



УДК 616.441.-006.6:611.441.018.13

Б. Б. Гуда, В. В. Пушкар'юв, О. В. Журавель, А. Є. Коваленко,
В. М. Пушкар'юв, Л. Ю. Зурнаджи, Ю. М. Тарашенко,
член-кореспондент НАН України М. Д. Тронько

Експресія ядерного антигену проліферуючих клітин (PCNA) в нормальних тканинах, доброякісних та високодиференційованих злоякісних (з наявністю метастатичного ураження та без метастазів) пухлинах щитоподібної залози людини

Вивчали експресію ядерного антигену проліферуючих клітин (PCNA) в нормальних тканинах, доброякісних та злоякісних (з метастазами та без метастазів) пухлинах щитоподібної залози (ЩЗ) людини. У злоякісних пухлинах та тканині фолікулярної аденоми виявлено підвищений рівень експресії PCNA, а кількість антигену в пухлинній тканині, за винятком фолікулярної карциноми, перевищувала його кількість в умовно нормальній тканині. Важливо відмітити, що в інкапсульованих пухлинах папілярних карцином це перевищення становить 85%, тоді як у неінкапсульованих, метастазуючих пухлинах кількість PCNA вище від норми в середньому більш ніж у 3 рази, а в найбільш агресивних пухлинах з метастазами в легені — навіть у 4 рази. Отже, кількість PCNA у тканині ЩЗ може слугувати діагностичним та прогностичним маркером, а розробка ефективних інгібіторів антигену може бути перспективним напрямом при лікуванні раку ЩЗ.

Ключові слова: рак щитоподібної залози, ядерний антиген проліферуючих клітин, агресивність пухлин.

Ступінь диференціації клітин — один з головних факторів розвитку та прогресії пухлин. Показники кількісної оцінки диференціації та дедиференціації — надзвичайно важливі діагностичні та прогностичні критерії розвитку пухлини. Отже, кількісна оцінка диференціації та дедиференціації має вагоме значення для діагностики та прогнозу перебігу пухлинного процесу. Для діагностики раку щитоподібної залози (ЩЗ) необхідно розробляти об'єктивні методи, щоб отримати специфічні для органа показники диференціації та дедиференціації на основі даних генної експресії [1].

© Б. Б. Гуда, В. В. Пушкар'юв, О. В. Журавель, А. Є. Коваленко, В. М. Пушкар'юв, Л. Ю. Зурнаджи, Ю. М. Тарашенко, М. Д. Тронько, 2015

Ядерний антиген проліферуючих клітин (PCNA) є висококонсервативним білком, необхідним для правильної організації компонентів, що беруть участь у процесах реплікації та репарації ДНК. Білки поєднуються в межах міждоменої сполучної петлі PCNA, і значна частина регуляторних впливів є результатом конкурування за цей стикувальний сайт. Якщо цей сайт PCNA модифікується, наприклад, в ракових клітинах, реплікація ДНК і процес репарації можуть змінюватися. В такому випадку з'являється можливість для таргетної терапії деяких типів раку [2].

Прогноз щодо раку ЩЗ значно різниться між випадками з наявністю та відсутністю метастазів. Для визначення біомаркерів, корисних для діагностики раку ЩЗ та встановлення панелі маркерів для раннього виявлення метастатичних карцином ЩЗ, було проведено ряд досліджень, які, зокрема, показали, що в метастазуючих пухлинах рівень PCNA вищий майже в 2 рази, ніж у неметастазуючих [3].

Отже, вивчення експресії PCNA та розробка методів його блокування є надзвичайно актуальним завданням.

За мету роботи ставилося порівняння експресії PCNA в нормальних, доброякісних та злоякісних (метастазуючих та неметастазуючих) 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". Усі пацієнти перед оперативним втручанням підписали інформовану згоду на застосування сучасних методів діагностики та дослідження. Одразу ж після видалення тканину ЩЗ поміщали на лід і швидко заморожували при -80°C . Тканину гомогенізували в гомогенізаторі TissueLyser II фірми "Retsch" (Німеччина) у спеціальному буфері з набору для імуноферментного аналізу QIA59, що містив суміш інгібіторів протеаз та фосфатаз, для збереження інтактності та активності білків. Гомогенат зберігали до подальшого використання при -80°C .

Для визначення кількості PCNA використовували набори для імуноферментного аналізу QIA59 фірми "Calbiochem" (США). Дослідження проводили в триплетах. Концентрацію білка в лізаті визначали за допомогою наборів на основі біцинхонінової кислоти (BCA protein assay kit) фірми "Novagen" (США). Планшети з PCNA зчитували на рідері фірми "Bio-tek Instruments" (США).

Одержані дані опрацьовані статистично з використанням *t*-критерію Стюдента і наведені у вигляді $M \pm SD$. Вірогідними вважали відміни при $P < 0,05$.

З рис. 1 видно, що одержана калібрувальна крива практично ідеально збігається з експонентою (X), що свідчить про відсутність розкиду даних у триплетах.

У тканині фолікулярної карциноми спостерігався високий рівень експресії PCNA, проте різниця між умовно нормальною та пухлинною тканинами була практично відсутня (рис. 2), на відміну від фолікулярної аденоми, де кількість антигену в пухлинній тканині перевищувала його кількість в умовно нормальній тканині майже в 2,5 рази. Рівень PCNA у пухлинній тканині папілярних карцином був вищим, ніж у нормальній тканині (див. рис. 2). Слід зазначити, що в інкапсульованих пухлинах це перевищення становило тільки 85%, тоді як у неінкапсульованих, метастазуючих пухлинах кількість PCNA була вищою від норми в середньому більш ніж у 3 рази (див. рис. 2), а в окремих пухлинах з метастазами в легені — навіть у 4 рази (6,215 Од/мг білка в пухлинах проти 1,539 Од/мг білка в умовно нормальній тканині).

В тканині багатовузлового зобу рівень експресії PCNA був низьким і ніякої різниці між пухлинною та умовно нормальною тканинами виявлено не було (див. рис. 2).

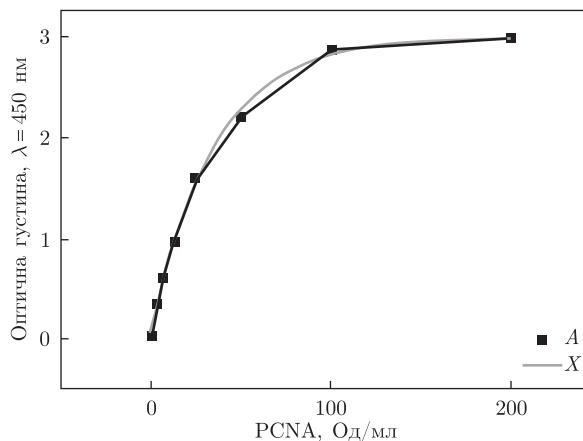


Рис. 1. Калібрувальна крива для визначення кількості PCNA в гомогенатах ЩЗ за допомогою набору для імуноферментного аналізу QIA59

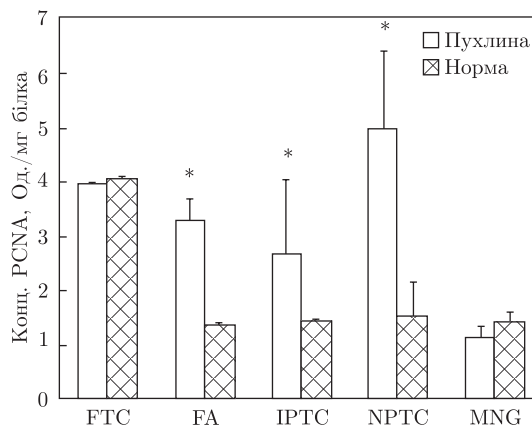


Рис. 2. Експресія PCNA в різних типах пухлин ЩЗ: FTC — фолікулярна карцинома, FA — фолікулярна аденома, IPTC — папілярна карцинома (інкапсульовані пухлини), NPTC — папілярна карцинома (неінкапсульовані, метастазуючі пухлини), MNG — багатовузловий зоб.

$M \pm SD$, $n = 3 \div 6$; * — відміни між умовно нормальною та пухлинною тканинами вірогідні, $P < 0,05$

Інші дослідники відмічали надекспресію PCNA у карциномах ЩЗ порівняно з аденомами [4]. Найвищий рівень експресії PCNA спостерігався в найбільш агресивних типах раку ЩЗ — анапластичній та медулярній карциномах [5]. У диференційованих пухлинах кількість антигену була дещо меншою, але помітно зростала в інвазивних варіантах цих пухлин.

Зараз проводяться дослідження по розробці інгібіторів PCNA, які могли б мати терапевтичний ефект. Так, дані щодо пригнічення PCNA трийодтироніном (Т3) стали основою синтезу невеликого за розмірами, небілкового та, що важливо, негормонального інгібітора — Т2-аміноспирту, похідного від Т3. Інгібітор зв'язується з РІР-боксом (PCNA-interacting protein box) антигену, перешкоджаючи останньому взаємодіяти з ДНК та ДНК-полімеразами [6].

Таким чином, кількість PCNA у пухлинних тканинах ЩЗ може служити діагностичним та прогностичним маркером для оцінки агресивності пухлин, а розробка ефективних інгібіторів антигену може бути перспективним напрямом при лікуванні раку ЩЗ.

Цитована література

1. Tomás G., Tarabichi M., Gacquer D. et al. A general method to derive robust organ-specific gene expression-based differentiation indices: application to thyroid cancer diagnostics // *Oncogene*. – 2012. – **31**. – P. 4490–4498.
2. Smith S. J., Gu L., Phipps E. A. et al. A Peptide mimicking a region in proliferating cell nuclear antigen specific to key protein interactions is cytotoxic to breast cancer // *Mol. Pharmacol.* – 2015. – **87**. – P. 263–276.
3. Liang H., Zhong Y., Luo Z. et al. Diagnostic value of 16 cellular tumor markers for metastatic thyroid cancer: an immunohistochemical study // *Anticancer Res.* – 2011. – **31**. – P. 3433–3440.
4. Liang H.-S., Zhong Y.-H., Luo Z.-J. et al. Comparative analysis of protein expression in differentiated thyroid tumours: a multicentre study // *J. Int. Med. Res.* – 2009. – **37**. – P. 927–938.
5. Lincoln D. T., Al-Yatama F., Mohammed F. M. A. et al. Thioredoxin and thioredoxin reductase expression in thyroid cancer depends on tumour aggressiveness // *Anticancer Res.* – 2010. – **30**. – P. 767–776.
6. Punchihewa C., Inoue A., Hishiki A. et al. Identification of small molecule proliferating cell nuclear antigen (PCNA) inhibitor that disrupts interactions with PIP-box proteins and inhibits DNA replication // *J. Biol. Chem.* – 2012. – **287**, No 17. – P. 14289–14300.

References

1. Tomás G., Tarabichi M., Gacquer D. et al. *Oncogene*, 2012, **31**: 4490–4498.
2. Smith S. J., Gu L., Phipps E. A. et al. *Mol. Pharmacol.*, 2015, **87**: 263–276.
3. Liang H., Zhong Y., Luo Z. et al. *Anticancer Res.*, 2011, **31**: 3433–3440.
4. Liang H.-S., Zhong Y.-H., Luo Z.-J. et al. *J. Int. Med. Res.*, 2009, **37**: 927–938.
5. Lincoln D. T., Al-Yatama F., Mohammed F. M. A. et al. *Anticancer Res.*, 2010, **30**: 767–776.
6. Punchihewa C., Inoue A., Hishiki A. et al. *J. Biol. Chem.*, 2012, **287**, No 17: 14289–14300.

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

Надійшло до редакції 07.04.2015

**Б. Б. Гуда, В. В. Пушкарєв, Е. В. Журавель, А. Е. Коваленко,
В. М. Пушкарєв, Л. Ю. Зурнаджи, Ю. Н. Таращенко,
член-корреспондент НАН України Н. Д. Тронько**

**Експрессия ядерного антигена пролиферирующих клеток (PCNA)
в нормальных тканях, доброкачественных
и высокодифференцированных злокачественных (метастазирующих
и неметастазирующих) опухолях щитовидной железы человека**

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

Изучали экспрессию ядерного антигена пролиферирующих клеток (PCNA) в нормальных тканях, доброкачественных и злокачественных (метастазирующих и неметастазирующих) опухолях щитовидной железы (ЩЖ) человека. В злокачественных опухолях и ткани фолликулярной аденомы выявлен повышенный уровень экспрессии PCNA, а количество антигена в опухолевой ткани, за исключением фолликулярной карциномы, превышало его количество в условно нормальной ткани. Важно отметить, что в инкапсулированных

опухолях папиллярных карцином это превышение составляет 85%, тогда как в неинкапсулированных, метастазирующих опухолях количество PCNA выше нормы в среднем более чем в 3 раза, а в наиболее агрессивных опухолях с метастазами в легкие — даже в 4 раза. Таким образом, количество PCNA в ткани ЩЖ может служить диагностическим и прогностическим маркером, а разработка эффективных ингибиторов антигена может быть перспективным направлением в лечении рака щитовидной железы.

Ключевые слова: рак щитовидной железы, ядерный антиген пролиферирующих клеток, агрессивность опухолей.

**B. B. Guda, V. V. Pushkarev, O. V. Zhuravel, A. Ye. Kovalenko,
V. M. Pushkarev, L. Yu. Zurnadzhi, Y. M. Tarashchenko,
Corresponding Member of the NAS of Ukraine M. D. Tronko**

Proliferating cells nuclear antigen (PCNA) expression in normal tissues, benign and malignant (metastatic and not metastatic) differentiated human thyroid tumors

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

PCNA expression in normal tissues, benign and malignant (metastatic and not metastatic) human thyroid tumors was studied. In malignant tumors and follicular adenoma tissue, the increased PCNA expression was observed, and the amount of antigen in tumor tissue, except for follicular carcinoma, exceeded the amount in the conditionally normal tissue. Importantly, in encapsulated papillary carcinomas tumors, this excess was 85%, while, in not encapsulated metastatic tumors, the PCNA amount was more than 3 times at the mean above normal and — in the most aggressive tumors with metastases in lungs — even 4 times. Thus, the PCNA amount in thyroid tissue can serve as a diagnostic and prognostic marker, and effective antigen inhibitors development may be a promising trend in thyroid cancer treatment.

Keywords: thyroid cancer, proliferating cell nuclear antigen, tumor aggressiveness.