



УДК 616.441-006:616-076:575.191:614.876

© 2008

Л. Г. Воскобойник, Т. І. Богданова, член-кореспондент НАН України
М. Д. Тронько

Експресія гена *RET* в післячорнобильських пухлинах щитовидної залози

The expression of RET gene that encodes a transmembrane receptor with tyrosine kinase activity, was studied on 59 post-Chernobyl thyroid tumors (35 papillary carcinomas and 24 follicular adenomas). It is shown that the majority of tumors, both benign and malignant, exhibits RET expression. The presence of gene RET in thyroid tumors was not associated with their histological structure, invasiveness, tumor's sizes, and the age and sex of patients. Nevertheless, the occurrence of RET expression (which is not expressed in normal thyroid cells) in the great part of post-Chernobyl thyroid tumors suggests a potential role of RET in the development of thyroid neoplasms, both benign and malignant.

Білок RET є трансмембранним рецептором з тирозинкіназною активністю і відповідає за широкий спектр клітинних функцій, зокрема проліферацію, диференціювання, міграцію та морфогенез [1, 2]. У щитовидній залозі (ЩЗ) експресія гена *RET* не відбувається в клітинах фолікулярного епітелію, однак вона властива нейроендокринним С-клітинам [3–5]. Вважають, що точкові мутації гена *RET* асоційовані із розвитком медулярної карциноми ЩЗ та синдромів MEN2A і MEN2B [2, 4, 6]. У папілярних карциномах (ПК) ЩЗ ген *RET* здатний до транслокацій, що призводить до формування химерних онкогенів родини *RET/PTC* з тирозинкіназною активністю [2, 5]. За даними літератури присутність перебудов *RET/PTC* відмічено в 12–87% ПК [7–10].

Незважаючи на те, що фолікулярні тироцити у звичайних умовах не здатні до експресії гена *RET*, його присутність відмічено в злоякісних пухлинах ЩЗ [5, 9, 11]. Деякі дослідники вважають, що експресія гена *RET* в ПК ЩЗ асоційована з найбільш агресивними за біологічною поведінкою пухлинами [11, 12]. Оскільки радіоіндуковані ПК ЩЗ характеризуються високою часткою перебудов *RET/PTC* [7, 8, 10], а *RET* потенційно може брати участь у прогресії зазначених карцином, мета нашого дослідження полягала у визначенні експресії гена *RET* в доброякісних та злоякісних післячорнобильських пухлинах ЩЗ.

Досліджено 35 ПК та 24 фолікулярні аденоми (ФА) ЩЗ. Екстракцію РНК проведено із заморожених зразків з реагентом TRIzol (“Sigma”, США) згідно з рекомендаціями виробника. Адекватність матеріалу оцінено на заморожених зрізах, що були зроблені перед

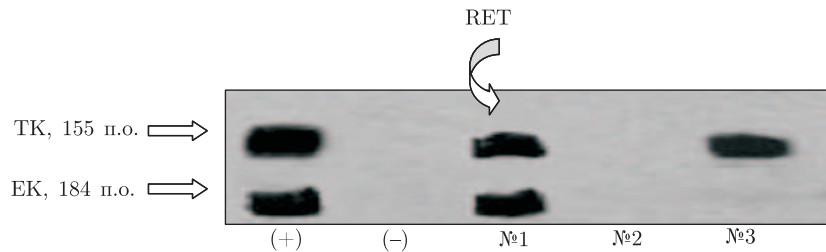


Рис. 1. Експресія доменів ТК і ЕК гена *RET* в деяких пухлинних зразках. Результати методу блотингу за Саузерном. (+), (-) — позитивний і негативний контролі, №№ 1–3 — зразки пухлинної тканини

екстракцією. Патогістологічний діагноз встановлено в лабораторії морфології ендокринної системи Інституту ендокринології та обміну речовин ім. В. П. Комісаренка і додатково верифіковано міжнародною групою експертів-патологів [13]. Середній вік пацієнтів на момент операції (21 ± 5 років для ПК і 23 ± 7 років для ФА) та середній латентний період, тобто проміжок часу між чорнобильською катастрофою і оперативним втручанням, були майже однаковими (14 ± 1 років) в обох досліджених групах.

Реакцію зворотної транскрипції для отримання кДНК та оцінку її якості проведено за методами, що описані раніше [10]. Для визначення експресії тирозинкіназного (ТК) і екстраклітинного (ЕК) доменів гена *RET* проводили полімеразну ланцюгову реакцію з відповідними праймерами та підтверджували результати за допомогою блотингу за Саузерном. Як позитивний контроль використана РНК, що була отримана з клітин медулярної карциноми лінії ТТ (CRL-1803, “American Type Culture Collection-ATCC”, США). Послідовність праймерів і зондів, умови проведення полімеразної ланцюгової реакції та блотингу за Саузерном описані в попередніх публікаціях [10].

Статистичний аналіз отриманих даних проведений за допомогою комп’ютерної програми EXEL за χ^2 -критерієм та парним *t*-критерієм Стьюдента.

Про наявність гена *RET* свідчила одночасна експресія його доменів ТК і ЕК (рис. 1, позитивний контроль та зразок № 1). Експресія домена ТК на тлі негативної реакції з праймерами до ЕК була обумовлена наявністю перебудов *RET/PTC* (зразок № 3). Експресія гена *RET* спостерігалася в переважній більшості досліджених пухлин. Не визначено статистично вірогідної різниці між наявністю даного гена в ПК та ФА (82,9 і 66,7% відповідно, $p = 0,151$ за χ^2 -критерієм). Експресію гена *RET* в значній кількості ПК відмічали й інші дослідники [11, 12]. Однак суперечливими є дані літератури щодо доброякісних пухлин ЩЗ. Одні дослідники вважають, що експресія гена *RET* не властива ФА ЩЗ [11], інші визначають його наявність в 28,6% ФА ЩЗ [14]. Проте наведені дані стосуються дорослих пацієнтів. Можливо, високий відсоток випадків ФА із експресією гена *RET* у наших дослідженнях обумовлений саме віком хворих чи впливом опромінення внаслідок аварії на Чорнобильській АЕС.

Нами встановлено, що експресія зазначеного гена у більшості випадків не залежала від гістологічної будови пухлин ЩЗ, як злоякісних, так і доброякісних (табл. 1, 2). Однак звертає на себе увагу те, що серед 35 досліджених ПК дві пухлини мали солідну будову і в обох мала місце експресія гена *RET*. Серед шести ПК змішаної будови з вираженим солідним компонентом у п’яти спостерігалася наявність гена *RET* і тільки одна пухлина характеризувалася його відсутністю. В доброякісних тиреоїдних пухлинах ЩЗ картина протилежна — у трьох із чотирьох аденом солідної будови експресія гена *RET* не виявлена. Незначна

кількість спостережень не дозволяє зробити об'єктивних висновків з цього приводу, але якщо взяти до уваги, що в інкапсульованих ПК відсоток випадків з відсутністю експресії гена *RET* вірогідно вищий, ніж з його наявністю (див. табл. 1), у подальших дослідженнях було б доцільно проаналізувати саме пухлини солідної будови (ФА та інкапсульовані ПК) на наявність експресії гена *RET*. Такі дослідження, з нашої точки зору, можуть бути корисними у складних випадках диференціальної діагностики між ПК і ФА.

Зазначимо, що серед 24 досліджених ФА дві були нетиповими (гангліоподібна та світлоклітинна) і обидві характеризувалися відсутністю гена *RET*. Крім того, п'ять ФА (20,8%) були оксифільноклітинними за походженням і в усіх них визначена експресія *RET*. Однак, знов-таки, недостатня кількість спостережень поки ще не дозволяє зробити остаточні висновки з цього приводу.

Деякі дослідники вважають, що експресія гена *RET* у ПК асоційована з агресивною біологічною поведінкою зазначених пухлин [11, 14]. Нами проведено порівняльний аналіз між наявністю гена *RET* у ПК та їх клініко-морфологічними особливостями. Встановлено,

Таблиця 1. Клініко-морфологічна характеристика ПК за наявності та відсутності гена *RET*

Показник	Експресія гена <i>RET</i>	Експресія гена <i>RET</i> відсутня
Кількість спостережень	29	6
Вік хворих, років	21,8 ± 5,4	18,9 ± 4,9
Ж/Ч	2,5 : 1	3,1 : 1
Розмір пухлини, мм	28 ± 13	41 ± 21
Інкапсульовані пухлини	7 (24,1%)*	4 (66,7%)
Гістологічна будова		
папілярна	9 (31,0%)	1 (16,7%)
фолікулярна	10 (34,5%)	2 (33,3%)
солідна	2 (6,9%)	0
змішана	8 (27,6%)	3 (50,0%)
папілярно-фолікулярна	2 (6,9%)	2 (33,3%)
солідно-фолікулярна	3 (10,3%)	1 (16,7%)
солідно-папілярна	3 (10,3%)	0
Екстратиреоїдне поширення	5 (17,2%)	2 (33,3%)
Багатофокусний ріст у протилежну частку ЩЗ	5 (17,2%)	2 (33,3%)
Судинна інвазія	25 (86,2%)	4 (66,7%)
Метастази до лімфовузлів шії	17 (58,6%)	3 (50,0%)
Віддалені метастази до легенів	6 (20,7%)	1 (16,7%)

* Різниця є вірогідною порівняно з ПК без експресії гена *RET*, $p = 0,041$ за χ^2 -критерієм.

Таблиця 2. Клініко-морфологічна характеристика ФА за наявності та відсутності гена *RET*

Показник	Експресія гена <i>RET</i>	Експресія гена <i>RET</i> відсутня
Кількість спостережень	16	8
Вік хворих, років	23,5 ± 7,9	21,7 ± 6,7
Ж/Ч	4,3 : 1	5 : 1
Розмір пухлини, мм	29,1 ± 11,7	18,9 ± 6,9
Гістологічна будова		
нормо-макрофолікулярна	2 (12,5%)	1 (12,5%)
мікрофолікулярна	6 (37,5%)	1 (12,5%)
мікрофолікулярно-солідна	7 (43,8%)	1 (12,5%)
солідна	1 (6,3%)	3 (37,5%)
нетипова	0	2 (25,0%)
гангліоподібна	0	1 (12,5%)
світлоклітинна	0	1 (12,5%)

що експресія гена *RET* не залежить від віку і статі хворих, розміру пухлин, наявності віддалених і регіонарних метастазів, ознак судинної інвазії (див. табл. 1), тобто одержані дані не свідчать про більш агресивну поведінку ПК. Навпаки, частка інкапсульованих ПК була вірогідно нижчою в групі пухлин, що характеризувалися наявністю гена *RET*. Частота ознак екстра- та інтратиреоїдного поширення також була нижчою (однак не вірогідно) у зазначеній групі. Не визначено залежності між віком хворих, розміром пухлин і експресією гена *RET* і в групі ФА.

Таким чином, переважна більшість післячорнобильських пухлин щитовидної залози, як злоякісних, так і доброякісних, характеризується експресією гена *RET*. Встановлено, що експресія зазначеного гена в більшості випадків не залежить від гістологічної будови пухлин, їх інвазійних властивостей, розміру, а також віку та статі хворих. Наявність гена *RET* переважно в неінкапсульованих ПК потребує подальших досліджень щодо можливості використання в складних випадках диференціальної діагностики тиреоїдних пухлин.

Автори висловлюють подяку співробітникам відділів ендокринології та молекулярної біології університету м. Піза, Італія за можливість проведення досліджень (керівники: проф. А. Пінкейра і проф. Р. Елізеї) та Міжнародній організації боротьби з раком (UICC) за надання наукового гранту для виконання роботи.

1. Bunone G., Uggeri M., Mondellini P. et al. RET receptor expression in thyroid follicular epithelial cell-derived tumors // *Cancer Res.* – 2000. – **60**. – P. 2845–2849.
2. Arighi E., Borrello M. G., Sartioli H. RET tyrosine kinase signaling in development and cancer // *Cytokine & Growth Factor Reviews.* – 2005. – No 16. – P. 441–467.
3. Panta G. R., Du L., Nwariaku F. E. et al. Direct phosphorylation of proliferative and survival pathway proteins by RET // *Surgery.* – 2005. – No 138. – P. 269–274.
4. Cerchia L., Libri D., Carlomagno M. S., Franciscis V. The soluble ectodomain of Ret^{C634Y} inhibits both the wild-type and the constitutively active Ret // *Biochem. J.* – 2003. – **372**. – P. 897–903.
5. Musholt T. J., Brehm C., Haback J. et al. Identification of Differentially Expressed Genes in Papillary Thyroid Carcinomas with and without Rearrangements of the Tyrosine Kinase Receptors RET and/or NTRK1 // *J. Surg. Res.* – 2006. – **131**. – P. 15–25.
6. Kato M., Iwashita T., Takeda K. et al. Dimerization and superactivation of oncogenic Ret tyrosine kinases // *Mol. Biol. Cell.* – 2000. – **11**. – P. 93–101.
7. Nikiforov Y. E., Rowland J. M., Monforte-Munos H., Fagin J. A. Distinct pattern of ret oncogene rearrangements in morphological variants of radiation-induced and sporadic thyroid carcinomas in children // *Cancer Res.* – 1997. – **57**, No 9. – P. 1690–1694.
8. Lima J., Trovisco V., Soares P. et al. BRAF Mutations Are Not a Major Event in Post-Chernobyl Childhood Thyroid Carcinomas // *J. Clin. Endocrinol.* – 2004. – **89**, No 9. – P. 4267–4271.
9. Brzezińska E., Karbownik M., Migdalska-Sek M. et al. Molecular analysis of the RET and NTRK1 gene rearrangements in papillary thyroid carcinomas in the Polish population // *Mutat. Res.* – 2006. – **599**, No 1–2. – P. 26–35.
10. Воскобойник Л. Г. Онкогенна активація генів RET, BRAF та NTRK1 в доброякісних та злоякісних післячорнобильських пухлинах щитовидної залози // *Ендокринологія.* – 2007. – **12**, № 1. – С. 33–47.
11. Kjellman P., Learoyd D. L., Messina M. et al. Expression of the RET proto-oncogene in papillary thyroid carcinoma and its correlation with clinical outcome // *Brit. J. Surg.* – 2001. – No 88. – P. 557–563.
12. Mayer B., Potter E., Goretzki P. et al. Expression of wild-type ret, ret/ptc and ret/ptc variants in papillary thyroid carcinoma in Germany // *Lang. Arch. Surg.* – 1999. – **384**, No 1. – P. 54–59.
13. Thomas G. A., Williams E. D., Becker D. V. et al. Thyroid tumor banks // *Science.* – 2000. – **289**, No 29. – P. 2945–2948.
14. Lee S., Hong S. W., Moon W. C. et al. High prevalence of c-RET expression in papillary thyroid carcinomas from the Korean population // *Thyroid.* – 2005. – **15**, No 3. – P. 259–266.

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

Надійшло до редакції 12.07.2007