

DOI: 10.17650/2313-805X-2022-9-4-41-49



Экспрессия транскрипционных, ростовых факторов, рецепторов стероидных гормонов, LC3B в ткани папиллярного рака щитовидной железы и связь с прогнозом заболевания и риском рецидивирования

Л.В. Спирина^{1,2}, И.В. Ковалева^{1,2}, С.Ю. Чижевская^{1,2}, И.В. Кондакова², Е.Л. Чойнзонов^{1,2}

¹ФГБУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России; Россия, 634050 Томск, Московский тракт, 2;

²Научно-исследовательский институт онкологии Томского национального исследовательского медицинского центра Российской академии наук; Россия, 634009 Томск, переулок Кооперативный, 5

Контакты: Людмила Викторовна Спирина spirinalvl@mail.ru

Введение. В процессе канцерогенеза в опухолевых клетках возникают различные генетические и эпигенетические нарушения, выявление которых позволяет прогнозировать дальнейшее развитие заболевания и предсказывать развитие химиорезистентности опухоли. В настоящее время использование молекулярных маркеров в решении проблем клинической онкологии (в том числе опухолей щитовидной железы) приобретает все большее значение. На сегодняшний день накоплены противоречивые данные о роли генетических и биологических параметров опухоли в прогнозировании исхода заболевания.

Цель исследования – изучение прогностической значимости транскрипционных, ростовых факторов, компонентов сигнального каскада AKT/mTOR и белка аутофагии LC3B у больных с папиллярным раком щитовидной железы в отношении риска развития рецидивов заболевания и общей выживаемости.

Материалы и методы. В исследование включены 65 пациентов с папиллярным раком щитовидной железы T1–4N0–1M0. Согласно критериям Американской тиреологической ассоциации (American Thyroid Association, ATA) (2015), пациенты были разделены на группы с высоким, низким и промежуточным риском развития рецидивов. В группу с низким риском вошли 30 больных, с промежуточным – 23, с высоким – 12. Для выявления мутации *BRAF*^{V600} был использован метод аллель-специфической полимеразной цепной реакции (ПЦР). Экспрессия транскрипционных факторов (субъединиц p65 и p50 ядерного фактора каппа би (NF-κB p65, NF-κB p50), фактора, индуцируемого гипоксией 1 (HIF-1), фактора, индуцируемого гипоксией 2 (HIF-2)), ростовых факторов (фактора роста эндотелия сосудов (VEGF), рецептора фактора роста VEGF (VEGFR-2), карбоангидразы 9 типа (CA-IX)), компонентов сигнального пути киназ AKT, c-RAF, GSK-3β, p70S6, мишени рапамицина млекопитающих (m-TOR), PDK, PTEN, 4E-BP1 в опухоли были оценены методом ПЦР в реальном времени. Мутацию *BRAF*^{V600} исследовали с помощью аллель-специфической ПЦР в режиме реального времени. Содержание белка LC3B определяли методом Вестерн-блоттинга.

Результаты. Согласно полученным данным отмечено повышение экспрессии c-RAF с увеличением риска с низкого до высокого, что сопровождалось снижением экспрессии 4E-BP1. Уровень матричной РНК c-RAF был увеличен в 3,0 и 2,8 раза в группах промежуточного и высокого риска соответственно по сравнению с группой низкого риска. Выявлено изменение экспрессии Vpn-3α в зависимости от риска развития рецидивов. Максимальные уровни матричной РНК обнаружены у пациентов с промежуточным риском: этот показатель у них был в 4,3 и 6,2 раза выше по сравнению с пациентами с низким и высоким риском соответственно. Показано увеличение экспрессии LC3B в 56,0 и 28,0 раз в ткани опухоли больных с промежуточным риском по сравнению с больными с низким и высоким риском. Выявленный факт сочетался с ростом содержания самого белка, который был выше у пациентов с промежуточным риском.

Пациенты с негативным статусом гена *BRAF* имели промежуточный и высокий риск развития рецидивов опухоли. Выявлена прогностическая значимость уровня экспрессии рецептора эстрогена β (ER-β) и NF-κB p50 в отношении безрецидивной и общей выживаемости больных с папиллярным раком щитовидной железы.

Заключение. В результате проведенного исследования обнаружены дополнительные молекулярные маркеры, свидетельствующие о повышении риска развития рецидивов опухоли после проведенного лечения. Показана значимость уровня экспрессии ER-β и NF-κB p50 для прогнозирования исходов заболевания.

Ключевые слова: папиллярный рак щитовидной железы, транскрипционные факторы, ростовые факторы, компоненты сигнального пути AKT/mTOR, рецепторы стероидных гормонов

Для цитирования: Спирина Л.В., Ковалева И.В., Чижевская С.Ю. и др. Экспрессия транскрипционных, ростовых факторов, рецепторов стероидных гормонов, LC3B в ткани папиллярного рака щитовидной железы и связь с прогнозом заболевания и риском рецидивирования. Успехи молекулярной онкологии 2022;9(4):41–9. DOI: 10.17650/2313-805X-2022-9-4-41-49

Expression of transcription, growth factors, steroid hormone receptors, LC3B in papillary thyroid cancer tissue, association with prognosis and risk of recurrence

L. V. Spirina^{1,2}, I. V. Kovaleva^{1,2}, S. Yu. Chizhevskaya^{1,2}, I. V. Kondakova², E. L. Choyznzonov^{1, 2}

¹Siberian State Medical University, Ministry of Health of Russia; 2 Moskovsky Tract, Tomsk 634050, Russia;

²Cancer Research Institute of the Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences; 5 Cooperative Lane, Tomsk 634009, Russia

Contacts: Lyudmila Viktorovna Spirina spirinalvl@mail.ru

Introduction. Biological characteristics of the tumor play a major role in its development and progression. Currently, using the molecular markers aimed at resolving the problems in clinical oncology is becoming more important, including thyroid carcinomas. Heterogeneous contradictory data had been accumulated to date showing the ability of tumors genetic and biological parameters to predict the diseases outcome.

Aim. To investigate prognostic value of transcription, growth factors, components of AKT/mTOR signaling pathway and autophagy protein LC3B in patients with papillary thyroid cancer in relation to recurrences and overall survival.

Materials and methods. The study included 65 patients with T1–4N0–1M0 papillary thyroid cancer. According to the criteria of the American Thyroid Association (ATA) (2015), patients were divided into groups of patients with high, low and intermediate risk. 30 patients were classified as low risk, 23 as intermediate risk, and 12 as high risk. The *BRAF*^{V600} mutation was identified in 18 samples. The expression of transcription factors (p65 and p50 subunits of nuclear factor kappa B (NF-κB p65, NF-κB p50), hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1), hypoxia-inducible factor 2 (HIF-2), growth factors (vascular endothelial growth factor (VEGF), receptor VEGF (VEGF-2), carbonic anhydrases of type 9 (CAIX)), AKT, c-RAF, GSK-3β, p70S6, mammalian target of rapamycin (m-TOR), PDK, PTEN, 4E-BP1 in the tumor was assessed by real-time polymerase chain reaction (PCR). The *BRAF*^{V600} mutation was investigated using real-time allele-specific PCR. The content of the LC3B protein was examined using the Western Blot method.

Results. As a result of the study, there is an increase in c-RAF expression with an increase in risk from low to high, which was accompanied by a decrease in 4E-BP1 expression. c-RAF mRNA levels were increased 3.0- and 2.8-fold in the intermediate and high-risk groups, respectively, compared to low risk patients. There is a change in the expression of Brn-3α depending on the relapse risk. The maximum mRNA levels were found in patients with intermediate risk, where the figure was 4.3 and 6.2 times higher than in patients with low and high risk, respectively. An increase in LC3B expression by 56.0 and 28.0 times was shown in the tumor tissue of patients with intermediate risk compared with patients with low and high risk. This fact corresponds with an increasing content of the protein itself, which was higher in patients with intermediate risk. Patients with a negative *BRAF* gene status had an intermediate and high risk of tumor recurrence. The prognostic significance of the estrogen receptor β (ER-β) and NF-κB p50 expression level had been revealed in relation with relapse-free and overall survival of patients with papillary thyroid cancer.

Conclusion. As a result of the study, additional molecular markers were found in order to for predict the tumors recurrence risk. The study showed the significance of ERβ and NF-κB p50 expression levels for predicting disease outcomes.

Keywords: papillary thyroid cancer, transcription and growth factors, AKT/mTOR signaling pathway components, steroid hormone receptors

For citation: Spirina L.V., Kovaleva I.V., Chizhevskaya S.Yu. et al. Expression of transcription, growth factors, steroid hormone receptors, LC3B in papillary thyroid cancer tissue, association with prognosis and risk of recurrence. *Uspexhi molekulyarnoy onkologii* = *Advances in Molecular Oncology* 2022;9(4):41–9. (In Russ.). DOI: 10.17650/2313-805X-2022-9-4-41-49

ВВЕДЕНИЕ

Молекулярные маркеры и лабораторные параметры значимы в предсказании исхода заболевания, в том числе в отношении риска развития рецидивов опухолей щитовидной железы [1]. В настоящее время наблюдается недостаток точных и эффективных средств оценки дальнейшего развития заболевания. Общепринятым является прогнозирование развития рецидивов и прогрессирования заболевания с учетом клинических

и морфологических параметров новообразования [2]. В отношении рака щитовидной железы (РЩЖ) выделяют такие факторы прогноза заболевания, как морфологические особенности и размер опухоли, метастазирование в регионарные лимфатические узлы, прорастание капсулы, что связано с инвазивным ростом и появлением экстратиреоидных очагов роста опухоли [3, 4]. Прогнозирование риска развития рецидивов папиллярного РЩЖ в настоящее время осуществляется на основе

рекомендаций Американской тиреоидологической ассоциации (American Thyroid Association, ATA). С учетом клинических параметров опухоли выделяют группы низкого, промежуточного и высокого риска [5].

При этом сложилось четкое представление о необходимости модификации существующих клинических и морфологических подходов, применении молекулярных и генетических маркеров для планирования лечения больных [5, 6]. В настоящее время рассматриваются большое количество генетических и молекулярных маркеров, ассоциированных с исходом заболевания, к которым относят особенности сайтов альтернативного сплайсинга [7], мутации генов *PDZK1IP1*, *TMC3*, *LRP2* и *KCNJ13* [8], а также генов программируемой гибели *AC008063.2*, *APOE*, *BCL3*, *ACAP3*, *ALOX5AP*, *ATXN2L*, *B2M* [9], белков и генов иммунной системы [10–12]. Формируются подходы для оценки 5-, 6-, 7-генных сигнатур для оценки прогноза заболевания [11].

Разнородный характер генетических маркеров, связанных с развитием и прогрессированием папиллярного РЩЖ, отражает противоречивые данные, связанные с оценкой их прогностической значимости [13]. Наиболее значимым генетическим маркером опухоли является мутация *BRAF^{V600E}*, которая связана с активацией сигнального каскада MAPK, приводящего к пролиферации опухолевых клеток [6]. Однако у этих же пациентов возможны дополнительные мутации сигнального пути АКТ/mTOR [14] – одного из основных биохимических каскадов, лежащих в основе канцерогенеза. В настоящее время большое внимание уделяется особенностям гормональной рецепции, влияющей на особенности биологического поведения опухоли [15], а также аутофагии, которая связана с развитием и прогрессированием опухолей различного происхождения [16], влияет на эффективность противоопухолевой терапии и опосредует выживаемость больных [17, 18]. Кроме того, в случае наличия мутации *BRAF^{V600E}* у больных с неблагоприятным прогнозом заболевания наблюдается увеличение содержания белка LC3B [18–20].

Цель исследования – изучение прогностической значимости транскрипционных, ростовых факторов, компонентов сигнального каскада АКТ/mTOR и белка аутофагии LC3B у больных с папиллярным РЩЖ в отношении риска развития рецидивов заболевания и общей выживаемости.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование включены 65 пациентов с папиллярным РЩЖ T1–4N0–1M0. Согласно критериям ATA (2015), пациенты были распределены на группы с высоким, низким и промежуточным риском (табл. 1). В группу с низким риском вошли 30 больных, с промежуточным – 23, с высоким – 12 [21].

Мутация *BRAF^{V600}* выявлена у 18 человек. После проведенного лечения и динамического наблюдения

Таблица 1. Критерии оценки риска развития рецидива, по данным Американской тиреоидологической ассоциации (American Thyroid Association, ATA) (2015)

Table 1. Criteria of evaluation of recurrence risk per the American Thyroid Association (ATA) (2015)

Риск Risk	Критерии Criteria
Низкий Low	Отсутствуют отдаленные и регионарные метастазы. No local or distant metastases. Вся макроскопическая опухоль резецирована. All macroscopic tumor has been resected. Отсутствует опухолевая инвазия в ближайшие ткани и структуры. No invasion of locoregional tissues. Опухоль неагрессивного гистологического типа. Tumor does not have aggressive histology. После радиоiodтерапии не обнаружены очаги активности I ¹³¹ вне щитовидной железы. No ¹³¹ I uptake outside the thyroid bed on the post-treatment scan. Отсутствует васкулярная инвазия. No vascular invasion. Стадия N0 или N1 и <5 микрометастазов (их максимальный размер <0,2 см) Stages N0 or N1 and < 5 micrometastases (with maximal size <0.2 cm)
Промежуточный Intermediate	Микроскопическая инвазия опухоли в окружающие железу ткани. Microscopic invasion into the perithyroidal soft tissues. Активные микрометастатические очаги в мягких тканях шеи после радиоiodтерапии. Active micrometastatic lesions in the perithyroidal soft tissues after radioactive iodine therapy. Опухоль агрессивного гистологического типа. Tumor with aggressive histology. Стадия N1 или N1 с вовлечением >5 лимфатических узлов (максимальный размер <3 см) Stage N1 or N1 with involvement of > 5 lymph nodes (maximal size <3 cm)
Высокий High	Макроскопическая инвазия в мягкие ткани шеи. Macroscopic tumor invasion into perithyroidal soft tissues. Незавершенная резекция опухоли. Incomplete tumor resection. Отдаленные метастазы. Distant metastases. Фолликулярный вариант папиллярного рака с обширной васкулярной инвазией (>4 очагов) Follicular type of papillary cancer with gross vascular invasion (>4 lesions)

в течение 5 лет рецидивы заболевания отмечены в 5 случаях, смертельные исходы – в 3.

Все процедуры с вовлечением больных выполнены в соответствии с протоколом Хельсинкской декларации по правам человека (1964).

Материалом исследования являлись образцы опухолевой и неизмененной ткани, полученные при проведении оперативного лечения и находящиеся на расстоянии не менее 1 см от границы опухоли. После забора их замораживали и хранили при температуре -80°C .

Выделение ДНК. ДНК выделяли с помощью набора FFPE DNA – Extraction Kit («Биолинк», Россия).

Определение мутации *BRAF*^{V600}. Мутацию *BRAF*^{V600} определяли с помощью набора реагентов Real-time-PCR-BRAF-V600E («Биолинк», Россия), предназначенного для выявления точечной мутации GTG→GGG в 600-м кодоне гена *BRAF*. Анализ проводится методом аллель-специфичной полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени.

Выделение РНК. РНК выделяли с помощью набора RNeasy mini Kit, содержащего ДНКазу I (Qiagen, Германия).

Количественная полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией в реальном времени. Уровень экспрессии генов оценивали с помощью количественной ПЦР с обратной транскриптазой в реальном времени с использованием красителя SYBR Green на амплификаторе iCycler (Bio-Rad, США). Ниже приведены последовательности праймеров исследуемых генов. *HIF1A*: F 5'-CAAGAACCTACTGCTAATGCCA-3', R'-TTTGGTGAGGCTGTCCGA-3'; *EPAS1*: F 5'-TGGAGTATGAAGAGCAAGCCT-3', R 5'-GGG AACCTGCTCTTGCTGT-3'; *NFKB1*: F'-CGTGTAACCAAAGCCCTAAA-3', R'-AACCAAGAAAGGAAGCCAAGT-3'; *RELA*: F'-GGAGCACAGATACCACCAAGA-3', R 5'-GGGTTGTTGTTGGTCTGGAT-3'; *VEGFA*: F 5'-AGGGCAGAATCATCACGAA-3', R 5'-TCTTGCTCTATCTTTCTTTGGTCT-3'; *KDR*: F 5'-AACACAGCAGGAATCAGTCA-3', R 5'-GTGGTGTCTGTGT-CATCGGA-3'; *4-BPI*: F 5'-CAGCCCTTTCTCCCTCACT-3', R 5'-TTCCCAAGCACATCAACCT-3'; *AKT1*: F 5'-CGAGGACGCCAAGGAGA-3', R 5'-GTCATCTTGCTCAGGTGGTGT-3'; *C-RAF*: F 5'-TGGTGTGTCCTGCTCCCT-3', R 5'-ACTGCCTGCTACSTTACTTCT-3'; *GSK3b*: F 5'-AGACAAGGACGGCAGCAA-3', R 5'-TGGAGTAGAAGAAATAACGCAAT-3'; 70S киназа а: F'-CAGCACAGCAAATCCTCAGA-3', R 5'-ACATCTCCCTCTCCACCTT-3'; *MTOR*: F 5'-CCAAA GGCAACAAGCGAT-3', R'-TTCACCAAACCGTCTCAA-3'; *PDK1*: F'-TCACCAGGACAGCCAATACA-3', R'-CTCCTCGGTCACTCATCTTCA-3'; *POU4F1*: F'-CA CGCTCTCGCACAACAA-3', R'-ATCCGCTTCTGCTTC TGTCT-3'; *AR*: F'-GAGGGACAGCAGGCAGA-3', R'-GCTATCAGAACACACACACACT-3'; *ERS*: F'-TC CTGATGATTGGTCTCGTCT-3', R'-GATGTGGGAGAGGATGAGGA-3'; *ESR2*: F'-GGTCCATCGCCAGTTATCAC-3', R'-GCSTTACATCCTTTCACACGA-3', *TRIM16*: F'-CAATGGAACGGGAAGGAG-3', R'-GGA CGGTGCTGGCTTCT-3'; *LC3B*: F'-CCCAAACCGCAGACACAT-3', R'-ATCCCACCAGCCAGCAC-3'; *GAPDH*: F'-GGAAGTCAGGTGGAGCGA-3',

R'-GCAACAATATCCACTTTACCAGA-3'. Праймеры были подобраны с помощью программы Vector NTI Advance 11.5 и базы данных National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>).

В качестве референсного гена использовали ген «домашнего хозяйства» фермента GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase). Уровень экспрессии представлен в условных единицах экспрессии (у. е.) и рассчитан с использованием $\Delta\Delta\text{Ct}$ -метода.

Получение гомогенатов. Замороженную ткань (100 мг) измельчали в жидком азоте, затем ресуспендировали в 300 мкл 50 mM трис-HCl буфера (pH 7,5), содержащего 2 mM аденозинтрифосфата (АТФ), 5 mM хлорида магния, 1 mM дитиотреитола, 1 mM этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА) и 100 mM хлорида натрия. Гомогенат центрифугировали 60 мин при 10 000 g и 4°C .

Электрофорез. Электрофорез проводили по Laemmli в 13 % полиакриламидном геле.

Вестерн-блоттинг. После электрофореза полипептиды переносили на PVDF-мембрану (Immobilon, Millipore, США). Иммунодетекцию выполняли с антителами к LC3B (Affinity Biosciences, США). Стандартизация проводилась относительно β -актина. Результаты выражали в процентах от содержания показателей в неизмененной ткани.

Статистическую обработку результатов проводили с применением пакета программ Statistica 12.0. Нормальность проверяли с помощью критерия Колмогорова–Смирнова. Результаты определения экспрессии генов представлены как медиана (Me) (Q_1 ; Q_3). Значимость различий независимых параметров в 2 группах оценивали с использованием критерия Манна–Уитни. Критерий Краскела–Уоллиса применяли при оценке значимости различий более чем в 2 группах. Различия считали значимыми при $p < 0,05$. Критерий Пирсона был использован при исследовании различий частот качественных признаков. Показатели выживаемости оценивали с помощью построения кривых выживаемости по методу Каплана–Майера, значимость – с использованием критерия Гехана–Уилкоксона.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В ходе исследования выявлено, что транскрипционные и ростовые факторы практически не изменялись в группах с разным риском развития рецидивов опухоли после лечения (табл. 2). При этом отмечалось повышение экспрессии c-RAF с увеличением риска с низкого до высокого, что сопровождалось снижением экспрессии 4E-BP1 (табл. 3). Уровень матричной РНК (мРНК) c-RAF был выше в 3,0 и 2,8 раза в группах промежуточного и высокого риска соответственно по сравнению с группой низкого риска. При этом минимальная экспрессия 4E-BP1 была зафиксирована у пациентов с высоким риском развития рецидивов опухоли.

Таблица 2. Экспрессия транскрипционных и ростовых факторов в ткани папиллярного рака щитовидной железы в зависимости от группы риска развития рецидивов по критериям Американской тиреологической ассоциации (American Thyroid Association, ATA), Me (Q₁; Q₃)

Table 2. Transcription and growth factor expression in papillary thyroid cancer tissue depending on American Thyroid Association (ATA) Risk of Recurrence Classification, Me (Q₁; Q₃)

Показатель Parameter	Низкий риск Low risk	Промежуточный риск Intermediate risk	Высокий риск High risk
NF-κB p65	1,48 (0,44; 7,30)	1,85 (0,18; 12,76)	1,62 (0,16; 10,37)
NF-κB p50	0,51 (0,07; 2,94)	1,16 (0,41; 70,31)	3,72 (0,50; 12,18)
HIF-2	1,45 (0,52; 48,38)	0,55 (0,16; 3,28)	1,00 (0,20; 6,50)
HIF-1	1,36 (0,21; 10,18)	0,85 (0,06; 5,35)	1,48 (0,03; 4,00)
VEGFR2	0,94 (0,40; 6,45)	0,45 (0,03; 8,51)	0,33 (0,00; 8,00)
VEGF	0,34 (0,08; 0,06)	0,16 (0,01; 1,97)	2,33 (0,05; 29,86)
CAIX	0,52 (0,03; 1,55)	1,50 (0,25; 23,51)	1,50 (0,13; 4,00)

Примечание. HIF-1 – фактор, индуцируемый гипоксией 1; HIF-2 – фактор, индуцируемый гипоксией 2; VEGF – фактор роста эндотелия сосудов; VEGFR2 – рецептор VEGF2.

Note. HIF-1 – hypoxia-induced factor 1; HIF-2 – hypoxia-induced factor 2; VEGF – vascular endothelial growth factor; VEGFR2 – VEGF2 receptor.

Таблица 3. Экспрессия компонентов сигнального пути АКТ/m-TOR в ткани папиллярного рака щитовидной железы в зависимости от группы риска развития рецидивов по критериям Американской тиреологической ассоциации (American Thyroid Association, ATA), Me (Q₁; Q₃)

Table 3. Expression of AKT/m-TOR signaling pathway components in papillary thyroid cancer tissue depending on American Thyroid Association (ATA) Risk of Recurrence Classification, Me (Q₁; Q₃)

Показатель Parameter	Низкий риск Low risk	Промежуточный риск Intermediate risk	Высокий риск High risk
АКТ	0,49 (0,08; 5,89)	3,31 (0,25; 8,68)	1,43 (0,35; 4,00)
c-RAF	0,32 (0,05; 2,18)	0,97 (0,06; 6,24)*	0,91 (0,01; 3,40)*.#
GSK-3β	1,03 (0,59; 6,37)	0,30 (0,02; 2,00)	0,50 (0,13; 0,80)
Киназа p70 S6 p70 S6 kinase	0,67 (0,07; 2,50)	2,12 (0,22; 7,34)	0,23 (0,00; 1,47)
m-TOR	1,83 (0,16; 17,00)	1,94 (0,08; 69,87)	0,50 (0,25; 8,40)
PDK	0,72 (0,14; 2,87)	0,80 (0,13; 7,65)	2,80 (0,13; 100,00)
PTEN	0,72 (0,27; 3,30)	0,71 (0,20; 2,00)	0,50 (0,00; 6,50)
4E-BP1	2,19 (0,69; 31,35)	0,43 (0,01; 2,52)*	0,15 (0,03; 1,41)*.#

*Значимость различий по сравнению с пациентами с низким риском развития рецидивов ($p < 0,05$) (парное сравнение с использованием критерия Манна–Уитни). #Значимость различий по критерию Краскела–Уоллиса ($p < 0,05$).

Примечание. GSK-3β – киназа-3 β гликогенсинтазы; m-TOR – мишень рапамицина млекопитающих.

*Significant differences compared to patients with low recurrence risk ($p < 0.05$) (pairwise comparison using in Mann–Whitney test). #Significant differences per the Kruskal–Wallis test ($p < 0.05$).

Note. GSK-3β – glycogen synthase kinase 3 β; m-TOR – mammalian target of rapamycin.

В табл. 4 представлены данные об экспрессии рецепторов половых гормонов и транскрипционных факторов Vpn-3α, TRIM16 у пациентов в зависимости от риска развития рецидивов опухоли. Отмечается связь изменения экспрессии Vpn-3α с риском развития рецидивов. Максимальные уровни мРНК отмечались у больных с промежуточным риском: в 4,3 и 6,2 раза

выше по сравнению с этим показателем у пациентов с низким и высоким риском соответственно.

Стоит отметить, что экспрессия РНК и содержание белка LC3B также были связаны с риском развития рецидивов опухоли (табл. 5). Выявлено увеличение экспрессии изучаемого показателя в 56,0 и 28,0 раз в ткани опухоли пациентов с промежуточным риском по

сравнению с больными с низким и высоким риском. Выявленный факт сочетался с ростом содержания самого белка, который был выше у пациентов с промежуточным риском.

Маркером агрессивного поведения опухоли является мутация *BRAF^{V600}*. В ранее проведенных исследованиях была отмечена активация ростовых и транскрипционных факторов при наличии данной мутации [15]. Однако это не было связано с изменением интенсивности процессов аутофагии. В ходе анализа распределения пациентов в зависимости от наличия мутации *BRAF^{V600}* отмечена связь наличия мутации с распределением пациентов на группы в зависимости от риска развития

рецидива ($p = 0,02$) (табл. 6). Ее присутствие отмечалось у пациентов с низким риском по критериям АТА. При этом в случае отсутствия мутации выявленные клинические и морфологические параметры опухоли свидетельствовали о наличии промежуточного и высокого риска развития рецидивов опухоли.

Прогнозирование исходов онкологических заболеваний и оценка безрецидивной и общей выживаемости больных является важной задачей в практической онкологии. Наибольшую информативную ценность для безрецидивной выживаемости имела экспрессия *ER-β* (1,09 у. е.), а для общей выживаемости – экспрессия *NF-κB p50* (1,07 у. е.). Следует отметить,

Таблица 4. Экспрессия рецепторов половых гормонов и регулирующих их факторов в ткани папиллярного рака щитовидной железы в зависимости от группы риска развития рецидивов по критериям Американской тиреологической ассоциации (American Thyroid Association, ATA), Me (Q_1 ; Q_3)

Table 4. Expression of sex hormones and their regulating factors in papillary thyroid cancer tissue depending on American Thyroid Association (ATA) Risk of Recurrence Classification, Me (Q_1 ; Q_3)

Показатель Parameter	Низкий риск Low risk	Промежуточный риск Intermediate risk	Высокий риск High risk
Brd-3α	0,55 (0,13; 1,63)*	2,35 (0,85; 4,00)*	0,38 (0,10; 5,66)**.#
AR	2,00 (0,67; 4,19)	1,12 (0,10; 2,65)	0,41 (0,03; 2,83)
ER-α	1,20 (0,45; 5,68)	1,64 (0,09; 5,92)	0,77 (0,06; 1,32)
ER-β	1,59 (0,07; 15,45)	1,24 (0,50; 6,70)	1,00 (0,13; 16,67)
TRIM16	0,97 (0,24; 22,24)	0,45 (0,04; 2,29)	1,73 (0,04; 12,97)

*Значимость различий по сравнению с пациентами с низким риском развития рецидивов, ($p < 0,05$) (парное сравнение с использованием критерия Манна–Уитни). **Значимость различий по сравнению с пациентами с промежуточным риском развития рецидивов ($p < 0,05$) (парное сравнение с использованием критерия Манна–Уитни). #Значимые различия, выявленные непараметрическим дисперсионным анализом с применением критерия Краскела–Уоллиса ($p < 0,05$).

Примечание. ER-α – рецептор эстрогена α; ER-β – рецептор эстрогена β.

*Significant differences compared to patients with low recurrence risk ($p < 0.05$) (pairwise comparison using the Mann–Whitney test). **Significant differences compared to patients with intermediate recurrence risk ($p < 0.05$) (pairwise comparison using the Mann–Whitney test). #Significant differences per non-parametric test of dispersion using the Kruskal–Wallis test ($p < 0.05$).

Note. ER-α – estrogen receptor α; ER-β – estrogen receptor β.

Таблица 5. Экспрессия РНК и содержание белка LC3B в ткани папиллярного рака щитовидной железы в зависимости от группы риска развития рецидивов по критериям Американской тиреологической ассоциации (American Thyroid Association, ATA), Me (Q_1 ; Q_3)

Table 5. Expression RNA and levels of LC3B protein in papillary thyroid cancer tissue depending on American Thyroid Association (ATA) Risk of Recurrence Classification, Me (Q_1 ; Q_3)

Показатель Parameter	Низкий риск Low risk	Промежуточный риск Intermediate risk	Высокий риск High risk
Экспрессия LC3B, у. е. LC3B expression, arbitrary units	0,00 (0,00; 0,16)	0,56 (0,03; 11,45)*	0,02 (0,02; 0,03)**
Белок LC3B, % неизменной ткани LC3B protein, % healthy tissue	137,57 (78,27; 152,30)	151,00 (132,04; 185,00)*	147,50 (141,00; 154,00)#

*Значимость различий по сравнению с пациентами с низким риском развития рецидивов ($p < 0,05$) (парное сравнение с использованием критерия Манна–Уитни). **Значимость различий по сравнению с пациентами с промежуточным риском развития рецидивов ($p < 0,05$) (парное сравнение с использованием критерия Манна–Уитни). #Значимые различия, выявленные непараметрическим дисперсионным анализом с применением критерия Краскела–Уоллиса ($p < 0,05$).

*Significant differences compared to patients with low recurrence risk ($p < 0.05$) (pairwise comparison using the Mann–Whitney test). **Significant differences compared to patients with intermediate recurrence risk ($p < 0.05$) (pairwise comparison using the Mann–Whitney test). #Significant differences per non-parametric test of dispersion using the Kruskal–Wallis test ($p < 0.05$).

что пороговый уровень вышеуказанных показателей сопоставим со стадиями онкологического процесса. Выявленные различия в группах статистически незначимы, что позволило проанализировать выживаемость больных с учетом выбранного уровня показателей в ткани опухоли (рис. 1, 2).

Таблица 6. Распределение пациентов с разным риском развития рецидивов в зависимости от наличия мутации $BRAF^{V600}$ в опухоли, согласно данным Американской тиреодологической ассоциации (American Thyroid Association, ATA)

Table 6. Distribution of patients with different recurrence risk per presence of $BRAF^{V600}$ mutation in tumor per American Thyroid Association (ATA) data

Риск Risk	Дикий тип гена, абс. (%) Wild type gene, abs. (%)	Мутация $BRAF^{V600}$, абс. (%) $BRAF^{V600}$ mutation, abs. (%)
Низкий Low	8 (17,4)	18 (45)
Промежуточный Intermediate	20 (43,5)	12 (30)
Высокий High	18 (39,1)	10 (25)

ОБСУЖДЕНИЕ

Молекулярные особенности опухоли играют большую роль в механизмах прогрессирования заболевания. Особенности сигнального пути АКТ/mTOR связаны с распространением заболевания и риском развития рецидивов, что наиболее выражено у пациентов с мутацией $BRAF^{V600}$ [15]. Выявлено увеличение экспрессии c-RAF и снижение уровня мРНК 4EBP1 при промежуточном и высоком рисках развития рецидивов по шкале ATA, что, вероятно, обусловлено ролью сигнального каскада MAPK в прогрессировании папиллярного РЩЖ [22]. Гиперэкспрессия данного сигнального пути отмечена в тканях опухолей с мутацией $BRAF^{V600E}$ [14], являющейся маркером агрессивного роста опухоли. Стоит отметить, что данная мутация выявлена у пациентов с низким риском развития рецидивов заболевания. Данное расхождение, вероятно, связано с активацией других универсальных процессов онкогенеза, детерминированных иными значимыми мутациями [2], однако способных влиять на биологическое поведение опухоли, в частности на аутофагию [17]. Так, у пациентов с высоким и промежуточным риском возникновения рецидивов отмечались высокие уровни мРНК и белкового продукта LC3B, что может быть ассоциировано с агрессивностью заболевания.

Следовательно, клинические и морфологические маркеры не всегда достоверно позволяют оценить риск развития рецидивов заболевания, что особенно выражено у пациентов с промежуточным прогнозом. Биологические особенности опухоли у больных с промежуточным и высоким риском развития рецидивов

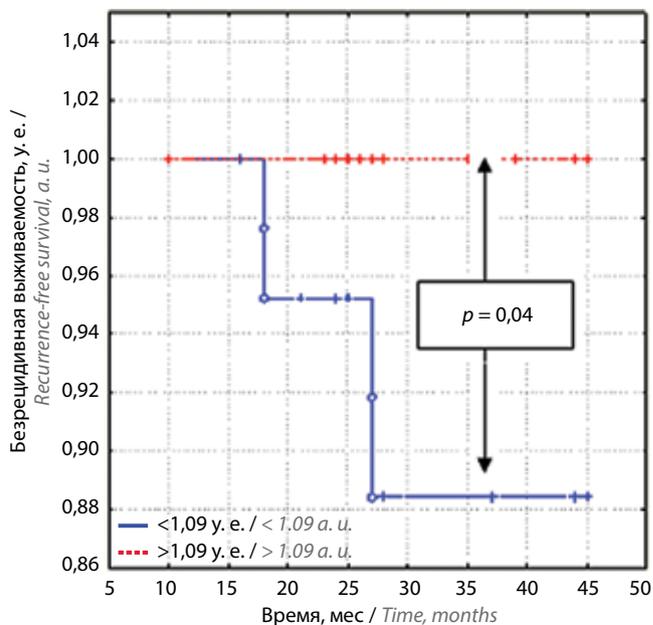


Рис. 1. Безрецидивная выживаемость больных папиллярным раком щитовидной железы в зависимости от порогового уровня экспрессии рецептора эстрогена β , равного 1,09 у. е.

Fig. 1. Recurrence-free survival of patients with papillary thyroid cancer depending on the threshold level of estrogen receptor β expression of 1.09 a. u.

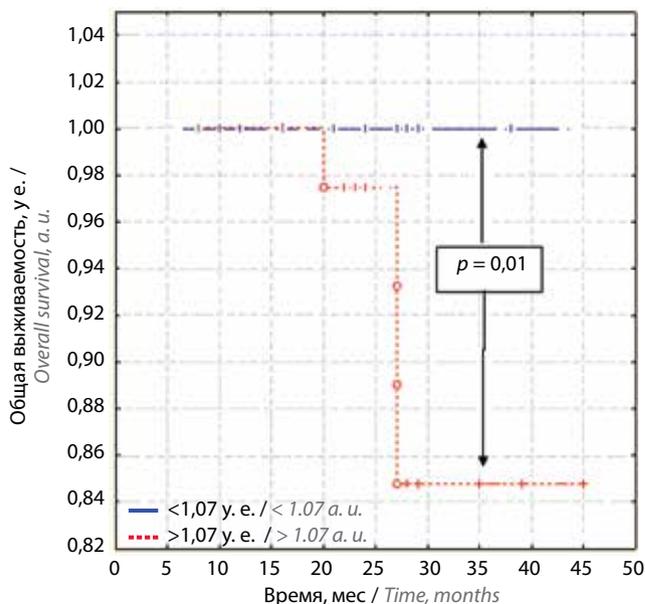


Рис. 2. Общая выживаемость больных папиллярным раком щитовидной железы в зависимости от порогового уровня экспрессии $NF-\kappa B$ p50, равного 1,07 у. е.

Fig. 2. Overall survival of patients with papillary thyroid cancer depending on the threshold level of $NF-\kappa B$ p50 expression of 1.07 a. u.

в отсутствие мутации, вероятно, связаны с активацией аутофагии.

Знание особенностей гормональной рецепции и экспрессии транскрипционных факторов способно стать ключевым в прогнозировании исхода заболевания. Это подтверждается при оценке прогностической способности изучаемых молекулярных маркеров в отношении безрецидивной и общей выживаемости. Так,

высокие уровни экспрессии ER- β ($>1,09$ у. е.) были отмечены у пациентов без рецидивов опухоли в течение 3 лет после хирургического лечения. Известно, что ER- β относится к онкосупрессорам. Он снижает пролиферативную активность опухоли в отличие от рецептора эстрогена α (ER- α) [23] и обеспечивает лучшие показатели безрецидивной выживаемости.

При этом высокая экспрессия NF- κ B p50 ($>1,07$ у. е.) была ассоциирована с низкими показателями общей выживаемости, что объясняется ролью белка в многочисленных процессах онкогенеза. В работе С. Giuliani и соавт. (2018) обоснована роль NF- κ B p50 в развитии более агрессивных форм опухолей щитовидной

железы [24], что согласуется с результатами проведенного исследования.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, выявлены дополнительные молекулярные маркеры, ассоциированные с повышенным риском развития рецидивов опухоли. Изучение экспрессии c-RAF и 4EBP1 при условии отсутствия мутантного белка b-RAF совместно с клиническими и морфологическими параметрами опухоли позволяет оценить риск развития рецидивов. Экспрессия ER- β и NF- κ B p50 ассоциирована с безрецидивной и общей выживаемостью больных с папиллярным РЩЖ.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Shrestha B.L., Кс А.К., Rajbhandari P. et al. Does the preoperative neutrophil-to-lymphocyte ratio and platelet-to-lymphocyte ratio associate with clinic-pathological characteristics in papillary carcinoma of thyroid. *Kathmandu Univ Med J (KUMJ)* 2021;19(74):225–9. DOI: 10.1097/MD.0000000000005079
- Lewiński A., Adamczewski Z. Papillary thyroid carcinoma: a cancer with an extremely diverse genetic background and prognosis. *Pol Arch Intern Med* 2017;127(6):388–9. DOI: 10.20452/pamw.4058
- Haugen B.R., Alexander E.K., Bible K.C. et al. 2015 American Thyroid Association Management Guidelines for Adult Patients with Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer: The American Thyroid Association Guidelines Task Force on Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer. *Thyroid* 2016;26(1): 1–133. DOI: 10.1089/thy.2015.0020
- Lindfors H., Ihre Lundgren C., Zedenius J. et al. The clinical significance of lymph node ratio and Ki-67 expression in papillary thyroid cancer. *World J Surg* 2021;45(7):2155–64. DOI: 10.1007/s00268-021-06070-y
- Täreb D., Baumstarck-Barrau K., Sebag F. et al. Health-related quality of life in thyroid cancer patients following radioiodine ablation. *Health Qual Life Outcomes* 2015;9:33. DOI: 10.1186/1477-7525-9-33
- Araque K.A., Gubbi S., Klubo-Gwiedzinska J. Updates on the management of thyroid cancer. *Horm Metab Res* 2020;52(8): 562–77. DOI: 10.1055/a-1089-7870
- Liu M., Khushbu R.A., Chen P. et al. Comprehensive analysis of prognostic alternative splicing signature reveals recurrence predictor for papillary thyroid cancer. *Front Oncol* 2021;11:705929. DOI: 10.3389/fonc.2021.705929
- Wen S., Luo Y.I., Wu W. et al. Identification of lipid metabolism-related genes as prognostic indicators in papillary thyroid cancer. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 2021;53(12):1579–89. DOI: 10.1093/abbs/gmab145
- Lin R., Fogarty C.E., Ma B. et al. Identification of ferroptosis genes in immune infiltration and prognosis in thyroid papillary carcinoma using network analysis. *BMC Genomics* 2021;22(1):576. DOI: 10.1186/s12864-021-07895-6
- Qin R., Li C., Wang X. et al. Identification and validation of an immune-related prognostic signature and key gene in papillary thyroid carcinoma. *Cancer Cell Int* 2021;21(1):378. DOI: 10.1186/s12935-021-02066-9
- Ruchong P., Haiping T., Xiang W. et al. A five-gene prognostic nomogram predicting disease-free survival of differentiated thyroid cancer. *Dis Markers* 2021;2021:5510780. DOI: 10.1155/2021/5510780
- Wan B., Deng P., Dai W. et al. Association between programmed cell death ligand 1 expression and thyroid cancer: a meta-analysis. *Medicine (Baltimore)* 2021;100(14):e25315. DOI: 10.1097/MD.00000000000025315
- Póvoa A.A., Teixeira E., Bella-Cueto M.R. et al. Genetic determinants for prediction of outcome of patients with papillary thyroid carcinoma. *Cancers (Basel)* 2021;13(9):2048. DOI: 10.3390/cancers13092048
- Pappa T., Ahmadi S., Marqusee E. et al. Oncogenic mutations in PI3K/AKT/mTOR pathway effectors associate with worse prognosis in *BRAFV600E*-driven papillary thyroid cancer patients. *Clin Cancer Res* 2021;27(15):4256–64. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-21-0874
- Spirina L.V., Chizhevskaya S.Y., Kovaleva I.V. et al. The association of the *BRAF-V600E* mutation with the expression of the molecular markers in the primary tumor and metastatic tissue in papillary thyroid cancer. *Asian Pac J Cancer Prev* 2021;22(7):2017–24. DOI: 10.31557/APJCP.2021.22.7.2017
- Satyavarapu E.M., Das R., Mandal C. et al. Autophagy-independent induction of LC3B through oxidative stress reveals its non-canonical role in anoikis of ovarian cancer cells. *Cell Death Dis* 2018;9(10):934. DOI: 10.1038/s41419-018-0989-8
- Gao P., Hao F., Dong X. et al. The role of autophagy and Beclin-1 in radiotherapy-induced apoptosis in thyroid carcinoma cells. *Int J Clin Exp Pathol* 2019;12(3):885–92.
- Kim H.M., Kim E.S., Koo J.S. Expression of autophagy-related proteins in different types of thyroid cancer. *Int J Mol Sci* 2017;18(3):540. DOI: 10.3390/ijms18030540
- Schwertheim S., Theurer S., Jastrow H. et al. New insights into intranuclear inclusions in thyroid carcinoma: Association with autophagy and with *BRAFV600E* mutation. *PLoS One* 2019;14(12):e0226199. DOI: 10.1371/journal.pone.0226199
- Xu Q., Gao S., Miao J. The relationship between autophagy-related genes and the staging and prognosis of thyroid cancer: a bioinformatics analysis. *Gland Surg* 2021;10(8):2511–27. DOI: 10.21037/gs-21-480
- Haugen B.R., Alexander E.K., Bible K.C. et al. 2015 American Thyroid Association Management Guidelines for Adult Patients with Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer. *Thyroid* 2016;26(1):1–133. DOI: 10.1089/thy.2015.0020
- Abdullah M.I., Junit S.M., Ng K.L. et al. Papillary thyroid cancer: genetic alterations and molecular biomarker investigations. *Int J Med Sci* 2019;16(3):450–60. DOI: 10.7150/ijms.29935
- Božović A., Mandušić V., Todorović L. et al. Estrogen receptor beta: the promising biomarker and potential target in metastases. *Int J Mol Sci* 2021;22(4):1656. DOI: 10.3390/ijms22041656
- Giuliani C., Bucci I., Napolitano G. The role of the transcription factor nuclear factor-kappa b in thyroid autoimmunity and cancer. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2018;9:471. DOI: 10.3389/fendo.2018.00471

Вклад авторов

Л.В. Спирина: написание текста статьи, обзор публикаций по теме статьи;
И.В. Ковалева: редактирование статьи и составление списка литературы;
С.Ю. Чижевская: получение данных для анализа, анализ полученных данных;
И.В. Кондакова: редактирование;
Е.Л. Чойнзонов: разработка концепции, утверждение окончательного варианта статьи.

Authors' contribution

L.V. Spirina: article writing, review of publications on the topic of the article;
I.V. Kovaleva: article editing and compiling a list of references;
S.Yu. Chizhevskaya: obtaining data for analysis, analysis of the data obtained;
I.V. Kondakova: editing;
E.L. Choyznzonov: development of the concept, approval of the final version of the article.

ORCID авторов / ORCID of authors

Л.В. Спирина / L.V. Spirina: <https://orcid.org/0000-0002-5269-736X>
И.В. Ковалева / I.V. Kovaleva: <https://orcid.org/0000-0003-2964-9041>
С.Ю. Чижевская / S.Yu. Chizhevskaya: <https://orcid.org/0000-0003-2974-4778>
И.В. Кондакова / I.V. Kondakova: <https://orcid.org/0000-0003-0907-4615>
Е.Л. Чойнзонов / E.L. Choyznzonov: <https://orcid.org/0000-0002-3651-0665>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Исследование проведено без спонсорской поддержки.

Funding. The study was performed without external funding.

Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики

Протокол исследования одобрен локальным этическим комитетом Научно-исследовательского института онкологии ФГБНУ «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук».

Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании.

Compliance with patient rights and principles of bioethics

The study protocol was approved by the biomedical ethics committee of Scientific Research Institute of Oncology of the Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences.

All patients gave written informed consent to participate in the study.