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

© 2009

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

Вплив онкогенів на експресію рецепторних тирозинкіназ у пухлинах щитоподібної залози

Проведено порівняльний аналіз злоякісних та доброякісних пухлин щитоподібної залози відносно експресії трансформованих та незмінених рецепторних тирозинкіназ (TRK, RET/PTC, RET, MET, EGFR). Досліджено 35 папілярних карцином та 24 фолікулярні аденоми. Встановлено, що рівень експресії реаранжованих онкогенів у злоякісних пухлинах щитоподібної залози вірогідно вищий, ніж у доброякісних новоутвореннях. Крім того, наявність генетичних порушень у папілярних карциномах щитоподібної залози була асоційована з посиленням експресії генів, що кодують рецепторні тирозинкінази. Для фолікулярних аденом такої залежності не виявлено.

Відомо, що рецепторні тирозинкінази (РТК) відіграють важливу роль у тиреоїдному канцерогенезі. Розрізняють два механізми активації тирозинкіназ: один з них реалізується шляхом формування нових, так званих химерних, онкогенів, інший — внаслідок посилення експресії незмінених генів [1]. Процес утворення онкогенів відбувається таким чином. Окремі гени, що кодують РТК і мають класичну будову — екстраклітинний (ЕК), трансмембранний (ТМ) та внутрішньоклітинний тирозинкіназний (ТК) фрагменти, здатні до реаранжування. Внаслідок інверсії чи транслокації нуклеотидна послідовність ТК може сполучатися з фрагментом іншого гена, що й призводить до формування онкогена.

Прикладом зазначених онкогенів є *TRK*. Шляхом інверсії ТК послідовність гена *NTRK1* (рецептор фактору росту нервів) з'єднується з часткою іншого гена, що розташований на тій самій хромосомі [2]. Існують декілька різних форм онкогенів *TRK*, спільною ознакою яких є наявність ТК послідовності гена *NTRK1*. Відрізняються зазначені онкогени так званими генами-партнерами, що беруть участь у їх формуванні (*TPM*, *TPR*, *TFG*). Оскільки експресія *NTRK1* не відбувається в клітинах щитоподібної залози (ЩЗ), метод виявлення онкогенів *TRK* є відносно простим. Проводять полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР) з праймерами до ТК послідовності гена *NTRK1* та підтверджують результати за допомогою блотингу за Саузерном. За даними літератури, експресія *TRK* відбувається в 0–12% папілярних карцином (ПК) ЩЗ [1, 2]. На українських післячорнобильських пухлинах подібні дослідження не проводилися. Крім того, у літературі відсутні дані про можливість чи неможливість виникнення *TRK* у доброякісних пухлинах ЩЗ.

Інший приклад онкогенів — *RET/PTC*. Механізм їх утворення аналогічний, змінюються лише субстрати. Джерелом ТК є *RET* (трансмембранний рецептор фактору росту клітин гліального походження). У літературі описані 16 різних форм онкогенів *RET/PTC*, які, як і *TRK*, відрізняються генами-партнерами [3]. На відміну від *NTRK1*, експресія *RET* властива нейросекреторним С-клітинам ЩЗ. Крім того, деякі дослідники вважають, що невисокий рівень експресії *RET* відбувається і в клітинах ПК ЩЗ [4]. Тому методичні

підходи щодо виявлення онкогенів *RET/PTC* відрізняються від тих, що використовують для *TRK*. Наявність *RET/PTC* визначають за допомогою численних ПЛР з праймерами до різних онкогенів. Альтернативним є метод кількісної ПЛР у реальному часі (real-time PCR) — визначають рівень експресії ТК та ЕК фрагментів та оцінюють їх співвідношення [4, 5]. Наявність *RET/PTC* встановлено в 20–85% ПК ЩЗ [3, 6–7]. У той же час дані літератури про експресію зазначених онкогенів у доброякісних пухлинах ЩЗ є суперечливими [3, 8].

Відомо, що онкогени *RET/PTC* та *TRK* обумовлюють появу химерних білків з тирозинкіназною активністю, які через RAS і далі RAF кінази активують МАРК каскад, що й призводить до проліферації та дедиференціювання тиреоїдного епітелію [3].

Необхідно зауважити, що в клітинах ЩЗ присутні інші не трансформовані РТК, зокрема *EGFR* та *MET* (рецептори епітеліального фактору росту та фактору росту гепатоцитів відповідно). Доведено, що в деяких ПК ЩЗ їх кількість зростає [9, 10]. Існує думка, що активація МАРК каскаду призводить до посилення експресії гена *MET* [10]. Можливо, що аналогічний механізм регуляції також властивий і для *EGFR* та інших генів, що кодують РТК. У зв'язку з цим становить інтерес дослідження післячорнобильських ПК, які, як відомо, характеризуються високим відсотком перебудов *RET/PTC* [6]. Саме тому мета наших досліджень полягала в проведенні порівняльного аналізу доброякісних та злоякісних пухлин ЩЗ щодо експресії генів РТК, як трансформованих, так і незмінених (*TRK*, *RET/PTC*, *RET*, *MET*, *EGFR*).

Досліджено 35 ПК та 24 фолікулярні аденоми (ФА) ЩЗ. В усіх випадках досліджено також відносно незмінену (НТ) тканину ЩЗ (59 випадків). Екстракцію РНК проведено із заморожених зразків з реагентом TRIzol ("Sigma", США) згідно з рекомендаціями виробника. Адекватність матеріалу оцінено на заморожених зрізах, що були виготовлені перед екстракцією. Патогістологічний діагноз встановлено в лабораторії морфології ендокринної системи ДУ "Інститут ендокринології та обміну речовин ім. В. П. Комісаренка АМН України" і додатково верифіковано міжнародною групою експертів-патологів [11]. Середній вік пацієнтів на момент операції був майже однаковим в обох досліджених групах (21 ± 5 років для ПК і 23 ± 7 років для ФА).

Реакцію зворотної транскрипції для отримання кДНК та оцінку її якості проводили за методами, що описані раніше [12]. Наявність онкогенів *TRK* визначали за допомогою ПЛР з наступним підтвердженням результатів блотингом за Саузерном. Послідовність праймерів і зондів, умови проведення ПЛР та блотингу описані в роботі [12]. Для визначення онкогенів *RET/PTC* та гена *RET* використовували кількісну ПЛР в реальному часі. Умови її проведення описані раніше [5]. Рівень експресії генів *MET* та *EGFR* визначали також за допомогою кількісної ПЛР. Метод виконання досліджень та оцінки даних наведено в роботі [13]. Статистичний аналіз отриманих даних проведений за допомогою комп'ютерної програми EXEL за χ^2-критерієм, парним t-критерієм та критерієм Стьюдента.

За результатами дослідження, експресію *TRK* встановлено в невеликій кількості пухлин ЩЗ, як злоякісних, так й доброякісних, без статистично вірогідної різниці (табл. 1). На відміну від *TRK*, онкогени *RET/PTC* виявлялися вірогідно частіше в злоякісних пухлинах ЩЗ. Зауважимо, що в одній ФА спостерігалася одночасна експресія онкогенів *TRK* та *RET/PTC*. В ПК ЩЗ така ситуація була відсутньою. Однак незначна кількість спостережень не дозволяє зробити об'єктивних висновків з цього приводу. У жодному з досліджених зразків НТ наявності реаранжованих генів не зафіксовано.

Експресію незміненого гена *RET* виявлено в переважній більшості пухлин ЩЗ (як злоякісних, так і доброякісних) та зразків НТ. Статистично вірогідної різниці між групами не встановлено (ПК порівняно з ФА — $P = 0{,}1510$; ПК порівняно з НТ — P= 0,1986; ФА порівняно з НТ — $P = 0{,}9128$ за χ^2-критерієм). У групах пухлин без наявності онкогенів (як ПК, так і ФА) експресія гена *RET* також не відрізнялася статистично від такої в групі НТ (табл. 2). У той же час пухлини з наявністю онкогенів (знов-таки, як ПК, так і ФА) вірогідно відрізнялися за відповідними новоутвореннями без перебудов. Так, у групі ПК з наявністю онкогенів виявлено найбільшу кількість випадків з експресією гена *RET*. Для доброякісних пухлин з перебудовами *TRK* та *RET/PTC* мала місце протилежна ситуація — у групі ФА з наявністю реаранжованих онкогенів кількість *RET*-позитивних пухлин була найменшою. Вірогідною була і різниця в порівнянні зі зразками НТ (див. табл. 2).

Таким чином, отримані дані свідчать про те, що онкогени *TRK* та *RET/PTC* в ПК ЩЗ активують ген *RET*. У той же час у доброякісних ФА ЩЗ його експресія гальмується. Оскільки за молекулярно-біологічними методами неможливо остаточно встановити належність гена *RET* до пухлинних чи нейросекреторних С-клітин, пояснити наведені факти можна двома різними припущеннями. Відповідно до думки переважної більшості дослідників, експресія гена *RET* відбувається виключно в С-клітинах ЩЗ, а не в тироцитах [3]. Наявність *RET* в екстрактах нуклеїнових кислот, що отримані зі зразків тканини ЩЗ (як пухлинної, так і НТ), можливо, обумовлена присутністю С-клітин, які у невеликій кількості знаходяться в тканині і не можуть бути вибірково вилучені з досліджуваних зразків напередодні екстракції. Це підтверджують дані про експресію гена *RET* у НТ ЩЗ. Відносно пухлин ЩЗ можна припустити, що в процесі їх росту частка таких клітин зберігається, що й обумовлює експресію гена *RET* у пухлинних зразках. Цілком імовірно, що в ПК ЩЗ, які характеризуються наявністю онкогенів, С-клітини присутні вірогідно частіше порівняно з доброякісними новоутвореннями та ПК без онкогенів. У той же час у ФА ЩЗ спостерігається протилежна ситуація.

Таблиця 1. Наявність онкогенів у доброякісних та злоякісних пухлинах щитоподібної залози

Онкогени	ПК ($n = 35$)	ФА ($n = 24$)	НТ ($n = 59$)
TRK	2 (5,7%)	0	0
TRK + RET/PTC	0	1 (4,2%)	0
RET/PTC	18 (51,4%)*	6 (25,0%)	0

*Різниця є вірогідною порівняно з ФА, $P = 0{,}0423$ за χ^2-критерієм.

Таблиця 2. Експресія незміненого гена *RET* у доброякісних та злоякісних пухлинах щитоподібної залози

Тип пухлин	Пухлини з експресією онкогенів	Пухлини без експресії онкогенів	Усього
ПК ($n = 35$)	19/20 (95,0%)*/***	10/15 (66,6%)	29/35 (82,9%)
ФА ($n = 24$)	1/6 (16,7%)**/****	15/18 (83,3%)	16/24 (66,7%)
НТ ($n = 22$)	—	—	15/22 (68,2%)

*Різниця є вірогідною порівняно з ПК без експресії онкогенів, P= 0,0277 за χ^2-критерієм.
**Різниця є вірогідною порівняно з ФА без експресії онкогенів, $P = 0{,}0027$ за χ^2-критерієм.
***Різниця є вірогідною порівняно з НТ, $P = 0{,}0271$ за χ^2-критерієм.
****Різниця є вірогідною порівняно з НТ, $P = 0{,}0238$ за χ^2-критерієм.

Інше пояснення полягає в можливій здатності безпосередньо пухлинних клітин до експресії гена *RET*, про що свідчать дані окремих дослідників [4]. У зв'язку з цим можна припустити, що в клітинах ПК онкогени безпосередньо активують експресію гена *RET*. Тоді виникає питання: чому в ФА зазначені генетичні зміни не призводять до аналогічного ефекту? Можливо, це обумовлено різноманітністю онкогенів. Як вже згадувалось вище, існують 16 різних форм *RET/PTC*, які відрізняються за структурою і, можливо, як наслідок, спектром дії. Відомо, що в ПК найчастіше виявляються онкогени *RET/PTC1* та *RET/PTC3* [3, 5–7]. У той же час для ФА характерна експресія інших представників родини *RET/PTC* [5].

На наступному етапі ми досліджували експресію генів, що кодують інші РТК — *MET* та *EGFR*. Встановлено, що рівень експресії мРНК гена *MET* в ПК був вірогідно вищим, ніж у відповідній НТ ($P < 0{,}0001$ за парним t-критерієм). Для ФА мала місце протилежна тенденція — зниження рівня експресії мРНК гена порівняно з таким у НТ ($P = 0{,}0091$ за парним t-критерієм). Чи впливають онкогени на рівень експресії гена *MET* у доброякісних та злоякісних пухлинах ЩЗ? Оскільки ефект онкогенів на експресію РТК, за даними літератури, здійснюється через МАРК каскад, уявляється доцільним проаналізувати, поряд з онкогенами, вплив інших генетичних порушень, зокрема мутацій гена *BRAF*, які також призводять до активації МАРК [7].

Визначення точкових мутацій $BRAF^{V600E}$ здійснювали за допомогою методу секвенування продуктів ПЛР, яку проводили з відповідними праймерами. Умови виконання досліджень описані в попередніх публікаціях [12]. Наявність точкових мутацій $BRAF^{V600E}$ встановлено в шести ПК ЩЗ. Зауважимо, що одна ПК характеризувалася наявністю одночасно мутації $BRAF^{V600E}$ та онкогена *RET/PTC3*. У жодному випадку ФА та НТ зазначених генетичних змін не виявлено.

Для визначення впливу генетичних порушень на експресію гена *MET* усі ПК було поділено на три групи: пухлини з мутаціями $BRAF^{V600E}$, пухлини з онкогенами та пухлини без генетичних змін. Виявлено, що в ПК, які характеризувалися генетичними змінами (як мутаціями, так і перебудовами), рівень експресії мРНК гена *MET* був вірогідно вищим, ніж у відповідній НТ (рис. 1). У ПК без генетичних порушень вірогідної різниці між рівнем експресії мРНК гена *MET* у пухлинній та відносно незміненій тканині не відмічено. Отримані дані підтверджують думку дослідників про роль онкогенів та мутацій у процесах активації генів, що кодують РТК.

У доброякісних пухлинах ЩЗ, що характеризувалися відсутністю онкогенів, рівень експресії мРНК гена *MET* був вірогідно нижчим, ніж у відповідній НТ (рис. 2). У ФА без генетичних змін зазначена різниця нівелювалася.

Відносно *EGFR* встановлено, що в цілому по групі рівень експресії мРНК гена *EGFR* в ПК не відрізнявся вірогідно від показників у НТ ($P = 0{,}0644$ за парним t-критерієм). Аналогічна ситуація простежувалася і в групі ПК без генетичних порушень (див. рис. 1). Однак у пухлинах, що характеризувалися наявністю мутацій чи перебудов, рівень експресії мРНК гена *EGFR* був вірогідно вищим, ніж у відповідній НТ (див. рис. 1). У ФА результати досліджень виявилися аналогічними до тих, що отримані при вивченні експресії мРНК гена *MET* (див. рис. 2).

Виникає логічне питання, чи є взаємозв'язок між рівнем експресії мРНК генів *MET* та *EGFR* у пухлинах ЩЗ? Встановлено, що в усіх групах ПК (незалежно від наявності генетичних порушень) рівень експресії мРНК *MET* вірогідно перевищує рівень експресії мРНК гена *EGFR* (табл. 3). У доброякісних пухлинах ЩЗ вірогідної різниці між даними не виявлено.

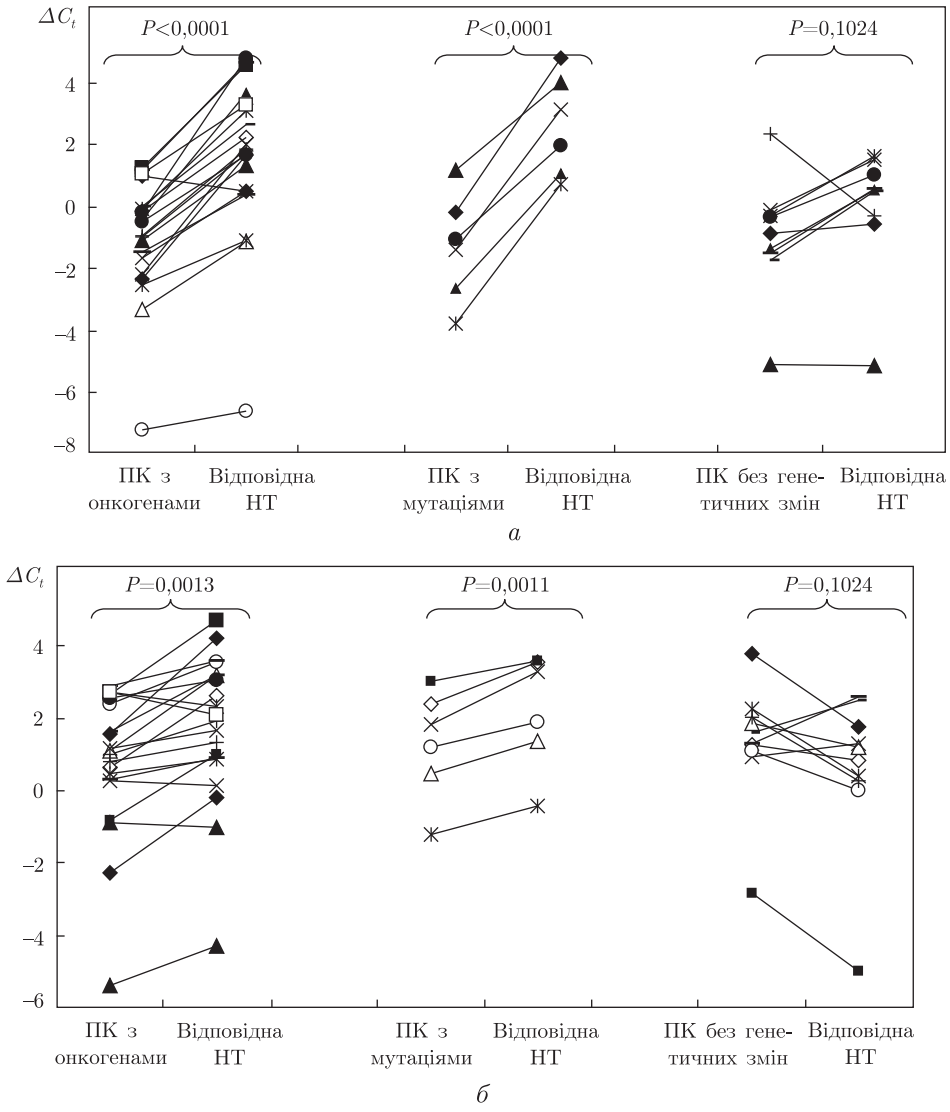

Рис. 1. Рівень експресії мРНК генів *MET* (*а*) та *EGFR* (*б*) у тканинах ПК відносно відповідної НТ залежно від генетичних змін. Рівень експресії мРНК генів *MET* і *EGFR* (нормалізація даних за геном *GAPDH*) визначали як ΔC_t ($\Delta C_t = C_{t\text{ДГ}} - C_{tGAPDH}$, ДГ — досліджуваний ген). Вірогідність визначена за парним t-критерієм

Таким чином, результати проведених досліджень свідчать про те, що ПК ЩЗ характеризуються онкогенною активацією РТК, яка відбувається як внаслідок формування онкогенів, так і шляхом посилення експресії нетрансформованих генів. Крім того, у злоякісних пухлинах ЩЗ генетичні порушення (онкогени та мутації), які сприяють активації МАРК каскаду, посилюють експресію генів, що кодують РТК. У доброякісних пухлинах ЩЗ також має місце експресія онкогенів, що, однак, не асоційовано з експресією інших РТК.

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

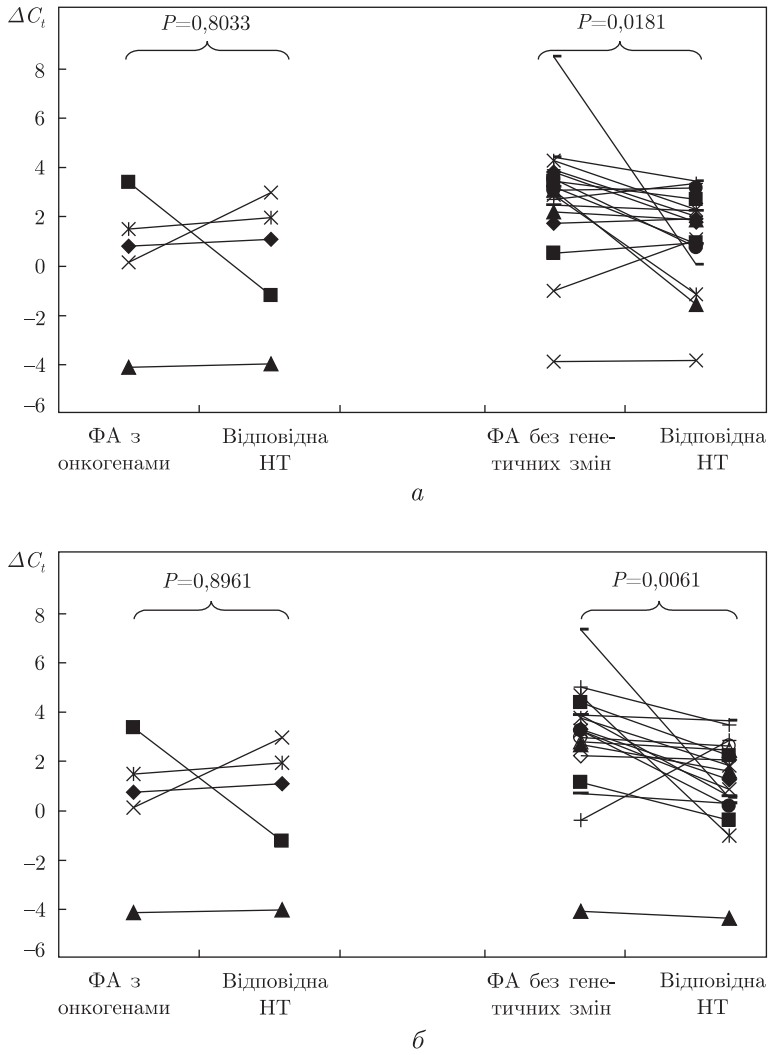

Рис. 2. Рівень експресії мРНК генів *MET* (*а*) та *EGFR* (*б*) у тканинах ФА відносно відповідної НТ залежно від генетичних змін. Рівень експресії мРНК генів *MET* і *EGFR* (нормалізація даних за геном *GAPDH*) визначали як ΔC_t ($\Delta C_t = C_{t\text{ДГ}} - C_{tGAPDH}$, ДГ — досліджуваний ген). Вірогідність визначена за парним t-критерієм

Таблиця 3. Експресія мРНК генів *MET* та *EGFR* у доброякісних та злоякісних пухлинах щитоподібної залози

Група пухлин	ПК		ФА	
	MET	*EGFR*	*MET*	*EGFR*
Пухлини з мутаціями $BRAF^{V600E}$	$17{,}90 \pm 3{,}70^{**}$	$1{,}95 \pm 0{,}18$	—	—
Пухлини з наявністю онкогенів	$8{,}59 \pm 1{,}70^{**}$	$2{,}3 \pm 0{,}35$	$1{,}89 \pm 1{,}10$	$2{,}21 \pm 1{,}29$
Пухлини без генетичних змін	$2{,}73 \pm 0{,}53^{*}$	$0{,}84 \pm 0{,}21$	$0{,}80 \pm 0{,}23$	$0{,}94 \pm 0{,}50$

Примітка. Показник експресії мРНК зазначених генів у зразках пухлини порівняно з таким у відповідній нормальній тканині підраховували як $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ($\Delta\Delta C_t = \Delta C_{t\text{П}} - \Delta C_{t\text{НТ}}$, П — в пухлинній тканині, НТ — в умовно нормальній тканині).

*Різниця є вірогідною порівняно з *EGFR*, $P < 0{,}01$ за критерієм Стьюдента.

**Різниця є вірогідною порівняно з *EGFR*, $P < 0{,}001$ за критерієм Стьюдента.

1. *Musholt T. J., Brehm C., Hanack J. et al.* Identification of differentially expressed genes in papillary thyroid carcinomas with and without rearrangements of tyrosine kinase receptor *RET* and/or *NTRK1* // J. Surg. Res. – 2006. – **131**. – P. 15–25.
2. *Pierotti M., Greco A.* Oncogenic rearrangements of the *NTRK1/NGF* receptor // Cancer Lancet. – 2006. – **232**. – P. 90–98.
3. *Arighi E., Borello M. G., Sariola H. RET* tyrosine kinase signaling in development and cancer // Cytokine and Growth Factor Rev. – 2005. – **16**. – P. 441–467.
4. *Rhoden K. J., Johnson G., Brandao G. et al.* Real-time quantitative RT-PCR identifies distinct c-*RET*, *RET/PTC1* and *RET/PTC3* expression pattern in papillary thyroid carcinoma // Lab. Invest. – 2004. – No 84. – P. 1557–1570.
5. *Воскобойник Л. Г.* Виявлення гена *RET* та онкогенів *RET/PTC* в пухлинах щитовидної залози за методом кількісної полімеразної ланцюгової реакції // Ендокринологія. – 2008. – **13**, № 1. – С. 45–57.
6. *Santoro M., Thomas G. A., Vecchio G. et al.* Gene rearrangement and Chernobyl related thyroid cancer // Brit. J. Cancer. – 2000. – **82**, No 2. – P. 315–322.
7. *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.
8. *Elisei R., Romei C., Vorontsova T. et al. RET/PTC* fearrangements in thyroid nodules: studies in irradiated and not irradiated, malignant and benign thyroid lesions in children and adults // Ibid. – 2001. – **86**, No 7. – P. 3211–3216.
9. *Mineo R., Costantino A., Frasca F. et al.* Activation of the hepatocyte growth factor (HGF) – Met system in papillary thyroid cancer: biological effects of HGF in thyroid cancer cells depend on Met expression levels // Endocrinologie. – 2004. – **145**, No 9. – P. 4355–4365.
10. *Wasenius V.-M., Hemmer S., Karjalainen-Lindsberg M. L. et al. MET* receptor tyrosine kinase sequence alterations in differentiated thyroid carcinoma // Amer. J. Surg. Pathol. – 2005. – **29**, No 4. – P. 544–549.
11. *Thomas G. A., Williams E. D., Becker D. V. et al.* Thyroid tumor banks // Science. – 2000. – **289**, No 29. – P. 2945–2948.
12. *Воскобойник Л. Г.* Онкогенна активація генів *RET*, *BRAF* та *NTRK1* в доброякісних та злоякісних пухлинах щитовидної залози // Ендокринологія. – 2007. – **12**, № 1. – С. 33–47.
13. *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 11.11.2008

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

Effects of oncogenes on the expression of receptor tyrosine kinase in thyroid tumors

The comparative analysis of benign and malignant thyroid tumors regarding the expression of receptor tyrosine kinases both transformed and intact (TRK, RET/PTC, RET, MET, EGFR) was carried out. 35 papillary carcinomas and 24 follicular adenomas of thyroid were studied. It was shown that the frequency of rearranged oncogenes was significantly higher in malignant thyroid tumors as compared to benign thyroid tumors. We note that the presence of genetic abnormalities in papillary thyroid carcinomas were associated with increasing the expression levels of genes which encode the receptor tyrosine kinases. In follicular thyroid adenomas, such features were absent.