

Институт экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии им. Р.Е. Кавецкого НАН Украины, Киев, Украина

Ключевые слова:

противоопухолевая терапия, эффективность лечения, прогноз, апоптоз, некроз, маркеры апоптоза, иммуногистохимия, иммуноферментный анализ, цитокератин-18, нуклеосомная ДНК, цитохром с, сыворотка крови, моча, ОФЭКТ, ПЭТ, радиофармпрепарат, аннексин V, МР-спектроскопия, таурин, холинсодержащие метаболиты.

ВИЗУАЛИЗАЦИЯ И ОЦЕНКА АПОПТОЗА, ВЫЗВАННОГО ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ ТЕРАПИЕЙ: КЛИНИЧЕСКИЕ ПЕРСПЕКТИВЫ

Резюме. Гибель опухолевых клеток в ответ на терапевтические воздействия чаще всего реализуется через программу апоптоза. При этом степень интенсивности апоптоза опухолевых клеток рассматривается в качестве одного из суррогатных маркеров чувствительности/резистентности больного к проводимой терапии. В обзоре рассмотрены молекулярные механизмы апоптоза и основные маркеры, позволяющие выявлять апоптотические клетки в биопсийном или операционном материале от онкологических больных. Описаны подходы, используемые для оценки прогноза и/или эффективности проводимой терапии по маркерам апоптоза в опухолевой ткани и биологических жидкостях больных. Особое внимание уделено современным неинвазивным технологиям визуализации и количественного анализа апоптоза *in vivo*.

ВВЕДЕНИЕ

После открытия феномена апоптоза (Ап) [1] стало очевидным, что гибель эукариотических клеток происходит не только вследствие их случайного повреждения или старения, но и в результате активации определенной генетической программы. Определяющее биологическое значение программируемой гибели клеток (Ап) связано с поддержанием оптимальной численности клеток в органах и тканях путем удаления «избыточных» и функционально аномальных клеток, включая злокачественно трансформированные клетки. Как известно, устойчивость к Ап рассматривается как одно из наиболее характерных свойств опухолевых клеток (ОК) [2]. Накопленные в литературе данные о механизмах цитотоксического действия различных лекарственных препаратов и ионизирующего излучения свидетельствуют о том, что в ответ на воздействие этих повреждающих агентов в ОК часто активируется программа Ап. Более того, многие исследователи рассматривают степень интенсивности Ап ОК в качестве одного из суррогатных маркеров чувствительности/резистентности больного к проводимой терапии. Например, показатель апоптотического индекса (параметр, который характеризует долю клеток с морфологическими или биохимическими признаками Ап) ОК является фактором прогноза клинического ответа на неoadъювантную химиотерапию (ХТ) у больных раком молочной железы либо на комбинированное химиолучевое лечение в случаях операбельного рака прямой кишки [3, 4].

Для выявления и изучения клеток, находящихся в состоянии Ап, разработано множество разнообразных методов и их модификаций. Эти методы базируются на регистрации событий, связанных с:

1) уменьшением размеров и увеличением плотности клеток;

2) изменениями состава наружной мембраны клеток;

3) избирательной фрагментацией ядерной ДНК;

4) изменениями содержания молекулярных маркеров Ап (или их перераспределением в погибающей клетке).

Поскольку морфологические и биохимические особенности апоптотических клеток (АК) являются общими для любых эукариотических клеток (хотя у разных типов клеток степень выраженности таких особенностей может быть различной) и не зависят от природы индуктора Ап, то и методы визуализации Ап носят, в общем, универсальный характер. Вместе с тем следует признать, что стандартного метода для выявления АК *in vivo* пока не существует. Исключение составляет трансмиссионная или сканирующая электронная микроскопия, но из-за высокой стоимости оборудования, длительности анализа и возможности оценивать лишь небольшое количество клеток метод не имеет широкого применения. Поэтому для верификации Ап рекомендуется использовать комбинации нескольких методик [5].

Как известно, АК в условиях *in vivo* быстро элиминируются макрофагами [6]. При этом спонтанный Ап в очаге опухоли не достигает значительного уровня, а его увеличение (в 2–6 раз) в ответ на терапевтические воздействия обычно не превышает 5–15% ОК [7, 8]. Кроме того, учитывая гетерогенность опухолевого очага, вероятно допустить, что точность результатов, полученных при исследовании образцов биопсийного материала, может не в полной мере отражать картину, характерную для всей массы опухоли. Эти обстоятельства обуславливают необходимость разработки новых методов, пригодных для визуализации и, главное, количественной оценки Ап, которые бы по своей чув-

ствительности, специфичности, воспроизводимости результатов и стоимости отвечали современным потребностям клиники.

Следует иметь в виду, что Ап не единственный тип гибели клеток, индуцированный противоопухолевой терапией. В зависимости от типа клеток, их генотипа, природы вызванных повреждений ДНК, а также дозы противоопухолевого агента гибель клеток может происходить путем Ап, программируемого некроза или митотической катастрофы [9]. Причем в клетках опухолевого очага, чувствительных к терапевтическому воздействию, эти разные типы клеточной гибели могут инициироваться одновременно. Тем не менее во многих клинических ситуациях была доказана возможность использования определения маркеров Ап у онкологических больных в качестве самостоятельного фактора прогноза и/или оценки эффективности проводимой терапии. Прежде чем перейти к анализу методов и технологий визуализации Ап, мы кратко остановимся на освещении вопросов, касающихся определения сущности процесса Ап и основных механизмов его регуляции.

ЧТО ТАКОЕ АПОПТОЗ И КАК ОН РЕАЛИЗУЕТСЯ?

Согласно рекомендациям международного Комитета по номенклатуре клеточной гибели следует различать следующие ее типы: Ап, аутофагию, некроз, митотическую катастрофу, апоптоз, эксайто-токсичность, валлеровское перерождение, орогование, паратоз, пироптоз, пиронекроз и энтоз [10]. В зависимости от участия в программе гибели клетки внутриклеточных ферментов семейства каспаз (Касп) различают 2 группы типов клеточной смерти. К первой из них, получившей название апоптотической (для развития которой необходима активация Касп), относятся Ап, апоптоз и пироптоз. Все остальные типы гибели называют неапоптотическими и для их реализации Касп не требуются. Таким образом, под Ап сегодня принято понимать каспазозависимый процесс упорядоченной гибели отдельных клеток, который происходит в нормальных и патологически измененных органах и тканях организма под действием внеклеточных или внутриклеточных стимулов.

Процесс Ап состоит из ряда последовательных событий, которые можно условно разделить на 3 фазы. Во время *сигнальной* фазы клетка воспринимает сигнал, инициирующий Ап. Затем активируются эффекторные внутриклеточные механизмы гибели (*эффекторная* фаза), что неизбежно приводит к *деструктивной* фазе, при которой отмечают расщепление ДНК и другие необратимые изменения биополимеров цитоплазмы и ядра клетки. После инициации Ап экзо- или эндогенными активаторами клетки сжимаются, округляются и утрачивают контакты с окружающими клетками и внеклеточным матриксом. Потом происходит конденсация содержимого цитоплазмы и ее вакуолизация, агрегация

хроматина и фрагментация ядра, а позже — фрагментация клетки с образованием апоптотических телец, которые ограничены плазматической мембраной. В условиях *in vivo* такие тельца, а также погибающие клетки подвергаются быстрому фагоцитозу.

Если говорить упрощенно, то в клетке Ап инициируется либо при участии рецепторов клеточной поверхности («рецепторов смерти»), либо вследствие повреждений внутриклеточных структур (чаще всего митохондрий (М)). Исходя из этого, разделяют рецепторный и митохондриальный пути реализации Ап. Оба этих сигнальных пути приводят к активации каспазного каскада. Как известно, Касп представляют собой семейство цистеиновых протеаз, расщепляющих молекулы своих субстратов после остатков аспарагиновой кислоты. Непосредственное участие в реализации Ап принимают только 7 из 12 каспаз, выявленных у человека (см. обзор [11]). В зависимости от функции их разделяют на два типа: инициаторные (Касп-2, -8, -9, -10) и эффекторные (Касп-3, -6, -7). Активация инициаторных каспаз происходит путем аутопротеолиза прокаспазных молекул после олигомеризации последних в составе сигнальных мультимерных белковых комплексов. Для активации эффекторных каспаз необходимо действие инициаторных каспаз — такой процесс последовательной (и необратимой) активации этих эндопептидаз называют каспазным каскадом.

«Рецепторы смерти» представляют собой трансмембранные белки I типа, для которых характерно наличие в цитоплазматической части молекулы участка размером около 80 аминокислотных остатков (а. о.), называемого «доменом смерти» (death domain — DD). Функция таких рецепторов заключается в распознавании внеклеточного «лиганда смерти» и активации в клетке эффекторных механизмов Ап. К «рецепторам смерти» относят рецептор фактора некроза опухоли (TNFR1), Fas, DR3, TRAILR-1, TRAILR-2 и DR6. В результате связывания «лигандов смерти» со своими специфическими рецепторами в клетке образуется особый белковый комплекс DISC (death-inducing signaling complex), инициирующий развитие Ап [12]. С активированными рецепторами Fas, TRAILR-1 и TRAILR-2 связывается (через DD-DD-взаимодействие) адаптерный белок FADD, который содержит также «эффекторный домен смерти» (death effector domain — DED). Этот домен участвует в связывании белка FADD (через DED-DED-взаимодействие) с неактивными проформами Касп-8 или Касп-10. После того, как прокаспаза-8 (или прокаспаза-10 в условиях недостаточного содержания прокаспазы-8) становится частью комплекса DISC, происходит ее олигомеризация с последующим аутопротеолизом и активацией. Затем Касп-8/-10 в свою очередь активирует эффекторные Касп-3 и -7, которые расщепляют многочисленные субстраты, отвечающие за поддержание жизнеспособности клетки.

Инициация Ап через митохондриальный сигнальный путь происходит вследствие пермеабилити-

зации либо разрывов наружной митохондриальной мембраны, что способствует выходу в цитоплазму ряда апоптогенных факторов (цитохрома *c*, Smac, AIF, эндонуклеазы G и др.). В частности, цитохром *c*, попав в цитозоль, связывается с адаптерным белком Araf-1 и прокаспазой-9, что приводит к образованию сигнального комплекса, называемого апоптосомой. Активированная каспаза-9 затем расщепляет и активирует эффекторные Касп-3 и -7. Процесс высвобождения апоптогенов из М регулируют представители семейства Bcl-2-подобных белков, для которых характерно присутствие по крайней мере одного специфического ВН(Bcl-2 homology)-домена. Исходя из структурных и функциональных особенностей указанных белков, выделяют три их подгруппы [13]. В первую подгруппу входят белки Bcl-2, Bcl-x_L, Bcl-w, A1 и Mcl-1, содержащие четыре ВН-домена (ВН1, ВН2, ВН3 и ВН4) и обладающие антиапоптотическими свойствами. Эти белки также содержат трансмембранный участок, который позволяет им встраиваться во внешнюю мембрану М. Представителей второй подгруппы (Bax, Bak и Bok) отличает не только отсутствие ВН4-домена, но и их проапоптотическая активность. Третью подгруппу составляют проапоптотические белки Bik, Bad, Bid, Bim, Bmf, HRK, Noxa и PUMA. Они содержат лишь один ВН-домен (ВН3), с помощью которого взаимодействуют с другими белками семейства Bcl-2. Эти молекулы чаще всего локализованы в цитоплазме, откуда в ответ на действие индукторов Ап они могут перемещаться к М. Интересно, что различные индукторы Ап избирательно активируют те или иные белки третьей подгруппы семейства Bcl-2. Например, Bim необходим для Ап, вызываемого дефицитом факторов роста, тогда как при гибели клеток вследствие необратимых повреждениях ДНК задействован белок PUMA. Про- и антиапоптотические белки семейства Bcl-2 могут связываться друг с другом, образуя сложную систему гомо- и гетеродимерных комплексов. Соотношение про- и антиапоптотических Bcl-2-подобных белков при формировании таких комплексов и определяет последующую реализацию или ингибирование Ап в клетках.

С учетом необходимости вовлечения митохондриального пути в развитие Fas- или TRAIL-иницированного Ап различают клетки I (независимого) и II (зависимого от выхода из М апоптогенных факторов) типов [14, 15]. Блокирование митохондриального пути в клетках II типа в условиях гиперэкспрессии антиапоптотических белков Bcl-2 или Bcl-x_L предотвращает активацию каспазного каскада через «рецепторы смерти».

Блокирование Касп может происходить с участием других клеточных белков, в частности, с-FLIP и семейства IAP (inhibitor of apoptosis proteins). В первом случае белки с-FLIP_L и с-FLIP_S способны конкурировать с прокаспазой-8 за образование сигнального комплекса DISC, препятствуя тем самым активации этой инициаторной Касп [16]. Наибо-

лее выраженной антиапоптотической активностью среди членов семейства IAP обладает белок XIAP. Он способен связываться с активированными Касп-3 и -7, а также предотвращать активацию Касп-9. При этом апоптогенный фактор Smac, который вместе с цитохромом *c* покидает пределы М, блокирует ингибирующее действие белка XIAP на эффекторные Касп [17]. Другой представитель семейства IAP — сурвивин — способен препятствовать функционированию апоптосомы путем образования комплекса с прокаспазой-9 и X-белком вируса гепатита В [18]. Следует отметить, что сурвивин обнаруживается в большинстве типов опухолей, но отсутствует в клетках нормальных тканей человека.

Понятно, что рецепторный и митохондриальный сигнальные пути не функционируют в клетке изолированно, а могут взаимодействовать между собой. Например, одним из субстратов Касп-8 является белок Bid, который относится к семейству Bcl-2-подобных белков. После частичного протеолиза Bid образуется его фрагмент tBid(p15). Когда уровень активации Касп-8 недостаточен для инициации рецепторного сигнального пути, tBid перемещается из цитоплазмы в М, что способствует агрегации проапоптотических белков Bax или Bad и вызывает выход из М апоптогенных факторов [19]. Таким образом, протеолиз белка Bid каспазой-8 приводит к активации Касп-9 и Касп-3, которая, в свою очередь, способна усиливать апоптотический сигнал за счет процессинга прокаспазы-8.

ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ ТЕРАПИИ С ПОМОЩЬЮ МАРКЕРОВ: ЧТО, ГДЕ И КОГДА?

Поскольку клинический ответ на противоопухолевую терапию часто ассоциируется с активацией Ап, то с большой степенью вероятности следует ожидать, что изменение экспрессии любого из описанных в предыдущем разделе белков (особенно имеющих отношение к митохондриальному апоптотическому пути), равно как и значений апоптотического индекса, будут свидетельствовать об индивидуальной чувствительности опухоли к проводимому лечению. Действительно, в многочисленных исследованиях была обнаружена зависимость между интенсивностью Ап ОК, вызванного лекарственными препаратами или лучевой терапией, и эффективностью проводимого лечения. АК в образцах опухолевой ткани можно идентифицировать с помощью стандартного гистологического исследования, однако для этого требуется определенный опыт. Поэтому идентификацию и учет АК в тканях опухолевого очага чаще всего проводят по молекулярным маркерам Ап, используя иммуногистохимический (ИГХ) метод (либо иммуноцитохимию при исследовании бронхоальвеолярного лаважа, тонкоигольных аспирационных пунктатов или мазков). Моноклональные антитела (MкАТ), полученные к маркерам Ап или к неоэпитопам белков, являющихся субстратами каспаз, и наборы для определения фрагмента-

ции ДНК или выявления фосфатидилсерина доступны для широкого использования. Важным моментом является возможность одновременного выявления в микропрепаратах тканеспецифических антигенов, что позволяет идентифицировать тип погибающей клетки. Далее будут рассмотрены некоторые молекулярные маркеры Ап, определяемые в биопсийном и операционном материале.

Каспаза-3. Каспазный каскад, описанный выше, является центральным звеном в реализации программы Ап и основан на последовательном расщеплении субстратов Касп-3 (включая сами Касп), приводящем, в конечном итоге, к распаду клетки на апоптотические тельца. После частичного протеолиза каспазного субстрата новый эпителий (неоэпителий), характерный только для его фрагмента, выявляют с помощью специфических антител. Эффекторная Касп-3, имеющая наибольшее по сравнению с другими Касп число клеточных субстратов, синтезируется в виде прокаспазной молекулы. Образование активной формы Касп-3 происходит после расщепления прокаспазы-3 инициаторными Касп. Ценность выявления Касп-3 состоит в том, что ее активация происходит на ранних этапах Ап, когда многие другие характеристики АК (например фрагментация ДНК) еще не проявляются. Разработан метод выявления активной формы Касп-3 в архивном материале (заключенные в парафин фиксированные формалином препараты) с помощью антител, которые распознают только большую субъединицу Касп-3, но не связываются с малой ее субъединицей или неактивированной формой прокаспазы-3 [20]. Важными моментами для выявления неоэпитопа любых каспазных субстратов с помощью метода ИГХ являются: их наличие в относительно большой популяции клеток и стабильность выявляемой пептидной последовательности в условиях проведения фиксации клеток и их заключения в парафин.

Достоверную корреляцию между отсутствием Касп-3-положительных ОК в биопсийном материале и их резистентностью к проводимой терапии в случае больных раком носоглотки отметили J.J. Oudejans и соавторы [21]. Кроме того, авторы данного исследования приходят к выводу, что отсутствие активной формы Касп-3 в ОК является неблагоприятным прогностическим признаком у этой категории больных. Похожая ситуация характерна для больных диффузной В-крупноклеточной лимфомой: выявление Касп-3-положительных клеток ассоциировано с лучшей общей выживаемостью больных, получивших индукционную терапию с включением ритуксимаба [22].

Фрагменты PARP-1. Фермент поли (АДФ-рибоза)-полимераза 1 (PARP-1), участвующий в процессе репарации однонитевых разрывов ДНК, является субстратом для Касп-3, -7, -8, -9 и -10, а также расщепляется Касп-7 и/или -9 в клетках, лишенных Касп-3 [23, 24]. После протеолиза этого ядерного белка Касп образуются два фрагмента с молекулярной массой 89 и 24 кДа, что приводит к инактивации фермента. Расщепление

PARP-1 наблюдается при действии любых индукторов Ап и блокируется ингибиторами Bcl-2 и Касп.

F.R. Sallmann и соавторы [25] получили два варианта антител, избирательно связывающихся с двумя фрагментами фермента PARP-1, которые образуются после его расщепления Касп. Антитела LP96-24 (против р89/PARP-1) не имеют видовой специфичности и не взаимодействуют с интактной молекулой PARP-1 или ее фрагментами, образующимися в некротических клетках. Вместе с тем антитела LP96-22 (против р24/PARP-1) распознают фрагменты PARP-1, которые образуются в результате некроза и могут быть использованы в ИГХ анализе для выявления некротически измененных клеток.

Разработана оригинальная методика двухцветной флуоресцентной окраски для обнаружения клеток, имеющих р89/PARP-1 и фрагментированную ДНК (выявляется методом TUNEL; см. далее) [26]. Поскольку антитела против р89/PARP-1 распознают не только TUNEL⁺-клетки, но и АК с начальными признаками конденсации хроматина, авторами сделан вывод, что образование р89/PARP-1 предшествует фрагментации ДНК-клетки. При этом на более поздних этапах Ап отмечается выход р89/PARP-1 из ядра в цитоплазму [27].

Кроме того, описано комбинированное использование антител против р89/PARP-1 и активной формы Касп-3 [28]. Такое одновременное выявление активной формы Касп-3 и фрагмента ее субстрата PARP-1 служит подтверждением функциональной активности обнаруживаемой Касп-3.

Фрагмент цитокератина-18. Цитокератины представлены семейством белков промежуточных волокон клеток, включающим 19 различных полипептидов, которые определенным образом распределены в эпителиальных тканях. В АК белки промежуточных волокон, включая цитокератин-18, подвергаются протеолизу Касп, что способствует образованию апоптотических телец. Получены антитела M30, избирательно распознающие так называемый неоэпителий цитокератина-18 (участок молекулы с 387 по 396 а. о.) в его фрагментах, которые образуются после расщепления Касп-3, -7 или -9 [29, 30]. Как оказалось, в интактных (живых) и некротически измененных эпителиальных клетках такой неоэпитопа в нативной молекуле цитокератина-18 отсутствует. Его образование происходит на ранних этапах Ап, перед началом фрагментации ДНК. С помощью антител M30 выявляется большее число АК по сравнению с методом TUNEL (см. далее) [31], что свидетельствует о высокой специфичности такого подхода. Существенным недостатком антител M30 является возможность их использования лишь для анализа клеток, которые экспрессируют цитокератин-18 (преимущественно клетки опухолей эпителиального происхождения).

«Рецепторы смерти». В ряде клинических исследований изучалась возможная взаимосвязь между уровнем рецепторов Fas, TRAIL-1 или TRAIL-2 и ответом опухоли на проводимое лечение. Для резидуальной опу-

холи яичников у женщин, которых подвергали лечению препаратами первой линии ХТ, характерен высокий уровень экспрессии рецептора TRAIL-2 [32]. Выявление повышенного содержания рецептора TRAIL-1 (но не TRAIL-2) в опухолевом очаге у больных с III стадией рака толстого кишечника позволяет определить прогностически неблагоприятную группу больных, нуждающихся в интенсивной адьювантной ХТ [33].

Белки семейства Bcl-2. Наиболее популярными маркерами Ап, исследуемыми у онкологических больных, можно считать белки Bcl-2 и Bax. Первый из них выполняет антиапоптотическую функцию, в том числе контролируя целостность наружной митохондриальной мембраны. Имеются данные о высокой прогностической значимости экспрессии Bcl-2 в ОК при немелкоклеточном раке легкого [34]. При его гиперэкспрессии (совместно с белком MDR1) отмечается худший клинический ответ на комбинированную химиолучевую терапию с использованием паклитаксела и меньшая продолжительность жизни без прогрессирования заболевания. Наличие Bcl-2 в ОК у больных с местно-распространенным плоскоклеточным раком ротоглотки, определяемое до начала проведения химиолучевой терапии (на основе препаратов платины), также является негативным фактором прогноза [35].

Белок Bax является проапоптотическим регулятором, который после встраивания в митохондриальную мембрану способствует выходу апоптогенов из М в цитоплазму. Результаты многофакторного анализа показали, что у больных раком пищевода II–IV стадии низкий уровень экспрессии Bax в ОК следует считать неблагоприятным прогностическим фактором ответа на химиолучевую терапию с использованием флуороурацила и цисплатина [36]. Подобная корреляция между уровнем белка Bax и ответом на проводимую ХТ была установлена для больных раком молочной железы и раком желудка [37, 38].

Как известно, белки Bax и Bcl-2 способны образовывать гетеродимерные комплексы, что приводит к блокированию антиапоптотической активности Bcl-2 [39]. Поэтому ответ клетки на действие индуктора Ап зависит не столько от содержания белков Bax и Bcl-2, сколько от их соотношения: если уровень Bax больше, то клетка вступает в Ап, а если больше Bcl-2, то гибели клетки не происходит. Такая зависимость находит отражение при анализе клинического материала от онкологических больных. Н. Matsumoto и соавторы [40] исследовали возможную корреляцию между экспрессией белков Bcl-2, Bax или p53 в клетках опухоли мочевого пузыря и клиническим ответом больных на проведение химиолучевой терапии. Оказалось, что ни один из исследуемых маркеров не имеет самостоятельного прогностического значения для больных переходноклеточным раком мочевого пузыря. Однако величина соотношения Bax : Bcl-2 достоверно коррелирует с частотой полных клинических ответов.

Белки семейства IAP. Для оценки интенсивности Ап ОК чаще всего исследуют белки сурвивин и XIAP.

Поскольку оба белка проявляют выраженную антиапоптотическую активность, то их экспрессия в ОК ассоциируется, как правило, с низкой эффективностью проводимых лечебных мероприятий. Например, показано [41, 42], что сурвивин служит неблагоприятным фактором прогноза при проведении комбинированной химиолучевой или адьювантной ХТ у больных с опухолями прямой кишки или немелкоклеточным раком легкого соответственно. Следует иметь в виду, что сурвивин участвует в регуляции не только выживания, но и деления клеток. При этом антиапоптотическую активность этого белка связывают с его внутриклеточным распределением (цитоплазматический, но не ядерный пул сурвивина отвечает за его участие в регуляции Ап). Интересно, что в случае белка XIAP наихудшие показатели общей выживаемости имели больные протоковым раком молочной железы с экспрессией в XIAP в ядре, а не в цитоплазме клеток [43]. Определенное значение для прогностической значимости сурвивина также имеет наличие его различных изоформ, которые образуются в результате альтернативного сплайсинга [44].

Цитохром с. Как мы уже отмечали, после инициации Ап цитохром с переходит из М в цитоплазму, что способствует активации Касп-9. Доказано, что такой переход происходит по принципу «все или ничего» и в условиях *in vitro* обычно завершается спустя несколько минут [45]. Поэтому цитохром с, локализованный в цитоплазме, рассматривается как один из маркеров ранних этапов Ап. Существенную помощь в ИГХ определении митохондриальной и цитоплазматической локализации цитохрома с может оказать совместное выявление в образцах опухолевой ткани цитохрома с и шаперона Hsp60 либо цитохрома с и красителя «MitoTracker», специфичного для М.

В заключение этой части обзора, посвященной значению белковых маркеров Ап для оценки эффективности проводимого лечения и их прогностической значимости, следует отметить, что наиболее объективным подходом здесь является выявление и оценка не одного, а нескольких маркеров одновременно. Например, в одной из недавних работ [46] авторы определяли экспрессию 6 апоптотических маркеров (Касп-3, Fas/CD95, c-FLIP, XIAP, сурвивин и Bcl-2) в гистологических срезах, полученных от больных диффузной В-крупноклеточной лимфомой. Оказалось, что, помимо общеклинических признаков заболевания, экспрессия антиапоптотических белков сурвивина и XIAP на фоне отсутствия рецептора Fas являются неблагоприятными факторами ответа на проводимую терапию и общей продолжительности жизни больных. Более того, проведение иммунохимиотерапии оказалось намного эффективней (по сравнению с ХТ) для больных с Касп-3/c-FLIP/сурвивин-позитивным и XIAP-негативным фенотипом.

Фрагментированная ДНК. Одним из наиболее популярных методов оценки интенсивности Ап в биопсийном или операционном материале считается ник-мечение 3'-концов молекулы ДНК, называе-

мое TUNEL (terminal deoxytransferase-mediated dUTP nick-end labeling). При анализе гистологических срезов методом TUNEL важно учитывать, что степень выявляемости АК существенно зависит от того, какой реактив используется для фиксации тканей (при фиксации этанолом интенсивность реакции меньше, чем при фиксации формальдегидом [47]) и сколько времени длится такая фиксация (продолжительная фиксация формальдегидом снижает эффективность ник-мечения ДНК [48]). Существенное значение имеет также длительность обработки фиксированных тканей пепсином или протеиназой К, поскольку после непродолжительной обработки значительная часть АК может не выявляться, а в результате длительного воздействия ферментов происходит ник-мечение клеток с неповрежденной структурой ДНК [49]. Все указанное выше, а также вероятность окрашивания живых клеток вследствие повреждений ДНК в процессе приготовления срезов могут обуславливать появление ложноположительных либо ложноотрицательных реакций. Поэтому необходимо использовать образцы с положительным и отрицательным контролем, а также один из альтернативных методов выявления АК.

Приведем несколько примеров определения клеток с фрагментированной ДНК с помощью TUNEL-метода в онкологической клинике. Наивысшие значения апоптотического индекса ОК при комбинированном использовании флуороурацила и цисплатина (по сравнению с применением указанных препаратов в монорежиме) у больных раком желудка выявили M. Imano и соавторы [50]. Низкий уровень спонтанного Ап в биопсийном материале, полученном от больных раком прямой кишки до проведения неoadъювантной химиолучевой терапии, свидетельствует о неэффективности проводимого лечения [51]. Несомненный интерес представляют результаты исследования, в котором TUNEL-метод использовался для доказательства, что гибель ОК у больного с плоскоклеточным раком кожи после однократного высокодозного облучения не связана с индукцией Ап [52].

D.W. Davis и соавторы [7] адаптировали метод TUNEL для количественного анализа Ап с помощью лазерного сканирующего цитометра. Метод лазерной сканирующей цитометрии, как известно, основывается на лазерной сканирующей микроскопии и позволяет регистрировать накопление и локализацию нескольких (до пяти одновременно) флуоресцентных меток в отдельных клетках и выявлять особенности распределения этих параметров в популяции клеток. Показано, что практически у всех больных с высокой чувствительностью опухоли молочной железы к проводимой неoadъювантной терапии уровень Ап оказался достоверно повышенным (по сравнению с таковым до проведения лечения) при его определении через 48 ч от начала лечения [7]. Интересно, что через 24 ч после первого введения доцетаксела в комбинации с доксорубицином или паклитакселом такая зависимость не выявляется.

Поскольку при использовании метода TUNEL происходит мечение 3'-концов как одно-, так и дву-

нитевых разрывов молекулы ДНК, то в результате такой реакции выявляются не только АК, но и некротически измененные клетки. Этот недостаток удалось преодолеть разработкой метода, который основан на денатурации ДНК клеточных ядер формамидом и последующей детекции денатурированной ДНК с помощью антител к однонитевой ДНК (оказалось, что формамид не вызывает денатурации ДНК в неапоптотических клетках) [53]. С помощью антител к однонитевой ДНК удается выявлять специфические изменения в конденсированном хроматине, в частности, нарушение связей между ДНК и гистонами. Метод оказался эффективным как при исследовании свежемороженых срезов, так и заключенных в парафин фиксированных формалином препаратов.

Фосфатидилсерин. После инициации Ап молекулы фосфатидилсерина перемещаются с внутренней на внешнюю сторону клеточной мембраны [54], что связывают с инактивацией ферментов транслоказы и флюппазы, а также соответствующей активацией скрамблазы. Молекулы фосфатидилсерина, экспрессирующиеся на поверхности АК, но не интактных клеток, можно визуализировать с помощью белка аннексина V, меченого биотином или флуорохромом (одним из наиболее популярных конъюгатов считается FITC-аннексин V). Следует однако помнить, что выявление фосфатидилсерина с целью идентификации АК возможно только при отсутствии нарушений целостности цитоплазматической мембраны. В противном случае, аннексин V может связываться с фосфатидилсеринем на внутренней стороне клеточной мембраны, что не позволяет сделать однозначный вывод о типе гибели клеток. Поэтому аннексиновые зонды рекомендуется совмещать с использованием красителей, которые не проникают в клетки с неповрежденной цитоплазматической мембраной.

Если говорить об использовании иных возможных объектов (как клеточных, так и внеклеточных) для оценки эффективности проводимого лечения, то это могут быть кровь, моча и некоторые другие биологические жидкости больного. Для их получения не требуется хирургическое вмешательство, что дает возможность проведения многократных исследований в динамике лечения. Рассмотрим наиболее значимые, на наш взгляд, внеклеточные маркеры Ап.

Нуклеосомы. Наличие внеклеточных нуклеиновых кислот в системе кровообращения человека впервые было установлено еще в 1948 г. (цит. по [55]). В настоящее время принято, что в крови здоровых лиц внеклеточная ДНК присутствует в низких концентрациях, но у онкологических больных ее уровень часто повышен. Наличие в составе ДНК, циркулирующей в крови онкологических больных, последовательностей онкогенов и генов-супрессоров, а также характер метилирования ряда генов, вовлеченных в онкогенез, свидетельствует о том, что источником внеклеточной ДНК в кровотоке являются ОК. Циркулирующая в крови ДНК существует в основном в виде моно- и олигонуклеосом. Поскольку фрагмен-

тация хромосомной ДНК до отдельных нуклеосом рассматривается как один из характерных признаков Ап, то ряд авторов связывает появление нуклеосом в крови с апоптотической гибелью ОК [56, 57]. Следует отметить, что увеличение концентрации циркулирующих нуклеосом обнаружено у больных как с доброкачественными, так и со злокачественными новообразованиями [57]. Поэтому определение содержания нуклеосом в крови не может быть использовано для дифференциальной диагностики. Однако определение концентрации свободных нуклеосом в сыворотке или плазме крови может оказаться полезным для мониторинга терапевтических мероприятий и для оценки прогноза эффективности лечения.

Разработан вариант иммуноферментного анализа, позволяющий проводить количественную оценку содержания нуклеосом в крови. Как показали P. Wimberger и соавторы [58], ХТ на основе препаратов платины вызывает каспазо-зависимый Ап клеток опухоли и увеличение содержания нуклеосом в крови больных раком яичника. Вместе с тем уровень нуклеосом, определяемый в первую неделю от начала лекарственной или лучевой терапии больных раком легкого, поджелудочной железы, толстой и прямой кишки или гемобластомами, позволяет прогнозировать исход их лечения [59].

sFas (soluble Fas). Одним из факторов устойчивости ОК к Fas-зависимому Ап считается продукция этими клетками секретлируемой формы рецептора Fas (sFas). Этот белок дистантно ингибирует действие FasL, что способствует уходу клеток злокачественных новообразований от противоопухолевой защиты организма. sFas образуется в результате частичного протеолиза трансмембранной формы рецептора Fas либо альтернативного сплайсинга мРНК, приводящего к образованию укороченного транскрипта. Независимо от места продукции, sFas попадает в периферическую кровь, где его концентрацию можно определить с помощью иммуноферментного анализа. В группе больных гепатоцеллюлярной карциномой, у которых не было зарегистрировано объективного ответа на комбинированную интраартериальную ХТ, содержание сывороточного sFas существенно увеличилось после проведения лечения [60]. Вместе с тем при наличии лечебного эффекта у больных подобных изменений в уровне sFas не отмечают. Авторы работы делают вывод, что низкий уровень sFas в сыворотке крови больных гепатоцеллюлярной карциномой служит признаком благоприятного исхода после проведения соответствующего лечения. Подобная ситуация отмечена в случае диссеминированной меланомы [61]. Уровень сывороточного sFas у больных с наличием либо отсутствием эффекта от иммунохимиотерапии оказался примерно одинаковым, если его измерения проводили до начала лечения. Однако когда уровень sFas определялся после окончания терапии, то отмечено его достоверное увеличение у больных, рефрактерных к проводимому лечению. При раке яичника высокая концентрация sFas в сыворотке крови перед проведе-

нием курса терапии служит самостоятельным неблагоприятным фактором прогноза общей продолжительности жизни и длительности безрецидивного периода заболевания [62]. Высокие исходные уровни sFas в сыворотке крови при колоректальном раке характерны для больных, у которых опухоли малочувствительны к неoadьювантной лучевой терапии [63]. В другой работе [64] с помощью оценки уровня сывороточного рецептора sFas была подтверждена целесообразность введения препарата ритуксимаб в индукционную терапию больных диффузной В-крупноклеточной лимфомой.

Цитохром с. Показано, что после индукции Ап цитохром с покидает не только пределы М, но и клеток [65]. Поскольку клетки с фрагментированной ДНК появляются только через 5 ч после добавления индуктора Ап, то выход цитохрома с в среду инкубации (через 1 ч) происходит до момента активации Касп и служит маркером ранних этапов апоптотической гибели клеток. В сыворотке крови больных лейкозами и лимфомами отмечается повышение уровня цитохром с уже через несколько часов после начала курса комбинированной ХТ [65]. Примечательно, что спустя несколько суток содержание цитохрома с в крови начинает понижаться, возвращаясь к исходному уровню или даже становясь меньшим, чем в группе здоровых людей. Небольшое количество сыворотки крови, необходимое для проведения иммуноблоттинга, а также возможность серийного количественного определения концентрации цитохрома с (денситометрический анализ) делают этот метод удобным для оценки эффективности проводимой противоопухолевой терапии. Еще более простым и доступным оказалось определение концентрации цитохрома с в сыворотке крови с помощью иммуноферментного анализа [66]. Авторы данной работы подтвердили, что в ходе лечения онкологических больных уровень цитохрома с в сыворотке крови повышается. Более того, больные с высоким содержанием цитохрома с в крови до проведения терапии или повышением этого показателя в процессе лечения имеют худший клинический ответ на проводимую терапию и 3-летнюю выживаемость. О негативном прогностическом значении высокого (> 40 нг/мл) содержания сывороточного цитохрома с у больных с операбельными опухолями сообщалось и другими исследователями [67]. Определение содержания цитохрома с в крови больных с острым Т-клеточным лейкозом взрослых позволило выделить две группы больных с 5-летней выживаемостью 67 и 11% [68].

Фрагмент цитокератина-18. Описанный выше неопитоп цитокератина-18 обнаруживается не только в опухолевой ткани, но и в плазме или сыворотке крови больного. Его выявляют с помощью МкАТ М30 методом иммуноферментного анализа. Оценка содержания неопитопа цитокератина-18, распознаваемого антителами М30, в сыворотке крови больных раком молочной железы позволяет проводить индивидуальный мониторинг эффективности ХТ без использования томографических или других методов оценки распространенности опухолевого процес-

са [69]. Статистически значимое увеличение уровня фрагмента цитокератина-18, образованного после его расщепления Касп, в сыворотке крови отмечено и у больных немелкоклеточным раком легкого, подвергшихся стереотаксической лучевой терапии [70].

Важно отметить высокую чувствительность иммуноферментного метода определения интенсивности Ап с помощью МкАТ М30 — для анализа нужно всего 25 мкл образца сыворотки крови (для сравнения, в случае проведения с той же целью иммуноблоттинга потребуется 3 мл сыворотки крови) [71]. Кроме того, необходимо учитывать, что непосредственное влияние на точность определения содержания любого биологического маркера в образце оказывает его стабильность. Как показали М.Н. Olofsson и соавторы [72], процедура многократного (до 6 циклов) замораживания-оттаивания образцов сыворотки крови не влияет на содержание в них фрагментов цитокератина-18.

Используя МкАТ М30 и М65, в плазме или сыворотке крови онкологических больных с помощью иммуноферментного анализа выявляют различные циркулирующие формы цитокератина-18, что позволяет судить о разных типах гибели клеток [73]. Считается, что М65, в отличие от М30, распознают как расщепленные Касп фрагменты цитокератина-18 (при индукции Ап), так и интактные молекулы этого белка (которые высвобождаются в кровоток в случае некротической гибели ОК). Это дает возможность оценивать терапевтический эффект проводимого лечения в целом, а не только определять степень выраженности Ап. Показано, например, что для всех больных мелкоклеточным раком легкого, которые ответили на проводимую терапию, характерно повышение содержания в сыворотке крови фрагментов цитокератина-18 и его неподвергнутой протеолизу молекулы, выявляемых МкАТ М65 (на 3-и сутки после начала лечения) [74].

Среди молекулярных маркеров Ап, выявляемых в моче онкологических больных, наибольший интерес представляют фрагментированная ДНК, сурвивин и Bcl-2. Как свидетельствуют результаты клинических исследований, внеклеточную ДНК, в том числе фрагменты ДНК из АК, обнаруживают не только в крови, но и в моче, где ее концентрация у здоровых людей в среднем составляет 2–96 г/л [75]. Преимуществами анализа ДНК из мочи по сравнению с ДНК плазмы крови являются: неинвазивность получения образцов, их больший объем (хотя концентрация внеклеточной ДНК в моче и плазме крови примерно одинаковая), более простая процедура выделения ДНК (в моче содержится белков в 1000 раз меньше, чем в плазме крови).

J.D. Sharp и соавторы [76] разработали простой Bio-Dot-тест для определения содержания антиапоптотического белка сурвивина в моче с использованием МкАТ против этого белка. Сурвивин был выявлен практически во всех образцах мочи больных с впервые диагностированными или рецидивирующими опухолями мочевого пузыря, но не у клинически здоровых доноров. В то же время этот белок

отсутствовал в моче 30 из 33 больных после проведения курса полихимиотерапии. У 3 оставшихся больных был обнаружен сурвивин, хотя на момент взятия образцов мочи результаты цистоскопии были отрицательными. Однако при последующем наблюдении в моче одного из этих больных были выявлены ОК, а у другого был обнаружен рецидив. Благодаря высокой чувствительности Bio-Dot-тест позволяет своевременно выявить те случаи рака мочевого пузыря, которые требуют более агрессивной терапии. Необходимо, однако, учитывать, что после радикальной простатэктомии, выполняемой при локализованном раке предстательной железы, наблюдается резкое снижение содержания сурвивина в моче [77].

Уровень антиапоптотического белка Bcl-2 в моче, выявляемый с помощью иммуноферментного метода, оказался значительно повышен у больных раком яичника и достоверно отличался от такового у больных с доброкачественными опухолями данной локализации [78]. По-видимому, в дальнейшем этот маркер может быть использован для дифференциальной диагностики и прогноза течения рака яичника.

Известно, что воздействие на ОК ДНК-повреждающими агентами вызывает либо их немедленную гибель (в течение 2–6 ч) еще до вступления в митоз, либо вначале происходит деление клеток, а затем — их Ап (в этом случае клетки погибают через 24–72 ч). Принимая во внимание значительную фенотипическую гетерогенность клеток опухолевого очага и асинхронность их гибели, оптимальным временем для регистрации Ап ОК либо внеклеточных молекулярных маркеров Ап у больного для оценки ближайших результатов лечения считается 1–3 сут. Хотя такие сроки обычно подбираются эмпирически и могут варьировать до нескольких недель (см. например [79]). Поскольку момент времени трудно судить об изменениях уровня Ап в тканях или органах после терапевтических воздействий в целом, целесообразно проводить оценку Ап в динамике лечения. При таких серийных исследованиях рассчитывают так называемый кумулятивный апоптотический ответ (КАО) на проводимую терапию. Например, авторы работы [80] определяли значения КАО за первые 96 ч после введения первой дозы паклитаксела больным раком молочной железы, суммируя данные ежедневной оценки апоптотического индекса (с учетом уровня спонтанного Ап ОК до начала неоадьювантной ХТ) в тонкоигольных аспирационных пунктатах. Такой подход позволяет учесть вариабельность интенсивности индуцированного терапии Ап у конкретного больного.

МЕТОДЫ НЕИНВАЗИВНОЙ ВИЗУАЛИЗАЦИИ АПОПТОЗА *IN VIVO*

В настоящее время для неинвазивного определения терапевтического эффекта проводимого лечения используют рентгенологическое, ультразвуковое исследование (УЗИ) и компьютерную томографию (КТ). При этом регрессию опухолевых очагов

оценивают, как правило, после окончания курса лечения. Отслеживание эффективности проводимого лечения в динамике уже на ранних сроках позволило бы избежать применения препаратов, которые могут оказаться не только бесполезными, а даже вредными для данного больного, и выбрать оптимальную схему терапии. Как отмечалось ранее, индукция Ап является одним из маркеров индивидуальной чувствительности опухоли к цитотоксическому действию лекарственных препаратов или лучевой терапии. Однако ни один из методов клинко-инструментального обследования больных, использующихся в современной онкологической практике, не позволяет производить регистрацию клеточных*, а тем более молекулярных событий, ассоциированных с Ап.

Существующие на сегодняшний день методы неинвазивной визуализации АК можно условно разделить на две группы: фармакологические и нефармакологические. К первым относят разные типы томографии, а ко вторым — спектроскопические технологии. Далее мы более детально рассмотрим методы однофотонной эмиссионной компьютерной томографии (ОФЭКТ), позитронной эмиссионной томографии (ПЭТ) и магнитно-резонансной спектроскопии (МРС).

Технология ОФЭКТ позволяет получать трехмерное изображение распределения в организме γ -излучающих стабильных изотопов (^{133}Xe , ^{123}I , $^{99\text{m}}\text{Tc}$). Выявление АК методом ОФЭКТ основано на визуализации молекул фосфатидилсерина на клеточной поверхности с помощью радиофармпрепарата, содержащего белок аннексин V. В 1998 г. были получены первые аннексиновые зонды, меченые $^{99\text{m}}\text{Tc}$ [82]. Результаты клинических испытаний указанных радиофармпрепаратов свидетельствуют о хорошей переносимости процедуры их внутривенного введения и отсутствии побочных эффектов [83, 84]. Период полувыведения $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -аннексина V из организма составляет 62 ± 13 ч. Проведена II фаза клинических испытаний $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -НУНИС-аннексина V с целью визуализации Ап у 16 больных немелкоклеточным раком легкого после начала лечения комбинацией цисплатина и гемцитабина [85]. У 5 больных, которые оказались чувствительными к проводимой терапии (у одного наблюдался полный ответ, а у 4 — частичный), отмечено накопление меченого аннексина V в опухолевой ткани через 2 сут после начала лечения. Вместе с тем, у 2 больных с прогрессированием заболевания поглощения радиофармпрепарата клетками опухоли не отмечали. При проведении аналогичного исследования у 38 больных (лимфомы — у 31, немелкоклеточный рак легкого — у 4 и плоскоклеточный рак головы и шеи — у 3) этими же авторами была установлена достоверная корреляция между накоплением ОК $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -НУНИС-аннексина V и эффективностью проводимого лечения [86]. Важно отметить, что радиофармпрепарат

*Единственным исключением здесь может оказаться метод УЗИ. Начиная с 1994 г., группой канадских исследователей ведутся работы по разработке такого варианта УЗИ-технологии, который позволил бы по характеристике отраженных ультразвуковых сигналов судить о наличии морфологических изменений в зоне опухолевого очага в ответ на проводимое лечение [81].

накапливается в опухоли уже через 2 сут после начала терапевтического воздействия, тогда как уменьшение размеров опухоли регистрируется значительно позже (4–8 нед). Данные о связывании аннексина V с клетками, погибающими путем некроза или аутофагии, свидетельствуют о том, что с помощью ОФЭКТ-технологии можно проводить комплексную оценку эффективности лекарственной или лучевой терапии, а не только определять уровень Ап в опухоли.

С помощью метода ПЭТ получают изображения анатомических структур на основе их физиологических или функциональных параметров. Это достигается путем внутривенного или ингаляционного введения позитрон-излучающих радиофармпрепаратов, которые включаются в биологические процессы. ПЭТ-технология имеет ряд преимуществ по сравнению с методом ОФЭКТ: метка сверхкороткоживущими изотопами ^{18}F , ^{11}C , ^{13}N и ^{15}O (в отличие от $^{99\text{m}}\text{Tc}$ или ^{123}I) не меняет химических свойств радиофармпрепаратов; ПЭТ-камера имеет большую разрешающую способность; количественная оценка распределения радионуклида в организме и возможность проводить многократное сканирование в процессе одного исследования. Наиболее часто в качестве метки используют изотоп фтора (^{18}F), характеризующийся стабильной эмиссией позитронов в период затухания, которая необходима для получения четкого изображения. Для регистрации гибели клеток методом ПЭТ получены различные молекулярные зонды, в том числе ^{18}F -аннексин V, ^{18}F -FDG и ^{18}F -ML-10. Важным качеством препарата ^{18}F -аннексин V можно считать его меньшее накопление в печени, селезенке и почках (по сравнению с таковым $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -НУНИС-аннексина V) [87].

Использование ^{18}F -FDG для определения чувствительности ОК к лекарственной и лучевой терапии основано на их способности утилизировать аналог глюкозы фтор-2-дезоксиглюкозу. Установлена прямая зависимость между повреждающим действием химиопрепаратов и ионизирующего излучения на ОК и уменьшением потребления ими ^{18}F -FDG. Следует отметить, что такая корреляция зависит от нескольких факторов, включая сроки проведения сцинтиграфии после начала лечения (выраженное снижение поглощения ^{18}F -FDG характерно для ранних этапов терапевтического воздействия), механизм действия противоопухолевого препарата и ряд других. В клинических исследованиях установлено, что определение поступления ^{18}F -FDG в клетки опухоли может быть важным фактором, предсказывающим эффективность проведения лучевой терапии у больных с опухолями головы и шеи (цит. по [88]). Данные ПЭТ-сканирования с использованием ^{18}F -FDG имеют ценность как предиктивный фактор оценки ответа больных раком пищевода на неoadьювантную терапию [89]. Фактором благоприятного прогноза является 50% уменьшение стандартизированного уровня накопления ^{18}F -FDG в опухолевом очаге, определяемое через 2 нед после начала лечения по сравнению с таковым до его проведения.

Весьма перспективным с точки зрения количественной оценки индукции Ап у онкологических больных после проведения терапии является меченое нуклидом ^{18}F производное малоновой кислоты, которое относится к группе низкомолекулярных амфипатических соединений, способных проникать через плазматическую мембрану АК (но не интактных клеток). Первое клиническое исследование препарата ^{18}F -ML-10 было проведено на 8 здоровых добровольцах методом совмещенной ПЭТ и КТ, когда за одно обследование одновременно визуализируются морфологические и функциональные изменения. Установлено, что препарат ^{18}F -ML-10 высоко стабилен *in vivo* (97,5% препарата сохраняется в сыворотке крови через 150 мин после внутривенного введения), имеет относительно короткий период выведения (через почки) и является практически безвредным для человека [90]. При этом у всех мужчин-добровольцев отмечено избирательное накопление радиофармпрепарата в яичках. В другом ПЭТ-исследовании с помощью радиофармпрепарата ^{18}F -ML-10 удалось зарегистрировать его накопление в метастазах головного мозга после проведения лучевой терапии. Причем такой эффект коррелирует с уменьшением размеров метастатических узлов, установленным спустя 2 мес после проведения сцинтиграфии (цит. по [91]).

По оценке специалистов основным недостатком технологии ПЭТ является анатомически бедная информация изображений. Для его преодоления разработан прибор, позволяющий проводить ПЭТ одновременно с КТ. Сопоставление морфологической и функциональной информации позволяет адекватно интерпретировать данные ПЭТ исследований. Авторы уже цитируемой нами работы [79] установили корреляцию между высокими значениями стандартизированного уровня накопления ^{18}F -FDG в опухолевом очаге и более коротким периодом общей выживаемости больных метастазирующим светлоклеточным раком почки после лечения сунитинибом.

Метод МРС основан на эффекте ядерно-магнитного резонанса и позволяет неинвазивно и быстро оценивать химический состав и динамику метаболических изменений в исследуемой ткани. В последние годы интенсивно исследуют возможности применения МРС для получения спектров тканей и органов, позволяющих верифицировать Ап *in vivo*. Для этого используют одно- или мультисексельную МРС (анализ только одного или нескольких участков ткани одновременно) на ядрах водорода (^1H) или фосфора (^{31}P). С помощью МРС на ядрах ^1H показана возможность применения этой технологии для выявления накопления полиненасыщенных жирных кислот (~ 2,8 p.p.m.) в АК BT4C глиомы крыс после внутрибрюшинной инъекции индуктора Ап [92]. Такое изменение внутриклеточной концентрации полиненасыщенных жирных кислот достоверно коррелирует с увеличением содержания АК BT4C через 4 сут после введения ганцикловира (согласно данным TUNEL-метода). На мышцах с подкожными ксенотрансплан-

татами рака молочной железы человека (линия MCF-7) методом протонной МРС показано, что через 3 сут после введения доцетаксела происходит существенное снижение концентрации фосфохолина и глицерофосфохолина в ОК [93]. Однако через 6 сут после начала терапии содержание указанных метаболитов возвращается к исходному уровню. Начато клиническое изучение возможностей оценки краткосрочных результатов лечения онкологических больных на основании анализа данных МРС зоны опухолевого узла. Важным преимуществом данной технологии является возможность одновременно с маркерами Ап определять энергетический статус клеток опухоли, что имеет практическую значимость при выборе тактики лечения больного.

Хотя в данном разделе мы рассматриваем лишь неинвазивные методы визуализации и количественной оценки Ап, нельзя не упомянуть о новой технологии МРС высокого разрешения в режиме вращения образца под «магическим» углом (HR MAS MRS). Этот метод позволяет получать спектры с улучшенным разрешением, что предполагает более точное определение химических сдвигов. К преимуществам метода следует отнести высокую степень воспроизводимости результатов, минимальное количество анализируемого образца ткани (10–20 мкг) при возможности его использования после спектрального анализа для иммуногистохимии, гибридизации с ДНК в микрочипах и других исследований, а также достаточно хорошую производительность (около 150 образцов в сутки). Используя технологию HR MAS MRS, K.S. Opstad и соавторы [94] показали, что концентрация таурина в астроцитах коррелирует с числом TUNEL-положительных АК независимо от присутствия в ткани опухоли некротически измененных клеток. Более того, для глиальных опухолей таурин может быть предпочтительным маркером Ап по сравнению с полиненасыщенными жирными кислотами, для которых корреляция с Ап характерна только для случаев опухолей без очагов некроза. Имеются сходные данные о взаимосвязи между содержанием таурина в ткани опухолей молочной железы и ответом больных на проведение неoadьювантной ХТ [95]. В этой же работе показана прогностическая значимость содержания общего холина (перед началом лечения) и глицерофосфохолина (по окончании медикаментозного воздействия) для 5-летней выживаемости указанной категории больных. Эти данные предполагают, что измерение содержания таурина и холинсодержащих метаболитов в опухолевом очаге даст возможность адекватно оценивать уровень Ап ОК и, соответственно, результаты проводимого лечения не только *ex vivo* (используя HR MAS MRS), но *in vivo* с помощью неинвазивной МРС.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Обобщая приведенный в обзоре материал, следует отметить, что одним из характерных признаков злокачественно трансформированных клеток является ингибирование Ап (как спонтанного, так и ин-

дуцированного), что способствует прогрессированию опухолевого процесса и развитию резистентности к противоопухолевой терапии. Прогресс в раскрытии ключевых молекулярных механизмов утраты чувствительности к Ап, вызываемому терапевтическими воздействиями, имеет существенный потенциал для практической онкологии. В частности, визуализация и количественный анализ Ап клеток опухолевого очага позволяют адекватно оценивать эффективность проводимой терапии, корректировать индивидуальные схемы лечения, а также точнее прогнозировать исход болезни. Определяющее значение при этом имеет выбор оптимального для данного случая метода идентификации АК. Важно учитывать такие параметры, как объект исследования, природа и интенсивность воздействия индуктора Ап, технические возможности, продолжительность анализа, его стоимость. Следует помнить, что описанные выше методы выявления АК могут быть специфичны только в отношении определенных типов клеток, индукторов Ап, их дозы, отдельных стадий развития процесса. Поэтому следует комбинировать методы, основанные на различных принципах, с обязательным цитоморфологическим исследованием. Принимая во внимание непродолжительный период времени, требующийся для полной элиминации погибающих клеток *in vivo*, а также асинхронность этого процесса в опухолевом очаге, целесообразно проводить такие исследования в динамике, с самых ранних сроков от начала терапевтического воздействия. Кроме того, учитывая высокую гетерогенность клеток опухолевого узла и их различную чувствительность к действию лекарственных препаратов или лучевой терапии, необходимо, чтобы анализ охватывал как можно большую часть опухоли. Несомненное предпочтение здесь имеют методы ОФЭКТ и ПЭТ, которые позволяют неинвазивно и безопасно для больного получать в масштабе реального времени объективную информацию о степени выраженности Ап в отдельных органах и тканях. Важно, что результаты, полученные с использованием этих технологий, хорошо коррелируют с «классическими» методами учета АК. Хотя определение внеклеточных маркеров Ап в сыворотке или плазме крови значительно дешевле и удобнее для пациента, чем радиологические процедуры. При этом важно учитывать не только чувствительность и специфичность метода, используемого для визуализации Ап *in vivo*, но и возможность его стандартизации. Есть основания полагать, что в самое ближайшее время разработки, описанные в данном обзоре, станут активно внедряться в рутинную клиническую практику.

ЛИТЕРАТУРА

1. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. *Br J Cancer* 1972; **26**: 239–57.
2. Hanahan D, Weinberg RA. *Cell* 2011; **144**: 646–74.
3. Tiezzi DG, De Andrade JM, Cândido dos Reis FJ, *et al.* *Pathology* 2006; **38**: 21–7.
4. Sadahiro S, Suzuki T, Maeda Y, *et al.* *Hepatogastroenterology* 2007; **54**: 1107–12.

5. Darzynkiewicz Z, Bedner E, Traganos F. *Methods Cell Biol* 2001; **63**: 527–46.
6. Savill J, Fadok V. *Nature* 2000; **407**: 784–8.
7. Davis DW, Buchholz TA, Hess KR, *et al.* *Clin Cancer Res* 2003; **9**: 955–60.
8. Mohsin SK, Weiss HL, Gutierrez MC, *et al.* *J Clin Oncol* 2003; **23**: 2460–8.
9. Galluzzi L, Vitale I, Vacchelli E, Kroemer G. *Front Oncol* 2011; **1** (5).
10. Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, *et al.*; *Nomenclature Committee on Cell Death* 2009. *Cell Death Differ* 2009; **16**: 3–11.
11. Philchenkov A. *J Cell Mol Med* 2004; **8**: 432–44.
12. Peter ME, Krammer PH. *Cell Death Differ* 2003; **10**: 26–35.
13. Hotchkiss RS, Strasser A, McDunn JE, Swanson PE. *N Engl J Med* 2009; **361**: 1570–83.
14. Scaffidi C, Fulda S, Srinivasan A, *et al.* *EMBO J* 1998; **17**: 1675–87.
15. Özören N, El-Deiry WS. *Neoplasia* 2002; **4**: 551–7.
16. Shirley S, Micheau O. *Cancer Lett* 2010 Nov 9 [E-pub].
17. Verhagen AM, Ekert PG, Pakusch M, *et al.* *Cell* 2000; **102**: 43–53.
18. Marusawa H, Matsuzawa S, Welsh K, *et al.* *EMBO J* 2003; **22**: 2729–40.
19. Luo X, Budihardjo I, Zou H, *et al.* *Cell* 1998; **94**: 481–90.
20. Gown AM, Willingham MC. *J Histochem Cytochem* 2002; **50**: 449–54.
21. Oudejans JJ, Harijadi A, Cillessen SA, *et al.* *Mod Pathol* 2005; **18**: 877–85.
22. Provencio M, Martín P, García V, *et al.* *Leuk Lymphoma* 2010; **51**: 2021–30.
23. Kottke TJ, Blajeski AL, Meng X, *et al.* *J Biol Chem* 2002; **277**: 804–15.
24. Germain M, Affar EB, D'Amours D, *et al.* *J Biol Chem* 1999; **274**: 28379–84.
25. Sallmann FR, Bourassa S, Saint-Cyr J, Poirier GG. *Biochem Cell Biol* 1997; **75**: 451–6.
26. Soldani C, Bottone MG, Pellicciari C, Scovassi AI. *Eur J Histochem* 2001; **45**: 389–92.
27. Soldani C, Lazzè MC, Bottone MG, *et al.* *Exp Cell Res* 2001; **269**: 193–201.
28. Dukers DF, Oudejans JJ, Vos W, *et al.* *J Pathol* 2002; **196**: 307–15.
29. Leers MP, Kolgen W, Bjorklund V, *et al.* *J Pathol* 1999; **187**: 567–72.
30. Schutte B, Henfling M, Kolgen W, *et al.* *Exp Cell Res* 2004; **297**: 11–26.
31. Kadyrov M, Kaufmann P, Huppertz B. *Placenta* 2001; **22**: 44–8.
32. Arts HJ, de Jong S, Hollema H, *et al.* *Gynecol Oncol* 2004; **92**: 794–800.
33. van Geelen CM, Westra JL, de Vries EG, *et al.* *J Clin Oncol* 2006; **24**: 4998–5004.
34. Maráz A, Furák J, Pálföldi R, *et al.* *Anticancer Res* 2011; **31**: 1431–6.
35. Michaud WA, Nichols AC, Mroz EA, *et al.* *Clin Cancer Res* 2009; **15**: 1645–54.
36. Kang SY, Han JH, Lee KJ, *et al.* *Clin Cancer Res* 2007; **13**: 4146–53.
37. Krajewski S, Blomqvist C, Franssila K, *et al.* *Cancer Res* 1995; **55**: 4471–8.
38. Jeong SH, Han JH, Kim JH, *et al.* *Dig Dis Sci* 2011; **56**: 131–8.
39. Oltvai ZN, Millman CL, Korsmeyer SJ. *Cell* 1993; **74**: 609–19.
40. Matsumoto H, Wada T, Fukunaga K, *et al.* *Jpn J Clin Oncol* 2004; **34**: 124–30.
41. Rodel F, Hoffmann J, Distel L, *et al.* *Cancer Res* 2005; **65**: 4881–7.
42. Dai CH, Li J, Shi SB, *et al.* *Jpn J Clin Oncol* 2010; **40**: 327–35.
43. Zhang Y, Zhu J, Tang Y, *et al.* *Diagn Pathol* 2011; **6**: 49.
44. Ling X, Yang J, Tan D, *et al.* *Lung Cancer* 2005; **49**: 353–61.

45. Goldstein JC, Waterhouse NJ, Juin P, *et al.* Nat Cell Biol 2000; **2**: 156–62.
46. Markovic O, Marisavljevic D, Cemerikic V, *et al.* Eur J Haematol 2011; **86**: 246–55.
47. Mundle SD, Gao XZ, Khan S, *et al.* Anticancer Res 1995; **15**: 1895–904.
48. Davison FD, Groves M, Scaravilli F. Histochem J 1995; **27**: 983–8.
49. Jerome KR, Vallan C, Jaggi R. Pathology 2000; **32**: 186–90.
50. Imano M, Itoh T, Satou T, *et al.* Eur J Surg Oncol 2010; **36**: 963–8.
51. Smith FM, Reynolds JV, Kay EW, *et al.* Int J Radiat Oncol Biol Phys 2006; **64**: 466–72.
52. Kan Y, Yamashita H, Le Pavoux A, *et al.* Med Oncol 2010; **27**: 86–90.
53. Frankfurt OS, Krishan A. J Histochem Cytochem 2001; **49**: 369–78.
54. Fadok VA, Voelker DR, Campbell PA, *et al.* J Immunol 1992; **148**: 2207–16.
55. Муравлева ЛЕ, Молотов-Лучанский ВБ, Клюев ДА и др. Современные успехи науки и образования 2010; (2): 15–20.
56. Fournié GJ, Courtin JP, Laval F, *et al.* Cancer Lett 1995; **91**: 221–7.
57. Holdenrieder S, Stieber P, Bodenmüller H, *et al.* Int J Cancer 2001; **95**: 114–20.
58. Wimberger P, Roth C, Pantel K, *et al.* Int J Cancer 2011; **128**: 2572–80.
59. Holdenrieder S, Nagel D, Schalhorn A, *et al.* Ann N Y Acad Sci 2008; **1137**: 180–9.
60. Nagai H, Miyaki D, Matsui T, *et al.* Cancer Chemother Pharmacol 2008; **62**: 271–6.
61. Mouawad R, Khayat D, Soubrane C. Melanoma Res 2000; **10**: 461–7.
62. Hefler L, Mayerhofer K, Nardi A, *et al.* Obstet Gynecol 2000; **96**: 65–9.
63. Аббасова СГ, Высоцкий ММ, Овчинникова ЛК и др. Бюлл эксп биол мед 2009; **147**: 442–6.
64. Hara T, Tsurumi H, Goto N, *et al.* J Cancer Res Clin Oncol 2009; **135**: 1421–8.
65. Renz A, Berdel WE, Kreuter M, *et al.* Blood 2001; **98**: 1542–8.
66. Barczyk K, Kreuter M, Pryjma J, *et al.* Int J Cancer 2005; **116**: 167–73.
67. Osaka A, Hasegawa H, Yamada Y, *et al.* J Cancer Res Clin Oncol 2009; **135**: 371–7.
68. Osaka A, Hasegawa H, Tsuruda K, *et al.* Int J Lab Hematol 2009; **31**: 307–14.
69. Ueno T, Toi M, Biven K, *et al.* Eur J Cancer 2003; **39**: 769–74.
70. Zhang L, Kavanagh BD, Thorburn AM, Camidge DR. Clin Cancer Res 2010; **16**: 4478–89.
71. Bantel H, Luger A, Heidemann J, *et al.* Hepatology 2004; **40**: 1078–87.
72. Olofsson MH, Ueno T, Pan Y, *et al.* Clin Cancer Res 2007; **13**: 3198–206.
73. Kramer G, Erdal H, Mertens HJ, *et al.* Cancer Res 2004; **64**: 1751–6.
74. Dean EJ, Cummings J, Roulston A, *et al.* Neoplasia 2011; **13**: 339–47.
75. Botezatu I, Serdyuk O, Potapova G, *et al.* Clin Chem 2000; **46**: 1078–84.
76. Sharp JD, Hausladen DA, Maher MG, *et al.* Front Biosci 2002; **7**: 36–41.
77. Davies B, Chen J, Modugno F, *et al.* J Urol 2005; **174**: 1767–70.
78. Anderson NS, Bermudez Y, Badgwell D, *et al.* Gynecol Oncol 2009; **112**: 60–7.
79. Katani I, Avril NE, Bomanji J, *et al.* Clin Cancer Res 2011; **17**: 6021–8.
80. Symmans WF, Volm MD, Shapiro RL, *et al.* Clin Cancer Res 2000; **6**: 4610–7.
81. Kolios MC, Czarnota GJ. Future Oncol 2009; **5**: 1527–32.
82. Blankenberg FG, Katsikis PD, Tait JF, *et al.* Proc Natl Acad Sci USA 1998; **95**: 6349–54.
83. Kemerink GJ, Liem IH, Hofstra L, *et al.* J Nucl Med 2001; **42**: 382–7.
84. Belhocine T, Steinmetz N, Hustinx R, *et al.* Clin Cancer Res 2002; **8**: 2766–74.
85. Kartachova M, van Zandwijk N, Burgers S, *et al.* J Clin Oncol 2007; **25**: 2534–9.
86. Kartachova MS, Valdés Olmos RA, Haas RL, *et al.* Nucl Med Commun 2008; **29**: 39–44.
87. Murakami Y, Takamatsu H, Taki J, *et al.* Eur J Nucl Med Mol Imaging 2004; **31**: 469–74.
88. van de Wiele C, Lahorte C, Oyen W, *et al.* Int J Radiat Oncol Biol Phys 2003; **55**: 5–15.
89. Chen YM, Pan XF, Tong LJ, *et al.* Nucl Med Commun 2011; **32**: 1005–10.
90. Höglund J, Shirvan A, Antoni G, *et al.* J Nucl Med 2011; **52**: 720–5.
91. Reshef A, Shirvan A, Akselrod-Ballin A, *et al.* J Nucl Med 2010; **51**: 837–40.
92. Hakumaki JM, Poptani H, Sandmair AM, *et al.* Nat Med 1999; **5**: 1323–7.
93. Jensen LR, Huuse EM, Bathen TF, *et al.* NMR Biomed 2010; **23**: 56–65.
94. Opstad KS, Bell BA, Griffiths JR, Howe FA. Br J Cancer 2009; **100**: 789–94.
95. Cao MD, Sitter B, Bathen TF, *et al.* NMR Biomed 2011 Aug 8 [E-pub]

VISUALIZATION AND ASSESSMENT OF TREATMENT-RELATED APOPTOSIS IN TUMORS: CLINICAL PERSPECTIVES

A.A. Philchenkov

Summary. *Tumor cell death in response to therapeutic interventions can proceed by several distinct mechanisms with apoptosis representing the predominant mode of cell demise. The extent of apoptosis is considered as one of the surrogate markers of tumor responsiveness to the therapy. The review deals with molecular mechanisms of apoptosis focusing on the most important markers useful for detecting the apoptotic cells in biopsy or surgery specimens of cancer tissue. The techniques used for predicting and monitoring the treatment efficacy in cancer patients based on accounting for apoptosis markers in tumor tissues and body fluids are described with particular emphasis on non-invasive technologies for imaging of apoptosis in vivo.*

Key Words: cancer therapy, treatment efficacy, prognosis, apoptosis, necrosis, apoptotic markers, immunohistochemistry, ELISA, cytokeratin-18, nucleosomal DNA, cytochrome *c*, serum, urine, SPECT, PET, radiotracers, annexin V, MR-spectroscopy, taurine, choline-containing metabolites.

Адрес для переписки:

Фильченков А.А.
03022, Киев, ул. Васильковская, 45
Институт экспериментальной патологии,
онкологии и радиобиологии
им. Р.Е. Кавецкого НАН Украины