

Т. В. Сегеда*, Н. А. Мітряєва, Т. С. Бакай,
Л. В. Гребінник, Н. О. Бабенко

ДУ “інститут медичної радіології ім. С. П. Григор’єва НАМН України”,
вул. Пушкінська, 82, м. Харків, 61024

**ЕФЕКТИ ПОЄДНАНОЇ ДІЇ
ВИСОКОЕНЕРГЕТИЧНОГО ФОТОННОГО
ВИПРОМІНЕННЯ ТА ЕТОПОЗИДУ НА СИНТЕЗ
ПРОАПОПТОЗНИХ СФІНГОЛІПІДІВ
У КАРЦИНОМІ ГЕРЕНА**

Вивчали поєднану дію високoenергетичного фотонного випромінення та етопозиду на синтез сфінголіпідів (цераміду та сфінгозину), які є індукторами апоптозу, в карциномі Герена. Опромінення пухлини проводили на лінійному прискорювачі Clinac 600 фракціоновано по 5 Гр двома фракціями з інтервалом між сеансами 24 год, етопозид вводили внутрішньоочеревинно за 24 год до першого сеансу опромінення в дозі 8 мг/кг. Встановлено, що при поєднаній дії опромінення та етопозиду в пухлині Герена вірогідно підвищувався синтез проапоптоznих сфінголіпідів (цераміду на 180%, а сфінгозину — на 143%) порівняно з інтактним контролем. Вперше встановлені ефекти поєднаної дії високoenергетичного фотонного випромінювання і етопозиду, які були спрямовані на потенціювання при синтезі цераміду та синергізм при утворенні сфінгозину. Отримані результати свідчать про можливості застосування радіомодифікації для індукції церамідного шляху апоптозу і відкривають перспективу пошуку нових шляхів керування променовою реакцією пухлини.

Ключові слова: високoenергетичне фотонне випромінення, етопозид, церамід, сфінгозин, апоптоз, карцинома Герена.

Загибель пухлинних клітин шляхом апоптозу є одним з механізмів терапевтичної дії іонізуючої радіації. Однак цей механізм не завжди ефективний при променевій терапії злоякісних пухлин [1]. Доведено, що однією з важливих причин радіорезистентності клітин пухлини є порушення сигнальних шляхів, які ведуть до апоптозу. Відомо, що

* Сегеда Тетяна Валеріївна, e-mail: tatyana.segeda@mail.ru

© Сегеда Т. В., Мітряєва Н. А., Бакай Т. С., Гребінник Л. В., Бабенко Н. О., 2012

критичним компонентом сигналінгу 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 [2–4]. Зважаючи на те, що порушення саме в сигнальній системі церамідного шляху апоптозу можуть бути причиною радіорезистентності пухлин, не викликає сумнівів актуальність досліджень в цій галузі. Одним з перспективних напрямків підвищення ефективності променевої терапії вважають використання радіомодифікаторів, дія яких направлена на індукцію проапоптозних сфінголіпідів (ЦМ і сфінгозину) в клітинах пухлини. До таких радіомодифікаторів належить протипухлинний препарат — етопозид [5, 6]. Однак механізми накопичення, обміну сфінголіпідів при поєднаній дії різних джерел випромінення та хемопрепаратів залишаються невизначеними.

Метою даного дослідження було вивчення впливу поєднаної дії високоенергетичного фотонного випромінення та етопозиду на синтез проапоптозних ліпідів — ЦМ та сфінгозину у карциномі Герена щурів.

Матеріал та методи дослідження

Експеримент було проведено на щурах-самицях лінії Вістар масою 160–180 г. Всі дослідження на тваринах виконували з дотриманням Міжнародних принципів Європейської конвенції про захист хребетних тварин, яких використовують 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), штам якої було одержано з Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р. Е. Кавецького НАН України. Експеримент починали на 10–12-ту добу після перещеплення пухлини, коли розміри пухлинного вузла досягали в діаметрі 1,5–2,0 см.

Тварин розподіляли методом випадкового добору на такі групи: 1) інтактний контроль; 2) етопозид; 3) опромінення; 4) опромінення + етопозид. Кожна експериментальна група складалася з 9 тварин. Коливання середнього об'єму пухлини на момент початку експерименту не перевищувало 10%.

Опромінення пухлини проводили на лінійному прискорювачі Clinac 600 С (високоенергетичне фотонне випромінення), за технічних умов: енергія фотонів 5 MeV, потужність дози 4 Гр/хв, розмір поля $5 \times 5 \text{ см}^2$, глибина 1 см. Розрахункова кількість моніторних одиниць для опро-

мінення пухлини Герена в дозі 5 Гр дорівнювала 515. Опромінювали двома фракціями по 5 Гр, з інтервалом між сеансами 24 год. Сумарна поглинута доза на зону росту пухлини складала 10 Гр. Хемопрепарат етопозид “Ебеве” вводили внутрішньоочеревинно за 24 год до першого сеансу опромінення у дозі 8 мг/кг маси тіла. Знеживлення тварин здійснювали під ефірним наркозом через 24 год після останнього сеансу опромінення в 3-й і 4-й групах або після введення хемопрепарата в 2-й групі.

В ролі попередника синтезу ліпідів використовували [¹⁴C]-пальмітинову кислоту (2,07 ГБк/ммоль; Amersham, YE Healthcare, UK). Шматочки пухлинної тканини інкубували в буфері Кребс-Хенслейт, в який додавали [¹⁴C]-пальмітинову кислоту ($3,7 \cdot 10^5$ Бк/мл), 25 ммоль НЕРЕС, пеніцилін (61 мг/л), стрептоміцин (100 мг/л), 10% ембріональну сироватку бика, протягом 120 хв при 37°C і 7,5 рН.

Екстракцію ліпідів з гомогенату тканини проводили за методом Фолча [7]. Церамід і сфінгозин розділяли за допомогою хроматографії в тонкому шарі силікагелю на комерційних пластинках Sorbfil (АО “Сорблімер”, Россия). Екстракти ліпідів, які використовували для аналізу сфінголіпідів, випарювали у вакуумі та інкубували 60 хв при 37°C в середовищі хлороформ-метанол (1:1, v/v), в яке додавали NaOH (0,1 моль) для гідролізу ацилгліциринів. Ліпіди знову екстрагували 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) [8]. Церамід 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 і сфінгозину (Sigma). Силікагель з площині 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, version 5” при використанні параметричних та непараметричних методів для малих вибірок та критерію Вілкоксона-Манна-Уйтні.

Результати та їх обговорення. Аналіз результатів проведених досліджень показав, що введення шурам-пухлиноносіям етопозиду стимулювало посилення в карциномі Герена синтезу ЦМ на 93,4%, сфінгозину на 24% (рис. 1) та зниження синтезу проапоптозного ліпіду ЦМ на 18,3% при окремій дії високоенергетичного фотонного випромінення в

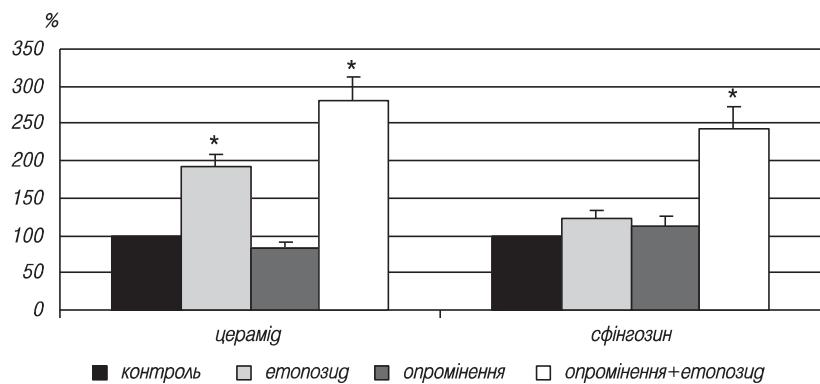


Рис. 1. Вплив високоенергетичного фотонного випромінення та етопозиду на синтез цераміду і сфінгозину в карциномі Герена, у відсотках від інтактного контролю. Примітка: * — вірогідно відносно контролю, $p < 0,05$

порівнянні з інтактним контролем, що може бути однією з причин радіорезистентності пухлини Герена за умов проведеного експерименту.

При аналізі результатів вивчення поєднаної дії опромінення та етопозиду було визначено підвищення синтезу церамідів на 180%, синтезу сфінгозину на 143% порівняно з інтактним 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 є проапоптозним ліпідом. Одним з доказів цього є дані літератури про блокування клітинного циклу, пригнічення проліферації клітин і посилення апоптозу при введенні сфінгозину в середовище культивування різних клітин [9–11].

Таким чином, можна припустити, що етопозид є потужним індуктором експресії проапоптозних сфінголіпідів, як в 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.

Для оцінки радіомодифікуючих ефектів використовували коефіцієнт взаємодії (Кв), який визначали за відношенням спостережуваного ефекту при поєднаній дії до суми ефектів роздільних взаємодій (опромінення та етопозид) [12]. Ефект радіосенсиблізуvalnoї дії етопозиду на синтез ЦМ мав характер потенціювання, тобто дія опромінення, яке

само по собі спостережуваного ефекту не викликало, посилювалась впливом етопозиду ($K_B=1,02$). Ефект дії на утворення сфінгозину за умов хеморадіомодифікації був синергічним. Проявом синергічного характеру взаємодії є перевищення біологічних наслідків поєднаної дії радіації і нерадіаційного фактору в порівнянні з сумою ефектів їх окремої дії. ($K_B=1,02$). В результаті поєднаної дії опромінення та етопозиду синтез ЦМ в пухлині зростав в 3,4 раза, синтез сфінгозину зростав в 2,1 раза порівняно з окремим опроміненням (рис. 2).

Отже, з отриманих даних видно, що поєднана дія опромінення та ето-позиду сприяє підвищенню синтезу сигнальних сфінголіпідів у карциномі Герена, які є індукторами ліпоапоптозу. Радіомодифікація етопозидом полягала в посиленні синтезу проапоптозних ліпідів у клітинах пухлини Герена — критичних компонентів радіаційно-індукованого апоптозу. Таким чином, отримані результати свідчать про можливість застосування хеморадіомодифікації для індукції церамідного апоптозу та відкриває нові шляхи керування променевими реакціями пухлини, що ймовірно може підвищити ефективність терапії злойкісних новоутворень.

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, у другому — за рахунок не тільки збільшення синтезу ЦМ, але й утворення сфінгозину.

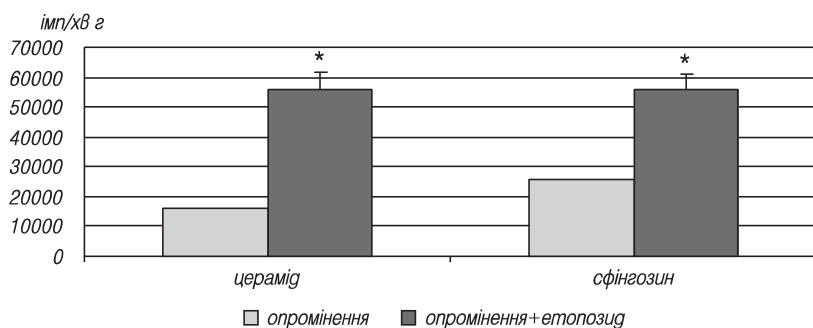


Рис. 2. Синтез сфінголіпідів у карциномі Герена за умов поєднаної дії високоенергетичного фотонного випромінення та етопозиду, імпульси на хвилину на грам тканини (імп/хв·г)

Примітка: * Р — опромінення — опромінення+етопозид < 0,05

2. Встановлено, що при поєднаній дії високоенергетичного фотонного випромінення і етопозиду в пухлині Герена шурів-пухлиноносій достовірно підвищувався синтез проапоптозних сфінголіпідів (ЦМ та сфінгозину).

3. За підвищенням синтезу проапоптозних сфінголіпідів встановлена виражена закономірність посилення поєднаних ефектів в порівнянні з ефектами окремо діючих факторів (опромінення та етопозид). Ефект поєднаної дії високоенергетичного фотонного випромінення та етопозиду мав характер потенціювання при синтезі ЦМ та синергізму — при утворенні сфінгозину.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Meyn R. E. The role of apoptosis in radiation oncology / R. E. Meyn, L. Milas, K. K. Ang // Int. J. Radiat. Biol. — 2009. — Vol. 85, № 2. — P. 107–115.
2. Hannun Y. A. Principles of bioactive lipid signaling: Lessons from sphingolipids / Y. A. Hannun, L. M. Obcid // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. — 2008. — Vol. 9, № 2. — P. 139–150.
3. Ceramide-induced cell death in malignant cells / A. Carpinteiro, C. Dumitru, M. Schenck, E. Gulbins // Cancer Lett. — 2008. — Vol. 264, № 1. — P. 1–10.
4. Kolesnick R. Radiation and ceramide-induced apoptosis / R. Kolesnick, Z. Fuks // Oncogene. — 2003. — Vol. 22. — P. 5897–5906.
5. Sequential caspase-2 and caspase-8 activation upstream of mitochondria during ceramide and Etoposide — induced apoptosis / C. F. Lin, C. L. Chen, W. T. Changet [et al.] // J. Biol. Chem. — 2004. — Vol. 279, № 39. — P. 40755–40761.
6. Ogretmen B. Sphingolipids in cancer: regulation of pathogenesis and therapy / B. Ogretmen // FEBS Lett. — 2006. — Vol. 580. — P. 5467–5476.
7. Folch J. A simple method for the isolation and purification of total lipid from animal tissues / J. Folch, M. Lees, G. Stanley // J. Biol. Chem. — 1957. — Vol. 226. — P. 497–509.
8. De novo ceramide accumulation due to inhibition of its conversion to complex sphingolipids in apoptotic photosensitized cells / V. Dolgachev, M. Farooqui, O. Kulaeva [et al.] // J. Biol. Chem. — 2004. — Vol. 279. — P. 23238–23249.
9. Sphingosine may have cytotoxic effects via apoptosis on the growths of keloid fibroblasts / S. Chang, K. Kim, K. Ro, Y. Lim // J. Dermatol. — 2004. — Vol. 31. — P. 1–5.
10. Padron J. Sphingolipids in anticancer therapy / J. Padron // Curr. Med. Chem. — 2006. — Vol. 13. — P. 755–770.
11. Woodcock J. Sphingosine and ceramid signaling in apoptosis / J. Woodcock // IUBMB Life. — 2006. — Vol. 58. — P. 462–466.
12. Маленченко А. Ф. Зависимости доза-эффект и время-эффект в процессе опухолеобразования при сочетанном действии ионизирующего излучения и химического канцерогена / А. Ф. Маленченко, С. Н. Сушко, Т. С. Кузьмина // Радиац. бiol. Радиоэкол. — 2001. — Т. 41, № 4. — С. 389–394.

Стаття надійшла до редакції 22.06.2012.

T. V. Segeda, N. A. Mitryaeva, T. S. Bakai, I. V. Grebenik, N. A. Babenko
ГУ “Інститут медичинської радіології ім. С.П. Григор’єва НАМН України”,
ул. Пушкінська, 82, г. Харків, 61024

**ЭФФЕКТЫ СОЧЕТАНОГО ДЕЙСТВИЯ ВЫСОКОЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО
ФОТОННОГО ИЗЛУЧЕНИЯ И ЭТОПОЗИДА НА СИНТЕЗ
ПРОАПОТОЗНЫХ СФИНГОЛИПИДОВ В КАРЦИНОМЕ ГЕРЕНА**

Изучали сочетанное действие высокоенергетического фотонного излучения и этопозида на синтез сфинголипидов (церамида и сфингозина), которые являются индукторами апоптоза, в карциноме Герена. Облучение опухоли проводили на линейном ускорителе Clinac 600 фракционированно по 5 Гр двумя фракциями с интервалом между сеансами 24 ч, этопозид вводили внутрибрюшинно за 24 ч до первого сеанса облучения в дозе 8 мг/кг. Установлено, что при сочетанном действии облучения и этопозида в опухоли Герена достоверно повышался синтез проапоптозных сфинголипидов (церамид на 180%, а сфингозина на 143%) по сравнению с интактным контролем. Впервые установлены эффекты сочетанного действия высокоенергетического фотонного излучения и этопозида, которые носили направленность потенцирования при синтезе церамида и синергизма при образовании сфингозина. Полученные результаты свидетельствуют о возможности применения радиомодификации для индукции церамидного пути апоптоза и открывают перспективу поиска новых путей управления лучевой реакцией опухоли.

Ключевые слова: высокоенергетическое фотонное излучение, этопозид, церамид, сфингозин, апоптоз, карцинома Герена.

T. V. Segeda, N. A. Mitryaeva, T. S. Bakai, I. V. Grebenik, N. A. Babenko
State Institution “S. P. Grigoriev Medical Radiology Institute,
Academy of Medical Science of Ukraine”,
Pushkinska str., 82, Kharkiv, 61024, Ukraine

**COMBINED EFFECT OF HIGH-ENERGY FOTON RADIATION
AND ETOPOSIDE ON PROAPOPTOSIS SPHINGOLIPIDE SYNTHESIS
IN GUERIN'S CARCINOMA**

Combined effect of high-energy photon radiation and etoposide on sphingolipide synthesis (ceramide and sphingosin), apoptosis inducers, in Guerin's carcinoma was studied. Tumor was irradiated at Clinac 600, linear accelerator, at two 5 Gr fractions with 24 hours intervals between sessions; etoposide was introduced at the dose of 8 mg/kg abdominally 24 hours before the first irradiation session. It was found that under combined action of irradiation and etoposide in Guerin's tumor, proapoptosis sphingolipide synthesis was significantly increased (ceramide by 180 %, sphingosin by 143 %) as compared to intact control. The combined effects of high-energy photon radiation and etoposide of potentiation in ceramide synthesis and synergy in sphingosine formation direction were found for the first time. Obtained results show the possibility of radiation modification usage for induction of ceramide way apoptosis and open prospects of searching for new ways of tumor radiation response control.

Key words: high-energy photon radiation, etoposide, ceramide, sphingosin, apoptosis, Guerin's carcinoma.