



<http://dx.doi.org/10.15407/dopovidi2016.07.120>

УДК 616.441.-006.6-092.9:615.252

Б. Б. Гуда, В. М. Пушкарьов, О. В. Журавель, В. В. Пушкарьов,
А. Є. Коваленко, Ю. М. Тарашенко,
член-кореспондент НАН України М. Д. Тронько

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

E-mail: pushkarev.vm@gmail.com

Експресія та активація протеїнкінази Akt/РКВ в нормальних тканинах, доброякісних та високодиференційованих злоякісних пухлинах щитоподібної залози людини

Вивчено експресію та активацію головної ефекторної протеїнкінази фосфатидилінозитол-3-кіназного каскаду (PI3K) – протеїнкінази Akt (v-akt murine thymoma viral oncogene homolog) в нормальних тканинах, доброякісних та високодиференційованих злоякісних (з метастазами та без метастазів) пухлинах щитоподібної залози (ЩЗ) людини. Встановлено відмінності щодо кількості Akt1 в пухлинній тканині порівняно з нормальними тканинами у фолікулярних аденомах та карциномах. Сумарна активність Akt всіх трьох ізоформ – Akt1, Akt2, Akt3 – майже повністю пригнічена в пухлинах, порівняно з нормальною тканиною, крім тканини багатовузлового зоба. Зроблено висновок, що активність Akt не пов'язана з проліферативними процесами в пухлинній тканині ЩЗ. Розглянуто можливі механізми пригнічення активності сигнального каскаду PI3K в пухлинах ЩЗ.

Ключові слова: щитоподібна залоза, доброякісні пухлини, злоякісні пухлини, сигнальний каскад PI3K/Akt.

Проліферативні процеси в пухлинних клітинах контролюються двома основними каскадами: PI3K/Akt та кіназами, що активуються мітогенами (MAPK). Останній каскад регулює власне поділ клітини. PI3K/Akt бере участь у регуляції білкового синтезу і забезпеченні клітини енергією, тобто готує клітину до мітозу. Крім того, цей сигнальний каскад пригнічує

© Б. Б. Гуда, В. М. Пушкарьов, О. В. Журавель, В. В. Пушкарьов, А. Є. Коваленко, Ю. М. Тарашенко, М. Д. Тронько, 2016

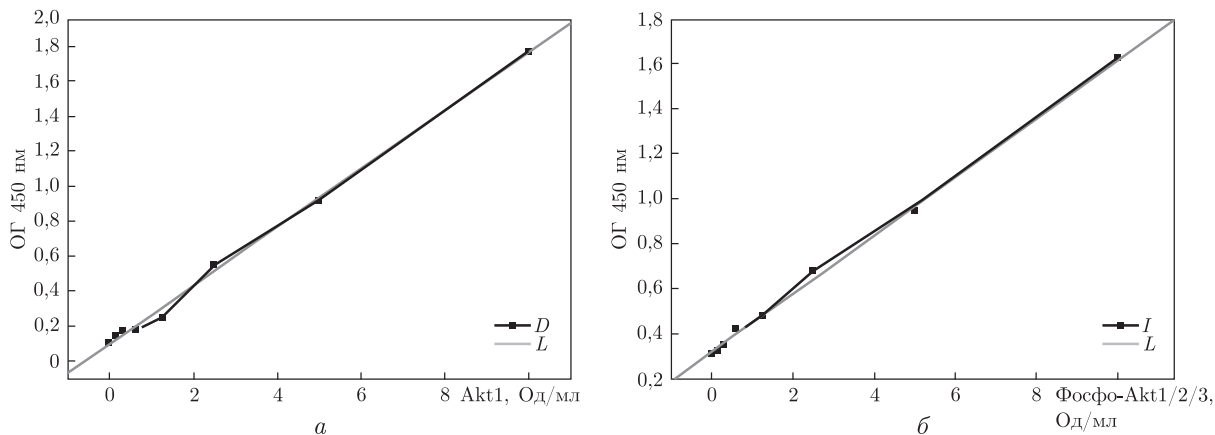


Рис. 1. Калібрувальна крива для визначення кількості Akt1 (*D*) та фосфо-Akt1/2/3 (*I*) в гомогенатах ЩЗ

апоптоз, сприяє виживанню пухлинних клітин і є активованим при багатьох типах раку [1]. Більше того, мутації та ампліфікація окремих компонентів РІЗК/Akt-каскаду є причиною злоякісної трансформації клітин різного походження, в тому числі і щитоподібної залози (ЩЗ) [2], а пригнічення каскаду специфічними інгібіторами посилює терапевтичний ефект протипухлинних засобів [3]. Активність Akt, яка представлена в клітинах у трьох ізоформах — Akt1, Akt2 та Akt3, регулюється шляхом фосфорилування по амінокислотних залишках треоніну 308 і серину 473 кіназами PDK1 і mTORC2 відповідно.

Раніше нами було виявлено значне збільшення вмісту ядерного антигену проліферуючих клітин (PCNA) у пухлинах ЩЗ, особливо в агресивних пухлинах з метастазами, що свідчить про значне посилення проліферативних процесів [4]. Метою даного дослідження було визначення експресії та активації Akt, як основної ефекторної кінази фосфатидилінозитол-3-кіназного каскаду (РІЗК) в нормальних тканинах та доброякісних і злоякісних пухлинах ЩЗ людини.

Дослідження проводили на післяопераційному матеріалі хворих, одержаному в хірургічному відділенні ДУ “Інститут ендокринології та обміну речовин ім. В. П. Комісаренка НАМН України”. Одразу ж після видалення тканину ЩЗ поміщали на лід і швидко заморожували при $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Тканину гомогенізували в гомогенізаторі TissueLyser II (“Retsch”, Німеччина) у спеціальному буфері RIPA (Radio-Immunoprecipitation Assay: 150 мМ NaCl, 1,0% IGEPAL[®] SA-630, 0,5% дезоксихолат натрію, 0,1% додецилсульфат натрію, 50 мМ Tris, рН 8,0), який запобігає деградації та втраті активності білків. Гомогенат зберігали до подальшого використання при $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Для визначення кількості Akt1 та фосфо-Akt1/2/3 (фосфо-T308) в гомогенатах ЩЗ використовували набори для імуноферментного аналізу ab176658 (“Abcam”, Велика Британія). Дослідження проводили в триплетах. Концентрацію білка в лізаті визначали за допомогою наборів (BCA protein assay kit) фірми “Novagen” (США). Вимірювання проводили на мікропланшетному рідері фірми “Bio-tek Instruments” (США).

Результати експериментів представляли як $M \pm m$, $n = 3 \div 6$. Для порівняння двох груп даних використовували *t*-критерій Стьюдента.

З рис. 1 видно, що одержані калібрувальні графіки практично ідеально збігаються з теоретичною прямою (*L*), що свідчить про відсутність розкиду даних.

У всіх досліджених тканинах, як нормальних, так і пухлинних, спостерігався досить

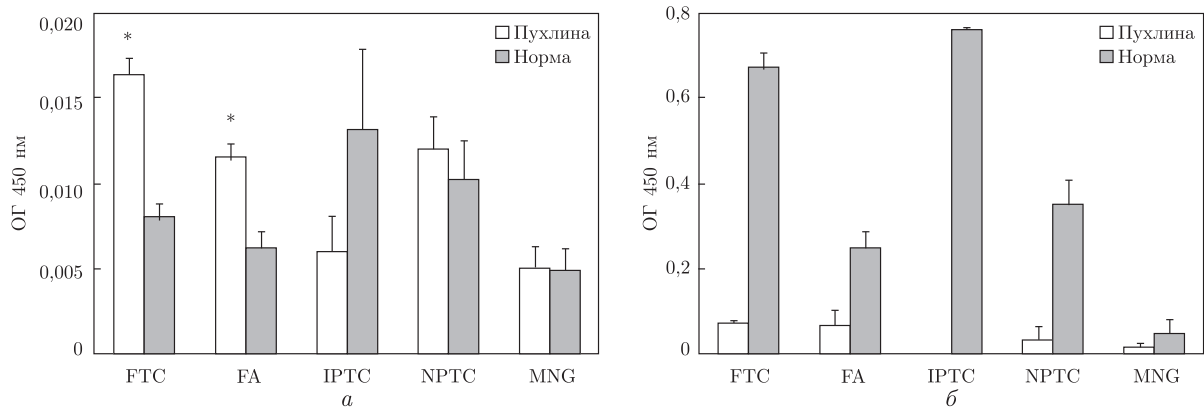


Рис. 2. Експресія Akt1 (а) та активація Akt1/2/3 (б) в різних типах пухлин ЩЗ.

FTC — фолікулярна карцинома, FA — фолікулярна аденома, IPTC — папілярна карцинома (інкапсульовані пухлини), NPTC — папілярна карцинома (неінкапсульовані пухлини), MNG — багатовузловий зуб. $M \pm m$, $n = 3 \div 6$; а: * — відміни між умовно нормальною та пухлинною тканинами достовірні, $P < 0,05$. б: відміни між умовно нормальною та пухлинною тканинами, крім тканини багатовузлового зуба, вірогідні, $P < 0,05$

високий рівень експресії Akt (рис. 2, а). За експресією Akt1 умовно нормальна та пухлинна тканини папілярних карцином та зуба вірогідно не відрізнялися (див. рис. 2, а), на відміну від фолікулярної карциноми, де кількість кінази в пухлинній тканині перевищувала її кількість в умовно нормальній тканині більш ніж у 2 рази, та фолікулярної аденоми, де рівень Akt1 також був вищий у пухлинній тканині (див. рис. 2, а).

Відомо, що порушення функцій каскаду РІЗК/Акт внаслідок мутацій та ампліфікацій генів *Ras*, *PTEN*, *PIK3CA* є характерними в першу чергу для фолікулярної карциноми та фолікулярної аденоми ЩЗ [2]. Можливо тому підвищення експресії Akt1 порівняно з нормою відмічалася тільки в фолікулярних аденомах та карциномах (див. рис. 2, а).

Інша картина спостерігалася щодо активації Akt1/2/3 (див. рис. 2, б). Рівень фосфо-Акт в умовно нормальній тканині всіх пухлин, за винятком зуба, був значно вищим (більш ніж у 10 разів у FTC та NPTC), ніж у пухлинній тканині, а в інкапсульованих папілярних карциномах фосфо-Акт була повністю відсутня (див. рис. 2, б). Таким чином, всупереч очікуванню, активність Akt у пухлинах карцином та фолікулярної аденоми була або відсутня, або значно пригнічена, що свідчить про відсутність зв'язку між активністю протеїнкінази і посиленими проліферативними процесами в пухлинах ЩЗ.

Доведено, що Akt в пухлинних тканинах через інгібування каспази-9, проапоптичного білка Bad та транскрипційного фактора FKHR пригнічує апоптоз; впливає на активність інгібіторів клітинного циклу p21, p27 та стан Mdm2 — регулятора пухлинного супресора p53, на протеїнкіназу Gsk-3, що загалом спричиняє порушення регуляції клітинного циклу та неконтрольовану проліферацію; активує ІКК та NF-κВ-залежний сигнальний шлях, сприяючи виживанню пухлинних клітин, ангіогенезу та утворенню метастазів; через активацію mTOR посилює ріст пухлини [1]. Крім того, надмірна активація Akt зумовлює резистентність пухлин до опромінення та хіміотерапії [5, 6]. Тому факт значного пригнічення активності кінази в карциномах ЩЗ заслуговує особливої уваги. Можливим поясненням цього факту є дані, які свідчать про те, що в певних умовах Akt бере участь у реплікативній сенесценції пухлинних клітин [7], явищі, що поряд з апоптозом стримує ріст пухлини. Раніше було показано, що хоча MAPK-каскад бере участь у злоякісній трансформації клітин ЩЗ, у багатьох випадках конститутивна активація цього каскаду в пухлинних тканинах

призводить до зупинки росту і сенесценції [8]. Тому цілком можливо, що, як і у випадку з MAPK [4, 8], клітини пухлин ініціюють спеціальні захисні механізми, які пригнічують активацію Akt і, таким чином, захищають себе від сенесценції і зупинки клітинного циклу.

Інше питання, яке виникає при аналізі одержаних даних, — яким чином пухлинна клітина заміщає неактивну Akt — одну з найважливіших протеїнкіназ, які контролюють ріст та поділ клітин. Ймовірна відповідь на це питання міститься в роботах, в яких показано можливість заміни Akt у сигнальному ланцюгу PI3K іншими протеїнкіназами, зокрема Sgk3 (serum/glucocorticoid regulated kinase) [9].

Цитована література

1. Kumar A., Rajendran V., Sethumadhavan R., Purohit R. AKT kinase pathway: a leading target in cancer research // Scientific World J. – 2013. – **2013**. – 756134, 6 p.
2. Xing M. Genetic alterations in the phosphatidylinositol-3 kinase/Akt pathway in thyroid cancer // Thyroid. – 2010. – **20**, No 7. – P. 697–706.
3. Пушкар'юв В. В., Ковзун О. І., Попадюк І. Д. та ін. Роль сигнального каскаду Ras/PI3K/Akt у формуванні стійкості клітин анапластичного раку щитоподібної залози до паклітакселу // Доп. НАН України. – 2011. – № 3. – С. 169–171.
4. Guda B. B., Pushkarev V. M., Pushkarev V. V. et al. The expression and activation of extracellular signal-regulated kinase-1/2 and proliferating cell nuclear antigen content in normal tissue and human thyroid tumors // SM J. Endocrinol. Metab. – 2015. – **1**, Iss. 1. – 1002, 4 p.
5. Shimura T. Acquired radioresistance of cancer and the AKT/GSK3 β /cyclin D1 overexpression cycle // J. Radiat. Res. – 2011. – **52**, No 5. – P. 539–544.
6. Wilks S. T. Potential of overcoming resistance to HER2-targeted therapies through the PI3K/Akt/mTOR pathway // Breast. – 2015. – **24**, No 5. – P. 548–555.
7. Xu Y., Li N., Xiang R., Sun P. Emerging roles of the p38 MAPK and PI3K/AKT/mTOR pathways in oncogene-induced senescence // Trends Biochem. Sci. – 2014. – **39**, No 6. – P. 268–276.
8. Park J. I. Growth arrest signaling of the Raf/MEK/ERK pathway in cancer // Front. Biol. (Beijing). – 2014. – **9**, No 2. – P. 95–103.
9. Bruhn M. A., Pearson R. B., Hannan R. D., Sheppard K. E. AKT-independent PI3-K signaling in cancer – emerging role for SGK3 // Cancer Manag. Res. – 2013. – **5**. – P. 281–292.

References

1. Kumar A., Rajendran V., Sethumadhavan R., Purohit R. Scientific World J., 2013, **2013**: 756134.
2. Xing M. Thyroid, 2010, **20**, No 7: 697–706.
3. Pushkarev V. V., Kovzun O. I., Popadiuk I. D. et al. Dopov. NAN Ukraine, 2011, No 3: 169–171 (in Ukrainian).
4. Guda B. B., Pushkarev V. M., Pushkarev V. V. et al. SM J. Endocrinol. Metab., 2015, **1**, Iss. 1: 1002.
5. Shimura T. J. Radiat. Res., 2011, **52**, No 5: 539–544.
6. Wilks S. T. Breast, 2015, **24**, No 5: 548–555.
7. Xu Y., Li N., Xiang R., Sun P. Trends Biochem. Sci., 2014, **39**, No 6: 268–276.
8. Park J. I. Front. Biol. (Beijing), 2014, **9**, No 2: 95–103.
9. Bruhn M. A., Pearson R. B., Hannan R. D., Sheppard K. E. Cancer Manag. Res., 2013, **5**: 281–292.

Надійшло до редакції 24.12.2015

Б. Б. Гуда, В. М. Пушкарев, Е. В. Журавель, В. В. Пушкарев,
А. Е. Коваленко, Ю. Н. Таращенко,
член-корреспондент НАН Украины Н. Д. Тронько

ГУ “Институт эндокринологии и обмена веществ им. В. П. Комисаренко НАМН Украины”,
Киев

E-mail: pushkarev.vm@gmail.com

Экспрессия и активация протеинкиназы Akt/PKB в нормальных тканях, доброкачественных и высокодифференцированных злокачественных опухолях щитовидной железы человека

Изучена экспрессия и активация главной эффекторной протеинкиназы фосфатидилинозитол-3-киназного каскада (PI3K) – протеинкиназы Akt (v-akt murine thymoma viral oncogene homolog) в нормальных тканях, доброкачественных и высокодифференцированных злокачественных (с метастазами и без метастазов) опухолях щитовидной железы (ЩЖ) человека. Установлены различия в количестве – Akt1 в опухолевой ткани по сравнению с нормальными тканями в фолликулярных аденомах и карциномах. Суммарная активность Akt всех трех изоформ Akt1, Akt2, Akt3 – была почти полностью подавлена в опухолях по сравнению с нормальной тканью, кроме ткани многоузлового зоба. Сделан вывод, что активность Akt не связана с пролиферативными процессами в опухолевой ткани ЩЖ. Рассмотрены возможные механизмы подавления активности сигнального каскада PI3K в опухолях ЩЖ.

Ключевые слова: щитовидная железа, доброкачественные опухоли, злокачественные опухоли, сигнальный каскад PI3K/Akt.

B. B. Guda, V. M. Pushkarev, O. V. Zhuravel, V. V. Pushkarev,
A. Ye. Kovalenko, Y. M. Tarachenko,
Corresponding Member of the NAS of Ukraine M. D. Tronko

V. P. Komisarenko Institute of Endocrinology and Metabolism of the NAMS of Ukraine, Kiev

E-mail: pushkarev.vm@gmail.com

The expression and the activation of protein kinase Akt/PKB in normal tissues, benign and highly differentiated malignant human thyroid tumors

We study the expression and the activation of the main effector protein kinase of phosphatidylinositol-3-kinase cascade (PI3K) – protein kinase Akt (v-akt murine thymoma viral oncogene homolog) in normal tissues, benign and highly differentiated (with and without metastases) human thyroid tumors. There was a difference in the Akt1 amount in tumor tissue compared with normal tissue in follicular adenomas and carcinomas. Total activity of all three isoforms Akt1/2/3 was almost completely suppressed in tumors compared to normal tissue except tissue of multinodular goiter. Thus, Akt activity is not associated with proliferative processes in the tumor tissue of the thyroid. The possible mechanisms of inhibition of signaling cascade PI3K in thyroid tumors are discussed.

Keywords: thyroid gland, benign tumors, malignant tumors, signaling cascade PI3K/Akt.