

Н.А. Мітряєва,
Н.О. Бабенко,
Т.С. Бакай,
В.П. Старенький,
Н.Є. Узленкова,
С.М. Пушкар

Вплив іонізуючого випромінювання та етопозиду на церамідний шлях активації апоптозу в пухлині Герена

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

Influence of ionizing radiation and etoposide on ceramide pathway of apoptosis activation in Guerin's carcinoma

Цель работы: Изучить влияние ионизирующего излучения, этопозиды и их комбинированного действия на обмен керамидов в опухоли Герена.

Материалы и методы: В качестве экспериментальной модели использовали крыс-опухоленосителей массой 160-180 г с подкожно перевитой карциномой Герена. Локальное икс-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. Этопозид «Ебева» вводили внутривнутрибрюшинно в дозе 5,0 мг/кг за 24 часа до облучения. Гомогенат ткани использовали для экстракции липидов по методу Фолча. Церамид, глюкозилцерамид, сфингозин и сфингомиелин разделяли с помощью хроматографии в тонком слое силикагеля на пластинках Sorbfil (АО «Сорбполимер», Россия). Для идентификации липидов использовали стандарты церамида, сфингозина, глюкозилцерамида и сфингомиелина (Sigma). Белок в гомогенате ткани определяли по Лоури. В качестве предшественника синтеза липидов использовали [¹⁴C]-пальмитиновую кислоту (2,07 ГБк/ммоль; Amersham, YE Healthcare, UK). Радиоактивность проб измеряли в сцинтилляционной жидкости ЖС-8 на счетчике ВЕТА. Статистический анализ проводили, используя t-критерий Стьюдента.

Результаты: Установлено, что в условиях *ex vivo* этопозид усиливает *de novo* синтез сфинголипидов и этим способствует накоплению индуктора апоптоза и предшественника сложных сфинголипидов — церамида. Повышение уровня последнего в опухолевых клетках приводит к синтезу других сфинголипидов: глюкозилцерамида и сфингомиелина, которые могут быть предшественниками биологически активных липидов, характерных для активно пролиферирующих клеток. Комбинированное действие этопозиды и радиации на организм экспериментальных животных вызывает накопление сфингозина — продукта деградации церамида, обладающего про-апоптотным действием и угнетающего синтез про-пролиферативного сфинголипида — глюкозилцерамида.

Выводы: Показано, что этопозид является мощным индуктором обмена про-апоптотных и про-пролиферативных сфинголипидов в опухоли Герена. При комбинированном влиянии этопозиды и радиационного фактора выявлено накопление сфингозина, обладающего про-апоптотным действием.

Ключевые слова: карцинома Герена, церамид, сфингомиелин, сфингозин, глюкозилцерамид, этопозид, ионизирующее излучение.

Objective: To study the influence of x-rays, etoposide and their simultaneous action on the metabolism of ceramide in Guerin's carcinoma.

Material and Methods: The experimental model consisted of rats weighing 160-180 g with subcutaneously inoculated Guerin's carcinoma. Local x-ray irradiation was delivered in fractions (5 Gy per fraction) with 24-hour intervals up to total dose of 10 Gy using RUM-17 unit. Etoposide was administered intraperitoneally at a dose of 5 mg/kg 24 hours before the exposure. Tissue homogenate was used for lipid extraction according to Folch. Ceramide, sphingosine, glucosyl-ceramide and sphingomyelin were separated with chromatography in a thin layer of silicagel Sorbfil (Russia). Ceramide, sphingosine, glucosyl-ceramide and sphingomyelin standards were used to identify the lipids (Sigma). Protein was isolated according to Lowry. [¹⁴C]-palmitate as radioactive precursor of lipid synthesis was used (2.07 GBq/mmol; Amersham, YE Healthcare, UK). Radioactivity of the samples was measured using β-counter. The statistical analysis was done using Student's t-test.

Results: It was established that etoposide increased *de novo* sphingolipid synthesis which contributed to accumulation of ceramide (tumor cell apoptosis inducer). Increase of ceramide level in tumor cells led to synthesis of other sphingolipids: glucosyl-ceramide and sphingomyelin, which may be precursors of lipids taking part in cell proliferation. Simultaneous action of etoposide and radiation on tumor of experimental rats led to accumulation of sphingosine (product of ceramide degradation), which produced apoptosis and pressed down synthesis of glucosyl-ceramide (proliferative lipid).

Conclusions: The results of investigation showed that etoposide is a powerful inducer of sphingolipid metabolism in Guerin's carcinoma. Simultaneous action of etoposide and radiation increases sphingosine amount (proliferative sphingolipid).

Key words: Guerin's carcinoma, ceramide, sphingomyelin, sphingosine, glucosyl-ceramide, etoposide, x-ray exposure.

Цераміди (ЦМ) — похідні сфінголіпідів, одного з основних класів мембранних ліпідів. Численними дослідженнями доведено їх роль вторинного месенджера в апоптозі.

Відомо, що цитостатичні препарати, застосовувані в протипухлинній терапії, впливають на різні ланки церамідного метаболізму. Протипухлинний препарат «Етопозид»

за механізмом дії є інгібітором топоізомерази II, що зумовлює розрив ланцюгів ДНК у пухлинних клітинах. Доведено, що цей цитостатик підвищує рівень ЦМ та індукує апоптичну загибель злоякісних клітин [1–5].

Іонізуюче випромінювання також є потужним індуктором апоптозу злоякісних клітин,

один з механізмів його апоптогенної дії пов'язаний із накопиченням клітинного ЦМ [6].

Незважаючи на зростаючу кількість даних щодо властивості цитостатичних препаратів підсилювати радіочутливість пухлин, залишається багато нез'ясованих питань стосовно механізмів їх апоптичної загибелі при комбінованій терапії і, зокрема, керамідного шляху апоптозу. Тому метою даного дослідження було вивчення радіомодифікувального агента — етопозиду, ікс-опромінювання та їх спільного впливу на вміст і обмін ЦМ у пухлині.

Методика дослідження

Експериментальною моделлю були 20 щурів-пухлинотроносців масою 160-180 г із підшкірно перещепленою карциномою Герена (Guerin's sarcoma). Трансплантацію проводили шляхом введення під шкіру 0,5 мл 20 %-вої суспензії клітин, отриманих із пухлинної тканини.

Локальне ікс-опромінювання зони росту пухлини виконували на апараті РУМ-17 у стандартних технічних умовах: напруга — 190 кВ, сила струму — 10 мА, фільтри — 0,5 мм Сu + 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 сек.

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.

Етопозид «Ебеве» вводили внутріочеревинно в дозі 5,0 мг/кг маси тіла за 24 год до першого сеансу опромінювання.

Протягом експерименту тварин розподілили таким чином: 1-ша група — інтактний контроль; 2-га — введення етопозиду; 3-тя — контрольне опромінювання пухлини; 4-та — введення етопозиду з наступним опромінюванням пухлини.

У кожній групі було 5 тварин, яких брали в дослід через 24 год після останнього сеансу опромінювання, декапітацію проводили під ефірним наркозом з дотриманням правил евтаназії.

Тканини пухлини гомогенізували в H_2O з метою повної руйнації клітин. Гомогенат використовували для екстракції ліпідів за методом Фолча [7]. Церамід, глікозилцерамід, сфінгозин і сфінгомієлін (СФМ) розділяли за допомогою хроматографії в тонкому шарі силікагелю на комерційних пластинках Sorbfil (АО «Сорбполімер», Росія). Екстракти ліпідів, використовувані для аналізу сфінголіпідів, випаровували у вакуумі та інкубували 60 хв при 37 °С у середовищі: хлороформ-метанол (1:1, v/v), в яке додавали NaOH (0,1 моль) для гідролізу ацилгліцеринів. Ліпіди знову екстрагували і використовували для розподілу на класи (СФМ, керамід, глікозилцерамід і сфінгозин) у системі розчинників: хлороформ-етилацетат-ізопропіловий спирт-метанол — 0,25 % КСl (25:25:25:10:9, об./об.) [8]. Ліпіди (СФМ, керамід і глікозилцерамід) проявляли в парах йоду; сфінгозин — за допомогою розчину 3 %-вого нінгідрину в бутанолі, насиченому H_2O_2 , та ідентифікували за допомогою порівняння зі стандартами. Для ідентифікації ліпідів використовували стандарти кераміду, сфінгозину, глікозилцераміду і сфінгомієліну (Sigma). Білок у гомогенаті тканини визначали за методом Лоурі [9]. Як попередник синтезу ліпідів використовували

[^{14}C]-пальмітинову кислоту (2,07 ГБк/ммоль; Amersham, YE Healthcare, UK). Шматочки тканини пухлини інкубували у буфері Кребса-Хенслейта, в який додавали [^{14}C]-пальмітинову кислоту (10 мкКі/мл), 25 ммоль НЕРЕС, пеніцилін (61 мг/л), стрептоміцин (100 мг/л), 10 %-ву ембріональну сироватку бика, протягом 120 хв при 37 °С і рН 7,5. По закінченні інкубації шматочки тканини двічі відмивали надлишком буфера Кребса-Хенслейта, з 0,2 %-вим вмістом альбуміну, рН 7,5. Екстракцію з гомогенату тканини і розподіл ліпідів на фракції проводили, як вказано вище. Силікагель з площі плям ліпідів переносили в склянки для лічби радіоактивності в сцинтиляційній рідині ЖС-8. Радіоактивність зразків вимірювали за допомогою лічильника ВЕТА. Статистично обробляли дані за допомогою критерію Стьюдента — Фішера.

Результати та їх обговорення

Виконаними дослідженнями встановлено, що введення щурам-пухлинотроносцям етопозиду стимулює посилення синтезу сфінголіпідів у тканинах карциноми (табл. 1). Опромінення, порівняно з етопозидом, впливає на синтез ліпідів у новоутворі значно меншою мірою. Однак при поєднаній дії на пухлину щурів етопозиду й ікс-випромінення спостерігалось істотне збільшення вмісту *de novo* синтезованих сфінголіпідів, порівняно з дією самого тільки опромінення на пухлину.

Відомо, що конденсація пальмітил - СоА із серином за участі ключового ферменту синтезу сфінголіпідів — серин-пальмітил-трансферази (ЕС 2.3.1.50) супроводжується утворенням 3-кетосфінганіну, який потім перетворюється на ЦМ, СФМ та інші складні сфінголіпіди. За даними Perry et al., введення в середовище інкубації ракових клітин інгібітора топоізомерази — етопозиду, підвищує активність серин-пальмітил-трансферази, синтез ЦМ і викликає клітинну загибель апоптозним шляхом [10]. Таким чином, одержані результати свідчать про посилення синтезу сфінголіпідів у пухлині під впливом етопозиду в умовах *ex vivo*, а також за умов комбінованого впливу етопозиду і опромінювання.

Вивчення дії етопозиду на обмін окремих фракцій сфінголіпідів у пухлині Герена виявило значний вплив препарату на синтез ЦМ *de novo* (табл. 2).

Так, рівень [^{14}C]-ЦМ під впливом етопозиду зростав у карциномі майже вдвічі порівняно з контролем. Застосований препарат також активізував синтез більш складних сфінголіпі-

Таблиця 1

Вплив етопозиду й ікс-випромінювання на синтез загальних сфінголіпідів у карциномі Герена, імп · (хв · г тканини)⁻¹
Influence of etoposide and x-rays on synthesis of total sphingolipids in Guerin's carcinoma (pulses · (min · g of tissue)⁻¹)

Умови експерименту	Сфінголіпіди	
	імп · (хв · г тканини) ⁻¹	% від контролю
Контроль	85852 ± 2680	100
Етопозид	120884 ± 2405*	141
Опромінювання	92922 ± 844*	108
Етопозид + опромінювання	108132 ± 4034*,**	125

* p_{контроль-дослід} < 0,05;** p_{опромінювання-етопозид+опромінювання} < 0,05.

дів — СФМ і глюкозилцераміду (в 1,5 та 1,2 разу відповідно) і не впливав на процес накопичення продукту деградації [¹⁴C]-цераміду — [¹⁴C]-сфінгозину (див. табл. 2). У пухлинах щурів, опромінених ікс-випромінюванням, вміст [¹⁴C]-ЦМ був нижче, а [¹⁴C]-сфінгомієліну — вище порівняно з контролем і групою тварин, яким вводили тільки етопозид (див. табл. 2). Поєднана дія опромінювання і етопозиду мало помітно впливала на синтез ЦМ, проте суттєво збільшувала у пухлині рівень [¹⁴C]-сфінгомієліну.

Відомо, що вміст ЦМ у клітинах під впливом різних стимулів може збільшуватися не тільки за рахунок їх синтезу de novo, а й завдяки активації деградації складних сфінголіпідів за участі СФ-аз. Зважаючи на те, що головним субстратом останніх у клітинах різних типів є СФМ, а етопозид вірогідно збільшував відно-

шення ЦМ/СФМ у тканині карциноми (див. табл. 2), можна припустити, що одним з альтернативних шляхів, що призводять до акумуляції [¹⁴C]-ЦМ у клітинах, є деградація СФМ, синтезованого у процесі активації ендогенних СФ-аз. Це припущення підтверджують дані, за якими етопозид активує в клітинах гліоми щурів Сб-нейтральну СФ-азу, що стимулює накопичення ЦМ, а останній індукує вивільнення з мітохондрій цитохрому С, яке веде до активації каспаз-9 і -3 й апоптичної загибелі клітин [11]. В той же час у проведених нами дослідженнях продемонстровано, що локальне опромінення пухлини значно посилює використання синтезованого de novo [¹⁴C]-ЦМ для синтезу [¹⁴C]-сфінгомієліну, можливо, за рахунок домінування процесів синтезу СФМ над процесами його деградації див. табл. 2. Зменшення під впливом опромінення відношення ЦМ/СФМ у карциномі підтверджує це припущення (див. табл. 2).

У проведених дослідженнях встановлено, що вміст [¹⁴C]-сфінгозину — продукту деградації [¹⁴C]-ЦМ у карциномі вірогідно не змінювався під дією окремо етопозиду і опромінення (табл. 3), що дозволило виключити за даних умов внесок церамідаз у процес зміни рівня синтезованого de novo ЦМ у пухлинних клітинах. Водночас при поєднаній дії опромінення і етопозиду спостерігається вірогідне зростання вмісту [¹⁴C]-сфінгозину у пухлині порівняно як з контрольними тваринами, так і з такими, що отримували етопозид або опромінювалися локально (див. табл. 3). Враховуючи те, що вільний сфінгозин, який виявляють у клітинах,

Таблиця 2

Вплив етопозиду й ікс-опромінювання на синтез ЦМ і СФМ у карциномі Герена, імп · (хв · г тканини)⁻¹
Influence of etoposide and x-rays on ceramide and sphingomyelin synthesis in Guerin's carcinoma (pulses · (min · g of tissue)⁻¹)

Умови експерименту	ЦМ	СФМ	ЦМ/СФМ
Контроль	21109 ± 524	18463 ± 391	1,14 ± 0,03
Етопозид	40173 ± 1380*	27760 ± 1031*	1,46 ± 0,06**
Опромінювання	13668 ± 1112*	34984 ± 953*	0,39 ± 0,04**
Етопозид + опромінювання	19764 ± 3198	35605 ± 3518*	0,57 ± 0,09**

*p_{контроль-дослід} < 0,001; **p_{контроль-дослід} < 0,05.

є, головним чином, продуктом обміну сфінголіпідів [12], слушно припустити, що в умовах поставленого експерименту поєднана дія етопозиду і опромінювання супроводжується активацією церамідаз, деградацією синтезованого *de novo* ЦМ і накопиченням вільного сфінгозину. При цьому не можна виключити можливість метаболізму самого сфінгозину і перетворення його, наприклад, на сфінгозин-1-фосфат, який є про-проліферативним сфінголіпідом [12]. Так, у дослідях на мишах показано, що ціла низка інгібіторів сфінгокінази, що каталізує перетворення сфінгозину в сфінгозин-1-фосфат, мають чітко виражену здатність пригнічувати ріст пухлини [13].

Зважаючи на те, що як ЦМ, так і сфінгозин є індукторами апоптозу пухлинних клітин, а тканина карциноми Герена має здатність накопичувати ці метаболіти сфінгом'єлінового циклу, досить важливим було з'ясувати, яким чином етопозид і локальне ікс-опромінювання впливають на загальний вміст токсичних сфінголіпідів. Продемонстровано, що введення тваринам-пухлиноносіям етопозиду викликає суттєве зростання в карциномі загального рівня проапоптозних сфінголіпідів (див. табл. 3). У клітинах пухлин тварин, підданих впливу випромінювання, загальний вміст токсичних ліпідів певною мірою знижувався, порівняно з контролем, і знову зростав при комбінованій дії опромінення й етопозиду. Таким чином, можна зробити припущення, що етопозид є потужним індуктором експресії про-апоптозних

сфінголіпідів, як у клітинах інтактної пухлини, так і в новоутворі опромінених тварин. Однак якщо в першому випадку це відбувається за рахунок збільшення продукції ЦМ, то в другому — за рахунок акумуляції сфінгозину.

За даними Bleicher і Cabot, зростання в клітинах продукції і маси ЦМ супроводжується активацією, поряд з церамідазою, глюкозилцерамідсинтази, яка каталізує перенесення UDP-глюкози на ЦМ і призводить до накопичення у клітинах глюкозилцераміду [1].

Встановлено, що глюкозилцераміди залучаються до багатьох клітинних процесів: проліферації і диференціювання клітин, онкогенної трансформації, метастазування пухлини, тромбозу вен і антикоагуляційної активності протеїнази С. Резистентність злоякісних клітин до дії хемотерапії також значною мірою пов'язана з глюкозилцерамідами. Проведеними дослідженнями показано, що етопозид викликав незначне, але статистично вірогідне збільшення продукції [¹⁴C]-глюкозилцераміду у клітинах карциноми Герена (див. табл. 3). Поряд з цим, рівень синтезованого *de novo* ЦМ у пухлині залишався достатньо високим. Можливо, саме етопозид стимулював синтез глюкозилцераміду. Опромінювання інтактних щурів-пухлиноносіїв не впливало на процес синтезу глюкозилцераміду, тоді як локальне опромінювання тварин у комбінації з етопозидом нівелювало стимулюючий ефект препарату на процес акумуляції про-проліферативного ліпиду.

Таблиця 3

Вплив етопозиду й ікс-опромінювання на вміст синтезованих de novo глюкозилцераміду, сфінгозину і токсичних сфінголіпідів у карциномі Герена, імн • (хв • г тканини)¹
Influence of etoposide and x-rays on the amount of synthesized de novo glucosyl-ceramide, sphingosine and toxic sphingolipids in Guerin's carcinoma, pulses • (min • g of tissue)¹

Умови експерименту	Глюкозилцерамід	Сфінгозин	Токсичні сфінголіпід ¹
Контроль	17701 ± 521	28579 ± 1333	49747 ± 1811
Етопозид	21986 ± 790*	30965 ± 293	71138 ± 1490*
Опромінювання	16652 ± 444	27613 ± 906	41283 ± 616*
Етопозид + опромінювання	19653 ± 1044	33109 ± 336*, **, ***	52873 ± 3212***

¹ — сума ЦМ і сфінгозину;

*р_{контроль-дослід} < 0,001;

**р_{етопозид-етопозид+опромінювання} < 0,001;

***р_{опромінювання-етопозид+опромінювання} < 0,001.

ВИСНОВКИ

1. Етопозид є потужним індуктором обміну про-апоптозних і про-проліферативних сфінголіпідів у пухлині Герена. В умовах *ex vivo*, він підсилює *de novo* синтез сфінголіпідів і цим сприяє накопиченню індуктора апоптозу і попередника складних сфінголіпідів — ЦМ.

3. Зростання рівня *de novo*, синтезованого ЦМ у ПК, є важливим стимулом для синтезу інших сфінголіпідів: глюкозилцераміду і СФМ, які, в свою чергу, можуть бути попередниками біологічно активних ліпідів, характерних для активно проліферуючих клітин.

4. Сполучна дія хемо- і радіотерапії на організм експериментальних тварин сприяє накопичуванню продукту деградації ЦМ-сфінгозину, який має про-апоптозну властивість і пригнічує синтез про-проліферативного сфінголіпиду — глюкозилцераміду.

Література

1. Bleicher R., Cabot M. // *Biochem. Biophys. Acta.* — 2002. — Vol. 1585. — P. 172–178.
2. Kok J., Sietsma H. // *Current. Drug. Target.* — 2004. — Vol. 5. — P. 375–382.
3. Lucei A., Cho W., Han T. et al. // *Anticancer Res.* — 1998. — Vol. 18. — P. 475–480.
4. Sawada M., Nakashima S., Banno G. et al. // *Cell. Death Differ.* — 2000. — Vol. 7. — P. 761–772.
5. Perry D., Carton J., Shah A. et al. // *J. Biol. Chem.* — 2000. — Vol. 275. — P. 9078–9084.
6. Peca L.A., Fuks Z., Kolesnick R. // *Biochem. Pharmacol.* — 1997. — Vol. 53. — P. 615–621.
7. Folch J., Lees M., Stanley G. // *J. Biol. Chem.* — 1957. — Vol. 226. — P. 497–509.
8. Dolgacher V., Farooqui M., Kulaeva O., Tainisky M. et al. // *Ibid.* — 2004. — Vol. 279. — P. 23238–23249.
9. Lowry O., Rosebrough N., Farr A. // *Ibid.* — 1951. — Vol. 193. — P. 265–275.
10. Perry D., Carton J., Shah A., Meredith F. et al. // *J. Biol. Chem.* — 2000. — Vol. 275. — P. 9078–9084.
11. Sawada M., Nakasima S., Banno Y., Yamakawa H. et al. // *Oncogene.* — 2000. — Vol. 19. — P. 3508–3520.
12. Spiegel S., Merrill A. // *FASEB J.* — 1996. — Vol. 10. — P. 1388–1397.
13. French K., Upson J., Keller S., Zhuang Y. et al. // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* — 2006. — Vol. 318. — P. 596–601.

Надходження до редакції 12.03.2007.

Прийнято 21.03.2007.

Адреса для листування:

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