

Н.А. Мітряєва,
Т.С. Бакай,
Н.О. Бабенко,
Т.В. Сегеда,
Н.Є. Узленкова

ДУ Інститут медичної
радіології ім. С.П. Григор'єва
АМН України, Харків

Вплив іонізуючого випромінювання та хемотерапевтичних препаратів (етопозид, таксотер, цисплатин) на керамідний шлях апоптозу в пухлині Герена

The influence of ionized radiation and chemotherapy drugs (etoposide, Taxotere, cisplatin) on ceramide pathway of apoptosis in Guerin's carcinoma

Цель работы: Изучить влияние ионизирующего излучения, таксотера, этопозид, цисплатина, а также комбинированного действия химиопрепаратов и рентгеновского облучения на содержание сфинголипидов — церамида и сфингомиелина в ткани опухоли Герена и сыворотке крови крыс-опухоленосителей.

Материалы и методы: В качестве экспериментальной модели использовали крыс популяции Вистар массой 160–180 г с подкожно перевитой карциномой Герена. Локальное рентгеновское облучение зоны роста опухоли проводили фракционированно при дозе фракции 5 Гр с интервалом между сеансами 24 часа (суммарная доза на зону роста опухоли составляла 10 Гр) на аппарате РУМ-17. Противоопухолевые препараты вводили внутривенно за 24 часа до первого сеанса облучения в дозах: цисплатин («Эбеве») — 6 мг/кг массы тела; таксотер («Рор Пуленк Рорер») — 8 мг/кг массы тела; этопозид («Эбеве») — 5 мг/кг массы тела. Декаптацию проводили через 24 часа после последнего сеанса облучения. Гомогенат ткани использовали для экстракции липидов по методу Фолча. Церамид и сфингомиелин разделяли с помощью хроматографии в тонком слое силикагеля на пластинках Sorbfil (АО «Сорбполимер», Россия). Для идентификации липидов использовали стандарты церамида и сфингомиелина (Sigma). Белок в гомогенате ткани определяли по Лоури. Статистический анализ проводили, используя t-критерий Стьюдента.

Результаты: Установлено, что наиболее мощными модуляторами сфинголипидного обмена в ткани аденокарциномы Герена являются таксотер и этопозид. Они увеличивают содержание проапоптотического сфинголипида — церамида в опухолевых клетках за счет активации сфингомиелинового цикла. Показано, что при комбинированном воздействии химио- и радиотерапии накопление церамида играет существенную роль в индукции апоптоза и повышении радиочувствительности опухолевых клеток, что весьма важно для преодоления резистентности опухоли к действию химиолучевого лечения.

Выводы: Выявлены разные механизмы накопления церамида в опухоли Герена при комбинированном действии ионизирующей радиации и противоопухолевых препаратов: действие рентгеновского излучения в комбинации с таксотером или этопозидом стимулирует синтез церамида de novo, а в комбинации с цисплатином приводит к накоплению церамида за счет деградации сфингомиелина.

Ключевые слова: опухоль Герена, апоптоз, церамид, сфингомиелин, цисплатин, таксотер, этопозид, ионизирующее излучение.

Ключові слова: пухлина Герена, апоптоз, керамід, сфінгомієлін, цисплатин, таксотер, етопозид, іонізуюче випромінювання.

Objective: To investigate the influence of ionizing radiation, Taxotere, etoposide, cisplatin as well as combination radiotherapy and x-ray exposure on the amount of sphingolipids (ceramine and sphingomyelin) in the tissue of Guerin's carcinoma and blood serum of the rats with tumors.

Material and Methods: Wistar rats weighing 160-180 g with subcutaneously inoculated Guerin's carcinoma were used as an experimental model. Local x-ray irradiation of the zone of the tumor growth was delivered in fractions (5 Gy per fraction) with 24-hour intervals (total dose on the tumor zone -10 Gy) using RUM-17 unit. Antitumor medication was administered intraperitoneally 24 hours before the first exposure in the following doses: cisplatin (Ebewe) – 6 mg/kg of the body mass; Taxotere (Rhone Poulenc Rorer) – 8 mg/kg of the body mass; etoposide (Ebewe) – 5 mg/kg of the body mass. The animals were decapitated 24 hours after the last exposure. Tissue homogenate was used for lipid extraction according to Folch. Ceramide and sphingomyelin were separated by means of chromatography in a thin layer of silica gel on Sorbfil plates (JSS Sorbpolimer, Russia). To identify the lipids, standards of ceramide and sphingomyelin (Sigma) were used. Protein in the tissue homogenate was detected according to Lowry. Statistical analysis was performed using Student's t-test.

Results: It was established that the most potent modulator of sphingolipid metabolism in the tissue of Guerin's carcinoma are Taxotere and etoposide. They increase the amount of proapoptosis sphingolipid (ceramide) in the tumor chiefly by means of activation of its synthesis de novo, while cispaltin stimulates accumulation of ceramide in the tumor cells by activation of sphingomyelin cycle. It was shown that at combination of chemo- and radiotherapy ceramide accumulation plays an essential role in apoptosis induction and increase of the tumor cell radiosensitivity, which is important to overcome the tumor resistance to chemoradiation treatment.

Conclusion: Different mechanisms of ceramide accumulation in Guerin's carcinoma at combination of ionized radiation with antitumor medication were revealed. X-rays in combination with Taxotere or etoposide stimulates ceramide synthesis de novo. Its combination with cispaltin results in accumulation of ceramide due to degradation of sphingomyelin.

Key words: Guerin's carcinoma, apoptosis, ceramide, sphingomyelin, cisplatin, Taxotere, etoposide, ionized radiation.

Успіхи в з'ясуванні молекулярних механізмів, які визначають регуляцію апоптичної загибелі клітин, а також позитивні результати експериментальних досліджень спрямованої індукції апоптозу відкривають нові терапевтичні можливості модифікації променевої реакції пухлин. Нова стратегія полягає в подоланні резистентності до проапоптичної дії іонізуючого випромінювання на злоякісні клітини [1].

Одним із найперспективніших напрямків підвищення ефективності променевої терапії (ПТ) є використання протипухлинних препаратів як радіомодифікаторів з метою підвищення радіочутливості пухлинних клітин (ПК) до іонізуючого випромінювання. Велику увагу в сучасних дослідженнях приділяють вивченню церамідного шляху апоптозу і агентів, що підвищують рівень церамідів у клітинах пухлини. З огляду на те, що хемотерапія та іонізуюча радіація підвищують рівень ендогенних церамідів, які ініціюють апоптоз [2, 3], метою даного дослідження стало вивчення радіомодифікуючого ефекту таксотеру, цисплатину та етопозиду на вміст сфінголіпідів у пухлинах щурів з перещепленою пухлиною Герена.

Методика дослідження

Як експериментальну модель використовували 60 щурів-пухлиноносців масою 160–180 г з підшкірно перещепленою пухлиною Герена (Guerin's sarcoma).

Експеримент починали на 10–12-ту добу після перещеплення пухлини, коли розміри пухлинного вузла досягали в діаметрі 1,5–2,0 см.

Локальне ікс-опромінювання зони росту пухлини проводили на апараті РУМ-17 за стандартних технічних умов: напруга — 190 кВ, сила струму — 10 мА, фільтри — 0,5 мм Cu + 1 мм Al. Коефіцієнт розподілу поглинутої дози в повітрі склав 0,965. Розрахунковий час опромінювання пухлини Герена в дозі 5 Гр дорівнював 4 хв 39 с. Опромінювання проводили фракційно, при поглинутій дозі на фракцію 5 Гр та з інтервалом між сеансами 24 год. Сумарна поглинута доза на зону росту пухлини складала 10 Гр.

Хемопрепарати вводили внутріочеревинно за 24 год до першого сеансу опромінювання в дозах:

цисплатин («Ебеве») — 6 мг/кг маси тіла;
таксотер («Рор Пуленк Рорер») — 8 мг/кг маси тіла;
етопозид («Ебеве») — 5 мг/кг маси тіла.

Протягом експерименту тварин розподілили таким чином:

1-ша група — інтактний контроль;
2-га група — контрольне опромінювання пухлини;
3-тя група — введення хемопрепарату;
4-та група — введення хемопрепарату з подальшим опромінюванням пухлини.

Тварин декапітували через 24 год після останнього сеансу опромінювання під ефірним наркозом із дотриманням правил евтаназії.

Тканини пухлини гомогенізували в H_2O з метою повнішої руйнації клітин. Гомогенат пухлини використовували для екстракції ліпідів за методом Фолча [4]. Церамід (ЦМ) і сфінгомієлін (СФМ) розділяли за допомогою хроматографії в тонкому шарі силікагелю на комерційних пластинках Sorbfil (АО «Сорбполимер», Россия). Екстракти ліпідів, які використовувалися для аналізу сфінголіпідів, випарювали у вакуумі та інкубували 60 хв при 37°С в середовищі хлороформ-метанол (1:1, v/v), у яке додавали NaOH (0,1 моль) для гідролізу ацилгліцеринів. Ліпіди знову екстрагували і використовували для розподілу на класи (СФМ, церамід) у системі розчинників: хлороформ-етилацетат-ізопропіловий спирт-метанол — 0,25 % -вий KCl (25:25:25:10:9) [5]. Ліпіди (СФМ, церамід) проявляли в парах йоду та ідентифікували за допомогою порівняння із стандартами цераміду і сфінгомієліну (Sigma). Білок у гомогенаті тканини визначали за методом Лоурі [6]. Статистично результати опрацьовували за допомогою критерію Стьюдента-Фішера.

Результати та їх обговорення

Проведеними дослідженнями встановлено, що введення в організм тварин-пухлиноносців цисплатину, таксотеру і етопозиду супроводжується різного ступеня зростанням маси ЦМ у тканинах пухлини (рис. 1). Найбільш значущі зміни рівня ЦМ відзначено у випадку застосування таксотеру і етопозиду. Водночас при використанні тільки цисплатину збільшення вмісту ЦМ у пухлині відбулося на фоні вірогідного зниження СФМ (див. рис. 1), в результаті чого зростало співвідношення ЦМ/СФМ. Зважаючи на цей ефект, можна зробити припущення про активацію сфінгомієліназ, деградацію СФМ і утворення з останнього ЦМ за даних умов експерименту. Таксотер і етопозид на відміну від цисплатину не викликали змін вмісту СФМ на фоні вірогідного підвищення рівня ЦМ (див. рис. 1), що дозволяє виключити вплив цих хемопрепаратів на сфінгомієліновий шлях утворення ЦМ. Таким чином, з'ясовано, що механізми накопичення ЦМ у пухлинах під впливом різних хемопрепаратів відрізняються.

Що стосується змін вмісту ЦМ у сироватці крові досліджуваних тварин під впливом вищезазначених хемопрепаратів, встановлено, що в сироватці крові щурів-пухлиноносців, які отримували цисплатин, він практично не відрізнявся від рівня у контрольній групі (рис. 2), тоді як таксотер і етопозид стимулювали підвищення вмісту ЦМ у понад 3 рази порівняно з контролем. Механізм цього ефекту поки що залишається нез'ясованим.

При вивченні впливу іонізуючого випромінювання на вміст і обмін біологічно активних сфінголіпідів у сироватці крові і тканинах аденокарциноми Герена щурів показано, що використані дози опромінення не викликають вірогідних змін вмісту ЦМ і СФМ у тканинах пухлини (рис. 3). Поряд з цим опромінювання щурів-пухлиноносіїв супроводжувалось значним збільшенням (майже в 3 рази) вмісту ЦМ і співвідношення ЦМ/СФМ у сироватці крові (див. рис. 3).

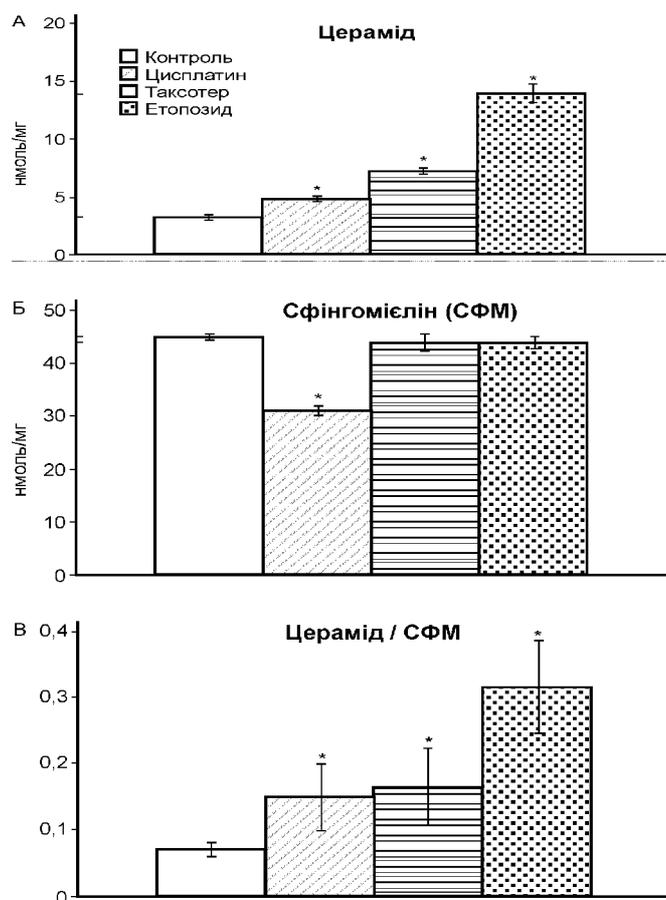


Рис. 1. Вплив цисплатину, таксотеру і етопозиду на вміст сфінголіпідів у тканинах аденокарциноми Герена.

Примітка. Тут і далі: * $P_{\text{контроль-дослід}} < 0,05$; кількість тварин у кожній групі = 5

Fig. 1. The influence of cisplatin, Taxotere and etoposide on the amount of sphingolipids in the tissues of Guerin's carcinoma

На сьогодні автори численних досліджень констатують, що іонізуюча радіація може збільшувати вміст ЦМ у пухлинних клітинах як за рахунок активації сфінгомеліназ, так і шляхом підсилення синтезу ліпиду de novo [7, 8]. Результати наших досліджень щодо впливу радіації на пухлину Герена свідчать про

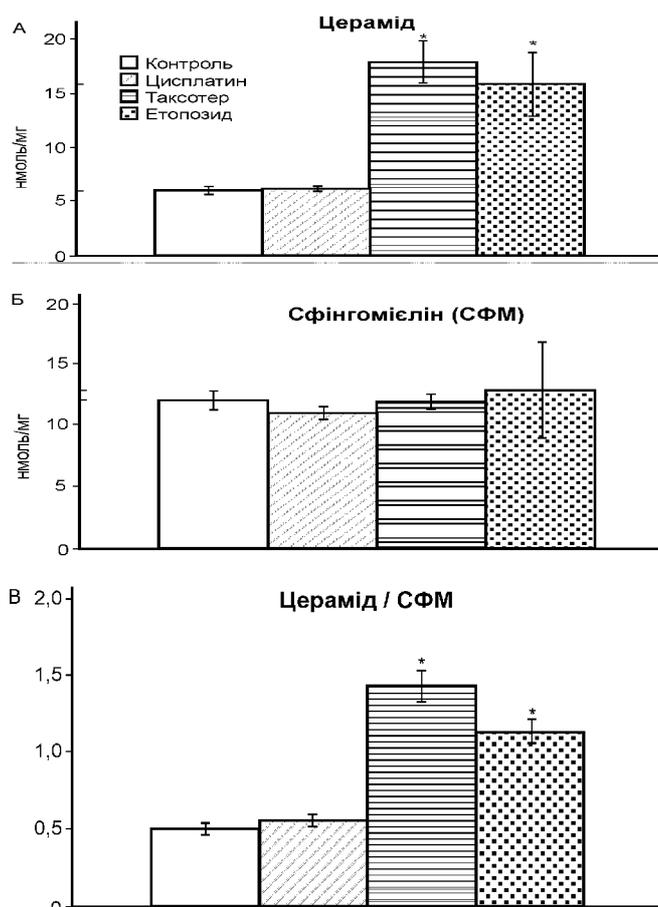


Рис. 2. Вплив цисплатину, таксотеру і етопозиду на вміст сфінголіпідів у сироватці крові щурів з аденокарциномою Герена

Fig. 2. The influence of cisplatin, Taxotere and etoposide on the amount of sphingolipids in the blood serum of rats with Guerin's carcinoma

відсутність активації синтезу ЦМ у пухлині, що може бути однією з причин радіорезистентності карциноми Герена.

Інша картина спостерігалася при вивченні впливу опромінення на вміст сфінголіпідів у сироватці крові тварин. Рівень цераміду зростає майже в 2,5 рази (див. рис. 3), а співвідношення ЦМ/СФМ — в 3 рази, що можна пояснити активацією сфінгомеліназ за даних умов.

При вивченні поєднаної дії опромінення і хемопрепаратів на вміст в тканинах пухлини і сироватці крові ЦМ і СФМ встановлено, що опромінення експериментальних тварин на фоні введення їм цисплатину вагомо не впливало на вміст ЦМ і СФМ, як у тканині аденокарциноми (табл. 1), так і в сироватці крові щурів-пухлиноносіїв (табл. 2). Цисплатин був менш ефективним порівняно з таксотером

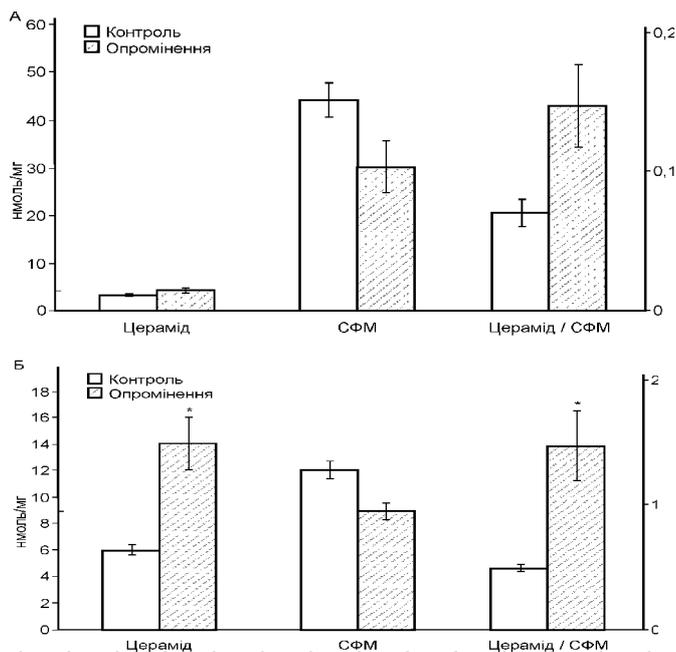


Рис. 3. Вплив опромінення на вміст сфінголіпідів: А — у тканинах пухлини і Б — сироватці крові щурів з аденокарциномою Герена

Fig. 3. The influence of irradiation on the amount of sphingolipids in the tumor tissue (A) and blood serum (B) of rats with Guerin's carcinoma

і етопозидом стосовно впливу на вміст ЦМ і СФМ у пухлинній тканині досліджуваних тварин.

Разом з тим продемонстровано, що опромінення тварин на фоні введення їм таксотеру істотно (майже вдвічі) збільшувало вміст ЦМ у пухлині і сироватці крові порівняно з таким інтактних або опромінених тварин (див. табл. 1, 2).

Зважаючи на те, що таксотер не змінює вмісту СФМ — субстрату сфінгомелінази в тканині пухлини і сироватці крові опромінених тварин, можна виключити активацію цього ферменту за даних умов експерименту.

Разом з цим, за даними літератури, відомо, що таксотер активує основний фермент синтезу ЦМ de novo — пальмітоїлсеринтрансферазу і таким чином збільшує його вміст у пухлинних клітинах [9]. У зв'язку з цим можна припустити, що таксотер за рахунок активації синтезу кераміду de novo підвищує радіочутливість клітин пухлини Герена. На користь цього припущення свідчать дані досліджень, проведених на клітинах раку легені (Lewis) про суттєве підсилення ефекту γ -радіації шляхом активації апоптозу пухлинних клітин при введенні екзогенного кераміду С2 ЦМ [10].

Таблиця 1

Вплив опромінення та поєднаної дії хемопрепаратів і опромінення на вміст ЦМ і СФМ у тканинах пухлини Герена, нмоль/мг
The influence of irradiation and combination chemotherapy with irradiation on the amount of CM and SPM in the tissue of Guerin's carcinoma (nmol/mg)

Вплив	ЦМ	СФМ
Контроль	3,18±0,29	44,60±3,92
Опромінення	4,37±0,74	30,40±6,46
Опромінення+цисплатин	5,06±0,24	29,10±2,72
Опромінення+таксотер	8,15±0,32*/**	43,60±8,43

Примітка. * — P контроль-опромінення+таксотер < 0,05;
** — P опромінення-опромінення+таксотер < 0,05;
n (кількість тварин у кожній групі) = 5.

Таблиця 2

Вплив опромінення і поєднаної дії хемопрепаратів і опромінення на вміст ЦМ і СФМ у сироватці крові щурів-пухлиноносців, нмоль/л
The influence of irradiation and combination chemotherapy with irradiation on the amount of CM and SPM blood serum of rats with Guerin's carcinoma (nmol/l)

Вплив	ЦМ	СФМ
Контроль	6,06±0,48	11,8±0,70
Опромінення	13,80±0,74*	9,38±0,76
Опромінення+цисплатин	10,20±0,54*	10,10±0,24
Опромінення+таксотер	20,70±1,40*/**	16,10±0,86

Примітка. * — P контроль-опромінення; контроль-опромінення+(таксотерабоцисплатин) < 0,05;
* — P опромінення-опромінення+таксотер < 0,05;
n (кількість тварин у кожній групі) = 5.

Узагальнення результатів проведених досліджень щодо впливу радіації і хемопрепаратів на керамідний шлях апоптозу в пухлинних клітинах аденокарциноми Герена дозволяє зробити висновок, що найбільш потужними модуляторами обміну сфінголіпідів виявилися таксотер і етопозид, які приводять до значного накопичення ЦМ у ПК переважно за рахунок активації його синтезу de novo, тоді як цисплатин стимулює накопичення кераміду шляхом активації сфінгомеліназ і деградації СФМ. Таким чином, однією зі складових терапевтичної ефективності використаних протипухлинних препаратів можна вважати їх здатність стимулювати синтез ЦМ у ПК, що відіграє важливу роль в індукції апоптозу і підвищенні радіочутливості пухлини.

ВИСНОВКИ

1. Таксотер і етопозид найактивніше впливають на обмін сфінголіпідів у клітинах аденокарциноми Герена.

2. Під впливом таксотеру і етопозиду накопичення ЦМ у ПК відбувається шляхом його синтезу de novo.

3. Цисплатин стимулює генерацію ЦМ у пухлині переважно шляхом деградації СФМ.

4. Комбінована дія радіації і протипухлинних препаратів підвищує радіочутливість ПК за рахунок накопичення в них ЦМ і подальшої індукції апоптозу.

Література

1. Акимов А.А., Иванов С.Д., Хансон К.П. // *Вопр. онкол.* — 2003. — Т. 49, № 3. — С. 261–268.
2. Hannun Y.A. // *Science.* — 1996. — Vol. 274. — P. 1866–1859.
3. Hannun Y.A., Luberto C. // *Trends Cell. Biol.* — 2000. — Vol. 10. — P. 73–80.
4. Folch J., Lees M., Stanley G. // *J. Biol. Chem.* — 1957. — Vol. 226. — P. 497–509.
5. Dolgachev V., Farooqui M., Kulaeva O. et al. // *Ibid.* — 2004. — Vol. 279. — P. 23233–23249.
6. Lowry O., Rosebrough N., Farr A. // *Ibid.* — 1951. — Vol. 193. — P. 265–275.
7. Peca L.A., Fuks Z., Kolesnick R. // *Biochem. Pharmacol.* — 1997. — Vol. 53. — P. 615–621.
8. Nava V., Cu viller O., Edsall L. et al. // *Cancer Res.* — 2000. — Vol. 60. — P. 4468–4474.
9. Perry D., Carton J., Shah A. et al. // *J. Biol. Chem.* — 2000. — Vol. 275. — P. 9078–9084.
10. Park H.W., Song J.-Y., Kim K.-S. et al. // *Exp. Mol. Medicine.* — 2004. — Vol. 36, № 5. — P. 411–419.

Надходження до редакції 05.03.2008.

Прийнято 06.03.2008.

Адреса для листування:

Мітряєва Наталія Андріївна,
ДУ Інститут медичної радіології ім. С.П. Григор'єва АМНУ,
вул. Пушкінська, 82, Харків, 61024, Україна