

Н.А. Мітряєва,
Т.С. Бакай,
В.П. Старенький,
Н.О. Бабенко,
Т.В. Сегеда,
В.І. Старіков

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

Вплив хемопроменевої терапії з різними протипухлинними препаратами на індукцію церамідного шляху апоптозу у хворих на недрібноклітинний рак легень

The influence of chemoradiation therapy
with different anti-tumor drugs on apoptosis
ceramide pathway induction in patients
with non-small-cell lung cancer

Цель работы: Изучение комбинированного влияния предоперационной лучевой терапии (ЛТ) и противоопухолевых препаратов (таксотера, этопозид) на содержание сфинголипидов — церамида (ЦМ) и его предшественника сфингомиелина (СФМ) в сыворотке крови и опухолевой ткани больных немелкоклеточным раком легких (НМРЛ).

Материалы и методы: У больных НМРЛ (IIВ стадия), получавших предоперационную лучевую терапию (5Гр × 3фр.) с радиомодификацией противоопухолевыми препаратами (таксотером — 12 чел., этопозидом — 6 чел.) определяли содержание сфинголипидов — ЦМ и СФМ в сыворотке крови и опухолевой ткани (резекционный материал) с использованием метода хроматографии в тонком слое силикагеля на пластинках Sorbfil. Контрольную группу составляли больные НМРЛ (13 чел.), получавшие только предоперационную ЛТ.

Результаты: При использовании таксотера уровень ЦМ в опухоли возрастал в 2,8 раза, а содержание СФМ при этом достоверно не изменялось. Подобным образом изменялось содержание ЦМ и СФМ в опухоли и при применении этопозид (уровень ЦМ увеличивался в 2,1 раза).

Выводы: Изучение влияния противоопухолевых препаратов — таксотера и этопозид в комбинации с радиотерапией на содержание сфинголипидов (ЦМ и СФМ) в опухоли и сыворотке крови больных НМРЛ выявило стимулирующее влияние этих препаратов на индукцию церамидного пути апоптоза, при этом более выраженный эффект наблюдался при применении таксотера. Наличие апоптоза в опухолевых клетках подтверждено данными морфологических исследований.

Ключевые слова: немелкоклеточный рак легких, лучевая терапия, таксотер, этопозид, церамид, сфингомиелин, апоптоз.

Objective: To study combined influence of pre-operative radiation therapy (RT) and anti-tumor drugs (Taxotere, Etoposid) on the amount of sphingolipids – ceramide (CM) and its pre-cursor sphingomyelin (SPM) in the blood serum and tumor tissue of the patients with non-small-cell lung cancer (NSCLC).

Material and Methods: Sphingolipid (CM and SPM) amount in the blood serum and tumor tissue (resection specimens) was determined using chromatography in a thin layer of silica gel on Sorbfil plates in patients with stage IIB NSCLC who received pre-operative radiation therapy (5 Gy × 3 fractions) with radiomodification with anti-tumor medication (Taxotere – 12 patients, Etoposid – 6 patients). The controls were the patients with NSCLC (13 patients) who received only pre-operative RT.

Results: At Taxotere administration CM level in the tumor increased 2.8 times, while SPM amount did not change significantly. CM and SPM in the tumor changed similarly at Etoposid administration (CM level increased 2.1 times).

Conclusion: The study of the influence of anti-tumor medication (Taxotere and Etoposid) in combination with radiotherapy on the amount of sphingolipids (CM and SPM) in the tumor and blood serum of the patients with NSCLC revealed a stimulating influence of these drugs on apoptosis ceramide pathway, more pronounced effect was observed at Taxotere administration. Apoptosis in the tumor cells was morphologically proven.

Key words: Non-small-cell lung cancer, radiation therapy, Taxotere, Etoposid, ceramide, sphingomyelin, apoptosis.

Мета роботи: Вивчення комбінованої дії передопераційної променевої терапії (ПТ) і протипухлинних препаратів (таксотеру, этопозиду) на вміст сфинголіпідів — цераміду (ЦМ) та його попередника сфингомієліну (СФМ) у сироватці крові та пухлинній тканині хворих на недрібноклітинний рак легень (НДРЛ).

Матеріали і методи: У хворих на НДРЛ (IIВ стадія), які отримували передопераційну ПТ (5 Гр × 3 фр.) із радіомодифікацією протипухлинними препаратами (таксотером — 12 осіб, этопозидом — 6) визначали вміст сфинголіпідів — ЦМ та СФМ у сироватці крові та пухлинній тканині (резекційний матеріал) із застосуванням методу хроматографії в тонкому шарі силікагелю на пластинках Sorbfil. Контрольну групу склали хворі на НДРЛ (13 осіб), що отримували тільки передопераційну ПТ.

Результати: При використанні таксотеру рівень ЦМ у пухлині зростав у 2,8 разу, а вміст СФМ при цьому вірогідно не змінювався. Так само змінювався вміст ЦМ і СФМ у пухлині й при використанні этопозиду (рівень ЦМ збільшувався в 2,1 разу).

Висновки: Вивчення дії протипухлинних препаратів — таксотеру та этопозиду в комбінації з радіотерапією на вміст сфинголіпідів (ЦМ і СФМ) у пухлині й сироватці крові хворих на НДРЛ виявило їх стимульований вплив на індукцію церамідного шляху апоптозу, при цьому більш виражений ефект спостерігали при застосуванні таксотеру. Наявність апоптозу в пухлинних клітинах підтверджена даними морфологічних досліджень.

Ключові слова: недрібноклітинний рак легень, променева терапія, таксотер, этопозид, церамід, сфингомієлін, апоптоз.

Недрібноклітинний рак легень (НДРЛ) є однією з головних причин смерті від злоякісних захворювань. З огляду на низьку чутливість НДРЛ до хемо- та радіотерапевтичних методів лікування внаслідок порушення регуляції апоптозу, однією з провідних стратегій, спрямованих на подолання хеморадіо-резистентності НДРЛ, є розробка засобів посилення апоптозу в пухлинних клітинах [1]. Успіхи в з'ясуванні молекулярних механізмів, що визначають регуляцію апоптичної загибелі клітин, а також позитивні результати експериментальних досліджень щодо спрямованої індукції апоптозу відкривають нові можливості модифікації променевої реакції пухлин. Нова стратегія полягає в подоланні резистентності до про-апоптичної дії іонізуючого випромінювання на злоякісні клітини [2]. Одним із перспективних напрямків підвищення ефективності променевої терапії (ПТ) НДРЛ вважають використання хемопрепаратів з метою модифікації променевої реакції пухлин [3].

У зв'язку з тим, що церамід (ЦМ) є представником одного з основних класів мембранних ліпідів — сфінголіпідів і відіграє роль вторинного месенджера в апоптозі, численні дослідження, які проводяться останнім часом, присвячені вивченню церамідного шляху апоптозу в пухлині, а також агентів, які підвищують його рівень у клітинах. З огляду на це, метою даного дослідження було вивчення комбінованого впливу передопераційної ПТ і протипухлинних препаратів (таксотер та етопозид) на вміст сфінголіпідів (ЦМ і попередника ЦМ — сфінгом'єліну (СФМ)) в сироватці крові і пухлинній тканині хворих на НДРЛ.

Методика дослідження

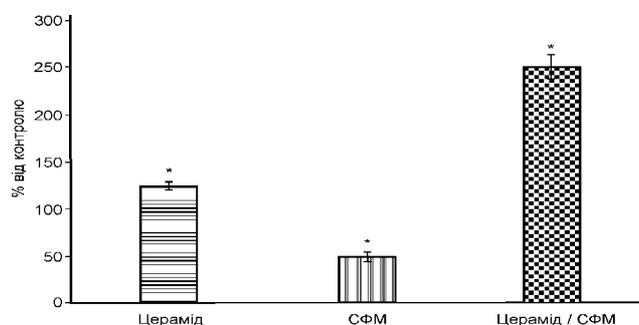
До групи обстеження ввійшли хворі на НДРЛ (II В стадія) віком від 45 до 65 років, яким проводили передопераційну ПТ в режимі 5 Гр x 3 фракції з модифікацією таксотером (12 осіб) та етопозидом (6 осіб). Опромінювали за методикою зустрічних полів; до об'єму опромінення залучали первинний осередок і регіонарні лімфовузлы на боці ураження; хемопрепарати вводили одноразово, внутрішньо, за добу до початку опромінювання (таксотер — 40 мг, етопозид — 100 мг). Оперативне лікування проводили через 2 доби після закінчення ПТ. До контрольної групи ввійшли хворі (13 осіб), які отримували тільки передопераційну ПТ. Церамід і СФМ визначали в пухлині (резекційний матеріал) та сироватці крові. Тканини пухлини гомогенізували в H_2O з метою повнішої руйнації клітин. Гомогенат пухлини використовували

для екстракції ліпідів за методом Фолча [4]. Церамід і СФМ розділяли за допомогою хроматографії в тонкому шарі силкагелю на комерційних пластинках Sorbfil (АТ «Сорбполімер», Росія). Екстракти ліпідів, використовувани для аналізу сфінголіпідів, випарювали у вакуумі та інкубували 60 хв при 37°С в середовищі: хлороформ-метанол (1:1, v/v), до якого додавали NaOH (0,1 моль) для гідролізу ацилгліцеринів. Ліпіди знову екстрагували і використовували для розподілу на класи (СФМ, ЦМ) у системі розчинників: хлороформ-етилацетат-ізопропіловий спирт-метанол — 0,25 % KCl (25:25:25:10:9) [5]. Ліпіди (СФМ і ЦМ) проявляли в парах йоду та ідентифікували, порівнюючи зі стандартами. Для ідентифікації ліпідів використовували стандарти ЦМ і СФМ (Sigma). Білок у гомогенаті тканини визначали методом Лоурі [6]. Статистично результати опрацьовували за допомогою критерію Стьюдента.

Результати та їх обговорення

Сучасні протипухлинні препарати впливають на різні ланки церамідного метаболізму. Досить високою активністю відзначається таксотер, механізм дії якого полягає в блокуванні клітинного циклу на найбільш радіочутливих етапах, на межі G_2 - та М-фаз клітинного циклу, що дозволяє застосовувати його як радіомодифікатор при опроміненні пухлини. Експериментальними дослідженнями останніх років на різних лініях пухлинних клітин доведено, що таксотер-індукований апоптоз здійснюється також і церамідним шляхом [7].

У групі хворих, яким з метою радіомодифікації застосовували таксотер, комбіноване лікування приводило до зростання рівня ЦМ у сироватці крові на 28 % (рис. 1) та зниження рівня СФМ на 50 % порівняно з контролем, унаслідок чого співвідношення ЦМ/СФМ у сироватці крові даної групи збільшувалось на 153 %.



Примітка. Тут і далі: вірогідність різниці між значеннями показників контрольної і основної груп, $p < 0,05$

Рис. 1. Вплив хемопроменевої терапії з таксотером на рівень сфінголіпідів у сироватці крові хворих на НДРЛ

Fig. 1. Influence of chemoradiation therapy with Taxotere on the level of sphingolipids in the blood serum of patients with NSCLC

У зв'язку з тим, що СФМ є субстратом сфінгомеліназ, активація яких приводить до гідролітичного утворення ЦМ, зростання співвідношення ЦМ/СФМ у сироватці крові або пухлинній тканині свідчить про активацію сфінгомеліназ.

Слід також відзначити, що ЦМ та СФМ входять до складу не тільки структурних компонентів різних клітин, а й до складу ліпопротеїдів сироватки крові. Таким чином, вміст сфінголіпідів у сироватці крові може зростати при посиленні їх синтезу в різних клітинах і тканинах.

Крім того, на підставі одержаних результатів і даних літератури можна зробити припущення, що опромінення на фоні таксотера викликає активацію кислоти сфінгомелінази ендотеліальних клітин судин пухлини, збільшуючи вміст ЦМ як у сироватці крові, так і в пухлинній тканині, що веде до індукції апоптозу клітин ендотелію й остаточно — до порушення кровообігу і редукції пухлини [8].

Порівнюючи вміст сфінголіпідів у пухлинах хворих досліджуваної та контрольної груп, слід зазначити, що радіомодифікація таксотером викликає значне (в 2,8 разу) зростання рівня ЦМ і в 2,3 разу — співвідношення ЦМ/СФМ (табл. 1). Разом з тим, значення вмісту СФМ вірогідно не змінювалося. Отже, отримані дані демонструють, що накопичення ЦМ у пухлині під впливом таксотеру і радіації не пов'язане з активацією сфінгомеліназ. Найімовірніше, за даних умов відбувається посилення синтезу ЦМ *de novo* або гальмування його деградації.

Зважаючи на застосування при лікуванні НДРЛ багатьох інших хемопрепаратів, які індують апоптоз пухлинних клітин, наступним етапом роботи було порівняння ефектів

Таблиця 1

Вміст сфінголіпідів у пухлині хворих на НДРЛ за умов передопераційної хемопроменевої терапії (5 Гр × 3 фракції) з таксотером, нмоль/мг
Sphingolipid amount in the tumor of the patients with NSCLC at combination of pre-operative chemoradiation therapy (5 Gy × 3 fractions) with Taxotere, nmol/mg

Група хворих	Церамід	Сфінгомелінін	Церамід/сфінгомелінін
Основна, n = 12	1654,95 ± 123,00	326,67 ± 21,50	5,06
Контрольна, n = 15	585,50 ± 19,70*	265,70 ± 6,90	2,20*

* Вірогідність різниці між показниками основної і контрольної груп, p < 0,05.

таксотеру з дією іншого активатора керамідного шляху апоптозу — етопозиду. Відомо, що етопозид — протипухлинний препарат, який інгібує топоізомеразу II і розриває ланцюги ДНК, а також підвищує рівень ЦМ і, навпаки, знижує рівень СФМ, що веде до апоптозу [9]. В цьому пересвідчились при дослідженні впливу етопозиду на лейкемічні клітини Molt-4, акумуляція ЦМ у яких пов'язувалась із стимуляцією серин-пальмітил-трансферази — ферменту, що бере участь у синтезі ЦМ *de novo* [10]. Здатність етопозиду стимулювати продукцію ЦМ у результаті синтезу *de novo* і гідролізу СФМ спостерігали на клітинах раку передміхурової залози [11]. Встановлено, що етопозид, подібно таксолу і фактору некрозу пухлини-альфа викликає накопичення ЦМ у клітинах гліоми і цей процес передуює гальмуванню їх росту та апоптозу [9].

Показано, що передопераційне опромінення з етопозидом, на відміну від такого з таксотером, не супроводжується змінами вмісту сфінголіпідів у сироватці крові (табл. 2).

Щодо вмісту ЦМ і СФМ у пухлині при хемопроменевої терапії з етопозидом, то вста-

Таблиця 2

Вміст сфінголіпідів у пухлині та сироватці крові хворих на НДРЛ за умов передопераційної хемопроменевої терапії (5 Гр × 3 фракції) з етопозидом, нмоль/мл, нмоль/мг
Sphingolipid amount in the tumor of the patients with NSCLC at combination of pre-operative chemoradiation therapy (5 Gy × 3 fractions) with Etoposid, nmol/ml, nmol/mg

Група хворих	Кров			Пухлина		
	ЦМ	СФМ	ЦМ/СФМ	ЦМ	СФМ	ЦМ/СФМ
Основна, n = 6	67,3 ± 5,4	102,5 ± 12,0	0,64	1235,5 ± 110,0	245,5 ± 16,5	5,03
Контрольна, n = 15	59,5 ± 3,8	97,0 ± 10,0	0,61	585,0 ± 19,7*	265,7 ± 16,9	2,2*

* Вірогідність змін відносно контрольної групи, p < 0,05.

новлено, що рівень ЦМ зростав у 2,1 разу на фоні незмінного рівня СФМ (див. табл. 2), внаслідок чого збільшувалось співвідношення ЦМ/СФМ.

Зростало також співвідношення ЦМ/СФМ. Таким чином, отримані результати свідчать про стимуляцію етопозидом продукції ЦМ у пухлинах хворих на НДРЛ, що може бути однією з причин його радіосенсибілізуючої дії. Наявність апоптозу в пухлинних клітинах доведено морфологічними дослідженнями.

Висновки

1. Аналіз вмісту про-апоптозного сфінголіпиду ЦМ у пухлинах хворих на НДРЛ під впливом хемопротеневої терапії з етопозидом і таксотером виявив стимулювальну дію цих препаратів на індукцію церамідного шляху апоптозу, тобто їх радіомодифікаторний ефект, що доведено морфологічними дослідженнями.

2. Зважаючи на те, що при застосуванні як таксотеру, так і етопозиду рівень СФМ у пухлинах хворих на НДРЛ вірогідно не змінювався, виникає припущення щодо схожих механізмів накопичення ЦМ в пухлині при використанні зазначених препаратів, а саме за рахунок синтезу *de novo*.

3. Аналіз вмісту ЦМ і СФМ в сироватці крові хворих на НДРЛ за умов хемопротеневої терапії виявив вірогідне зростання рівня ЦМ на фоні зниження рівня СФМ під впливом таксотеру і відсутність значущих змін досліджуваних сфінголіпідів при застосуванні етопозиду.

Література

1. Reed J.C. // *J. Clin. Oncol.* – 1999. – Vol. 17. – P. 2941–2953.
2. Акимов А.А., Иванов С.Д., Хансон К.П. // *Вопр. онкол.* – 2003. – Т. 49, № 3. – С. 261–268.
3. Claus Belka, M. D., Gendrossek V., Pruschy M. et al. // *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* – 2004. – Vol. 58, № 2. – P. 542–554.
4. Folch J., Lees M., Stanley G. // *J. Biol. Chem.* – 1957. – Vol. 226. – P. 497–509.
5. Dolgacher V., Farooqui M., Kulaeva O., Tainisky M. et al. // *Ibid.* – 2004. – Vol. 279. – P. 23238–23249.
6. Lowry O., Rosebrough N., Farr A. // *Ibid.* – 1951. – Vol. 193. – P. 265–275.
7. Tishler R.B., Schiff P.B., Geard C.R. // *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* – 1992. – Vol. 22. – P. 613–617.
8. Santana P., Pena L.A., Haimovitz-Friedman A. et al. // *Cell.* – 1996. – Vol. 86, № 2. – P. 189–199.
9. Sawada M., Nakashima S., Banno G. et al. // *Cell. Death Differ.* – 2000. – Vol. 7. – P. 761–772.

10. Perry D., Carton J., Shah A. et al. // *J. Biol. Chem.* – 2000. – Vol. 275. – P. 9078–9084.

11. Chmura J., Nodzenki E., Becklett M. et al. // *Cancer Res.* – 1997. – Vol. 57. – P. 1270–1275.

Надходження до редакції 24.06.2008.

Прийнято 17.07.2008.

Адреса для листування:

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