

ОЦІНКА ВПЛИВУ ПОЄДНАНОЇ ДІЇ РЕНТГЕНІВСЬКОГО ВИПРОМІНЕННЯ ТА ЕТОПОЗИДУ НА СИНТЕЗ ПРОАПОПТОЗНИХ СФІНГОЛІПІДІВ У КАРЦИНОМІ ГЕРЕНА

Т.В. Сегеда, Н.А. Мітряєва, Т.С. Бакай, Л.В. Гребіник

ДУ "Інститут медичної радіології ім. С.П. Григор'єва НАМН України", м. Харків, Україна

Одним з основних напрямків наукового пошуку в радіаційній онкології є підвищення специфічного протипухлинного ефекту. Останніми роками набула активного розвитку стратегія багатофакторної терапії, яка поряд з опроміненням включає використання модифікаторів, зокрема цитостатиків. У зв'язку з цим зростає актуальність пошуку способів модифікації променевої терапії для подолання радіорезистентності пухлин. Перспективним шляхом подальшого розвитку хіміопроменевої терапії може бути розробка технологій, направлених на підвищення ініціації апоптозної загибелі пухлинних клітин як одного з найважливіших шляхів подолання радіорезистентності.

Нині особлива увага приділяється вивченню церамідного шляху апоптозу. Доведено, що генерація проапоптозного ліпиду — цераміду (ЦМ) є важливим етапом в індукції загибелі пухлинних клітин під дією радіації [1-3]. Саме з порушенням у пухлинних клітинах накопичення ЦМ та його метаболізму пов'язують явище радіорезистентності [4, 5]. Встановлено, що протипухлинний препарат "Етопозид" підвищує рівень ЦМ та індукує апоптичну загибель злоякісних клітин [6, 7]. Протипухлинні препарати (етопозид, цисплатин) використовують як радіосенсибілізатори. Цитотоксичний ефект дії цих препаратів пов'язаний з активацією апоптозу через ЦМ-опосередковані шляхи. Однак механізми направленої індукції апоптозу за умов хіміорадіотерапії, зокрема, при спільній дії різних джерел іонізуючого випромінювання та хемопрпаратів залишаються невизначеними.

Метою даного дослідження було вивчення ефектів поєднаної дії рентгенівського випромінювання та етопозиду на синтез проапоптозних ліпідів — ЦМ та сфінгозину в карциномі Герена шурів.

Матеріали і методи

Експеримент було проведено на щурах масою 160 — 180 г. Всі дослідження на тваринах виконували з дотриманням Міжнародних принципів Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментів та інших наукових цілей (Страсбург, 1985) і національних Загальних етичних принципів експериментів на тваринах (Україна, 2001). Тваринам підшкірно вводили 0,5 мл 20 % суспензії клітин, отриманих з пухлинної тканини експериментальної карциноми Герена

(Guerin's carcinoma), штамп якої було одержано з Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Е. Кавецького НАН України. Експеримент починали на 10 — 12 день після перещеплення пухлини, коли розміри пухлинного вузла досягали у діаметрі 1,5 — 2,0 см.

Тварин розподіляли методом випадкового добору на такі групи: 1 — інтактний контроль; 2 — етопозид; 3 — опромінення; 4 — опромінення + етопозид. Коливання середнього об'єму пухлини на момент початку експерименту не перевищувало 10 %.

Опромінення пухлини проводили на апараті РУМ-17 за стандартних технічних умов: напруга — 190 кВ, сила струму — 10 мА, фільтри: 0,5 мм Cu плюс 1 мм Al, потужність дози (потужність повітряної керми), вимірної в повітрі складала 0,981 Гр/хв, фокусна відстань 30 см. Опромінення проводили двома фракціями по 5 Гр, з інтервалом між сеансами 24 год, час опромінення — 4 хв 39 с, сумарна поглинута доза на зону росту пухлини складала 10 Гр.

Хіміопрепарат етопозид "Ебеве" вводили внутрічеревинно за 24 год до першого сеансу опромінення у дозі 8 мг/кг маси тіла. Тварин забивали під ефірним наркозом через 24 год після останнього сеансу опромінення в 3-й і 4-й групах або після введення хіміопрепарату в 2-й групі.

В ролі попередника синтезу ліпідів використовували [¹⁴C]-пальмітинову кислоту (2,07 ГБк/ммоль; Amersham, YE Healthcare, UK). Шматочки тканини пухлини інкубували в буфері Кребс-Хенслеит, в який додавали [¹⁴C]-пальмітинову кислоту (3,7·10⁵ Бк/мл), 25 ммоль HEPES, пеніцилін (61 мг/л), стрептоміцин (100 мг/л), 10 % ембріональну сироватку бика, протягом 120 хв при 37 °С і рН 7,5. По закінченні інкубації шматочки тканини двічі відмивали надлишком буферу Кребс-Хенселейт з 0,2 % вмістом альбуміну, рН 7,5.

Екстракцію ліпідів з гомогенату тканини проводили за методом Фолча [8]. Церамід, сфінгозин і сфінгомієлін розділяли за допомогою хроматографії в тонкому шарі силікагелю на комерційних пластинках Sorbfil (АО "Сорбполимер", Росія). Екстракти ліпідів, які використовували для аналізу сфінголіпідів, випарювали у вакуумі та інкубували 60 хв при 37 °С в середовищі хлороформ-метанол (1:1, v/v), в яке додавали NaOH (0,1 моль) для гідролізу ацилгліцеринів. Ліпіди знову екстрагували

Таблиця

Вплив етопозиду та рентгенівського випромінення на синтез цераміду та сфінгозину в карциномі Герена, імпульси на хвилину на грам тканини, імп/хв·г, ($\bar{X} \pm S\bar{X}$)

Група тварин	n	[¹⁴ C] церамід	Порівняння груп	Кв	[¹⁴ C] сфінгозин	Порівняння груп	Кв
1-контроль	9	19957±1017			22895 ± 2500		
2-етопозид	9	38604±1642	(1-3)*		28484± 2850	1-2	
3-опромінення (РУМ-17)4-опромінення (РУМ-17)+ етопозид	9	12278±3008	(1-3)*		22993 ± 3195	1-3	
4-опромінення (РУМ-17)+ етопозид	9	51584±4500	(1,2,3-4)*	1,01	54257 ± 3650	(1,2,3-4)*	1,05

Примітки: 1. * P — вірогідність відмінностей між групами (критерій U; Вілкоксона-Манна-Уїтні); вірогідними вважали результати при P < 0,05;

2. Кв — коефіцієнт взаємодії визначали відносно ефекту поєднаної дії до суми ефектів роздільних взаємодій (опромінення та етопозид).

і використовували для розподілу на класи (ЦМ і сфінгозин) у системі розчинників хлороформ-етилацетат-ізопропіловий спирт-метанол 0,25 % KCl (25:25:25:10:9) [9]. Ліпіди (сфінгомієлін, ЦМ) проявляли в парах йоду; сфінгозин за допомогою розчину 3 % нінгідрину в бутанолі, насиченому H₂O, та ідентифікували за допомогою порівняння зі стандартами. Для ідентифікації ліпідів використовували стандарти ЦМ та сфінгозину (Sigma). Силікагель з площі плям ліпідів переносили у склянки для підрахунку радіоактивності у сцинтиляційній рідині ЖС-8. Радіоактивність зразків вимірювали за допомогою лічильника БЕТА — 1 ("Медприлад", Київ). Статистичний аналіз даних проводили за допомогою статистичних програм для ПК "Statistica, V 5" при використанні параметричних та непараметричних методів для малих вибірок.

Результати та їх обговорення

Для з'ясування механізмів накопичення ЦМ у клітинах нативної пухлини і при дії індукторів апоптозу вивчали синтез різних фракцій сфінголіпідів після інкубації гомогенатів пухлини Герена з попередником синтезу сфінголіпідів — [¹⁴C]-пальмітиновою кислотою. Відомо, що конденсація пальмітил-CoA із серином за участі ключового ферменту синтезу сфінголіпідів — серин-пальмітил-трансферази супроводжується утворенням 3-кетосфінганіну, який потім перетворюється на ЦМ або сфінгомієлін та інші сфінголіпіди. Показано, що введення етопозиду в середовище інкубації пухлинних клітин підвищувало активність серин-пальмітил-трансферази, синтез ЦМ і викликало апоптичну загибель клітин [10].

Виконаними дослідженнями встановлено, що введення щурам-пухлиноносій етопозиду стимулювало посилення синтезу проапоптозних сфінголіпідів у тканинах карциноми порівняно з контролем: ЦМ — на 93,4 %, сфінгозину — на 24,4 % (таблиця). Доведено зниження активності синтезу ЦМ на 38,5 % при окремій дії рентгенівського випромінення. Таким чином, результати досліджень свідчать про відсутність активації акумуляції ЦМ у пухлин за умов опромінення, що може бути однією з причин радіорезистентності карциноми Герена.

Поєднана дія опромінення та етопозиду сприяла підвищенню синтезу ЦМ на 158 %, сфінгозину на 137 % порівняно з контролем.

Враховуючи те, що вільний сфінгозин є, головним чином, продуктом обміну ЦМ, можна припустити, що в умовах поставленого експерименту поєднана дія етопозиду і опромінення супроводжувалася активацією церамідаз, деградацією синтезованого de novo ЦМ і накопиченням вільного сфінгозину. Сфінгозин визнано проапоптозним ліпідом, що беззаперечно доводять дані літератури про блокування клітинного циклу, пригнічення проліферації клітин і посилення апоптозу при введенні сфінгозину в середовище культивування різних клітин [11-13].

Таким чином, можна зробити припущення, що етопозид є потужним індуктором експресії проапоптозних сфінголіпідів, як у клітинах інтактної пухлини, так і в пухлинах опромінених тварин. Однак, якщо в першому випадку це відбувалося за рахунок збільшення синтезу ЦМ, то в другому — як за рахунок збільшення ЦМ, так і за рахунок утворення сфінгозину.

Ефект радіосенсибілізуючої дії етопозиду на синтез ЦМ мав характер потенціювання, тобто дія опромінення, яке само по собі очікуваного ефекту не викликало, посилювалася впливом етопозиду. В результаті поєднаної дії опромінення та етопозиду синтез ЦМ у пухлині зростав в 4,2 рази, порівняно з окремим опроміненням, і 2,6 разів порівняно з інтактним контролем.

Етопозид та рентгенівське випромінення взаємодіють синергічно в індукції проапоптозного сфінгозину, тобто результат поєднаної дії опромінення та етопозиду перевищував суму ефектів їх роздільної дії, коефіцієнт синергізму перевищував 1. В результаті поєднаної дії опромінення і етопозиду синтез сфінгозину зростав в 2,4 разів порівняно як з окремим опроміненням, так із інтактним контролем.

Таким чином, однією зі складових терапевтичної ефективності етопозиду можна вважати його здатність стимулювати синтез ЦМ у пухлинних клітинах, що відіграє важливу роль в індукції апоп-

тозу і підвищенні радіочутливості пухлини. Поєднання дія рентгенівського випромінювання і етопозиду значно посилює ефективність опромінення, що, можливо, зумовлено направленою індукцією церамідного шляху апоптозу. Отримані в експерименті дані, які продемонстрували значне збільшення синтезу проапоптозних сфінголіпідів за умов поєднаної дії опромінення і етопозиду, дають підставу для розробки нових підходів і способів, що забезпечують селективне керування радіочутливістю на основі індукції церамідного шляху апоптозу на етапах хіміопроменевого лікування онкологічних хворих.

Висновки:

1. Етопозид виявився потужним індуктором експресії проапоптозних ліпідів як у клітинах інтактної пухлини, так і в пухлині опромінених тварин. У першому випадку це відбувалося шляхом збільшення синтезу ЦМ, в другому — за рахунок не тільки збільшення синтезу ЦМ, але й утворення сфінгозину.
2. Встановлено, що поєднана дія рентгенівського випромінювання і етопозиду в пухлині Герена щурів-пухлиноносіїв викликає достовірне посилення синтезу проапоптозних сфінголіпідів (ЦМ та сфінгозину).
3. Радіобіологічний ефект поєднаної дії рентгенівського випромінювання та етопозиду набував характеру потенціювання при синтезі ЦМ та синергізму — при утворенні сфінгозину.

ЛІТЕРАТУРА

1. Hannun Y. A., Obeid L. M. Principles of bioactive lipid signaling: Lessons from sphingolipids // *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. — 2008. — Vol. 9, №2. — P. 139-150.
2. Carpinteiro A., Dumitru C., Schenck M., Gulbins E. Ceramide-induced cell death in malignant cells // *Cancer Letters*. — 2008. — Vol. 264, № 1. — P. 1-10.
3. Kolesnick R., Fuks Z. Radiation and ceramide-induced apoptosis // *Oncogene*. — 2003. — Vol. 22. — P. 5897-5906.
4. Bionda C. Radioresistance of human carcinoma cells is correlated to a defect in raft membrane clustering / C. Bionda, E. Hadchity, G. Alfonse et al. // *Free. Radic. Biol. Med.* — 2007. — Vol. 43, № 5. — P. 681-694.
5. Medler T. Apoptotic sphingolipid signaling by ceramides in lung endothelial cells / T. Medler, D. Petrusca, P. Lee et al. // *Am. J. Res. Cell. Mol. Biol.* — 2008. — Vol. 38, № 6 — P. 639-646.
6. Lin C. F. Sequential caspase-2 and caspase-8 activation upstream of mitochondria during ceramide and Etoposide — induced apoptosis. / Lin C. F., Chen C. L., Changet W.T. et al. // *Journal of Biological Chemistry*. — 2004. Vol. 279, № 39. — P. 40755-40761.
7. Ogretmen B. Sphingolipids in cancer: regulation of pathogenesis and therapy // *FEBS Lett.* — 2006. — Vol. 580. — P. 5467-5476.
8. Folch J. A simple method for the isolation and purification of total lipid from animal tissues / Folch J., Lees M., Stanley G. // *J. Biol. Chem.* — 1957. — Vol. 226. — P. 497-509.

9. Dolgachev V. De novo ceramide accumulation due to inhibition of its conversion to complex sphingolipids in apoptotic photosensitized cells / Dolgachev V., Farooqui M., Kulaeva O., Tainy M. et al. // *J. Biol. Chem.* — 2004. — Vol. 279. — P. 23238-23249.

10. Reynolds C. P., Maurer B. J., Kolesnik R. N. Ceramide synthesis and metabolism as a target for cancer therapy // *Cancer Lett.* — 2004. — Vol. 206. — P. 169-180.

11. Chang S., Kim K., Ro K., Lim Y. Sphingosine may have cytotoxic effects via apoptosis on the growth of keloid fibroblasts / S. Chang, K. Kim, K. Ro, Y. Lim // *J. Dermatol.* — 2004. — Vol. 31. — P. 1-5.

12. Padron J. Sphingolipids in anticancer therapy. // *Curr. Med. Chem.* — 2006. — Vol. 13. — P. 755-770.

13. Woodcock J. Sphingosine and ceramid signaling in apoptosis. // *IUBMB Life.* — 2006. — Vol. 58. — P. 462-466.

РЕЗЮМЕ. Целью работы было изучение эффектов сочетанного действия рентгеновского излучения и этопозиды на синтез проапоптозных сфинголипидов — церамида и сфингозина в карциноме Герена крыс.

Крысы с перевитой карциномой Герена подвергали локальному облучению в зоне роста опухоли на рентгеновской установке "РУМ-17". Облучение проводили двумя фракциями, поглощённая доза на фракцию 5 Гр, мощность дозы 0,965 Гр/мин, с интервалом между сеансами 24 ч. Этопозид вводили внутривентриально за 24 ч до первого сеанса облучения.

Установлено, что сочетанное действие рентгеновского излучения и этопозиды на животных с перевитой карциномой Герена усиливает синтез проапоптозных сфинголипидов — ЦМ и сфингозина в опухоли в 4,2 раза и в 2,4 — по сравнению с изолированным облучением. Показаны радиобиологические эффекты сочетанного действия облучения и этопозиды на синтез сфинголипидов. Полученные результаты позволяют предположить, что при сочетанном действии рентгеновского излучения и этопозиды может повышаться радиочувствительность опухоли за счёт синтеза индукторов апоптоза — ЦМ и сфингозина.

Ключевые слова: карцинома Герена, апоптоз, сфинголипиды, рентгеновское излучение, этопозид.

SUMMARY. The purpose of the investigation was studying of the influence of x-rays, etoposide and their simultaneous action on the apoptotic sphingolipids (ceramide, sphingosine) generation in Guerin's carcinoma.

The rats with inoculated Guerin's carcinoma were local x-ray irradiated in fractions (5 Gy per fraction) with 24-hour interval up to total dose of 10 Gy using RUM-17 unit. Etoposid was introduced intraperitoneally 24 hours before the first treatment.

It was determined that simultaneous action of etoposide and radiation on tumor of experimental rats leads to increasing level of the apoptotic sphingolipids in tumor (ceramide increased 4.2 times, sphingosin 2.4 times compared with only irradiation). It has been shown radiobiological effects of combined action of etoposide and radiation on sphingolipid synthesis. These results confirm that simultaneous action of x-rays and etoposide may be useful for the overcoming radioresistance due to sphingolipid synthesis.

Key words: carcinoma Guerin's, apoptosis, sphingolipids, x-ray, etoposide.