

АКТИВНІСТЬ ФОСФАТИДИЛІНОЗИТОЛ-3-КІНАЗИ ЗА УМОВ РОЗВИТКУ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО КОЛІТАСОЦІЙОВАНОГО КАНЦЕРОГЕНЕЗУ

Наведено результати дослідження активності фосфатидилінозитол-3-кінази (PI3K) в епітеліоцитах слизової оболонки товстої кишки щурів при експериментальному колітасоційованому канцерогенезі. Показано, що розвиток запалення в слизовій оболонці товстої кишки супроводжується зниженням активності досліджуваного ензиму в середньому на 50 %. При стимуляції злоякісної трансформації специфічним проканцерогеном відмічено збільшення PI3-кіназної активності в епітеліоцитах слизової оболонки товстої кишки піддослідних тварин. На 10-й тиждень розвитку онкопатології гістологічними та цитологічними дослідженнями була підтверджена аденокарцинома товстої кишки. Активність PI3K у ці терміни досліджень досягала максимального значення та перевищувала контроль більш ніж у 2 рази. Очевидно, в основі трансформуючої дії PI3K лежать комплексні зміни клітинних сигнальних шляхів.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: фосфатидилінозитол-3-кіназа, колітасоційований канцерогенез, епітеліоцити слизової оболонки товстої кишки (колоноцити).

ВСТУП. Одним з найважливіших внутрішньоклітинних сигнальних месенджерів, що забезпечує реалізацію програми виживання клітини і блокує дію широкого спектра індукторів її загибелі, є фосфатидилінозитол-3-кіназа (PI3K) та шляхи сигнальної трансдукції, що активуються даним ферментом. Подвійна ферментативна активність (ліпід- та протеїнкіназна), притаманна PI3K, як і її здатність активувати цілий ряд сигнальних білків, включаючи деякі онкобілки, вказує на принципове значення цього ензиму в регуляції таких функцій клітини, як ріст, старіння та пухлинна трансформація [7, 10].

Фосфатидилінозитол-3-кіназа є одним з найважливіших регуляторних білків, що перебувають на перетині різних сигнальних каскадів та контролюють ключові функції клітини. Активуватись PI3K може як у результаті безпосередньої її взаємодії з тирозинкіназами, так і за рахунок зв'язування з білками Ras. Даному протеїнкіназному месенджерному шляху належить провідна роль в опосередкуванні дії інсуліну, ростових факторів, інтегринів та рецепторів, спряжених з G-білками. Крім того, він залучений у регуляцію клітинного виживання, метаболізму, експресії генів, проходження клітинного циклу та синтезу білків [4, 23].

© О. О. Кравченко, М. О. Тимошенко, Л. М. Гайда, О. В. Сокур, Л. І. Остапченко, 2012.

Усі протеїнкінази цього каскаду належать родині серин-треонінових фосфотрансфераз та формують єдину досить розгалужену сигнальну мережу [2]. Більшість із цих протеїнкіназ містить плекстрингомодіфіковані (PH) домени, які специфічно зв'язуються з фосфоінозитидними ліпідами, включаючи фосфатидилінозитол-3,4,5-трифосфат (ФІФ₃), що генерується в плазматичній мембрані у відповідь на дію агоністів [5, 21]. Активація протеїнкіназ, що містять PH-домени, серед яких найбільш важливі PKB/Akt та 3-фосфоінозитидзалежна протеїнкіназа-1 (PDK1), залежить безпосередньо від дії фосфатидилінозитол-3-ОН-кінази (PI3K). Тому PI3K є одним з найважливіших регуляторних білків, які контролюють ключові функції клітини [8].

Відомо, що фосфатидилінозитол-3-кіназа відіграє особливу роль у процесі пухлинної трансформації, оскільки їй притаманна не тільки власна онкогенна активність, але і здатність утворювати комплекси з деякими вірусними та клітинними онкобілками, серед яких: src, ras, rac, alb, T-антиген [22]. Для реалізації трансформуючого потенціалу останніх необхідна обов'язкова присутність PI3K у клітині. Вважають, що в основі трансформуючої дії PI3K лежать комплексні зміни клітинних сигнальних шляхів, а саме: виникнення постійно генерованого PI3K-залежного мітогенного

сигналу, активація деяких протонкогенів (src, ras, gас та ін.) і стимуляція PI3K/PKB-шляху, яка призводить до часткового блокування апоптозу, наслідком чого є збільшення життєздатності клітин та реорганізація актинового цитоскелета [15, 19, 20].

Беручи до уваги все вищесказане, значний інтерес викликає дослідження особливостей функціонування фосфатидилінозитол-3-кінази за умов розвитку хронічних запальних патологій, одним з найпоширеніших і несприятливих ускладнень яких є злаякісна трансформація клітин. Тому метою даної роботи було вивчити активність PI3K у клітинах слизової оболонки товстої кишки щурів на різних етапах колітасоційованого канцерогенезу.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. У роботі дотримувалися міжнародних рекомендацій про проведення медично-біологічних досліджень з використанням тварин відповідно до Європейської конвенції. Експерименти проводили на білих лабораторних щурах-самцях з початковою масою 160–180 г. Їх поділили на 9 груп по 10–15 тварин: 1-ша – контрольні тварини, яких утримували на стандартному раціоні віварію; 2–4 – тварини з 1-, 3- та 7-денним терміном розвитку виразкового коліту відповідно; 5–9 – тварини, яких піддавали впливу специфічного проканцерогену.

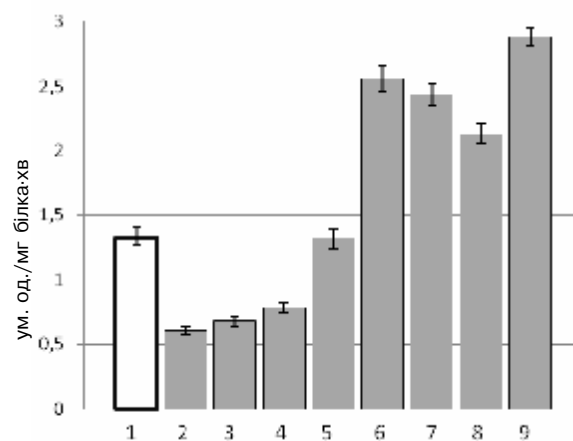
Колітасоційований канцерогенез моделювали, замінюючи питну воду 1,5 % розчином декстрансульфатнатрієвої солі (ДСН) з відносною молекулярною масою 35 000–50 000 ("ICN", США) протягом 7 днів з наступним підшкірним введенням специфічного проканцерогену – 1,2-диметилгідразину (ДМГ) ("Aldrich", США) в дозі 20 мг/кг маси тіла згідно з рекомендаціями [1]. Формування патології діагностували за специфічними симптомами (зміни консистенції випорожнень, присутність у них домішок крові) та морфолого-гістологічним дослідженням пошкоджень слизової оболонки товстої кишки.

Епітеліальні клітини слизової оболонки товстої кишки (колоноцити) виділяли хелаторним методом згідно з [17]. Отримані клітини гомогенізували та використовували для визначення активності фосфатидилінозитол-3-кінази. Активність ферменту вимірювали за допомогою стандартного флуоресцентного набору PI3-Kinase HTRF™ Assay ("Millipore", США). Активність ферменту виражали в умовних одиницях за 1 хв на 1 мг білка, вміст якого визначали методом Бредфорд [3]. Статистичну обробку результатів дослідження проводили загальноприйнятими методами варіаційної

статистики. В роботі використовували мікропланшетний спектрофлуорофотометр фірми "BioScience" (США).

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. В результаті проведених досліджень було встановлено, що активність ферменту, який генерує 3'OH-фосфопохідні фосфатидилінозитидів та регулює PKB, PDK, PKC та MAP кіназоопосередковані месенджерні каскади, зазнає суттєвих змін як у процесі розвитку запалення, так і при наступній злаякісній трансформації клітин слизової оболонки товстої кишки. Зокрема, вже на 1-шу добу дії запального чинника – декстрансульфатнатрієвої солі в колоноцитах відмічено статистично достовірне зниження активності досліджуваного ензиму на 54 % порівняно з контролем (рис.). В наступні терміни розвитку коліту (3, 7 доби), на фоні проявів виражених симптомів запалення і раніше встановленого нами [11] зростання вмісту внутрішньоклітинного кальцію, спостерігалось зменшення активності PI3-кінази на 49 і 41 % відповідно відносно показників інтактних тварин.

В експериментах з використанням специфічних інгібіторів PI3K та/або при трансфекції клітин різними варіантами гена PI3K було встановлено, що PI3K бере участь у регуляції принаймні двох важливих функцій клітин: поділу (забезпечуючи внутрішньоклітинну передачу сигналів, стимульованих ростовими факторами) та апоптозу (перешкоджаючи його розвитку в клітинах) [14]. Це дає



1 – контроль; 2 – 1-ша доба розвитку коліту; 3 – 3-тя доба розвитку коліту; 4 – 7-ма доба розвитку коліту; 5 – 2-й тиждень дії проканцерогену ДМГ; 6 – 4-й тиждень дії проканцерогену ДМГ; 7 – 6-й тиждень дії проканцерогену ДМГ; 8 – 8-й тиждень дії проканцерогену ДМГ; 9 – 10-й тиждень дії проканцерогену ДМГ.

Рис. Активність фосфатидилінозитол-3-кінази при експериментальному колітасоційованому канцерогенезі.

підстави припустити, що запальні реакції в слизовій оболонці товстої кишки на початкових стадіях коліту супроводжуються захисними явищами активації апоптозу та пригніченням мітотичних процесів.

Серед інших важливих функцій PI3K, прямо або опосередковано пов'язаних з передачею мітогенного сигналу, слід виділити участь у рецепторній down-регуляції (ендоцитозі та деградації активованих рецепторів ростових факторів), регуляції синтезу лізосомальних ферментів, а також участь PI3K у реорганізації актинового цитоскелета та в управлінні мембранним транспортом [12]. Тому, очевидно, зафіксовані нами симптоми коліту, пов'язані з порушенням везикулярного транспорту слизу та розбалансуванням водно-іонної рівноваги, принаймні частково зумовлені зниженням активності фосфатиділінозитол-3-кінази.

Слід також зазначити, що даний фермент відіграє важливу роль у реакціях імункомпетентних клітин, забезпечуючи їх хемокін-індуковану міграцію до джерела запалення та регуляцію синтезу прозапальних цитокінів, включаючи інтерлейкін-1 β , фактор некрозу пухлин- α (TNF- α), інтерферон γ , а також проти-запального інтерлейкіну-4 [22].

Введення специфічного проканцерогену – 1,2-диметилгідразину характеризувалось вираженим зростанням активності досліджуваного ферменту. На 2-й тиждень дії диметилгідразину активність фосфатиділінозитол-3-кінази підвищувалась відносно показників, зафіксованих у період запалення, та досягала значень, характерних для контрольних тварин (рис.). Наступне введення проканцерогену призводило до постійного зростання активності PI3K в епітеліоцитах слизової оболонки товстої кишки. Так, на 4-й тиждень стимуляції злоякісної трансформації PI3-кіназна активність перевищувала контроль на 92 %, на 6-й та 8-й тижні – на 83 і 60 % відповідно. Максимуму даний параметр досягав на 10-й тиждень дії диметилгідразину, перевищуючи контроль більш ніж у 2 рази. Зазначимо, що в цей період у кишечнику спостерігались макроскопічні утвори.

Отримані результати узгоджуються з даними літератури [15, 19] про значення фосфорилування інозитидів для виживання клітин. Протеїнкіназа B (PKB/Akt) – основний фермент, що активується PI3-кіназним шляхом, залучений у супресію апоптозу через модифікацію проапоптичного білка Bad (що попереджує його зв'язування з Bcl-2), каспази-9, декількох транскрипційних факторів, а також кінази синтази глікогену-3 (GSK-3), яка регулює ста-

більність β -катеніну та цикліну D. Велике значення в процесі PI3K-залежної трансформації клітин належить також стимуляції RAS/RAF/ERK-кіназного каскаду та збільшенню активності транскрипційного фактора AP-1 [24].

Сучасні дослідження показали, що важливу роль у розвитку онкопатології різної локалізації відіграють мутації гена, який кодує каталітичну субодиницю PI3-кінази p110 α , що часто призводять до гіперактивації ферменту. Більшість з відомих пухлинних супресорів та онкогенів бере участь у сигнальних шляхах, що регулюються PI3K. Посилення PI3K-сигналу проявляється збільшенням накопичення ліпідних вторинних посередників, посиленням сигналу і трансформацією клітин. Крім того, незважаючи на різноманіття проліферативних стимулів, у пухлинних клітинах існує універсальний механізм інтеграції проліферативного і трансляційного сигналів. Цю роль відіграє PI3K/Akt шлях, що забезпечує в клітинах швидку підготовку апарату синтезу білка у відповідь на проліферативний стимул та підтримання великої швидкості трансляції щойно синтезованої мРНК. У літературі є дані про те, що активація PI3K призводить до стимуляції в пухлинних клітинах Akt, ключового ефектора PI3K/Akt сигнального шляху. Так, накопичення в пухлинах активованої Akt (фосфорилуваної в положенні S473) спостерігається при злоякісних процесах, таких, як: множинна міелома, гострий мієлолейкоз, пухлини голови та шиї, рак легень, молочної залози, шлунка, товстої кишки, ендометрія, яєчника, передміхурової залози, пухлини головного мозку, нирок та меланоми [16, 18]. Такі пухлини характеризуються агресивним ростом, стійкістю до хіміо- та променевої терапії і несприятливим прогнозом для пацієнтів [6, 9].

Таким чином, отримані результати вказують на те, що розвиток колітасоціюваного канцерогенезу супроводжується порушенням функціонування однієї з важливих ланок сигнальної трансдукції – фосфатиділінозитол-3-кіназного шляху в епітеліальних клітинах слизової оболонки кишечника. Причому запальний період характеризується зниженням активності PI3K, а дія проканцерогену призводить до її гіперактивації. Імовірно, в основі трансформуючої дії PI3K лежать комплексні зміни клітинних сигнальних шляхів: виникнення PI3K-залежного мітогенного сигналу, що постійно генерується, активація деяких протоонкогенів (src, ras, gac та ін.) і стимуляція PKB-шляху, що призводить до часткового блокування апоптозу та збільшення виживання клітин, тому ці фактори можуть бути використані

як біомаркери диспластичної трансформації та для терапевтичної корекції в клітинах слизової оболонки товстої кишки.

ВИСНОВКИ. 1. Отримані дані свідчать про те, що в патогенез колітасоційованого канцерогенезу залучені порушення процесів внутрішньоклітинної сигналізації, які призводять не лише до змін у функціонуванні клітин, а й до розладів їх поділу та загибелі.

2. Розвиток запальних уражень слизової оболонки товстої кишки супроводжується зниженням активності фосфатидилінозитол-3-кінази в епітеліоцитах кишечника на всіх етапах спостереження.

3. Встановлено зростання активності ферменту, що забезпечує фосфорилювання фосфатидилінозитидів, в епітеліоцитах слизової оболонки товстої кишки за умов введення щурам специфічного проканцерогену, який стимулює розвиток колоректального раку.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. A novel mouse model for colitis-associated colon carcinogenesis induced by 1,2-dimethylhydrazine and dextran sulfate sodium / W. Jian-Guo, W. Dong-Fei, L. Bing-Jian, [et al.] // *World J. Gastroenterol.* – 2004. – **10**, № 20. – P. 2958–2962.
2. BMK1 mediates growth factor-induced cell proliferation through direct cellular activation of serum and glucocorticoid-inducible kinase / M. Hayashi, R. I. Tapping, T. H. Chao [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2001. – **276**, № 12. – P. 8631–8634.
3. Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding / M. M. Bradford // *Anal. Biochem.* – 1976. – **72**. – P. 248–254.
4. Carpenter C. L. Phosphoinositide kinases / C. L. Carpenter, L. C. Cantley // *Current Opinion in Cell Biology.* – 1996. – **8**. – P. 153–158.
5. Characterization of the structure and regulation of two novel isoforms of serum- and glucocorticoid-induced protein kinase / T. Kobayashi, M. Deak, N. Morrice [et al.] // *Biochem. J.* – 1999. – **344**. – P. 189–197.
6. Dai D. L. Prognostic significance of activated Akt expression in melanoma: a clinicopathologic study of 292 cases. / D. L. Dai, M. Martinka, G. Li // *J. Clin. Oncol.* – 2005. – **23**. – P. 1473–1482.
7. Engelman J. A. Targeting PI3K signalling in cancer: opportunities, challenges and limitations / J. A. Engelman // *Nat. Rev. Cancer.* – 2009. – № 9. – P. 550–562.
8. Fruman D. A. Phosphoinositide kinases / D. A. Fruman, R. E. Meyers // *An. Review of Biochem.* – 1998. – **67**. – P. 481–507.
9. Incidence, mechanism and prognostic value of activated AKT in pancreas cancer / M. G. Schlieman, B. N. Fahy, R. Ramsamoj [et al.] // *Br. J. Cancer.* – 2003. – **89**. – P. 2110–2115.
10. Jiang B. H. PI3K/PTEN signaling in tumorigenesis and angiogenesis / B. H. Jiang, L. Z. Liu // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2008. – **1784**. – P. 150–158.
11. Kravchenko O. O. Intracellular calcium content, phospholipase C and protein kinase C activity under colitis-associated carcinogenesis development / O. O. Kravchenko, O. V. Drobinska, L. I. Ostapchenko // *Abstracts of the 35th FEBS Congress Goteborg (Gothenburg), 2010.* – P. 136.
12. Lee G. Phosphoinositide 3-kinase signaling mediates beta-catenin activation in intestinal epithelial stem and progenitor cells in colitis / G. Lee, T. Goretsky // *Gastroenterology.* – 2010. – **139** (3). – P. 869–881.
13. Massion P. P. Early involvement of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway in lung cancer progression / P. P. Massion, P. M. Taflan // *American J. of Respiratory and Critical Care Medicine.* – 2004. – **170**. – P. 1088–1094.
14. Peng X. D. Inhibition of phosphoinositide 3-kinase ameliorates dextran sodium sulfate-induced colitis in mice / X. D. Peng, X. H. Wu // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* – 2010. – **332**, № 1. – P. 46–56.
15. PTEN/PI3K/AKT signalling pathway in cancer, therapeutic implications / A. Carnero, C. Blanco-Aparicio, O. Renner [et al.] // *Curr. Cancer Drug Targets.* – 2008. – **8**, № 3. – P. 187–198.
16. Qiao M. Metastasis and AKT activation / M. Qiao, S. Sheng, A. B. Pardee // *Cell Cycle.* – 2008. – **7**. – P. 2991–1996.
17. Roediger W. E. W. Method of preparing isolated colonic epithelial cells (colonocytes) for metabolic studies / W. E. W. Roediger, S. C. Truelove // *Gut.* – 1979. – **20**, № 6. – P. 484–497.
18. Shtilbans V. Current overview of the role of Akt in cancer studies via applied immunohistochemistry / V. Shtilbans, M. Wu, D. E. Burstein // *Ann Diagn Pathol.* – 2008. – **12**. – P. 153–160.
19. Strahl T. Synthesis and function of membrane phosphoinositides in budding yeast, *Saccharomyces cerevisiae* / T. Strahl, J. Thorner // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2007. – **1771**, № 3. – P. 353–404.
20. Targeting the phosphoinositide 3-kinase pathway in cancer / P. Liu, H. Cheng, T. M. Roberts, J. J. Zhao // *Nat. Rev. Drug Discov.* – 2009. – **8**. – P. 627–644.
21. Toliás K. F. Pathways for phosphoinositide synthesis / K. F. Toliás, L. C. Cantley // *Chem. Phys. Lipids.* – 1999. – **98**. – P. 69–77.
22. van Dop W. A. The absence of functional PI3Kgamma prevents leukocyte recruitment and ame-

liorates DSS-induced colitis in mice / W. A. van Dop, S. Marengo // Immunol Lett. – 2010. – **131**, № 1. – P. 33–39.

23. Vanhaesebroeck B. The study of phosphoinositide 3-kinase function / B. Vanhaesebroeck, R. C. Stein,

M. D. Waterfield // Cancer Surv. – 1996. – **2**. – P. 249–270.

24. Vivanco I. The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer / I. Vivanco, C. L. Sawyers // Nat. Rev. Cancer. – 2002. – **2**. – P. 489–501.

О. А. Кравченко, М. А. Тимошенко, Л. Н. Гайда, О. В. Сокур, Л. И. Остапченко
КИЕВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ ТАРАСА ШЕВЧЕНКО

АКТИВНОСТЬ ФОСФАТИДИЛИНОЗИТОЛ-3-КИНАЗЫ ПРИ РАЗВИТИИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО КОЛИТАССОЦИИРОВАННОГО КАНЦЕРОГЕНЕЗА

Резюме

Представлены результаты исследования активности фосфатидилинозитол-3-киназы (ПИЗК) в эпителиоцитах слизистой оболочки толстой кишки крыс при экспериментальном колитассоциированном канцерогенезе. Показано, что развитие воспаления в слизистой оболочке толстой кишки сопровождается снижением активности исследуемого фермента в среднем на 50 %. При стимуляции злокачественной трансформации специфическим проканцерогеном отмечено увеличение ПИЗК-киназной активности в эпителиоцитах слизистой оболочки толстой кишки подопытных животных. На 10 неделю развития онкопатологии гистологическими и цитологическими исследованиями была подтверждена аденокарцинома толстой кишки. Активность ПИЗК в эти сроки исследований достигала максимального значения и превышала контроль более чем в 2 раза. Очевидно, в основе трансформирующего действия ПИЗК лежат комплексные изменения клеточных сигнальных путей.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: фосфатидилинозитол-3-киназа, колитассоциированный канцерогенез, эпителиоциты слизистой оболочки толстой кишки (колоноциты).

O. O. Kravchenko, M. O. Tymoshenko, L. M. Haida, O. V. Sokur, L. I. Ostapchenko
TARAS SHEVCHENKO KIYV NATIONAL UNIVERSITY

THE PHOSPHATIDYLINOSITOL 3-KINASE ACTIVITY UNDER EXPERIMENTAL COLITIS-ASSOCIATED CARCINOGENESIS DEVELOPMENT

Summary

The results of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) activity researching in rat colonocytes under experimental colitis-associated carcinogenesis development are presented. The decreasing of the phosphatidylinositol 3-kinase activity in rat colonocytes on 41–50 % relatively to the control was estimated on first till seventh day of experimental ulcerative colitis development. The important role of the phosphatidylinositol 3-kinase signaling pathway in the normal processes of angiogenesis, survival and differentiation of cell was well known but it also took part in tumors growth. So, we found, that the processes of malignant transformation after inflammation in colon mucous epithelial cells were accompanied the increase of the PI3K enzyme activity on 60–92 % relatively to the control during eight weeks of specific procarcinogen (1, 2- dimethylhydrazine) injections. The phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) activity exceeded control indexes in 2 times on the tenth 10 week of carcinogenesis, when adenocarcinoma was examined. The shown hyper activation of PI3K could result to uncontrolled proliferation of the cell.

KEY WORDS: phosphatidylinositol 3-kinase, colitis-associated carcinogenesis, colon mucous epithelial cells (conocytes).

Отримано 12.09.11

Адреса для листування: О. О. Кравченко, вул. Наб.-Корчуватська, 96, кв. 59, Київ, 03045, Україна.