

**В. В. Пушкарьов, О. І. Ковзун, В. М. Пушкарьов, О. А. Стаценко,**  
член-кореспондент НАН України **М. Д. Тронько**

## **Дія паклітакселу на стійку до препарату лінію клітин анапластичного раку щитоподібної залози КТС-3**

*Вивчено дію протипухлинного засобу паклітакселу на клітини стійкішої до препарату порівняно з іншими лініями раку щитоподібної залози КТС-3. Показано, що у присутності паклітакселу в пухлинних клітинах активація апоптозних процесів виявляється через 18 год після початку інкубації. Можливим механізмом ініціації апоптозу є активація транскрипційного чинника ATF-2 та фосфорилування Bcl-2 в умовах зупинки клітинного циклу.*

Більшість ліній анапластичного раку щитоподібної залози (АТС) характеризуються високою чутливістю до паклітакселу — високоефективного препарату, що успішно використовується для лікування деяких форм раку [1]. Показано, що паклітаксел ініціює в пухлинних клітинах щитоподібної залози апоптозні процеси, які призводять до їх загибелі [2]. Проте є клітинні лінії, які виявляють значну стійкість до дії препарату, до яких належать клітини КТС-3. Дослідження механізмів дії паклітакселу на стійкі клітини має велике значення для розробки способів пригнічення механізмів, які беруть участь у набутті резистентності клітин до цього протипухлинного препарату.

Метою дослідження було вивчення дії паклітакселу на клітини найстійкішої лінії анапластичного раку щитоподібної залози, КТС-3.

Клітини КТС-2 та КТС-3 були одержані з Медичного університету Кавасакі (Окіяма, Японія). Клітини культивували в середовищі RPMI-1640, що містило 5% бичачої сироватки, 1% пеніциліну/стрептоміцину, в атмосфері з 5% CO<sub>2</sub> при 37 °С протягом 2 діб, промивали 2 рази PBS-буфером (80 мМ ортофосфат натрію однозаміщений, 20 мМ ортофосфат натрію двоаміщений, 100 мМ хлорид натрію, рН 7,4) і 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 такий же кількості ДМСО. По закінченні інкубації клітини двічі промивали холодним (2 °С) буфером PBS, що містив пірофосфат та ортованадат натрію, збирали в 1 мл буфера PBS і осаджували протягом 3 хв при 1000 об/хв і 2 °С. Одержання клітинних білків та вестерн-блотинг проводили за методикою, що описана раніше [2]. У дослідженні використано поліклональні антитіла до ПАРП (полі-АДФ-рибозо-полімераза), фосфоформ білків Bcl-2, ATF-2, pRb, мічені пероксидазою хрому вторинні антитіла від фірми “Cell Signaling Technology” (США). Комплекси білків з антитілами візуалізували за допомогою реагенту ECL (“Amersham Life Science”, Велика Британія). Визначення виживаності клітин анапластичного раку проводили, культивуючи клітини в 96-лункових планшетах з плоским дном у середовищі RPMI-1640, що містило 5% FBS. Суспензію клітин (100 мкл, 1000 клітин) вносили в лунки і інкубували протягом 24 год. Паклітаксел, розчинений у ДМСО, додавали в об’ємі 10 мкл у концентраціях, що зростали, по 6 лунок на кожну концентрацію. У контрольні проби додавали у такий же кількості ДМСО. Після інкубації в лунки додава-

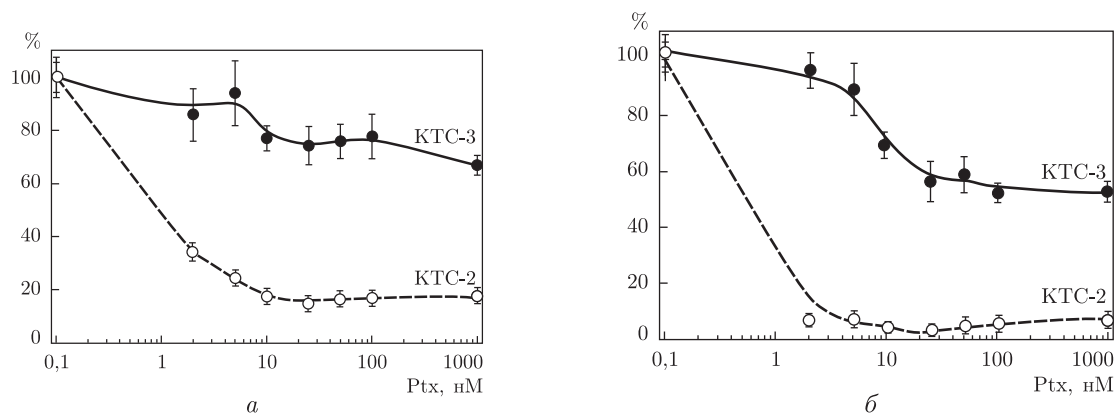


Рис. 1. Вплив паклітакселу (Ptx) на виживаність клітин анапластичного раку ліній КТС-2 та КТС-3. *a* – 48 год, *б* – 72 год інкубації. За 100% приймали виживаність клітин у пробах без паклітакселу.  $M \pm SD$ ,  $n = 6$

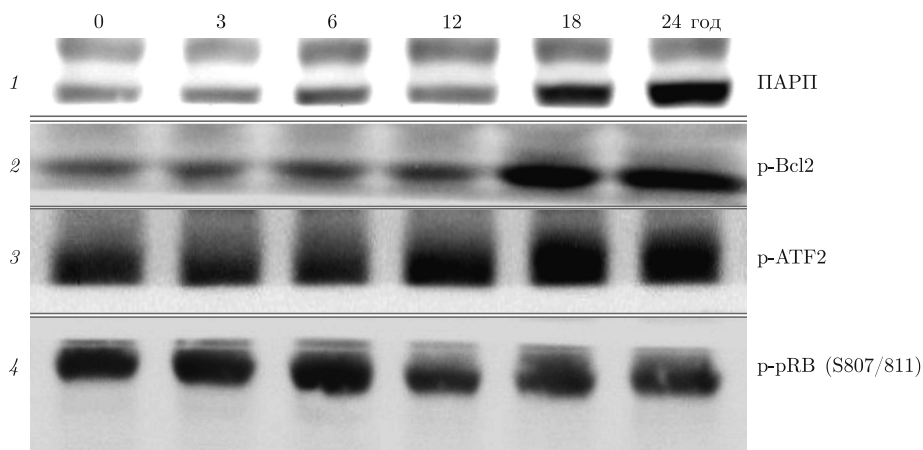


Рис. 2. Залежність інтенсивності розщеплення ПАРП (1), фосфорилювання антиапоптозного білка Bcl-2 (2), транскрипційного чинника ATF-2 (3) та пухлинного супресора pRb (4) від часу інкубації клітин КТС-3 з 25 нМ паклітакселу

ли по 11 мкл розчину з набору для підрахунку клітин (ССК-8, Dojin, Японія), інкубували протягом 1 год при 37 °С і вимірювали оптичну густина при 450 нм.

Паклітаксел викликає дозозалежну загибель клітин АТС (рис. 1). Проте порівняння ліній КТС-2 та КТС-3 показало, що остання клітинна лінія є набагато стійкішою. Через 48 год інкубації з паклітакселом кількість клітин КТС-2, що вижили, становила менше 20%, через 72 год – їх кількість знижувалася до 4%. Водночас для клітин КТС-3 відмічено зниження виживаності тільки на 30–40% через 48 год інкубації з препаратом і на 50% через 72 год (див. рис. 1).

Причиною загибелі клітин анапластичного раку є індуковані паклітакселом апоптозні та некротичні процеси. Аналіз біохімічних механізмів апоптозу показав, що розщеплення білка ПАРП, яке здійснюється каспазою-3 і є свідченням незворотності апоптозних процесів, починається через 18 год інкубації (рис. 2, 1), тоді як у клітинах КТС-2 цей процес стартує починаючи з 12 год [2]. Можливим механізмом ініціації апоптозу в пухлинних клітинах є фосфорилювання антиапоптозного білка Bcl-2, яке призводить до його інактивації

та деградації в протеасомах [3–5]. З рис. 2, 2 видно, що фосфорилювання Bcl-2 збігається у часі з розщепленням ПАРП. Одночасно активується транскрипційний фактор ATF-2 (див. рис. 2, 3), який є кінцевою ланкою проапоптозних сигнальних каскадів і фосфорилюється ключовими протеїнкіназами JNK та p38MAPK [6–8].

Вивчення активності пухлинного супресора — білка ретинобластоми pRb, який контролює вхід клітини у фазу синтезу клітинного циклу (G1/S перехід), показало, що у перші 6 год фосфорилювання pRb по 807/811 залишках серину помітно посилюється (див. рис. 2, 4). Це свідчить про інактивацію супресора і вказує на певні мітогенні властивості паклітакселу, який сприяє прогресу клітинного циклу. Після 6 год інкубації клітин з препаратом спостерігається зворотний процес — активація pRb, яка свідчить про гальмування або повну зупинку клітинного циклу. Звертає на себе увагу той факт, що активація білка ретинобластоми збігається у часі з активацією ATF-2, фосфорилюванням Bcl-2 та розщепленням ПАРП.

Таким чином, причиною стійкості клітин КТС-3 до паклітакселу, можливо, є запізнена, порівняно з клітинами інших ліній, активація апоптозних процесів, а тригерним механізмом такої активації може бути зупинка клітинного циклу.

1. Jordan M. A., Wilson L. Microtubules as a target for anticancer drugs // *Nat. Rev. Canc.* – 2004. – 4. – P. 253–265.
2. Pushkarev V. M., Starenki D. V., Saenko V. A. et al. Molecular mechanism of the effects of low concentrations of taxol in anaplastic thyroid cancer cells // *Endocrinology.* – 2004. – 145, No 7. – P. 3143–3152.
3. Labi V., Grespi F., Baumgartner F., Villunger A. Targeting the Bcl-2-regulated apoptosis pathway by BH3 mimetics: a breakthrough in anticancer therapy? // *Cell Death Diff.* – 2008. – 15. – P. 977–987.
4. Skommer J., Wlodkowic D., Deptala A. Larger than life: Mitochondria and the Bcl-2 family // *Leukemia Res.* – 2007. – 31. – P. 277–286.
5. Geng F., Tang L., Li Y. et al. Allyl isothiocyanate arrests cancer cells in mitosis, and mitotic arrest in turn leads to apoptosis via BCL-2 phosphorylation // *J. Biol. Chem.* – 2011. – 286. – P. 32259–32267.
6. Btaouri H., Morjani H., Greffe Y. et al. Role of JNK/ATF-2 pathway in inhibition of thrombospondin-1 (TSP-1) expression and apoptosis mediated by doxorubicin and camptothecin in FTC-133 cells // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2011. – 1813, No 5. – P. 695–703.
7. Hassan M., Feyen O., Grinstein E. Fas-induced apoptosis of renal cell carcinoma is mediated by apoptosis signal-regulating kinase 1 via mitochondrial damage-dependent caspase-8 activation // *Cell. Oncol.* – 2009. – 31, No 6. – P. 437–456.
8. Selimovic D., Hassan M., Haikel Y., Hengge U. R. Taxol-induced mitochondrial stress in melanoma cells is mediated by activation of c-Jun N-terminal kinase (JNK) and p38 pathways via uncoupling protein 2 // *Cell Signal.* – 2008. – 20, No 2. – P. 311–322.

ДУ “Інститут ендокринології та обміну речовин  
ім. В. П. Комисаренка НАМН України”, Київ

Надійшло до редакції 23.12.2011

**В. В. Пушкарев, Е. І. Ковзун, В. М. Пушкарев, А. А. Стаценко,**  
член-корреспондент НАН України **Н. Д. Тронько**

### **Действие паклитаксела на устойчивую к препарату линию клеток анапластического рака щитовидной железы КТС-3**

*Изучено действие противоопухолевого средства паклитаксела на клетки более устойчивой к препарату по сравнению с другими линии рака щитовидной железы КТС-3. Показано, что в присутствии паклитаксела в опухолевых клетках активация апоптотических процессов проявляется через 18 ч после начала инкубации. Возможным механизмом инициации апоптоза является активация транскрипционного фактора ATF-2 и фосфорилирование Bcl-2 в условиях остановки клеточного цикла.*

**V. V. Pushkarev, O. I. Kovzun, V. M. Pushkarev, O. A. Statsenko,**  
Corresponding Member of the NAS of Ukraine **M. D. Tronko**

**Paclitaxel action on thyroid anaplastic cancer cell line KTC-3 stable to drug**

*The effects of antitumoral drug paclitaxel on a more stable — comparing to others — cell line KTC-3 of thyroid anaplastic cancer are studied. It is shown that, in the presence of paclitaxel, the activation of apoptotic processes in cancer cells is observed in 18 h after the beginning of incubation. Activation of transcription factor ATF-2 and Bcl-2 phosphorylation under conditions of cell cycle arrest appears to be a possible mechanism of apoptosis initiation.*