

НАРУШЕНИЕ АККУМУЛЯЦИИ ЦЕРАМИДА В РЕЗИСТЕНТНОМ К ЦИКЛОФОСФАНУ СУБШТАММЕ ПЕРЕВИВАЕМОЙ ЛИМФОСАРКОМЫ МЫШИ

Евгения Владимировна МЕЛЬНИКОВА¹, Алевтина Юрьевна ГРИШАНОВА², Василий Иванович КАЛЕДИН³, Дмитрий Иванович КУЗЬМЕНКО⁴, Инна Олеговна ЛУКША⁴

¹ ГУ НИИ клинической и экспериментальной лимфологии СО РАМН

630177, Новосибирск, ул. Академика Тимакова, 2

² ГУ НИИ молекулярной биологии и биофизики СО РАМН

630177, Новосибирск, ул. Академика Тимакова, 2

³ ГУ НИИ цитологии и генетики СО РАН

630090, Новосибирск, пр. Академика Лаврентьева, 10

⁴ ГОУ ВПО Сибирский государственный медицинский университет Росздрава

634050, Томск, Московский тракт, 2

Определено содержание сфингомиелина, сфингозин-1 фосфата и церамида в клетках линейноспецифической лимфосаркомы мыши LS и ее нечувствительного к индукции апоптоза субштамма RLS после введения мышам-опухоленосителям циклофосфана. Выявлено накопление церамида в клетках LS и снижение его уровня в клетках RLS после воздействия циклофосфаном.

Ключевые слова: лимфосаркома, лекарственная устойчивость, сфинголипиды, апоптоз.

В злокачественных клетках выявлено множество механизмов, позволяющих им защищаться от токсического действия химиопрепаратов. В классической модели лекарственной устойчивости трансмембранный гликопротеин, называемый Р-гликопротеин, действует как помпа, выкачивающая лекарственные вещества из клетки, тем самым снижая их уровень до сублетальных концентраций. В других случаях лекарственная устойчивость достигается повышенной функциональной активностью MRP (multidrug-resistance protein; белок, подобный Р-гликопротеину), изменением активности топоизомеразы II и глутатион-S-трансфераз. Лекарственная устойчивость также может обеспечиваться экспрессией апоптоз-ассоциированных протеинов, в частности, белков семейства bcl-2 и белка – супрессора опухолевого роста, p53 [1].

Биоактивные сфинголипиды, такие как церамид, гликозилцерамид, сфингозин и сфингозин-1-фосфат, играют важную роль в различных аспектах канцерогенеза, участвуя в процессах апоптоза, клеточной пролиферации, миграции клеток и воспалении. Эти регулируемые сфинголипидами процессы являются критическими при злокачественной трансформации и прогрессии, влияют на эффективность противоопухолевой терапии [2]. Множество химиотерапевтических агентов, применяемых в клинике, включая этопозид, даунорубин,

винкристин, паклитаксел, вызывают апоптоз через церамид-опосредуемые пути [3]. Церамид участвует в остановке клеточного цикла, клеточной дифференцировке, апоптозе. Исследования последних лет показывают, что церамид может оказывать значительное влияние на эффективность различных видов противоопухолевой терапии. В частности, цитотоксический эффект от химиотерапии снижается при низком уровне синтеза церамида и повышается при блокировании его деградации [3]. Кроме того, у многих химиорезистентных клеток найдены дефекты в метаболизме сфинголипидов, лимитирующие накопление церамида под действием проапоптотических стимулов [3].

В отличие от церамида, обладающего проапоптотическими свойствами, сфингозин-1-фосфат, один из метаболитов церамида, напротив, блокирует апоптоз и стимулирует клеточную пролиферацию. Считается, что соотношение уровней церамида и сфингозин-1-фосфата в клетке является реостатом, отвечающим за выживание или гибель клетки [4].

Перевиваемая мышинная лимфосаркома (LS), индуцированная нитрозометилмочевойной у самца линии СВА [5], и ее резистентный субштамм (RLS) являются удачной моделью *in vivo* для изучения лекарственной устойчивости опухолей. Циклофосфан (ЦФ) в дозах от 25 до 50 мг/кг тормозит рост опухоли LS на 100% и вызывает ремиссию продолжительностью от 17

Мельникова Е.В. – н.с. лаборатории иммуноморфологии НИИКЭЛ, e-mail: gennyma@gmail.com

Гришанова А.Ю. – д.б.н., доцент, зав. лабораторией биохимии чужеродных соединений

Каледин В.И. – канд.б.н., старш.н.с.

Кузьменко Д.И. – д.м.н., профессор кафедры биохимии и молекулярной биологии

Лукша И.О. – аспирант

до 25 суток [5]. Доза ЦФ 100 мг/кг приводит к полному излечению животных с опухолью LS за счет апоптотической гибели опухолевых клеток [5]. У мышей с RLS лишь на некоторое время незначительно замедляется скорость роста опухоли даже при высоких дозах ЦФ [6].

Определение содержания сфинголипидов в опухолях LS и RLS представляет интерес в связи с их оппозитной чувствительностью к ЦФ.

Материал и методы исследования

Опыт проводили на 3–5-месячных самцах линии СВА, полученных из вивария Института цитологии и генетики СО РАН. Животных содержали в условиях естественного освещения при свободном доступе к воде и пище.

Используемые в опытах опухоли LS и RSL поддерживали в асцитной форме. Опухолевые клетки перевивали в мышцы бедра (10^6 клеток на мышь). Когда опухоли достигали размера 1 см в диаметре, мышам-опухоленосителям внутрибрюшинно вводили ЦФ («Биохимик», Россия) в дозе 100 мг/кг, препарат растворяли в изотоническом растворе NaCl. Контрольной группе вводили изотонический раствор NaCl. Через 24, 48 и 72 ч после введения ЦФ животных забивали цервикальной дислокацией под эфирным наркозом, извлекали опухоли и хранили в жидком азоте до выполнения анализа. В опыте использовали по 4–5 мышей в каждой группе.

Содержание сфингомиелина, церамида и сфингозин-1-фосфата в различных формах перевиваемой лимфосаркомы мыши определяли методом тонкослойной хроматографии. Для исследования брали по 200 мг опухолевой ткани и гомогенизировали в 1,8 мл 0,05 М трис-HCl буфера (pH 7,4). Гомогенаты фильтровали через 4 слоя марли и центрифугировали при 3000 об./мин в течение 10 мин. К осадку приливали 5 мл смеси Фолча (хлороформ:метанол

в соотношении 2:1) и инкубировали при постоянном перемешивании 10 мин при комнатной температуре. Смесь фильтровали через бумажные фильтры. Для очищения экстрактов от нелипидных примесей в каждую пробирку добавляли 1/5 часть от объема пробы 50 мМ раствора CaCl_2 и центрифугировали в течение 5 мин при 1000 об./мин. Верхний слой осторожно удаляли с помощью водоструйного насоса. Процедуру очистки экстрактов повторяли дважды. Очищенные экстракты выпаривали на водяной бане в пенициллиновых флаконах при температуре 70°C. Липидную пленку растворяли в 0,1 мл смеси хлороформ:метанол (1:1). Хроматографический анализ проводили на пластинах «Sorbfil» (ЗАО «Сорбполимер», Россия) в системе растворителей толуол/метанол в соотношении 7:3. На линию старта наносили по 5 мкл экстракта. После хроматографии пластинки высушивали и окрашивали 10% раствором фосфорномолибденовой кислоты в 96% этаноле. Для проявления окраски пластины сушили при температуре 70°C в течение 5 мин. В качестве свидетелей использовали стандартные растворы соответствующих сфинголипидов в хлороформе (1 мг/мл). Для количественной оценки изучаемых сфинголипидов хроматограммы сканировали с помощью стандартного компьютерного сканера и анализировали в программе Chrom 2.3.

Статистическую обработку полученных результатов проводили, используя пакет программ STATISTICA (ver. 6.0), применяя непараметрические критерии Крускала-Уоллиса и Манна-Уитни.

Результаты исследования

Опухоли LS и RLS не отличались по исходному уровню изучаемых сфинголипидов и количество сфингомиелина и сфингозин-1-фосфата не изменялось под действием ЦФ (табл.).

Таблица

Содержание сфингомиелина, сфингозин-1-фосфата и церамида в опухолях LS и RLS до и после воздействия циклофосфана

Опухоль	Время после введения ЦФ	Сфингомиелин	Сфингозин-1-фосфат	Церамид
		мкг/г опухолевой ткани		
LS	0 ч	0,82 (0,75; 0,93)	1,59 (1,16; 1,89)	0,66 (0,59; 0,69)
	24 ч	0,75 (0,64; 0,83)	1,44 (1,34; 1,62)	0,82 (0,79; 0,86)*
	48 ч	0,77 (0,68; 0,81)	1,50 (1,39; 1,77)	0,97 (0,86; 0,96)*
	72 ч	0,93 (0,86; 0,96)	1,56 (1,56; 1,64)	1,07 (0,94; 1,16)*
RLS	0 ч	0,83 (0,64; 0,89)	1,42 (1,30; 1,65)	0,72 (0,65; 0,79)
	24 ч	0,83 (0,37; 0,91)	1,57 (1,22; 1,76)	0,58 (0,53; 0,63)**
	48 ч	0,67 (0,58; 0,75)	1,40 (1,32; 1,57)	0,77 (0,69; 0,86)
	72 ч	0,73 (0,63; 0,81)	1,50 (1,24; 1,52)	0,36 (0,33; 0,41)***

Примечание: в таблице приведены значения величин медианы, в скобках — 25-го и 75-го процентилей.

* — $p < 0,03$, ** — $p < 0,04$, *** — $p < 0,008$ — при сравнении с соответствующим контролем.

В опухоли LS церамид постепенно накапливался под действием ЦФ, что свидетельствовало об индукции препаратом церамид-зависимого апоптоза в клетках этой опухоли. Следует отметить, что пик апоптотической гибели клеток LS зафиксирован через 72 ч после введения ЦФ мышам-опухоленосителям [7], в этот же период наблюдался максимальный уровень церамида в клетках этой опухоли. Аккумуляция церамида возможна через активацию синтеза *de novo* церамидсинтетазой и серинпальмитолсинтетазой или через активацию гидролиза сфингомиелина [8]. Исходя из того, что уровень сфингомиелина в опухоли LS после введения циклофосфана мышам-опухоленосителям не снижался (см. табл.), накопление церамида в клетках этой опухоли происходило за счет синтеза *de novo*.

В опухоли RLS отмечено снижение уровня церамида ниже контрольного через 24 и 72 ч после воздействия ЦФ. По-видимому, в этой опухоли снижался синтез церамида либо усиливался его гидролиз и /или гликозилирование.

Возможно, в клетках RLS существуют дефекты в метаболизме сфинголипидов, лимитирующие накопление церамида под действием проапоптотических стимулов, индуцируемых ЦФ, что может в значительной степени влиять на устойчивость клеток этой опухоли к химиотерапии.

Литература

1. Ставровская А.А. Клеточные механизмы множественной устойчивости опухолевых клеток // Биохимия. 2000. 65 (1): 112-116.

Stavrovskaya A.A. Cellular mechanisms of multiple

resistance of tumor cells // Biokhimiya. 2000. 65 (1): 112-116.

2. Ogretmen B., Hannum Y.A. Biologically active sphingolipids in cancer pathogenesis and treatment // Nat. Rev. Cancer. 2004. 4: 604-616.

3. Senchenkov A., Litvak D.A., Cabot M.C. Targeting ceramide metabolism — a strategy for overcoming drug resistance // J. Nat. Cancer Inst. 2001. 93 (5): 347-357.

4. Tilly J.L., Pru J.K., Rueda B.R. Apoptosis and follicular atresia // The Ovary, 2d ed. Leung P., Adashi E. (eds.). Elsevier Science, 2004. 321-352.

5. Каледин В.И., Николлин Н.П., Агеева Т.А. и др. Циклофосфамид-индуцированный апоптоз клеток мышинной лимфосаркомы в условиях *in vivo* // Вопросы онкологии. 2000. 46 (5): 588-593.

Kaledin V.I., Nikolin N.P., Ageeva T.A. etc. Cyclophosphamide induced apoptosis of cells of mice' lymphosarcoma *in vivo*. // Voprosy onkologii. 2000. 46 (5): 588-593.

6. Каледин В.И., Попова Н.А., Андреева Е.М. Изучение эффективности моно- и полихимиотерапии на модели перевиваемой мышинной лимфосаркомы, нечувствительной к индукции апоптоза // Вопросы онкологии. 2006. 52 (1): 70-73.

Kaledin V.I., Popova N.A., Andreeva E.M. Study of effectiveness of mono- and poly-chemotherapy by the model of transplantable mice limphosarcoma resistant to apoptosis induction // Voprosy onkologii. 2006. 52 (1): 70-73.

7. Гришанова А.Ю., Мельникова Е.В., Каледин В.И. и др. Возможная роль Р-гликопротеина в устойчивости к циклофосфамиду перевиваемой мышинной лимфосаркомы // Бюлл. exper. биол. и мед. 2005. 139 (5): 573-577.

Grishanova A.Yu., Melnikova E.V., Kaledin V.I. etc. Possible role of P-glycoprotein in resistance of transplantable mice limphosarcoma to Cyclophosphamide // Byul. eksper. biol. 2005. 139 (5): 573-577.

8. Taha T.A., Mullen T.D., Obeid L.M. A house divided: ceramide, sphingosine, and sphingosine-1-phosphate in programmed cell death // Biochim. Biophys. Acta. 2006. 1758: 2027-2036.

CERAMIDE ACCUMULATION DISTURBANCE IN TRANSPLANTABLE CYCLOPHOSPHAMIDE-RESISTANT LYMPHOSARCOMA OF MICE

Evgeniya Vladimirovna MELNIKOVA¹, Alevtina Yurievna GRISHANOVA², Vasiliy Ivanovich KALEDIN³, Dmitry Ivanovich KUZMENKO⁴, Inna Olegovna LUKSHA⁴

¹ SI RI of clinical and experimental lymphology of SB RAMS

2, Ac. Timakov str., Novosibirsk, 630117

² SI RI of molecular biology and biophysics of SB RAMS

2, Ac. Timakov str., Novosibirsk, 630117

³ SI RI of cytology and genetics of SB RAS

10, Ac. Lavrentiev str., Novosibirsk, 630090

⁴ Siberian State Medical University of Roszdrav

2, Moscow trakt, Tomsk, 634050

The content of sphingomyelin, sphingosine-1-phosphate and ceramide in strain-specific mice lymphosarcoma LS and its resistance to an induction of apoptosis form RLS after treatment of tumor-bearing mice with cyclophosphamide has been determined. The accumulation of ceramide in LS tumor cells and decrease of its level in RLS ones under cyclophosphamide action has been revealed.

Key words: lymphosarcoma, drug resistance, sphingolipids, apoptosis.

Melnikova E.V. — researcher of laboratory of immune morphology, e-mail: gennyma@gmail.com

Grishanova A.Y. — doctor of Biological Sciences, docent, head of laboratory of foreign compounds

Kaledin V.I. — candidate of Biological Sciences, senior researcher of Institute for cytology and genetics

Kuzmenko D.I. — doctor of Medical Sciences, professor of chair of biochemistry and molecular biology

Luksha I.O. — post-graduate student