



УДК 577.151.64;616.006

© 2008

**С. В. Хижняк, Л. В. Сорокіна, Д. С. Осинський, Є. М. Дьомін,
В. М. Войціцький**

Експресія антиапоптозних білків у тканинах колоректальної аденокарциноми при різних клінічних стадіях

(Представлено академіком НАН України Д. О. Мельничуком)

The disbalance between the processes of cell division and cell death is the most inherent attribute of tumor cells. The aim of this work was to evaluate the expression levels of 3'-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (PDK 1) and antimetastatic proteins Bcl-2 and Bcl-xL in the tumor tissues of surgically removed colorectal adenocarcinoma of different clinical stages. The estimated increased quantities of these signal proteins at the II-nd and IV-th carcinoma stages testify to the involvement of the precisely coordinated signal proteins to the processes of general programmed cell death inhibiting during the carcinogenesis.

Рак товстої кишки є третім за поширеністю та частотою летального кінця онкологічним захворюванням в Україні після бронхолегенового раку та онкопатологій молочних залоз [1]. Це зумовлює актуальність дослідження молекулярних механізмів формування та підтримання неопластичного фенотипу на різних етапах колоректального канцерогенезу. Прогресування пухлини, спричинене, насамперед, розбалансуванням у регуляції процесів проліферації та програмованої загибелі клітин, є однією з властивостей новоутворень [2]. Пошук білків, зміни експресії яких можуть бути характерними ознаками колоректального канцерогенезу, є необхідним для виявлення нових молекулярних маркерів цього процесу.

Відомо, що серинтреонінова 3'-фосфоінозитидзалежна протеїнкіназа-1 (PDK-1) є ключовим ензимом у регуляції сигнальних шляхів при реалізації процесів клітинного поділу та диференціювання, апоптозної загибелі та рухливості клітин [3, 4]. Можливі кінцеві мішені дії PDK-1 — проапоптозні білки мітохондріального каскаду програмованої клітинної загибелі з сімейства протеїну BCL-2 [5], які є продуктами генів-супресорів пухлин та одним з пускових факторів мітоптозу [6]. Ключову роль у блокуванні програмованої загибелі на рівні мітохондрій відіграють протеїни Bcl-2 й Bcl-xL, які локалізовані в мембранах цих органелів [7].

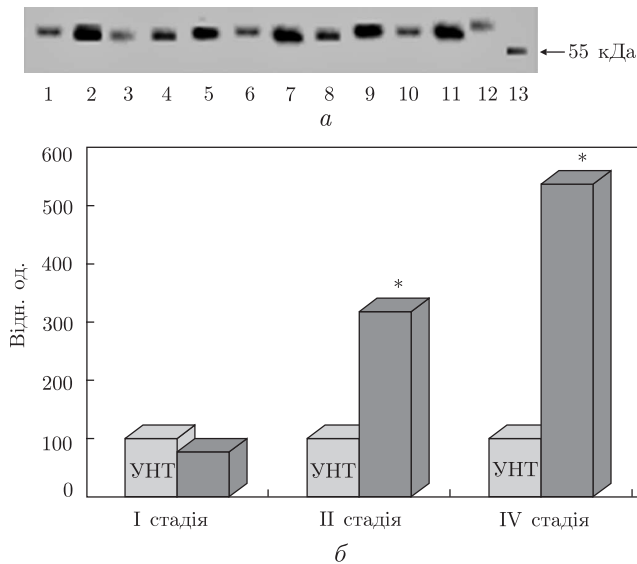


Рис. 1. Результати вестерн-блотингу з використанням моноклональних антитіл проти кінази PDK-1: *a* — типова блотограма [Стадія (тут і на рис. 2, 3): I — пухлина 1, УНТ відповідно 2; II — пухлина 3, 5, 7, УНТ відповідно 4, 6, 8; IV — пухлина 9, 11, УНТ відповідно 10, 12.]; *б* — вміст кінази PDK-1 на різних клінічних стадіях колоректальної аденокарциноми.

Зірочка (*) — $p \leq 0,05$

Метою даної роботи було виявлення рівнів експресії кінази PDK-1 та антиапоптозних мітохондріальних білків Bcl-2 й Bcl-xL — сигнальних молекул, залучених до механізмів запобігання мітоптозу в пухлинних клітинах колоректальної аденокарциноми людини при різних клінічних стадіях.

Матеріали та методи досліджень. За об'єкти дослідження використовували післяопераційний матеріал пухлин товстої кишки, а саме: ободової (сигмоподібний та низхідний відділи) та прямої кишки, які, згідно з клінічною класифікацією, відповідали I, II і IV стадіям, а за результатами гістологічного аналізу — помірно- та низькодиференційованим аденокарциномам. В якості контрольних брали відповідні ділянки умовно нормальної епітеліальної тканини (УНТ), макроскопічно незміненої слизової, на відстані 10 см від карциноми.

Досліджувані тканини промивали фізіологічним розчином і гомогенізували у скляному гомогенізаторі в середовищі, яке містило 20 ммоль/л трис-НСl (рН 7,4 при 20 °С), 0,32 ммоль/л сахарозу, 2 ммоль/л ЕДТА та інгібітори протеаз (1 ммоль/л фенолметилсульфонілфлуорид, 50 мкг/мл бензамідин натрію, 0,1 мг/мл соєвий інгібітор трипсину). У досліджах використовували супернатант після центрифугування протягом 20 хв при 800 г.

Вміст досліджуваних білків визначали за допомогою методу імуноблотингу, використовуючи специфічні антитіла до протеїнів PDK-1, Bcl-2, Bcl-xL (Santa Cruz Biotechnologies Inc., США). За вторинні антитіла брали антимишині імуноглобуліни G, що кон'юговані з пероксидазою кінського хрому (Santa Cruz Biotechnologies Inc., США). Візуалізацію блотограм проводили за допомогою системи підсиленої хемілюмінесценції; кількісну обробку отриманих результатів — стандартними методами варіаційної статистики та з застосуванням пакету програм TotalLab Demo v.2.01.

Результати та їх обговорення. В ході досліджень отримано такі результати (рис. 1, *a*): на I стадії колоректальної аденокарциноми кількісний вміст PDK-1 у пухлинній тканині

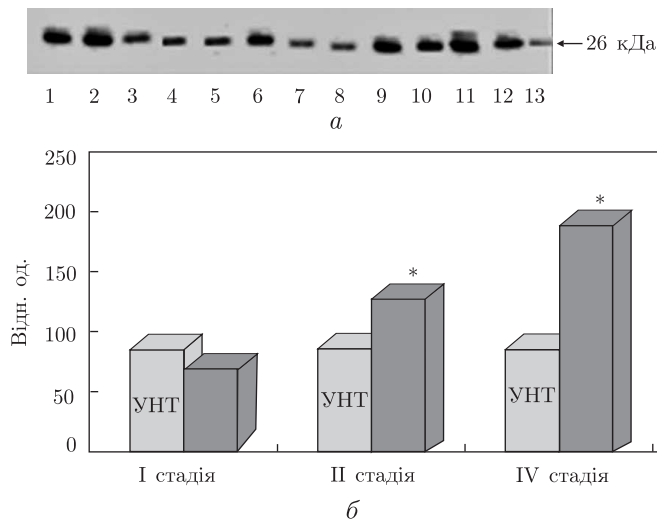


Рис. 2. Результати вестерн-блотингу з використанням моноклональних антитіл проти білка Bcl-2: *a* — типова блотограма; *б* — вміст білка Bcl-2 на різних клінічних стадіях колоректальної аденокарциноми. Зірочка (*) — $p \leq 0,05$

зменшується у порівнянні з показником відповідно УНТ (прийнятим за 100) у середньому в 1,25 раза, тоді як на II стадії вміст протеїнкінази в пухлинній тканині збільшується в 3,18 раза відносно УНТ, а на IV — у 5,37 раза (див. рис. 1, *б*).

Підвищення рівня експресії 3'-фосфатидилінозитидзалежної PDK-1 у міру прогресування пухлини може свідчити про участь даного регуляторного ензиму в реалізації ряду сигнальних каскадів упродовж канцерогенезу. Так, активація синтезу PDK-1 у пухлинних клітинах може призводити до реорганізації цитоскелету, інактивації низки проапоптозних білків, посилення проліферативної активності клітин тощо [3, 4, 8]. Здатність PDK-1 сприяти виживанню пухлинних клітин, можливо, пов'язана з участю даного ферменту в пригніченні мітохондріальної ланки апоптозної загибелі клітин шляхом фосфорилування протеїнкінази B/Akt, яка активується та здатна інгібувати функціональну активність протеїнів сімейства BCL-2 — Bax й Bad [5, 8]. Крім того, збільшення туморогенного потенціалу пухлинних клітин при підвищеній експресії PDK-1 може бути зумовлене активуючим впливом кінази на мішень PKC α , яка через β -катенін та циклін D спричинює стимуляцію клітинної проліферації [9].

Подальші дослідження проводили з метою з'ясування характеру експресії ключових антиапоптозних білків мітохондріального каскаду — Bcl-2 й Bcl-xL у тканинах колоректальної аденокарциноми на різних клінічних стадіях. При цьому враховували можливість впливу PDK-1 на компоненти сигнального шляху реалізації мітоптозу.

Згідно з результатами, наведеними на рис. 2, *a*, на I стадії аденокарциноми не виявлено достовірних відмінностей у вмісті протеїну Bcl-2 порівняно з УНТ, на II стадії вміст Bcl-2 білка в пухлинній тканині збільшується в 1,46 раза у порівнянні з відповідною УНТ, а на IV стадії — у 1,93 раза (див. рис. 2, *б*).

Подібну тенденцію виявлено при визначенні вмісту іншого антиапоптозного протеїну, задіяного в регуляції сигнального каскаду мітоптичної загибелі — Bcl-xL (рис. 3, *a*). Результати аналізу блотограми вказують на відсутність виражених змін в експресії даного білка на початковій стадії розвитку аденокарциноми, проте на II та IV стадіях спо-

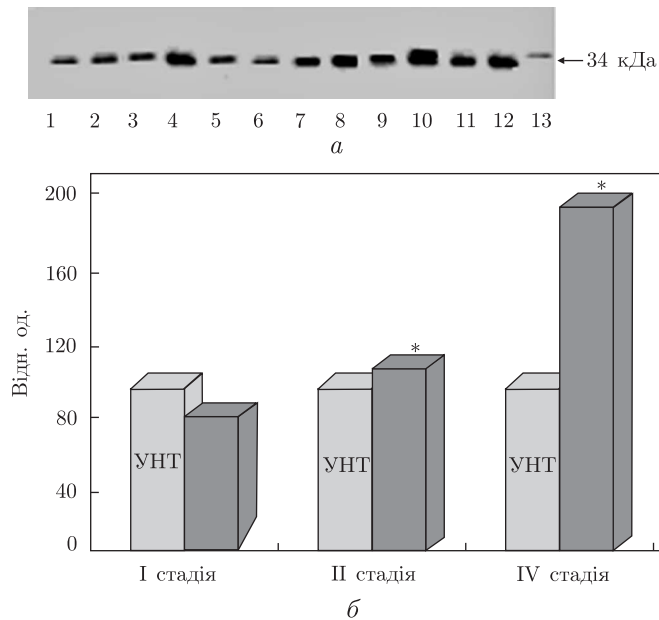


Рис. 3. Результати вестерн-блотингу з використанням моноклональних антитіл проти білка Bcl-xL: *a* — типова блотограма; *б* — вміст білка Bcl-xL на різних стадіях клінічних колоректальної аденокарциноми. Зірочка (*) — $p \leq 0,05$

стерігається збільшення вмісту білка Bcl-xL у 1,15 і 2,01 рази відносно відповідної УНТ (див. рис. 3, *б*).

Функціональний синергізм білків Bcl-2 й Bcl-xL підтверджується односпрямованим характером їх експресії при різних клінічних стадіях колоректальної аденокарциноми. Надекспресія протеїнів Bcl-2 й Bcl-xL у трансформованих клітинах запобігає їх цитокініндукованій загибелі [10, 11], перешкоджає відкриттю в мітохондріальній мембрані мегаканалів, через які відбувається вивільнення цитохрому *c*, апоптозіндукованого фактора та ряду малих молекул [7, 11], спричинює формування механізмів стійкості до впливу апоптичних стимулів та дії хімотерапевтичних засобів [12].

Таким чином вивчення клінічного матеріалу колоректальної аденокарциноми дало змогу оцінити рівні експресії регуляторної протеїнкінази-1 та антиапоптозних білків Bcl-2 й Bcl-xL, на активність яких вона може впливати впродовж канцерогенезу. Збільшення вмісту протеїнів Bcl-2 й Bcl-xL, а також їх регулятора PDK-1 у тканинах колоректальної аденокарциноми на II і IV стадіях свідчить про скоординоване функціонування даних сигнальних білків, наслідком чого може бути пригнічення мітоптозу при канцерогенезі.

Подальші дослідження є перспективними як для розуміння фундаментальних механізмів онкогенезу, так і для створення більш інформативних методів прогнозування раку товстої кишки й розробки нових заходів мішенної протипухлинної терапії.

1. Пушкар Л. О. Епідеміологічні аспекти гастроінтестинального раку в Європі та Україні // Сучасна гастроентерологія. — 2006. — **28**, № 2. — С. 22–25.
2. Hanahan D., Weinberg R. The hallmarks of cancer // Cell. — 2000. — **100**. — P. 57–70.
3. Anderson K., Coadwell J., Stephens L., Hawkins P. Translocation of PDK-1 to the plasma membrane is important in allowing PDK-1 to activate protein kinase B // J. Curr. Biol. — 1998. — **8**, No 12. — P. 684–691.

4. *Paradis S., Ailion M., Toker A. et al.* A PDK 1 homolog is necessary and sufficient to transduce AGE-1 PI3kinase signals that regulate diapause in *Caenorhabditis elegans* // *Genes and Dev.* – 1999. – **13**, No 11. – P. 1438–1452.
5. *Stephens L., Anderson K., Stokoe D. et al.* Protein kinase B kinases that mediate phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate – dependent activation of protein kinase B // *Science.* – 1998. – **5351**. – P. 710–714.
6. *Gross A., McDonnell J., Korsmeyer S.* BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis // *Genes and Dev.* – 2007. – **13**. – P. 1899–1911.
7. *Adams J. M., Cory S.* The Bcl-2 protein family: Arbiters of cells survival // *Science.* – 2001. – **281**. – P. 1322–1326.
8. *Xie Zh., Zeng X., Waldman T., Glazer R. J.* Transformation of Mammary Epithelial Cells by 3'-Phosphoinositide-dependent Protein Kinase-1 Activates β -Catenin and C-myc, and Down Regulates Caveolin-1 // *Cancer Res.* – 2003. – **63**. – P. 5370–5375.
9. *Teker A., Newton A.* Cellular signalling: pivoting around PDK 1 // *Cell.* – 2001. – **103**. – P. 185–188.
10. *Kelekar A., Thompson C.* Bcl-2-family proteins: the role of the BH3 domain in apoptosis // *Trends Cell Biol.* – 1998. – **8**. – P. 324–330.
11. *Wang X.* The expanding role of mitochondria in apoptosis // *Genes and Dev.* – 2000. – **15**. – P. 2922–2933.
12. *Фільченков О. О., Стойка Р. С.* Апоптоз і рак: від теорії до практики. – Тернопіль: Тернопіль. держ. ун-т, 2006. – 524 с.

*Київський національний університет
ім. Тараса Шевченка
Інститут онкології АМН України, Київ*

Надійшло до редакції 27.09.2007