ДОПОВІДІ
НАЦІОНАЛЬНОЇ
АКАДЕМІЇ НАУК
УКРАЇНИ

10 • 2009

МЕДИЦИНА

УДК 616.441-006.6:615.252

© 2009

Член-кореспондент НАН України **М. Д. Тронько, І. Р. Янчій, В. М. Пушкарьов, В. М. Гончарук, О. А. Стеценко, А. Є. Коваленко**

Дія протипухлинного препарату паклітакселю на клітини фолікулярного раку щитоподібної залози

Вивчено дію протипухлинного препарату паклітакселю на клітини фолікулярного раку щитоподібної залози лінії FRO у порівнянні з нормальними тироцитами. Показано, що клітини FRO чутливі до дії паклітакселю навіть при дуже низьких концентраціях цієї сполуки. Критичною для утворення колоній є концентрація препарату 20–25 нМ. Нормальні тироцити значно стійкіші до паклітакселю. Цитотоксична дія паклітакселю на клітини фолікулярного раку щитоподібної залози пов'язана з індукцією масового апоптозу. Зроблено висновок про перспективність доклінічних випробувань паклітакселю щодо лікування неоперабельних форм раку щитоподібної залози.

Після аварії на Чорнобильській АЕС в Україні спостерігається стійка тенденція до зростання кількості випадків захворювання на рак. У першу чергу це стосується пухлин щитоподібної залози (ЩЗ), яка є найбільш уразливим органом через активне поглинання радіоактивного йоду. Щорічний приріст кількості злоякісних пухлин ЩЗ становить близько 3%. Хоча більшість типів пухлин ЩЗ досить ефективно видаляються хірургічним шляхом, необхідно шукати альтернативні способи лікування злоякісних новоутворень. Це стосується випадків з неоперабельними пухлинами, а також стійких до терапії радіоактивним йодом метастазів.

Фолікулярна карцинома є високодиференційованим типом раку, її частка становить до 10% злоякісних пухлин ЩЗ, а на йододефіцитних територіях — до 40% [1]. Варіанти карциноми, що є стійкими до радіойоду, характеризуються поганим прогнозом [2]. У той же час віддалені метастази в кістках та легенях формуються при фолікулярному раку раніше, ніж при папілярному, і є більш агресивними [3, 4]. За деякими даними частота утворення метастазів при фолікулярних карциномах становить від 10 до 30% [5]. Тому пошук сполук, що могли б ефективно пригнічувати ріст злоякісних пухлин ЩЗ та утворення метастазів, набуває особливої актуальності [6].

Паклітаксель є високоефективним протипухлинним препаратом, який використовується для лікування деяких видів раку. Ефективність його дії щодо раку молочної залози дося-

гає 68%, а в комбінації з іншими допоміжними препаратами — навіть 94% [7]. Обмежує застосування препарату його висока токсичність. Тому надзвичайно актуальними є дослідження механізмів дії паклітакселю в нормальних і трансформованих клітинах та визначення мінімально можливої концентрації, ефективної для лікування різних видів раку, у тому числі і фолікулярного раку ЩЗ.

Метою дослідження було вивчення впливу паклітакселю на клітини фолікулярного раку ЩЗ лінії FRO.

Клітини культивували в середовищі RPMI-1640, що містило 5% бичачої сироватки, 1% пеніциліну/стрептоміцину, в атмосфері з 5% CO_2 при 37 °C протягом 2 діб, промивали двічі PBS-буфером (80 мМ ортофосфат натрію однозаміщений, 20 мМ ортофосфат натрію двозаміщений, 100 мМ хлорид натрію, pH 7,4) і замінювали середовище. Через 24 год вносили розчинений у диметилсульфоксиді (ДМСО) паклітаксель фірми "Wako Chemicals" (Японія) і збирали клітини через визначені проміжки часу. У контрольні проби вносили в такій же кількості ДМСО. По закінченні інкубації клітини двічі промивали холодним (2 °C) буфером PBS, збирали в 1 мл буфера PBS і осаджували протягом 3 хв при 1000 об/хв і 2 °C.

Для визначення клоногенності клітини висівали в кількості 500 кл. на одну чашку Петрі з діаметром 10 см. Через 24 год середовище замінювали свіжим з додаванням паклітакселю. Після 24 год експозиції клітин з паклітакселем їх промивали, середовище замінювали свіжим і клітини росли ще протягом двох тижнів. Потім клітини забарвлювали барвником Гімза і підраховували кількість утворених колоній.

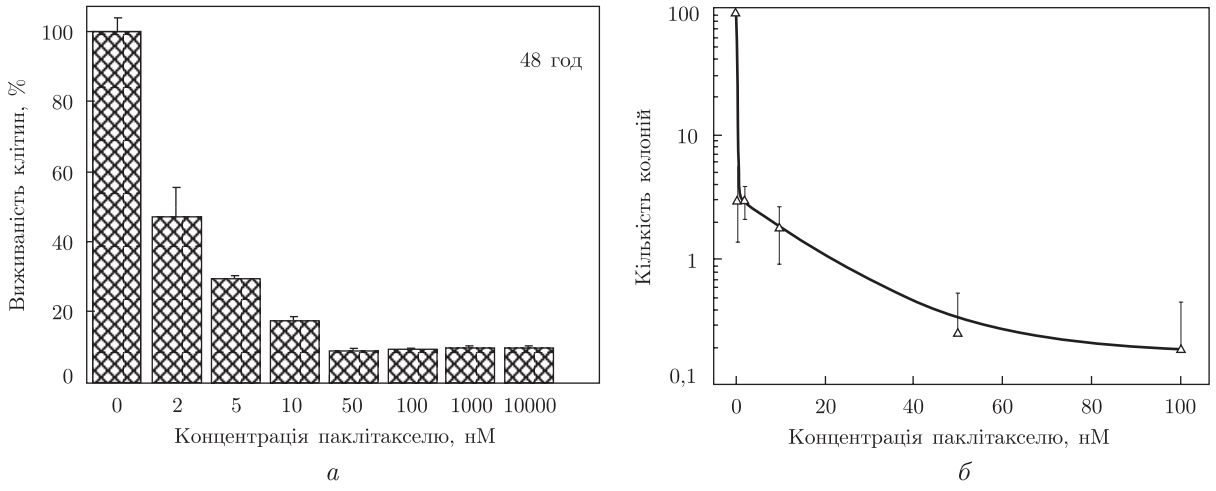
При визначенні виживаності клітин їх висівали в 96-лункові мікропланшети з пласким дном у кількості 1000 кл. на лунку в об'ємі 100 мкл і інкубували протягом 24 год. Паклітаксель розчиняли в ДМСО, змішували з живильним середовищем і вносили в кожну лунку по 10 мкл (на кожну концентрацію препарату по шість лунок). Кінцева концентрація ДМСО не перевищувала 0,1%. Після завершення інкубації в кожну лунку додавали по 11 мкл розчину з набору для підрахунку клітин (CCK-8, "Dojin", Японія) і інкубували протягом 1 год при 37 °C (WST-тест). Оптичну густину при 450 нм визначали за допомогою приладу для зчитування мікропланшетів.

Для вивчення апоптозу клітини знімали з чашок Петрі трипсинізацією і промивали один раз теплим (37 °C) PBS. $1 \cdot 10^5$ клітин інкубували 15 хв при кімнатній температурі з флуоресцин-ізотіоціанат-кон'югованим (FITC) анексином V та пропідієм йодидом (PI) у збагаченому Ca^{2+} буфері з набору для визначення апоптозу ("Wako Chemicals", Японія), а потім аналізували на проточному цитофлуориметрі ("Becton Dickinson", США). Емісію анексину V та PI визначали по каналах FL-1 та FL-2 відповідно. Кількість клітин у кожному зразку була не менше 20 000. Одержані дані аналізували з використанням програми WinMDI.

Статистичну обробку даних проводили за Стьюдентом.

Згідно з результатами дослідження паклітаксель викликає швидку дозозалежну загибель клітин фолікулярного раку (рис. 1, *а*). Вірогідні відміни від контролю (проба без паклітакселю) спостерігаються вже при концентрації препарату 2 нМ, а при 10 нМ виживає менше 20% клітин. Збільшення концентрації препарату до 50 нМ призводить до загибелі майже 90% клітин, і при подальшому збільшенні вмісту паклітакселю кількість клітин, що гинуть, істотно не змінюється.

Найважливішим показником, який потрібно враховувати при вивченні дії протипухлинних препаратів на пухлинні клітини, є їх клоногенність — здатність клітин до утворення нових колоній після того, як із середовища вилучено сам препарат. За нашими даними,



а *б*

Рис. 1. Вплив різних концентрацій паклітакселю на життєздатність клітин FRO (*а*) та їх клоногенність (*б*). $M \pm m$, $n = 6$ (*а*), $n = 3$ (*б*)

паклітаксель вже в концентрації близько 1 нМ зменшує здатність утворювати колонії клітинами фолікулярного раку на 90% (див. рис. 1, *б*). Граничною концентрацією препарату, коли ще можуть виникати колонії, є 20–25 нМ. Починаючи з концентрації паклітакселю 50 нМ оброблені ним клітини фолікулярного раку втрачають здатність до утворення колоній.

На наступному етапі дослідження нами вивчався механізм токсичної дії паклітакселю на клітини фолікулярного раку, визначалось, які саме процеси (некроз, апоптоз) викликає паклітаксель у клітинах-мішенях. Як показник апоптозу було вибрано явище інверсії фосфатидилсерину в цитоплазматичній мембрані, у результаті якої цей фосфоліпід експонується на зовнішній поверхні мембрани клітин, що знаходяться в стані апоптозу. Про факт інверсії свідчить зв'язування клітинами анексину V. Крім того, клітини попередньо інкубують з PI, який зв'язується з ДНК у мертвих клітинах. Отже, інкубація клітин з анексином V та PI дозволяє визначити співвідношення між живими клітинами, клітинами в стані апоптозу і некротичними та мертвими клітинами в даній популяції.

Встановлено, що при концентрації 5 нМ паклітаксель практично не впливає на клітини фолікулярного раку (рис. 2, *а*, *б*). Проте збільшення концентрації сполуки до 25 нМ викликає масовий апоптоз, при цьому кількість інтактних клітин значно зменшується (див. рис. 2, *в*). Ефект концентрації препарату 50 нМ майже не відрізняється від того, що спостерігається при 25 нМ, але кількість мертвих клітин помітно збільшується (див. рис. 2, *г*, біла стрілка).

Таким чином, паклітаксель викликає масовий апоптоз у клітинах фолікулярного раку ЩЗ, що, очевидно, і є головною причиною їх загибелі. У той же час у нормальних тироцитах апоптозні зміни не відбуваються, навіть при клінічно значущих концентраціях препарату (5 мкМ) (не показано).

Одержані дані свідчать про перспективність використання паклітакселю для лікування фолікулярного раку ЩЗ, оскільки препарат вибірково викликає загибель пухлинних клітин, практично не впливаючи на нормальні. Цей факт можна пояснити тим, що паклітаксель діє на мікротрубочки, порушуючи клітинний цикл, а отже, поділ клітин [8, 9]. Тому клітини, які інтенсивно діляться (клітини фолікулярного раку), більшою мірою зазнають пошкоджень

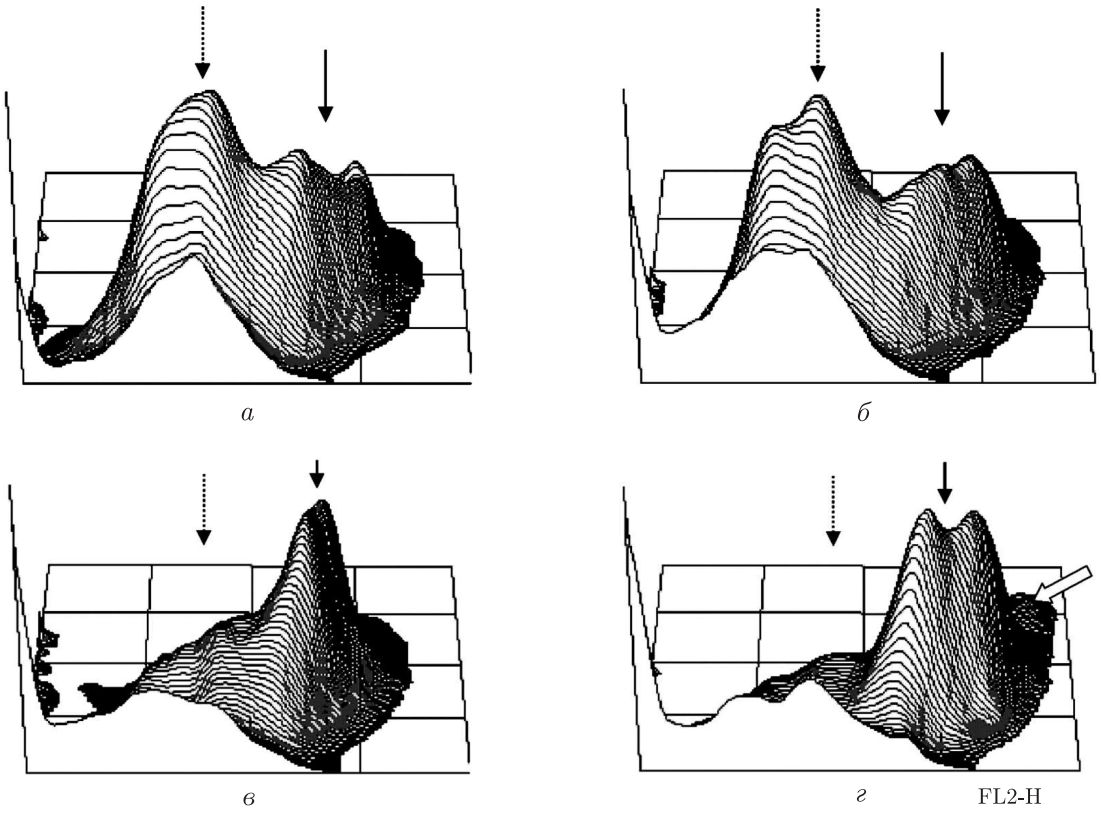


Рис. 2. Співвідношення живих клітин та клітин, що знаходяться в стані апоптозу, при дії різних концентрацій паклітакселю:
а — контроль; *б* — 5 нМ; *в* — 25 нМ; *г* — 50 нМ. Пунктирна стрілка — живі клітини, суцільна — клітини в стані апоптозу, біла — мертві клітини. Вісь ординат — кількість подій (клітин)

з боку паклітакселю. Інший важливий висновок, який випливає з отриманих результатів, — навіть дуже низькі концентрації паклітакселю (2 нМ) при тривалій дії (48, 72 год) викликають загибель більшості пухлинних клітин. Отже, у передклінічних дослідженнях необхідно зосередитись на відпрацюванні дози та тривалості застосування препарату.

1. *Богданова Т. И., Козырицкий В. Г., Тронько Н. Д.* Патология щитовидной железы у детей. Атлас. – Киев: Чернобыльинтеринформ, 2000. – 280 с.
2. *Younes M. N., Yazici Y. D., Kim S. et al.* Dual epidermal growth factor receptor and vascular endothelial growth factor receptor inhibition with NVP-AEE788 for the treatment of aggressive follicular thyroid cancer // Clin. Cancer Res. – 2006. – **12**, No 11, pt. 1. – P. 3425–3434.
3. *Lin J. D., Huang M. J., Juang J. H. et al.* Factors related to the survival of papillary and follicular thyroid carcinoma patients with distant metastases // Thyroid. – 1999. – **9**, No 12. – P. 1227–1235.
4. *Muresan M. M., Olivier P., Leclere J. et al.* Bone metastases from differentiated thyroid carcinoma // Endocr. Relat. Cancer. – 2008. – **15**, No 1. – P. 37–49.
5. *Younes M. N., Yigitbasi O. G., Park Y. W. et al.* Antivascular therapy of human follicular thyroid cancer experimental bone metastasis by blockade of epidermal growth factor receptor and vascular growth factor receptor phosphorylation // Cancer Res. – 2005. – **65**, No 11. – P. 4716–4727.
6. *Riesco-Eizaguirre G., Santisteban P.* New insights in thyroid follicular cell biology and its impact in thyroid cancer therapy // Endocr. Relat. Cancer. – 2007. – **14**, No 4. – P. 957–977.
7. *Rowinsky E. K.* The development and clinical utility of the taxane class of antimicrotubule chemotherapy agents // Annu. Rev. Med. – 1997. – **48**. – P. 353–374.

8. *Snyder J. P., Nettles J. H., Cornett B. et al.* The binding conformation of taxol in β-tubulin: A model based on electron crystallographic density // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. – 2001. – **98**, No 9. – P. 5312–5316.
9. *Jordan M. A., Wilson L.* Microtubules as a target for anticancer drugs // Nat. Rev. Canc. – 2004. – **4.** – P. 253–265.

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

Надійшло до редакції 17.02.2009

Corresponding Member of the NAS of Ukraine **M. D. Tronko, I. R. Yanchiy, V. M. Pushkarev, V. M. Goncharuk, O. A. Statsenko, A. E. Kovalenko**

Effect of antitumor agent paclitaxel on thyroid follicular cancer cells

The effect of antitumor drug, paclitaxel, on the FRO cell line of thyroid follicular carcinoma comparing to normal thyrocytes is studied. It is shown that FRO cells are sensitive to taxol even at its very low concentrations. Critical for the colony forming was a concentration of 20–25 nM of paclitaxel. Primary thyrocytes turned out more resistant to taxol. The cytotoxic paclitaxel action on thyroid cancer cells appears to be associated with massive apoptosis induction. The conclusion about the promising of taxol preclinical trials for thyroid follicular carcinoma treatment is made.