Внутриклеточный окислительный стресс и апоптоз // Успехи совр. биологии, 1999. Т. 119. № 5. С. 440–450.
9. *Копнин Б. П.* Мишени действия онкогенов и опухолевых супрессоров: ключ к пониманию базовых механизмов канцерогенеза // Биохимия, 2000. Т. 65. № 1. С. 5–33.
10. *Крыжанов М. А., Барышников А. Ю., Блохина Н. Г. и др.* Получение и характеристика моноклональных антител ИКО ГМ1 // Бюлл. эксперим. биол. мед., 1985. № 6. С. 721–723.
11. *Логачева Н. П.* Нестабильность иммунологического фенотипа бластных клеток при хроническом миелоидном лейкозе. Автореф. дисс... канд. мед. наук. М., 1998. 25 с.

12. *Метелица И. С., Лазарева Н. И., Чинарева И. В. и др.* Экспрессия CD95(Fas/APO-1)-рецептора, опосредующего апоптоз, на лимфоцитах периферической крови больных злокачественными и доброкачественными гинекологическими заболеваниями // *Материалы IV Международной конференции «СПИД, рак и родственные проблемы»*. СПб., 1996. С. 80.
13. *Метелица И. С.* Иммунологический статус лимфоцитов периферической крови при патологии женской репродуктивной системы. Автореф. дисс... канд. мед. наук. М., 1996. 24 с.
14. *Новиков В. С.* (Под ред.) Программированная клеточная гибель. СПб., Наука, 1996. 276 с.
15. *Обушева М. Н.* Растворимый Fas-антиген в сыворотке крови больных раком и доброкачественными новообразованиями яичников и его клиническое значение. Автореф. дисс... канд. мед. наук. М., 1999. 25 с.
16. *Петерсон И. С., Шишкин Ю. В., Дроздова Т. С., Тулицын Н. Н.* Случаи эритрофагоцитоза бластными клетками при лейкозах у детей // *Педиатрия*, 1986. № 6. С. 71–72.
17. *Селицкая Р. П., Варфоломеева М. И.* Апоптоз и легочные заболевания. Сб. «Новости науки и техники». Серия «Медицина». Вып. «Туберкулез». М., 1997. № 5. С. 5–7.
18. *Слонимская Е. М.* Прогнозирование исхода заболевания у больных раком молочной железы. Автореф. дисс... докт. мед. наук. Томск, 1999. 48 с.
19. *Сидоренко С. П., Бердова А. Г., Ветрова Е. П. и др.* Моноклональные антитела ИРО-4, распознающие антиген-активированные Т- и В-лимфоциты человека // *Эксперим. онкол.*, 1990. Т. 12. С. 21–24.
20. *Сидоренко С. П., Ветрова А. Г., Юрченко О. В. и др.* Моноклональные антитела серии ИПО в изучении и диагностике злокачественных лимфопролиферативных заболеваний // *Гематолог. и трансфузиолог.*, 1990. Т. 35. № 4. С. 19–22.
21. *Сидоренко С. П.* Fas/CD95-опосредованный апоптоз в патогенезе лимфоидных новообразований // *Эксперим. онкол.*, 1998. Т. 20. С. 15–28.
22. *Ставровская А. А.* Клеточные механизмы множественной лекарственной устойчивости опухолевых клеток // *Биохимия*, 2000. Т. 65. № 1. С. 112–126.
23. *Фильченков А. А., Стойка Р. С.* Апоптоз (физиологическая смерть клетки) // *Семинары по гематопатологии*. Вып. 2. Киев, 1995. 24 с.

24. Фильченков А. А. Современные представления о роли апоптоза в опухолевом росте и его значении при противоопухолевой терапии // Эксперим. онкол., 1998. Т. 20. С. 259–270.
25. Чумаков П. М. Функция гена p53: выбор между жизнью и смертью // Биохимия, 2000. Т. 65. № 1. С. 34–47.
26. Шлапацкая Л. Н., Бердова А. Г., Михалан С. В., Сидоренко С. П. и др. Моноклональные антитела ИПО-4 к молекуле апоптоза и ИПО-38 к ядерному антигену пролиферирующих клеток для изучения гемобластозов // Эксперим. онкол., 1996. С. 178–179.
27. Шмаров Д. А., Козинец Г. И. Закономерности клеточного цикла гемопоэтических клеток при действии ионизирующей радиации // Гематол. и трансфузиол., 1995. Т. 40, № 6. С. 25–29.
28. Ярилин А. А. Апоптоз. Природа феномена и его роль в целостном организме // Патол. физиол. экспер. тер., 1998. Т. 2. С. 38–48.
29. Adachi M., Suematsu S., Kondo T. et. al. Targeted mutation in the Fas gene causes hyperplasia in peripheral lymphoid organs and liver // Nature Genet. 1995. Vol. 11. P. 294–299.
30. Adachi S., Cross A. R., Gottlieb and Bernand M. Bcl-2 and the outer mitochondrial membrane in the inactivation of cytochrome, during Fas-mediated apoptosis // J. Biol. Chem. 1997. Vol. 272. P. 21878–21882.
31. Adachi S., Gottlieb and Bernand M. Lack of release of Cytochrome c from mitochondria into cytosol early in the course of Fas-mediated apoptosis of Jurkat cells // J. Biol. Chem., 1998. Vol. 273. P. 19892–19894.
32. Aftabuddin M., Yamadori I., Yoshino T. et. al. Correlation between the number of apoptotic cells and expression of the apoptosis-related antigens Fas, Le(y) and Bcl-2 protein in non-Hodgkin's lymphomas // Pathol. Int., 1995. Vol. 45. P. 422–9.
33. Allen R. D., Marshall J. D., Roths J. B. and Sidman C. L. Differences defined by bone marrow transplantation suggest that lpr and gld are mutations of genes encoding an interacting pair of molecules // J. Exp. Med., 1990. Vol. 172. P. 1367–1375.
34. Alderson M. R., Armitage R. J., Maraskovsky E. et. al. Fas transduces activation signals in normal human T lymphocytes // J. of Experimental Medicine, 1993. Vol. 178. P. 2231–2.
35. Alderson M. R., Tough T. W., Braddy S. et. al. Regulation of apoptosis and T-cell activation by Fas-specific mAb // Int. Immunol., 1994. Vol. 6. P. 1799–1806.

36. *Alderson M. R., Tough T. W., Davis-Smith T. et. al.* Fas-ligand mediated activation-induced cell death in human T-lymphocytes // *J. Exp. Med.*, 1995. Vol. 181. P. 71.
37. *Althaus F. R., Richer C.* ADP-ribosylation of proteins. Ezimology and biological significance // *Mol. Biol. Biochem. Biophys.*, 1987. Vol. 37. P. 1-126.
38. *Arase H., Arase N., Saito T.* Fas-mediated cytotoxicity by freshly isolated natural killer cells // *J. Exp. Med.*, 1995. Vol. 181. P. 1235-1238.
39. *Alexander D. Z., Pearson T. C., Hendrix R. et. al.* Analysis of effector mechanisms in murine cardiac allograft rejection // *Transpl. Immunol.*, 1996. Vol. 4. P. 4.
40. *Amasaki Y., Kobayashi S., Takeda T. et. al.* Up-regulated expression of Fas antigen (CD95) by peripheral naive and memory T-cell subsets in patients with systemic lupus erythematosus (SLE): a possible mechanism for lymphopenia // *Clin. Exp. Immunol.*, 1995. Vol. 99. P. 245-50.
41. *Andjelic S., Drappa J., Lacy E. et. al.* The onset of Fas expression parallels the acquisition of CD8 and CD4 in fetal and adult alpha-beta-thymocytes // *Int. Immunol.*, 1994. Vol. 6. P. 73-9.
42. *Arends M. Y., Morris R. G. and Wyllie A. N.* Apoptosis: The role of the endonuclease // *Am. J. Pathol.*, 1990. Vol. 136. P. 593.
43. *Aries S. P., Schaaf B., Muller C. et. al.* Fas(CD95) expression on CD4+-T-cells from HIV-infected patients increases with disease progression // *J. Mol. Med.*, 1995. Vol. 73. № 12. P. 59.
44. *Ashany D., Song X., Lacy E. et. al.* The CD4+ lymphocytes delete activated macrophages through the Fas/APO-1 antigen pathway // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1995. Vol. 21. Vol. 92. № 24. P. 11225-11229.
45. *Bargou R. C., Daniel P., Mapara M. Y. et. al.* Expression of the *Bcl-2* gene family in normal and malignant breast tissue: low bax-alpha expression in tumor cells correlates with resistance towards apoptosis // *Int. J. Cancer.*, 1995. Vol. 60. № 6. P. 854-858.
46. *Baumter C., Bohler T., Herr I. et. al.* Activation of the CD95(APO-1/Fas) System in T-cells from human immunodeficiency virus type-1-infected children // *Blood*, 1996. Vol. 88. P. 1747-1748.
47. *Berrebi A., Bassous L. and Shvidel L.* Verapamil induced in vitro enhancement of apoptosis in B-CLL cells // *Int. J. Haemat.*, 1996. Suppl. 1. P. 127.

48. *Boesen de Cock J. D., Tepper A. D., de Vries E. et. al.* CD95(Fas/APO-1) induces ceramide formation and apoptosis in the absence of a functional acid sphingomyelinase // *J. Biol. Chem.*, 1998. Vol. 273. P. 7560–7565.
49. *Bogdanovic A. D., Jankovic G. M., Colovic M. D. et. al.* Apoptosis in bone marrow of myelodysplastic syndrome patients // *Blood*, 1996. Vol. 87. P. 3064.
50. *Behrmann I., Walczak H., Krammer P. H.* Structure of the human APO-1 gene // *Eur. J. Immunol.*, 1994. Vol. 24. № 12. P. 3057–3062.
51. *Boise L. H., Gonzalez-Garcia M., Postema C. E. et. al.* *Bcl-x*, and *Bcl-2* related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death // *Cell*, 1993. Vol. 74. P. 597–608.
52. *Boldin M. P., Varfolomeev E. E., Pancer Z. et. al.* A novel protein that interacts with the death domain of Fas/APO-1 contains a sequence motive related the death domain // *J. Biol. Chem.*, 1995. Vol. 270. P. 7795–7798.
53. *Boldin M. P., Goncharov T. M., Golysev Y. V. et. al.* Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1- and TNF receptor-induced cell death // *Cell*, 1996. Vol. 85. P. 803–815.
54. *Borgers M., Shul G., Xhonneux R. et. al.* Changes in ultrastructure and Ca^{2+} distribution in the isolated working rabbit heart after ischemia: a time-related study // *Am. J. Pathol.*, 1987. Vol. 126. P. 92–102.
55. *Borthwick N. J., Bofill M., Hassan I., Panayiotidis P., Janosy G., Salmon M. and Akbar A. N.* Factors that influence activated CD8+-T-cell apoptosis in patients with acute herpesvirus infections: loss of costimulatory molecules CD28, CD5 and CD6 but relative maintenance of *Bax* and *Bcl-X* expression. *Immunology*, 1996. Vol. 88. № 4: 508–515.
56. *Bossy-Wetzel E., Green D. R.* Caspases induced Cytochrome c release from mitochondria by activating cytosolic factors // *J. Biol. Chem.*, 1999. Vol. 274. P. 17484–17490.
57. *Bouscary D., Vos J., Guesnu M. et. al.* Fas/APO-1(CD95) expression and apoptosis in patients with myelodysplastic syndromes / *Leukemia*, 1997. № 11. P. 839–845.
58. *Brunner T., Mogil R. J., La Face D. et. al.* Cell-autonomous Fas (CD95)/Fas-ligand interaction mediates activation-induced apoptosis in T-cell hybridomas // *Nature*, 1995. Vol. 373. P. 441–444.
59. *Cahil M. A., Peter M. E., Kischkel F. C. et. al.* CD95(APO-1/Fas) induced activation of CAP kinases downstream of ICE-like proteases // *Oncogen*, 1996. Vol. 13. P. 2087–2120.

60. *Campana D., Coustan-Smith E., Manabe A. et al.* Prolonged survival of B-lymphoblastic leukemia cells // *Blood*, 1993. Vol. 81. № 4. P. 1025–1031.
61. *Carson D. E., Ribeiro J. M.* Apoptosis and disease (Review) // *Lancet*, 1993. Vol. 341. P. 1251–1254.
62. *Cascino I., Fiucci G., Pupoff G. and Ruberti G.* Three functional soluble forms of the human apoptosis-inducing Fas molecule are produced by alternative splicing. *J. Immunol.*, 1995. Vol. 154. № 6. P. 2706–2713.
63. *Caul'n C., Salvesen G. S. and Oshima R. G.* Caspase cleavage of keratin 18 and reorganization of intermediate filaments during epithelial cell apoptosis // *J. cell Biol.*, 1997. Vol. 138. P. 1379–1394.
64. *Cheng J., Zhou T., Liu C., Shapiro J. P., Brauer M. J., Kiefer M. C., Barr P. J. and Mountz J. D.* Protection from Fas-mediated apoptosis by a soluble form of the Fas molecule // *Science*, 1994. Vol. 263. № 5154. P. 1759–1762.
65. *Chikayama S., Kabayashi Y., Takahashi Y. et al.* The effect on cell cycle and apoptosis at a low concentration of daunorubicin // *Int. J. of Haemat.*, 1996. Suppl. 1. P. 174.
66. *Chinnaiyan A. M., O'Rourke K., Tewari M. et al.* FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis // *Cell*, 1995. Vol. 81. P. 505–512.
67. *Chinnaiyan A. M., O'Rourke K., Yu G. L., Lyons R. H., Garg M., Duan D. R., Xing L., Gentz R., Ni J. and Dixit Vol. M.* Signal transduction by DR3, a death domain-containing receptor related to TNFR-1 and CD95 // *Science*, 1996. Vol. 274. № 5289. P. 990–992.
68. *Cohen J. J.* Apoptosis // *Immunol. Today.*, 1993. Vol. 14. P. 126–130.
69. *Cohen P. L. and Eisenberg R. A.* Fas/APO-1: a cell surface receptor that signals apoptosis // *Apoptosis and the Immune Response* / Wiley Liss. Inc., 1995. P. 169–186.
70. *Collins R. J., Harmon B. V., Souvlis T. et al.* Effect of cycloheximide on B-chronic lymphocytic leukemia and normal lymphocytes in vitro: Induction of apoptosis // *Brit. J. Cancer*, 1991. Vol. 64. P. 518–522.
71. *Coney L. R., Daniel P. T., Sanborn D., Dhein J., Debatin K. M., Krammer P. H. and Zurawski Vol. R.* Apoptotic cell death induced by a mouse-human anti-APO-1 chimeric antibody leads to tumor regression // *International J. of Cancer*, 1994. Vol. 58. № 4. P. 562–567.
72. *Cosman D.* A family of ligands for the TNF receptor superfamily. SO: Stem. // *Cells. Dayt.*, 1994. Vol. 12. № 5. P. 440–455.

73. *Cosulich S., Clarke P.* Apoptosis: does stress kill? // *Curr Biol.*, 1996. Vol. 6. P. 1586–1588.
74. *62. Cuende E., Ales-Martinez J. E., Ding L. L., Gonzales-Garcia M., Martinez A. C. and Nuñez G.* Programmed cell death by *Bcl-2*-dependent and independent mechanisms in B lymphoma cells // *EMBO J.*, 1993. Vol. 12. P. 1555–1560.
75. *Daniel P. T., Krammer P. H.* Activation induces sensitivity toward APO-1 (CD95)-mediated apoptosis in human B cells // *J. Immunol.*, 1994. Vol. 152. № 12. P. 5624–5632.
76. *Debatin K.-M., Goldman C. K., Bamford R. et. al.* Monoclonal antibody mediated apoptosis in adult T-cell leukemia // *Lancet*, 1990. Vol. 335. P. 447.
77. *Debatin K.-M., Goldman C. K., Waldman T. A., Krammer P. H.* APO-1-induced apoptosis of leukemia cells from patients with adult T-cell leukemia // *Blood*, 1993. Vol. 81. P. 2972–2977.
78. *Debatin K.-M., Fahrting-Faissner A., Enenkel-Stoodt S. et. al.* High expression of APO-1(CD95) on T-lymphocytes from human immunodeficiency virus infected children // *Blood*, 1994. Vol. 83. P. 3101.
79. *Debatin K.-M., Krammer P. H.* Resistance to APO-1 (CD95) induced apoptosis in T-ALL is determined by a *Bcl-2* independent anti-apoptotic program // *Leukemia*, 1995. Vol. 9. P. 815–820.
80. *Debatin K.-M.* CD95, apoptosis pathways and cancer therapy // *Eur. J. Cancer*, 1999. Vol. 35. Suppl. 4. P. 336.
81. *De Maria R., Lenti L., Malisan F. et. al.:* Requirement for GD3 ganglioside in CD95-and ceramide-induced apoptosis // *Science*, 1997. Vol. 277. P. 1652–1655.
82. *Maria R. de , Rippo M. R., Scuchman E. H. et. al.:* Acidic spingomeelinase (ASM) is necessary for fas-induced GD3 ganglioside accumulation and efficient apoptosis of lymphoid cells // *J. Exp. Med.*, 1998. P. 897–902.
83. *Desbarats J., Freed J. H., Campbell P. A. and Newell M. K.* Fas (CD95) expression and death-mediating function are induced by CD4 cross-linking on CD4+-T-cells // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996. Vol. 93. № 20. P. 1104–1108.
84. *De Weerdt O., Van Vliet M., Roovers D. J. et. al.* Possible invlvement of *Bcl-2/Bax* in the pathogenesis and grugresistance of multiple myeloma // *Brit. J. Haemat.*, 1998. Vol. 102. P. 346.

85. *Dewson G., Wardlaw A. J. and Walsh G. M.* Human eosinophils: apoptosis versus survival in the mediation of inflammation // *Apoptosis*. 1996. Vol. 1. P. 111–118.
86. *Dhein J., Daniel P. T., Trauth B. C., Oehm A., Moller P. and Krammer P. H.* Induction of apoptosis by monoclonal antibody anti-APO-1 class switch variants is dependent on cross-linking of APO-1 cell surface antigens // *J. Immunology*, 1992. Vol. 149. № 10. P. 3166–3173.
87. *Dhein J., Waiczak H., Baumier C. et. al.* Autocrine T-cell suicide mediated by APO-1/(Fas/CD95) // *Nature*, 1995. Vol. 373. P. 438–441.
88. *Donina S., Engele L., Jaunalksne I. et. al.* Fas APO-1(CD95+) expressin on peripheral blood Tlymphocytes before and after surgery in colorectal cancer patient // *Eur. J. Cancer*, 1999. Vol. 35. Suppl. 4. P. 74.
89. *Dowling P., Shang G., Raval S. et. al.* Involvement of the CD95 (APO-1/Fas) receptor/ligand system in multiple sclerosis brain // *J. Exp. Med.*, 1996. Vol. 184. № 4. P. 1513–1518.
90. *Drappa J., Vaishnaw A. K., Sullivan K. E., Chu J. L. and Elkon K. B.* Fas gene mutations in the Canale--Smith syndrome, an inherited lymphoproliferative disorder associated with autoimmunity // *N. Engl. J. Med.* 1996. Vol. 335. № 22. P. 1643–1649.
91. *Duan H., Orth K., Chinnaiyan A. M. et. al.* ICE-LAP6, a novel member ICE/CED-3 gene family, is activated by the cytotoxic T-cell protease granzyme B // *J. Biol. Chem.*, 1996. Vol. 271. P. 16720–16724.
92. *Earnshaw W. C.* Nuclear changes in apoptosis // *Curr. Opin. Cell Biol.*, 1995. Vol. 7. P. 337–343.
93. *Effert T., Fabry U., Osieka R.* Anti-Fas/APO-1 monoclonal antibody CH-11 depletes glutathione and kills multidrug-resistant human leukemic cells // *Blood cells, Molecules and Diseases*, 1996. Vol. 22. № 1. P. 2–9.
94. *Elkon K. B.* Apoptosis in SLE—too little or too much? // *Clin. Exp. Rheumatol.*, 1994. Vol. 12. № 5. P. 553–559.
95. *Ellis R. E., Yuan J. and Horvitz H. R.* Mechanisms and functions of cell death // *Annu. Rev. Cell Biol.*, 1991. Vol. 7. P. 663–698.
96. *Enari M., Talanian R. V., Wong W. W. and Nagata S.* Sequential activation of ICE-like and CPP32-like proteases during Fas-mediated apoptosis // *Nature*, 1996. Vol. 380. P. 723–726.
97. *Estaquier J., Idziorek T., Zou W. et. al.* T helper type 1/T helper type 2 cytokines and T-cell death: Preventive effect of interleukin 12 on activation-induced and CD95(Fas/APO-1)-mediated apoptosis of CD4+-cells from



- human immunodeficiency virus-infected persons // *J. Exp. Med.*, 1995. Vol. 182. P. 1759.
98. *Falk M. H., Trauth B. C. and Debatin K.-M.* Expression of the APO-1 antigen in Burkitt lymphoma cell lines correlates with a shift towards a lymphoblastoid phenotype // *Blood*, 1992. Vol. 72. P. 3300.
99. *Fadeel B., Thorpe J. and Chiodi F.* Mapping of the linear site on the Fas/APO-1 molecule targeted by the prototypic anti-Fas mAb // *Int. Immunol.*, 1995. Vol. 7. № 12. P. 1967–75.
100. *Fadeel B., Thorpe C. J., Yonehara S. and Chiodi F.* Anti-Fas IgG1 antibodies recognizing the same epitope of Fas/APO-1 mediate different biological effects in vitro // *Int. Immunol.*, 1997 Vol. 9. № 2. P. 201–209.
101. *Fadok Vol. A., Voelker P. A., Campbell J. J. et. al.* Exposure of phosphatidylethanol-amine on the surface of apoptotic cells // *Exp. Cell. Res.*, 1992. Vol. 232. P. 430–434.
102. *Fernandes-Alnemri T., Armstrong R. C., Krebs J. et. al.* In vitro activation of CPP32 and Mch3 by Mch4, a novel human apoptotic cysteine protease containing two FADD-like domains // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996. Vol. 93. P. 7464–7469.
103. *Fialkow P. J., Jacobson R. J. and Papayannopoulou T.* Clonal origin in a stem cell common to the granulocyte, erythrocyte, platelet and monocyte/macrophage // *Am. J. Med.*, 1977. Vol. 63. P. 125–130.
104. *Finkel T. H., Tudor-Williams G., Banda N. K. et. al.* Apoptosis occurs predominantly in bystander cells and not in productively infected cells of HIV- and SIV-infected lymphocytes / *Nat. Med.*, 1995. Vol. 1. P. 129.
105. *Fulda S., Seiverts H., Friesen C. et. al.* The CD95 (APO-1/CD95) system mediates drug-induced apoptosis in neuroblastoma cells // *Cancer Res.*, 1997. Vol. 57. P. 3823–3829.
106. *Fuss I. J., Sirober W., Dale J. K. et. al.* Characteristic T helper 2 T-cell cytokine abnormalities in autoimmune lymphoproliferative syndrome, a syndrome marked by defective apoptosis and humoral autoimmunity // *J. Immunol.*, 1997. Vol. 158. P. 1912–1918.
107. *Galle P. R., Hofmann W. J., Walczak H., Schaller H., Otto G., Stremmel W., Krammer P. H. and Runkel L.* Involvement of the CD95 (APO-1/Fas) receptor and ligand in liver damage // *J. Exp. Med.*, 1995. Vol. 182. N 5. P. 1223–1230.
108. *Gamen S., Anel A., Pieiro A. et. al.* Caspases are the main executioners of Fas-mediated apoptosis, irrespective of the ceramide signalling pathway // *Cell Death Different.*, 1998. Vol. 5. P. 241–249.

109. *Gersuk G. M., Lee J. W., Beckham C. A. et. al.* Fas(CD95) receptor and Fas-ligand expression in bone marrow cells from patients with myelodysplastic syndrome // *Blood*, 1996. Vol. 88. № 3. P. 1122–1126.
110. *Giordano C., De Maria R., Stassi G., Todaro M., Richiusa P., Giordano M., Testi R. and Galluzzo A.* Defective expression of the apoptosis-inducing CD95 (Fas/APO-1) molecule on T and B-cells in IDDM // *Diabetologia*, 1995. Vol. 38. № 12. P. 1449–1454.
111. *Goel N., Chiu Vol. K., Walsh C. M., Liu C. C., Reed J. C., Clark W. R., Ulrich D. T., St. Clair E. W., Fleming J. A., Lynch D. H. and Seldin M. F.* Lack of correlation between serum soluble Fas/APO-1 levels and autoimmune disease // *Arthritis--Rheum*, 1995. Vol. 38. № 12. P. 1738–1743.
112. *Gougeon M. L.* Does apoptosis contribute to CD4 cell depletion in human immunodeficiency virus infection? // *Cell Death Differ*, 1995. Vol. 2. P. 1.
113. *Graves J. D., Gotoh Y., Draves K. E. et. al.:* Caspase-mediated activation and induction of apoptosis by the mammalian Ste20-like kinase Mst1 // *EMBO J.*, 1998. Vol. 17. P. 2224–2234.
114. *Green D. R. and Cotter T. G.* Apoptosis in the immune system // *Sem. Immunol.*, 1992. Vol. 4. P. 355–362.
115. *Green D. R., Amarante-Mendes G. and Martin S. J.* Scissors for the executioner: central mechanisms of apoptosis in cell mediated cytotoxicity // *Int. J. Hemat.*, 1996. Vol. 64. Suppl. 21. P. 6.
116. *Gruss H. J., Duyster J., Herrmann F.* Structural and biological features of the TNF receptor and TNF ligand superfamilies: interactive signals in the pathobiology of Hodgkin's disease // *Ann-Oncol.*, 1996. 7 Suppl. 4. P. 19–26.
117. *Gulbins E., Bissonnette R. and Mahboubi A.* FAS induced apoptosis is mediated via a ceramide initiated RAS signaling pathway // *Immunity*, 1995. Vol. 2. P. 341–351.
118. *Haarman E. G., Kaspers G. I. L., Pieters R. et. al.* *Bcl-2*-expression, spontaneous and drug induced apoptosis in childhood leukemia: a pilot study // *Brit. J. Haemat.*, 1998. Vol. 102. № 1. P. 327.
119. *Hahn S., Stalder T., Wernli M., Burgin D., Tschopp J., Nagata S. and Erb P.* Down-modulation of CD4+ T helper type 2 and type 0 cells by T helper type 1 cells via Fas/Fas-ligand interaction // *Eur. J. Immunol.*, 1995. Vol. 25. № 9. P. 2679–2685.
120. *Hamazaki K., Gochi A., Matsubara N., Mori M., and Orita K.* Expression of Fas antigen and *Bcl-2* protein in hepatocellular carcinoma // *Acta. Med. Okayama*, 1995. Vol. 49. N 4. P. 227–230.

121. *Harada H., Kawano M. M., Huang N. et. al.* // *Blood*, 1993. Vol. 81. P. 2658–2663.
122. *Hata H., Matsuzaki H., Takeya M. et. al.* Expression of Fas/APO-1 (CD95) and apoptosis in tumor cells from patients with plasma cell disorders // *Blood*, 1995. Vol. 86. № 5. P. 1939–1945.
123. *Hawking H. K., Ericsson Y. L. E., Biberfeld P., and Trump B. F.* Lysosome and phagosome stability in lethal cell injury // *Am. J. Pathol.*, 1972. Vol. 68. P. 255–288.
124. *Heisterkamp N., Stefenson J. P., Groffen J. et. al.* Localisation of the c-abl oncogene adjacent to the translocation breakpoint in chronic myelogenous leukemia // *Nature*, 1983. Vol. 306. P. 239–242.
125. *Hengartner M. O., Ellis R. E. and Horvitz H. R.* Caenorhabditis elegans gene *ced-9* protects cells from programmed cell death // *Nature*, 1992. Vol. 356. P. 494–499.
126. *Herr I., Wilhelm D., Bohler T. et. al.*: Activation of CD95(APO-1/Fas) signaling by ceramide mediates cancer therapy-induced apoptosis // *EMBO J.*, 1997. Vol. 16. P. 6200–6208.
127. *Hickman J. A.* Apoptosis induced by anticancer drugs // *Cancer Metastasis Rev.*, 1992. Vol. 11. P. 121–139.
128. *Higashimoto I., Chihara J., Kakazu T. et. al.* Regulation of eosinophil cell death by adhesion to fibronectin // *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 1996. Vol. 111. Suppl 1. P. 66–69.
129. *Hirata H., Takahashi A., Kobayashi S. Y. et. al.* Caspases are activated in branched proteases cascade and control downstream processes in Fas-induced apoptosis // *J. Exp. Med.*, 1998. Vol. 187. P. 587–600.
130. *Ho D. D., Neuman A. U., Pereison A. S. et. al.* Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV infection // *Nature*, 1995. Vol. 373. P. 123.
131. *Holzman D.* Cellular apoptosis: on death and dying // *ASM News*, 1994. Vol. 60. № 12. P. 634.
132. *Homburg R., Amsterdam A.* Polycystic ovary syndrome loss of the apoptotic mechanism in the ovarian follicles? // *J. Endocrinol. Invest.*, 1998. Vol. 21. № 9. P. 552–557.
133. *Hsu H., Huang J., Shu H. B. et. al.* TNF-dependent recruitment of the protein kinase RIP to the TNF receptor-1 signaling complex // *Immunity*, 1996. Vol. 4. P. 387–396.

134. *Hu Y., Benedict M. A., Wu D. et. al.* *Bcl-xL* interacts with Apaf-1 and inhibits Apaf-1-dependent caspase-9 activation // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998. Vol. 95 P. 4386–4391.
135. *Huang S., Jiang Y., Li Z. et. al.* Apoptosis signaling pathway in T-cells is composed of ICE/Ced 3 family and MAP kinase kinase 6b // *Immunity*, 1997. Vol. 6. P. 739–749.
136. *Ito M., Watanabe M., Ihara T., Kamiya H. and Sakurai M.* Fas antigen and *Bcl-2* expression on lymphocytes cultured with cytomegalovirus and varicella-zoster virus antigen // *Cell-Immunol.*, 1995. Vol. 160. №. 2. P. 1.
137. *Itoh N., Yonehara S., Ishii A. et. al.* The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis // *Cell*, 1991. Vol. 66. P. 233.
138. *Itoh N., Nagata S.* A novel protein domain required for apoptosis // *Biol. Chem.*, 1993. Vol. 268. P. 10932–10937.
139. *Itoh N., Tsujimoto Y. and Nagata S.* Effect of *Bcl-2* on Fas antigen-mediated cell death // *J. Immunol.*, 1993. Vol. 151. P. 621–627.
140. *Ivanov V. E., Tolchko G. V., Shuvaeva L. P. and Ivanov E. P.* Increase of the myelodysplastic syndrome (MDS) incidence in Chernobyl-contaminated region of Belarus can be the first evidence of radiation-dependent leukemogenesis // *Eur. J. Cancer*, 1999. Vol. 35. Suppl. P. 333.
141. *Jacobson M. D., Burne J. E. and Raff M. C.* Programmed cell death and *Bcl-2* protection in the absence of a nucleus // *EMBO J.*, 1994. Vol. 13. P. 1899–1910.
142. *Jodo S., Kobayashi S., Nakajima Y. et. al.* Elevated serum levels of a soluble Fas/APO-1 (CD95) in patients with hepatocellular carcinoma // *Clin. Exp. Immunol.*, 1998. Vol. 112. P. 166–171.
143. *Ju S. T., Cui H., Panka D. J. et. al.* Participation of target Fas protein in apoptosis pathway induced by CD4+ Th1 and CD8+ cytotoxic T-cells // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1994. Vol. 91. № 10. P. 4185–4189.
144. *Ju S. T., Panka D., Cui H. et. al.* Fas(CD95)/FasL interactions required for programmed cell death after T-cell activation // *Nature*, 1995. Vol. 373. P. 444–448.
145. *Juo P., Kuo C. J., Yuan J., and Blenis J.* Essential requirement for caspase-8/FLICE in the initiation of the Fas-induced apoptotic cascade // *Curr. Biol.*, 1998. Vol. 8. P. 1001–1008.

146. *Jurlander J., Geiser C. and Hansen M. M.* Fas-receptor expression and function on B-CLL cells // In: «VIII International Workshop on CLL», 1999. P. 49.
147. *Kabelitz D., Marx S., Robertson M. J. et. al.* Rapid modulation of T-lymphocyte surface antigens induced by Fas(CD95/APO-1) ligation // *Cell. Immunol.*, 1996. Vol. 173. P. 108–115.
148. *Kamada S., Washida M., Hasegawa J. et. al.*: Involvement of caspase-4(-like) protease in Fas-meiated apoptotic pathway // *Oncogene*, 1997. Vol. 15. P. 285–290.
149. *Kamada S., Funahashi Y. and Tsujimoto Y.* Caspase-4 and caspase-5, members of the ICE/CED-3 family of cysteine proteases, are CrmA-inhibitable proteases // *Cell Death Different.*, 1997. Vol. 4. P. 473–478.
150. *Kamitani T., Nguyen H. P. and Yeh E. T. H.* Activation-induced aggregation and processing of the human Fas antigen // *The Journal of biological chemistry*, 1997. Vol. 272. № 35. P. 22307–22314.
151. *Kapranos N., Stathopoulos G. P., Manolopoulos L. et. al.* Apoptosis in relation to topoisomerase IIa, p53, p21 and p27 in head and neck cancer // *Eur. J. Cancer*, 1999. Vol. 35. Suppl. 4. P. 171.
152. *Karawajew L., Wuchter C., Ruppert V., Drexler H., Gruss H.-J., Dorken B. and Ludwig W.-D.* Differential CD95 expression and function in T and B lineage acute lymphoblastic leukemia cells // *Leukemia*, 1997. № 11. P. 1245–1252.
153. *Kato M., Hirai H., Imano M. et. al.* Induction of apoptosis in gastric cancer cells by neoadjuvant chemotherapy // Abstract book «17-th International Cancer Congress. 1998, Rio de Janeiro, Brasil». P. 12.
154. *Katsikis P. D., Wunderlich E. S., Smith C. A. et. al.* Fas antigen stimulation induced marked apoptosis of T-lymphocytes in human immunodeficiency virus-infected individuals // *J. Exp. Med.*, 1995. Vol. 181. P. 2029.
155. *Kaufmann S. H.* Proteolytic cleavage during chemotherapy-induced apoptosis // *Mol. Med Today*, 1996. Vol. 2. P. 269.
156. *Kerr J. F. R.* Shrinkage necrosis: A distinct mode of cellular death // *J. Pathol.* 1971. Vol. 105. P. 13.
157. *Kerr J. F. R., Wyllie A. N. and Currie A. R.* Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics // *Br. J. Cancer*, 1972. Vol. 26. P. 239–257.
158. *Kerr J. F. R., Winterford C. V. and Harmon B. V.* Apoptosis: Its significance in cancer and cancer therapy // *Cancer*, 1994. Vol. 73. № 8. P. 2013–2026.

159. *Kerr J. F. R., Gobe G. C., Winterford C. M., Harmon B. V.* Anatomical methods in cell death // *Methods in Cell Biology*, 1995. Vol. 46. P. 1–27.
160. *Kidd Vol. J.* Proteolytic activities that mediate apoptosis // *Annu. Rev. Physiol.*, 1998. Vol. 60. P. 533–73.
161. *Kirsch D. G., Doseff A., Nelson B. C., et. al.* Caspase-3-dependent Cleavage of *Bcl-2* Promotes Release of Cytochrome c* // *J. Biol. Chem.*, 1999. Vol. 274. Issue 30. P. 21155–21161.
162. *Kishi S., Kobayashi Y. and Nishimura Y.* Fas and CD3 signals involved in redundancy of immature human T-cell death // *Tissue antigens*, 1993. Vol. 42. № 4. P. 245.
163. *Kischkel F. C., Hellbards S., Behrmann I. et. al.*: Cytotoxicity-dependent APO-1(Fas/CD95)-associated Proteins form a death-inducing signalling complex(DISC) with the receptor // *EMBO J.*, 1995. Vol. 14. P. 5579–5588.
164. *Klass C., Debanin K-M., Jonker R. R. and Krammer P. H.* Activation interferes with the APO-1 pathway in mature human T cells // *Int. Immunology*, 1993. Vol. 5. P. 625–630.
165. *Kluck R. M., Bossy-Wezel T., Green D. R. and Newmeyer D. D.* The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for *Bcl-2* regulation of apoptosis // *Science*, 1997. Vol. 275. P. 1132–1136.
166. *Knipping E., Debatin K. M., Stricker K., Heilig B., Eder A. // Krammer P. H.* Identification of soluble APO-1 in supernatants of human B- and T-cell lines and increased serum levels in B- and T-cell leukemias // *Blood*, 1995. Vol. 85. № 6. P. 1562–1569.
167. *Kobayashi N., Hamamoto Y.* Anti-Fas monoclonal antibody is cytotoxic to human immunodeficiency virus-infected cells without augmenting viral replication // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1990. Vol. 87. P. 9620–9624.
168. *Koeffler H. P., Golde D. W.* Chronic myelogenous leukemia: new concepts // *New Engl. J. Med.*, 1981. Vol. 304. P. 1201.
169. *Koizumi H., Wakisaka M., Nakada K. et. al.* Demonstration of apoptosis in neuroblastoma and its relationship to tumour regression // *Virchows-Arch.*, 1995. Vol. 427. № 2. P. 167–73.
170. *Kolesnick R., Golde D.* The sphingomyelin pathway in tumor necrosis factor and interleukin-1 signaling // *Cell*, 1994. Vol. 77. P. 325–328.
171. *Korsmeyer S. J.* *Bcl-2* initiates a new category of oncogenes: regulators of cell death // *Blood*, 1992. Vol. 80. P. 879–886.

172. *Kotani T., Aratake Y., Kondo S., Tamura K. and Ohtaki S.* Expression of functional Fas antigen on adult T-cell leukemia // *Leuk-Res.*, 1994. Vol. 18. № 4. P. 305–310.
173. *Kothakota S., Asuma T., Reinhard C. et. al.*: Caspase-3-generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis // *Science*, 1997. Vol. 278. P. 294–298.
174. *Krammer P. K., Behrmann I., Bier V. et. al.* Apoptosis in the APO-1 system. In: Tomei D., Cope F. (eds): *Apoptosis: the Molecular Basis of cell Death*. Cold Spring Harbor, NY, Gold Spring Harbor Laboratory. 1991. P. 87.
175. *Kroemer G.* The pharmacology of T-cell apoptosis // *Adv. Immunol.*, 1995. Vol. 58. P. 211–296.
176. *Kroemer G., Petit P. X., Zumzumani N. et. al.* The biochemisty of apoptosis // *FASEB J.*, 1995. Vol. 9. P. 1277–1287.
177. *Kyprianov N., English H. F., Davidson N. E. and Isaacs Y. T.* Programmed cell death during regression of the MCF-7 human breast cancer following estrogen ablation // *Cancer Res.*, 1991. Vol. 51. P. 162.
178. *Lugresle C., Bella C., Daniel P. T. et. al.* Regulation of germinal center B-cell differentiation. Role of the human APO-1/Fas (CD95) molecule // *J. Immunol.*, 1995. Vol. 154. № 11. P. 5746–5756.
179. *Laiho K. U., Berezsky I. K. and Trump B. F.* The role of calcium in cell injury: studies in Ehrlich ascites tumor cells following injury with anoxia and arganie mercurials // *Surv. Synth Pathol. Res.*, 1983. Vol. 2. P. 170–183.
180. *Laurent-Crawford A. G., Krust B., Muller S. et. al.* The cytopatic effect of HIV is associated with apoptosis // *Virology*, 1991. Vol. 185. P. 829.
181. *Lazebnik Y. A., Kaufmann S. H., Desnoyers S. et. al.* Cleavage of poly(ADP-ribose)polymerase by a proteinase with properties like ICE // *Nature*, 1994. Vol. 371. P. 346–347.
182. *Lee N., MacDonald H., Reinhard C. et. al.*: Activation of hPAK65 by caspase cleavage induces some of the morphological and biochemical changes of apoptosis // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997. Vol. 94. P. 13642–13647.
183. *Lenczowski J. M., Dominguez L., Eder A. M. et. al.* Lack of a role for Jun kinase and AP-1 in Fas-induced apoptosis // *Mol. Cell. Biol.*, 1997. Vol. 17. P. 170–181.
184. *Lepelley P., Campergue L., Grardel N. et. al.* Is apoptosis a massive process in myelodysplastic syndromes? // *Br. J. Haemat.*, 1996. Vol. 95. № 2. P. 368–71.

185. *Levkau B., Herren B., Koyama H. et. al.*: Caspase-mediated cleavage of focal adhesion kinase pp125 and disassembly of focal adhesions in human endothelial cell apoptosis // *J. Exp. Med.*, 1998. Vol. 187. P. 579–586.
186. *Levy J.* Pathogenesis of human immunodeficiency virus induction // *Microbiol. Rev.*, 1993. Vol. 57. P. 183.
187. *Li H., Zhu H., Xu C. J. and Yuan J.* Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis // *Cell*, 1998. Vol. 94. P. 491–501.
188. *Li P., Allen H., Banerjee S. and Seshadri T.* Characterization of mice deficient in interleukin-1 β converting enzyme // *J. Cell. Biochem.*, 1997. Vol. 64. P. 27–32.
189. *Li P., Nijhawan D., Budihardjo I., Srinivasula S. M. et. al.* Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease caspase // *Cell*, 1997. Vol. 91. P. 479–489.
190. *Liles W. C., Klebanoff S. J.* Regulation of apoptosis in neutrophils—Fas track to death? // *J. Immunol.*, 1995. Vol. 155. № 7. P. 3289–3291.
191. *Liu Z. G., Hsu H., Goaddel D. et. al.* Dissection of TNF receptor 1 effector functions: JNK activation is not linked to apoptosis while NF- κ B activation prevents cell death // *Cell*, 1996. Vol. 87. P. 565–576.
192. *Liu X., Kim C. N., Yang J. et. al.* Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for d ATP and cytochrome C // *Cell*, 1996. Vol. 86. P. 147–157.
193. *Liu Y., Cigola E., Cheng W., Kajstura J., Olivetti G., Hintze T. H. and Anversa P.* Myocyte nuclear mitotic division and programmed myocyte cell death characterize the cardiac myopathy induced by rapid ventricular pacing in dogs // *Lab-Invest.*, 1995. Vol. 73. № 6. P. 771–787.
194. *Lowin B., Mattman C., Hahne M. and Tschopp J.* TI: Comparison of Fas(APO-1/CD95)- and perforin-mediated cytotoxicity in primary T-lymphocytes // *SO: Int-Immunol.*, 1996. Vol. 8. № 1. P. 57–63.
195. *Lu Y. Y., Koga Y., Tanaka K. et. al.* Apoptosis induced in CD4 $^{+}$ -cells expressing gp160 of human immunodeficiency virus type 1 // *SO: J-Virol.*, 1994. Vol. 68. № 1. P. 390–399.
196. *Lucking-Fumira K. M., Daniel P. T., Moller P., Krummer P. H. and Debatin K. M.* APO-1 (CD95) mediated apoptosis in human T-ALL engrafted in SCID mice // *Leukemia*, 1994. Vol. 8. № 11. P. 1825–1833.

197. Luo X., Budihardjo I., Zou H., et. al. Bid, a *Bcl-2* interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors // *Cell*, 1998. Vol. 94. P. 481–490.
198. Lynch D. H., Ramsdell F., Alderson M. R. Fas and FasL in the homeostatic regulation of immune responses // *Immunol-Today*, 1995. Vol. 16. № 12. P. 569–574.
199. Maciejewski J. P., Selleri C., Sato T. et. al. Increased expression of Fas antigen on bone marrow CD34+ -cells of patients with aplastic anaemia // *Br. J. Haematol.*, 1995. Vol. 91. № 1. P. 245–252.
200. Mainou-Fowler T., Craig Vol. A., Copplestone A. J., Hamon M. D. and Prentice A. G. Effect of anti-APO-1 on spontaneous apoptosis of B-cells in chronic lymphocytic leukaemia: the role of *Bcl-2* and interleukin 4 // *Leuk-Lymphoma*, 1995. Vol. 19. № 3–4. P. 301–308.
201. Mapara M. Y., Bargou R., Zugck C. et. al. APO-1-mediated apoptosis or proliferation in human chronic B lymphocytic leukemia: correlation with *Bcl-2* oncogene expression // *Eur. J. Immunol.*, 1993. Vol. 23. P. 702–708.
202. Marchetti P., Zamzami N., Susin S. A. et. al. Apoptosis of cells lacking mitochondrial DNA // *Apoptosis*. 1996. Vol. 1. P. 119–125.
203. Mariani S. M., Matibu B., Baumer C., Krammer P. H. Regulation of cell surface APO-1/Fas (CD95) ligand expression by metalloproteases // *Eur. J. Immunol.*, 1995. Vol. 25. P. 2303.
204. Martin S. J., Green D. R. and Cotter T. G. Dicing with death: dissecting the components of the apoptosis machinery // *Trends Biochem. Sci.*, 1994. Vol. 19. P. 28–30.
205. Martin S. J., Green D. R. Protease activation during apoptosis // *Cell*, 1995. Vol. 82. P. 349–352.
206. Martikainen P., Kyprianov N., Tucker R. W. and Isaacs J. T. Programmed death of non proliferating antigen-independent prostatic cancer cells // *Cancer Res.*, 1991. Vol. 51. P. 4693.
207. Massaia M., Borriore P., Attisano C., Barral P., Beggiato P., Montacchini L., Beanchi A., Boccardo M. and Pileri A. Dysregulated Fas and *Bcl-2* expression leading to enhanced apoptosis in T-cell of multiple myeloma patients // *Blood*, 1995. Vol. 85. P. 3679–3687.
208. Matsumoto K., Schleimer R. P., Suito et. al. Induction apoptosis in human eosinophils by anti-Fas antibody treatment in vitro // *Blood*, 1995. Vol. 86. P. 1437–1443.

209. *Medema J. P., Scaffidi C., Kischkel F. C. et. al.* FLICE is activated by association with the CD95 death-inducing signaling complex (DISC) // *EMBO J.*, 1997. Vol. 16. P. 2794–2804.
210. *Medema J. P., Toes R. E. M., Scaffidi C. et. al.* Cleavage of FLICE by granzyme B during cytotoxic T-lymphocyte-induced apoptosis // *Eur. J. Immunol.*, 1997. Vol. 27 P. 3492–3498.
211. *Meroni L., Varchetta S., Milazzo L., Rusconi S. and Galli M.* CD95 Workshop: Workshop anti-Fas monoclonal antibodies reactivity and induced apoptosis on peripheral blood lymphocytes // *Leucocyte typing VI: White Cell Differentiation Antigens. Part 9 Cytokine Receptors*, Eds. T. Kishimoto, S. Goyert, H. Kikutani et. al., 1996. P. 809–810.
212. *Mignotte B. and Vayssiere.* Mitochondria and apoptosis // *Eur. J. Biochim.*, 1998. Vol. 252. P. 1–15.
213. *Minn A. J., Velez P., Schendel S. L. et. al.* *Bcl-xL* forms an ion channel in synthetic lipid membranes // *Nature*, 1997. Vol. 385. P. 353–357.
214. *Mita E., Hayashi N., Ito S. et. al.* Role of Fas-ligand in apoptosis induced by hepatitis C virus infection // *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1994. Vol. 204. P. 468–474.
215. *Miyawaki T., Uehara T., Nibu R. et. al.* Differential expression of apoptosis-related Fas antigen on lymphocyte subpopulations in human peripheral blood // *J. Immunol.*, 1992. Vol. 149. P. 3753–3758.
216. *Mochizuki K., Hayashi N., Hiramatsu N., Katayama K., Kawanishi Y., Kasahara A., Fusamoto H. and Kamada T.* Fas antigen expression in liver tissues of patients with chronic hepatitis B // *J. Hepatol.*, Vol. 24. P. 1–7.
217. *Mogil R. J., Radvunyi L., Gonzalez-Quintial R. et. al.* Fas (CD95) participates in peripheral T-cell deletion and associated apoptosis in vivo // *Int. Immunol.*, 1995. Vol. 7. № 9. P. 1451–1458.
218. *Molica S., Mannella A., Dattilo A., Levato D., Iuliano F., Peta A., Consarino C. and Magro S.* Differential expression of *Bcl-2* oncoprotein and Fas antigen on normal peripheral blood and leukemic bone marrow cells. A flow cytometric analysis // *Haematologica*, 1996. Vol. 81. № 4. P. 302–309.
219. *Moller P., Henne C., Leithauser F. et. al.* Correlation of the APO-1 antigen with intercellular adhesion molecule-1 (CD54) in tonsillar B-cells and coordinate expression in follicular center B-cells and in follicle center and mediastinal B-cell lymphomas // *Blood*, 1993. Vol. 81. P. 2067–2075.

220. *Moller P., Koretz K., Leithauser F., Bruderlein S., Henne C., Quentmeier A. and Krammer P. H.* Expression of APO-1 (CD95), a member of the NGF/TNF receptor superfamily, in normal and neoplastic colon epithelium // *Int.-J. Cancer*, 1994. Vol. 57. № 3. P. 371–377.
221. *Moreno M. B., Memon S. A. and Zacharchuk C. M.* Apoptosis signaling pathways in normal T-cells: differential activity of *Bcl-2* and *IL-1*beta-converting enzyme family protease inhibitors on glucocorticoid- and Fas-mediated cytotoxicity // *J. Immunol.*, 1996. Vol. 157. № 9. P. 3845–3849.
222. *Morimoto H., Yonehara S. and Bonavida B.* Overcoming tumor necrosis factor and drug resistance of human tumor cell lines by combination treatment with anti-Fas antibody and drugs or toxins // *Cancer Res.*, 1993. Vol. 53. P. 2591–2593.
223. *Mountz J. D., Wu J., Cheng J. and Zhou T.* Autoimmune disease. A problem of defective apoptosis. *Arthritis-Rheum.*, 1994. Vol. 37. № 10. P. 1415–1420.
224. *Muller K. P., Mariani S. M., Matiba B., Kyewski B. and Krammer P. H.* Clonal deletion of major histocompatibility complex class I-restricted CD4+CD8+ thymocytes in vitro is independent of the CD95 (APO-1/Fas) ligand // *Eur. J. Immunol.*, 1995. Vol. 25. № 10. P. 2996–2999.
225. *Munck A., Crabtree G. R.* Glucocorticoid-induced lymphocyte death // In: Bowen I. D., Lockshin R. A. eds. *Cell death in biology and pathology*. London: Chapman and Hall, 1981. P. 324–359.
226. *Munker R., Lubbert M., Yonehara S. et. al.* Expression of the Fas antigen on primary human leukemia cells // *Ann. Hematol.* 1995. Vol. 70. P. 15–17.
227. *Muzio M., Chinnaiyan A. M., Kischel F. C. et. al.* FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95(Fas/APO-1) death-inducing signaling complex (DISC) // *Cell*, 1996. Vol. 85. P. 817–827.
228. *Mysler E., Bini P., Drappa J., Ramos P., Friedman S. M., Krammer P. H. and Elkon K. B.* The apoptosis-1/Fas protein in human systemic lupus erythematosus. *J. Clin. Invest.*, 1994. Vol. 93. № 3. P. 1029–1034.
229. *Nakajima H., Golstein P. and Henkart P. A.* The target cell nucleus is not required for cell-mediated granzyme- or Fas-based cytotoxicity // *J. Exp. Med.*, 1995. Vol. 181. P. 1905–1909.
230. *Nagata S.* Apoptosis regulated by a death factor and its receptor: Fas-ligand and Fas // *The role of apoptosis in development, tissue homeostasis and malignancy*. Chapman and Hall, 1995. P. 45–51.

231. *Natoli G., Ianni A., Costanzo A., De Petrilla G., Ilari I., Chirillo P., Balsano C. and Levvero M.* Resistance to Fas-mediated apoptosis in human hepatoma cells. *Oncogene*, 1995. Vol. 11. № 6. P. 115.
232. *Natoli G., Costanzo A., Ianni A. et. al.* Activation of SAPK/JNK by TNF receptor 1 through a noncytotoxic TRAF2-dependent pathway // *Science*, 1997. № 275. P. 200–203.
233. 214. *Nicholson D. W.* ICE/CED3-like proteases as therapeutic targets for the control of inappropriate apoptosis // *NB*. Vol. 14. P. 297. 1996.
234. *Nishimura T., Akiyama H., Yonehara S., Kondo H., Ikeda K., Kato M., Iseki E. and Kosaka K.* Fas antigen expression in brains of patients with Alzheimer-type dementia // *Brain Res.*, 1995. Vol. 695. № 2. P. 137–145.
235. 215. *Nishimura Y., Ishii A., Kobayashi Y., Yamasaki Y. and Yonahara S.* Expression and function of mouse Fas antigen on immature and mature T-cells // *J. Immunology*, 1995. Vol. 154. № 9. P. 4395.
236. *Nishimura Y., Hirabayashi Y., Matsuzaki Y., Musette P., Ishi A., Nakauchi H., Inoue T. and Yonehara S.* In vivo analysis of Fas antigen-mediated apoptosis: effects of agonistic anti-mouse Fas mAb on thymus, spleen and liver // *International Immunology*, 1997. Vol. 9. № 2. P. 307–316.
237. *Nuñez G., Merino R., Grillo D. and Gonzalez-Garcia.* *Bcl-2* and *Bcl-x* regulatory switches for lymphoid death and survival // *Immunology Today*, 1994. Vol. 15. P. 582–587.
238. 217. *Oberg H.-H., Pohl T., Wesch D., Marx S., Janssen O. and Kabelitz D.* CD95 Workshop: Effect of anti-cytokine-receptor Workshop antibodies on activation-induced death of T-lymphocytes // *Leucocyte typing VI: White Cell Differentiation Antigens. Part 9 Cytokine Receptors*, Eds. T. Kishimoto, S. Goyert, H. Kikutani et. al. 1996. P. 810–811.
239. *Ohsako S., Hara M., Harigai M., Fukasawa C., Kushiwazaki S.* Expression and function of Fas antigen and *Bcl-2* in human systemic lupus erythematosus lymphocytes // *Clin-Immunol-Immunopathol.*, 1994. Vol. 73. № 1. P. 109–114.
240. *Oehm A., Behrmann I., Falk W. et. al.* Purification and molecular cloning of the APO-1 cell surface antigen, a member of the tumor necrosis factor/nerve growth factor receptor superfamily: sequence identity with the Fas antigen // *J. Biol. Chem.*, 1993. Vol. 268. P. 10932–10937.
241. 219. *Ogasawara J., Watanabe-Fukunaga R., Adachi M., Matsuzawa A., Kasugai T., Kitamura Y., Iton N., Suda T. and Nagata S.* Lethal effect

- of the anti-Fas antibody in mice // *Nature*, 1993. Vol. 364. № 6440. P. 806-809.
242. *Ogasawara J., Sudu T. and Nagata S.* Selective apoptosis of CD4+CD8+ thymocytes by the anti-Fas antibody // *J. Exp. Med.*, 1995. Vol. 181. № 2. P. 485-491.
243. *Oishi M., Maeda K. and Sugiyama S.* Distribution of apoptosis-mediating Fas antigen in human skin and effects of anti-Fas monoclonal antibody on human epidermal keratinocyte and squamous cell carcinoma cell lines // *Arch-Dermatol- Res.*, 1994. Vol. 286. № 7. P. 396-407.
244. *Oka M., Hazama S., Suzuki M., Ogura Y., Kobayashi N. and Suzuki T.* Histological analysis of hepatocellular carcinoma treated by intraarterial combined immunochemotherapy // *Hepatogastroenterology*, 1995. Vol. 42. № 5. P. 561-566.
245. *Okazaki M., Keisuke H., Fujii K. et. al.* Hepatic Fas antigen expression before and after and after interferon therapy in patients with chronic hepatitis C // *Digest. Dis. Sci.*, 1995. Vol. 41. P. 2453-2458.
246. *Oltvai Z., Millman C. L., Korsmeyer S. J.* *Bcl-2* heterodimerises in vivo with a conserved homolog, *Bax*, that accelerates programmed cell death // *Cell*, 1993. Vol. 74. P. 609-619.
247. *Owen-Schaub L. B., Yonehara S., Crump W. L. III and Grimm E. A.* DNA fragmentation and cell death is selectively triggered in activated human lymphocytes by Fas antigen engagement // *Cell Immunol.*, 1992. Vol. 140. P. 197-205.
248. *Owen-Schaub L.* Fas/APO-1: A cell surface protein mediating apoptosis // *Cancer Bulletin.*, 1994. Vol. 46. № 2. P. 141-145.
249. *Owen-Schaub L. B., Radinsky R., Berry K. and Yonehara S.* Anti-Fas on nonhematopoietic tumors: levels of Fas/APO-1 and *Bcl-2* are not predictive of biological responsiveness // *Cancer Res.*, 1994. Vol. 54. P. 1580-1586.
250. *Owen-Schaub L. B., Angelo L. S., Radinsky R., Ware C. F., Gesner T. G. and Bartos D. P.* Soluble Fas/APO-1 in tumor cells: a potential regulator of apoptosis? // *Cancer. Lett.*, 1995. Vol. 94. № 1. P. 1-8.
251. *Oyaizu N., McCloskey T. W., Than S., Hu R. and Pahuw S.* Mechanism of apoptosis in peripheral blood mononuclear cells of HIV-infected patients // *Adv. Exp. Med. Biol.*, 1995. 374. P. 101-114.
252. *Pan G., O'Rourke K., Dixit Vol. M. et. al.* Caspase-9, *Bcl-Xl* and *Apaf-1* form a ternary complex // *J. Biol. Chem.*, 1998. Vol. 273. P. 5841-5845.

253. *Panayiotidis P., Ganeshaguru K., Foroni L. and Hoffbrand A. V.* Expression and function of the FAS antigen in B chronic lymphocytic leukemia and hairy cell leukemia // *Leukemia*, 1995. Vol. 9. № 7. P. 1227–1232.
254. *Peitsch M. C., Tschopp J.* Comparative molecular modelling of the Fas-ligand and other members of the TNF family // *Mol. Immunol.*, 1995. Vol. 32. № 10. P. 761–772.
255. *Peter M. E., Dhein J., Ehret A., Hellbardt S., Walczak H., Moldenhauer G. and Krammer P. H.* APO-1 (CD95)-dependent and independent antigen receptor-induced apoptosis in human T- and B-cell lines // *Int. Immunol.*, 1995. Vol. 7. № 11. P. 1873–1877.
256. *Pollard J. W., Pacey J., Cheng S. V. and Jordan E. G.* Estrogens and cell death in murine uterine luminal epithelium // *Cell Tissue Res.*, 1987. Vol. 249. P. 533–540.
257. *Quirk S. M., Cowan R. G. and Huber S. H.* Fas antigen-mediated apoptosis of ovarian surface epithelial cells // *Endocrinology*, 1997. Vol. 138. № 11. P. 4558–4566.
258. *Rathmell J. C., Townsend S. E., Xu J. C., Flavell R. A. and Goodnow C. C.* Expansion or elimination of B cells in vivo: dual roles for CD40- and Fas (CD95)-ligands modulated by the B-cell antigen receptor // *Cell*, 1996. Vol. 87. № 2. P. 319–329.
259. *Reed J. C., Kitada S., Takayama S. and Miyashita T.* Regulation of chemoresistance by the *Bcl-2* oncoprotein in non-Hodgkin's lymphoma and lymphocytic leukemia cell lines // *Ann. Oncol.*, 1994. Vol. 5. Suppl. 1. S. 61–65.
260. *Rensing-Ehl A., Frei K., Flury R., Matiba B., Muriani S. M., Weller M., Aebischer P., Krammer P. H. and Fontana A.* Local Fas/APO-1 (CD95) ligand-mediated tumor cell killing in vivo // *Eur. J. Immunol.*, 1995. № 8. P. 2253–2258.
261. *Rheume E., Cohen L. Y., Uhlmann F. et al.* The large subunit of replication factor C is a substrate for caspase-3 in vitro and is cleaved by a caspase 3-like protease during Fas-mediated apoptosis // *EMBO J.*, 1997. Vol. 16. P. 6346–6354.
262. *Richardson B. C., Lulwani N. D., Johnson K. J. and Marks R. M.* Fas-ligation triggers apoptosis in macrophages but not endothelial cells // *Eur. J. Immunol.*, 1994 Vol. 24. № 11. P. 2640–2645.
263. *Robertson L. E., Plunkett W.* Apoptotic cell death in chronic lymphocytic leukemia // *Leukemia & Lymphoma*, 1993. Vol. 11. Suppl. 2. P. 71–74.

264. *Robertson M. J., Ritz J.* Cluster report: CD95 // *Leukocyte Typing V*. Ed. Schlossman S. F. et. al. Boston: Oxford University Press, 1995. Vol. 2. P. 1142–1143.
265. *Robertson M. J., Manley T. J., Pichert G., Cameron C., Cochran K. J., Levine H., Ritz J.* Functional consequences of APO-1/Fas (CD95) antigen expression by normal and neoplastic hematopoietic cells // *Leuk-Lymphoma*, 1995. Vol. 17. № 1–2. P. 51–61.
266. *Robertson M. J., Ritz J. and Wang D.* CD95 Workshop: Characterization of CD95 monoclonal antibodies. Epitope specificities and functional effects // In: *Leukocyte Typing VI*. Ed. by T. Kishimoto et. al. Garland Publ., Inc. NY & London, 1997. P. 812–814.
267. *Rodriguez-Tarduchy G., Collins M. and Lopez-Rivas A.* Regulation of apoptosis in interleukin-3-dependent hemopoietic cells by interleukin-3 and calcium ionophores // *EMBO J.*, 1990. Vol. 9. P. 2997.
268. *Rokhlin O. W., Bishop G. A., Hostager B. S., et. al.* Fas-mediated apoptosis in human prostatic carcinoma cell lines // *Cancer Res.*, 1997. Vol. 57. P. 1758–1768.
269. *Roovers D. J., Van Vliet M., Martinotti A. et. al.* Idarubicin overcomes P-glycoprotein-related multidrug resistance: comparison with doxorubicin and daunorubicin in human multiple myeloma cell lines // *Brit. J. Haemat.*, 1998. Vol. 102. P. 354.
270. *Rotello R. J., Liberman R. C., Lepoff R. B. and Gerschenson L. E.* Coordinated regulation of apoptosis and cell proliferation by TGF- β 1 in cultured uterine epithelial cells // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1992. Vol. 88. P. 3412–3415.
271. *Rowan S., Ludwig R. L.* Specific loss of apoptotic but not cell cycle arrest function in human tumor derived p-53 mutant // *EMBO J.*, 1996. Vol. 15. P. 827–838.
272. *Rowley L. F.* Ph-positive leukemia, including chronic myelogenous leukemia // *Nature*, 1973. Vol. 243. P. 290–293.
273. *Rose L. M., Latchman D. S. and Isenberg D. A.* Bcl-2 and Fas, molecules which influence apoptosis. A possible role in systemic lupus erythematosus? // *Autoimmunity*, 1994. Vol. 17. № 4. P. 271–278.
274. *Rubin M., Thompson B.* Apoptosis and disease // *Annu. Rev. Med.*, 1997. Vol. 48. P. 267–281.
275. *Russell J. H.* Activation-induced death of mature T-cells in the regulation of immune responses // *Curr. Opin. Immunol.*, 1995. Vol. 7. № 3. P. 382–388.