



УДК 616.441.-006.6-092.9:615.252

© 2011

В. В. Пушкаръов, О. І. Ковзун, І. Д. Попадюк, В. М. Пушкаръов,
член-кореспондент НАН України **М. Д. Тронько**

Роль сигнального каскаду Ras/PI3K/Akt у формуванні стійкості клітин анапластичного раку щитоподібної залози до паклітакселу

Вивчали участь протеїнкіназ PI3K та Akt у опосередкуванні дії протипухлинного препарату паклітакселу на клітини раку щитоподібної залози лінії ARO. Показано, що в присутності паклітакселу в пухлинних клітинах активація Akt пригнічується. Інгібітор PI3K – LY294 002 посилює активацію каспази-3 та пригнічує експресію інгібітора апоптозу – сурвайвіну, що вказує на можливий механізм формування стійкості пухлинної клітини до паклітакселу за участю PI3K/Akt-каскаду. Отже, комбінована дія інгібіторів цього каскаду та паклітакселу є одним з шляхів посилення канцеростатичної дії препарату щодо клітин анапластичного раку щитоподібної залози.

Паклітаксел — високоефективний препарат, що успішно використовується для лікування деяких форм раку [1]. Вивчається можливість використання паклітакселу для терапії анапластичної карциноми щитоподібної залози (АТС) — найбільш агресивної форми раку людини [2]. Показано, що паклітаксел ініціює апоптозні та некротичні процеси в пухлинних клітинах. Проте одночасно активуються і механізми, що протидіють канцеростатичному ефекту препарату [3]. Тому дослідження механізмів дії паклітакселу в трансформованих клітинах та визначення способів інактивації сигнальних каскадів, які беруть участь у набутті резистентності пухлини до цього протипухлинного препарату, є надзвичайно актуальними.

У даному повідомленні наведено результати вивчення ролі каскаду, пов'язаного з фосфатидилінозитид-3-кіназою (PI3K), щодо індукованого паклітакселем апоптозу в клітинах найбільш агресивної лінії анапластичного раку щитоподібної залози, ARO.

Клітини культивували в середовищі RPMI-1640, що містило 5% бичачої сироватки, 1% пеніциліну/стрептоміцину, в атмосфері з 5% CO₂ при 37 °C протягом 2 діб, промивали двічі 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)

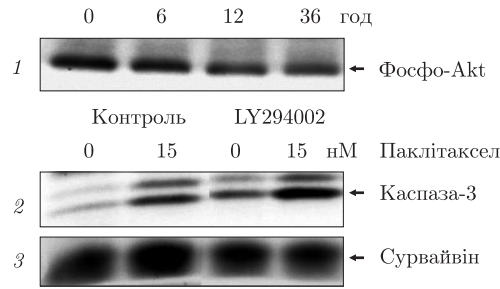


Рис. 1. Вплив паклітакселу на активацію протеїнкінази Akt, каспази-3 та експресію сурвайвіну в клітинах анапластичного раку ARO.

1 — залежність фосфорилування протеїнкінази Akt від часу інкубації клітин ARO з 15 нМ паклітакселу; 2, 3 — ефект паклітакселу та інгібітора PI3K, LY294002 (10 мкМ) на активацію каспази-3 та експресію сурвайвіну в клітинах анапластичного раку щитоподібної залози

і збирали клітини через визначені проміжки часу. У контрольні проби вносили в такий же кількості ДМСО. 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 Вестерн-блотинг проводили за методикою, що описана раніше [4]. У дослідженні використані поліклональні антитіла до каспази-3, сурвайвіну, фосфорформи білка Akt, мічені пероксидазою хрому вторинні антитіла та інгібітор PI3K — LY294002 від фірми “Cell Signaling Technology” (США). Комплекси білків з антитілами візуалізували за допомогою реагенту ECL (“Amersham Life Science”, Велика Британія).

Як було показано раніше, паклітаксел викликає дозозалежну загибель клітин АТС [5]. Причиною такої загибелі є індуковані сполукою апоптозні процеси. Серед сигнальних механізмів, що опосередковують антиапоптозні, захисні процеси в пухлинній клітині головними вважаються Ras/Raf/MEK/MAPK та Ras/PI3K/Akt каскади. PI3K активується ГТФазою Ras через низку адаптерних білків і далі активує Akt, яка інгібує проапоптозний білок Bad, транскрипційні фактори сімейства Forkhead, каспазу-9 і активує протеїнкінази IKK, mTOR, p70S6 K, які беруть участь у виживанні клітини, посилюють синтез білка і сприяють прогресу клітинного циклу на стадії G1/S [6–8].

Вивчення ефекту паклітакселу на активацію Akt в клітинах АТС показало, що фосфорилування, а отже, і активація протеїнкінази помітно знижується починаючи з 6 год інкубації клітин з препаратом (рис. 1, 1), що узгоджується з даними, одержаними на інших типах пухлинних клітин.

Для з'ясування ролі сигнального каскаду PI3K/Akt у індукованому паклітакселем апоптозі клітини інкубували зі специфічним інгібітором PI3K — LY294002. З рис. 1, 2 видно, що паклітаксел ініціює активацію каспази-3, яка значно посилюється в присутності інгібітора протеїнкінази.

Одним з механізмів пригнічення апоптозу є взаємодія білків-інгібіторів апоптозу (IAP) з активованими каспазами. Протеїнкіназа Akt прямо або опосередковано через активацію ядерного транскрипційного фактора NFκB, посилює експресію IAP, до яких належить і сурвайвін [9]. У присутності паклітакселу експресія сурвайвіну посилюється, що є одним з можливих механізмів протидії пухлинній клітині цитотоксичному ефекту сполуки (див. рис. 1, 3). У присутності інгібітора PI3K кількість сурвайвіну помітно зменшується (див. рис. 1, 3).

Отже, активність PI3K/Akt з наступним посиленням експресії IAP, зокрема сурвайвіну, є одним з механізмів, які стримують індуковані паклітакселем апоптозні процеси.

Таким чином, інгібітори сигнального каскаду PI3K/Akt є перспективними сполуками, використання яких у комбінації з паклітакселем дасть можливість посилити терапевтичний ефект останнього.

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. Ling X., Bernacki R. J., Brattain M. G., Li F. Induction of survivin expression by taxol (paclitaxel) is an early event, which is independent of taxol-mediated G2/M arrest // J. Biol. Chem. – 2004. – 279, No 15. – P. 15196–15203.
4. Пушкар'ов В. М., Ковзун О. І., Тронько М. Д. та ін. Шляхи передачі регуляторного сигналу K^+ в адренкортикальних клітинах людини // Укр. біохім. журн. – 2005. – 77, № 1. – С. 61–67.
5. Тронько М. Д., Левчук Н. І., Попадюк І. Д. та ін. Дія протипухлинного препарату таксолу на клітини анапластичного раку щитоподібної залози // Доп. НАН України. – 2006. – № 8. – С. 204–206.
6. Ciechomska I., Pyszynska B., Kazmierczak P., Kaminska B. Inhibition of Akt kinase signalling and activation of Forkhead are indispensable for upregulation of FasL expression in apoptosis of glioma cells // Oncogene. – 2003. – No 22. – P. 7617–7627.
7. Chiang G. G., Abraham R. T. Targeting the mTOR signaling network in cancer // Trends Mol. Med. – 2007. – 13, No 10. – P. 433–442.
8. Brunette A., Datta S. R., Greenberg M. E. Transcription-dependent and -independent control of neuronal survival by the PI3K-Akt signalling pathway // Curr. Opin. Neurobiol. – 2001. – 11. – P. 297–305.
9. Carvalho A., Carmena M., Sambade C. et al. Survivin is required for stable checkpoint activation in taxol-treated HeLa cells // J. Cell Sci. – 2003. – 116. – P. 2987–2998.

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

Надійшло до редакції 25.06.2010

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

The role of the signal cascade Ras/PI3K/Akt in the formation of the resistance of thyroid anaplastic cancer cells to paclitaxel

The role of PI3K and Akt protein kinases in mediating the action of antitumor drug paclitaxel on the cell line of thyroid anaplastic cancer – ARO is studied. It is shown that paclitaxel reduces the Akt activation in cancer cells. PI3K-inhibitor, LY294002, enhances caspase-3 activation and reduces expression of apoptosis inhibitor – survivin, which points out the possible cancer cells resistance forming mechanism to paclitaxel involving the PI3K/Akt-cascade. Thus, the combined use of this cascade inhibitors and paclitaxel is one of the possible ways to augment the drug therapeutic effect upon thyroid anaplastic cancer cells.