

С.М. Пушкар

Вплив хемотерапії з таксотером на керамідний шлях активації апоптозу у хворих на рак грудної залози

Харківська медична академія
післядипломної освіти

Influence of chemotherapy with Taxotere on ceramide pathway of apoptosis activation in patients with breast cancer

Цель работы: Изучить влияние ионизирующего излучения и комбинированного действия излучения и таксотера на содержание церамида и апоптоз клеток рака грудной железы (РГЖ).

Материалы и методы: Содержание керамидов в опухолевой ткани и сыворотке крови исследовали у 20 больных РГЖ ІІВ–ІІІВ (Т2–3 N0–1M0 – Т1–4 N0–3 M0), которым проводили неoadъювантную лучевую терапию и химиолучевую терапию с таксотером. Уровень апоптоза определяли в биопсийном материале опухолей. Количественную оценку апоптозных клеток в опухолях проводили с использованием апоптозного индекса, который характеризует количество клеток с морфологическими признаками апоптоза. Для определения керамидов использовали гомогенат ткани опухоли и сыворотку крови больных РГЖ. Керамиды ткани и сыворотки крови разделяли с помощью хроматографии в тонком слое силикагеля на коммерческих пластинках Sorbfil (АО «Сорбполимер», Россия). Для идентификации липида использовали стандарты церамида (Sigma). Для количественного определения содержания керамидов в тканях и сыворотке крови пятна липидов переносили в пробирки и элюировали смесью хлороформа с метанолом (1:1 об./об.) с последующим элюированием метанолом. Объединенные элюаты выпаривали в вакууме и подвергали кислоту гидролизу в 0,5 М HCl в метаноле при 65° С в течение 15 час. Массу керамидов определяли по высвобождению длинноцепочечных оснований в ходе гидролиза липидов. Белок в гомогенате ткани и сыворотке крови определяли по методу Лоури.

Результаты: Установлено, что лучевая терапия больных РГЖ не приводила к существенным изменениям массы про-апоптозного липида — церамида в опухолевой ткани и сыворотке крови, и не изменяла величину апоптозного индекса в раковых клетках. При сочетанном действии индуктора апоптоза — таксотера и ионизирующего излучения происходило существенное повышение уровня церамида в опухоли и сыворотке крови больных раком и величины апоптозного индекса клеток опухоли.

Выводы: Установлено, что комбинированная химиолучевая терапия с таксотером приводит к индукции керамидного пути апоптоза в клетках радиорезистентной опухоли грудной железы.

Ключевые слова: рак грудной железы человека, ионизирующее излучение, таксотер, радиорезистентность, керамид, апоптоз.

Objective: To investigate the influence of ionizing radiation and combined action of irradiation and Taxotere on ceramide amount and cell apoptosis in breast cancer (BC).

Material and Methods: Ceramide amount in the tumor tissue and blood serum was investigated in 20 patients with II B – III B BC (T2-3N0-1M0 – T1-4N0-3M0) who were administered neoadjuvant radiation therapy and chemoradiation therapy with Taxotere.

Apoptosis level was determined in the biopsy specimens from the tumors. Quantitative assessment of apoptosis cells in the tumors was done using apoptosis index, which characterized the number of the cells with morphological signs of apoptosis.

Ceramides were determined using homogenate of the tumor tissue and blood serum of the patients with BC. Tissue and serum ceramides were separated using thin-layer chromatography with silica gel of commercially available Sorbfil (JS Sorbopolymer, Russia). Ceramide standards (Sigma) were used to identify the lipid.

For quantitative determining of tissue and serum ceramide amount lipid stains were taken to test tubes and eluted with mixture of chloroform with methanol (1:1) followed by elution with methanol. Mixed eluates were evaporated in vacuum and subjected to acid hydrolysis in 0.5 M HCl in methanol at 65° C for 15 hours. Ceramide mass was determined based on release of long-chain bases during lipid hydrolysis. Protein in homogenate and blood serum was determined using Lowry technique.

Results: It was established that radiation therapy of BC did not cause considerable changes in the mass of pro-apoptosis lipid, ceramide in the tumor tissue and blood serum and did not change apoptosis index in the tumor cells. Combination action of apoptosis inductor, Taxotere and ionized radiation considerably increased ceramide level in the tumor and blood serum of the patients as well as apoptosis index in the tumor cells.

Conclusion: Multimodality chemoradiation therapy with taxotere induces ceramide pathway of apoptosis in the cells of radioresistant BC tumor.

Key words: human breast cancer, ionizing radiation, Taxotere, radioresistance, ceramide, apoptosis.

Рак грудної залози (РГЗ) — пухлинний процес, що найчастіше діагностують у жінок. Резистентність пухлини до терапевтичних впливів є однією з найважливіших причин

неможливості вилікувати цю хворобу. Відомо, що променева терапія (ПТ) і хемотерапія справляють протипухлинний ефект через активацію шляхів програмованої загибелі ракової

клітини. Внаслідок різних дефектів у апоптозному каскаді розвивається резистентність пухлинних клітин до зазначених протипухлинних терапевтичних впливів. Відомо, що сфінголіпід — церамід є незамінним учасником сигналіngu про-апоптозних стимулів у клітинах різних типів. У пухлинних клітинах такі хемотерапевтичні препарати, як доксорубіцин, вінкристин, етопозид і паклітаксел [1], а також ПТ [2] приводять до збільшення вмісту внутріклітинного цераміду.

У більшості випадків індуковане терапевтичними впливами накопичення цераміду є визначальним у реалізації апоптозної програми [3, 4]. Водночас низка ліній ракових клітин і тканин злоякісних пухлин, резистентних до дії ПТ і ряду різних протипухлинних препаратів [5, 6], нездатні накопичувати церамід у відповідь на такий вплив [7, 8]. Це дозволяє припустити, що збільшення продукції і маси цераміду в ракових клітинах у ході клінічних маніпуляцій — важливий механізм придушення життєздатності пухлини та подолання її резистентності до дії радіо- та хемотерапії.

У цій праці ми вивчали акумуляцію цераміду й апоптоз клітин пухлини грудної залози після ПТ і поєднаної дії ПТ й індуктора апоптозу — таксотеру.

Методика дослідження

Вміст церамідів у пухлинній тканині досліджували в 20 хворих на РГЗ ІІБ–ІІІБ (Т2–3N0–1M0 — Т1–4N0–3M0).

Пацієнтів розподілили на 2 групи: першу — з 10 жінок, хворих на РГЗ ІІБ–ІІІБ ст., яким у складі неоад'ювантної традиційної ПТ вводили малі дози таксотеру перед початком тижневого циклу ПТ (5–6 циклів). Традиційну ПТ проводили малими фракціями в режимі 2,0 Гр × 5 фракцій на тиждень за такою програмою: на зону пухлини — СОД 60,0 Гр, на аксиллярну — СОД 45,0 Гр, на надключичну ділянку — СОД 40,0 Гр, на парастернальну — СОД 40,0 Гр. Протягом усього зазначеного курсу ПТ 1 раз на тиждень за 24 години до опромінювання внутрішньо вводили таксотер (разова доза 20 мг крапельно на 400,0 мл фізіологічного розчину). Премедикацію проводили дексаметазоном перорально двічі на день у разовій дозі 8,0 мг (16 мг на добу) протягом 3 діб. Таксотер вводили на другу добу після початку премедикації.

Друга група складалася з хворих на РГЗ ІІБ–ІІІБ ст. (10 жінок), які отримували тільки традиційну ПТ малими фракціями у зазначеному режимі (СОД — 60,0 Гр).

Передопераційну ПТ і хемотерапевтичну ПТ з таксотером хворим на ІІБ–ІІІБ ст. проводили на гамма-терапевтичних апаратах РОКУС-АМ і РОКУС-М.

Рівень спонтанного апоптозу визначали в біопсійному матеріалі нативних пухлин, індукований таксотером апоптоз визначали в клітинах резидуальної пухлини.

Її шматочки фіксували в 10 % -вому формаліні з наступним парафіновим проведінням. Кількісно оцінювали апоптозні клітини в пухлинах з використанням апоптозного індексу, який характеризує кількість клітин з морфологічними ознаками апоптозу. Після депарафінування парафінових зрізів і промивання фосфатно-сольовим буфером (Ph — 7,0) їх забарвлювали Hoechst (5 мг/мл) протягом 20 хв при кімнатній температурі. За допомогою флуоресцентного мікроскопа підраховували кількість клітин із характерною для апоптозу структурою — конденсацією і фрагментацією ядра, фрагментацією клітин з утворенням дискретних апоптозних тіл. Результати виражали у відсотковому відношенні клітин із флуоресцентними фрагментами ДНК апоптозно змінених клітин на 100 досліджуваних клітин у полі зору [9].

Для визначення цераміду використовували гомогенат тканини пухлини і сироватку крові хворих на РГЗ. Екстракцію ліпідів проводили за методом Блайя і Дайера [10]. Цераміди тканини і сироватки крові розділяли за допомогою хроматографії в тонкому шарі силікагелю на комерційних пластинках: Sorbfil (АТ «Сорбполімер», Росія). Для ідентифікації ліпідів використовували стандарти цераміду (Sigma). З метою оцінки кількісного вмісту церамідів у тканинах і сироватці крові плями ліпідів переносили до пробірок і елюювали сумішшю хлороформу з метанолом (1 : 1 об./об.) з наступним елююванням метанолом [11]. Об'єднані елюати випаровували у вакуумі та піддавали кислому гідролізу в 0,5 М НСІ у метанолі при 65° С протягом 15 годин. Масу церамідів визначали за вивільненням довголанцюгових основ у процесі гідролізу ліпідів методом Лаутера і Трамса [12]. Білок у гомогенаті тканини і сироватці крові визначали за Лоурі [13].

Результати та їх обговорення

Дані про вміст цераміду в тканині пухлини й сироватці крові хворих на РГЗ ІІБ–ІІІБ ст. до та після неоад'ювантної ПТ у класичному режимі представлено в табл. 1. Вміст цераміду в пухлині після ПТ зростав до 14,0 % ($2,91 \pm 0,12$ ммоль/мг білка проти $2,56 \pm 0,15$ у нативній пухлині, $p > 0,05$), а в сироватці крові всього на 3,0 % ($p > 0,05$).

Таблиця 1

Вміст цераміду в тканині пухлини і сироватці крові хворих на РГЗ до і після променевої терапії
Ceramide amount in the tumor tissue and blood serum in patients with breast cancer before and after radiation therapy

Об'єкт дослідження	Пухлина	Сироватка крові
Кількість хворих з нативною пухлиною	10	10
Вміст цераміду у хворих з нативною пухлиною (вихідні дані) (нмоль/мг білка)	$2,56 \pm 0,15$	$1,35 \pm 0,10$
Кількість хворих, які отримали ПТ	10	10
Вміст цераміду після ПТ (нмоль/мг білка)	$2,91 \pm 0,12$	$1,39 \pm 0,12$
Вміст цераміду (у відсотках) порівняно з вихідним рівнем	$114,00 \pm 8,04$	$103,00 \pm 1,05$

У другій групі хворих на РГЗ ІІБ—ІІІБ ст. — вміст цераміду визначали після неоад'ювантної ПТ з таксотером. Нашими дослідженнями встановлено, що при опромінюванні хворих на РГЗ на фоні введення їм таксотеру збільшується маса цераміду в тканині пухлини і сироватці крові (табл. 2). Після хемопроменевого лікування з таксотером вміст останнього збільшувався майже втричі у пухлинній тканині і більш ніж у 1,5 разу — в сироватці крові ($p < 0,05$). Рівень цераміду досягав $8,46 \pm 0,82$ ммоль/мг білка в індукованих таксотером пухлинних клітинах проти $2,91 \pm 0,12$ — у нативних.

Таблиця 2

Вміст цераміду в тканині пухлини і сироватці крові хворих на РГЗ після променевої терапії і поєднаної дії таксотеру й променевої терапії

Ceramide amount in the tumor tissue and blood serum in patients with breast cancer after radiation therapy and simultaneous action of Taxotere and radiation therapy

Об'єкт дослідження	Пухлина	Сироватка крові
Кількість хворих, які отримали ПТ	10	10
Вміст цераміду після ПТ (ммоль/мг білка)	$2,91 \pm 0,12$	$1,39 \pm 0,12$
Кількість опромінених хворих, які отримали хемопроменеву терапію з таксотером	10	10
Вміст цераміду після хемопроменевої терапії з таксотером (ммоль/мг білка)	$8,46 \pm 0,82^*$	$2,28 \pm 0,54^*$
Вміст цераміду (у відсотках) у групі хворих з хемотерапією із таксотером порівняно з тими, хто отримував ПТ	$290,70 \pm 9,04$	$164,00 \pm 7,06$

* — вірогідно відносно показників групи хворих, які отримали ПТ ($p < 0,05$).

У порівняльному аспекті було проведено вивчення рівня апоптозу пухлинних клітин після ПТ і хемопроменевої терапії з таксотером у хворих на РГЗ. Встановлено, що передопераційна ПТ таких пацієнток практично не впливала на величину апоптозного індексу в пухлинних клітинах. Так, цей індекс клітин пухлини до і після ПТ склав $3,38 \pm 0,27$ ($n = 92$) і $4,25 \pm 0,41$ ($n = 40$) умовних одиниць відповідно. Водночас у 19 хворих із ІІБ—ІІІБ ст., підданих поєднаній дії таксотеру і ПТ, величина апоптозного індексу була в 2,5 разу вищою, ніж у опромінених пацієнток, — $10,50 \pm 0,71$ ($p < 0,05$).

Відомо, що втрата здатності клітини продукувати й накопичувати церамід у відповідь на

дію іонізуючої радіації призводить до розвитку радіорезистентного фенотипу [5]. Дані літератури свідчать, що в таких клітинах іонізуюча радіація не викликає активації нейтральної сфінгомієлінази, деградації сфінгомієліну, утворення цераміду та індукції апоптозної загибелі клітин. У той же час культивування клітин карциноми легень у присутності екзогенного С2-цераміду перед впливом на них γ -радіації призводить до накопичування цераміду всередині клітин і їх апоптозу [14]. Введення у культуральне середовище ракових клітин конкурентного інгібітора сфінгозинкінази (N, N-диметилсфінгозину) супроводжується збільшенням маси ендогенного цераміду, придушенням продукції індуктора проліферації — сфінгозин 1-фосфату і підвищує чутливість клітин до впливу γ -радіації. При цьому церамід підсилює індукований γ -радіацією апоптоз переважно через дію на мітохондрії клітин і каспазалежний сигнальний шлях. Встановлено також, що фактор некрозу пухлини альфа істотно збільшує вміст цераміду в клітинах раку простати LNCaP, резистентних до дії γ -радіації, і при поєднаному впливі з опромінюванням викликає апоптоз клітин [15]. Таким чином, стає очевидним, що збільшення продукції і вмісту цераміду за допомогою різних експериментальних впливів на ракову клітину може збільшувати її чутливість до радіотерапії.

Серед потенційних індукторів апоптозу, з одного боку, і стимуляторів метаболізму сфінголіпідів, з іншого, особливе місце належить різним протираковим препаратам. Для лікування раку яєчників і грудної залози найчастіше застосовують таксол (таксотер). На клітинах гормоночутливої (MDA-MB-468) ракової пухлини грудної залози встановлено, що в присутності таксолу і попередника синтезу сфінголіпідів — [^3H] пальмітинової кислоти відбувається дворазове збільшення продукції [^3H] цераміду і загибель 50 % клітин [16]. Дія на клітини екзогенного С6-цераміду чи активатора синтезу цераміду de novo (трициклодекану 9-іл-ксантану) імітує дію таксолу і викликає апоптоз MDA-MB-435 клітин карциноми грудної залози [17]. Таким чином, встановлено, що таксол збільшує

масу цераміду в клітинах РГЗ, активуючи ключові ферменти синтезу сфінголіпідів, що є важливою передумовою індукованого таксолом апоптозу [16, 17].

В умовах експериментального онкогенезу таксотер збільшує масу цераміду в тканині аденокарциноми і в сироватці крові тварин-пухлинноносіїв [18]. Встановлено також, що таксотер збільшує чутливість аденокарциноми Герена до дії рентгенівського випромінювання. Так, опромінювання піддослідних тварин не викликало збільшення маси цераміду в пухлині, тоді як при поєднанні дії таксотеру і опромінювання відбувалося значне підвищення рівня цераміду в пухлині і сироватці крові щурів-пухлинноносіїв [18].

У модельних експериментах на різних лініях клітин РГЗ (MSF-7N, MSF-7TN-R, MDA-MB-231, NCI/ADR-RES) встановлено, що різні синтетичні аналоги цераміду можуть накопичуватися в клітинах і призводити до вибіркового пригнічення їх проліферації та індукції апоптозу [19]. На моделі солідної аденокарциноми грудної залози тварин і культурах тканин такої пухлини людини показано, що цераміди, включені в ліпосоми, здатні накопичуватися в ракових клітинах, придушувати їх проліферацію і мікроциркуляцію пухлинної тканини та індукувати апоптоз [20].

Встановлено, що церамід накопичується в клітинах аденокарциноми грудної залози у структурних мікродоменах (збагачених кавеолін-1 рафтах), що регулюють динамічну взаємодію між сигнальними молекулами. Церамід інгібує кіназу Akt, локалізовану в рафтах і втягнуту в сигнальні шляхи, які ведуть до виживання клітини [21]. Церамід також активує протеїнкіназу Сζ, що фосфорилує кіназу Akt і, таким чином, залучається в процес апоптозної загибелі клітин [22]. Іншим механізмом церамідзалежного апоптозу клітин РГЗ є акумуляція цераміду в мітохондріях. Локалізований тут церамід викликає їх дисфункцію, вивільнення цитохрому-с і активацію каспаз [23, 24].

Не менш важлива мішень дії цераміду в пухлинних тканинах — ендотеліальні клітини судин [25]. Нашими дослідженнями встановлено, що при поєднаній дії таксотеру і рент-

генівського випромінювання на організм хворих на РГЗ відбувається значне накопичення цераміду в сироватці крові. За таких умов (під дією таксотеру і рентгенівського випромінювання) може індукуватися вивільнення секретованої сфінгомієлінази у кров'яне русло, де градація під дією такого фермента сфінгомієліну ліпопротеїнів низької густини та вивільнення цераміду [11]. Ліпопротеїни, що утворюються при цьому, збагачені церамідом, можуть інтенсивно захоплюватися ендотеліальними клітинами судин пухлини, в результаті відбувається накопичення в них цераміду та індукція апоптозу.

З огляду на результати наших досліджень і дані літератури можна зробити висновок, що таксотер — перспективний препарат для подолання резистентності пухлинних клітин до впливу ПТТ через реалізацію церамідного шляху апоптозу в ракових клітинах.

Висновки

1. Вивчення вмісту цераміду й апоптозного індексу в клітинах пухлин грудної залози показало, що таку тканину зі стабільно низьким рівнем ендогенного індуктора апоптозу — цераміду, можна розглядати як радіорезистентну.

2. Опромінювання хворих на фоні введення їм таксотеру супроводжується збільшенням маси цераміду в пухлинній тканині і сироватці крові, що корелює з індукцією апоптозу ракових клітин — триразове збільшення рівня церамідів супроводжувалося зростанням апоптозного індексу в 2,5 рази.

3. Продукція ендогенного цераміду в пухлинній тканині, індукована хемотерапією, може бути важливим стимулом для запускання апоптозного сигнального каскаду у ракових клітинах грудної залози і, тим самим, сприяти подоланню їх резистентності до дії ПТТ.

Література

1. Senchenkov A., Litvak D.A., Cabot M.C. // *J. Natl. Cancer Inst.* – 2001. – Vol. 93. – P. 347–357.
2. Haimovitz-Friedman A., Kan C.C., Ehleiter D., Persaud R.S. et al. // *J. Exp. Med.* – 1994. – Vol. 180, № 2. – P. 525–535.
3. Olshefski R.S., Ladisch S. // *Int. J. Cancer.* – 2001. – Vol. 93. – P. 131–138.
4. Litvak D.A., Bilchik A.J., Cabot M.C. // *J. Gastrointest. Surg.* – 2003. – Vol. 7. – P. 140–148.

5. Chmura S.J., Nodzinski E., Beckett M.A., Kufe D.W. et al. // *Cancer Res.* – 1997. – Vol. 57, № 7. – P. 1270–1275.
6. Michael J.M., Lavin M.F., Watters D.J. // *Ibid.* – P. 3600–3605.
7. Cai Z., Bettaieb A., Mahdani N.E., Legrüs L.G. et al. // *J. Biol. Chem.* – 1997. – Vol. 272, № 11. – P. 6918–6926.
8. Wang X.Z., Beebe J.R., Pwiti L. // *Cancer Res.* – 1999. – Vol. 59. – P. 5842–5848.
9. Allen S., Sotos J., Sytle M.J. et al. // *Clin. and diagnos. laborat. immunol.* – 2001. – Vol. 8, № 2. – P. 460–464.
10. Bligh E.G., Dyer W.J. // *Canad. J. Biochem. Physiol.* – 1959. – Vol. 37, № 8. – P. 911–917.
11. Sathishkumar S., Boyanovsky B., Karakashian A.A. et al. // *Cancer Biol. Ther.* – 2005. – Vol. 4, № 9. – P. 979–986.
12. Lauter C.J., Trams E.G. // *J. Lipid. Res.* – 1962. – Vol. 3. – P. 135–138.
13. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.E., Randall R.J. // *J. Biol. Chem.* – 1951. – Vol. 193. – P. 265–275.
14. Park H.-W., Song J.-Y., Kim K.-S. et al. // *Exp. Molec. Med.* – 2004. – Vol. 36, № 5. – P. 411–419.
15. Nava V.E., Cuvillier O., Edsall L.C. et al. // *Cancer Res.* – 2001. – Vol. 60. – P. 4468–4474.
16. Charles A.G., Han T.Y., Lin Y.Y. et al. // *Cancer Chemother. Pharmacol.* – 2001. – Vol. 47. – P. 444–450.
17. Chan S.Y., Hilchie A.L., Brown M.G. et al. // *Exp. Mol. Pathol.* – 2006. – Vol. 21. – P. 678–680.
18. Міряєва Н.А., Гребіник Л.В., Узленкова Н.Є. та ін. // *УРЖ.* – 2005. – Т. XIII, вип. 1. – С. 58–61.
19. Struckhoff A.P., Bittman R., Burrow M.E. et al. // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* – 2004. – Vol. 309. – P. 523–532.
20. Stover T.C., Sharma A., Robertson G.P., Kester M. // *Clin. Cancer Res.* – 2005. – Vol. 11, № 9. – P. 3465–3473.
21. Zhou H., Summers S.A., Birnbaum M.J. // *J. Biol. Chem.* – 1998. – Vol. 273. – P. 16568–16575.
22. Bourbon N.A., Sandirasegarane L., Kester M. // *Ibid.* – 2002. – Vol. 277. – P. 3286–3292.
23. Birbes H., Bawab S.E., Obeid L.M., Hannun Y.A. // *Adv. Enzyme Regul.* – 2002. – Vol. 42. – P. 113–119.
24. Di Paola M., Cocco T., Lorusso M. // *Biochem.* – 2000. – Vol. 39. – P. 6660–6668.
25. Matsunaga T., Kotamraju S., Lalivendi S.V. et al. // *J. Biol. Chem.* – 2004. – Vol. 279. – P. 28614–28624.

Надходження до редакції 12.12.2007.

Прийнято 21.12.2007.

Адреса для листування:
Пушкар Сергій Миколайович,
ХМАПО, вул. Корчагінців, 58,
Харків, 61176, Україна