

Л.В. Спирина^{1,2}, С.Ю. Чижевская¹, И.В. Кондакова¹, Е.Л. Чойнзонов^{1,2}

Связь мутации *BRAF-V600E* с экспрессией транскрипционных, ростовых факторов, компонентов АКТ/m-TOR сигнального пути в ткани папиллярного рака щитовидной железы

¹НИИ онкологии Томского НИМЦ,

²Сибирский государственный медицинский университет

Введение. Одной из инициирующих мутаций развития рака щитовидной железы является *BRAF-V600E*, которая приводит к активации различных сигнальных каскадов и изменению продукции транскрипционных и ростовых факторов. Для папиллярного рака щитовидной железы характерна активация экспрессии транскрипционных факторов NF-κB и HIF-2α и АКТ/m-TOR сигнального каскада. Однако связь уровня мРНК транскрипционных, ростовых факторов и компонентов АКТ/m-TOR пути у пациентов в зависимости от наличия мутации *BRAF* до сих пор не изучена.

Цель работы заключалась в исследовании экспрессии транскрипционных факторов NF-κB p65 и NF-κB p50, HIF-1α, HIF-2α, ростовых факторов VEGF, CAIX и VEGFR2, компонентов АКТ/m-TOR сигнального пути у больных папиллярным раком щитовидной железы в зависимости от наличия мутации *BRAF-V600E*.

Материал и методы. В исследование было включено 40 больных папиллярным раком щитовидной железы со стадией опухолевого процесса T1-4N0-2M0. Уровень мРНК изучаемых показателей определялся методом ПЦР в реальном времени. Мутацию *BRAF-V600E* определяли в аллель-специфичной ПЦР в режиме реального времени.

Результаты и обсуждение. При наличии сходных клинко-морфологических параметров пациентов с отсутствием и наличием мутации *BRAF-V600E* выявлены молекулярно-биологические отличия. Присутствие мутантной формы гена в опухоли сопровождалось снижением уровня мРНК киназ АКТ, cRAF, GSK-3β и ростом экспрессии ядерных факторов NF-κB p65, HIF-1 и ростового фактора VEGF.

Заключение. Для пациентов с папиллярным раком щитовидной железы характерно отсутствие различий в клинко-морфологических характеристиках заболевания в зависимости от статуса гена *BRAF-V600E*. Выявлены биологические параметры, ассоциированные с данной соматической мутацией. Отмечено возрастание уровня мРНК ростовых и транскрипционных факторов при снижении активности АКТ/m-TOR сигнального пути.

Ключевые слова: рак щитовидной железы, *BRAF-V600E*, АКТ/m-TOR, транскрипционные и ростовые факторы

Актуальность

Папиллярная карцинома является наиболее частой злокачественной опухолью щитовидной железы (60% всех случаев злокачественных патологий данной локализации) и характеризуется высокой частотой регионарного метастазирования [1, 2]. Развитие злокачественных опухолей щитовидной железы ассоциировано с возникновением ряда генетических нарушений, что способствует вовлечению в механизмы опухолей MAPK (mitogen-activated protein kinase) и АКТ/m-TOR сигнальных каскадов [3]. Половина случаев папиллярного рака щитовидной железы связана с активацией гена *BRAF* [2, 4].

Активация АКТ/m-TOR сигнального пути, связанная с повышением продукции транскрипционных и ростовых факторов, является ключевым механизмом опухолевой трансформации клеток [5]. Его составляющими являются протеинкиназы: АКТ, c-Raf, GSK-3, PDK1, а также m-TOR, ее субстраты p70-S64 и E-BP1, онко-супрессор PTEN. Показана высокая экспрессия киназ m-TOR, АКТ в опухолях щитовидной железы, сопряженная с риском прогрессирования заболевания [6].

К значимым молекулярным параметрам онкогенеза относят также транскрипционные и ро-

стовые факторы: ядерный фактор NF-κB, HIF, VEGF и карбоангидразы IX (CAIX) [7]. Имеются экспериментальные данные о значимости транскрипционных факторов HIF-1, NF-κB в обеспечении инвазивного роста и в формировании метастатического потенциала папиллярного рака щитовидной железы [8, 9].

Показано, что наибольшая активность АКТ/m-TOR сигнального каскада наблюдается у пациентов с наличием мутации гена *BRAF* [3]. Полагают, что его гиперактивация является причиной развития резистентности к проводимому лечению у больных раком щитовидной железы [10, 11], в том числе и таргетной терапии ингибиторами BRAF [12].

Сложность и многокомпонентность молекулярных механизмов развития и прогрессирования опухоли является причиной отсутствия до настоящего времени значимых и клинически апробированных молекулярных прогностических факторов развития заболевания. Показано, что наличие соматической мутации *BRAF-V600E* не может определять исход заболевания. В работе F.J. Jing et al. отмечено, что появление спорадической мутации гена не является признаком агрессивного поведения опухоли и не может быть использовано в качестве предсказательного маркера относительно риска развития отдаленных метастазов [13].

Кроме того, показано, что данная генетическая мутация способна изменять молекулярные характеристики опухоли. Зафиксирован факт того, что мутантный белок b-Raf опосредованно влияет на уровень активации ядерного фактора NF-κB [4, 14].

Имеются сведения, что процесс неоангиогенеза и сопровождаемая им продукция ядерного фактора HIF-1, ростовых факторов VEGF и CAIX в ткани опухоли щитовидной железы более активны при наличии мутации гена *BRAF* [13].

В наших исследованиях показано, что для папиллярного рака щитовидной железы характерна активация экспрессии транскрипционных факторов NF-κB и HIF-2α, протеинкиназы АКТ, фосфатазы PTEN, на фоне низкого уровня мРНК c-Raf по сравнению с доброкачественными опухолями [15]. Однако экспрессия транскрипционных, ростовых факторов в ассоциации с уровнем мРНК компонентов АКТ/m-TOR сигнального пути у пациентов в зависимости от наличия мутации *BRAF-V600E* до сих пор не изучена.

Целью работы было исследование экспрессии транскрипционных факторов NF-κB p65 и NF-κB p50, HIF-1α, HIF-2α, ростовых факторов VEGF, CAIX и VEGFR2, компонентов

АКТ/m-TOR сигнального пути у больных папиллярным раком щитовидной железы в зависимости от наличия или отсутствия мутации *BRAF-V600E*.

Материал и методы

В исследование было включено 40 больных папиллярным раком щитовидной железы со стадией опухолевого процесса T1-4N0-2M0, проходивших оперативное лечение в клиниках НИИ онкологии Томского НИМЦ. В зависимости от статуса гена *BRAF* пациенты были разделены на две группы: без мутации *BRAF-V600E*, которую составили 27 человек и с ее наличием – 13 человек.

Материалом исследования являлись образцы опухолевой и неизменной ткани щитовидной железы, находящиеся на расстоянии не менее 1 см от границы опухолей, которые после забора замораживались и хранились при t -80°C.

Проведение данной работы одобрено Этическим комитетом НИИ онкологии Томского НИМЦ. Все процедуры с вовлечением больных были проведены в соответствии с Протоколом Хельсинской декларации по правам человека (1964 г.) Все больные подписывали информированное согласие на участие в исследовании.

Выделение ДНК. ДНК выделяли с помощью набора FFPE DNA – Extraction Kit (Биолинк, Россия). Для оценки количества выделенной ДНК оценивали ее концентрацию на спектрофотометре NanoDrop-2000 (Thermo Scientific, USA). Полученная ДНК использовалась для ПЦР в режиме реального времени.

Определение мутации *BRAF-V600E*. Мутацию *BRAF-V600E* определяли с помощью набора реагентов Real-time-PCR-*BRAF-V600E*, предназначенного для выявления точечной мутации GTG→GGG в 600 кодоне гена *BRAF*. Анализ проводится методом аллель-специфичной ПЦР в реальном времени.

Выделение РНК. РНК выделяли с помощью набора RNeasy mini Kit, содержащего ДНК-азу I (Qiagen, Germany). Для оценки количества выделенной РНК на спектрофотометре NanoDrop-2000 (Thermo Scientific, USA) оценивали концентрацию и чистоту выделенной РНК. Концентрация РНК составила от 80 до 250 нг/мкл, A260/A280 = 1.95-2.05; A260/A230 = 1.90-2.31. Целостность РНК оценивалась при помощи капиллярного электрофореза на приборе TapeStation (Agilent Technologies, USA) и набора R6K ScreenTape (Agilent Technologies, USA). RIN составил 5.6 – 7.8.

Количественная ПЦР с обратной транскрипцией в режиме реального времени. Уровень экспрессии генов оценивали при помощи количественной обратнотранскрипционной ПЦР в режиме реального времени (RT-qPCR) с использованием красителя SYBR Green на амплификаторе iCycler (Bio-Rad, USA). Для получения кДНК на матрице РНК проводили реакцию обратной транскрипции с помощью набора ОТ m-MuLV-RN (БиоЛабмикс, Россия) со случайными гексануклеотидными праймерами в соответствии с инструкцией к набору. ПЦР ставили в трех репликах в объеме 25 мкл, содержащем 12,5 мкл БиоМастер HS-qPCR SYBR Blue (БиоЛабмикс, Россия), 300 нМ прямого и обратного праймеров и 50 нг кДНК. Двухшаговая программа амплификации включала 1 цикл – 94°C, 10 мин – предварительная денатурация; 40 циклов – 1 шаг 94°C, 10 сек и 2 шаг 20 сек – при температуре 60°C. Праймеры были подобраны с использованием программы Vector NTI Advance 11.5 и базы данных NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore>) (табл. 1).

Таблица 1. Последовательность праймеров проб исследованных генов

Ген	Ампликон	Последовательность
CAIX NM_001243084.1	217 п.н.	F 5'-GTTGCTGTCTCGTTGGAA-3' R 5'-CAGGGTGTGACAGAGGGGTGT-3'
HIF-1a NM_001243084.1	188 п.н.	F 5'-CAAGAACCTACTGTAATGCCA-3' R 5'-TTTGGTGAGGCTGTCCGA-3'
EPAS1 NM_001430.4	265 п.н.	F 5'-TGGAGTATGAAGAGCAAGCCT-3' R 5'-GGGAACCTGCTCTTGCTGT-3'
NFKB1 NM_001165412.1	144 п.н.	F 5'-CGTGTAAACCAAAGCCCTAAA-3' R 5'-AACCAAGAAAGGAAGCCAAGT-3'
RELA NM_001145138.1	271 п.н.	F 5'-GGAGCACAGATACCACCAAGA-3' R 5'-GGGTTGTTGTTGGTCTGGAT-3'
PTEN NM_001304717.2	136 п.н.	F 5'-GGGAATGGAGGGAATGCT-3' R 5'-CGCAACAACAAGCAGTGA-3'
VEGFA NM_001025366.2	316 п.н.	F 5'-AGGGCAGAATCATCACGAA-3' R 5'-TCTTGCTATCTTTCTTTGGTCT-3'
KDR NM_002253.2	306 п.н.	F 5'-AACACAGCAGGAATCAGTCA-3' R 5'-GTGGTGTCTGTGTCATCGGA-3'
4EBP1 NM_004095.3	244 п.н.	F 5'-CAGCCCTTCTCCCTCACT -3' R 5'-TTCCAAGCATCAACCT -3'
AKT1 NM_001014431.1	181 п.н.	F 5'-CGAGGACGCCAAGGAGA -3' R 5'-GTCATCTGGTCAGGTGGTGT -3'
C-RAF NM_002880.3	152 п.н.	F 5'-TGGTGTCTCTGCTCCCT -3' R 5'-ACTGCCTGCTACCTACTCTCT -3'
GSK3b NM_001146156.1	267 п.н.	F 5'-AGACAAGGACGGCAGCAA -3' R 5'-CTGGAGTAGAAGAAATAACGCAAT-3'
70S kinase alpha NM_001272042.1	244 п.н.	F 5'-CAGCACAGCAAATCCTCAGA -3' R 5'-ACACATCTCCCTCTCCACCTT -3'
m-TOR NM_004958.3	160 п.н.	F 5'-CCAAAGGCAACAAGCGAT-3' R 5'-TTCACCAACCGTCTCCA -3'
PDK1 NM_001278549.1	187 п.н.	F 5'-TCACCAGGACAGCCAATACA -3' R 5'-CTCCTCGGTCACTCATTTCA -3'
GAPDH NM_001256799.2	138 п.н.	F 5'-GGAAGTCAGGTGAGCGA-3' R 5'-GCAACAATATCCACTTTACCAGA-3'

Примечание: NM – номер последовательности РНК в NCBI Nucleotide Database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore>); F – прямой праймер; R – обратный праймер

Таблица 2. Клинико-морфологические характеристики больных в зависимости от статуса гена BRAF-V600E

	Отсутствие мутации BRAF-V600E (n=37)	Мутантный, BRAF-V600E (n=13)	p
Возраст, лет	50,0 (34,0; 58,0)	46,0 (46,0; 58,0)	>0.05
Гистологический вариант папиллярного рака			
Классический вариант	36 (97,3)	13 (100%)	0.581
Фолликулярный вариант	1 (2,7%)	0 (0%)	
Критерий Хи-квадрат с поправкой Йейтса 0.305			
Размер опухоли			
T1-2	12 (54,5%)	6 (46%)	0.897
T3-4	10 (45,6%)	7 (54%)	
Критерий Хи-квадрат с поправкой Йейтса 0.236			
Вовлеченность регионарных лимфоузлов			
N0	15 (68,2%)	7 (53,8%)	0.627
N1-2	7 (31,8%)	6 (46,2%)	
Критерий Хи-квадрат с поправкой Йейтса 0.017			

Примечание: p – значимость различий

В качестве референсного гена использовали ген «домашнего хозяйства» фермента GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase), и уровень экспрессии каждого целевого гена нормализовали по отношению к экспрессии GAPDH. Количественный анализ экспрессии проводили по формуле $2^{-\Delta\Delta Ct}$ по отношению к конститутивно-экспрессируемому гену-рефери фермента GAPDH.

Статистическую обработку результатов проводили с применением пакета программ Statistica 8.0. Проверку нормальности проводили с помощью критерия Холмогорова-Смирнова. Результаты определения экс-

прессии генов представлены как Me (Q1; Q3). Значимость различий оценивали по критерию Манна-Уитни. Различия считали значимыми при $p < 0.05$. Значимость различий частот качественных признаков оценивали с помощью Хи квадрат критерия с поправкой Йейтса.

Результаты исследования

Частота мутации составила 26% (13 человек) у больных папиллярным раком щитовид-

ной железы, у 37 человек данной мутации не было обнаружено. В зависимости от ее наличия пациенты были разделены на две группы: без мутации *BRAF-V600E* и с ее наличием. В табл. 2 представлены клиничко-морфологические характеристики больных этих групп; причем, отмечено отсутствие значимых различий между этими параметрами у пациентов обеих групп.

При анализе уровня экспрессии компонентов АКТ/м-TOR сигнального пути показано снижение экспрессии генов АКТ, с-RAF GSK-3β у пациентов с мутацией *BRAF-V600E* в 8,0; 5,6 и 6 раза, соответственно, по сравнению с больными без нее (табл. 3). Однако, в ранее проведенных исследованиях показана активация АКТ/м-TOR сигнального каскада, протеинкиназы м-TOR, сопряженная с наличием мутантного белка b-RAF [3], что, по данным авторов, свидетельствует об агрессивном характере развития опухоли.

Таблица 3. Экспрессия компонентов АКТ/м-TOR сигнального пути: АКТ, с-Raf, GSK-3β, PDK1 и PTEN, м-TOR, 70s киназа в зависимости от наличия мутации BRAF-V600E; Me(Q1;Q3)

Показатель	Отсутствие мутации <i>BRAF-V600E</i> (n=37)	Мутантный, <i>BRAF-V600E</i> (n=13)
PDK1	1,00 (0,25; 4,04)	2,80 (1,52; 10,00)
АКТ	2,00 (0,31; 14,00)	0,25 (0,00; 1,00)*
с-RAF	2,14 (0,54; 8,00)	0,38 (0,01; 0,38)*
GSK-3	3,48 (0,80; 14,93)	0,58 (0,50; 0,66)*
PTEN	1,62 (0,57; 2,33)	0,50 (0,00; 0,76)
м-TOR	1,87 (0,25; 4,04)	1,0 (0,31; 2,30)
70s киназа	3,25 (1,00; 16,00)	0,32 (0,25; 0,38)
4EBP1	0,50 (0,06; 2,00)	0,19 (0,03; 0,25)

Примечание: * - значимость различий по сравнению с группой больных папиллярным раком щитовидной железы без мутации *BRAF-V600E*, p<0,05

При этом отмечено повышение уровня мРНК ядерного фактора NF-κB p65, VEGF и HIF-1α в 368,2; 12,1 и 2,0 раза, соответственно, у пациентов с наличием мутации *BRAF-V600E* по сравнению с больными без нее (табл. 4). В литературе имеются противоречивые сведения о механизмах активации ядерного фактора NF-κB в ткани папиллярного рака щитовидной железы под влиянием мутантного белка b-RAF [4, 14]. В проведенной работе показана связь высоких уровней мРНК транскрипционных и ростовых факторов (NF-κB p65, HIF-1 и VEGF) с мутацией *BRAF-V600E*, что, вероятно, определяет изменения биологических особенностей папиллярной опухоли, влияющих на исход заболевания.

Таблица 4. Экспрессия транскрипционных факторов NF-κB p65, NF-κB p50, HIF-1α, HIF-2α, ростовых факторов VEGF, CAIX, VEGFR2 в ткани папиллярного рака щитовидной железы в зависимости от наличия мутации BRAF-V600E; Me(Q1;Q3)

Показатель	Дикий (n=37)	Мутантный, <i>BRAF-V600E</i> (n=13)
NF-κB p65	0,05 (0,01; 3,66)	18,41 (14,67; 51,20)*
NF-κB p50	1,00 (0,03; 11,7)7	0,50 (0,38; 44,31)
VEGFR2	1,78 (0,13; 6,06)	0,68 (0,01; 0,76)
VEGF	0,47 (0,13; 4,92)	12,13 (1,00; 56,00)*
CAIX	1,00 (0,29; 8,57)	1,50 (0,19; 4,00)
HIF-2α	0,50 (0,13; 4,00)	1,00 (0,25; 3,03)
HIF-1α	0,25 (0,01; 6,06)	0,50 (0,03; 1,00)*

Примечание: * - значимость различий по сравнению с группой больных папиллярным раком щитовидной железы без мутации *BRAF-V600E*, p<0,05

Обсуждение

Папиллярная карцинома щитовидной железы в большинстве случаев связана с активацией гена *BRAF* [2, 4], являющегося важным генетическим маркером заболевания. Однако до настоящего времени имеются противоречивые сведения, касающиеся механизмов прогрессирования заболевания при наличии мутантного белка b-RAF, а также их ассоциаций с компонентами АКТ/м-TOR сигнального пути [6], транскрипционными и ростовыми факторами [7, 8, 9].

Учитывая отсутствие различий в клиничко-морфологических характеристиках больных в зависимости от статуса гена *BRAF*, именно биологические особенности опухоли могут определять прогрессирование заболевания. Полагают, что изменение молекулярных характеристик опухоли при наличии мутации *BRAF-V600E* может влиять на механизмы опухолевой прогрессии. Так, в случае накопления мутантного белка b-RAF отмечено снижение уровня мРНК АКТ, с-RAF GSK-3β – ключевых компонентов АКТ/м-TOR сигнального пути, связанных с формированием инвазивного роста и развитием метастазов. При этом рядом авторов, напротив, отмечается отсутствие связи между данной мутацией и клиничко-морфологическими особенностями заболевания [13, 16], что также выявлено в данной работе. Более того, пациенты с неметастатическим папиллярным раком на фоне мутации хорошо отвечают на лечение и имеют более благоприятный исход [17].

Следовательно, в развитии папиллярного рака щитовидной железы значимы другие молекулярные механизмы. Вероятно, они связаны с транскрипционными и ростовыми факторами. Нами выявлено, что повышение экспрессии ядерных

факторов NF-κB p65, HIF-1 и ростового фактора VEGF сочеталось с наличием мутации белка b-RAF. Известно, что эти молекулярные параметры ответственны за активацию ангиогенеза, развитие иммунного воспаления и угнетение апоптоза в опухолевых клетках [4, 13, 14].

Заключение. В результате проведенного исследования отмечено отсутствие различий в клинико-морфологических характеристиках пациентов папиллярным раком щитовидной железы в зависимости от статуса гена *BRAF-V600E*. Выявлены биологические параметры, ассоциированные с данной мутацией, которые могут влиять на развитие и прогрессирование заболевания. При наличии соматической мутации отмечена инактивация АКТ/m-TOR сигнального пути в опухоли, что сопровождается гиперпродукцией ядерных факторов NF-κB p65, HIF-1 и ростового фактора VEGF.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

ЛИТЕРАТУРА

1. Злокачественные новообразования в России в 2016 году (заболеваемость и смертность). / Под ред. Каприна А.Д., Старинского В.В., Петровой Г.В. – М.: МНИОИ им. П.А. Герцена, 2018. [Kaprin AD, Starinsky VV, Petrova GV, editors. Cancers in Russia in 2016 year (incidence and mortality). Moscow: P.Herzen Moscow Oncology Research Institute, 2018 (in Russ).]
2. Kim WW, Ha TK, Bae SK. Clinical implications of the BRAF mutation in papillary thyroid carcinoma and chronic lymphocytic thyroiditis. *J Otolaryngol Head Neck Surg.* 2018;47(1):4. Published 2018 Jan 9. doi:10.1186/s40463-017-0247-6
3. Faustino A, Couto JP, Pópulo H, et al. mTOR pathway overactivation in BRAF mutated papillary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012;97(7):E1139-49. doi: 10.1210/jc.2011-2748.
4. Margalef P, Colomer C, Villanueva A. et al. BRAF-induced tumorigenesis is IKKα-dependent but NF-κB-independent. *Sci Signal.* 2015;8(373):ra38. doi: 10.1126/scisignal.2005886.
5. Tanaka TN, Alloju SK, Oh DK. et al. Thyroid cancer: molecular pathogenesis, tyrosine kinase inhibitors, and other new therapies. *The American journal of hematology/oncology.* 2015;11(4):5-9.
6. Tavares C, Eloy C, Melo M, et al. mTOR Pathway in Papillary Thyroid Carcinoma: Different Contributions of mTORC1 and mTORC2 Complexes for Tumor Behavior and SLC5A5 mRNA Expression. *Int J Mol Sci.* 2018;19(5):1448. doi:10.3390/ijms19051448
7. Marotta V, Sciammarella C, Capasso M, et al. Erratum to: Preliminary data of VEGF-A and VEGFR-2 polymorphisms as predictive factors of radiological response and clinical outcome in iodine-refractory differentiated thyroid cancer treated with sorafenib. *Endocrine.* 2017;57(3):544. doi: 10.1007/s12020-017-1269-6.
8. Burrows N, Babur M, Resch J, et al. GDC-0941 inhibits metastatic characteristics of thyroid carcinomas by targeting both the phosphoinositide-3 kinase (PI3K) and hypoxia-inducible factor-1α (HIF-1α) pathways. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011;96(12):E1934-43. doi: 10.1210/jc.2011-1426.
9. Ma Y, Wang Q, Liu F, et al. KLF5 promotes the tumorigenesis and metastatic potential of thyroid cancer cells through the NF-κB signaling pathway. *Oncol Rep.* 2018;40(5):2608-2618. doi: 10.3892/or.2018.6687.
10. Xing M. Genetic alterations in the phosphatidylinositol-3 kinase/Akt pathway in thyroid cancer. *Thyroid.* 2010;20(7):697-706. doi: 10.1089/thy.2010.1646.
11. Mondragón-Terán P, López-Hernández LB, Gutiérrez-Salinas J. et al. Intracellular signalling mechanisms in thyroid cancer. *Cirugía y Cirujano.* 2016;84(5):434-443
12. Byeon HK, Na HJ, Yang YJ, et al. c-Met-mediated reactivation of PI3K/AKT signaling contributes to insensitivity of BRAF(V600E) mutant thyroid cancer to BRAF inhibition. *Mol Carcinog.* 2016;55(11):1678-1687. doi: 10.1002/mc.22418. Epub 2015 Oct 12.
13. Jing FJ, Liang J, Liang ZY, et al. BRAF(V600E) mutation is not a positive predictor for distant metastasis in sporadic papillary thyroid carcinoma. *Chin Med J (Engl).* 2013;126(16):3013-8.
14. Bommarito A, Richiusa P, Carissimi E, et al. BRAFV600E mutation, TIMP-1 upregulation, and NF-κB activation: closing the loop on the papillary thyroid cancer trilogy. *Endocr Relat Cancer.* 2011;18(6):669-85. doi: 10.1530/ERC-11-0076.
15. Спирина Л.В., Чижевская С.Ю., Кондакова И.В. Экспрессия транскрипционных, ростовых факторов и компонентов АКТ/m-TOR сигнального пути в ткани папиллярного рака щитовидной железы. // Проблемы эндокринологии. — 2018. — Т. 64. — № 4. — С.208-215. doi: 10.14341/probl9310 [Spirina LV, Chigevskaya SYu, Kondakova IV. Expression of transcription, growth factors and components of АКТ/m-TOR signaling pathway in papillary thyroid cancers. *Problems of Endocrinology.* 2018;64(4):208-215. (In Russ).] doi: 10.14341/probl9310
16. Givens DJ, Buchmann LO, Agarwal AM, et al. BRAF V600E does not predict aggressive features of pediatric papillary thyroid carcinoma. *Laryngoscope.* 2014 Sep;124(9):E389-93. doi: 10.1002/lary.24668.
17. Shen G1, Kou Y, Liu B, Huang R, et al. BRAFV600E Mutation Does Not Significantly Affect the Efficacy of Radioiodine Therapy in Patients With Papillary Thyroid Carcinoma Without Known Distant Metastases. *Clin Nucl Med.* 2018 Jul;43(7):e215-e219. doi: 10.1097/RLU.0000000000002142.

Поступила в редакцию 28.01.2019 г.

L.V. Spirina^{1,2}, S.Yu. Chigevskaya¹, I.V. Kondakova¹,
E.L. Choyznov^{1,2}

The relationship of the BRAF-V600E mutation with the expression of transcriptional, growth factors, components of the AKT / m-TOR signaling pathway in the tissue of papillary thyroid cancer

¹Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences, Tomsk,

²Siberian State Medical University, Tomsk

Introduction. One of the initiating mutations in the development of thyroid cancer is *BRAF-V600E*, which leads to the various signaling cascades activation and changes in the production of transcription and growth factors. It is known that papillary thyroid cancer is characterized by activation of the expression of transcription factors NF-κB and HIF-2α and AKT/m-TOR signaling cascade. However, the relationship of the studied molecular markers in patients with the wild and mutant *BRAF* gene has not yet been studied.

The aim of the work was to study the expression of transcription factors NF-65B p65 and NF-κB p50, HIF-1α, HIF-2α, growth factors VEGF, CAIX and VEGFR2, components of the AKT/m-TOR signaling pathway in patients with thyroid papillary cancer depending on the presence of mutations *BRAF-V600E*.

Material and methods. It was included 40 patients with papillary thyroid cancer with the stage of the tumor process T1-4N0-2M0. The expression of the indicators was determined by real-time PCR. *BRAF-V600E* mutation was revealed by allele-specific PCR in real-time.

Results and discussion. It was found that patients with the absence and presence of the *BRAF-V600E* mutation had similar clinical and morphological parameters of the disease, which was accompanied by a change in the molecular-biological characteristics of the tumor. The presence of the mutant form of the gene in the tumor led to a decrease in the AKT, cRAF, GSK-3β kinases mRNA levels and the overexpression of NF-κB p65, HIF-1 and VEGF.

Conclusion. Patients with papillary thyroid cancer have no differences in the clinical and morphological characteristics of the disease, depending on the status of the *BRAF-V600E* gene, is characteristic. It was identified biological parameters associated with this somatic mutation. An increase in the mRNA level of growth and transcription factors was observed with a decrease in the activity of the AKT / m-TOR signaling pathway.

Key words: thyroid cancer, *BRAF-V600E*, AKT/m-TOR signaling cascade, transcription and growth factors