

## Молекулярные механизмы канцерогенеза астроцитарных глиом

О. М. Гарифулин, В. В. Дмитренко, В. М. Кавсан

Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины  
Ул. Академика Заболотного, 150, Киев, 03143, Украина

---

*В обзоре освещены ключевые молекулярно-генетические события, ведущие к формированию астроцитарных глиом II–IV степени злокачественности. Обобщены данные о роли отдельных генетических элементов в неопластической трансформации астроцитов. Прослежены молекулярные механизмы образования de novo и развития вторичных форм астроцитарных опухолей. Дана сравнительная молекулярно-биологическая характеристика канцерогенеза астроцитарных глиом разной степени злокачественности, выделены общие и специфические элементы, определяющие злокачественную прогрессию этих опухолей.*

---

**Введение.** Астроцитарные глиомы — новообразования астроцитарной глиии головного мозга человека, составляющие до половины всех внутрочерепных опухолей. Для астроцитарных глиом характерна практически стопроцентная летальность, что связано с приобретением злокачественности доброкачественными формами и высокой частотой рецидивов этих опухолей. По данным Управления медицинской статистики МОЗ Украины, случаи злокачественных новообразований центральной нервной системы (ЦНС) составили 4,7 в 1996 и 4,8 в 1997 г. в пересчете на 100000 населения. В нейрохирургических отделениях Украины в 1997 г. прооперировано 1201 человек со злокачественными и 1716 с доброкачественными опухолями нервной системы [1].

В соответствии с системой градации злокачественности астроцитарных опухолей, одобренной ВОЗ, астроцитарная глиома II степени злокачественности обнаруживает атипичность ядер клеток; астроцитарная глиома III степени злокачественности в дополнение к предыдущей характеристике обладает повышенной митотической активностью клеток; астроцитарной глиоме IV степени злокачественности наряду с двумя первыми свойствами присуща эндотелиально-васкулярная пролиферация и/или некротические явления.

Опухолевая прогрессия астроцитарных глиом сопровождается неслучайными хромосомными

абберациями, приводящими к инактивации специфических антионкогенов и активации определенных онкогенов. Формирование злокачественных астроцитарных глиом ассоциировано со сверхэкспрессией генов целого ряда белков контроля клеточного цикла, факторов роста и митогенных стимуляторов клетки. В данном обзоре освещены ключевые молекулярно-генетические события канцерогенеза астроцитарных опухолей разной степени злокачественности.

Молекулярно-генетический анализ формирования астроцитарных глиом I—II степени злокачественности. Общий феномен опухолевых клеток и клеток зародышевого пути — способность к неограниченному делению, минуя критическое укорочение длин теломерных районов хромосом, являющееся следствием эффекта концевой недорепликации [2, 3]. Это явление связывают с активацией теломеразы — рибонуклеопротеида, способного синтезировать теломерные последовательности, используя в качестве матрицы часть собственного РНК-компонента [4]. Теломеразная активность обнаружена в 85 % случаев различных опухолей [5]. В клетках нормальной ткани головного мозга человека теломеразная активность отсутствует. В новообразованиях ЦНС, аналогично другим опухолям, теломераза активируется. Обнаружено, что 65 % глиом содержат активную теломеразу [6]. Прослеживается явная зависимость активации теломеразы от стадии развития опухоли: чем злокачественнее опухоль, тем чаще активирована теломераза [7—

Таблица 1  
Генетические аномалии астроцитарных глиом I—II степени злокачественности

Локализация	Аберрации генетического материала	Частота, %	Литературный источник
10q/10p	Делеции	35	[20]
p53 (17p)	Делеции, инсерции	25—35	[21—24]
17p	Делеции	26	[25]
8q	Инсерции	20—50	[26, 27]
19p/12p	Инсерции	20	[28]
22q	Делеции	16—30	[25, 28]
13q/13p	Делеции	15	[25]

Примечание. Здесь и в табл. 2, 3 участки хромосом с одинаковой частотой перестроек приведены в одном ряду и разделены знаком «/»; возле гена, для которого показано участие в канцерогенезе данных астроцитарных глиом, в скобках приведен участок хромосомы, где он картирован.

9]. Это согласуется с предположением о том, что активация теломеразы является не причиной возникновения, а, скорее, приспособлением, позволяющим пролиферировать уже возникшей опухоли, клетки которой преодолели лимит клеточных делений [4].

Эмбриональная и опухолевая ткани обладают общим свойством — высокой интенсивностью гликолиза даже в аэробных условиях, что отличает их от остальных тканей, где превалирует окислительный метаболизм. Хотя одна из наиболее характерных черт ткани головного мозга человека — потребление большого количества глюкозы и кислорода вследствие высокой интенсивности аэробного гликолиза (дыхательный коэффициент серого вещества головного мозга — 1, белого — 0,86) [10], структурно-функциональные элементы такого метаболизма существенно изменяются в злокачественных новообразованиях головного мозга. Так, отмечено ингибирование митохондриальных функций в астроцитарных опухолях, а также перестройки и модификации самого митохондриального генома, в том числе инсерции его фрагментов в ядерный геном [11—13]. Документировано повышение активности ферментов, вовлеченных в гликолитический путь обмена веществ [10, 13, 14], в частности, изоформы 5-лактатдегидрогеназы [15], а также появление GLUT3 в высокозлокачественных клетках астроцитарных глиом, хотя в норме экспрессия гена *GLUT3* специфична только для нейронов мозга [16].

Члены семейства малых белков теплового шока — Б-кристаллин ( $\alpha$ -изоформа) и HSP27 специфичны для клеток ЦНС человека, причем увеличение экспрессии соответствующих генов вызывается воздействиями различной природы на клеточные культуры астроцитов [17]. Иммуногистохимически

показано, что  $\alpha$ -изоформа Б-кристаллина чаще обнаруживается в астроцитарных глиомах II—III степени злокачественности, чем в глиобластомах, в то время как процент иммуноположительных по белку HSP27 опухолей равномерно увеличивается с возрастанием их степени злокачественности, достигая пика в глиобластоме (74 % опухолей позитивны) [18]. Примерно в половине астроцитарных глиом установлено наличие *sgp90*, отсутствующего в клетках нормальной ткани головного мозга человека [19].

RFLP-анализом и CGH-методом установлено, что ряд специфических мутаций наблюдается уже в клетках доброкачественных астроцитарных опухолей (табл. 1). Определенные типы хромосомных аберраций в астроцитарных глиомах могут свидетельствовать о плохом клиническом прогнозе для больного. Так, в астроцитарных глиомах II степени злокачественности с плохим клиническим прогнозом по гистопатологическому анализу наблюдаются случаи инсерций хромосомного материала, тогда как для их благоприятного варианта более характерны его утери (табл. 1) [29].

Потери гетерозиготности 22, 13 и 17-й хромосом обнаруживаются в астроцитарных глиомах примерно с одинаковой частотой (15—30 %), причем независимо от степени их злокачественности [21, 26, 28]. Предполагаемый антионкоген, делетируемый на коротком плече 22-й хромосомы, однозначно не идентифицирован [30]. Генетический дисбаланс 22-й хромосомы может играть ведущую роль в патогенезе менингиом, поскольку другие хромосомные аберрации у них встречаются очень редко [31]. Ген *NF2* короткого плеча 22-й хромосомы, ответственный за возникновение нейрофиброматоза типа II, часто делетирован в менингиомах и шванномах [30, 31], хотя в астроцитарных опу-

хотя подобной закономерности не обнаружено [30].

Кроме потери предполагаемого антионкогена на коротком плече 22-й хромосомы, с формированием астроцитарных опухолей II степени злокачественности связана также инактивация антионкогена *p53* и активация системы PDGF [32]. Инактивация *p53* в результате мутации одной копии гена и делеции аллеля на коротком плече 17-й хромосомы происходят в одной трети астроцитарных глиом II степени злокачественности [21]. Это приводит к исчезновению опосредованного белком *p53* контроля ряда клеточных процессов: апоптоза, регуляции клеточного цикла, сенсбилизации к повреждениям ДНК, ангиогенеза. Как вероятный механизм реализации в клетке эффекта инактивации *p53* предполагается рост нестабильности генома [22].

Показано, что в ряде случаев амплификация генов и клеточная анеуплоидия прямо связаны с мутациями гена *p53* [32]. Тем не менее, несмотря на то, что отмена функции *p53* действительно может быть ранним инициирующим событием в эволюции астроцитарных опухолей, его абсолютная необходимость для инициации злокачественной трансформации астроцитов остается под вопросом. Так, мутации гена *p53* выявлены и в доброкачественных пилоцитарных астроцитомах [33]. Хотя ген *p21 (WAF1/CIP1)*, являющийся медиатором индуцируемого белком *p53* апоптоза, не обнаруживает мутаций в большинстве астроцитарных глиом II степени злокачественности, повышенная активность *p21* в ряде случаев не коррелирует с возрастающим пролиферативным индексом опухоли [34, 35]. Более того, некоторые низкоккачественные астроцитарные глиомы с неделетированным аллелем гена *p53* аккумулируют его белок в ядрах, что характерно для опухолей с высокой степенью злокачественности [36]. Этот белок может быть функционировать, поскольку существует взаимосвязь его накопления со сверхэкспрессией гена *p21* [35].

Повышение содержания белка *p53* в ядрах клеток некоторых астроцитарных опухолей может отражать и его сродство к повреждениям геномной ДНК, накапливающимся с ростом их злокачественности. Интересно, что в глиомах, аккумулирующих *p53*, появляется антиапоптотический белок Bcl-2, который наряду с инактивацией гена *p53* позволяет клеткам этих опухолей избежать апоптоза [37].

Повышенная экспрессия генов  $\alpha$ - и  $\beta$ -рецепторов PDGF, а также самого гена *PDGF* — раннее и частое событие в этиологии астроцитарных глиом [38, 39]. Механизм, обеспечивающий сверхэкспрессию системы PDGF, пока неизвестен, хотя прослеживается, особенно для  $\alpha$ -рецептора, корреляция с делецией длинного плеча 17-й хромосомы,

на котором расположен ген *p53* [39]. Взаимосвязь между инактивацией *p53* и активацией системы PDGF может играть важную роль в злокачественной трансформации астроцитов. Клеточные культуры астроцитов мышей после утраты *p53* приобретают свойства трансформированных клеток [40, 41]. Такие культуры были способны к формированию подкожных опухолей у «голых» мышей. Как и первичные опухоли мозга у человека, мышинные опухоли обладали весьма слабой способностью к метастазированию [41]. Было показано, что преимущественно А-цепь PDGF и  $\alpha$ -цепь его рецептора обеспечивают аутокринную стимуляцию в низкоккачественных формах астроцитарных опухолей [42]. Реализация такой стимуляции в клетке может быть связана с активацией фосфорилирования HSP27, считающегося одним из ключевых клеточных субстратов для передачи регуляторных сигналов извне в клетку в норме и при патологии [43]. Активация HSP27 отмечена и в клеточных линиях астроцитов, обработанных рядом цитокинов и факторов роста [43].

Остаются неясными генетические механизмы формирования инвазивности, проявляемой клетками астроцитарных опухолей уже II степени злокачественности, но без приобретения метастазирующего потенциала даже у клеток глиобластом [44]. Ген клеточного рецептора гиалуроновой кислоты (*CD44*), вовлеченный в приобретение метастазирующей активности клетками ряда лимфом и карцином, экспрессируется на низком уровне во всех астроцитарных глиомах независимо от степени злокачественности опухоли. Активация гена *CD44* может быть одной из ранних причин приобретения клетками астроцитарных глиом способности к инвазии [45].

Молекулярно-генетический анализ формирования астроцитарных глиом III степени злокачественности. Для этих глиом характерно возрастание частоты генетических aberrаций, отмеченных для опухолей I—II степеней злокачественности, а также появление новых мутаций, ассоциированных со злокачественной прогрессией астроцитарных глиом (табл. 2).

Инсерции в районе 7p и делеции в районах 9p, 11p, 13q или 19q обычны для астроцитарных глиом III степени злокачественности и глиобластом (30—60 % случаев), но очень редки в астроцитарных опухолях II степени злокачественности (табл. 1, 2) [27]. Из генетических aberrаций, приведенных в табл. 2, только один аллелотип, включающий одновременную делецию в районах 10q/10p и 17p, встречается со статистически значимой частотой

Таблица 2

Генетические аномалии астроцитарных глиом III степени злокачественности

Локализация	Аберрации генетического материала	Частота, %	Литературный источник
10q/10p	Делеции	66	[20, 26, 28]
7p13-p11	Амплификация	60	[28]
EGFR (7p13-p11)	Амплификация, мутации	33	[27]
9p	Делеции	40—50	[26, 47]
IFN (тип I) (9p)	Делеции	40—50	[26, 47, 48]
CDKN2/p16 (9p)	Делеции	40—50	[26, 47, 48]
19q	Делеции	40—50	[49, 50]
22q/11p/17p	Делеции	20—30	[26, 28, 51—53]
17p	Делеции	20—30	[51]
p53 (17p)	Делеции	25—35	[21, 22, 37]
13q	Делеции	20—25	[54]
Rb (13q)	Делеции	20—30	[54]
1q/6p/20q	Инсерции	20	[26]
12q13-15	Амплификация	15	[55]
CDK4 (12q13-15)	Амплификация	10—15	[56]

(не менее чем в 35 % случаев злокачественных астроцитарных глиом) [24]. Астроцитарные опухоли III степени злокачественности, рецидивные от низкоккачественных форм, отличаются по типам и количеству хромосомных аберраций от *de novo* возникающих опухолей той же степени злокачественности. В 10 случаях повторного возникновения опухоли: астроцитарная глиома II степени злокачественности — астроцитарная опухоль III степени злокачественности (пять случаев) и астроцитарная глиома II степени злокачественности — глиобластома (пять случаев) отмечены общие для данных пар делеции генетического материала (в X-хромосоме — 30 %; в районе 5p — 20 %), а также его инсерции в районах 8q, 19p, 12p (20 % для каждой пары) [26]. В рецидивных опухолях отмечены делеции в районах 4q, 9p, 10q, 11p, 13q (средняя частота — 30 %) и инсерции в районах 1q, 6p, 12p13, 20q (средняя частота — 20 %) [26].

В локусе 9p21 картирован ген *p16 MTS1*, кодирующий белок CDKN2, ингибирующий активность CDK4. Делеции в *MTS1* отмечены в 82 % астроцитарных опухолей, причем преимущественно у злокачественных их форм [48]. Показательно, что инактивация CDKN2/p16, делеция антионкогена *Rb*, картированного в локусе 13q14.1-2, а также амплификация и сверхэкспрессия гена *CDK4*, картированного в локусе 12q13-15, — альтернативные события в клетках злокачественных астроцитарных опухолей [54, 56]. Половина астроцитарных глиом

II степени злокачественности обнаруживает мутации хотя бы одного компонента в регуляторной цепи p16-CDK4/D1-pRb клеточного цикла [48, 54]. Делеция антионкогена *Rb* происходит в 20—30 % астроцитарных опухолей высокой степени злокачественности [54]. Активация положительного регуляторного фактора клеточной пролиферации CDK4 отмечена в 10—15 % астроцитарных глиом III—IV степени злокачественности [55].

По соседству с геном *p16* в локусе 9p13-21 расположено семейство 20 генов *IFN* типа I ( $\alpha$ ,  $\beta$  и  $\gamma$ ), часто делетируемых (30—40 % случаев) в астроцитарных глиомах III степени злокачественности [26, 48].  $\alpha$ -IFN ингибирует транскрипцию более 30 ядерных белков, вовлеченных в положительную регуляцию клеточного цикла, что приводит к замедлению пролиферации раковых клеток и способствует процессам клеточной дифференцировки [57].  $\alpha$ -IFN посредством *Fas*-лиганда усиливает апоптоз опухолевых клеток и тормозит процессы ангиогенеза в опухолевой ткани [58, 59]. Предполагалось ингибирующее влияние  $\alpha$ -IFN на онкогены *c-myc*, *c-src*, *Ha-ras* [59], однако повышенная экспрессия этих и других онкогенов в астроцитарных глиомах — очень редкое событие, которое было показано только в единичных случаях глиобластом для *c-myc*, *c-myb*, *c-fos*, *N-myc*, *N-ras* (*Ha-ras* и *Ki-ras*) [60—63].

Амплификация и повышенная экспрессия гена *EGFR*, одного из медиаторов аутокринной стимуля-

Таблица 3  
Генетические аномалии астроцитарных глиом IV степени злокачественности

Локализация	Аберрации генетического материала	Частота, %	Литературный источник
10q/10p	Делеции	> 90	[20, 68, 69]
MMAC1/PTEN (10q)	Делеции	17—44	[70—73]
7p	Амплификация	70	[26, 74]
EGFR (7p)	Амплификация, мутации	46	[46, 75]
9p	Делеции	50—71	[26, 48]
IFN (тип I) (9p)	Делеции	50—71	[26, 47, 48]
CDKN2/p16 (9p)	Делеции	33—68	[26, 47, 48]
19q	Делеции	50—60	[49, 50]
17p	Делеции	36—39	[51]
p53 (17p)	Делеции, мутации	30—60	[21, 22, 37]
22q	Делеции	25—33	[74]
13q	Делеции	29	[54]
11p	Делеции	20—30	[52, 53]
15q	Делеции	23	[74]
1q/6p/20q	Инсерции	20	[28, 74]
CDK4 (12q13-15)	Амплификация	11	[76]

ции роста клеток, обнаружена в 33 % астроцитарных глиом III степени злокачественности [46]. Наблюдаются также структурные перестройки и точечные мутации в нуклеотидной последовательности самого амплифицированного гена *EGFR*, что приводит к изменению функциональных характеристик его белка. Установлено, что нуклеотидные последовательности гена *EGFR*, соответствующие экстра- и внутриклеточным доменам его белка, имеют «горячие точки», в которых чаще всего происходят мутации [46].

Любое из вышеописанных событий ведет к нарушению нормального соотношения фаз клеточного цикла G1-S; онкогенный эффект такого нарушения проявляется в возрастании митотического индекса, отмечаемом в астроцитарных опухолях III степени злокачественности, по сравнению с опухолями I—II степени.

Злокачественные астроцитарные глиомы исследовали на экспрессию генов ряда факторов, вовлеченных в приобретение клетками метастазирующей активности и способности к миграции. Обнаружено, что экспрессия гена *IL-8*, белок которого является хемокином (опухолезависимым хемотаксическим фактором), участвующим в процессах инвазии и метастазирования новообразований, коррелирует с ростом степени злокачественности астроцитарных глиом [64, 65]. Экспрессия генов коллагеназ типа IV, соответствующих белкам 72 кДа

(MMP-2) и 92 кДа (MMP-9), значительно повышалась в злокачественных по сравнению с доброкачественными опухолями, достигая пика в глиобластомах [66, 67].

Молекулярно-генетический анализ формирования астроцитарных глиом IV степени злокачественности. Для глиобластомы как для самой злокачественной формы астроцитарных опухолей характерны множественные генетические аномалии, которые трудно систематизировать. Тем не менее, многие из них отмечаются и в астроцитарных глиомах I—III степени злокачественности. Основные мутационные события, обнаруженные в клетках глиобластом, суммированы в табл. 3.

Помимо приведенных в табл. 3 данных, для высокозлокачественных астроцитарных глиом установлена внутриопухолевая цитогенетическая гетерогенность. Так, неодинаковыми для нескольких биопсий одной астроцитарной опухоли, взятых в ее разных участках (локус-зависимыми), были аберрации хромосом 3, 4, 8, 11, 12, 17, 20, 21 и X. Частота появления хотя бы одной из этих генетических аномалий коррелировала со степенью злокачественности опухоли и отмечалась в 72 % глиобластом, 50 % астроцитарных глиом II—III степени злокачественности и не отмечалась ни в одной из астроцитарных опухолей I степени злокачественности. Лocus-независимыми были утери и добавления генетического материала 7-й хромосо-

мы (67—73 % случаев), а также делеции участков 10-й (47 % случаев) и 22-й (37 % случаев) хромосом, участков в 9p и 13q (53 % случаев) [74]. Цитогенетическая гетерогенность может быть связана с анеупloidией опухолевых клеток, которая характерна для 45 % глиобластом и 12 % астроцитарных глиом II—III степени злокачественности [74]. Важно отметить, что первичные глиобластомы в 70 % случаев обнаруживают в локусах хромосом, указанных в табл. 3, инсерции генетического материала, тогда как у рецидивных от астроцитарных глиом II—III степени злокачественности опухолей такое явление весьма редко [77].

Частоты аберраций хромосомы 10 возрастают пропорционально степени злокачественности астроцитарной глиомы и достигают пика в глиобластоме. Поиск возможного антионкогена, расположенного на участке 10q, привел к идентификации как наиболее вероятного кандидата гена *MMA31/PTEN*, обладающего тирозин-фосфатазной активностью (*MMA31*) и имеющего гомологию с некоторыми белками цитоскелета — тензином и оксиллином (*PTEN*) [69, 70]. Оказалось, что мутации *MMA31/PTEN* обнаруживаются в 10—15 % различных опухолей [70]. Появляется все больше данных о вероятной локализации в участках 10q и 10p еще нескольких потенциальных антионкогенов [70—73].

Наиболее распространенное явление, связанное с увеличением копияности генов в глиобластомах, — амплификация гена *EGFR*, которая характерна для 46 % данных опухолей [46]. Увеличение копияности гена *EGFR* почти никогда не выявляется в глиобластомах с мутацией гена *p53* или с высоким уровнем экспрессии гена  $\alpha$ -рецептора PDGF [78]. Мутации *p53* обнаруживаются более чем в двух третях вторичных глиобластом, но очень редки в первичных опухолях [32]. По мутациям гена *p53* и результатам иммуноанализа белка *EGFR* выделяется вариант *p53+/EGFR-*, характерный для вторичных глиобластом, и вариант *p53-/EGFR+*, наблюдающийся у *de novo* возникающих этих опухолей [78]. Около одной трети глиобластом обнаруживают только инактивацию *p53*, тогда как остальные — амплификацию гена *EGFR* либо ни одной из этих генетических аномалий [78]. Глиобластомы с мутацией гена *p53* возникают у более молодых пациентов, имевших ранее менее злокачественные формы астроцитарных глиом, в то время как опухоли с амплификацией гена *EGFR* выявляются у значительно более пожилых людей, которые не имели ранее случаев новообразований астроцитарного происхождения [32, 78].

В глиобластомах с амплификацией гена *EGFR*

всегда отмечаются и делеции хромосомы 10, однако одновременно никогда не обнаруживаются случаи инсерции генетического материала в участках 8q. Последнее характерно для половины астроцитарных глиом II степени злокачественности [26, 27]. Это указывает на то, что инсерции в 8q — важное событие при образовании глиобластом, производных от низкоккачественных форм астроцитарных глиом и представляющих генетический вариант, отличный от первичных опухолей, для которых характерна амплификация гена *EGFR* [22, 79].

Повышенная экспрессия гена *MDM2*, клеточного ингибитора функций *p53*, играет важную роль в этиологии первичных злокачественных астроцитарных опухолей. Иммунореактивность к белку *MDM2* обнаружена в половине первичных глиобластом и только в 11 % вторичных опухолей, причем в большинстве иммуноположительных образцов не было выявлено амплификации гена *MDM2* и одновременной мутации гена *p53*. При формировании вторичных глиобластом предполагается доминирование механизма контроля клеточной пролиферации, связанного с активацией гена *MDM2*, что позволяет клеткам избегать опосредованного *p53* контроля этого процесса [80].

В глиобластомах несколько чаще, чем в астроцитарных опухолях III степени злокачественности, инактивируется ген *CDKN2/p16*, который ингибирует активность *CDK4* или циклина D1 [48]. Высококкачественные астроцитарные глиомы с гомозиготной делецией гена *CDKN2/p16* содержат более активно пролиферирующие клетки, чем без такой делеции, что может вызывать более интенсивный рост культур клеток некоторых глиобластом [81]. Функциональная активность амплифицированного гена *CDK4* играет важную роль в формировании независимого от рассмотренных выше генетического варианта глиобластом, составляющего 11 % случаев этих опухолей [76].

Выше уже обсуждалась возможная роль инактивации генов интерферона, расположенных на коротком плече 9-й хромосомы, в этиологии злокачественных астроцитарных глиом. Показательно, что трансфекция гена  $\beta$ -*IFN* в клетки глиомной культуры заметно ингибировала рост реципиентных клеток [82].

Сравнительный генетический анализ парных образцов биопсий астроцитарных опухолей и рецидивных от них глиобластом, проведенный в ряде работ, позволил классифицировать рецидивы на две группы [83]. В первой группе рецидивных глиобластом сохранялись генетические аномалии, отмеченные у опухолей-предшественников. Во второй группе мутации генов, связанные с канцероген-

незом астроцитарных глиом, наблюдались только у рецидивных форм и не были обнаружены у первичных опухолей: делеции участков 17-й хромосомы, мутации гена *p53*, делеции гена *CDKN2/p16*, а также амплификация и сверхэкспрессия генов *CDK4* и  $\alpha$ -рецептора PDGF.

Для глиобластом характерен ряд патологических явлений, включающих эндотелиально-васкулярную пролиферацию, некроз, а также ярко выраженную резистентность к традиционным цитостатическим препаратам. Возможным объяснением может служить физиология самой опухоли, создающая в ней эффект гипоксии, что ведет к усилению некротических явлений и селекции еще более злокачественных клонов опухолевых клеток [84]. Клетки, разрушающиеся при гипоксии, могут быть источником ростостимулирующих факторов, а сама гипоксия может вызывать активацию ангиотензиногенных факторов, в частности, увеличение экспрессии гена *VEGF*. В злокачественных глиомах экспрессия гена *VEGF* увеличивается в 20—50 раз в сравнении с менее злокачественными формами этих опухолей [84]. К активации гена *VEGF* может приводить и сверхэкспрессия гена *EGFR*, характерная для первичных глиобластом [85].

Одновременно с геном *VEGF* в глиобластомах выявлена повышенная экспрессия широкого спектра генов клеточных факторов роста. Белки А-цепи PDGF и  $\alpha$ -рецептора для А-цепи PDGF обнаруживались в клетках глиобластом, тогда как белок Б-цепи PDGF локализовался в гиперплазированной эндотелии сосудов опухоли, а  $\beta$ -рецептор — в околоопухолевой строме [38]. Примечательно, что экспрессия всей системы генов *PDGF* была значительно более увеличена в глиобластомах, чем в астроцитарных глиомах II—III степени злокачественности, что свидетельствует об усилении роли PDGF в паракринной и аутокринной стимуляции опухолевой прогрессии клеток.

В нервной системе человека IGF-I и IGF-II активны во время эмбрионального развития мозга и периферических нервов, когда они действуют как митогены на незрелые нейроны и астроциты [86]. Постнатально только IGF-II детектируется в нервном сплетении сосудистой оболочки глаза и менингеальных тканях головного мозга, а оба фактора — в ганглиях симпатической нервной системы и мозговом веществе надпочечника. Обнаружено стимулирующее воздействие этих факторов на ДНК- и РНК-синтез в клетках, а также на процессы усвоения клетками глюкозы, синтеза гликогена, транспорта аминокислот и синтеза липидов [86]. Экспрессия обоих генов *IGF* повышена в глиомах, где эти факторы могут участвовать в регуляции

метаболизма глюкозы, интенсивность которого в клетках новообразований мозга существенно возрастает, а также действовать как митогены [87—89]. Показана роль IGF-I и его рецептора в аутокринной стимуляции клеток глиобластом, независимой от системы PDGF [90].

FGF — митогенный стимулятор эндотелия сосудистой системы, а также ряда мезодермальных и нейроэктодермальных клеток [91]. FGF и его рецепторы выявляются иммуногистохимически в менингиомах, шванномах и злокачественных глиомах [91, 92]. Экспрессия гена изоформы FGF — основного фактора bFGF — одинаково повышена в различных опухолях мозга, в то время как изоформа кислого белка aFGF или FGF-1 не выявлялась в менингиомах [92]. Ген *FGF-1* и гены его рецепторов (*FGFR-1*, *FGFR-2*) обнаруживают ярко выраженное усиление экспрессии в глиобластоме [93]. Содержание иммунореактивных белков указанных генов было значительно выше в глиобластоме, чем в окружающей ее нормальной ткани головного мозга, причем FGF-1 был представлен изоформой В (FGF-1.В), которая характерна для нейрональных, но не глиальных клеток нервной системы. Для генов *FGFR* обнаруживается дифференциальная активность с ростом степени злокачественности астроцитарных опухолей: если *FGFR-2* активен в ткани головного мозга и низкоклеточных астроцитарных глиомах, то экспрессия гена *FGFR-1* ( $\beta$ -форма) значительно увеличивается в высокозлокачественных опухолях [94].

В целом активация системы FGF обеспечивает аутокринный механизм стимуляции процессов неоваскуляризации с ростом степени злокачественности астроцитарных глиом [95]. Обнаружено, что образование глиобластом часто сопровождается угнетением функционирования иммунной системы организма. Это угнетение связывают с повышенной продукцией клетками глиобластом  $\beta$ -2 формы TGF — цитокина, продуцируемого различными опухолевыми клетками и одновременно обладающего свойством тормозить рост некоторых видов рака [46, 96].  $\beta$ -2 форма TGF ингибирует на 70—85 % IL-2-зависимую пролиферацию инфильтрующихся из опухоли лимфоцитов и на 60—100 % — цитотоксическое действие этих лимфоцитов по отношению к различным опухолевым мишеням, включая аутологичные глиобластомные клетки [97, 98].

Помимо TGF в глиобластоме показана дерегуляция экспрессии генов целого ряда цитокинов, обеспечивающих пролиферацию и инвазию высокозлокачественных клеток данной опухоли. IL-10 — проопухолевый цитокин, мощный ингибитор

противоопухолевой цитотоксичности ряда моноцитов и макрофагов, усиливающий рост многих видов неоплазм [99]. В ряду астроцитарных глиом показана избирательная экспрессия IL-10 только для высокоинвазивных клеток глиобластом, где он может оказывать ингибирующее влияние на продукцию  $\alpha$ - и  $\gamma$ -IFN, тормозящих пролиферативную активность опухолей [100]. GM-CSF действует на зрелые моноциты/макрофаги, усиливая секрецию этими клетками провоспалительного цитокина IL-1, а также проопухолевых IL-6 и TNF. Понижение экспрессии соответствующих этим факторам генов в ряде глиобластом по сравнению с астроцитарными опухолями более низкой степени злокачественности может быть связано с формированием высокого инвазионного и пролиферативного потенциала глиобластомных клеток [100].

В формировании инвазивности клеток глиобластом, как и других опухолей, показана важная роль системы *u-AP*, к которой относятся сам *u-AP*, *u-APR*, плазмин, а также ингибиторы активности *u-AP*: PAI-1, PAI-2 и  $\alpha$ -форма антиплазмина-2 [101]. Установлено, что плазмин активируется в результате протеолитического расщепления активатором урокиназы и осуществляет протеолитическую деградацию ряда белков внеклеточного матрикса (фибрин, фибронектин, ламинин) [101]. В ткани нормального головного мозга человека гены *u-AP* и *u-APR* неактивны. В астроцитарных глиомах II—III степени злокачественности выявляется только белок *u-APR*, равномерно распределенный в ткани этих опухолей, тогда как в глиобластоме обнаруживается и белок *u-AP*, причем в клетках, локализованных по периметру данной опухоли [102]. В клеточных линиях глиобластом были выявлены PAI-1 и PAI-2, а экспрессия гена *PAI-1*, наряду с геном *u-AP* усиливалась после обработки клеток провоспалительным IL-1 [103]. Клетки глиобластомной линии, трансфицированные антисмысловой кДНК *u-APR*, теряли способность к инвазии и опухолеобразованию у «голых» мышей [104]. Экспрессия генов белков внеклеточного матрикса — коллагена (тип 6), фибронектина и ламинина, появление которых ассоциировано с установлением метастазирующей активности клеток многих опухолей, иммуногистохимическим анализом астроцитарных глиом была подтверждена только для глиобластом [105]. Для некоторых глиобластом показана активация гена *hNr-CAM*, а также появление мембранной изоформы N-CAM. Это указывает на вовлечение специфических молекул клеточной адгезии в формирование межклеточных контактов внутри опухолевой ткани глиобластом [106]. В астроцитарных глиомах наблюдаются слу-

чай ингибирования экспрессии гена *DCC*, картированного в локусе 18q21 и относящегося к семейству генов белков адгезии нервных клеток, которые мажорно представлены в нервной системе. Астроцитарные глиомы I—II степени злокачественности были иммуноположительны по *DCC*, в то время как более чем в половине высокозлокачественных опухолей (66 %) отмечают значительное снижение иммунореактивности к этому белку. Вторичные глиобластомы в половине случаев давали отрицательный результат, тогда как первичные опухоли в 80 % случаев были иммуноположительны по *DCC*. Инактивация гена *DCC* коррелирует со злокачественной прогрессией астроцитарных опухолей и характерна при формировании вторичных глиобластом [107].

Гены *mdr1a*, *mdr1b* и кодируемый ими гликопротеин P интенсивно изучались как потенциально связанные с мультирезистентностью клеток высокозлокачественных глиом к фармакотерапии, однако однозначно их роль в этом явлении не определена [108, 109]. Взаимосвязь экспрессии генов контроля клеточного цикла (*p16*, *p53*, *EGFR*, *MDM2*, *Bcl-2*) с резистентностью опухоли к терапии и последующей неблагоприятной клиникой пациентов исследовали для первичных и вторичных глиобластом. Как оказалось, выживание больных в трех возрастных группах (до 40, 40—60 и 61—80 лет) не обнаруживает зависимости от мутаций ни одного из указанных выше генов или фактора первичности/вторичности возникновения опухоли [110]. Экспрессия гена *IL-1* в опухолевых клетках, по-видимому, может предопределять более продолжительный срок выживания больных с глиобластомами [65, 111]. Показано, что монооксид азота NO, продуцируемый индуцибельной NOSII, являет собой один из возможных эффекторов активации цитокинов [112]. Экспрессия NOSII чрезвычайно вариабельна в глиобластомах и позитивно коррелирует с экспрессией IL-1. Тем не менее, статистический анализ обнаружил, что корреляция между присутствием IL-1 в ткани глиобластомы и выживанием в большинстве случаев не зависит от активности NOSII [113].

Таким образом, формирование астроцитарных глиом может осуществляться альтернативными генетическими путями. Одними из самых ранних инициирующих событий в неопластической трансформации астроцитов (примерно с равной частотой встречаемости) являются инактивация антионкогена *p53* и активация системы PDGF. В злокачественных астроцитарных глиомах инактивация антионкогенов *CDKN2/p16* или *Rb* (около половины всех опухолей), а также сверхэкспрессия гена про-

мотора клеточного цикла *CDK4* (10—15 % опухолей) — взаимоисключающие события. В глиобластомах альтернативными событиями являются сверхэкспрессия гена *EGFR* (характерна для первичных опухолей), инактивация антионкогена *p53* (вторичные опухоли) или может иметь место вариант данной опухоли, в котором не выявляется ни одна из этих мутаций. По-видимому, разнообразие генетических вариантов образования астроцитарных опухолей может быть обусловлено также эпигенетическими эффектами [114].

*O. M. Garifulin, V. V. Dmitrenko, V. M. Kavsan*

Molecular mechanisms of astrocytic gliomas carcinogenesis

#### Summary

Basic genetic alterations which lead to forming the astrocytic gliomas of grade II—IV are described in the review. The data concerning the genetic elements, participating in the malignant transformation of astrocytic cells, are summarized. The molecular mechanisms of the arising de novo and developing of the secondary astrocytic tumors are analyzed. The molecular characteristics of carcinogenesis of different malignancy grades astrocytic gliomas are compared. The general and specific elements that determine the malignant progression of astrocytic gliomas are described.

*O. M. Гарифулин, В. В. Дмитренко, В. М. Кавсан*

Молекулярні механізми канцерогенезу астроцитарних гліом

#### Резюме

В огляді висвітлено ключові молекулярно-генетичні події, які спричиняють формування астроцитарних гліом II—IV ступеня злоякісності. Узагальнено дані стосовно ролі окремих генетичних елементів у неопластичній трансформації астроцитів. Простежено молекулярні механізми виникнення de novo і розвитку вторинних форм астроцитарних пухлин. Надамо порівняльну молекулярно-біологічну характеристику канцерогенезу астроцитарних гліом різного ступеня злоякісності, визначено загальні і специфічні елементи, які зумовлюють злоякісну прогресію цих пухлин.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Зозуля Ю. П., Пацко Я. В., Никифорова Г. М. Эпидемиология нейроонкологических заболеваний: современный стан в Украине та зарубіжжі (огляд літератури) // Клін. медицина.—1999.—5, № 2.—С. 234—247.
2. Оловников А. М. Принцип маргинотомии в матричном синтезе полинуклеотидов // Докл. АН СССР.—1971.—201, № 6.—С. 1496—1499.
3. Watson J. D. Origin of concatameric T7 DNA // Nature New Biol.—1972.—239, N 94.—P. 197—201.
4. Чех Т. Р., Накамура Т. М., Лингнер И. Теломераза как истинная обратная транскриптаза // Биохимия.—1997.—62, № 11.—С. 1407—1410.
5. Миккер А. К., Коффи Д. С. Теломераза: многообещающий маркер биологического бессмертия половых, стволовых и раковых клеток // Биохимия.—1997.—62, № 11.—С. 1547—1557.
6. Morii K., Tanaka R., Onda K., Tsumanuma I., Yoshimura J. Expression of telomerase RNA, telomerase activity, and telomere length in human gliomas // Biochem. and Biophys. Res. Commun.—1997.—239, N 3.—P. 830—834.

7. Mokbel K., Ghilchik M. Telomerase activity in human breast tumors // J. Nat. Cancer Inst.—1996.—88, N 12.—P. 839—840.
8. Hiyama E., Kodama T., Shinbara K., Iwao T., Itoh M., Hiyama K., Shay J. W., Matsuura Y., Yokoyama T. Telomerase activity is detected in pancreatic cancer but not in benign tumors // Cancer Res.—1997.—57, N 2.—P. 326—331.
9. Brien T. P., Kallakury B. V., Lowry C. V., Ambros R. A., Muraca P. J., Malfetano J. H. Telomerase activity in benign endometrium and endometrial carcinoma // J. Cancer Res.—1997.—57, N 13.—P. 2760—2764.
10. Воллеман М. Биохимия опухолей мозга.—М.: Мир, 1977.—211 с.
11. Liang B. C., Hays L. Mitochondrial DNA copy number changes in human gliomas // Cancer Lett.—1996.—105, N 2.—P. 167—173.
12. Liang B. C. Evidence for association of mitochondrial DNA sequence amplification and nuclear localization in human low-grade gliomas // Mut. Res.—1996.—354, N 1.—P. 27—33.
13. Oudard S., Boitier E., Miccoli L., Rousset S., Dutrillaux B., Poupon M. F. Gliomas are driven by glycolysis: putative roles of hexokinase, oxidative phosphorylation and mitochondrial ultrastructure // Anticancer Res.—1997.—17, N 3.—P. 1903—1911.
14. Meixensberger J., Herting B., Roggendorf W., Reichmann H. Metabolic patterns in malignant gliomas // J. Neurooncol.—1995.—24, N 2.—P. 153—161.
15. Subhash M. N., Rao B. S., Shankar S. K. Changes in lactate dehydrogenase isoenzyme pattern in patients with tumors of the central nervous system // J. Neurochem.—1993.—22, N 2.—P. 121—124.
16. Boado R. J., Black K. L., Pardridge W. M. Gene expression of Glut3 and Glut1 glucose transporters in human brain tumors // Brain Res.—1994.—27, N 1.—P. 51—57.
17. Head M. W., Corbin E., Goldman J. E. Coordinate and independent regulation of alpha B-crystallin and hsp27 expression in response to physiological stress // J. Cell Physiol.—1994.—159, N 1.—P. 41—50.
18. Hitotsumatsu T., Iwaki T., Fukui M., Tateishi J. Distinctive immunohistochemical profiles of small heat shock proteins (heat shock protein 27 and alpha B-crystallin) in human brain tumors // Cancer.—1996.—77, N 2.—P. 352—361.
19. Kato S., Morita T., Takenaka T., Kato M., Hirano A., Herz F., Ohama E. Stress-response (heat-shock) protein 90 expression in tumors of the central nervous system: an immunohistochemical study // Acta Neuropathol. (Berlin)—1995.—89, N 2.—P. 184—188.
20. Ichimura K., Schmidt E. E., Miyakawa A., Goike H. M., Collins V. P. Distinct patterns of deletion on 10p and 10q suggest involvement of multiple tumor suppressor genes in the development of astrocytic gliomas of different malignancy grades // Genes Chromosomes Cancer.—1998.—22, N 1.—P. 9—15.
21. Louis D. N. The p53 gene and protein in human brain tumors // J. Neuropathol. Exp. Neurol.—1994.—53, N 1.—P. 11.
22. Sidransky D., Mikkelsen T., Schwachheimer K., Rosenblum M. L., Cavane W., Vogelstein B. Clonal expansion of p53 mutant cells is associated with brain tumour progression // Nature.—1992.—355, N 6363.—P. 846—847.
23. Ohgaki H., Watanabe K., Peraud A., Biernat W., von Deimling A., Yasargil M. G., Yonekawa Y., Kleihues P. A case history of glioma progression // Acta Neuropathol. (Berlin)—1999.—97, N 5.—P. 525—532.
24. Ohgaki H., Schauble B., zur Hausen A. Genetic alterations

- associated with the evolution and progression of astrocytic brain tumours // *Virchows Arch.*—1995.—427, N 2.—P. 113—118.
25. James C. D., Collins V. P. Glial tumors // *Molecular genetics of nervous system tumors* / Eds A. J. Levine, H. H. Schmidek.—New-York: Wiley-Liss press, 1993.—P. 241—248.
  26. Weber R. G., Sabel M., Reifenberger J., Sommer C., Oberstrass J., Reifenberger G., Kiessling M., Cremer T. Characterization of genomic alterations associated with glioma progression by comparative genomic hybridization // *Oncogene.*—1996.—13, N 5.—P. 983—994.
  27. Nishizaki T., Ozaki S., Harada K., Ito H., Arai H., Beppu T., Sasaki K. Investigation of genetic alterations associated with the grade of astrocytic tumor by comparative genomic hybridization // *Genes Chromosomes Cancer.*—1998.—21, N 4.—P. 340—346.
  28. Fufts D., Pedone C. A., Thomas G. A., White R. Allelotype of human malignant astrocytoma // *Cancer Res.*—1990.—50, N 18.—P. 5784—5789.
  29. Sallinen S. L., Sallinen P., Haapasalo H., Kononen J., Karhu R., Helen P., Isola J. Accumulation of genetic changes is associated with poor prognosis in grade II astrocytomas // *Amer. J. Pathol.*—1997.—151, N 6.—P. 1799—1807.
  30. Hoang-Xuan K., Merel P., Vega F., Hugot J. P., Cornu P., Delattre J. Y., Poisson M., Thomas G., Delattre O. Analysis of the NF2 tumor-suppressor gene and of chromosome 22 deletions in gliomas // *Int. J. Cancer.*—1995.—60, N 4.—P. 478—481.
  31. Seizinger B. R., Martuza R. L., Gusella J. F. Loss of genes on chromosome 22 in tumorigenesis of human acoustic neuroma // *Nature.*—1986.—322, N 6080.—P. 644—647.
  32. Louis D. N. A molecular genetic model of astrocytoma histopathology // *Brain Pathol.*—1997.—7, N 2.—P. 755—764.
  33. Willert J. R., Daneshvar L., Sheffield V. C., Cogen P. H. Deletion of chromosome arm 17p DNA sequences in pediatric high-grade and juvenile pilocytic astrocytomas // *Genes Chromosomes Cancer.*—1995.—12, N 3.—P. 165—172.
  34. Koopmann J., Maintz D., Schild S., Schramm J., Louis D. N., Wiestler O. D., von Deimling A. Multiple polymorphisms, but no mutations, in the WAF1/CIP1 gene in human brain tumours // *Brit. J. Cancer.*—1995.—72, N 5.—P. 1230—1233.
  35. Ono Y., Tamiya T., Ichikawa T., Matsumoto K., Furuta T., Ohmoto T., Akiyama K., Seki S., Ueki K., Louis D. N. Accumulation of wild type p53 in astrocytomas is regionally heterogeneous and associated with increased p21 expression // *Acta Neuropathol. (Berlin).*—1997.—94, N 1.—P. 21—27.
  36. Rubio M.-P., von Deimling A., Yandell D. W., Wiestler O. D., Gusella J. F., Louis D. N. Accumulation of wild-type p53 protein in human astrocytoma // *Cancer Res.*—1993.—53, N 15.—P. 3465—3467.
  37. Alderson L. M., Castleberg R. L., Harsh G. R., 4th, Louis D. N., Henson J. W. Human gliomas with wild-type p53 express bcl-2 // *Cancer Res.*—1995.—55, N 5.—P. 999—1001.
  38. Heldin C.-H. Structural and functional studies on platelet-derived growth factor // *EMBO J.*—1992.—11, N 12.—P. 4251—4259.
  39. Hermanson M., Funa K., Koopmann J., Maintz D., Waha A., Westermarck B., Heldin C. H., Wiestler O. D., Louis D. N., von Deimling A., Nister M. Association of loss of heterozygosity on chromosome 17p with high platelet-derived growth factor receptor expression in human malignant gliomas // *Cancer Res.*—1996.—56, N 1.—P. 164—171.
  40. Bogler O., Huang H.-J. S., Cavenee W. K. Loss of wild-type p53 bestows a growth advantage on primary cortical astrocytes and facilitates their *in vitro* transformation // *Cancer Res.*—1995.—55, N 13.—P. 2746—2751.
  41. Yahanda A. M., Bruner J. M., Donehower L. A., Morrison R. S. Astrocytes derived from p53-deficient mice provide a multistep *in vitro* model for development of malignant gliomas // *Mol. Cell. Biol.*—1995.—15, N 8.—P. 4249—4259.
  42. Hermanson M., Funa K., Hartman M., Claesson-Welsh L., Heldin C. H., Westermarck B., Nister M. Platelet-derived growth factor and its receptors in human glioma tissue: expression of messenger RNA and protein suggests the presence of autocrine and paracrine loops // *Cancer Res.*—1992.—52, N 11.—P. 3213—3219.
  43. Satoh J., Kim S. U. Cytokines and growth factors induce HSP27 phosphorylation in human astrocytes // *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*—1995.—54, N 4.—P. 504—512.
  44. Pilkington G. J. Tumour cell migration in the central nervous system // *Brain Pathol.*—1994.—4, N 2.—P. 157—166.
  45. Eibl R. H., Pietsch T., Moll J., Skroch-Angel P., Heider K. H., von Ammon K., Wiestler O. D., Pontu H., Kleihues P., Herrlich P. Expression of variant CD44 epitopes in human astrocytic brain tumors // *J. Neurooncol.*—1995.—26, N 3.—P. 165—170.
  46. Ekstrand A. J., James C. D., Cavenee W. K., Seliger B., Pettersson R. F., Collins V. P. Genes for epidermal growth factor receptor, transforming growth factor alpha, and epidermal growth factor and their expression in human gliomas *in vivo* // *Cancer Res.*—1991.—51, N 8.—P. 2164—2172.
  47. Kamb A., Gruis N. A., Weaver-Feldhaus J., Liu Q., Harshman K., Tavtigian S. V., Stockert E., Day R. S., 3rd, Johnson B. E., Skolnick M. H. A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types // *Science.*—1994.—264, N 5157.—P. 436—440.
  48. Walker D. G., Duan W., Popovic E. A., Tomlinson F. H., Lavin M. Homozygous deletions of the multiple tumor suppressor gene 1 in the progression of human astrocytomas // *Cancer Res.*—1995.—55, N 1.—P. 20—23.
  49. Rosenberg J. E., Lisle D. K., Burwick J. A., Ueki K., von Deimling A., Mohrenweiser H. W., Louis D. N. Refined deletion mapping of the chromosome 19q glioma tumor suppressor gene to the D19S412-STD interval // *Oncogene.*—1996.—13, N 11.—P. 2483—2485.
  50. Rubio M.-P., Correa K. M., Ueki K., Mohrenweiser H. W., Gusella J. F., von Deimling A., Louis D. N. The putative glioma tumor suppressor gene on chromosome 19q maps between APOC2 and HRC // *Cancer Res.*—1994.—54, N 17.—P. 4760—4763.
  51. El-Azouzi M., Chung R. Y., Farmer G. E., Martuza R. L., Black P. M., Rouleau G. A., Hettlich C., Hedley-Whyte E. T., Zervas N. T., Panagopoulos K. Loss of distinct regions on the short arm of chromosome 17 associated with tumorigenesis of human astrocytomas // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1989.—86, N 18.—P. 7186—7190.
  52. Fufts D., Petronio J., Noblett B. D., Pedone C. A. Chromosome 11p15 deletions in human malignant astrocytomas and primitive neuroectodermal tumors // *Genomics.*—1992.—14, N 3.—P. 799—801.
  53. Sonoda Y., Iizuka M., Yasuda J., Makino R., Ono T., Kayama T., Yoshimoto T., Sekiya T. Loss of heterozygosity at 11p15 in malignant glioma // *Cancer Res.*—1995.—55, N 10.—P. 2166—2168.
  54. Ueki K., Ono Y., Henson J. W. CDKN2/p16 or RB alterations occur in the majority of glioblastomas and are inversely correlated // *Cancer Res.*—1996.—56, N 1.—P. 150—153.
  55. Fischer U., Meltzer P., Meese E. Twelve amplified and expressed genes localized in a single domain in glioma // *Hum. Genet.*—1996.—98, N 5.—P. 625—628.
  56. He J., Olson J. J., James C. D. Lack of p16INK4 or retinoblastoma protein (pRb) or amplification-associated over-

- expression of CDK4 is observed in distinct subsets of malignant glial tumors and cell lines // *Cancer Res.*—1995.—55, N 21.—P. 4833—4836.
57. Matsuoka M., Tani K., Asano S. Interferon-alpha-induced G1 phase arrest mediated by the down-regulation of G1 cyclin-associated kinase activities in mouse macrophages // *Blood.*—1996.—88, N 10.—P. 539—543.
  58. Selleri C., Sato T., DelVecchio L., Luciano L., Barrett A. J., Rotoli B., Young N. S., Maciejewski J. P. Involvement of fas-mediated apoptosis in the inhibitory effects of interferon-alpha in chronic myelogenous leukemia // *Blood.*—1997.—89, N 3.—P. 957—964.
  59. Dutcher J. Biological and antitumor activity of IFN // *Oncol. Biother. Update.*—1996.—1, N 11.—P. 1—11.
  60. Welter C., Henn W., Theisinger B., Fischer H., Zang K. D., Blin N. The cellular *myb* oncogene is amplified, rearranged and activated in human glioblastoma cell lines // *Cancer Lett.*—1990.—52, N 1.—P. 57—62.
  61. Roberts W. M., Douglass E. C., Peiper S. C., Houghton P. J., Look A. T. Amplification of the *gli* gene in childhood sarcomas // *Cancer Res.*—1989.—49, N 19.—P. 5407—5413.
  62. Gerosa M. A., Talarico D., Fognani C., Raimondi E., Colombatti M., Tridente G., De Carli L., Della Valle G. Overexpression of *N-ras* oncogene and epidermal growth factor receptor gene in human glioblastomas // *J. Nat. Cancer Inst.*—1989.—81, N 1.—P. 63—67.
  63. Lang F. F., Miller D. C., Koslow M., Newcomb E. W. Pathways leading glioblastoma multiforme: a molecular analysis of genetic alterations in 65 astrocytic tumors // *J. Neurosurg.*—1994.—81, N 3.—P. 427—436.
  64. Hebert C. A., Baker J. B. Interleukin-8: A review // *Cancer Invest.*—1993.—11, N 6.—P. 743—750.
  65. Yamanaka R., Tanaka R., Saitoh T., Okoshi S. Cytokine gene expression on glioma cell lines and specimens // *J. Neurooncol.*—1994.—21, N 3.—P. 243—247.
  66. Sawaya R. E., Yamamoto M., Gokaslan Z. L., Wang S. W., Mohanam S., Fuller G. N., McCutcheon I. E., Stetler-Stevenson W. G., Nicolson G. L., Rao J. S. Expression and localization of 72kDa type IV collagenase (MMP-2) in human malignant gliomas *in vivo* // *Clin. Exp. Metastasis.*—1996.—14, N 1.—P. 35—42.
  67. Rao J. S., Yamamoto M., Mohanam S., Gokaslan Z. L., Fuller G. N., Stetler-Stevenson W. G., Rao V. H., Liotta L. A., Nicolson G. L., Sawaya R. E. Expression and localization of 92kDa type IV collagenase/gelatinaseB (MMP-9) in human gliomas // *Clin. Exp. Metastasis.*—1996.—14, N 1.—P. 12.
  68. Karlbom A. E., James C. D., Boethius J., Cavenee W. K., Collins V. P., Nordenskjold M., Larsson C. Loss of heterozygosity in malignant gliomas involves at least three distinct regions on chromosome 10 // *Hum. Genet.*—1993.—92, N 2.—P. 169—174.
  69. Steck P. A., Pershouse M. A., Jasser S. A., Yung W. K., Lin H., Ligon A. H., Langford L. A., Baumgard M. L., Hattier T., Davis T., Frye C., Hu R., Swedlund B., Teng D. H., Tavtigian S. V. Identification of a candidate tumour suppressor gene, MMAC1, at chromosome 10q23.3 that is mutated in multiple advanced cancers // *Nature Genet.*—1997.—15, N 4.—P. 356—362.
  70. Teng D. H., Hu R., Lin H., Davis T., Ilijev D., Frye C., Swedlund B., Hansen K. L., Vinson V. L., Gumpfer K. L., Ellis L., El-Naggar A., Frazier M., Jasser S., Langford L. A., Lee J., Mills G. B., Pershouse M. A., Pollack R. E., Tornos C., Troncoso P., Yung W. K., Fujii G., Berson A., Steck P. A. MMAC1/PTEN mutations in primary tumor specimens and tumor cell lines // *Cancer Res.*—1997.—57, N 23.—P. 5221—5223.
  71. Wang S. I., Puc J., Li J., Bruce J. N., Cairns P., Sidransky D., Parsons R. Somatic mutations of PTEN in glioblastoma multiforme // *Cancer Res.*—1997.—57, N 19.—P. 4183—4186.
  72. Bostrom J., Cobbers J. M., Wolter M., Tabatabai G., Weber R. G., Lichter P., Collins V. P., Reifenberger G. Mutation of PTEN (MMAC1) tumor suppressor gene in a subset of glioblastomas but not in meningiomas with loss of chromosome arm 10q // *Cancer Res.*—1998.—58, N 1.—P. 29—33.
  73. Chiariello E., Roz L., Albarosa R., Magnani I., Finocchiaro G. PTEN/MMAC1 mutations in primary glioblastomas and short-term cultures of malignant gliomas // *Oncogene.*—1998.—16, N 4.—P. 541—545.
  74. Harada K., Nishizaki T., Ozaki S., Kubota H., Ito H., Sasaki K. Intratumoral cytogenetic heterogeneity detected by comparative genomic hybridization and laser scanning cytometry in human gliomas // *Cancer Res.*—1998.—58, N 20.—P. 4694—4700.
  75. Sugawa N., Ekstrand A. J., James C. D., Collins V. P. Identical splicing of aberrant epidermal growth factor receptor transcripts from amplified rearranged genes in human glioblastomas // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1990.—87, N 21.—P. 8602—8606.
  76. Rollbrocker B., Waha A., Louis D. N., Wiestler O. D., von Deimling A. Amplification of the cyclin-dependent kinase 4(CDK4) gene is associated with high *cdk4* protein levels in glioblastoma multiforme // *Acta Neuropathol. (Berlin).*—1996.—92, N 1.—P. 70—74.
  77. Maruno M., Yoshimine T., Muhammad A. K., Ninomiya H., Kato A., Hayakawa T. Chromosome aberrations detected by comparative genomic hybridization (CGH) in human astrocytic tumors // *Cancer Lett.*—1999.—135, N 1.—P. 61—66.
  78. Watanabe K., Tachibana O., Sata K., Yonekawa Y., Kleihues P., Ohgaki H. Overexpression of the EGF receptor and p53 mutations are mutually exclusive in the evolution of primary and secondary glioblastomas // *Brain Pathol.*—1996.—6, N 3.—P. 217—223.
  79. Von Deimling A., Louis D. N., von Ammon K., Petersen I., Hoell T., Chung R. Y., Martuza R. L., Schoenfeld D. A., Yasargil M. G., Wiestler O. D. Association of epidermal growth factor receptor gene amplification with loss of chromosome 10 in human glioblastoma multiforme // *J. Neurosurg.*—1992.—77, N 2.—P. 295—301.
  80. Biernat W., Kleihues P., Yonekawa Y., Ohgaki H. Amplification and overexpression of MDM2 in primary (*de novo*) glioblastomas // *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*—1997.—56, N 2.—P. 180—185.
  81. Ono Y., Tamiya T., Ichikawa T., Kunishio K., Matsumoto K., Furuta T., Ohmoto T., Ueki K., Louis D. N. Malignant astrocytomas with homozygous CDKN2/p16 gene deletions have higher Ki-67 proliferation indices // *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*—1996.—55, N 10.—P. 1026—1031.
  82. Mizuno M., Yoshida J., Sugita K., Inoue I., Seo H., Hayashi Y., Koshizaka T., Yagi K. Growth inhibition of glioma cells transfected with the human beta-interferon gene by liposomes coupled with a monoclonal antibody // *Cancer Res.*—1990.—50, N 24.—P. 7826—7829.
  83. Saxena A., Shriml L. M., Dean M., Ali I. U. Comparative molecular genetic profiles of anaplastic astrocytomas/glioblastomas multiforme and their subsequent recurrences // *Oncogene.*—1999.—18, N 6.—P. 1385—1390.
  84. Graeber T. G., Osmanian C., Jacks T., Housman D. E., Koch C. J., Lowe S. W., Giaccia A. J. Hypoxia-mediated selection of cells with diminished apoptotic potential in solid tumors // *Nature.*—1996.—379, N 6560.—P. 88—91.
  85. Goldman C. K., Kim J., Wong W. L., King V., Brock T.,

- Gillespie G. Y. Epidermal growth factor stimulates vascular endothelial growth factor production by human malignant glioma cells: a model of glioblastoma multiforme pathophysiology // *Mol. Cell Biol.*—1993.—4, N 1.—P. 121—133.
86. Gammeltoft S., Danielsen A., Frodin M. Insulin-like growth factors in the nervous system: evolution, fetal development, maintenance and tumor formation // *The insulin-like growth factors and their regulatory proteins* / Ed. D. LeRoith.—New-York: Elsevier Science, 1994.—P. 295—305.
  87. Glick R. P., Unterman T. G., Lacson R. Identification of insulin-like growth factor (IGF) and glucose transporter-1 and -3 mRNA in CNS tumors // *Regul. Pept.*—1993.—48, N 1—2.—P. 251—256.
  88. Sandberg A. C., Engberg C., Lake M., von Holst H., Sara V. R. The expression of insulin-like growth factor I and insulin-like growth factor II genes in the human fetal and adult brain and in glioma // *Neurosci. Lett.*—1988.—93, N 1.—P. 114—119.
  89. Trojan J., Blossey B. K., Johnson T. R., Rudin S. D., Tykocinski M., Ilan J., Ilan J. Loss of tumorigenicity of rat glioblastoma directed by episome-based antisense cDNA transcription of insulin-like growth factor I // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1992.—89, N 11.—P. 4874—4878.
  90. Ambrose D., Resnicoff M., Coppola D., Sell C., Miura M., Jameson S., Baserga R., Rubin R. Growth regulation of human glioblastoma T98G cells by insulin-like growth factor-1 and its receptor // *J. Cell Physiol.*—1994.—159, N 1.—P. 92—100.
  91. Chotani M. A., Chiu J. M. Differential regulation of human fibroblast growth factor1 transcripts provides a distinct mechanism of cell-specific growth factor expression // *Cell Growth and Differ.*—1997.—8, N 9.—P. 999—1013.
  92. Takahashi J. A., Mori H., Fukumoto M., Igarashi K., Jaye M., Oda Y., Kikuchi H., Hatanaka M. Gene expression of fibroblast growth factors in human gliomas and meningiomas: demonstration of cellular source of basic fibroblast growth factor mRNA and peptide in tumor tissues // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1990.—87, N 15.—P. 5710—5714.
  93. Morrison R. S., Yamaguchi F., Saya H., Bruner J. M., Yahanda A. M., Donehower L. A., Berger M. Basic fibroblast growth factor and fibroblast growth factor receptor 1 are implicated in the growth of human astrocytomas // *J. Neurooncol.*—1994.—18, N 3.—P. 207—216.
  94. Yamaguchi F., Saya H., Bruner J. M., Morrison R. S. Differential expression of two fibroblast growth factor-receptor genes is associated with malignant progression in human gliomas // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1994.—91, N 2.—P. 484—488.
  95. Myers R. L., Chedid M., Tronick S. R., Chiu J. Different fibroblast growth factor1 (FGF-1) transcripts in neural tissues, glioblastomas and kidney carcinoma cell lines // *Oncogene.*—1995.—11, N 4.—P. 785—789.
  96. Mapstone T., McMichael M., Goldthwait D. Expression of platelet-derived growth factors, transforming growth factors, and the *ros* gene in a variety of primary human brain tumors // *Neurosurgery.*—1991.—28D, N 2.—P. 216—222.
  97. Wrann M., Bodmer S., de Martin R., Siepl C., Hofer-Warbinek R., Frei K., Hofer E., Fontana A. T cell suppressor factor from human glioblastoma cells is a 12.5-kd protein closely related to transforming growth factor-beta // *EMBO J.*—1987.—6, N 6.—P. 1633—1636.
  98. Kuppner M. C., Hamou M.-F., Sawanuzza Y., Bodmer S., de Tribolet N. Inhibition of lymphocyte function by glioblastoma-derived transforming growth factor beta2 // *J. Neurosurg.*—1989.—71, N 2.—P. 211—217.
  99. Nabioullin R., Sone S., Mizuno K., Yano S., Nishioka Y., Haku T., Ogura T. Interleukin-10 is a potent inhibitor of tumor cytotoxicity by human monocytes and alveolar macrophages // *J. Leuk. Biol.*—1994.—55, N 4.—P. 437—442.
  100. Nitta T., Hishii M., Sato K., Okumura K. Selective expression of interleukin-10 gene within glioblastoma multiforme // *Brain Res.*—1994.—649, N 1—2.—P. 122—128.
  101. Kwaan H. C. The plasminogen-plasmin system in malignancy // *Cancer Metastasis Rev.*—1992.—11, N 3—4.—P. 291—311.
  102. Gladson C. L., Pijuan-Thompson V., Olman M. A., Gillespie G. Y., Yacoub J. Z. Up-regulation of urokinase and urokinase receptor genes in malignant astrocytoma // *Amer. J. Pathol.*—1995.—146, N 5.—P. 1150—1160.
  103. Murphy P., Hart D. A. Modulation of plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor expression in the human U373 glioblastoma/astrocytoma cell line by inflammatory mediators // *Exp. Cell Res.*—1992.—198, N 1.—P. 93—100.
  104. Go Y., Chintala S. K., Mohanam S., Gokaslan Z., Venkaiah B., Bjerkvig R., Oka K., Nicolson G. L., Sawaya R., Rao J. S. Inhibition of *in vivo* tumorigenicity and invasiveness of a human glioblastoma cell line transfected with antisense u-PA vectors // *Clin. Exp. Metastasis.*—1997.—15, N 4.—P. 440—446.
  105. Chintala S. K., Sawaya R., Gokaslan Z. L., Fuller G., Rao J. S. Immunohistochemical localization of extracellular matrix proteins in human glioma, both *in vivo* and *in vitro* // *Cancer Lett.*—1996.—101, N 1.—P. 107—114.
  106. Sehgal A., Boynton A. L., Young R. F., Vermeulen S. S., Yonemura K. S., Kohler E. P., Aldape H. C., Simrell C. R., Murphy G. P. Cell adhesion molecule Nr-CAM is over-expressed in human brain tumors // *Int. J. Cancer.*—1998.—76, N 4.—P. 451—458.
  107. Reyes-Mugica M., Rieger-Christ K., Ohgaki H., Ekstrand B. C., Helie M., Kleinman G., Yahanda A., Fearon E. R., Kleihues P., Reale M. A. Loss of DCC expression and glioma progression // *Cancer Res.*—1997.—57, N 3.—P. 382—386.
  108. Schott B., Bennis S., Pourquier C. Differential over-expression of *mdr1* genes in multidrug-resistant rat glioblastoma cell lines selected with doxorubicin or vincristine // *Int. J. Cancer.*—1993.—55, N 1.—P. 115—121.
  109. Walther W., Stein U., Pfeil D. Gene transfer of human TNF alpha into glioblastoma cells permits modulation of *mdr1* expression and potentiation of chemosensitivity // *Int. J. Cancer.*—1995.—61, N 6.—P. 832—839.
  110. Newcomb E. W., Cohen H., Lee S. R., Bhalla S. K., Bloom J., Hayes R. L., Miller D. C. Glioblastoma multiforme is not influenced by altered expression of p16, p53, EGFR, MDM2 or *Bcl-2* genes // *Brain Pathol.*—1998.—8, N 4.—P. 655—667.
  111. Lichter T., Libermann T. A. Coexpression of interleukin-1 beta and interleukin-6 in human brain tumors // *Neurosurgery.*—1994.—34, N 4.—P. 669—672.
  112. Farias-Eisner R., Sherman M. P., Aeberhard E., Chaudhuri G. Nitric oxide is an important mediator for tumoricidal activity *in vivo* // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1994.—91, N 20.—P. 9407—9411.
  113. Ludwig H. C., Feiz-Erfan I., Bockermann V., Behnke-Mursch J., Schallock K., Markakis E. Expression of nitric oxide synthase isozymes (NOS I-III) by immunohistochemistry and DNA *in situ* hybridization. Correlation with macrophage presence, vascular endothelial growth factor (VEGF) and oedema volumetric data in 220 glioblastomas // *Anticancer Res.*—2000.—20, N 1A.—P. 299—304.
  114. Strohmman R. Epigenesis: the missing beat in biotechnology // *Biotechnology.*—1994.—12, N 2.—P. 156—164.

УДК 577.21:577.214.622

Надійшла до редакції 28.02.01