

Ингибирование АКТ-сигнального пути модулирует чувствительность клеток остеосарком к ингибиторам ДНК-топоизомеразы II типа

Научный руководитель – Бойчук Сергей Васильевич

Галембикова Айгуль Рафиковна

Выпускник (специалист)

Казанский государственный медицинский университет, Медико-биологический факультет, Казань, Россия

E-mail: ailuk000@mail.ru

Целью настоящего исследования явилось изучение способности селективного ингибитора АКТ - МК2206, повышать чувствительность клеток ГИСО к ингибитору ДНК-топоизомеразы II типа - доксорубину.

Эксперименты проводились на клеточных линиях остеосарком U2OS и Saos-2. На начальном этапе была изучена фоновая экспрессия киназ, играющих важную роль в клеточной пролиферации - c-Met, FGFR, Akt, MAPK, в клетках линии U2OS и Saos-2. Методом вестерн-блоттинга было обнаружено, что уровень экспрессии фосфорилированных форм этих киназ положительно коррелировал с синергизмом действия доксорубина и селективными ингибиторами соответствующих киназ. Например, фоновая экспрессия фосфорилированной формы АКТ в клетках линии Saos-2 была менее выраженной, по сравнению с клетками остеосаркомы линии U2OS. Средний показатель синергизма доксорубина с селективным ингибитором АКТ - МК2206, выявил аналогичную тенденцию. Для определения оптимального синергизма был проведен колориметрический анализ цитотоксичности (МТТ-тест) с 5 концентрациями доксорубина кратных 2 (0,0625-1 мкМ) и 4 концентрациями МК-2206 кратных 2 (1,25-10 мкМ). С помощью программного обеспечения Synergy Finder были получены двухмерный и трехмерный графики (surface-plots), отражающие оптимальные дозы доксорубина и МК2206, которые обуславливают наибольший синергизм. Было определено, что для клеток остеосарком (U2OS и Saos-2) наиболее выраженный цитотоксический эффект наблюдается при использовании доксорубина в концентрации 0,125 мкМ и МК2206 - 10 мкМ. Средний показатель синергизма (average synergy score) для клеток остеосаркомы Saos-2 составил 16,587, а для клеток остеосаркомы U2OS - 39,136. Результаты МТТ-теста коррелировали с результатами проточной цитофлуориметрии по подсчету количеств клеток, погибающих по механизму апоптоза и результатами вестерн-блоттинга по выявлению маркеров апоптоза. Было показано, что уже спустя 12-часов после инкубации клеток всех вышеперечисленных опухолевых линий в присутствии доксорубина и МК2206 мы наблюдали достоверное повышение (уровень значимости $p < 0.05$) количества апоптотических (аннексин V-положительных) клеток линии U2OS и Saos-2, по сравнению с контрольными клетками, а также клетками, находившимися под воздействием доксорубина или МК2206 в отдельности. Также было выявлено, что спустя 24-48 часов в аналогичных экспериментальных условиях повышается экспрессия расщепленных форм поли-АДФ-рибоза-полимеразы (ПАРП) и каспазы 3 в вышеуказанных опухолевых клетках в присутствии комбинации МК2206 и доксорубина.

Таким образом, полученные нами результаты свидетельствуют о том, что ингибирование АКТ-сигнального пути эффективно сенсibiliзирует клетки остеосарком к ингибитору ДНК-топоизомеразы II типа, доксорубину, что иллюстрирует перспективность комбинированного использования селективного ингибитора АКТ-сигнального пути и ингибиторов ДНК-топоизомеразы II типа в терапии больных с остеосаркомами.

Работа поддержана грантом Российского Научного (РНФ №21-75-00014).