

Н.А.Мітряєва,  
Л.В.Гребіник,  
Н.Є.Узленкова,  
Н.О.Бабенко,  
В.А.Гусакова,  
С.М. Пушкар

Інститут медичної радіології  
ім. С.П. Григор'єва  
АМН України,  
м. Харків

## Вплив іонізуючого випромінювання та таксотеру на керамідний шлях активації апоптозу в пухлині Герена

Influence of ionizing radiation and Taxotere pathway ceramide pathway on apoptosis activation in Guerin's carcinoma

**Цель работы:** Изучение влияния ионизирующего излучения, таксола и комбинированного их действия на содержание в опухоли Герена сфинголипидов — керамида и сфингомиелина.

**Материалы и методы:** Экспериментальной моделью служили крысы-опухоленосители массой 160–180 г с подкожно перевитой карциномой Герена. Трансплантацию опухоли осуществляли путем введения под кожу 0,5 мл 20 % -ной суспензии клеток, полученных из опухолевой ткани. Эксперимент начинали на 10–12-е сутки после перевивки опухоли, когда размеры опухолевого узла достигали в диаметре 2,0–2,5 см. Локальное облучение зоны роста опухоли проводили фракционно при дозе на фракцию 5 Гр и интервале между сеансами 24 часа (суммарная доза на зону роста опухоли составляла 10 Гр) на аппарате РУМ-17. Таксотер вводили внутривентриально в дозе 5 мг/кг за 24 часа до облучения. Гомогенат ткани использовали для экстракции липидов по методу Фолча. Керамид и сфингомиелин разделяли с помощью хроматографии в тонком слое силикагеля Woelm (Germany). Для идентификации липидов применяли стандарты керамида и сфингомиелина (Sigma). Количественное определение липидов проводили по методу Марча и Венстейна. Белок определяли по Лоури. Для морфологической оценки влияния вышеуказанных факторов изучали микротомные срезы продольных и поперечных участков опухоли. Статистический анализ проводили, используя t-критерий Стьюдента.

**Результаты:** Установлено, что при локальном облучении крыс содержание в опухолевой ткани керамида и сфингомиелина, по сравнению с контрольной группой, не изменяется. Возможно, карцинома Герена устойчива к действию применяемой дозы облучения. Введение животным таксотера приводит к увеличению содержания керамида в опухоли. Совместное действие облучения и противоопухолевого препарата керамида на образование сопровождается усилением эффекта.

**Выводы:** В данной работе впервые исследовано влияние ионизирующего излучения и таксотера на содержание керамида и сфингомиелина в ткани карциномы Герена. Выявлена резистентность ткани карциномы к действию применяемого в работе режима облучения подопытных животных. В то же время применение таксотера в комбинации с действием облучения явилось мощным стимулятором накопления в ткани опухоли индуктора апоптоза опухолевых клеток — керамида.

**Ключевые слова:** карцинома Герена, керамид, сфингомиелин, таксол, ионизирующее излучение.

**Objective:** To study the influence of x-rays, taxol and their simultaneous action on the amount of sphingolipids (ceramide and sphingomyelin) in Guerin's carcinoma.

**Material and Methods:** The experimental model consisted of rats weighing 160-180 g with subcutaneously inoculated Guerin's carcinoma. The rats were transplanted 0.5 ml of 20% cell suspension from the tumor tissue. The experiment was started on day 10-12 after the inoculation when the size of the tumor was 2.0-2.5 cm. Local x-ray irradiation was delivered in fractions (5 Gy per fraction) with 24-hour intervals up to total dose of 10 Gy using RUM-17 unit. Taxotere was administered intraperitoneally at a dose of 5 mg/kg 24 hours before the exposure. Tissue homogenate was used for lipid extraction according to Folch. Ceramide and sphingomyelin were separated with chromatography in a thin layer of silicagel Woelm (Germany). Ceramide and sphingomyelin standards (Sigma) were used to identify the lipids. Quantitative lipid study was done according to March and Weinstein. Protein was isolated according to Lowry. Morphological evaluation was done using microtome longitudinal and transverse sections of the tumor. The statistical analysis was done using Student's t-test.

**Results:** It was established that local x-ray exposure did not change ceramide and sphingomyelin amount in the tumor tissue when compared with the controls. It is possible that Guerin's carcinoma is resistant to the used dose or irradiation. Taxotere administration increased ceramide amount in the tumor. Concomitant effect of irradiation and Taxotere on ceramide production increased the effect.

**Conclusion:** For the first time, influence of x-rays and Taxotere on ceramide and sphingomyelin amount in the tissue of Guerin's carcinoma was studied. Resistance of the carcinoma tissue to the used irradiation mode was revealed. Simultaneous administration of Taxotere and irradiation is a powerful stimulant of ceramide (tumor cell apoptosis inducer) accumulation in the tumor tissue.

**Key words:** Guerin's carcinoma, ceramide, sphingomyelin, taxol, x-ray exposure.

При обміні сфінголіпідів керамід (ЦМ) посідає у клітинах центральне місце [1]. Тут він може накопичуватися в результаті синтезу *de novo*, а також протягом активації різноманітних типів сфінгомієліназ і деградації сфінгомієліну (СФМ) або більш складних фосфоліпідів. Керамід — компонент не тільки мембранних структур клітин, але й ліпопротеїдів [2]. Унаслідок цього вміст ЦМ у клітинах може залежати від інтенсивності процесів утворення та транспорту ліпопротеїдів. Рівень

ЦМ у клітинах регулюється також у процесі його перетворення на глікозильовані види чи сфінгозин або керамід-1-фосфат [3–5]. Саме з порушенням у пухлинних клітинах різноманітних ланок обміну ЦМ пов'язують явище множинної лікарської резистентності [5]. Так, у клітинах карциноми грудної залози (ГЗ), резистентних до дії адриаміцину чи доксорубіцину, виникає інтенсивне перетворення ЦМ у глікоцерамід [4, 5]. Пригнічення в таких клітинах процесу перетворення ЦМ на глікоцерамід

за допомогою специфічних інгібіторів призводить до накопичення ЦМ у відповідь на дію різноманітних лікарських препаратів, що й призводить до загибелі клітин [6].

Цитотоксичний ефект низки протипухлинних препаратів пов'язаний із апоптозом клітин. На численних прикладах встановлено, що загибель клітин запобігає накопичуванню в них ЦМ. Так, етопозид, цисплатин та фактор некрозу пухлини  $\alpha$  індукують у клітинах гліоми щурів апоптоз, який асоціюється з накопиченням ЦМ унаслідок активації нейтральної сфінгомієлінази [7, 8]. Підвищення рівня ЦМ у клітинах МДА-МВ-468 гормонозалежної пухлини ГЗ у відповідь на дію таксолу є попередником апоптозу [9].

Встановлено, що йонізувальне випромінювання — потужний індуктор апоптозу багатьох ліній ракових клітин, і процес радіаційної дії як правило, відбувається перед накопиченням ЦМ [10]. Значно менше вивчено питання спільної дії хемопрепаратів і радіотерапії на рівень ЦМ у пухлинах. Практично відсутні відомості про вплив таксотеру на вміст ЦМ та СФМ у тканині карциноми Герена. З огляду на це метою дослідження стало вивчення впливу йонізувального випромінювання, таксотеру та їх спільної дії на вміст сфінголіпідів (ЦМ та СФМ) у пухлині Герена.

## Методика дослідження

Експериментальною моделлю служили щури-пухлинноносії масою 160–180 г, яким підшкірно перещеплювали карциному Герена.

Трансплантацію проводили шляхом введення під шкіру 0,5 мл 20 %-ної суспензії клітин, отриманих із пухлинної тканини. Експеримент починали на 10–12-ту добу після перещеплення пухлини, коли розміри пухлинного вузла досягали 2,0–2,5 см в діаметрі. Локальне опромінювання зони росту пухлини проводили на апараті РУМ-17 у стандартному режимі: сила струму ( $\tau$ ) — 15 мА, напруга (U) — 150 кВ, фільтри — 0,5 Сu, потужність дози — 0,47 Гр/хв. Коефіцієнт розподілу

доз в повітрі становив 0,97. Променеву дію проводили фракційно при дозі на фракцію 5 Гр та інтервалі між сеансами 24 години. Сумарна доза опромінення на зону росту пухлини становила 10 Гр. Таксотер «Рон-Пуленк Рорер» вводили внутріочеревинно в дозі 5 мг/кг за 24 год. до опромінювання. Протягом експерименту тварин поділили на групи таким чином: 1-ша група — інтактний контроль новоутвору, 2-га — його опромінювання, 3-тя — введення таксотеру, 4-та група — введення таксотеру з наступним фракціонованим опромінюванням пухлини. Тканину останньої гомогенізували в  $H_2O$  для повнішого руйнування клітин. Гомогенат використовували для екстракції ліпідів за методом Фолча [11]; ЦМ та СФМ розділяли за допомогою хроматографії в тонкому шарі силікагелю Wodm (Germani), використовуючи метод, описаний раніше [12].

Для ідентифікації ліпідів застосовували стандарти цераміду та СФМ (Sigma). Кількісне визначення ліпідів проводили за методом Марча та Венстейна [13] після попередньої екстракції ліпідів із силікагелю. Білок у гомогенаті тканини визначали методом Лоурі [14]. Для гістологічних досліджень матеріал фіксували у 10 %-вому розчині нейтрального формаліну, зневоднювали, заливали в парафін. Мікротомні зрізи обробляли уніфікованими методами. Для оцінки ступеня й особливостей зазначених вище впливів на неопластичні новоутвори досліджено мікротомні зрізи поздовжніх та поперечних ділянок пухлин. Протягом експерименту щурів умертвляли шляхом декапітації під ефірним наркозом з дотриманням правил етаназії. Статистичний аналіз проводили за критерієм Стьюдента.

## Результати та їх обговорення

Проведеними дослідженнями встановлено, що при локальному опромінюванні піддослідних щурів у пухлинній тканині не відбувається змін вмісту ЦМ та СФМ порівняно з контрольною групою тварин (табл. 1).

Введення піддослідним тваринам таксотеру або його поєднання з опромінюванням викликає значне збільшення у тканині пухлини вмісту ЦМ, зокрема в тканинах карциноми — у 3 рази. Поєднана дія йонізувального опромінювання та протипухлинного препарату також супроводжується посиленням їх ефекту на утворення ЦМ (збільшення у 3,6 разу).

За допомогою морфологічних досліджень визначили, що в 1-й (контрольній) групі щурів пухлини були мікроскопічно представлені

Таблиця 1

Вміст ЦМ і СФМ у тканині пухлини Герена, нмоль/мг білка  
The amount of ceramide and sphingomyelin in Guerin's carcinoma tissue (nmol/mg of protein)

Показник	Контроль	Опромінювання	Таксотер	Таксотер + опромінювання
ЦМ	3,10 ± 0,49	3,45 ± 1,05	10,2 ± 1,2	11,2 ± 2,1
% від контролю	100	111,3	329,0*	361,0*
СФМ	30,9 ± 6,5	35,8 ± 3,8	42,9 ± 5,8	37,5 ± 6,1
ЦМ, % від СФМ	10,0	10,4	23,8*	29,9*

Примітка. \* — контроль —  $p < 0,05$ ;  $n = 6$  — кількість тварин у кожній серії.

структурами, відповідними до аденокарциноми Герена. Волокниста сполучнотканинна капсула та дрібні тяжі стромальних структур оксифільно забарвлені, зі збільшеною кількістю фібробластичних клітин. Останні містили розширені подовжені ядра з великоглибчастим хроматином. Серед стромальних структур спостерігалася помірна кількість капілярів та артерійол, заповнених кров'ю. Паренхіматозні структури представлені шарами і тяжами яскраво-базофільних клітин з численними мітотичними атиповими фігурами (рис. 1).

У 3-й групі, де щури-пухлиноносії одержували таксотер, волокна капсули новоутворів були стоншені, компактні, забарвлені оксифільно, прилеглі до волокон ядра фібробластів — дрібні, гіперхромні. Місцями капсули містили округлі порожні розширення. Епітеліоподібні клітини фрагментовані групами по 5–10 клітин (рис. 2). Останні виражено зменшені. Їх цитоплазма округлена, великоглибчата, місцями з оксифільним відтінком забарвлення. Ядра виражено зменшені, хроматин щільно конденсований, базофільний, ядерна оболонка щільна, звивиста. У міжклітинних розширеннях місцями трапляються оксифільно забарвлені тяжі стромальних структур. Аналогічно зменшена кількість мітотичних фігур пухлинних клітин.

У 4-й групі досліджені морфологічні особливості пухлин у щурів, які одержували таксотер та локальне фракційне іонізувальне опромінювання на пухлину. Капсула відтворена поширеними, нерівномірно забарвленими, сполучнотканинними волокнами серед блідо-оксифільних гомогенних полів. На всьому їх протязі між сполучнотканинними волокнами спостерігалися незабарвлені простори різноманітної витягнутої форми (рис. 3). Прилеглі ядра гіперхромні, конденсовані. Гіперхромний ядерний хроматин конденсований, переважно фрагментований. Ядра камбіальних клітин конденсовані, місцями фрагментовані, утворюють невеликі ділянки «ядерного піску», капіляри заповнені клітинами крові з вираженим вмістом лейкоцитів.

На підставі морфологічного вивчення структур аденокарциноми Герена можна зробити висновок, що таксотер і локальне фракційне опромінювання справляли девіталізуювальну дію

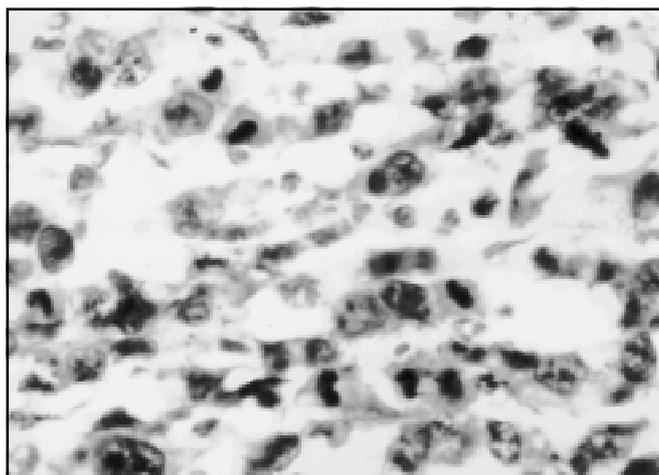


Рис. 1. Пухлинна тканина, контрольна група. Фігури мітозів у епітеліоподібних клітинах; гематоксилін-еозин;  $\times 2500$  (масляна імерсія)

Tumor tissue (the controls). Mitoses patterns in the epithelioid cells, hematoxylin-eosin;  $\times 2500$  (oil immersion)

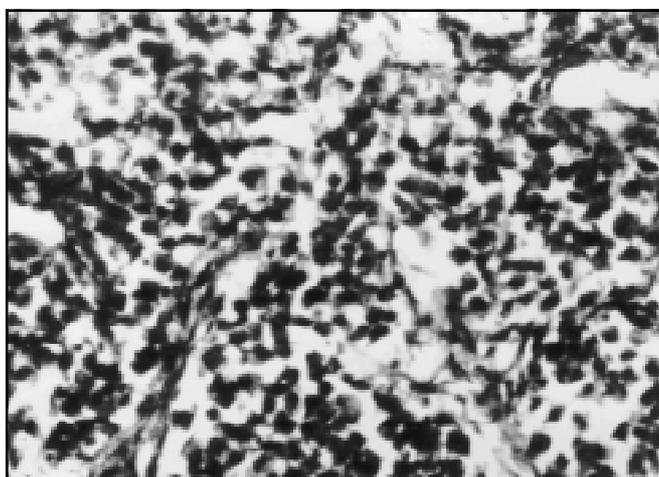


Рис. 2. Пухлинна тканина, 3-тя група, таксотер. Фрагментовані тяжі епітеліоподібних клітин; гематоксилін-еозин;  $\times 1000$

Tumor tissue, group 3, Taxotere. Fragments of epithelioid cell bands; hematoxylin-eosin;  $\times 1000$

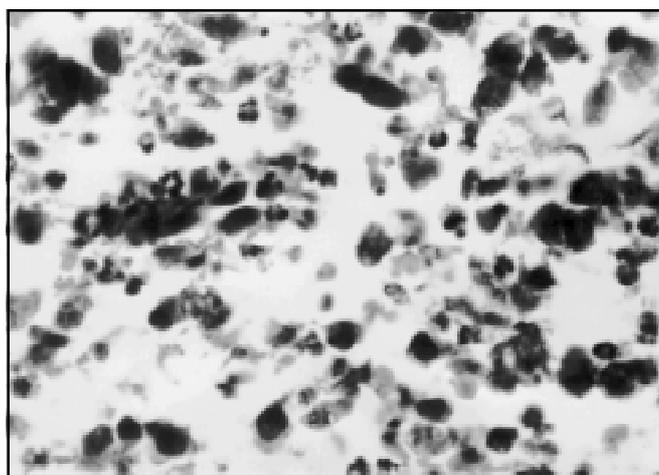


Рис. 3. Пухлинна тканина, 4-та група, таксотер + опромінювання. Фрагментовані ядра пухлинних тканин; гематоксилін-еозин;  $\times 2500$  (масляна імерсія)

Tumor tissue, group 4, Taxotere + irradiation. Fragmented nuclei in the tumor tissue; hematoxylin-eosin;  $\times 2500$  (oil immersion)

на пухлинні клітини. Таксотер сприяє порушенню клітинних контактів, скороченню й округленню цитоплазми, декомплексації хроматину ядер. Локальне фракційне опромінювання пухлин виражено посилювало ефект дії препаратів.

Отримані в цій роботі дані щодо істотного підвищення вмісту ЦМ у тканині пухлини Герена під дією таксотеру та його поєднання з опромінюванням добре узгоджуються з даними інших дослідників, які встановили значне збільшення продукції ЦМ та підвищення його маси в різних ракових клітинах людини під дією даного препарату [9].

Таким чином, можна припустити, що дія таксотеру на ракові клітини тварин і людини відносно накопичення в них ЦМ універсальна. Водночас, як видно з даних літератури [4, 5, 9], механізм, який лежить в основі даного процесу, неоднаковий у різних типах пухлинних тканин. Так, у клітинах гліоми щурів індукція накопичення ЦМ під дією таксотеру відбувається внаслідок деградації СФМ нейтральною сфінгомеліназою [7, 8]. Водночас у клітинах РГЗ людини таксотер сприяє збільшенню ЦМ унаслідок посилення його синтезу *de novo* [9]. У клітинах нейробластоми таксотер сприяє накопиченню ЦМ шляхом гальмування його наступного перетворення на глікосфінголіпіди [15].

Щоб з'ясувати питання участі СФМ упродовж часу утворення ЦМ у клітинах тканини карциноми Герена тварин, що отримували таксотер, у даній роботі вивчали вплив останнього на зміну маси СФМ у клітинах, який, як відомо, є субстратом сфінгомелінази. Встановлено, що в усіх вивчених групах тварин рівень СФМ значно не змінюється. Отже, отримані дані дозволяють припустити, що накопичення ЦМ, індуковане таксотером, не пов'язане з механізмом активації СФМ. Можливо, під дією даного препарату посилюється синтез цих СФМ або гальмування деградації та наступне перетворення ЦМ на інші сфінголіпіди. Питання щодо дії таксотеру на пухлину Герена, які виникли під час досліджень, вивчатимуть і далі.

Таким чином, у даній роботі вперше проведені дослідження впливу іонізуючого опромінювання й таксотеру на вміст ЦМ і СФМ у тканині карциноми Герена. Виявлено резистент-

ність тканини карциноми до дії застосовуваного в роботі режиму опромінювання піддослідних тварин. До того ж застосований протипухлинний препарат, поєднаний з дією опромінювання, став сильним індуктором накопичення у тканині пухлини відомого активатора апоптозу ракових клітин — ЦМ.

## ВИСНОВКИ

1. Локальне фракційне іонізуюче опромінювання пухлин виражено підсилює протипухлинний ефект таксотеру і проявляється в синергічному впливі на пухлинні структури.

2. Поєднана дія протипухлинних препаратів і локального фракційного іонізуючого опромінювання є індуктором накопичення у тканині пухлини активатора апоптозу ракових клітин — ЦМ.

## Література

1. Perry D.K., Hannun Y.A. // *Bioch. Bioph. Acta.* — 1998. — Vol. 1436. — P. 233–243.
2. Vesper H., Schmelz E.M., Nikolova-Karakashian M.N., Dillehay D.L. et al. // *J. Nutr.* — 1999. — Vol. 129. — P. 1239–1250.
3. Pyne S., Pyne N. // *Biochem. J.* — 2000. — Vol. 349. — P. 385–402.
4. Lucei A., Cho W.I., Han T.Y., Ginliano A.E. et al. // *Anticancer Res.* — 1998. — Vol. 18. — P. 475–780.
5. Lin Y.Y., Han T.Y., Giuliano A.E., Cabot M.C. // *FASEB J.* — 2001. — Vol. 15. — P. 719–730.
6. Mordak D.E., Rodriguez M.D., Goldenberg D.M., Lew W. et al. // *Int. J. Oncol.* — 2002. — Vol. 20. — P. 379–384.
7. Sawada M., Nakashima S., Banno Y., Yamakawa H. et al. // *Oncogene.* — 2000. — Vol. 19. — P. 3508–3520.
8. Noda S., Yoshimura S., Sawada M., Naganawa T. et al. // *Neurooncol.* — 2001. — Vol. 52. — P. 11–12.
9. Charles A.G., Han T.Y., Hansen N., Ginliano A.E. et al. // *Cancer Chemother. Pharmacol.* — 2001. — Vol. 47. — P. 444–450.
10. Peca L.A., Fuks Z., Kolesnick R. // *Biochem. Pharmacol.* — 1997. — Vol. 53. — P. 615–621.
11. Folch J., Lees M., Stanley G.H.S. // *J. Biochem.* — 1957. — Vol. 226. — P. 497–509.
12. Бабенко Н.А., Намарова Ю.А. // *Биохим.* 1999. — Т. 2. — С. 130–132.
13. March J.B., Weinstein D.B. // *J. Lipid Res.* — 1966. — Vol. 7. — P. 574–580.
14. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.E. et al. // *J. Biol. Chem.* — 1951. — Vol. 193. — P. 265–275.
15. Sietsma H., Veldman R.J., Kolk D., Ansema Bet al. // *Clin. Cancer. Res.* — 2000. — Vol. 6. — P. 942–948.

Надходження до редакції 29.10.2004.

Прийнято 01.02.2005.

Адреса для листування:  
Мітряєва Наталія Андріївна,  
ІМР ім. С.П. Григор'єва АМНУ,  
вул. Пушкінська, 82, Харків, 61024, Україна