

ПЕРЕСТРОЙКИ ПРОТООНКОГЕНА *C-RET* В КЛЕТКАХ ПАПИЛЛЯРНОГО РАКА ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

МАНЬКОВСКАЯ С.В.*, ДЕМИДЧИК Ю.Е.**

ГУ «Институт физиологии НАН Беларуси»*,
Республиканский центр опухолей щитовидной железы**

Резюме. В работе исследована частота перестроек *RET/PTC* в папиллярном раке щитовидной железы у взрослых. Проанализирована связь данного молекулярного события с клинико-морфологическими характеристиками опухоли.

Ключевые слова: папиллярный рак щитовидной железы, онкогены, перестройки *RET/PTC*.

Abstract. In work the frequency of *RET/PTC* rearrangements in papillary thyroid carcinoma at adults was investigated. The analysis of the given molecular event with the clinical and morphological characteristics of thyroid cancer was carried out.

Адрес для корреспонденции: 220013, г.Минск, пр-т Независимости, д. 64, к. 4, Республиканский центр опухолей щитовидной железы, тел. +375 017 2902971. – Демидчик Ю.Е.

Папиллярный рак щитовидной железы (ПРЩЖ) – самая распространенная злокачественная опухоль эндокринной системы [1]. Результаты молекулярно-генетических исследований показали, что в карциноме этого вида с высокой частотой встречаются хромосомные перестройки, затрагивающие протоонкоген *c-ret* [3, 5, 7]. В итоге таких рекомбинаций возникают онкогены *RET/PTC*, состоящие из тирозинкиназного домена гена *c-ret* и 5' – части другого гена, который активно экспрессируется в тиреоцитах. Во всех случаях химерные белки способны к спонтанной димеризации и обладают конститутивной активностью тирозинкиназы, и, таким образом, вызывают нерегулируемый поток внутриклеточных сигналов выживания и пролиферации клеток [2, 7].

По данным литературы структурные мутации гена *c-ret* встречаются только в ПРЩЖ и не найдены в других гистологических типах тиреоидного рака. Однако в нескольких исследованиях сообщалось о наличии онкогенов *RET/PTC* в фолликулярной аденоме щитовидной железы. Единого мнения о роли данного молекулярного события в доброкачественных образованиях пока нет [5, 7]. Однако практически всегда высказывается предположение о присутствии в этих случаях папиллярной микрокарциномы, как источника вышеуказанной перестройки.

Известно, что белковые комплексы *RET/PTC* часто обнаруживаются в ПРЩЖ, который связан с радиационным излучением. Это было показано на когортах больных с папиллярной карциномой, получивших ранее терапевтического облучения в области головы и шеи по медицинским показаниям, а также среди пациентов с аналогичным заболеванием, которые проживали на территориях, загрязненных радиоактивным йодом в результате аварии на Чернобыльской АЭС. При чем, по мнению ряда авторов, структурная мутация протоонкогена *c-ret* – основной молекулярный механизм развития данного вида тиреоидного рака [2, 7, 10].

К настоящему моменту выявлено более десятка перестроек *RET/PTC*, среди которых варианты *RET/PTC1* и *RET/PTC3* встречаются с наибольшей частотой [3, 5, 7].

Четкой взаимосвязи присутствия перестроек *RET/PTC* с клиническим поведением ПРЩЖ пока не установлено. Показано, что химерные онкогены чаще обнаруживаются в папиллярных раках у больных моложе 30 лет, чем в опухолях, развившихся у взрослых старшей возрастной группы [3, 7, 10]. При этом статистической достоверной разницы между частотой *RET/PTC1* и *RET/PTC3* и возрастом пациента не наблюдается. Однако установлено, что молекулярные изменения соответствуют определенным морфологическим фенотипам: перестройка *RET/PTC3* обнаруживаются значительно чаще в ПРЩЖ с солидно-фоликулярной архитектурой. *RET/PTC1*, напротив, связана с классическим сосочковым или диффузно-склеротическим вариантом. Фоликулярный вариант папиллярной карциномы характеризуется отсутствием данных хромосомных aberrаций протоонкогена *c-ret* [10].

Результаты несколько исследований продемонстрировали связь онкогенов *RET/PTC* с экстратиреоидным распространением опухоли [6], стадией заболевания [10], ранним метастазированием в регионарные лимфоузлы шеи [10, 11] и отдаленные органы [11]. Однако эти данные не были подтверждены другими научными группами [7, 9].

В данной работе мы проанализировали частоту перестроек *RET/PTC* в папиллярном раке щитовидной железы у взрослых и изучили взаимосвязь данного молекулярного события с клинико-морфологическими характеристиками заболевания.

Методы

В исследование включены пункты 49 пациентов (11 мужчин и 38 женщин, соотношение м:ж = 1:3,5) с ПРЩЖ. Возраст больных варьировал от 19,1 до 55,8 лет, составляя в среднем 37,2 года. Во всех случаях предоперационная аспирационная биопсия выполнялась под контролем УЗИ. Каждый образец подвергался цитологическому исследованию, а смывы из аспирационной иглы использовались для молекулярных тестов.

Всем пациентам проведено хирургическое лечение. При гистологическом исследовании удаленной опухоли ПРЩЖ был верифицирован во всех случаях. Оценка степени распространения рака щитовидной железы проводилась в соответствии с морфологической классификацией ВОЗ 2004 года [12]. На момент установления диагноза большинство больных не предъявляли жалоб и

имели солитарную опухоль до 2 см в наибольшем измерении, соответствующую категории pT1 (n=32; 65,3%). В значительном проценте наблюдений отмечалось метастатическое поражение регионарных лимфатических узлов шеи (таблица 1). Отдаленные метастазы диагностированы только в одном случае.

Таблица 1

Основные клинические данные пациентов

Признаки	Класс	Частоты и средние значения
1. Пол	мужской женский	11 (22,4%) 38 (77,6%)
2. Возраст (лет) к началу лечения	значение	19,1 – 55,8; средний – 37,2
3. Локализация узла в ЩЖ	левая доля правая доля перешеек	19 (38,8%) 26 (53,1%) 4 (8,1%)
4. Клинические проявления	отсутствуют симптомы (+)	43 (87,8%) 6 (12,2%)
5. Наибольший размер опухоли (мм)	значение	3 – 70; средний – 18,6
6. Инвазивный потенциал опухоли	интратиреоидный экстратиреоидный	44 (89,8%) 5 (10,2%)
7. Характер роста опухоли	солитарный мультифокальный	36 (73,5%) 13 (26,5%)
8. Категория T (TNM UICC)	T1 T2 T3 T4	32 (65,3%) 9 (18,4%) 6 (12,2%) 2 (4,1%)
9. Категория N (TNM UICC)	N0 N1	17 (34,7%) 32 (65,3%)

РНК выделена из пунктатов с помощью реагента TRIzol («Invitrogen», США) по методике производителя. Синтез кДНК проводили с использованием MuLV Reverse Transcriptase и рандомических гексамеров (все реагенты «Applied Biosystems», США) при следующих условиях: 41°C – 60 мин, 95°C – 5 мин.

Анализ онкогенов *RET/PTC* был произведен при помощи полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием в качестве матрицы 2 мкл кДНК и пары соответствующих праймеров. Структура праймеров и температура отжига представлены в таблице 2. При этом прямые праймеры имели последовательность специфичную либо для *H4* гена (в случае перестройки *RET/PTC1*), либо для *ELE1* гена (в случае *RET/PTC3*). Последовательность обратного праймера в обеих реакциях была специфична к участку гена *c-ret*. Условия амплификации: 95°C – 10 мин, затем 40 циклов: 94°C – 30 сек, 57°C – 30 сек (для *RET/PTC3*) или 56°C – 30 сек (для *RET/PTC1*), 72°C – 30 сек.

Характеристика праймеров, использованных в работе

Праймеры	Продукт ПЦР	Последовательность нуклеотидов в праймере	Температура отжига, °С
PTC3	210	F – ACCTGCCAGTGGTTATCAAGCT Rinter – CTCTGCCTTTCAGATGGAA	57
PTC1	255	Finter – GCCTGGAGGAGCTCACCAA Rinter – CTCTGCCTTTCAGATGGAA	56

Анализ продуктов реакции осуществляли методом горизонтального электрофореза в 1,5% агарозных блоках с последующим окрашиванием бромистым этидием. Наличие целевого продукта определяли по присутствию в геле фрагмента кДНК длиной 255 или 210 п.о., соответственно для перестройки *RET/PTC1* или *RET/PTC3*.

Статистическую обработку данных проводили с помощью двустороннего точного теста Фишера.

Результаты

В исследованной группе структурные мутации гена *c-ret* зарегистрированы в 9 (18,4%) из 49 случаев ПРЦЖ. На рисунке приведен пример электрофореграммы продуктов амплификации при скрининге хромосомных aberrаций *RET/PTC*.

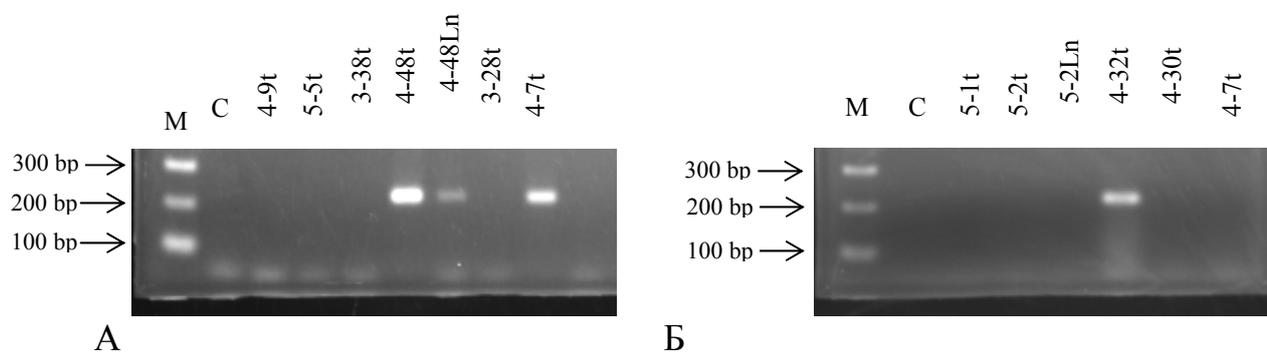


Рис. Результат поиска хромосомных aberrаций протоонкогена *c-ret*. А – перестройки *RET/PTC1*. Б – перестройки *RET/PTC3*.

Размеры маркера (М) указаны слева, С – отрицательный контроль, образец без кДНК. Амплифицированный фрагмент длиной в 255 п.о., свидетельствующий о наличии онкогенов *RET/PTC1*, обнаружен в образцах 4-48t, 4-48Ln и 4-7t; образец 4-32t содержал фрагмент длиной в 210 п.о. соответствующий *RET/PTC3*.

Анализ клинических данных показал отсутствие взаимосвязи перестроек *RET/PTC* с полом, возрастом, размером и характером роста опухоли (табл.3).

Частота распространения *RET/PTC* в ПРЦЖ у взрослых

Показатель		Наличие перестройки <i>RET</i>	Количество случаев
Возраст (лет)	< 30 / ≥ 30	6/3 p=0,06	18/31
Симптомы заболевания	есть/нет	2/7 p=0,30	6/43
Размер опухоли (мм)	< 10/≥ 10	1/8 p=0,14	17/32
Капсула узла	есть/нет	0/9 p=0,09	11/38
Мультифокальность	есть/нет	2/7 p=1,00	13/36
Экстратиреодное распространение	есть/нет	3/6 p=0,04	5/44
Стадия заболевания – III-IV	есть/нет	2/7 p=1,00	12/37
Регионарные метастазы	есть/нет	9/0 p=0,02	32/17
Отдаленные метастазы	есть/нет	1/8 p=0,18	1/48

Метастазы в регионарные лимфатические узлы шеи обнаружены во всех *RET/PTC*-положительных карциномах (p=0,02; табл.3). Более того, оказалось, что образцы этих лимфоузлов содержат хромосомную перестройку идентичную той, которая была найдена в опухолевом образовании.

Установлено также, что наличие в клетках папиллярного рака перестроек гена *c-ret* сопровождается более агрессивным клиническим поведением – склонностью к инвазии за пределы капсулы щитовидной железы (p=0,04).

Парацентрические инверсии *RET/PTC1* и *RET/PTC3* выявлены в 4 (8,2%) и 5 (10,2%) ПРЦЖ, соответственно. При этом амплификация онкогена *RET/PTC1* отмечена в карциномах с преобладанием папиллярных структур, в то время как *RET/PTC3* – в солидно-фолликулярных раках. Других отличий в клинико-морфологических характеристиках *RET/PTC1*- и *RET/PTC3*-положительных случаях не установлено (данные не показаны).

Обсуждение

Протоонкоген *c-ret* картирован в локусе 10q11.2 генома человека и кодирует мембранный рецептор тирозинкиназу. В ПРЦЖ выявляется активированная форма RET, образованная вследствие хромосомных перестроек – инверсий и транслокаций. В результате таких структурных мутаций

происходит замена трансмембранного и внеклеточного доменов гена *c-ret* на фрагменты посторонних генов и появление онкогенов, в общем случае называемых *RET/PTC* (*PTC*, от англ. Papillary Thyroid Carcinoma). При этом химерные белки, обладающие тирозинкиназной активностью, в большом количестве накапливаются в цитоплазме, что в конечном итоге приводит к постоянной стимуляции сигнального каскада *Ras/Raf/MEK/MAPK* [2, 7].

Среди известных в настоящее время различных вариантов перестроек вышеуказанного гена наиболее распространены *RET/PTC1* и *RET/PTC3*. Оба нарушения характеризуются разрывом двойной спирали ДНК с последующей репарацией путем внутрихромосомной сбалансированной парацентрической инверсией длинного плеча хромосомы 10 и ошибочной рекомбинацией ДНК. При *RET/PTC1* внутриклеточный домен гена *c-ret* сливается с геном *H4*, локализованным в локусе 10q21. Биологическая функция белка *H4* не установлена, но предполагается, что он является компонентом цитоскелета клетки. В онкогене *RET/PTC3* обнаружено слияние с геном *ELE1* (коактиватор транскрипции андрогенного рецептора), который располагается в районе 10q11.2 [3, 5, 7].

По данным литературы, частота перестроек *RET/PTC* в ПРЦЖ варьирует в пределах 0–60% в спорадических и от 29 до 86% – в индуцированных радиацией случаях [3, 5, 7, 10]. Подобный разброс может быть отчасти связан с неоднородностью исследованных групп по полу, месту проживания, гистологическому варианту опухолей, этническому составу, а также, с чувствительностью молекулярно-генетических методик, использованных в различных лабораториях. Вместе с тем, установлено, что ионизирующее излучение и ранний возраст пациентов считаются независимыми факторами риска, повышающими частоту образования активированной формы *RET* [7, 10].

Хотелось бы обратить внимание на тот факт, в спорадическом ПРЦЖ преобладают онкогены *RET/PTC1* [3, 5]. В радиогенных карциномах характер мутации зависит от типа радиационного воздействия. Так внутреннее облучение тиреоцитов за счет радиоизотопов йода (постчернобыльские опухоли) способствует образованию онкогенов *RET/PTC3*, в то время как прочие факторы – внешнее облучение и таковые, природа которых до сих пор не выяснена, приводят к преимущественному возникновению *RET/PTC1* [2, 7, 10]. Заметим также, что большинство редких структурных мутаций гена *RET* было выявлено именно в тиреоидном раке у детей из Беларуси и у больных, получивших ранее лучевую терапию по медицинским показаниям [7].

В нашей работе перестройки протоонкогена *c-ret* зарегистрированы в 9 (18,4%) из 49 случаев папиллярной тиреоидной карциномы у взрослых, при чем варианты *RET/PTC1* и *RET/PTC3* найдены в 4 (8,2%) и в 5 (10,2%) образцах, соответственно.

Из таблицы 3 видно, что частота мутации *RET/PTC* имела тенденцию к снижению с увеличением возраста пациентов, однако статистическая достоверность не была достигнута ($p=0,06$). Тем не менее, полученные результаты согласуются с ранее опубликованными данными, свидетельствующими о том, что химерные белки преимущественно

обнаруживаются в группе больных молодого возраста. В этой связи уместно упомянуть о значительной доле перестроек *RET/PTC* в ПРЦЖ у детей и подростков, подвергшихся облучению во время Чернобыльской аварии [7, 10]. Предполагается, что такая закономерность распространения данного генетического нарушения отражает различия в биологических особенностях развития опухолевого процесса в разных возрастных группах.

Заметим, что по некоторым сведениям онкогены *RET/PTC* в большом количестве случаев (42 – 77%) выявляются при папиллярной микрокарциноме щитовидной железы [4, 7]. По мнению авторов, такой вид структурных мутаций может быть ранним событием в молекулярном патогенезе ПРЦЖ. В нашем исследовании из 17 (34,7%) опухолей с размером меньше 10 мм только в 1 (2,0%) образце найдена хромосомная абберрация протоонкогена *c-ret*, что не позволяет нам сделать аналогичное заключение.

По данным литературы метастазы в регионарные лимфатические узлы шеи были частой находкой в папиллярных раках, имеющих перестройки *RET/PTC*. В изученной группе установлена связь между вышеуказанным молекулярным событием и метастатическим поражением лимфоузлов. Отдельно отметим, что у пациента с метастазами в легкие была зарегистрирована мутация *RET/PTC3*.

Существуют наблюдения относительно различий гистологических характеристик ПРЦЖ в зависимости от присутствия конкретного типа активированной формы белка RET [7, 8, 10]. Действительно, выявленные нами онкогены *RET/PTC1* обнаружены в одном случае диффузно-склерозирующего варианта папиллярного рака и в трех опухолях преимущественно папиллярного строения, а перестройки *RET/PTC3* – в одном образце высококлеточного варианта и в четырех карциномах с преобладанием солидно-фолликулярных компонентов. Полагают, что такие морфологические особенности опухолевой ткани связаны со структурой партнерского полипептида, входящего в состав химерного комплекса *RET/PTC*. В модельных экспериментах на культуре клеток было показано, что мутация *RET/PTC3* имеет более сильный митогенный потенциал, чем *RET/PTC1* [8]. В ряде публикаций продемонстрировано, что *RET/PTC3*-положительные новообразования характеризуются более агрессивным течением, например, экстратиреоидным распространением, быстрым ростом и частым метастазированием [6, 7, 10]. За исключением гистологических особенностей ПРЦЖ, сравнительный анализ, проведенный в данной работе, не выявил других клинико-морфологических различий между опухолями, несущими перестройки *RET/PTC1* и *RET/PTC3*. Более того, во всех трех *RET/PTC*-положительных случаях с инвазией капсулы щитовидной железы выявлен онкопротеин RET/PTC1. На наш взгляд, для более определенного заключения о роли этих молекулярных нарушений в течение ПРЦЖ требуется обобщение результатов исследований большого количества однородных по гистологическому строению карцином данной локализации. При этом анализ полученного экспериментального материала не только позволит расширить существующее представление о механизмах трансформации тиреоцитов в злокачественные клетки, но и сможет найти

адекватное применение в практической медицине – в разработке новых дополнительных критериев диагностики папиллярного рака и индивидуализации лечения.

Заключение

1. В исследованной серии ПРЦЖ у взрослых частота перестроек протоонкогена *c-ret* не превышала 20% с одинаковой распространенностью вариантов *RET/PTC1* и *RET/PTC3*.

2. *RET/PTC*-положительные новообразования характеризуются экстратиреоидным распространением и повышенной частотой метастатического поражения регионарных лимфатических узлов шеи. Такая особенность данного вида карциномы требует проведения тотальной тиреоидэктомии с обязательной шейной лимфодиссекцией, даже в случаях с непальпируемыми или плохо визуализированными лимфоузлами.

3. Установлено отсутствие взаимосвязи структурных мутаций *RET/PTC* с полом, возрастом, размером, стадией заболевания и характером роста опухоли.

Литература

1. Валдина, Е. А. Заболевания щитовидной железы / Е. А. Валдина. – СПб.: Питер, 2006. – 368 с.

2. High prevalence of activating ret proto-oncogene rearrangements in thyroid tumors from patients who had received external radiation / A. Bounacer [et al.] // *Oncogene*. – 1997. – Vol. 15. – P. 1263-1273.

3. Prevalence and distribution of *ret/ptc* 1, 2 and 3 in papillary thyroid carcinoma in New Caledonia and Australia / E. L. Chua [et al.] // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 2000. – Vol. 85. – P. 2733-2739.

4. Frequent *RET* rearrangements in thyroid papillary microcarcinoma detected by interphase fluorescence in situ hybridization / R. Corvi [et al.] // *Lab. Invest.* – 2001. – Vol. 81. – P. 1639-1645.

5. Lam, K. Y. High prevalence of *RET* proto-oncogene activation (*RET/PTC*) in papillary thyroid carcinomas / K. Y. Lam, C. Y. Lo, P. S. Leung // *Eur. J. Endocrinol.* – 2002. – Vol. 147. – P. 741-745.

6. *RET/PTC* may be associated with local invasion of thyroid papillary carcinoma / H Miki [et al.] // *J. Surg. Oncol.* – 1999. – Vol. 71. – P.76-82.

7. Nikiforov, Y. E. The molecular pathways induced by radiation and leading to thyroid carcinogenesis / Y. E. Nikiforov // *Cancer Treat. Res.* – 2004. – Vol. 122. – P. 191-206.

8. The *RET/PTC3* oncogene: metastatic solid-type papillary carcinomas in murine thyroids / D. J. Powell [et al.] // *Cancer Res.* – 1998. – Vol. 58. – P. 5523–5528.

9. *RET/PTC* activation does not influence clinical and pathological features of adult papillary thyroid carcinomas / E. Puxeddu [et al.] // *Eur. J. Endocrin.* – 2003. – Vol. – 148. – P. 505-513.

10. Pattern of radiation-induced RET and NTRK1 rearrangements in 191 post-Chernobyl papillary thyroid carcinomas: biological, phenotypic and clinical implication / H. M Rabes [et al.] // Clin. Cancer Res. – 2000. – Vol. 6. – P.1093-1103.
11. Distinct multiple RET/PTC gene rearrangements in multifocal papillary thyroid neoplasia / S. L. Sugg [et al.] // J. Clin. Endocrinol. Metab. – 1998. – Vol. 83. – P. 4116-4122.
12. WHO Classification of Tumors. Pathology and Genetics of Tumors of Endocrine Organs / eds. R. A. DeLellis, P. U. Hetz, C. Eng. – Lyon: IARC Press. – 2004.