



Л.В. Спирина^{1,2}, И.В. Ковалева^{1,2}, С.Ю. Чижевская¹, И.В. Кондакова¹, Е.Л. Чойнзон¹

Связь экспрессии и содержания белков SRC-1, SRC-3 с транскрипционным профилем стероидных гормонов, факторов Brn-3a, TRIM16 в ткани папиллярного рака щитовидной железы

¹НИИ онкологии Томского НИМЦ, г. Томск
²ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России, г. Томск

L.V. Spirina^{1,2}, I.V. Kovaleva^{1,2}, S.Yu. Chizhevskaya¹, I.V. Kondakova¹, E.L. Choynzonov¹

The Correlation Between the Expression Levels and the Content of SRC-1 and SRC-3 Proteins with the Expression of Steroid Hormone Receptors, Brn-3a Factors, and TRIM16 in Papillary Thyroid Cancer Tissue

¹Scientific Research Institute of Oncology, the Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences, Tomsk, the Russian Federation
²Siberian State Medical University, Tomsk, the Russian Federation

Введение. Папиллярный рак щитовидной железы (ПРЩЖ) является наиболее распространенной опухолевой патологией среди новообразований эндокринных органов. Ключевыми молекулярными механизмами является активация онкогена b-RAF и MAPK сигнального пути с формированием агрессивного инвазивного и метастатического потенциала. Ко-активаторы стероидных рецепторов SRC-1, SRC-3 являются молекулярными факторами с широкой специфичностью действия, способными регулировать транскрипционную активность ядерных факторов, ассоциированных с онкогенезом.

Цель. Цель исследования заключалась в изучении экспрессии и содержания белка SRC-1, SRC-3 в ткани опухоли больных с ПРЩЖ в зависимости от уровня транскрипционных, ростовых факторов, рецепторов стероидных гормонов и клинико-морфологических параметров.

Материалы и методы. В исследование было включено 82 пациента, проходивших лечение в клиниках НИИ онкологии Томского НИМЦ: 46 больных с ПРЩЖ T₁₋₄N₀₋₁M₀ и 36 пациентов с доброкачественной патологией щитовидной железы. Экспрессию молекулярных маркеров оценивали с помощью метода ПЦР в реальном времени. Содержание белков оценивали методом Вестерн блоттинг. Мутацию BRAFV600E определяли с помощью аллель-специфичной ПЦР.

Результаты. Выявлены ассоциации между экспрессией и содержанием ко-активаторов стероидных рецепторов с подтипом ПРЩЖ, наличием мутации BRAFV600E, размером опухоли и наличием признаков инвазии опухоли в капсулу щитовидной железы. Молекулярный портрет опухоли при наличии мутации BRAFV600E был связан с разнонаправленными изменениями экспрессии и содержания SRC-1 и SRC-3. Выраженный рост содержания белка SRC-3 наблюдается при мутации, приводящей к гиперактивации транскрипционных и ростовых факторов NF-κB, HIF-1, VHL и ростового фактора VEGF.

Заключение. Высокий уровень экспрессии и содержания SRC-3 связан с развитием агрессивного поведения опухоли. При мутации BRAFV600E отмечена активация транскрипционных факторов NF-κB, HIF-1, Brn-3a, VEGF,

Introduction. Papillary thyroid cancer (PTC) is the most common tumor among endocrine tumors. The key molecular mechanisms of PTC progression are the activation of the b-RAF oncogene and the MAPK signaling pathway with the formation of an aggressive invasive and metastatic potential. Steroid receptor coactivators SRC-1 and SRC-3 are molecular factors with broad specificity capable of regulating the transcriptional activity of nuclear factors associated with oncogenesis.

Aim. To study the expression and content of SRC-1 and SRC-3 in the papillary thyroid cancer tissue of patients with PTC, depending on transcription and growth factors, steroid hormone receptors and clinicomorphological parameters.

Materials and Methods. The study included 82 patients treated at the clinics of the Research Institute of Oncology at the Tomsk National Research Medical Center: 46 patients with PTC T1-4N0-1M0 and 36 patients with benign thyroid pathologies. Molecular marker expressions were assessed using real-time PCR. Protein content was evaluated by Western blotting. The BRAFV600E mutation was determined using allele-specific PCR.

Results. Associations were found between the expression and content of co-activators of steroid receptors and the PTC subtype, the presence of the BRAFV600E mutation, tumor size, and signs of tumor invasion into the thyroid capsule. The molecular profile of the tumor with the BRAFV600E mutation was associated with divergent changes in the expression and content of SRC-1 and SRC-3. Significant elevation of SRC-3 protein content was observed in BRAFV600E mutated samples resulting in increased expression of NF-κB, HIF-1, VHL, and VEGF.

Conclusion. High levels of SRC-3 expression and content are associated with the development of aggressive tumor behavior. The presence of the BRAFV600E mutation is associated with the activation of transcription factors NF-κB, HIF-1,

что также выявлено при инвазии опухоли в капсулу щитовидной железы.

Ключевые слова: папиллярный рак щитовидной железы; SRC-1; SRC-3; BRAFV600E

Для цитирования: Спирина Л.В., Ковалева И.В., Чижевская С.Ю., Кондакова И.В., Чойнзон Е.Л. Связь экспрессии и содержания белков SRC-1, SRC-3 с транскрипционным профилем стероидных гормонов, факторов Brn-3a, TRIM16 в ткани папиллярного рака щитовидной железы. Вопросы онкологии. 2023;69(4):684–691. doi: 10.37469/0507-3758-2023-69-4-684-691

Папиллярный рак щитовидной железы (ПРЩЖ) является наиболее распространенной опухолью среди эндокринных неоплазий [1]. Ключевыми молекулярными механизмами являются активация онкогена b-RAF и MAPK сигнального пути с формированием агрессивного инвазивного и метастатического потенциала [2]. Ранее были проведены исследования, в которых выявлены ассоциации между мутацией BRAFV600E в опухоли и активацией транскрипционных и ростовых факторов [3–4].

Исследование биологических особенностей опухоли, определяющих прогноз и исход заболевания, является приоритетным в молекулярной онкологии, т. к. несмотря на благоприятный прогноз заболевания у большинства пациентов, у 25 % больных развиваются рецидивы опухоли [5]. Среди молекулярных каскадов большое значение приобретают транскрипционные факторы Brn-3, TRIM16 и ко-активаторы стероидных рецепторов [6], способные влиять на рецепторный статус опухоли.

Ко-активаторы стероидных рецепторов представляют собой семейство, состоящее из трёх белков: SRC-1 (NCOA1), SRC-2 (TIF2 или GRIP1) и SRC-3 (AIB1 или ACTR). Ко-активаторы стероидных рецепторов SRC-1 и SRC-3 являются значимыми в регуляции инвазивного и метастатического потенциала опухоли. К мишеням SRC-1 относят прогестероновый рецептор (PR), альфа рецепторы эстрогена (ER α) [7]. Показано влияние данного фактора на стимуляцию ростовых факторов за счет изменения транскрипционного фактора NF- κ B [8]. Кроме того, известно, что SRC-3, служащий адаптером для привлечения белков ремоделирования хроматина и других транскрипционных ферментов, опосредует транскрипционную активность ER и PR [9]. Было обнаружено, что SRC-3 способствует гормонозависимому росту клеток рака молочной железы MCF-7 человека путем коактивации ER α и PR. SRC-3 также потенцирует транскрипционную активность других факторов HIF-1 (ядерный фактор, активируемый гипоксией), NF- κ B [10].

Цель исследования заключалась в изучении содержания матричной РНК (мРНК) и содержания белков ко-активаторов стероидных гор-

Brn-3a, VEGF, which are also detected in tumor invasion into the thyroid capsule.

Keywords: papillary thyroid cancer; SRC-1; SRC-3; BRAFV600E

For citation: Spirina LV, Kovaleva IV, Chizhevskaya SYu, Kondakova IV, Choyzonov EL. The correlation between the expression levels and the content of SRC-1 and SRC-3 proteins with the expression of steroid hormone receptors, Brn-3a Factors, and TRIM16 in papillary thyroid cancer tissue. Voprosy Onkologii. 2023;69(4):684–691. (In Russ.). doi: 10.37469/0507-3758-2023-69-4-684-691

монов SRC-1, SRC-3 в ткани опухоли больных папиллярным раком щитовидной железы в зависимости от уровней мРНК транскрипционных и ростовых факторов, рецепторов стероидных гормонов, а также их роль в формировании инвазивного потенциала опухоли.

Материалы и методы

В исследование было включено 82 пациента, проходивших лечение в клиниках НИИ онкологии Томского НИМЦ: 46 больных с ПРЩЖ и 36 — с доброкачественной патологией щитовидной железы. Больные были распределены на группы по размеру опухоли: стадия T₁₋₂N₀M₀ выявлена у 26 больных, а T₃₋₄N₀₋₁M₀ — у 20 пациентов. 16 пациентов имели регионарные метастазы, а 30 больных не имели. У 8 пациентов был верифицирован фолликулярный подтип ПРЩЖ, а у 38 — классический. Мутация BRAF-V600E была выявлена у 18 человек.

Проведение данной работы одобрено этическим комитетом НИИ онкологии Томского НИМЦ. Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием людей, соответствуют этическим стандартам национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 г. и ее последующим изменениям. От каждого из включенных в исследование участников было получено информированное добровольное согласие. Материалом исследования являлись образцы опухолевой ткани, полученные при проведении оперативного лечения, и неизменной ткани, забранные на расстоянии не менее 1 см от границы опухоли, которые после забора замораживались и хранились при температуре -80 °C.

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 (Биолинк, Россия), 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 обратно-транскриптазной 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-RH (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. *SRC-1*: F 5'- CTCATGGTGGCTCGTTCATC-3', R 5'-GCTCTGCTGGCGTTTATTCTG-3'; *SRC-3*: F 5'- TTGCCTTTGCTCTGTGTGC-3', R 5'- ACATTAGGAGGTGGGCTGAA-3'; *HIF1A*: F 5'-CAAGAACCTACTGCTAATGCCA-3', R 5'-TTTGGTGAGGCTGTCCGA-3'; *EPAS1*: F 5'-TGGAGTATGAAGAGCAAGCCT-3', R 5'-GGGAACCTGCTCTTGCTGT-3'; *NFKB1*: F 5'-CGTGTAACCAAGCCCTAAA-3', R 5'-AACCAAGAAAGGAAGCCAAGT-3'; *RELA*: F 5'-GGAGCACAGATACCACCAAGA-3', R 5'-GGGTTGTTGTTGGTCTGGAT-3'; *VEGFA*: F 5'-AGGGCAGAATCATCACGAA-3', R 5'-TCTTGCTCTATCTTTCTTTGGTCT-3'; *KDR*: F 5'-AACACAGCAGGAATCAGTCA-3', R 5'-GTGGTGTCTGTGTCATCGGA-3'; *4-BPI*: F 5'-CAGCCCTTCTCCCTCACT-3', R 5'-TTCCCAAGCACATCAACCT-3'; *AKT1*: F 5'-CGAGGACGCCAAGGAGA -3', R 5'-GTCATCTTGGTCAGGTGGTGT-3'; *C-RAF*: F 5'-TGGTGTGCTCTGCTCCCT-3', R 5'-ACTGCCTGCTACCTTACTTCCCT-3'; *GSK3b*: F 5'-AGACAAGGACGGCAGCAA-3', R 5'-TGGAGTAGAAGAAATAACGCAAT-3'; *70S* киназа a: F 5'-CAGCACAGCAAATCCTCAGA-3', R 5'-ACACATCTCCCTCTCCACCT-3'; *MTOR*: F 5'-CCAAAGGCAACAAGCGAT-3', R 5'-TTCACCAAACCGTCTCCAA-3'; *PDK1*: F 5'-TCACCAGGACAGCCAATACA-3', R 5'-CTCCTCGGTCACATCTTCA-3'; *POU4F1*: F 5'-CACGCTCTCGCACAACA-3', R 5'-ATCCGCTTCTGCTTCTGTCT-3'; *AR*: F 5'-GAGGGACAGCAGGCAGA-3', R 5'-GCTATCAGAACACACACACACT-3'; *ERS*: F 5'-TCCTGATGATTGGTCTCGTCT-3', R 5'-GATGTGGGAGAGGATGAGGA-3'; *ESR2*: F 5'-GGTCCATCGCCAGTTATCAC-3', R 5'-GCCTTACATCTTCCACGA-3'; *TRIM16*: F 5'-CAATGGAACGGGAAGGAG-3', R 5'-GGACGGTGTGCTGGCTTCT-3'; *PR*: F 5'-TGCCTATCCTGCCTCTCAAT-3', R 5'-CTTCTCTCTCTCTTTATCTTT-3'; *GAPDH*: F 5'-GGAAGTCAGGTGGAGCGA-3', R 5'-GCAACAATATCCACTTACCAGA-3'. Двухшаговая программа амплификации включала 1 цикл — 94 °С, 10 мин — предварительная денатурация; 40 циклов — 1 шаг 94 °С, 10 сек и 2 шаг 20 сек при температуре 60 °С. Праймеры были подобраны с использованием программы Vector NTI Advance 11.5 и базы данных NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>).

В качестве референсного гена использовали ген GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase), и уровень экспрессии каждого целевого гена нормализовали по отношению к экспрессии GAPDH. Количественный анализ экспрессии проводили по 2ΔΔCt по отношению к конститутивно-экспрессируемому гену-рефери фермента GAPDH.

Получение гомогенатов. Замороженную ткань (100 мг) измельчали в жидком азоте, затем ресуспендировали в 300 мкл 50 мМ трис-НСl буфера (pH = 7,5), содержащего 2 мМ АТФ, 5 мМ хлорид магния, 1 мМ дитиотреитол, 1 мМ ЭДТА и 100 мМ хлорид натрия. Гомогенат центрифугировали 60 мин при 10 000 g и 40 °С.

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

Вестерн блоттинг. После электрофореза переносили полипептиды на PVDF-мембрану (Immobilon, Millipore, США). Иммунодетекцию проводили с антителами к SRC-1, SRC-3, LC3B (Affinity Biosciences, USA). Стандартизация проводилась относительно β-актина (рис. 1). Результаты выражали в процентах от содержания показателей в неизменной ткани. Статистическую обработку результатов проводили с применением пакета программ Statistica 12.0. Проверку нормальности проводили с помощью критерия Колмогорова-Смирнова. Результаты определения экспрессии генов представлены как Me (Q1; Q3). Тест Манна-Уитни использовался для оценки значимых различий. Корреляционный анализ количественных показателей проводили с помощью непараметрического критерия Спирмена (r). Различия считались значимыми при p < 0,05.

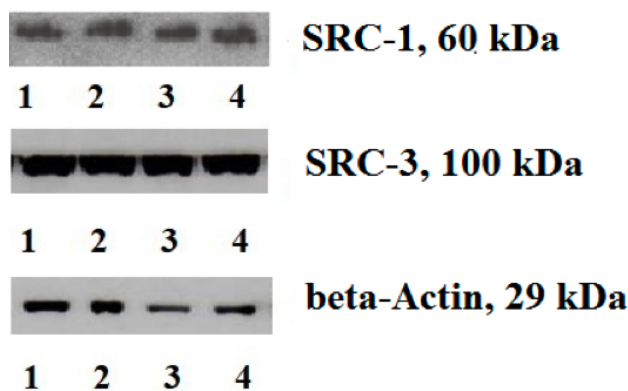


Рис. 1. Содержание белков SRC-1 SRC-3 в ткани опухоли щитовидной железы по данным Вестерн-блоттинга

Результаты

Зафиксирован рост экспрессии SRC-3 в 1,3 раза у пациентов с фолликулярным подтипом опухоли по сравнению с классическим вариантом ПРЩЖ, что сопровождалось снижением содержания белка SRC-1 в 1,6 раза.

Отмечена связь мутации *BRAFV600E* в опухоли с экспрессией и содержанием SRC-1, которые снижались в 9,6 и 1,4 раза соответственно, по сравнению с опухолями без мутации. При этом содержание SRC-3 увеличивалось в 1,7 раза в ткани опухоли с мутантным белком с-RAF.

Показано увеличение уровня мРНК SRC-3 в 1,9 раза у больных с размером опухоли T_{3,4}N₁M₀ по сравнению с T_{1,2}N₀M₀. При этом значимых различий у пациентов в зависимости от наличия метастазов в регионарных узлах выявлено не было. Вклад белка SRC-3 был отмечен при формировании инвазивного потенциала опухоли, где происходил рост данного показателя в 1,5 раза в ткани опухоли с наличием признаков экстракапсулярного роста.

Таблица 1. Содержание белка и экспрессия SRC-1 и SRC-3 в ткани ПРЦЖ в зависимости от клинико-морфологических параметров опухоли Me (Q1; Q4)

Клинико-морфологические критерии	SRC-1	SRC-3
Гистологический подтип опухоли		
Уровень экспрессии (Усл. Ед.)		
Классический подтип	1.69 (0.24; 4.38)	1.50 (0.24; 3.89)
Фолликулярный подтип	0.69 (0.17; 2.46)	2.00 (0.31; 5.18)*
Содержание белка		
Классический подтип	84.10 (22.00; 143.00)	96.97 (45.00; 174.00)
Фолликулярный подтип	53.33 (1.88; 68.10)*	100.00 (32.00; 101.95)
Наличие мутации BRAFV600E		
Экспрессия (Усл. Ед.)		
Нет мутации	1.45 (0.69; 2.98)	0.58 (0.24; 4.84)
BRAFV600E	0.15 (0.00; 1.38)**	0.45 (0.00; 0.57)
Содержание белка		
Нет мутации	122.45 (27.95; 215.00)	54.82 (24.85; 143.50)
BRAFV600E	90.00 (75.00; 264.80)**	92.00 (17.92; 188.00)**
Размер опухоли		
Уровень экспрессии (Усл. Ед.)		
T ₁₋₂ N ₀ M ₀	1.8 (0.34; 2.55)	0.96 (0.18; 3.19)
T ₃₋₄ N ₁ M ₀	1.45 (0.17; 4.38)	1.87 (0.45; 17.07)***
Содержание белка		
T ₁₋₂ N ₀ M ₀	60.72 (2.32; 102)	96 (45; 101.95)
T ₃₋₄ N ₁ M ₀	78.2 (22; 236)	113 (36; 188)
Наличие метастазирования в регионарные лимфоузлы		
Уровень экспрессии (Усл. Ед.)		
T ₁₋₂ N ₀ M ₀	1.82 (0.20; 7.12)	1.24 (0.15; 1.84)
T ₃₋₄ N ₁ M ₀	1.93 (0.27; 4.36)	0.57 (0.02; 5.52)
Содержание белка		
T ₁₋₂ N ₀ M ₀	84.10 (15.00; 104.90)	100.97 (45.00; 118.00)
T ₃₋₄ N ₁ M ₀	68.10 (22.00; 264.80)	79.00 (32.00; 188.00)
Наличие инвазии в капсулу		
Экспрессия (Усл. Ед.)		
Нет инвазии	1.62 (0.24; 27.86)	2.00 (0.24; 3.89)
Есть инвазия	1.60 (0.17; 2.38)	0.96 (0.45; 4.84)
Содержание белка		
Нет инвазии	60.71 (2.10; 97.45)	76.00 (48.32; 101.95)
Есть инвазия	78.20 (26.80; 143.00)	113.00 (45.00; 174.00)****

Примечание: * — значимость различий по сравнению с опухолями с фолликулярным подтипом, $p < 0,05$; ** — значимость различий по сравнению с пациентами с наличием мутации BRAFV600E, $p < 0,05$; *** — значимость различий по сравнению с пациентами с размером опухоли T₃₋₄N₁M₀, $p < 0,05$; **** — значимость различий по сравнению с пациентами с наличием инвазии опухоли в капсулу ЦЖ, $p < 0,05$

Были изучены корреляционные ассоциации между исследуемыми показателями (табл. 2). Выявлены прямые корреляции между SRC-1, SRC-3 и транскрипционным фактором NF-κB p65 ($r_1 = 0,4$; $p < 0,05$; $r_2 = 0,4$; $p < 0,05$), HIF-1 ($r_1 = 0,4$; $p < 0,05$; $r_2 = 0,4$; $p < 0,05$), что могло также оказать влияние на содержание ангиогенных факторов. Так в результате корреляционного анализа между коактиваторами и ангиогенными

факторами, были выявлены корреляции между экспрессией SRC-1, VEGFR2 ($r = 0,38$; $p < 0,05$) и SRC-3, CAIX ($r = 0,33$; $p < 0,05$). Обнаружены статистически значимые связи между экспрессией SRC-1, SRC-3 и транскрипционными факторами TRIM16 ($r_1 = 0,46$; $p < 0,05$; $r_2 = 0,49$; $p < 0,05$), Bm-3α ($r_1 = 0,4$; $p < 0,05$; $r_2 = 0,4$; $p < 0,05$), а также ERα ($r_1 = 0,33$; $p < 0,05$; $r_2 = 0,36$; $p < 0,05$) и ERβ ($r_1 = 0,44$; $p < 0,05$; $r_2 = 0,37$; $p < 0,05$).

Таблица 2. Корреляционные связи между экспрессией SRC-1 и SRC-3 и экспрессией транскрипционных, ростовых факторов и рецепторов стероидных гормонов

Показатели	r	p	Показатели	r	p
SRC-1 & NF-κB p65	0.409	< 0.001	SRC-3 & NF-κB p65	0.414	< 0.001
SRC-1 & NF-κB p50	0.210	0.101	SRC-3 & NF-κB p50	-0.013	0.915
SRC-1 & HIF-1	0.489	< 0.001	SRC-3 & HIF-1	0.427	< 0.001
SRC-1 & HIF-2	0.171	0.182	SRC-3 & HIF-2	-0.147	0.253
SRC-1 & VHL	-0.156	0.444	SRC-3 & VHL	0.078	0.708
SRC-1 & VEGF	0.126	0.328	SRC-3 & VEGF	-0.054	0.678
SRC-1 & CAIX	0.165	0.199	SRC-3 & CAIX	0.337	< 0.05
SRC-1 & VEGFR2	0.389	< 0.05	SRC-3 & VEGFR2	0.188	0.143
SRC-1 & TRIM16	0.462	< 0.001	SRC-3 & TRIM16	0.499	< 0.001
SRC-1 & Brn-3α	0.434	< 0.001	SRC-3 & Brn-3α	0.421	< 0.001
SRC-1 & ERα	0.339	< 0.01	SRC-3 & ERα	0.362	< 0.01
SRC-1 & ERβ	0.440	< 0.001	SRC-3 & ERβ	0.372	< 0.01
SRC-1 & AR	0,233	0,068	SRC-3 & Ar	0,213	0,097
SRC-1 & PR	-0,045	0,832	SRC-3 & PR	-0,168	0,432

Примечание: r — коэффициент Спирмена; p — значимость различий

Таблица 3. Экспрессия транскрипционных, ростовых факторов и рецепторов стероидных гормонов в зависимости от наличия инвазии в капсулу и мутации BRAFV600E, Me (Q1; Q4)

Показатели, Усл. Ед.	Мутация BRAFV600E		Инвазия в капсулу щитовидной железы	
	Нет мутации	Есть мутация	Нет инвазии	Наличие инвазии
NF-κB p65	0.63 (0.05; 2.72)	9.39 (1.03; 32.00)*	1.35 (0.25; 5.90)	0,76 (0.14; 10.37)
NF-κB p50	0.89 (0.08; 4.59)	3.67 (0.22; 96.86)*	0.5 (0.08; 3.25)	1.07 (0.35; 89.33)**
HIF-1	0.25 (0.01; 2.04)	1.48 (0.13; 5.78)*	1.13 (0.25; 7.46)	0.21 (0.02; 8.95)**
HIF-2	0.65 (0.13; 2.14)	0.82 (0.2; 33.14)	0.91 (0.25; 8)	0.60 (0.16; 1.56)
VHL	0.26 (0.02; 0.70)	4.51 (0.41; 56.59)*	1.79 (0.17; 11.5)	0.41 (0.1; 2.15)**
VEGF	0.38 (0.13; 20.00)	2.15 (0.05; 26.35)*	0.50 (0.15; 13.19)	0.41 (0.02; 2.01)
CAIX	0.99 (0.25; 4.00)	1.09 (0.20; 2.94)	0.65 (0.03; 3.53)	1.13 (0.23; 4.56)**
VEGFR2	0.65 (0.06; 4.95)	0.62 (0.11; 8.51)	0.56 (0.04; 2.83)	0.55 (0.06; 6.82)
Brn-3α	0.53 (0.04; 2.62)	1.86 (0.08; 15.12)*	0.66 (0.13; 5.77)	1.06 (0.19; 3.85)
TRIM16	0.81 (0.07; 2.58)	0.54 (0.04; 3.30)	2.36 (0.40; 32.62)	0.43 (0.04; 2.29)**
ERα	0.63 (0.36; 2.42)	1.39 (0.05; 9.09)	1.00 (0.36; 6.98)	0.60 (0.03; 3.48)
ERβ	1.07 (0.5; 3.34)	1.16 (0.08; 6.70)	1.00 (0.21; 8.33)	1.24 (0.34; 7.23)
AR	1.00 (0.22; 3.25)	1.16 (0.05; 11.49)	1.62 (0.25; 4.38)	0.62 (0.05; 1.65)**
PR	0.48 (0.11; 1.74)	0.18 (0.03; 1.08)	0.58 (0.03; 1.10)	0.34 (0.60; 1.17)

Примечание: * — значимость различий по сравнению с пациентами с наличием мутации BRAFV600E, p < 0,05; ** — значимость различий по сравнению с пациентами с наличием признаков инвазии в капсулу ЩЖ, p < 0,05

Полученные данные были верифицированы при сравнении групп больных в зависимости от наличия мутации BRAFV600E и от наличия инвазии в капсулу щитовидной железы. Выявлены молекулярные особенности опухоли, связанные с наличием мутации (табл. 3). В условиях наличия мутантного белка c-RAF зафиксировано повышение содержания мРНК транскрипционных факторов NF-κB p65 и NF-κB p50 в 14,9 и 4,1

раза соответственно, по сравнению с больными без мутации в опухоли. Активация процессов ангиогенеза в данном случае была связана с повышением уровня мРНК HIF-1, VHL и VEGF в 5,92; 17,3 и 5,6 раза соответственно. Стоит отметить, что изменение состояния рецепторов стероидных гормонов отмечено при повышенном содержании мРНК транскрипционного фактора Brn-3α в 3,5 раза в трансформированной

ткани с мутантным белком b-RAF по сравнению пациентами без мутации *BRAFV600E*.

Показано, что активация транскрипционных, ростовых факторов, рецепторов стероидных гормонов связана с формированием инвазивного потенциала опухоли. Так повышение экспрессии транскрипционного фактора NF-κB в 2,1 раза и снижение экспрессии HIF-1 в 5,3 отмечалось в ткани опухоли с наличием признаков экстратироидного роста по сравнению с пациентами без инвазии, что сопровождалось снижением уровня мРНК VHL в 4,4 и повышением экспрессии CAIX в 1,7 раза. При этом выявлены изменения рецепторов стероидных гормонов, что было связано со снижением экспрессии AR и TRIM16 в 2,6 и 5,4 раза соответственно.

Обсуждение

Выявлены значимые ассоциации содержания мРНК и белкового продукта SRC-1 и SRC-3 с формированием инвазивного потенциала опухоли. Снижение уровня мРНК SRC-1 и SRC-3 было выявлено при фолликулярном подтипе опухоли, что свидетельствует о их роли в развитии агрессивных свойств опухоли. Стоит отметить, что распространение опухоли, увеличение размеров и развитие признаков инвазии в капсулу щитовидной железы протекало на фоне роста экспрессии и содержания белка SRC-3 в ткани опухоли.

При этом молекулярный портрет опухоли при наличии мутации *BRAFV600E* был связан с разнонаправленными изменениями экспрессии SRC-1 и SRC-3. Выраженный рост содержания белка SRC-3 выявлен в случае мутации, что приводило к гиперэкспрессии транскрипционных и ростовых факторов, опухолевой прогрессии и активации неоангиогенеза за счет увеличение уровня мРНК NF-κB, HIF-1, VHL и VEGF [8, 13]. Известно, что мутация *BRAFV600E* является ключевой в формировании агрессивного инвазивного и метастатического потенциала опухоли [2], что отмечалось в ранее проведенных исследованиях [4–5].

Вероятно, ко-активаторы стероидных рецепторов влияют на повышение содержания мРНК ростовых факторов за счет положительного влияния на экспрессию транскрипционных факторов NF-κB, *Brn-3α*. Подобное влияние в значительной степени обусловлено влиянием SRC-3 [8, 10]. Известен вклад исследуемых показателей в регуляцию транскрипции большинства факторов, занимающих ключевые позиции в онкогенезе при раке щитовидной железы [11]. Известно влияние *Brn-3α* на экспрессию рецепторов эстрогенов, что определяет прогноз заболевания [9]. При наличии мутации *BRAFV600E* отмечается преимущественное влияние фактора *Brn-3α* на рецепторный статус эстрогенов в опухоли.

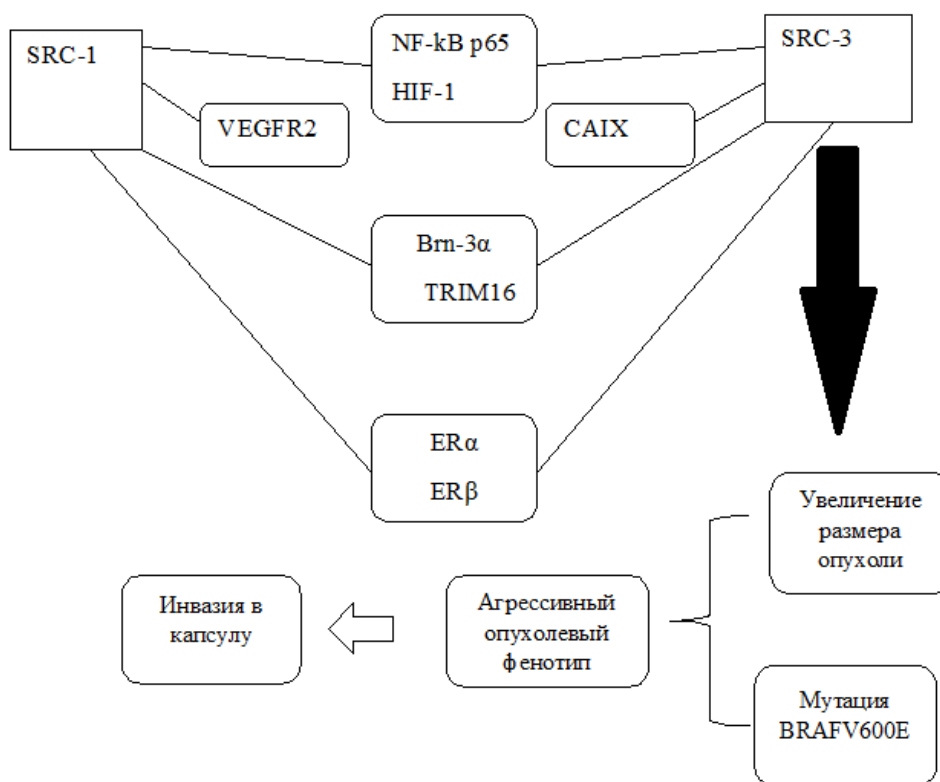


Рис. 2. Вклад ко-активаторов стероидных гормонов, транскрипционных, ростовых факторов и рецепторов стероидных гормонов в формировании инвазивного потенциала опухоли с учетом клинко-морфологических параметров опухоли

При наличии признаков инвазии опухоли в капсулу щитовидной железы были выявлены изменения транскрипционных и ростовых факторов NF-κB, HIF-1, CAIX на фоне снижения мРНК андрогенового рецептора и TRIM16. Приведенные данные свидетельствуют о снижении роли онкосупрессоров, что, возможно, способствует опухолевой прогрессии [6, 11]. Особенности гормональной рецепции относятся к малоизученным факторам опухолевой прогрессии при раке щитовидной железы, однако известно, что гормональный профиль связан с ростом опухоли и развитием регионарных метастазов [12]. Выявлено повышение мРНК рецепторов транскрипционных факторов Brn-3α и TRIM16 у больных с папиллярным раком щитовидной железы по сравнению с нормальной тканью [4-5], что указывает на их участие в процессах онкогенеза.

На рис. 2 представлены данные о вкладе коактиваторов стероидных гормонов, транскрипционных, ростовых факторов и рецепторов стероидных гормонов в формирование инвазивного потенциала опухоли. Выявлены особенности активации ростовых факторов для SRC. Экспрессия SRC-1 связана с уровнем мРНК VEGF, что сопровождается наличием мутации *BRAFV600E*. В то же время выявлена ассоциация между SRC-3 и CAIX, связанной с наличием признаков инвазии в капсулу щитовидной железы.

Известно, что инвазивный потенциал опухоли определяет прогноз заболевания в отношении развития рецидивов. Выявлена значимая роль высокого уровня SRC-3 в развитии признаков инвазии опухоли, ассоциированной с активацией каскада молекулярных факторов, в т. ч. за счет мутации *BRAFV600E*, влияющих на неоангиогенез, апоптоз и уход опухолевых клеток от иммунного надзора.

Конфликт интересов

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией данной статьи.

Финансирование

Исследование не имело спонсорской поддержки.

Участие авторов

Спирина Л.В., Ковалева И.В., Чойнзонов Е.Л. — разработка концепции, планирование и проведение эксперимента;

Чижевская С.Ю. — набор клинического материала и данных;

Спирина Л.В. — анализ полученных данных;

Спирина Л.В. — написание текста статьи, обзор публикаций по теме статьи;

Ковалева И.В., Кондакова И.В. — редактирование статьи и оформление.

ЛИТЕРАТУРА

1. Prete A, Borges de Souza P, Censi S, et al. Update on fundamental mechanisms of thyroid cancer. *Front Endocrinol.* 2020;11. doi:10.3389/fendo.2020.00102.
2. Keskin FE, Ozkaya HM, Ferahman S, et al. The role of different molecular markers in papillary thyroid cancer patients with acromegaly. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 2018;127(07):437–44. doi:10.1055/a-0629-9223.
3. Спирина Л.В., Чижевская С.Ю., Кондакова И.В. Экспрессия транскрипционных, ростовых факторов и компонентов АКТ/mTOR сигнального пути в ткани папиллярного рака щитовидной железы. *Проблемы эндокринологии.* 2018;64:208–215 [Spirina LV, Chizhevskaya SYu, Kondakova IV. Expression of transcription and growth factors and the AKT/m-TOR signaling pathway components in papillary thyroid cancer. *Problems of Endocrinology.* 2018;64(4):208–15 (In Russ.)]. doi:10.14341/probl9310.
4. Спирина Л.В., Чижевская С.Ю., Кондакова И.В., Чойнзонов Е.Л. Рецепция половых стероидных гормонов в ткани папиллярного рака щитовидной железы, связь с экспрессией и содержанием транскрипционных факторов Brn-3α и TRIM16. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* 2018;166:237–240 [Spirina LV, Chizhevskaya SYu, Kondakova IV, Choinzonov EL. Reception of sex steroid hormones in thyroid papillary cancer tissue and relationship with expression and content of transcription factors Brn-3α and TRIM16. *Bull Exp Biol Med.* 2018;166:237–240. (In Russ.)]. doi: 10.1007/s10517-018-4322-4.
5. Abdullah MI, Junit SM, Ng KL, et al. Papillary thyroid cancer: genetic alterations and molecular biomarker investigations. *Int J Med.* 2019;16(3):450–60. doi:10.7150/ijms.29935.
6. Spirina LV, Chizhevskaya SY, Kovaleva IV, Kondakova IV. The association of the BRAF-V600E mutation with the expression of the molecular markers in the primary tumor and metastatic tissue in papillary thyroid cancer. *asian pacific journal of cancer prevention.* 2021;22(7):2017–24. doi:10.31557/apjcp.2021.22.7.2017.
7. Walsh CA, Bolger JC, Byrne C, et al. Global gene repression by the steroid receptor coactivator SRC-1 promotes oncogenesis. *cancer research.* 2014;74(9):2533–44. doi:10.1158/0008-5472.can-13-2133.
8. Gao B, Guo L, Luo D, et al. Steroid receptor coactivator-1 interacts with NF-κB to increase VEGFC levels in human thyroid cancer. *Bioscience Reports.* 2018;38(3). doi:10.1042/bsr20180394.
9. Wu M-Y, Fu J, Xu J, et al. Steroid receptor coactivator 3 regulates autophagy in breast cancer cells through macrophage migration inhibitory factor. *Cell Res.* 2012;22(6):1003–21. doi:10.1038/cr.2012.44.
10. Spirina LV, Yunusova NV, Kondakova IV, et al. Transcription factors Brn-3α and TRIM16 in cancers, association with hormone reception. *Heliyon.* 2019;5(8):e02090. doi:10.1016/j.heliyon.2019.e02090.
11. Shrestha A, Bruckmueller H, Kildalsen H, et al. Phosphorylation of steroid receptor coactivator-3 (SRC-3) at serine 857 is regulated by the p38MAPK-MK2 axis and affects NF-κB-mediated transcription. *Scien-*

- tific Reports. 2020;10(1). doi:10.1038/s41598-020-68219-4.
12. Browne AL, Charmsaz S, Varešlija D, et al. Network analysis of SRC-1 reveals a novel transcription factor hub which regulates endocrine resistant breast cancer. *Oncogene* [Internet]. 2018;37(15):2008–21. doi:10.1038/s41388-017-0042-x.
13. Rajabi S, Dehghan MH, Dastmalchi R, et al. The roles and role-players in thyroid cancer angiogenesis. *Endocr J*. 2019;66(4):277–93. doi:10.1507/endocrj.ej18-0537.

Поступила в редакцию 01.02.2023
 Прошла рецензирование 10.04.2023
 Принята в печать 20.04.2023

Сведения об авторах

Спирина Людмила Викторовна, ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-5269-736X>, spirinalvl@mail.ru.
Ковалева Ирина Владимировна, ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-2964-9041>.
Чижевская Светлана Юрьевна, ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-2974-4778>.
Кондакова Ирина Викторовна, ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-0907-4615>.
Чойнзонов Евгений Лхаматсыренович, ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-3651-0665>.

Spirina Luidmila Viktorovna, ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-5269-736X>, email: spirinalvl@mail.ru.
Kovaleva Irina Vladimirovna, ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-2964-9041>.
Chizhevskaya Svetlana Yurievna, ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-2974-4778>.
Kondakova Irina Viktorovna, ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-0907-4615>.
Choynzonov Evgeny Lkhamatsyrenovich, ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-3651-0665>.