

4. Пат. № 1289440 А1 СССР, А 61 К37/22. Способ получения фосфолипидов / Д. А. Мельничук, В. К. Лишко, А. В. Стефанов, В. Н. Кириленко и др. – Заявл. 23.01.85; Оpubл. 15.02.87.
5. Усатюк П. В., Мельничук Д. О. Отримання апікальних та базолатеральних мембран епітелію тонкого кишечника. Методичні аспекти // Укр. біохім. журн. – 1995. – **67**, № 5. – С. 16–24.
6. Lowry O. H., Rosebrough N. F., Farr A. L. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent // J. Biol. Chem. – 1951. – **193**, No 1. – P. 265–275.
7. Цвильховський Н. И., Усатюк П. В., Мельничук Д. А. Выделение, очистка и характеристика щеточной каймы и базолатеральных мембран из клеток кишечного эпителия крупного рогатого скота // Укр. биохим. журн. – 1988. – **60**, № 6. – С. 91–94.
8. Добрецов Г. Е. Флуоресцентные зонды в исследовании клеток, мембран и липопротеидов. – Москва: Наука, 1989. – 277 с.
9. Демченко А. П. Люминесценция и динамика структуры белков. – Киев: Наук. думка, 1988. – 280 с.
10. Фоменко Б. С., Длмбетова Г. К., Акоев И. Г. Индуктивно-резонансный перенос энергии между хромофорами, локализованными в разных участках облученных и необлученных теней эритроцитов // Радиобиология. – 1985. – **25**, № 1. – С. 12–15.
11. Литвинов И. С., Образцов В. В. Изучение вязкости свободных и связанных с белком липидов в мембранах // Биофизика. – 1982. – **26**, вып. 1. – С. 81–85.
12. Лактович Дж. Основы флуоресценции спектроскопии. – Москва: Мир, 1986. – 236 с.
13. Владимиров Ю. А., Добрецов Г. Е. Флуоресцентные зонды в исследовании биологических мембран. – Москва: Наука, 1980. – 320 с.
14. Шустанова Т. А., Милюткина Н. П., Бондаренко Т. И. Биологические мембраны. – 2001. – **18**, № 5. – С. 375–381.

Національний аграрний університет, Київ  
 Київський національний університет  
 ім. Тараса Шевченка

Надійшло до редакції 08.11.2006

УДК 616.441.-006.6-092.9:615.252

© 2007

Член-кореспондент НАН України М. Д. Тронько, В. В. Пушкарьов,  
 О. І. Ковзун, В. М. Пушкарьов

## Стимуляція протипухлинним препаратом таксоллом клітинного циклу (G1/S перехід) в клітинах анапластичного раку щитовидної залози

*The effect of antitumor drug, taxol, on the activity of cell cycle regulatory factors in two cell lines of anaplastic thyroid cancer ARO and KTC-2 is studied. It is shown that taxol enhances the phosphorylation of retinoblastoma protein, pRB, in both cell lines. The taxol addition to the incubation medium in 6 h of incubation induced a significant decrease of the level of the inhibitor of cyclin-dependent kinases (CDK) and G1/S progression – p27<sup>KIP1</sup>. The level of another CDK inhibitor, p21<sup>waf1</sup>, was also decreased but after 12 h of incubation. These results indicate that the low concentration of taxol stimulates the early cell cycle stages in thyroid anaplastic cancer cells.*

Анапластичний рак щитовидної залози (ЩЗ) є досить рідкою (до 10% від усіх злоякісних новоутворень щитовидної залози), але найбільш агресивною формою раку людини з поганим прогнозом [1, 2].

Таксол (паклітаксель, доцетаксель) — протипухлинний препарат, який успішно використовується для лікування раку легень, молочної залози, простати, яєчників, голови та шиї [3, 4]. Робляться спроби розширити коло типів злоякісних пухлин, для терапії яких міг би використовуватися таксол. Вивчається можливість його застосування і для лікування анапластичного раку ШЗ [5].

Для підвищення ефективності протипухлинної дії таксолу необхідне розуміння суті біохімічних процесів, які активуються під впливом таксолу в трансформованих клітинах ШЗ. Відомо, що таксол викликає гіперполяризацію мікротрубочок, що, в свою чергу, призводить до порушення клітинного циклу [6, 7]. Проте конкретні механізми впливу препарату на клітинний цикл на сьогодні невідомі.

Метою роботи було вивчення впливу таксолу на початкові стадії клітинного циклу в клітинах двох ліній анапластичного раку ШЗ людини — ARO та KTC-2. Клітини культивували у середовищі RPMI-1640, що містило 5% бичачої сироватки, 1% пеніциліну/стрептоміцину, в атмосфері з 5% CO<sub>2</sub> при 37 °C протягом 2 діб, промивали 2 рази PBS-буфером (80 мМ ортофосфат натрію однозаміщений, 20 мМ ортофосфат натрію двозаміщений, 100 мМ хлорид натрію, рН 7,4) та замінювали середовище. Через 24 год вносили розчинений у диметилсульфоксиді (ДМСО) таксол фірми “Wako Chemicals” (Японія) і збирали клітини через визначені проміжки часу. В контрольні проби вносили в такій самій кількості ДМСО. По закінченні інкубації клітини двічі промивали холодним (2 °C) буфером PBS, що містив пірофосфат та ортованадат натрію, збирали в 1 мл буфера PBS та осаджували протягом 3 хв при 1000 об/хв і 2 °C. Одержання клітинних білків та імуноблотинг проводили за методикою, описаною раніше [8]. Антитіла до фосфоформ білка ретинобластоми та інгібіторів циклінзалежних кіназ p27<sup>KIP1</sup> й p21<sup>waf1</sup> від фірми “Cell Signaling Technology” (США). Комплекси білків з антитілами візуалізували за допомогою реагента ECL (“Amersham Life Science”, Велика Британія).

Початковим етапом входу в S-фазу клітинного циклу (реплікація ДНК) є каскадне фосфорилування супресора пухлин, негативного регулятора клітинного росту — білка ретинобластоми (pRB) й так званих pocket — білків p107 й p130, комплексами циклін-циклінзалежна кіназа (CDK), а саме комплексом циклін D-CDK4/6 [9]. На другому етапі комплекс циклін E-CDK2 фосфорилує pRB по інших амінокислотних залишках. У результаті такого фосфорилування зменшується спорідненість pRB до сімейства факторів транскрипції E2F, які відіграють центральну роль у переході з G1-фази до S-фази [10]. Активація E2F, у свою чергу, призводить до ініціації транскрипції, посилення експресії генів циклінів, CDK та інших факторів, які беруть участь в позитивній регуляції клітинного циклу і визначають проходження контрольної точки (точки звороту) G1/S та вхід у S-фазу циклу.

З рис. 1, 1 й 2 видно, що під впливом низьких, таких що індукують апоптоз [11], доз таксолу (20 нМ) у клітинах ARO та KTC-2 спостерігається посилення фосфорилування pRB по залишках серину в положенні як 795, так і 807/811. Таке інтенсивне фосфорилування може свідчити про суттєву активацію комплексів факторів транскрипції E2F з ДНК-полімеразою (E2F/DP) за цих умов. Включення фосфату в Ser<sub>795</sub> посилюється вже через 6 год інкубації клітин з таксолем, фосфорилування по залишках в положенні 801/811 починається з 12 год інкубації. Певно, ці процеси відбуваються послідовно і є першими двома каскадами фосфорилування. В клітинах ARO максимальна інтенсивність фосфорилування спостерігається через 24 год після початку інкубації з таксолем і дещо знижується до 36 год (рис. 1, 1, 2).

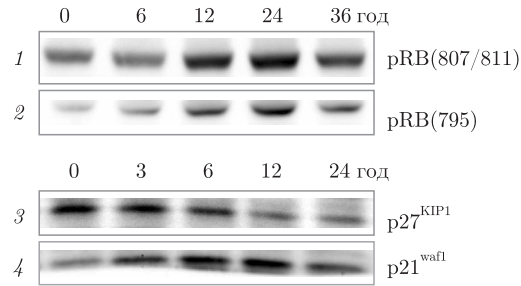


Рис. 1. Вплив низьких (20 нМ) концентрацій таксолу на фосфорилування білка ретинобластоми (1, 2) та кількість інгібіторів CDK та G1/S переходу, p27<sup>KIP1</sup> (3) і p21<sup>waf1</sup> (4), у клітинах анапластичного раку щитовидної залози ліній ARO (1, 2, 4) і KTC-2 (3). (Представлені дані типового дослідження з трьох.)

Одночасно с фосфорилуванням pRB у клітинах обох ліній анапластичного раку, починаючи з 6 год після внесення таксолу до середовища, помітно зменшується кількість інгібітора CDK та G1/S переходу, p27<sup>KIP1</sup> (рис. 1, 3), ймовірно внаслідок протеолізу після його фосфорилування комплексом циклін E/CDK2 [12]. Деградація p27<sup>KIP1</sup>, що зв'язує комплекси циклін E/CDK2 і циклін A/CDK2, які відіграють важливу роль у пізній G1-фазі та S-фазі, створює передумови для проходження цих фаз клітинного циклу. На відміну від p27<sup>KIP1</sup> кількість іншого важливого інгібітора CDK, p21<sup>waf1</sup>, зростає у перші години інкубації з таксолем і тільки після 12 год помітно зменшується (рис. 1, 4). Це можна пояснити тим, що на перших стадіях циклу p21<sup>waf1</sup> виконує транспортну функцію, стимулюючи перехід комплексів циклін D-CDK4/6 в ядро [13] і тільки потім, після розпаду цих комплексів, проявляє свої інгібіторні властивості щодо комплексів циклін E-CDK2 та циклін A-CDK2. Факт стабілізації таксолем білка p53 та стимуляції утворення залежного від нього білка p21<sup>waf1</sup> був продемонстрований на кількох клітинних лініях пухлин [14].

Таким чином, у присутності низької концентрації таксолу, з одного боку, посилюється фосфорилування білка ретинобластоми, що призводить до звільнення і активації транскрипційного чинника E2F, з іншого — зменшується кількість інгібітора G1/S переходу, p27<sup>KIP1</sup>, та інгібітора CDK, p21<sup>waf1</sup>, що разом дає підстави стверджувати про стимуляцію цим антимітотиком початкових стадій клітинного циклу. Значення такої стимуляції поки що невідоме, але можна припустити, що проходження циклу є необхідною умовою апоптозу. Таксол у концентраціях, які зупиняють цикл (50–1000 нМ), індукує в клітинах анапластичного раку щитовидної залози вже не апоптоз, а некротичні зміни [15]. Суперечність між зупинкою таксолем G2/M переходу і стимуляцією G1/S переходу та конкретні механізми, що пов'язують ефект таксолу щодо клітинного циклу з індукованим ним апоптозом, ще потребують з'ясування.

1. Богданова Т. И., Козырицкий В. Г., Тронько Н. Д. Патология щитовидной железы у детей: Атлас. — Киев: Чернoбыльинтеринформ, 2000. — 280 с.
2. Nix P. A., Nicolaides A., Coatesworth A. P. Thyroid cancer review 3: management of medullary and undifferentiated thyroid cancer // Int. J. Clin. Pract. — 2006. — 60, No 1. — P. 80–84.
3. Rowinsky E. K. The development and clinical utility of the taxane class of antimicrotubule chemotherapy agents // Ann. Rev. Med. — 1997. — 48. — P. 353–374.
4. Li Y., Okegawa T., Lombardi D. P. et al. Enhanced transgene expression in androgen independent prostate cancer gene therapy by taxane chemotherapeutic agents // J. Urol. — 2002. — 167, No 1. — P. 339–346.
5. Copland J. A., Marlow L. A., Kurakata S. et al. Novel high-affinity PPARgamma agonist alone and in combination with paclitaxel inhibits human anaplastic thyroid carcinoma tumor growth via p21WAF1/CIP1 // Oncogene. — 2006. — 25, No 16. — P. 2304–2317.

6. Jordan M. A., Wilson L. Microtubules as a target for anticancer drugs // Nat. Rev. Canc. – 2004. – 4. – P. 253–265.
7. Тронько М. Д., Пушкарьов В. М. Механізм дії таксолу та перспективи його використання для лікування злоякісних пухлин щитоподібної залози // Ендокринологія. – 2003. – 8, № 2. – С. 228–243.
8. Пушкарьов В. М., Ковзун О. І., Тронько М. Д. та ін. Участь фосфоінозитидів, протеїнкіназ С та А у передачі регуляторного сигналу  $K^+$  в адренокортикальних клітинах людини // Укр. біохім. журн. – 2005. – 77, № 1. – С. 65–71.
9. Копнин Б. П. Мишени действия онкогенов и опухолевых супрессоров: ключ к пониманию базовых механизмов канцерогенеза // Биохимия. – 2000. – 65, № 1. – С. 5–33.
10. Russo A. J., Magro P. G., Hu Z. et al. E2F-1 overexpression in U2OS cells increases cyclin B1 levels and cdc2 kinase activity and sensitizes cells to antimetabolic agents // Cancer Res. – 2006. – 66, No 14. – P. 7253–7260.
11. Тронько М. Д., Левчук Н. І., Попадюк І. Д. та ін. Дія протипухлинного препарату таксолу на клітини анапластичного раку щитовидної залози // Доп. НАН України. – 2006. – № 8. – С. 204–206.
12. Sherr C. J., Roberts J. M. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression // Genes and Development. – 1999. – 13. – P. 1501–1512.
13. Sherr C. J. The Pezcoller lecture: cancer cell cycles revisited // Cancer Res. – 2000. – 60. – P. 3689–3695.
14. Blagosklonny M. V., Schulte T. W., Nguyen P. et al. Taxol induction of p21WAF1 and p53 requires c-raf-1 // Cancer Res. – 1995. – 55, No 20. – P. 4623–4626.
15. Pushkarev V. M., Starenki D. V., Saenko V. A. et al. Molecular mechanisms of the effects of low concentrations of taxol in anaplastic thyroid cancer cells // Endocrinology. – 2004. – 145, No 7. – P. 3143–3152.

Інститут ендокринології та обміну речовин  
ім. В. П. Комісаренка АМН України, Київ

Надійшло до редакції 27.10.2006

УДК 576.535.2

© 2007

Є. З. Філяк, О. С. Філяк, С. І. Сушельницький,  
член-кореспондент НАН України Р. С. Стойка

## Протеоміка активації Т-лімфоцитів мишей, позбавлених гена *pttg*

*T lymphocytes play a key role in functioning the immune systems of a man and other mammals. We found 18 proteins, whose expression was changed in pttg-knockout T lymphocytes as compared with wild-type T lymphocytes. We showed that pttg-knockout was accompanied by a decreased expression of interleukin-4 and an enhanced expression of interferon-gamma in activated T lymphocytes.*

Онкоген *pttg* (Pituitary Tumor Transforming Gene) вперше був виявлений у пухлинних клітинах гіпофіза щура в 1997 р. На сьогодні відомо, що цей ген активно експресується в пухлинних клітинах гіпофіза (більше ніж 90% випадків аденом гіпофіза), але майже не експресується в нормальних клітинах, що дозволяє вважати його одним із найкращих маркерів пухлин (аденом) гіпофіза [1, 2]. Результати проведених досліджень вказують на те, що надмірна експресія продукту цього гена — білка РТТГ — добре корелює зі злоякісною трансформацією клітин також в інших видах пухлин, зокрема при раку щитоподібної залози, молочної залози, прямої кишки та багатьох інших [1, 2]. Кількість повідомлень щодо ролі