

3. Bowman J. P., Sly L. I., Hayward A. C. Patterns of tolerance to heavy metals among methane-utilizing bacteria // Lett. Appl. Microbiol. – 1990. – **10**, No 2. – P. 85–87.
4. Vives-Rego J., Garcia-Lara J., Martinez J. Effect of heavy metals and urban wastes on electron transport system activity in seawater // Microbiol. Lett. – 1988. – **38**, No 151–152. – P. 117–121.
5. Таширеєв А. Б., Матвеева Н. А., Романовська В. А., Таширеєва А. А., Рокитко П. В. Полірезистентність і свєрхустойчивість к тяжєлым металлам антарктических мікроорганізмів // Доп. НАН України. – 2007. – № 11. – С. 170–175.
6. Pourbaix M. Atlas of electrochemical equilibria in aqueous solutions. – Oxford: Pergamon press, 1963. – 320 p.
7. Справочник химика / Под ред. Б. П. Никольского. – Москва; Ленинград: Химия, 1965. – 827 с.
8. Готтшальк Г. Метаболизм бактерий. – Москва: Мир, 1982. – 310 с.
9. Шлегель Г. Общая микробиология. – Москва: Мир, 1972. – 476 с.
10. Bacterial energy transduction / Ed. A. Christopper. – London; Toronto: Acad. Press, 1988. – 517 p.
11. Мейнелл Дж., Мейнелл Э. Экспериментальная микробиология. – Москва: Мир, 1967. – 332 с.

Институт микробиологии и вирусологии
им. Д. К. Заболотного НАН Украины, Киев
Мюнхенский инновационный центр, Германия

Поступило в редакцию 01.11.2007

УДК 616.441.-006.6-092.9:615.252

© 2008

Член-корреспондент НАН України М. Д. Тронько, В. М. Пушкарьов,
Д. В. Старенький, В. В. Пушкарьов, О. І. Ковзун, І. Д. Попадюк

Вплив низьких та високих концентрацій протиракового препарату таксолу на клітини анепластичного раку щитовидної залози

We studied changes of the cell cycle and the mitochondrial membrane potential, as well as the caspase activation in response to antitumour drug Taxol on the ARO cell line of anaplastic thyroid cancer. Taxol activated the cleavage of the caspase substrate starting from a drug concentration of 5 nM. Maximum activation was observed at 25 nM, and the increase in the Taxol concentration to 100 nM resulted in the reduction of caspase activation. Concomitant to caspase activation, we observed the loss of the mitochondrial membrane potential in cells, which indicates the initiation of the mitochondrial apoptotic pathway. At a concentration of 100 nM of Taxol, most cells lost its mitochondrial membrane potential. Low Taxol concentrations (10 nM) caused changes of the cell cycle typical of apoptosis. Higher Taxol doses starting from 50 nM arrested the cell cycle at G2/M phase. Possible types of cell death induced by the treatment with low and high doses of Taxol on thyroid cancer cells are discussed.

Таксол є високоефективним протираковим препаратом, який використовується для лікування багатьох видів раку, у тому числі і злоякісних пухлин ендокринного походження [1]. Вивчаються можливості його застосування для терапії анепластичного раку щитовидної залози (ЩЗ) — найбільш агресивної форми раку людини [2, 3]. Результати досліджень свідчать про те, що низькі концентрації (5–25 нМ) таксолу ініціюють в пухлинних клітинах ЩЗ апоптичні процеси [3]. У той же час у клінічній практиці застосовуються набагато вищі

концентрації цієї сполуки — 5–30 мкМ [4]. Тому актуальним є визначення оптимальних, необхідних і достатніх концентрацій таксолу, що зумовлюють загибель усіх трансформованих клітин при мінімальних пошкодженнях нормальних тканин організму.

Нами проведено порівняльне дослідження ефектів низьких та високих концентрацій таксолу в клітинах анапластичного раку ЩЗ лінії ARO.

Клітини культивували в середовищі RPMI-1640, що містило 5% фетальної 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 збирали клітини через визначені проміжки часу. У контрольні проби вносили в такій же кількості ДМСО.

Для вивчення стадій клітинного циклу клітини знімали з чашок Петрі трипсинізацією і промивали один раз теплим (37 °С) PBS. $1 \cdot 10^5$ клітин інкубували 15 хв при кімнатній температурі з флуоресцин-ізотіоціанат-кон'югованим (FITC) анексином V та пропідій йодидом (PI) у збагаченому Ca²⁺ 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 20000.

Зміни мембранного потенціалу мітохондрій клітин, забарвлених етиловим ефіром тетраметилродаміну (TMRE, “Molecular probes”, США), вивчали за допомогою проточного цитофлуориметра [5]. Після інкубації з таксолем клітини збирали трипсинізацією і $1 \cdot 10^5$ клітин інкубували з 100 нг/мл TMRE у фізіологічному розчині, що містив HEPES (рН 7,4), протягом 15 хв з наступним аналізом на проточному цитофлуориметрі (20000 клітин на пробу). Інтенсивність флуоресценції TMRE визначали при довжині хвилі 582 нм (FL-2). Одержані дані аналізували з використанням програми WinMDI.

Прижиттєве забарвлення клітин з активованими каспазами та інтактними мітохондріями здійснювали в камерах на предметних стеклах (4 камери на скло). Після інкубації з таксолем через 24 або 48 год клітини промивали теплим PBS та інкубували 15 хв у термостаті в розчині PBS з барвниками 10 нМ TMRE (мітохондрії), 100 нМ біс-L-аспартат-аміду родаміну-110 (R-22122, “Molecular probes”, США) — каспази, 1 мМ Hoechst 33342 (“Wako”) — ядра. Аналізували за допомогою флуоресцентного мікроскопа “Nikon” з цифровою відеокамерою при збудженні ультрафіолетом.

Як було показано раніше, таксол викликає дозозалежну загибель клітин анапластичного раку [3]. З рис. 1 видно, що інкубація клітин з таксолем у концентрації 10 нМ призводить до їх відділення від субстрату (клітини округлої форми на фотографії) і загибелі основної маси через 48 год. У присутності 100 нМ таксолу відділяються від поверхні чашки Петрі та гинуть усі клітини. Як вважалось, причиною такої загибелі є індуковані цією сполукою апоптозні процеси. Дане припущення підтверджується результатами прижиттєвого забарвлення клітин флуоресцентними барвниками (рис. 2). У контролі активовані каспази (зелений колір на фото) практично відсутні, інкубація клітин з 5 нМ таксолу призводить до їх активації, максимум якої спостерігається при 25 нМ препарату. Необхідно відзначити, що збільшення концентрації таксолу до 100 нМ призводить до зменшення кількості активованих каспаз у клітинах (див. рис. 2).

Використання одночасно кількох флуоресцентних барвників дозволило паралельно з активацією каспаз спостерігати зміну кількості клітин з інтактними мітохондріями. Барвник

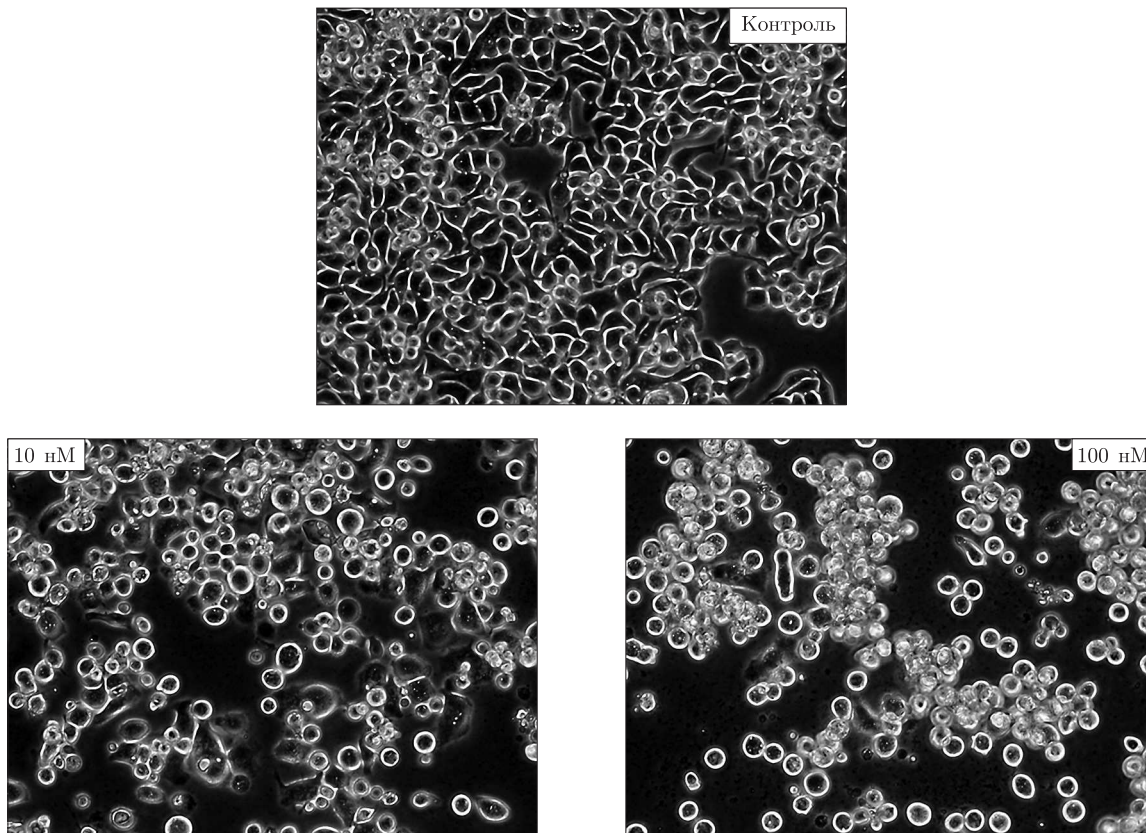


Рис. 1. Вплив таксолу (10 і 100 нМ) на прикріплення клітин до субстрату та життєздатність клітин анапластичного раку ARO. Наведено дані типового дослідження з трьох

(TMRE) проникає через клітинну мембрану і накопичується в мітохондріях з незмінним мембранним потенціалом. Зменшення кількості клітин, забарвлених на рис. 2 у червоний колір, свідчить про втрату цими клітинами мембранного потенціалу мітохондрій. Таке зменшення стає помітним при 25 нМ таксолу, а в присутності 100 нМ сполуки клітин з непошкодженими мітохондріями залишається незначна кількість (див. рис. 2). Ці дані підтверджуються результатами дослідів з використанням методу проточної цитофлуориметрії (рис. 3). Видно, що при 100 нМ таксолу кількість клітин з пошкодженими мітохондріями зростає (на рис. 3 популяція таких клітин обведена овалом).

Забарвлення клітин йодистим пропідієм і подальший їх аналіз методом проточної цитофлуориметрії показав, що в контрольних пробах більшість клітин знаходяться на стадії G1 циклу (рис. 4). Таксол у концентрації 2 нМ не впливав на співвідношення клітин, які знаходяться на різних стадіях клітинного циклу. Значні зміни спостерігалися при підвищенні концентрації препарату до 10 нМ. Зменшувалася кількість клітин на стадії G1 та зростала їх кількість на стадії subG1, що свідчить про ініціацію апоптозних процесів. Це припущення підтверджується і результатами, одержаними за допомогою методу імуноблотингу [3]. Збільшення концентрації таксолу до 50 нМ та, особливо, до 100 нМ призводить до зупинки всіх клітин на стадії G2/M циклу.

Таким чином, одержані результати та дані літератури [6] свідчать про досить чітку відмінність між ефектами низьких (10–25 нМ) та високих (50–100 нМ) концентрацій таксолу.

У першому випадку спостерігається апоптоз *bona fide*, тоді як при високих концентраціях таксолу поряд з апоптозом може мати місце деградація, колапс мітохондрій, що призводить до інших видів клітинної смерті. Можна припустити, що апоптозні процеси відбуваються в клітинах, що не втратили здатності до проходження всіх стадій клітинного циклу, а отже, до поділу клітини. Зупинка клітинного циклу та втрата клітинами здатності до поділу при пошкодженні ДНК або в присутності хімічних агентів може призводити до таких типів клітинної смерті, як мітотична катастрофа, некроз або прискорена сенесценсія [7].

Варто відзначити, що навіть дуже низькі концентрації таксолу (5–10 нМ) спричиняють апоптоз та загибель практично всіх клітин найбільш стійкої лінії анапластичного раку ЩЗ — ARO. Тому надзвичайно високі концентрації таксолу, які застосовують у медичній практиці, можливо, є не досить виправданими. Це припущення підтверджують дані, одержані шляхом аналізу фармакокінетики модифікованого таксолу — доцетакселу, які свідчать про те, що вже через кілька хвилин після введення препарату його концентрація в плазмі крові знижується з 10 мкМ до 100 нМ, а через 6 год — до 10 нМ [4]. Тому, можливо, треба вводити невеликі кількості таксолу та підтримувати протягом тривалого часу (кілька діб) його концентрацію в межах 10–25 нМ, що є достатнім для ініціації апоптозу в пухлинній тканині і в той же час практично не пошкоджує нормальні тканини [3].

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. 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.
5. Scaduto R. C., Grotyohann L. W. Measurement of mitochondrial membrane potential using fluorescent rhodamine derivatives // *Biophys. J.* – 1999. – 76. – P. 469–477.
6. Takimoto C. H., Rowinsky E. K. Dose-intense paclitaxel: deja vu all over again? // *J. Clin. Oncol.* – 2003. – 21, No 15. – P. 2810–2814.
7. Roninson I. B., Broude E. V., Chang B.-D. If not apoptosis, then what? Treatment-induced senescence and mitotic catastrophe in tumor cells // *Drug Resist. Update.* – 2001. – 4. – P. 303–313.

*Інститут ендокринології та обміну речовин
ім. В. П. Комісаренка АМН України, Київ*

Надійшло до редакції 24.07.2007