

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

## Порівняльний аналіз експресії симпортера натрію/йоду (NIS), рецепторних тирозинкіназ (EGFR, MET) та наявності генетичних змін у папілярних карциномах щитоподібної залози

*Проведено порівняльний аналіз експресії симпортера натрію/йоду (NIS), рецепторних тирозинкіназ MET, EGFR та наявності генетичних змін (онкогени RET/PTC, TRK, мутації BRAF<sup>V600E</sup>) у 35 папілярних карциномах (ПК) щитоподібної залози (ЩЗ). В усіх випадках досліджено і позапухлинну відносно незмінену тканину (НТ) ЩЗ. Встановлено, що в переважній більшості ПК (77,2%) експресія NIS була відсутня. Майже у третині пухлин (22,8%) спостерігалася позитивна імуногістохімічна реакція, проте локалізації NIS була цитоплазматичною. Не виявлено жодної ПК з NIS-позитивним мембранним забарвленням. Наявність генетичних змін встановлено у 25 пухлинах (71,4%). Не виявлено вірогідної різниці між відсотком NIS-позитивних випадків у ПК без генетичних змін та пухлинах з їх наявністю. Проте відсоток карцином з NIS-позитивною цитоплазматичною реакцією серед ПК з RET/PTC, але не з TRK чи мутаціями BRAF<sup>V600E</sup>, був вірогідно нижчим порівняно з ПК без генетичних змін. Не встановлено взаємозв'язку між експресією NIS та мРНК гена EGFR. Водночас зниження вмісту функціонально активного NIS-білка було асоційовано з підвищенням рівня експресії мРНК гена MET, особливо в ПК з цитоплазматичною локалізацією NIS.*

Симпортер натрію/йоду (NIS) є інтегрованим до плазматичної мембрани тироцитів білком, що забезпечує процеси надходження до зазначених клітин йоду і який є необхідним компонентом для біосинтезу тиреоїдних гормонів [1]. Надходження йоду є активним процесом і відбувається проти градієнта концентрації. Проте виконувати функцію транспортувальника йоду NIS здатен лише за умов його мембранної локалізації. При транслокації зазначеного білка від мембрани до цитоплазми, що спостерігається при деяких патологічних станах, він втрачає функціональну активність і не забезпечує процеси поглинання тироцитами йоду з мікроциркуляторного русла [2, 3].

Крім щитоподібної залози (ЩЗ) експресію NIS виявлено в слинній залозі, слизовій шлунка, молочній залозі в стадії лактації, плаценті, лімфатичних вузлах, а також у злоякісних пухлинах легенів, передміхурової та молочної залоз [4, 5]. Проте найбільшу увагу дослідників і клініцистів привертають питання щодо вмісту та активності NIS у диференційованих раках ЩЗ, оскільки основним методом виявлення та руйнування їх рецидивів є скінтиграфія з NaI<sup>131</sup>. Відомо, що зазначені пухлини характеризуються дуже низькою здатністю до акумулювання радіоактивного йоду [6]. Вважають, що така ситуація цілком обумовлена зниженням експресії чи активності NIS-білка [7].

Відомо, що на функціональну активність NIS можуть впливати різні чинники — тиреотропний гормон, статеві гормони, цитокіни, транскрипційні і ростові фактори та ін. [1, 5]. Крім того, існує думка про можливу кореляцію між транскрипційною активністю NIS та рецептора епітеліального фактора росту (EGFR), який характеризується тирозинкіназою

активністю [1]. Однак конкретні дані про взаємозв'язок чи його відсутність між експресією NIS та різних рецепторних тирозинкіназ у сучасній літературі відсутні.

В останні роки з'явилися роботи, присвячені взаємозв'язку між експресією NIS та індукцією онкогенів *RET/PTC* і мутацій *BRAF<sup>V600E</sup>* у клітинах папілярної карциноми (ПК) ЩЗ [8, 9]. Вважають, що обидва типи зазначених генетичних змін гальмують експресію гена *NIS* та процеси поглинання йоду. У той же час деякі дослідники зазначають, що такий взаємозв'язок властивий лише *BRAF<sup>V600E</sup>* [10].

Оскільки одним з факторів регуляції функціональної активності NIS є йод [1], безумовну зацікавленість викликають дослідження щодо експресії NIS в ПК, які виникли в осіб, що зазнали впливу радіоактивного йоду внаслідок аварії на Чорнобильській АЕС. Такі дані в сучасній літературі відсутні.

У зв'язку із зазначеним вище наша мета полягала в проведенні порівняльного аналізу між експресією білка NIS, мРНК рецепторних тирозинкіназ (*EGFR*, *MET*) та наявністю генетичних змін у післячорнобильських ПК ЩЗ.

Досліджено 35 ПК ЩЗ, що були видалені оперативним шляхом в осіб, які були дітьми чи підлітками на час аварії на ЧАЕС. Середній вік пацієнтів на момент операції становив 21 рік $\pm$ 3 роки, середній латентний період (тобто час, що минув між Чорнобильською катастрофою і оперативним втручанням) — 14 років  $\pm$  1 рік. Діагноз “папілярна карцинома” встановлювався згідно з класифікацією BOOЗ [11] в лабораторії морфології ендокринної системи ДУ “Інститут ендокринології та обміну речовин ім. В. П. Комісаренка АМН України” і був додатково верифікований міжнародною групою експертів-патологів [12].

Дослідження експресії NIS проведені за допомогою імуногістохімічної реакції з відповідними антитілами (BRAHMS, Італія) за непрямим імунопероксидазним методом [3]. При аналізі результатів звертали увагу на локалізацію NIS — цитоплазматична чи мембранна. Реакцію вважали позитивною при забарвленні не менш 20% клітин [3].

Наявність онкогенів *RET/PTC1*, *RET/PTC3* та *TRK* визначено за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) з відповідними праймерами та підтверджено блотингом за Саузерном. Метод з наведенням послідовності праймерів, зондів, умов виконання ПЛР та блотингу описаний раніше [13]. Кількісний рівень експресії мРНК генів рецепторних тирозинкіназ *EGFR*, *MET* та наявність онкогенів *RET/PTCX* досліджено за допомогою кількісної ПЛР у реальному часі (real-time RT-PCR) [13, 14]. Наявність мутації *BRAF<sup>V600E</sup>* встановлено за методом секвенування [13]. В усіх випадках досліджено як пухлинну, так і позапухлинну відносно незмінену тканину (НТ) ЩЗ.

Статистичний аналіз отриманих даних проведений за допомогою комп'ютерної програми EXCEL за  $\chi^2$ -критерієм та критерієм Стьюдента.

В усіх зразках НТ ми спостерігали наявність NIS-позитивних клітин, причому забарвлення було виключно мембранним. Проте зауважимо, що реакція була гетерогенною — лише окремі тироцити чи їх невеличкі скупчення були позитивними до NIS. Навіть у межах одного фолікула виявлялися як NIS-позитивні, так і NIS-негативні клітини.

Встановлено, що в переважній більшості ПК (27 із 35, чи 77,2%) експресія NIS була відсутня (табл. 1). Цитоплазматична реакція спостерігалася в 8 із 35 ПК (22,8%). При цьому в чотирьох випадках були забарвлені майже всі пухлинні клітини, а ще в чотирьох — реакція була локальною, але поширеною. За даними літератури, транслокація NIS-білка від мембрани тироцитів до цитоплазми свідчить про втрату симпортером його функціональної активності, тобто здатності транспортувати йод [2, 3]. Серед досліджених карцином не виявлено жодного випадку з чіткою мембранною реакцією з антитілами до NIS. Таким

чином, отримані дані свідчать про зменшення вмісту активного NIS-білка в клітинах ПК ЩЗ внаслідок зниження його експресії чи транслокації до цитоплазми.

Наявність онкогенів *RET/PTC* встановлено у 18 ПК (*RET/PTC1* — 4 випадки, *RET/PTC3* — 7 випадків, одночасна експресія *RET/PTC1* та *RET/PTC3* — 1 випадок і *RET/PTCX* — 6 випадків). Індукцію онкогенів *TRK* відмічено у двох пухлинах. Наявність мутацій *BRAF<sup>V600E</sup>* ідентифіковано в шести ПК. Необхідно зауважити, що одна карцинома характеризувалася наявністю перебудови *RET/PTC3* та мутації *BRAF<sup>V600E</sup>*. Тому загальна кількість ПК, позитивних до генетичних порушень, становила 25 (див. табл. 1). В усіх досліджених зразках НТ (35 випадків) онкогени чи мутації були відсутні.

Позитивна цитоплазматична реакція з антитілами до NIS частіше спостерігалася в ПК без генетичних змін, однак різниця не була вірогідною (див. табл. 1). Оскільки в наших дослідженнях були виявлені різні генетичні порушення, які, за даними літератури, відрізняються за мітогенним ефектом [10], вони проаналізовані окремо. Не встановлено вірогідної різниці між кількістю NIS-позитивних пухлин у випадках ПК з наявністю онкогенів *TRK* чи мутацій *BRAF<sup>V600E</sup>* порівняно з ПК без генетичних змін. У той же час відсоток NIS-позитивних карцином був вірогідно нижчим (лише одна пухлина) у групі ПК з індукцією онкогенів *RET/PTC* (див. табл. 1). Причому цікавим є те, що зазначена ПК характеризувалася одночасною експресією двох онкогенів — *RET/PTC1* та *RET/PTC3*. В усіх зразках НТ будь-які генетичні порушення були відсутні і, як зазначалось вище, спостерігалася позитивна мембранна реакція з антитілами до NIS.

Встановлено, що кількісний рівень експресії мРНК генів *EGFR* та *MET* у зразках НТ був практично однаковим ( $0,39 \pm 0,22$  та  $0,41 \pm 0,19$  відповідно). Не встановлено взаємозв'язку між експресією NIS та мРНК гена *EGFR* у ПК ЩЗ — кількісний рівень експресії *EGFR* був майже однаковим у NIS-негативних та NIS-позитивних ПК і не відрізнявся від показників НТ (табл. 2). Однак, за даними літератури, гальмування експресії NIS чи пригнічення його функціональної активності асоційовано з активацією *EGFR* [1]. Проте необхідно зауважити, що такі результати одержані на культурі пухлинних клітин, але ж не в умовах *in vivo*. На відміну від даних літератури у наших дослідженнях зниження вмісту та активності NIS у пухлинах не супроводжувалося підвищенням експресії мРНК *EGFR*.

Рівень експресії гена *MET* в ПК ЩЗ був вірогідно вищим, ніж у НТ (див. табл. 2). Причому в NIS-позитивних ПК він був у 1,4 раза вище порівняно з NIS-негативними пухлинами, проте різниця не була статистично вірогідною. Крім того, лише в групі ПК з позитивною

Таблиця 1. Порівняльний аналіз результатів імуногістохімічної реакції з антитілами до NIS та наявності генетичних змін у папілярних карциномах щитоподібної залози

Група	Кількість випадків	Цитоплазматична реакція	Негативна реакція
Усі ПК	35	8 (22,8%)	27 (77,2%)
ПК без генетичних змін	10 (28,6%)	4 (40,0%)	6 (60,0%)
ПК з наявністю генетичних змін	25 <sup>Δ</sup> (71,4%)	4 (16,0%)	21 (84,0%)
<i>RET/PTC</i>	18 (51,4%)	1 (5,6%)*	17 (94,4%)
<i>BRAF<sup>V600E</sup></i>	6 (17,1%)	3 (50,0%)	3 (50,0%)
<i>TRK</i>	2 (5,7%)	0	2

Примітка. <sup>Δ</sup> — одна ПК характеризувалася одночасною експресією *RET/PTC3* та *BRAF<sup>V600E</sup>*, тому її проаналізовано двічі (у ПК з онкогенами *RET/PTC* та ПК з мутаціями *BRAF<sup>V600E</sup>*) і, таким чином, загальна кількість ПК з наявністю генетичних змін дорівнює 25.

\*  $P = 0,0225$  порівняно з ПК без генетичних змін за  $\chi^2$ -критерієм.

Таблиця 2. Порівняльний аналіз результатів імуногістохімічної реакції з антитілами до NIS та кількісного рівня експресії рецепторних тирозинкіназ *EGFR* та *MET* у папілярних карциномах щитоподібної залози

Результат імуногістохімічної реакції	<i>EGFR</i>		<i>MET</i>	
	Пухлинна тканина	НТ	Пухлинна тканина	НТ
Цитоплазматична реакція, $n = 8$	$0,51 \pm 0,48$	$0,35 \pm 0,15$	$2,34 \pm 1,14^*$	$0,33 \pm 0,08$
Негативна реакція, $n = 27$	$0,45 \pm 0,34$	$0,40 \pm 0,29$	$1,71 \pm 1,22$	$0,44 \pm 0,33$
Середній показник	$0,46 \pm 0,39$	$0,39 \pm 0,22$	$1,83 \pm 1,18^*$	$0,41 \pm 0,19$

\*  $P < 0,05$  порівняно з відповідною НТ за  $t$ -критерієм Стьюдента.

імуногістохімічною реакцією до NIS рівень експресії мРНК гена *MET* вірогідно перевищував показники у відповідній НТ (див. табл. 2).

Таким чином, встановлено, що у післячорнобильських папілярних карциномах ЩЗ має місце зменшення вмісту активного NIS-білка внаслідок відсутності його експресії (негативна реакція) чи транслокації до цитоплазми (позитивна цитоплазматична реакція). Проведений порівняльний аналіз показав, що в пухлинах з онкогенами *RET/PTC*, на відміну від ПК з *TRK* чи *BRAF<sup>V600E</sup>*, відсоток NIS-позитивних карцином вірогідно нижчий порівняно з ПК без генетичних порушень. Не виявлено взаємозв'язку між експресією білка NIS та мРНК гена *EGFR* в ПК. Однак встановлено, що зниження вмісту функціонально активного NIS-білка в злоякісних пухлинах ЩЗ асоційоване з підвищенням експресії *MET*. Крім того, у ПК з цитоплазматичною локалізацією NIS підвищення рівня експресії мРНК гена *MET* більш виражене порівняно з NIS-негативними пухлинами.

1. Dohan O., De la Vieja A., Paroder V. et al. The sodium/iodide symporter (NIS): characterization, regulation, and medical significance // *Endocrine Rev.* – 2003. – **24**, No 1. – P. 48–77.
2. Dayem M., Basquin C., Navarro V. et al. Comparison of expressed human and mouse sodium/iodide symporters reveals differences in transport properties and subcellular localization // *J. Endocrinol.* – 2008. – **197**. – P. 95–109.
3. Sodr e A. K., Rubio G. S., Galr o A. L. R. et al. Association of low sodium-iodide symporter messenger ribonucleic acid expression in malignant thyroid nodules with increased intracellular protein staining // *J. Clin. Endocrinol. and Metabol.* – 2008. – **93**, No 10. – P. 4141–4145.
4. Donah O., Carrasco N. Advances in  $\text{Na}^+/\text{I}^-$  symporter (NIS) research in the thyroid and beyond // *Mol. Cell. Endocrinol.* – 2003. – **213**. – P. 59–70.
5. Воскобойник Л. Г. Симпортер натрію/йоду (NIS): структура, функція, механізми регуляції, роль в патогенезі тиреоїдної патології (огляд літератури і власні дані) // *Ендокринологія.* – 2008. – **13**, № 2. – С. 262–279.
6. Jonklaas J. Role of radioactive iodine for adjuvant therapy and treatment of metastases // *J. Natl. Compr. Canc. Netw.* – 2007. – **5**, No 6. – P. 631–640.
7. Khan M. U., Nawaz M. K., Saadullah M. et al. Differentiated thyroid carcinoma in a juvenile patient // *Clin. Nucl. Med.* – 2008. – **33**, No 5. – P. 319–320.
8. Lundh C., Lindencrona U., Postgerd P. et al. Radiation-induced thyroid stunning: differential effects of (123)I, (131)I, (99m)Tc, and (211)At on iodide transport and NIS mRNA expression in cultured thyroid cells // *J. Nucl. Med.* – 2009. – **50**, No 7. – P. 1161–1167.
9. Durante C., Puxeddu E., Ferretti E. et al. BRAF mutations in papillary thyroid carcinomas inhibit genes involved in iodine metabolism // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 2007. – **92**, No 7. – P. 2840–2843.
10. Di Cristofaro J., Silvy M., Lanteaume A. et al. Expression of tpo mRNA in thyroid tumors: quantitative PCR analysis and correlation with alterations of ret, Braf, ras and pax8 genes // *Endocrinol. Rel. Cancer.* – 2006. – **13**. – P. 485–495.
11. DeLelis R., Lloyd R., Heitz Ph., Eng Ch. Pathology and genetics of tumours of endocrine organs. WHO classification of tumours. – Lyon: IARC Press, 2004. – 320 p.
12. Thomas G. A., Williams E. D., Becker D. V. et al. Thyroid tumor banks // *Science.* – 2000. – **289**, No 29. – P. 2945–2948.

13. 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.
14. Воскобойник Л. Г. Експресія MET та EGFR в післячорнобильських пухлинах щитовидної залози // Там само. – 2007. – **12**, № 2. – С. 227–239.

Державна установа “Інститут ендокринології  
та обміну речовин ім. В. П. Комісаренка  
АМН України”, Київ

Надійшло до редакції 18.03.2010

**L. G. Voskoboynyk, T. I. Bogdanova,**  
Corresponding Member of the NAS of Ukraine **M. D. Tronko**

### **Comparative analysis of the expression of sodium iodide symporter (NIS), tyrosine kinase receptors (EGFR, MET) and gene alterations in papillary thyroid carcinomas**

*The comparative analysis of the expression of sodium iodide symporter (NIS), mRNA tyrosine kinase receptors MET, EGFR, and gene alterations (RET/PTC, TRK, mutation BRAV<sup>V600E</sup>) in 35 papillary thyroid carcinomas (PTC) is carried out. In all cases, both tumor and normal thyroid tissues (NT) are studied. It is shown that, in a great majority of PTC (77.2%), the NIS expression was not observed. Up to one third of tumors (22.8%), the positive immunohistochemical reaction was detected, but the localization of NIS was cytoplasmic. There were not PTC with membrane positivity. The presence of gene alterations was detected in 25 tumors (71.4%). The significant difference between the percentages of NIS-positive cases among the PTC with and without gene's alterations was not revealed. The frequency of NIS-positivity in PTC with RET/PTC, but not TRK or mutations BRAV<sup>V600E</sup>, was significantly lower with respect to PTC without gene's alterations. No correlation between the expression of NIS and mRNA EGFR in papillary thyroid carcinomas was revealed. On the contrary, a decrease of the content of functionally active NIS protein is associated with a increase of the expression level of MET mRNA, particularly in PTC with cytoplasmic localization of NIS.*