

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

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

Оцінка впливу різних протипухлинних препаратів у комбінації з променевою терапією на індукцію керамідного шляху апоптозу у хворих на недрібноклітинний рак легень

Assessment of the influence of various anti-tumor drugs in combination with radiation therapy on apoptosis ceramide pathway induction in non-small-cell lung cancer

Цель работы: Изучение комбинированного влияния предоперационной лучевой терапии и противоопухолевых препаратов (таксотер, этопозид, цисплатин) на содержание сфинголипидов — керамида (ЦМ) и сфингомиелина (СФМ) в опухолевой ткани больных немелкоклеточным раком легких (НМРЛ).

Материалы и методы: У больных НМРЛ (IIB стадия), получавших предоперационную лучевую терапию (5 Гр × 3 фр.) с радиомодификацией противоопухолевыми препаратами, вводимыми однократно перед облучением (12 человек — таксотер, 40 мг, 6 — этопозид, 100 мг, 6 — цисплатин, 50 мг), определяли содержание сфинголипидов — СФМ и ЦМ в опухолевой ткани (резекционный материал) с использованием метода тонкослойной хроматографии на пластинках Sorbfil.

Результаты: При использовании таксотера уровень ЦМ в опухоли больных увеличивался в 2,8 раза по сравнению с контролем, а содержание СФМ не изменялось. Применение этопозидов также индуцировало значительное увеличение (в 2,1 раза) уровня ЦМ на фоне неизменного уровня СФМ. Анализ результатов химиолучевой терапии с цисплатином выявил повышение содержания ЦМ в опухоли на 30 % и снижение содержания СФМ на 40 %.

Выводы: Выявленные эффекты таксотера, этопозидов и цисплатина на содержание ЦМ и СФМ в условиях предоперационной химиолучевой терапии, связаны с разными механизмами действия радиомодификации на индукцию керамидного пути апоптоза: при действии цисплатина накопление ЦМ происходит путем гидролиза СФМ, а при действии таксотера и этопозидов — в результате синтеза de novo, причем самым эффективным индуктором керамидного пути апоптоза в опухоли больных НМРЛ является таксотер.

Ключевые слова: немелкоклеточный рак легких, лучевая терапия, таксотер, этопозид, цисплатин, керамид, сфингомиелин, апоптоз.

Objective: To investigate the influence of combination of pre-operative radiation therapy and anti-tumor drugs (Taxotere, Etoposid, Cisplatin) on the amount of sphingolipids, i.e. ceramide (CM) and sphingomyelin (SPM) in the tumor tissue of the patients with non-small-cell lung cancer (NSCLC).

Material and Methods: Sphingolipid amount (ceramide and sphingomyelin) in the tumor tissue (resection material) was determined using chromatography on a thin layer of silica gel on Sorbil plates in patients with NSCLC (stage II) who received pre-operative radiation therapy (5 Gy x 3 fractions) with radioiodine modification using anti-tumor drugs which were administered once before the irradiation (12 persons – Taxotere, 40 mg, 6 persons – Etoposid, 100 mg, 6 persons – Cisplatin, 50 mg).

Results: At Taxotere administration, CM level in the tumors increased 2.8 times, SPM did not change. Administration of Etoposid also induced considerable (2.1 times) increase of CM level against a background of preserved SPM level. The analysis of the results of chemoradiation therapy with Cisplatin revealed increase of CM amount in the tumor by 30% and reduction of CPM amount by 40%.

Conclusion: The revealed effects of Taxotere, Etoposid and Cisplatin on the amount of CM and CPM at pre-operative chemoradiation therapy are associated with different mechanisms of radiomodification action on induction of ceramide apoptosis pathway: at Cisplatin administration CM accumulated by way of CPM hydrolysis, at Taxotere and Etoposid administration as a result of de novo synthesis, Taxotere being the most powerful inducer of apoptosis ceramide pathway in the tumor in the patients with NSCLC.

Key words: non-small-cell lung cancer, radiation therapy, Taxotere, Etoposid, Cisplatin, ceramide, sphingomyelin, apoptosis.

Мета роботи: Вивчення комбінованого впливу передопераційної променевої терапії і протипухлинних препаратів (таксотер, этопозид, цисплатин) на вміст сфинголипідів — керамід (ЦМ) та сфингомиелін (СФМ) у пухлинній тканині хворих на недрібноклітинний рак легень (НДРЛ).

Матеріали і методи: У хворих на НДРЛ (IIB стадія), що отримували передопераційну променевою терапією (5 Гр × 3 фр.) з радіомодифікацією протипухлинними препаратами, які вводили одноразово перед опромінюванням (12 осіб — таксотер, 40 мг, 6 — этопозид, 100 мг, 6 — цисплатин, 50 мг), визначали вміст сфинголипідів — керамід та сфингомиелін в пухлинній тканині (резекційний матеріал) з використанням методу хроматографії в тонкому шарі силікагелю на пластинках Sorbfil.

Результати: При використанні таксотеру рівень ЦМ у пухлинах хворих зростав у 2,8 разу порівняно з контролем, а вміст СФМ при цьому не змінювався. Застосування этопозиду також індукувало значне зростання (в 2,1 разу) рівня ЦМ на фоні незмінного рівня СФМ. Аналіз результатів хемопротипухлинної терапії з цисплатином виявив збільшення вмісту ЦМ у пухлині на 30 % і зменшення вмісту СФМ на 40 %.

Висновки: Виявлені ефекти таксотеру, етопозиду та цисплатину на вміст ЦМ і СФМ за умов передопераційної хемопротерапевтичної терапії пов'язані з різними механізмами дії радіомодифікації на індукцію керамідного шляху апоптозу: при дії цисплатину накопичення ЦМ відбувається шляхом гідролізу СФМ, а при дії таксотеру і етопозиду — в результаті синтезу де novo, причому найпотужнішим індуктором керамідного шляху апоптозу у пухлині хворих на НДРЛ виявився таксотер.

Ключові слова: недрібноклітинний рак легень, променева терапія, таксотер, етопозид, цисплатин, керамід, сфінгомелінін, апоптоз.

Рак легень — одна з основних причин смерті від злоякісних новоутворів. У переважній більшості пацієнтів (60–70 %) діагностують III–IV стадію захворювання. Недрібноклітинний рак легень (НДРЛ) становить 75–80 % від усіх форм раку легень і є однією з найскладніших проблем клінічної онкології [1]. Це пов'язано насамперед із системним характером процесу вже на ранніх стадіях захворювання і первинною хеморадіорезистентністю пухлини. За даними численних досліджень, однією з причин резистентності пухлини при НДРЛ до хемо- та променевої терапії є порушення регуляції апоптозу — генетично запрограмованої загибелі клітин [2], тому однією з важливих складових підвищення ефективності хеморадіотерапії при НДРЛ є розробка методів подолання хеморадіорезистентності на підставі сучасних поглядів на механізми цього явища. Розуміння важливості апоптозу, що виникає у відповідь на дію різних ДНК-ушкоджувальних агентів, постійно зростає і визнається фундаментальним біологічним механізмом клітинної депопуляції в пухлинах. Цьому сприяли, перш за все, експериментальні дослідження останніх років, які продемонстрували, що терапевтична дія хеморадіотерапії при різних онкозахворюваннях може реалізовуватися шляхом ініціації апоптозу в пухлинних клітинах. Наразі численними дослідженнями доведено, що критичним компонентом апоптозного сигналіngu в опромінених клітинах є метаболіт сфінголіпідів керамід (ЦМ) [3], що відіграє значну роль у сигнальній трансдукції і бере участь у регуляції диференціювання клітин, блокуванні клітинного циклу і апоптозу [4]. Індукція накопичення ЦМ у клітинах відбувається під дією різних стресорних чинників, до яких належать радіація і хемотерапевтичні препарати. Іонізуюча радіація ініціює апоптоз шляхом активації гідролізу мембранного сфінголіпі-

ду — сфінгомеліну (СФМ) — і викликає накопичення продукту його деградації — кераміду. Останній, у свою чергу, активує сигнальні шляхи, критичні для індукції апоптозу [5]. Найбільш перспективним напрямком підвищення ефективності променевої терапії вважають використання хемопрепаратів з метою модифікації променевої реакції пухлини [6]. Незважаючи на зростаючу кількість даних щодо властивості цитостатичних препаратів підсилювати радіочутливість пухлин, зокрема НДРЛ, залишається багато нез'ясованих питань стосовно механізмів апоптичної загибелі пухлинних клітин при комбінованій терапії і, зокрема, керамідного шляху апоптозу. Отже метою представленої роботи було визначення впливу іонізуючого опромінення і низки протипухлинних препаратів на вміст сфінголіпідів — ЦМ та сфінгомеліну у пухлині хворих на НДРЛ.

Методика дослідження

До групи обстеження увійшли хворі на НДРЛ (II В стадія) віком 45–65 років, до яких застосовували передопераційну променево-хіміотерапію в режимі 5 Гр × 3 фр. з модифікацією таксотером (12 осіб), етопозидом (6 осіб) та цисплатином (6 осіб). Опромінювання проводили за методикою зустрічних полів; в об'єм опромінення залучали первинний осередок і регіонарні лімфовузли на боці ураження; хемопрепарати вводили одноразово, в/в, за 1 добу до початку опромінювання (таксотер — 40 мг, етопозид — 100 мг, цисплатин — 50 мг). Оперативне лікування проводили за 2 доби після закінчення променевої терапії. До контрольної групи увійшли хворі (13 осіб), які отримували тільки передопераційну променево-хіміотерапію; ЦМ і СФМ визначали в пухлині (резекційний матеріал). Тканини пухлини гомогенізували в H₂O з метою повнішої руйнації клітин. Гомогенат використовували для екстракції ліпідів за методом Фолча [7]. За допомогою хроматографії в тонкому шарі силікагелю на комерційних пластинках Sorbfil (АО «Сорбполімер», Росія) ЦМ і СФМ розділяли. Екстракти ліпідів, використовували для аналізу сфінголіпідів, випаровували у вакуумі та інкубували 60 хв при 37 °С у середовищі: хлороформ-метанол (1:1, v/v), в яке додавали NaOH (0,1 моль) для гідролізу ацилгліцеринів. Ліпіди знову екстрагували і використовували для розподілу на класи (СФМ, ЦМ) у системі розчинників: хлороформ-етилацетат-ізопропіловий спирт-метанол — 0,25 % KCl (25:25:25:10:9) [8]. Ліпіди (СФМ і ЦМ) проявляли в парах йоду та ідентифікували за допомогою порівняння із стандартами. Для ідентифі-

кації ліпідів використовували стандарти ЦМ і СФМ (Sigma). Білок у гомогенаті тканини визначали за Лоурі [9]. Статистично результати опрацьовували за допомогою критерію Стьюдента.

З метою верифікації апоптозу в пухлинних клітинах проводили морфологічні дослідження з використанням мікроскопа AxioLab-Zeiss відповідно до методичних рекомендацій [10].

Результати та їх обговорення

Сучасні протипухлинні препарати впливають на різні ланки керамідного метаболізму. Досить високою активністю відзначається таксотер, механізм дії якого полягає в блокуванні клітинного циклу на найбільш радіочутливих етапах, а саме, на межі G₂- та M-фаз клітинного циклу, що дозволяє застосовувати його як радіосенсибілізатор при опроміненні пухлини [11–12]. Експериментальними дослідженнями останніх років на різних лініях пухлинних клітин доведено, що таксотер-індукований апоптоз здійснюється також і керамідним шляхом [13].

У зв'язку з тим, що СФМ є субстратом сфінгомеліназ, активація яких призводить до гідролітичного утворення ЦМ, зростання співвідношення ЦМ/СФМ у пухлинній тканині свідчить про активацію сфінгомеліназ. Крім того, дані літератури [8, 14] свідчать, що опромінення на фоні таксотеру викликає активацію кислій сфінгомелінази ендотеліальних клітин судин пухлини, збільшуючи в ній вміст ЦМ, що веде до індукції апоптозу клітин ендотелію.

Нами проведено дослідження комбінованого впливу таксотеру і променевої терапії на вміст ЦМ і СФМ у пухлині хворих на НДРЛ. Порівнюючи вміст сфінголіпідів у новоутворах хворих досліджуваної та контрольної груп, слід зазначити, що радіомодифікація таксотером викликає значне зростання рівня ЦМ (у 2,8 разу) і співвідношення ЦМ/СФМ (в 2,3 разу) (табл. 1). Разом з тим, вміст СФМ вірогідно не змінюється. Отже, отримані дані демонструють, що накопичення ЦМ у пухлині під впливом таксотеру і радіації не пов'язане з активацією сфінгомеліназ. Найімовірніше, за даних умов посилюється синтез ЦМ de novo або гальмується його деградація.

Зважаючи на застосування при лікуванні НДРЛ багатьох інших хемопрепаратів, що

Вміст сфінголіпідів у пухлині хворих на НДРЛ за умов передопераційної хемопроменевої терапії (5 Гр × 3 фр.) з таксотером, нмоль/мг
Sphingolipid amount in the tumor of the patients with NSCLC at pre-operative chemoradiation therapy (5 Gy × 3 fractions) with Taxotere, nmol/mg

Група хворих	Церамід	Сфінгомелінін	Церамід /сфінгомелінін
Основна, n = 12	1654,95±23,00	326,67±21,50	5,06
Контрольна n = 13	585,50±9,70*	265,70±6,90	2,20*

* Вірогідність різниці між величинами показників основної і контрольної груп $p < 0,05$.

індукують апоптоз пухлинних клітин, наступним етапом роботи стало порівняння ефектів таксотеру з дією іншого активатора керамідного шляху апоптозу — етопозиду. Відомо, що цей протипухлинний препарат інгібує топоізомеразу II і розриває ланцюги ДНК, а також підвищує рівень ЦМ і, навпаки, знижує рівень СФМ, що веде до апоптозу [15]. В цьому пересвідчилися при дослідженні впливу етопозиду на лейкемічні клітини Molt-4, акумуляція ЦМ у яких пов'язувалася зі стимуляцією серинпальмітил-трансферази — ферменту, що бере участь у синтезі ЦМ de novo [16]. Здатність етопозиду стимулювати продукцію ЦМ шляхом синтезу de novo і гідролізу СФМ спостерігали на клітинах раку передміхурової залози [17]. Встановлено, що етопозид, подібно таксолу і фактору некрозу пухлини — альфа, викликає накопичення ЦМ у клітинах гліоми і цей процес передуює гальмуванню їх росту і апоптозу [16].

Щодо вмісту ЦМ і СФМ у пухлині при хемопроменевої терапії хворих на НДРЛ з етопозидом, встановлено, що рівень ЦМ зростав в 2,1 разу на фоні незмінного рівня СФМ (табл. 2), внаслідок чого збільшувалося співвідношення ЦМ/СФМ.

Таким чином, отримані результати свідчать про стимуляцію етопозидом продукції ЦМ у пухлинах хворих на НДРЛ, що може бути однією з причин його радіосенсибілізуючої дії.

Досить широко при променевої терапії для радіосенсибілізації використовують препарати платини. Цисплатин є протипухлинним

Вміст сфінголіпідів у пухлині хворих на НДРЛ за умов передопераційної хемопротенової терапії (5 Гр × 3 фр.) з етопозидом, нмоль/мг
Sphingolipid amount in the tumor of the patients with NSCLC at pre-operative chemoradiation therapy (5Gy × 3 fractions) with Etoposid, nmol/mg

Група хворих	Церамід	Сфінгомієлін	Церамід/сфінгомієлін
Основна, n = 6	1235,5 ± 110,0	245,5 ± 16,5	5,03
n = 13	585,0 ± 19,7*	265,7 ± 16,9	2,2*

* Вірогідність змін відносно контрольної групи $p < 0,05$.

препаратом на основі платини із властивостями водночас цитостатика і радіосенсибілізатора: крім безпосереднього токсичного впливу на пухлину, він інгібує репарацію суб- і потенційно летальних постпроменевих ушкоджень і, таким чином, підвищує чутливість пухлинних клітин до променевої терапії. Слід також зазначити, що для цього необхідні значно менші дози препарату, ніж терапевтичні [18–20]. Експериментально доведено, що в пухлинних клітинах комплекси платини ковалентно зв'язуються з ДНК і під впливом радіації відбувається її розщеплення в місцях локалізації атомів платини [16].

Аналіз результатів хемопротенової терапії в режимі передопераційного опромінювання (5 Гр × 3 фр.) з цисплатином показав, що вміст про-апоптичного ЦМ зростає в пухлині на 30 %, а рівень СФМ знижувався на 40 % порівняно з контрольною групою. Важливо, що в результаті застосованої комбінованої терапії відношення ЦМ/СФМ у пухлині зросло до 4,1 порівняно з 2,2 у контрольній групі.

Наявність апоптозу в пухлинних клітинах всіх досліджуваних груп доведено морфологічними дослідженнями. Поєднання радіації та протипухлинних препаратів, порівняно з окремою дією препаратів чи опромінювання, значно посилювало абластичний ефект, а саме: збільшувалася кількість ядер девіталізованих пухлинних клітин з фрагментованим хроматином та зменшувався об'єм їх цитоплазми, що характерно для апоптичної загибелі.

Висновки

1. Радіомодифікація хемопротенатами (таксотером, етопозидом, цисплатином) має виражену радіосенсибілізуючу дію і сприяє індукції керамідного шляху апоптозу в пухлині хворих на НДРЛ.

2. Різні ефекти таксотеру, етопозиду та цисплатину на вміст ЦМ і СФМ за умов передопераційної хемопротенової терапії свідчать про різні механізми дії радіомодифікації на індукцію керамідного шляху апоптозу, а саме при дії таксотеру і етопозиду накопичення ЦМ відбувається в результаті синтезу de novo, а при дії цисплатину — шляхом гідролізу СФМ.

Література

1. Parkin D., Pisani P., Ferlay J. // *Int. J. Cancer.* – 1999. – Vol. 83. – P. 18–29.
2. Reed J.C. // *J. Clin. Oncol.* – 1999. – Vol. 17. – P. 2941–2953.
3. Hannun Y.A., Luberto C. // *Trends Cell. Biol.* – 2000. – Vol. 10. – P. 73–80.
4. Radin N.S. // *Biochem. J.* – 2003. – Vol. 371. – P. 243–256.
5. Perry D., Hannun Y. // *Biochem. Bioph. Acta.* – 1998. – Vol. 1436. – P. 233–243.
6. Claus Belka, Gendrossek V., Pruschy M. et al. // *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* – 2004. – Vol. 58, № 2. – P. 542–554.
7. Folch J., Lees M., Stanley G. // *J. Biol. Chem.* – 1957. – Vol. 226. – P. 497–509.
8. Dolgacher V., Farooqui M., Kulaeva O., Tainisky M. et al. // *Ibid* – 2004. – Vol. 279. – P. 23238–23249.
9. Lowry O., Rosebrough N., Farr A. // *Ibid.* – 1951. – Vol. 193. – P. 265–275.
10. Морфологічні дослідження на етапі доклінічного вивчення лікарських засобів: Метод. рекомендації / А.В. Матвієнко, Л.В. Степанова — К., 2001. — 19 с.
11. Tishler R.B., Schiff P.B., Geard C.R. // *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* – 1992. – Vol. 22. – P. 613–617.
12. Mason K.A., Kishi K., Hunter N. et al. // *Clin. Canc. Res.* – 1999. – Vol. 5. – P. 4191–4198.
13. Charles A.G., Han T.Y., Lin Y.Y. et al. // *Cancer Chemoh., Pharmacol.* – 2001. – Vol. 47. – P. 444–450.
14. Jiand X., Paultre F., Pearson T.A., Reed R.G. et al. // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2000. – Vol. 20. – P. 2614–2618.
15. Sawada M., Nakashima S., Banno G. et al. // *Cell. Death Differ.* – 2000. – Vol. 7. – P. 761–772.
16. Perry D., Carton J., Shah A. et al. // *J. Biol. Chem.* – 2000. – Vol. 275. – P. 9078–9084.
17. Chmura J., Nodzenki E., Becklett M. et al. // *Cancer Res.* – 1997. – Vol. 57. – P. 1270–1275.
18. Pisters K.M., L. Chevalier T. // *J. Clin. Oncol.* – 2005. – Vol. 23. – P. 3270–3278.
19. Орлова Р.В. // *Практ. онкол.* — 2000. — № 3. — С. 17–20.
20. Komaki R., Seiferheld W., Ettinger D. et al. // *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* – 2002. – Vol. 53. – P. 548–557.

Надходження до редакції 08.10.2008.

Прийнято 11.11.2008.

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