

АННОТАЦИЯ

Крыкпаева Айнур Сериковна

Тема диссертации на соискание ученой степени
доктора философии (PhD):

**«Ранняя диагностика рака щитовидной железы на молекулярно-
генетическом уровне»**

Специальность: 6D110100 – «Медицина»

Научные руководитель: д.м.н., профессор М.Ж. Еспенбетова

Научные консультанты: MD, PhD, профессор М. Накашима,
MD, PhD, Ж.Б. Мусажанова

Актуальность темы: Рак щитовидной железы (РЩЖ) занимает в современной онкологии особое место по нескольким причинам. Во-первых, отмечается тенденция его увеличения в связи с внедрением обязательной биопсии у всех больных с узлообразованием более 1 см [Довыденко Е.И. 2018] во-вторых наша территория является неблагоприятной в отношении радиационного фона и йодной обеспеченности [Еспенбетова М.Ж., 2018].

Рост различных форм патологии щитовидной железы в Казахстане напрямую связан с воздействием природных, экологических факторов. По данным мировой литературы на долю РЩЖ приходится до 3% всех злокачественных опухолей, а как известно, смертность от онкологических заболеваний занимает второе место в мире [Дедов И.И., 2000; Filie A., 1999, Абдрашитова А.Т., 2018].

По данным Всемирной Организации Здравоохранения (ВОЗ) патология щитовидной железы встречается у 8 – 18% взрослого населения земного шара, а это примерно у 1,5 миллиарда человек. Самой часто встречаемой патологией щитовидной железы (ЩЖ) является узлообразование [Атантаева Б.Ж., 2000, Василькова О.Н., 2019], которое считается как доклиническим собирательным понятием, включающий в себя ряд различных заболеваний щитовидной железы, сопровождающиеся образованием узлов это – доброкачественные узловые образования такие как узловые коллоидные, кисты щитовидной железы, «псевдоузлы» при гипертрофической форме аутоиммунного тиреоидита (АИТ), аденомы щитовидной железы и злокачественные опухоли щитовидной железы [Дедов И.И., 2003]. По данным ВОЗ среди эндокринных заболеваний патология щитовидной железы занимает второе место после сахарного диабета. В мире более 665 млн. человек имеют эндемический зоб или заболевают другими тиреоидными патологиями, 1,5 млрд. человек сталкиваются с риском развития йододефицитных заболеваний. При этом согласно мировой статистике прирост числа заболеваний щитовидной железы в мире составляет 5% в год. Злокачественные опухоли ЩЖ составляют 1-3% в структуре онкологических патологии [Ольшанский В.О., 1996]. По прогнозам ВОЗ заболеваемость и смертность от онкологических заболеваний может увеличиться к 2020 году еще в 2 раза, что связано с поздним выявлением опухолей и отсутствием гарантированного доступа людей к современным методам диагностики и лечения рака. В настоящее время диагностика и прогноз течения большинства онкологических заболеваний основываются на данных инструментальных методов исследования, что не всегда позволяет правильно оценить прогноз заболевания и возможности лечения, поэтому исследование молекулярно-генетических причин их возникновения является одной из наиболее актуальных проблем здравоохранения. Несмотря на значительный прогресс в идентификации генов, принимающих участие в злокачественной трансформации клеток, до сих пор не существует системы маркеров для оценки риска развития рака щитовидной железы в общей популяции. В последние годы было установлено, что процесс злокачественной

трансформации клеток может происходить как в результате генетических событий (делеции, точковые и миссенс-мутации, реаранжировка генов), так и в результате эпигенетических изменений, поэтому актуальным является комплексный анализ механизмов инактивации генов, вовлеченных в патогенез рака щитовидной железы.

Учитывая растущую распространенность злокачественной патологии, молодого и трудоспособного возраста большинства пациентов, становится все более необходимым совершенствование методов и подходов к диагностике. Верификация карцином ЩЖ, особенно дифференцированных форм сложна, в связи с неоднородностью их гистологического строения и сложной дифференцировкой опухолевых клеток [Рожкова Е.Б., 2007]. ВОЗ рекомендует использовать сочетание морфологического метода с молекулярно-биологическими и генетическими с определением биомолекулярных маркеров опухоли как новый подход к диагностике РЩЖ. Изучение биомолекулярных маркеров и генетической нестабильности в ПРЩЖ имеет важное значение для определения ее злокачественного потенциала и выбора терапии.

Для всестороннего и комплексного изучения рака щитовидной железы эпидемиологами, клиницистами, генетиками создан международный консорциум для проведения масштабных исследований, в том числе и полногеномного анализа ассоциаций (Genome-wide Association Studies, GWAS), который является одним из современных методов исследований, связанных с поиском ассоциаций между геномными вариантами и фенотипическими признаками. На сегодняшний день во всем мире проводятся исследования, направленные на поиск генов, отвечающих за формирование предрасположенности к РЩЖ. С помощью GWAS выявлены ассоциации с предрасположенностью РЩЖ на хромосомах 8q12 (ген NRG1) [Wang et al., 2013], 9q22 (ген FOXE1) [Matsuse M et al., 2011], 14q13 (NKX2-1) [Gudmundsson et al., 2009]. Данные работы вносят большой вклад в понимание патогенеза заболевания и играют важную роль для подбора тактики лечения. Вышесказанное позволяет учесть частоту и характеристику клинического течения ПРЩЖ на ранних стадиях и обнаруживаемость мутации гена FOXE1 (rs 965513) и NKX2-1(rs 944289) у коренного этноса Казахстана. Важно учитывать, что существует значительное своеобразие генофонда населения Республики Казахстан, формирование которого имеет длительную и сложную историю, что должно отражаться на структуре заболеваемости онкопатологиями, в том числе и рака щитовидной железы. На основании всего вышеизложенного нами были сформулированы цель и задачи исследования.

Вышесказанное позволяет учесть частоту и характеристику клинического течения ПРЩЖ на ранних стадиях, обнаруживаемость мутации генов FOXE1 (rs 965513) и NKX2-1(rs 944289) в казахской популяции.

Цель работы: Выявить связь однонуклеотидных полиморфизмов генов FOXE1 (rs 965513) и NKX2-1(rs 944289) у больных с папиллярным раком щитовидной железы среди казахской популяции, для использования в качестве дополнительных диагностических маркеров и выбора персонализированной тактики лечения.

Задачи:

1. Провести эпидемиологическую оценку злокачественных опухолей щитовидной железы по Восточно-Казахстанской области.

2. Изучить частоту встречаемости полиморфизмов генов NKX2-1 (rs944289) и FOXE1(rs 965513) в исследуемых группах казахской популяции.

3. Проанализировать ассоциацию полиморфизмов генов NKX2-1 (rs944289) и FOXE1 (rs 965513) с папиллярным раком щитовидной железы в казахской популяции.

4. Разработать алгоритм диагностики новообразования ЩЖ на основе молекулярно-генетических исследований.

Научная новизна исследования

Впервые в Казахстане определена частота встречаемости аллелей и генотипов полиморфизмов генов FOXE1(rs 965513) и NKX2-1(rs944289) у больных с папиллярным раком щитовидной железы и контрольной группы среди казахской популяции, проведенным исследованием установлена связь онкогенов, позволяющая прогнозировать предрасположенность к развитию ПРЩЖ у коренного этноса Казахстана.

Практическая значимость

Результаты проведенного исследования могут служить основой для определения предрасположенности к развитию папиллярного рака щитовидной железы так как полиморфизмы генов FOXE1 (rs965513) и NKX2-1 (rs944289) являются наиболее значимыми генетическими предикторами рака ЩЖ. Полиморфизмы генов FOXE1 (rs965513) и NKX2-1 (rs944289) можно использовать как дополнительный диагностический маркер для определения персонализированной тактики послеоперационного лечения.

Основные положения диссертационного исследования, выносимые на защиту:

1. Показатели частоты РЩЖ по Восточно-Казахстанской области имеют тенденцию к увеличению. Средний возраст максимальной частоты выявления рака щитовидной железы составил 54 ± 10 лет, причем у женщин в 12 раз чаще, чем у мужчин.

2. Для дополнительной диагностики ПРЩЖ на молекулярно-генетическом уровне в качестве подтверждающего критерия служит носительство неблагоприятных аллелей полиморфизмов генов FOXE1 (rs965513) и NKX2-1 (rs 944289) «А» и «Т» соответственно.

3. Учитывая отсутствие значимых популяционных отличий по данным GWAS в генах FOXE1 (rs965513) и NKX2-1 (rs944289), они могут

быть использованы в качестве генетических предикторов ПРЦЖ в казахской популяции.

4. Алгоритм диагностики новообразования ЩЖ на основе молекулярно-генетических исследований способен стать надежным вспомогательным методом прогнозирования ПРЦЖ в повседневной клинической практике.

Личный вклад автора

Автором самостоятельно проанализирована научная литература по теме диссертации, а также данные статистики региональных онкологических диспансер Восточно-Казахстанской области. Диссертантом лично проведено выделение ДНК и генотипирование, обобщены результаты, выполнено статистическое вычисление полученных данных. Все разделы диссертации цели, задачи и программы исследования, сбор и обработка материала, разработка основных положений диссертации, заключения, выводы и практические рекомендации сформулированы и написаны автором самостоятельно.

Публикации по теме диссертации

По исследуемой работе имеются 14 публикации, из них 1 статья в издании индексируемой в базе Scopus (журнал «Вестник РАМН» (Российской академии медицинских наук)), 4 в изданиях, рекомендованных Комитетом по контролю в сфере образования и науки МОН РК (2 статьи в журнале «Медицина» и 2 статьи в журнале «Наука и здравоохранение»); 9 тезисов в сборниках международных конференции.

По данной работе было получено свидетельство о государственной регистрации прав на объект авторского права «Ранняя диагностика рака щитовидной железы на молекулярно-генетическом уровне» № Гос. Регистрации № 2343 от 17 июля 2018г и два удостоверения на рационализаторские предложения.

Апробация работы

Результаты исследования были доложены на международных конференциях, с последующей публикацией тезиса в сборниках конференции в том числе в материалах международных конференции в дальнем зарубежье «European Public Health Conference Health in Europe – from global to local policies, methods and practices» Милан, Италия, 2015г., «Japan Endocrine Society Annual Meeting» Токио, Япония 2016г., The 12 th Asia and Oceania Thyroid Association Congress» Пусан, Корея, 2017г., XIV Международная (XXIII Всероссийская) Пироговская научная медицинская конференция студентов и молодых ученых, Москва, Россия, 2019г; На конференциях республиканского уровня международного значения: XII Международная научно – практическая конференция «Экология. Радиация. Здоровье», Семей 2016; Международная научно-практическая конференция молодых ученых «Наука и здоровье», Семей 2016.

Результаты нашей работы также были доложены на съезде Ассоциации эндокринологов ВКО г.Семей, май 2017г.

Внедрение результатов исследования

Материалы и результаты исследования внедрены в практическое здравоохранение и в учебный процесс кафедры персонизированной медицины и эндокринологии Некоммерческого акционерного общества «Медицинский университет Семей».

Финансирование. Исследовательская работа выполнена при финансовой поддержке Института изучения заболеваний, вызванных атомной бомбардировкой атомной бомбардировкой, Университета Нагасаки (Нагасаки, Япония)

Материалы и методы исследования

Нами было проведено аналитическое ретроспективное исследование типа «случай-контроль», позволяющее ретроспективно оценить ассоциацию полиморфизма генов NKX2-1(rs944289) и FOXE1(rs 965513) и папиллярного рака щитовидной железы в казахской популяции.

Каждый из участников исследования дал письменное информированное согласие на участие в исследовании, в том числе на забор крови для генетического исследования. Протокол работы был одобрен локальным Этическим комитетом Государственного медицинского университета города Семей №2 от 18.03.2015г. Исследовательская работа выполнена в соответствии с принципами Хельсинской Декларации.

В качестве объекта исследования участвовали 1493 лиц казахской национальности, из них 485 человек с ПРЩЖ составили основную группу и 1008 здоровых лиц, представили контрольную группу. Средний возраст $44,14 \pm 16,76$ лет. Набор групп, сбор данных и забор биологического материала для исследования проводился с сентября 2014 года по август 2015 года. Молекулярное исследование было начато с сентября 2015 года и продолжалось на протяжении двух лет.

Каждый из участников исследования дал письменное информированное согласие на участие в исследовании, в том числе на забор венозной крови в объеме 5 мл в вакуумные пробирки К2/К3 с ЭДТА (этилендиаминтетрауксусная кислота) для генетического исследования. Для всех исследуемых проводили комплексное обследование: пальпация щитовидной железы, УЗИ ЩЖ, гормональное исследование гипофиза и ЩЖ с помощью иммуноферментного анализатора.

Формирование группы случаев производилось среди взрослых лиц казахской популяции, состоящих на учете с диагнозом ПРЩЖ в региональных и городских онкологических диспансерах (г.Усть-каменогорск, г.Семей г.Алматы, г.Астана). Диагноз ПРЩЖ был верифицирован гистологически.

Контрольная группа состояла из 1008 здоровых людей казахской популяции, отобранных случайным образом согласно данных организаций первичной медико-санитарной помощи и проживающих на территории вышеуказанных городов и регионов.

Критериями включения в контрольную группу были следующие условия:

- 1) Лица казахской популяции
- 2) Отсутствие увеличения объема щитовидной железы по данным пальпации;
- 3) Отсутствие узловых образований и гипоэхогенности структуры щитовидной железы по данным ультразвукового исследования (УЗИ);
- 4) Уровень тиреоидных гормонов в пределах нормальных значений;
- 5) Отсутствие беременности;
- 6) Отсутствие в анамнезе данных о патологии щитовидной железы и/или о получении препаратов йода, тиреоидных гормонов.

Предметом исследования была периферическая кровь, сыворотка, ДНК для исследования распространенности различных вариантов полиморфизмов FOXE1(rs 965513) (генотипов GG, GA и AA) и NKX2-1(rs944289) (генотипов CC, CT, TT) у больных с папиллярным раком щитовидной железы и в контрольной группе здоровых людей.

Для определения гормонального статуса использована сыворотка, полученная из 5 мл венозной крови исследуемых. Анализ проводился иммуноферментным методом на анализаторе «Hoffman Le Roshe» Швейцария, с использованием набора реагентов в биохимической лаборатории консультативно-диагностической лаборатории «In vitro» г.Семей.

Для типирования полиморфизмов генов FOXE1 и NKX2-1 были использованы препараты ДНК цельной крови.

Анализ полиморфизма проводился методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в лаборатории молекулярной генетики Института болезней атомной бомбардировки Нагасакского университета (Нагасаки, Япония).

Выделение ДНК проводили с использованием набора QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN, Japan) в соответствии с инструкцией изготовителя.

Качественный и количественный анализ ДНК был выполнен нанодропом NanoDrop 1000 (Thermo Scientific, Валтам, США);

Генотипирование проводили методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени (real-time PCR) на приборе Light Cycler 480 II (Roche, Индианаполис, США).

Для статистической обработки данных использовали критерий χ^2 Пирсона и отношения шансов (ОШ) с 95% доверительными интервалами (ДИ). Анализ ассоциации вариантов полиморфизмов FOXE1 (GG, GA и AA) и NKX2-1 (CC, CT и TT) с ПРЦЖ проведен с помощью расчета отношения шансов (Odds Ratio – OR) и его 95% ДИ (доверительного интервала (95% Confidence Interval – CI)). OR = 1 рассматривали как отсутствие ассоциации, OR > 1, как положительную ассоциацию с риском развития ПРЦЖ и OR < 1, как отрицательную ассоциацию с риском развития ПРЦЖ. Критический уровень статистической значимости различий был установлен на уровне $p < 0,05$. Статистический анализ выполнен с помощью IBM SPSS Statistics

Version 20 (International Business Machines Corp., Армонк, США), WINPEPI и SPSS 20.0 (Государственный медицинский университет города Семей). Мета-анализ исследований генетических ассоциаций риска проводили в программе Review Manager (RevMan 5), Cochrane Collaboration.

Результаты

Эпидемиологическая оценка злокачественных опухолей щитовидной железы по Восточно-Казахстанской области

Для реализации поставленной задачи диссертационного исследования по изучению эпидемиологических особенностей патологии ЩЖ в восточном регионе Казахстана нами было организовано поперечное эпидемиологическое исследование показателей заболеваемости и смертности от рака щитовидной железы у населения Восточно-Казахстанской области за период с 2011 по 2015 год.

Для выполнения работы служили учетно-отчетные данные Восточно-Казахстанского областного онкологического диспансера г.Усть-Каменогорск и регионального онкологического диспансера г.Семей. Базой данных о случаях заболеваемости, смертности и дифференциации стадий служит общий для ВКО территориальный раковый регистр.

Нами были рассчитаны грубые показатели заболеваемости и смертности от РЩЖ за 5-летний период наблюдения, в расчете на 100 тыс.населения. В Республике Казахстан (РК), наблюдается рост заболеваемости РЩЖ с 2,5 на 100 тыс.населения в 2011 г. до 3,5 на 100 тыс.населения в 2015 г., что соответствует 411 новым случаям РЩЖ в 2011 г. и 619 – в 2015 г. в абсолютных цифрах. Анализ показателей заболеваемости по Восточно-Казахстанской области (ВКО) за 5 лет выявил динамику роста заболеваемости РЩЖ по области с 2,9 на 100 тыс.населения в 2011 г. до 4,2 на 100 тыс.населения в 2015г. Тренд прироста составил +0,39. Аналогичная картина за исследуемый период наблюдалась и в Республике Казахстан, где также отмечалось повышение грубого показателя заболеваемости РЩЖ с тенденцией роста +0,25.

Грубый показатель смертности РЩЖ в РК и ВКО за 2011-2015 годы демонстрирует относительно стабильную картину с небольшим колебанием 0,6‰ до 0,4‰ в ВКО и на республиканском уровне – 0,5‰.

Анализ заболеваемости РЩЖ в зависимости от пола показал, что в 92% всех случаев РЩЖ обнаруживается у лиц женского пола.

По результатам анализа средний возраст больных с впервые установленным диагнозом РЩЖ составил 54±10 лет. Наибольший удельный вес диагноза РЩЖ в ВКО за период с 2014 по 2015 гг. приходился на группу 50-59 лет и составил 29,79%.

Анализ связи онкогенов FOXE1 (rs965513) и NKX2-1 (rs944289) с папиллярным раком щитовидной железы в казахской популяции

Непосредственно генетический блок исследований был посвящен анализу связи онкогенов FOXE1 и NKX 2-1 с папиллярным раком

щитовидной железы в казахской популяции. Прежде всего, следует сказать, что NKX2-1 (NK2 homeobox 1), является первым щитовидно-транскрипционным фактором (TTF1-Thyroid Transcription Factor1) и FOXE1 (Forkhead box factor E1) также называют вторым щитовидно-транскрипционным фактором (TTF2-Thyroid Transcription Factor 2) убедительные кандидаты, связанные с дифференцированными злокачественными новообразованиями щитовидной железы в различных популяциях из-за их роли в генезе щитовидной железы.

Нами было проведено молекулярно-генетическое исследование на полиморфизмы генов FOXE1 (rs965513) и NKX2-1 (rs944289) у всех участников исследования. Для генотипирования из крови успешно выделено ДНК 1493 участников: у 485 лиц с РЩЖ и у 1008 условно здоровых лиц. Общая половозрастная характеристика исследования представлена в таблице 1.

Таблица 1 – Половозрастная характеристика групп исследования, n=1493

	Случаи (ПРЩЖ)	Контроль (здоровые лица)
Количество наблюдений, абс.ч.	485	1008
Возрастной диапазон, лет	18-87	17-83
Средний возраст, лет	54,8±13,26	39,02±15,84
Мужчины, %	9,7	21,3
Женщины, %	90,3	78,7

Соотношение количества наблюдений в группах исследования примерно составило 1 случай к 2 контролям не подобранным по полу и возрасту. Минимальный и максимальный возраст исследуемых находился в эквивалентных границах, от 18 до 87 лет в группе случаев и от 17 до 83 лет в группе контролей. Средний возраст 54,8±13,26 лет и 39,02±15,84 лет соответственно. Превалирующую часть в группе больных ПРЩЖ составили женщины (90,3%) против числа лиц мужского пола (9,7%). В группе контролей, также большая часть наблюдений была представлена женщинами (78,7%) и менее трети составили мужчины (21,3%).

Для решения поставленной задачи проводился сравнительный анализ распространенности аллелей полиморфизма FOXE1 (rs965513) генотипы GG, GA, AA и NKX2-1(rs944289) генотипы CC, CT, TT у больных с ПРЩЖ и в контрольной группе здоровых людей казахской популяции. Для сравнения уровня FOXE1 в зависимости от генотипа 485 больных папиллярным раком щитовидной железы и 1008 лиц группы контроля генотипированных по однонуклеотидному полиморфизму (rs 965513) гена FOXE1 были разделены на подгруппы в зависимости от того носителем каких генотипов они являются: группа носителей генотипа FOXE1 (rs 965513) AA, группа носителей FOXE1 (rs 965513) GG и группа с гетерозиготным вариантом FOXE1 (rs 965513) GA.

Аналогичные подгруппы были сформированы для сравнения уровня NKX2-1 в пределах генотипов (NKX2-1 rs944289 CC, TT, TC) из этих же групп генотипированных по полиморфизму (rs 944289) гена NKX2-1.

Определение частоты ассоциации ОНП FOXE1 rs965513 и NKX2-1 rs944289 с папиллярным раком ЩЖ проводилось методом многофакторного логистического регрессионного анализа в мультипликативной модели наследования.

Частота встречаемости аллелей полиморфизма гена FOXE1 (rs965513) в казахской популяции

В различных популяционных исследованиях (GWAS SNP) вблизи FOXE1 rs965513 гена при изучении восприимчивости к ПРЦЖ была обнаружена связь с носительством минорного аллеля «А». В нашем исследовании было выявлено доли аллеля «А» ведущее к увеличению его носительства, как в гомозиготном состоянии (генотип AA), так и гетерозиготном (генотипа GA).

Распределения частот полиморфизма FOXE1 rs965513 в группе ПРЦЖ и группе контролей, представленных здоровыми лицами статистически значимо отличалось ($\chi^2=100,09$; D.f.=2; p=0,000). В группе случаев ПРЦЖ более, чем в три раза чаще встречался генотип AA (17,5%) против группы контролей (5,1%). Носительство генотипа GA в группе случаев встречалось в 44,5% наблюдений и в группе контролей в 33,5%. Вариант GG имел меньшую частоту встречаемости в группе лиц с ПРЦЖ (37,9%) по сравнению с группой контролей (61,4%) (таблица 2).

Таблица 2 – Частота полиморфизма FOXE1 rs965513 в группах исследования, n=1493

Полиморфизм FOXE1 rs965513	ПРЦЖ, абс. число (%)	Здоровые, абс. число (%)	χ^2	D.f.	p-оценка
GG	184 (37,9)	619 (61,4)	100,09	2	0,000
GA	216 (44,5)	338 (33,5)			
AA	85 (17,5)	51 (5,1)			
Всего	485 (100,0)	1008 (100,0)			

Примечание - χ^2 – Хи-квадрат, D.f. - Degrees of freedom (степени свободы), p – статистический уровень значимости

С целью определения степени ассоциации носительства FOXE1 rs965513 с риском развития ПРЦЖ нами был произведен расчет отношения шансов (ОШ) в группах ПРЦЖ и здоровых лиц. Таким образом, ОШ для казахской популяции составил 2,367 (95% CI:2,0044-2,796), что соответствует увеличению шансов развития ПРЦЖ у носителей аллеля «А» FOXE1 rs965513 в 2,367 раза. При сравнении ассоциации носительства FOXE1 rs965513 в других популяциях (японцев, исландцев, немцев) нами не было найдено значимых популяционных отличий, так как в каждом из

исследований данный ген выступал в роли фактора риска развития ПРЦЖ (ОШ>1) (таблица 3).

Таблица 3 – Ассоциация rs965513 (9q22.33, FOXE1) с ПРЦЖ в казахской и других популяциях

Популяция	Частота аллеля «А» FOXE1 rs965513		ОШ	95% ДИ		р-оценка
	ПРЦЖ	Здоровые		Верхний	Нижний	
Казахи	0,3979	0,2182	2,367	2,0044	2,796	3,26E-23
Японцы	0,0899	0,0555	1,6829	1,3254	2,1369	2,17E-05
Исландцы	0,490	0,352	1,77	1,57	2,0	6,8E-20
Немцы	0,454	0,356	1,51	1,16	1,97	0,003

Примечание - ОШ – отношение шансов, 95% ДИ – 95% доверительный интервал, р – статистический уровень значимости

Частота встречаемости аллелей полиморфизма NKX2-1 (rs 944289) в казахской популяции

Для гена NKX2-1 (rs944289) выявление минорного аллеля «Т» рассматривался как связь с ПРЦЖ.

Распределения аллелей и генотипов полиморфного маркера NKX2-1 (rs 944289) в сравниваемых группах статистически значимо отличались ($\chi^2=100,09$; D.f.=2; p=0,000). В группе случаев ПРЦЖ более, чем в полтора раза чаще встречался генотип ТТ (30,5%) против группы контролей (20,7%). Носительство генотипа СТ в группе случаев встречалось в 49,7% наблюдений и в группе контролей в 50,4%. Вариант СС имел меньшую частоту встречаемости в группе лиц с ПРЦЖ (19,8%) по сравнению с группой контролей (28,9%) (таблица 4).

Таблица 4 – Частота полиморфизма NKX2-1 (rs944289) в группах исследования

Полиморфизм NKX2-1 (rs944289)	ПРЦЖ, абс. число (%)	Здоровые, абс. число (%)	χ^2	D.f.	р-оценка
СС	96 (19,8)	291 (28,9)	100,09	2	0,000
СТ	241 (49,7)	508 (50,4)			
ТТ	148 (30,5)	209 (20,7)			
Всего	485 (100,0)	1008 (100,0)			

Примечание - χ^2 – Хи-квадрат, D.f. - Degrees of freedom (степени свободы), р – статистический уровень значимости

Для определения степени связи носительства NKX2-1 (rs944289) с восприимчивостью к ПРЦЖ также было рассчитано ОШ в группах ПРЦЖ и здоровых лиц. Таким образом, ОШ для казахской популяции составил 1,46 (95% CI:1,2515-1,7027), что соответствует увеличению шансов развития

ПРЦЖ у носителей аллеля «Т» НКХ2-1 (rs944289) в 1,46 раз. При сравнении ассоциации носительства НКХ2-1 (rs944289) в других популяциях (японцев, исландцев, немцев) также нами не было найдено значимых популяционных отличий, так как в каждом из исследований данный ген выступал в роли фактора риска развития ПРЦЖ (ОШ>1) (таблица 5).

Таблица 5 – Ассоциация rs944289 (14q13,3 НКХ2-1) с ПРЦЖ в казахской и других популяциях

Популяция	Частота аллеля «Т» НКХ2-1 (rs944289)		ОШ	95% ДИ		р-оценка
	ПРЦЖ	Здоровые		Верхний	Нижний	
Казахи	0,5536	0,4593	1,46	1,2515	1,7027	1,33E-06
Японцы	0,4653	0,4109	1,2479	1,0909	1,4279	0,0014
Исландцы	0,644	0,558	1,44	1,26	1,63	2,5E-08
Немцы	0,411	0,411	1,00	0,77	1,30	0,95

Примечание - ОШ – отношение шансов, 95% ДИ – 95% доверительный интервал

В парном анализе взаимодействия между двумя ОНП рисков (rs965513А и rs944289Т), связанными с ПРЦЖ методом логистического регрессионного анализа в мультипликативной модели с коррекцией на возраст и пол, нами было выявлено, что комбинация двух рисков аллелей (rs965513А и rs944289Т: ОШ=3,13) прямопропорционально повышает риск развития ПРЦЖ по сравнению с комбинациями отсутствия риска (rs965513G и rs944289Т: ОШ=1,91) и гетерозиготного носительства (rs965513GA и rs944289Т: ОШ=2,33). Взаимодействие между rs965513 (9q22, расположенный рядом с FOXE1) и rs944289 (14q13.3 НКХ2-1, НК2 окрестность homeobox 1) продемонстрировано в таблице 6.

Таблица 6 – Анализ риска развития ПРЦЖ, связанный с различной комбинацией генотипов (диплотипы) в rs965513 и rs944289, n = 485

rs965513	rs944289	Частота (%)		ОШ (95% ДИ)	*р-оценка
		Случаи	Контроли		
GG	CC	38 (20,7)	184 (29,7)	Референсная группа	
	CT	89 (48,4)	293 (47,3)	1,46 (0,95-2,23)	0,84
	TT	57 (31,0)	142 (22,9)	1,91 (1,19-3,05)	0,007
GA	CC	39 (18,1)	88 (26,0)	Референсная группа	
	CT	115 (53,2)	192 (56,8)	1,32 (0,85-2,06)	0,22
	TT	62 (28,7)	58 (17,2)	2,33 (1,38-3,93)	0,002
AA	CC	19 (22,4)	19 (37,3)	Референсная группа	
	CT	37 (43,5)	23 (45,1)	1,64 (0,71-3,79)	0,25

	ТТ	29 (34,1)	9 (17,6)	3,13 (1,16-8,47)	0,025
* Логистический регрессионный анализ в мультипликативной модели с коррекцией на возраст и пол. Аллели риска – rs965513A и rs944289T. Аллель rs965513G и rs944289C – референсная категория (минимальный риск).					

Более высокая распространенность маркера среди лиц с определенной патологией по сравнению со здоровыми указывает на предрасположенность (повышенный риск), а более низкая — на устойчивость к заболеванию (пониженный риск). Изучение генетической предрасположенности к патологии на популяционном уровне с использованием полиморфных маркеров различных генов-кандидатов заключается в проверке предположения о том, что наличие маркера связано с ранним развитием и/или быстрым прогрессированием заболевания.

На основании полученных данных мы пришли к заключению, что носители генотипов AA и GA FOXE1 имеют повышенный риск развития ПРЦЖ 2,367 (95% CI:2,0044-2,796). Предполагаемый риск гомозиготных носителей rs965513 и rs944289 у лиц с двойным гомозиготным состоянием с аллелями риска имеет более чем в два раза больший риск по сравнению с индивидами, которые несут один аллель риска в одном локусе (4, 8-кратный и 3,2-кратный).

Общее заключение

Результаты проведенного нами молекулярно-генетического исследования доказали, что для папиллярного рака щитовидной железы среди казахской популяции такие факторы как генетические полиморфные маркеры существуют. Во всяком случае, полученные результаты позволяют рассматривать полиморфизмы генов FOXE1 rs965513 и NKX2-1 rs944289 как молекулярно-генетические предикторы при канцерогенезе ПРЦЖ. Исследование полиморфных локусов генов-кандидатов, а также выявление генотипов и аллелей, ассоциированных с заболеванием, позволяет оценить генетические риски развития ПРЦЖ. Гены FOXE1 (rs965513) и NKX2-1 (rs944289) функционируют, как генетические факторы риска ПРЦЖ несмотря на этническую принадлежность, вследствие отсутствия значимых популяционных отличий.

В конечном итоге, полученные в диссертационной работе результаты, позволили разработать алгоритм диагностики РЦЖ в казахской популяции.

Принимая во внимание высокую частоту распространения генов FOXE1 (rs965513) и NKX2-1 (rs944289) при ПРЦЖ, проведение скрининга на предмет носительства данных онкомаркеров в казахской популяции может стать эффективным методом ранней диагностики на молекулярном уровне. В экологически неблагоприятных условиях, в местах эндемии и последствий радиационного облучения изучение предрасполагающих онкогенов, как например, FOXE1 (rs965513) и NKX2-1 (rs944289) необходимо проводить в виде скрининговых исследований групп риска. Данное обстоятельство

создает необходимость пересмотра существующего клинического протокола по тиреопатологии.

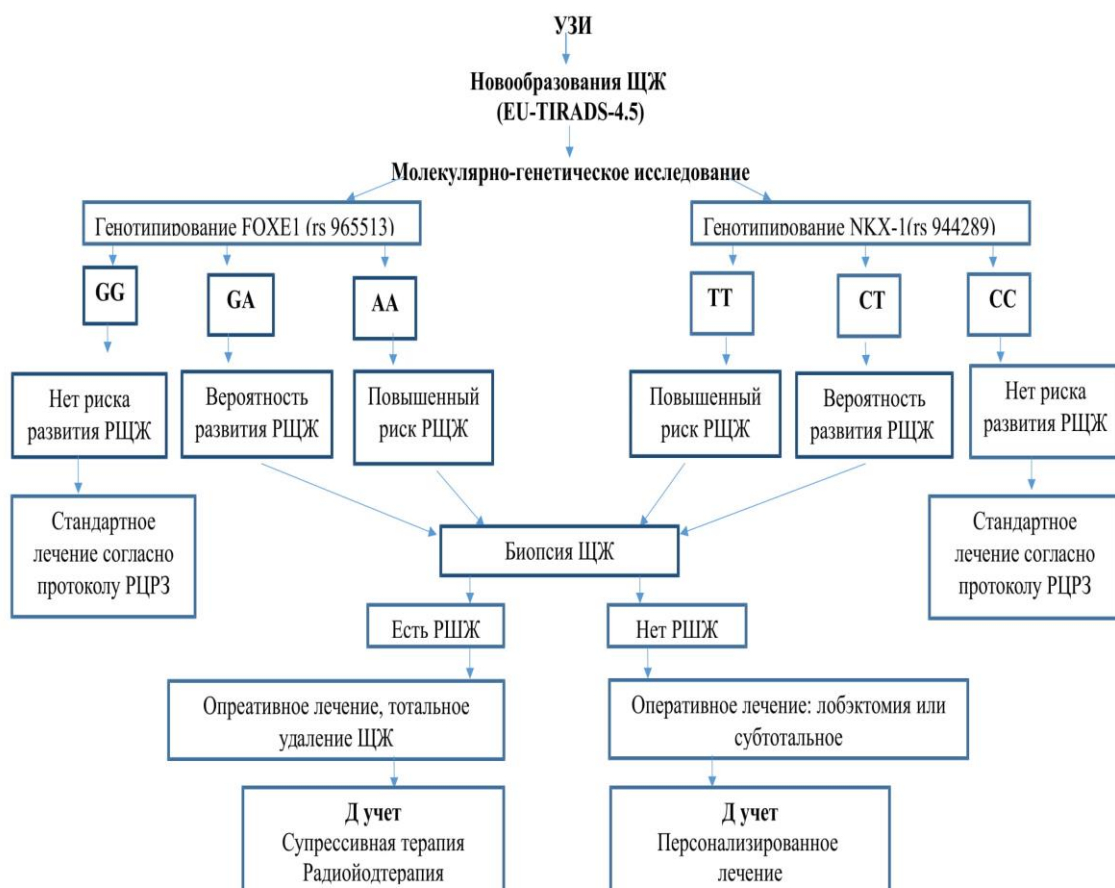
Алгоритм диагностики новообразования ЩЖ на основе молекулярно-генетических исследований

Для своевременной диагностики рака щитовидной железы любое узловое образование в данном органе следует рассматривать как потенциальную опухоль. Для верификации диагноза диагностический комплекс должен включать обязательное ультразвуковое, морфологическое и молекулярно-генетическое исследование с определением однонуклеотидных полиморфизмов rs965513 гена FOXE1 и rs944289 гена NKX2-1. Многоэтапная диагностика позволяет в преобладающем большинстве наблюдений установить точный диагноз и в ряде наблюдений выявить начальные формы рака и позволит прогнозировать предрасположенность к развитию ПРЦЖ у коренного этноса Казахстана. Нами разработан и внедрен в практику алгоритм, позволяющий выявлять начальные формы рака ЩЖ у большинства больных.

В рамках данного алгоритма маршрут пациента с подозрением на патологию щитовидной железы (по данным жалоб, пальпации) или с выявленным во время скринингового обследования узловым новообразованием щитовидной железы диаметром (D) = > 1 см начинается с проведения молекулярно-генетического исследования на определение маркеров риска ПРЦЖ полиморфизмов гена FOXE1 rs965513 и гена NKX2-1 rs944289. При обнаружении патологических аллелей в гомозиготном и гетерозиготном состоянии – FOXE1 rs965513:AA (риск выше в 2,37 раза по сравнению с остальными генотипами), GA (повышенный риск, есть вероятность развития ПРЦЖ) и NKX2-1 rs944289 – TT (риск выше в 1,46 раза по сравнению с остальными генотипами), СТ (повышенный риск, есть вероятность развития ПРЦЖ) пациент расценивается, как потенциальный кандидат для более детальной диагностики на предмет выявления ПРЦЖ. В данном случае назначается проведение тонкоигольной аспирационной биопсии узла из 8-10 точек. При подтверждении диагноза рака щитовидной железы по результатам биопсии пациент должен получить оперативное лечение. В случае гомозиготного носительства рискованных аллелей FOXE1 rs965513:AA и NKX2-1 rs944289 – TT рекомендуется проводить тотальную резекцию ЩЖ с последующим назначением супрессивной терапии и радиойодтерапии. При варианте гетерозиготных генотипов FOXE1 rs965513: GA и NKX2-1 rs944289 – СТ рекомендуется выполнение лобэктомии пораженной доли ЩЖ с последующим взятием на пожизненное диспансерное наблюдение у соответствующего специалиста (онколог, эндокринолог) и персонализированной терапией. У больных с новообразованиями ЩЖ, выявленными при УЗИ диагностике по данным жалоб или скрининга и отрицательными маркерами FOXE1 rs965513 и NKX2-1 rs944289, в виде носительства генотипов FOXE1 rs965513 GG и

NKX2-1 rs944289 CC рекомендуется стандартное лечение согласно протоколу РЦРЗ.

Таким образом, внедрение алгоритма диагностики новообразования щитовидной железы с использованием молекулярно-генетических исследований в клиническую практику является прямым фактором снижения наследственного риска развития РЩЖ.



Алгоритм диагностики новообразования ЩЖ на основе молекулярно-генетических исследований

Алгоритм диагностики новообразования ЩЖ на основе молекулярно-генетических исследований

Практические рекомендации

1. Исследование связи полиморфизма генов FOXE1 (rs965513) и NKX2-1 (rs944289) у больных с ПРЩЖ дает возможность прогнозировать восприимчивость к развитию заболевания у лиц казахской популяции. Проведение скрининга на предмет носительства полиморфизмов генов FOXE1 rs965513 и NKX2-1 (rs944289) может стать методом ранней

диагностики с учетом их распространения и наличия ассоциаций со случаями папиллярного рака щитовидной железы в казахской популяции.

2. Выявление полиморфизмов генов FOXE1 (rs965513) генотип А и NKX2-1 (rs944289) генотип Т можно использовать как дополнительный диагностический маркер и в определении персонализированной тактики послеоперационного лечения.

3. Внедрение алгоритма диагностики новообразования щитовидной железы с использованием молекулярно-генетических исследований в клиническую практику может стать методом ранней диагностики РЩЖ.

Выводы, сформулированные на основе полученных результатов

1. Эпидемиологические показатели частоты РЩЖ по Восточно-Казахстанской области и по общереспубликанскими данным РК имеют тенденцию к увеличению. Эта тенденция прослеживается в абсолютных числах и в изменении интенсивного показателя. Чаще рак ЩЖ встречается у лиц в возрасте 50 лет (54 ± 10 лет), причем у женщин в 12 раз чаще, чем у мужчин. Анализ показателей заболеваемости за 5 лет выявил динамику роста заболеваемости РЩЖ по Восточно-Казахстанской области 2,9‰ в 2011г. до 4,2‰ в 2015г.

2. Анализ распространенности полиморфизма генов NKX2-1 (rs944289) и FOXE1 (rs965513) показал, что встречаемость аллелей в казахской популяции отличается от европейской и восточноазиатской популяции и имеет промежуточное значение.

3. а) Установлена связь полиморфизма (rs944289) гена NKX2-1 с папиллярным раком щитовидной железы. Гомозиготное носительство аллеля «Т» — генотипа ТТ, способствует развитию ПРЩЖ (OR = 1,46; 95%-ный CI = 1,2515-1,7027), носительство генотипов СС и СТ препятствует развитию ПРЩЖ.

б) В результате анализа распределении аллеля «А» полиморфизма (rs965513) гена FOXE1 была найдена большая частота в группе ПРЩЖ (39,8%) относительно контрольной группы (21,8%). Содержание аллеля G в группе ПРЩЖ было относительно меньше – 60,2% против 78,2% в контрольной группе. Носители генотипов АА и GA FOXE1 имеют повышенный риск развития ПРЩЖ (OR = 2,367; 95% CI: 2,0044-2,796).

4. Разработан алгоритм диагностики новообразования ЩЖ с использованием молекулярно-генетических исследований, где рекомендовано, что при выявлении онкомаркеров полиморфизмов генов FOXE1 rs965513 (генотипы GA и AA) и NKX2-1 rs944289 (генотипы СТ и ТТ) у больных с узлообразованием ЩЖ показан персонализированный подход в лечении, определяющий необходимость объема оперативного вмешательства и применения радиойодтерапии.

Список опубликованных работ по теме диссертации

1. 1. Крыкпаева А.С., Накашима М., Еспенбетова М.Ж., Мусажанова Ж.Б., Азизов Б.С. Однонуклеотидные полиморфизмы, ассоциированные со sporadic papillary thyroid cancer в казахской популяции // Вестник Российской академии медицинских наук. – 2018. – №73(6). – С.431-435 // <https://doi.org/10.15690/vramn1024>.
2. Еспенбетова М.Ж., Крыкпаева А.С., Амренова К.Ш., Шалгумбаева Г.М., Жуманбаева Ж.М. Ранняя диагностика новообразований щитовидной железы на молекулярно-генетическом уровне (обзор литературы) // *Medicine*. – Almaty, 2016. – №4 (166). – P. 36-48.
3. Жуманбаева Ж.М., Еспенбетова М.Ж., Заманбекова Ж.К., Крыкпаева А.С. және біріккен авторлар. Бұрынғы Семей ядролық сынақ полигон аймағына жататын тұрғындардағы қалқанша без ауруларының кездесу жиілігі // *Наука и здравоохранение*. – 2016. – №6. – С. 80-88.
4. Еспенбетова М.Ж., Крыкпаева А.С., Глушкова Н.Е., Рогонович Т., Мусажанова Ж.Б., Накашима М. Онкомаркер FOXE1 (rs9655313) в развитии папиллярного рака щитовидной железы в казахской популяции // *Medicine*. – Алматы, 2017. – №3 (177). – С. 10-17.
5. Еспенбетова М.Ж., Крыкпаева А.С., Жуманбаева Ж.М., Глушкова Н.Е. Онкологические показатели рака щитовидной железы по Восточно-Казахстанской области // *Наука и здравоохранение*. – 2018. – Т.20, №5. – С. 88-95.
6. Espenbetova M.Zh. et al. Thyroid cancer in the population living around Semipalatinsk nuclear testing site, Kazakhstan // *Eur J Public Health*. – 2015. – Vol. 25, suppl 3. – P.281.
7. Espenbetova M.Zh. et al. Thyroid disorders in population living around the Semipalatinsk Nuclear Test Site, Kazakhstan // *Eur J Public Health*. – 2015. – Vol. 25, suppl 3. – P.319-320.
8. Mussazhanova Zh., Rogounovitch T., Saenko V., Krykpayeva A Zhumanbayeva Zh., Espenbetova M., Tuleutayev M., Sandybayev M., Yamashita Sh., Nakashima M. Association of some oncogenes with papillary thyroid cancer // XII Международная научно – практическая конференция «Экология. Радиация. Здоровье» посвященная академику Б. Атчабарову и 25-летию закрытия Семипалатинского испытательного ядерного полигона. – Семей, 2016. - 141 с.
9. Жуманбаева Ж.М., Еспенбетова М.Ж., Заманбекова Ж.К., Крыкпаева А.С. и соавторы. Узловые образования щитовидной железы у жителей Семипалатинского региона // *Наука и здоровье*. - 2016. - С. 76-77.
10. Распространенность рака щитовидной железы по Восточно-Казахстанской области // Материалы международной научно-практической конференции молодых ученых «Наука и здоровье», посвященной 75 - летию президента ассоциации оториноларингологов республики казахстан, академика национальной академии наук республики казахстан, доктора медицинских наук, профессора толебаева райса кажкеновича 22 апреля 2016 г.с.103.

11. Еспенбетова М.Ж., Крыкпаева А.С, Жуманбаева Ж.М., Глушкова Н.Е. Заманбекова Ж.К., Амренова К.Ш. Семей ядролық полигон аймағында тұратын тұрғындар арасындағы қалқанша без қатерлі обыры // XII Международная научно – практическая конференция «Экология. Радиация. Здоровье» посвященная академику Б. Атчабарову и 25-летию закрытия Семипалатинского испытательного ядерного полигона. – Семей, 2016. – С.113.

12. Mussazhanova Zh., Rogounovith T., Saenko V., Krykpayeva A., Tuleuthaev M., Espenbetova M. Replication study of genetic determinants associating with risk for sporadic papillary thyroid carcinoma in Kazakh population // The 20th Annual Meeting of the Japan Endocrine Pathology Society in Tokyo. – Tokyo, 2016. -83 p. 3. Еспенбетова М.Ж., Заманбекова Ж.К., Юрковская О.А., Жуманбаева Ж.М., Амренова К.Ш., Крыкпаева А.С. Методы лечения доброкачественных новообразований щитовидной железы: методические рекомендации. - Астана, 2015. – 38 с.

13. Mussazhanova Zh. et al. SNP association with risk for sporadic papillary thyroid carcinoma in Kazakh population // The 12 th Asia and Oceania Thyroid Association Congress. - Busan-Korea, 2017. - 268p.

14. Крыкпаева А.С., Абенова А.С. Ассоциация генов FOXE1 и NKX2-1 с риском папиллярного рака щитовидной железы в казахской популяции // XIV Международная (XXIII Всероссийская) Пироговская научная медицинская конференция студентов и молодых ученых. – М., 2019. -93с.

15. Еспенбетова М.Ж., Крыкпаева Заманбекова Ж.К., Юрковская О.А., Жуманбаева Ж.М., Амренова К.Ш., А.С. Методы лечения доброкачественных новообразований щитовидной железы: методические рекомендации. - Астана, 2015. – 38 с.

16. Еспенбетова М.Ж., Крыкпаева А.С.Свидетельство о государственной регистрации прав на объект авторского права № 2343 от 17 июля 2018 г. Ранняя диагностика рака щитовидной железы на молекулярно-генетическом уровне.