



УДК 616.441.-006.6-092.9:615.252

© 2011

**В. М. Пушкар'юв, Д. В. Старенький, В. В. Пушкар'юв,
О. І. Ковзун, член-кореспондент НАН України М. Д. Тронько**

Ефект паклітакселу на клітинний цикл та ініціація апоптозу в клітинах раку щитоподібної залози

Вивчали ефекти паклітакселу щодо апоптозних процесів у клітинах анапластичного раку щитоподібної залози ліній KTC-2 та ARO, які походять з недиференційованої карциноми щитоподібної залози. Показано, що паклітаксел активує в пухлинних клітинах ряд регуляторів клітинного циклу, які беруть участь у переході зі стадії G2 до мітозу — Cdc25C, Cdk1 та циклін B1. Представлені докази, що ініціація апоптозу в клітинах анапластичного раку щитоподібної залози опосередковується не JNK, як вважалося, а Cdk1.

Сполуки, що стабілізують мікротрубочки (MSA), до яких належать таксани (паклітаксел, доцетаксел), є найбільш ефективними протипухлинними препаратами. Відомо, що лікувальний ефект цих препаратів пов'язаний із зупинкою клітинного циклу з подальшою ініціацією апоптозних процесів [1]. Проте механізм, що пов'язує порушення поділу клітини з апоптозом, практично не вивчений.

Мета проведеного нами дослідження полягала у встановленні зв'язку між ефектом паклітакселу щодо клітинного циклу і індукцією апоптозних процесів у клітинах анапластичного раку щитоподібної залози (АТС) 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, промивали два рази 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) і інкубували клітини протягом наступних 24 год. В контрольні проби вносили в такий же кількості ДМСО. В частину чашок додавали інгібітор c-Jun-N-кінцевої протеїнкінази (JNK) — SP600125 (5 мкМ) та інгібітор циклінзалежних кіназ (Cdk) — росковітин

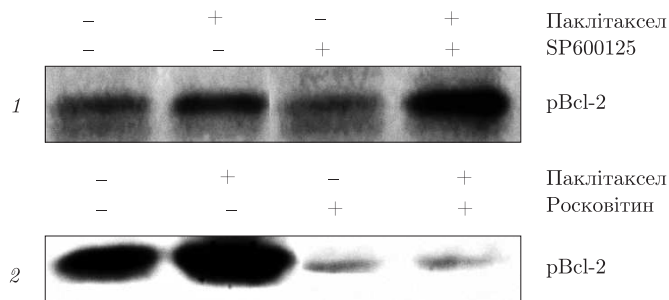


Рис. 1. Фосфорилування Bcl-2 у клітинах анапластичного раку щитоподібної залози при дії паклітакселу в присутності інгібіторів.

1 — інгібітор JNK, SP600125 (5 мкМ); 2 — інгібітор Cdk1, росковітин (25 мкМ). Концентрація паклітакселу — 20 нМ. Тривалість інкубації з паклітакселем — 24 год

(25 мкМ). 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 [2]. У дослідженні використані поліклональні антитіла до цикліну B1, фосфоформ білків Bcl-2, Cdc25C, Cdk1 (Cdc2) 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”, Велика Британія).

Вважається доведеним, що в основі механізму індукції апоптозу паклітакселем є фосфорилування з подальшою деградацією антиапоптозного білка Bcl-2, який стабілізує мітохондріальну мембрану [2, 3]. Зменшення кількості цього білка призводить до порушення рівноваги між про- та антиапоптозними білками, що спричиняє вивільнення з мітохондрій цитохрому *c* та інших апоптозних чинників і активацію каспаз. Найбільш імовірним вважалося фосфорилування Bcl-2 с-Jun-N-кінцевою протеїнкіназою (JNK), яка активується при дії паклітакселу [3]. Проте досліди з інгібітором кінази — SP600125 показали, що в клітинах АТС пригнічення JNK не послаблює фосфорилування Bcl-2, як очікувалося, а навіть дещо посилює його (рис. 1, 1). Оскільки паклітаксел у клітинах АТС активує цілий ряд регуляторів клітинного циклу [4], був поставлений дослід зі специфічним інгібітором Cdk — росковітином. Виявилось, що інгібування Cdk призводить до практично повного, якісного пригнічення фосфорилування Cdk (див. рис. 1, 2). Отже, саме Cdk, активовані паклітакселем, є відповідальними за фосфорилування прямо чи опосередковано антиапоптозного білка Bcl-2.

Головною мішенню росковітину в клітині є Cdk1 [5], яка у комплексі з цикліном B1 сприяє переходу клітини зі стадії G2 до мітозу. Показано, що паклітаксел, як і інші MSA, зупиняє саме цей перехід, провокуючи арешт клітин на стадії G2/M [2]. При цьому активуються ряд регуляторів циклу, які на тлі пригнічення інгібіторів Cdk — p27^{KIP1} та p21^{WAF1}, стимулюють подолання бар'єру G2/M [4]. Серед найбільш важливих чинників треба відмітити активацію фосфатази Cdc25C (дефосфорилування 216 залишку серину), яка, в свою чергу, активує Cdk1 шляхом видалення інгібуючого фосфату в положенні 15 тирозинового залишку та значне збільшення кількості кофактора Cdk1 — цикліну B1 (рис. 2). Можливо, надмірна активація Cdk1, яка спостерігається при дії паклітакселу, і є тим тригером, що ініціює процес апоптозу в пухлинній клітині.

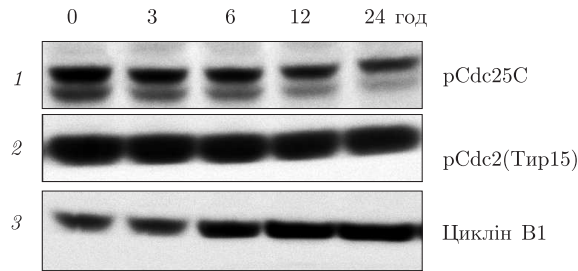


Рис. 2. Активація (дефосфорилування) фосфатази Cdc25C, протеїнкінази Cdk1 та експресія цикліну B1 у клітинах АТС при дії паклітакселу. Концентрація паклітакселу — 20 нМ

Таким чином, можна стверджувати, що ініціація мітохондріального варіанта апоптозу в клітинах анапластичного раку щитоподібної залози при дії паклітакселу опосередковується циклінзалежними кіназами, насамперед — Cdk1.

1. Bergstralh D. T., Ting J. P.-Y. Microtubule stabilizing agents: Their molecular signaling consequences and the potential for enhancement by drug combination // *Cancer Treat. Rev.* – 2006. – **32**. – P. 166–179.
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. McGrogan B. T., Gilmartin B., Carney D. N., McCann A. Taxanes, microtubules and chemoresistant breast cancer // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2008. – **1785**, No 2. – P. 96–132.
4. Pushkarev V. M., Starenki D. V., Saenko V. A. et al. Differential effects of low and high doses of taxol in anaplastic thyroid cancer cells: possible implication of the Pin1 prolyl isomerase // *Exp. Oncol.* – 2008. – **30**, No 3. – P. 190–194.
5. Meijer L., Borgne A., Mulner O. et al. Biochemical and cellular effects of roscovitine, a potent selective inhibitor of the cyclin-dependent kinases cdc2, cdk2, and cdk5 // *Eur. J. Biochem.* – 1997. – **243**. – P. 527–536.

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

Надійшло до редакції 26.05.2010

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

Effect of paclitaxel upon cell cycle and apoptosis initiation in thyroid anaplastic cancer cells

We have studied the effects of paclitaxel on apoptotic processes in KTC-2 and ARO cell lines derived from undifferentiated thyroid carcinoma. It is shown that paclitaxel activates some regulators of the cell cycle in tumor cells, which take part in G2 to mitosis transition — Cdc25C, Cdk1, and cyclin B1. The evidences are brought that the apoptosis initiation in anaplastic thyroid cancer cells is mediated not by JNK, as supposed, but by Cdk1.