

10. Mirimanoff R. et al. // *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* – 2007. – Vol. 69 (Suppl.). – S. 2.
11. Бажанов С.П. // *Саратов. научно-мед. журн.* – 2010. – Т. 6, № 1. – С. 189–194.
12. Ferrara N. // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* – 2001. – Vol. 280. – P. 1358–1366.
13. Ferrara N., Gerber H.P., Couter J. // *Nat. Med.* – 2003. – Vol. 9. – P. 669–676.
14. DeAngelis L.M. // *N. Engl. J. Med.* – 2001. – Vol. 344. – P. 114–123.
15. Жуков Н.В. // *Практ. онкол.* – 2007. – Т. 8, № 3. – С. 164–172.
16. Cannistra S.A. et al. // *J. Clin. Oncol.* – 2006. – Vol. 24. – P. 257S.
17. Kretzschmar A. et al. // *Ibid.* – 2007. – Vol. 25. – P. 4072

Н.А. Мітряєва, Т.С. Бакай, Т.В. Сегеда,
В.П. Старенький

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

Використання хемомодифікації для направленої індукції церамідного шляху апоптозу пухлини

The use of chemomodification for tumor apoptosis ceramide pathway induction

Summary. Comparative analysis of the clinical findings of pre-operative radiation therapy in patients with non-small-cell lung cancer with chemomodification (Taxotere, Etoposide, Cisplatin) and without it demonstrated the advantages of the combination therapy. Experimental investigation of chemomodifying effect of chemotherapy drugs (Taxotere, Etoposide, Cisplatin) on Guerin's carcinoma showed various mechanisms of accumulation of pro-apoptosis ceramides and their potential role in apoptosis induction and tumor regression.

Key words: ceramide, radiation therapy, chemomodification, apoptosis, non-small-cell lung cancer, Guerin's carcinoma.

Резюме. Сравнительный анализ клинических результатов предоперационной лучевой терапии больных немелкоклеточным раком легкого с химиомодификацией (таксотер, этопозид, цисплатин) и без нее, показал преимущество комбинированного лечения. Экспериментальное изучение химиомодифицирующего влияния химиопрепаратов (таксотер, этопозид, цисплатин) на опухоль Герена показало разные механизмы накопления проапоптотических керамидов и их возможную роль в индукции апоптоза и регрессии опухоли.

Ключевые слова: керамид, лучевая терапия, химиомодификация, апоптоз, немелкоклеточный рак легкого, опухоль Герена.

Ключові слова: керамід, променева терапія, хемомодифікація, апоптоз, недрібноклітинний рак легені, пухлина Герена.

Апоптична загибель пухлинних клітин є одним з механізмів дії іонізуювальної радіації. Однак у багатьох випадках злоякісні пухлини відзначаються радіорезистентністю, що становить перешкоду для ефективного лікування певних онкозахворювань. Результати численних досліджень, як експериментальних, так і клінічних, стосовно пошуку засобів хемосенсибілізації пухлин переконливо свідчать, що направлена індукція апоптозу злоякісних клітин сприяє підвищенню їх радіочутливості. Відомо, що сфінголіпіди відіграють важливу роль як у проліфе-

ративних процесах, так і в апоптозі, а керамід (ЦМ), що є центральною молекулою сфінголіпідного метаболізму, виступає вторинним месенджером в індукції апоптичної відповіді. Зважаючи на те, що порушення саме в сигнальній системі керамідного шляху апоптозу можуть бути причиною радіорезистентності пухлини, не викликає сумніву актуальність досліджень у цій галузі [1–4].

Встановлено, що хемомодифікувальна дія багатьох цитостатичних препаратів, використовуваних у клінічній онкології, певною мірою пов'язана з індукцією керамідного шляху апоптозу в пухлинних клітинах. До таких хемомодифікаторів належать таксотер, этопозид, цисплатин [5, 6].

Протягом останніх років в ДУ Інститут медичної радіології ім. С.П. Григор'єва НАМН України вивчають вплив поєднаної дії променевої терапії (ПТ) і зазначених хемопрепаратів на вміст і обмін проапоптотичних сфінголіпідів з метою підвищення ефективності ПТ злоякісних пухлин.

Отримані в експерименті дані продемонстрували накопичення ЦМ, підвищення радіочутливості і високий рівень апоптозу в пухлинних клітинах в умовах комбінованого впливу локального рентгенівського опромінення і хемопрепаратів — хемомодифікаторів і стали підставою для оптимізації методів хемопроменевої терапії у хворих з місцевопоширеним, первинно неоперабельним раком грудної залози (РГЗ) та хворих на недрібноклітинний рак легені (НДРЛ) [7–10].

Доведено, що у хворих на РГЗ (67 осіб; II В–III В стадії) передопераційна ПТ з використанням толерантної дози таксотеру стимулювала зростання вмісту ЦМ у пухлині на 400%, порівняно з хворими, опроміненіми в тому ж самому режимі, але без таксотеру, і на 455% — відносно вмісту ЦМ в інтактній пухлині грудної залози. У сироватці крові вміст ЦМ перевищував контрольні показники на 90 і 68% відносно контролю і групи хворих, які отримували тільки опромінення. Апоптичний індекс у хворих з таксотером підвищувався більш ніж у 3 рази відносно нативної пухлини і в 2,5 разу — відносно групи з ПТ без таксотеру. Ці показники корелювали зі ступенем регресії пухлини, а також у 63% хворих, що отримали ПТ з таксотером, мала місце 100%-ва регресія регіонарних метастазів.

Таким чином, введення толерантних доз таксотеру в схему класичної неoad'ювантної ПТ хворих на РГЗ супроводжувалося значним збільшенням вмісту ЦМ у пухлині і сироватці крові, індукцією апоптозу пухлинних клітин та істотною редукцією пухлини (в середньому на 75–100%), що свідчить про хемосенсибілізуювальний ефект таксотеру через стимуляцію апоптозу.

З огляду на те, що рак легені посідає провідне місце в загальній структурі онкозахворюваності, а поширеність процесу на момент встановлення діагнозу досить значна, основними методами лікування хворих на рак легені (РЛ) залишаються променева та хемотерапія. Приблизно 75% всіх випадків складає НДРЛ, який відзначається хемо- і радіорезистентністю. Зважаючи на цю особливість, що ускладнює його лікування, чимало сучасних досліджень присвячено з'ясуванню причин терапевтичної резистентності НДРЛ. Відомо, що цей феномен має мультифакторну природу, властиву певним клітинним шляхам сигнальної трансдукції. У зв'язку з тим, що сучасними дослідженнями доведено важливу роль біоактивних сфінголіпідів у патогенезі раку та модуляції чутливості пухлинних клітин до різних чинників, метою наших досліджень було вивчення впливу передопераційної ПТ в комбінації з хемомодифікацією різними препаратами (таксотером, цисплатином, этопозидом) на вміст проапоптотичного ліпиду — ЦМ і його попередника сфінгом'єліну в пухлинній тка-

нині хворих на НДРЛ. При дослідженні комбінованого впливу таксотеру і ПТ на вміст ЦМ і сфінгомеліну (СФМ) у пухлині хворих на НДРЛ встановлено, що хемомодифікація таксотером призводила до вірогідного збільшення рівня ЦМ у 2,8 разу і співвідношення ЦМ/СФМ — у 2,3 разу (у контрольну групу ввійшли хворі на НДРЛ, які отримували тільки передопераційну ПТ).

Застосування етопозиду також збільшувало вміст ЦМ у пухлині в 2,1 разу, що може бути однією з причин його хемосенсибілізуючої дії.

Результати передопераційної хемопроменевої терапії з цисплатиною виявили підвищення вмісту ЦМ у пухлині на 30% і зниження рівня СФМ на 40% порівняно з контролем, таким чином, співвідношення ЦМ/СФМ у пухлині зросло до 4,1 порівняно з 2,2 в контрольній групі. Цей ефект може свідчити про стимулювальний вплив цисплатину на утворення ЦМ шляхом гідролізу СФМ.

Наявність ознак апоптозу в пухлинних клітинах хворих на НДРЛ всіх досліджуваних груп підтверджено електронно-мікроскопічними дослідженнями, а саме: зафіксовано зростання кількості ядер пухлинних клітин з фрагментованим хроматином.

Таким чином, хемосенсибілізуюча дія використаних препаратів може бути пов'язана зі стимуляцією накопичення ЦМ у пухлинних клітинах хворих на НДРЛ. Подальші дослідження були спрямовані на вивчення впливу хемопроменевого лікування на активність ферменту — сфінгомелінази (СМ-ази) в сироватці крові хворих на НДРЛ, яка каталізує гідроліз сфінгомеліну, продукуючи при цьому ЦМ. Результати багатьох досліджень інших авторів свідчать, що інгібування кислотої СМ-ази спричиняє резистентність пухлинних клітин до різних чинників, зокрема до радіації і хемотерапії. Зважаючи на це, засоби, що посилюють активність кислотої СМ-ази і ведуть до індукції генерації ЦМ, можна розглядати як метод лікування онкологічних захворювань. Показано, наприклад, що кислота СМ-ази активується за умов Fas-індукованого апоптозу клітин гліоми. Слід зазначити, що цей фермент відіграє важливу роль не тільки в самих злоякісних клітинах, а і в мікрооточенні пухлини, особливо в ангиогенезі, тому розробку методів останнього вважають перспективною стратегією лікування раку [11, 12].

Вивчення активності кислотої СМ-ази сироватки крові у 29 хворих на НДРЛ в динаміці хемопроменевої терапії з етопозидом виявило підвищення її рівня в 2,9 разу у 86 % пацієнтів. Показано, що на фоні зростання її активності відбувалось вірогідне зростання рівня (в 2,6 разу) ЦМ у сироватці крові, який може у складі ліпопротеїдів крові індукувати в пухлині апоптоз ендотеліальних клітин судин і, таким чином, порушувати кровообіг у пухлині, про що переконливо свідчать дані інших авторів [11].

У експериментальних дослідженнях, присвячених вивченню впливу іонізуючого випромінювання і хемопрепаратів, а також їх комбінованої дії на вміст сфінголіпідів (ЦМ, СФМ) у пухлині і сироватці крові як експериментальну модель було використано щурів популяції Вістар з перещепленою карциномою Герена. Рентгенівське опромінення пухлини проводили при поглинутій дозі на фракцію 5 Гр і з інтервалом між сеансами 24 год. Сумарна поглинута доза на зону росту пухлини складала 10 Гр. Найбільш значущі зміни рівня ЦМ у пухлині при окремій дії хемопрепаратів реєстрували при застосуванні таксотеру і етопозиду, причому рівень СФМ вірогідно не змінювався. При дії цисплатину зростання рівня ЦМ відбувалось на фоні вірогідного зменшення рівня СФМ. Таким чином, механізми накопичення ЦМ у пухлині під впливом різних препаратів відрізнялися. При використанні так-

сотеру і етопозиду відбувалось триразове підвищення вмісту ЦМ у сироватці крові.

Вплив тільки рентгенівського випромінювання, навпаки, не викликав вірогідних змін вмісту ЦМ і СФМ у пухлинах, що, ймовірно, пов'язане з механізмами, що формують хеморезистентність карциноми Герена.

При вивченні комбінованої дії опромінення і хемопрепаратів на вміст ЦМ і СФМ у пухлині встановлено, що введення таксотеру майже вдвічі збільшувало вміст ЦМ у пухлині і сироватці крові, проте рівень СФМ не змінювався. Таким чином, можна припустити, що генерація ЦМ в цьому випадку відбувається не за рахунок гідролізу СФМ, а шляхом синтезу *de novo*, що в свою чергу, підвищує радіочутливість пухлини. Схожі ефекти спостерігали і при використанні етопозиду в комбінації з радіацією. Поєднана дія цисплатину і радіації стимулювала підвищення рівня ЦМ на фоні падіння вмісту СФМ в пухлині, що вказує на можливе накопичення ЦМ за рахунок гідролізу СФМ і активації СМ-ази.

Зважаючи на отримані результати, було закономірним подальше вивчення впливу радіації і етопозиду на активність кислотої СМ-ази сироватки крові у щурів-пухлинноносіїв. Встановлено, що в особин з перещепленою пухлиною Герена застосовані дози локального опромінення не викликали активації кислотої СМ-ази в сироватці крові, а при поєднаному застосуванні радіації і етопозиду активність ферменту підвищувалася на 21 %, що супроводжувалося зростанням рівня ЦМ у сироватці крові та можливою подальшою загибеллю клітин мікровазкулярного ендотелію.

Таким чином, методи ПТ з використанням субтерапевтичних доз хемопрепаратів, що стимулюють індукцію церамідного шляху апоптозу пухлинних клітин, дозволяють досягнути істотної регресії пухлини завдяки підвищенню її радіочутливості, а терапевтичні стратегії, спрямовані на підвищення рівня ЦМ у пухлині й сироватці крові, відкривають нові шляхи керування променевими реакціями пухлин, що безперечно могло б підвищити ефективність лікування раку.

Література

1. Meyn R. E., Milas L., Ang K. K. // *Int. J. Radiat. Biol.* – 2009. – Vol. 85, № 2. – P. 107–115.
2. Kolesnick R., Fuks Z. // *Oncogene.* – 2003. – Vol. 22. – P. 5897–5906.
3. Brown J. M., Attardi L. D. // *Nature Rev. Cancer.* – 2005. – Vol. 5. – P. 231–237.
4. Saddoughi S. A., Song P., Ogretmen B. // *Sub-Cell. Biochem.* – 2008. – Vol. 49. – P. 413–440.
5. Lin C. F., Chen C. L., Lin Y. S. // *Cur. Med. Chem.* – 2006. – Vol. 13, № 14. – P. 1609–1616.
6. Gimenez-Bonafe P., Tortosa A., Perez-Tomas R. // *Cur. Cancer Drug Targets.* – 2009. – Vol. 9, № 3. – P. 320–340.
7. Мітряєва Н. А., Бабенко Н. А., Бакай Т. С. та ін. // *УРЖ.* – 2008. – Т. XVI, вип. 1. – С. 27–31.
8. Мітряєва Н. А., Бабенко Н. А., Бакай Т. С., Сеґеда Т. С. // *Там же.* – 2009. – Т. XVII, вип. 2. – С. 201–205.
9. Старенький В. П., Мітряєва Н. А., Бакай Т. С. та ін. // *Пробл. сучасн. мед. науки та освіти.* – 2009. – № 2. – С. 38–40.
10. Белозор Н. В., Мітряєва Н. А., Бакай Т. С. и др. // *Комбинированное влияние ионизирующей радиации и этопозиды на активность кислотої Zn²⁺-зависимой сфингомиеліназы сыворотки крови больных немелкоклеточным раком легкого* // *Тез. докл. VI сьезда по радиац. исслед.: матер. сьезда.* – М., 2010. – С. 234.
11. Smith E. L., Schuchman E. H. // *FASEB Journ.* – 2008. – Vol. 22, № 10. – P. 3419–3431.
12. Grammatikos G., Teichgraber V., Carpinteiro A. et al. // *Antioxid. and Redox Signal.* – 2007. – Vol. 9, № 9. – P. 1449–1456.