



УДК 616.441.-006.6-092.9:615.252

© 2008

В. М. Пушкар'юв, Д. В. Старенький, В. М. Гончарук, С. Ямашита,
В. О. Саєнко, член-кореспондент НАН України М. Д. Тронько

Комбінована дія паклітакселю та селективного інгібітора NFκB дегідроксиметилепоксиквіноміцину на клітини фолікулярного раку щитовидної залози

A novel nuclear factor kappa B (NFκB) inhibitor, dehydroxymethylepoxyquinomicin, is found to enhance the cytotoxic effect of an anticancer drug paclitaxel in the FRO cell line derived from nondifferentiated thyroid carcinoma of the follicular origin. A strong activation of caspases and PARP cleavage, as well as the decreased levels of small proteins-suppressors of apoptosis, are observed when cells are treated with a combination of both drugs. Of note are the singular paclitaxel treatment induced NFκB activation and the NFκB-dependent phosphorylation of cRaf-1, an upstream kinase of ERK1/2 which is a key member of the mitogen-activated signaling cascade that may comprise an additional NFκB-induced antiapoptotic pathway. Thus, the combination of paclitaxel and NFκB inhibitor is a promising pharmacological strategy for further preclinical trials aimed at the development of new therapeutic approaches to the treatment of nondifferentiated and anaplastic thyroid cancer.

Паклітаксель є протипухлинним препаратом, який широко використовується для лікування деяких видів раку [1]. Проводяться доклінічні дослідження щодо можливості його застосування для терапії ширшого кола злоякісних пухлин людини, у тому числі і пухлин щитовидної залози (ЩЗ) [2]. Одержані дані свідчать про те, що паклітаксель активує в пухлинних клітинах не тільки процеси, які призводять до клітинної смерті, але й механізми, що активно протидіють загибелі клітин [2, 3]. З огляду на це актуальним є визначення способів інактивації сигнальних каскадів, що беруть участь у формуванні стійкості ракових клітин до цього протипухлинного препарату.

Раніше було показано, що паклітаксель посилює активацію та експресію кіназного комплексу ІКК (ІκВ-кіназа) [4], який призводить до вивільнення ядерного фактора каппа В (NFκB) з неактивного комплексу і транспортування його до ядра. Оскільки фактор NFκB задіяний здебільшого в антиапоптозних процесах [5], очікувалося, що його пригнічення буде посилювати ефект паклітакселю в пухлинах.

Мета дослідження полягала у вивченні комбінованої дії паклітакселю та нового інгібітора ядерного чинника NFκB — дегідроксиметилепоксиквіноміцину (DHMEQ) — щодо апоптозних процесів у клітинах фолікулярного раку ЩЗ лінії FRO.

Клітини культивували в середовищі RPMI-1640, що містило 5% бичачої сироватки, 1% пеніциліну/стрептоміцину, в атмосфері з 5% CO₂ при 37 °С протягом 2 днів, двічі промивали PBS-буфером (80 мМ ортофосфат натрію однозаміщений, 20 мМ ортофосфат натрію дво-заміщений, 100 мМ хлорид натрію, рН 7,4) і замінювали середовище. Через 24 год вносили розчинений у диметилсульфоксиді (ДМСО) паклітаксель фірми “Wako Chemicals” (Японія) і інкубували клітини протягом наступних 24 год. У контрольні проби вносили в такій 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 імуноблотинг проводили за методикою, що описана раніше [2]. Поліклональні антитіла до каспаз, ПАРП (полі-АДФ-рибозо-полімераза), сІАР-2, XIAP (Х-зв’язаний інгібітор апоптозу), сурвайвіну, фосфорформи білка сRaf-1 та кон’юговані з пероксидазою хрину вторинні антитіла — від фірми “Cell Signaling Technology” (США). Комплекси білків з антитілами візуалізували за допомогою реагенту ECL (“Amersham Life Science”, Великобританія). Препарат DNMEQ був люб’язно наданий доктором К. Умегава (Університет Кейо м. Йокогама, Японія). Стоковий розчин рацемату DNMEQ (10 мг/мл) готували на ДМСО і зберігали при –20 °С.

Останнім часом вплив NFκB на апоптичні процеси в пухлинних клітинах інтенсивно досліджується. Показано, що даний фактор активує групу генів, продукти яких гальмують апоптоз шляхом пригнічення каспаз [6]. У першу чергу це стосується генів сімейства білків-супресорів апоптозу, які здатні інгібувати активність ефекторних каспаз, у тому числі і каспази-3 [7, 8]. До них належать сІАР1–2, XIAP, сурвайвін. Пригнічення NFκB інгібітором DNMEQ викликало апоптоз у клітинах раку ШЗ [9].

У клітинах анапластичного раку ШЗ паклітаксель максимально посилює фосфорилування кіназного комплексу ІКК, а отже, і активацію NFκB, через 12 год від початку інкубації [4]. Одночасно зростає і експресія XIAP та сурвайвіну [2]. Припускалося, що пригнічення NFκB призведе до зниження експресії білків-інгібіторів апоптозу і, як наслідок, до посилення індукованих паклітакселем апоптозних процесів.

З рис. 1, а, б видно, що активація основної ефекторної каспази-3 відсутня в контролі (доріжка 1) та помітно зростає у присутності як паклітакселю (доріжка 3), так і, особливо, інгібітора NFκB (доріжка 2). Поєднання обох агентів демонструє адитивний ефект (доріжка 4), який перевищує ефекти окремих сполук. Подібна картина спостерігається і при дослідженні активації каспази-9, яка репрезентує мітохондріальний шлях розвитку апоптозу (див. рис. 1, а).

Однією з найважливіших ознак апоптозу в клітині, поряд з активацією каспаз, є деградація (розщеплення) певних білків, у тому числі і ПАРП, який розпадається під дією каспаз на два фрагменти. Цей білок є зручним для кількісної оцінки апоптозу, оскільки великий фрагмент (89 кДа) є близьким за розміром до інтактного ПАРП (117 кДа), що дає можливість одночасно спостерігати як за зменшенням кількості інтактного білка, так і за збільшенням кількості його великого фрагмента. З рис. 1, а видно, що в контролі (доріжка 1) білок залишається інтактним, під дією паклітакселю кількість фрагмента 89 кДа (показано стрілкою) збільшується (доріжка 3), у присутності інгібітора NFκB білок деградує ще більше і спільна дія обох сполук дає максимальний ефект.

Отже, комбінована дія паклітакселю та інгібітора NFκB більшою мірою посилює апоптоз у клітинах фолікулярного раку ШЗ, ніж кожен з агентів окремо.

Для з’ясування механізмів такого посилення апоптозних процесів вивчали фосфорилування білка сRaf-1 та експресію ряду антиапоптозних білків. Встановлено, що паклітаксель

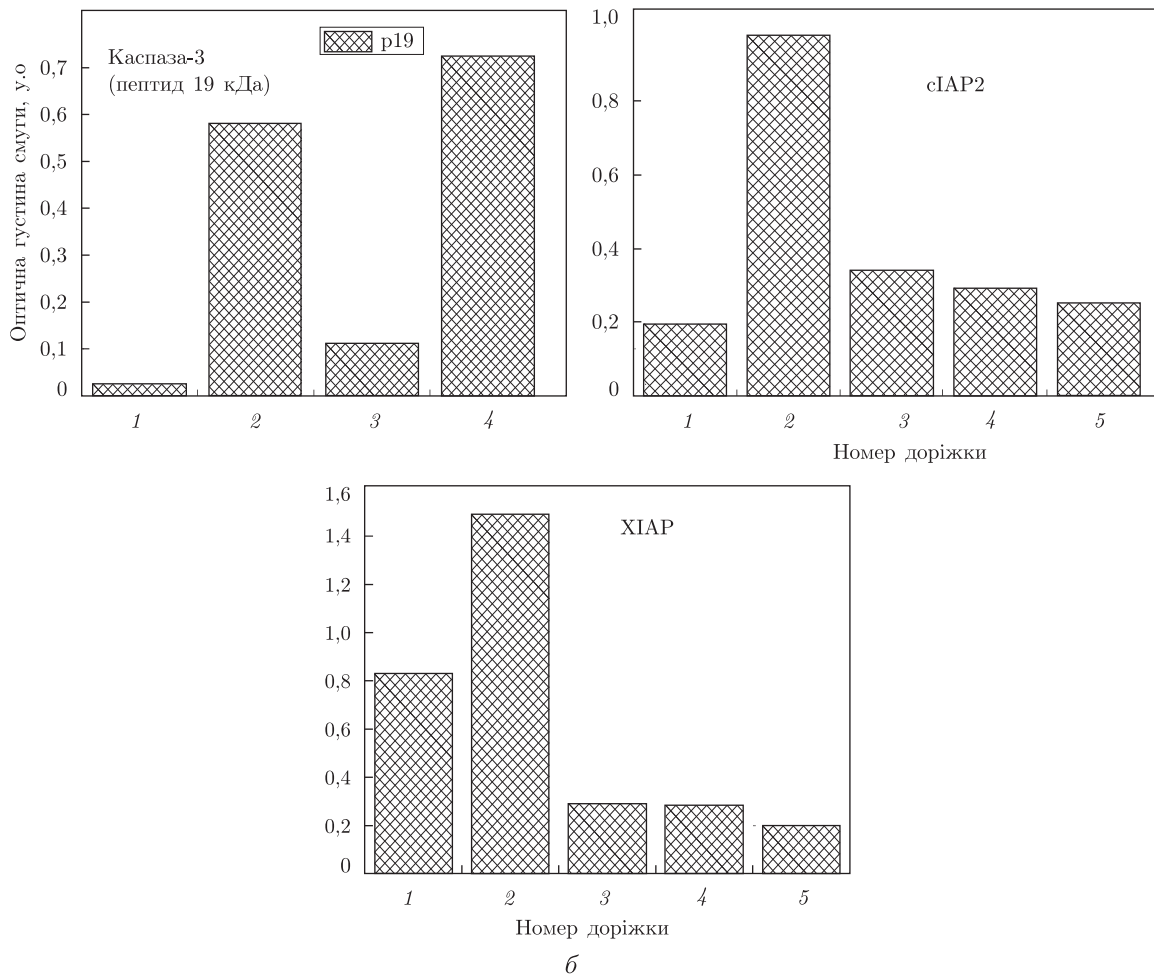
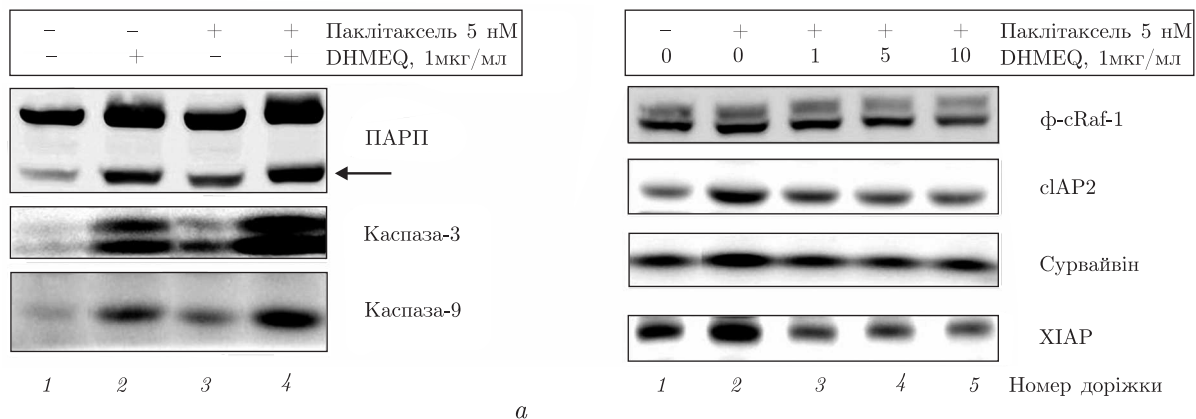


Рис. 1. Ефект комбінованої дії паклітакселю та інгібітора NF κ B на активацію і експресію про- та антиапоптозних білків у клітинах FRO.

a — визначення кількості білків методом імуноблотингу;

б — оцінка кількості окремих білків з рис. 1, *a* після сканування білкових смуг за допомогою програми GelPro31

посилне фосфорилювання, а отже, і активацію білка cRaf-1 (див. рис. 1, а, доріжка 2). У присутності концентрацій ДНМЕQ, що зростають, фосфорилювання поступово послаблюється, що свідчить про інактивацію цієї кінази. Одержані дані цікаві тим, що cRaf-1 репрезентує проліферативний сигнальний ланцюг і є кіназою, що стоїть у регуляторному ланцюгу вище протеїнкіназ MEK1 та ERK1/2, які відіграють важливу роль у антиапоптозних процесах. Раніше нами було показано, що пригнічення цього сигнального ланцюга специфічними інгібіторами призводить до посилення апоптозних процесів, індукованих паклітакселем [2]. Отже, можна зробити важливий висновок, що NF κ B прямо чи опосередковано активує протеїнкінази, що активуються мітогенами (МАРК).

Щодо конкретних механізмів антиапоптозної дії NF κ B, одержані дані свідчать про те, що цей фактор контролює експресію білків-активаторів апоптозу — cIAP2, XIAP та сурвайвіну (див. рис. 1, а, б). У присутності інгібітора NF κ B кількість цих білків у клітині значно зменшується, іноді до рівня, що є нижчим за контрольний (див. рис. 1, б (XIAP)). Оскільки NF κ B є транскрипційним фактором, який здатен самостійно регулювати експресію ряду антиапоптозних білків, з'ясування ролі МАРК у цих процесах потребує подальших досліджень. Можливо, МАРК через трансактивацію власних транскрипційних факторів додатково активують в клітині процеси, спрямовані на виживання клітини.

Таким чином, на підставі результатів дослідження можна зробити такі висновки. Інгібітор NF κ B, дегідроксиметилепоксиквіноміцин (ДНМЕQ), пригнічує експресію білків-інгібіторів апоптозу, чим посилює цитотоксичний ефект паклітакселю щодо клітин фолікулярного раку ШЗ людини. NF κ B трансактивує сигнальний каскад, який активується мітогенами, — факт, що може свідчити про існування досі невідомого механізму антиапоптозної дії фактора. Комбінація паклітакселю та інгібітора NF κ B є перспективним варіантом для доклінічних досліджень щодо терапії фолікулярного раку ШЗ.

1. Jordan M. A., Wilson L. Microtubules as a target for anticancer drugs // Nat. Rev. Canc. – 2004. – 4. – P. 253–265.
2. Pushkarev V. M., Starenki D. V., Saenko V. A. et al. Molecular mechanism of the effects of low concentrations of taxol in anaplastic thyroid cancer cells // Endocrinology. – 2004. – 145, No 7. – P. 3143–3152.
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. Ковзун О. І., Пушкарьов В. В. Таксол посилює фосфорилювання ізоформ протеїнкінази С та кіназного комплексу ІКК у клітинах анапластичного раку щитовидної залози // Ендокринологія. – 2005. – 10, № 1. – С. 130–133.
5. Baldwin A. S. Control of oncogenesis and cancer therapy resistance by the transcription factor NF-kappaB // J. Clin. Invest. – 2001. – 107. – P. 241–246.
6. Wang C. Y., Mayo M. W., Korneluk R. G. et al. NF-kappaB antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation // Science (Wash. DC). – 1998. – 281. – P. 1680–1683.
7. Roy N., Deveraux Q. L., Takahashi R. et al. The c-IAP-1 and c-IAP-2 proteins are direct inhibitors of specific caspases // EMBO J. – 1997. – 16. – P. 6914–6925.
8. Deveraux Q. L., Takahashi R., Salvesen G. S., Reed J. C. X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases // Nature (London). – 1997. – 388. – P. 300–304.
9. Starenki D. V., Namba H., Saenko V. A. et al. Induction of thyroid cancer cell apoptosis by a novel nuclear factor κ B inhibitor, dehydroxymethylepoxyquinomicin // Clin. Canc. Res. – 2004. – 10. – P. 6821–6829.

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

Надійшло до редакції 08.02.2008