



УДК 616.441.-006.6-092.9:615.252

О. Л. Геращенко, О. В. Журавель, В. В. Пушкаръов,
П. В. Погрібний, член-кореспондент НАН України М. Д. Тронько

Вплив таксанів на проліферацію клітин папілярної карциноми щитовидної залози

Досліджено вплив таксанів у наднизьких концентраціях на проліферативну активність клітин папілярного раку щитовидної залози та на активність і експресію деяких регуляторних факторів клітинного циклу. Показано, що доцетаксел пригнічував проліферацію клітин лінії TPC1. Причиною гальмування клітинного циклу може бути дефосфорилювання пухлинного супресора pRb та посилення експресії інгібітора циклінзалежних кіназ — p21^{Waf1/Cip1}.

Таксани є найефективнішими протипухлинними препаратами, які використовуються для лікування деяких видів раку, в тому числі й пухлин ендокринного походження — молочної залози, яєчників, простати [1]. Вивчаються можливості їх застосування для терапії раку щитовидної залози (ЩЗ), в першу чергу анапластичного, як найбільш агресивної форми раку людини [2, 3].

Обмежують застосування таксанів їх токсичність та висока вартість лікарських препаратів. Тому актуальними є дослідження, які дозволили б встановити мінімальні ефективні концентрації таксанів, що здатні ініціювати зупинку проліферації, сенесценцію та загибель трансформованих клітин при незначних пошкодженнях нормальних тканин організму.

Незважаючи на те що папілярна карцинома досить успішно видаляється хірургічним шляхом з подальшим опроміненням радіойодом [4], надто важливим та актуальним завданням стали розробка і впровадження альтернативних підходів у терапії стійких до радіойоду, метастазуючих варіантів цієї карциноми.

Мета нашої роботи полягала в дослідженні впливу таксанів у наднизьких концентраціях на проліферативну активність клітин папілярного раку ЩЗ та активність і експресію деяких регуляторних факторів клітинного циклу.

Клітинні лінії папілярного раку ЩЗ–TPC1 (зміни в будові *Ret/PTC1*, *wtBRAF* та відсутня експресія тироїдного транскрипційного фактора-1 — TTF-1) було надано проф. В. О. Саєнко та проф. С. Ямашітою (Nagasaki University Graduate School of Biomedical Sciences, Нагасаки, Японія). Клітини культивували в середовищі RPMI-1640 або DMEM з 10% сироватки ембріонів великої рогатої худоби із 100 од./мл пеніциліну та 100 мкг/мл стрептоміцину

© О. Л. Геращенко, О. В. Журавель, В. В. Пушкаръов, П. В. Погрібний, М. Д. Тронько, 2014

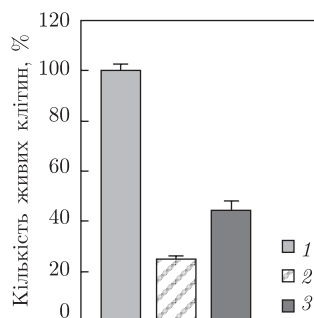


Рис. 1. Вплив доцетакселу на рівень виживаності клітин папілярної карциноми TPC1: 1 — контроль; 2 — 0,1 нмоль/л Dtx; 3 — 1,0 нмоль/л Dtx.

* — Відміни від контролю вірогідні; $p < 0,05$; $M \pm SD$; $n = 4$

в атмосфері 5% CO₂. Доцетаксел (Dtx) (“Wako Chemicals”, Японія) додавали розчиненим у диметилсульфоксиді (ДМСО).

Для прямого підрахунку клітини культивували в 24-лункових планшетах у кількості $2 \cdot 10^5$, через 24 год вносили таксани в концентраціях 0,1 й 1,0 нмоль/л. Через 24, 48 й 72 год клітини знімали за допомогою трипсину. Підрахунок клітин відбувався у гемоцитометрі.

Для вестерн-блот аналізу проводили електрофорез білків у градієнтному поліакриламідному гелі (7–22%) і напівсухе перенесення білків на нітроцелюлозну мембрану. Рівень експресії/фосфорилування досліджуваних білків, визначали з використанням антитіл до фосфо-pRb (Ser780) (“Cell Signaling Technology”, США), p53 (Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р. Є. Кавецького НАН України, Київ), цикліну E (“Santa Cruz Biotechnology”, США), цикліну D1 (“Cell Signaling Technology”, США), p21^{Waf1} (Oncogene, США) та β-актину (“Santa Cruz Biotechnology”, США), PARP (“Santa Cruz Biotechnology”, США).

Отримані дані було опрацьовано статистично з використанням *t*-критерію Стьюдента. Критичний рівень значущості — 0,05.

Вивчення впливу таксанів на клітини папілярного раку ЩЗ та дії доцетакселу на клітини лінії TPC1 показало, що клітини папілярної карциноми ЩЗ чутливі до наднизьких (у десятки й сотні тисяч разів менших від тих, що використовуються в клінічній практиці) концентрацій Dtx. Кількість живих клітин лінії TPC1 через 24 год інкубації з 0,1 й 1,0 нмоль/л Dtx зменшувалась в 2,5–4 рази (рис. 1).

Дослідження дії доцетакселу на регуляторні механізми клітинного циклу клітин лінії TPC1 показало (рис. 2), що Dtx у концентрації 0,1 нмоль/л не впливає на фосфорилування білка ретинобластоми (див. *a*) — пухлинного супресора, який контролює вхід клітини у фазу реплікації ДНК [5]. При підвищеній концентрації препарату (1 нмоль/л) спостерігали істотне дефосфорилування супресора (див. *a*), що може свідчити про зупинку циклу на стадії G1/S. Дослідження експресії циклінів D1 й E, які в комбінації з відповідними циклінзалежними кіназами (CDK) фосфорилують pRb [5], показало, що Dtx стимулює синтез цикліну D1, особливо при більш високій концентрації сполуки — 1 нмоль/л (див. рис. 2). У той самий час Dtx не впливав (0,1 нмоль/л) або істотно пригнічував синтез цикліну E.

Незважаючи на те що у присутності Dtx рівень іншого пухлинного супресора (p53) істотно не змінювався або навіть дещо зменшувався, помітно зростала кількість інгібітора CDK — p21^{Waf1/Cip1} (див. рис. 2). Очевидно, посилення експресії інгібітора відбувається за альтернативними, p53-незалежними механізмами [6, 7].

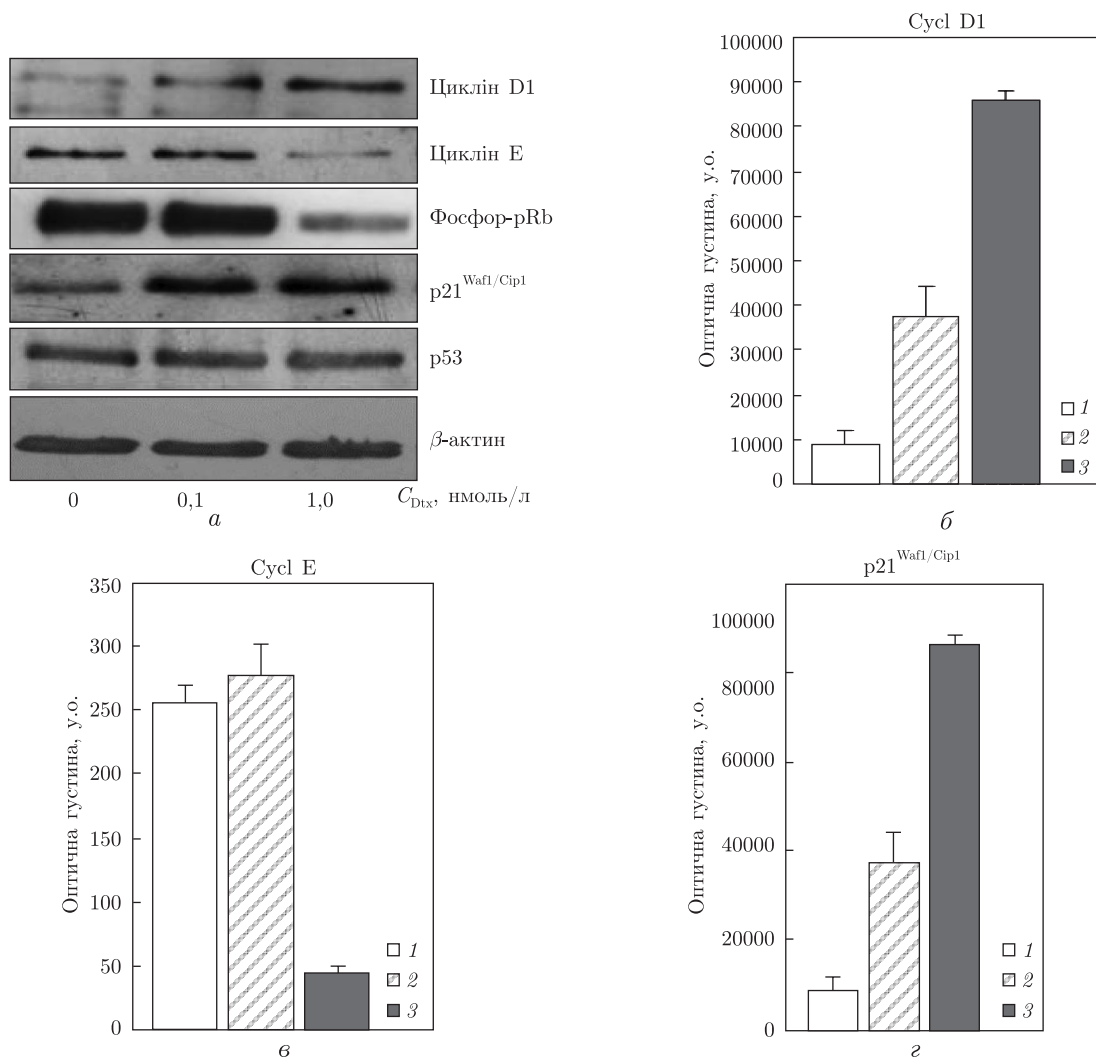


Рис. 2. Вплив доцетакселу на стан білків, які контролюють клітинний цикл клітин папілярної карциноми TRC1.

a — Результат вестерн-блот аналізу; *б...г* — оцінка кількості білків шляхом сканування за допомогою програми GelPro v.3.2: 1 — контроль; 2 — 0,1 нмоль/л Dtx; 3 — 1,0 нмоль/л Dtx. $M \pm m$

Отже, цитостатичні ефекти Dtx щодо клітин папілярної карциноми ШЗ, певно, реалізуються за двома різними механізмами. По-перше, це стимуляція експресії інгібітора CDK — p21^{Waf1/Cip1}, який пригнічує активність комплексів циклін-CDK, по-друге, активація білка ретинобластоми шляхом дефосфорування останнього. Вирішальним чинником щодо активації pRb є, певно, зниження у присутності 1 нмоль/л Dtx кількості цикліну Е (більш ніж у 5 разів щодо контролю), динаміка кількості якого повністю збігається з процесом дефосфорилювання pRb (див. рис. 2, *a*). Спостерігається, однак, протиріччя між посиленням експресії цикліну D1 та дефосфорилованим станом pRb. Циклін D1 у комплексі з CDK4/6 не тільки фосфорилює pRb, а й активує експресію цикліну Е. Можливо головною причиною неактивності комплексу циклін D1/CDK є його пригнічення інгібітором CDK — p21^{Waf1/Cip1}, внаслідок чого не відбувається трансактивації гена цикліну Е та фосфорилювання pRb комплексами циклін D1/CDK та циклін Е/CDK.

Таким чином, вірогідно, головним фактором, який зумовлює пригнічення проліферативних процесів у клітинах TPC1, є рівень експресії інгібітора CDK — p21^{Waf1/Cip1}.

1. Jordan M. A., Wilson L. Microtubules as a target for anticancer drugs // Nat. Rev. Canc. – 2004. – 4. – P. 253–265.
2. Ain K. B., Egorin M. J., DeSimone P. A. Treatment of anaplastic thyroid carcinoma with paclitaxel: phase 2 trial using ninety-six-hour infusion. Collaborative Anaplastic Thyroid Cancer Health Intervention Trials (CATCHIT) Group // Thyroid. – 2000. – 10, No 7. – P. 587–594.
3. Тронько М. Д., Левчук Н. І., Попадюк І. Д. та ін. Дія протипухлинного препарату таксолу на клітини анапластичного раку щитовидної залози // Доп. НАН України. – 2006. – № 8. – С. 204–206.
4. Zuo H., Tang W., Yasuoka H. et al. A review of 227 cases of small papillary thyroid carcinoma // Eur. J. Surg. Oncol. – 2007. – 33. – P. 370–375.
5. Nelson J. Structure and function in cell signalling. – Chichester: Wiley, 2008. – 389 p.
6. Phalk S., Mzoughi S., Bezzi M. et al. p53-Independent regulation of p21Waf1/Cip1 expression and senescence by PRMT // Nucleic Acids Res. – 2012. – 40, No 19. – P. 9534–9542.
7. Zuo S., Liu C., Wang J. et al. IGFBP-rP1 induces p21 expression through a p53-independent pathway, leading to cellular senescence of MCF-7 breast cancer cells // J. Cancer Res. Clin. Oncol. – 2012. – 138, No 6. – P. 1045–55.

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

Надійшло до редакції 05.02.2014

О. Л. Геращенко, Е. В. Журавель, В. В. Пушкарев, П. В. Погрибной,
член-корреспондент НАН України **Н. Д. Тронько**

Влияние таксанов на пролиферацию клеток папиллярной карциномы щитовидной железы

Исследовано влияние таксанов в сверхнизких концентрациях на пролиферативную активность клеток папиллярного рака щитовидной железы и на активность и экспрессию некоторых регуляторных факторов клеточного цикла. Показано, что доцетаксел подавлял пролиферацию клеток линии TPC1. Причиной торможения клеточного цикла может быть дефосфорилирование опухолевого супрессора pRb и усиление экспрессии ингибитора циклин-зависимых киназ — p21^{Waf1/Cip1}.

O. L. Gerashchenko, E. V. Zhuravel, V. V. Pushkarev, P. V. Pogrebnoy,
Corresponding Member of the NAS of Ukraine **M. D. Tronko**

Effect of taxanes on the cell proliferation of thyroid papillary carcinoma

We studied the effect of taxanes in ultralow concentrations on the proliferative activity of papillary thyroid cancer cells, as well as on the activity and the expression of several cell cycle regulatory factors. It is shown that docetaxel inhibited the proliferation of TPC1 cell line. The reason for cell cycle inhibition may be a tumor suppressor pRb dephosphorylation and increasing the expression of an inhibitor of cyclin-dependent kinases — p21^{Waf1/Cip1}.