

КОРОТКІ ПОВІДОМЛЕННЯ

"Журнал НАМН України", 2016, т. 22, № 3-4. – С. 435-439

УДК 616.441.-006.6-092.9:615.252

ТЕОРЕТИЧНА МЕДИЦИНА

**Б. Б. Гуда, В. М. Пушкарьов, О. В. Журавель, В. В. Пушкарьов, А. Є. Коваленко,
Ю. М. Таращенко, М. Д. Тронько**

Державна установа «Інститут ендокринології та обміну речовин ім. В. П. Комісаренка НАМН України»,
04114 Київ

RET/PTC ПЕРЕБУДОВИ ТА BRAF МУТАЦІЇ У ВИСОКОДИФЕРЕНЦІЙОВАНИХ ЗЛОЯКІСНИХ ТА ДОБРОЯКІСНИХ ПУХЛИНАХ ЩИТОПОДІБНОЇ ЗАЛОЗИ ЛЮДИНИ

Вивчали хромосомні транслокації гена рецепторної тирозинкінази *RET/PTC1*, *RET/PTC3*, мутації гена протеїнкінази *BRAF (BRAV600E)* та експресію *BRAFwt* в тканині багатовузлового зобу, фолікулярних та папілярних карцином щитоподібної залози людини. З 21 зразка тканин, що вивчались, зміни експресії, мутації та перебудови генів виявлені у 8 випадках (38 %). В одному зразку пухлини папілярної карциноми знайдена подвійна перебудова гена *RET* — *RET/PTC1* та *RET/PTC3*. У більш агресивних, інвазивних пухлинах рівень експресії *RET/PTC* був вищим ніж у інкапсульованих пухлинах. Підвищена експресія протеїнкінази *BRAF (BRAVwt)* спостерігалася при багатовузловому зобі, як в умовно нормальній так і у трансформованій тканині. У пухлинній тканині фолікулярної карциноми експресія *BRAFwt* перевищувала її показники у нормі в 16 разів. Обговорюється значення сигнального каскаду MAPK в пухлинах щитоподібної залози.

Ключові слова: щитоподібна залоза людини, високодиференційовані злоякісні пухлини, перебудови *RET/PTC*, мутації та експресія *BRAF*.

Проліферативний потенціал ракових клітин є одним із найважливіших факторів розвитку пухлини. Проліферативні процеси у клітинах контролюються двома основними каскадами РІЗК/Акт та кіназами, що активуються мітогенами (MAPK — Mitogen-Activated Protein Kinase). Останній каскад контролює власне поділ клітини. Раніше нами було продемонстровано значне збільшення рівня

ядерного антигену проліферуючих клітин (PCNA) у пухлинах щитоподібної залози (ЩЗ), особливо в агресивних пухлинах з метастазами, що свідчить про істотне посилення проліферативних процесів [1]. Мітогенний сигнальний шлях *RET/RAS/RAF/MEK/ERK* (MAPK-каскад), який пов'язує сигнали факторів росту на рецепторах клітинної поверхні з транскрипційними факторами, які регулюють

М. Д. Тронько - директор Інституту, акад. НАМН України

Відділ хірургії ендокринних залоз

А. Є. Коваленко – керівник відділу, д.м.н., професор

Б. Б. Гуда – с.н.с., к.м.н.

Ю. М. Таращенко – н.с.

Лабораторія патофізіології радіаційних уражень ендокринної системи

В. М. Пушкарьов - зав. лабораторії, д.б.н. (pushkarev.vm@gmail.com)

О. В. Журавель — с.н.с., к.б.н.

В. В. Пушкарьов – н.с. лаб. гормональної регуляції обміну речовин, к.б.н.

© Б. Б. Гуда, О. В. Журавель, В. М. Пушкарьов, В. В. Пушкарьов, А. Є. Коваленко, Ю. М. Таращенко, М. Д. Тронько, 2016.

експресію генів, що контролюють такі важливі клітинні процеси, як ангиогенез, ріст і проліферацію клітин [2]. Цей сигнальний шлях часто є конститутивно активованим в деяких пухлинах у результаті хромосомних транслокацій *RET/PTC*, мутацій в генах *BRAF* (*BRAFV600E*), *RAS*, деяких рецепторів цитокінів або надмірної експресії нормальних і мutowаних рецепторів, таких, як рецептор епідермального фактору росту (*EGFR* — Epidermal Growth Factor Receptor) [3, 6]. В основі патогенезу раку ЩЗ також лежить неконтрольована активність різних сигнальних шляхів і, у першу чергу — *MAPK*-каскаду [13]. Пригнічення цього каскаду специфічними інгібіторами посилює чутливість ракових клітин (в тому числі і карцином ЩЗ) до хіміотерапії [7, 8].

Мета роботи — визначити хромосомні транслокації *RET/PTC1*, *RET/PTC3* та мутації *BRAF* (*BRAFV600E*) у тканині багатовузлового зобу, фолікулярних та папілярних карцином ЩЗ людини.

Матеріал і методи. Дослідження проводили на післяопераційному матеріалі 21 хворого, одержаному у хірургічному відділенні Інституту. Всі пацієнти перед оперативним втручанням підписували інформовану згоду на участь у дослідженні. Одразу після видалення тканину ЩЗ поміщали на лід і швидко заморожували при -80°C . Гістологічне заключення та його номер — з клінічної бази тканин ЩЗ ІЕОР-TerDep.

Виділення РНК

РНК виділяли за допомогою наборів RNease (фірми Qiagen, США) згідно з протоколом виробника. Тканину масою біля 25 мг гомогенізували у 500 мкл лізис-буфера RLT, що містить гуанідин ізоціанат, у гомогенізаторі TissueLyser II (фірми Retsch, Німеччина) протягом 2 хв. Пробірки центрифугували 15 с при 3000 об./хв в настільній центрифугі фірми «Eppendorf» (США) і відбирали 320 мкл супернатанта для виділення РНК. До відібраних 320 мкл додавали 150 мкл буфера RLT, 590 мкл води без РНКаз та 10 мкл розчину протеїнази К з набору. Суміш перемішували, інкубували при 55°C 10 хв і центрифугували у стандартному кутовому роторі при 13000 об./хв протягом 3 хв. Супернатант (прибл. 1 мл) відбирали і додавали половину об'єму (до 0,5 мл) 96-100 % етанолу. Суміш перемішували і вміст пробірок переносили на мікроколонуку з фільтром. Після центрифугування колонки у спеціальній пробірці РНК залишається на фільтрі колонки. Фільтр промивали 350 мкл буфера RW1 (містить солі гуанідину, етанол, і використовується для ефективного видалення вуглеводів, білків, жирних кислот та ін., які неспеци-

фічно зв'язуються з фільтром), наносили ДНКазу в буфері RDD (склад і концентрації солей буферу забезпечують ефективне розщеплення ДНК, а також створюють умови для затримки РНК на колонці), інкубували при кімнатній температурі 15 хв і знов промивали буфером RW1. Після центрифугування протягом 15 с при максимальній швидкості ротора і заміни пробірок для збирання центрифугату, фільтр двічі промивали буфером RPE (буфер для м'якої промивки, що містить етанол, для видалення слідів солей, що знаходяться на колонці), просушували центрифугуванням, переносили в конічну пробірку фірми «Eppendorf» на 1,5 мл і розчиняли очищену РНК у 50 мкл води без РНКаз. Зберігали при -80°C . Контроль якості одержаних РНК здійснювали за допомогою спектрофотометра Nanodrop (Thermo Fisher Scientific Inc., США), капілярного електрофорезу на наночіпах у біоаналізаторі Agilent-2100 (Agilent Technologies, США) та електрофорезу в 1 % агарозному гелі з додаванням на 100 мл розчину 10 мкл флуоресцентного барвника SYBRgreen або етидій броміду.

Кількісний аналіз експресії мРНК *RET/PTC1*, *RET/PTC3* та *BRAF* (wt/mut)

Реакцію зворотної транскрипції проводили з використанням 1 мкМ оліго dT18 праймера, 2 мкг загальної РНК, 500 мкМ кожного дНТФ, 1 од./мкл зворотної транскриптази, 1 од./мкл інгібітора РНКаз та стандартного буфера в термоциклері GeneAmp PCR System 2720 (Applied Biosystems, США). 2,5 мкл кДНК використовували для кількісної ПЛР в 20 мкл реакційної суміші з SYBRgreen/Rox qPCR мастер-мікс (Thermo Fisher Scientific Inc., США). Для визначення експресії мРНК в зразках пухлинної тканини кількісну ПЛР проводили з такими праймерами: *RET/PTC-1*: прямий — 5'-GAGCTG-GAGACCTACAAACTGA-3', зворотний — 5'-CGTT-GCCTTGACCACTTTTC-3', *RET/PTC-3*: прямий — 5'-AAACCTGCCAGTGGTTATCAAG-3', зворотний — 5'-TCGCCCTCTCCTAGAGTTTTTCC-3', *BRAFwt*: прямий — 5'-TAGGTGATTTTGGTC-TAGCTACAGT-3', *BRAFmut*: прямий — 5'-TAGGTGATTTTGGTCTAGCTACGGA-3', зворотний *BRAF-R*: — 5'-TCTGACTGAAAGCTGTATGGATT-3'. Інтенсивність експресії бета-2-мікроглобуліну використовували як внутрішній контроль. Усі реакції проводили тричі з використанням ампліфікатора ABI/PRISM 7500 Sequence Detector System (Applied Biosystems) за таких умов: 95°C — 10 хв, і далі 40 циклів при 95°C — 15 с та при 60°C — 40 с. Специфічність кількісної ПЛР визначали за допомогою аналізу кривих плавлення. Відносний рівень експресії мРНК розраховували за методом К. J. Livak та Т. D. Schmittgen [5].

Результати та їх обговорення. Стан генів рецепторної тирозинкінази *RET* та протеїнкінази *BRAF* аналізували на післяопераційному матеріалі хворих на папілярний та фолікулярний рак ЩЗ. Зміни експресії, наявність мутацій та перебудов генів були виявлені у 8 зразках з 21 (38 %). Зразки з гістологічними номерами 245, 367 та 396 були взяті з неінкапсульованих, інвазивних папілярних карцином; зразки № 130 та № 352 — з інкапсульованих, неінвазивних пухлин папілярного раку; зразок № 479 — з фолікулярної карциноми. Крім того, перебудова *RET/PTC1* та підвищена експресія немутованої протеїнкінази *BRAF* (*BRAFwt*) спостерігалася у зразку № 173, де було встановлено фолікулярна аденому та оксифільноклітинну папілярну карциному з багатофокусним ростом, що є більш агресивною формою карциноми (не показано). Можливо посилення експресії *BRAFwt* є наслідком перебудови *RET/PTC1*.

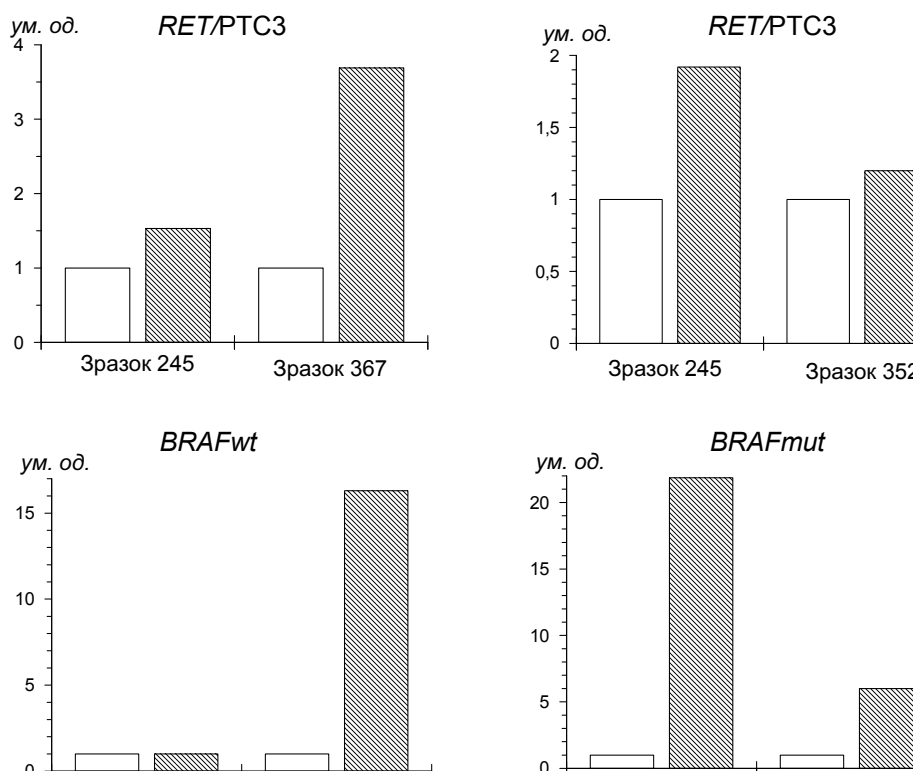
Підвищена інтенсивність експресії *RET/PTC1* та *RET/PTC3* у пухлинній тканині порівняно з нормальною спостерігається у неінкапсульованих пухлинах (зразки 245 та 367) (рисунок). Важливо відзначити, що зразок № 245 містив обидві перебудови *RET/PTC1* та *RET/PTC3*, хоча більш інтенсивною була експресія *RET/PTC3* (див. рис.). Такі подвійні

перебудови в папілярних карциномах зустрічаються рідко — 1 %, вони свідчать про агресивність пухлини і характеризуються гіршим прогнозом. Крім того, вважається що *RET/PTC3*-позитивні карциноми є більш інвазивними [9].

Мутації гена *BRAF* спостерігали у пухлинній тканині інкапсульованого неінвазивного папілярного раку (зразок № 130) та неінкапсульованій папілярній карциномі (зразок № 396). Особливо інтенсивною експресією характеризувався зразок № 130, в якому рівень мРНК мутованого гена перевищував норму більше ніж у 20 разів (див. рис.).

Підвищена експресія немутованої протеїнкінази *BRAF* (*BRAFwt*) спостерігалася при багатовузловому зобі, причому як в умовно нормальній так і у трансформованій тканині (не показано).

Найбільш цікаві дані отримано щодо пухлинної тканини фолікулярної карциноми. Ступінь експресії *BRAFwt* перевищував норму в 16 разів (див. рис.). Останній факт викликає значний інтерес, оскільки експресія PCNA (ядерний антиген проліферуючих клітин) у цих же зразках пухлини не відрізнялася від нормальної тканини, а кількість і активність ERK1/2 (протеїнкінази, що знаходиться нижче від *BRAF* у сигнальному ланцюзі) у нормальній тканині була значно вище ніж у пухлині [1, 4]. У попередніх



Експресія мРНК *RET/PTC1*, *RET/PTC3* та *BRAF* (wt/V600E) у пухлинній тканині (заштриховані стовпчики) неінкапсульованих папілярних карцином (зразки 245, 367, 396), інкапсульованих неінвазивних пухлин папілярного раку (зразки 130, 352) та фолікулярної карциноми (зразок 479). Ордината — рівень експресії нормалізований по бета-2-мікроглобуліну та по незмінній тканині, що прийнята за 1 (світлі стовпчики) [5].

роботах ми відзначали факт так званої токсичності онкогенів — явища, при якому продукти онкогенів, що спричинили утворення пухлини, гальмують ріст вже сформованої пухлини, викликають прискорене старіння та апоптоз пухлинних клітин. У цьому випадку пухлина продукує спеціальні білки (білок теплового шоку морталін), що захищають пухлину від токсичних продуктів онкогенів пригніченням експресії і активності протеїнкіназ MAPK-каскаду [4, 10-12]. З одержаних даних стає очевидним, що пригнічення MAPK-каскаду реалізується на рівні останньої протеїнкінази каскаду — ERK1/2. Таке пригнічення могло б відбуватися також на рівні другої протеїнкінази каскаду — MEK, проте той факт,

що знижується не лише активність, але й кількість ERK1/2 (за рахунок гальмування експресії або посилення деградації білка), свідчить, що саме ERK є мішенню інгібуючих факторів. Можливо надекспресія *BRAF^{wt}* є компенсаторною реакцією клітин на пригнічення експресії та інактивацію ERK1/2.

Отже, інтенсивність експресії *RET/PTC1* або *RET/PTC3*, а також наявність обох перебудов можуть свідчити про агресивність та інвазивність пухлини. Визначення експресії *RET/PTC1* та *RET/PTC3*, як додаткових молекулярних маркерів агресивності пухлини, дає змогу більш точно розрахувати обсяг оперативного втручання та подальших лікувальних процедур.

Список використаної літератури

1. Гуда Б. Б., Пушкарьов В. В., Журавель О. В. та ін. Експресія ядерного антигену проліферуючих клітин (PCNA) в нормальних тканинах та доброякісних, вискодиференційованих злоякісних (з наявністю метастатичного ураження та без метастазів) пухлинах щитоподібної залозилюддини // Доп. НАН України. — 2015. — № 10. — С. 93-97.
2. Beeram M., Patnaik A., Rowinsky E. K. Raf: a strategic target for therapeutic development against cancer // J. Clin. Oncol. — 2005. — 23. — P. 6771-6790.
3. Caronia L. M., Phay J. E., Shah M. H. Role of BRAF in thyroid oncogenesis // Clin. Cancer Res. — 2011. — 17, № 24. — P. 7511-7517.
4. Guda B. B., Pushkarev V. M., Pushkarev V. V. et al. The expression and activation of extracellular signal-regulated kinase-1/2 and proliferating cell nuclear antigen content in normal tissue and human thyroid tumors // SM J. Endocrinol. Metab. — 2015. — 1, № 1. — P. 1002-1005.
5. Livak K. J., Schmittgen T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-Delta Delta C(T)} method // Methods. — 2001. — 25. — P. 402-408.
6. McCubrey J. A., Steelman L. S., Chappell W. H. et al. Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance // Biochim. Biophys. Acta. — 2007. — 1773, № 8. — P. 1263-1284.
7. Milosevic Z., Pesic M., Stankovic T. et al. Targeting RAS-MAPK-ERK and PI3K-AKT-mTOR signal transduction pathways to chemosensitize anaplastic thyroid carcinoma // Transl. Res. — 2014. — 164, № 5. — P. 411-423.
8. Montagut C., Settleman J. Targeting the RAF-MEK-ERK pathway in cancer therapy // Cancer Lett. — 2009. — 283, № 2. — P. 125-134.
9. Nakazawa T., Kondo T., Kobayashi Y. et al. RET gene rearrangements (RET/PTC1 and RET/PTC3) in papillary thyroid carcinomas from an iodine-rich country (Japan) // Cancer. — 2005. — 104, № 5. — P. 943-951.
10. Park J. I. Growth arrest signaling of the Raf/MEK/ERK pathway in cancer // Front. Biol. (Beijing). — 2014. — 9, № 2. — P. 95-103.
11. Park J. I., Strock C. J., Ball D. W., Nelkin B. D. The Ras/Raf/MEK/Extracellular signal-regulated kinase pathway induces autocrine-paracrine growth inhibition via the leukemia inhibitory factor/JAK/STAT pathway // Mol. Cell. Biol. — 2003. — 23, № 2. — P. 543-554.
12. Wu P.K., Hong S.K., Veeranki S. et al. A Mortalin/HSPA9-mediated switch in tumor-suppressive signaling of Raf/MEK/Extracellular signal-regulated kinase // Mol. Cell. Biol. — 2013. — 33, № 20. — P. 4051-4067.
13. Xing M. Molecular pathogenesis and mechanisms of thyroid cancer // Nat. Rev. Cancer. — 2013. — 13. — P. 184-199.

Одержано 26.06.2016

RET/PTC ПЕРЕСТРОЙКИ И BRAF МУТАЦИИ В ВЫСОКОДИФЕРЕНЦИРОВАННЫХ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ И ДОБРОКАЧЕСТВЕННЫХ ОПУХОЛЯХ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ЧЕЛОВЕКА

Б. Б. Гуда, В. М. Пушкарев, Е. В. Журавель, В. В. Пушкарев, А.Е. Коваленко, Ю.Н. Тарашенко, Н. Д. Тронько

Государственное учреждение “Институт эндокринологии и обмена веществ им. В. П. Комиссаренко НАМН Украины”, 04114 Киев

Изучали хромосомные транслокации гена рецепторной тирозинкиназы *RET/PTC1*, *RET/PTC3*, мутации гена протеинкиназы *BRAF (BRAV600E)* и экспрессию *BRAFwt* в ткани многоузлового зоба, фолликулярных и папиллярных карциномах щитовидной железы человека. Из 21 образца тканей изменения экспрессии, мутации и перестройки генов обнаружены в 8 случаях (38%). В одном образце опухоли папиллярной карциномы найдена двойная перестройка гена *RET* — *RET/PTC1* и *RET/PTC3*. В более агрессивных, инвазивных опухолях уровень экспрессии *RET-PTC1* и *RET-PTC3* был выше, чем в инкапсулированных опухолях. Повышенная экспрессия протеинкиназы *BRAF (BRAVwt)* наблюдалась при многоузловом зобе, как в условно нормальной так и в трансформированной ткани. В опухолевой ткани фолликулярной карциномы уровень экспрессии *BRAFwt* превышал ее уровень в норме в 16 раз. Обсуждается значение сигнального каскада MAPK в опухолях щитовидной железы.

RET/PTC REARRANGEMENTS AND BRAF MUTATIONS IN HIGHLY DIFFERENTIATED MALIGNANT AND BENIGN TUMORS OF THE HUMAN THYROID

B. B. Guda, V. M. Pushkarev, O. V. Zhuravel, V. V. Pushkarev, A. Ye. Kovalenko, Y. M. Tarachenko, N. D. Tronko

State institution “V. P. Komisarenko Institute of Endocrinology and Metabolism NAMS Ukraine”, 04114 Kyiv

We studied the chromosomal translocation of receptor tyrosine kinase gene *RET/PTC1*, *RET/PTC3*, gene mutations of protein kinase *BRAF (BRAV600E)* and the expression of *BRAFwt* in the multinodular goiter tissue, follicular and papillary carcinoma of the human thyroid. Of the 21 tissue samples which were studied, changes in the expression, gene mutations and rearrangements were detected in 8 cases (38%). In one tumor sample of papillary carcinoma double rearrangement of the gene *RET* — *RET/PTC1* and *RET/PTC3* was found. In a more aggressive invasive tumors the expression level *RET/PTC1* and *RET/PTC3* was higher than in encapsulated tumors. Increased expression of protein kinase *BRAF (BRAVwt)* was observed in multinodular goiter, both in conventionally normal and tumor tissue. In follicular carcinoma tumor tissue expression level *BRAFwt* exceeded its normal level by 16 times. The significance of MAPK signaling pathway in tumors of the thyroid was discussed.