

ОРИГІНАЛЬНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ

Сегеда Тетяна Валеріївна

ДУ Інститут медичної
радіології ім. С.П. Григор'єва
НАМН України, ХарківСинергізм дії іонізуючої радіації
та протипухлинних препаратів
на вміст цераміду в пухлині
ГеренаSynergism of the effect of ionizing radiation
and anticancer drugs on the content
of ceramide in Guerin's carcinoma

Цель работы: Исследование эффектов совместного действия ионизирующей радиации (ИР) и химиопрепаратов на содержание индуктора апоптоза — церамида (ЦМ) в опухоли Герена.

Материалы и методы: В качестве экспериментальной модели использовали крыс популяции Вистар массой 160–180 г с подкожно перевитой аденокарциномой Герена. Облучение зоны роста опухоли проводили на аппарате РУМ (рентгеновское излучение) и на линейном ускорителе Clinac 600 С (высокоэнергетическое фотонное излучение) при стандартных технических условиях, фракционированно с интервалом между сеансами 24 часа, поглощенная доза за фракцию — 5 Гр, суммарно — 10 Гр. Противоопухолевые препараты вводили внутривентрально за 24 ч до первого сеанса облучения: таксотер фирмы «Рор Пуленок Рорер» — 8 мг/кг, цисплатин фирмы «Эбеве» 6,0 мг/кг, этопозид фирмы «Тева» в дозе 8 мг/кг массы тела. Декапитацию проводили через 24 часа после последнего сеанса облучения. Экстракция липидов проводилась по методу Фолча. Липиды проявляли в парах йода и сравнивали со стандартами церамида (Sigma). Результат был выражен в нмоль/мг белка. Содержание белка в исследуемых пробах определяли по методу Лоури. Статистический анализ проводился при помощи статистических программ для ПК Biostat и Statistica при использовании параметрических и непараметрических методов для малых выборок.

Результаты: Показано, что при совместном действии ИР и химиопрепаратов, содержание проапоптозного липида — церамида в опухоли Герена повышается: при действии рентгеновского излучения и таксотера в 5,6 раза, цисплатина в 4,2 и этопозид в 7,5 раза по сравнению с контрольной группой; при действии высокоэнергетического фотонного излучения и химиопрепаратов — в 6,3, в 4,9 и в 7,5 раза соответственно относительно контрольной группы. Определены радиобиологические эффекты действия ИР и химиопрепаратов на содержание церамида.

Выводы: Установлены синергические эффекты действия ионизирующей радиации разного энергетического диапазона и химиопрепаратов на уровень церамида в опухоли Герена и получены их количественные оценки.

Ключевые слова: карцинома Герена, ионизирующее излучение, таксотер, цисплатин, этопозид, синергизм действия.

Мета роботи: Дослідження ефектів поєднаної дії іонізуючої радіації (ИР) і хемопрепаратів на вміст індуктора апоптозу — цераміду (ЦМ) в пухлині Герена.

Матеріали і методи: Як експериментальну модель використовували щурів популяції Вистар масою 160–180 г з підшкірно перевитою аденокарциномою Герена. Опромінення зони зростання пухлини проводили на апараті РУМ (ікс-випромінювання) і на лінійному прискорювачі Clinac 600 С (високоенергетичне фотонне випромінювання) при стандартних технічних умовах, фракціоновано з інтервалом між сеансами 24 години, поглинута доза за фракцію — 5 Гр, сумарно — 10 Гр. Протипухлинні препарати вводили внутріочеревинно за 24 год до першого сеансу опромінення: таксотер фірми «Рор Пуленок Рорер» — 8 мг/кг, цисплатин фірми «Ебеве» 6,0 мг/кг, этопозид фірми «Тева» у дозі 8 мг/кг маси тіла. Декапітацію проводили через 24 год після останнього сеансу опромінення. Екстракцію ліпідів виконували методом Фолча. Ліпідів виявляли в парах йоду і порівнювали зі стандартами цераміду (Sigma). Результат виражали в нмоль/мг білка. Вміст білка

Objective: To study the effects of combined action of ionizing radiation and chemotherapy on the amount of apoptosis inducers, i.e. ceramide in Guerin's carcinoma.

Material and Methods: Wistar rats weighing 160–180 g with subcutaneously inoculated Guerin's adenocarcinoma were used as an experimental model. Irradiation of the tumor zone was performed with RUM x-ray unit and linear accelerator 600 Clinac C (high-energy photon radiation) at standard conditions, with 24-hour intervals between fractions, absorbed dose of 5 Gy per fraction, total of 10 Gy. Antitumor drugs were administered intraperitoneally 24 hours before the first session of irradiation: Taxotere (Rohr Pulenok Rorer) - 8 mg/kg, cisplatin (Ebeve) 6.0 mg/kg, etoposide (Ebeve) in a dose of 8 mg/kg. Decapitation was performed 24 hours after the last irradiation session. Lipid extraction was performed by the method of Folch. Lipids were developed in iodine vapor and compared with ceramide standards (Sigma). The findings were expressed as nmol/mg of protein. The protein content in the test samples was determined according to Lowry. Statistical analysis was performed using statistical software for PC, Biostat and Statistica, using parametric and nonparametric methods for small samples.

Results: It was shown that combined action of ionizing radiation and chemotherapy increased the content of proapoptotic lipid, ceramide in Guerin's carcinoma: 5.6 times at the action of x-rays and Taxotere, 4.2 times with cisplatin and 7.5 times with etoposide vs. the controls. The action of high-energy photon radiation and chemotherapy increased this 6.3, 4.9, and 7.5 times, respectively when compared to the controls. Radiobiological effects of ionizing radiation and chemotherapy on ceramide amount were identified.

Conclusion: Synergic effects of exposure to ionizing radiation of different energy range and chemotherapy on the level of ceramide in Guerin's carcinoma were determined, their quantitative assessment was done.

Key words: Guerin carcinoma, ionizing radiation, Taxotere, cisplatin, etoposide, synergism.

в досліджуваних пробах визначали методом Лоурі. Статистичний аналіз проводили за допомогою статистичних програм для ПК Biostat і Statistica при використанні параметричних і непараметричних методів для малих вибірок.

Результати: Показано, що при поєднаній дії ІР і хіміопрепаратів вміст проапоптозного ліпиду — кераміду у пухлині Герена підвищується: при дії ікс-випромінення і таксотеру в 5,6 разу, цисплатину в 4,2 і етопозиду — в 7,5 порівняно з контрольною групою; при дії високоенергетичного фотонного випромінення і хіміопрепаратів — у 6,3, у 4,9 і в 7,5 разу відповідно відносно контрольної групи. Визначено радіобіологічні ефекти дії ІР і хіміопрепаратів на вміст кераміду.

Висновки: Встановлені синергічні ефекти дії ІР різного енергетичного діапазону і хіміопрепаратів на рівень кераміду в пухлині Герена та отримані їх кількісні оцінки.

Ключові слова: карцинома Герена, іонізвнне випромінення, таксотер, цисплатин, етопозид, синергізм дії.

Одним з важливих напрямків наукового пошуку в радіаційній онкології є підвищення протипухлинного ефекту. Останніми роками це зумовило активний розвиток стратегії багатофакторної терапії, яка поряд з опроміненням включає в себе використання модифікаторів різної природи [1, 2]. Показано, що введення у схеми променевої терапії цитостатиків значно підвищує протипухлинний ефект при лікуванні злоякісних новоутворів [3, 4]. Незважаючи на те, що сучасний рівень знань та теоретичних розробок дозволяє сформулювати найбільш вірогідні механізми складання ефектів [5, 6], насправді ще необхідно провести чимало досліджень біологічних основ поєднаної дії іонізвнної радіації (ІР) та хіміопрепаратів для розкриття механізмів та умов радіомодифікації.

Встановлено, що в ініціації апоптичного сигналіngu важлива роль належить кераміду (ЦМ) — сфінголіпідному метаболіту, вміст якого зростає під дією екстраклітинних стимулів, зокрема, й після дії іонізвнного випромінення (ІВ) [7]. З порушенням у пухлинних клітинах різних ланок обміну ЦМ пов'язують явища резистентності пухлини до дії радіації [8]. Особливого значення при цьому набувають дослідження, спрямовані на пошук радіомодифікаторів, які індукують керамідний шлях апоптозу [8, 9]. У попередніх дослідженнях нами було показано, що поєднана дія ІР та радіомодифікаторів, зокрема таксотеру, цисплатину, етопозиду, дозволяє підвищити ефективність променевої терапії пухлини Герена шляхом направленої індукції керамідного шляху апоптозу [10, 11].

Втім, радіобіологічні ефекти поєднаної дії ІР різного енергетичного діапазону та радіомодифікаторів хіміопрепаратів на накопичення ЦМ у пухлині Герена вивчені ще недостатньо. У зв'язку з цим метою роботи стало дослідження ефектів поєднаної дії іонізвнного випромінення та хіміопрепаратів на вміст індуктора апоптозу ЦМ у пухлині Герена.

Методика дослідження

Дослідження виконане з використанням піддослідних щурів-самиць лінії Вістар масою 160–180 г, під контролем комітету з біоетики ДУ «ІМР ім. С.П. Григор'єва НАМНУ». Усі досліді на тваринах виконували з дотриманням Міжнародних принципів Європейської конвенції про захист хребетних тварин, використовуваних 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-ту д після перещеплення пухлини, коли розміри пухлинного вузла досягали у діаметрі 1,5–2,0 см. Різниця в середньому об'ємі пухлини на момент початку експерименту не перевищувала 10 %.

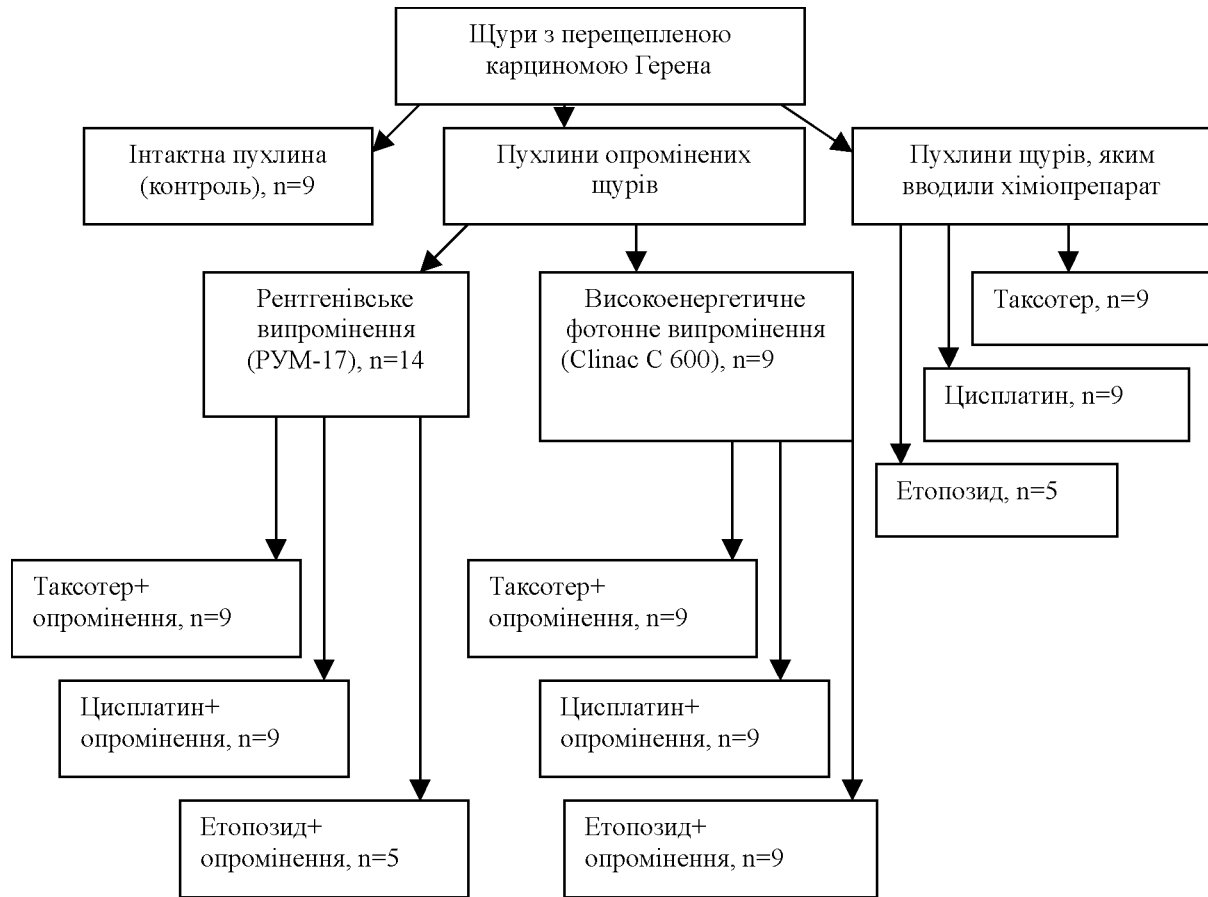
У першій серії експерименту опромінення пухлини проводили на апараті РУМ-17 (ікс-випромінення) за стандартних технічних умов: напруга — 190 кВ, сила струму — 10 мА, фільтри: 0,5 мм Сu плюс 1 мм Аl, коефіцієнт розподілу поглинутої дози у повітрі — 0,981 Гр/хв, фокусна відстань 30 см. Опромінювали фракційно при поглинутій дозі за фракцію 5 Гр, тривалість опромінення — 4 хв 39 с, з інтервалом між сеансами 24 год, сумарна поглинута доза на зону росту пухлини складала 10 Гр. У другій серії експерименту пухлини опромінювали на лінійному прискорювачі Clinac 600 С (високоенергетичне фотонне випромінення), сумарна поглинута доза на зону росту пухлини складала 10 Гр, енергія фотонів при цьому становила 6 МеВ, потужність дози — 400 МОд/хв, розмір поля 5 × 5 см, 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 внутріочеревинно за 24 год до першого сеансу опромінення в дозах: таксотер фірми «Рор Пуленок Рорер» — 8 мг/кг маси тіла, цисплатин фірми «Ебеве» — 6,0, етопозид фірми «Тева» — у дозі 8 мг/кг маси тіла. Знеживлювали тварин через 24 год після опромінення або введення хіміопрепарату.

Щоб визначити сфінголіпіди у тканині, пухлину гомогенізували в Н₂О для більш повного руйнування клітин, гомогенат використовували для екстракції ліпідів методом Фолча [12]. Сфінголіпіди розділяли за допомогою хроматографії в тонкому шарі силікагелю на комерційних пластинках Sorbfil (АО «Сорбполимер», Росія). Екстракти ліпідів, які використовували для аналізу сфінголіпідів, випаровували у вакуумі та інкубували 60 хв при 37°C 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 у системі розчинників: хлороформ-етилацетат-ізопропіловий спирт-метанол — 0,25 % KCl (25 : 25 : 25 : 10 : 9). Ліпіди проявляли в парах йоду, порівнюючи зі стандартами. Для ідентифікації ліпідів використовували стандарти ЦМ (Sigma). Результат виражали в нмоль/мг білка, його вміст у досліджуваних пробах визначали методом Лоурі [13].

Аналіз даних проводили за допомогою статистичних програм для ПК Biostat і Statistica, ver. 5, при викорис-

Відповідно до мети роботи схема експерименту мала такий вигляд:



танні непараметричних методів для малих вибірок та критерію Вілкоксона-Манна-Уїтні.

Результати та їх обговорення

У даній роботі вивчали радіобіологічні ефекти поєднаної дії ІВ різного енергетичного діапазону (рентгенівське та високоенергетичне фотонне випромінювання) та різних хіміопрепаратів (таксотер, цисплатин, етопозид) на рівень ЦМ у пухлині Герена. Вираженням синергічного характеру взаємодії є перевищення накопичення рівня ЦМ при поєднаній дії радіації і хіміопрепаратів порівняно із сумою ефектів їх окремої дії.

У дослідженнях першої серії експерименту вивчали дію ікс-випромінювання та хіміопрепаратів на вміст проапоптозного ліпиду ЦМ у пухлині Герена. Встановлено, що під впливом таксотеру, цисплатину або етопозиду цей показник зростав у 2,9, 2,5 та 4,6 рази відповідно, порівняно з контролем. Опромінювання пухлини, порівняно з контрольною групою, не призвело до вірогідних змін рівня ЦМ у пухлинній тканині. При поєднаній дії радіації та таксотеру рівень ЦМ підвищувався у

тканині Герена в 5,6 рази, при поєднанні з цисплатином — у 4,2, з етопозидом — у 7,5 порівняно з контрольною групою, та в 4,2; 3,1 і 5,7 рази відповідно, у порівнянні тільки з опромінюванням. Поєднання ІВ з хіміопрепаратами вірогідно підвищувало вміст ЦМ у тканині пухлини Герена відносно груп, яким було введено тільки хіміопрепарат: в 1,9 рази — з таксотером, в 1,6 — з цисплатином, 1,7 — із етопозидом.

Для оцінки ефектів радіомодифікації використовували коефіцієнт синергізму (Кс) [4], який визначали за відношенням ефекту накопичення ЦМ, що спостерігали при поєднаній дії, до суми ефектів роздільних взаємодій (опромінювання та хіміопрепарат). При поєднаній дії ікс-випромінювання та хіміопрепаратів (таксотер, цисплатин, етопозид) було виявлено посилення ефекту — синергізм дії, який перевищував розрахований адитивний ефект (ефект поєднаної дії дорівнює сумі ефектів кожного з агентів, незалежно від послідовності їх застосування). Коефіцієнт синергізму становив 1,3, 1,1 та 1,3 відповідно, тобто синергічний ефект перевищував ефект суми роздільних взаємодій (рисунк 1).

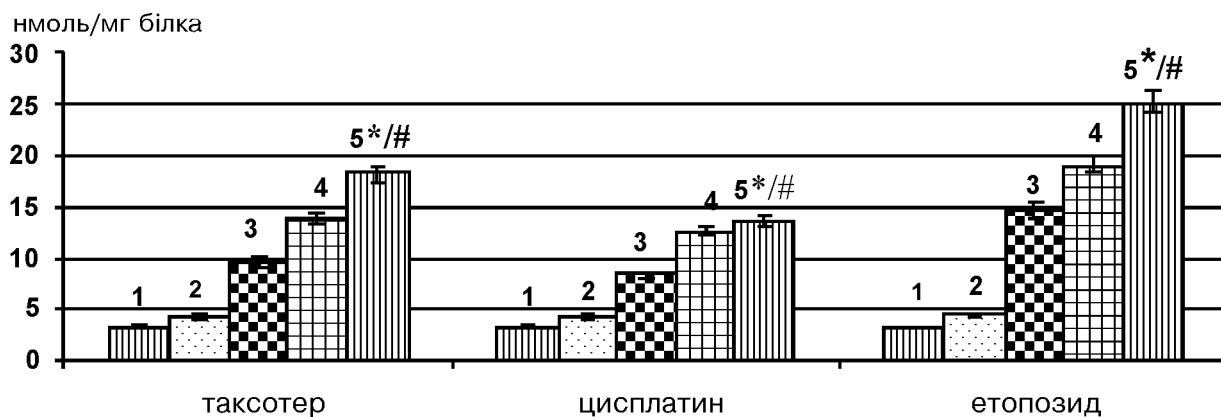


Рисунок 1. Синергізм при дії ікс-випромінювання і хіміопрепаратів.

Примітка. Тут і далі: По осі абсцис — хіміопрепарат. По осі ординат — вміст ЦМ у пухлині Герена. 1 — контроль, 2 — дія радіації, 3 — дія хіміопрепарату, 4 — розрахована адитивна дія, 5 — дія, яка спостерігається при поєднанні обох факторів. Вірогідність різниці: * — відносно контрольної групи, $p < 0,05$; # — відносно опромінення, $p < 0,05$.

Fig.1. Synergism of x-rays and chemotherapy. The axis of abscissa: chemotherapy drug. The axis of ordinates: CM content in Guerin's carcinoma. 1 - controls, 2 - effect of radiation, 3 - effect of chemotherapy, 4 - calculated additive effect, 5 - effect that occurs at combination of both.

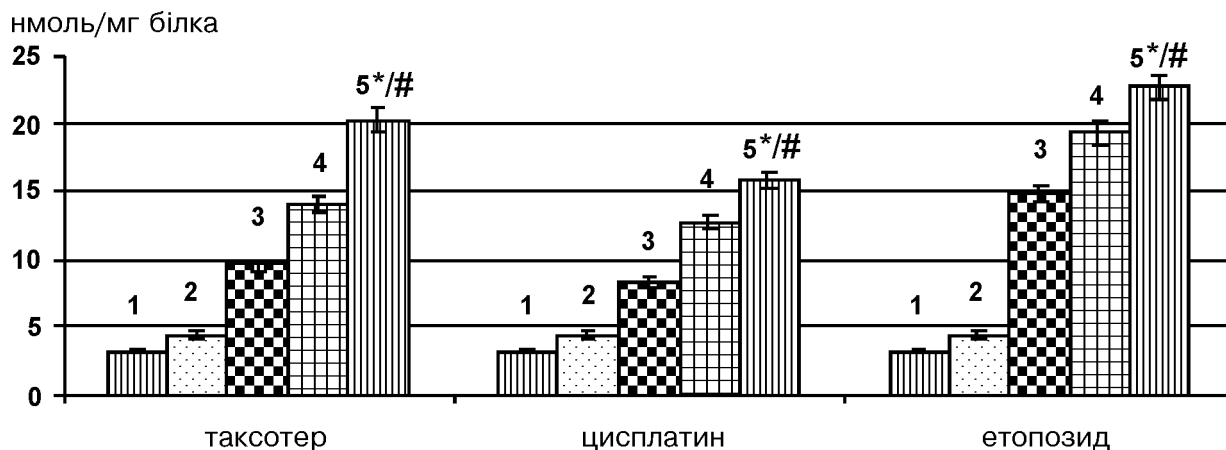


Рисунок 2. Синергізм при дії високоенергетичного фотонного випромінювання і хіміопрепаратів

Fig. 2. Synergism of high-energy photons and chemotherapy

Друга серія експерименту була присвячена вивченню ефектів дії високоенергетичного фотонного (ВЕФ) випромінювання та хіміопрепаратів (таксотер, цисплатин, етопозид) на вміст проапоптозного ліпиду ЦМ у пухлині Герена. Опромінення пухлини випромінюванням іншого енергетичного діапазону так само, як і в першій серії експерименту, не дало вірогідних змін рівня ЦМ у пухлинній тканині. Під впливом таксотеру, цисплатину або етопозиду рівень ЦМ у пухлині зростав у 2,9, в 2,5 та в 4,6 рази відповідно, порівняно з контрольною групою. При поєднаній дії ВЕФ-випромінювання та таксотеру вміст ЦМ у пухлинній тканині зростав у 6,3, із цисплатином — у 4,9 та з етопозидом — у 7,5 рази порівняно з контролем. Фракціоноване ВЕФ-опромінення, поєднане з хіміопрепаратами, приводило до зро-

стання рівня ЦМ у пухлині, у порівнянні з опроміненням, що здійснювалось окремо з таксотером у 4,5, з цисплатином — в 3,5 та при поєднанні опромінення і етопозиду — в 5 разів, а також в 2,1, в 1,9 та в 1,5 рази відповідно, відносно груп, яким вводили тільки хіміопрепарат.

Аналіз результатів поєданої дії ВЕФ-випромінювання та хіміопрепаратів показав, що ефект підвищення рівня ЦМ був синергічним при дії такого випромінювання в поєднанні з хіміопрепаратами. При дії радіації та таксотеру K_s становив 1,4, при поєднаній дії опромінення та цисплатину — 1,2, при дії опромінення та етопозиду — 1,2 (рисунок 2).

Зазначені ефекти в усіх серіях експерименту були однонаправленими — синергічними, що впливає з величин K_s , значення яких варіюва-

Література

1. Suresh S., Ramalinga K., Taofeek K. et al. // *Cancer j. clin.* – 2011. – Vol. 61. – P. 91–112.
2. Pirker R., Filipits M. // *Curr. Pharm. Des.* – 2009. – Vol. 15 (2). – P. 188–206.
3. *Рак легкого* / Пер. с англ.: под ред. П. Логригана. – М.: ООО «Рид Элсивер», 2009. – 196 с.
4. Акимова Е.Н., Зуева Е.П., Разина Т.Г. и др. // *Бюл. экпер. биол.* – 2003. – Прил. № 1. – С.16–19.
5. Кузин А.М. // *Изв. Сер. биол.* – 1983. – №4. – С. 8–12.
6. Белкина С.В., Комарова Л.Н., Крицкий Р.О. // *Радиаци. и риск.* – 2006. – Т. 15, № 34. – С. 120–134.
7. Carpinteiro A., Dumitru C., Schenck M., Gulbins E. // *Cancer Lett.* – 2008. – Vol. 264, № 1. – P. 1–10.
8. Reynolds C.P., Maurer B.J., Kolesnik R.N. // *Ibid.* – 2004. – Vol. 206. – P 169–180.
9. Modrak D. E., Gold D. V., Goldenberg D. M. // *Mol. Cancer Ther.* – 2006. – Vol. 5. – P. 200–208.
10. Сегеда Т.В., Мітряєва Н.А., Бакай Т.С., Гребіник Л.В. // *Вісник Львів. ун-ту. Сер. біол.* – 2012. – Вип. 60. – С. 111–116.
11. Мітряєва Н.А., Бакай Т.С., Бабенко Н.О., Сегеда Т.В. // *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. Lowry O., Rosebrough N., Farr A. // *Ibid.* – 1951. – Vol. 193. – P. 265–275.
14. Ярмоненко С.П. *Радиобиология человека и животных.* – М., 1984. – 376 с.

Надходження до редакції 21.10.2013.

Прийнято 31.10.2013.

Адреса для листування:
Сегеда Тетяна Валеріївна,
ДУ «Інститут медичної радіології ім. С.П. Григор'єва
НАМН України»,
вул. Пушкінська, 82, Харків, 61024, Україна

ло від 1,1 до 1,4 (див. рисунки 1, 2), тобто коефіцієнт синергізму перевищує 1.

У результаті поєднаної дії ікс-випромінення та таксотеру, цисплатину або етопозиду вміст ЦМ у пухлині підвищувався порівняно з окремою дією опромінення та хіміопрепарату. Зростає індекс ефекту [14] — відношення показників у досліді (ікс-випромінення з використанням модифікуючого агента) та в контролі (опромінення) в 4,2, 3,1 та 5,7 разу відповідно; при поєднанні високоенергетичного фотонного випромінення та етопозиду, таксотеру, цисплатину — в 5,0, 4,5 та 3,5 разу відповідно.

Таким чином, при дослідженні ефектів взаємодії випромінення різного енергетичного діапазону та хіміопрепаратів (таксотер, цисплатин, етопозид) на рівень ЦМ встановлено, що вони мали синергічний характер. Визначено однонаправленість сумарних ефектів — синергізму, при дії фракціонованого опромінення різного енергетичного діапазону та хіміопрепаратів. Наявність синергізму при комбінованій дії радіації і радіомодифікаторів приводить до висновку про їх значний внесок у формування кінцевих радіобіологічних ефектів, пов'язаних з індукцією керамідного апоптозу, і, таким чином, підвищенням радіочутливості пухлини.

Висновки

1. Доведено, що за умов поєднаної дії ІР та хіміопрепаратів, які є індукторами апоптозу, вміст проапоптозного ліпиду — ЦМ у пухлині Герена зростає: при поєднанні ікс-випромінення і таксотеру у 5,6 разу, цисплатину — в 4,2 та етопозиду — у 7,5 разу, порівняно з контрольною групою, і в 4,2, в 3,1 і в 5,7 разу відповідно, порівняно з групою в якій опромінення проводилось окремо; та при дії ВЕФ-випромінення і хіміопрепаратів у 6,3, в 4,9 та в 7,5 разу відповідно, порівняно з контролем та у 4,5, в 3,5 та в 5,0 відповідно, порівняно з самим опроміненням.

2. Доведено синергізм дії ІВ різного енергетичного діапазону та хіміопрепаратів на рівень ЦМ у пухлині Герена, що впливає з величин Кс, які перевищують 1.