

ВПЛИВ ПОЄДНАНОЇ ДІЇ ІОНІЗУЮЧОГО ВИПРОМІНЮВАННЯ ТА ХІМІОПРЕПАРАТІВ НА ВМІСТ ПРОАПОПТОЗНОГО ЛІПІДУ ЦЕРАМІДУ В КАРЦИНОМІ ГЕРЕНА

Т. Сегеда*, Н. Мітряєва, Т. Бакай, Л. Гребіник

*Державна установа «Інститут медичної радіології
імені С.П. Григор'єва НАМН України»
вул. Пушкінська, 82, Харків 61024, Україна
e-mail: tatyana.segeda@mail.ru*

Досліджували вплив поєднаної дії різних видів іонізуючого випромінювання та хіміопрепаратів (таксотер, цисплатин) на вміст проапоптозних ліпідів цераміду і сфінгомеліну в карциномі Герена щурів. Встановлено, що поєднана дія опромінення та хіміопрепаратів є індуктором накопичення у тканині пухлини Герена активатора апоптозу ракових клітин цераміду, що може підвищувати радіочутливість. Показано, що поєднана дія опромінення й таксотеру підвищує рівень вмісту цераміду за рахунок активації синтезу *de novo*, тоді як цисплатин активує сфінгомеліновий шлях накопичення цераміду в пухлинних клітинах.

Ключові слова: іонізуюче випромінювання, хіміопрепарати, церамід, сфінгомелін, апоптоз.

Відомо, що однією з важливих причин радіорезистентності пухлинних клітин є порушення сигнальних шляхів, які ведуть до апоптозу. Показано, що критичним компонентом сигналіngu в опромінених клітинах є метаболіт сфінголіпідів – церамід (ЦМ), який відіграє центральну роль у сигнальній трансдукції, в регуляції диференціювання клітин, арешті клітинного циклу та бере участь в апоптозі [3, 6, 7]. Доведено, що генерація ЦМ є важливим етапом в індукції загибелі пухлинних клітин під дією іонізуючої радіації (ІР) [5, 10, 11]. Саме з порушенням у пухлинних клітинах різних ланцюгів обміну зі зниженням вмісту проапоптозного ліпідів ЦМ пов'язують явище радіорезистентності. Так, експериментальними дослідженнями показано, що клітинні лінії, резистентні до гамма-опромінення та доксирубіцину, і не продукують ЦМ [2, 8]. Одним із перспективних напрямів підвищення ефективності променевої терапії вважають використання радіомодифікаторів, дія яких спрямована на посилену продукцію ЦМ у клітинах пухлини. Протипухлинні препарати таксотер і цисплатин використовують як радіосенсибілізатори. Цитотоксичний ефект цих препаратів пов'язаний з активацією апоптозу через ЦМ-опосередковані шляхи. Однак механізми накопичення, обміну сфінголіпідів при поєднаній дії різних видів ІР та хіміопрепаратів у пухлині залишаються маловивченими. Метою даної роботи було вивчення поєднаного впливу рентгенівського або високоенергетичного фотонного випромінювання та хіміопрепаратів (таксотер, цисплатин) на вміст сфінголіпідів – ЦМ і сфінгомеліну (СФМ) у клітинах карциноми Герена щурів.

Матеріали та методи

Дослідження виконане з використанням піддослідних 81 щура-самиці лінії Вістар масою 160–180 г. Усі дослідження на тваринах виконували з дотриманням Міжнародних принципів Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментів та інших наукових цілей (Страсбург, 1985 р.) і Національних загальних

етичних принципів експериментів на тваринах (Україна, 2001 р.). Експеримент починали на 10–12 добу після перещеплення пухлини, коли розміри пухлинного вузла досягали у діаметрі 1,5–2,0 см.

У першій серії експерименту опромінення пухлини проводили на апараті РУМ-17 (рентгенівське випромінювання) за стандартних технічних умов: напруга – 190 кВ, сила струму – 10 мА, фільтри: 0,5 мм Cu плюс 1 мм Al, коефіцієнт розподілу поглинутої дози у повітрі – 0,981 Гр/хв, фокусна відстань 30 см. Опромінювали фракційно при поглинутій дозі на фракцію 5 Гр, час опромінення – 4 хв 39 с, з інтервалом між сеансами 24 год, сумарна поглинута доза на зону росту пухлини становила 10 Гр. У другій серії експерименту опромінення пухлини проводили на лінійному прискорювачі Clinac 600 C (високоенергетичне фотонне випромінювання). Clinac 600 C – енергія фотонів 5 МеВ, потужність дози 4 Гр/хв, розмір поля 5×5 см², глибина 1 см. Розрахункова кількість моніторних одиниць для опромінення пухлини Герена в дозі 5 Гр дорівнювала 515. Опромінювали двома фракціями по 5 Гр, з інтервалом між сеансами 24 год. Хіміопрепарати вводили внутрічеревинно за 24 год до першого сеансу опромінення в дозах: таксотер («Рор Пуленок Рорер») – 8 мг/кг маси тіла, цисплатин («Эбеве») 6,0 мг/кг маси тіла. Знеживлення тварин здійснювали через 24 год після опромінення або введення хіміопрепарату.

Екстракцію ліпідів з гомогенату тканини проводили за методом Фолча [4]. ЦМ і СФМ розділяли за допомогою хроматографії в тонкому шарі силікагелю на комерційних пластинках Sorbfil (АО «Сорбполимер», Россия). Екстракти ліпідів, які застосовували для аналізу сфінголіпідів, випарювали у вакуумі й інкубували 60 хв при 37°C у середовищі: хлороформ-метанол (1:1, v/v), у яке додавали NaOH (0,1 моль) для гідролізу ацилгліцеринів. Ліпіди знову екстрагували і використовували для розподілу на класи (СФМ і ЦМ) у системі розчинників: хлороформ-етилацетат-ізопропіловий спирт-метанол – 0,25% KCl (25:25:25:10:9). Ліпіди (СФМ, ЦМ) проявляли в парах йоду, порівнюючи зі стандартами. Для ідентифікації ліпідів використовували стандарти ЦМ і СФМ (Sigma). Білок визначали за методом Лоурі [8].

Статистичний аналіз даних проводили за допомогою статистичних програм для ПК «Statistica, version 5» при використанні непараметричних методів для малих вибірок і критерію Вілкоксона-Манна-Вітні.

Результати і їхнє обговорення

Проведені дослідження показали, що у щурів із перещепленою карциномою Герена, під впливом як рентгенівського, так і високоенергетичного фотонного опромінення достовірно не змінюється вміст ЦМ у пухлинній тканині, порівняно з контрольною групою (див. таблицю). Відсутність активації накопичення ЦМ у пухлині щурів при опроміненні може бути однією з причин радіорезистентності карциноми Герена. Оскільки пухлина резистентна до дії вибраних режимів фракціонованого опромінення, вона може бути використана як модель для вивчення механізмів впливу радіосенсибілізації протипухлинними препаратами на індукцію накопичення проапоптозного ліпиду – ЦМ.

Введення піддослідним тваринам таксотеру або цисплатину або їхнього поєднання з дією ІР супроводжувалося підвищенням у тканині пухлини вмісту ЦМ порівняно з контролем. Зокрема, під впливом таксотеру вміст ЦМ у пухлинній тканині підвищувався в 2,9, а під впливом цисплатину – в 2,3 рази. Поєднана дія рентгенівського опромінення й таксотеру або цисплатину супроводжувалося підвищенням вмісту в пухлині проапоптозного ліпиду ЦМ в 5,6 і в 4,2 рази відповідно. За умов поєднаної дії високоенергетичного фотонного опромінення та хіміопрепаратів вміст ЦМ у пухлинній тканині також підвищувався в 6,3 рази при дії таксотеру і в 4,9 рази – при дії цисплатину. Показано, що за умов

поєднаної дії опромінення та хіміопрепаратів зростає рівень вмісту ЦМ порівняно з опроміненням, що здійснювалося окремо (див. таблицю). Відомо, що під впливом іонізуючого випромінювання вміст ЦМ може підвищуватися в пухлинних клітинах двома шляхами: активацією ферменту сфінгомелінази, і, таким чином, індукцією перетворення СФМ в ЦМ або посиленням синтезу ліпідів *de novo* [10, 11].

Вплив рентгенівського й високоенергетичного фотонного опромінення та хіміопрепаратів на вміст кераміду і сфінгомеліну в карциномі Герена, нмоль/мг білка, ($\bar{X} \pm S\bar{x}$)

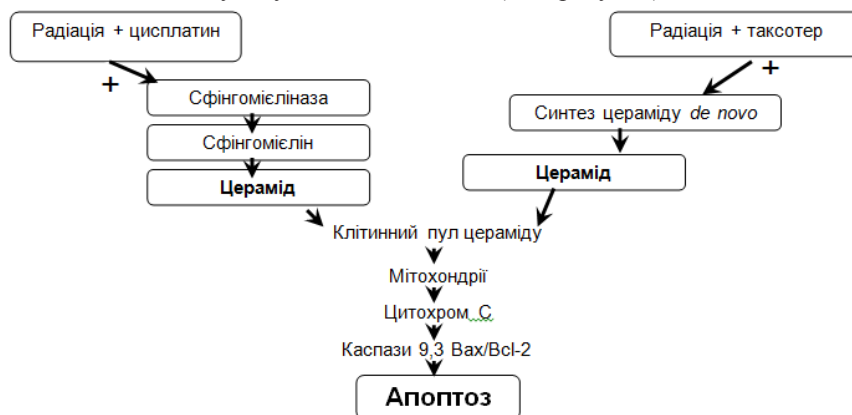
| Група піддослідних тварин | n | Церамід | Сфінгомелінін |
|--|---|---------------|---------------|
| Контроль (пухлина) | 9 | 3,24±0,31 | 44,11±3,05 |
| Опромінення (РУМ) | 9 | 4,28±0,87 | 34,80±3,84 |
| Опромінення (Clinac 600 С) | 9 | 4,48±0,92 | 31,63±2,96 |
| Таксотер | 9 | 9,56±1,12* | 41,13±3,09 |
| Цисплатин | 9 | 8,29±1,41* | 25,22±1,92* |
| Опромінення (РУМ) + таксотер | 9 | 18,23±2,71*/# | 42,74±4,37 |
| Опромінення (РУМ) + цисплатин | 9 | 13,47±2,72*/# | 18,06±2,64*/# |
| Опромінення (Clinac 600 С) + таксотер | 9 | 20,32±2,61*/# | 42,43±3,84 |
| Опромінення (Clinac 600 С) + цисплатин | 9 | 15,79±3,38*/# | 17,41±2,53*/# |

Примітка. * – вірогідність різниці щодо контрольної групи, $P < 0,05$; # – вірогідність різниці щодо опромінення, $P < 0,05$.

Для вивчення механізмів активації накопичення ЦМ у пухлині досліджували вплив опромінення та хіміопрепаратів на зміну вмісту СФМ у клітинах, який, як було показано вище, є субстратом сфінгомелінази, що каталізує процес перетворення СФМ в ЦМ. Як видно з представлених у таблиці даних, при введенні таксотеру або при його поєднанні з дією рентгенівського чи високоенергетичного фотонного випромінювань не спостерігалось змін вмісту СФМ порівняно з контролем. Результати дають змогу припустити, що накопичення ЦМ, індуковане таксотером, не пов'язане з активацією сфінгомеліназ і перетворенням СФМ у ЦМ. Враховуючи, що таксотер не змінює вміст СФМ – субстрату сфінгомелінази у тканині пухлини, можна виключити активацію цього ферменту в даних умовах досліджу. Водночас доведено, що таксотер активує основний фермент синтезу ЦМ *de novo* – серинпальмітоїлтрансферазу і, таким чином, посилює синтез ліпиду та підвищує його вміст у пухлинних клітинах [12]. З'ясування цих питань присвячені інші наші дослідження.

При використанні цисплатину або його поєднаної дії з рентгенівським і високоенергетичним фотонним випромінюванням встановлено, що підвищення вмісту ЦМ відбувається на фоні зниження рівня СФМ у пухлині Герена. Зокрема, при введенні цисплатину вміст СФМ знижується в 1,7 разу, при поєднаній дії рентгенівського або високоенергетичного фотонного випромінювання та цисплатину – в 2,4 та в 2,5 разу відповідно. Це свідчить про те, що генерація ЦМ здійснюється шляхом деградації СФМ. У зв'язку з цим можна припустити, що таксотер і цисплатин шляхом активації різними механізмами синтезу проапоптозного ліпиду ЦМ, а саме: таксотер індукує зростання вмісту ЦМ у пухлині переважно шляхом активації його синтезу *de novo*, тоді як цисплатин стимулює утворення ЦМ за рахунок ферментативного гідролізу СФМ сфінгомеліназою, при опроміненні підвищують радіочутливість карциноми Герена. На користь такого припущення свідчать дані досліджень, проведених на клітинах раку легень, щодо суттєвого посилення ефекту ІР шляхом активації апоптозу пухлинних клітин при введенні екзогенного ЦМ [1]. Проте поєднана дія рентгенівського або високоенергетичного фотонного випромінювання та протипухлинних препаратів (таксотер і цисплатин) є потужним активатором накопичення у тканині пухлини відомого індуктора апоптозу ракових клітин – ЦМ.

Зважаючи на отримані результати проведених досліджень, а також на дані літератури, пропонуємо схему поєднаного впливу опромінення та хіміопрепаратів на індукцію ЦМ-опосередкованого апоптозу в пухлинних клітинах (див. рисунок)



Вплив поєднаної дії опромінення та хіміопрепаратів на вміст цераміду й індукцію церамід-опосередкованого апоптозу пухлинних клітин.

Отже, в роботі проведені дослідження впливу рентгенівського та високоенергетичного фотонного опромінення, хіміопрепаратів таксотеру і цисплатину та їх поєднаної дії на вміст ЦМ і СФМ у тканині пухлини Герена. Виявлена резистентність тканини карциноми до дії застосованих при цьому режимів опромінення. Доведено, що поєднана дія іонізуючого випромінювання та протипухлинних препаратів є індуктором накопичення проапоптозного ліпиду ЦМ у карциномі Герена і здатна посилювати радіочутливість пухлини. Поєднана дія опромінення й таксотеру підвищує вміст ЦМ за рахунок активації синтезу *de novo*, тоді як цисплатин активує сфінгомієліновий шлях накопичення ЦМ у пухлинних клітинах.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Bartke N., Hannun Y. A. Bioactive sphingolipids: metabolism and function // *J. Lipid Research*. 2009. Vol. 50. P. 591–596.
2. Bionda C., Hadchity E., Alphonse G. et al. Radioresistance of human carcinoma cells is correlated to a defect in raft membrane clustering // *Free Radic. Biol. Med.* 2007. Vol. 43. P. 681–694.
3. Carpinteiro A., Dumitru C., Schenck M., Gulbins E. Ceramide-induced cell death in malignant cells // *Cancer Letters*. 2008. Vol. 264. N 1. P. 1–10.
4. Folch J., Lees M., Stanley G. A simple method for the isolation and purification of total lipid from animal tissues // *J. Biol. Chem.* 1957. Vol. 226. P. 497-509.
5. Gulbins E., P. Li. Physiological and pathophysiological aspects of ceramide // *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2006. Vol. 290. P. 11-26.
6. Hannun Y. A., Obeid L. M. Principles of bioactive lipid signaling: Lessons from sphingolipids // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2008. Vol. 9. N 2. P. 139–150.
7. Kolesnick R., Fuks Z. Radiation and ceramide-induced apoptosis // *Oncogene*. 2003. Vol. 22. P. 5897–5906.
8. Lowry O., Rosebrough N., Farr A. Protein measurement with the folin phenol reagent // *Ibid.* 1951. Vol. 193. P. 265-275.

9. *Medler T., Petrusca D., Lee P.* et al. Apoptotic sphingolipid signaling by ceramides in lung endothelial cells // *Am. J. Res. Cell Mol. Biol.* 2008. Vol. 38. N 6. P. 639–646.
10. *Ogretmen B., Hannum Y. A.* Biological active sphingolipid in cancer pathogenesis treatment // *Nat. Rev. Cancer.* 2004. Vol. 4. P. 604–616.
11. *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.
12. *Swanton C., Merani M.* Regulators of mitotic arrest and ceramide metabolism are determinants of sensitivity to paclitaxel and other chemotherapy eutic drugs // *Cancer Cell.* 2007. Vol. 7. N 10. P. 498–512.

Стаття: надійшла до редакції 13.07.12

доопрацьована 30.10.12

прийнята до друку 31.10.12

INFLUENCE OF IONIZING RADIATION AND CHEMOTHERAPEUTIC DRUGS ON PROAPOPTOTIC CERAMIDE LEVEL IN GUERIN'S CARCINOMA

T. Segeda, N. Mitryaeva, T. Bakai, I. Grebenik

*State Institution "S.P. Grigoriev Medical Radiology Institute
Academy of Medical Science of Ukraine"
82, Pushkinska St., Kharkiv 61024, Ukraine
e-mail: tatyana.segeda@mail.ru*

It was investigated the influence of action of different kinds of radiation and chemotherapeutic drugs (taxothere and cisplatin) on the proapoptotic lipids (ceramide and sphingomyeline) in Guerin's carcinoma of rats. It was established that combined action of irradiation and chemotherapeutic drugs on tumor of rats leads to accumulation of ceramide, which produces apoptosis and enhances the radiation sensitivity. It has been shown that simultaneous action of irradiation and taxothere initiates the ceramide generation by de novo synthesis whereas cisplatin activates ceramide accumulation via enzymatic hydrolysis of sphingomyelyn.

Keywords: ionizing radiation, chemotherapeutic drags, ceramide, sphingomyeline, apoptosis.

ВЛИЯНИЕ СОЧЕТАННОГО ДЕЙСТВИЯ ИОНИЗИРУЮЩЕЙ РАДИАЦИИ И ХИМИОПРЕПАРАТОВ НА СОДЕРЖАНИЕ ПРОАПОПТОЗНОГО ЛИПИДА ЦЕРАМИДА В КАРЦИНОМЕ ГЕРЕНА

T. Segeda*, N. Mitryaeva, T. Bakai, I. Grebenik

*Государственное учреждение «Институт медицинской радиологии имени
С.П. Григорьева АМН Украины»
ул. Пушкинская, 82, Харьков 61024, Украина
e-mail: tatyana.segeda@mail.ru*

Изучено влияние сочетанного действия разных видов ионизирующего излучения и химиопрепаратов (таксотер, цисплатин) на содержание проапоптотических

липидов (церамид, сфингомиелин) в карциноме Герена крыс. Установлено, що сочетанное действие облучения и химиопрепаратов является индуктором накопления в ткани опухоли Герена активатора апоптоза раковых клеток – церамида, повышающего радиочувствительность. Показано, что сочетанное действие облучения и таксотера увеличивает содержание церамида за счёт активации синтеза *de novo*, тогда как цисплатин активирует сфингомиелиновый путь накопления церамида в опухолевых клетках.

Ключевые слова: ионизирующая радиация, химиопрепараты, церамид, сфингомиелин, апоптоз.