



УКРАЇНА

(19) UA (11) 29847 (13) U

(51) МПК (2006)

G01N 33/53

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІОПИС  
ДО ПАТЕНТУ  
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬвидається під  
відповідальність  
власника  
патенту

(54) СПОСІБ ВИЯВЛЕННЯ ОНКОГЕНІВ RET/PTC В ПАПІЛЯРНИХ КАРЦИНОМАХ ЩИТОПОДІБНОЇ ЗАЛОЗИ

1

2

(21) u200711704

(22) 23.10.2007

(24) 25.01.2008

(72) ВОСКОБОЙНИК ЛАРИСА ГРИГОРІВНА, UA,  
БОГДАНОВА ТЕТЯНА ІВАНІВНА, UA, ЗУРНАДЖИ  
ЛЮДМИЛА ЮЛІЇВНА, UA, ТРОНЬКО МИКОЛА  
ДМИТРОВИЧ, UA, ПУШКАРЬОВ ВОЛОДИМИР  
МИХАЙЛОВИЧ, UA, КОВЗУН ОЛЕНА ІГОРІВНА,  
UA(73) ІНСТИТУТ ЕНДОКРИНОЛОГІЇ ТА ОБМІНУ  
РЕЧОВИН ІМ. В.П. КОМІСАРЕНКА АКАДЕМІЇ МЕ-  
ДИЧНИХ НАУК УКРАЇНИ, UA

(57) Спосіб виявлення онкогенів RET/PTC в папілярних карциномах щитоподібної залози, що включає екстракцію РНК з пухлинної тканини, проведення реакції зворотної транскрипції та ампліфікацію транскриптів з відповідними праймерами, який відрізняється тим, що ампліфікацію проводять за допомогою кількісної полімеразної ланцюгової реакції з визначенням рівнів експресії тирозинкіназного та екстраклітинного доменів гена RET та подальшою оцінкою їх співвідношення і, якщо співвідношення більше двох, то встановлюють наявність онкогенів RET/PTC.

Корисна модель відноситься до галузі медицини, зокрема до ендокринології, онкології і може застосовуватися для виявлення онкогенів RET/PTC в папілярних карциномах щитоподібної залози (ЩЗ).

Встановлено, що папілярні карциноми ЩЗ з перебудовами RET/PTC досить часто характеризуються ознаками судинної інвазії, екстратиреоїдного розповсюдження, багатофокусного росту в протилежну долю ЩЗ, метастатичним ураженням лімфовузлів ший, а також ризиком розвитку метастазів, в тому числі, і віддалених метастазів до легенів [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 // Am. J. Surg. Pathol. - Vol. 30, N2. - P.216-222]. Саме тому, наявність онкогенів RET/PTC слугує маркером папілярних карцином ЩЗ з найбільш агресивною біологічною поведінкою в післяопераційному періоді.

Відомий спосіб виявлення онкогенів RET/PTC - молекулярно-біологічний, що полягає у виділенні РНК з пухлинної тканини, проведенні реакції зворотної транскрипції для отримання кДНК та ампліфікації транскриптів шляхом проведення полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) з відповідними праймерами з подальшим підтвердженням результатів блотгібридизацією продуктів ПЛР з відповідним зондом [Brzezianska E., Karbownik M.,

Migdalska-Sek M. et al. Molecular analysis of the RET and NTRK1 gene rearrangements in papillary thyroid carcinoma in the Polish population // Mut. Res. - 2006. - Vol. 599, N 1-2. - P.26-35].

Однак, за таких обставин, повний скринінг всіх відомих транслокацій гену RET (за теперішнім часом відомі 16 різних форм онкогенів RET/PTC) є надзвичайно складною процедурою, що потребує проведення багатьох ПЛР з різними праймерами. Крім того, для отримання об'єктивних результатів доцільним є проведення в кожному позитивному випадку додаткової реакції з зовнішньою парою праймерів для виключення можливості контамінації продуктами ПЛР, що також призводить до ускладнення процедури.

Існує інший метод непрямого загального скринінгу онкогенів RET/PTC, згідно з яким, експресія тирозинкіназного (ТК) домена гена RET за відсутності експресії його екстраклітинного (ЕК) домена вказує на наявність перебудов RET/PTC [Santoro M., Thomas G. A., Vecchio G. et al. Gene rearrangement and Chernobyl related thyroid cancer // British. J. Cancer. - Vol. 82, N2. - P.315-322]. Зазначений метод надає можливість виявити наявність онкогенів RET/PTC не визначаючи їх форми і є менш складним і трудомістким порівняно з проведенням чисельних ПЛР.

Недоліком цього методу є те, що він не дозволяє виявляти наявність онкогенів RET/PTC на тлі експресії незміненого гена RET в пухлинах. Між

(13) U

(11) 29847

(19) UA

тим, з повідомлень літератури відомо, що незмінений ген RET також виявляється у значній кількості пухлин ЩЗ [Lee S., Hong S. W., Moon W. C. et al. High prevalence of c-RET expression in papillary thyroid carcinomas from the Korean population // *Thyroid*. - 2005. - 15, №3. - P.259-266]. Крім того, часто спостерігається коекспресія онкогенів RET/PTC та незміненого гена RET. За таких обставин, використання зазначеного метода не є доцільним, тому що експресія незміненого гена RET перешкоджає виявленню онкогенів RET/PTC.

Таким чином, на сьогодні не існує метода загального виявлення перебудов RET/PTC на тлі експресії звичайного незміненого гена RET в пухлинах щитоподібної залози, між тим, загальний скринінг онкогенів RET/PTC може бути корисними для визначення найбільш агресивних папілярних карцином ЩЗ.

За прототип нами взятий спосіб виявлення онкогенів RET/PTC з використанням молекулярно-біологічного методу [Elisei R., Romei C, Vorontsova T. et al. RET/PTC rearrangements in thyroid nodules: studies in irradiated and not irradiated, malignant and benign thyroid lesions in children and adults // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* - 2001. - Vol. 86, N7. - P.3211-3216]. Для цього з тканини пухлин щитоподібної залози проводять екстракцію РНК з наступним виконанням реакції зворотної транскрипції для ампліфікації кДНК. Отриману кДНК використовують для проведення ПЛР з відповідними парами праймерів до найбільш розповсюджених форм онкогенів RET/PTC1 та RET/PTC3 і контролюють результати методом блот-гібридизації ДНК з відповідними зондами. Решту зразків, які не є позитивними щодо наявності RET/PTC1 та RET/PTC3, аналізують за допомогою методу непрямого виявлення онкогенів RET/PTC, згідно з яким проводять ПЛР з праймерами до ТК та ЕК ділянок гена RET і, знов таки, підтверджують результати методом блот-гібридизації ДНК з відповідними зондами. Зразки, в яких спостерігається лише експресія ТК, яка не асоційована з експресією ЕК, вважають позитивними щодо наявності онкогенів RET/PTC.

Однак, наведений спосіб має ряд недоліків:

а) для виявлення кожного типу онкогенів RET/PTC необхідно проводити окрему ПЛР та блот-гібридизацію продуктів ПЛР з відповідними праймерами та зондами;

б) на тлі експресії незміненого гена RET можливо визначити лише перебудови RET/PTC1 та RET/PTC3 шляхом проведення відповідних ПЛР та блот-гібридизації, в той же час, наявність інших форм онкогенів RET/PTC виявити неможливо;

в) метод є складним, трудомістким, потребує багато часу для проведення чисельних ПЛР з підтвердженням результатів блот-гібридизацією.

В основу корисної моделі поставлено завдання удосконалити спосіб виявлення онкогенів RET/PTC в папілярних карциномах щитоподібної залози шляхом використання кількісної ПЛР для визначення рівня експресії різних ділянок (тирозинкіназного та екстраклітинного) гена RET з подальшою оцінкою їх співвідношення.

Поставлене завдання вирішується тим, що в способі, який включає екстракцію РНК з пухлинної

тканини, проведення реакції зворотної транскрипції та ампліфікацію транскриптів з відповідними праймерами, згідно з корисною моделлю, ампліфікацію проводять за допомогою кількісної ПЛР з визначенням рівнів експресії ТК і ЕК доменів гена RET та подальшою оцінкою їх співвідношення, і якщо співвідношення більше двох, то встановлюють наявність онкогенів RET/PTC.

Основною відмінністю вказаного способу виявлення онкогенів RET/PTC від прототипу є те, що автори вперше пропонують аналізувати співвідношення ТК/ЕК рівнів експресії ТК і ЕК доменів гена RET, а для отримання зазначених показників використовувати кількісну полімеразну ланцюгову реакцію. Такий підхід дозволяє відмовитися від проведення чисельних ПЛР з наступною блот-гібридизацією і проводити повний скринінг онкогенів RET/PTC в пухлинах навіть за умов експресії незміненого гена RET. Таким чином, спосіб є інформативним, простим і дозволяє суттєво скоротити (майже у 5 разів) термін виконання досліджень.

Процес виконується наступним чином.

Екстракцію РНК проводять із шматочків пухлин ЩЗ з реагентом TRIzol згідно з рекомендаціями виробника («Sigma», США). Концентрацію РНК визначають на спектрофотометрі. Якість і цілісність отриманої РНК оцінюють за допомогою біоаналізатора. Загальну РНК за допомогою реакції зворотної транскрипції перетворюють в кДНК. Отриману кДНК використовують для ампліфікації транскриптів шляхом проведення кількісної ПЛР з відповідними праймерами та зондами для визначення рівнів експресії ТК і ЕК доменів гена RET. Для нормалізації отриманих даних використовують ген GAPDH.

Експресія лише мРНК домена ТК за умов відсутності експресії домена ЕК свідчить про наявність онкогена RET/PTC. Для решти зразків аналізують співвідношення ТК/ЕК. За умов експресії звичайного гена RET спостерігаються майже однакові рівні експресії мРНК його доменів ТК і ЕК (співвідношення ТК/ЕК дорівнюється одиниці). Підвищення співвідношення ТК/ЕК більш ніж 2 свідчить про наявність онкогенів RET/PTC.

Наведемо кілька прикладів використання даного способу в практиці.

Приклад 1

Хвора Поддубная Л. В., 1982 року народження, прооперована з приводу папілярної карциноми щитоподібної залози. З пухлини щитоподібної залози проведена екстракція РНК з наступною реакцією зворотної транскрипції для перетворення загальної РНК в кДНК. Отримана кДНК була використана для проведення кількісної ПЛР з відповідними праймерами та зондами до ТК і ЕК доменів гена RET. За результатами кількісної ПЛР визначено експресію ТК та ЕК доменів гена RET, при цьому співвідношення ТК/ЕК дорівнювалося 9.4, що вказувало на наявність онкогена RET/PTC. Патоморфологічні дослідження встановили наявність папілярної карциноми щитоподібної залози з морфологічними ознаками екстра- та інтратиреоїдного розповсюдження, судинної інвазії, багатофокусного росту та метастазами в лімфатичні вузли ший. В післяопераційному періоді у пацієнтки

виникли віддалені метастази папілярної карциноми до легенів.

#### Приклад 2

Хворий Лещенко Л. В., 1975 року народження, прооперований з приводу папілярної карциноми щитоподібної залози. Екстракція РНК проведена із шматочків пухлини. Загальна РНК була транскрибована до кДНК, яка була використана для проведення кількісної ПЛР з відповідними праймерами та зондами. За результатами кількісної ПЛР встановлено експресію ТК та ЕК доменів гена RET за співвідношенням ТК/ЕК рівним 1.2, тобто близьким до одиниці. Отримані результати свідчили за відсутність онкогена RET/PTC на тлі експресії незміненого гена RET. Патоморфологічно встановлена інкапсульована папілярна карцинома щитоподібної залози з відсутністю метастазів до лімфатичних вузлів ший, без морфологічних ознак екстра- та інтратиреоїдного розповсюдження, багатофокусного росту. В післяопераційному періоді не виявлено рецидивів метастатичного ураження лімфатичних вузлів ший та появи віддалених метастазів до легенів.

Ефективність способу підтверджено шляхом аналізу отриманих даних щодо 35 пацієнтів з папілярними карциномами щитоподібної залози. Проведено порівняльний аналіз даних, що були отримані за допомогою методу, що пропанується, та методу, що був обраний за прототип.

Згідно з даним способом, 17 пухлин характеризувалися співвідношенням ТК/ЕК більшим ніж 2, що свідчило про наявність онкогенів RET/PTC. Таким чином, наявність онкогенів RET/PTC виявлено в 48.6% досліджених папілярних карциномах

щитоподібної залози.

Проведення звичайної ПЛР з наступною блот-гібридизацією продуктів ПЛР з відповідними праймерами та зондами (за методом, що був обраний за прототип) виявило в них наявність онкогенів RET/PTC1 (4 випадки) і RET/PTC3 (7 випадків). Крім того, в одній папілярній карциномі визначена експресія ТК домена гена RET, що не була асоційована з експресією ЕК домена. Така ознака свідчила про експресію онкогена RET/PTC. Загалом, за методом, що був обраний нами за прототип, наявність онкогенів RET/PTC виявлено в 12 із 35 (34.3%) досліджених папілярних карцином. Всі зазначені 12 випадків були позитивними до онкогенів RET/PTC і за методом кількісної ПЛР з оцінкою співвідношення ТК/ЕК. Крім того, ще в 5 випадках папілярних карцином була визначена експресія обох (ТК і ЕК) доменів гена RET за співвідношенням ТК/ЕК більш ніж 2, що надало підстави вважати зазначені пухлини позитивними щодо онкогенів RET/PTC на тлі експресії незміненого гена RET. Так, запропонований нами спосіб дозволив підвищити точність виявлення онкогенів RET/PTC в папілярних карциномах щитоподібної залози на 14.3% порівняно з існуючими методами.

Таким чином, даний спосіб виявлення онкогенів RET/PTC в пухлинах щитоподібної залози, який пропонують автори, є інформативним, простим у виконанні, дозволяє виявляти наявність онкогенів RET/PTC на тлі експресії незміненого гена RET, сприяє суттєвому скороченню терміну виконання досліджень і пропонується для впровадження в наукову та клінічну практику.