

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

## Характеристика змін клітинного циклу залежно від концентрації та часу дії таксолу на клітини раку щитоподібної залози

*Вивчали ефекти таксолу на клітинний цикл та апоптозні процеси в клітинах анапластичного раку щитоподібної залози. Показано, що таксол змінює розподіл клітинної популяції по фазах клітинного циклу. Цей розподіл залежить від концентрації таксолу. Низькі концентрації сполуки викликають зміни клітинного циклу, характерні для апоптозу, високі (понад 50 нМ) спричиняють арешт циклу на стадії G2/M. Індукція таксолем апоптозу починається при концентрації сполуки 5 нМ, досягаючи максимуму при 25 нМ. Обговорюється можлива стратегія лікування анапластичного раку щитоподібної залози низькими концентраціями таксолу.*

Таксол є найефективнішим протипухлинним препаратом, який використовується для лікування багатьох видів злоякісних пухлин, таких як рак легень, молочної залози, сечового міхура, яєчників, голови і шиї та меланоми [1]. Вважається, що дія препарату пов'язана з його впливом на полімеризацію мікротрубочок, що, у свою чергу, спричиняє зупинку клітинного циклу [2]. Анапластичний рак щитоподібної залози (ЩЗ) є найбільш агресивною, неоперабельною формою раку людини з практично 100%-м летальним кінцем [3]. Тому пошук терапевтичних засобів, які могли б подовжити життя хворим, є надзвичайно актуальним. Крім того, розв'язання цієї проблеми могло б дати ключ для розробки нових підходів при лікуванні недиференційованих пухлин іншого походження.

Ефекти таксолу на клітини анапластичного раку ЩЗ *in vitro* значною мірою визначаються його концентрацією, причому дія низьких (10–25 нМ) та високих (понад 50 нМ) концентрацій може істотно відрізнятись [4]. Мета нашого дослідження полягала у вивченні дії різних доз таксолу на клітинний цикл та апоптозні процеси в клітинах анапластичного раку ЩЗ (АТС) ліній ARO та KTC-2.

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 двічі PBS-буфером (80 мМ ортофосфат натрію однозаміщений, 20 мМ ортофосфат натрію дво-заміщений, 100 мМ хлорид натрію, рН 7,4) і замінювали середовище. Через 24 год вносили розчинений у диметилсульфоксиді (ДМСО) таксол фірми "Wako Chemicals" (Японія) і інкубували клітини протягом наступних 12–72 год. У контрольні проби вносили в такий же кількості ДМСО. По закінченні інкубації клітини двічі промивали холодним (2 °С) буфером PBS, збирали в 1 мл буфера PBS і осаджували протягом 3 хв при 1000 об/хв і 2 °С.

Для вивчення стадій клітинного циклу та апоптозу методом проточної цитофлуориметрії (ПЦФ) клітини знімали з чашок Петрі трипсинізацією і промивали один раз теплим PBS.  $1 \cdot 10^5$  клітин інкубували 15 хв при кімнатній температурі з флуоресцин-ізотіоціанат-кон'югованим (FITC) анексином V та йодидом пропідію (PI) у збагаченому Ca<sup>2+</sup> буфері з набору для визначення апоптозу ("Wako Chemicals", Японія), а потім аналізували

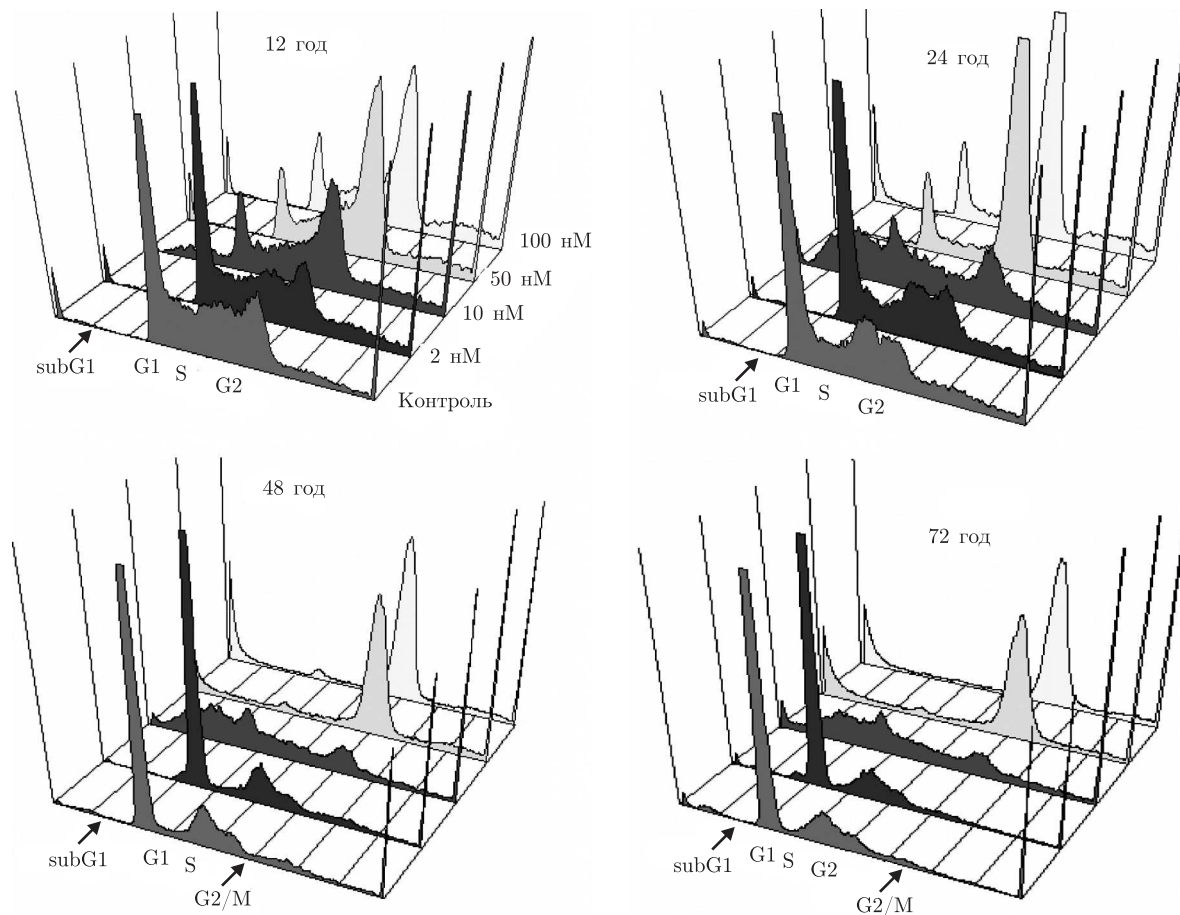


Рис. 1. Динаміка змін клітинного циклу в клітинах лінії ARO під впливом різних концентрацій таксолу. Вісь  $x$  — стадії клітинного циклу (пояснення в тексті); вісь  $y$  — кількість клітин; вісь  $z$  — концентрація таксолу. Концентрація таксолу для всіх періодів інкубації була такою ж, як для 12 год інкубації. Наведено результати одного з п'яти незалежних дослідів

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 20000. В окремих дослідях PI замінювали новим барвником — DRAQ5NO, похідним антрахінону з  $Em_{\lambda \max} = 700,5$  нм, який дає можливість дискримінації між інтактними клітинами, клітинами з пошкодженими мембранами, клітинним дебрисом та клітинами у стані раннього апоптозу [5].

За допомогою методу ПЦФ клітини, проінкубовані з PI, можна розподілити за вмістом ДНК. Клітини з диплоїдним набором хромосом, що ще не діляться, відповідають стадії G1 (рис. 1, контроль), клітини, в яких почався синтез (реплікація) ДНК, зміщуються по осі абсцис вправо (стадія S), тетраплоїдні клітини, які подвоїли кількість ДНК, але ще не поділилися, відповідають стадії G2 (див. рис. 1). Інкубація клітин анапластичного раку ЩЗ лінії ARO з таксолем у концентрації 2 нМ протягом 12 год не викликає істотних змін у розподіленні клітин. Помітні зміни спостерігаються при підвищенні концентрації препарату до 10 нМ (див. рис. 1, 12 год інкубації). Кількість клітин значно зменшується у фазі G1, збільшується на стадії G2 і, що важливо, невелика кількість клітин накопичується на стадії

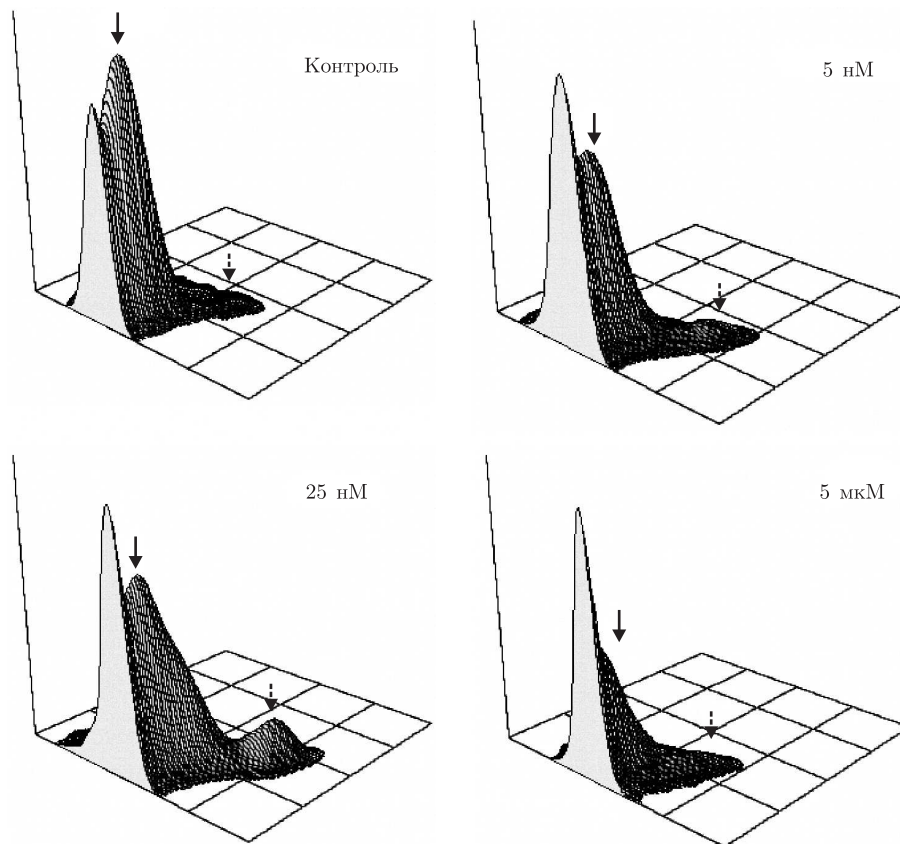


Рис. 2. Вплив різних концентрацій таксолу на рівень апоптозу та кількість інтактних клітин у популяції клітин лінії КТС-2.

Вісь  $x$  — анексин V (канал FL-2); вісь  $y$  — кількість клітин. Суцільна стрілка — інтактні клітини, штрихова — клітини в стані апоптозу. Наведено результати одного з двох незалежних дослідів

subG1, що свідчить про початок апоптозних процесів. Підвищення вмісту таксолу в інкубаційному середовищі до 50 і 100 нМ приводить до збільшення кількості клітин на стадії G2, але одночасно до зникнення клітин на стадії subG1 (див. рис. 1, 12 год). Через 24 год інкубації за дії таксолу в концентрації 10 нМ кількість клітин у фазі G2 зменшується порівняно із спостережуваною через 12 год інкубації, але помітно зростає на стадії subG1, що свідчить про інтенсивні апоптозні процеси в популяції пухлинних клітин при цій концентрації препарату. Вищі концентрації препарату спричиняють подальше збільшення кількості клітин у фазі G2 клітинного циклу та їх зменшення у фазі G1 (див. рис. 1, 24 год). Через 48 та 72 год інкубації спостерігається інтенсивний апоптоз при 10 нМ таксолу, а при концентраціях сполуки 50–100 нМ практично всі клітини сконцентровані на стадії G2/M (див. рис. 1, 48 год, 72 год). Важливо зазначити, що арешт усіх клітин на цій стадії відбувається тільки через 72 год при 100 нМ таксолу.

Необхідно зауважити, що максимум, який відповідає тетраплоїдним клітинам у фазі G2 у контрольних пробах, не збігається з таким для клітин, що знаходяться в стані G2/M-арешту. Останні зміщені по осі абсцис у бік вищого вмісту ДНК, що може свідчити про їх більшу плоїдність. Отже, можна зробити висновок, що навіть при високих концентраціях таксолу частина клітин продовжує синтезувати ДНК протягом досить тривалого часу (до

3 діб). Цей факт ще не був висвітлений у світовій науковій літературі і потребує спеціального вивчення.

Таким чином, низькі концентрації (10 нМ) таксолу ініціюють апоптоз, починаючи з 12 год, який досягає максимуму після 24 год інкубації клітин з препаратом. Арешт клітинного циклу на стадії G2/M відбувається тільки при високих концентраціях таксолу, дія яких не супроводжується апоптозними процесами на всіх досліджених стадіях інкубації.

Аналіз взаємодії клітин з анексином V, який зв'язується з інвертованим назовні фосфатидилсеринном клітинної мембрани апоптозної клітини, у поєднанні з методом ПЦФ дозволяє досить точно визначити кількість клітин у популяції, що знаходяться в стані апоптозу. З рис. 2 видно, що кількість інтактних клітин лінії КТС-2 у контрольних пробах є високою (показано суцільною стрілкою), у той час як кількість апоптозних клітин (штрихова стрілка) незначна. Починаючи з концентрації таксолу 5 нМ у живильному середовищі, кількість живих клітин знижується, а частка апоптозних помітно зростає. При концентрації сполуки 25 нМ спостерігається максимальний апоптоз. За подальшого підвищення концентрації таксолу до 100 нМ кількість клітин у стані апоптозу знижується (не показано), а при 5 мкМ препарату відмічається мінімальний апоптоз при значному зниженні кількості живих клітин (див. рис. 2). Отже, власне апоптоз ініціюється тільки низькими концентраціями таксолу (5–25 нМ), тоді як вищі його концентрації призводять до інших типів клітинної смерті, таких як, наприклад, некроз.

Згідно з теорією “рани, що не загоюється” [6], саме некротичні процеси, що відбуваються в злоякісних пухлинах, внаслідок генетичної нестабільності значної кількості пухлинних клітин є причиною їх постійного росту. Організм сприймає некротичні явища в будь-яких тканинах як сигнал тривоги і спрямовує туди ростові фактори, цитокіни та “будівельні матеріали” для якомога швидшої ліквідації осередку некрозу. Тому надзвичайно високі концентрації протипухлинних препаратів, зокрема таксолу (5–30 мкМ), які використовуються в клініці і які, за нашими даними, викликають некроз, можуть дати позитивні наслідки тільки за малоймовірної умови, що протягом дуже короткого часу загинуть усі клітини пухлини. Ми вважаємо за доцільне запропонувати іншу стратегію лікувального процесу: введення в організм невеликих доз таксолу та підтримання його концентрації в крові на певному рівні (10–25 нМ) протягом тривалого строку (2–3 тижні). При цьому пухлинні клітини будуть гинути шляхом апоптозу, який не викликає запальних процесів, і зменшиться ризик пошкодження нормальних тканин надвисокими дозами препарату. Такий підхід вже використовується при лікуванні раку молочної залози [7]. Аргументом на користь застосування такого способу лікування є те, що після введення в організм 5 мкМ таксолу вже через 30 хв його концентрація в плазмі крові знижується до 100 нМ, а через 5–6 год — до 10 нМ [8], що і є реальною діючою концентрацією.

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. 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.
3. Copland J. A., Marlow L. A., Kurakata S. et al. Novel high-affinity PPAR $\gamma$  agonist alone and in combination with paclitaxel inhibits human anaplastic thyroid carcinoma tumor growth via p21<sup>WAF1/CIP1</sup> // *Oncogene*. – 2006. – **25**. – P. 2304–2317.
4. 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.

5. *Wiltshire M., Patterson L. H., Smith P. J.* A novel deep red/low infrared fluorescent flow cytometric probe, DRAQ5NO, for the discrimination of intact nucleated cells in apoptotic cell populations // *Cytometry*. – 2000. – **39**. – P. 217–223.
6. *Luchnik A. N.* A model of self-maintenance of in vivo malignant growth not dependent on tumor type or origin. Syndrome of everlasting wound healing // *Canc. Biol. Ther.* – 2003. – **2**, No 4. – P. 343–346.
7. *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.
8. *Gustafson D. L., Long M. E., Zirrolli J. A. et al.* Analysis of docetaxel pharmacokinetics in humans with the inclusion of later sampling time-points afforded by the use of a sensitive tandem LCMS assay // *Cancer Chemother. Pharmacol.* – 2003. – **52**. – P. 159–166.

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

Надійшло до редакції 21.01.2009

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

**The characteristic of the cell cycle changes depending on the  
concentration and the duration of Taxol action on thyroid anaplastic  
cancer cells**

*We studied the effects of Taxol on the cell cycle and apoptotic processes in anaplastic thyroid cancer cells. It was shown that Taxol changed the cell population distribution on cell cycle phases. This distribution depends on the Taxol concentration. Low drug concentrations induced cell cycle changes typical of apoptosis, whereas high concentrations (more than 50 nM) caused the cell cycle arrest on G2/M stage. It was demonstrated that Taxol-induced apoptosis started at 5 nM of the drug with a maximum at 25 nM. The possible strategy of the thyroid anaplastic carcinoma treatment with low doses of Taxol is discussed.*