

ИСАЕВА
Анна Владимировна

**РОЛЬ β -КАТЕНИНА В МЕХАНИЗМАХ ОПУХОЛЕВОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ
ТИРЕОИДНОГО ЭПИТЕЛИЯ**

14.03.03 – патологическая физиология

03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Работа выполнена в Государственном бюджетном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (г. Томск).

Научные руководители:

доктор медицинских наук, профессор

**Рязанцева Наталья
Владимировна**

доктор медицинских наук

**Зима Анастасия
Павловна**

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук, профессор,
заведующий лабораторией молекулярно-
генетических исследований терапевтических
заболеваний Федерального государственного бюджетного
научного учреждения «Научно-исследовательский институт
терапии и профилактической медицины» (г. Новосибирск)

**Максимов Владимир
Николаевич**

доктор медицинских наук, доцент кафедры
педиатрии и неонатологии ФПК и ПП Государственного
бюджетного образовательного учреждения высшего
профессионального образования «Уральский государственный
медицинский университет» Министерства здравоохранения
Российской Федерации (г. Екатеринбург)

**Княев Алексей
Васильевич**

Ведущая организация: Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Саратовский государственный медицинский университет имени В.И. Разумовского» Министерства здравоохранения Российской Федерации (г. Саратов)

Защита состоится «_»_____ 2016 г. в __ часов на заседании диссертационного совета Д 208.096.01 Сибирского государственного медицинского университета (634050, г. Томск, Московский тракт, д. 2)

С диссертацией можно ознакомиться в научно-медицинской библиотеке ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России и на сайте <http://www.ssmu.ru/>

Автореферат разослан «_»_____ 2016 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета

Петрова Ирина Викторовна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Узловые образования щитовидной железы (ЩЖ) среди заболеваний эндокринной системы являются одной из наиболее частых диагностируемых патологий у взрослых. Они встречаются в общей популяции с частотой 4-7% [Welker M.J.O. et al., 2003; Nikiforov Y.E. et al., 2009; Maia F.F.R. et al., 2012; Naugen B.R. et al., 2016]. Рак щитовидной железы, несмотря на свое минимальное представительство среди узловых образований щитовидной железы, занимает лидирующую позицию среди злокачественных эндокринных опухолей. Ежегодно регистрируется примерно 1-1,5% новых случаев рака щитовидной железы среди других онкологических заболеваний. Кроме того, наблюдается тенденция к росту этого показателя на всех континентах [Curado M.P. et al., 2007; Kilfoy B.A. et al., 2009; Jemal A. et al., 2011; Naugen B.R. et al., 2016]. Основываясь на современных данных, рак щитовидной железы занимает пятое место среди злокачественных опухолей у женщин [Pellegriti G. et al., 2013].

Особенно актуальным и важным вопросом, как для пациента, так и для врача является определение риска малигнизации выявленного узлового образования щитовидной железы.

Опухолевая трансформация представляет собой сложный многоэтапный процесс, приводящий к злокачественной реорганизации нормальных клеток. В настоящее время известны различные механизмы, лежащие в ее основе: активация протоонкогенов, инактивация антионкогенов, нарушение внутриклеточных сигнальных путей, торможение процессов программированной гибели клетки [Галицкий В.А., 2003; Nanahan D. et al., 2011; Куликов В.А. и соавт., 2014; Чикина А.С. и соавт., 2014]. Несмотря на бурное развитие молекулярной онкологии, механизмы опухолевой трансформации тиреоидного эпителия остаются на данный момент до конца не раскрытыми [Tomei S. et al., 2012; Zane M. et al., 2016].

В настоящее время предприняты попытки идентификации молекулярных механизмов, а также генетических перестроек, приводящих к нарушению процессов пролиферации, дифференцировки, программированной клеточной гибели при опухолевой трансформации эпителия щитовидной железы [Nikiforov Y.E. et al., 2009; Maia F.F.R. et al., 2012; Rodrigues H.G.C. et al., 2012; Zane M. et al., 2016]. Так, в 70% случаях папиллярного рака определяются точечные мутации в генах BRAF или RAS, или перестройка RET/PTC [Cohen Y. et al., 2003; Xing M. et al., 2004]. При фолликулярном раке выявляются мутации RAS генов, транслокация PAX8/PPAR γ [Howell G.M. et al., 2013]. Анапластический рак щитовидной железы может сопровождаться самыми различными молекулярно-генетическими нарушениями, в частности, изменениями эффекторных генов и основных участников MAPK, PI3K/Akt и Wnt/ β -катенин сигнальных путей [Чухловын А.Б. и соавт., 2013; Ragazzi M. et al., 2014].

Интерес представляет тот факт, что большая часть из известных молекулярных событий при опухолевой трансформации тиреоидного эпителия связаны с работой канонического Wnt сигнального пути, главным компонентом которого является многофункциональный белок β -катенин [Castellone M.D. et al., 2009; Zeller E. et al., 2013; Chien A.J. et al., 2014]. Wnt/ β -катенин сигнальный путь активируется за счет взаимодействия Wnt лиганда с мембранными рецепторами (Frizzled, LRP5/6 (Low density lipoprotein receptor-related protein 5/6), Dishevelled). Это приводит цитоплазматический деструкционный комплекс в неактивное состояние с накоплением стабильного β -катенина в цитоплазме и его транслокацией в ядро с активацией транскрипции генов-мишеней. В рамках Wnt сигнального каскада β -катенин реализует

свою транскрипционную/сигнальную функцию, которая определяет его участие в механизмах пролиферации, дифференцировки клеток, поддержания тканевого гомеостаза. Другая важная функция β -катенина – адгезионная, реализуемая за счет формирования связей с цитоплазматическим доменом E-кадгерина. Нарушения адгезионной и транскрипционной функции β -катенина выявлены при различных вариантах неоплазий (колоректальном раке, меланоме, раке предстательной железы, раке молочной железы, гепатоцеллюлярной карциноме) [Polakis P., 2000; Valkenburg K.C. et al., 2011]. Это определяет актуальность исследования функционального статуса β -катенина в клетках тиреоидного эпителия узловых образований щитовидной железы доброкачественной и злокачественной природы.

Степень разработанности темы исследования. Процесс пролиферации клеток тиреоидного эпителия находится под влиянием функционирования Wnt/ β -катенин сигнального пути [Rao A.S. et al., 2005]. Роль β -катенина в механизмах опухолевой трансформации изучена недостаточно (в основном - низкодифференцированный и анапластический рак щитовидной железы). Так, было установлено, что в 66% случаев анапластического рака и 25% низкодифференцированного рака определяются точечные мутации в 3-м экзоне гена *CTNNB1* (ген β -катенина) [Garcia-Rostan G. et al., 2001]. При этом в клетках анапластического рака часто обнаруживают сочетанные мутации в различных регионах гена *CTNNB1*, что, возможно, отражает генетическую нестабильность в этом варианте рака щитовидной железы [Sastre-Perona A. et al., 2012]. Мутации были определены в консервативных Ser и Trp остатках β -катенина, что приводит к нарушению фосфорилирования белка, его стабилизации с последующей транслокацией в ядро и активацией транскрипции генов мишеней, в том числе, ответственных за пролиферацию клеток (*CCND1*, *MYC*) [Kurihara T. et al., 2004].

Данные литературы указывают на то, что для клеток злокачественных опухолей щитовидной железы характерно ослабление мембранной экспрессии β -катенина. Ряд исследователей выявляют прямую корреляцию между снижением мембранной экспрессии β -катенина и стадией опухолевого процесса, включая наличие отдаленных метастазов [Garcia-Rostan G. et al., 2001; Ishigaki K. et al., 2002].

Результаты анализа экспрессии β -катенина в ткани дифференцированных форм рака щитовидной железы и доброкачественных процессов носят неоднозначный характер [Garcia-Rostan G. et al., 2001; Sastre-Perona A. et al., 2012]. Сравнительный анализ реализации адгезионной и транскрипционной функции β -катенина при патологии щитовидной железы различной природы позволит расширить наши знания о молекулярных перестройках в клетках тиреоидного эпителия, приводящих к их опухолевой реорганизации.

Цель исследования: установить роль дисбаланса адгезионной и транскрипционной/сигнальной функций β -катенина в механизмах опухолевой трансформации клеток тиреоидного эпителия.

Задачи исследования:

1. Оценить экспрессию мРНК гена *CTNNB1* и белка β -катенина в клетках тиреоидного эпителия при узловой патологии щитовидной железы (коллоидный узловой зоб, аутоиммунный тиреоидит, фолликулярная аденома, папиллярный рак).

2. Дать сравнительный анализ экспрессии мРНК гена *CDH1* и белка E-кадгерина в клетках тиреоидного эпителия при различных вариантах узловой патологии щитовидной железы (коллоидный узловой зоб, аутоиммунный тиреоидит, фолликулярная аденома, папиллярный рак).

3. Оценить уровень экспрессии мРНК генов-мишеней β -катенина (*CCND1*, *MYC*) в клетках тиреоидного эпителия при различных вариантах узловой патологии щитовидной железы (коллоидный узловой зоб, аутоиммунный тиреоидит, фолликулярная аденома, папиллярный рак).

4. Выявить особенности и общие закономерности соотношения адгезионной и транскрипционной/сигнальной функций β -катенина при доброкачественных и злокачественных вариантах узловой патологии щитовидной железы.

Научная новизна. Впервые дана комплексная сравнительная оценка адгезионной и транскрипционной/сигнальной функций β -катенина в клетках тиреоидного эпителия при доброкачественном неопухоловом процессе (коллоидный узловой зоб, аутоиммунный тиреоидит), доброкачественном опухолевом процессе (фолликулярная аденома) и злокачественном опухолевом процессе (папиллярный рак) щитовидной железы. На основании полученных данных впервые были построены патогенетические модели особенностей реализации адгезионной и транскрипционной/сигнальной функций β -катенина. Было установлено, что сочетание активации Wnt/ β -катенин сигнального пути и ослабление экспрессии комплекса E-кадгерин/ β -катенин на поверхности клеток тиреоидного эпителия узлового образования щитовидной железы сопряжено с их злокачественной трансформацией; преобладание адгезионной функции β -катенина характерно для доброкачественного процесса в щитовидной железе.

Впервые в жидкостных образцах пунктата узлового образования щитовидной железы использован подход обогащения образцов эпителиальными клетками методом магнитной сепарации по эпителиальному маркеру EpCAM (CD326). Использование такого методологического подхода позволяет изолировать клетки определенной популяции, не влияя на их целостность и сохранность, а также дифференцированно оценивать экспрессию мРНК генов только в эпителиальных клетках.

Теоретическая и практическая значимость. Идентификация патогенетического значения дисбаланса адгезионной и транскрипционной/сигнальной функции β -катенина расширяет имеющиеся на сегодняшний день фундаментальные представления о механизмах опухолевой трансформации клеток тиреоидного эпителия. Результаты выполненного исследования могут быть положены в основу разработки новых подходов к предоперационной диагностике злокачественной природы узлового образования щитовидной железы, патогенетически обоснованной таргетной терапии, направленной на регуляцию баланса функций β -катенина.

Проведена сравнительная оценка методов традиционной и жидкостной цитологии в дифференциальной диагностике узловой патологии щитовидной железы и установлена чувствительность данных методов морфологической оценки пунктатов щитовидной железы.

Методология и методы исследования:

В работе использованы высокоинформативные методы, выполненные на базе научно-образовательного центра молекулярной медицины ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России и кафедры клинической лабораторной диагностики ГБОУ ДПО РМАПО Минздрава России.

Материалом служили биоптаты узловых образований щитовидной железы, полученные путем тонкоигольной аспирационной биопсии (ТАБ) под контролем УЗИ у пациентов с узловой патологией щитовидной железы.

Методы исследования: клинический блок исследований, морфологический анализ (цитологический, иммуноцитохимический методы исследования), оценка адгезионной функции β -катенина (анализ экспрессии белков β -катенина и E-кадгерина методом иммуноцитохимии с оценкой интенсивности и преимущественной внутриклеточной

локализации; оценка уровня экспрессии мРНК генов β -катенина (*CTNNB1*) и Е-кадгерина (*CDH1*) методом РТ-ПЦР), оценка транскрипционной/сигнальной функции β -катенина (анализ уровня экспрессии генов-мишеней β -катенина – *CDH1*, *CCND1*, *MYC* методом РТ-ПЦР; определение методом иммуноцитохимии преимущественной локализации (ядерная, цитоплазматическая, мембранная) белка β -катенина), статистическая обработка данных (описательная статистика, корреляционный анализ, сравнение количественных и качественных признаков в двух и более группах).

Основные методы исследования:

1. Получение суспензии клеток ткани щитовидной железы путем ТАБ узлового образования под ультразвуковым контролем.

2. Цитологический анализ препаратов с морфологической диагностикой по категориям классификации Bethesda традиционным и жидкостным методом.

3. Определение содержания белка β -катенина, Е-кадгерина в жидкостных образцах, полученных путем ТАБ щитовидной железы, методом иммуноцитохимии с оценкой интенсивности иммунной окраски и внутриклеточной локализации белка с использованием соответствующих моноклональных антител (протокол фирмы производителя) с применением микроскопа «AxioStar plus» (Carl Zeiss, Германия).

4. Выделение мРНК, оценка экспрессии мРНК генов *CTNNB1*, *CDH1*, *CCND1*, *MYC* методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени в полученных образцах ткани щитовидной железы после селективного обогащения жидкостных образцов клетками фолликулярного эпителия методом магнитной сепарации по маркеру EpCAM (CD326).

Положения, выносимые на защиту:

1. В клетках тиреоидного эпителия при злокачественном опухолевом процессе (папиллярный рак) происходит активация транскрипционной/сигнальной и подавление адгезионной функций β -катенина. При доброкачественном опухолевом процессе в щитовидной железе (фолликулярная аденома) в эпителиальных клетках β -катенин реализует свой бифункциональный статус: наряду с адгезионной функцией определяется его транскрипционная/сигнальная активность.

2. В клетках узлового образования щитовидной железы доброкачественной природы в случае коллоидного узлового зоба реализуется адгезионная функция β -катенина, при этом Wnt/ β -катенин сигнальный путь находится в неактивном состоянии; при аутоиммунном тиреоидите в эпителиальных клетках происходит активация транскрипционной/сигнальной функции β -катенина с ослаблением его адгезионной функции.

Апробация и внедрение результатов работы. Результаты проведенных исследований представлены и обсуждены на XVI международной научно-практической конференции «Научная дискуссия: Вопросы медицины» (Москва, 2013), VII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Молекулярная диагностика 2014» (Москва, 2014), 18-ой международной Пушкинской школе-конференции молодых ученых "Биология - наука 21 века"» (Пушино, 2014), XVIII Всероссийском онкологическом конгрессе (Москва, 2014), международной молодежной биотехнологической школе «Биотехнология: от бактериофагов до вакцин» (Барнаул, 2014), V Международной научной конференции «Актуальные проблемы биохимии и бионанотехнологии» (Казань, 2014), XX всероссийской научно-практической конференции «Достижения и перспективы развития лабораторной службы России» (Москва, 2015), 39th European Congress of Cytology (Милан, 2015), XI съезде Ассоциации клинических цитологов России (Звенигород, 2015), конференции

«Молекулярная онкология: итоги и перспективы» (Москва, 2015), международной конференции «Физика рака: трансдисциплинарные проблемы и клинические применения» (Томск, 2016).

Результаты исследования положены в основу проекта «Разработка и внедрение комплекса молекулярных маркеров дифференциальной диагностики фолликулярных опухолей щитовидной железы» в конкурсе научно-инновационных проектов в рамках общероссийского научно-практического мероприятия – Эстафета «Вузовская наука - 2013» в номинации «Перспективная инновационная идея» в профильной платформе «Эндокринология» (Томск, 2013; Москва, 2013). Исследования поддержаны Грантом президента для поддержки молодых докторов наук (государственный контракт № МД-1233.2012.7). Основные положения и выводы диссертационной работы используются в учебном процессе кафедры патофизиологии (раздел «Патофизиология опухолевого роста») ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России.

Автор принимал непосредственное участие в планировании исследования, разработке его методических основ, анализе литературы. Автором проведены исследования, статистическая обработка полученных данных и интерпретация результатов.

Личное участие автора. Автор принимал непосредственное участие в планировании исследования и разработке методического подхода, анализе литературы. Автором проведены все исследования, статистическая обработка полученных данных и интерпретация результатов.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 16 работ, из них – 4 статьи в центральных рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК РФ.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 145 страницах машинописного текста и состоит из введения, четырех глав, выводов и списка литературы, включающего 336 источников, из них – 10 отечественных и 326 зарубежных авторов. Работа иллюстрирована 12 таблицами и 25 рисунками.

ХАРАКТЕРИСТИКА МАТЕРИАЛА И МЕТОДОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе приведены результаты обследования 557 пациентов с узловыми образованиями щитовидной железы (49 мужчин и 508 женщин) в возрасте от 20 до 88 лет. Все лица, участвовавшие в исследовании, дали информированное согласие. Разрешение на проведение исследования было получено в локальном этическом комитете ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России (№3220 от 25.02.13 г.). Критериями включения пациента в исследование явились: узловое образование щитовидной железы более 1 см в диаметре; узловое образование щитовидной железы менее 1 см в диаметре с ультразвуковыми признаками злокачественного роста (микрокальцинаты, гипоехогенность, нечеткость контуров, увеличение размеров, выявляемое при динамическом УЗИ); согласие пациента участвовать в исследовании и способность дать письменное информированное согласие; отсутствие хронических воспалительных заболеваний, онкологических, наследственных и психических болезней, алкогольной и наркотической зависимости.

Материалом служили биоптаты узловых образований щитовидной железы, полученные путем ТАБ под контролем УЗИ. Приготовление микропрепаратов осуществлялось одновременно традиционным методом (взятие материала на стекло с последующей окраской по Романовскому-Гимзе) и методом жидкостной цитологии (приготовление цитологических препаратов из жидкой клеточной суспензии методом центрифугирования, с последующей окраской по Папаниколау). Обязательным

критерием включения материала в экспериментальный блок исследований явилось полное совпадение цитологического заключения (по результатам традиционной цитологии и анализа жидкостной цитологии) с гистологическим диагнозом. На основании этого условия для идентификации роли β -катенина в механизмах опухолевой трансформации тиреоидного эпителия в соответствии со сформулированными в диссертационной работе задачами нами было проведено обследование 88 пациентов (77 женщин и 11 мужчин, средний возраст - 55 лет) с узловыми образованиями щитовидной железы различной природы: 33 пациента с коллоидным узловым зобом, 13 пациентов с диагнозом фолликулярная аденома, 29 пациентов с папиллярным раком (согласно классификации pTNM (UICC/AJCC, 6-я редакция, 2002 год), у 12-ти пациентов была установлена I клиническая стадия (pT1N0M0), у 5-ти пациентов – II стадия (pT2N0M0), у 9-ти пациентов – III стадия (4 пациента – pT3N1aM0, 4 пациентов – pT3N0M0, 1 пациент – pT2N1aM0), у 3-х пациентов – IV стадия (2 пациента – pT2N1bM0, 1 пациента – pT4N0M0)) и 13 пациентов с аутоиммунным тиреоидитом. Во всех включенных в исследование группах пациентов диагноз был установлен на основании гистологической оценки операционного материала, а также результатов комплексного клинического и лабораторно-инструментального обследования.

Экспериментальный блок исследования проводился на базе научно-образовательного центра молекулярной медицины ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России (научный руководитель – академик РАН, д-р. мед. наук, профессор В.В. Новицкий), кафедры клинической лабораторной диагностики ГБОУ ДПО РМАПО Минздрава России (зав. кафедрой – д-р. мед. наук, профессор В.В. Долгов).

Распределение обследованных пациентов по группам в соответствии с использованными методами исследования представлено в таблице 1.

В нашем исследовании, наряду с традиционной цитологической диагностикой, был использован метод жидкостной цитологии. Отличие жидкостной цитологии от стандартного цитологического анализа заключается в том, что взятый материал помещался в жидкую стабилизирующую среду CYTO-FAST Solution (HOSPITEX DIAGNOSTICS, Италия). Далее материал в объеме 100 мкл наносился на адгезивное стекло (Menzel, Германия) с помощью цитоцентрифуги (Cellspin II (Tharmac, Германия)) в режиме - 5 мин при скорости вращения ротора 1 000 об/мин. Окрашивание по Папаниколау осуществляли на автоматическом приборе АФОМК-13-ПАП (ЭМКО, Россия), программа «EMCO-PAP-16» [Безруков А.В. и соавт., 2012].

Материал, получаемый в результате ТАБ узлового образования щитовидной железы, характеризуется клеточной неоднородностью, что затрудняет интерпретацию молекулярно-генетического анализа. Для преодоления данной проблемы было выполнено обогащение жидкостных образцов клетками фолликулярного эпителия методом магнитной сепарации с использованием моноклональных антител EpCAM (CD326) («Miltenyi Biotec GmbH», Германия) согласно протоколу фирмы.

Выделение мРНК из клеток щитовидной железы для оценки уровня экспрессии мРНК генов *CTNNB1*, *CDH1*, *CCND1*, *MYC* осуществляли сорбентно-колоночным методом (RNeasy Plus Mini Kit, QIAGEN, Германия). Реакцию обратной транскрипции проводили с использованием статистического праймера (N₉) и ДНК-зависимой РНК полимеразы (MMuLV-RT) («Promega», США). Полученный фрагмент ДНК амплифицировали методом ПЦР в режиме реального времени с использованием SYBR Green I («Molecular Probe», США) на амплификаторе Mini Opticon («Bio-Rad», США). Результаты выражали в отн. ед.

Таблица 1 – Распределение исследуемых групп пациентов в соответствии с использованными методами исследования

Методы исследования, общее число пациентов (n)	Группы обследованных лиц			
	Пациенты с КЗ	Пациенты с АИТ	Пациенты с ФА	Пациенты с ПР
Цитологическое исследование фолликулярного эпителия щитовидной железы (методом традиционной и жидкостной цитологии) на этапе дооперационной диагностики (n=541)	428	28	47	38
Гистологическая верификация диагноза (n=136)	43	28	28	37
Обогащение жидкостных образцов клетками фолликулярного эпителия методом магнитной сепарации по маркеру EpCAM (CD326) (n=88)	33	13	13	29
Оценка уровня мРНК генов <i>CTNNB1</i> , <i>CDH1</i> в клетках щитовидной железы при патологии методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (n=88)	33	13	13	29
Оценка экспрессии белка β -катенина в клетках эпителия щитовидной железы методом иммуноцитохимии (n=88)	33	13	13	29
Оценка экспрессии белка E-кадгерина в клетках эпителия щитовидной железы методом иммуноцитохимии (n=88)	33	13	13	29
Оценка уровня мРНК генов-мишеней β -катенина - <i>CCND1</i> , <i>MYC</i> в клетках щитовидной железы при патологии методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (n=88)	33	13	13	29

Примечание. КЗ – коллоидный узловой зоб, АИТ – аутоиммунный тиреоидит, ФА – фолликулярная аденома, ПР – папиллярный рак.

Для оценки экспрессии белков β -катенина и E-кадгерина в клетках эпителия щитовидной железы использовали иммуноцитохимический метод исследования с непрямым трехступенчатым принципом визуализации. Исследование проводили на монослойных цитологических препаратах, полученных методом жидкостной цитологии. В работе использовали моноклональные козы антитела к β -катенину («Abcam», Великобритания, разведение 1:250) и кроличьи антитела к E-кадгерину («RnD Systems», США, разведение 1:400). В качестве вторичных антител использовали вторичные биотинилированные анти-козы антитела (RnD Systems, США) и универсальный иммунопероксидазный полимер (анти-мышинный, анти-кроличий) системы детекции Histofine Simple Stain MAX PO (NICHIREI BIOSCIENCES INC., Япония). Для визуализации иммуноцитохимической реакции наносили хромоген ДАБ (3,3-диаминобензидин) (Histofine DAB-3S kit, NICHIREI BIOSCIENCES INC., Япония).

Иммуноцитохимическую реакцию оценивали качественно и количественно. Для всех маркеров определяли локализацию окрашивания в клетке (мембрана, цитоплазма, ядро). Для количественной оценки использовали модифицированную систему подсчета Histochemical score (H.S.), разработанную Mc Carthy с соавторами (1985 г.). Формула подсчета: $\text{Histochemical score} = \sum P(i) \times i$, где i – интенсивность окрашивания, выраженная в баллах (от 0 до 3), $P(i)$ – процент клеток, окрашенных с разной интенсивностью. Подсчет проводили на 200 клеток. Результат выражали следующим образом: от 0 до 10 – отрицательный результат, от 10 до 100 – слабоположительный, от 100 до 300 – положительный.

При оценке полученных данных использовали методы статистического описания и проверки статистических гипотез. Проверку нормальности распределения количественных показателей проводили с использованием критерия Шапиро-Уилка. Для каждой выборки вычисляли средневыборочные характеристики: медиану, первый и третий квартили. Для попарного анализа количественных признаков в независимых выборках использовали критерий Манна–Уитни с поправкой Бонферрони при уровне значимости $p < 0,05$. Для показателей, характеризующих качественные признаки, указывали абсолютное число и относительную величину в процентах. Статистическую значимость различий частоты встречаемости качественных признаков в группах проверяли с помощью критерия χ^2 Пирсона с поправкой Йетса, а также использовали двусторонний вариант точного критерия Фишера с уровнем значимости $p < 0,05$.

Центральные функции β -катенина реализуются, благодаря его вовлеченности в механизмы клеточной адгезии и сигнальной передачи в рамках Wnt сигнального каскада. Данные методы позволили нам определить функциональный статус бета-катенина в клетках тиреоидного эпителия.

Адгезионная функция реализуется мембранно-ассоциированным пулом β -катенина. Для оценки адгезионной функции β -катенина нами был выполнен анализ экспрессии белков E-кадгерина и β -катенина методом иммуноцитохимии в клетках фолликулярного эпителия щитовидной железы. Правомерность такого методологического подхода была ранее подтверждена экспериментальными работами на гистологическом материале [Vincan E., 2005]. Принципиально важным подходом являлось определение внутриклеточного распределения пула β -катенина по трем функциональным группам: нормальное мембранное иммунное окрашивание, пониженное мембранное иммунное окрашивание (сочетанная мембранная и цитоплазматическая локализация белка) и цитоплазматическое и/или ядерное иммунное окрашивание [Cho S.W. et al., 2014]. Такой подход позволил нам, по преимущественной локализации β -катенина, более четко определять преобладающий функциональный пул изучаемого нами белка. Кроме того, нами был выполнен анализ экспрессии мРНК генов *CTNNB1* и *CDH1*. Ген *CDH1* через опосредованный механизм является мишенью канонического Wnt каскада [Kolligs F.T. et al., 2002; Jamora C. et al., 2003], а значит данный подход также отражал транскрипционную активность β -катенина.

Сигнальную/транскрипционную функцию β -катенина оценивали путем анализа уровня экспрессии генов-мишеней – *CDH1*, *CCND1*, *MYC*, а также определяя методом иммуноцитохимии преимущественную локализацию (ядерная, цитоплазматическая, мембранная) β -катенина в клетках фолликулярного эпителия щитовидной железы. Аналогичный подход в анализе сигнальной/транскрипционной активности β -катенина был использован авторами [Behrens J. et al., 1996; Lin S.Y. et al., 2000; Nishimura I. et al., 2011; Bozkaya G. et al., 2012; Herbst A. et al., 2014].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Сравнительный анализ результатов методов традиционной и жидкостной цитологии в диагностике природы узлового образования щитовидной железы

Несмотря на то, что ТАБ занимает позицию золотого стандарта в диагностике природы узлового образования щитовидной железы, остаются вопросы соотношения цитологического и гистологического заключений [Schiro A.G., 2009; Lee M.J. et al., 2011; Maia F.F.R. et al., 2012]. В нашем исследовании из 557 пациентов, прошедших ТАБ ЩЖ, были прооперированы 136 (24,4%) пациентов. Нами было выполнено сопоставление гистологического диагноза и цитологических заключений, полученных традиционным и жидкостным методами. У 43 пациентов с гистологическим диагнозом коллоидный узловой зоб совпадение с предоперационным цитологическим заключением составило: методом традиционной цитологии - 76,7%, жидкостной цитологии – 79% случаев. Из 28-ми пациентов с подтвержденным диагнозом аутоиммунного тиреоидита соответствие диагноза по результатам традиционного цитологического исследования составило 53,6%, методом жидкостной цитологии – 46,4%. Цитологическое заключение фолликулярная аденома, как по результатам традиционного, так и жидкостного метода, практически в равнозначных случаях (50 и 46%, соответственно) было подтверждено гистологическим исследованием. Из 37-ми пациентов с диагнозом папиллярный рак традиционным цитологическим методом верно был заподозрен в 81% случаев, а методом жидкостной цитологии - в 78%. В проведенном нами исследовании чувствительность традиционного цитологического исследования составила 68,4%. Чувствительность жидкостного цитологического исследования – 65,4%. Таким образом, чувствительность методов находится на практически равных уровнях, но возможность использовать жидкостной материал для иммуноцитохимического, молекулярно-генетического и при необходимости повторного цитологического исследований определяется преимуществами жидкостной цитологии перед традиционным методом.

Реализация адгезионной функции β -катенина в клетках коллоидного узлового зоба

Исследование функционирования β -катенина в ткани коллоидного узлового зоба носит ограниченный характер. Преимущественно внимание исследователей обращено к анализу экспрессии E-кадгерина [Brabant G. et al., 1993; Werutsky G. et al., 2008; Ozolins A. et al., 2012]. Нами была выполнена оценка дополнительных параметров с целью определения преобладающей функции β -катенина при изучаемой патологии.

В группе пациентов с коллоидным узловым зобом уровень экспрессии мРНК гена *CTNNB1* составил 4,5 (2,4-5,52) отн. ед., что достоверно ниже по сравнению с данным показателем у пациентов с АИТ и фолликулярной аденомой и выше, чем у пациентов с папиллярным раком (рис. 1).

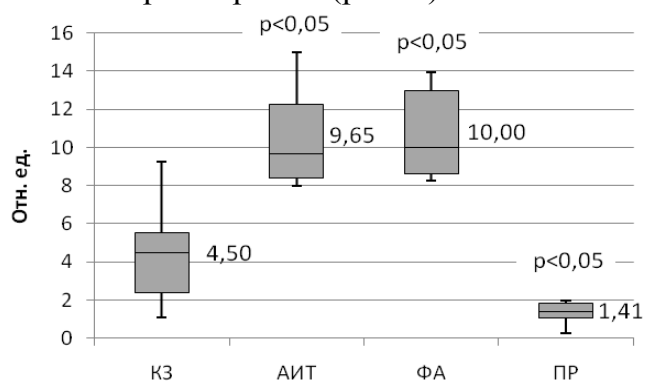


Рисунок 1 – Уровень экспрессии мРНК гена *CTNNB1*, Me(Q1-Q3). Указаны уровни достоверности по отношению к показателю в клетках коллоидного узлового зоба. Нозологическая форма узлового образования: КЗ – коллоидный узловой зоб, АИТ – аутоиммунный тиреоидит, ФА – фолликулярная аденома, ПР – папиллярный рак.

Известно, что между уровнем экспрессии мРНК и количеством соответствующего белка нет прямой корреляции [Tian, Q. et al., 2004; Lundberg E. et al., 2010; Schwanhausser B. et al., 2011; Schwanhausser B. et al., 2013]. Учитывая этот факт, нами был выполнен полуколичественный анализ экспрессии белка β -катенина методом иммуноцитохимии. У пациентов с коллоидным узловым зобом белок β -катенин либо отсутствовал в клетке (30,3%), либо определялась его слабая мембранная экспрессия (у 69,7% пациентов). Мембранная локализация β -катенина указывает на реализацию его адгезионной функции [Vincan E. Book, 2005].

Формирование адгезионных контактов между эпителиальными клетками в ЩЖ с участием β -катенина осуществляется за счет его взаимодействия с цитоплазматическим доменом E-кадгерина [Huber A.H. et al., 2001]. Во всех анализируемых нами случаях коллоидного узлового зоба определялась положительная мембранная иммуноцитохимическая экспрессия E-кадгерина (30,3% случаев – слабоположительная, 69,7% - положительная), что согласуется с результатами зарубежных авторов [Ozolins A. et al., 2012].

Несмотря на положительную мембранную экспрессию белка E-кадгерина, нами был определен низкий уровень экспрессии мРНК гена *CDH1* в ткани узлового образования у пациентов с коллоидным зобом. Данный параметр составил 2,95 (2,03-4,25) отн. ед. (рис. 2). Такой результат, возможно, связан с коротким временным промежутком между синтезом и распадом мРНК гена *CDH1* - согласно данным литературы, период полужизни мРНК этого гена составляет от 5 до 13 ч. [Sharova L.V. et al., 2009].

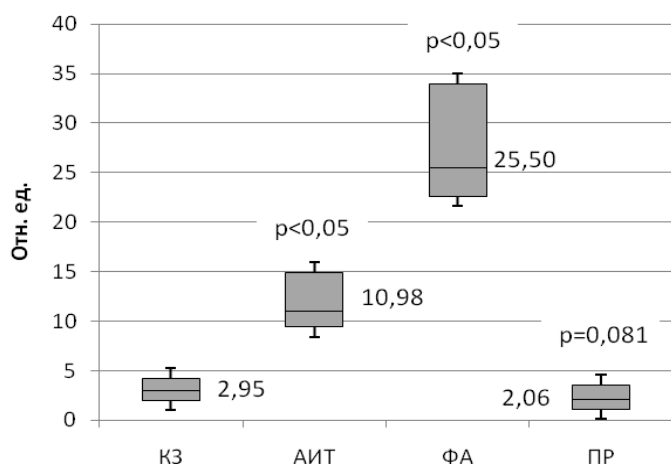


Рисунок 2 – Уровень экспрессии мРНК гена *CDH1*, Me(Q1-Q3). Указаны уровни достоверности по отношению к показателю в клетках коллоидного узлового зоба.

Нозологическая форма узлового образования: КЗ – коллоидный узловой зоб, АИТ – аутоиммунный тиреоидит, ФА – фолликулярная аденома, ПР – папиллярный рак.

Весь комплекс полученных результатов указывает на реализацию адгезионной функции β -катенина в клетках коллоидного узлового зоба. Такое рассуждение позволило нам сделать предположение о низкой экспрессии мРНК генов-мишеней β -катенина – *CCND1* и *MYC* в клетках фолликулярного эпителия у пациентов с коллоидным узловым зобом, которое в последствии было подтверждено – уровень экспрессии мРНК гена *CCND1* составил 0,058 (0,034-0,107) отн. ед., уровень экспрессии мРНК гена *MYC* - 0,370 (0,298-0,600) отн. ед. (рис. 3А, Б).

Таким образом, в клетках фолликулярного эпителия при коллоидном узловом зобе β -катенин в условиях реализации своей адгезионной функции располагается в примембранном пространстве в связанном с цитоплазматическим хвостом E-кадгерина состоянии.

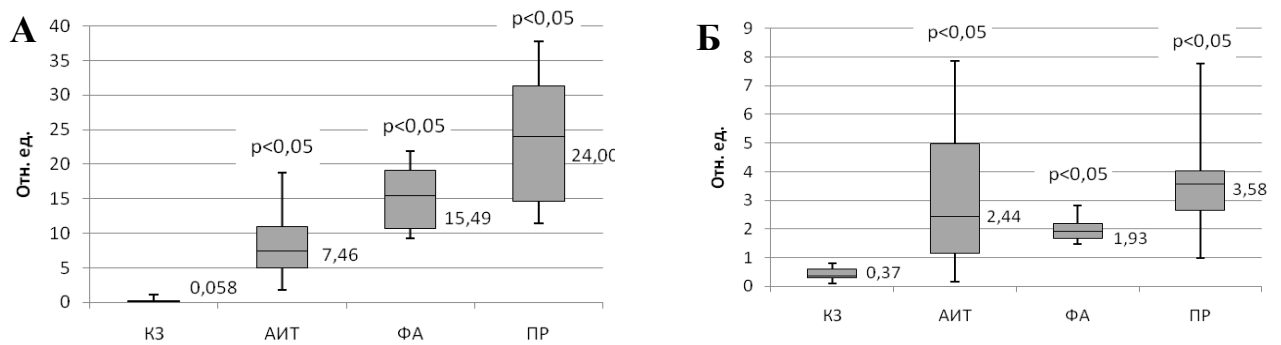


Рисунок 3 – Уровень экспрессии мРНК гена *CCND1* (А) и *MYC* (Б), Me(Q1-Q3). Указаны уровни достоверности по отношению к показателю в клетках коллоидного узлового зоба.

Такое конкурентное связывание и вероятное отсутствие внешнего Wnt стимула приводит канонический Wnt путь в неактивное состояние. Умеренная экспрессия мРНК гена *CTNNB1* не исключает формирование цитоплазматического пула β -катенина. Однако его нестабильное состояние за счет работы белков деструкционного комплекса не позволило нам определить его в цитоплазме методом иммуноцитохимии. Соответственно, не происходит транслокации β -катенина в ядро и не активируется транскрипция генов-мишеней – *CCND1* и *MYC* (рис. 4).

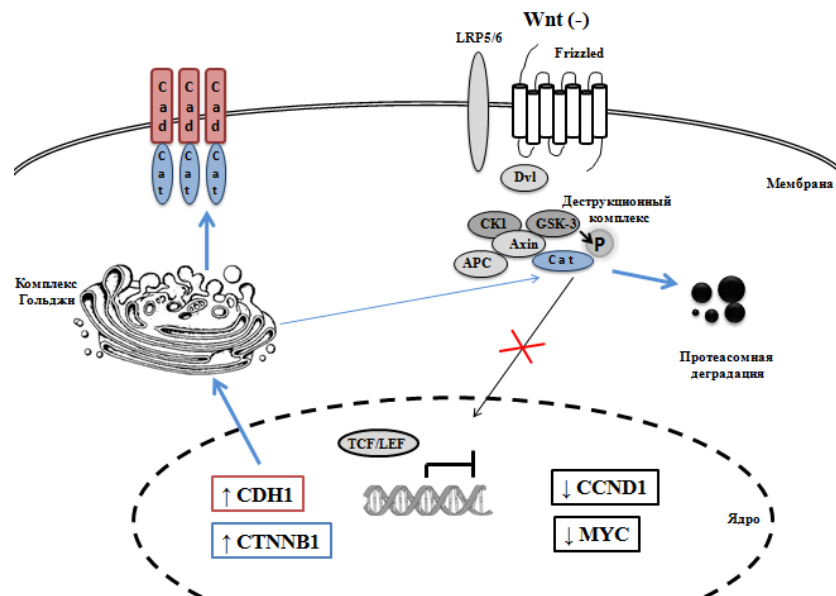


Рисунок 4 – Схема, отражающая адгезионную и транскрипционную функции β -катенина в клетках фолликулярного эпителия при коллоидном узлом зобе (по результатам собственных исследований).

Здесь и далее в рисунках 8, 12, 16: Wnt(-) – отсутствие стимуляции Wnt лигандом; Wnt(+) – стимуляция Wnt лигандом; LRP5/6 - рецептор липопротеина низкой плотности 5/6 (Low density lipoprotein receptor-related protein 5/6); Dvl - Dishevelled; CK1 - киназа-1 α (casein kinase 1 α); GSK3 β - киназа-3 β гликогенсинтазы (glycogen synthase kinase-3 β); APC - аденоматозный полипоз толстой кишки (Adenomatous Polyposis Coli); TCF/LEF - T cell factor (Т-клеточный фактор)/ Lymphoid Enhancer Factor (белок, связывающийся с лимфоидным энхансером); P - участки фосфорилирования; Cat – β -катенин; Cad – E-кадгерин; CDH1 – мРНК гена E-кадгерина; CTNNB1 – мРНК гена β -катенина; CCND1 – мРНК гена циклина D1; MYC – мРНК гена MYC; SLUG – мРНК гена SLUG; SNAIL – мРНК гена SNAIL

↓ - снижение уровня экспрессии, ↑ увеличение уровня экспрессии,
 → , → - толщина стрелки отражает степень реализации данного пути: чем толще, тем более представлен этот путь

Баланс адгезионной и транскрипционной функции β -катенина в клетках фолликулярной аденомы

Фолликулярная аденома представляет собой доброкачественную опухоль ЩЖ, морфологическим субстратом которой являются клетки фолликулярного эпителия. В нашем исследовании в клетках фолликулярной аденомы был выявлен высокий уровень экспрессии мРНК *CTNNB1* (10,00 (8,62-12,95) отн. ед.) по сравнению с таковым показателем в группах пациентов с коллоидным узловым зобом и папиллярным раком (рис. 5). Известна сложность интерпретации результатов экспрессии мРНК в связи с ее коротким периодом полужизни (для мРНК *CTNNB1* этот период составляет от 8 до 18 ч.) [Hollams E.M. et al., 2002]. Однако существуют предположения, что в случаях опухолевой трансформации клетки процесс деградации мРНК замедляется, что позволяет нам акцентировать внимание, в том числе и на экспрессии мРНК интересующих нас генов [Benjamin D. et al., 2007; Kim I. et al., 2015].

В связи с высокой экспрессией мРНК *CTNNB1* интерес представлял иммуноцитохимический анализ локализации β -катенина. По сравнению с результатами, полученными на клетках коллоидного зоба, в клетках фолликулярной аденомы, наряду с мембранной экспрессией, появляется слабая цитоплазматическая экспрессия β -катенина (в 91,7% случаев определялась только цитоплазматическая локализация маркера, в 8,3% - мембранная и цитоплазматическая), при этом ядерная - не регистрировалась.

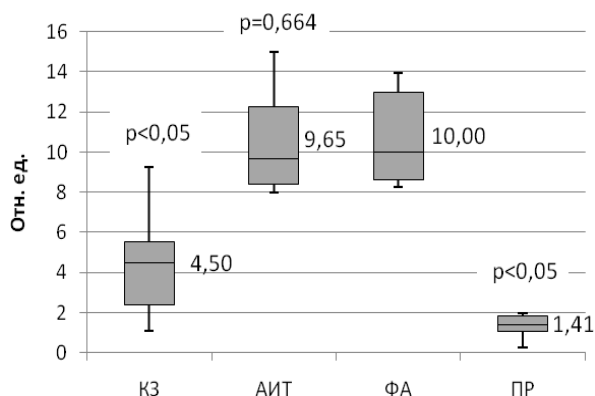


Рисунок 5 – Уровень экспрессии мРНК гена *CTNNB1*, Me(Q1-Q3). Указаны уровни достоверности по отношению к показателю в клетках фолликулярной аденомы. Нозологическая форма узлового образования: КЗ – коллоидный узловой зоб, АИТ – аутоиммунный тиреоидит, ФА – фолликулярная аденома, ПР – папиллярный рак.

Согласно данным литературы, подобная мембранная и цитоплазматическая коэкспрессия β -катенина определяется и при аденомах других локализаций [Kobayashi M. et al., 2000; Abineno P.D. et al., 2010]. Таким образом, при фолликулярной аденоме мембранное и цитоплазматическое внутриклеточное распределение β -катенина может свидетельствовать о том, что наряду с реализацией адгезионной функции, запускается транскрипционная/сигнальная активность изучаемого белка.

Для подтверждения активации сигнальной функции β -катенина в случае фолликулярной аденомы нами был исследован уровень экспрессии его генов-мишеней – *CCND1* и *MYC* [Tetsu O. et al., 1999; Shutman M. et al., 1999]. Согласно полученным нами результатам, по сравнению с другими изучаемыми нозологиями, в клетках фолликулярной аденомы был определен умеренный уровень экспрессии мРНК генов *CCND1* - 15,49 (10,76-19,05) отн. ед. (при коллоидном зобе и аутоиммунном тиреоидите - ниже, при папиллярном раке - выше) и *MYC* - 1,93 (1,67-2,18) отн. ед. (при коллоидном зобе - ниже, при папиллярном раке и аутоиммунном тиреоидите - выше) (рис. 6А, Б).

Несмотря на то, что мы предполагаем активацию транскрипционной функции β -катенина в клетках фолликулярной аденомы, экспрессия гена *CDH1* остается на высоком уровне (25,50 (22,60-34,00) отн. ед.) (рис. 7). С первого взгляда, это противоречит данным литературы, согласно которым стабилизированный β -катенин за

счет связывания в ядре с транскрипционными факторами TCF/LEF запускает транскрипцию ряда генов (*SNAIL*, *SLUG*, *TWIST*), продукты которых негативно регулируют транскрипцию гена *CDH1* [Batlle E. et al., 2000; Cano A. et al., 2000]. Однако D. Buehler et al. [2013] установили, что при фолликулярной аденоме определяется диффузное мембранное окрашивание для E-кадгерина и отсутствует экспрессия белков *SLUG* и *TWIST* ($p < 0,0001$). Таким образом, при фолликулярной аденоме выявляется избирательная активация транскрипции генов-мишеней β -катенина: в подавленном состоянии остаются гены *SLUG*, *TWIST*, что влечет за собой стабильную транскрипцию гена *CDH1*.

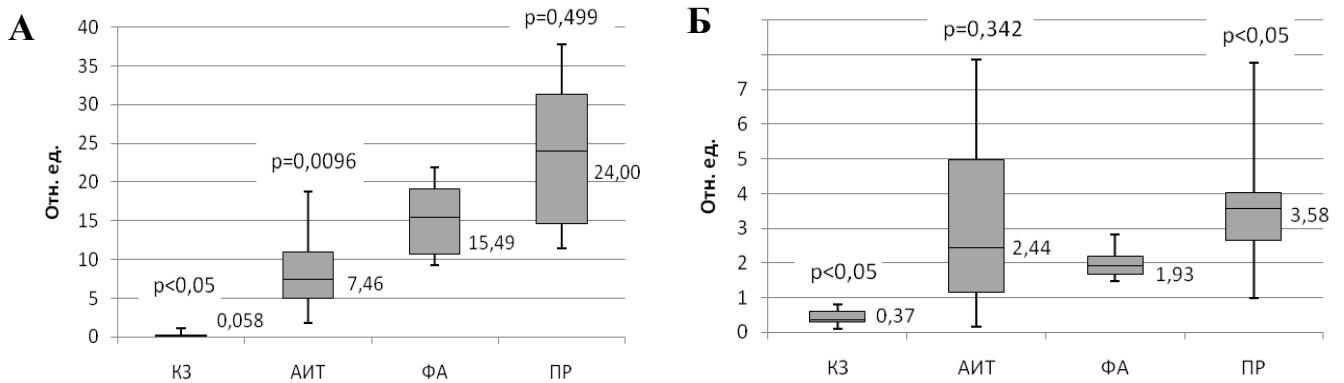


Рисунок 6 – Уровень экспрессии мРНК гена *CCND1* (А) и *MYC* (Б), Me(Q1-Q3). Указаны уровни достоверности по отношению к показателю в клетках фолликулярной аденомы. Нозологическая форма узлового образования: КЗ – коллоидный узловой зоб, АИТ – аутоиммунный тиреоидит, ФА – фолликулярная аденома, ПР – папиллярный рак.

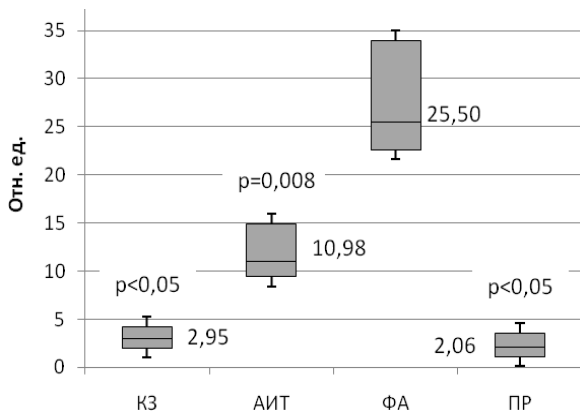


Рисунок 7 – Уровень экспрессии мРНК гена *CDH1*, Me(Q1-Q3). Указаны уровни достоверности по отношению к показателю в клетках фолликулярной аденомы.

Нозологическая форма узлового образования: КЗ – коллоидный узловой зоб, АИТ – аутоиммунный тиреоидит, ФА – фолликулярная аденома, ПР – папиллярный рак.

Полученные нами результаты экспрессии β -катенина и мРНК его гена, а также экспрессии белка E-кадгерина, мРНК генов *CDH1*, *CCND1*, *MYC* могут быть интерпретированы следующим образом: при фолликулярной аденоме в клетках фолликулярного эпителия происходит активация Wnt сигнального каскада со стабилизацией и накоплением β -катенина в цитоплазме, однако высокий уровень E-кадгерина на поверхности клетки приводит к привлечению части белка β -катенина к мембране (рис. 8). Таким образом, при фолликулярной аденоме ЩЖ β -катенин реализует свой бифункциональный статус – наряду с адгезионной функцией запускается и транскрипционная/сигнальная функция белка.

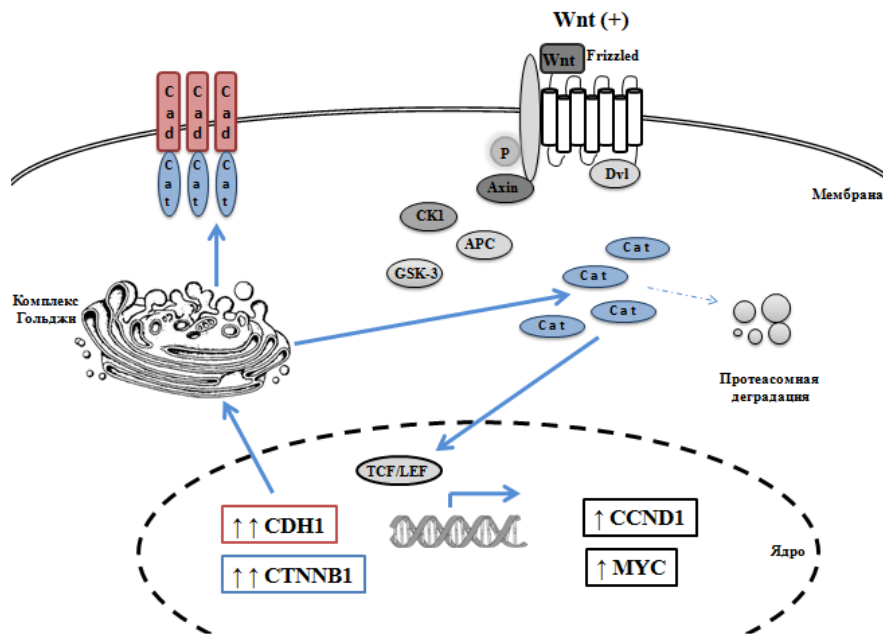


Рисунок 8 – Схема, отражающая адгезионную и транскрипционную/сигнальную функции β-катенина в клетках фолликулярного эпителия при фолликулярной аденоме (по результатам собственных исследований).

Активация Wnt/β-катенин сигнального пути и подавление адгезионной функции β-катенина в клетках папиллярного рака

Папиллярный рак среди первичных и вторичных злокачественных опухолей ЩЖ занимает лидирующую позицию.

При анализе экспрессии мРНК *CTNNB1* был определен самый низкий уровень экспрессии (1,41 (1,05-1,84) отн. ед.) по сравнению с аналогичным показателем в других изучаемых нами группах пациентов (рис. 9).

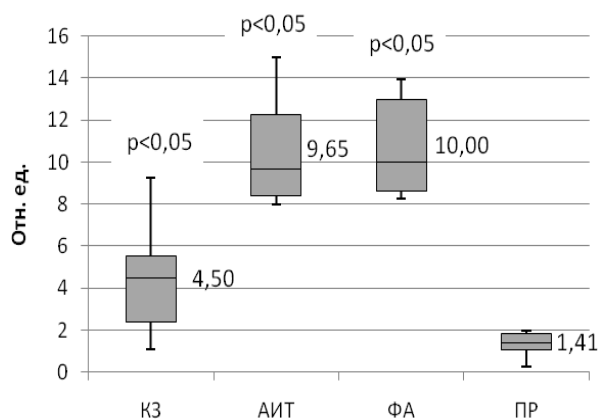


Рисунок 9 – Уровень экспрессии мРНК гена *CTNNB1*, Me(Q1-Q3). Указаны уровни достоверности по отношению к показателю в клетках папиллярного рака. Нозологическая форма узлового образования: КЗ – коллоидный узловой зоб, АИТ – аутоиммунный тиреоидит, ФА – фолликулярная аденома, ПР – папиллярный рак.

Несмотря на низкую экспрессию мРНК гена, иммуноцитохимический анализ белка β-катенина установил во всех анализируемых случаях папиллярного рака положительную экспрессию (62,1% - положительная, 37,9% - слабоположительная экспрессия). При этом в опухолевых клетках β-катенин определялся в цитоплазме и ядре, а мембранная локализация, характерная для коллоидного зоба и фолликулярной аденомы, отсутствовала.

Такое сочетание низкой экспрессии мРНК гена *CTNNB1* с высоким содержанием его белка в клетке, с нашей точки зрения, можно объяснить эффектом стабилизации

белка β -катенина за счет нарушения работы деструкционного комплекса, что является закономерным результатом активации канонического Wnt сигнального пути. Кроме того, ранее отмеченный период полужизни мРНК гена *CTNNB1* в случае злокачественной трансформации клетки может удлиняться и давать полученную нами картину, т.е. копий мРНК мало, но за счет удлинения периода полужизни они «успевают» дать большее число копий белка.

Еще одним подтверждением сигнальной активности β -катенина в опухолевых клетках папиллярного рака является высокая экспрессия мРНК его генов-мишеней *CCND1* и *MYC* (24,00 (14,59-31,35) и 3,58 (2,64-4,04) отн. ед, соответственно), по сравнению с другими анализируемыми группами пациентов (рис. 10).

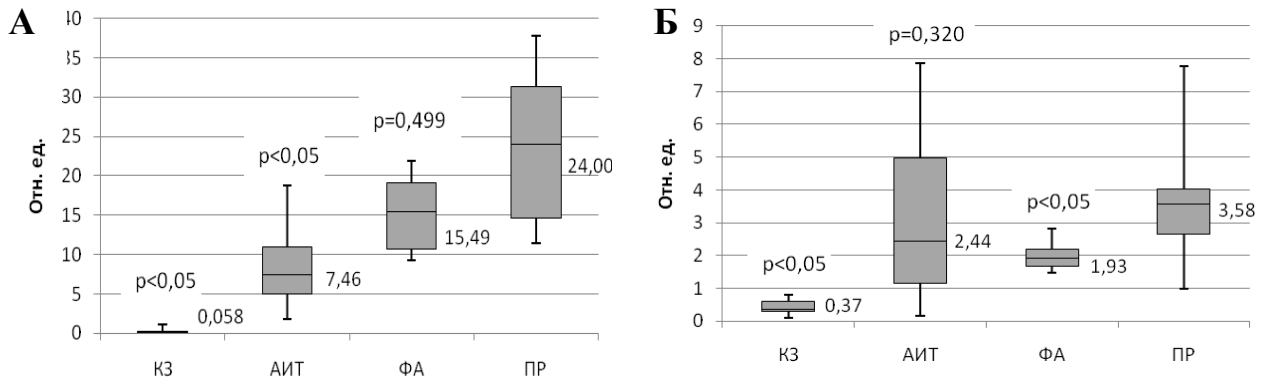


Рисунок 10 – Уровень экспрессии мРНК гена *CCND1* (А) и *MYC* (Б), Me(Q1-Q3). Указаны уровни достоверности по отношению к показателю в папиллярного рака.

Выявленная нами методом иммуноцитохимии локализация β -катенина указывает на его стабилизацию в цитоплазме и последующую транслокацию в ядро. Известно, что β -катенин через связывание в ядре транскрипционных факторов TCF/LEF, наряду с другими генами-мишенями канонического Wnt сигнального пути, запускает экспрессию генов *SNAIL*, *SLUG*, *TWIST*, участвующих в эпителиально-мезенхимальном переходе. Наш интерес к этим генам обусловлен их вовлеченностью в регуляцию экспрессии мРНК гена *CDH1*. Транскрипционные факторы *SNAIL* и *SLUG*, отвечая на сигналы окружающей клетку среды, эффективно подавляют транскрипцию гена *CDH1*, тем самым вносят свой вклад в формирование изменений, приводящих к эпителиально-мезенхимальному переходу [Batlle E. et al., 2000; Cano et al., 2000; Nieto M.A., 2002].

Наше исследование установило, что экспрессия мРНК гена *CDH1* в клетках узлового образования у пациентов с папиллярным раком характеризуется низким уровнем (2,06 (1,11-3,58) отн. ед.), по сравнению с аналогичным показателем в клетках ЦЖ в других анализируемых группах пациентов (рис. 11). Мы полагаем, что в основе низкой экспрессии мРНК *CDH1* лежит опосредованный механизм подавления транскрипции гена Е-кадгерина через активацию Wnt сигнального пути и запуск синтеза транскрипционных факторов *SNAIL* и *SLUG*.

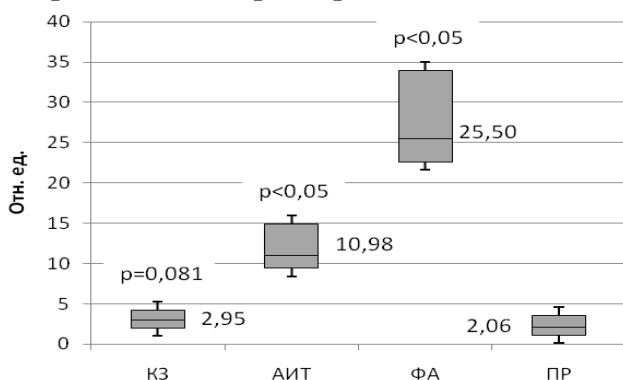


Рисунок 11 – Уровень экспрессии мРНК гена *CDH1*, Me(Q1-Q3). Указаны уровни достоверности по отношению к показателю в клетках папиллярного рака.

Нозологическая форма узлового образования: КЗ – коллоидный узловой зоб, АИТ – аутоиммунный тиреоидит, ФА –

фолликулярная аденома, ПР – папиллярный рак.

Иммуноцитохимический анализ экспрессии E-кадгерина в опухолевых клетках папиллярного рака ЩЖ определил у 75,8% пациентов слабую мембранную экспрессию, у 24,2% - умеренную мембранную экспрессию.

Мы предполагаем, что в случае папиллярного рака активация Wnt сигнального пути со стабилизацией β -катенина в цитоплазме, его транслокацией в ядро, с одной стороны, запускает транскрипцию таких генов как *CCND1* и *MYC*, т.е. реализуется его транскрипционная функция; с другой стороны, - нарушает кадгерин-опосредованную межклеточную адгезию за счет снижения экспрессии гена *CDH1* и его белка, нарушения формирования необходимого количества комплексов E-кадгерин/ β -катенин в аппарате Гольджи, нарушения их мобилизация к мембране и несостоятельности процессов цис-взаимодействия между молекулами E-кадгерина на поверхности соседних клеток.

Таким образом, в клетках папиллярного рака происходит активация Wnt/ β -катенин сигнального пути с подавлением адгезионной функции β -катенина (рис. 12).

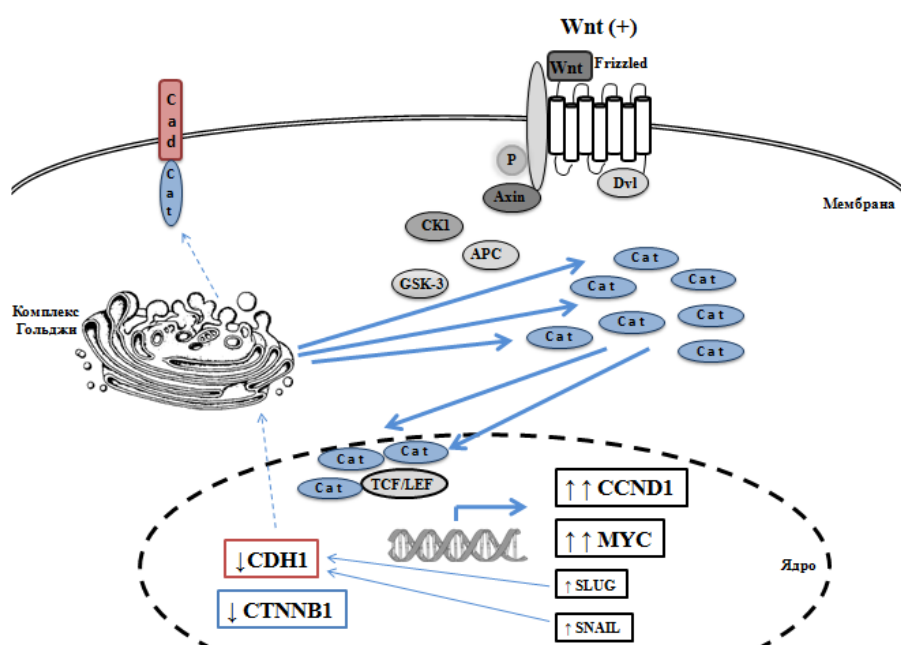


Рисунок 12 – Схема, отражающая адгезионную и транскрипционную функции β -катенина в клетках фолликулярного эпителия при папиллярном раке (по результатам собственных исследований).

Реализация транскрипционной и слабой адгезионной функции β -катенина в эпителиальных клетках при аутоиммунном тиреоидите

Взаимосвязь между АИТ и папиллярным раком впервые была предположена М.Е. Dailey et al. (1955) [Dailey M.E. et al., 1955]. С тех пор этот вопрос широко обсуждается в литературе и имеет спорный характер [Guarino V. et al., 2010; Cunha L.L. et al., 2011; Azizi G. et al., 2014]. Нами была предпринята попытка найти молекулярную основу взаимосвязи АИТ и папиллярного рака на основании анализа преобладающей функции β -катенина. Исследование заданных в нашей работе параметров при аутоиммунном тиреоидите показало аналогичную картину, как и в клетках фолликулярной аденомы. Достоверные отличия определялись лишь в группе показателей экспрессии белка E-кадгерина. В случаях аутоиммунного тиреоидита определяется преобладание слабой

экспрессии (у 61,5% пациентов) и в меньшем количестве случаев (38,5%) - положительная иммуноцитохимическая экспрессия Е-кадгерина. У пациентов с диагнозом фолликулярная аденома распределение по интенсивности экспрессии было несколько иным: 77% - положительная экспрессия, 23% случаев – слабая экспрессия Е-кадгерина на мембране клетки.

Полученное нами распределение Е-кадгерина на поверхности эпителиальных клеток в случае аутоиммунного тиреоидита косвенно указывает на ослабление адгезионных контактов, что, возможно, связано с активацией Wnt/ β -катенин сигнального пути. С этой точки зрения, интерес представлял анализ иммуноцитохимической экспрессии β -катенина: в 84,6% случаев аутоиммунного тиреоидита определялась только цитоплазматическая локализация маркера и лишь в 15,4% - сочетанная мембранная и цитоплазматическая (или слабая мембранная). Такая картина, наряду со сниженной экспрессией мРНК *CDH1* (10,98 (9,44-14,94) отн. ед.) и умеренной экспрессией мРНК *CCND1* и *MYC* (7,46 (4,98-11,03) и 2,44 (1,15-4,98) отн. ед., соответственно), действительно, указывает на активацию Wnt сигнального пути, формирование стабильного цитоплазматического пула β -катенина, умеренную активацию транскрипции генов-мишеней данного сигнального каскада (рис. 13, 14).

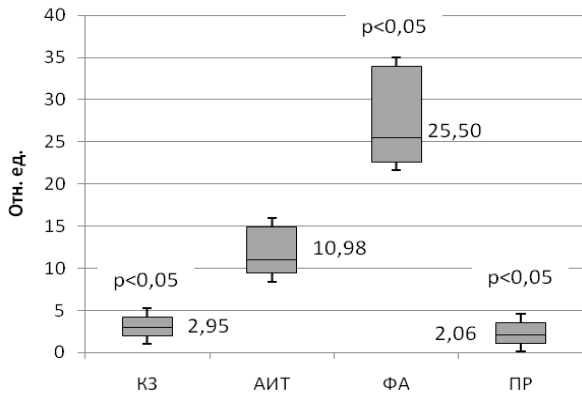


Рисунок 13 – Уровень экспрессии мРНК гена *CDH1*, Me(Q1-Q3). Указаны уровни достоверности по отношению к показателю в клетках тиреоидного эпителия аутоиммунного тиреоидита. Нозологическая форма узлового образования:

КЗ – коллоидный узловой зоб, АИТ – аутоиммунный тиреоидит, ФА – фолликулярная аденома, ПР – папиллярный рак.

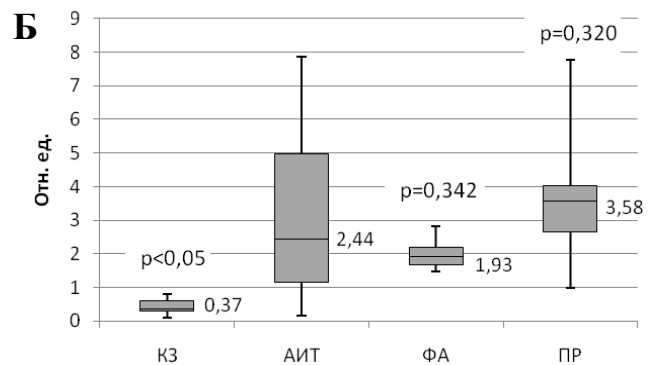
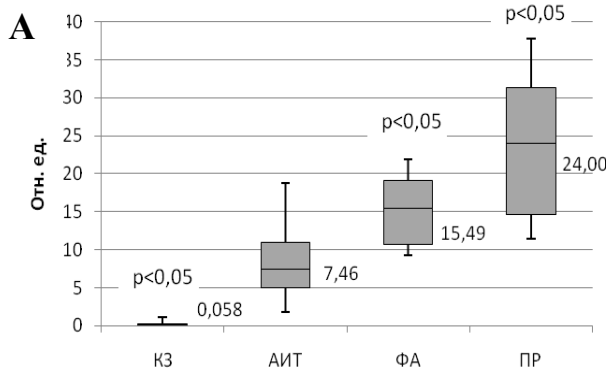


Рисунок 14 – Уровень экспрессии мРНК гена *CCND1* (А) и *MYC* (Б), Me(Q1-Q3). Указаны уровни достоверности по отношению к показателю при аутоиммунном тиреоидите. КЗ – коллоидный узловой зоб, АИТ – аутоиммунный тиреоидит, ФА – фолликулярная аденома, ПР – папиллярный рак.

Обращает внимание, что ядерная транслокация главного кофактора пути (β -катенина) методом иммуноцитохимии при аутоиммунном тиреоидите не определяется (в отличие от опухолевых клеток папиллярного рака). Таким образом, результаты анализа функционального статуса β -катенина в эпителиальных клетках при аутоиммунном тиреоидите указывают на активацию канонического Wnt сигнального пути с реализацией транскрипционной функции β -катенина. Однако, в отличие от

опухолевых клеток папиллярного рака, в клетках фолликулярного эпителия при АИТ за счет сохраненной мембранной экспрессии E-кадгерина и умеренной экспрессии мРНК его гена, формируется пул примембранной локализации β -катенина. Более того, при АИТ определяется достоверно более высокая экспрессия мРНК гена *CTNNB1* в эпителиальных клетках, по сравнению с клетками папиллярного рака и составляет 9,65 (8,42-12,26) отн. ед. (рис. 15).

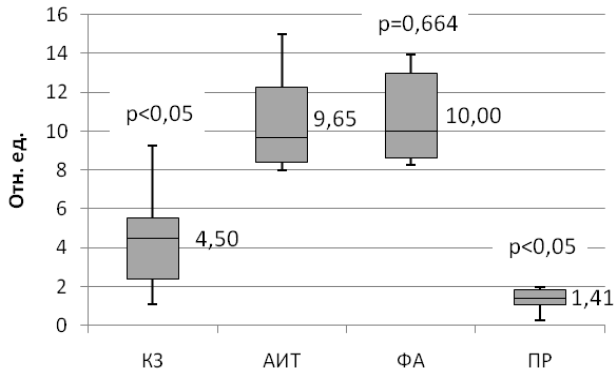


Рисунок 15 – Уровень экспрессии мРНК гена *CTNNB1*, Me(Q1-Q3). Указаны уровни достоверности по отношению к показателю в клетках фолликулярной аденомы. Нозологическая форма узлового образования: КЗ – коллоидный узловой зоб, АИТ – аутоиммунный тиреоидит, ФА – фолликулярная аденома, ПР – папиллярный рак.

Как нами было ранее отмечено, при фолликулярной аденоме, несмотря на активацию Wnt сигнального пути, адгезионная функция β -катенина продолжает реализовываться, что и отличает клетки фолликулярной аденомы от эпителиальных клеток АИТ, где адгезионная функция менее эффективна (рис. 16).

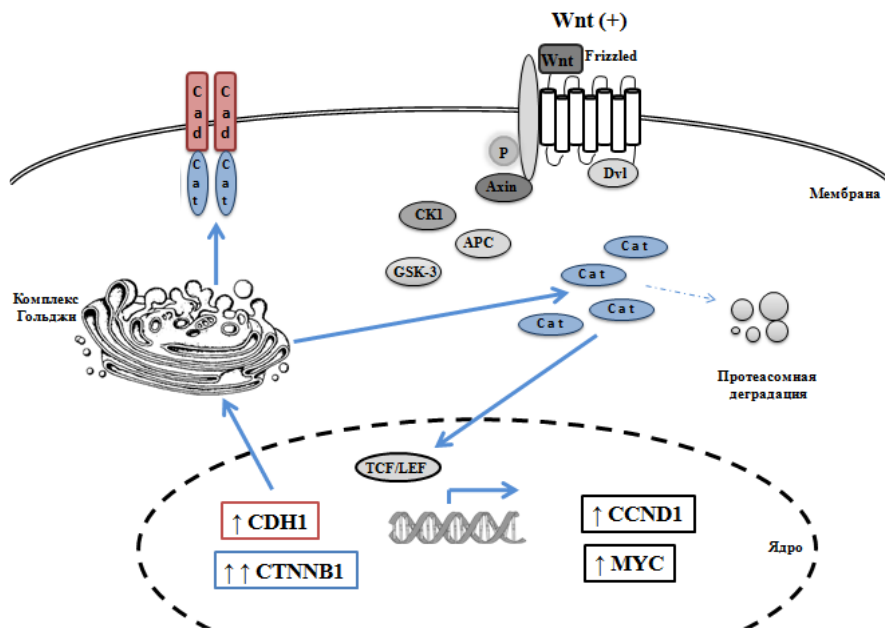


Рисунок 16 – Схема, отражающая адгезионную и транскрипционную функции β -катенина в клетках фолликулярного эпителия при аутоиммунном тиреоидите (по результатам собственных исследований)

Заключение

Актуальность изучения роли β -катенина при злокачественных опухолях позволила нам предположить его вовлеченность в процесс опухолевой трансформации клеток тиреоидного эпителия. В качестве модели исследования были сформированы группы пациентов с доброкачественным неопухолевым процессом (коллоидный узловой

зоб), доброкачественным опухолевым процессом (фолликулярная аденома) и злокачественной опухолью (папиллярный рак). Особую группу составили пациенты с диагнозом аутоиммунный тиреоидит в связи с предположением риска развития злокачественной опухоли ЩЖ на его фоне.

Несмотря на формирование новой фетальной теории механизма канцерогенеза тиреоидного эпителия, по-прежнему, наиболее поддерживаемой в научной среде остается многоступенчатая модель канцерогенеза. Основываясь на данной модели и учитывая полученные нами результаты по особенностям реализации функций β -катенина при доброкачественном и злокачественном процессе в ЩЖ, выстраивается последовательная патогенетическая цепочка переключения соотношений адгезионной и транскрипционной/сигнальной функций β -катенина при узловой патологии ЩЖ: от преобладания адгезионной функции в клетках коллоидного узлового зоба и функционального баланса адгезионной и транскрипционной функции в клетках фолликулярной аденомы до подавления адгезионной и активации сигнальной функции в клетках папиллярного рака. В эпителиальных клетках при аутоиммунном тиреоидите функциональный потенциал β -катенина занимает промежуточное положение между фолликулярной аденомой и папиллярным раком.

Полученные результаты указывают на то, что переключение функции β -катенина от адгезионной к транскрипционной/сигнальной может служить молекулярной платформой опухолевой трансформации клеток тиреоидного эпителия.

ВЫВОДЫ

1. В клетках папиллярного рака щитовидной железы определяется снижение экспрессии мРНК гена β -катенина (*CTNNB1*), по сравнению со значениями данного показателя в эпителиальных клетках при коллоидном узловом зобе, аутоиммунном тиреоидите, а также фолликулярной аденоме. При злокачественном новообразовании щитовидной железы в эпителиальных клетках происходит накопление белка β -катенина преимущественно цитоплазматического и/или ядерного пула, при коллоидном узловом зобе β -катенин локализуется на мембране клетки, при аутоиммунном тиреоидите и фолликулярной аденоме - на мембране и в цитоплазме клетки.

2. У пациентов с папиллярным раком щитовидной железы в клетках тиреоидного эпителия имеет место снижение экспрессии мРНК гена адгезионного белка E-кадгерина (*CDH1*), по сравнению со значением данного показателя у пациентов с фолликулярной аденомой и аутоиммунным тиреоидитом. При этом мембранная экспрессия белка E-кадгерина характеризуется слабopоложительной реакцией.

3. Экспрессия мРНК генов-мишеней β -катенина (*CCND1*, *MYC*), являющихся маркерами его транскрипционной активности, в клетках тиреоидного эпителия наиболее значима у больных папиллярным раком щитовидной железы.

4. Механизмы опухолевой трансформации клеток тиреоидного эпителия сопряжены с активацией транскрипционной/сигнальной функции и подавлением адгезионной функции β -катенина. Напротив, при коллоидном узловом зобе реализуется адгезионная функция β -катенина, при фолликулярной аденоме имеет место баланс его адгезионной и транскрипционной функций, при аутоиммунном тиреоидите - активация сигнальной функции и реализацией слабой адгезионной функции.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Анализ структуры и динамики заболеваемости раком щитовидной железы у населения Томска и Томской области за 2008-2012гг / Латыпова В.Н., Березкина И.С., Саприна Т.В., Зима А.П., **Исаева А.В.**, Белоконь В.В. // Научная дискуссия: Вопросы медицины. – 2013. - №5(12) - С. 6-14.
2. Особенности и характеристика показателей заболеваемости раком щитовидной железы у жителей г.Томска и Томской области / Ворожцова И.Н., Латыпова В.Н., Саприна Т.В., Березкина И.С., Зима А.П., **Исаева А.В.**, Лунёва С.В., Кудяков Л.А., Пикалова Л.В. // **Бюллетень сибирской медицины**. – 2014. – Т.13, № 2 - С.74–81. ИФ РИНЦ 0,342.
3. Сравнительная оценка экспрессии генов Е-кадгерин (CDH1) и В-катенин (CTNNB) в жидкостных образцах узловых образований щитовидной железы / **Исаева А.В.**, Березкина И.С., Зима А.П., Саприна Т.В., Латыпова В.Н., Белоконь В.В., Рязанцева Н.В., Касоян К.Т., Васильева О.А. // Сборник трудов: Тезисы VII Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Молекулярная диагностика 2014». - 2014.– Т. 2 – М.: ООО "Издательство МБА", – С.117-118.
4. Анализ экспрессии гена в-катенина (CTNNB) в жидкостных образцах дифференцированного рака щитовидной железы / **Исаева А.В.**, Зима А.П., Саприна Т.В., Березкина И.С., Латыпова В.Н., Касоян К.Т., Рязанцева Н.В. // Сборник трудов: Тезисы 18-ой Международной Пушкинской школы-конференции молодых ученых «Биология - наука 21 века». – Пушино, 2014. – С. 340-341.
5. Экспрессия гена CTNNB и белка β-катенина в жидкостных образцах ткани узловых образований щитовидной железы / **Исаева А.В.**, Березкина И.С., Зима А.П., Саприна Т.В., Латыпова В.Н., Касоян К.Т., Рязанцева Н.В. // Злокачественные опухоли. – 2014. - №3(10) – С.298-299.
6. Проблема диагностической значимости молекулярного тестирования в дифференциальной диагностике узловых образований щитовидной железы / Березкина И.С., Саприна Т.В., Зима А.П., **Исаева А.В.**, Рязанцева Н.В., Латыпова В.Н., Мухамедов М.Р., Ворожцова И.Н. // **Российский биотерапевтический журнал**. - 2014 - №3. – С.83-94. ИФ РИНЦ 0,304.
7. Анализ экспрессии мРНК бета-катенина (CTNNB) и циклина D1 (CCND1) в жидкостных образцах дифференцированного рака щитовидной железы / **Исаева А.В.**, Зима А.П., Саприна Т.В., Латыпова В.Н., Березкина И.С., Касоян К.Т., Брынова О.В. // «Актуальные проблемы биохимии и бионанотехнологии» сборник трудов V международной Интернет-Конференции, Казань, 18-19 ноября 2014 г. – С. 77-79.
8. Исаева А.В. Оценка влияния сепарации жидкостных образцов пунктатов щитовидной железы по маркеру EpCAM (CD326) на результаты полимеразной цепной реакции в режиме реального времени / **Исаева А.В.** // Лабораторная диагностика (материалы XX всероссийской научно-практической конференции «Достижения и перспективы развития лабораторной службы России»). - 2015. - №2. – С. 27.
9. Возможности метода жидкостной цитологии в комплексной диагностике заболеваний щитовидной железы / Касоян К.Т., Брынова О.В., Шабалова И.П., Зима А.П., **Исаева А.В.**, Березкина И.С. // Лабораторная диагностика (материалы XX всероссийской научно-практической конференции «Достижения и перспективы развития лабораторной службы России»). - 2015. - №2. – С. 28.
10. β-катенин: структура, функции и роль в опухолевой трансформации эпителиальных клеток / **Исаева А.В.**, Зима А.П., Шабалова И.П., Рязанцева Н.В., Васильева О.А., Касоян К.Т., Саприна Т.В., Латыпова В.Н., Березкина И.С., Новицкий В.В. // **Вестник РАМН**. – 2015. – Т. 70, №4. – С. 475-483. ИФ РИНЦ 1,070

11. Liquid-based cytology in comprehensive diagnostics of thyroid diseases / Shabalova I., Brynova O., Kasoyan K., Zima A., **Isaeva A.**, Berezkina I. // Abstract of the 39th European Congress of Cytology, Milan, September 2015. - Cytopathology. - 2015. - 26 (Suppl. 1), 10–18, p.14.

12. The modern approach to differential diagnosis of thyroid diseases / Brynova O., Kasoyan K., Shabalova I., Zima A., **Isaeva A.**, Berezkina I. // Abstract of the 39th European Congress of Cytology, Milan, September 2015. – Cytopathology. - 2015. - 26 (Suppl. 1), 38–87, p.90 .

13. Традиционная и жидкостная цитология в диагностике поражений щитовидной железы / Брынова О.В., Касоян К.Т., Шабалова И.П., Зима А.П., **Исаева А.В.**, Березкина И.С. // Новости клинической цитологии России. – 2015. - Т.19, №1-2. - С. 35-36.

14. Возможности иммуноцитохимии в диагностике узловых образований щитовидной железы / Березкина И.С., Саприна Т.В., Зима А.П., **Исаева А.В.**, Латыпова В.Н., Ворожцова И.Н., Мухамедов М.Р., Базилевич Л.Р., Попов О.С. // «Успехи молекулярной онкологии» материалы конференции «Молекулярная онкология: итоги и перспективы», Москва, 16-17 декабря 2015 г. – С. 60-61

15. Сравнительная оценка экспрессии b-катенина и E-кадгерина в жидкостных образцах пунктатов узловых образований щитовидной железы / **Исаева А.В.**, Зима А.П., Саприна Т.В., Касоян К.Т., Попов О.С., Брынова О.В., Березкина И.С., Васильева О.А., Рязанцева Н.В., Шабалова И.П., Литвинова Л.С., Пак Ю.Д., Новицкий В.В. // **Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.** – 2016. - Т.161, №2. - С. 251-256. ИФ РИНЦ 0,554.

16. Disorders of the adhesion function of b-catenin as a molecular platform malignant transformation of thyroid epithelium / **Isaeva A.V.**, Vasil'eva O.A., Prokhorenko T.S., Zima A.P. // Abstract of the International Conference «Physics of cancer: interdisciplinary problems and clinical application» March 22-25, 2016, Tomsk, Russia. – Tomsk: ISPMA SB RAS, 2016. – P. 33.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АИТ - аутоиммунный тиреоидит;
 ДАБ - 3,3-диаминобензидин;
 КЗ – коллоидный узловой зоб;
 мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота;
 ПР – папиллярный рак;
 ТАБ – тонкоигольная аспирационная биопсия;
 ФА – фолликулярная аденома;
 АРС – белок аденоматозного полипоза толстой кишки (Adenomatous Polyposis Coli);
 СК1 - казеин киназа 1 α (casein kinase 1 α);
 Dvl - Dishevelled;

GSK3 β - киназа-3 β гликогенсинтазы (glycogen synthase kinase-3 β);
 LRP5/6 - рецептор липопротеина низкой плотности 5/6 (Low density lipoprotein receptor-related protein 5/6);
 RT-ПЦР - полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией;
 Ser – остаток аминокислоты серин;
 TCF/LEF - T cell factor (Т-клеточный фактор)/ Lymphoid Enhancer Factor (белок, связывающийся с лимфоидным энхансером);
 Trp – остаток аминокислоты триптофан.