

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

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

## Вплив іонізуючої радіації та протипухлинного препарату «Етопозид» на вміст сфінголіпідів та активність кислоти $Zn^{2+}$ -залежної сфінгомелінази в сироватці крові щурів-пухлиноносців

Influence of ionizing radiation and antitumor drug etoposid on sphingolipid amount and acid  $Zn^{2+}$ -dependent sphingomyelinase activity in the blood serum of tumor-carrying rats

**Цель работы:** Оценка влияния ионизирующего излучения и этопозид на активность кислоти  $Zn^{2+}$ -зависимой сфингомиелінази в сыворотке крови крыс-опухоленосителей.

**Материалы и методы:** В качестве экспериментальной модели использовали крыс популяции Вистар массой 160–180 г с подкожно перевитой аденокарциномой Герена. Локальное рентгеновское облучение зоны роста опухоли проводили фракционировано при дозе фракции 5 Гр с интервалом между сеансами 24 часа (суммарная доза на зону роста опухоли составляла 10 Гр) на аппарате РУМ-17. Противоопухолевый препарат «Этопозид» («Эбева») вводили внутривентриально за 24 ч. до первого сеанса облучения в дозе 5 мг/кг. Декапитацию выполняли через 24 часа после последнего сеанса облучения. Экстракцию липидов из сыворотки крови проводили по методу Фолча, церамид и сфингомиелин разделяли с помощью хроматографии на пластинках Sorbfil (АО «Сорбполимер», Россия). Для идентификации липидов использовали стандарты церамид и сфингомиелина (Sigma). С целью определения активности кислоти  $Zn^{2+}$ -зависимой сфингомиелінази в сыворотке крови использовали [N-метил- $^{14}C$ ] сфингомиелин (1924 МБк/ммоль). Радиоактивность образцов измеряли на счетчике БЕТА-1 («Медприбор», Киев). Статистический анализ проводили методом вариационной статистики с использованием критерия Стьюдента.

**Результаты:** Установлено, что при действии этопозид, как и при действии радиации, уровень церамид в сыворотке крови крыс-опухоленосителей значительно увеличивается, при этом содержание сфингомиелина достоверно снижается только в условиях радиационного воздействия, что может свидетельствовать об активирующем влиянии радиации на фермент — сфингомиеліназу. Показано, что при комбинированном действии этопозид и радиации активность кислоти  $Zn^{2+}$ -зависимой сфингомиелінази достоверно возрастает.

**Выводы:** Усиление активности кислоти  $Zn^{2+}$ -зависимой сфингомиелінази сыворотки крови крыс-опухоленосителей при комбинированном действии этопозид и радиации индуцирует повышение содержания церамид в крови и апоптоз микроваскулярного эндотелия опухоли, что сопряжено с ее регрессией.

**Ключевые слова:** опухоль Герена, апоптоз, церамид, сфингомиелин, кислота  $Zn^{2+}$ -зависимая сфингомиеліназа, этопозид, ионизирующее излучение.

**Мета роботи:** Оцінка впливу йонізуючого випромінювання й етопозиду на активність кислоти  $Zn^{2+}$ -залежної сфінгомелінази у сироватці крові щурів-пухлиноносців.

**Матеріали і методи:** Як експериментальну модель використовували щурів популяції Вистар масою 160–180 г з підшкірно перещепленою аденокарциномою Герена. Локальне рентгенівське опромінення зони росту пухлини проводили фракціоновано фракціями 5 Гр з інтервалами між сеансами 24 години (сумарна доза на зону росту пухлини складала 10 Гр) на апараті РУМ-17. Протипухлинний препарат «Етопозид» («Ебева») вводили внутріочеревинно за 24 години до першого сеансу опромінювання в дозі 5 мг/кг. Декапітацію проводили через 24 години після останнього сеансу опромінювання. Екстрагування ліпідів з сироватки крові виконували за Фолчем, церамід і сфінгомеліні розділяли за допомогою хроматографії на пластинках Sorbfil (АО «Сорбполімер», Росія). Для ідентифікації ліпідів використовували стандарти цераміду і сфінгомеліну (Sigma). З метою визначення активності кислоти  $Zn^{2+}$ -залежної сфінгомелінази в сироватці крові використовували [N-метил- $^{14}C$ ] сфінгомеліні (1924 МБк/ммоль). Радіо-

**Objective:** To assess the influence of ionizing radiation and etoposid on the activity of acid  $Zn^{2+}$ -dependent sphingomyelinase in the blood serum of tumor-carrying rats.

**Material and Methods:** Wistar rats weighing 160-180 g with subcutaneously inoculated Guerin's adenocarcinoma were used as the experimental model. Local x-ray irradiation of the tumor area was delivered at a dose of 5 Gy with 24-hour intervals between the treatments (total dose to the tumor area 10 Gy) using РУМ-17 unit. Antitumor drug etoposid (Ebewe) was introduced intraperitoneally 24 hours before the first treatment at a dose of 5 mg/kg. Decapitation was done 24 hours after the last treatment. Lipid extraction from the blood serum was done according to Folch, ceramide and sphingomyelin were separated with the use of chromatography on Sorbfil plates (JSS Sorbopolimer, Russia). To identify lipids standards of ceramide and sphingomyelin (Sigma) were used. To assess the activity of acid  $Zn^{2+}$ -dependent sphingomyelinase in the blood serum, [N-methyl- $^{14}C$ ] sphingomyelin (1924 MBq/mmol) was used. Sample radioactivity was measured using BETA-1 counter (Medpribor, Kyiv). Statistical analysis was performed by means of variation statistics using Student's criterion.

**Results:** It was determined that both etoposid and radiation considerably increased ceramide level in the blood serum of tumor-carrying rats, while sphingomyelin amount significantly decreased only at radiation exposure which can suggest activating influence of radiation on the enzyme, sphingomyelinase. It is shown that at combined action of etoposid and radiation, activity of acid  $Zn^{2+}$ -dependent sphingomyelinase significantly increased.

**Conclusion:** Increase of acid  $Zn^{2+}$ -dependent sphingomyelinase activity in the blood serum of tumor-carrying rats at combined action of etoposid and radiation induced increase of blood ceramide amount and apoptosis of microvascular endothelium of the tumor which is associated with its regression.

**Key words:** Guerin's carcinoma, apoptosis, ceramide, sphingomyelin, acid  $Zn^{2+}$ -dependent sphingomyelinase, etoposid, ionizing radiation.

активність зразків вимірювали на лічильнику БЕТА-1 («Медприлад», Київ). Статистичний аналіз проводили методом варіаційної статистики з використанням критерію Стьюдента.

**Результати:** Встановлено, що при дії етопозиду, як і радіації, рівень цераміду в сироватці крові щурів-пухлиноносіїв значно зростає, при цьому вміст сфінгомеліну вірогідно зменшувався тільки в умовах радіаційного впливу, що може свідчити про активний вплив радіації на фермент — сфінгомеліназу. Показано, що при комбінованій дії етопозиду й радіації активність кислоти  $Zn^{2+}$ -залежної сфінгомелінази вірогідно зростає.

**Висновки:** Підсилення активності кислоти  $Zn^{2+}$ -залежної сфінгомелінази сироватки крові щурів-пухлиноносіїв при комбінованій дії етопозиду і радіації індукує підвищений вміст цераміду в крові і апоптоз мікроциркуляторного ендотелію пухлини, що пов'язано з її регресією.

**Ключові слова:** пухлина Герена, апоптоз, церамід, сфінгомелінін, кислота  $Zn^{2+}$ -залежна сфінгомеліназа, етопозид, іонізувальне випромінювання.

Успіхи у з'ясуванні молекулярних механізмів регуляції апоптичної загибелі клітин відкривають нові терапевтичні можливості модифікації променевої реакції злоякісних пухлин. Нова стратегія полягає в подоланні резистентності до проапоптичної дії іонізувального випромінювання на злоякісні клітини [1]. Одним з перспективних напрямків підвищення ефективності променевої терапії вважають використання радіомодифікаторів.

На сьогоднішній день численні дослідження спрямовані на вивчення церамідного шляху апоптозу і агентів, здатних підвищувати рівень цераміду (ЦМ) у клітинах. Відомо, що ЦМ є похідною сфінголіпідів, одного з основних класів мембранних ліпідів, і відіграє роль вторинного месенджера в апоптозі. Дія низки сучасних протипухлинних препаратів, зокрема й етопозиду — інгібітора топоізомерази II, опосередковується індукцією церамідного шляху апоптозу [2–5]. Експериментальними дослідженнями показано, що клітинні лінії, резистентні до  $\gamma$ -радіації і доксорубіцину, не продукують ЦМ під впливом цих агентів [6–8]. При вивченні ЦМ-індукованого апоптозу велику увагу приділяють реакції утворення ЦМ із сфінгомеліну (СФМ). З'ясовано, що радіація, впливаючи безпосередньо на плазматичні мембрани клітин, активує кислоту сфінгомеліназу (СМ-азу), за участі якої шляхом ензиматичного гідролізу СФМ продукується ЦМ. При вивченні радіаційно-індукованого апоптозу на культуральних ендотеліальних клітинах та в тканині легені продемонстровано провідну роль кислоти СМ-ази в запуску апоптозу [9]. Кислота СМ-аза має дві форми: лізосомальну, яка вважається катіон-незалежною, і  $Zn^{2+}$ -залежну, яка може секретуватися і відігравати важливу роль, пов'язану з гідролізом екстраклітинного СФМ і залученням продуктів цієї реакції до нелізо-

сомальних процесів [10]. У зв'язку з тим, що механізм зростання вмісту ЦМ у сироватці крові щурів-пухлиноносіїв при дії етопозиду і радіації в попередніх дослідженнях [11] залишився нез'ясованим, метою даної роботи була оцінка впливу цих агентів на активність кислоти  $Zn^{2+}$ -залежної СМ-ази сироватки крові у щурів з перещепленою пухлиною Герена.

## Методика дослідження

Експериментальні дослідження проводили на щурах популяції Вістар масою 160–180 г з підшкірно перещепленою карциномою Герена, відповідно до національних Загальних етичних принципів експериментів на тваринах (Україна 2001р.), які узгоджуються з положеннями Європейської конвенції захисту хребетних тварин, використаних у експериментальних та інших наукових цілях (Страсбург, Франція, 1986), внутрішній протокол від 31.10.2007 р. №7.

Штам експериментальної аденокарциноми Герена було отримано з Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. 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.

Локальне ікс-опромінювання зони росту пухлини проводили на апараті РУМ-17 за стандартних технічних умов: напруга — 190 кВ, сила струму — 10 мА, фільтри — 0,5 мм Cu + 1 мм Al. Коефіцієнт розподілу поглинутої дози в повітрі склав 0,965.

Розрахунковий час опромінення пухлини Герена в дозі 5 Гр дорівнював 4 хв 39 с.

Опромінення проводили фракційно, при поглинутій дозі на фракцію 5 Гр та з інтервалом між сеансами 24 год. Сумарна поглинута доза на зону росту пухлини складала 10 Гр.

Хемопрепарат «Етопозид» («Ебеве») в дозі 5 мг/кг маси тіла вводили внутріочеревинно за 24 год. до першого сеансу опромінювання.

Протягом експерименту тварин розподілили таким чином:

- 1-ша група — інтактний контроль (n = 6);
- 2-га — контрольне опромінювання пухлини (n = 6);
- 3-тя — уведення етопозиду (n = 6);
- 4-та — уведення етопозиду з наступним опромінюванням пухлини (n = 6).

Тварин декапітували під ефірним наркозом через 24 год. після останнього сеансу опромінювання.

Екстракцію ліпідів із сироватки крові проводили за методом Фолча [12], ЦМ і СФМ розділяли за допомогою хроматографії в тонкому шарі силікагелю на комерційних пластинках Sorbfil (АО «Сорбполимер», Росія). Екстракти ліпідів, використовувані 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 % -вий KCl (25:25:25:10:9) [13]. Ліпіди (СФМ, ЦМ) проявляли в парах йоду та ідентифікували за допомогою порівняння із стандартами. Для ідентифікації ліпідів застосовували стандарти ЦМ і СФМ (Sigma).

Для визначення активності кислоти  $Zn^{2+}$ -залежної СМ-ази застосовували інкубаційну суміш, до складу якої входили: 0,1 мМ ацетатний буфер (рН 5,0) з додаванням 1 ЄДТА, 1 % тритон Х-100, 0,1 мМ  $ZnCl_2$ , 2 мМ [N-метил- $^{14}C$ ] СФМ (1924 МБк/ммоль), ендогенний СФМ мозку бика і 0,1 мл сироватки крові. Суміш інкубували при 37° С протягом 3 год. Реакцію припиняли додаванням охолодженої суміші: хлороформ-метанол (1: 2, v/v); [N-метил- $^{14}C$ ] СФМ і [N-метил- $^{14}C$ ] фосфорилхолін екстрагували за допомогою багаторазової послідовної екстракції суспензії хлороформом, метанолом і водою. Визначали СМ-азну активність за інтенсивністю переходу мітки у вигляді [N-метил- $^{14}C$ ] СФМ у хлороформну фазу, яку використовували для хроматографічного розподілу ліпідів і визначення радіоактивності [ $^{14}C$ ] СФМ. Радіоактивність зразків вимірювали за допомогою лічильників БЕТА-1 («Медприлад», Київ). Одержані дані опрацьовували методом варіаційної статистики з використанням критерію Стьюдента.

## Результати та їх обговорення

У результаті проведених досліджень встановлено, що при дії етопозиду майже в 3 рази підвищувався вміст ЦМ у сироватці крові щурів-пухлиноносіїв порівняно з контролем, тоді як вірогідних змін вмісту СФМ за даних умов не спостерігали (рис.1).

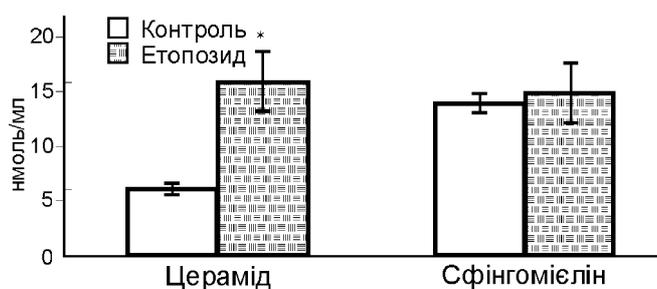


Рис.1. Вплив етопозиду на вміст сфінголіпідів у сироватці крові щурів-пухлиноносіїв

\*  $p < 0,05$  порівняно з контролем

Fig. 1. Influence of etoposid on sphingolipid amount in the blood serum of tumor-bearing rats

При вивченні впливу радіації на вміст сфінголіпідів у сироватці крові щурів з пухлиною Герена також виявлено значне збільшення вмісту ЦМ на фоні вірогідного зниження вмісту СФМ, при цьому співвідношення ЦМ/СФМ зростало втричі порівняно з контролем (рис. 2), що свідчить про активацію сфінгомієліназ за даних умов.

За даними Лі та співавт. (2003), при опроміненні експериментальних тварин відбувалась активація кислоти СФМ-ази, підвищення продукції ЦМ та індукція апоптозу ендотеліальних клітин. Показано, що рентгенівське випромінювання стимулює секрецію в кров з ендотеліальних клітин судин кислоти сфінгомієлінази, її активацію, в результаті чого відбувається деградація СФМ і накопичення ЦМ у сироватці крові [14] (див. рис. 2).

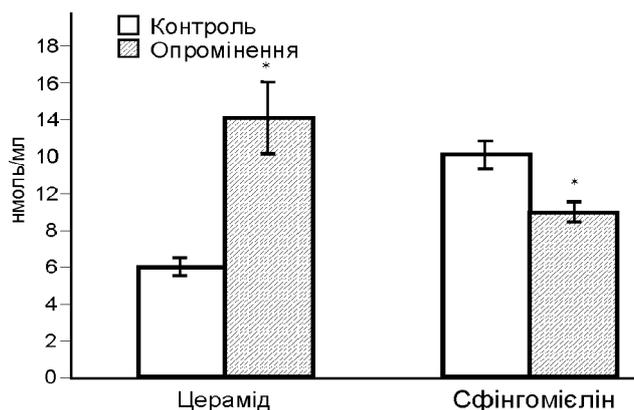


Рис. 2. Вплив опромінення на вміст сфінголіпідів у сироватці крові

\*  $p < 0,05$  порівняно з контролем

Fig. 2. Influence of irradiation on sphingolipid amount in the blood serum

З огляду на це, наступна серія досліджень була присвячена вивченню змін активності кислоти  $Zn^{2+}$ -залежної СМ-ази у сироватці крові щурів-пухлиноносіїв при дії випромінювання та опроміненні в комбінації з етопозидом. Відомо, що СМ-аза каталізує деградацію СФМ, у результаті чого утворюються ЦМ і фосфорилхолін. Доведено також, що  $Zn^{2+}$ -залежна СМ-аза кодується відповідним геном і секретується різними клітинами кровоносних судин [15,16].

Активація кислоти  $Zn^{2+}$ -залежної СМ-ази у сироватці крові щурів-пухлиноносіїв при комбінованій дії радіації і етопозиду, очевидно, веде до підвищення вмісту ЦМ в крові, що, в свою чергу, може індукувати апоптоз клітин мікрovasкулярного ендотелію пухлини і сприяти, таким чином, її регресії.

За даними Sathishkumar та співавт. (2005), активність  $Zn^{2+}$ -залежної СМ-ази і вміст ЦМ стрімко зростають у сироватці крові хворих з пухлинами голови і шиї (меланома, карцинома, аденокарцинома і т. ін.) після сеансів опромі-



Рис. 3. Активність  $Zn^{2+}$ -залежної кислоти СМ-ази в сироватці крові щурів-пухлиноносіїв при дії опромінення і етопозиду: а — рівень  $^{14}C$ -фосфорилхоліну, продукованого в результаті ферментативного гідролізу  $^{14}C$ -сфінгом'єліну при опромінюванні та опромінюванні в комбінації з етопозидом (у % відносно контролю); б — рівень залишкового  $^{14}C$ -сфінгом'єліну (у % відносно контролю)

Примітка. \*  $p < 0,05$  порівняно з контролем; #  $p < 0,05$  — порівняно з опроміненою групою

Fig. 3. Activity of  $Zn^{2+}$ -dependent acid SM-ase in the blood serum of tumor-carrying rats at action of irradiation and etoposid: а – level of  $^{14}C$ -phosphorylcholine produced in the result of enzyme hydrolysis of  $^{14}C$ -sphingomyelin at irradiation and irradiation in combination with etoposid (% when compared with the controls); б – the level of residual  $^{14}C$ -sphingomyelin (% when compared with the controls)

нювання (15 Гр). Слід зазначити, що активація  $Zn^{2+}$ -залежної СМ-ази опромінених хворих корелювала з посиленням апоптозу в ендотелії пухлин [17].

В дослідженнях Grammaticos та співавт. (2007) продемонстровано зростання чутливих клітин гліоми до дії хемотерапії за рахунок експресії кислоти сфінгом'єлінази, індукованої гемцитабіном або доксорубіцином [18].

Про аналогічний ефект кислоти сфінгом'єлінази свідчать результати дослідження Garcia Barros M. та співавт. (2003). На мишах з успадкованим дефіцитом кислоти сфінгом'єлінази, яким було перещеплено фібросаркому МСА/129 або меланому В 16 F, продемонстровано суттєве зниження апоптозу в ендотеліальних клітинах і прискорення росту пухлини порівняно з мишами дикого типу на 200–400 %. Показано також, що при дії радіації інтенсивність апоптозу в експериментальних мишей була значно меншою порівняно з контролем. Таким чином, ендотеліальний апоптоз автори дослідження розглядають як гомеостатичний фактор, що регулює ангіогенез-залежний ріст пухлини [19].

Проведене нами дослідження активності  $Zn^{2+}$ -залежної СМ-ази в сироватці крові щурів з перещепленою пухлиною Герена виявило

вірогідну активацію фермента за умов комбінованої дії випромінення і етопозиду (рис. 3), яка супроводжувалася інтенсивною деградацією міченого екзогенного СФМ з вивільненням  $^{14}C$ -фосфорилхоліну. Останнє підвищувалось на 21 % порівняно з контролем (рис. 3а), а вміст залишкового  $^{14}C$ -фосфорилхоліну складав 56 % від контролю (рис. 3б).

Таким чином, встановлено, що комбінований вплив етопозиду і опромінення викликає активацію кислоти  $Zn^{2+}$ -залежної СМ-ази в сироватці крові щурів-пухлиноносіїв.

## ВИСНОВКИ

1. Дія етопозиду і радіації на пухлину Герена викликає вірогідне підвищення вмісту ЦМ-індуктора апоптозу в сироватці крові щурів-пухлиноносіїв.

2. Локальне опромінення не активує кислоту  $Zn^{2+}$ -залежну СМ-азу в сироватці крові щурів-пухлиноносіїв.

3. Комбінована дія етопозиду і радіації зумовлює посилення активності кислоти  $Zn^{2+}$ -залежної СМ-ази у сироватці крові щурів-пухлиноносіїв, що в свою чергу сприяє підвищенню вмісту ЦМ у складі ліпопротеїдів сироватки крові.

---

## Література

1. Акимов А.А., Иванов С.Д., Хансон К.П. // *Вопр. онкол.* — 2003. — Т. 49, № 3. — С. 261–268.
2. Gulbins E., Li P. // *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* — 2006. — Vol. 290. — P. 11–26.
3. Kok J., Sietsma H. // *Curr. Drug. Target.* — 2004. — Vol. 5. — P. 375–382.
4. Padron J. // *Curr. Med. Chem.* — 2006. — Vol. 13. — P. 755–770.
5. Hara S., Nakashima S., Kiyono T., Sawada V. et al. // *Oncol. Rep.* — 2004. — Vol. 12, № 1. — P. 119–123.
6. Michael J., Watters D. // *Ibid.* — Vol. 57. — P. 2600–3605.
7. Hannun Y. // *Science.* — 1996. — Vol. 274. — P. 1859–1866.
8. Kolesnick R., Fuks Z. // *J. Exp. Med.* — 1995. — Vol. 181. — P. 1949–1952.
9. Pena L.A., Fuks Z., Kolesnick R.N. // *Cancer Res.* — 2000. — Vol. 60. — P. 321–327.
10. Schissel S.L., Keesler G.A., Schuchman E.H. et al. // *J. Biol. Chem.* — 1998. — Vol. 273. — P. 18250–18259.
11. Мітрьєва Н.А., Бакаї Т.С., Бабенко Н.А. и др. // *УРЖ.* — 2008. — Т. XVI, вип. 1 — С. 27–31.
12. Folch J., Lees M., Stanley G. // *J. Biol. Chem.* — 1957. — Vol. 226. — P. 497–509.
13. Dolgacher V., Farooqui M., Kulaeva O., Tainisky M. et al. // *Ibid.* — 2004. — Vol. 279. — P. 23238–23249.
14. Li Y.Q., Chen P., Haimovitz-Friedman A. et al. // *Cancer Res.* — 2003. — Vol. 63. — P. 5950–5956.
15. Takahashi I., Takahashi T., Abe T. // *Tohoku J. Exp. Med.* — 2000. — Vol. 192, №1. — P. 61–66.
16. Knapp P., Dobrzyn A., Gorski J. // *Horm. Metab. Res.* — 2005. — Vol. 37, №7. — P. 433–437.
17. Sathishkumar S., Boyanovsky B., Karakashian A.A. et al. // *Cancer Biol. Ther.* — 2005. — Vol. 4, №9. — P. 979–986.
18. Grammaticos G., Teichgruber V., Carpinteiro A. et al. // *Antioxid. Redox Signal.* — 2007. — Vol. 9, № 9. — P. 1449–1456.
19. Barros M., Paris F., Cordon-Cardo C. et al. // *Science* — 2003 — May 16. — Vol. 300 (5622). — P. 1155–1159.

Надходження до редакції 25.03.2009.

Прийнято 18.05.2009.

Адреса для листування:

Мітрьєва Наталія Андріївна,  
ДУ Інститут медичної радіології ім. С.П. Григор'єва АМНУ,  
вул. Пушкінська, 82, Харків, 61024, Україна