

Л. Г. Воскобойник, Н. М. Костюченко, В. М. Пушкарьов,
О. І. Ковзун, Л. Ю. Зурнаджи, Т. І. Богданова,
член-кореспондент НАН України М. Д. Тронько

Порівняльний аналіз експресії онкогенів *RET/PTC1* та *RET/PTC3* у папілярних карциномах щитоподібної залози дітей з найменш та найбільш постраждалих регіонів, що народилися до і після Чорнобильської катастрофи

*Проведено порівняльний аналіз експресії онкогенів *RET/PTC1* та *RET/PTC3* у папілярних карциномах дітей з різних регіонів України, що народилися до та після аварії на Чорнобильській АЕС. Встановлено, що у дітей з найбільш забруднених внаслідок Чорнобильської катастрофи регіонів України, що народилися до аварії, переважали карциноми з наявністю онкогенів *RET/PTC* з переважанням *RET/PTC3* форми. У дітей, народжених після аварії, та дітей з найменш забруднених територій більшість пухлин характеризувалася відсутністю генетичних змін. Відсоток перебудов *RET/PTC1* був майже однаковим в усіх досліджених групах. Отримані дані свідчать про можливий вплив радіаційного опромінення на індукцію *RET/PTC3* онкогенів, однак відсутність вірогідної різниці внаслідок невеликої кількості спостережень не дозволяє поки що зробити об'єктивних та переконливих висновків.*

Папілярні карциноми (ПК) щитоподібної залози (ЩЗ) є найпоширенішою формою тироїдної онкопатології і досить часто асоційовані з експресією онкогенів *RET/PTC*. Ідентифіковано 16 різних типів зазначених онкогенів, з яких найчастіше фіксуються *RET/PTC1* та *RET/PTC3* форми [1]. Було показано [2], що післячорнобильські ПК ЩЗ дітей з коротким латентним періодом розвитку характеризуються високим відсотком перебудов *RET/PTC* (87% випадків) з переважанням (58%) *RET/PTC3* типу. За даними пізніших публікацій, відсоток *RET/PTC* транслокацій є нижчим, що можна пояснити подовженням латентного періоду розвитку пухлин і, як наслідок, збільшенням віку пацієнтів [3]. У той же час у спонтанних ПК ЩЗ дорослих відсоток пухлин з перебудовами *RET/PTC* є значно нижчим (11–20%), серед них переважають *RET/PTC1* форми [4]. На підставі цих даних логічно вважати, що існує певний взаємозв'язок між індукцією онкогенів *RET/PTC*, зокрема *RET/PTC3*, та радіаційним опроміненням. Проте необхідно відзначити, що у розглянутих випадках порівнювалися різновікові групи, тому деякі питання залишаються відкритими. Нез'ясовано, чи є така асоціація, чи експресія онкогена *RET/PTC3* властива дитячим ракам взагалі?

У зв'язку із зазначеним вище науковий інтерес викликають дослідження щодо порівняльного аналізу експресії онкогенів *RET/PTC1* та *RET/PTC3* в ПК адекватних за віком групах, тобто у дітей з різних регіонів України, що народилися до та після аварії на Чорнобильській АЕС.

Досліджено 46 ПК ЩЗ дітей віком 8–14 років (середній вік $12,5 \pm 0,3$), яких було прооперовано в хірургічному відділі ДУ "Інститут ендокринології та обміну речовин ім. В. П. Ко-

місаренка АМН України”. Патогістологічний діагноз встановлений у лабораторії морфології ендокринної системи і додатково верифікований міжнародною групою експертів-патологів [5]. В усіх випадках досліджено також відносно незмінену тканину (НТ) ЩЗ (46 випадків). Усі пацієнти залежно від дати народження та місця проживання (найменш та найбільш постраждалих внаслідок Чорнобильської катастрофи регіони України) були поділені на чотири групи:

I — діти з найбільш постраждалих регіонів, що народилися до аварії (10 випадків; середній вік $(12,8 \pm 0,4)$ років);

II — діти з найбільш постраждалих регіонів, що народилися після аварії (13 випадків; середній вік $(12,1 \pm 0,5)$ років).

III — діти з найменш постраждалих регіонів, що народилися до аварії (8 випадків; середній вік $(12,8 \pm 0,4)$ років);

IV — діти з найменш постраждалих регіонів, що народилися після аварії (15 випадків; середній вік $(12,4 \pm 0,5)$ років).

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. Реакцію зворотної транскрипції для отримання кДНК та оцінку її якості проведено за методами, що описані раніше [6]. Наявність онкогенів *RET/PTC1* та *RET/PTC3* визначали за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) з відповідними праймерами. Послідовність праймерів, умови проведення ПЛР описані в попередній публікації [6].

Статистичний аналіз отриманих даних проведений за χ^2 -критерієм та *t*-критерієм Стьюдента.

Встановлено, що в усіх зразках НТ експресія онкогенів *RET/PTC1* та *RET/PTC3* була відсутня. Отримані дані повністю узгоджуються з даними літератури про відсутність зазначених перебудов у НТ ЩЗ та в доброякісних новоутвореннях [7].

За результатами порівняльного аналізу щодо наявності онкогенів *RET/PTC* у ПК встановлено, що експресія *RET/PTC1* має місце в усіх досліджених групах (табл. 1) майже в однакових відсотках випадків без вірогідної різниці даних (у середньому в 15% пухлин). Таким чином, частота виникнення онкогенів *RET/PTC1* в ПК дітей та дорослих майже однакова і, скоріше за все, не пов’язана з радіаційним опроміненням [4].

Експресію онкогена *RET/PTC3* виявлено в середньому в 26,1% пухлин (див. табл. 1). Проте максимальний відсоток *RET/PTC3*-позитивних пухлин спостерігався в групі дітей з найбільш забруднених регіонів України, що народилися до аварії на ЧАЕС. В усіх інших

Таблиця 1. Експресія онкогенів *RET/PTC1* та *RET/PTC3* у папілярних карциномах щитоподібної залози дітей з найменш та найбільш постраждалих регіонів України, що народилися до і після Чорнобильської катастрофи

Група	<i>RET/PTC1</i>		<i>RET/PTC3</i>		Усі <i>RET/PTC</i>	
	Кількість випадків	%	Кількість випадків	%	Кількість випадків	%
I, <i>n</i> = 10	1	10,0	5	50,0	6	60,0
II, <i>n</i> = 13	2	15,4	2	15,4	4	30,8
III, <i>n</i> = 8	1	12,5	2	25,0	3	37,5
IV, <i>n</i> = 15	3	20,0	3	20,0	6	40,0
Всього	7	15,2	12	26,1	19	41,3

Примітка. Дані вірогідно не відрізняються за критерієм χ^2 .

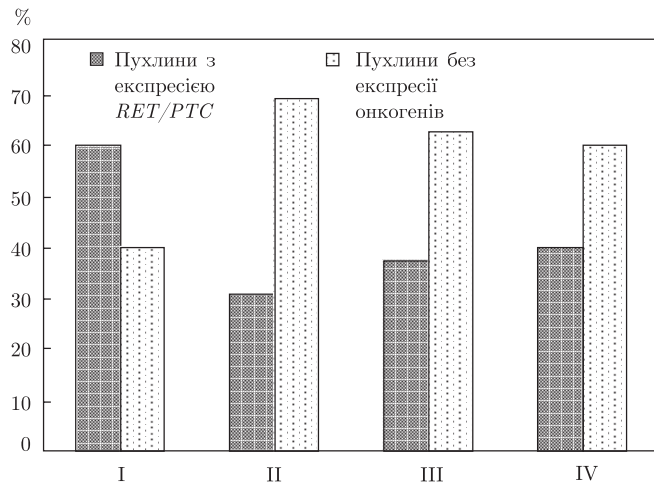


Рис. 1. Експресія онкогенів *RET/PTC1* та *RET/PTC3* у папілярних карциномах щитоподібної залози дітей, які були народжені до та після Чорнобильської катастрофи, з найбільш та найменш забруднених територій України. I-IV — номери груп

групах зазначений показник був більш ніж удвічі нижчим. Дані, однак, не є статистично вірогідними, але тенденція простежується достатньо чітко і показово. Скоріше за все, відсутність статистичної різниці обумовлена недостатньою кількістю спостережень по групах. Високий відсоток *RET/PTC3*-позитивних пухлин у післячорнобильських ПК дітей з коротким латентним періодом виявляли й інші дослідники [2, 3]. Про існування взаємозв'язку між радіаційним впливом та індукцією онкогенів *RET/PTC3* свідчать й експерименти. Показано, що X-опромінення тироцитів у культурі викликало формування онкогенів *RET/PTC* [8].

У середньому наявність онкогенів *RET/PTC* зафіксовано в 41,3% пухлин. Необхідно зазначити, що в групі дітей з найбільш забруднених регіонів України, що народилися до аварії на ЧАЕС, переважали (60% випадків) саме карциноми з перебудовами *RET/PTC*. В усіх інших групах спостерігалася протилежна ситуація — переважали (60–70% випадків) карциноми без генетичних змін (рис. 1). Зауважимо, що у цілому відсоток *RET/PTC*-позитивних ПК у дітей був вищим порівняно зі спонтанними карциномами дорослих [4]. Вважають, що активні проліферативні процеси у ЩЗ дітей обумовлюють її більшу чутливість до ушкодження ДНК та індукції онкогенів *RET/PTC* [9, 10]. Тому навіть у неопроміненого населення частота перебудов *RET/PTC* у дітей вища, ніж у дорослих, що підтверджує гіпотезу про те, що реаранжування генів відбувається частіше в ЩЗ дітей [11]. Існує думка, що це пов'язано з меншою стабільністю генома дітей внаслідок активних проліферативних та транскрипційних процесів у клітинах ЩЗ [9].

Інший момент, що заслуговує на увагу. Серед усіх досліджених карцином не було жодного випадку з одночасною експресією онкогенів *RET/PTC1* та *RET/PTC3*. За даними літератури наявність двох різних генетичних змін (транслокацій чи мутацій) в одній пухлині є надзвичайно рідкою подією, оскільки, як вважають дослідники, навіть однієї перебудови достатньо для ініціації злоякісної трансформації тироїдних клітин та розвитку ПК [12]. Проте такі випадки описані, але в ПК з подовженим латентним періодом розвитку [6].

Спільною ознакою онкогенів *RET/PTC1* та *RET/PTC3* є наявність нуклеотидної послідовності, що кодує тирозинкіназу *RET* (ТК *RET*). Вважають, що мітогенний ефект химерних білків *RET/PTC* обумовлений онкогенною активацією саме ТК *RET* [12]. Відомо,

Таблиця 2. Експресія ТК *RET* залежно від наявності онкогенів *RET/PTC1* та *RET/PTC3* у папілярних карциномах щитоподібної залози дітей з найменш та найбільш постраждалих регіонів України, що народилися до і після Чорнобильської катастрофи

Онкоген	Відносно незмінена тканина ЩЗ	Папілярна карцинома ЩЗ
<i>RET/PTC1</i> , $n = 7$	$2,12 \pm 0,47$	$5,93 \pm 1,47^{*,\phi}$
<i>RET/PTC3</i> , $n = 12$	$1,87 \pm 0,64$	$16,11 \pm 3,12^{**,\Delta,\phi\phi}$
Онкогени відсутні, $n = 27$	$3,55 \pm 0,85$	$3,29 \pm 1,12$

Примітка. Різниця вірогідна за *t*-критерієм Стьюдента: * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ порівняно з відносно незміненою тканиною ЩЗ; $\Delta P < 0,05$ порівняно з папілярними карциномами з наявністю онкогена *RET/PTC1*; $\phi P < 0,05$, $\phi\phi P < 0,01$ порівняно з папілярними карциномами без онкогенів *RET/PTC*.

що фолікулярні тироцити в звичайних умовах не здатні до експресії гена *RET*, однак його присутність відмічено в злоякісних пухлинах ЩЗ [13]. Крім того, експресія ТК *RET* може спостерігатися в ПК та НТ внаслідок присутності нейросекреторних С-клітин у зразках. У зв'язку із зазначеним проаналізовано кількісний рівень експресії ТК *RET* в ПК та НТ за допомогою визначення оптичної густини (о.г.) смуг. Умови проведення ПЛР, послідовність праймерів описані раніше [14].

Встановлено, що майже в усіх досліджених групах рівень експресії ТК *RET* у пухлинній тканині був вірогідно вищим, ніж у НТ — у середньому $8,32 \pm 1,31$ та $2,71 \pm 0,55$ відповідно ($P < 0,001$). Крім того, проаналізовано, чи є взаємозв'язок між індукцією онкогенів *RET/PTC1* та *RET/PTC3* і рівнем експресії ТК *RET*. Доведено, що рівень експресії ТК *RET* у *RET/PTC3*-позитивних ПК (табл. 2) був вірогідно вищим за такий у *RET/PTC1*-позитивних пухлинах та ПК без генетичних змін. Рівень експресії в ПК з індукцією онкогена *RET/PTC1* також був вищим, ніж у ПК без онкогенів. Зауважимо, що в ПК з наявністю онкогенів *RET/PTC1* чи *RET/PTC3*, на відміну від ПК без генетичних змін, рівень експресії ТК *RET* у пухлинній тканині вірогідно відрізнявся від відповідних показників у НТ.

Таким чином, експресія онкогенів *RET/PTC1* та *RET/PTC3* властива лише ПК. У позапухлинній відносно незміненій тканині ЩЗ зазначені перебудови відсутні. У дітей з найбільш забруднених регіонів України, що народилися до аварії на ЧАЕС (класичні післячорнобильські раки), переважали карциноми з наявністю онкогенів *RET/PTC3* з переважанням *RET/PTC3* форми. У дітей, народжених після Чорнобильської катастрофи, та дітей з найменш забруднених територій більшість пухлин характеризувалася відсутністю генетичних змін. Відсоток перебудов *RET/PTC1* був майже однаковим в усіх досліджених групах. Отримані дані свідчать про можливий вплив радіаційного опромінення на індукцію *RET/PTC3* онкогенів, однак відсутність вірогідної різниці внаслідок невеликої кількості спостережень не дозволяє поки що зробити об'єктивних та переконливих висновків. Звертає на себе увагу той факт, що кількісний рівень експресії ТК *RET* був найвищим у *RET/PTC3*-позитивних ПК порівняно з іншими пухлинами, що може свідчити про найбільший ступінь активації ТК *RET* у ПК з перебудовами *RET/PTC3*.

1. 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.
2. Nikiforov Y. E., Rowland J. M., Bove K. E. et al. Distinct pattern of *ret* oncogene rearrangements in morphological variants of radiation-induced and sporadic thyroid papillary carcinomas in children // Cancer Res. – 1997. – 57. – P. 1680–1684.
3. 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.

4. Carta C., Moretti S., Passeri L. et al. Genotyping of an Italian papillary thyroid carcinoma cohort revealed high prevalence of BRAF mutations, absence of RAS mutations and allowed the detection of a new mutation of BRAF oncoprotein (BRAF V599Ins) // Clin. Endocrinol. – 2006. – **64**. – P. 105–109.
5. Thomas G. A., Williams E. D., Becker D. V. et al. Thyroid tumor banks // Science. – 2000. – **289**, No 9. – P. 2945–2948.
6. Воскобойник Л. Г. Онкогенна активація генів *RET*, *BRAF* та *NTRK1* в доброякісних та злоякісних пухлинах щитовидної залози // Ендокринологія. – 2007. – **12**, № 1. – С. 33–47.
7. Adeniran A. J., Zhu Z., Gandhi M. et al. Correlation between genetic alterations and microscopic features, clinical manifestations, and prognostic characteristics of thyroid papillary carcinomas // Amer. J. Sur. Pathol. – 2006. – **30**. – P. 216–222.
8. Nakashima M., Takamura N., Namba H. et al. RET oncogene amplification in thyroid cancer: correlations with radiation-associated and high-grade malignancy // Hum. Pathol. – 2007. – **38**. – P. 621–628.
9. Saad A. G., Kumar S., Ron E. et al. Proliferative activity of human thyroid cells in various age groups and its correlation with the risk of thyroid cancer after radiation exposure // J. Clin. Endocrinol. and Metabol. – 2006. – **91**. – P. 2672–2677.
10. Yamashita S., Saenko V. Mechanisms of Disease: molecular genetics of childhood thyroid cancers // Nat. Clin. Pract. Endocrinol. Metab. – 2007. – **3**. – P. 422–442.
11. Powell N., Jeremiah S., Morishita M. et al. Frequency of *BRAF* T1796A mutation in papillary thyroid carcinoma relates to age of patient at diagnosis and not to radiation exposure // J. Pathology. – 2005. – **205**. – P. 558–564.
12. Cassinelli G., Favini E., Degl'Innocenti D. et al. *RET/PTC1*-driven neoplastic transformation and proinvasive phenotype of human thyrocytes involve Met induction and beta-catenine nuclear translocation // Neoplasia. – 2009. – **11**, No 1. – P. 10–21.
13. 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. Surgery. – 2001. – No 88. – P. 557–563.
14. Santoro M., Thomas G. A., Vecchio G. et al. Gene rearrangement and Chernobyl related thyroid cancers // Brit. J. Cancer. – 2000. – **82**, No 2. – P. 315–322.

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

Надійшло до редакції 28.12.2009

**L. G. Voskoboynyk, N. M. Kostuchenko, V. M. Pushkarev, O. I. Kovzun,
L. Yu. Zurnadzhy, T. I. Bogdanova,
Corresponding Member of the NAS of Ukraine M. D. Tronko**

**Comparative analysis of the expression of both *RET/PTC1* and
RET/PTC3 oncogenes in papillary thyroid carcinomas of children from
different regions of Ukraine who were born before and after the
Chernobyl accident**

*The comparative analysis of the expression of both *RET/PTC1* and *RET/PTC3* oncogenes in papillary thyroid carcinomas of children who were living in more and less radiation-contaminated regions of Ukraine and were born before and after the Chornobyl accident, is carried out. It is shown that, in children from more radiation-contaminated regions of Ukraine who were born before the Chornobyl accident, the presence of *RET/PTC* oncogenes with the prevalence of *RET/PTC3* form is detected in the majority of carcinomas. In children who was born after the Chornobyl accident and lived from less radiation-contaminated regions of Ukraine, the majority of carcinomas are characterized by the absence of any gene alterations. The percentages of *RET/PTC1* rearrangements were equal in all studied groups. The presented data probably point to the effect of radiation on the induction of *RET/PTC3* oncogenes, but the absence of a statistical difference and a small number of studied cases do not allow us to make objective conclusions.*