

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

Экспрессия VHL при опухолевой патологии щитовидной железы: связь с распространенностью процесса, экспрессией транскрипционных, ростовых факторов и компонентов АКТ/m-TOR сигнального пути

¹НИИ онкологии, Томский НИМЦ, г. Томск

²Сибирский государственный медицинский университет, г. Томск

Белок-онкосупрессор VHL играет решающую роль в механизмах опухолевой прогрессии. Развитие злокачественных новообразований щитовидной железы связано с активацией транскрипционных и ростовых факторов. Однако роль гена VHL в механизмах развития рака щитовидной железы практически не изучена. Цель проведенного исследования заключалась в изучении клинико-морфологических особенностей, экспрессии транскрипционных, ростовых факторов и компонентов АКТ/m-TOR сигнального пути у пациентов с папиллярным раком щитовидной железы в зависимости от уровня экспрессии гена VHL.

Материалы и методы. В исследование было включено 46 пациентов с опухолевой патологией щитовидной железы: 20 пациентов с доброкачественными опухолями щитовидной железы и 26 пациентов с папиллярным раком щитовидной железы T₁₋₄N₀M0. Уровень мРНК изучаемых генов определялся методом ПЦР в реальном времени. Мутацию BRAF-V600E определяли в аллель-специфичной ПЦР в режиме реального времени.

Результаты и их обсуждение. Уровень мРНК гена VHL был сравнимым в двух группах пациентов с опухолевой патологией щитовидной железы (в ткани папиллярного рака и в ткани доброкачественных опухолей), но зависел от распространенности процесса и статуса гена BRAF. При наличии мутации BRAF-V600E экспрессия VHL увеличивалась на 12,28 Усл. Ед. по сравнению с больными без данной соматической мутации. Выявлено, что экспрессия NF-κB p65, NF-κB p50, HIF-1, HIF-2, ростовых факторов VEGF и CAIX у пациентов в группе с уровнем VHL >1,0 Усл. Ед. повышена по сравнению с пациентами с уровнем VHL <1,0 Усл. Ед. Также зафиксировано снижение уровня мРНК PDK, c-RAF, mTOR, 70s 6 киназы, PTEN у пациентов с повышенным уровнем экспрессии VHL по сравнению с пациентами с экспрессией VHL <1,0 Усл. Ед.

Заключение. Таким образом, выявлено, что экспрессия VHL связана с опухолевой прогрессией при папиллярном раке щитовидной железы и наличием мутантного белка bRAF. Отмечены ассоциации между экспрессией гена VHL и уровнем мРНК транскрипционных и ростовых факторов.

Ключевые слова: рак щитовидной железы, белок фон Хиппель-Линдау, транскрипционные факторы, ростовые факторы, компоненты АКТ/mTOR сигнального пути, BRAF-V600E, распространенность процесса

Рак щитовидной железы — одна из самых распространенных опухолевых патологий. Формирование гипоксии является ключевым событием в онкогенезе и связано с соматическими мутациями генов RET1, BRAF-V600E [1]. Известно, что интенсивность процесса неоангиогенеза жестко регулируется протеасомальной деградацией факторов и связана с функциональной активностью белка фон Хиппель-Линдау (VHL) [2].

Белок-онкосупрессор VHL играет значимую роль в механизмах опухолевой прогрессии при папиллярном раке щитовидной железы [3]. Стоит отметить тот факт, что соматические мутации и гиперметилование промотора гена VHL не выявлены при папиллярном раке щитовидной железы [4]. Известно, что экспрессия VHL снижена в ткани папиллярного рака щитовидной железы и не связана с клинико-морфологическими параметрами, а также со статусом гена BRAF [5]. При этом отмечается, что низкая экспрессия данного белка характерна для агрессивных форм опухоли [4, 6].

Развитие злокачественных новообразований щитовидной железы связано с активацией транскрипционных и ростовых факторов. В ранее проведенных исследованиях было показано, что в ткани папиллярного рака щитовидной железы происходит рост экспрессии ядерных факторов NF-κB и HIF-2, а также компонентов внутриклеточных сигнальных каскадов — АКТ, PTEN, на фоне низкой экспрессии c-RAF [7]. При этом

тяжесть гипоксии и повышение экспрессии факторов, индуцированных гипоксией, — HIF-1 и HIF-2 в ткани папиллярного рака щитовидной железы, характеризующее биологическое поведение опухоли, связано с формированием агрессивного метастатического потенциала [8]. Известно, что экспрессия HIF-1 определяется не только развитием гипоксии, но и стимулируется *BRAFV600E*-ассоциированным внутриклеточным сигнальным каскадом MAPK [9]. В ранее проведенных исследованиях отмечена низкая экспрессия компонентов АКТ/mTOR сигнального каскада в ткани папиллярного рака, наиболее выраженная при наличии мутации *BRAF-V600E* [7, 10].

Известно, что уровень транскрипционного фактора NF-κB ассоциирован с опухолевой прогрессией и формированием регионарных метастазов [11, 12], что связано с активацией факторов, индуцированных гипоксией, сопровождаемый ростом сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGF) и карбоангидразы IX (CAIX) [13].

Имеются единичные данные о роли белка фон Хиппель-Линдау в регуляции экспрессии транскрипционных, ростовых факторов и компонентов внутриклеточных сигнальных каскадов. Известно, что при гипоксии изменение экспрессии компонентов АКТ/mTOR сигнального пути [14, 15], транскрипционных и ростовых факторов [16] происходит за счет прямого и непрямого влияния белка VHL на множество процессов онкогенеза (формирование воспаления, уход опухоли от иммунного надзора, развитие инвазивного потенциала опухоли и др.) и не ограничивается регуляцией протеосомальной деградации фактора HIF-1. В целом, роль изучаемого молекулярного маркера в развитии опухолевой патологии щитовидной железы, и его связь с молекулярными маркерами заболевания практически не изучена. Цель проведенного исследования заключалась в изучении клинико-морфологических особенностей, экспрессии транскрипционных, ростовых факторов и компонентов АКТ/m-TOR сигнального пути у пациентов с папиллярным раком щитовидной железы в зависимости от уровня экспрессии гена *VHL*.

Материал и методы

В исследование было включено 46 пациентов с опухолевой патологией щитовидной железы: 20 пациентов с доброкачественными опухолями щитовидной железы (средний возраст — 53,0±4,4 лет) и 26 пациентов с папиллярным раком щитовидной железы (средний возраст — 52,0±2,6 года) со стадией опухолевого процесса T₁₋₄N₀₋₂M₀. Всем пациентам было проведено оперативное лечение в клиниках НИИ онкологии Томского НИМЦ. Диагноз у всех больных был морфологически верифицирован.

Стадия T₁₋₂N₀₋₂M₀ наблюдалась у 24 пациентов, T₃₋₄N₀₋₂M₀ — у 2 пациентов. В зависимости от распространенности заболевания были выделены группы больных без регионарных метастазов и с наличием метастазов. Стадия T₁₋₄N₀M₀ была диагностирована у 18 больных, а T₁₋₄N₁₋₂M₀ — у 8 пациентов. У всех пациентов был верифицирован классический вариант папиллярного рака щитовидной железы. Мутация *BRAF-V600E* была выявлена у 15 пациентов, и 11 пациентов имели негативный *BRAF* статус. Пониженная экспрессия VHL была зафиксирована у 16 пациентов (<1,0 Усл. Ед.), повышенный уровень экспрессии (>1,0 Усл.Ед.) — у 10 больных.

Материалом исследования являлись образцы опухолевой и неизмененной ткани щитовидной железы, находящиеся на расстоянии не менее 1 см от границы опухоли, 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 FPET 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 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. CAIX: F 5'-GTTGCTGTCTC-GCTTGGAA-3', R 5'-CAGGGTGTGAGAGAGGGTGT-3'; HIF-1a: F 5'-CAAGAACCTACTGCTAATGCCA-3', R 5'-TTTGGTGAGGCTGTCCGA-3'; EPAS1: F 5'-TGGAG-TATGAAGAGCAAGCCT-3', R 5'-GGGAACCTGCTCTT-GCTGT-3'; NFKB1: F 5'-CGTGTAACCAAAAGCCCTA-AA-3', R 5'-AACCAAGAAAGGAAGCCAAGT-3'; RELA: F 5'-GGAGCACAGATACCACCAAGA-3', R 5'-GGGTT-GTTGTTGGTCTGGAT-3'; VEGFA: F 5'-AGGGCAGAAT-CATCACGAA-3', R 5'-TCTTGCTCTATCTTTCTTTG-GTCT-3'; KDR: F 5'-AACACACAGGAATCAGTCA-3', R 5'-GTG-GTGTCTGTGTCATCGGA-3'; 4E-BP1: F 5'-

CAGCCCTTTCTCCCTCACT -3¢, R 5¢- TTCCCAAGCA-CATCAACCT -3¢; AKT1: F 5¢- CGAGGACGCCAAGGAGA -3¢, R 5¢- GTCATCTTGGTCAGGTGGTGT -3¢; C-RAF: F 5¢- TGGTGTGCTCCTGCTCCCT -3¢, R 5¢- ACTGCCTGC-TACCTTACTTCCCT -3¢; GSK3b: F 5¢- AGACAAGGACG-GCAGCAA -3¢, R 5¢- TGGAGTAGAAGAAATAACGCAAT -3¢; 70S kinase alpha: F 5¢- CAGCACAGCAAATCCTCAGA -3¢, R 5¢- ACACATCTCCCTTCCACCTT -3¢; m-TOR: F 5¢- CCAAAGGCAACAAGCGAT-3¢, R 5¢- TTCACCAAAC-CGTCTCCAA -3¢; PDK1: F 5¢- TCACCAGGACAGCCAATA-CA -3¢, R 5¢- CTCCTCGGTCACTCATCTTCA -3¢; VHL F 5¢-GGCAGGCCGAATCTCTTGA-3¢, R 5¢-СТАТТТСТТ-ТАСТCAGCACCATT-3¢; GAPDH: F 5¢- GGAAGTCAG-GTGGAGCGA-3¢, R 5¢-GCAACAATATCCACTTTACCA-GA-3¢. 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/nucscore>).

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 $2\Delta\Delta Ct$ 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 экспрессии 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 Йетса.

Результаты исследования

Выявлено отсутствие различий по уровню мРНК гена VHL в ткани между группами пациентов с папиллярным раком и доброкачественными опухолями щитовидной железы (таблица 1). При этом отмечена связь изучаемого показателя с распространённостью процесса и поражением регионарных лимфоузлов. У пациентов с наличием лимфогенных метастазов выявлено повышение уровня мРНК гена VHL в 45,8 раза по сравнению с пациентами с локализованным процессом. Отмечен тот факт, что экспрессия VHL зависела от статуса исследованного варианта мутации, а именно BRAF-V600E. При наличии мутации показатель увеличивался на 12,28 Усл. Ед. по сравнению с больными без данной соматической мутации.

В табл. 2 представлены данные о связи клинико-морфологических параметров заболевания с повышенным и пониженным уровнем экспрессии VHL (менее и более 1,0 Усл. Ед.) в опухоли. Выявлено, что больные из двух изучаемых групп не различались по клинико-морфологическим параметрам (размер опухоли, наличие регионарных метастазов). Однако при наличии мутации BRAF-V600E количество пациентов с повышенной экспрессией было больше в 2,4 раза по сравнению больными с отрицательным статусом BRAF-V600E.

Таблица 1. Экспрессия VHL в ткани доброкачественных опухолей и папиллярном раке щитовидной железы, Me (Q1; Q3)

VHL, Усл. Ед.		
в зависимости от вида опухолевой патологии	Доброкачественные опухоли	Папиллярный рак щитовидной железы
	0,41 (0,02-56,59)	0,41 (0,02-41,00)
В зависимости от размера опухоли	$T_{1-2}N_0M_0$	$T_{3-4}N_{0-1}M_0$
	0,41 (0,02-53,59)	0,46 (0,00-101,00)
При прогрессировании и поражении регионарных лимфоузлов	Первичная опухоль без регионарных метастазов	Первичная опухоль с наличием регионарных метастазов
	1,17 (0,02-5,59)	53,59 (20,11-154,00)*
в зависимости от статуса гена BRAF-V600E	отсутствие мутации BRAF-V600E	наличие мутации BRAF-V600E
	0,02 (0,0; 0,35)	12,3 (1,02; 56,67)**

Примечание: * — значимость различий по сравнению с группой больных без регионарных метастазов, $p < 0,05$; ** — значимость различий по сравнению с группой больных без мутации BRAF-V600E, $p < 0,05$;

Таблица 2. Клинико-морфологические параметры больных с папиллярным раком щитовидной железы в зависимости от уровня экспрессии VHL, % (n)

Клинико-морфологические параметры	VHL <1,0 Усл. Ед.	VHL >1,0 Усл. Ед.	Значимость различий
В зависимости от стадии Т			$p = 0,318$
$T_{2-3}N_0M_0$	36% (n=9)	64% (n=15)	Критерий Хи-квадрат с поправкой Йейтса 0.997
$T_{3-4}N_0M_0$	100% (n=2)	0%(n=0)	
В зависимости от поражения регионарных лимфоузлов			$p = 0,510$
Без регионарных метастазов	16,7% (n=3)	83,3% (n=15)	Критерий Хи-квадрат с поправкой Йейтса 0.435
С наличием регионарных метастазов	37,5% (n=3)	62,5% (n=5)	
В зависимости от статуса гена BRAF-V600E			$P = 0.003$
Отсутствие мутации BRAF-V600E	11 (76%)	2 (24%)	Критерий Хи-квадрат с поправкой Йейтса 9.19
Наличие мутации BRAF-V600E	3 (42%)	12 (58%)	

Примечание: p — значимость различий;

Таблица 3. Экспрессия транскрипционных факторов, ростовых факторов и компонентов АКТ/mTOR сигнального пути в ткани папиллярного рака щитовидной железы в зависимости от уровня мРНК VHL, Me (Q1; Q3)

Показатель Усл. Ед.	VHL <1,0 Усл. Ед.	VHL >1,0 Усл. Ед.
Экспрессия транскрипционных факторов, ростовых факторов		
NF-κB p65	0,10 (0,00; 1,39)	8,69 (1,32; 36,00)*
NF-κB p50	0,51 (0,00; 7,39)	38,00 (1,40;145,00)*
HIF-1	0,06 (0,00-0,58)	3,85 (0,34-25,61) *
HIF-2	0,15 (0,005-1,43)	25,97 (0,67-48,53) *
VEGFR2	0,36 (0,02-3,65)	1,93 (0,05-8,51)
VEGF	0,05 (0,005-1,13)	7,89 (0,32-26,35) *
CAIX	0,30 (0,01-1,75)	2,94 (0,56-15,63)*
PDK	2,17 (0,29; 147,36)	0,15 (0,02; 1,90)*
Экспрессия компонентов АКТ/mTOR сигнального пути		
АКТ	2,73 (0,09; 14,67)	0,18 (0,01; 4,36)
c-RAF	4,47 (1,90; 31,44,)	0,03 (0,00; 1,44)*
GSK-3β	0,99 (0,39; 36,65))	0,21 (0,00; 1,39)
PTEN	6,78 (1,42; 48,00)	0,20 (0,02; 3,57)*
mTOR	8,40 (2,36; 107,01)	0,33 (0,01; 16,53)*
4EBP1	0,15 (0,01; 4,51)	0,33 (0,02; 1,99)
70s 6 киназа	4,14 (1,47; 31,4)	0,03 (0,00; 0,38)*

Примечание: * — значимость различий по сравнению с пациентами с уровнем VHL <1, p <0,05;

В табл. 3 представлены данные об экспрессии транскрипционных факторов и ростовых факторов в зависимости от уровня экспрессии VHL. Выявлено, что экспрессия NF-κB p65, NF-κB p50, HIF-1, HIF-2, ростовых факторов VEGF и CAIX у пациентов с уровнем VHL >1,0 Усл. Ед. выше в 86,0; 74,5; 64,1; 173, 1 и 157, 8; 9,8 раза, соответственно, по сравнению с пациентами с уровнем VHL <1,0 Усл. Ед.

Уровень мРНК компонентов АКТ/mTOR сигнального пути также зависел от экспрессии гена VHL (Таблица 3). Зафиксировано снижение уровня мРНК PDK, c-RAF, mTOR, 70s 6 киназы у пациентов с повышенным уровнем экспрессии VHL в 14,44; 149; 25,2 и 138 раз по сравнению с пациентами с экспрессией VHL <1,0 Усл. Ед. При этом отмечено снижение экспрессии фосфатазы PTEN в 33,9 раза у пациентов в исследуемых группах.

Обсуждение результатов исследования

Выявлена связь экспрессии гена VHL в ткани папиллярного рака щитовидной железы с развитием лимфогенных метастазов. Мутации гена VHL не обнаруживались при папиллярном раке щитовидной железы [4, 5]. Имеется ряд наблюдений, говорящих о том, что в ткани опухоли отмечается низкая экспрессия гена

VHL, что не связано с клинико-морфологическими параметрами заболевания [5]. Однако несколько авторов отметили связь изменения уровня мРНК гена VHL с агрессивностью заболевания [4, 6]. При этом в отличие от данных E. Baldini (2019) [5] в настоящей работе показана связь экспрессии VHL с мутацией гена *BRAF-V600E*.

В ранее проведенных исследованиях показано, что в ткани папиллярного рака щитовидной железы отмечается рост экспрессии транскрипционных и ростовых факторов на фоне снижения экспрессии компонентов АКТ/mTOR внутриклеточного каскада [7]. При этом отмечается, что при наличии варианта гена BRAF-V600E в опухоли экспрессия АКТ, c-RAF, GSK-3β снижалась, а уровень мРНК ядерных факторов NF-κB p65, HIF-1 и ростового фактора VEGF повышался [10].

Известно, что VHL способен не только регулировать содержание факторов, индуцированных гипоксией, но и влиять на продукцию ядерного фактора NF-κB [11, 12, 15, 16]. Именно уровень транскрипционного фактора NF-κB ассоциирован с опухолевой прогрессией, в том числе развитием инвазивного потенциала и формированием регионарных метастазов [11, 13]. Известно, что продукция HIF-1α регулируется не только гипоксией, но и компонентами BRAF-

V600E-ассоциированного внутриклеточного сигнального каскада [9]. Возможно, нарастание мРНК гена VHL, зафиксированное при наличии мутации гена *BRAF*, приводило к поражению регионарных лимфоузлов за счет влияния на значимые процессы опухолевой прогрессии, в том числе — формирование воспаления, развитие инвазивного потенциала опухоли. В связи с этим становятся более понятным и молекулярные основы развития заболевания при участии транскрипционных и ростовых факторов и их связь с экспрессией гена VHL.

Заключение

Таким образом, выявлено, что экспрессия VHL связана с опухолевой прогрессией при папиллярном раке щитовидной железы. Рост показателя был связан с распространением процесса и наличием мутантного белка *bRAF* (вариант V600E). Показано, что экспрессия гена VHL в ткани опухоли ассоциирована с уровнем транскрипционных, ростовых факторов и компонентов АКТ/mTOR сигнального пути.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

ЛИТЕРАТУРА

- Li D.D., Zhang Y.F., Xu H.X. et al. The role of BRAF in the pathogenesis of thyroid carcinoma. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2015;20:1068-1078.
- Koperek O., Bergner O., Pichlhöfer B. et al. Expression of hypoxia-associated proteins in sporadic medullary thyroid cancer is associated with desmoplastic stroma reaction and lymph node metastasis and may indicate somatic mutations in the VHL gene. *J Pathol*. 2011;225(1):63-72. doi:10.1002/path.2926.
- Todorović L., Stanojević B., Mandušić V. et al. Expression of VHL tumor suppressor mRNA and miR-92a in papillary thyroid carcinoma and their correlation with clinical and pathological parameters. *Med Oncol*. 2018;35(2):17. doi:10.1007/s12032-017-1066-3.
- Stanojevic B., Saenko V., Todorovic L. et al. Low VHL mRNA expression is associated with more aggressive tumor features of papillary thyroid carcinoma. *PLoS One*. 2014;9(12):e114511. doi:10.1371/journal.pone.0114511.
- Baldini E., Tuccilli C., Arlot-Bonnemains Y. et al. Deregulated expression of VHL mRNA variants in papillary thyroid cancer. *Mol Cell Endocrinol*. 2017;443:121-127. doi:10.1016/j.mce.2017.01.019.
- Rossi E.D., Martini M., Bizzarro T. et al. Uncommon BRAF mutations in the follicular variant of thyroid papillary carcinoma: New insights. *Cancer Cytopathol*. 2015;123(10):593-602. doi:10.1002/cncy.21586.
- 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; 64(4): 208-215. doi: 10.14341/probl9310 [Spirina L.V., Chigevskaya S.Yu., Kondakova I.V. Expression of transcription, growth factors and components of AKT/m-TOR signaling pathway in papillary thyroid cancers. *Problems of Endocrinology*. 2018;64(4):208-215. doi: 10.14341/probl9310 (in Russ.)].
- Liu Y.M., Ying S.P., Huang Y.R. et al. Expression of HIF-1 α and HIF-2 α correlates to biological and clinical significance in papillary thyroid carcinoma. *World J Surg Oncol*. 2016;14(1):30. doi:10.1186/s12957-016-0785-9.
- Zerilli M., Zito G., Martorana A. et al. BRAF(V600E) mutation influences hypoxia-inducible factor-1 α expression levels in papillary thyroid cancer. *Mod Pathol*. 2010;23(8):1052-1060. doi:10.1038/modpathol.2010.86.
- Спирина Л.В., Чижевская С.Ю., Кондакова И.В. и др. Связь мутации BRAF-V600E с экспрессией транскрипционных, ростовых факторов, компонентов АКТ/m-TOR сигнального пути в ткани папиллярного рака щитовидной железы. *Вопросы онкологии*. 2019;65(4): 608-613 [Spirina L.V., Chigevskaya S.Yu., Kondakova I.V. et al. 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. *Problems in Oncology*. 2019;65(4): 608-613 (in Russ.)].
- Le F., Zhang J.Y., Liu W. et al. The levels of NF- κ B p50 and NF- κ B p65 play a role in thyroid carcinoma malignancy in vivo. *J Int Med Res*. 2018;46(10):4092-4099. doi:10.1177/0300060518785846.
- Park A., Lee Y., Kim M.S. et al. Prostaglandin E2 Secreted by Thyroid Cancer Cells Contributes to Immune Escape Through the Suppression of Natural Killer (NK) Cell Cytotoxicity and NK Cell Differentiation. *Front Immunol*. 2018;9:1859. doi:10.3389/fimmu.2018.01859.
- Azoitei N., Becher A., Steinestel K. et al. PKM2 promotes tumor angiogenesis by regulating HIF-1 α through NF- κ B activation. *Mol Cancer*. 2016;15:3. doi:10.1186/s12943-015-0490-2.
- Sun X., Feinberg M.W. NF- κ B and hypoxia: a double-edged sword in atherosclerosis. *Am J Pathol*. 2012;181(5):1513-1517. doi:10.1016/j.ajpath.2012.09.001.
- Labrousse-Arias D., Martínez-Alonso E., Corral-Escariz M. et al. VHL promotes immune response against renal cell carcinoma via NF- κ B-dependent regulation of VCAM-1. *J Cell Biol*. 2017;216(3):835-847. doi:10.1083/jcb.201608024.
- Спирина Л.В., Слонимская Е.М., Юрмазов З.А. и др. Роль ядерного фактора NF- κ B и белка фон Хиппель-Линдау в формировании молекулярного портрета опухоли почки. *Молекулярная медицина*. 2019; 17(3):15-19. doi: 10.29296/24999490-2019-03-03 [Spirina L.V., Slonimskaya E.M., Yurmazov Z.A. et al. The role of TNF- κ B and Hippel-Lindau protein in the creation of a molecular portrait of kidney cancers. *Molekulyarnaya meditsina*. 2019; 17 (3): 15-19. https://doi.org/10.29296/24999490-2019-03-03(in Russ.)].

Поступила в редакцию 03.07.2020 г.

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

VHL expression in case of thyroid tumor pathology: connection with the prevalence of the disease, expression of transcription, growth factors and components of the AKT / m-TOR signaling pathway

¹Cancer Research Institute, Tomsk National Research Center, Russian Academy of Medical Sciences, Tomsk,
²Siberian State Medical University, Tomsk

Introduction. The oncosuppressor protein VHL plays a decisive or at least important role in the mechanisms of tumor progression. The development of malignant neoplasms of the thyroid gland is associated with the activation of transcriptional and growth factors. However, the role of the VHL gene in the mechanisms of the development of thyroid cancer has hardly been studied.

The study aimed to study the clinical and morphological features, expression of transcription, growth factors, and components of the AKT / m-TOR signaling pathway in patients with papillary thyroid cancer depending on the level of expression of the VHL gene.

Material and methods. The study included 46 patients with tumor pathology of the thyroid gland: 20 patients with benign thyroid tumors and 26 patients with papillary thyroid cancer T1-4N0-2M0. The expression of parameters was determined by PCR in real-time. Mutation *BRAF-V600E* was determined in allele-specific PCR in real-time.

Results and their discussion. The mRNA level of the VHL gene remained virtually unchanged in the tissue of papillary cancer and benign thyroid tumors. It depended on the prevalence of the disease, the defeat of regional lymph nodes, and the *BRAF-V600E* status. In the presence of the *BRAF-V600E* mutation, VHL expression increased 615 times in patients with a mutation compared with patients without this somatic mutation. It was revealed that the expression of NF-κB p65, NF-κB p50, HIF-1, HIF-2, growth factors VEGF and CAIX in patients in the group with a VHL level > 1.0 RU increased compared with patients with a VHL level <1.0 RU. A decrease in PDK, c-RAF, mTOR, 70s 6 kinase, PTEN mRNA levels were also recorded in patients with increased levels of VHL expression compared with patients with VHL expression <1.0 RU.

Conclusion. That the association of the VHL expression with tumor progression in papillary thyroid cancer and the mutant protein BRAF presence was found. Also, associations between the VHL expression and the level of mRNA of transcription and growth factors are noted.

Key words: thyroid cancer, von Hippel-Lindau protein, transcription factors, growth factors, components of the AKT / mTOR signaling pathway, *BRAF-V-600E*, cancer spread