



УДК 616.441.-006.6-092.9:615.252

© 2009

В. М. Пушкарьов, Д. В. Старенький, І. Д. Попадюк, С. Ямашита,
В. О. Саєнко, член-кореспондент НАН України М. Д. Тронько

Ефект комбінованої дії таксолу та іонізуючої радіації на клітини анапластичного раку щитоподібної залози

Вивчено ефекти таксолу, γ -опромінення та їх комбінації на апоптозні процеси в клітинах анапластичного раку щитоподібної залози ліній KTC-2 та ARO. Показано, що іонізуюча радіація і таксол конкурентно впливають на фосфорильовання основного регулятора клітинного циклу, пухлинного супресора p53, експресію проапоптозного білка Bax та важливого регулятора циклу c-Abl в пухлинних клітинах. У той же час ефект комбінованої дії радіації і таксолу щодо апоптозних процесів вірогідно вищий за такий кожного з цих агентів, застосованих окремо. Комбіноване застосування таксолу в концентраціях, що викликають апоптоз, та низьких доз γ -опромінення є перспективною фармакологічною стратегією для подальших доклінічних досліджень.

Таксол є ефективним протипухлинним препаратом, який протягом останніх трьох десятиліть успішно використовується для лікування деяких видів злоякісних пухлин, у тому числі раку легень, молочної залози, сечового міхура, яєчників, голови і шиї та меланоми [1]. Проводяться дослідження щодо можливості посилення його лікувального ефекту шляхом комбінованого застосування з іншими протипухлинними терапевтичними засобами [2]. Оскільки таксол діє на мікротрубочки, блокуючи поділ клітин, можна припустити доцільність використання додаткових агентів, які б пошкоджували в пухлинних клітинах ще й ДНК, викликаючи генотоксичний стрес. Одним з таких агентів, що широко використовується в протипухлинній терапії, є іонізуюча радіація (ІР).

Метою дослідження було вивчення комбінованої дії низьких доз таксолу та низьких доз радіації щодо апоптозних процесів у клітинах анапластичного раку щитоподібної залози (АТЗ) ліній ARO та KTC-2.

Клітини культивували в середовищі RPMI-1640, що містило 5% бичачої сироватки, 1% пеніциліну/стрептоміцину, в атмосфері з 5% CO₂ при 37 °С протягом 2 діб, двічі промивали PBS-буфером (80 мМ ортофосфат натрію однозаміщений, 20 мМ ортофосфат натрію двозаміщений, 100 мМ хлорид натрію, рН 7,4) і замінювали середовище. Через 24 год вносили розчинений у диметилсульфоксиді (ДМСО) таксол фірми "Wako Chemicals" (Японія)

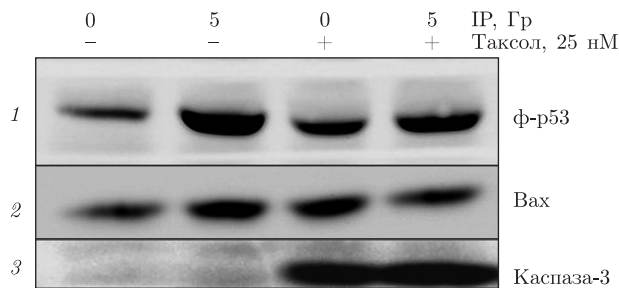


Рис. 1. Вплив таксолу та γ -опромінення (IP) на фосфорилування пухлинного супресора p53, експресію проапоптозного білка Вах та активацію каспази-3 (фрагмент 19 кДа) після 24 год інкубації з таксолу. 1, 3 — клітини лінії КТС-2; 2 — АРО

і інкубували клітини протягом наступних 24 год. У контрольні проби вносили в такий же кількості ДМСО. Частина чашок з клітинами опромінювали (доза 5 Гр). 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 імуноблотинг проводили за методикою, що описана раніше [3]. У дослідженні використані поліклональні антитіла до каспази-3, ПАРП (полі-АДФ-рибозо-полімераза), Вах, фосфорформи білка p53, c-Abl та кон'юговані з пероксидазою хрину вторинні антитіла від фірми “Cell Signaling Technology” (США). Комплекси білків з антитілами візуалізували за допомогою реагенту ECL (“Amersham Life Science”, Великобританія).

Клітини опромінювали на установці потужністю 1 Гр/хв фірми “Ропу” (Японія), модель PS-3100SB з джерелом випромінювання ^{137}Cs (γ ; 0,662 МеВ).

Статистичну обробку даних проводили за Стьюдентом. Значення $P < 0,05$ вважали за вірогідні.

Згідно з результатами дослідження, опромінення клітин анапластичного раку КТС-2 γ -променями в дозі 5 Гр помітно посилює фосфорилування одного з ключових білків, які регулюють клітинний цикл, — супресора пухлин p53 по 15 залишку серину (рис. 1, 1), що зумовлює послаблення його взаємодії з негативним регулятором — онкопротеїном Mdm2 [4]. Це, у свою чергу, дає можливість білку p53 уникнути убіквітинізації і розщеплення в протеасомах, а отже, приводить до його накопичення в ядрі і трансактивації генів, продукти яких можуть, залежно від контексту, зупиняти клітинний цикл, ініціювати репарацію ДНК або апоптоз [4]. Таксол у концентрації 25 нМ, при якій індукується класичний апоптоз у клітинах АТС [3], також посилює фосфорилування p53, але меншою мірою порівняно з IP. Важливо відзначити, що в присутності таксолу IP-залежне фосфорилування p53 вірогідно зменшувалось (див. рис. 1, 1, трек 4; рис. 2, а).

Одним з можливих наслідків накопичення p53 є трансактивація генів, продукти яких ініціюють апоптоз, зокрема гена проапоптозного білка Вах, який є одним з ключових факторів у розвитку мітохондріального шляху апоптозу [5]. За нашими даними, експресія Вах, як і фосфорилування p53, посилюється при опроміненні клітин та в присутності таксолу (див. рис. 1, 2; 2, б). Комбінована дія IP та таксолу приводить до пригнічення експресії Вах у порівнянні з дією цих чинників, використаних окремо. Така ж закономірність у дії IP та таксолу характерна і для експресії нерецепторної тирозинкінази c-Abl (не показано), яка стабілізує і стимулює накопичення біологічно активного p53 [6] та бе-

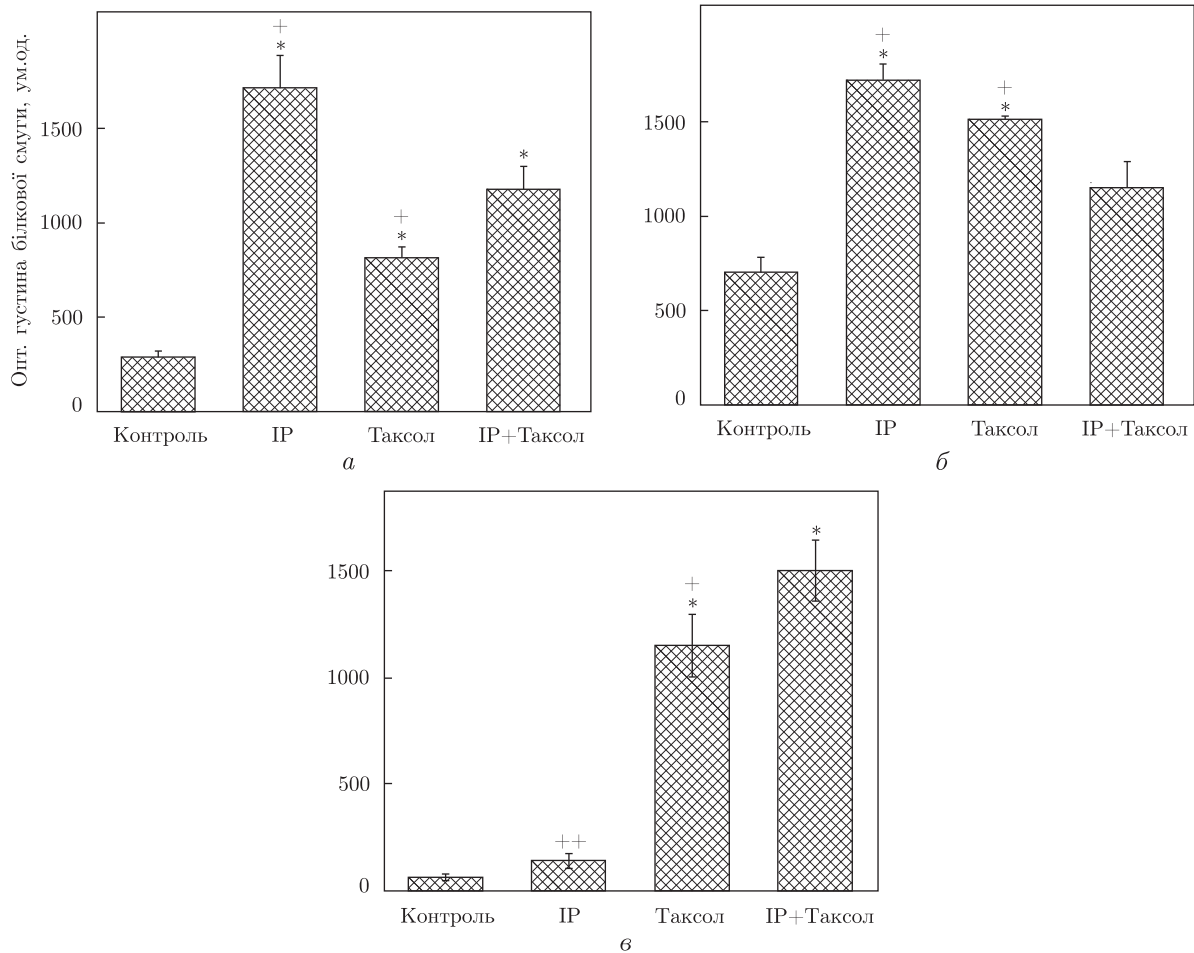


Рис. 2. Кількісна оцінка фосфорилування пухлинного супресора р53 (а), експресії проапоптичного білка Вах (б), активації каспази-3 (в).

а: * – відміни від контролю вірогідні, $p < 0,0001$; + – ефект комбінованої дії таксолу та опромінення вірогідно відрізняється від дії γ -опромінення та таксолу, застосованих окремо: $p = 0,035$ та $p = 0,026$ відповідно. $M \pm m$, $n = 5$.

б: * – відміни від контролю вірогідні, $p < 0,0001$; + – ефект комбінованої дії таксолу та опромінення вірогідно відрізняється від дії γ -опромінення та таксолу, застосованих окремо: $p = 0,004$ та $p = 0,01$ відповідно. $M \pm m$, $n = 3$.

в: * – відміни від контролю вірогідні, $p < 0,001$; ефект комбінованої дії таксолу та опромінення вірогідно відрізняється від дії γ -опромінення та таксолу, застосованих окремо, + – $p = 0,003$; ++ – $p < 0,001$. $M \pm m$, $n = 3$.

ре участь у таксолзалежних процесах: індукції апоптозу, зупинці клітинного циклу у фазі G2/M [7].

Таким чином, ІР і таксол виступають антагоністами щодо фосфорилування та експресії ряду білків, які опосередковують ефекти обох цих агентів у пухлинній клітині. Можливо, це пояснюється спільними сигнальними каскадами, які активуються у відповідь на дію ІР та таксолу. Отже, можна припустити, що відповідь клітини на генотоксичний стрес та на стрес, пов'язаний з порушенням структури цитоскелету, реалізується хоча б частково за спільними механізмами. На це вказує і факт посилення фосфорилування білка р53 у присутності таксолу, що є характерною відповіддю клітини на пошкодження ДНК радіацією та

іншими генотоксичними агентами. З іншого боку, можна зробити висновок, що p53 і Bax не відіграють ключової ролі в опосередкованому IP та таксолем апоптозі, що підтверджується і даними літератури [8].

У той же час, незважаючи на конкурентні взаємовідносини між таксолем та IP щодо певних сигнальних механізмів, кінцевий ефект такої взаємодії є синергічним щодо апоптотичних процесів. Результати досліджень свідчать про те, що ефект IP щодо активації основної ефекторної каспази-3 є незначним порівняно з ефектом таксолу (див. рис. 1, 3; 2, 6). Проте комбінована дія обох агентів дає адитивний ефект, посилюючи дію кожного з них. Така ж закономірність спостерігалась і щодо розщеплення ПАРП (не показано) — одного з основних показників заключних стадій апоптозу.

Отже, спільне використання низьких доз (0,5–5 Гр) IP та низьких доз таксолу приводить до істотного посилення апоптотичного ефекту в клітинах АТС і може бути рекомендоване для доклінічних випробувань.

1. Kingston D. G. I. The shape of things to come: Structural and synthetic studies of taxol and related compounds // *Phytochemistry* – 2007. – **68**. – P. 1844–1854.
2. Luck H.-J., Roche H. Weekly paclitaxel: an effective and well-tolerated treatment in patients with advanced breast cancer // *Crit. Rev. Oncology/Hematology*. – 2002. – **44**. – P. S15–S30.
3. 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.
4. Levine A. J., Hu W., Feng Z. The P53 pathway: what questions remain to be explored? // *Cell Death Diff.* – 2006. – **13**. – P. 1027–1036.
5. Lalier L., Cartron P.-F., Juin P. et al. Bax activation and mitochondrial insertion during apoptosis // *Apoptosis*. – 2007. – **12**. – P. 887–896.
6. Sionov R. V., Coen S., Goldberg Z. et al. c-Abl regulates p53 levels under normal and stress conditions by preventing its nuclear export and ubiquitination // *Mol. Cell. Biol.* – 2001. – **21**, No 17. – P. 5869–5878.
7. Nehme A., Lee B. L., Baskaran R. et al. Effect of c-Abl tyrosine kinase on the cellular response to paclitaxel-induced microtubule damage // *Brit. J. Cancer*. – 2000. – **83**, No 10. – P. 1360–1366.
8. 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.

Державна установа “Інститут ендокринології та обміну речовин ім. В. П. Комісаренка АМН України”, Київ

Надійшло до редакції 14.11.2008

V. M. Pushkarev, D. V. Starenki, I. D. Popadiuk, S. Yamashita, V. O. Saenko,
Corresponding Member of the NAS of Ukraine **M. D. Tronko**

The effect of combined action of Taxol and ionizing radiation on thyroid anaplastic cancer cells

We studied the effects of Taxol, γ -irradiation, and their combination on apoptotic processes in KTC-2 and ARO cell lines. Ionizing radiation and Taxol exhibited a competitive effect upon phosphorylation of main cell cycle controller, tumor suppressor p53, expression of proapoptotic Bax, and important cycle regulator c-Abl in tumor cells. At the same time, the combined effect of radiation and Taxol on apoptotic processes was significantly higher than effects of single agents. The combination of Taxol in apoptotic concentrations and low doses of γ -radiation is a promising pharmacological strategy for further preclinical trials.