

Государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего профессионального образования
«Сибирский государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации

На правах рукописи

Исаева Анна Владимировна

РОЛЬ β -КАТЕНИНА В МЕХАНИЗМАХ ОПУХОЛЕВОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ
ТИРЕОИДНОГО ЭПИТЕЛИЯ

14.03.03 – патологическая физиология

03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

Диссертация

на соискание ученой степени кандидата медицинских наук

Научные руководители:

доктор медицинских наук,
профессор Н.В. Рязанцева

доктор медицинских наук

А.П. Зима

Томск – 2016

Оглавление

ВВЕДЕНИЕ	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	13
1.1. Современный взгляд на патогенез рака щитовидной железы.....	13
1.1.1. Теории канцерогенеза рака щитовидной железы.....	13
1.1.2. Генетические и молекулярные маркеры, идентифицированные при дифференцированном раке щитовидной железы.....	16
1.2. Общая характеристика β -катенина.....	21
1.3. β -катенин как ключевой компонент канонического Wnt сигнального пути.....	25
1.4. Роль β -катенина в формировании межклеточных адгезионных контактов.....	27
1.4.1. E-кадгерин как ключевой партнер β -катенина в механизмах адгезии.....	27
1.4.2. Молекулярные механизмы взаимодействия β -катенина с E-кадгерином.....	29
1.5. Механизмы регуляции баланса сигнальной и адгезионной функции β -катенина.....	33
1.6. Роль нарушения комплекса E-кадгерин/ β -катенин в механизмах прогрессии злокачественных опухолей.....	37
1.7. Роль β -катенина в механизмах опухолевой трансформации.....	38
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	44
2.1. Материал и дизайн исследования.....	44
2.1.1. Особенности клинических и лабораторно-инструментальных показателей в группах пациентов, включенных в исследование.....	46
2.2. Методы исследования.....	51
2.2.1. Морфологическая оценка фолликулярного эпителия щитовидной железы методом традиционной и жидкостной цитологии.....	51
2.2.2. Обогащение жидкостных образцов клетками фолликулярного	

эпителия по маркеру EpCAM (CD326) методом магнитной сепарации	57
2.2.3. Выделение РНК из клеток пунктатов узловых образований щитовидной железы	62
2.2.4. Оценка уровня мРНК генов <i>CTNNB1</i> , <i>CDH1</i> , <i>CCND1</i> , <i>MYC</i> в клетках щитовидной железы методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени	63
2.2.5. Оценка экспрессии белков β -катенина и E-кадгерина в клетках эпителия щитовидной железы методом иммуноцитохимии	62
2.3. Статистический анализ результатов исследования	69
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ	70
3.1. Сравнительный анализ цитологической диагностики узловых образований щитовидной железы при применении традиционной и жидкостной цитологии	72
3.2. Анализ экспрессии мРНК и белка β -катенина в клеточном материале щитовидной железы при различных вариантах узловых образований	78
3.2.1. Особенности экспрессии мРНК <i>CTNNB1</i> в клеточном материале щитовидной железы при различных вариантах узловых образований	78
3.2.2. Особенности экспрессии β -катенина при различных вариантах узловых образований щитовидной железы методом иммуноцитохимии ...	79
3.3. Анализ экспрессии мРНК и белка E-кадгерина в клеточном материале щитовидной железы при различных вариантах узловых образований	82
3.3.1. Особенности экспрессии мРНК <i>CDH1</i> в клеточном материале щитовидной железы при различных вариантах узловых образований	82
3.3.2. Особенности экспрессии E-кадгерина при различных вариантах узловых образований щитовидной железы методом иммуноцитохимии	82
3.4. Оценка транскрипционной активности β -катенина по результатам анализа экспрессии мРНК его генов-мишеней (<i>CCND1</i> и <i>MYC</i>) в клеточном материале щитовидной железы при различных вариантах узловых образований	84

3.4.1. Особенности экспрессии мРНК <i>CCND1</i> в клеточном материале щитовидной железы при различных вариантах узловых образований	84
3.4.2. Особенности экспрессии мРНК <i>MYC</i> в клеточном материале щитовидной железы при различных вариантах узловых образований	85
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	87
4.1. Реализация адгезионной функции β -катенина в эпителиальных клетках коллоидного узлового зоба	88
4.2. Баланс адгезионной и транскрипционной функции β -катенина в клетках фолликулярной аденомы	92
4.3. Активация Wnt/ β -катенин сигнального пути и подавление адгезионной функции β -катенина в клетках папиллярного рака	99
4.4. Реализация транскрипционной и слабой адгезионной функции β -катенина в эпителиальных клетках при аутоиммунном тиреоидите	105
ВЫВОДЫ.....	112
Список использованных сокращений	113
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	114

ВВЕДЕНИЕ

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; Haugen 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; Haugen B.R. et al., 2016]. По современным данным, 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, ведущий к глубокой 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; Hanahan 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, запрограммированной 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 кофактором 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 к цитоплазматической деструкции комплекса 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-кадгеринов. 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

Процесс пролиферации клеток тиреоидного эпителия находится под влиянием функционирования Wnt/ β -катенин сигнального пути [Rao A.S. et al., 2005]. Изучение роли β -катенина в механизмах опухолевой трансформации тиреоидного эпителия носит ограниченный характер (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 опухолевых клетках при этом варианте рака щитовидной железы [Sastre-Perona A. et al., 2012]. Мутации были определены в консервативных Ser и Thr 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 при доброкачественных процессах 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 глубокой 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 и установлена чувствительность морфологических методов оценки пунктатов узловых образований щитовидной железы методом традиционной и жидкостной цитологии.

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 E-кадгерина (*CDH1*) методом RT-ПЦР), оценка транскрипционной/сигнальной функции β -катенина (анализ уровня экспрессии генов-мишеней β -катенина – *CDH1*, *CCND1*, *MYC* методом RT-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, E-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.

Публикации

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

Объем и структура работы

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.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Современный взгляд на патогенез рака щитовидной железы

В структуре общей онкологической заболеваемости опухоли щитовидной железы злокачественной природы составляют около 2%. Согласно принятой гистологической классификации, рак щитовидной железы включает в себя следующие морфологические типы: дифференцированный (папиллярный, фолликулярный и рак из клеток Гюртля), низкодифференцированный, медуллярный и анапластический рак. Наиболее обширную группу (80%) формирует папиллярный рак, 11% - фолликулярный рак, 3% - рак из клеток Гюртля, 4% - медуллярный рак, 2% - анапластический рак и низкодифференцированный рак [Kronenberg G. et al., 2008; Catalano M.J. et al., 2012]. Показатель 10-ти летней выживаемости для пациентов с папиллярным, фолликулярным раком и раком из клеток Гюртля составляет 93, 85 и 76%, соответственно [Hundahl S.A. et al., 1998].

Морфологическим субстратом рака щитовидной железы могут служить два типа клеток: фолликулярные клетки и парафолликулярные С-клетки. Злокачественные опухоли из фолликулярных клеток составляют в общем пересчете более 90% всех злокачественных опухолей щитовидной железы и включают в себя папиллярный, фолликулярный, низкодифференцированный и анапластический раки щитовидной железы. Медуллярный рак происходит из С-клеток и составляет небольшую долю злокачественных опухолей щитовидной железы.

1.1.1. Теории канцерогенеза рака щитовидной железы

Согласно современным представлениям, патогенез рака щитовидной железы можно рассматривать с двух позиций. Первоначально была предложена многоступенчатая модель канцерогенеза, актуальность которой рассматривается также и при развитии других злокачественных опухолей [Luebeck E.G. et al., 2002; Moolgavkar S.H. et al., 2003; Yamada Y. et al., 2007; Schiffman M. et al., 2013; Meza R. et al., 2015]. Ранним событием формирования

опухоли, согласно данной гипотезе, является последовательное повреждение генома клетки с приобретением способности клетки к неограниченной пролиферации, инвазии и метастазированию [Kondo T. et al., 2006]. Основываясь на этой теории, фолликулярный рак развивается из фолликулярной аденомы, папиллярный рак - непосредственно из зрелых неизменных тироцитов, анапластический рак - из папиллярного или фолликулярного рака путем дедифференцировки клеток (рис. 1).

Однако на 12-ом Международном конгрессе, посвященном патологии щитовидной железы (12th International Thyroid Congress), в 2000 году была предложена альтернативная теория развития рака щитовидной железы – «fetal cell carcinogenesis» (фетальная теория канцерогенеза) [Takano T. et al., 2002; Takano T., 2004; Takano T. et al., 2005; Takano T., 2007; Takano T., 2014]. Несмотря на то, что основная концепция данной модели сильно отличается от гипотезы классического многоступенчатого канцерогенеза, последние достижения в молекулярной онкологии в области стволовых опухолевых клеток позволяют ученым говорить о правомерности выдвинутой теории [Lin R.Y., 2011]. Эмбриональная/фетальная клетка обладает способностью к пролиферации и миграции. Такие биологические свойства, необходимые для развития и ремоделирования/реконструкции тканей, очень похожи на свойства опухолевых клеток. Согласно фетальной теории канцерогенеза, клетки злокачественной опухоли формируются непосредственно из фетальных/эмбриональных клеток, которые уже имеют раковые свойства без прохождения дальнейших процессов дифференцировки и дедифференцировки. Кроме того, по данной теории геномные изменения не играют ключевую роль в канцерогенезе, за исключением случаев генетических перестроек, нарушающих процесс дифференцировки эмбриональных клеток [Takano T., 2004].

Таким образом, опухолевые клетки щитовидной железы образуются из трех типов эмбриональных клеток щитовидной железы [Bhatia P. et al., 2014]. Анапластический рак является производным от стволовых клеток щитовидной железы. Папиллярный и фолликулярный рак развиваются из тиреобластов. При

этом фолликулярный рак, согласно данной модели, является более дифференцированным вариантом папиллярного рака. Клетки аденомы представляют собой производные от протироцитов, которые не обладают опухолевыми свойствами (рис. 1).

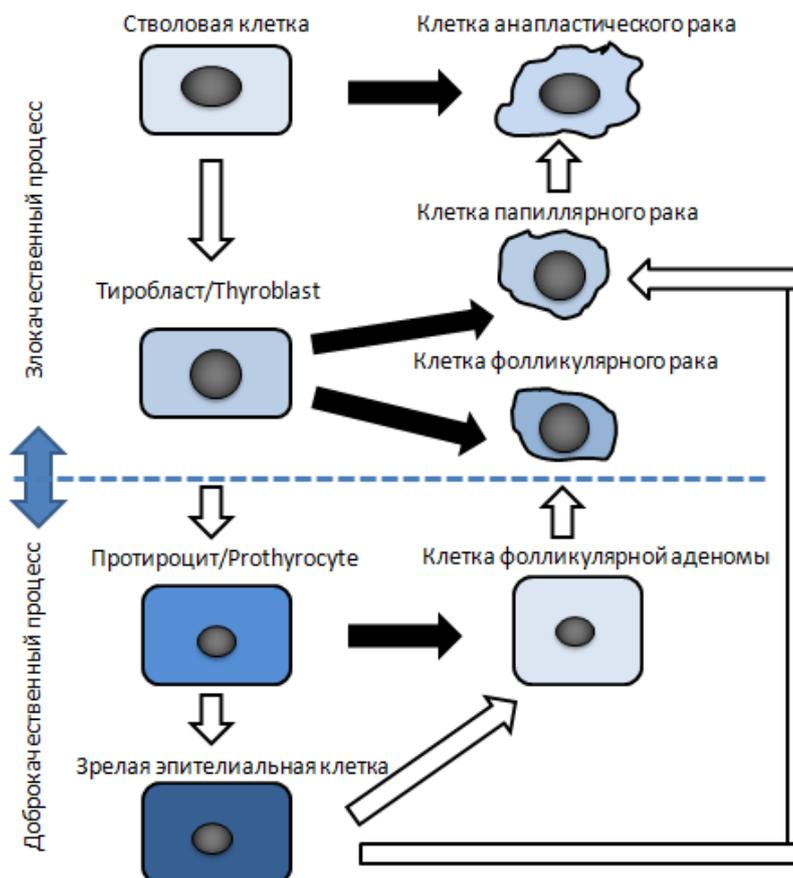


Рис. 1. Теории механизма развития рака щитовидной железы (по данным Т. Такано, 2014). Объяснения в тексте.

Примечание:

- ⇨ - белые стрелки отражают путь трансформации согласно многоступенчатой модели канцерогенеза,
- ⇨ - черные стрелки отражают путь трансформации согласно фетальной теории канцерогенеза.

На данный момент обе указанные теории опухолевой трансформации тиреоидных клеток остаются правомерны. Успехи молекулярной онкологии позволили открыть целый ряд новых участников опухолевого процесса в щитовидной железе, что, с одной стороны, расширяет возможности развития мишень-направленной терапии, эффективность которой требуется еще

доказать, и, с другой стороны, – задает ученым закономерный вопрос о формировании единой системы взглядов на процесс трансформации эпителиальных клеток щитовидной железы.

1.1.2. Генетические и молекулярные маркеры, идентифицированные при дифференцированном раке щитовидной железы

Папиллярный рак является наиболее распространенной формой дифференцированного рака щитовидной железы. Завершившийся проект Cancer Genome Atlas исследовал 496 случаев папиллярного рака щитовидной железы [The Cancer Genome Atlas Research Network, 2014]. Это исследование позволило идентифицировать онкогенные ведущие («driver») повреждения генома, которые определяют прогрессию заболевания и соотносятся с определенными патологическими и клиническими характеристиками папиллярного рака щитовидной железы. Последний факт в скором времени приведет к формированию молекулярных подтипов папиллярного рака, определяющих характер клинического течения заболевания, ответ на проводимую терапию и прогноз.

Фолликулярный рак в настоящий момент остается наиболее сложной диагностической проблемой не только в плане цитологической диагностики, но и в области изучения и поиска молекулярных основ его развития. В последние десятилетия достигнуты определенные успехи в обнаружении генетических дефектов при дифференцированном раке щитовидной железы, в том числе при фолликулярном раке.

Наш интерес к известным на данный момент молекулярным изменениям при раке щитовидной железы, в первую очередь, направлен на идентификацию единой платформы их взаимосвязи. Далее будут рассмотрены основные генетические изменения в опухолевых клетках щитовидной железы с анализом их влияния на функцию белка β -катенина.

Перестройка RET/PTC

Результаты молекулярно-генетических исследований показали, что при папиллярном раке с вариабельной частотой (от 5 до 70%, по данным различных исследований) встречаются хромосомные перестройки, затрагивающие протоонкоген *RET* [Lam K.Y. et al., 2002; Nikiforov Y.E. et al., 2004]. В результате такой перестройки образуется химерный онкоген и его химерный белок RET/PTC (Rearranged during Transfection/Papillary thyroid cancer). Протоонкоген *RET* локализован в коротком плече 10-й хромосомы (10q11.2), кодирует белок трансмембранного рецептора с тирозинкиназной активностью [Santoro M. et al., 2006]. Химерные белки обладают постоянной активностью тирозинкиназы и вызывают нерегулируемый поток внутриклеточных сигналов, способствующих выживанию и пролиферации опухолевых клеток [Jhiang S.M., 2000].

Так, показано, что RET/PTC стимулирует β -катениновый сигнальный путь [Castellone M.D. et al., 2009; Tartari C.J. et al., 2011]. Такой эффект связан со способностью RET/PTC активировать PI3K/АКТ и Ras/ERK (extracellular signal-regulated kinase) каскады, которые промотируют фосфорилирование GSK3 β -киназы (glycogen synthase kinase 3beta), что приводит к стабилизации β -катенина и запуску транскрипции его генов-мишеней.

Мутации в гене BRAF

Впервые вовлеченность гена *BRAF* в опухолевый процесс была определена у пациентов с диагнозом злокачественная меланома [Brose M.S. et al., 2002]. Ген *BRAF* локализован на коротком плече 7-й хромосомы (7q34), продукт гена – серин/треонин киназа – является важным компонентом RAS-BRAF-МАРК-киназного пути, играя ключевую роль в клеточной пролиферации, дифференцировке и апоптозе [Mercer K.E. et al., 2003]. В дальнейшем было установлено, что у 70% пациентов с папиллярным раком определяется точечная мутация T1799A в 15-м экзоне гена *BRAF*, которая приводит к экспрессии мутантного белка BRAF-V600E и вызывает активацию конститутивной серин/треонин киназы [Cohen Y. et al., 2003; Xing M. et al., 2004].

Молекулярные механизмы взаимодействия BRAF и β -катенина изучаются при злокачественных меланоммах [Chien A.J. et al., 2014; Prasad C.P. et al., 2015]. Рядом авторов было установлено, что у пациентов с диагнозом меланомма с выраженной ядерной иммуногистохимической экспрессией β -катенина терапия ингибиторами BRAF не дает преимуществ с контрольной группой пациентов с меланоммой, не получавших терапию таргетными препаратами [Chien A.J. et al., 2014]. Было сделано предположение о том, что активация сигнальной функции β -катенина может являться одним из механизмов развития химиорезистентности к препаратам ингибиторов BRAF. Однако на данный момент механизм и уровень взаимодействия BRAF и β -катенина остается неясным.

Увеличение экспрессии гена Met

Одним из онкогенов, который играет важную роль в канцерогенезе щитовидной железы, является ген *Met*, кодирующий тирозинкиназный рецептор для фактора роста гепатоцитов (HGF, hepatocyte growth factor) [Bottaro D.P. et al., 1991; Birchmeier C. et al., 2003]. Последний при активации действует как митогенный фактор, а также способствует подвижности и инвазии клеток [Gentile A. et al., 2008]. Увеличение экспрессии гена *Met* определяется в 75% случаев папиллярного рака щитовидной железы [Wasenius V.M. et al., 2005].

Экспериментальные работы ряда научных групп определили взаимосвязь между β -катенином и *Met* на внутренней поверхности мембраны клетки [Monga S.P. et al., 2002, 2007; Zeng G. et al., 2006]. Было установлено, что *Met*, образуя комплекс на внутренней мембране с β -катенином, фосфорилирует его по серину 552, что вызывает транслокацию и накопление β -катенина в ядре с активацией транскрипции генов-мишеней.

Мутации в генах RAS

Гены *RAS* (*Rat Sarcoma*) играют важную роль в регуляции роста и дифференцировки клеток. Активационные мутации в кодонах 12, 13 и 61 трех *RAS* генов (*H-RAS*, *K-RAS* и *N-RAS*) преобразуют их в активные онкогены, играющие важную роль в патогенезе многих опухолей [Crespo P. et al., 2000].

Продукты этих генов представляют собой 21kDa мембранно-связанные белки малые ГТФазы, играющие центральную роль в передаче сигналов от рецепторов тирозинкиназ и G-связанных белков эффекторам MAPK и PI3K-AKT сигнальных путей, которые опосредуют дифференцировку, пролиферацию и выживание клеток. Мутации, приводящие к онкогенной трансформации *RAS*, нарушают переход активной формы белка *RAS*, связанной с ГТФ, в неактивную, связанную с ГДФ, тем самым вызывают постоянную стимуляцию митогенного сигнального пути *RAS*/MAPK. По данным литературы, частота мутаций в генах *RAS* при фолликулярной аденоме составляет 48%, при фолликулярном раке – 57%, при папиллярном раке – 21% [Howell G.M. et al., 2013].

Данные литературы указывают на различные механизмы, с помощью которых сигнальные каскады Wnt/ β -катенин и *RAS*/MAPK связаны друг с другом [Zeller E. et al., 2013]. В частности, существуют сведения, доказывающие перекрест этих двух путей на уровне GSK3 β -киназы: активация *RAS*/MAPK каскада запускает фосфорилирование GSK3 β -киназы и опосредованно через данный механизм ингибирует фосфорилирование β -катенина и его деградацию, в итоге - реализуется транскрипционная функция β -катенина [Li J. et al., 2005]. Вместе с тем следует отметить, что работа такого механизма регистрируется не во всех клетках [Takahashi-Yanaga F. et al., 2004].

С другой стороны, показано, что гиперактивация *RAS*/MAPK сигнального пути, напротив, ингибирует транскрипционную активность [Biechele T.L. et al., 2012]. Механизмы взаимосвязи β -катенина и *RAS*/MAPK каскада в клетках щитовидной железы на данный момент не изучены.

Транслокация PAX8-PPAR γ 1

Ген *PAX8* (хромосома 2) кодирует транскрипционный фактор, играющий важную роль в развитии фолликулярного рака щитовидной железы, за счет активации транскрипции ряда генов [Fabbro D. et al., 1998]. Продукт гена *PPAR γ* (γ рецептор, активируемый пролифератором пероксисом) (хромосома 3) имеет значение в контроле апоптоза и дифференцировки клеток. В 2000 году в

клетках фолликулярного рака была определена транслокация t(2; 3)(q13; p25), в результате которой образуется химерный ген *PAX8-PPAR γ 1* с подавлением транскрипции гена *PPAR γ* [Kroll T.G. et al., 2000]. Транслокация *PAX8-PPAR γ 1* регистрируется в клетках фолликулярного рака (26-56%), фолликулярной аденомы (0-13%), папиллярного рака (0-1%) [Nikiforova M.N. et al., 2002].

В отличие от других представленных ранее путей взаимодействия β -катенина с Met, BRAF, Ras, где последние запускают активацию его транскрипционной функции, в данном случае определяется обратный процесс – β -катенин, транслоцируясь в ядро, активирует транскрипцию гена транскрипционного фактора PAX8 [Sastre-Perona A. et al., 2014].

Поиск новых генетических изменений в клетках тиреоидного эпителия при его трансформации активно продолжается [Parameswaran R. et al., 2010; Xing M., 2013]. Но даже такой короткий экскурс в наиболее изученные генетические перестройки, регистрируемые при различных вариантах рака щитовидной железы, указывает на то, что возможной объединяющей мишенью всех представленных выше молекулярным механизмов является β -катенин, что объясняет важность изучения реализации его функций при патологии щитовидной железы (табл. 1).

Таблица 1

Генетические изменения, идентифицированные при патологии щитовидной железы и их влияние на функцию β -катенина

Название гена и белка	Функция белка	Перестройка/ мутация при патологии ЩЖ	Патология ЩЖ и частота перестройки/ мутации	Наличие функциональной связи с β -катенином и ее характер	Механизм влияния на функцию β -катенина
ген <i>RET</i> и его белок	Рецептор тирозинкиназы	Химерный ген и белок RET/PTC	ПР - 3-85% [Tallini G., 2001; Nikiforov Y.E., 2002],	Активация транскрипционной функции [Castellone M.D. et al., 2009]	Активация PI3K/AKT и Ras/ERK каскадов, фосфорилирование GSK3 β -киназы и стабилизация β -катенина [Castellone M.D. et al., 2009]

Продолжение таблицы 1

Название гена и белка	Функция белка	Перестройка/мутация при патологии ЩЖ	Патология ЩЖ и частота перестройки/мутации	Наличие функциональной связи с β -катенином и ее характер	Механизм влияния на функцию β -катенина
ген <i>BRAF</i> и его белок	Серин/треонин киназа	Мутация T1799A в 15 экзоне гена, образование химерного белка BRAF V600E	ПР - до 50% [Xu X. et al., 2003], до 70% [Cohen Y. et al., 2003]	Активация транскрипционной функции [Prasad C.P. et al., 2015]	На данный момент неизвестен
ген <i>Met</i> и его белок	Тирозинкиназный рецептор для фактора роста гепатоцитов (HGF)	Увеличение уровня экспрессии гена <i>Met</i>	ПР – 75% [Wasenius V.M. et al., 2005].	Активация транскрипционной функции [Monga S.P. et al., 2007]	Фосфорилирование β -катенина по серину 552, его ядерное накопление [Monga S.P. et al., 2007]
гены <i>RAS</i> и их белки	Малые ГТФазы	Мутации в кодонах 12, 13 и 61 трех <i>RAS</i> генов (H-RAS, K-RAS и N-RAS)	ФА - 48%, ФР – 57%, ПР - 21% [Howell G.M. et al., 2013]	Эффект зависит от типа клеток. Чаще активация транскрипционной функции [Zeller E. et al., 2013].	Активирование <i>RAS/MAPK</i> каскада, фосфорилирование <i>GSK3β</i> -киназы, стабилизация β -катенина [Li J. et al., 2005].
Ген <i>PAX8</i> , Ген <i>PPARγ1</i>	Транскрипционные факторы	Транслокация <i>PAX8-PPARγ1</i>	ФА – 0-13%, ФР - 26-56%, ПР – 0-1% [Nikiforova M.N. et al., 2002].	β -катенин запускает транскрипцию гена <i>PAX8</i> [Sastre-Perona A. et al., 2014].	----

Примечание. ЩЖ – щитовидная железа, ПР – папиллярный рак, ФА – фолликулярная аденома, ФР – фолликулярный рак.

1.2. Общая характеристика β -катенина

β -катенин относится к семейству белков катенинов. Данное семейство впервые было выделено в 1989 году. Группа ученых под руководством R. Kemler при изучении механизмов адгезии E-кадгерина (тогда еще именуемого увоморулином) определили три независимых белка с молекулярной массой 102,

88 и 80 кДа, которые связывались с его цитоплазматическим доменом [Ozawa M., Varibault H., Kemler R., 1989]. Авторами было сделано предположение о том, что данные белки обеспечивают связь E-кадгерина с цитоскелетом клетки. Отсюда и их название – катенины (от лат. catena – цепь). В соответствии с молекулярной массой выделенных белков были даны обозначения: 102 кДа – α -катенины; 88 кДа – β -катенины; 80 кДа – γ -катенины (плакоглобины) [Ozawa M. et al., 1989].

Дальнейшее расширение данных о первичной последовательности катенинов позволило их разделить на 3 подсемейства: β -катенины (β -катенин, γ -катенин/плакоглобин), p120 (p120; Armadillo-Repeat gene deleted in Velo-Cardio-Facial syndrome, ARVCF; δ -катенин; p0071) и плакофилины (1 и 3 типа). Такое разделение семейства катенинов, в первую очередь, отражает их структурные и функциональные особенности [McCrea P.D. et al., 2010; Hatzfeld M., 2007]. При этом открытый одновременно с β -катенином и γ -катенином α -катенин оказался структурно неродственным. α -катенин является важным связывающим звеном между комплексом E-кадгерин/ β -катенин и актином цитоскелета [Gates J. et al., 2005].

Ген β -катенина (*CTNNB1*, cadherin-associated protein beta 1) расположен на коротком плече 3-ей хромосомы (3p21). Первичная структура белка β -катенина представлена 781 аминокислотным остатком и состоит из NH₂-терминального домена (NDT), центрального региона, представленного 12 Armadillo (Arm)-повторами (R1–12), и COOH-терминального конца (CTD) (рис. 2) [Huber A.H. et al., 1997, 2001; Maiden S.L. et al., 2010].

Arm-повтор включает в себя приблизительно 42 аминокислотных остатка, образующих три спирали. Вся совокупность Arm-повторов в структуре одного белка в виде суперспирали формирует длинную положительно заряженную канавку. В конце центрального региона расположена специфическая консервативная петля (спираль C) [Xu W. et al., 2007]. Данный регион известен как домен трансактивации, который связывается со множеством регуляторов транскрипции и регуляторами хроматина [Huber A.H. et al., 1997]

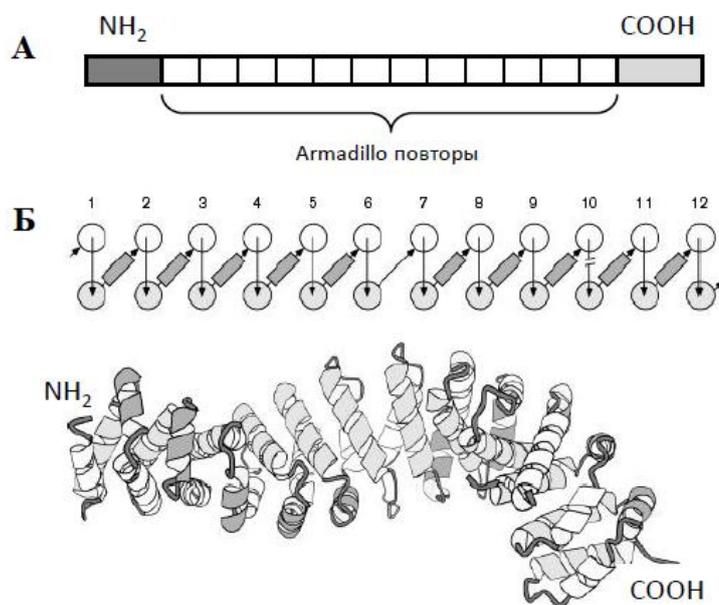


Рис. 2. Структура β -катенина. А. Первичная структура β -катенина: центральный домен, состоящий из 12 Armadillo повторов; Б. Топология (сверху) (по данным К. Willert et al., 1998) и кристаллическая структура β -катенина (рентгеноструктурный анализ) (снизу) из 12 Armadillo повторов (по данным Worldwide Protein Data Bank (wwPDB) // URL : <http://www.wwpdb.org/>)

В то время, как концевые отделы β -катенина (NTD и CTD) могут быть структурно гибкими, центральная область формирует относительно жесткий скаффолд, который служит платформой для связывания многих молекул, в том числе факторов транскрипции TCF (T cell factor) и LEF (Lymphoid Enhancer Factor), α -катенина, APC (Adenomatous Polyposis Coli), Axin, белка клеточной адгезии кадгерина, BCL9, ICAT (Inhibitor of β -Catenin and Tcf4), малых ГТФаз семейства Rho и др. [Huber A.H. et al., 2001; Xu W. et al., 2007]. На основании структурных и термодинамических данных было высказано предположение, что NTD и CTD могут препятствовать неспецифическим белок-белковым взаимодействиям, выступая в качестве «внутримолекулярных шаперонов» центральной области [Xing Y. et al., 2008].

β -катенин взаимодействует со многими белками. На данный момент зарегистрировано более 38 молекул, взаимодействующих с β -катенином [http://www.stanford.edu/group/nusselab/cgi-bin/wnt/protein_interactions]. Однако

структура белка и особенности расположения сайтов связывания (центральная область R3-R9) подразумевают, что данные молекулы не могут связываться с β -катенином одновременно [Valenta T. et al., 2012]. Пространственное разделение различных β -катенин-связывающих факторов в клетке может быть важным для правильного функционирования этих белков. Кроме того, конкуренция между партнерами β -катенина имеет важное значение для регулирования работы Wnt/ β -катенинового сигнального пути [Choi H.J. et al., 2006]. Работа β -катенина регулируется путем различных посттрансляционных модификаций, включая фосфорилирование Ser/Thr и Tyr, убиквитилирование и ацетилирование [Xu W. et al., 2007].

β -катенин принимает участие в механизмах развития различных общепатологических процессов (альтерации, воспаления, компенсаторно-приспособительных процессов, новообразований) [Morin P.J., 1999; Polakis P., 2000; Gustafson B. et al., 2006; Silva-García O. et al., 2014]. Так, в контексте Wnt сигнального пути β -катенин участвует в контроле воспалительной реакции на бактериальную инфекцию [Sun J. et al., 2005; Duan Y. et al., 2007; Jiang A. et al., 2007; Liu X. et al., 2010; Manicassamy S. et al., 2010; Schaale K. et al., 2011; Liu X. et al., 2012]. Противоречивость его эффектов (как провоспалительные, так и противовоспалительные) может быть объяснена особенностями стимула, на который формируется воспалительный ответ, перекрестным взаимодействием с другими сигнальными путями, типом пораженных клеток. Также как кофактор канонического Wnt сигнального пути, он задействован в процессах дифференцировки, апоптоза и пролиферации, сохранения пула стволовых клеток. Исследования его функционального потенциала активно продолжаются.

Центральные функции β -катенина реализуются, благодаря его вовлеченности в механизмы сигнальной передачи в рамках Wnt сигнального каскада и клеточной адгезии.

1.3. β -катенин как ключевой компонент канонического Wnt сигнального пути

Wnt/ β -катенин сигнальный путь является одним из фундаментальных механизмов, который отвечает за клеточную пролиферацию, дифференцировку и тканевой гомеостаз, его дисрегуляция может лежать в основе опухолевой трансформации клеток [Тяжелова В.Г., 2005; MacDonald B.T. et al., 2009; McDonald S.L, Silver A., 2009; Sastre-Perona A. et al., 2012]. Запуск данного сигнального пути осуществляется белками семейства Wnt. Нужно отметить, что белки семейства Wnt способны стимулировать как минимум три различных сигнальных каскада: канонический β -катениновый (Wnt 1, 3, 3a, 7a, 10b) и два неканонических сигнальных пути – Ca^{2+} -зависимый и PCP (путь клеточной поляризации) (Wnt 4, 5a, 11) [Veeman M.T. et al., 2003; Widelitz R., 2005].

В условиях отсутствия белков Wnt в клетке формируется цитозольный белковый комплекс (комплекс «деструкции»), который включает в себя белки Axin, APC (Adenomatous Polyposis Coli), CK1 α (casein kinase 1) и GSK3 β (glycogen synthase kinase-3 β) [Kimelman D. et al., 2006; Clevers H. et al., 2012; Stamos J.L. et al., 2013; Zeller E. et al., 2013]. Ключевым регулирующим шагом канонического Wnt сигнального пути является процесс фосфорилирования β -катенина компонентами комплекса деструкции: CK1 α фосфорилирует серин в 45-м положении, что в дальнейшем активирует работу GSK-3 β киназы, которая обеспечивает фосфорилирование β -катенина по серину в 33-м и 37-м положениях и треонину в 41-м положении [Kimelman D. et al., 2006; Verheyen E.M. et al., 2010]. Координирует данный процесс белок Axin, имеющий отдельные домены для взаимодействия с GSK3 β , CK1 α и β -катенином [Amit S. et al., 2002]. Только после такой комплексной модификации фосфорилированный β -катенин распознается β -TrCP-содержащей убиквитинлигазой, запускающей процесс деструкции β -катенина в протеасомах (рис. 3) [Liu C. et al., 2002; Kikuchi A. et al., 2006]. Однако точные механизмы деградации фосфорилированного β -катенина не достаточно ясны.

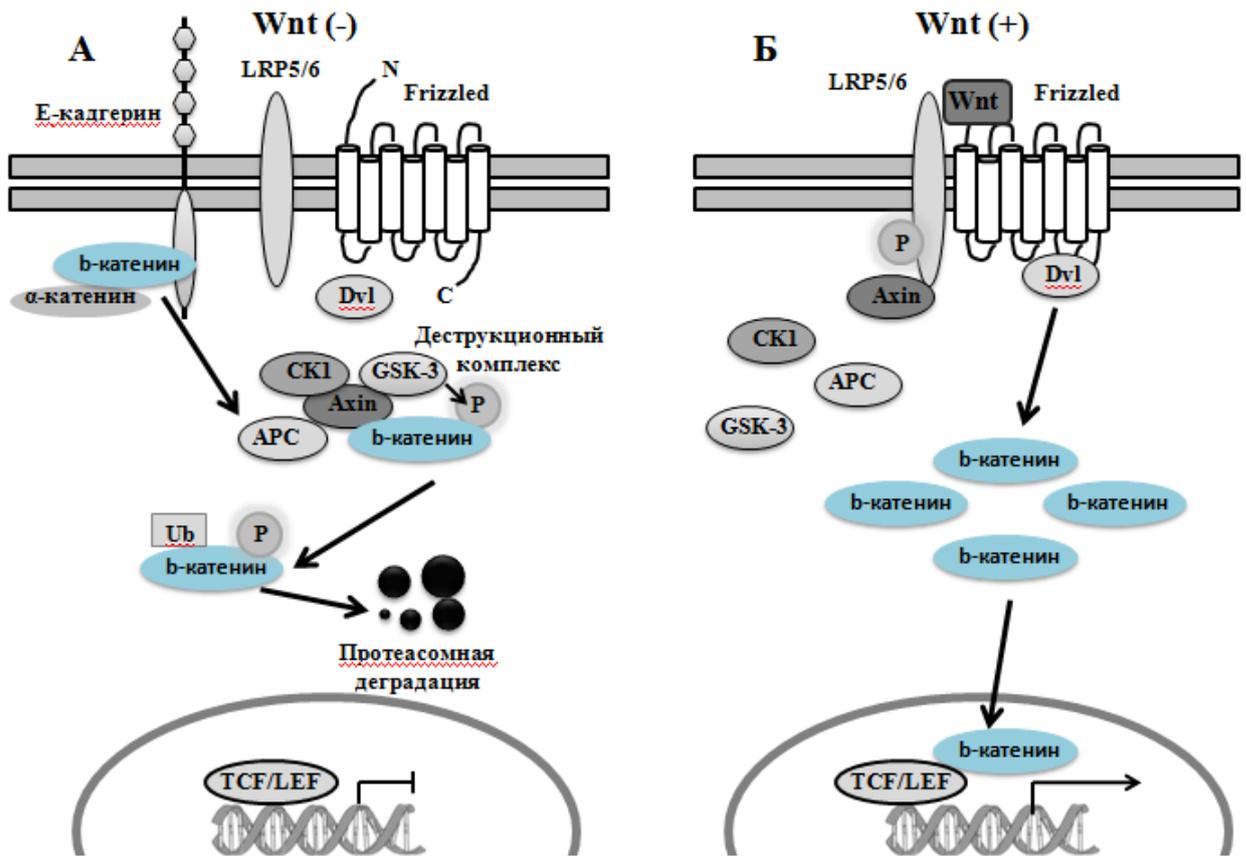


Рис. 3. Wnt/β-катениновый сигнальный путь (по данным M. Corr, 2008; J.N. Anastas et al., 2013)

Примечание. А - сигнальный путь без стимуляции белками Wnt; Б - сигнальный путь после стимуляции белками Wnt (пояснение в тексте). LRP5/6 - рецептор липопротеина низкой плотности 5/6 (Low density lipoprotein receptor-related protein 5/6); Dvl - Dishevelled; CK1 - казеин киназа 1α (casein kinase 1α); GSK3b - киназы-3β гликогенсинтазы (glycogen synthase kinase-3β); APC - аденоматозный полипоз толстой кишки (Adenomatous Polyposis Coli); TCF - Т-клеточный фактор (T cell factor); LEF - белок, связывающийся с лимфоидным энхансером (Lymphoid Enhancer Factor); P - участки фосфорилирования; Ub - участки убиквитинирования

Таким образом, в отсутствие Wnt-стимуляции цитоплазматическая концентрация β-катенина поддерживается на низком уровне.

Присутствие во внеклеточной среде Wnt белков (1, 3, 3а, 7а, 10в) приводит к формированию на клеточной поверхности рецепторного комплекса между Frizzled (Fzd)-рецепторами и LRP5/6 (Low density lipoprotein Receptor-related Protein-5/6). LRP5/6-сигнальный комплекс (комплекс Fzd–LRP5/6 и связанный с ним белок Dishevelled (Dvl)) восстанавливает белок Axin и, тем самым, ингибирует фосфорилирование β-катенина, вызывая его стабилизацию [Liu С.

et al., 2002; Kimelman D. et al., 2006; Chu M.L-H. et al., 2013; Hur J. et al., 2013]. Накопленный β -катенин мигрирует в ядро и вступает во взаимодействие с транскрипционными факторами TCF/LEF. Вместе они включают или выключают транскрипцию «канонических» (т.е. β -катенин зависимых) генов Wnt-ответа, включающих специфические TCF-связывающие сайты в области промоторов этих генов: *MYC*, *CCND1*, *E2f1*, *Axin-2*, *vimentin*, *Snail*, *Slug*, *Twist* и др. [Graham T.A. et al., 2000; Xu W. et al., 2007].

Однако данные, опубликованные в последние годы, предполагают более сложную организацию комплексов β -катенин/TCF и β -катенин/APC/Axin, чем описанная линейная модель [Gerlach J.P. et al., 2014; Hagemann A.I.H. et al., 2014].

Таким образом, активация Wnt/ β -катенинового сигнального пути, благодаря своему влиянию на экспрессию целого ряда генов-мишеней, поддерживает внутриклеточный гомеостаз. Нарушения данного каскада являются важным патогенетическим фактором при ряде заболеваний, в том числе злокачественных опухолей [Clevers H. et al., 2012; Hur J. et al., 2013].

1.4. Роль β -катенина в формировании межклеточных адгезионных контактов

1.4.1. E-кадгерин как ключевой партнер β -катенина в механизмах адгезии

Одной из конкурирующих функций β -катенина, наряду с сигнальной активностью, является участие в межклеточной адгезии [Ozawa M. et al., 1989; Valenta T. et al., 2012]. Мембранная локализация β -катенина обусловлена его взаимодействием с цитоплазматическим доменом E-кадгерина [Nelson W.J. et al., 2004].

Представители семейства кадгеринов являются одноцепочечными трансмембранными гликопротеинами, которые опосредуют Ca^{2+} -зависимую межклеточную адгезию [Hulpiau P. et al., 2009]. На основе молекулярной структуры, особенностей экспрессии и функционирования, семейство кадгеринов подразделяется на пять основных подсемейств: классические

кадгерины I типа (Е-кадгерин/кадгерин-1 (epithelial) (ген *Cdh1*), N-кадгерин/кадгерин-2 (neural) (ген *Cdh2*), Р-кадгерин/кадгерин-3 (placental) (ген *Cdh3*), R-кадгерин/кадгерин-4 (ген *Cdh4*)), тесно связанные с кадгеринами II типа, десмосомальные кадгерины, протокадгерины и различные кадгерин-связывающие молекулы [Yagi T. et al., 2000; Hulpriau P. et al., 2009; Marie P.J. et al., 2014]. Классические кадгерины получили свое название от ткани, в которой они преимущественно экспрессируются. Название «Е-кадгерин» было предложено группой авторов в начале 1980-х годов [Ogou S.I. et al., 1983; Yoshida-Noro C. et al., 1984].

Ген Е-кадгерина (*CDH1*) локализуется на хромосоме 16q22.1, охватывая объем около 100 кб. *CDH1* содержит 16 экзонов и 15 интронов, структура гена аналогична у различных видов животных [Berx G. et al., 1995].

Е-кадгерин, как представитель классических кадгеринов, состоит из экстраклеточного домена (ЕС, 550 а.а.), одного трансмембранного домена и цитоплазматического хвоста (150 а.а.), который консервативен среди различных подтипов семейства кадгеринов [Blaschuk O.W. et al., 1990; Nollet F. et al., 2000; Berx G. et al., 2008] (рис. 4).

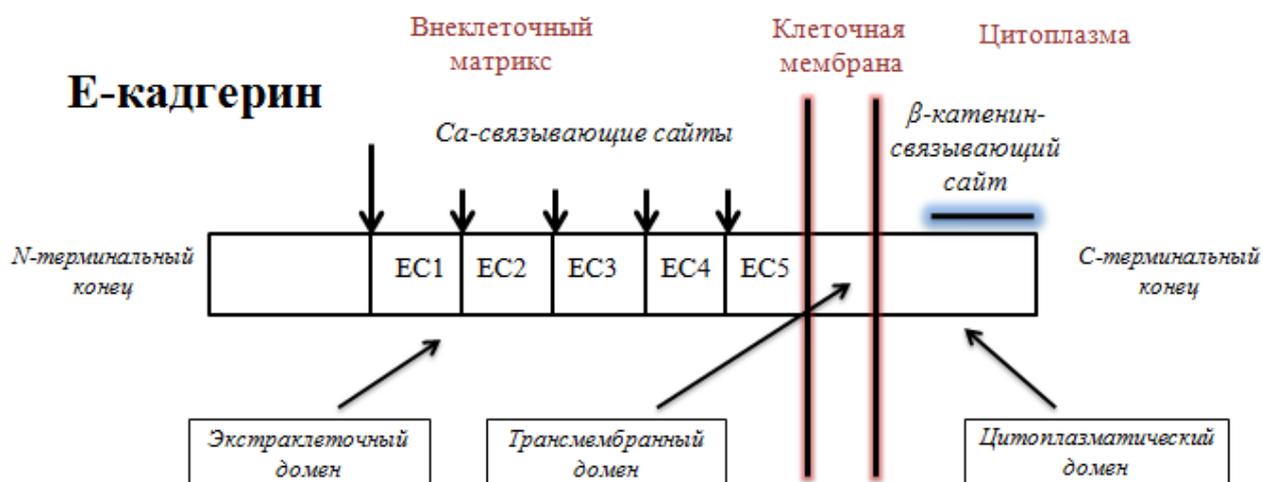


Рис. 4. Схематическое изображение структуры белка Е-кадгерина (по данным S. Semba et al., 2001).

Примечание. ЕС - эктодомен Е-кадгерина

Эктодомен, состоящий из пяти тандемных Ca^{2+} -связывающих повторов (EC1-EC5), формирует связь между соседними клетками путем боковой димеризации [Pokutta S. et al., 1994; Shapiro L. et al., 1995; Hartsock A. et al., 2008]. Данный домен E-кадгерина опосредует, в основном, гомотипическую адгезию между эпителиальными клетками, реже - гетеротипическую, (например, взаимодействие меланоцитов или дендритных клеток с кератиноцитами) [Tang A. et al., 1994]. Примером гетерофильных-гетеротипических взаимодействий может служить связь между E-кадгерином энтероцитов и интегрином $\alpha\text{E}\beta 7$ Т-лимфоцитов [Сепек К.Л. et al., 1994; Van den Bossche, 2012]. Цитоплазматический домен состоит из мембранного проксимального цитоплазматического/консервативного домена (membrane proximal cytoplasmic/conserved domain (MPCD)) и С-терминального домена (β -катенин-связывающий домен (CBD)) [Rimm D.L. et al., 1994]. Внутриклеточный регион E-кадгерина связывает белки, которые регулируют эндоцитоз и деградацию E-кадгерина, внутриклеточную передачу сигнала и транскрипцию генов [Halbleib J.M. et al., 2006]. Цитоплазматический хвост кадгеринов димеризован и связывается с актином цитоскелета через p120, β -катенин и α -катенин [Huber A.H. et al., 2001; Глушанкова Н.А., 2003].

Благодаря особенностям своей структуры, E-кадгерин обеспечивает нормальную архитектуру эпителиальных тканей, играет важную роль в реализации эпителиально-мезенхимального перехода.

1.4.2. Молекулярные механизмы взаимодействия β -катенина с E-кадгерином

Межклеточная адгезия является динамичным процессом. Именно динамичность адгезионных контактов обеспечивает такие внутритканевые события как создание новых клеточных контактов во время движения клеток, обновления тканей и заживления ран. Кадгерины способны адаптировать свои адгезионные взаимодействия в ответ на изменения механических свойств окружающей их среды.

Как было отмечено ранее, в эпителиальной ткани адгезионный контакт с соседней клеткой обеспечивает эктодомен E-кадгерина, при этом цитоплазматический хвост молекулы опосредует структурные и сигнальные операции, необходимые для адгезии [Leckband D. et al., 2000].

Нужно отметить, что E-кадгерин способен выполнять адгезионную функцию только в связанном состоянии с катенинами.

Экспериментальные исследования показали, что комплекс E-кадгерин/ β -катенин формируется котрансляционно в эндоплазматической сети/комплексе Гольджи и затем мигрирует к клеточной мембране [Curtis M.W. et al., 2008]. Если E-кадгерин не ассоциируется с β -катенином, в таком случае E-кадгерин остается в эндоплазматической сети, где в последствии разрушается.

Дальнейшее формирование адгезионных контактов при участии E-кадгерина и β -катенина представляет собой многоступенчатый процесс. Первоначально комплексы в пределах одной клетки располагаются диффузно. Адгезия инициируется образованием димеров кадгеринов на поверхности двух соседних клеток через *транс*-взаимодействия [Trojanovsky S., 2005]. Последующая латеральная кластеризация кадгеринов через *цис*-взаимодействия является пусковым механизмом для окончательного формирования адгезионных контактов [Hong S. et al., 2010; Wu Y. et al., 2010; Harrison O.J. et al., 2011; Wu Y.H. et al., 2011].

Другим важным процессом в работе комплекса E-кадгерин/ β -катенин является его деградация. Перестройка комплекса и регуляция его активности на клеточной поверхности опосредована клеточным эндоцитозом. Сначала происходит захват комплекса цитоплазмой, а затем либо его возвращение на мембрану клетки, либо деградация [Quang V.A.T. et al., 2013]. Диссоциация комплексов приводит к формированию свободных мембраносвязанных молекул E-кадгерина и цитоплазматического пула β -катенинов [Hinck L. et al., 2004] (рис. 5).

Работа E-кадгерина, в дополнении к β -катенину, ассоциирована также с такими белками как, α -катенин, p120-катенин, винкулин и EPLIN (Epithelial protein lost in neoplasm) [Yonemura S. et al., 2010; Abe K. et al., 2008]. α -катенин является актин-связывающим белком, который динамически взаимодействует с кадгеринами и цитоскелетом.

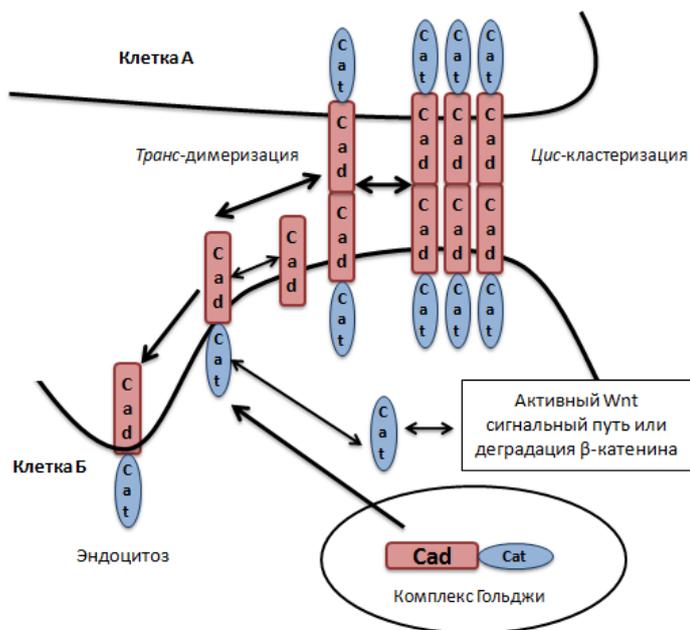


Рис. 5. Схематичное изображение многошагового процесса формирования межклеточных адгезионных контактов на основе комплекса E-кадгерин/ β -катенин (по данным J. Chen et al., 2014). Пояснения в тексте.

Примечания. Cad – E-кадгерин, Cat – β -катенин

В молекуле α -катенина отсутствует Armadillo домен, таким образом он структурно не связан с β -катенином [Yamada S. et al., 2005]. p120-катенин принадлежит к подсемейству Armadillo белков [Hatzfeld M., 2005].

Несмотря на структурное сходство, p120-катенин и β -катенин связываются с разными сайтами цитоплазматического домена E-кадгерина. p120-катенин, взаимодействуя с проксимальной частью домена, принимает участие в регуляции боковой кластеризации и стабилизации E-кадгерина на мембране [Hartsock A. et al., 2008; Ishiyama N. et al., 2010]. Связывание p120-катенина может препятствовать эндоцитозу E-кадгерина. β -катенин взаимодействует с дистальной частью цитоплазматического хвоста E-кадгерина и с α -катенином.

Последний непосредственно связывается с нитчатым актином (F-актином) [Drees F. et al., 2005] (рис. 6).

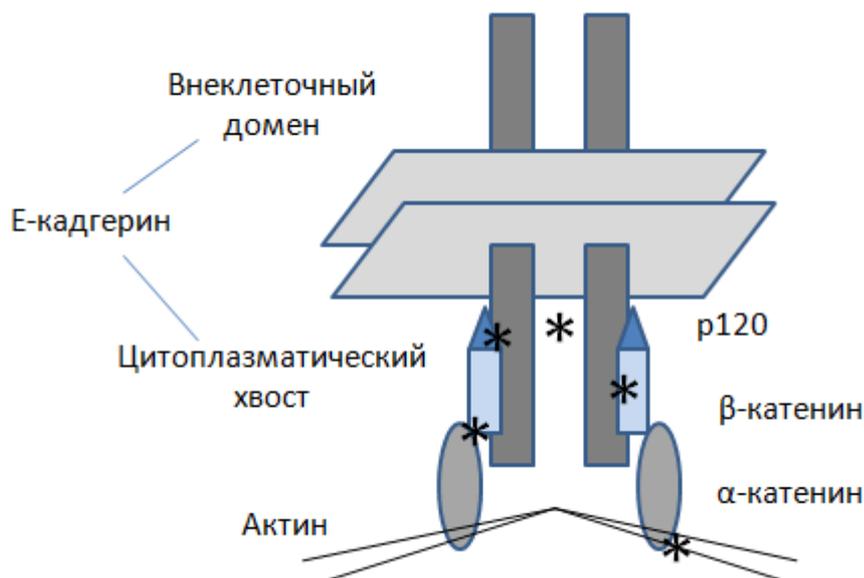


Рис. 6. Схематическое изображение комплекса E-кадгерин/катенины на клеточной мембране. Ключевые сайты регуляции отмечены звездочками (по данным J. Chen et al., 2014).

Таким образом, в рамках комплекса E-кадгерин/β-катенин/α-катенин цитоплазматический домен E-кадгерина связывается с центральной Armadillo областью β-катенина; связь между β-катенином и α-катенином происходит между их N-терминальными доменами [Choi H.J. et al., 2006; Shapiro L. et al., 2009; Verx G. et al., 2008]. Эти взаимодействия регулируются фосфорилированием тирозина и дефосфорилированием в остатках серин/треонин β-катенина. α-катенин, имея эволюционно консервативную роль в организации цитоскелета, стабилизирует и связывает нити актина за счет подавления полимеризации актина на комплексе Arp2/3 (Actin-Related Proteins 2/3) [Shapiro L. et al., 2009; Franz C.M. et al., 2004].

Важно понимать, что *цис*-кластеризация комплекса E-кадгерин/ β -катенин и его диссоциация с образованием цитоплазматического пула β -катенина и свободного E-кадгерина должны достигать равновесия, чтобы поддерживать стабильный уровень комплекса E-кадгерин/ β -катенин на поверхности клеток.

1.5. Механизмы регуляции баланса сигнальной и адгезионной функции β -катенина

В клетке β -катенин существует в двух различных пулах: один связан с плазматической мембраной и выступает в качестве составной части комплекса с E-кадгерином, а другой, цитоплазматический/ядерный бассейн, служит для передачи сигнала от мембраны к ядру.

С момента идентификации β -катенина, как ключевого компонента кадгерин-опосредованной межклеточной адгезии, и с последующим обнаружением его центральной роли в Wnt сигнальном каскаде, стало важным объяснить координацию этих двух путей [Bienz M., 2005; Fu Y. et al., 2011]. Ранние работы на клеточных линиях и простых модельных организмах указывают, что экспрессия E-кадгерина и сигнальная функция β -катенина взаимосвязаны. Например, направленное увеличение экспрессии белка E-кадгерина коррелирует с повышением адгезионной активности β -катенина [Heasman J. et al., 1994; Fagotto F. et al., 1996; Sanson B. et al., 1996; Orsulic S. et al., 1999]. И, напротив, снижение уровня экспрессии E-кадгерина в период развития тканей сочетается с усилением транскрипционной функции β -катенина [Cox R.T. et al., 1996; Ciruna B. et al., 2001].

Согласно данным литературы, центральным координирующим белком может быть E-кадгерин. При этом формирование адгезионных контактов может влиять как негативно, так и позитивно на функционирование канонического Wnt сигнального каскада.

Действительно, кажется логичным, что экспрессия E-кадгерина может подавлять Wnt/ β -катениновый сигналинг за счет формирования с сайтами β -катенина межклеточных контактов. Результаты исследований показывают, что

для ингибирования экспрессии генов-мишеней Wnt пути достаточно присутствия цитоплазматического домена E-кадгерина [Gottardi C.J. et al., 2001]. Последние данные свидетельствуют о том, что E-кадгерин также усиливает взаимодействие между кавеолином-1 и β -катенином возле плазматической мембраны, что приводит к снижению β -катенин/TCF/LEF-зависимой транскрипции генов [Torres V.A. et al., 2007]. Вместе с тем вне адгезионной связи E-кадгерин может быть необходимым компонентом инициирования Wnt сигнального пути за счет его способности в комплексе с p120-катенином регулировать сборку сигналосомы Wnt пути [Casagolda D. et al., 2010]. Кроме того, активированная SK1 α фосфорилирует E-кадгерин, тем самым ослабляя связь в комплексе E-кадгерин/ β -катенин и переводит β -катенин из связанного с E-кадгерином бассейна в цитоплазматический сигнальный пул [Dupre-Crochet S. et al., 2007; Casagolda D. et al., 2010].

Суммируя многочисленные разноплановые исследования в этом направлении, становится понятно, что E-кадгерин может оказывать влияние на сигнальную функцию β -катенина на трех уровнях: 1) прямое, высоко-аффинное связывание с β -катенином, которое конкурирует за его взаимодействия с другими связывающими партнерами (TCF, Axin, APC) и тем самым предотвращает ядерный импорт белка и запуск транскрипции генов-мишеней [Fagotto F. et al., 1998; Suh E.K. et al., 2003]; 2) увеличение скорости потока β -катенина через комплекс деструкции [Hay et al., 2009; Maher M.T. et al., 2009]; 3) облегчение активации Wnt рецепторного комплекса на уровне фосфорилирования LRP5/6, эндоцитоза комплекса и формирования "сигналосомы" [Bilic J. et al., 2007; Blitzer J.T. et al., 2006; Chen J. et al., 2014].

Однако сам факт вовлеченности β -катенина как в механизм адгезии, так и передачу сигналов к ядру поднимает закономерный вопрос, не может ли сам β -катенин координировать адгезию и Wnt сигнальный путь?

Авторами J. Chen et al. была создана модель, отражающая такую координацию и взаимодействие (рис. 7) [Chen J. et al., 2014].

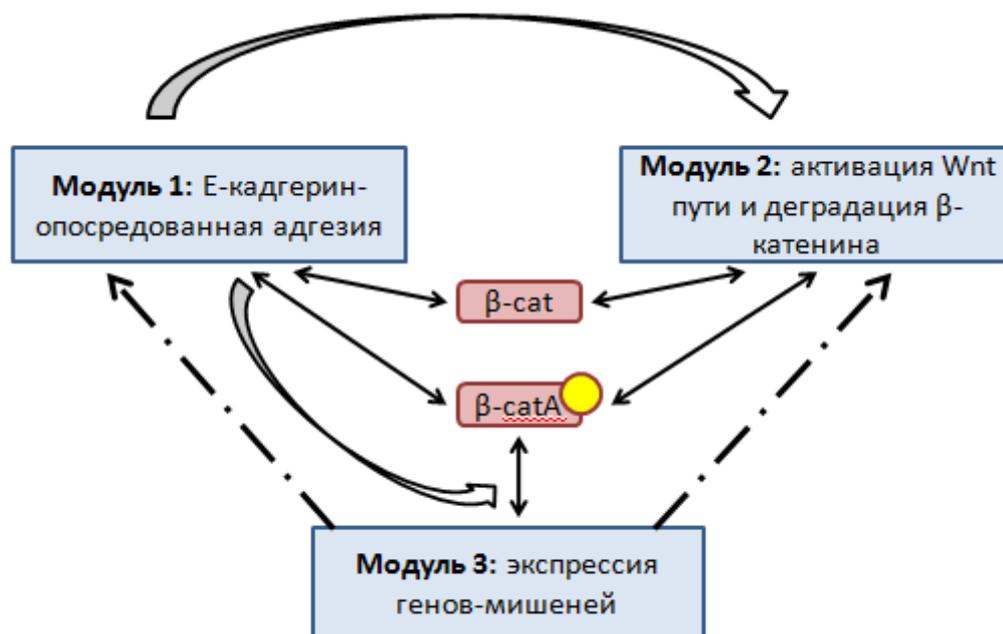


Рис. 7. Модифицированная модель J. Chen, отражающая взаимодействие между кадгерин-опосредованной межклеточной адгезией и Wnt/ β -катениновым сигнальным путем [по данным Chen J. et al., 2014]. Представлены три модуля функциональной активности β -катенина (E-кадгерин-опосредованная адгезия, активация Wnt пути и деградация β -катенина, экспрессия генов мишеней) и их взаимосвязи.

Примечание. β -cat – β -катенин, β -catA – активированный β -катенин.

-  – взаимосвязь вокруг активированного β -катенина.
-  – влияние запуска экспрессии генов-мишеней на модуль 1 и 2.
-  – механизм обратной отрицательной связи.

Согласно предложенной модели выделяют три модуля: 1. Модуль клеточной адгезии. Он характеризует динамику формирования адгезионных контактов и взаимодействие E-кадгерина и β -катенина во время этого процесса; 2. Модуль активации Wnt-сигнального пути и деградации β -катенина. Определяет связь между внеклеточной активацией Wnt сигнального пути Wnt-лигандами и внутриклеточной деградацией β -катенина; 3. Модуль экспрессии генов-мишеней Wnt/ β -катенинового сигнального каскада. Указанные три модуля объединены β -катенином. Поэтому динамика всей сети, согласно данной модели, регулируется балансом β -катенина в различных модулях.

Не исключено наличие дополнительных белков, регулирующих баланс между двумя функционально отделенными друг от друга бассейнами β -

катенина. F.H. Brembeck et al. [Brembeck F.H. et al., 2004] предположили, что таким потенциальным переключателем может быть белок VCL9-2.

Таким образом, полученные к настоящему времени результаты исследований не дают однозначного ответа, каким образом реализуется регуляция адгезионной и транскрипционной функций β -катенина. С нашей точки зрения, регуляция адекватного соотношения данных функции β -катенина осуществляется суммированием эффектов как самого β -катенина, так и E-кадгерина. Возможно построение линейной модели такого взаимного влияния. Так, высвобождение β -катенина из комплекса деструкции при активации канонического Wnt пути и его транслокация в ядро в дальнейшем предполагает подавление экспрессии гена E-кадгерина *CDH1*. С другой стороны, выраженная экспрессия на мембране E-кадгерина удерживает β -катенин в примембранном пуле, препятствуя реализации его сигнальной активности.

Внутренняя связь двух центральных функций β -катенина проявляется также при раке, прогрессирование которого зависит от нарушения внутриклеточного сигналинга и потери кадгерин-опосредованной адгезии [Birchmeier W. et al., 1995; Brabletz T. et al., 2001; Tang W.W. et al., 2007; Vermeulen L. et al., 2013]. Важно отметить, что такие изменения не являются универсальными для прогрессии опухолевого процесса; так, при некоторых эпителиальных злокачественных опухолях, несмотря на потерю экспрессии белка E-кадгерина, не фиксируется активность Wnt/ β -катенинового сигнального пути [Caca et al., 1999; van de Wetering M. et al., 2001; Herzig et al., 2007].

Этим определяется необходимость комплексного исследования баланса адгезионной и сигнальной/транскрипционной функции β -катенина при различных злокачественных опухолях.

1.6. Роль нарушения комплекса E-кадгерин/ β -катенин в механизмах прогрессии злокачественных опухолей

Нарушения комплекса E-кадгерин/ β -катенин определяются при разных вариантах злокачественных опухолей и коррелируют с их патологическими и клиническими особенностями, такими как дедифференцировка опухоли, инфильтративный рост, метастазирование в лимфатические узлы.

Потеря экспрессии E-кадгерина или нарушение его нормальной локализации в межклеточных контактах закономерно наблюдается в сайтах эпителиально-мезенхимального перехода в процессе опухолевой прогрессии. Часто уровень экспрессии E-кадгерина имеет обратную корреляцию со злокачественным потенциалом опухоли [Yap A., 1998; Cowin P. et al., 2005; Junghans D. et al., 2005]. Являясь опухолевым супрессором, потеря E-кадгерина ухудшает прогноз многих злокачественных новообразований [Bhagat R. et al., 2013].

β -катенин, как было показано в ряде исследований, является одним из ключевых модуляторов выживания и пролиферации опухолевых клеток [Morin P.J., 1999; Polakis P., 2000; Valenta T. et al., 2012]. За счет участия в регуляции экспрессии эндотелиального фактора роста сосудов (VEGF), β -катенин способен поддерживать рост опухоли, стимулируя местный ангиогенез [Easwaran V. et al., 2003; Shivanna S. et al., 2015]. Также, β -катенин регулирует экспрессию генов матриксных металлопротеиназ (MMP2, MMP7, MMP9, MMP26), продукты которых играют роль в ремоделировании тканей, ангиогенезе, пролиферации, миграции и дифференцировки клеток, апоптозе [Brabletz T. et al., 1999; Lowy A.M. et al., 2006; Hua H. et al., 2011; Said A.H. et al., 2014]. Это определяет, наряду с другими механизмами, его роль в процессах метастазирования опухолей. Кроме того, участие β -катенина в прогрессе и росте опухоли связано с индукцией экспрессии таких онкогенов, как циклина D1 (*CNND1*) и c-мыс (*MYC*) [He T.C. et al., 1998; Tetsu O. et al., 1999; Shtutman M. et al., 1999; Ripple M.J. et al., 2014]. В последние годы особое значение для роста и прогрессии злокачественной опухоли придается опухолевому

микроокружению. β -катенин, изменяя экспрессию генов-мишеней в мезенхимальных стволовых клетках, фибробластах, макрофагах, эндотелиальных клетках, участвует в ремоделировании опухолевой стромы и способствует росту опухоли [Vermeulen L. et al., 2010; Friedl P. et al., 2011].

1.7. Роль β -катенина в механизмах опухолевой трансформации

Нарушения сигнальной и адгезивной функции β -катенина выявлены при колоректальном раке, раке молочной железы, меланоме, раке предстательной железы, раке щитовидной железы и некоторых других вариантах опухолей [Polakis P., 2000; Morin P.J., 1999].

Рак толстой кишки

Поддержание равновесия между стволовыми, делящимися и дифференцирующимися клетками кишечного эпителия во многом обусловлено слаженной работой Wnt/ β -катенин сигнального пути [Scoville D.H. et al., 2008; Vermeulen L. et al., 2010; Roy S. et al., 2012]. Показано, что нарушения данного баланса в быстро и постоянно регенерирующей ткани, которой является эпителий толстой кишки, могут лежать в основе развития злокачественных опухолей [Valkenburg K.C. et al., 2011; Lien W-H. et al., 2014]. Первоначально при семейном аденоматозе и раке толстой кишки была выявлена мутация в гене *APC* [Nishisho I. et al., 1991]. Позже было отмечено, что при раке толстой кишки в опухолевых клетках наблюдается накопление β -катенина. Это объясняется не только инактивирующей мутацией в гене *APC*, но и собственно мутаций в гене β -катенина *CTNNB1* [Morin P.J. et al., 1997]. Исследования последних лет установили, что в случае прогрессии колоректального рака активация канонического Wnt сигнального пути также связана с инактивацией малых ГТФаз RhoA-семейства [Rodrigues P. et al., 2014]. Кроме того, нужно учитывать результаты исследования, выполненного R. Aamodt et al. с соавторами, которые свидетельствуют о различной роли мембранной экспрессии β -катенина при раке прямой кишки и раке толстой кишки. Подобные результаты авторы наблюдали и в отношении экспрессии E-кадгерина [Aamodt R. et al., 2010].

Такое различие, возможно, определяемое особенностями биологии опухоли в разных отделах толстой кишки, в дальнейшем определяет и прогностическое значение данных маркеров: при раке прямой кишки нет корреляции между экспрессией белков E-кадгерина и β -катенина и прогнозом заболевания, в то время как при аденокарциноме толстой кишки другой локализации существует положительная корреляция экспрессии изучаемых белков и прогнозом [Aamodt R. et al., 2010].

Современные данные указывают на повышение интенсивности экспрессии β -катенина не только в опухолевых клетках толстой кишки, но и в T-регуляторных клетках опухолевого микроокружения. При этом активация β -катенина в T-регуляторных клетках нарушает их нормальное развитие и функцию [van Loosdregt J. et al., 2013; Keerthivasan S. et al., 2014]. Таким образом, при раке толстой кишки наблюдаются патогенетические значимые изменения экспрессии β -катенина как в клетках самой опухоли, так и в клетках опухолевого микроокружения.

Рак предстательной железы

Доказано, что β -катенин принимает активное участие в эмбриональном и постнатальном этапах развития предстательной железы. Так, являясь главным кофактором канонического Wnt сигнального пути, β -катенин контролирует самообновление клеток-предшественников эпителия предстательной железы [Valkenburg K.C. et al., 2011; Bisson I. et al., 2009]. При раке предстательной железы мутации в гене β -катенина *CTNNB1* встречаются редко (в 5% случаев) [Voeller H.J. et al., 1998; Chesire D.R. et al., 2003]. Как правило, они затрагивают GSK3 β -связывающий сайт β -катенина: делеция Ser45 и замена Ser33 на Thr [Voeller H.J. et al., 1998; Chesire D.R. et al., 2000; Gerstein A.V. et al., 2002]. Мутации в гене нарушают дальнейшее убиквитинирование белка и его деградацию в протеасомах, приводят к накоплению β -катенина в цитоплазме и ядре клетки.

Низкая частота мутаций в генах *CTNNB1*, *APC* и *AXIN1* при раке предстательной железы противопоставляются с сообщениями о том, что в

большой части опухолевых клеток рака предстательной железы β -катенин имеет аномальную экспрессию и локализацию [Yardy G. W. et al., 2009]. Так, у пациентов с раком предстательной железы с высоким баллом по шкале Глисона более характерна ядерная локализация β -катенина, чем при раке ранней стадии [Whitaker H.C. et al., 2008]. При этом низкий уровень ядерной экспрессии данного белка коррелирует с прогрессией рака и увеличением риска развития рецидива заболевания [Horvath L.G. et al., 2005]. У пациентов с кастрат-резистентной формой рака предстательной железы с метастазами в костную ткань в 37% случаев также определяется преимущественно ядерная локализация β -катенина с реализацией его транскрипционной функции [Wan X. et al., 2012]. В дополнение к своей роли в Wnt-сигнальном пути, β -катенин выступает в качестве кофактора рецепторов андрогенов. При взаимодействии между рецепторами андрогенов и β -катенином происходит стимуляция опосредованной андрогенами транскрипции генов-мишеней [Voeller H.J. et al., 1998; Lonergan P.E. et al., 2011]. В клеточных линиях рака предстательной железы β -катенин усиливает андроген-стимулированную активацию транскрипции рецепторов андрогенов, повышает их чувствительность к низкому уровню андрогенов [Lee E. et al., 2013]. Существуют также данные о том, что и при доброкачественной гиперплазии предстательной железы β -катенин может локализоваться в ядре [Bauman T.M. et al., 2014].

Обнаружение ядерного β -катенина при гиперплазии, а также при раке предстательной железы позволяет предположить, что смещение баланса функций β -катенина в сторону сигнальной/транскрипционной функции играет важную роль как в предраковых процессах, так и в прогрессии злокачественной опухоли [Kurta R.M. et al., 2012].

Гепатоцеллюлярный рак

Белок β -катенин имеет важное значение для нормального развития печени, начиная с его ключевой роли в эмбриональном периоде до контроля экспрессии генов метаболизма, активации факультативных стволовых клеток в постнатальном периоде [Thompson M.D. et al., 2007; Lade A.G. et al., 2011].

В 33-67% случаев гепатоцеллюлярного рака определяется ядерное накопление β -катенина [Tien L.T. et al., 2005; Lee H.C. et al., 2006]. Кроме того, у одной трети пациентов найдены мутации в гене *CTNNB1* в 3-м экзоне [Ma L. et al., 2014; Waisberg J. et al., 2015]. Ядерная локализация β -катенина в клетках гепатоцеллюлярного рака может быть связана с выраженной аномальной секрецией белка Frizzled 7, который способствует активации канонического Wnt сигнального пути и как следствие накоплению главного кофактора пути β -катенина [Lee H.C. et al., 2006].

Позднее была выявлена связь между ядерным накоплением β -катенина и дедифференцировкой гепатоцитов, повышенной их способностью к инвазии и более ранних рецидивов после ортотопической трансплантации печени. Анализ экспрессии β -катенина в циркулирующих стволовых опухолевых клетках ГЦР, которые впоследствии могут стать субстратом рецидива после трансплантации печени, указывает также на его ядерное накопление [Zulehner G. et al., 2010; Nejak-Bowen K.N. et al., 2011; Зубко М.Д., 2013].

Аберрантная ядерная экспрессия β -катенина коррелирует со степенью распространенности опухоли и неблагоприятным прогнозом развития ГЦР у пациентов.

Рак молочной железы

Комплекс E-кадгерин/ β -катенин участвует в нормальном развитии и стабилизации цитоархитектуры молочной железы за счет влияния на полярность, подвижность и гибель клеток [Hatsell S. et al., 2003].

Первоначально экспрессия β -катенина была исследована в группе веретенноклеточных поражений молочной железы, включая фиброматоз, листовидную опухоль и метапластическую карциному [Abraham S.C. et al., 2002; Sawyer E.J. et al., 2002; Sawyer E.J. et al., 2003; Hayes M.J. et al., 2008]. Во всех исследованных группах определялась преимущественно цитоплазматическая и/или ядерная локализация маркера, что указывает на активацию канонического Wnt пути. Так, во всех случаях фиброматоза, 23% случаев метапластических карцином и в стромальных клетках 93% случаев

листовидных опухолей молочной железы определялась ядерная экспрессия β -катенина. Ни в одном из случаев метастатической карциномы не была выявлена мутация гена *CTNNB1*, в то время как в клетках фиброматоза присутствовала мутация в 3-м экзоне гена *CTNNB1* [Lacroix-Triki M. et al., 2010]. Потеря мембранной экспрессии β -катенин является также характерной особенностью инвазивных дольковых карцином молочной железы [Geyer F.C. et al., 2011; Заседкевич Ю.М. и соавт., 2014].

Особое место занимает агрессивный вариант рака молочной железы – трипл-негативный. Он является подтипом опухоли, который отличается от других подтипов рака молочной железы профилем экспрессии генов, гистопатологическими признаками и клинической характеристикой [Tan D.S. et al., 2008; Foulkes W.D. et al., 2010]. Для трипл-негативного рака молочной железы также характерна преимущественная цитоплазматическая и ядерная экспрессия β -катенина, что связано со снижением общей выживаемости пациентов, по сравнению с группой пациентов с мембранной экспрессией β -катенина [King T.D. et al., 2012; Xu J. et al., 2015]. Вся совокупность данных, полученных на сегодняшний день, свидетельствует о том, что работа Wnt/ β -катенин сигнального пути в опухолевых клетках молочной железы имеет решающее значение для управления подвижности клеток, а значит, определяет риск развития метастазов и прогноз заболевания.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

β -катенин за счет участия как в механизмах адгезии, так и в сигналинге играет важную роль не только в поддержании внутриклеточного гомеостаза в физиологических условиях, но также определяет развитие и прогрессирование ряда злокачественных опухолей.

Опухолевая трансформация тиреоидного эпителия сопровождается целым рядом генетических изменений (мутации в генах *RAS*, *BRAF*, транслокация *PAX8-PPAR γ 1*, амплификация гена *Met*), эффект которых реализуется через активность таких сигнальных путей как RAS-RAF-МЕК-МАРК-ERK (МАРК

пути), R3K-AKT. Анализ данных литературы указывает на наличие функциональной связи между выше представленными продуктами генов с β -катенином.

Краткий обзор диагностического и прогностического значения β -катенина при раке толстой кишки, раке предстательной железы, гепатоцеллюлярном раке, раке молочной железы и соответствующих некоторых предраковых процессах четко указывает на патогенетическое значение нарушения баланса адгезионной и сигнальной/транскрипционной функций данного белка в механизмах опухолевой трансформации.

Все это позволяет нам подчеркнуть актуальность и важность исследования дисбаланса функций β -катенина при патологии щитовидной железы, включая доброкачественный и злокачественный опухолевый процесс.

Понимание молекулярных аспектов заболевания, включая участие кофакторов сигнальных путей, позволит в дальнейшем предложить новые мишени для таргетной терапии.

Глава 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Материал и дизайн 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. Обследованные пациенты находились на диспансерном учете в эндокринологическом отделении консультативно-диагностической поликлиники Томской областной клинической больницы (зав. отделением – канд. мед. наук М.И. Харахулах), ОГАУЗ "Томский областной онкологический диспансер" (главный врач – канд. мед. наук Л.А. Кудяков), а также на стационарном лечении в клинике общей хирургии ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России (главный врач – канд. мед. наук В.М. Шевелев), отделении опухолей головы и шеи ФГБУ «НИИ онкологии» СО РАН (зав. отделением - академик РАН, д-р. мед. наук, профессор Е.Л. Чойнзонов), отделении хирургии Томской областной клинической больницы (зав. отделением – канд. мед. наук А.И. Хващевский). 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.).

Первичными 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, гипозоногенность, нечеткость контуров, увеличение размеров, выявляемое при динамическом УЗИ); согласие пациента участвовать в исследовании и способность дать письменное информированное согласие. Первичным критерием исключения из программы исследования явился отказ от участия в исследовании (не подписанное информированное согласие), диагностированное и/или леченное злокачественное заболевание в течение последних 5 лет, наличие хронических воспалительных заболеваний, онкологических, наследственных и психических болезней, алкогольной и наркотической зависимости.

Комплексное клиническое обследование пациентов с узловыми образованиями щитовидной железы включало:

- сбор анамнеза, наличие семейного анамнеза по заболеваниям щитовидной железы, а также злокачественных опухолей;
- пальпация щитовидной железы и регионарных групп лимфатических узлов;
- определение концентрации свободной фракции гормона Т4 и ТТГ в сыворотке крови, титра сывороточных антител к тиреопероксидазе;
- УЗИ щитовидной железы с оценкой объема железы, количества узловых образований, их локализация, размеры, контуры, эхогенность, тип кровотока, наличие кальцинатов;
- тонкоигольная аспирационная биопсия (ТАБ) щитовидной железы под контролем УЗИ, цитоморфологическое исследование.

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).

На основании сопоставления результатов клинического, инструментального исследований и цитологического заключения определялась дальнейшая тактика ведения пациента с исключением, либо включением оперативного вмешательства. Объем операции зависел от предполагаемого диагноза. Вторичный отбор пациентов проводился по результатам гистологической верификации диагноза.

На основании клинического, инструментального обследования пациентов, а также гистологического заключения пациенты (n=136) были распределены на четыре клинические группы: пациенты с коллоидным узловым зобом (n=43),

пациенты с АИТ (n=28), больные с фолликулярной аденомой (n=28), больные с папиллярным раком (n=37).

Обязательным критерием включения материала, полученного путем ТАБ узлового образования под контролем УЗИ, в экспериментальный блок исследований явилось полное совпадение цитологического заключения, по результатам традиционной цитологии и анализа жидкостной цитологии, с гистологическим диагнозом. На основании этого условия были выделены группы исследования: пациенты с коллоидным узловым зобом (n=33), пациенты с АИТ, в том числе в сочетании с коллоидным узловым зобом (n=13), больные с фолликулярной аденомой (n=13), больные с папиллярным раком (n=29). Дизайн исследования представлен на рисунке 8.

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 2.

2.1.1. Особенности клинических и лабораторно-инструментальных показателей в группах пациентов, включенных в исследование

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 – 53 ± 11 года) с узловыми образованиями щитовидной железы различной природы: 33 пациента с коллоидным узловым зобом, 13 пациентов с диагнозом фолликулярная аденома, 29 пациентов с папиллярным раком и 13 пациентов с аутоиммунным тиреоидитом.

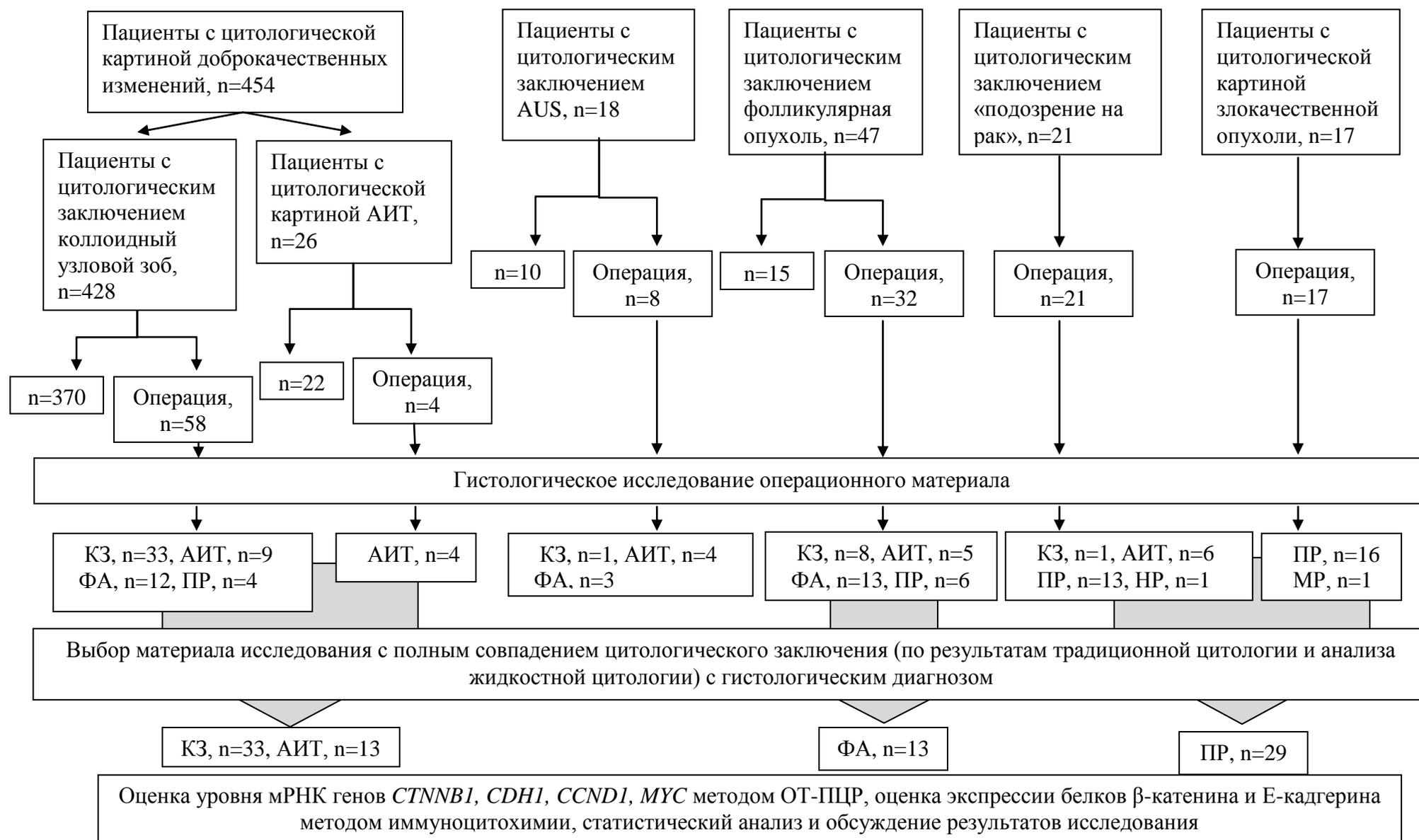


Рис. 8. Дизайн исследования. Примечание. AUS – атипия неясного значения, КЗ-коллоидный зоб, АИТ-аутоиммунный тиреоидит, ФА-фолликулярная аденома, ФР-фолликулярный рак, ПР-папиллярный рак, МР-медуллярный рак, НР-низкодифференцированный рак

Таблица 2

Распределение исследуемых групп пациентов в соответствии с использованными методами исследования

	Методы исследования, общее число пациентов (n)	Группы обследованных лиц			
		Доброкачественный неопухолевый процесс		Доброкачественный опухолевый процесс	Злокачественный опухолевый процесс
		Пациенты с коллоидным узловым зобом	Пациенты с аутоиммунным тиреоидитом	Пациенты с фолликулярной аденомой	Пациенты с папиллярным раком
1.	Цитологическое исследование фолликулярного эпителия щитовидной железы (методом традиционной и жидкостной цитологии) на этапе дооперационной диагностики (n=541)	428	28	47	38
2.	Гистологическая верификация диагноза (n=136)	43	28	28	37
3.	Обогащение жидкостных образцов клетками фолликулярного эпителия методом магнитной сепарации по маркеру EpCAM (CD326) (n=88)	33	13	13	29
4.	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
5.	Оценка экспрессии белка β -катенина в клетках эпителия щитовидной железы методом иммуноцитохимии (n=88)	33	13	13	29
6.	Оценка экспрессии белка E-кадгерина в клетках эпителия щитовидной железы методом иммуноцитохимии (n=88)	33	13	13	29
7.	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

Во всех включенных в исследование группах пациентов диагноз был установлен на основании гистологической оценки операционного материала.

Диагноз коллоидного узлового зоба (шифр МКБ – E01) был установлен на основании комплексного обследования пациентов (n=33), включенных в данную группу: клинические данные, результаты лабораторных исследований, ультразвуковые признаки, цитологическая картина и гистологическое заключение (по результатам исследования операционного материала). Длительность заболевания пациентов с коллоидным узловым зобом до выполнения операционного вмешательства составил 11 (4-25) мес. (таб. 3).

Диагноз фолликулярной аденомы (шифр МКБ – D34) был установлен на основании гистологического исследования операционного материала. На дооперационном этапе, учитывая ограниченные возможности цитологической диагностики у данной группы больных, заключение имело вероятностный характер и трактовалось как фолликулярная опухоль, коллоидный зоб или атипия неясного значения. По данным ультразвукового исследования в нашей работе, узловые образования чаще имели ровные, четкие контуры, гипо- или изоэхогенную структуру, повышенную васкуляризацию. Клиническое и лабораторное обследование установило увеличение щитовидной железы чаще 1 степени, эутиреоз. Средний стаж наблюдения за узловым образованием в щитовидной железе с момента первичной диагностики составил 8,5 мес. (таб. 3).

На данный момент известно, что клиническое течение, прогноз и ответ на терапию папиллярного рака щитовидной железы зависят от его гистологического варианта [Sadow P.M. et al., 2011]. Выделяют классический, фолликулярный, микрофолликулярный, онкоцитарный, светлоклеточный, высококлеточный, диффузный склерозирующий, столбчатоклеточный, солидный, криброзный и более редкие варианты папиллярного рака щитовидной железы (шифр МКБ – C73). В наше исследование были включены пациенты с классическим гистопатологическим вариантом папиллярного рака.

Данная клиническая группа характеризовалась быстрорастущим в последние месяцы узловым образованием в щитовидной железе, при этом анамнез заболевания составил в среднем 14 месяцев. Наличие семейного анамнеза по онкологическим заболеваниям (в том числе раку щитовидной железы) было установлено у 37,9% пациентов данной группы. Постановка диагноза была основана на данных физикального обследования (наличие папилируемого плотного узла/узлов, увеличение щитовидной железы, регионарный лимфаденит), ультразвукового исследования (узел с неровными нечеткими контурами, гипоэхогенный, неоднородный, наличие микрокальцинатов, регионарный лимфаденит), характерной цитологической и гистологической картины (таб. 2, 3). По результатам комплексного обследования, 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).

Диагноз АИТ (шифр МКБ – E06.3) был установлен на основании клинической картины, данных физикального обследования (увеличение щитовидной железы), наличия характерных ультрасонографических признаков (неоднородность, преимущественно гипоэхогенность узлового образования), обнаружения в сыворотке крови повышенного титра антитиреоидных антител (антитела к тиреопероксидазе >30 МЕ/мл и (или) тиреоглобулину >150 МЕ/мл), а также при обнаружении вышеуказанных признаков и первичного гипотиреоза (повышенного уровня тиреотропного гормона (ТТГ) (>3,0 мМЕ/л) в сочетании с нормальной или пониженной концентрацией свободных фракций трийодтиронина (Т3) и тироксина (Т4) (референтные значения для Т3 - 1,08-3,14 пмоль/л; Т4 - 12,0-26,0 пмоль/л), цитологической картины пунктата узлового образования, гистологического исследования операционного материала. В исследование были включены пациенты только с узловой формой АИТ. 4 пациента в группе больных АИТ находились в фазе эутиреоза. Данное

функциональное состояние щитовидной железы было достигнуто путем приема L-тироксина. В фазе гипотиреоза находилось 9 пациентов АИТ. Стаж заболевания у пациентов в данной группе составил 10 (1-23) мес. (таб. 3).

2.2. Методы исследования

2.2.1. Морфологическая оценка фолликулярного эпителия щитовидной железы методом традиционной и жидкостной цитологии

Пункционный материал при традиционном цитологическом анализе сразу наносился на стекло. Препарат окрашивался методом Романовского-Гимзы.

Для проведения цитологического анализа узлового образования щитовидной железы методом жидкостной цитологии материал, полученный методом тонкоигольной аспирационной биопсии (ТАБ) под контролем УЗИ, помещался в стабилизирующий раствор CYTO-FAST Solution (HOSPITEX DIAGNOSTICS, Италия). На втором этапе осуществлялось полуавтоматическое нанесение полученного материала на адгезивное стекло (Menzel, Германия). Клеточный материал в объеме 100 мкл помещали в камеру для образца и центрифугировали 5 мин при скорости вращения ротора 1 000 об/мин (Cellspin II (Tharmas, Германия)). Полученные препараты высушивали при комнатной температуре.

Окрашивание по Папаниколау осуществляли на автоматическом приборе АФОМК-13-ПАП (ЭМКО, Россия), программа «EMCO-PAP-16» [Безруков А.В. и соавт., 2012]. При окраске по Папаниколау последовательно применяются три красителя: гематоксилин для окраски ядер, ОГ6 (на основе красителя оранжевый G) и комбинированная краска ЕА (на основе красителей эозин Y, светло-зеленый SF и фосфорно-вольфрамовой кислоты) для окраски цитоплазмы [Papanicolaou G.N., 1942].

Таблица 3

Особенности клинических и лабораторно-инструментальных показателей у пациентов различных групп исследования

Показатель	Группа пациентов с диагнозом коллоидный зоб (n=33)	Группа пациентов с диагнозом фолликулярная аденома (n=13)	Группа пациентов с диагнозом папиллярный рак (n=29)	Группа пациентов с диагнозом аутоиммунный тиреоидит (n=13)
Возраст, годы	52,3 ±14,2	54,1±12,9	52,0±13,4	52,6±11,1
Пол:				
женский	31 (93,9%)	10 (76,9%)	27 (93,1%)	12 (92,3%)
мужской	2 (6,1%)	3 (23,1%)	2 (6,9%)	1 (7,7%)
Курение:				
да	4 (12,1%)	3 (23,1%)	5 (17,2%)	2 (15,4%)
нет	26 (78,8%)	8 (61,5%)	12 (41,4%)	6 (46,2%)
пассивное	3 (9,1%)	2 (15,4%)	12 (41,4,3%)	5 (38,4%)
Влияние радиации в анамнезе:				
да	1 (3,1%)	0 (0%)	1 (3,5%)	0 (0%)
нет	32 (96,9%)	13 (100%)	28 (96,5%)	13 (100%)
Наличие в семейном анамнезе онкологических заболеваний:				
да	6 (18,2%)	3 (23,1%)	11 (37,9%)	2 (15,4%)
нет	27 (81,8%)	10 (76,9%)	18 (62,1%)	11 (84,6%)
Длительность наблюдения от момента первичного обнаружения, месяцы	11 (4-25)	8,5 (0-12)	14 (2-42)	10 (1-23)
Размер щитовидной железы:				
в пределах нормы	5 (15,1%)	2 (15,4%)	1 (3,5%)	1 (7,6%)
1 степень	12 (36,4%)	10 (76,9%)	18 (62,1%)	6 (46,2%)
2 степень	16 (48,5%)	1 (7,7%)	10 (34,4%)	6 (46,2%)

Продолжение таблицы 3

Показатель	Группа пациентов с диагнозом коллоидный зоб (n=33)	Группа пациентов с диагнозом фолликулярная аденома (n=13)	Группа пациентов с диагнозом папиллярный рак (n=29)	Группа пациентов с диагнозом аутоиммунный тиреозит (n=13)
Количество узловых образований:				
единичное	17 (51,5%)	10 (76,9%)	22 (75,9%)	5 (38,5%)
множественные	16 (48,5%)	3 (23,1%)	7 (24,1%)	8 (61,5%)
Локализация узлового образования:				
правая доля	17 (51,5%)	7 (53,8%)	13 (44,8%)	7 (53,9%)
левая доля	15 (45,4%)	6 (46,2%)	15 (51,7%)	5 (38,5%)
перешеек	1 (3,1%)	0 (0%)	1 (3,5%)	1 (7,6%)
Размер узлового образования, см.куб	1,783 (1,167-7,691)	3,027 (1,007 – 8,029)	1,734 (0,866 – 2,469)	3,146 (1,005 – 9,915)
Края узлового образования:				
ровные	27 (81,8%)	10 (76,9%)	8 (27,6%)	8 (61,5%)
неровные	6 (18,2%)	3 (23,1%)	21 (72,4%)	5 (38,5%)
Эхогенность узлового образования:				
изо-	21 (63,6%)	5 (38,5%)	7 (24,1%)	4 (30,8%)
гипо-	8 (24,2%)	8 (61,5%)	22 (75,9%)	7 (53,9%)
гипер-	2 (6,1%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (15,3%)
ан-	2 (6,1%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Однородность узлового образования:				
однородное	13 (39,4%)	4 (30,8%)	4 (13,8%)	4 (30,8%)
неоднородное	20 (60,6%)	9 (69,2%)	25 (86,2%)	9 (69,2%)
Наличие кальцинатов:				
да	6 (18,2%)	2 (15,4%)	16 (55,2%)	3 (23,0%)
нет	27 (81,8%)	11 (84,6%)	13 (44,8%)	10 (77,0%)

Продолжение таблицы 3

Показатель	Группа пациентов с диагнозом коллоидный зоб (n=33)	Группа пациентов с диагнозом фолликулярная аденома (n=13)	Группа пациентов с диагнозом папиллярный рак (n=29)	Группа пациентов с диагнозом аутоиммунный тиреоидит (n=13)
Васкуляризация узлового образования:				
неизменена	8 (24,2%)	0 (0%)	5 (17,2%)	3 (23,0%)
понижена	3 (9,1%)	4 (30,8%)	2 (6,9%)	0 (0%)
повышена	10 (30,3%)	8 (61,5%)	7 (24,2%)	5 (38,5%)
нет данных	12 (36,4%)	1 (7,7%)	15 (51,7%)	5 (38,5%)
Тип кровотока:				
периферический	6 (18,2%)	6 (46,1%)	5 (17,2%)	4 (30,8%)
внутри	1 (3,0%)	0 (0%)	2 (6,9%)	1 (7,7%)
смешанный	9 (27,3%)	4 (30,8%)	15 (51,7%)	5 (38,5%)
нет данных	17 (51,5%)	3 (23,1%)	7 (24,2%)	3 (23,0%)
Лимфаденит:				
да	0 (0%)	1 (7,7%)	13 (44,8%)	2 (15,4%)
нет	33 (100%)	12 (92,3%)	16 (55,2%)	11 (84,6%)
Консервативное лечение:				
да	10 (30,3%)	2 (15,4%)	7 (24,1%)	6 (46,2%)
нет	23 (69,7%)	11 (84,6%)	22 (75,9%)	7 (53,8%)
Гормональный профиль (референсные значения):				
ТТГ (0,4-5 мМЕ/л)	1,23 (0,49-2,72)	2,15 (1,60-2,80)	2,06 (1,25-2,50)	2,52 (0,61-5,90)
св.Т4 (10-23 пмоль/л)	16,14 (14,50-17,87)	13,75 (13,00-14,00)	15,10 (12,50-15,95)	12,35 (11,80-17,00)
АТ к ТПО (0-34 МЕ/мл)	23,04 (10,01-27,00)	15,04 (15,00-18,20)	18,00 (17,00-18,20)	57,80 (19,50-637,90)
Функциональное состояние ЩЖ:				
эутиреоз	19 (57,6%)	11 (84,6%)	25 (86,2%)	4 (30,8%)
гипотиреоз	5 (15,1%)	1 (7,7%)	3 (10,3%)	9 (69,2%)
гипертиреоз	9 (27,3%)	1 (7,7%)	1 (3,5%)	0 (0%)

Продолжение таблицы 3

Показатель	Группа пациентов с диагнозом коллоидный зоб (n=33)	Группа пациентов с диагнозом фолликулярная аденома (n=13)	Группа пациентов с диагнозом папиллярный рак (n=29)	Группа пациентов с диагнозом аутоиммунный тиреоидит (n=13)
Общий объем щитовидной железы, мм. куб	23,80 (17,25-57,60)	21,25 (18,00-27,90)	17,98 (15,60-22,95)	24,56 (13,50 – 36,90)
Объем правой доли, мм. куб	13,1 (7,7 – 23,1)	13,35 (10,00-20,70)	9,50 (8,20 – 11,40)	10,40 (6,70-18,90)
Объем левой доли, мм. куб	12,25 (6,7 – 28,60)	8,5 (7,2 – 9,3)	9,2 (6,5 – 10,2)	14,32 (6,8 – 20,45)

Данная окраска позволяет более четко оценить особенности коллоида и ядерного хроматина, в том числе внутриядерные цитоплазматические включения, характерные для папиллярного рака.

Оценку морфологии клеток пунктата узлового образования щитовидной железы проводили с применением светового микроскопа «Axioskop» (Carl Zeiss, Германия) под увеличением x100, x400, x1000.

Заключение цитологического исследования формулировалось согласно категориям системы Bethesda, которая позволяет оценить риск злокачественности и определить тактику ведения пациента (табл. 4) [Cibas E.S. et al., 2009].

Таблица 4

Система Bethesda в классификации поражений щитовидной железы

Диагностическая категории по системе Bethesda	Риск злокачественности	Рекомендации
I. Недиагностический материал	1-4%	Повторная пункция
II. Доброкачественные	0-3%	Клиническое наблюдение
III. Атипия неясного значения (AUS) или фолликулярные изменения неясного значения	5-15%	Повторная пункция
IV. Подозрение на фолликулярную опухоль	15-30%	Удаление доли
V. Подозрение на рак	60-75%	Субтотальная тиреоидэктомия
VI. Злокачественная опухоль	97-99%	Субтотальная тиреоидэктомия

В постановке предварительного диагноза по результатам анализа препаратов традиционной и жидкостной цитологии был использован ряд морфологических признаков/критериев (табл. 5).

Сравнение особенностей морфологических признаков патологии щитовидной железы, определяющихся методом традиционной и жидкостной цитологии (категории Bethesda)

Категории Bethesda		Морфологические признаки при использовании традиционного цитологического метода	Морфологические признаки при использовании жидкостной цитологии
II. Доброкачественные изменения	Коллоидный зоб	Обильный коллоид (диффузно рассеянный, плотный), мелкие мономорфные клетки фолликулярного эпителия разрозненные или в виде небольших скоплений. Ядра клеток пикнотичные, контуры цитоплазмы нечеткие, сливаются с окружающим фоном (рис. 9).	Кластеры малых мономорфных тиреоцитов с чистой, иногда «гранулированной» цитоплазмой; небольшое количество плотного коллоида (рис. 10).
	Аутоиммунный тиреоидит	Реактивные лимфоидные клетки (лимфоциты, плазматические клетки); небольшие скопления тиреоцитов; скудный коллоид (рис. 11); клетки Ашкенази с реактивными изменениями.	Среди немногочисленных лимфоидных элементов разной степени зрелости небольшие скопления тиреоцитов или оксифильных клеток; скудный коллоид (рис. 12)
IV. Подозрение на фолликулярную опухоль	Фолликулярная аденома	Обильная клеточность; скудный коллоид; клетки эпителия располагаются в фолликулярных структурах и разрозненно; ядра укрупнены, «штампированные» (рис. 13).	Небольшие скопления тиреоцитов с полиморфными несколькими укрупненными ядрами, формирующие микрофолликулы и отдельные скопления; скудный коллоид (рис. 14).

Продолжение таблицы 5

Категории Bethesda		Морфологические признаки при использовании традиционного цитологического метода	Морфологические признаки при использовании жидкостной цитологии
V. Подозрение на рак; VI. Злокачественная опухоль	Папиллярный рак	Скопления крупных тиреоцитов с выраженным ядерным полиморфизмом, формируют папиллярные структуры. Отсутствует коллоид (рис. 15)	Скопления тиреоцитов с большими полиморфными ядрами. Клетки формируют папиллярные структуры. Коллоид отсутствует (рис. 16)

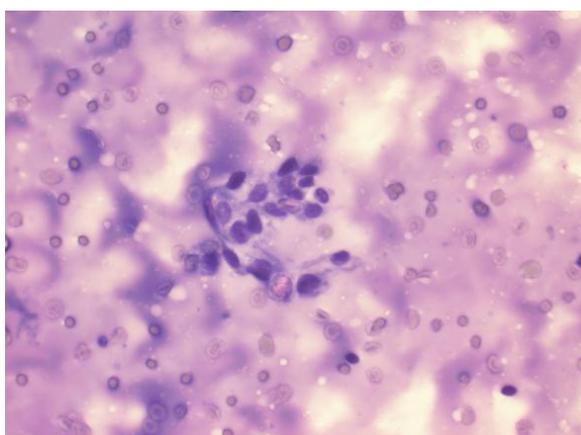


Рис. 9. Коллоидный зоб. Единичное скопление клеток фолликулярного эпителия. Фон препарата – коллоид. Метод традиционной цитологии. Окраска по Романовскому-Гимза. $\times 100$

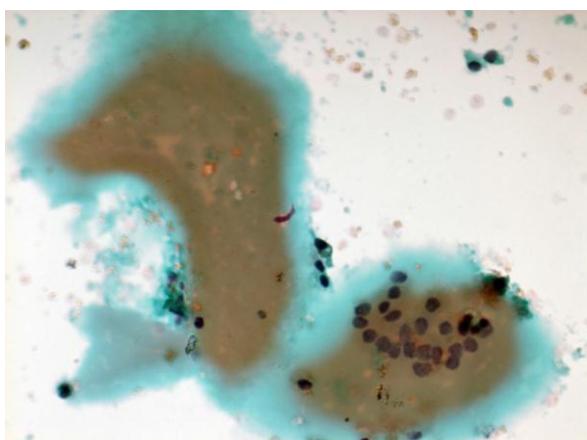


Рис. 10. Коллоидный зоб. Обильный коллоид, скопление тиреоцитов. Метод жидкостной цитологии. Окраска по Папаниколау. $\times 100$

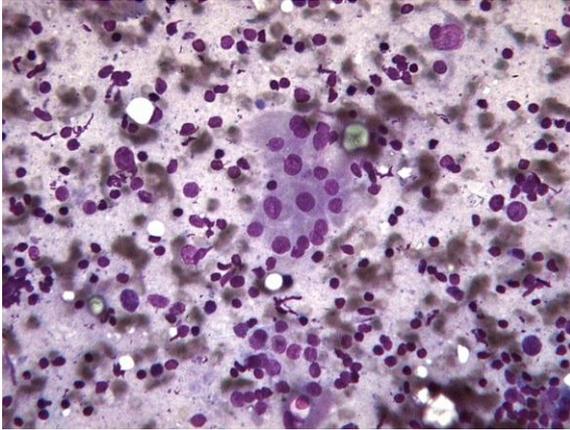


Рис. 11. Аутоиммунный тиреоидит. Обильная лимфоидная инфильтрация – большое число лимфоидных элементов разной степени зрелости, единичные плазматические клетки. Группы клеток фолликулярного эпителия. Метод традиционной цитологии. Окраска по Романовскому-Гимза. ×400

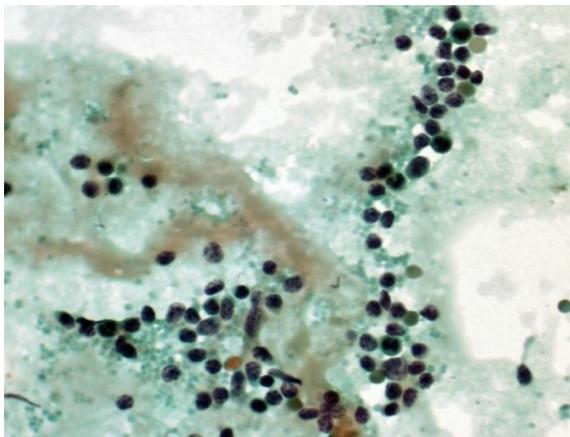


Рис. 12. Аутоиммунный тиреоидит. Среди лимфоидных элементов разной степени зрелости немногочисленные клетки фолликулярного эпителия. Метод жидкостной цитологии. Окраска по Папаниколау. ×400

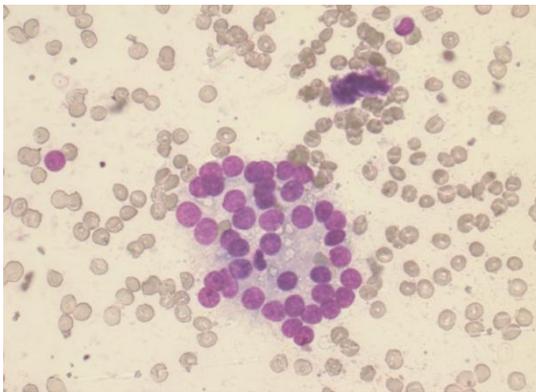


Рис. 13. Фолликулярная аденома. Тиреоциты формируют фолликулярные структуры. Клетки среднего размера, ядра «штампированные». Метод традиционной цитологии. Окраска по Романовскому-Гимза. ×400

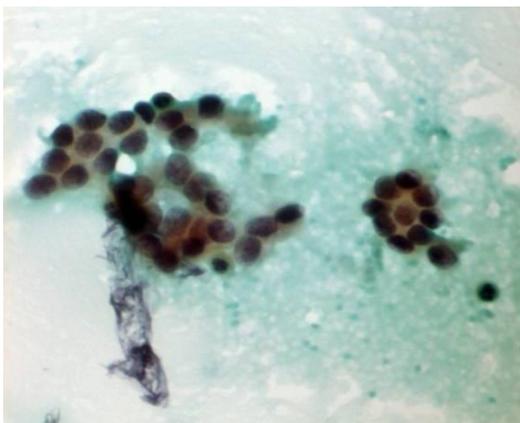


Рис. 14. Фолликулярная аденома. Тиреоциты формируют фолликулярные структуры. Клетки среднего размера, ядра округлые, «штампированные». Метод жидкостной цитологии. Окраска по Папаниколау. ×400

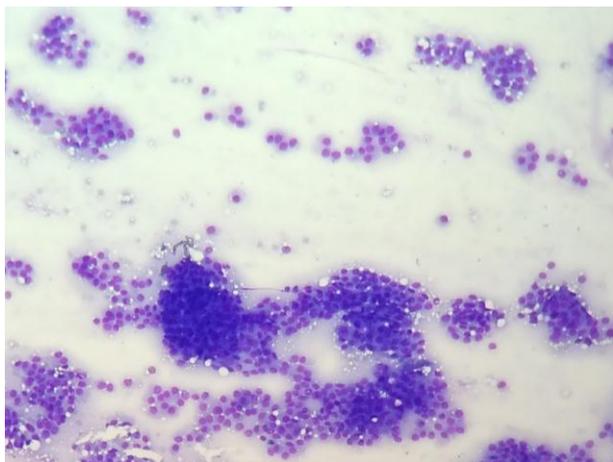


Рис. 15. Папиллярный рак. Многочисленные папиллярные структуры. Метод традиционной цитологии. Окраска по Романовскому-Гимза. $\times 100$

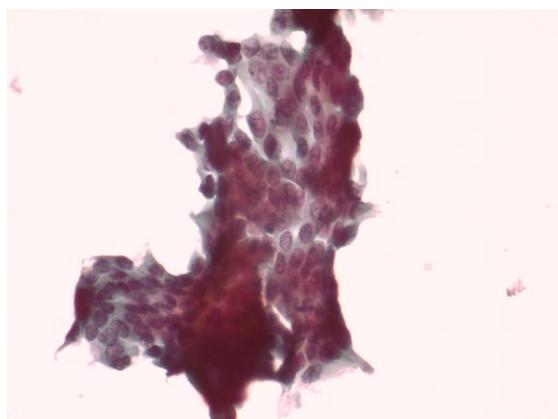


Рис. 16. Папиллярный рак. Папиллярная структура, образованная тиреоцитами с полиморфными ядрами. Метод жидкостной цитологии. Окраска по Папаниколау. $\times 400$

2.2.2. Обогащение жидкостных образцов клетками фолликулярного эпителия по маркеру ЕpСAM (CD326) методом магнитной сепарации

Материал, получаемый в результате тонкоигольной пункционной биопсии узлового образования щитовидной железы, характеризуется клеточной неоднородностью. Это затрудняет интерпретацию молекулярно-генетического анализа. Для преодоления данной проблемы существуют методы сепарации клеток, которые позволяют изолировать клетки определенной популяции, не влияя на их целостность и жизнеспособность, тем самым обеспечивая обогащение исследуемого образца.

В качестве маркера сепарации была выбрана молекула адгезии эпителиальных клеток (ЕpСAM, CD326), представляющая собой трансмембранный гликопротеин с молекулярной массой 40 кДа. ЕpСAM выполняет важную роль в клеточной адгезии, пролиферации,

дифференцировке, миграции клеток, регуляции клеточного цикла, участвует в сигналинге опухолевых и стволовых клеток [Munz M. et al., 2009]. Молекула широко экспрессируется на эпителиальных клетках и опухолевых клетках эпителиального происхождения [Schmelzer E. et al., 2008]. По результатам исследования, проведенного R. Ralhan et al. [2010], выявлена избыточная экспрессия внеклеточного домена молекулы EpCAM в клетках эпителия при дифференцированных вариантах рака щитовидной железы. Именно эти особенности молекулы EpCAM позволили нам обогатить жидкостной образец ткани узлового образования щитовидной железы эпителиальными клетками и очистить от клеток неэпителиального происхождения.

Магнитная сепарация клеток, экспрессирующих молекулу EpCAM, из суспензий клеток жидкостных образцов пунктатов щитовидной железы проводилась с использованием моноклональных антител EpCAM (CD326) («Miltenyi Biotec GmbH», Германия), соединенных с магнитными микрошариками. Положительный отбор жизнеспособных эпителиальных клеток осуществляли на MiniMACS колонках согласно протоколу производителя («Miltenyi Biotec GmbH», Германия). Для подготовки однородной клеточной суспензии жидкостной образец ресуспендировали и проводили через нейлоновую сетку с диаметром отверстия 30 мкм для удаления плотных скоплений клеток (Pre-separation Filters, «Miltenyi Biotec GmbH», Германия). Полученную клеточную суспензию центрифугировали при 1000 об/мин в течение 10 мин., удаляли супернатант. Ресуспендировали осадок клеток в 300 мкл буфера (фосфатно-солевой буфер (PBS), pH 7,2, 0,5% бычьего сывороточного альбумина (BSA) и 2 мМ ЭДТА для разбавления MACS BSA Stock Solution, разведение 1:20). Для блокирования неспецифической Fc-рецептор-опосредованной маркировки неэпителиальных клеток добавляли 100 мкл FcR блокирующего реагента (FcR Blocking Reagent, Miltenyi Biotec GmbH, Германия), хорошо перемешивали. Далее добавляли 100 мкл моноклональных антител EpCAM (CD326) Microbeads, хорошо перемешивали, инкубировали в течение 30 мин. при температуре 4-8 °С. После инкубации клеточную

суспензию промывали в 5 мл буфера и центрифугировали при 1000 об/мин в течение 10 мин. Полностью удаляли надосадочную жидкость и добавляли 500 мкл буфера. Для выполнения следующего этапа MiniMACS колонку помещали в магнитное поле MACS сепаратора. Колонку подготавливали, промывая 500 мкл буфера. Затем на колонку вносили клеточную суспензию в растворе буфера. Непомеченные клетки беспрепятственно проходили через колонку. Для очистки ЕрСАМ меченых клеток колонку, не вынимая из магнитного сепаратора, промывали трехкратно буфером в объеме 500 мкл. Далее удаляли колонку из магнитного поля, помещая ее на эппендорф, добавляли 1 мл буфера и с помощью резкого проталкивания поршня вымывали ЕрСАМ-меченные клетки.

Для оценки клеточного состава жидкостного образца после магнитной сепарации клеток по эпителиальному маркеру ЕрСАМ было выполнено морфологическое исследование суспензии. Для этого часть материала была нанесена на стекло с последующей окраской по Папаниколау и оценкой морфологии с применением светового микроскопа «Axioskop» (Carl Zeiss, Германия) под увеличением x10, x20, x40.

2.2.3. Выделение мРНК из клеток пунктатов узловых образований щитовидной железы

Выделение мРНК из клеток щитовидной железы осуществляли сорбентно-колоночным методом (RNeasy Plus Mini Kit, QIAGEN, Германия). В основе метода лежит связывающая способность мембран на силико-гелевой основе.

На первом этапе биологические образцы (5×10^6 клеток на 1 мл суспензии) осаждали центрифугированием при 10 000 об/мин в течение 5 мин, удаляли супернатант. Согласно протоколу производителя к клеточной суспензии добавляли 350 мкл денатурирующего гуанидин-изотиоцианатного буфера RLT, в который предварительно внесли 3,5 мкл 14,5М β -меркаптоэтанола для инактивации РНКаз. Путем тщательного пипетирования образцы лизировали и гомогенизировали до полного удаления конгломератов

клеток. Затем лизат пропускали через колонку «gDNA Eliminator spin». Данная колонка, в комбинации с оптимизированным солевым буфером, позволяет эффективно удалить геномную ДНК. После центрифугирования при 10 000 об/мин в течение 30 сек, удаляли колонку с осажденной ДНК, к полученному образцу добавляли один объем 70% этанола (350 мкл), обеспечивающий лучшие условия для связывания РНК. Аккуратно перемешивали пипетированием, сразу перенося на колонки «RNeasy spin», центрифугировали 15 сек при 10 000 об/мин. Тотальная РНК связывается с мембраной, а последующие этапы эффективно вымывают «загрязняющие» вещества. После центрифугирования раствор, прошедший колонку, удаляли, а на колонку наслаивали 700 мкл RW1 буфера для очистки РНК. Центрифугировали в течение 15 сек при 10 000 об/мин. Прошедший через колонку раствор удаляли, затем дважды наслаивали на колонку буфер RPE с предварительно добавленным 96% этанолом (1:4) в объеме 500 мкл. Буфер RPE с добавленным этанолом необходим нам, чтобы удалить соли с колонки. После нанесения буфера колонку закрывали и центрифугировали при 10 000 об/мин в течение 15 сек. Для элюирования РНК колонку переносили в новую пробирку и наслаивали на мембрану 30 мкл RNase-free воды, центрифугировали 1 мин при 10 000 об/мин. Оценку качества выделенной РНК проводили по анализу результатов электрофоретического разделения в 1,2% агарозном геле и буфере TAE (40 мМ Трис-уксусная кислота, 1мМ ЭДТА (pH=8,0)).

2.2.4. Оценка уровня мРНК генов *CTNNB1*, *CDH1*, *CCND1*, *MYC* в клетках щитовидной железы методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени

Метод полимеразной цепной реакции в режиме реального времени основан на амплификации определенного участка ДНК при повторяющихся температурных циклах с одновременной оценкой количества данной молекулы ДНК после каждого цикла амплификации.

На матрице мРНК при участии фермента обратной транскриптазы синтезировали кДНК. Состав реакционной смеси: 2 мкл (0,5-2 мкг) РНК, 2 мкл

(100 нг) случайного праймера (гексануклеотиды, Random Primer 6), 10 мкл RT-буфера (20 mM Tris-HCl (pH=8,3), 5 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 100 mM KCl, 0,4 mM dNTP), 200 ед. акт. ДНК-зависимой РНК полимеразы (MMuLV-RT, Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase) («Медиген», Россия). Реакцию обратной транскрипции проводили в течение 60 мин при t=37°С.

Полученный фрагмент ДНК амплифицировали методом PCR в режиме реального времени с использованием SYBR Green I («Molecular Probe», США) на амплификаторе Mini Opticon («Bio-Rad», США).

Праймеры, позволяющие специфично амплифицировать фрагменты кДНК генов, были подобраны при помощи программы Vector NTI 11.0 (Life Technologies, США) и базы данных NCBI (табл. 6).

Таблица 6

Праймеры, использованные для специфичной амплификации фрагментов кДНК генов *CTNNB1*, *CDH1*, *CCND1*, *MYC*, *actb*

Название гена	Праймеры	Длина ПЦР фрагмента, п.о.
<i>CTNNB1</i>	F: 5'-TCATGCGTTCTCCTCAGATG-3'	178
	R: 5'-CTCACDATGATGGGAAAGGT-3'	
<i>CDH1</i>	F: 5'-CCATCGCTTACACCATCCT-3'	235
	R: 5'-CTTGTACGTGGTGGGATTGAAG-3'	
<i>CCND1</i>	F: 5'-GTCTGCGAGGAACAGAAGTGCG-3'	233
	R: 5'-CCATTTGCAGCAGCTCCTC-3'	
<i>MYC</i>	F: 5'-GTAGTGGAAAACCAGCAGCCT-3'	240
	R: 5'-AGCAGCTCGGTCACCATCT-3'	
<i>actb</i>	F: 5'- CTGGCACCCAGCACAATG-3'	153
	R: 5'- AGCGAGGCCAGGATGGA -3'	

Реакционная смесь для проведения полимеразной цепной реакции в объеме составила 25 мкл и содержала K25 буфер (x1), 0,4mM dNTP, 300 nM обратного и прямого праймеров, 0,5 ед. акт. SmartTaq ДНК-

полимеразы, блокированной антителами («Медиген», Россия), SYBRGreen I [1:25000] и 0,1-5 нг кДНК.

Протокол амплификации: первичная денатурация – 3 мин при 96°C; амплификационный цикл (x 40): денатурация – 10 сек при- 96°C, отжиг праймеров – 6 сек при 60°C, элонгация – 6 сек при 72°C, съем сигнала – 10 сек при температуре плавления продукта амплификации (определялась индивидуально для каждой пары праймеров, при анализе кривой плавления); построение кривой плавления – нагревание- амплификационной смеси с 72 до 96°C, с шагом 0,5°C, сопровождающиеся съемом флуоресцентного сигнала на каждом шаге в течение 10 сек.

Для каждой пары праймеров были подобраны оптимальные режимы амплификации, путем варьирования температуры отжига праймеров, состава амплификационного буфера, параметров амплификационного цикла. Условия ПЦР оптимизировали путем амплификации пяти последовательных 2-х кратных разведений кДНК, при этом каждая точка была представлена в двойном повторе. Для оценки эффективности обратной транскрипции, а также нормализации начального количества мРНК в образце измеряли количество кДНК гена-рефери β -актина (*actb*). Данный ген относительно в равной степени экспрессируется во всех клетках. Для определения относительного количества кДНК в образце использовался метод ddCt. Результаты выражали в относительных единицах (отношение относительного количества кДНК исследуемого гена к относительному количеству кДНК гена-рефери).

2.2.5. Оценка экспрессии белков β -катенина и E-кадгерина в клетках эпителия щитовидной железы методом иммуноцитохимии

Иммуноцитохимическое исследование проводилось непрямым трехступенчатым иммуноферментным методом визуализации, при котором антиген связывается с немечеными моноклональными антителами первого слоя, последние соединяются с биотинилированными поликлональными

антителами второго слоя. Далее проводилась обработка стрептовидином, конъюгированным ферментом – пероксидазой хрена.

Для визуализации иммунной реакции в случае анализа экспрессии E-кадгерина использовали систему детекции Histofine Simple Stain MAX PO, универсальный иммунопероксидазный полимер, анти-мышинный и анти-кроличий (NICHIREI BIOSCIENCES INC., Япония). В случае анализа экспрессии β -катенина использовали вторичные моноклональные анти-козьи антитела. Выявление пероксидазой активности проводили с помощью 3,3 – диаминобензидина (ДАБ) (Histofine DAB-3S kit, NICHIREI BIOSCIENCES INC., Япония). Цитопрепараты докрасивали гематоксилином Майера.

Исследование проводилось на монослойных цитологических препаратах, полученных при заборе клеточного материала щитовидной железы в консервирующий раствор CYTO-FAST Solution (HOSPITEX DIAGNOSTICS, Италия), с последующим нанесением клеточной суспензии на стекла с адгезивным покрытием (Menzel, Германия) путем центрифугирования на центрифуге Cellspin II (Tharmac, Германия) при 1 000 об/мин в течение 5 мин. Перед проведением исследования оценивали информативность препарата и соответствие гистологическому диагнозу у каждого образца по результатам жидкостной цитологии. Цитологические препараты с диагнозом, не соответствующим гистологическому заключению, с малым количеством клеточных элементов, большим содержанием эритроцитов, с наличием некротических масс, выраженными дистрофическими изменениями клеток из исследования исключались.

Фиксацию цитологических препаратов проводили в охлажденном до +4°C ацетоне в течение 2 мин. После фиксации сушили препараты в течение 5 сек, далее специальным иммуноцитохимическим карандашом «ДАКО» маркировали диагностическое поле. Подготовленные стекла помещали в цитратный буфер на 10 мин в контейнер с 0,05M Tris-HCl буфером, pH 7,2-7,6, комнатной температуры. Для устранения активности эндогенной пероксидазы клеток препараты обрабатывали свежеприготовленным 3% раствором перекиси

водорода в дистиллированной воде в течение 5 мин (наносили 1 каплю приготовленного раствора на диагностическую область препарата). После реакции стекла стряхивали и промывали в Tris-HCl буфере в течение 10 мин. Далее наносили первичные антитела и инкубировали при комнатной температуре в течение 60 мин., помещая стекла во влажную камеру для предотвращения высыхания реактива. В работе были использованы моноклональные кроличьи и козьи антитела фирмы RnD Systems (США) и Abcam (Великобритания). Первичные антитела предварительно разводили стерильным раствором PBS. Разведенные антитела наносили на цитологические препараты в объеме 50 мкл на одно поле. Используемые в исследовании первичные антитела и их разведения представлены в таблице 7.

Таблица 7

Панель использованных в исследовании антител

Наименование	Фирма	Разведение
Первичные антитела		
Anti-beta catenin antibody (E247)	Abcam	1:250
Anti-E-cadherin antibody	RnD Systems	1:400
Вторичные антитела		
Goat IgG Biotinylated Antibody	RnD Systems	1:1000

Для проверки специфичности первичных антител при окрашивании параллельно был поставлен отрицательный контроль – реакция без добавления первичных антител.

После инкубации препараты промывали в двух сменах Tris-HCl буфера в течение 5 мин и наносили либо вторичные биотинилированные анти-козьи антитела (RnD Systems, США) в случае анализа экспрессии β -катенина, либо универсальный иммунопероксидазный полимер (анти-мышинный, анти-кроличий) системы детекции Histofine Simple Stain MAX PO (NICHIREI BIOSCIENCES INC., Япония). Инкубацию проводили в течение 30 мин при

комнатной температуре во влажной камере, затем излишки реактива стряхивали и препараты промывали в Tris-HCl буфере в течение 10 мин. Далее наносили хромоген ДАБ (3,3-диаминобензидин) (Histofine DAB-3S kit, NICHIREI BIOSCIENCES INC., Япония) в объеме 50 мкл на 1 стекло, который готовили непосредственно перед нанесением на препарат согласно прилагаемой инструкции производителя (на 1000 мкл дистиллированной воды добавляли 1 каплю раствора А (DAB solution concentrate), тщательно перемешивали, далее добавляли 1 каплю раствора В (Enhancer solution concentrate), перемешивали и добавляли 1 каплю раствора С (Hydrogen peroxide solution concentrate), тщательно перемешивали). Инкубацию проводили при комнатной температуре в течение 10 мин. Препараты промывали в трех сменах дистиллированной воды и окрашивали гематоксилином Майера (20-30 сек.) с последующим промыванием в дистиллированной воде, а затем воде, подщелоченной раствором аммиака, для придания клеткам голубого окрашивания.

Оценку иммуноцитохимической реакции проводили с применением светового микроскопа «Axioskop» (Carl Zeiss, Германия) под увеличением $\times 10$, $\times 20$, $\times 40$. 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.). Система подсчета включает оценку интенсивности иммуноцитохимической реакции (по 3-х балльной системе: 0 – нет окрашивания, 1 – слабое окрашивание, 2 – умеренное окрашивание, 3 – сильное окрашивание) и доли окрашенных клеток. Представляет собой сумму произведений процентов, отражающих долю клеток с различной интенсивностью окраски на балл, соответствующий интенсивности реакции. Подсчет проводился на 200 клеток.

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.

Результат трактовался следующим образом: от 0 до 10 – отрицательный результата, от 10 до 100 – слабоположительный, от 100 до 300 – положительный.

2.3. Статистический анализ результатов исследования

Анализ первичных данных проводили с применением методов статистического описания и проверки статистических гипотез. При анализе количественных показателей выполнялся этап проверки соответствия на нормальность распределения, для этого был использован критерий Шапиро-Вилка. Результаты исследования представлялись в виде средней и стандартного отклонения ($M \pm SD$) при соблюдении нормального закона распределения. Значения количественных данных, не подчиняющиеся нормальному закону распределения были представлены в виде медианы и интерквартильного размаха ($Q1-Q3$). Анализ количественных данных выполняли, используя непараметрический критерий Крускала-Уолиса (для данных не подчиняющихся нормальному закону распределения и исследования 4-х групп). При обнаружении статистически значимых различий ($p < 0,05$) проводили попарный анализ групп при помощи критерия Мэнна-Уитни с поправкой Бонферрони. При описании качественных признаков указывали абсолютное число и относительную величину в процентах (%). Статистическую значимость различий частоты встречаемости качественных признаков в анализируемых группах проверяли с помощью критерия χ^2 Пирсона с поправкой Йетса, а также использовался двусторонний вариант точного критерия Фишера с критическим уровнем значимости $p < 0,05$ (при количестве наблюдаемых случаев в одной из выборок менее 5). Для выявления функциональных взаимосвязей между изученными параметрами проводили корреляционный анализ путем вычисления коэффициента ранговой корреляции Спирмена (r). Полученную корреляцию считали статистически значимой при $p < 0,05$. При проведении расчетов использовался пакет прикладных программ SPSS Statistics 17.0.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Белок β -катенин был первоначально обнаружен в контексте межклеточной адгезии [Ozawa M., Varibault H., Kemler R. 1989]. Адгезионная функция реализуется мембранно-ассоциированным пулом β -катенина. В противоположность этому, транскрипционная/сигнальная функция определяется его растворимым цитоплазматическим бассейном, который очень нестабилен и в отсутствии Wnt сигналов, за счет слаженной работы белков деструкционного комплекса (GSK3 β киназы, CK1 киназы, Axin, APC), фосфорилируется и подвергается протеасомной деградации [Kimelman D. et al., 2006; Clevers H. et al., 2012; Stamos J.L. et al., 2013; Zeller E. et al., 2013].

В физиологических условиях в клетке наблюдается баланс адгезионной и транскрипционной функций β -катенина. В ткани щитовидной железы межклеточная адгезия, которая определяется работой комплекса E-кадгерин/ β -катенин, является необходимым условием адекватной дифференцировки и поддержания структурной целостности органа [Rao A.S. et al., 2005].

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 при различных нозологических формах патологии щитовидной железы (коллоидный зоб, аутоиммунный тиреоидит, фолликулярная аденома, папиллярный рак), с определением интенсивности иммунного окрашивания, а также локализации изучаемых нами белков в клетке (мембрана, цитоплазма, ядро). 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.

Транскрипционная функция β -катенина инициируется связыванием Wnt лигандов с мембранными рецепторами Fzd и LRP5/6 и цитоплазматическим белком Dvl [Gerlach J.P. et al., 2014]. Восстановление Axin и дисрегуляция комплекса деструкции приводит к стабилизации β -катенина в рамках его цитоплазматического пула. Далее свободный белок транслоцируется в ядро, где посредством факторов транскрипции семейства TCF/LEF запускает экспрессию генов-мишеней [Liu C. et al., 2002; Hur J. et al., 2013; Graham T.A. et al., 2000].

Условно, весь перечень уже известных (http://web.stanford.edu/group/nusselab/cgi-bin/wnt/target_genes) генов-мишеней Wnt/ β -катенин сигнального пути можно разделить на три категории, ориентируясь на биологическую функцию продуктов этих генов [Chen J. et al., 2014]. Первая категория генов связана с реализацией кадгерин-опосредованной межклеточной адгезии и включает в себя такие гены, как *Slug*, *Snail* и *Twist*. Они, в свою очередь, меняют скорость экспрессии генов E-кадгерина (*CDH1*) или N-кадгерина (*CDH2*). Вторая категория генов-мишеней связана с Wnt стимуляцией и деградацией β -катенина (например, такие гены как *AXIN1*, *AXIN2*). И последняя категория генов-мишеней участвует в процессах, не связанных напрямую с адгезионной и сигнальной функцией β -катенина (в том числе исследуемые нами гены *CCND1* и *MYC*). Неоднократно была выявлена прямая зависимость между активностью сигнального каскада и уровнем экспрессии генов *CCND1* и *MYC* [He T.C. et al., 1998; Tetsu O. et al., 1999; Shtutman M. et al., 1999; Gotoh J. et al., 2003; Zhang S. et al., 2012; Herbst A. et al., 2014].

Сигнальная/транскрипционная функция β -катенина была нами оценена путем анализа уровня экспрессии генов-мишеней – *CDH1*, *CCND1*, *MYC*, а также определением методом иммуноцитохимии преимущественной локализации (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; Vozkaya G. et al., 2012; Herbst A. et al., 2014].

3.1. Сравнительный анализ цитологической диагностики узловых образований щитовидной железы при применении традиционной и жидкостной цитологии

Наиболее информативным методом диагностики природы узловых образований щитовидной железы является тонкоигольная аспирационная биопсия. Точность забора материала достигается ультразвуковой визуализацией узлового образования [Dobrinja S., Trevisan G., 2009].

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 помещается в жидкую стабилизирующую среду, которая предотвращает преждевременное высыхание клеток и позволяет сохранить образец в оптимальных условиях для дальнейшей его транспортировки в лабораторию и длительного хранения. Процесс нанесения суспензии клеток на стекло осуществляется в автоматическом или ручном режиме на цитоцентрифуге. Цитологические препараты состоят из отдельных клеток, которые сконцентрированы на одном месте и образуют ровный слой. К преимуществам метода жидкостной цитологии также можно отнести минимизацию содержания слизи, элементов крови, элементов воспаления и разрушенных клеток, при этом клетки тиреоидного эпителия сохраняют как морфологические, так и молекулярно-генетические свойства. Кроме того, метод

жидкостной цитологии открывает возможность многократного цитологического, иммуноцитохимического и молекулярно-генетического анализа полученного образца.

Несмотря на то, что тонкоигольная аспирационная биопсия занимает позицию золотого стандарта в диагностике природы узлового образования щитовидной железы, остаются вопросы соотношения цитологического и постоперационного 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 (табл. 8).

С гистологически подтвержденным диагнозом коллоидный зоб из 43 пациентов, по результатам предоперационного традиционного цитологического анализа, совпадение составило 76,7% (33 пациента), заключение жидкостной цитологии подтвердилось в 79% (34 пациента) случаев.

Обращает внимание в данной группе пациентов один случай ошибочной диагностики папиллярного рака традиционным методом, что в последующем определило включение в терапевтическую тактику ведения пациента операции тиреоидэктомии.

Аналогичная тактика была определена у пациентов с цитологическим диагнозом «подозрение на рак» при традиционной цитологии в 4,6% (2 случая), методом жидкостной цитологии в 2,3% (1 случай), который по результатам гистологического исследования не подтвердился.

Таблица 8

**Сопоставление гистологического заключения с цитологической характеристикой
пунктатов щитовидной железы пациентов с узловыми образованиями методами
традиционной и жидкостной цитологии по категориям Bethesda**

Гистологический диагноз	Количество пациентов с заключением традиционной цитологии распределенных по категориям Bethesda (n)			Количество пациентов с заключением жидкостной цитологии распределенных по категориям Bethesda (n)			Количество пациентов с совпадением диагнозов по результатам традиционной, жидкостной цитологии и гистологии (n)		
	1*	2**	3***	1*	2**	3***			
Коллоидный узловой зоб (n=43)	33	I	0		34	I	0		33
		II	KЗ	33		II	KЗ	34	
			АИТ	0			АИТ	1	
		III	2			III	1		
		IV	5			IV	6		
		V	2			V	1		
VI	1		VI	0					
Аутоиммунный тиреоидит (n=28)	15	I	0		13	I	0		13
		II	KЗ	4		II	KЗ	0	
			АИТ	15			АИТ	13	
		III	2			III	4		
		IV	4			IV	5		
		V	3			V	6		
VI	0		VI	0					
Фолликулярная аденома (n=28)	14	I	0		13	I	0		13
		II	KЗ	4		II	KЗ	12	
			АИТ	4			АИТ	0	
		III	4			III	3		
		IV	14			IV	13		
		V	2			V	0		
VI	0		VI	0					
Папиллярный рак (n=37)	31	I	0		29	I	0		29
		II	KЗ	3		II	KЗ	4	
			АИТ	0			АИТ	0	
		III	1			III	0		
		IV	3			IV	4		
		V	13			V	13		
VI	17		VI	16					

Примечания. Категории Bethesda: I-недиагностический материал; II-доброкачественные изменения: КЗ – коллоидный зоб, АИТ – аутоиммунный тиреоидит; III-атипия неясного значения; IV-фолликулярная опухоль/подозрение на фолликулярную опухоль; V-подозрение на злокачественность; VI-злокачественная опухоль. * 1 – Общее количество пациентов (n) с соответствующим гистологическим заключением. ** 2 – Категории Bethesda. *** 3 – количество пациентов (n) по каждой категории Bethesda

Цитологическое заключение, соотносимое с IV категорией по классификации Bethesda (подозрение на фолликулярную опухоль), в группе пациентов с диагнозом коллоидный зоб составило традиционным и жидкостным методом 11,6% (5 клинических случаев) и 13,9% (6 пациентов), соответственно. Формулировка цитологического заключение как атипия неясного значения (AUS) или фолликулярные изменения неясного значения, в данной группе пациентов составило традиционным и жидкостным методом 4,6% (2 клинических случая) и 2,3% (1 случай), соответственно.

Анализ данных литературы указывает, что аутоиммунный тиреоидит по результатам тонкоигольной аспирационной биопсии с последующим цитологическим исследованием, по распространенности занимает второе место после коллоидного зоба [Bhatia A. et al., 2007; Gayathri B.N. et al., 2011; McLeod D.S.A. et al., 2012]. В настоящем исследовании из 28-ми пациентов с подтвержденным диагнозом аутоиммунного тиреоидита на дооперационном этапе, по результатам традиционного цитологического исследования, были сформулированы следующие заключения: 53,6% (15 пациентов) – аутоиммунный тиреоидит, 14,2% (4 пациента) – коллоидный зоб, 7,3% (2 пациента) – атипия неясного значения (AUS), 14,2% (4 пациента) – подозрение на фолликулярную опухоль, 10,7% (3 пациента) – подозрение на рак. При этом распределение по цитологическим заключениям по результатам анализа жидкостной цитологии в анализируемой группе пациентов было следующее: 46,4% (13 пациентов) – аутоиммунный тиреоидит, 14,2% (4 пациента) – AUS, 17,9% (5 пациентов) – подозрение на фолликулярную опухоль, 21,5% (6 пациентов) – подозрение на рак. Особый интерес вызывает высокий процент (21,5% и 14,2%) заключений «подозрение на рак» при анализе жидкостной цитологии и традиционной цитологии, соответственно. Действительно, несмотря на то, что тонкоигольная аспирационная биопсия с последующим цитологическим исследованием обладает высокой чувствительностью (92%) в диагностике аутоиммунного тиреоидита, данный диагноз может быть ошибочно пропущен в цитологических препаратах на фоне обильного

коллоида, картины гиперплазии, напоминающей болезнь Грейвса [Kocjan G., 2006]. Кроме того, случаи аутоиммунного тиреоидита с минимальной лимфоидной инфильтрацией и папиллярноподобными структурами из фолликулярных клеток могут служить диагностической ловушкой и будут интерпретированы цитологом как папиллярный рак. Иногда на фоне редких воспалительных клеток может определяться заметное изменение клеток Гюртля, эта цитологическая картина имитирует опухоль из клеток Гюртля [Kumarasinghe M.P. et al., 1999; Ekambaram M. et al., 2010]. Таким образом, цитологическая интерпретация пунктата клеток щитовидной железы при подозрении на аутоиммунную природу узлового образования требует комплексного анализа с включением данных клинического и лабораторного обследования пациента.

В 28-ми случаях после оперативного вмешательства был поставлен диагноз фолликулярная аденома. Цитологическая классификация поражений щитовидной железы по Bethesda предполагает данный диагноз в категории IV – подозрение на фолликулярную опухоль. В выделенной категории разделение на доброкачественные и высококодифференцированные злокачественные формы ограничено пределами метода. Цитологическое заключение, как по результатам традиционного, так и жидкостного метода, практически в равнозначных случаях (50 и 46%, соответственно) было подтверждено гистологическим исследованием. Наиболее частыми ошибочными цитологическими заключениями при анализе жидкостных образцов были – коллоидный зоб (43%, 12 пациентов), при анализе традиционных цитологических мазков – коллоидный зоб (14%, 4 пациента) и аутоиммунный тиреоидит (14%, 4 пациента). Обращают внимание 2 случая (7%) с заключением «подозрение на рак» по результатам традиционного исследования. Действительно, адекватное разделение нозологии фолликулярный рак и фолликулярная аденома цитологическим методом практически невозможно. Цитологический диагноз «фолликулярная опухоль» формируется на основании определения структур по типу микрофолликулов, состоящих из фолликулярных клеток среднего размера

на фоне скудного объема коллоида. Злокачественная природа узлового образования в таком случае определяется по результатам гистологического определения признаков инвазии в капсулу.

Особый интерес представляет группа пациентов с подтвержденным папиллярным раком. Из 37-ми пациентов в предоперационном периоде традиционным цитологическим методом верно был заподозрен рак в 81% случаев (30 случаев), причем в 46% (17 пациентов) он не вызывал сомнений, в 19% (7 случаев) - был дан ложноотрицательный результат (3 пациента с цитологическим диагнозом коллоидный зоб, 3 пациента – фолликулярная опухоль, 1 пациент – AUS). Несколько иная ситуация наблюдалась по результатам анализа жидкостной цитологии – у 29-ти обследованных пациентов (78%) из данной группы был заподозрен рак, у 4-х пациентов (11%) – фолликулярная опухоль и у 4-х (11%) пациентов – коллоидный зоб. Одной из причин расхождения пред- и послеоперационных диагнозов при узловой патологии щитовидной железы является пестрое морфологическое строение железы. Кроме того, затрудняет однозначную интерпретацию цитологического препарата нередкое сочетание нескольких патологических процессов, таких как коллоидный зоб и фолликулярная аденома, аутоиммунный тиреоидит и папиллярный рак и т.д.

Согласно современным данным литературы, число ложноположительных и ложноотрицательных результатов цитологического исследования пунктатов узловых образований щитовидной железы различается в больших пределах. Так, некоторые авторы [Nggada H.A. et al., 2006] указывают число ложноотрицательных результатов в пределах 1,5-11,5%. При этом M.W. Ashcraft et al. определяли этот показатель от 2 до 50% [Ashcraft M.W. et al., 1981]. Число ложноположительных случаев составляет в среднем 1,5-6% [Nggada H.A. et al., 2006].

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.

3.2. Анализ экспрессии мРНК и белка β -катенина в клеточном материале щитовидной железы при различных вариантах узловых образований

3.2.1. Особенности экспрессии мРНК *CTNNB1* в клеточном материале щитовидной железы при различных вариантах узловых образований

Оценка экспрессии мРНК гена *CTNNB1* показала, что ее уровень у пациентов с папиллярным раком [1,41 (1,05-1,84) отн.ед.] оказался достоверно ниже аналогичного показателя у пациентов с фолликулярной аденомой [10,0 (8,62-12,95) отн.ед.], коллоидным узловым зобом [4,5 (2,4-5,52) отн. ед.] и аутоиммунном тиреоидитом [9,65 (8,42-12,26) отн.ед.] (табл. 9).

При этом величина данного показателя у больных с коллоидным узловым зобом была достоверно ниже ($p < 0,005$), чем у пациентов с фолликулярной аденомой и клинической группой пациентов с аутоиммунным тиреоидитом и достоверно выше ($p = 0,00000436$), по сравнению с экспрессией мРНК гена *CTNNB1* у пациентов с папиллярным раком. Обращает внимание отсутствие статистически значимых различий ($p = 0,664$) уровня мРНК β -катенина у пациентов с аутоиммунным тиреоидитом, по сравнению с данным показателем у пациентов с фолликулярной аденомой.

Таким образом, анализ экспрессии мРНК гена *CTNNB1* в клетках фолликулярного эпителия у пациентов с узловыми образованиями щитовидной железы указывает на ее наименьшие значения у пациентов с папиллярным раком и наибольший уровень - у пациентов с подтвержденным диагнозом фолликулярная аденома.

Таблица 9

Экспрессия генов *CTNNB1* и *CDH1* при различных вариантах узловых образований щитовидной железы (Me (Q1-Q3))

Группы пациентов	Экспрессия гена <i>CTNNB1</i> , отн.ед.	Экспрессия гена <i>CDH1</i> , отн.ед.
Пациенты с коллоидным узловым зобом (n=33)	4,50 (2,40-5,52)	2,95 (2,03-4,25)
Пациенты с аутоиммунным тиреоидитом (n=13)	9,65 (8,42-12,26) $p_1=0,0000017$	10,98 (9,44-14,94) $p_1=0,00000148$
Пациенты с фолликулярной аденомой (n=13)	10,00 (8,62-12,95) $p_1=0,0000948$ $p_2=0,664$	25,50 (22,60-34,00) $p_1=0,00007$ $p_2=0,008$
Пациенты с папиллярным раком (n=29)	1,41 (1,05-1,84) $p_1=0,00000436$ $p_2=0,00002$ $p_3=0,000298$	2,06 (1,11-3,58) $p_1=0,081$ $p_2=0,0000203$ $p_3=0,000298$

p_1 – достоверность различий по сравнению со значениями аналогичного показателя у пациентов с коллоидным зобом;

p_2 - достоверность различий по сравнению со значениями аналогичного показателя у пациентов с аутоиммунным тиреоидитом;

p_3 – достоверность различий по сравнению со значениями аналогичного показателя у пациентов с фолликулярной аденомой.

3.2.2. Особенности экспрессии β -катенина при различных вариантах узловых образований щитовидной железы методом иммуноцитохимии

При проведении иммуноцитохимического исследования экспрессии β -катенина у пациентов с фолликулярной аденомой в 100% случаев определялась слабоположительная реакция (табл. 10).

У 23-х (69,7%) пациентов с коллоидным узловым зобом экспрессия данного маркера была слабоположительной, а в 10-ти (30,3%) случаях - была отрицательной (рис. 17).

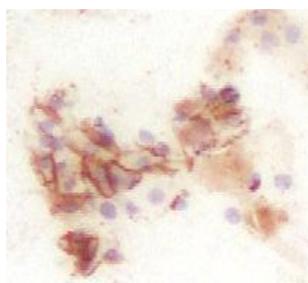


Рис. 17. Иммуноцитохимическая реакция в клетках коллоидного узлового зоба. Отрицательная и слабоположительная мембранная экспрессия β -катенина. x400

У пациентов с диагнозом папиллярный рак во всех случаях определялась иммуноцитохимическая реакция, причем в 11-ти (37,9%) случаях - слабоположительная реакция, а в 18-ти (62,1%) – положительная.

У 12-ти (92,3%) пациентов с аутоиммунным тиреоидитом определялась слабоположительная реакция. Важное значение при иммуноцитохимической оценке экспрессии β -катенина имеет анализ локализации исследуемого маркера, свидетельствующее о его функциональном состоянии. Согласно современным данным, передача Wnt сигналов и E-кадгерин-опосредованная межклеточная адгезия имеют тесную перекрестную связь друг с другом, при этом адгезия негативно регулирует Wnt сигнализацию путем конкуренции за цитоплазматический пул β -катенина.

В проведенном нами исследовании у 23-х пациентов с коллоидным зобом слабоположительная иммуноцитохимическая экспрессия β -катенина определялась на мембране и оценивалась как нормальная мембранная. При этом у пациентов с аутоиммунным тиреоидитом лишь в одном случае экспрессия белка наблюдалась как мембранная, так и цитоплазматическая. Согласно современным научным взглядам такая сочетанная экспрессия интерпретируется как сниженная мембранная за счет появления цитоплазматической экспрессии. В остальных случаях (91,7%) аутоиммунного тиреоидита β -катенин локализовался в цитоплазме. В группе пациентов с фолликулярной аденомой определялась преимущественно сниженная мембранная экспрессия β -катенина (84,6%) (рис. 18). Обращала внимание 100% цитоплазматическая и/или ядерная локализация белка в эпителиальных клетках у пациентов с папиллярным раком.

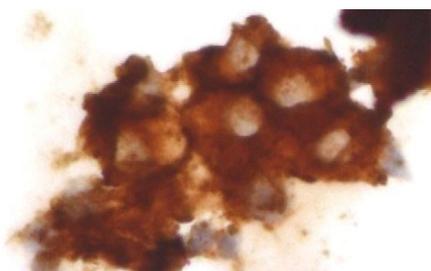


Рис. 18. Иммуноцитохимическая реакция в клетках фолликулярной аденомы. Положительная цитоплазматическая и мембранная экспрессия β -катенина. x400

Таблица 10

Результаты анализа экспрессии β -катенина при различных вариантах узловых образований щитовидной железы методом иммуноцитохимии

Группы пациентов	Качественная оценка иммуноцитохимической реакции				
	Экспрессия β -катенина			Локализация β -катенина*	Общая характеристика экспрессии β -катенина
	отрицательная	слабоположительная	положительная		
Пациенты с коллоидным узловым зобом (n=33)	10 (30,3%)	23 (69,7%)	0	23 (100,0%) - М	100% - нормальная мембранная
Пациенты с аутоиммунным тиреоидитом (n=13)	1 (7,7%)	12 (92,3%)	0	11 (91,7%) – Цп 1 (8,3%) – Цп, М	91,7% - цитоплазматическая и/или ядерная, 8,3% - сниженная мембранная
Пациенты с фолликулярной аденомой (n=13)	0	13 (100,0%)	0	2 (15,4%) - Цп 11(84,6%) - Цп, М	84,6% - сниженная мембранная, 15,4% - цитоплазматическая и/или ядерная
Пациенты с папиллярным раком (n=29)	0	11 (37,9%)	18 (62,1%)	15 (50,0%) – Цп, Я 6 (20,0%) – Я 9 (30,0%) – Цп	100% - цитоплазматическая и/или ядерная

Примечание. *локализации β -катенина: М - мембрана, Цп – цитоплазма, Я – ядро

Таким образом, иммуноцитохимическая оценка экспрессии β -катенина в жидкостных образцах пунктатов щитовидной железы позволила провести качественную оценку β -катенина, а также определить его преобладающую функцию при различных вариантах патологии щитовидной железы: локализация белка на мембране клетки указывала на преобладание адгезионной функции; а цитоплазматическая и/или ядерная - была интерпретирована как признак реализации сигнальной/транскрипционной функции β -катенина.

3.3. Анализ экспрессии мРНК и белка E-кадгерина в клеточном материале щитовидной железы при различных вариантах узловых образований

3.3.1. Особенности экспрессии мРНК *CDH1* в клеточном материале щитовидной железы при различных вариантах узловых образований

Уровень экспрессии мРНК гена *CDH1* в пунктатах щитовидной железы у пациентов с фолликулярной аденомой составил 25,5 (22,6-34,0) отн.ед. и достоверно превышал соответствующий показатель у больных с коллоидным узловым зобом [2,95 (2,03-4,25) отн.ед.], папиллярным раком [2,06 (1,11-3,58) отн.ед.] и аутоиммунным тиреоидитом [10,98 (9,44-14,94) отн.ед.] (см. табл. 9). Величина исследуемого показателя у больных с папиллярным раком была достоверно ниже, чем у пациентов с фолликулярной аденомой ($p=0,000298$) и пациентов с аутоиммунным тиреоидитом ($p=0,0000203$). При этом достоверные различия уровня экспрессии мРНК гена E-кадгерина у пациентов с папиллярным раком и коллоидным узловым зобом отсутствовали ($p=0,081$). Оценка экспрессии мРНК гена *CDH1* также показала, что ее уровень у пациентов с коллоидным узловым зобом достоверно ниже ($p=0,00000148$) такового у пациентов с аутоиммунным тиреоидитом.

Таким образом, уровень экспрессии мРНК гена *CDH1* был достоверно выше в группе пациентов с фолликулярной аденомой. При этом одинаково сниженный данный показатель определялся в группах пациентов с папиллярным раком и коллоидным зобом.

3.3.2. Особенности экспрессии E-кадгерина при различных вариантах узловых образований щитовидной железы методом иммуноцитохимии

При иммуноцитохимическом исследовании экспрессии E-кадгерина у 22-х больных с папиллярным раком (75,8%) определялась слабopоложительная реакция, у 7-ми (24,2%) пациентов - положительная реакция (табл. 11) (рис. 19).

Результаты анализа экспрессии Е-кадгерина при различных вариантах узловых образований щитовидной железы (по данным иммуноцитохимического исследования)

Группы пациентов	Качественная оценка иммуноцитохимической реакции		
	Экспрессия Е-кадгерина		
	отрицательная	слабоположительная	положительная
Пациенты с коллоидным узловым зобом (n=33)	0	10 (30,3%)	23 (69,7%)
Пациенты с аутоиммунным тиреоидитом (n=13)	0	8 (61,5%)	5 (38,5%)
Пациенты с фолликулярной аденомой (n=13)	0	3 (23,0%)	10 (77,0%)
Пациенты с папиллярным раком (n=29)	0	22 (75,8%)	7 (24,2%)



Рис. 19. Иммуноцитохимическая реакция в клетках папиллярного рака. Слабоположительная мембранная экспрессия Е-кадгерина. x400

Анализ аналогичного показателя у больных с фолликулярной аденомой определил у 10-ти (77,0%) пациентов – положительную реакцию, и лишь у 3-х (23,0%) больных отмечалась слабоположительная реакция (рис. 20).

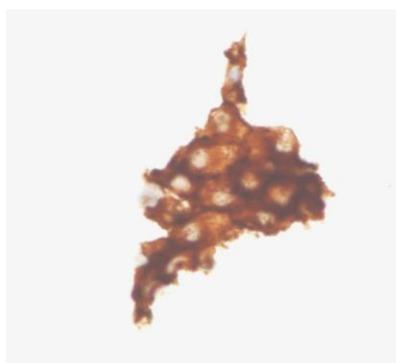


Рис. 20. Иммуноцитохимическая реакция в клетках фолликулярной аденомы. Положительная экспрессия Е-кадгерина. x400

При коллоидном узловом зобе определялась положительная реакция Е-кадгерина в 68,7% случаев, а в 31,3% - слабоположительная экспрессия данного маркера. У 8-ми (61,5%) пациентов с аутоиммунным тиреоидитом экспрессия данного маркера была слабоположительной, а в 5-ти (38,5%) случаях - была положительной. Во всех анализируемых группах определялось мембранное иммуноцитохимическое окрашивание на Е-кадгерин.

Во всех проанализированных группах пациентов отсутствовали случаи отрицательного результата экспрессии белка Е-кадгерина. Качественный анализ позволил установить различия в соотношении интенсивности экспрессии данного адгезионного белка – от преобладания положительной экспрессии у пациентов с диагнозом фолликулярная аденома и коллоидный зоб до преобладания слабоположительной мембранной экспрессии у пациентов с аутоиммунным тиреоидитом и папиллярным раком.

3.4. Оценка транскрипционной активности β -катенина по результатам анализ экспрессии мРНК его генов-мишеней (*CCND1* и *MYC*) в клеточном материале щитовидной железы при различных вариантах узловых образований

3.4.1. Особенности экспрессии мРНК *CCND1* в клеточном материале щитовидной железы при различных вариантах узловых образований

Оценка экспрессии мРНК гена *CCND1* показала, что ее уровень у пациентов с коллоидным узловым зобом [0,058 (0,034-0,107) отн.ед.] достоверно ниже такового у пациентов с аутоиммунным тиреоидитом [7,46 (4,98-11,03) отн.ед.], фолликулярной аденомой [15,49 (10,76-19,05) отн.ед.] и папиллярным раком [24,00 (14,59-31,35) отн.ед.] (табл. 12).

При этом величина данного показателя у больных с папиллярным раком была достоверно выше ($p < 0,005$), чем у пациентов с коллоидным узловым зобом и пациентов с аутоиммунным тиреоидитом. Обращают внимание отсутствие статистически значимых различий ($p = 0,4992$) уровня экспрессии мРНК *CCND1* у пациентов с папиллярным раком, по сравнению с данным показателем у пациентов с фолликулярной аденомой. Достоверные различия по

уровню экспрессии мРНК гена *CCND1* определялись у пациентов с фолликулярной аденомой и аутоиммунным тиреоидитом.

Таблица 12

Экспрессия генов *CCND1* и *MYC* при различных вариантах узловых образований щитовидной железы (Me (Q1-Q3))

Группы пациентов	Экспрессия гена <i>CCND1</i> , отн.ед.	Экспрессия гена <i>MYC</i> , отн.ед.
Пациенты с коллоидным узловым зобом (n=33)	0,058 (0,034-0,107)	0,370 (0,298-0,600)
Пациенты с аутоиммунным тиреоидитом (n=13)	7,46 (4,98-11,03) $p_1=0,0000168$	2,44 (1,15-4,98) $p_1=0,0003744$
Пациенты с фолликулярной аденомой (n=13)	15,49 (10,76-19,05) $p_1=0,0000162$ $p_2=0,0096$	1,93 (1,67-2,18) $p_1=0,0000168$ $p_2=0,342$
Пациенты с папиллярным раком (n=29)	24,00 (14,59-31,35) $p_1=0,00000061$ $p_2=0,0000822$ $p_3=0,4992$	3,58 (2,64-4,04) $p_1=0,00000852$ $p_2=0,320$ $p_3=0,002424$

p_1 – достоверность различий по сравнению со значениями аналогичного показателя у пациентов с коллоидным зобом;

p_2 - достоверность различий по сравнению со значениями аналогичного показателя у пациентов с аутоиммунным тиреоидитом;

p_3 – достоверность различий по сравнению со значениями аналогичного показателя у пациентов с фолликулярной аденомой.

Таким образом, анализ экспрессии мРНК гена *CCND1* в клетках фолликулярного эпителия у пациентов с узловыми образованиями щитовидной железы указывал на ее наименьшее значение у пациентов с коллоидным зобом и наибольший уровень - у пациентов с папиллярным раком.

3.4.2. Особенности экспрессии мРНК *MYC* в клеточном материале щитовидной железы при различных вариантах узловых образований

Уровень экспрессии мРНК гена *MYC* в пунктах щитовидной железы у пациентов с коллоидным узловым зобом составил 0,37 (0,298-0,600) отн.ед. и был достоверно ниже соответствующего показателя у больных с фолликулярной аденомой [1,93 (1,67-2,18) отн.ед.], аутоиммунным

тиреоидитом [2,44 (1,15-4,98) отн.ед.] и папиллярным раком [3,58 (2,64-4,04) отн.ед.] (табл. 5). При этом отсутствовали достоверные различия при сравнении уровня экспрессии мРНК исследуемого гена в следующих группах пациентов: с аутоиммунным тиреоидитом и папиллярным раком ($p=0,320$), аутоиммунным тиреоидитом и фолликулярной аденомой ($p=0,342$). Оценка экспрессии мРНК гена *MYC* также показала, что ее уровень у пациентов с папиллярным раком достоверно выше ($p=0,002424$) такового у пациентов с фолликулярной аденомой.

Таким образом, уровень экспрессии мРНК гена *MYC* выше у пациентов с папиллярным раком. Напротив, низкий уровень экспрессии мРНК гена *MYC* был определен в группе пациентов с коллоидным узловым зобом.

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Узловые образования щитовидной железы занимают лидирующую позицию среди всех заболеваний эндокринной системы [Maia F.F.R. et al., 2012]. Они представляют собой обширную группу патологических изменений [Welker M.J.O. et al., 2003; Шевченко С.П. и др., 2011; Maia F.F.R. et al., 2012]. Большая часть (>95%) среди узловых образований имеет доброкачественную природу [Tomei S. et al., 2012]. Рак щитовидной железы среди популяции составляет менее 1% [Horner M.J. et al., 2010; Catalano M.G. et al., 2012], однако в пересчете на общую численность населения данный показатель достаточно внушающий: так, в 2009 году в США было диагностировано 37 200 новых случаев рака щитовидной железы [Jemal A. et al., 2011]. Кроме того, в последние десятилетия отмечается тенденция к прогрессивному увеличению глобальной заболеваемости раком щитовидной железы [Jemal A. et al., 2011].

На данный момент нет однозначного ответа на вопрос, каким образом происходит процесс опухолевой трансформации тиреоидного эпителия и дальнейшей прогрессии злокачественной опухоли.

В поисках молекулярной основы механизмов опухолевой трансформации и прогрессии рака щитовидной железы нами было выполнено исследование функционального статуса белка β -катенина.

β -катенин является многофункциональным белком, который занимает важную позицию в поддержании клеточного гомеостаза [Valenta T. et al., 2012]. Нарушения его экспрессии определяются при различных заболеваниях, в том числе - злокачественных опухолях [Polakis P., 2000; Valkenburg K.C. et al., 2011]. Для оценки преобладающей функции β -катенина нами были исследованы следующие параметры: экспрессия мРНК гена *CTNNB1* и белка β -катенина, экспрессия мРНК *CDH1* и белка E-кадгерина, экспрессия мРНК генов-мишеней β -катенина – *CCND1* и *MYC*.

В качестве модели изучения функциональной активности β -катенина в настоящее исследование были включены следующие группы пациентов с диагностированными узловыми образованиями щитовидной железы: пациенты

с доброкачественными неопухолевыми узловыми образованиями (коллоидный узловой зоб, аутоиммунный тиреоидит); пациенты с доброкачественными опухолевыми узловыми образованиями (фолликулярная аденома); пациенты со злокачественными узловыми образованиями (папиллярный рак). Включение в исследование пациентов с узловыми образованиями щитовидной железы аутоиммунной природы было обусловлено формированием в мировой клинической и научной общественности взгляда о наличии взаимосвязи между аутоиммунным тиреоидитом и папиллярным раком [Guarino V. et al., 2010; Cunha L.L. et al., 2011; Azizi G. et al., 2014].

4.1. Реализация адгезионной функции β -катенина в эпителиальных клетках коллоидного узлового зоба

Цитологическая картина коллоидного узлового зоба охватывает широкий спектр морфологических изменений, отражающих различные этапы развития заболевания: ранняя фолликулярная гиперплазия, циклы инволюции/регенерации и собственно образование узла. Такие вторичные изменения, как оксифильная метаплазия, признаки свежего и старого кровоизлияния, кистозная дегенерация, некроз, грануляционная ткань, фиброз и кальциноз могут происходить в любой из выше представленных стадий.

Как известно, причина формирования узлового зоба связана с дефицитом гормонов щитовидной железы, что приводит к увеличению синтеза ТТГ с последующей стимуляцией пролиферации клеток и гиперплазии тиреоидного эпителия с целью нормализации уровня гормонов щитовидной железы [Wilson J.D. et al., 1992].

Исследование функционирования β -катенина в ткани коллоидного узлового зоба носит ограниченный характер. Преимущественно внимание исследователей более обращено к анализу экспрессии E-кадгерина при различной патологии щитовидной железы, в том числе коллоидного узлового зоба [Brabant G. et al., 1993; Werutsky G. et al., 2008; Ozolins A. et al., 2012]. Результаты этих работ на основании оценки экспрессии E-кадгерина могут

лишь косвенно указывать на преобладание адгезионной функции β -катенина в фолликулярном эпителии у пациентов с коллоидным узловым зобом. Нами была выполнена оценка дополнительных параметров (иммуноцитохимическая экспрессия β -катенина, экспрессия мРНК *CTNNB1*, иммуноцитохимическая экспрессия E-кадгерина, экспрессия мРНК *CDH1*, экспрессия мРНК генов-мишеней β -катенина) с целью определения преобладающей функции β -катенина при изучаемой патологии.

В группе пациентов с коллоидным зобом в ткани узлового образования щитовидной железы определялся умеренный уровень экспрессии мРНК гена *CTNNB1*, по сравнению с аналогичным показателем в других, включенных в исследование, клинических группах пациентов (с фолликулярной аденомой, папиллярным раком, аутоиммунным тиреоидитом). Известно, что между уровнем экспрессии мРНК и количеством соответствующего белка нет прямой корреляции [Tian, Q. et al., 2004; Lundberg E. et al., 2010; Schwanhausser V. et al., 2011; Schwanhausser V. et al., 2013]. Это связано, в первую очередь, с процессами посттрансляционной модификации, которым подвергается мРНК [Ryan K. et al., 2008; Vogel C. et al., 2010]. Поэтому определение уровня мРНК не в полной мере отражает экспрессию белка. Учитывая этот факт, нами был выполнен полуколичественный анализ экспрессии белка β -катенина методом иммуноцитохимии. У пациентов с коллоидным 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 щитовидной железе с участием β -катенина осуществляется за счет его взаимодействия с цитоплазматическим доменом E-кадгерина и формированием комплекса E-кадгерин/ β -катенин/ α -катенин на клеточной мембране [Huber A.H. et al., 2001]. Во анализируемых нами случаях коллоидного зоба определялась преимущественно положительная мембранная иммуноцитохимическая

экспрессия E-кадгерина в клетках эпителия щитовидной железы, что согласуется с результатами зарубежных авторов [Ozolins A. et al., 2012].

В нормальной ткани процесс синтеза, накопления и деградации мРНК того или иного гена носит циклический характер. Деградация мРНК является одним из ключевых процессов, который контролирует стабильный уровень экспрессии генов. Действительно, стабильность мРНК влияет на экспрессию генов практически во всех организмах (от бактерий до млекопитающих) и накопление конкретной мРНК может возникать вне зависимости от процессов транскрипции. В свою очередь, количественное определение периода полужизни важно для интерпретации данных экспрессии генов. Так, например, если транскрипт стабилен в течение нескольких дней, то изучение экспрессии соответствующего гена дает более точный результат. И, напротив, короткий период полужизни мРНК не позволяет нам судить об истинной экспрессии гена в клетке. В нашем случае, согласно данным литературы, период полужизни мРНК гена *CDH1* составляет от 5 до 13 ч. [Sharova L.V. et al., 2009]. Такой короткий временной промежуток между синтезом и распадом мРНК в неизменной ткани объясняет полученный нами низкий уровень экспрессии мРНК гена *CDH1* в ткани узлового образования у пациентов с коллоидным зобом, несмотря на положительную мембранную экспрессию белка E-кадгерина.

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 зобом, которое в последствии было подтверждено.

Таким образом, на основе полученных фактических данных предложенная картина складывается в следующую цепочку изменений в клетках фолликулярного эпителия при коллоидном зобе (рис. 21).

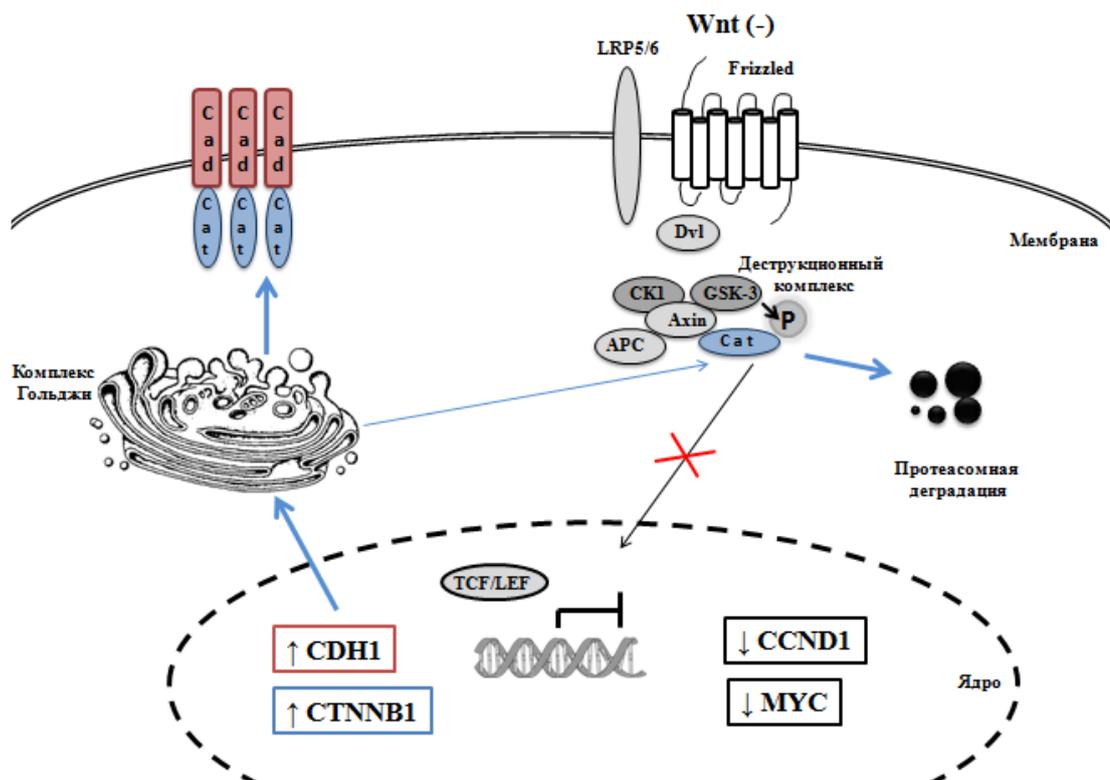


Рис. 21. Схема, отражающая адгезионную и транскрипционную функции β -катенина в клетках фолликулярного эпителия при коллоидном узловом зобе (по результатам собственных исследований).

Примечание. Wnt(-) – отсутствие стимуляции Wnt лигандом; LRP5/6 - рецептор липопротеина низкой плотности 5/6 (Low density lipoprotein receptor-related protein 5/6); Dvl - Dishevelled; CK1 - киназа казеина 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.

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

β -катенин в условиях реализации своей адгезионной функции располагается в примембранном пространстве в связанном с цитоплазматическим хвостом E-кадгерина состоянии. 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*.

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

Фолликулярная аденома представляет собой доброкачественную опухоль щитовидной железы, морфологическим субстратом которой являются клетки фолликулярного эпителия. Согласно мультицентрической теории фолликулярная аденома трансформируется в фолликулярный рак [Kondo T. et al., 2006]. При этом, согласно фетальной теории канцерогенеза, данная ветвь развития не имеет своего продолжения [Takano T. et al., 2002].

Существует сложность цитологической дифференциальной диагностики между фолликулярной аденомой и фолликулярным раком [Ravinsky E. et al., 1990; DeMay R.M., 1996; Yoon J.H. et al., 2014]. Именно поэтому в принятой цитологической классификации по Bethesda (2009) данные нозологические формы объединены в одну категорию - фолликулярная опухоль/подозрение на фолликулярную опухоль (IV категория). При цитологическом исследовании заключение «фолликулярная опухоль», как правило, основывается на выявлении микрофолликулов, состоящих из фолликулярных клеток среднего размера, на фоне скудного коллоида.

Окончательный диагноз устанавливается только на основании гистологического исследования. Дифференциальными признаками фолликулярного рака являются инвазия опухолевых клеток в капсулу, в сосуды, за пределы щитовидной железы, а также наличие лимфогенных и гематогенных метастазов [Dosen D. et al., 2003; Vasko V.V. et al., 2004; D'Avanzo A. et al., 2004]. При этом сосудистая инвазия является наиболее

надежным признаком злокачественной природы процесса, по сравнению с инвазией в капсулу.

Изучение особенностей бифункционального потенциала β -катенина в клетках фолликулярной аденомы позволяет нам судить о молекулярном субстрате данной патологии.

В нашем исследовании в клетках фолликулярной аденомы был выявлен самый высокий уровень экспрессии мРНК *CTNNB1* по сравнению с таковым показателем в группах пациентов с другими нозологическими формами патологии щитовидной железы. Известна сложность интерпретации результатов экспрессии мРНК в связи с ее коротким периодом полужизни (для мРНК *CTNNB1* этот период составляет от 8 до 18 ч.). Однако данный постулат относится, прежде всего, к неопухолевым клеткам [Sharova L.V. et al., 2009]. Фолликулярная аденома щитовидной железы является примером доброкачественного опухолевого процесса. Известно, что различные внешние и внутренние стимулы влияют на запуск деградации мРНК – стимулируя его или, напротив, ингибируя [Hollams E.M. et al., 2002]. 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 фолликулярных клетках коллоидного зоба, в клетках фолликулярной аденомы, наряду с мембранной экспрессией, появляется слабая цитоплазматическая экспрессия β -катенина, при этом ядерная - не регистрируется. Согласно данным литературы, подобная мембранная и цитоплазматическая коэкспрессия β -катенина определяется и при аденомах других локализаций. Так, в случаях спорадических аденом толстой кишки и аденом у пациентов с семейным аденоматозным полипозом выявлялась мембранная локализация β -катенина, а также цитоплазматическое

окрашивание, характер которого был значительно интенсивней, чем в клетках нормальной слизистой оболочки толстой кишки [Kobayashi M. et al., 2000]. Важно отметить, что при аденокарциноме толстой кишки также определяется цитоплазматическое накопление β -катенина, однако, в этом случае оно сочетается с ядерным [Abineno P.D. et al., 2010].

Такая цитоплазматическая локализация β -катенина, согласно данным литературы, указывает на активацию канонического Wnt сигнального пути с последующим ингибированием фосфорилирования β -катенина, его стабилизацией и накоплением в клетке [Chaiyaran W. 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].

Циклины представляют собой семейство белков, играющих важную роль в смене фаз клеточного цикла. Они проявляют свое действие путем связывания и активации ряда специфических циклин-зависимых киназ (CDKs - cyclin-dependent kinases) [Sherr C.J. et al., 2004; Besson A. et al., 2008]. В клетке последовательно синтезируется четыре основных типа циклинов (D, E, A и B). Циклины B необходимы для активации фазы митоза. Развитие S фазы обеспечивают циклины A. Циклины D и E способствуют G1/S переходу. Три типа D циклинов (D1, D2, D3) начинают накапливаться в середине G1 фазы, тогда как циклин E появляется позже, непосредственно перед G1/S переходом [Weinstein I.B., 2000]. Циклин D1 кодируется геном *CCND1*, который расположен на коротком плече 11 хромосомы (11q13.3). С функциональной точки зрения, он является наиболее значимым. Взаимодействуя с циклинзависимыми киназами CDK4 и CDK6, циклин D1 образует активные комплексы, которые способствуют прогрессии клеточного цикла. Данные

комплексы фосфорилируют белок ретинобластомы (Rb), что в дальнейшем индуцирует экспрессию некоторых генов (например, циклина E) и способствует развитию G1/S-перехода клеточного цикла [Adams P.D. et al., 1999; Burke J.R. et al., 2012; Narasimha A.M. et al., 2014]. Кроме того, в дополнение к своей первоначальной описанной функции в качестве CDK-зависимого регулятора клеточного цикла, циклин D1 также выполняет CDK-независимые функции: регулирует деятельность транскрипционных факторов, коактиваторов и коэкспрессоров, которые регулируют ацетилирование гистонов и ремоделирование хроматина. Циклин D1 избыточно экспрессируется при многих злокачественных опухолях человека [Casimiro M.C. et al., 2014].

Ген *MYC* расположен на 8-й хромосоме. Кодируемый белок MYC имеет α -спиральную многодоменную структуру, в которой выделяют участки связывания с ДНК и другими белками. MYC всегда находится в клеточном ядре за счет рецептора ядерной локализации. Он может образовывать как гомодимеры (MYC/MYC), так и гетеродимеры (например, MYC/MAX). Белок MYC способен выполнять свою функцию только в фосфорилированном состоянии [Luscher B., 2012]. Отмечено, что в норме этот белок присутствует во всех клетках, где осуществляет регуляторные функции. Основная функция MYC состоит в модуляции экспрессии генов. Считается, что под контролем MYC находится экспрессия около 15% всего человеческого генома [McDuff F.O. et al., 2009].

Механизм MYC-опосредованной регуляции активности генов заключается в специфическом присоединении комплекса MYC/MYC либо димера MYC/MAX к промоторной области гена. Присоединяясь к ДНК, комплекс приобретает сродство к гистонацетилтрансферазе (НАТ1). НАТ1 вводят в гистоны остаток уксусной кислоты, за счет чего они приобретают отрицательный заряд и отталкиваются друг от друга, что облегчает последующую транскрипцию гена [Dang C.V., 2012]. Кроме этого, белок MYC, напротив, может подавлять экспрессию генов, в промоторах которых имеется E-boxes (белок-связывающий мотив ДНК - CANNTG, где N — любой

нуклеотид) за счет последующего привлечения гистондеацетилазы (histone deacetylases, HDAC), которая отщеплет от гистонов заряженную ацетогруппу. Лишившись заряда, гистоны больше не отталкиваются друг от друга и затрудняют транскрипцию генов [Luscher B. et al., 2012].

MYC играет значимую роль в пролиферации клетки. В частности, он обеспечивает переход из G₀/1-фазы клеточного цикла в S-фазу за счет участия в активации экспрессии *CCND2* и циклинзависимых киназ (CDKs), а также подавляет экспрессию ингибиторов клеточного цикла [Keller U.B. et al., 2007; Meyer N. et al., 2008; Bueno M.J. et al., 2011]. Кроме того, MYC опосредованно инактивирует факторы p21 и p27, которые стимулируют «клеточный арест» в фазе G₁ [Keller U.B. et al., 2007; Dang C.V., 2012].

Изучение экспрессии мРНК генов *CCND1* и *MYC* при патологии щитовидной железы достаточно хорошо освещено [Wang S. et al., 2000; Vièche I. et al., 2001; Temmim L. et al., 2006; Lamba Saini M. et al., 2015]. Однако, в нашем исследовании выполнена комплексная оценка нескольких параметров, при этом результаты экспрессии мРНК генов *CCND1* и *MYC* сопоставляются с работой β-катенина и служат важной основой для анализа транскрипционной функции данного белка.

Согласно полученным нами результатам, по сравнению с другими изучаемыми нозологиями, в клетках фолликулярной аденомы был определен умеренный уровень экспрессии мРНК генов *CCND1* (при коллоидном зобе и аутоиммунном тиреоидите - ниже, при папиллярном раке - выше) и *MYC* (при коллоидном зобе - ниже, при папиллярном раке и аутоиммунном тиреоидите - выше).

Несмотря на то, что мы предполагаем активацию транскрипционной функции β-катенина в клетках фолликулярной аденомы, экспрессия гена *CDH1* остается на высоком уровне. 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 в неизменной ткани щитовидной железы, а также 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*.

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. 22). Действительно, в некоторых публикациях указано, что E-кадгерин может конкурировать за связь с β -катенином и в таком случае реализуется его адгезионная функция [Sanson V. et al., 1996; Gottardi C.J. et al., 2001; Gottardi C.J. et al., 2004]. При фолликулярной аденоме клетки пролиферирующего эпителия сохраняют специфическую тканевую архитектуру, при этом они плотно прилежат друг к другу, формируя так называемые микрофолликулы и псевдофолликулы. Мы полагаем, что в основе такого морфологического феномена лежит повышенная экспрессия E-кадгерина и реализация адгезионной функции β -катенина. Тот факт, что на фоне активности Wnt сигнального каскада сохраняется выраженная экспрессия E-кадгерина и мРНК его гена может объяснить отсутствие инвазивных свойств и доброкачественную природу процесса. Согласно многоступенчатой теории развития опухолей, формирование фолликулярного рака происходит на основе уже существовавшей фолликулярной аденомы [Kondo T. et al., 2006]. Особенностью клеток фолликулярного рака является способность к инвазии [D'Avanzo A. et al., 2004]. Инвазивные свойства опухолевой клетки связаны с

запуском эпителиально-мезенхимального перехода. Согласно современным данным одной из первых ступеней является подавление экспрессии гена *CDH1* [Thierry J.P., 2002]. В случае фолликулярной аденомы мы установили обратную экспрессионную картину.

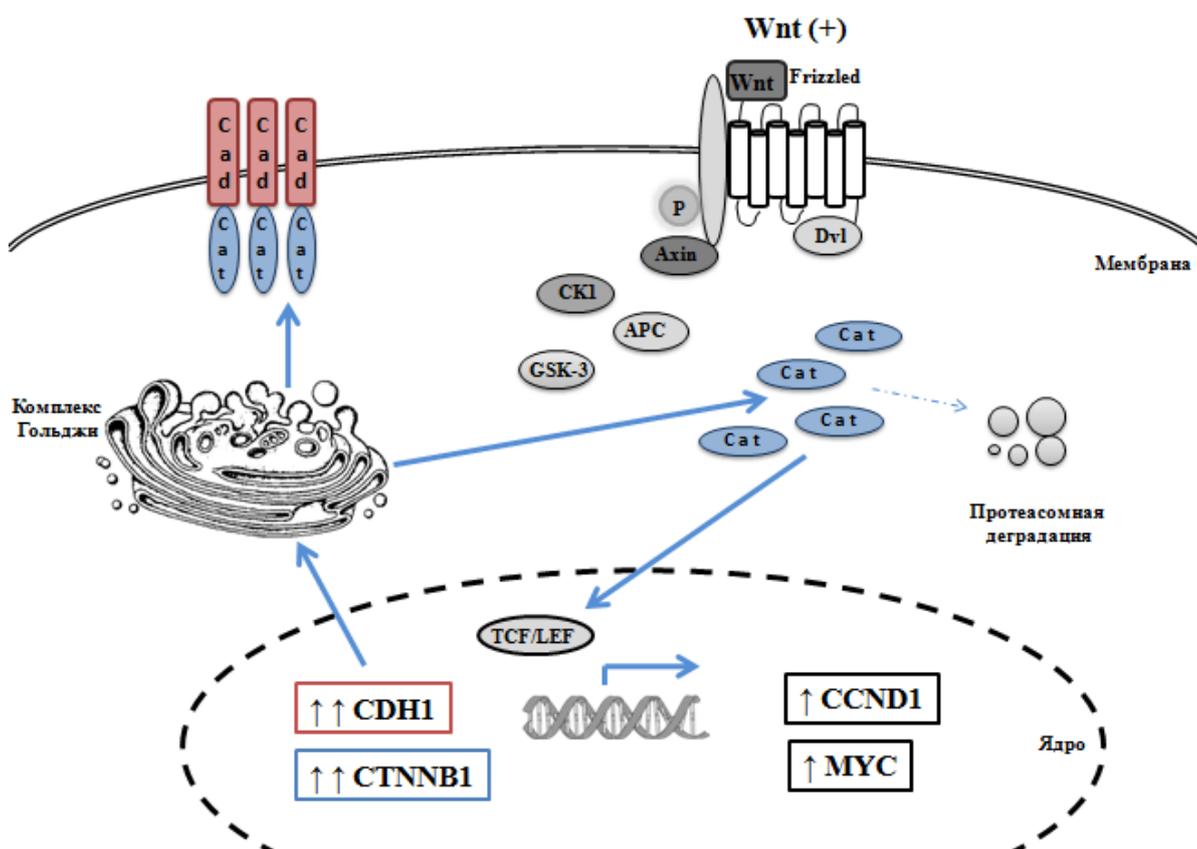


Рис. 22. Схема, отражающая адгезионную и транскрипционную функции β-катенина в клетках фолликулярного эпителия при фолликулярной аденоме (по результатам собственных исследований).

Примечание. Wnt(+) – стимуляция Wnt лигандом; LRP5/6 – рецептор липопротеина низкой плотности 5/6 (Low density lipoprotein receptor-related protein 5/6); Dvl – Dishevelled; CK1 – киназа 1α (casein kinase 1α); GSK3β – киназа-3β гликогенсинтазы (glycogen synthase kinase-3β); 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.

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

Таким образом, при фолликулярной аденоме щитовидной железы β -катенин реализует свой бифункциональный статус – наряду с адгезионной функцией запускается и транскрипционная/сигнальная функция белка.

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

Папиллярный рак среди первичных и вторичных злокачественных опухолей щитовидной железы занимает лидирующую позицию. Клетки папиллярного рака характеризуются высокой пролиферативной активностью. Морфологическая картина классического варианта папиллярного рака определяется формированием сосочков с тонкой сосудисто-волокнистой основой. Сосочки покрыты кубическими и цилиндрическими клетками с эозинофильной цитоплазмой [Al-Brahim N. et al., 2006]. При первичной диагностике папиллярного рака часто (у 50% пациентов) встречаются метастазы в регионарные лимфатические узлы. Отдаленные метастазы в легкие и кости менее характерны для данного варианта рака щитовидной железы и происходят в 5-7% случаев [LiVolsi V.A., 2011].

Прогноз этой опухоли в значительной степени связан со следующими клиническими параметрами: возраст, размер опухоли, такие гистологические признаки, как распространение за пределы капсулы щитовидной железы, наличие метастазов в лимфатические узлы и отдаленных метастазов, а также гистологический вариант [Gonzalez-Gonzalez R. et al., 2011; Sadow P.M. et al., 2011]. В наше исследование были включены пациенты только с классическим вариантом папиллярного рака.

Накопленные данные указывают на то, что β -катенин занимает центральную роль в злокачественной трансформации нормальных клеток. C. Herencia et al. (2012) при изучении дифференцировки гепатоцитов из мезенхимальных стволовых клеток обнаружили, что активация передачи Wnt сигналов и ядерное накопление β -катенина более характерно для опухолевого фенотипа клетки [Herencia C. et al., 2012]. В эпителиальных клетках легких

активации транскрипционной функции β -катенина было достаточно для индукции опухолевой трансформации клетки [Pacheco-Pinedo E.C. et al., 2011]. Знания того, что β -катенин принимает активное участие в регенерации экзокринной части поджелудочной железы при ее повреждении в результате острого панкреатита, позволили предположить его вовлеченность в развитие и прогрессию рака поджелудочной железы [Wells J.M. et al., 2007; Keefe M.D. et al., 2012]. Действительно, лиганд-опосредованная активация Wnt сигнального каскада с реализацией транскрипционной функции β -катенина требуется для индукции протоковой аденокарциномы поджелудочной железы [Zeng G. et al., 2006; Heiser P.W. et al., 2008; Zhang Y. et al., 2013]

По аналогии с вышеперечисленными злокачественными опухолями ожидаемо было увидеть все признаки преобладания транскрипционной/сигнальной функции β -катенина с подавлением его адгезионной активности и при папиллярном раке.

Несмотря на то, что уже в ранних работах отмечалось наличие мутации в гене β -катенина при широком спектре злокачественных опухолей (колоректальный рак [Morin P.J. et al., 1997], рак эндометрия [Saegusa M. et al., 2001], рак яичника [Palacios J. et al., 1998], рак желудка [Ebert M.P. et al., 2002], гепатоцеллюлярный рак [Miyoshi Y. et al., 1998; Monga S.P., 2015], аденокарцинома легкого [Shigemitsu K. et al., 2001; Sunaga N. et al., 2001]) исследование мутационного статуса гена *CTNNB1* при раке щитовидной железы определило мутации в 3-м экзоне гена только в случаях низкодифференцированного и анапластического вариантов рака щитовидной железы [Garcia-Rostan G. et al., 2001]. Точечные мутации в экзоне 3 гена *CTNNB1* были зарегистрированы в 25% случаев низкодифференцированного рака и 66% анапластического рака щитовидной железы [Garcia-Rostan G. et al., 2001]. При папиллярном и фолликулярном вариантах рака такие изменения не были найдены [Miyake N. et al., 2001]. Таким образом, основываясь на ранее полученных данных, в нашем исследовании был выполнен только анализ экспрессии мРНК гена *CTNNB1* без оценки мутационного статуса.

При анализе экспрессии мРНК *CTNNB1* был определен самый низкий уровень экспрессии по сравнению с аналогичным показателем в других изучаемых нами группах пациентов с патологией щитовидной железы.

Несмотря на низкую экспрессию мРНК гена, иммуноцитохимический анализ белка β -катенина установил во всех анализируемых случаях папиллярного рака положительную экспрессию. При этом в опухолевых клетках β -катенин определялся в цитоплазме и ядре, а мембранная локализация, так 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.

Нужно отметить, что еще одним подтверждением сигнальной активности β -катенина в опухолевых клетках папиллярного рака является высокая экспрессия мРНК его генов-мишеней *CCND1* и *MYC*, по сравнению с другими анализируемыми группами пациентов.

Таким образом, полученные результаты экспрессии β -катенина не противоречат нашему первоначальному предположению о преобладании транскрипционной/сигнальной функции β -катенина в клетках 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]. Однако такое прямое подавление транскрипции не является единственным механизмом, влияющим на реализацию E-кадгерин-опосредованной гомофильной межклеточной адгезии. Так, было показано, что в случае гиперэкспрессии фактора *SNAIL* также происходит замедление процесса транспортировки белка E-кадгерина от комплекса Гольджи к мембране клетки [Ohkubo T. et al., 2004].

Альтернативным механизмом инактивации гена *CDH1* может служить метилирование промотора этого гена [Hennig G. et al., 1995; Graff J.R. et al., 1995]. Ранние работы в этом направлении на клеточных культурах выявили aberrантное гиперметилование 5' CpG островка E-кадгерина в 83% папиллярного рака щитовидной железы, 11% фолликулярного варианта рака щитовидной железы, 40% рака из клеток Гюртля и 21% плохо дифференцированных карцином щитовидной железы [Graff J.R. et al., 1998]. Однако более поздние работы, выполненные на ткани щитовидной железы у пациентов с папиллярным раком, указывают на отсутствие метилирования промотора гена *CDH1* [Werutsky G. et al., 2008].

Наше исследование установило, что экспрессия мРНК гена *CDH1* в ткани узлового образования у пациентов с папиллярным раком характеризуется низким уровнем, по сравнению с аналогичным показателем в клетках щитовидной железы в других анализируемых группах пациентов. Мы полагаем, что в основе низкой экспрессии мРНК *CDH1* лежит опосредованный механизм

подавления транскрипции гена E-кадгерина через активацию Wnt сигнального пути и запуск синтеза транскрипционных факторов SNAIL и SLUG.

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

E-кадгерин является одним из основных классических кадгеринов, ответственных за межклеточную адгезию эпителиальных клеток. Многократно в литературе постулировался тот факт, что потеря нормальной функции кадгеринов может явиться важным шагом в прогрессии дедифференцировки опухолевых клеток, проводящей к увеличению метастатического потенциала опухоли. Так, показано, что снижение экспрессии E-кадгерина при аденокарциноме желудка, раке яичников и некоторых других карциномах коррелирует с признаками опухолевой инвазии и метастазированием [Braske M.E. et al., 1996; Sawada K. et al., 2008; Zhong X.Y. et al., 2008].

E-кадгерин способен осуществлять свою адгезионную функцию только при взаимодействии с β -катенином, за счет связующей функции β -катенина и α -катенина с актином цитоскелета клетки [Polyak K. et al., 2009]. В некоторых работах было показано, что активность β -катенина и его связывание с кадгерином в адгезионных контактах конкурируют друг с другом [Nelson W.J. et al., 2004; Fu Y. et al., 2011].

Таким образом, коммуникация эпителиальных клеток с соседними клетками через адгезионные контакты формирует пути взаимодействия с внутриклеточным цитоскелетом и сигнальными путями, и тем самым вносит свой вклад в регулирование фенотипа клетки, пролиферацию и дифференцировку. И наоборот, физиологические/патофизиологические изменения в деятельности конкретных сигнальных путей влияют на адгезионные контакты между клетками.

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 (рис. 23).

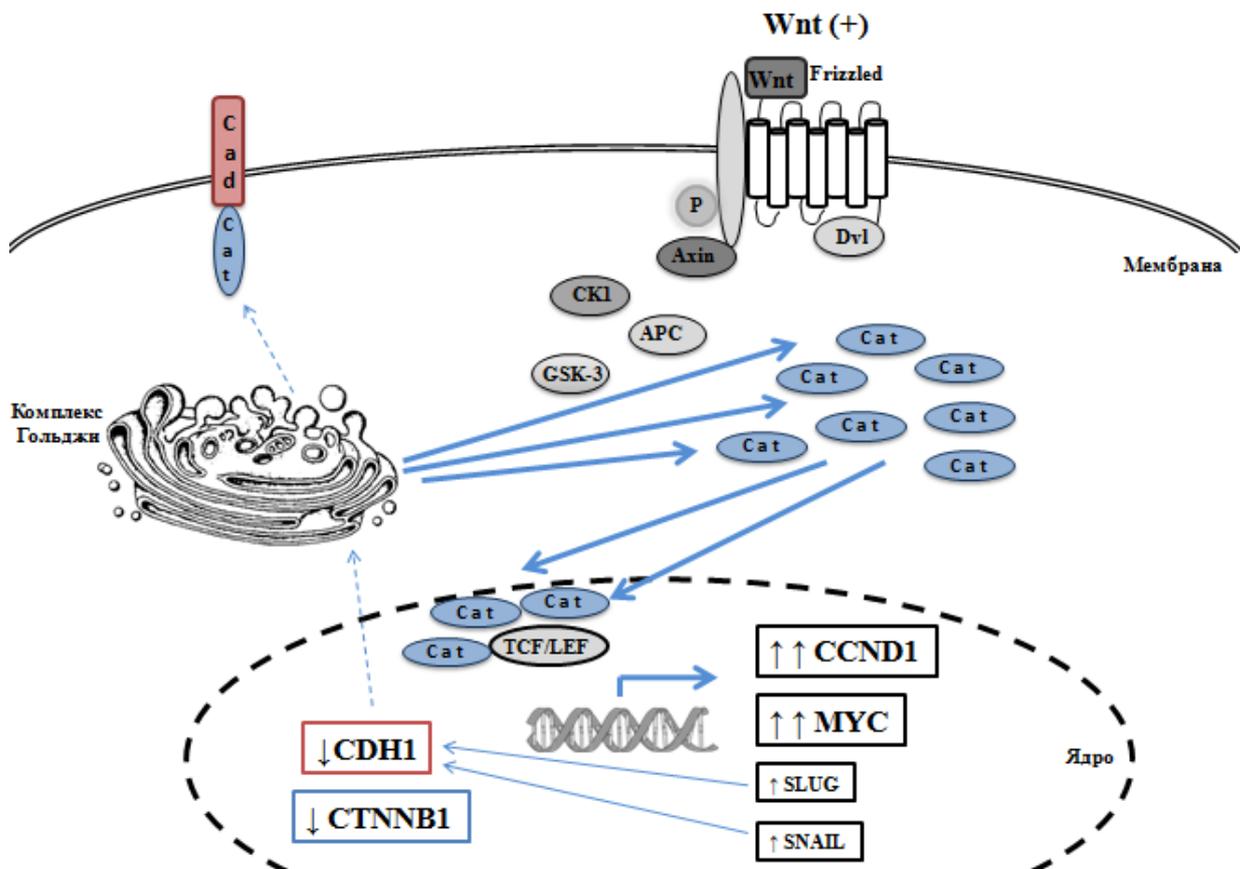


Рис. 23. Схема, отражающая адгезионную и транскрипционную функции β-катенина в клетках фолликулярного эпителия при папиллярном раке (по результатам собственных исследований).

Примечание. Wnt(+) – стимуляция Wnt лигандом; LRP5/6 - рецептор липопротеина низкой плотности 5/6 (Low density lipoprotein receptor-related protein 5/6); Dvl - Dishevelled; CK1 - казеин киназа 1α (casein kinase 1α); GSK3β - киназы-3β гликогенсинтазы (glycogen synthase kinase-3β); 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 и пунктир стрелки отражает степень реализации данного пути: чем толще, тем более представлен этот путь

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 мобилизации 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.

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

Аутоиммунный тиреоидит (АИТ, тиреоидит Хашимото, хронический лимфоцитарный тиреоидит), по результатам цитологического исследования тонкоигольной аспирационной биопсии, по распространенности среди патологии щитовидной железы занимает второе место после коллоидного зоба. Само название заболевания указывает на его аутоиммунную природу, которая характеризуется высокими титрами циркулирующих антител к тиреопероксидазе (ТПО) и тиреоглобулину. Типичными морфологическими изменениями при АИТ являются лимфо-плазмоцитарная инфильтрация, прогрессирующее уменьшение числа клеток фолликулярного эпителия щитовидной железы и формирование лимфоидных фолликулов с хорошо развитым зародышевым центром. Воспалительная инфильтрация железы часто приводит к гипотиреозу вследствие разрушения и последующего фиброзного замещения паренхимы ткани.

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].

Факт существования связи между формированием злокачественной опухоли и воспалением был еще отмечен Р. Вирховым в 1863 году. В литературе существуют убедительные доказательства такой связи на примере других аутоиммунных заболеваний: 1) болезнь Крона и аденокарцинома толстой кишки [Freeman H.J., 2008]; 2) хронический гепатит В, гепатит С и

гепатоцеллюлярный рак [Di Bisceglie A.M., 2009; De Oliveria Andrade L.J. et al., 2009]; 3) хронический гастрит, индуцированный *Helicobacter Pylori*, и рак желудка [Wroblewski L.E. et al., 2010]; 4) асбестоз и мезотелиома [Kang D. et al., 2013]; 5) склеродермия и рак молочной железы [Joseph C.G. et al., 2014].

Взаимосвязь между воспалением при АИТ и раком щитовидной железы до сих пор полностью не ясна [Guarino V. et al., 2010]. Ряд исследователей полагают, что объединяющим звеном между этими двумя патологиями является специфические антитела [Kim E.S. et al., 2010; Azizi G. et al., 2011]. Так, антитела к тиреоглобулину могут иметь онкогенный потенциал. В альтернативном варианте молекула тиреоглобулина при раке щитовидной железы может быть более антигенной, благодаря измененного процессинга или зародышевой мутации в первичной структуре. Интерес представляет тот факт, что антитела к ТПО не связаны с риском развития рака щитовидной железы. При этом они являются более чувствительным маркером АИТ, фиксируют компоненты комплемента и тем самым обладают высоким цитотоксическим эффектом. Возможно именно последний эффект защищает клетки щитовидной железы от онкогенного воздействия воспалительного микроокружения [Azizi G. et al., 2014].

Нами была предпринята попытка найти молекулярную основу взаимосвязи АИТ и папиллярного рака на основании анализа преобладающей функции β -катенина. Так, в случаях папиллярного рака нами был определен запуск транскрипционного/сигнального потенциала β -катенина и подавление его адгезионной функции.

Исследование заданных в нашей работе параметров (экспрессия мРНК и белка β -катенина, экспрессия мРНК и белка Е-кадгерина, уровень экспрессии мРНК генов-мишеней β -катенина – *CCND1* и *MYC*) при аутоиммунном тиреоидите показало аналогичную картину, как и в клетках фолликулярной аденомы. Достоверные отличия определялись лишь в группе показателей экспрессии белка Е-кадгерина, изменения экспрессии мРНК гена *CDH1* не имели достоверного отличия. Дальнейшее исследование уровня протеина Е-

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

Впервые исследование экспрессии E-кадгерина и его гена в эпителиальных клетках аутоиммунного тиреоидита было выполнено P. Smyth et al. [2001]. В этой работе случаи *RET/PTC* положительного тиреоидита Хашимото сочетаются с низкой экспрессией E-кадгерина на поверхности клетки. В более поздних работах, выполненных на операционном материале методом иммуногистохимии, достоверных отличий в экспрессии белка E-кадгерина в клетках при папиллярном раке, фолликулярном раке, фолликулярной аденоме, аутоиммунном тиреоидите выявлено не было [El Demellawy D. et al., 2008].

Полученное нами распределение E-кадгерина на поверхности эпителиальных клеток при аутоиммунном тиреоидите 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* и умеренной экспрессией мРНК *CCND1* и *MYC*, действительно, указывает на активацию Wnt сигнального пути, формирование стабильного цитоплазматического пула β -катенина, умеренную активацию транскрипции генов-мишеней данного сигнального каскада. Обращает внимание, что ядерная локализация 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. 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. 24).

Согласно результатам анализа соотношения адгезионной и сигнальной/транскрипционной активности β -катенина, аутоиммунный тиреоидит на данной молекулярной платформе занимает промежуточное положение между фолликулярной аденомой и папиллярным раком.

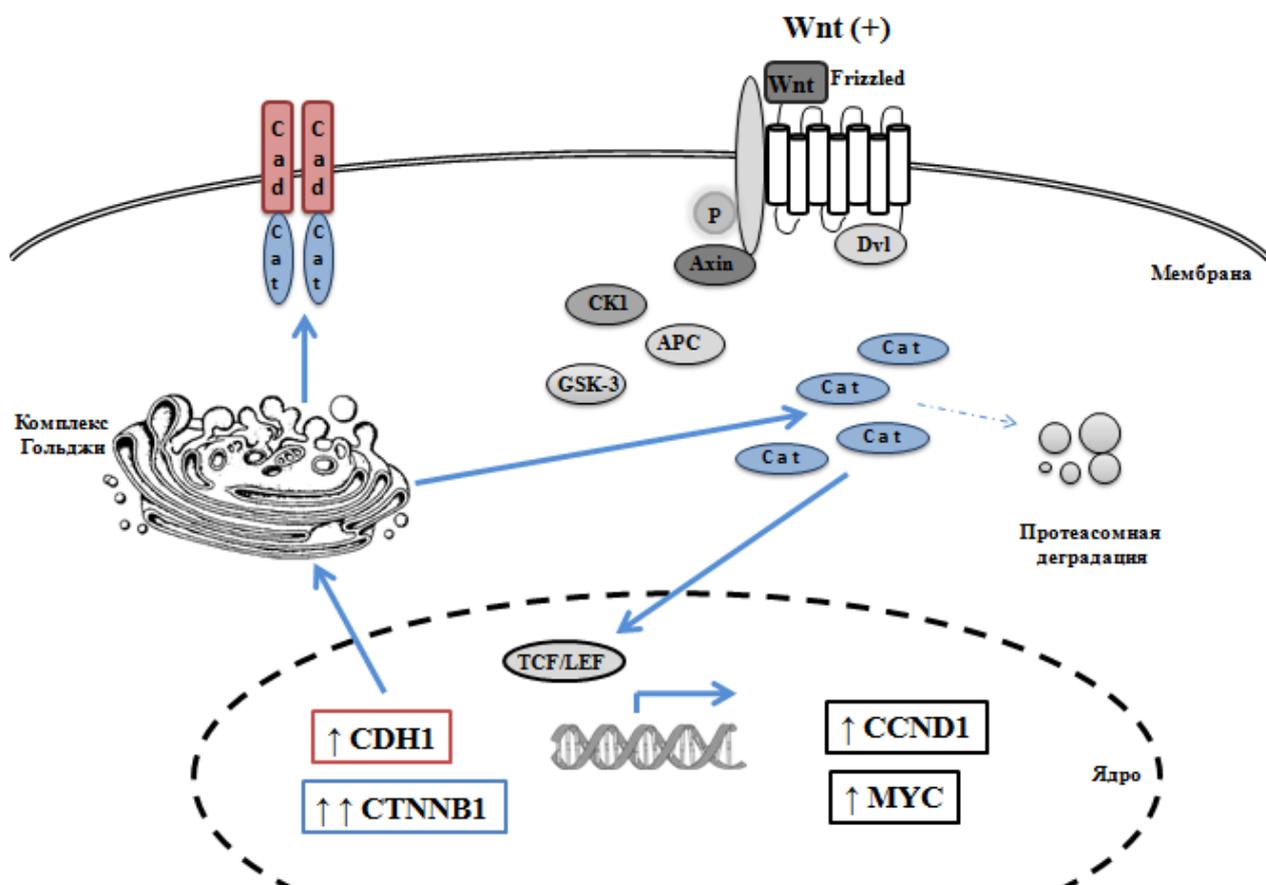


Рис. 24. Схема, отражающая адгезионную и транскрипционную функции β -катенина в клетках фолликулярного эпителия при аутоиммунном тиреоидите (по результатам собственных исследований).

Примечание. Wnt(+) – стимуляция Wnt лигандом; LRP5/6 – рецептор липопротеина низкой плотности 5/6 (Low density lipoprotein receptor-related protein 5/6); Dvl – Dishevelled; CK1 – кэзеин киназа 1 α (casein kinase 1 α); GSK3 β – киназы-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

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

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 щитовидной железы 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 щитовидной железе, выстраивается последовательная патогенетическая цепочка переключения соотношений адгезионной и транскрипционной/сигнальной функций β -катенина при узловой патологии щитовидной железы: 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 (рис. 25).

В клетках аутоиммунного тиреоидита 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.

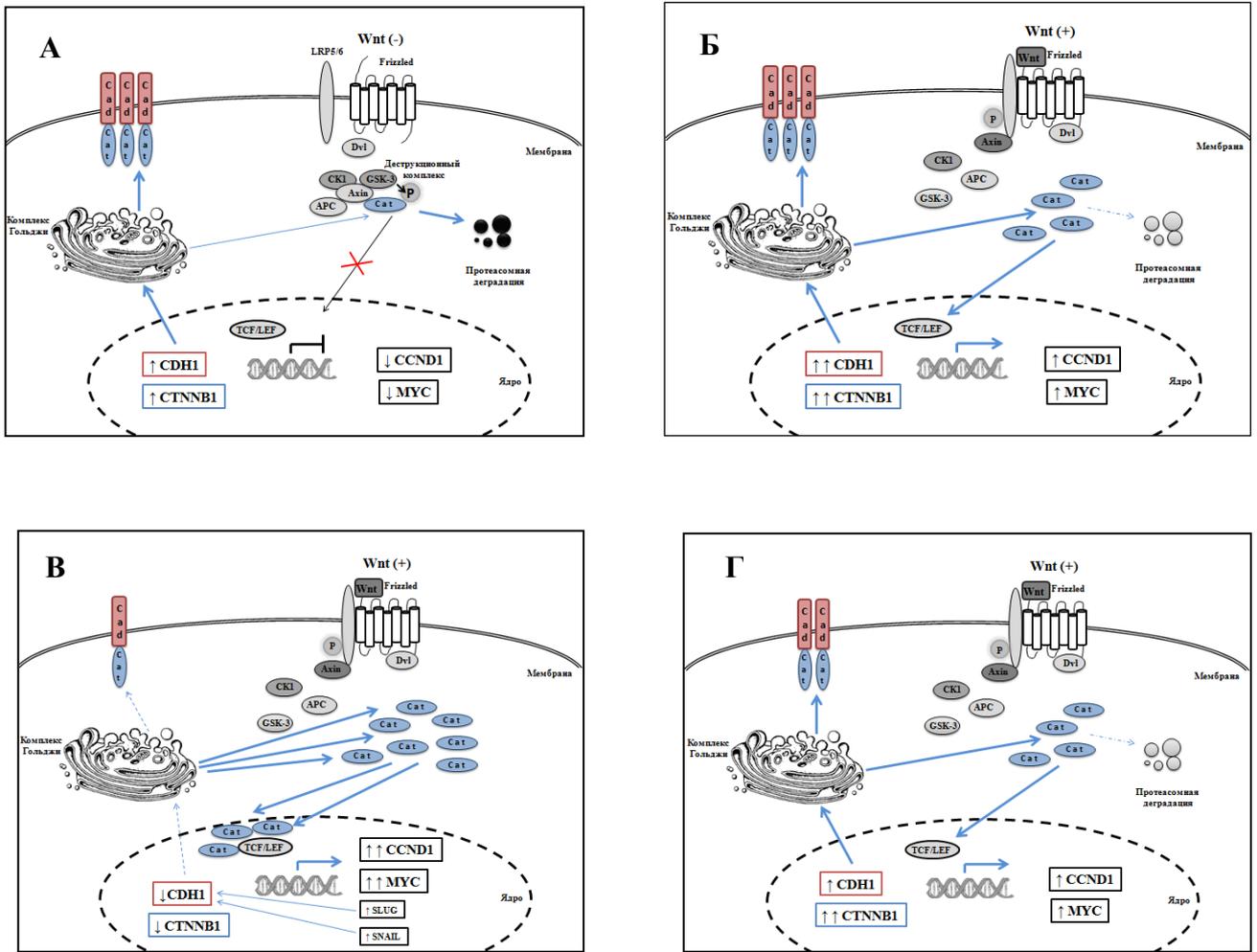


Рис. 25. Схемы, отражающие адгезионную и транскрипционную функции β -катенина в клетках фолликулярного эпителия при узловатой патологии щитовидной железы различной природы (по результатам собственных исследований). **А.** В клетках коллоидного узловатого зоба; **Б.** В клетках фолликулярной аденомы; **В.** В клетках папиллярного рака; **Г.** В эпителиальных клетках при аутоиммунном тиреоидите.

Примечание. 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 - казеин киназа 1 α (casein kinase 1 α); GSK3 β - киназы-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 и пунктир стрелки отражает степень реализации данного пути: чем толще, тем более представлен этот путь

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 реализация слабой адгезионной функции.

Список использованных сокращений

АИТ - аутоиммунный тиреоидит;

ДАБ - 3,3-диаминобензидин;

кДНК - комплементарная дезоксирибонуклеиновая кислота;

КЗ – коллоидный узловой зуб;

мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота;

ПР – папиллярный рак;

ТАБ – тонкоигольная аспирационная биопсия;

ФА – фолликулярная аденома;

ФР – фолликулярный рак;

ЩЖ – щитовидная железа;

АРС - аденоматозный полипоз толстой кишки (Adenomatous Polyposis Coli);

Arm – Armadillo;

AUS - атипия неясного значения;

СК1 - казеин киназа 1 α (casein kinase 1 α);

CTD - COOH-терминальный конец;

Dvl - Dishevelled;

Fzd - Frizzled рецепторы;

GSK3b - 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);

NDT - NH₂-терминальный домен;

РТ-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);

Thr – остаток аминокислоты триптофан;

Tyr - остаток аминокислоты тирозин.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Галицкий, В.А. Канцерогенез и механизмы внутриклеточной передачи сигналов. / В.А. Галицкий // Вопросы онкологии. - 2003. - Т.49, № 3. - С. 278-293.
2. Глушанкова, Н.А. Цитоскелет и межклеточная адгезия. / Н.А. Глушанкова // Вестник РОНЦ им Н.Н. Блохина РАМН. – 2003. – Т. 14. - №3. – С. 50-58.
3. Делекторская, В.В. Клиническое значение содержания молекулярно-биологических маркеров в зонах инвазивного фронта рака толстой кишки. / В.В. Делекторская, Д.А. Головков, Н.Е. Кушлинский // БЭБМ. – 2008. – Т. 146. - №11. – С. 552-555.
4. Заседкевич, Ю.М. Экспрессия эпителиальных кадгеринов и ассоциированных молекул при люминальном А подтипе рака молочной железы. / Ю.М. Заседкевич, А.А. Бриллиант, С.В. Сазонов // Уральский медицинский журнал. – 2014. - №8(122). – С. 43-45.
5. Зубко, М.Д. Характеристика уровня экспрессии E-кадгерина и V-катенина в гепатоцеллюлярном и холангиоцеллюлярном раке печени. / М.Д. Зубко // Патология. – 2015. - №2(34). – С. 64-70.
6. Куликов, В.А. Сигнальные каскады, онкогены, гены-онкосупрессоры и метаболизм раковой клетки. / В.А. Куликов, Л.Е., Беляева // Вестник ВГМУ. – 2014. – Т. 13. - №15. – С. 6-15.
7. Окраска по Папаниколау на отечественных автоматах окраски мазков ЭМКОСТЕЙНЕР / М.В. Безруков, М.Е. Беланов, Г.А. Бухаров и соавт. // Лаборатория. – 2012. - №3. – С. 34-36.
8. Тяжелова, В.Г. Trail- и Wnt-сигнальные пути в апоптозе. / В.Г. Тяжелова // Иммунология. – 2005. - Т. 26. - №6. – С. 377-384.
9. Чикина, А.С. Метастазирование: клеточные механизмы и их регуляция. / А.С. Чикина, А.Ю. Александрова // Молекулярная биология. – 2014. – Т. 48. - № 2. - С. 165-180.

10. Чухловин, А.Б. Молекулярно-генетические подходы к прогнозированию течения и исхода рака щитовидной железы. / А.Б. Чухловин, А.А. Богатиков, А.С. Кузьмичев // Клинико-лабораторный консилиум. – 2013. - №1(45). – С. 7-12.
11. A molecular computational model improves the preoperative diagnosis of thyroid nodules. / S. Tomei, I. Marchetti, K. Zavaglia et al. // BMC Cancer. – 2012. – Vol. 12. – P. 396.
12. A National Cancer Data Base report on 53,856 cases of thyroid carcinoma treated in the U.S., 1985–1995. / S.A. Hundahl, I.D. Fleming, A.M. Fremgen et al. // Cancer. – 1998. – Vol. 83. – P. 2638–2648.
13. A p120-catenin-CK1epsilon complex regulates Wnt signaling. / D. Casagolda, B. Del Valle-Pérez, G. Valls et al. // J Cell Sci. – 2010. – Vol. 123(Pt15). – P. 2621-2631.
14. Abe, K. EPLIN mediates linkage of the cadherin catenin complex to F-actin and stabilizes the circumferential actin belt. / K. Abe, M. Takeichi // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2008. – Vol. 105. – P. 13–19.
15. Aberrant localization of beta-catenin correlates with overexpression of its target gene in human papillary thyroid cancer. / K. Ishigaki, H. Namba, M. Nakashima et al. // J. Clin. Endocrinol. Metab. – 2002. – Vol. 87(7). – P. 3433-3440.
16. Aberrant Wnt/ β -Catenin Signaling in Pancreatic Adenocarcinoma. / G. Zeng, M. Germinaro, A. Micsenyi et al. // Neoplasia (New York, NY). – 2006. – Vol. 8(4). – P. 279-289.
17. Abineno, P.D. Alteration of Subcellular Beta Catenin Expression in Normal Mucosa, Adenoma and Carcinoma in Relation to Colorectal Carcinogenesis. / P.D. Abineno, D.R. Handjari, B. Siregar // Indonesian J. of Gastroenterology, Hepatology, and Digestive Endoscopy. – 2010. – Vol. 11. – N. 2. – P. 83-87.
18. Absence of mutations in the beta-catenin and adenomatous polyposis coli genes in papillary and follicular thyroid carcinomas. / N. Miyake, H. Maeta, S. Horie et al. // Pathol Int. – 2001. – Vol. 51(9). – P. 680-685.

19. Activation of b-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in b-catenin or APC. / P.J. Morin, A.B. Sparks, V. Korinek et al. // *Science*. – 1997. – Vol. 275. – P. 1787-1790.
20. Activation of beta-catenin in dendritic cells regulates immunity versus tolerance in the intestine. / S. Manicassamy, B. Reizis, R. Ravindran et al. // *Science*. – 2010. Vol. 329. – №5993. – P. 849-853.
21. Activation of Beta-Catenin Signaling in Androgen Receptor–Negative Prostate Cancer Cells. / X. Wan, J. Liu, J-F. Lu et al. // *Clinical Cancer Research*. – 2012. – Vol. 18(3). – P. 726-736.
22. Activation of c-Myc and Cyclin D1 by JCV T-Antigen and β -Catenin in Colon Cancer. / M.J. Ripple, A. Parker Struckhoff, J. Trillo-Tinoco et al. // *PLoS ONE*. – 2014. – Vol. 9(9). - e106257.
23. Activation of the beta-catenin gene in primary hepatocellular carcinomas by somatic alterations involving exon 3. / Y. Miyoshi, K. Iwao, Y. Nagasawa et al. // *Cancer Res*. – 1998. – Vol. 58(12). – P. 2524-2527.
24. Activity of the beta-catenin phosphodestruction complex at cell-cell contacts is enhanced by cadherin-based adhesion. / M.T. Maher, A.S. Flozak, A.M. Stocker // *J Cell Biol*. – 2009. – Vol. 186(2). – P. 219-228.
25. Adhesion between epithelial cells and T lymphocytes mediated by E-cadherin and the α E β 7 integrin / K.L. Cepek, S.K. Shaw, C.M. Parker et al. // *Nature*. – 1994. – Vol. 372. – P. 190-193.
26. Al-Brahim, N. Papillary Thyroid Carcinoma: An Overview. / N. Al-Brahim, S.L. Asa // *Arch Pathol Lab Med*. – 2006. - Vol. 130. - N. 7. – P. 1057-1062.
27. Alpha-Catenin as a tension transducer that induces adherens junction development. / S. Yonemura, Y. Wada, T. Watanabe et al. // *Nat. Cell Biol*. – 2010. – Vol. 12. – P. 533–542.
28. Alpha-catenin is a molecular switch that binds E-cadherin-beta-catenin and regulates actinfilament assembly. / F. Drees, S. Pokutta, S. Yamada et al. // *Cell*. – 2005. – Vol. 123. – P. 903–915.

29. Alterations in β -catenin expression and localization in prostate cancer. / H.C. Whitaker, J. Girling, A.Y. Warren et al. // *Prostate*. – 2008. – Vol. 68. – P. 1196–1205.
30. Analyses of MYC, ERBB2, and CCND1 genes in benign and malignant thyroid follicular cell tumors by real-time polymerase chain reaction. / I. Bièche, B. Franc, D. Vidaud et al. // *Thyroid*. – 2001. – Vol. 11(2). – P. 147-152.
31. APC/CTNNB1 (β -catenin) pathway alterations in human prostate cancers. / A.V. Gerstein, T.A. Almeida, G. Zhao et al. // *Genes Chromosomes Cancer*. – 2002. – Vol. 34. – P. 9–16.
32. Ashcraft, M.W. Management of Thyroid Nodules II: Scanning techniques, thyroid suppressive therapy and fine needle aspiration. / M.W. Ashcraft, A.J. Van Herle // *Head Neck Surg*. – 1981. – Vol. 3(4). – P. 297-322.
33. Association Between Hepatitis C and Hepatocellular Carcinoma. / L.J. De Oliveria Andrade, A. D'Oliveira, R.C. Melo et al. // *Journal of Global Infectious Diseases*. - 2009. – Vol. 1(1). – P. 33–37.
34. Association of Hashimoto's thyroiditis with thyroid cancer. / G. Azizi, J.M. Keller, M. Lewis et al. // *Endocr Relat Cancer*. – 2014. – Vol. 21(6). – P. 845–852.
35. Association of the autoimmune disease scleroderma with an immunologic response to cancer. / C.G. Joseph, E. Darrah, A.A. Shah et al. // *Science*. – 2014. – Vol. 343. – P. 152–157.
36. Axin-mediated CKI phosphorylation of beta-catenin at Ser 45: a molecular switch for the Wnt pathway. / S. Amit, A. Hatzubai, Y. Birman // *Genes Dev*. – 2002. – Vol. 16(9). – P. 1066-1076.
37. Azizi, G. Autoimmune thyroid disease: a risk factor for thyroid cancer. / G. Azizi, C.D. Malchoff // *Endocr Pract*. – 2011. – Vol. 17(2). – P. 201-209.
38. Benjamin, D. mRNA stability and cancer: an emerging link? / D. Benjamin, C. Moroni // *Expert Opin Biol Ther*. – 2007. – Vol. 7(10). – P. 1515-1529.
39. Berx, G. The cell-cell adhesion molecule E-cadherin / G. Berx, F. van Roy // *Cell. Mol. Life Sci*. – 2008. – Vol. 65. – P. 3756–3788.

40. Besson, A. CDK inhibitors: cell cycle regulators and beyond. / A. Besson, S.F. Dowdy, J.M. Roberts // *Dev. Cell.* – 2008. – Vol. 14. – P. 159–169.
41. Beta-catenin abnormalities and associated insulin-like growth factor overexpression are important in phyllodes tumours and fibroadenomas of the breast. / E.J. Sawyer, A.M. Hanby, R. Poulson et al. // *J Pathol.* – 2003. – Vol. 200. – P. 627–632.
42. Beta-Catenin activity negatively regulates bacteria-induced inflammation. / Y. Duan, A.P. Liao, S. Kuppireddi et al. // *Lab Invest.* – 2007. – Vol. 87. – №6. – P. 613–624.
43. Beta-catenin and Tcfs in mammary development and cancer. / S. Hatsell, T. Rowlands, M. Hiremath et al. // *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* – 2003. – Vol. 8. – P. 145–158.
44. Beta-catenin is elevated in human benign prostatic hyperplasia specimens compared to histologically normal prostate tissue. / T.M. Bauman, C.M. Vezina, W. Huang et al. // *Am J Clin Exp Urol.* – 2014. – Vol. 2(4). – P. 313-322.
45. Beta-catenin regulates the expression of the matrix metalloproteinase-7 in human colorectal cancer. / T. Brabletz, A. Jung, S. Dag et al. // *Am J Pathol.* – 1999. – Vol. 155. – P. 1033–1038.
46. Beta-Catenin regulates vascular endothelial growth factor expression in colon cancer. / V. Easwaran, S.H. Lee, L. Inge et al. // *Cancer Res.* – 2003. – Vol. 63(12). – P. 3145-3153.
47. Beta-catenin, a novel prognostic marker for breast cancer: its roles in cyclin D1 expression and cancer progression. / S.Y. Lin, W. Xia, J.C. Wang et al. // *Proc Natl Acad Sci USA.* - 2000. – Vol. 97. – P. 4262–4266.
48. Beta-Catenin/Wnt signaling regulates expression of the membrane type 3 matrix metalloproteinase in gastric cancer. / A.M. Lowy, W.M. Clements, J. Bishop et al. // *Cancer Res.* – 2006. – Vol. 66(9). – P. 4734-4741.
49. Better Understanding in the Differentiation of Thyroid Follicular Adenoma, Follicular Carcinoma, and Follicular Variant of Papillary Carcinoma: A

- Retrospective Study. / J.H. Yoon, E-K. Kim, J.H. Youk et al. // *International Journal of Endocrinology*. – 2014. – Vol. 2014. - 321595.
50. Bienz, M. Beta-Catenin: a pivot between cell adhesion and Wnt signaling / M. Bienz // *Curr Biol*. – 2005. – Vol. 15(2). – P. 64-67.
51. Binding to cadherins antagonizes the signaling activity of beta-catenin during axis formation in *Xenopus*. / F. Fagotto, N. Funayama, U. Gluck et al. // *J Cell Biol*. – 1996. – Vol. 132(6). – P. 1105-1114.
52. Birchmeier, W. Adherens junction proteins in tumour progression. / W. Birchmeier, J. Hülsken, J. Behrens // *Cancer Surv*. – 1995 – Vol. 24. – P. 129–140.
53. Bisson, I. WNT signaling regulates self-renewal and differentiation of prostate cancer cells with stem cell characteristics. / I. Bisson, D.M. Prowse // *Cell Res*. – 2009. – Vol. 19. - P. 683-697.
54. Blitzer, J.T. A critical role for endocytosis in Wnt signaling. / J.T. Blitzer, R. Nusse // *BMC Cell Biol*. – 2006. – Vol. 7. – P. 28-31.
55. Bracke, M.E. The E-cadherin/catenin complex in invasion and metastasis. / M.E. Bracke, F.M. van Roy, M.M. Mareel // *Curr Top Microbiol Immunol*. – 1996. – Vol. 213. – P. 123–161.
56. BRAF and RAS mutations in human lung cancer and melanoma. / M.S. Brose, P. Volpe, M. Feldman et al. // *Cancer Res*. – 2002. – Vol. 62. – P. 6997–7000.
57. BRAF mutation in papillary thyroid carcinoma / Y. Cohen, M. Xing, E. Mambo et al. // *J. Natl. Cancer Inst*. 2003. Vol. 95. P. 625–627.
58. BRAF T1796A transversion mutation in various thyroid neoplasms. / M. Xing, V. Vasko, G. Tallini et al. // *J. Clin. Endocrinol. Metab*. - 2004. - Vol. 89. - P. 1365–1368.
59. Bueno, M.J. MicroRNAs and the cell cycle. / M.J. Bueno, M. Malumbres // *Biochim. Biophys. Acta*. – 2011. – Vol. 1812(5). – P. 592–601.
60. Burke, J.R. Structures of inactive retinoblastoma protein reveal multiple mechanisms for cell cycle control. / J.R. Burke, G.L. Hura, S.M. Rubin // *Genes & Development*. – 2012. – Vol. 26. – P. 1156–1166.

61. Cadherin Mediated Cell-Cell Adhesion and Signaling in the Skeleton / P.J. Marie, E. Haÿ, D. Modrowski et al. // *Calcified tissue international*. – 2014. – Vol. 94(1). – P. 46-54.
62. Cancer Incidence in Five Continents. / M. P. Curado, B. Edwards, H. R. Shin et al. // *IARC Scientific Publications*. - 2007. - Vol. 9(160).
63. Cano, A. The transcription factor Snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. / A. Cano, M.A. Pérez-Moreno, M.A. Pérez-Moreno // *Nature Cell Biology*. – 2000. – Vol. 2. – N. 2. – P. 76-83.
64. Canonical Wnt signaling Is required for pancreatic carcinogenesis. / Y. Zhang, J.P. Morris, W. Yan et al. // *Cancer research*. – 2013. – Vol. 73(15). – P. 4909-4922.
65. Canonical Wnt signaling negatively modulates regulatory T cell function. / van Loosdregt J., Fleskens V., Tiemessen M.M. et al. // *Immunity*. 2013; 39: 298-310.
66. Casein Kinase 1 Is a Novel Negative Regulator of E-Cadherin-Based Cell-Cell Contacts. / S. Dupre-Crochet, A. Figueroa, C. Hogan et al. // *Molecular and Cellular Biology*. – 2007. – Vol. 27(10). – P. 3804-3816.
67. Chen, J. Computational Modeling of the Interplay between Cadherin-Mediated Cell Adhesion and Wnt Signaling Pathway. / J. Chen, Z-R. Xie, Y. Wu // *PLoS ONE*. – 2014. – Vol. 9(6). - e100702.
68. Chesire, D.R. β -Catenin signaling in prostate cancer: an early perspective. / D.R. Chesire, W.B. Isaacs // *Endocr. Relat. Cancer*. – 2003. – Vol. 10. – P. 537-560.
69. Choi, H.J. Thermodynamics of β -catenin-ligand interactions: the roles of the N- and C-terminal tails in modulating binding affinity. / H.J. Choi, A.H. Huber, W.I. Weis // *J. Biol. Chem*. – 2006. – Vol. 281. – P. 1027-1038.
70. Cibas, E.S. The Bethesda System for Reporting Thyroid Cytopathology / E.S. Cibas, S.Z. Ali // *Thyroid*. – 2009. – Vol. 19(11). – P. 1159-1165.
71. Ciruna, B. FGF signaling regulates mesoderm cell fate specification and morphogenetic movement at the primitive streak. / B. Ciruna, J. Rossant // *Dev Cell*. – 2001. – Vol. 1(1). – P. 37-49.

72. Clevers, H. Wnt/b-Catenin Signaling and Disease. / H. Clevers, R. Nusse // Cell. – 2012. – Vol. 149. – P. 1192-1205.
73. Clinical and pathological implications of concurrent autoimmune thyroid disorders and papillary thyroid cancer. / L.L. Cunha, R.C. Ferreira, M.A. Marcello et al. // Journal of Thyroid Research. – 2011. – Vol. 2011. - e387062.
74. Cloning and characterization of the human invasion suppressor gene E-cadherin (CDH1). / G. Berx, K. Staes, J. van Hengel et al. // Genomics. – 1995. – Vol. 26. – P. 281-289.
75. Comprehensive analysis of β -catenin target genes in colorectal carcinoma cell lines with deregulated Wnt/ β -catenin signaling. / A. Herbst, V. Jurinovic, S. Krebs et al. // BMC Genomics. – 2014. – Vol. 15. – P. 74-76.
76. Conformational changes of the recombinant extracellular domain of E-cadherin upon calcium binding / S. Pokutta, K. Herrenknecht, R. Kemler et al. // Eur J Biochem. 1994. – Vol. 223(3). – P. 1019-1026.
77. Constitutive activation of the Wnt signaling pathway by CTNNB1 (beta-catenin) mutations in a subset of human lung adenocarcinoma. / N. Sunaga, T. Kohno, F.T. Kolligs et al. // Genes Chromosomes Cancer. – 2001. – Vol. 30(3). – P. 316-321.
78. Control of b-catenin phosphorylation/degradation by a dual-kinase mechanism. / C. Liu, Y. Li, M. Semenov et al. // Cell. – 2002. – Vol. 108. – P. 837-847.
79. Cooperative interaction of MUC1 with the HGF/c-Met pathway during hepatocarcinogenesis. / Bozkaya G, Korhan P, Çokaklı M, et al. // Molecular Cancer. – 2012. – Vol. 11. – P. 64-67.
80. Cooperativity between trans and cis interactions in cadherin-mediated junction formation. / Y. Wu, X. Jin, O. Harrison et al. // Proc Natl Acad Sci U S A. – 2010. – Vol. 107. – P. 17592–17597.
81. Corrigendum: Global quantification of mammalian gene expression control. / B. Schwanhausser, D. Busse, N. Li et al. // Nature. - 2013. – Vol. 495(7439). – P. 126-127.

82. Cowin, P. Cadherins and catenins in breast cancer. / P. Cowin, T.M. Rowlands, S.J. Hatsell // *Current Opinion in Cell Biology*. – 2005. – Vol. 17. – N.5. – P. 499–508.
83. Cox, R.T. Armadillo is required for adherens junction assembly, cell polarity, and morphogenesis during *Drosophila* embryogenesis. / R.T. Cox, C. Kirkpatrick, M. Peifer // *J Cell Biol*. – 1996. – Vol. 134(1). – P. 133-148.
84. Crespo, P. Ras proteins in the control of the cell cycle and cell differentiation. / P. Crespo, J. Leon // *Cell Mol Life Sci*. – 2000. – Vol. 57. – P. 1613-1636.
85. Crosstalk between NF-kappaB and beta-catenin pathways in bacterial-colonized intestinal epithelial cells. / J. Sun, M.E. Hobert, Y. Duan et al. // *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. – 2005. – Vol. 289. - №1. – P. 129-137.
86. Crystal structure of a beta-catenin/Tcf complex. / T.A. Graham, C. Weaver, F. Mao et al. // *Cell*. – 2000. – Vol. 103. – P. 885–896.
87. Crystal Structure of a Full-Length β -Catenin. / Y. Xing, K.I. Takemaru, J. Liu et al. // *Structure*. – 2008. – Vol. 16. – P. 478–487.
88. Current view: intestinal stem cells and signaling. / D.H. Scoville, T. Sato, X.C. He et al. // *Gastroenterology*. – 2008. – Vol. 134. – P. 849-864.
89. Curtis, M.W. E-Cadherin/Catenin Complexes Are Formed Cotranslationally in the Endoplasmic Reticulum/Golgi Compartments. / M.W. Curtis, K.R. Johnson, M.J. Wheelock // *Cell Communication and Adhesion*. – 2008. – Vol. 15. – P. 365–378.
90. Cyclin D activates the Rb tumor suppressor by mono-phosphorylation. / A.M. Narasimha, M. Kaulich, G.S. Shapiro et al. // *ELife*. – 2014. – Vol. 3. - e02872.
91. Cyclin D1 in well differentiated thyroid tumour of uncertain malignant potential. / Lamba M. Saini, B. Weynand, J. Rahier et al. // *Diagnostic Pathology*. – 2015. – Vol. 10. – P. 32.
92. Cyclin D1 over-expression correlates with β -catenin activation, but not with H-ras mutations, and phosphorylation of Akt, GSK3 β and ERK1/2 in mouse hepatic carcinogenesis. / J. Gotoh, M. Obata, M. Yoshie et al. // *Carcinogenesis*. 2003. – Vol. 24(3). – P. 435-442.

93. Cyclin D1 protein expression in human thyroid gland and thyroid cancer. / L. Temmim, A.K. Ebraheem, H. Baker et al. // *Anat Histol Embryol.* – 2006. – Vol. 35(2). – P. 125-129.
94. Dailey, M.E. Relation of thyroid neoplasms to Hashimoto disease of the thyroid gland. / M.E. Dailey, S. Lindsay, R. Skahen // *A.M.A. Archives of Surgery.* – 1955. – Vol. 70. – P. 291–297.
95. Dang, C.V. MYC on the path to cancer. / C.V. Dang // *Cell.* – 2012. – Vol. 149(1). – P. 22–35.
96. Database for mRNA half-life of 19 977 genes obtained by DNA microarray analysis of pluripotent and differentiating mouse embryonic stem cells. / L.V. Sharova, A.A. Sharov, T. Nedorezov et al. // *DNA Res.* – 2009. – Vol. 16(1). – P. 45-58.
97. Deconstructing the cadherin-catenin-actin complex. / S. Yamada, S. Pokutta, F. Drees, W.I. Weis et al. // *Cell.* – 2005. – Vol. 123(5). – P. 889-901.
98. Defining stem cell dynamics in models of intestinal tumor initiation. / L. Vermeulen, E. Morrissey, M. van der Heijden et al. // *Science.* – 2013. – Vol. 342. – P. 995–998.
99. Defining the transcriptome and proteome in three functionally different human cell lines. / E. Lundberg, L. Fagerberg, D. Klevebring et al. // *Mol Syst Biol.* – 2010. – Vol. 6. – P. 450.
100. DeMay R.M. The art and science of cytopathology. / R.M. DeMay - Chicago:ASCP Press. – 1996. – pp 724-729.
101. Detection and analysis of β -catenin mutations in prostate cancer. / D.R. Chesire, C.M. Ewing, J. Sauvageot et al. // *Prostate.* – 2000. – Vol. 45. – P. 323–334.
102. Di Bisceglie, A.M. Hepatitis B And Hepatocellular Carcinoma. / A.M. Di Bisceglie, // *Hepatology (Baltimore, Md.).* - 2009. – Vol. 49(5). – P. 56–60.
103. Disruption of E-cadherin-mediated adhesion induces a functionally distinct pathway of dendritic cell maturation. / A. Jiang, O. Bloom, S. Ono et al. // *Immunity.* - 2007. – Vol. 27(4). – P. 610-624.

104. Dissection of the RET/beta-catenin interaction in the TPC1 thyroid cancer cell line. / C.J. Tartari, C. Donadoni, E. Manieri et al. // *Am. J. Cancer Res.* – 2011. – Vol. 1. – P. 716–725.
105. Distinct patterns of E-cadherin CpG island methylation in papillary, follicular, Hurthle's cell, and poorly differentiated human thyroid cancer. / J.R. Graff, V.E. Greenberg, J.G. Herman et al. // *Cancer Res.* – 1998. – Vol. 58. – P. 2063–2066.
106. Dynamic and Static Interactions between p120 Catenin and E-Cadherin Regulate the Stability of Cell-Cell Adhesion. / N. Ishiyama, S.H. Lee, S. Liu et al. // *Cell.* 2010 – Vol. 141. – P. 117–128.
107. Dynamics of cadherin/catenin complex-formation - novel protein interaction and pathway of complex assembly. / L. Hinck, I.S. Nathke, J. Papkoff et al. // *Journal of Cell Biology.* – 2004. – Vol. 125. – P. 1327–1340.
108. E-cadherin binding prevents beta-catenin nuclear localization and beta-catenin/LEF-1-mediated transactivation. / S. Orsulic, O. Huber, H. Aberle et al. // *J Cell Sci.* – 1999. – Vol. 112(8). – P. 1237-1245.
109. E-cadherin is required for caveolin-1-mediated down-regulation of the inhibitor of apoptosis protein survivin via reduced β -catenin-Tcf/Lef-dependent transcription. / V.A. Torres, J.C. Tapia, D.A. Rodriguez et al. // *Mol Cell Biol.* – 2007. – Vol. 27(21). – P. 7703-7717.
110. E-cadherin is the major mediator of human melanocyte adhesion to keratinocytes in vitro. / A. Tang, M.S. Eller, M. Hara et al. // *J Cell Sci* -1994. – Vol. 107. – P. 983–992.
111. E-Cadherin Methylation Status in Normal Thyroid tissue, Goiter and Papillary thyroid Cancer. / G. Werutsky, O.P. Júnior, C.P. Hors et al. // *Intl. Arch. Otorhinolaryngol.* – 2008. – Vol. 12. – N. 2. – P. 210-213.
112. E-cadherin: a differentiation marker in thyroid malignancies. / G. Brabant, C. Hoang-Vu, Y. Cetin et al. // *Cancer Res.* – 1993. – Vol. 53(20). – P. 4987-4993.
113. El Demellawy, D. Application of CD56, P63 and CK19 immunohistochemistry in the diagnosis of papillary carcinoma of the thyroid. / D. El Demellawy, A. Nasr, S. Alowami // *Diagnostic Pathology.* – 2008. – Vol. 3. – P. 3-5.

114. EpCAM nuclear localization identifies aggressive Thyroid Cancer and is a marker for poor prognosis / R. Ralhan, J. Cao, T. Lim et al. // *BMC Cancer* . – 2010. – Vol. 10. – P. 331.
115. Essential role of BCL9–2 in the switch between β -catenin's adhesive and transcriptional functions. / F.H. Brembeck, T. Schwarz-Romond, J. Bakkers et al. // *Genes Dev.* – 2004. – Vol. 18. – P. 2225–2230.
116. Expression and localization of E-cadherin and β -catenin in uterine carcinosarcoma. / I. Nishimura, Y. Ohishi, Y. Oda et al. // *Virchows Archiv.* 2011. – Vol. 458(1). – P. 85-94.
117. Expression of beta-catenin in hepatocellular carcinoma. / L.T. Tien, M. Ito, M. Nakao et al. // *World J Gastroenterol.* – 2005. – Vol. 11(16). P. 2398-2401.
118. Expression of epithelial-mesenchymal transition regulators SNAI2 and TWIST1 in thyroid carcinomas. / D. Buehler, H. Hardin, W. Shan et al. // *Mod Pathol.* – 2013. – Vol. 26(1). – P. 54-61.
119. Fibromatosis of the breast and mutations involving the APC/beta-catenin pathway. / S.C. Abraham, C. Reynolds, J.H. Lee et al. // *Hum Pathol.* – 2002. – Vol. 33. – P. 39–46.
120. Fine needle aspiration cytology of Hashimoto's thyroiditis—a diagnostic pitfall with review of literature. / B.N. Gayathri, R. Kalyani, M.L. Harendra Kumar et al. // *Journal of Cytology.* – 2011. – Vol. 28. – N.4. – P. 210-213.
121. Fine needle aspiration cytology of thyroid nodule(s); a Nigerian tertiary hospital experience. / H.A. Nggada, A.B. Musa, B.M. Gali et al. // *Internet J Pathol.* – 2006. – Vol.5. – P.1-7.
122. Follicular thyroid carcinoma: histology and prognosis. / A. D'Avanzo, P. Treseler, P.H. Ituarte et al. // *Cancer.* – 2004. – Vol. 100(6). – P. 1123-1129.
123. Foulkes, W.D. Triple-negative breast cancer. / W.D. Foulkes, I.E. Smith, J.S. Reis-Filho // *N Engl J Med.* – 2010. – Vol. 363. – P. 1938–1948.
124. Franz, C.M. p120 catenin associates with microtubules: inverse relationship between microtubule binding and Rho GTPase regulation. / C.M. Franz, A.J. Ridley // *J. Biol. Chem.* – 2004. – Vol. 279. – P. 6588–6594.

125. Freeman, H.J. Colorectal cancer risk in Crohn's disease. / H.J. Freeman // *World Journal of Gastroenterology : WJG.* – 2008. – Vol. 14(12). – P. 1810–1811.
126. Friedl, P. Cancer invasion and the microenvironment: plasticity and reciprocity. / P. Friedl, S. Alexander // *Cell.* – 2011. – Vol. 147(5). – P. 992-1009.
127. Functional interaction of β -catenin with the transcription factor LEF-1. / J. Behrens, J.P. von Kries, M. Kuhl et al. // *Nature.* – 1996. – Vol. 382. – P. 638–642.
128. Gates, J. Can 1000 reviews be wrong? Actin, alpha-Catenin, and adherens junctions. / J. Gates, M. Peifer // *Cell.* – 2005. – Vol. 123. – P. 769–772.
129. Genetic alteration of the beta-catenin gene (CTNNB1) in human lung cancer and malignant mesothelioma and identification of a new 3p21.3 homozygous deletion. / K. Shigemitsu, Y. Sekido, N. Usami et al. // *Oncogene.* – 2001. – Vol. 20(31). – P. 4249-4257.
130. Genetic changes of Wnt pathway genes are common events in metaplastic carcinomas of the breast. / M.J. Hayes, D. Thomas, A. Emmons et al. // *Clin Cancer Res.* – 2008. – Vol. 14. – P. 4038–4044.
131. Gentile, A. The Met tyrosine kinase receptor in development and cancer. / A. Gentile, L. Trusolino, P.M. Comoglio // *Cancer Metastasis Rev.* – 2008. – Vol. 27(1). – P. 85–94.
132. Global cancer statistics. / A. Jemal, F. Bray, M.M. Center et al. // *CA Cancer J Clin.* - 2011. – Vol. 61(2). – P.69-90.
133. Global quantification of mammalian gene expression control. / B. Schwanhausser, D. Busse, N. Li et al. // *Nature.* - 2011. – Vol. 473(7347). – P. 337-342.
134. Glycogen synthase kinase-3beta is tyrosinephosphorylated by MEK1 in human skin fibroblasts. / F. Takahashi-Yanaga, F. Shiraishi, M. Hirata et al. // *Biochem Biophys Res Commun.* – 2004. – Vol. 316(2). – P. 411–415.
135. Gottardi, C.J. Distinct molecular forms of β -catenin are targeted to adhesive or transcriptional complexes. / C.J. Gottardi, B.M. Gumbiner // *J. Cell Biol.* – 2004. – Vol. 167. – P. 339–349.

136. Gottardi, C.J. E-cadherin suppresses cellular transformation by inhibiting beta-catenin signaling in an adhesion-independent manner. / C.J. Gottardi, E. Wong, B.M. Gumbiner // *J Cell Biol.* – 2001. – Vol. 153(5). – P. 1049-1059.
137. Gustafson, B. Cytokines Promote Wnt Signaling and Inflammation and Impair the Normal Differentiation and Lipid Accumulation in 3T3-L1 Preadipocytes. / B. Gustafson, U. Smith // *J Biol Chem.* – 2006. – Vol. 281. – №14. – P. 9507-9516.
138. Halbleib, J.M. Cadherins in development: cell adhesion, sorting, and tissue morphogenesis / J.M. Halbleib, W.J. Nelson // *Genes Dev.* – 2006. – Vol. 20(3). – P. 199-214.
139. Hanahan, D. Hallmarks of cancer: the next generation. / D. Hanahan, R.A. Weinberg // *Cell.* – 2011. – Vol. 144. – P. 646-674.
140. Hartsock, A. Adherens and tight junctions: Structure, function and connections to the actin cytoskeleton / A. Hartsock, W.J. Nelson // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2008. – Vol. 1778. – P. 660-669.
141. Hatzfeld, M. Plakophilins: Multifunctional proteins or just regulators of desmosomal adhesion? / M. Hatzfeld // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2007. – Vol. 1773. – P. 69-77.
142. Hatzfeld, M. The p120 family of cell adhesion molecules. / M. Hatzfeld // *Eur J Cell Biol.* – 2005. – Vol. 84(2-3). – P. 205-214.
143. Hepatocyte growth factor induces Wnt-independent nuclear translocation of beta-catenin after Met-beta-catenin dissociation in hepatocytes. / S.P. Monga, W.M. Mars, P. Pediaditakis et al. // *Cancer Res.* – 2002. – Vol. 62(7). – P. 2064-2071.
144. Hepatocyte growth factor induces Wnt-independent nuclear translocation of β -catenin after Met- β -catenin dissociation in hepatocytes. / S.P. Monga, W.M. Mars, P. Pediaditakis et al. // *Cancer Res.* – 2007. – Vol. 62. – P. 2064-2071.
145. High prevalence of BRAF gene mutation in papillary thyroid carcinomas and thyroid tumor cell lines. / X. Xu, R.M. Quiros, P. Gattuso et al. // *Cancer Res.* – 2003. – Vol. 63. – P. 4561-4567.

146. Hong, S. Spontaneous assembly and active disassembly balance adherens junction homeostasis. / S. Hong, R.B. Troyanovsky, S.M. Troyanovsky // PNAS. - 2010. – Vol. 107. – P. 3528–3533.
147. Howell, G.M. RAS Mutations in Thyroid Cancer. / G.M. Howell, S.P. Hodak, L. Yip // The Oncologist. – 2013. – Vol. 18(8). – P. 926-932.
148. Huber, A.H. The structure of the b-catenin/E-cadherin complex and the molecular basis of diverse ligand recognition by b-catenin. / A.H. Huber, W.I. Weis // Cell. – 2001. – Vol. 105. – P. 391-402.
149. Huber, A.H. Three-dimensional structure of the armadillo repeat region of beta-catenin. / A.H. Huber, W.J. Nelson, W.I. Weis // Cell. – 1997. – Vol. 90. – P. 871–882.
150. Hulpiau, P. Molecular evolution of the cadherin superfamily / P. Hulpiau, F. van Roy // Int J Biochem Cell Biol. – 2009. – Vol. 41(2). – P. 349-369.
151. Hur, J. Multitasking β -catenin: from adhesion and transcription to RNA regulation. / J. Hur, S. Jeong // Animal Cells Syst. – 2013. – Vol. 17(5). – P. 299-305.
152. Identification of a cadherin cell adhesion recognition sequence. / O.W. Blaschuk, R. Sullivan, S. David et al. // Dev Biol. – 1990. – Vol. 139. – P. 227-229.
153. Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. / T.C. He, A.B. Sparks, C. Rago et al. // Science. – 1998. – Vol. 281(5382). – P. 1509-1512.
154. Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. / T.C. He, A.B. Sparks, C. Rago et al. // Science. – 1998. – Vol. 281. – N. 5382. – P. 1509–1512.
155. Identification of the hepatocyte growth factor receptor as the c-met proto-oncogene product. / D.P. Bottaro, J.S. Rubin, D.L. Faletto et al. // Science. – 1991. – Vol. 251(4995). – P. 802–804.
156. Immunohistochemical and sequencing analyses of the Wnt signaling components in Japanese anaplastic thyroid cancers. / T. Kurihara, S. Ikeda, Y. Ishizaki et al. // Thyroid. – 2004. – Vol. 14. – P. 1020–1029.
157. Immunohistochemical expression of HBME-1, E-cadherin, and CD56 in the differential diagnosis of thyroid nodules. / A. Ozolins, Z. Narbutis, I. Strumfa et al. // Medicina (Kaunas). – 2012. – Vol. 48(10). – P. 507-514.

158. Immunohistological evidence for Wnt-signaling activation in Peutz-Jeghers polyposis. / W. Chaiyapan, S. Sangkhathat, S. Kannurn et al. // *Pediatr Surg Int.* – 2010. – Vol. 26(2). – P. 173-177.
159. In vivo analysis of formation and endocytosis of the Wnt/ β -Catenin signaling complex in zebrafish embryos. / A.I.H. Hagemann, J. Kurz, S. Kauffeld et al. // *J. Cell Sci.* – 2014. – Vol. 127. – P. 3970–3982.
160. Increased beta-catenin mRNA levels and mutational alterations of the APC and beta-catenin gene are present in intestinal-type gastric cancer. / M.P. Ebert, G. Fei, S. Kahmann et al. // *Carcinogenesis.* – 2002. – Vol. 23(1). – P. 87-91.
161. Inhibition of androgen receptor and β -catenin activity in prostate cancer. / Lee E., Madar A., David G. et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2013. – Vol. 110(39). – P. 15710-15715.
162. Integrated genomic and proteomic analyses of gene expression in Mammalian cells. / Q. Tian, S.B. Stepaniants, M. Mao et al. // *Mol Cell Proteomics.* - 2004. – Vol. 3(10). – P. 960-969.
163. International patterns and trends in thyroid cancer incidence, 1973–2002 // B.A. Kilfoy, T. Zheng, T.R. Holford et al. // *Cancer Causes and Control.* – 2009. - Vol. 20, N5. – P. 525–531.
164. ITF-2, a downstream target of the Wnt/TCF pathway, is activated in human cancers with beta-catenin defects and promotes neoplastic transformation. / F.T. Kolligs, M.T. Nieman, I. Winer et al. // *Cancer Cell.* – 2002. – Vol. 1(2). – P. 145-155.
165. Jhiang, S.M. The RET proto-oncogene in human cancers. / S.M. Jhiang // *Oncogene.* – 2000. – Vol. 19(49). – P. 5590–5597.
166. Junghans, D. Mammalian cadherins and protocadherins: about cell death, synapses and processing. / D. Junghans, I.G. Haas, R. Kemler, // *Current Opinion in Cell Biology.* – 2005. – Vol. 17. – N.5. – P. 446–452.
167. Kikuchi, A. Regulation of Wnt signaling by protein-protein interaction and posttranslational modifications. / A. Kikuchi, S. Kishida, H. Yamamoto // *Exp. Mol. Med.* – 2006. – Vol. 38. – P. 1-10.

168. Kim, I. HuR represses Wnt/ β -catenin-mediated transcriptional activity by promoting cytoplasmic localization of β -catenin. / I. Kim, J. Hur, S. Jeong // *Biochem Biophys Res Commun.* – 2015. – Vol. 457(1). – P. 65-70.
169. Kimelman, D. b-Catenin destruction complex: insights and questions from a structural perspective. / D. Kimelman, W. Xu // *Oncogene.* – 2006. – Vol. 25. – P. 7482-7491.
170. King, T.D. The Wnt/beta-catenin signaling pathway: a potential therapeutic target in the treatment of triple negative breast cancer. / T.D. King, M.J. Suto, Y. Li // *J Cell Biochem.* – 2012. – Vol. 113. – P. 13–18.
171. Kocjan G. Lymphoid Infiltrate. In: Schroder G, editor. *Fine needle aspiration cytology: diagnostic principles and dilemmas.* / Kocjan G. - 1st ed. Germany: Springer. - 2006. - pp. 99–101.
172. Kondo, T. Pathogenetic mechanisms in thyroid follicular-cell neoplasia. / T. Kondo, S. Ezzat, S.L. Asa // *Nat Rev Cancer.* – 2006. – Vol. 6. – P. 292-306.
173. Kumarasinghe, M.P. Pitfalls in cytological diagnosis of autoimmune thyroiditis. / M.P. Kumarasinghe, S. De Silva // *Pathology.* – 1999. – Vol. 31(1). – P. 1-7.
174. Kypta, R.M. Wnt/ β -catenin signalling in prostate cancer. / R.M. Kypta, J. Waxman // *Nat Rev Urol.* – 2012. – Vol. 9(8). – P. 418-428.
175. Lade, A.G. Beta-catenin signaling in hepatic development and progenitors: which way does the WNT blow? / A.G. Lade, S.P.S. Monga // *Dev Dyn.* – 2011. – Vol. 240(3). – P. 486-500.
176. Lam, K. Y. High prevalence of RET proto-oncogene activation (RET/PTC) in papillary thyroid carcinomas / K.Y. Lam, C.Y. Lo, P.S. Leung // *Eur. J. Endocrinol.* – 2002. – Vol. 147. – P. 741-745.
177. Leckband, D. Mechanism of homophilic cadherin adhesion. / D. Leckband, S. Sivasankar // *Curr Opin Cell Biol.* – 2000. – Vol. 12(5). – P. 587-592.
178. Lee, H.C. Wnt/Frizzled signaling in hepatocellular carcinoma. / H.C. Lee, M. Kim, J.R. Wands // *Front Biosci.* – 2006. – Vol. 11. – P. 1901–1915.

179. Lien, W-H. Wnt some lose some: transcriptional governance of stem cells by Wnt/ β -catenin signaling. / W-H. Lien, E. Fuchs // *Genes & Dev.* – 2014. – Vol. 28. – P. 1517-1532.
180. Lin, R.Y. Thyroid cancer stem cells. / R.Y. Lin // *Nat Rev Endocrinol.* – 2011. – Vol. 7(10). – P. 609-616.
181. Links between signal transduction, transcription and adhesion in epithelial bud development. / Jamora C., DasGupta R., Kocieniewski P. et al. // *Nature.* – 2003. – Vol. 422(6929). – P. 317-322.
182. Lithium stimulates proliferation in cultured thyrocytes by activating Wnt/beta-catenin signalling. / A.S. Rao, N. Kremenevskaja, J. Resch et al. // *Eur. J. Endocrinol.* – 2005. – Vol. 153. – P. 929-938.
183. LiVolsi, V.A. Papillary thyroid carcinoma: an update. / V.A. LiVolsi // *Mod Pathol.* – 2011. – Vol. 2. – P. 1-9.
184. Lonergan, P.E. Androgen receptor signaling in prostate cancer development and progression. / P.E. Lonergan, D.J. Tindall // *J. Carcinog.* – 2011. – Vol. 10. – P. 20-25.
185. Loss of cell-adhesion molecule complexes in solid pseudopapillary tumor of pancreas. / W.W. Tang, A.A. Stelter, S. French et al. // *Mod Pathol.* – 2007. – Vol. 20. – P. 509–513.
186. Loss of E-cadherin promotes ovarian cancer metastasis via alpha 5-integrin, which is a therapeutic target. / K. Sawada, A.K. Mitra, A.R. Radjabi et al. // *Cancer Res.* – 2008. – Vol. 68. - P. 2329–2339.
187. Lower levels of nuclear β -catenin predict for a poorer prognosis in localized prostate cancer. / L.G. Horvath, S.M. Henshall, C.S. Lee et al. // *Int. J. Cancer.* – 2005. – Vol. 113. – P. 415–422.
188. Luebeck, E.G. Multistage carcinogenesis and the incidence of colorectal cancer. / E.G. Luebeck, S.H. Moolgavkar // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 2002. – Vol. 99. P. 15095–15100.
189. Luscher, B. MAD1 and its life as a MYC antagonist: an update. / B. Luscher // *Eur. J. Cell. Biol.* – 2012. – Vol. 91(6–7). – P. 506–514.

190. Luscher, B. Regulation of gene transcription by the oncoprotein MYC. / B. Luscher, J. Vervoorts // *Gene*. – 2012. – Vol. 494(2). – P. 145–160.
191. Lymphocytic Thyroiditis—is cytological grading significant? A correlation of grades with clinical, biochemical, ltrasonographic and radionuclide parameters. / A. Bhatia, A. Rajwanshi, R.J. Dash et al. // *CytoJournal*. – 2007. – Vol. 4. – P. 10-14.
192. Maia, F.F.R. Thyroid nodule management: clinical, ultrasound and cytopathological parameters for predicting malignancy. / F.F.R. Maia, D.E. Zantut-Wittmann // *Clinics*. – 2012. – Vol. 67(8). – P. 945-954.
193. Maiden, S.L. The secret life of β -catenin: Moonlighting in morphogenesis. / S.L. Maiden, J. Hardin // *J. Cell Biol.* – 2010. – Vol. 195. – №4. – P. 543–552.
194. Matrix metalloproteinases in tumorigenesis: An evolving paradigm. / H. Hua, M. Li, T. Luo et al. // *Cell. Mol. Life Sci.* – 2011. – Vol. 68. – P. 3853–3868.
195. McCrea, P.D. The catenin family at a glance / P.D. McCrea, D. Gu // *J. Cell Sci.* – 2010. – Vol. 123. – P. 637-642.
196. McLeod, D.S.A. The incidence and prevalence of thyroid autoimmunity. / D.S.A. McLeod, D.S. Cooper // *Endocrine*. – 2012. – Vol. 42(2). – P. 252-265.
197. Mechanisms of RAS/ β -catenin interactions. / E. Zeller, K. Hammer, M. Kirschnick // *Arch Toxicol.* – 2013. – Vol. 87. – P. 611-632.
198. Mercer, K.E. Raf proteins and cancer: B-Raf is identified as a mutational target. / K.E. Mercer, C.A. Pritchard // *Biochim Biophys Acta*. – 2003. – Vol. 1653. – P. 25-40.
199. MET receptor tyrosine kinase sequence alterations in differentiated thyroid carcinoma. / V.M. Wasenius, S. Hemmer, M.L. Karjalainen-Lindsberg et al. // *Am J Surg Pathol*. – 2005. – Vol. 29(4). – P. 544-549.
200. Met, metastasis, motility and more. / C. Birchmeier, W. Birchmeier, E. Gherardi et al. // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* – 2003. – Vol. 4(12). – P. 915–925.
201. Meyer, N. Reflecting on 25 years with MYC. / N. Meyer, L.Z. Penn // *Nat. Rev. Cancer*. – 2008. – Vol. 8(12). – P. 976–990.

202. Meza, R. Multistage carcinogenesis and the incidence of thyroid cancer in the US by sex, race, stage and histology. / R. Meza, J.T. Chang // *BMC Public Health*. – 2015. – Vol. 15. – P. 1.
203. Molecular testing for mutations in improving the fine-needle aspiration diagnosis of thyroid nodules. / Y.E. Nikiforov, D.L. Steward, T.M. Robinson-Smith et al. // *J Clin Endocrinol Metab*. – 2009. – Vol. 94(6). – P. 2092-2098.
204. Monga, S.P. β -Catenin Signaling and Roles in Liver Homeostasis, Injury, and Tumorigenesis. / S.P. Monga // *Gastroenterology*. – 2015. – Vol. 148(7). – P. 1294-1310.
205. Moolgavkar, S.H. Multistage carcinogenesis and the incidence of human cancer. / S.H. Moolgavkar, E.G. Luebeck // *Genes, Chromosomes Cancer*. – 2003. – Vol. 38. – P. 302–306.
206. Morin, P.J. b-catenin signaling and cancer. / P.J. Morin // *BioEssays*. – 1999. – Vol. 21. P. 1021-1030.
207. mRNA stability and the control of gene expression: implications for human disease. / E.M. Hollams, K.M. Giles, A.M. Thomson et al. // *Neurochem Res*. – 2002. – Vol. 27(10). – P. 957-980.
208. Munz, M. The emerging role of EpCAM in cancer and stem cell signaling / M. Munz, P.A. Baeuerle, O. Gires // *Cancer Res*. – 2009. – Vol. 69. – P. 5627-5629.
209. Mutant E-cadherin breast cancer cells do not display constitutive Wnt signaling. / van de M. Wetering, N. Barker, I.C. Harkes et al. // *Cancer Res*. – 2001. – Vol. 61(1). – P. 278-284.
210. Mutations in the AXIN1 gene in advanced prostate cancer. / G.W. Yardy, D.C. Bicknell, J.L. Wilding et al. // *Eur. Urol*. – 2009. – Vol. 56. – P. 486–494.
211. Mutations of chromosome 5q21 gene in FAP and colorectal cancer patients. / I. Nishisho, Y. Nakamura, Y. Miyoshi et al. // *Science*. – 1991. – Vol. 253. - P. 665-669.
212. Myc targets Cks1 to provoke the suppression of p27Kip1, proliferation and lymphoma agenesis. / U.B. Keller, J.B. Old, F.C. Dorsey et al. // *EMBO. J*. – 2007. – Vol. 26(10). – P. 2562–2574.

213. Nejak-Bowen, K.N. Beta-catenin signaling, liver regeneration and hepatocellular cancer: sorting the good from the bad. / K.N. Nejak-Bowen, S.P. Monga // *Semin Cancer Biol.* – 2011. – Vol. 21(1). – P. 44-58.
214. Nelson, W.J. Convergence of Wnt, β -Catenin, and Cadherin Pathways / W.J. Nelson, R. Nusse // *Science.* – 2004. – Vol. 305. – P. 1483-1487.
215. Nieto, M.A. The Snail superfamily of zinc-finger transcription factors. / M.A. Nieto // *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* - 2002. – Vol. 3. – P. 155-166.
216. Nikiforov, Y.E. RET/PTC rearrangement in thyroid tumors. / Y.E. Nikiforov // *Endocrine Pathology.* – 2002. – Vol. 13. – P. 3–16.
217. Nikiforov, Y.E. The molecular pathways induced by radiation and leading to thyroid carcinogenesis / Y.E. Nikiforov // *Cancer Treat. Res.* – 2004. – Vol. 122. – P. 191-206.
218. Nollet, F. Phylogenetic analysis of the cadherin superfamily allows identification of six major subfamilies besides several solitary members. / F. Nollet, P. Kools, F. van Roy // *J Mol Biol.* – 2000. – Vol. 299. – P. 551-572.
219. Normal vs cancer thyroid stem cells: the road to transformation. / M. Zane., E. Scavo., V. Catalano et al. // *Oncogene.* – 2016. – Vol. 35(7). – P. 805-815.
220. Nuclear beta-catenin induces an early liver progenitor phenotype in hepatocellular carcinoma and promotes tumor recurrence. / G. Zulehner, M. Mikula, D. Schneller et al. // *Am J Pathol.* – 2010. – Vol. 176. – P. 472–481.
221. Nuclear translocation of β -Catenin during mesenchymal stem cells differentiation into hepatocytes is associated with a tumoral phenotype. / C. Herencia, M. Julio, M. Moreno et al. // *PLoS ONE.* – 2012. – Vol. 7. - e34656.
222. Nuclear translocation of beta-catenin in colorectal cancer. / M. Kobayashi, T. Honma, Y. Matsuda et al. // *Br J Cancer.* – 2000. – Vol. 82(10). – P. 1689-1693.
223. Ogou, S.I. Calcium-dependent cell-cell adhesion molecules common to hepatocytes and teratocarcinoma stem cells. / S.I. Ogou, C. Yoshida-Noro, M. Takeichi // *J Cell Biol.* – 1983. – Vol. 97. – P. 944-948.

224. Ohkubo, T. The transcription factor Snail downregulates the tight junction components independently of E-cadherin downregulation. / T. Ohkubo, M. Ozawa // *J Cell Sci.* – 2004. – Vol. 117(9). – P. 1675-1685.
225. Oncogenic K-ras stimulates Wnt signaling in colon cancer through inhibition of GSK-3beta. / J. Li, Y. Mizukami, X. Zhang et al. // *Gastroenterology.* – 2003. – Vol. 128(7). – P. 1907–1918.
226. Overexpression of cadherins and underexpression of beta-catenin inhibit dorsal mesoderm induction in early *Xenopus* embryos. / J. Heasman, A. Crawford, K. Goldstone et al. // *Cell.* – 1994. – Vol. 79(5). – P. 791-803.
227. Overview of cyclins D1 function in cancer and the CDK inhibitor landscape: past and present. / M.C. Casimiro, M. Velasco-Velázquez, C. Aguirre-Alvarado et al. // *Expert Opin Investig Drugs.* – 2014. – Vol. 23(3). – P. 295-304.
228. Ozawa, M. The cytoplasmic domain of the cell adhesion molecular uvomorulin associates with three independent proteins structurally related in different species / M. Ozawa, H. Baribault, R. Kemler // *EMBO J.* – 1989. – Vol. 8. – P. 1711-1717.
229. Palacios, J. Mutations in the beta-catenin gene (CTNNB1) in endometrioid ovarian carcinomas. / J. Palacios, C. Gamallo // *Cancer Res.* – 1998. – Vol. 58. – P. 1344–1347.
230. Papanicolaou, G.N. A new procedure for staining vaginal smears / G.N. Papanicolaou // *Science.* – 1942. – Vol. 95. – P. 438-439.
231. Papillary Thyroid Carcinoma: Differential Diagnosis and Prognostic Values of Its Different Variants: Review of the Literature. / R. Gonzalez-Gonzalez, R. Bologna-Molina, R.G. Carreon-Burciaga et al. // *ISRN Oncology.* – 2011. – Vol. 2011. - e915925.
232. Parameswaran, R. Molecular pathogenesis of follicular cell derived thyroid cancers. / R. Parameswaran, S. Brooks, G.P. Sadler // *Int J Surg.* – 2010. – Vol. 8(3). – P. 186-193.
233. Pax-8 protein levels regulate thyroglobulin gene expression. / Fabbro, D., Pellizzari, L., Mercuri, F. et al. // *J Mol Endocrinol.* – 1998. – Vol. 21. – P. 347-354.

234. PAX8-PPARgamma rearrangement in thyroid tumors: RT-PCR and immunohisto-chemical analyses. / M.N. Nikiforova, P.W. Bid-dinger, C.M. Caudill et al. // *Am. J. Surg. Pathol.* - 2002. - Vol. 26. - P. 1016–1023.
235. PAX8-PPARgamma1 fusion oncogene in human thyroid carcinoma. / T.G. Kroll, P. Sarraf, L. Pecciarini et al. // *Science.* - 2000. - Vol. 289. - P. 1357–1360.
236. Polakis, P. Wnt signaling and cancer. / P. Polakis // *Genes Dev.* – 2000. – Vol. 14. – P. 1837-1851.
237. Polyak, K. Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits. / K. Polyak, R.A. Weinberg // *Nature Reviews Cancer.* – 2009. – Vol. 9. – N. 4. – P. 265–273.
238. Positive association of up-regulated Cripto-1 and down-regulated E-cadherin with tumour progression and poor prognosis in gastric cancer. / X.Y. Zhong, L.H. Zhang, S.Q. Jia et al. // *Histopathology.* – 2008. – Vol. 52. – P. 560–568.
239. Prasad, C.P. Therapy for BRAFi-Resistant Melanomas: Is WNT5A the Answer? / C.P. Prasad, P. Mohapatra, T. Andersson // *Cancers.* – 2015. – Vol. 7(3). - P. 1900-1924.
240. Principles of E-Cadherin Supramolecular Organization In Vivo. / B.A.T. Quang, M. Mani, O. Markova et al. // *Current Biology.* – 2013. – Vol. 23. – P. 2197–2207.
241. Progression of carcinoma cells is associated with alterations in chromatin structure and factor binding at the E-cadherin promoter in vivo. / Hennig G., Behrens J., Truss M. et al. // *Oncogene.* – 1995. – Vol. 11(3). – P. 475-484.
242. Ravinsky, E. Fine-needle aspirates of follicular lesions of the thyroid gland. The intermediate-type smear. / E. Ravinsky, J.R. Safneck // *Acta Cytol.* – 1990. – Vol. 34. – P. 813– 820.
243. Real-time quantitative analysis of E-cadherin expression in ret/PTC-1-activated thyroid neoplasms. / P. Smyth, O. Sheils, S. Finn et al. // *Int J Surg Pathol.* – 2001. – Vol. 9(4). – P. 265-272.

244. Retinoblastoma protein contains a C-terminal motif that targets it for phosphorylation by cyclin-cdk complexes. / P.D. Adams, X. Li, W.R. Sellers et al. // *Molecular and Cellular Biology*. – 1999. – Vol. 19. – P. 1068–1080.
245. RHOA inactivation enhances Wnt signalling and promotes colorectal cancer. / P. Rodrigues, I. Macaya, S. Bazzocco et al. // *Nat. Commun.* – 2014. – Vol. 5. – P. 5458-5461.
246. Rimm, D.L. Molecular cloning of human E-cadherin suggests a novel subdivision of the cadherin superfamily / D.L. Rimm, J.S. Morrow // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1994. – Vol. 200. – P. 1754-1761.
247. Roy, S. Signaling in colon cancer stem cells. / S. Roy, A.P.N. Majumdar // *J. Molecular Signaling*. – 2012. – Vol. 7. P. 11.
248. Ryan, K. Finishing Touches: Post-Translational Modification of Protein Factors Involved in Mammalian pre-mRNA 3' End Formation. / K. Ryan, D.L.V. Bauer // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* – 2008. – Vol. 40(11). – P. 2384-2396.
249. Sadow, P.M. Update on clinically important variants of papillary thyroid carcinoma. / P.M. Sadow, J.L. Hunt // *Diagnostic Histopathology*. – 2011. – Vol. 17. – N. 3. – P. 106-113.
250. Said, A.H. The role of matrix metalloproteinases in colorectal cancer. / A.H. Said, J-P. Raufman, G. Xie // *Cancers*. – 2014. – Vol. 6(1). – P. 366-375.
251. Salmonella regulation of intestinal stem cells through the Wnt/ β -catenin pathway. / X. Liu, R. Lu, S. Wu et al. // *FEBS Lett.* – 2010. – Vol. 584. – №5. P. 911-916.
252. Sanson, B. Uncoupling cadherin-based adhesion from wingless signalling in *Drosophila*. / B. Sanson, P. White, J.P. Vincent // *Nature*. – 1996. – Vol. 383(6601). – P. 627-630.
253. Santoro, M. RET/PTC activation in papillary thyroid carcinoma: European Journal of Endocrinology Prize Lecture. / M. Santoro, R.M. Melillo, A. Fusco // *Eur J Endocrinol.* – 2006. – Vol.155(5). – P. 645–653.
254. Sastre-Perona, A. Role of the Wnt pathway in thyroid cancer. / A. Sastre-Perona, P. Santisteban // *Front. Endocrinol.* – 2012. – Vol. 3. – P. 31-37.

255. Sastre-Perona, A. Wnt-independent role of β -catenin in thyroid cell proliferation and differentiation. / A. Sastre-Perona, P. Santisteban // *Mol Endocrinol.* – 2014. – Vol. 28(5). – P. 681-695.
256. Schiffman, M. Human papillomavirus (HPV) infection and the multi-stage carcinogenesis of cervical cancer. / M. Schiffman, N. Wentzensen // *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* – 2013. – Vol. 22(4). – P. 553-560.
257. Schmelzer, E. EpCAM expression in normal, non-pathological tissues / E. Schmelzer, L.M. Reid // *Frontiers in Bioscience.* – 2008. – Vol. 13. – P. 3096-3100.
258. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2006, National Cancer Institute. / M.J. Horner, L.A.G. Ries, M. Krapcho et al. - Bethesda, MD. – 2010. – P. 457.
259. Sequence signatures and mRNA concentration can explain two-thirds of protein abundance variation in a human cell line. / C. Vogel, S. Abreu Rde, D. Ko et al. // *Mol Syst Biol.* – 2010. – Vol. 6. – P. 400-405.
260. Shapiro, L. Structure and biochemistry of cadherins and catenins. / L. Shapiro, W.I. Weis // *Cold Spring Harb Perspect Biol.* – 2009. – Vol. 1: a003053.
261. Sherr, C.J. Living with or without cyclins and cyclin-dependent kinases. / C.J. Sherr, J.M. Roberts // *Genes Dev.* – 2004. – Vol. 18. – P. 2699–2711.
262. Significance of eosinophils in diagnosing Hashimoto's thyroiditis on fine-needle aspiration cytology. / M. Ekambaram, B. Kumar, N. Chowdhary et al. // *Indian J Pathol Microbiol.* – 2010. – Vol. 53(3). – P. 476-479.
263. Silva-García, O. Wnt/ β -catenin signaling pathway controls the inflammatory response in infections caused by pathogenic bacteria. / O. Silva-García, J.J. Valdez-Alarcón, V.M. Baizabal-Aguirre // *Mediators Inflamm.* – 2014. – ID 310183. – P. 1-7.
264. Stabilization of beta-catenin induces pancreas tumor formation. / P.W. Heiser, D.A. Cano, L. Landsman et al. // *Gastroenterology.* – 2008. – Vol. 135. – P. 1288–1300.
265. Stamos, J.L. The β -Catenin Destruction Complex. / J.L. Stamos, W.I. Weis // *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology.* – 2013. – Vol. 5(1). - a007898.

266. Stem cell biology in thyroid cancer: Insights for novel therapies. / P. Bhatia, K. Tsumagari, Z.Y. Abd Elmageed et al. // *World Journal of Stem Cells*. – 2014. – Vol. 6(5). – P. 614–619.
267. Structural basis of cell-cell adhesion by cadherins. / L. Shapiro, A.M. Fannon, P.D. Kwong et al. // *Nature*. – 1995. – Vol. 374. – P. 327-337.
268. Structural studies of Wnts and identification of an LRP6 binding site. / M.L-H. Chu, V.E. Ahn, H-J. Choi et al. // *Structure (London, England : 1993)*. – 2013. – Vol. 21(7). – P. 1235-1242.
269. Suh, E.K. Translocation of beta-catenin into the nucleus independent of interactions with FG-rich nucleoporins. / E.K. Suh, B.M. Gumbiner // *Exp Cell Res*. – 2003. – Vol. 290(2). – P. 447-456.
270. Systematic Review of the Effects of Asbestos Exposure on the Risk of Cancer between Children and Adults. / D. Kang, M-S. Myung, Y-K. Kim et al. // *Ann Occup Environ Med*. – 2013. – Vol. 25. – P. 10.
271. Takano, T. Cancer-specific mRNAs in thyroid carcinomas: detection, use, and their implication in thyroid carcinogenesis. / T. Takano, N. Amino // *Endocr J*. – 2002. – Vol. 49. – P. 97-107.
272. Takano, T. Fetal cell carcinogenesis of the thyroid: a hypothesis for better understanding of gene expression profile and genomic alternation in thyroid carcinoma. / T. Takano // *Endocr J* 2004. – Vol. 51. – P. 509-515.
273. Takano, T. Fetal cell carcinogenesis of the thyroid: a modified theory based on recent evidence. / T. Takano // *Endocr J*. – 2014. – Vol. 61(4). P. 311-320.
274. Takano, T. Fetal cell carcinogenesis of the thyroid: theory and practice. / T. Takano // *Semin Cancer Biol* 2007. – Vol. 17. – P. 233-240.
275. Takano, T. Fetal cell carcinogenesis: a new hypothesis for better understanding of thyroid carcinoma. / T. Takano, N. Amino // *Thyroid*. - 2005. – Vol. 15. – P. 432-438.
276. Tallini, G. RET oncogene activation in papillary thyroid carcinoma. / G. Tallini, S.L. Asa // *Advances in Anatomic Pathology*. – 2001. – Vol. 8. – P. 345–354.

277. Tankyrase inhibitors attenuate WNT/ β -catenin signaling and inhibit growth of hepatocellular carcinoma cells. / L. Ma, W. Wei, M-S. Chua et al. // *Gastrointest Cancer*. – 2014. – Vol. 4. – P. 49–63.
278. Targeted BRAF Inhibition Impacts Survival in Melanoma Patients with High Levels of Wnt/ β -Catenin Signaling. / A.J. Chien, L.E. Haydu, T.L. Biechele et al. // *PLoS ONE*. – 2014. Vol. 9(4). - e94748.
279. Tetsu, O. β -Catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. / O. Tetsu, F. McCormick // *Nature*. – 1999. – Vol. 398. – P. 422–426.
280. The c-Cbl ubiquitin ligase regulates nuclear β -catenin and angiogenesis by its tyrosine phosphorylation mediated through the Wnt signaling pathway. / S. Shivanna, I. Harrold, M. Shashar et al. // *J Biol Chem*. – 2015. - doi: 10.1074/jbc.M114.616623.
281. The cyclin D1 gene is a target of the β -catenin/LEF-1 pathway. / M. Shtutman, J. Zhurinsky, I. Simcha et al. // *Proc Natl Acad Sci USA*. – 1999. – Vol. 96. – P. 5522–5527.
282. The cyclin D1 gene is a target of the β -catenin/Lef-1 pathway. / M. Shutman, J. Zhurinsky, I. Simcha et al. // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. – 1999. – Vol. 96. – P. 5522–5527.
283. The Extracellular Architecture of Adherens Junctions Revealed by Crystal Structures of Type I Cadherins. / O.J. Harrison, X. Jin, S. Hong et al. // *Structure*. – 2011. – Vol. 19. – P. 244–256.
284. The Max homodimeric b-HLH-LZ significantly interferes with the specific heterodimerization between the c-Myc and Max b-HLH-LZ in absence of DNA: a quantitative analysis. / F.O. McDuff, J.F. Naud, M. Montagne et al. // *J. Mol. Recognit*. – 2009. – Vol. 22(4). – P. 261–269.
285. The Prognostic Impact of Protein Expression of E-Cadherin-Catenin Complexes Differs between Rectal and Colon Carcinoma. / R. Aamodt, J. Bondi, S.N. Andersen et al. // *Gastroenterol Res Pract*. – 2010. - 616023.
286. The role of cell cycle regulatory protein, cyclin D1, in the progression of thyroid cancer. / S. Wang, R.V. Lloyd, M.J. Hutzler et al. // *Mod Pathol*. – 2000. – Vol. 13(8). – P. 882-887.

287. The transcription factor Snail controls epithelial-mesenchymal transition by repressing E-cadherin expression. / A. Cano, M.A. Pérez-Moreno, I. Rodrigo et al. // *Nat. Cell Biol.* – 2000. – Vol. 2. – P. 76-83.
288. The transcription factor Snail is a repressor for E-cadherin gene expression in epithelial tumor cells. / E. Batlle, E. Sancho, C. Franci et al. // *Nat. Cell Biol.* – 2000. – Vol. 2. – P. 84-89.
289. The value of frozen section in intraoperative surgical management of thyroid follicular carcinoma. / D. Dosen, M. Turic, J. Smalcelj et al. // *Head & Neck.* – 2003. – Vol. 25. – N. 7. – P. 521-528.
290. The Wnt pathway, epithelial-stromal interactions, and malignant progression in phyllodes tumours. / E.J. Sawyer, A.M. Hanby, A.J. Rowan et al. // *J Pathol.* – 2002. – Vol. 196. – P. 437–444.
291. The β -catenin Axis Integrates Multiple Signals Downstream From RET/PTC and Leads to Cell Proliferation. / M.D. Castellone, V. De Falco, D.M. Rao et al. // *Cancer research.* – 2009. – Vol. 69(5). – P. 1867-1876.
292. Thiery, J.P. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. / J.P. Thiery // *Nat Rev Cancer.* – 2002. – Vol. 2(6). – P. 442-454.
293. Thompson, M.D. WNT/beta-catenin signaling in liver health and disease. / M.D. Thompson, S.P. Monga // *Hepatology.* – 2007. – Vol. 45(5). – P. 1298-1305.
294. Thyroglobulin antibody is associated with increased cancer risk in thyroid nodules. / E.S. Kim, D.J. Lim, K.H. Baek et al. // *Thyroid.* – 2010. – Vol. 20(8). – P. 885-891.
295. Thyroid cancer and inflammation. / V. Guarino, M.D. Castellone, E. Avilla et al. // *Molecular and Cellular Endocrinology.* – 2010. – Vol. 321. – P. 94–102.
296. Thyroid follicular adenomas may display features of follicular carcinoma and follicular variant of papillary carcinoma. / V.V. Vasko, J. Gaudart, C. Allasia et al. // *Eur J Endocrinol.* – 2004. – Vol. 151. – N. 6. – P. 779-786.
297. Transforming binding affinities from three dimensions to two with application to cadherin clustering. / Y.H. Wu, J. Vendome, L. Shapiro et al. // *Nature.* 2011. – Vol. 475. – P. 510–U107.

298. Triple negative breast cancer: molecular profiling and prognostic impact in adjuvant anthracycline-treated patients. / D.S. Tan, C. Marchio, R.L. Jones et al. // *Breast Cancer Res Treat.* – 2008. – Vol. 111. – P. 27–44.
299. Troyanovsky, S. Cadherin dimers in cell-cell adhesion. / S. Troyanovsky // *Eur J Cell Biol.* – 2005. – Vol. 84(2-3). P. 225-233.
300. Update on Anaplastic Thyroid Carcinoma: Morphological, Molecular, and Genetic Features of the Most Aggressive Thyroid Cancer. / M. Ragazzi, A. Ciarrocchi, V. Sancisi et al. // *International Journal of Endocrinology.* – 2014. – Vol. 2014. - e790834.
301. Valenta, T. The many faces and functions of b-catenin. / T. Valenta, G. Hausmann, K. Basler // *EMBO J.* – 2012. Vol. 31. – P. 2714-2736.
302. Variable beta-catenin expression in colorectal cancers indicates tumor progression driven by the tumor environment. / T. Brabletz, A. Jung, S. Reu et al. // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 2001. – Vol. 98. – P. 10356–10361.
303. Veeman, M.T. A second canon. Functions and mechanisms of beta-catenin-independent Wnt signaling. / M.T. Veeman, J.D. Axelrod, R.T. Moon // *Dev Cell.* – 2003. – Vol. 5. – P. 367–377.
304. Verheyen, E.M. Regulation of Wnt/ β -catenin signaling by protein kinases. / E.M. Verheyen, C.J. Gottardi // *Dev. Dyn.* – 2010. – 2010. – Vol. 239. P. 34–44.
305. Vincan E. Wnt Signaling, Volume I: Pathway Methods and Mammalian Models. / E. Vincan, - 2008. - Vol. 468. – P. 91-98.
306. Voeller, H.J. β -catenin mutations in human prostate cancer. / H.J. Voeller, C.I. Truica, E.P. Gelmann // *Cancer Res.* – 1998. – Vol. 58. – P. 2520–2523.
307. Waisberg, J. Wnt-/ β -catenin pathway signaling in human hepatocellular carcinoma. / Waisberg J., Saba G.T. // *World Journal of Hepatology.* – 2015. – Vol. 7(26). – P. 2631-2635.
308. Weinstein, I.B. Disorders in cell circuitry during multistage carcinogenesis: the role of homeostasis. / I.B. Weinstein // *Carcinogenesis.* – 2000. – Vol. 21(5). – P. 857-864.

309. Welker, M.J. Thyroid nodules / M.J. Welker, D. Orlov // *Am Fam Physician*. – 2003. – Vol. 1:67(3). – P. 559-566.
310. Widelitz, R. Wnt signaling through canonical and non-canonical pathways: recent progress. / R. Widelitz // *Growth Factors*. – 2005. – Vol. 23(2). – P. 111-116.
311. Wilson J.D. The thyroid gland. *Williams Textbook of Endocrinology*. / J.D. Wilson, D.W. Foster - Harcourt Brace & Co, 8th ed. - 1992. – p. 732.
312. Wnt 2 inhibits enteric bacterial-induced inflammation in intestinal epithelial cells. / X. Liu, R. Lu, S. Wu et al. // *Inflamm Bowel Dis*. – 2012. – Vol. 18(3). – P. 418-429.
313. Wnt activity defines colon cancer stem cells and is regulated by the microenvironment. / L. Vermeulen, E. De Sousa, F. Melo et al. // *Nat Cell Biol*. – 2010. – Vol. 12(5). – P. 468-476.
314. Wnt induces LRP6 signalosomes and promotes dishevelled-dependent LRP6 phosphorylation. / J. Bilic, Y.L. Huang, G. Davidson et al. // *Science*. – 2007. – Vol. 316(5831). – P. 1619-1622.
315. Wnt signaling in macrophages: augmenting and inhibiting mycobacteria-induced inflammatory responses. / K. Schaale, J. Neumann, D. Schneider et al. // *Eur J Cell Biol*. – 2011. – Vol. 90(6). – P. 553-559.
316. Wnt signalling induces accumulation of phosphorylated β -catenin in two distinct cytosolic complexes. / J.P. Gerlach, B.L. Emmink, H. Nojima et al. // *Open Biol*. – 2014. – Vol. 4. – P. 140120.
317. Wnt/beta-catenin signaling and AXIN1 regulate apoptosis triggered by inhibition of the mutant kinase BRAFV600E in human melanoma. / T.L. Biechele, R.M. Kulikauskas, R.A. Toroni et al. // *Sci Signal*. – 2012. – Vol. 5(206). - ra3.
318. Wnt/beta-catenin signaling is required for development of the exocrine pancreas. / J.M. Wells, F. Esni, G.P. Boivin et al. // *BMC Dev Biol*. – 2007. – Vol. 12. – P. 4-7.
319. Wnt/ β -catenin signaling accelerates mouse lung tumorigenesis by imposing an embryonic distal progenitor phenotype on lung epithelium. / E.C. Pacheco-Pinedo,

- A.C. Durham, K.M. Stewart et al. // *J Clin Invest.* – 2011. – Vol. 121. – P. 1935–1945.
320. Wnt/ β -catenin Signaling in Normal and Cancer Stem Cells. / K.C. Valkenburg, C.R. Graveel, C.R. Zylstra-Diegel et al. // *Cancers.* – 2011. – Vol. 3. – P. 2050-2079.
321. Wnt/ β -catenin signaling pathway upregulates c-Myc expression to promote cell proliferation of P19 teratocarcinoma cells. / S. Zhang, Y. Li, Y. Wu et al. // *Anat Rec (Hoboken).* – 2012. – Vol. 295(12). – P. 2104-2113.
322. Worldwide Increasing Incidence of Thyroid Cancer: Update on Epidemiology and Risk Factors. / G. Pellegriti, F. Frasca, C. Regalbuto et al. // *Journal of Cancer Epidemiology.* – 2013. - 965212.
323. Wroblewski, L.E. Helicobacter pylori and Gastric Cancer: Factors That Modulate Disease Risk. / L.E. Wroblewski, R.M. Peek, K.T. Wilson // *Clinical Microbiology Reviews.* – 2010. – Vol. 23(4). – P. 713-739.
324. Xing, M. Molecular pathogenesis and mechanisms of thyroid cancer. / M. Xing // *Nature reviews Cancer.* – 2013. – Vol. 13(3). – P. 184-199.
325. Xu, W. Mechanistic insights from structural studies of β -catenin and its binding partners. / W. Xu, D. Kimelman // *J. Cell Sci.* – 2007. – Vol. 120. – P. 3337-3344.
326. Yagi, T. Cadherin superfamily genes: functions, genomic organization, and neurologic diversity / T. Yagi, M. Takeichi // *Genes Dev.* – 2000. – Vol. 14(10). – P. 1169-1180.
327. Yamada, Y. Multistep carcinogenesis of the colon in Apc(Min/+) mouse. / Y. Yamada, H. Mori // *Cancer Sci.* – 2007. – Vol. 98(1). – P. 6-10.
328. Yap, A.S. The morphogenetic role of cadherin cell adhesion molecules in human cancer: a thematic review. / A.S. Yap // *Cancer Investigation.* – 1998. - Vol. 16. – N. 4. – P. 252-261.
329. Yoshida-Noro, C. Molecular nature of the calcium-dependent cell-cell adhesion system in mouse teratocarcinoma and embryonic cells studied with a monoclonal antibody. / C. Yoshida-Noro, N. Suzuki, M. Takeichi // *Dev Biol.* – 1984. – Vol. 101. – P. 19-27.

330. β -Catenin Dysregulation in Thyroid Neoplasms : Down-Regulation, Aberrant Nuclear Expression, and CTNNB1 Exon 3 Mutations Are Markers for Aggressive Tumor Phenotypes and Poor Prognosis. / G. Garcia-Rostan, R.L. Camp, A. Herrero et al. // *Am J Pathol.* – 2001. – Vol. 158(3). – P. 987-996.
331. β -Catenin Is Required for the Tumorigenic Behavior of Triple-Negative Breast Cancer Cells. / J. Xu, J.R. Prosperi, N. Choudhury et al. // *PLoS ONE.* – 2015. – Vol. 10(2). - e0117097.
332. β -catenin is selectively required for the expansion and regeneration of mature pancreatic acinar cells in mice. / M.D. Keefe, H. Wang, O.J.P. De La et al. // *Dis Model Mech.* – 2012. – Vol. 5(4). – P. 503-514.
333. β -Catenin mutations and aberrant nuclear expression during endometrial tumorigenesis. / M. Saegusa, M. Hashimura, T. Yoshida et al. // *British Journal of Cancer.* – 2001. – Vol. 84(2). – P. 209-217.
334. β -Catenin pathway activation in breast cancer is associated with triple-negative phenotype but not with CTNNB1 mutation. / F.C. Geyer, M. Lacroix-Triki, K. Savage et al. // *Mod Pathol.* – 2011. – Vol. 24(2). – P. 209-231.
335. β -Catenin promotes colitis and colon cancer through imprinting of proinflammatory properties in T cells. / S. Keerthivasan, K. Aghajani, M. Dose et al. // *Sci. Transl. Med.* – 2014. – Vol. 26. – P. 225-228.
336. β -catenin/Wnt signalling pathway in fibromatosis, metaplastic carcinomas and phyllodes tumours of the breast. / M. Lacroix-Triki, F.C. Geyer, M.B. Lambros et al. // *Mod Pathol.* – 2010. – Vol. 23(11). – P. 1438-1448.