

## A STUDY OF THE INFLUENCE UROGENITAL INFECTIONS ON THE HORMONAL FUNCTION OF THE OVARIES

*S. Ye. Kosilova*

**Abstract:** The influence of chronic urogenital infections has been studied on the functional state of the ovaries. A reliable decline of the products of estrogens and progesterone, an increase of the synthesis of testosterone, has been ascertained. A disturbance of the production of the sexual hormones, developing due to the action of infections agents, stipulates dysmenorrhea, sterility, noncarrying of pregnancy.

**Key words:** urogenital infections, hormonal dysbalance, disturbance of reproductive function.

Bukovinian State Medical University (Chernivtsi)

Рецензент – д. мед. н. І.В. Каліновська

Buk. Med. Herald. – 2012. – Vol. 16, № 2 (62). – P. 89-91

Надійшла до редакції 19.03.2012 року

© С.Є. Косілова, 2012

УДК 616.441-006.6-07-092

*О.С. Ларін<sup>1</sup>, В.Г. Хоперія<sup>1</sup>, В.В. Васько<sup>2</sup>*

## ЗНАЧЕННЯ АКТИВАЦІЇ АКТ У КАНЦЕРОГЕНЕЗІ ПУХЛИН ЩИТОПОДІБНОЇ ЗАЛОЗИ

<sup>1</sup>Український науково-практичний центр ендокринної хірургії, трансплантації ендокринних органів і тканин МОЗ України, м. Київ

<sup>2</sup> Педіатричний факультет Університету силових структур, Бетезда, США

**Резюме.** Активация Akt (протеїнкіназа B) залучена в патогенез спорадичного та спадкового раку щитоподібної залози (РЩЗ) за синдрому Коудена. У культурі клітин щитоподібної залози (ЩЗ) Akt регулює ріст і виживання клітин, а також впливає на їх рухливість. Метою роботи було оцінити роль Akt у прогресії РЩЗ. Експресію активованої Akt (фосфорильованої, pAkt), Akt 1, 2, та 3, та p27 проаналізовано в 46 випадках РЩЗ, 20 фолікулярних аденом та нормальній тканині залози. Активацию Akt виявлено в 10/10 випадках фолікулярного раку (ФР), 26/26 папілярного раку (ПР) ЩЗ, 2/10 випадках фолікулярного варіанта папілярного раку, у 4/66 зразків нормальної тканини залози та у 2/10 випадках фолікулярної аденоми. У зонах інвазії виявлено на найвищу імунореактивність pAkt, локалізована в

ядрі за ФР та в цитоплазмі за ПР, за винятком зон інвазії ПР, де вона локалізується і в ядрі, і в цитоплазмі. Імунореактивність Akt 1 корелює із локалізацією pAkt, а ядерна локалізація pAkt пов'язана із цитоплазматичною експресією p27. У дослідженнях *in vitro* із використанням клітинних ліній РЩЗ показало, що ядерна транслокація Akt 1 і pAkt пов'язана із цитоплазматичною експресією p27, інвазією і міграцією клітин. Під впливом PI3-кінази відбувалося гальмування міграції клітин і переходу локалізації Akt 1, pAkt і p27. Ці дані свідчать про важливу роль ядерної активації Akt 1 у прогресії РЩЗ.

**Ключові слова:** рак щитоподібної залози, активація Akt.

**Вступ.** Рак щитоподібної залози (РЩЗ) є гетерогенним розладом, характеризується мутаціями генів, що активують сигнальні шляхи, а також аномаліями пухлин-супресуючих генів та протеїнів клітинного циклу [6]. Наявність ознак екстаорганної інвазії та віддалених метастазів зумовлюють низьку ефективність радіоїодтерапії та подальшу пухлинну прогресію і смертність внаслідок РЩЗ [1]. Також доведена неефективність альтернативних методів лікування в пацієнтів із йод-нечутливим метастазуючим РЩЗ. Отже, існує необхідність кращого розуміння причин, що зумовлюють агресивний ріст клітин РЩЗ і пухлинну прогресію з метою визначення відповідних терапевтичних мішеней.

Активация Akt сигнального шляху відіграє важливу роль у розвитку пухлин ЩЗ, особливо за РЩЗ. Активацию Akt встановлено за синдрому Коудена (автосомно-домінантний синдром поліо-

рганних пухлинних уражень), який характеризується наявністю доброякісних та злоякісних пухлин ЩЗ, раку молочної залози і товстої кишки [3]. Активация Akt відбувається в більшості спорадичних раків ЩЗ. У моделях доброякісних пухлин ЩЗ Akt сприяє росту клітин у відповідь на вплив інсуліну, інсуліноподібного фактора росту 1 (ІФР-1) [2, 9], і активується онкогенами ЩЗ, включаючи p21, RAS і транслокації онкогена RET (RET/PTC) [4, 5]. Мало відомо про роль Akt у прогресії як спадкових, так і спорадичних форм РЩЗ.

Доведено функціональну роль Akt у міграції клітин, а також необхідність активації Akt і його локалізації на цитоплазматичній мембрані для ефективного хемотаксису [7]. Існує три ізоформи Akt: Akt 1, Akt 2, Akt 3 [10]. У попередніх дослідженнях показана активация Akt у РЩЗ, а також доведено роль Akt у процесі інвазії за саркома та раку молочної залози.

**Мета дослідження.** Визначити ізоформи Akt, залучені в патогенез РЩЗ, у процес інвазії, а також дослідити зв'язок між активацією Akt та мутаціями онкогенів.

**Матеріал і методи.** Матеріалом для дослідження послужили пухлини ЩЗ 66 пацієнтів (50 пацієнтів прооперовано на базі хірургічного відділу Українського науково-практичного центру ендокринної хірургії, трансплантації ендокринних органів і тканин МОЗ України, 16 – в Ітонському шпиталі та в Токійському медичному університеті). За результатами патогістологічного дослідження, проведеному відповідно до критеріїв ВООЗ 2004 р., діагностовано: 10 фолікулярних аденом (ФА), 10 атипичних аденом, 10 фолікулярних РЩЗ (ФР), 26 папілярних РЩЗ (ПР) та 10 фолікулярних варіантів ПР (ФВПР). У роботі застосовували наступні методи дослідження: визначення мутацій RAS, RET, BRAF, трансфекція з онкогеном RET/PTC3, імуногістохімічне визначення pAkt, Akt1, Akt2, Akt3, а також конфокальна мікроскопія та модель інвазії клітин. Експериментальну модель міграції клітин ПР ЩЗ досліджено в камері Боуена з мембраною, вкритою матригелем. Ефективність міграції оцінювали за допомогою мембранного забарвлення за методом Diff-Quick kit. Рівень росту клітин досліджували з використанням набору для оцінки життєздатності клітин Vi-CELL™ Cell Viability Analyzer. Статистичний аналіз проведено із використанням SAS Versions 9.0 і 9.12 software.

**Результати дослідження та їх обговорення.** На 66 зразках нормальної тканини ЩЗ досліджено експресію Akt із застосуванням неізоформспецифічних антитіл до Akt. У більшості випадків (62 із 66) активацію Akt не визначено, що збігається з даними літератури.

Також активацію Akt дослідили у 20 випадках фолікулярних аденом, включаючи 10 аденом з ознаками клітинної атипії. У 6/10 пухлин із зонами атипії визначено активацію Akt, тоді як серед типових фолікулярних аденом активацію виявлено лише у 2/10 випадків. Тобто, у доброякісних пухлинах, порівняно з атипичними аденомами, активація Akt визначалася рідко.

За результатами попередніх досліджень із Western blot аналізом, виявлено високий рівень активації Akt за ФРЩЗ порівняно з нормальною тканиною залози та ПРЩЗ.

Активуючи Akt виявлено в зонах інвазії судин та інвазії капсули в усіх первинних випадках ФРЩЗ, а також у регіонарних і віддалених метастазах. На відміну від цього, у центральних ділянках пухлин, імунореактивність до фосфорильованої Akt (pAkt) була значно меншою. Точкову мутацію (A-G) у кодоні 61 гена N-RAS виявлено у 3/10 випадків ФРЩЗ.

Серед 36 випадків ПРЩЗ імуногістохімічно активацію Akt досліджували в 10 випадках фолікулярного варіанта, 21 класичних ПР і 5 низько диференційованих РЩЗ. Western blot аналіз проведено в 14 із 36 випадків. Активуючи Akt виявлено у 21 випадку класичного ПР і в усіх 5

випадках низько диференційованого раку. Водночас активацію Akt виявлено лише у 2/10 випадків фолікулярного варіанта ПРЩЗ. Найвищий рівень експресії pAkt виявлено в зонах інвазії та метастазах у лімфатичних вузлах.

Імуногістохімічне дослідження та імуноблотинг проведено на парафінових та свіжозаморожених препаратах інвазивних ПР ЩЗ. В усіх випадках імуногістохімічно виявлено активацію Akt у зонах інвазії ПР, але не в прилеглій тканині. Подібні результати отримано з використанням імуноблотингу, у 12 із 14 випадків виявлено надмірну активацію Akt.

За допомогою імуногістохімічного методу досліджували експресію RET у 10 випадках класичного ПР і низько диференційованого РЩЗ у пацієнтів, які зазнали опромінення під час Чорнобильської катастрофи (період між опроміненням та операцією на ЩЗ склав 13,2 року); у 8 із 10 випадків виявлено надмірну експресію гена RET/PTC1. В усіх восьми випадках шляхом зворотно-транскрипційної полімеразної ланцюгової реакції (ЗТ-ПЛР) підтверджено наявність RET/PTC1. Із двох випадків фолікулярного варіанта ПР із підвищеною активністю pAkt в одному виявлено надмірну експресію мутацій RET, а в другому - N-RAS.

Із використанням імуногістохімічного дослідження та імуноблотингу встановлено рівень загальної Akt і pAkt у 14 випадках ПРЩЗ. В усіх випадках підвищений рівень активованої pAkt виявлено в зонах інвазії та регіонарних метастазах. Шляхом Вестернблотингу виявлено високий рівень експресії pAkt у 12/14 випадків. За сумарними результатами обох досліджень виявлено надмірну активацію Akt у РЩЗ, а також встановлено її зв'язок з інвазією пухлини.

За допомогою імуногістохімічного дослідження встановлено різницю в субклітинній локалізації активованої Akt за ФРЩЗ та ПРЩЗ. Ядерну локалізацію активованої pAkt виявлено в клітинах інвазійного ФРЩЗ та клітинах з ознаками атипії за фолікулярної аденоми. На відміну від цього, цитоплазматична локалізація pAkt характерна для ПРЩЗ. Для підтвердження отриманих результатів проведено конфокальну мікроскопію у трьох випадках: ПРЩЗ, ФРЩЗ і фолікулярна аденома.

За результатами конфокальної мікроскопії виявлено зв'язок між субклітинною локалізацією активованої Akt і гістологічним типом РЩЗ, а саме: цитоплазматичну локалізацію pAkt виявлено у ПРЩЗ, а ядерну – у ФРЩЗ.

Встановлено зв'язок між активацією p27 та pAkt у зонах інвазії пухлин РЩЗ. В усіх досліджуваних випадках (10 ФРЩЗ і 10 ПРЩЗ) у зонах інвазії пухлини виявлено ядерну локалізацію pAkt та цитоплазматичну p27.

Шляхом імуноблотингу показано надмірну експресію Akt 1 і Akt 2 у ФРЩЗ порівняно з нормальною тканиною залози. З метою визначення експресії Akt 1, 2 і 3 та загальної фосфорильованої Akt, у 38 випадках проведено імуногістохімічний аналіз із використанням специфічних антитіл.

У фолікулярних аденомах pAkt виявлено в клітинах з ознаками атипії, а Akt 1 і 2, та 3 не визначено. Для ПРЦЗ характерна цитоплазматична локалізація pAkt, за винятком зон інвазії, де виявлено як цитоплазматичну, так і ядерну Akt. Для ПРЦЗ характерна експресія лише Akt 1, що підтверджено кількісною ЗТ-ПІР. Отже, у досліджуваних пухлинах РЦЗ Akt 1 є основною формою активованої Akt. На відміну від ФРЦЗ, в атипових фолікулярних аденомах виявлено ядерну експресію як Akt 1, так і Akt 2.

Для оцінки міграційної здатності клітин застосовано клітинні лінії РЦЗ. На моделі інвазії клітин визначено високий рівень pAkt, Akt 1 та ядерну локалізацію pAkt.

Враховуючи центральну роль Akt в онкогенній передачі сигналів та процесі інвазії, ми висунули гіпотезу, що активація Akt буде найбільш значущою в зонах інвазії РЦЗ, що і підтверджено проведеними дослідженнями. Виявлено також відмінність її субклітинної локалізації у ПР і ФР, а також асоціацію активації ядерної Akt з інвазією клітин РЦЗ *in vitro*.

На відміну від нормальної тканини ЩЗ, надмірну активацію Akt виявлено в усіх випадках ФРЦЗ і в більшості випадків ПРЦЗ. Найбільший рівень активації Akt зафіксовано в клітинах раку в зонах інвазії в капсулу пухлини, капсулу залози, а також у метастазах у лімфатичних вузлах. У випадках фолікулярної аденоми ядерну активацію Akt виявлено в клітинах із цитологічними ознаками атипії. Майже у всіх випадках РЦЗ рівень активації Akt у клітинах раку значно вищий, ніж у попередній тканині залози, а за ПРЦЗ – асоціювався з транслокацією онкогена RET.

Вищенаведене дозволяє дійти висновку, що постійну активацію Akt 1 пов'язано з прогресією РЦЗ. Ці результати доводять виключну перспективність розробок специфічних терапевтичних препаратів, здатних блокувати активацію Akt у тироцитах.

Так, нещодавно описано нові білки (hsp90 і p50cdc37), що впливають на клітинний ріст. Показано, що вони відіграють ключову роль у рості пухлинних клітин і/або регуляції активності Akt. Під дією препарату Гелданаміцину (інгібітору HSP90) у клітинних лініях РЦЗ виявлено пригнічення проліферації клітин, регуляторних онкопротеїнів, а також затримку EGF-індукованої інвазії [8].

Також показано, що пригнічення дії hsp90 за допомогою 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin (17-ААГ) призводить до зменшення вмісту RET/PTC1 білків. Більше того, 17-ААГ сприяє підвищенню акумуляції йоду в клітинах ЩЗ шляхом непрямого залучення протеїнкінази-А незалежного механізму. 17-ААГ може використовуватися як хімотерапевтичний засіб не лише з метою пригнічення клітинної проліферації, а й для підвищення ефективності радіоїодтерапії в пацієнтів із РЦЗ [8].

## Висновки

1. Протеїнкіназа В бере участь у процесах інвазії та метастазування раку щитоподібної залози. Найбільший рівень активації протеїнкінази В виявлено в зонах інвазії раку та метастазах у лімфатичних вузлах.

2. Рівень активації протеїнкінази В у клітинах раку щитоподібної залози асоціюється із транслокацією онкогена RET.

3. Активована протеїнкіназа В є перспективною мішенню для хімотерапії тиреоїдних карцином.

**Перспективи подальших досліджень** полягають у пошуку критеріїв для розробки диференційованого підходу у морфологічній діагностиці пухлин щитоподібної залози на основі визначення прогностичних чинників.

## Література

1. Clinicopathological analysis of papillary thyroid cancer with PIK3CA alterations in a Middle Eastern population / J. Abubaker, Z. Jehan, P. Bavi [et al.] // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 2008. – Vol. 93. – P. 611-618.
2. Binding of ras to phosphoinositide 3-kinase p110alpha is required for ras-driven tumorigenesis in mice / S. Gupta, A.R. Ramjaun, P. Haiko [et al.] // *Cell.* – 2007. – Vol. 129. – P. 957-968.
3. Hou P. Association of PTEN gene methylation with genetic alterations in the phosphatidylinositol 3-kinase/AKT signaling pathway in thyroid tumors / P. Hou, M. Ji, M. Xing // *Cancer.* – 2008. – Vol. 113. – P. 2440-2447.
4. Lengyel E. Tyrosine kinase mutations in human cancer / E. Lengyel, K. Sawada, R. Salgia // *Curr. Mol. Med.* – 2007. – Vol. 7. – P. 77-84.
5. Targeting the phosphoinositide 3-kinase pathway in cancer / P. Liu, H. Cheng, T.M. Roberts [et al.] // *Nat. Rev. Drug. Discov.* – 2009. – Vol. 8. – P. 627-644.
6. Riesco-Eizaguirre G. Molecular biology of thyroid cancer initiation / G. Riesco-Eizaguirre, P. Santisteban // *Clin. Transl. Oncol.* – 2007. – Vol. 9. – P. 686-693.
7. Saji M. The PI3K-Akt-mTOR pathway in initiation and progression of thyroid tumors / M. Saji, M.D. Ringel // *Mol. Cell. Endocrinol.* – 2010. – Vol. 321. – P. 20-28.
8. Stravopodis D.J. Drug-mediated targeted disruption of multiple protein activities through functional inhibition of the Hsp90 chaperone complex / D.J. Stravopodis, L.H. Margaritis, G.E. Voutsinas // *Curr. Med. Chem.* – 2007. – Vol. 14. – P. 3122-3138.
9. High prevalence and mutual exclusivity of genetic alterations in the phosphatidylinositol-3-kinase/akt pathway in thyroid tumors / Y. Wang, P. Hou, H. Yu [et al.] // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 2007. – Vol. 92. – P. 2387-2390.
10. Xing M. Genetic-targeted therapy of thyroid cancer: a real promise / M. Xing // *Thyroid.* – 2009. – Vol. 19. – P. 805-809.

## ЗНАЧЕНИЕ АКТИВАЦИИ АКТ В КАНЦЕРОГЕНЕЗЕ ОПУХОЛЕЙ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

*А.С. Ларин, В.Г. Хоперия, В.В. Васько*

**Резюме.** Активация Akt вовлечена в патогенез sporadic и наследственных раков щитовидной железы (РЩЖ) при синдроме Коудена. В культуре клеток щитовидной железы (ЩЖ) Akt регулирует рост и выживание клеток, а также влияет на их подвижность. Целью работы было оценить роль Akt в прогрессии РЩЖ. Экспрессия активированной Akt (pAkt), Akt 1, 2 и 3, и p27 проанализирована в 46 случаях РЩЖ, 20 фолликулярных аденом и нормальной ткани железы. Активация Akt обнаружена в 10/10 фолликулярных (ФР), 26/26 папиллярных РЩЖ (ПР), и 2/10 случаях фолликулярного варианта ПР, в 4/66 случаях нормальной ткани железы и в 2/10 фолликулярных аденом. В зонах инвазии опухоли определена выраженная иммунореактивность pAkt, локализованная в ядре при ФР и в цитоплазме при ПР, за исключением зон инвазии ПР, где она локализуется и в ядре, и в цитоплазме. Иммунореактивность Akt 1 коррелирует с локализацией pAkt, а ядерная локализация pAkt связана с цитоплазматической экспрессией p27. Исследования *in vitro* с использованием клеточных линий РЩЖ показали, что ядерная транслокация Akt 1 и pAkt связана с цитоплазматической экспрессией p27, инвазией и миграцией клеток. Воздействие P13-киназы тормозило миграцию клеток и переход локализации Akt 1, pAkt и p27. Эти данные свидетельствуют о важной роли ядерной активации Akt 1 в прогрессии РЩЖ.

**Ключевые слова:** рак щитовидной железы, активация Akt.

## THE VALUE OF AN AKT ACTIVATION IN CARCINOGENESIS OF THYROID TUMORS

*O.S. Larin<sup>1</sup>, V.H. Kopperia<sup>1</sup>, V.V. Vas'ko<sup>2</sup>*

**Abstract.** An activation of Akt (protein kinase B) is involved in the pathogenesis of sporadic and inherited cancer of the thyroid gland (CTG) in Cowden's syndrome. Akt regulates the growth and survival of cells in a cell culture of the thyroid gland, and also influences on their motility. The object of the research was to evaluate the role of Akt in the progression of CTG. The expression of activated Akt (phosphorylated, pAkt), Akt 1, 2, and 3, and p27 has been analyzed in 46 cases of CTG, 20 follicular adenomas and the normal glandular tissue. An activation of Akt has been detected in 10/10 cases of follicular carcinoma (FC), 26/26 of papillary carcinoma (PC) of the TG, 2/10 cases of a follicular variant of papillary carcinoma, in 4/66 specimens of the normal tissue of the gland in 2/10 cases of follicular adenoma. The highest immunoreactivity of pAkt has been revealed in the zones of invasion, being localized in the nucleus in FC and in the cytoplasm in case of PC with the exception of the zones of the PC invasion, where it is localized both in the nucleus and cytoplasm. The immunoreactivity of Akt 1 correlates with the pAkt localization, whereas the nuclear localization of Akt is associated with the cytoplasmic expression of p27. *In vitro* studies, using CTG cellular lines, have shown that the nuclear translocation of Akt and pAkt is associated with cytoplasmic p27, cellular invasion and migration. There occurred an inhibition of the migration of cells and a transition of the localization of Akt 1, pAkt, and p27 under the influence of P13-kinase. These data are indicative of an important role of the nuclear activation of Akt 1 in the progression of CTG.

**Key words:** thyroid carcinoma, Akt activation.

Ukrainian Scientific-Practical Centre of Endocrine Surgery, Transplantation of Endocrine Organs and Tissues of Ukraine's MHP (Kyiv)

Department of Pediatrics, University of Uniformed Services, Bethesda, USA

Рецензент – проф. Р.В. Сенютович

Buk. Med. Herald. – 2012. – Vol. 16, № 2 (62). – P. 91-94

Надійшла до редакції 30.03.2012 року