Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования «Первый Санкт-Петербургский государственный
медицинский университет имени академика И.П. Павлова»
Министерства здравоохранения Российской Федерации

На правах рукописи

БОРИСКОВА
Марина Евгеньевна

ВЛИЯНИЕ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОГО ПРОФИЛЯ ВЫСОКОДИФФЕРЕНЦИРОВАННОГО РАКА ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ НА ХИРУРГИЧЕСКУЮ ТАКТИКУ

14.01.12 – онкология
14.01.17 – хирургия
ДИССЕРТАЦИЯ
на соискание ученой степени
доктора медицинских наук

Научные консультанты:
Решетов Игорь Владимирович
академик РАН,
доктор медицинских наук, профессор

Семенов Дмитрий Юрьевич
доктор медицинских наук, профессор

Санкт-Петербург – 2019

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ 7

Глава 1 ВЫСОКОДИФФЕРЕНЦИРОВАННЫЙ РАК ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ: ДИАГНОСТИКА, ЛЕЧЕНИЕ, ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГРУПП РИСКА РЕЦИДИВА НА ОСНОВАНИИ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОГО ПРОФИЛЯ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)... 16

1.1 Эпидемиология рака щитовидной железы 16

1.2 Диагностика рака щитовидной железы 22

1.3 Молекулярно-генетические онкомаркеры в диагностике высокодифференцированного рака щитовидной железы 31

1.3.1 Использование галектина-3 в качестве онкомаркера высокодифференцированного рака щитовидной железы 33

1.3.2 Использование онкомаркеров в дооперационной диагностике рака щитовидной железы 36

1.4 Значимость BRAF-мутации при папиллярном раке щитовидной железы 39

1.4.1 Молекулярная патофизиология спорадического высокодифференцированного рака щитовидной железы. Мутация гена BRAF 39

1.4.2 BRAF мутация и гистологический вариант папиллярного рака щитовидной железы 44

1.4.3 Значение BRAF мутации в стратификации риска при раке щитовидной железы 47

1.5 Натрий-йодный симпортер в норме и при высокодифференцированном раке щитовидной железы 52

1.5.1 Синтез натрий-йодного симпортера при различных заболеваниях щитовидной железы 54

1.6 Лечение высокодифференцированного рака щитовидной железы 57

1.6.1 Хирургическое лечение 57

1.6.2 Послеоперационная радиойодтерапия и факторы, влияющие на развитие рецидива 61

Глава 2 МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ 64

2.1 Организация (дизайн) исследования 64

2.2 Клиническая характеристика больных и принципы разделения по группам 68

2.2.1 Исследование онкомаркера Galectin-3 68

2.2.2 Определение роли мутации BRAF V600E в диагностике высокодифференцированного рака щитовидной железы 72

2.2.3 Исследование роли экспрессии натрий-йодного симпортера и определения BRAF V600E мутации в прогнозировании течения высокодифференцированного рака щитовидной железы 75

2.3 Методика иммуногистохимического определения экспрессии галектина-3 81

2.4 Методика проточного иммуноцитометрического определения экспрессии галектина-3 и HBME-1 82

2.5 Методика иммуногистохимического определения экспрессии натрий-йодного симпортера 84

2.6 Молекулярно-генетическое определение мутации T1799A (V600E) гена BRAF методом полимеразной цепной реакции 86

2.6.1 Выделение ДНК из парафиновых блоков (операционного материала) 86

2.6.2 Постановка полимеразной цепной реакции 86

2.6.3 Детекция продуктов амплификации 87

2.7 Методика определения экспрессии натрий-йодного симпортера методом проточной флуороцитометрии в материале тонкоигольной аспирационной биопсии 88

2.8 Молекулярно-генетическое определение мутации T1799A (V600E) гена BRAF методом полимеразной цепной реакции 89

2.8.1 Выделение ДНК из материала тонкоигольной аспирационной биопсии щитовидной железы 89
2.8.2 Постановка полимеразной цепной реакции и детекция продуктов амплификации 90
2.9 Статистическая обработка результатов 90
Глава 3 ОЦЕНКА ЗНАЧЕНИЯ ПРЕДЛОЖЕННОЙ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ПАНЕЛИ В ПРЕДОПЕРАЦИОННОЙ ДИАГНОСТИКЕ ВЫСОКОДИФФЕРЕНЦИРОВАННОГО РАКА ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ... 93
3.1 Оценка значения экспрессии Galectin-3 в дифференциальной диагностике узловых образований и папиллярного рака щитовидной железы (ретроспективный этап) 93
3.2 Исследование экспрессии Gal-3 проточным флюороцитометрическим методом в материале тонкоигольной аспирационной биопсии 97
3.3 Исследование экспрессии HBME-1 в аспирате из узловых образований щитовидной железы 108
3.4 Частота выявления BRAF-мутации у пациентов с высокодифференцированным раком щитовидной железы (ретроспективный анализ)..... 114
3.5 Оценка значимости выявления BRAF-мутации в пункционном материале тонкоигольной аспирационной биопсии в диагностике папиллярного рака щитовидной железы 116
3.6 Тактика хирургического лечения пациентов с узловыми образованиями щитовидной железы с применением в диагностическом алгоритме п редложенной молекулярно-генетической панели 121
Глава 4 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ПРОГНОСТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ ВЫСОКОДИФФЕРЕНЦИРОВАННОГО РАКА ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ. Ретроспективный анализ 123

4.1 Анализ распределения натрий-йодного симпортера
во внутренних компартментах тиреоцита 123
4.2 Оценка среднего значения экспрессии
натрий-йодного симпортера по группам 127
4.3 Влияние уровня экспрессии натрий-йодного симпортера
на прогноз течения высокодифференцированного рака
щитовидной железы 129
4.3.1 Влияние уровня экспрессии натрий-йодного симпортера
на развитие рецидива заболевания 129
4.3.2 Уровень экспрессии натрий-йодного симпортера
и стадия опухоли 131
4.3.3 Взаимосвязь между полом
и уровнем натрий-йодного симпортера 132
4.4 Влияние BRAF мутации на течение папиллярного рака
щитовидной железы 135
4.5 Оценка прогностической ценности метода выявления
BRAF-мутации при раке щитовидной железы 138
4.5.1 Изучение частоты выявления BRAF-мутации в зависимости
от прорастания капсулы щитовидной железы 139
4.5.2 Изучение частоты выявления BRAF-мутации в зависимости
от наличия мультицентричности опухолевого роста 140
4.5.3 Изучение частоты выявления BRAF-мутации в зависимости
от поражения регионарных лимфатических узлов 141
4.5.4 Изучение частоты обнаружения BRAF-мутации в зависимости
от выявления отдаленных метастазов 143
4.5.5 Изучение частоты выявления BRAF-мутации в зависимости
от развития рецидивов 144
4.5.6 Изучение частоты выявления BRAF-мутации в зависимости
от пола и возраста больных 145
4.6 Частота встречаемости BRAF-мутации
при микрокарциномах щитовидной железы 145

4.7 Проспективный анализ экспрессии натрий-йодного симпортера 149
4.7.1 Оценка среднего значения экспрессии натрий-йодного симпортера по группам 150
4.7.2 Влияние уровня экспрессии натрий-йодного симпортера на безрецидивную выживаемость пациентов с высокодифференцированным раком щитовидной железы ... 152
4.7.3 Зависимость экспрессии натрий-йодного симпортера от стадии опухоли 155
4.7.4 Влияние мутации гена BRAF на уровень экспрессии натрий-йодного симпортера 157

Глава 5 ПРОГНОСТИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ И ХИРУРГИЧЕСКАЯ ТАКТИКА ЛЕЧЕНИЯ ВЫСОКОДИФФЕРЕНЦИРОВАННОГО РАКА ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ 160
5.1 Проспективная оценка предложенной тактики хирургического лечения у пациентов с папиллярным раком щитовидной железы 167
5.2 Тактика лечения пациентов папиллярным раком щитовидной железы при BRAF негативных опухолях 171

ЗАКЛЮЧЕНИЕ 174

ВЫВОДЫ 194

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ 195

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ 196

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ 197

ПРИЛОЖЕНИЕ 237
Приложение А (справочное). Патент № 2548783 237

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы

Рак щитовидной железы (РЩЖ) является самой распространенной злокачественной опухолью эндокринной системы, и наиболее часто встречаются высокодифференцированные его формы, характеризующиеся хорошим прогнозом при своевременной диагностике и радикальном лечении. Однако даже среди высокодифференцированных форм РЩЖ наблюдается значительное разнообразие гистологических типов, обладающих разным потенциалом злокачественности и, соответственно, прогнозом. Поэтому стандартный подход в лечении оказывается не всегда оправданным, что влечет за собой поиск новых методов диагностики и прогнозирования.

В настоящее время в мире наблюдается тенденция роста выявляемости высокодифференцированных форм рака щитовидной железы. Так, в США диагностика этого рака имеет самые высокие темпы роста выявляемости и по последним данным наблюдается рост заболеваемости на 4% в год. По статистическим данным в РФ за 2012 год было выявлено 9 092 случаев РЩЖ, тогда как в 2017 году – уже 12 315 случаев [83, 84]. Связывают это не с истинным ростом заболеваемости, а с улучшением методов диагностики. Однако смертность остается на прежнем уровне и не увеличивается число выявляемых агрессивных форм РЩЖ [364].

Прослеживаются две наиболее актуальные проблемы. Во-первых, это дооперационная диагностика РЩЖ. Известно, что до 30% результатов цитологического исследования носят неопределенный характер и требуют выполнения диагностической операции, объем которой не всегда оказывается радикальным. Усовершенствование дооперационной диагностики позволило бы в ряде случаев поставить диагноз РЩЖ и выполнить радикальную операцию. Одним

из перспективных развивающихся направлений является выявление онкомаркеров, которые могут быть использованы для диагностики рака ЩЖ.

В современной литературе встречается большое количество исследований, посвященных изучению роли генетических маркеров в патогенезе и диагностике РЩЖ [264]. Появились сообщения о возможности использования молекулярного анализа различных мутаций в образцах тонкоигольной пункционной биопсии в качестве факторов диагностики и прогноза РЩЖ [184, 166]. Исследователи полагают, что внедрение этих методов в клиническую практику может увеличить диагностическую точность цитологического исследования пунктатов из узлов щитовидной железы и, таким образом, повысить эффективность дооперационной диагностики РЩЖ [75, 350].

Вторым, не менее актуальным вопросом, является выявление уже на этапе дооперационной диагностики биологически агрессивных форм рака не зависимо от стадии опухолевого процесса на момент выявления. Это позволит формировать группы риска с индивидуальным прогнозом и персонализированным планом лечения.

В последнее время наметилась тенденция к снижению хирургической агрессии при высокодифференцированном раке щитовидной железы (ВДРЩЖ). По рекомендациям ATA 2016 у хорошо отобранных пациентов группы среднего и низкого риска (пациенты с унифокальными опухолями максимальным размером менеее 4 см, без экстратиреоидного распространения и без регионарных и отдаленных метастазов, определяемых при физикальном обследовании или с помощью различных методов визуализации) возможно выполнение гемитиреоидэктомии, что оказывает незначительное влияние на специфическую выживаемость. Однако тут же приводятся данные, что, не смотря на низкую частоту рецидивов у этих пациентов, вероятно наименьшая частота рецидивов достигается выполнением тотальной тиреоидэктомии. Также активные дискуссии ведутся по поводу целесообразности выполнения профилактической лимфодиссекции. Таким образом, основной проблемой в выборе объема операции

является определение достоверных критериев отбора группы риска более агрессивно текущих форм рака.

Не смотря на относительно благоприятный прогноз течения высокодифференцированного рака ЩЖ, различные гистологические варианты имеют отличное течение и, соответственно, смертность, вероятность рецидивирования и метастазирования. Следует отметить, что прогноз течения заболевания и выживаемость больных не всегда коррелирует с гистологическим типом опухоли и стадией заболевания. Однако принятая в настоящее время тактика лечения и, в частности, хирургическая тактика, основана на гистологической классификации и стадии по TNM [73], что не соответствует современным представлениям об онкогенезе. Однако в Рекомендациях Американской Тиреодологической Ассоциации (АТА) за 2016 год было предложено выделять BRAF-позитивные опухоли как фактор неблагоприятного прогноза. В связи с этим возникает проблема не только своевременной и точной диагностики, но и прогнозирования течения опухолевого процесса, что позволит выбрать оптимальный для каждого пациента алгоритм лечения. Индивидуальный подход с учетом прогностических критериев может позволить улучшить отдаленные результаты лечения.

Цель: Оптимизация хирургической тактики лечения высокодифференцированного рака щитовидной железы за счет использования молекулярно-генетической панели маркеров.

Задачи исследования:

1. Исследование возможности использования определения онкомаркера galektin-3, HBME-1 методом проточной цитометрии в дооперационной стратификации рисков в группе неопределенных неоплазий по данным ТАБ.

2. Изучение значимости мутационного повреждения гена BRAF в дооперационной диагностике РЩЖ.
3. Изучение прогностического значения наличия BRAF-мутации у больных раком щитовидной железы.
4. Изучение возможности использования определения экспрессии натрий-йодного симпортера в материале ТАБ и парафинизированных препаратах у пациентов ВДРЩЖ в прогнозировании радиойодрезистентности.
5. Обоснование влияния уровня экспрессии НИС на хирургическую тактику лечения ВДРЩЖ.
6. На основании выявленных диагностических и прогностических критериев создание алгоритма дооперационного обследования с целью индивидуализации хирургической тактики лечения больных ВДРЩЖ.

Научная новизна

В работе показано, что ВДРЩЖ является биологически неоднородной, собирательной группой опухолей с различным потенциалом к пролиферации, метастазированию, рецидивированию.

Впервые показана возможность формирования групп риска с использованием онкомаркеров, определяемых на дооперационном этапе. В работе была создана и апробирована новая молекулярно-генетическая панель для диагностики и прогнозирования течения высокодифференцированного рака щитовидной железы.

Результаты данной работы подтверждают, что галектин-3 является онкомаркером высокодифференцированного рака щитовидной железы. Усовершенствован и впервые внедрен в клиническую практику метод проточного флюороцитометрического определения экспрессии галектина-3 в пунктате из узла щитовидной железы, полученном при тонкоигольной аспирационной биопсии (ТАБ) (Удостоверение на рационализаторское предложение «Способ определения экспрессии галектина-3» № 1528 от 28 мая 2009 года.) Впервые показаны возможности проточного флюороцитометрического метода определения

экспрессии галектин-3 в предоперационной стратификации риска в группе неопределенных неоплазий по данным цитологического исследования.

В работе определена роль выявления мутации гена BRAF V600E в качестве фактора, определяющего тактику хирургического лечения папиллярного рака щитовидной железы. Выявлены взаимосвязи наличия мутации гена BRAF в ткани щитовидной железы с клиническими и морфологическими особенностями РЩЖ, а также определена прогностическая значимость данного фактора.

В работе проведено исследование и определены предельные значения экспрессии НИС при различных патологических состояниях в щитовидной железе. Достоверно доказано снижение уровня экспрессии натрий-йодного симпортера (НИС) при РЩЖ. Наиболее низкие значения наблюдались у пациентов с рецидивным течением ВДРЩЖ после выполнения радиойодтерапии (РЙТ). Полученные данные легли в основу понимания радиойодрезистентности. Впервые в работе проанализировано значение определения уровня экспрессии НИС методом проточной флюроцитометрии (ПФЦ) в первичной опухоли для оценки риска радиойодрезистентности метастазов ВДРЩЖ.

Оценена корреляция уровня экспрессии НИС и мутации гена BRAF V600E. Достоверно доказано отсутствие корреляции между наличием BRAF мутации и уровнем экспрессии НИС, что позволило предположить различные пути онкогенеза у этих прогностических маркеров, что диктует необходимость их совместного использования в прогностической панели.

Доказано, что при ВДРЩЖ и принятых объемах хирургического вмешательства в группе высокого риска неэффективность РЙТ объясняется изначально низким значением уровня экспрессии НИС, что диктует необходимость расширения объема хирургического вмешательства.

Оформлен и получен патент № 2548783 «Способ дооперационного определения объема хирургического лечения высокодифференцированного рака щитовидной железы» (приложение А).

Предложенная панель позволяет улучшить диагностику рака щитовидной железы и на дооперационном этапе прогнозировать течение заболевания и индивидуализировано планировать объем оперативного вмешательства.

Теоретическая и практическая значимость работы

Проведенная работа показывает, что пациенты раком щитовидной железы должны лечиться в специализированных стационарах.

В работе показаны основные проблемы дифференциальной диагностики узловых образований щитовидной железы. Изучена и проанализирована диагностическая ценность определения экспрессии онкомаркера галектина-3 и HBME-1 в узловых образованиях щитовидной железы. Показана роль проточного иммуноцитометрического исследования экспрессии галектина-3 в аспирационном материале, получаемом при ТАБ узла щитовидной железы, в дифференциальной диагностике новообразований щитовидной железы и в выборе объема оперативного вмешательства.

Разработан и апробирован метод определения BRAF-мутации у пациентов с высокодифференцированным раком щитовидной железы, доказана его эффективность. Результаты работы подтвердили высокую диагностическую значимость определения мутации гена BRAF, что позволяет значительно улучшить дооперационную дифференциальную диагностику узловых образований щитовидной железы.

Разработан и апробирован метод определения уровня экспрессии НИС в материале ТАБ с использованием ПФЦ. Определены предельные значения уровня экспрессии НИС в группах высокого, промежуточного и низкого рисков пациентов ВДРЩЖ. Показана прогностическая значимость выявления точечной мутации гена BRAF и НИС, что позволило формировать группы пациентов высокого риска рецидива/персистенции ВДРЩЖ. На основании этого разработаны рекомендации по дооперационному определению BRAF мутации и уровня экспрессии НИС с целью индивидуализации хирургической тактики.

Индивидуальный подход в лечении ВДРЩЖ с использованием молекулярно-генетической панели на дооперационном этапе позволяет улучшить диагностику рака щитовидной железы, прогнозировать его течение и выбрать оптимальную хирургическую и лечебную тактику, что приводит к уменьшению риска развития рецидива/персистенции заболевания.

База проведения научного исследования – кафедра хирургии общей с клиникой, отделение онкологии (хирургической эндокринологии) НИИ хирургии и неотложной медицины ПСПбГМУ им. И.П.Павлова.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Определение экспрессии галектин-3 может быть использовано в качестве дополнительного дооперационного маркера стратификации риска в группе неопределенных значений цитологического исследования.
2. Выявление BRAF мутации в материале ТАБ со 100% вероятностью подтверждает папиллярный рак щитовидной железы (ПРЩЖ).
3. Наличие BRAF мутации и снижение мембранной экспрессии НИС являются независимыми факторами неблагоприятного прогноза высокодифференцированного рака щитовидной железы
4. Пациентам группы высокого риска рецидива/персистенции заболевания (наличие BRAF мутации и низкой экспрессии НИС) показано выполнение профилактической центральной лимфодиссекции.
5. Применение молекулярно-генетической панели позволяет индивидуализировать лечебную тактику в рамках существующих стандартов и улучшить результаты лечения ВДРЩЖ.

Внедрение результатов работы

Полученные результаты диссертационной работы «Влияние молекулярно-генетического профиля высокодифференцированного рака щитовидной железы

на хирургическую тактику» применяются в работе онкологического отделения № 3 (хирургической эндокринологии) НИИ хирургии и неотложной медицины Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (Санкт-Петербург, 197022, ул. Льва Толстого, д. 6-8). Материалы диссертационной работы используются при подготовке студентов, аспирантов, врачей-интернов и клинических ординаторов на кафедре общей хирургии.

Оформлен и получен патент № 2548783 публикация от 20.04.2015 г. № 11 на оригинальный способ дооперационного определения объема хирургического лечения высокодифференцированного рака щитовидной железы (приложение А).

Апробация работы

По теме диссертации получен Федеральный грант «У.М.Н.И.К» 2012-2014 гг., грант молодых ученых в рамках СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова 2011 г., субсидия правительства Санкт-Петербурга молодым ученым вузов и академических институтов, расположенных на территории Санкт-Петербурга 2011 г. Результаты полученных исследований доложены и обсуждены на следующих научно-практических конференциях:

1. Европейский конгресс эндокринологов 24-28 апреля 2010 г., Прага, Чешская Республика.
2. 14-й Международный Европейский тиреодологический конгрессе 11-16 сентября 2010 г., Париж, Франция.
3. 36-й Ежегодный европейский тиреодологический конгресс 8-12 сентября 2012 г., Пиза, Италия.
4. II Всероссийский конгресс с участием стран СНГ «Инновационные технологии в эндокринологии», 25-28 мая 2014 г., Москва, Россия.
5. 38-й Ежегодный европейский тиреодологический конгресс 6-10 сентября 2014 г., Сантьяго де Компостелло, Испания.

6. 2 445 заседание Хирургического общества Пирогова 25 февраля 2015 г., Санкт-Петербург, Россия.
7. Всероссийская конференция с международным участием «Актуальные вопросы современной эндокринологии: фокус на регионы» 24-26 мая 2018 г.
8. VIII Конгресс Европейского общества эндокринных хирургов, 24-26 мая 2018, Амстердам.
9. IV Петербургский международный онкологический форум «Белые ночи 2018», 5-8 июля 2018, Санкт-Петербург, Россия.
10. VII Международный междисциплинарный конгресс по заболеваниям органов головы и шеи, 30-31 мая, 1 июня 2019, Москва.

По теме диссертации опубликовано 19 научных работ, т.ч. 16 статей в изданиях, рекомендованных в ВАК РФ и 1 статья в зарубежном журнале. Оформлен и получен патент № 2548783 публикация от 20.04.2015 г. № 11.

Личный вклад

Автором лично выполнено планирование исследования. Практически все больные, включенные в исследование, были прооперированы автором или с его участием. Автор освоила методы, применяемые для получения и оценки результатов, принимала участие в ретроспективном и проспективном анализе результатов лечения больных РЩЖ, провела сравнительное исследование данных основных клинических, лабораторных и инструментальных исследований. Автором выполнены анализ, статистическая обработка и описание материала.

Структура и объем диссертации

Диссертация состоит из введения, пяти глав, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка литературы и приложения. Объем работы составляет 238 страниц машинописного текста. Работа иллюстрирована

64 таблицами, 24 рисунками. Список литературы содержит 102 отечественных и 283 зарубежных источников.

Глава 1
ВЫСОКОДИФФЕРЕНЦИРОВАННЫЙ РАК ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ: ДИАГНОСТИКА, ЛЕЧЕНИЕ, ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГРУПП РИСКА РЕЦИДИВА НА ОСНОВАНИИ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОГО ПРОФИЛЯ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

1.1 Эпидемиология рака щитовидной железы

Наиболее распространенным онкологическим заболеванием эндокринной системы является рак щитовидной железы. Он составляет около 1-1,5% среди всех злокачественных новообразований [10, 50]. РЩЖ диагностируется как узловая патология ЩЖ. Встречаемость узлов ЩЖ крайне высока, они выявляются при пальпации у 4-7% в популяции, при УЗ-скрининге – в 50% случаев [165, 245, 322]. У населения, не подвергавшегося облучению, встречаемость рака ЩЖ среди узловых образований составляет 5%. Есть сведения, что у населения, подвергшейся лучевой терапии на область шеи, частота рака щитовидной железы увеличивается [27, 53]. Вероятность возникновения рака щитовидной железы увеличивается после облучения области шеи в детском и подростковом возрасте [13, 310].

Папиллярная карцинома – наиболее часто встречающийся гистологический тип злокачественной опухоли органа. Его доля составляет в среднем 80-85% всех случаев РЩЖ. Этот тип РЩЖ преобладает в детской и подростковой возрастной группе (92-96% случаев), у взрослых пациентов до 65 лет его доля составляет около 80% случаев, в старшей возрастной группе – 70-75% случаев [298]. Фолликулярный рак щитовидной железы (ФРЩЖ) диагностируется примерно у

5-20% заболевших, у 5-10% больных выявляется медуллярный РЩЖ [78]. Низкодифференцированный рак щитовидной железы (НРЩЖ) встречается в 0,5-3% случаев [298]. Анапластический рак щитовидной железы (АРЩЖ, недифференцированный РЩЖ) диагностируется в 0,1-1% случаев. Другие гистологические типы злокачественных опухолей ЩЖ, такие как плоскоклеточный рак и лимфома, встречаются исключительно редко и рассматриваются как казуистика.

По статистическим данным с конца прошлого века во всем мире наблюдается стабильный рост выявляемости онкопатологии щитовидной железы [50, 183, 266]. Исключение составляет, согласно наблюдениям ученых, только Африка, что можно обьяснить проблемами диагностики [378]. Показатели статистики свидетельствуют, что рак щитовидной железы занимает пятое место среди онкологических заболеваний у женщин [169]. Приведем пример из статистики европейских стран. Италия: вторая по частоте злокачественная опухоль среди женщин до 45 лет [236]. Однако в Норвегии и Швеции заболеваемость раком щитовидной железы имеет тенденцию к снижению [242].

Обратимся к отечественным данным. Согласно статистике, в 2013 г. заболеваемость РЩЖ – 93,2 случая на 100 тыс. населеня в год, по сравнению с 2000 г. заболеваемость увеличилась более чем вдвое с 47,2 до 93,2 на 100 тыс. [81].

Данные свидетельствуют, что среди онкопатологии рак щитовидной железы демонстрирует самый высокий темп прироста, достигая 3-5% в год [83]. Северо-западный регион, в котором проводилось данное диссертационное исследование, демонстрирует те же тенденции. В Санкт-Петербурге с 2010 по 2013 гг. показатели заболеваемости возросли от 72,9 до 84,9 случаев на 100 000 населения [83]. Согласно статистике, пик заболеваемости приходится на 50-60 лет. Таким образом, заболеванию подвержены люди трудоспособного возраста, что делает исследование и решение этой проблемы социально значимым [83]. Следует отметить, что наибольший темп прироста наблюдается у папиллярных карцином,

тогда как более агрессивные формы РЩЖ (медуллярный, фолликулярный и анапластический) сохраняют прежнюю динамику.

Для нашего исследования важно установить как кореллирует заболеваемость и смертность от рака щитовидной железы. Данные противоречивы. В мире смертность больных РЩЖ составляет в среднем 0,5 случаев на 100 тысяч населения в год [25, 298]. Интересные данные были получены корейскими учеными: если до 2004 года отмечался рост смертности от данной патологии, то с 2005 года наблюдается тенденция снижения этого показателя [173]. Исследователи видят возможные причины этой закономерности в своевременной диагностике, изменении стратификации факторов риска и стандартизированном подходе к диагностике и лечению.

Канадские исследователи в 2017 г. проанализировали изменения распространенности рака щитовидной железы за период с 1970 по 2012 гг. в Канаде. Они сделали заключение о том, что темп прироста выявляемости РЩЖ с начала 1990 года связан с «эпидемией» гипердиагностики клинически незначимых его форм. Их заключение подтверждают данные статистики: смертность от этого вида рака осталась без динамики за данный период, и не увеличилось число выявляемых агрессивных форм РЩЖ [364]. Отсюда следует вывод, что рост впервые выявленных случаев РЩЖ связан не столько с истинным ростом заболеваемости, сколько с улучшением его диагностики.

Мнения экспертов относительно причин роста заболеваемости раком щитовидной железы разделились. Часть ученых полагают, что использование таких чувствительных методик как УЗИ, МСКТ, МРТ, ПЭТ и др. привели к увеличению частоты выявления маленьких асимптомных раков щитовидной железы [238]. Следует отметить, что узловые образования щитовидной железы встречаются у 20-50% всего взрослого населения [257]. Рак же щитовидной железы часто протекает под маской узлового нетоксического зоба, что диктует необходимость исследования всех выявляемых узловых образований. Последнее время увеличилось и количество так называемых инциденталом: опухолей выявляемых случайно при проведении диагностического обследования по поводу

другого заболевания. Недавнее исследование Американских авторов [353] выявило удвоение заболеваемостью РЩЖ с 2000 по 2012 гг. в сравнении с предшествующим десятилетием преимущество за счет инцендеталом. Узловые образования щитовидной железы могут быть выявлены при проведении доплерографии сосудов шеи, выполнении ПЭТ [370, 377]. Внедрение УЗИ области шеи, как скринингового метода исследования, приводит к выявлению микрокарцином (МК), которые, учитывая торпидное течение высокодифференцированного рака щитовидной железы, могли существовать у пациента годами или даже десятилетиями. Эти данные подтверждаются аутопсийными исследованиями, которые обнаруживают микрокарциномы без признаков экстратиреоидного распространения в 2,9-39% случаев [227, 259]. Данные аутопсийные исследования привели к появлению работ, описывающих натуральное течение микрокарцином щитовидной железы [306]. В работе Y. Ito et al. описывается натуральное течение 162 микрокарцином щитовидной железы. В 70% случаев при наблюдении не отмечалось роста узлового образования. В 10,2% случаев размер узлового образования увеличился более чем нам 10 мм. Метастазы в боковую клетчатку шеи были выявлены у 1,2% наблюдавшихся. Данные исследования вскрывают проблему гипердиагностики микрокарцином щитовидной железы на фоне отсутствия на данный момент точных предикторов биологического потенциала высокодифференцированного рака щитовидной железы, в частности, опухолей менее 1 см в диаметре.

С другой стороны, доводы ученых, полагающих, что увеличение количества заболевших высокодифференцированным раком щитовидной железы происходит не только вследствие научно-технического прогресса в диагностике и медицине, звучат весьма убедительно. Так, в настоящее время рост выявляемости рака щитовидной железы происходит среди опухолей всех размеров и стадий. В США с 1992 по 2005 гг. вклад опухолей менее 1 см в диаметре в увеличение заболеваемости высокодифференцированным раком щитовидной железы составил 50%, от 1,1 см до 2 см – 30%, и 20% группа опухолей более 2 см в диаметре [321]. В другом исследовании W. Kent et al. (2007) показано увеличение

заболеваемости в группах опухолей менее 2 см и более 4 см, при сохранении частоты выявления опухолей от 3 до 4 см на прежнем уровне [237]. В Испании с 1978 по 2001 год увеличилась выявляемость как микрокарцином, так и опухолей большего диаметра [363]. Следует так же отметить, как упоминалось выше, увеличение заболеваемости происходит преимущественно за счет папиллярного рака щитовидной железы, в то время как при увеличении заболеваемости, за счет улучшения диагностики, должны были бы пропорционально увеличиваться все гистологические варианты рака щитовидной железы.

Высокодифференцированный рак ЩЖ характеризуется относительно доброкачественным течением и 5-летней выживаемостью в 90-95% [24, 55]. Относительно доброкачественное течение высокодифференцированного рака щитовидной железы позволяет говорить не тольно о 5-летней, но и о 10-летней выживаемости. Так, 10-летняя выживаемость при папиллярном раке составляет 93-95%, при фолликулярном раке – 85-97% [17, 61, 69, 72].

Нам кажется показательным исследование E.J. Kuo et al., в котором проанализирована группа пациентов ВДРЩЖ, в том числе и с микрокарциномами, которые вошли в группу активного наблюдения без оперативного лечения. В этой группе не было ни одной смерти, связанной с ВДРЩЖ [286]. Это позволило выдвинуть предположение, что рост заболеваемости носит не истинный характер, а связан с улучшением диагностики, что приводит к выявлению преимущественно микрокарцином папиллярного строения. В пользу этого утверждения свидетельствуют данные аутопсийных исследований. От 12 до 36% населения, у которых при жизни не было выявлено патологии ЩЖ, на самом деле имеют в ней папиллярные микрокарциномы [64, 98]. Это также доказывает, что эти опухоли не требуют агрессивной хирургической тактики.

Что же касается гендерного фактора, рак щитовидной железы, как впрочем, и узловой зоб, чаще наблюдается у женщин, предрасположенных к гиперпластическим процессам. По данным Санкт-Петербургского городского онкологического диспансера женщины страдают раком ЩЖ в 5 раза чаще, чем

мужчины [15]. Заболеваемость раком ЩЖ среди женщин наблюдается во всех возрастных группах, но особенно часто в возрасте 40-49 лет [16]. В то же время доля рака щитовидной железы среди узловых образований у мужчин выше в 2-3 раза, чем у женщин [60, 90]. По данным ряда авторов среди запущенных и распространенных форм тиреоидной карциномы почти 35% случаев составляют больные мужского пола [1]. Существуют данные, что у мужчин РЩЖ имеет более агрессивное течение [88]. Об этом так же свидетельствует отчет Национального института онкологии США о заболеваемости и смертности населения от рака щитовидной железы за период наблюдения с 1975 по 2010 года. Был выявлен рост смертности от рака щитовидной железы среди мужчин, несмотря на более раннюю выявляемость и более агрессивное лечение групп высокого риска [82].

Противоречивые данные о связи между заболеваемостью, диагностикой и смертностью от РЩЖ, заставляют исследователей и клиницистов искать новые пути решения проблемы.

В гистологической классификации, опубликованной в 2016 г., произошли существенные изменения. Отличия TNM классификации 7-го пересмотра от вновь вступившей в действие (с 01.01.2018) 8-го пересмотра следующие для высокодифференцированного рака щитовидной железы: повышен возрастной критерий при стадировании с 45 до 55 лет; минимальная экстратиреоидная инвазия, выявленная при гистологическом исследовании, убрана из определения стадии T3 и таким образом не влияет теперь ни на T-стадию, ни на стадирование в общем; N1 в новой TNM не повышает стадию заболевания пациента до III (т. е., если пациенту меньше 55 лет, то при наличии N1 стадия заболевания St I, если больше 55 лет и N1, то стадия заболевания St II); стадия T3a – новая категория для опухолей более 4 см, ограниченных тканью щитовидной железы, стадия N3b – новая категория для опухолей любого размера с массивной инвазией в короткие мышцы шеи (m. sternohyoid, sternothyroid, thyrohyoid или omohyoid) [368]. Следует отметить, что в возрасте понизили стадии большой группы людей (от 45 до 55 лет), однако, изменения не привели к изменению показателей выживаемости в каждой из групп. Так же следует отметить, что исследования,

накопленные за период существования 7-го выпуска TNM, позволили убрать из фактора агрессивности микроскопическую инвазию капсулы щитовидной железы, а оставить лишь массивную инвазию, выявляемую при дооперационном обследовании или макроскопически на операции.

Отдельные случаи РЩЖ, ранее трактовавшиеся как фолликулярный рак, в новой гистологической классификации расцениваются как фолликулярный вариант папиллярного РЩЖ [6], что соответственно требует совершенствования методов диагностики для выработки тактики лечения заболевания. Так же в апреле 2017 года вышло предложение от группы авторов Американской тиреоидологической ассоциации, опубликованное в журнале Thyroid, где предложено реклассифицировать инкапсулированный вариант фолликулярного варианта папиллярного рака без инвазии в неинвазивную фолликулярную неоплазию с ядерными признаками папиллярного строения [115]. Данная инициатива основана на великолепном прогнозе для данного типа опухоли, и предположении о психологическом комфорте пациента. Однако данная рекомендация нуждается в проспективных исследованиях и определении экономической целесообразности.

Таким образом, в мире неуклонно отмечается рост заболеваемости раком щитовидной железы, особенно папиллярного строения, поэтому диагностика и лечения данного онкологического процесса представляется актуальной задачей современной медицины.

1.2 Диагностика рака щитовидной железы

Главной задачей в диагностике рака щитовидной железы на амбулаторном этапе является обнаружение узлов щитовидной железы, требующих хирургического вмешательства [17, 31, 32, 49]. В связи с отсутствием специфичности клинических проявлений рака щитовидной железы в начальной

стадии, данные анамнеза и общего осмотра не позволяют заподозрить злокачественность узловых образований щитовидной железы. Согласно литературным данным, дифференцированный рак щитовидной железы в начальной стадии протекает бессимптомно [18, 102]. При пальпации злокачественный узел обладает всеми характеристиками доброкачественного узла. Так, каменистая плотность характерна не только для злокачественных образований, но и для кальцифицированных доброкачественных узлов [65].

Одним из специфичных признаков рака щитовидной железы является осиплость голоса. Так, при недифференцированной опухоли щитовидной железы изменение голоса обусловлено ее распространением за пределы капсулы железы [52, 72]. Однако охриплость голоса может быть вызвана не только сдавлением nervus laryngeus recurrens растущей карциномой, но и растяжением нерва растущими узлами. В литературе указано, что изменение голоса не всегда является признаком поздней стадии рака и может носить транзиторный характер при сдавлении или растяжении nervus laryngeus recurrens, тогда как при инвазивном росте опухоли – постоянный.

Объективным признаком, позволяющим заподозрить рак щитовидной железы, является быстрый рост узлов [62]. Однако внутреннее кровотечение с образованием кисты или аденома щитовидной железы могут имитировать быстрый рост узлов [20, 291]. Кроме трудностей в дифференциальной диагностике узлов щитовидной железы, сложности вызывает диагностика «скрытого» рака – непальпируемых бессимптомных образований щитовидной железы размером 10-15 мм. Чаще всего, подобные образования выявляются случайно на УЗИ, либо при метастазировании опухоли, и составляют 18,2-34% от всех злокачественных образований щитовидной железы [11, 260]. Мнения исследователей о значимости клинического обследования в диагностике рака щитовидной железы разнятся [2, 16, 17]. Объективными признаками, позволяющими заподозрить рак щитовидной железы, является каменистая плотность, прогрессирующий рост узлов, отсутствие смещения железы, пол (мужской), возраст (<20 лет; >70 лет), постоянное изменение голоса [20, 31, 32].

Любая опухоль, протекающая как доброкачественная, может оказаться злокачественной.

Отсутствие специфических симптомов рака щитовидной железы, а также частая сопутствующая тиреоидная патология – причины диагностических ошибок [50, 186]. По данным литературы, отсутствует единое мнение о факторах риска развития рака щитовидной железы. Однако группу риска по раку щитовидной железы составляют пациенты с наследственностью по данному заболеванию и подвергнутые радиоактивному излучению. Общий осмотр пациента, сбор анамнеза заболевания и жалоб позволяют заподозрить рак щитовидной железы только на поздних стадиях при наличии метастазирования или выраженной инфильтрации опухоли. Дифференциальная диагностика злокачественных и доброкачественных узлов на ранних стадиях вызывает большие трудности, тогда как при своевременном лечении I-II стадии рака щитовидной железы 10-летняя выживаемость больных составляет до 96% [37].

Ультразвуковое исследование щитовидной железы обеспечивает визуализацию образований до 1 мм [9, 52]. Наиболее характерными признаками рака щитовидной железы, на которые ориентируются специалисты функциональной диагностики, являются гипоэхогенность образования, неровность границ, нечеткость контуров, хаотичный кровоток в узле, отсутствие «хало», микроцальцинаты [7, 79]. Для злокачественных опухолей наиболее характеры мелкие слоистые кальцификаты, тогда как для доброкачественных – перинодулярные отложения извести. Однако, большинство исследователей считают, что метод ультразвуковой диагностики оправдан для обнаружения непальпируемых, в том числе злокачественных, опухолей, так как патогномоничные для рака щитовидной железы ультразвуковые признаки отсутствуют [5, 248]. Непальпируемые узлы щитовидной железы и визуализированные методом УЗИ узлы обладают одинаковым риском трансформации в злокачественное образование [226]. Были предприняты попытки оценить морфологическую структуру опухолевых образований щитовидной железы методом УЗИ. Так, C. Lu et al. (1994) описали

«ультразвуковой портрет» папиллярного рака с использованием ретроспективного анализа эхо-картины узловых образований щитовидной железы. По данным различных исследований, чувствительность УЗИ в диагностике рака щитовидной железы составляет 16-100% [4, 91]. Чувствительность и специфичность каждого эхографического признака папиллярного рака составляет 18-84% и 31-88% соответственно. При использовании всех УЗИ-признаков, по мнению E. Koike et al. (2001), чувствительность и специфичность диагностики нефолликулярного рака щитовидной железы возрастает до 88,7% и 92,3% соответственно.

При наличии у больного многоузлового зоба чувствительность УЗИ-диагностики злокачественных узлов снижается с 90% до 64%. По данным Е.Ю. Трофимовой (2000), чувствительность метода УЗИ в обнаружении рака щитовидной железы составляет 46,2-93,8%, специфичность – 50-92%.

Таким образом, использование ультразвуковой диагностики с допплерографией незаменимо в обнаружении непальпируемых узлов щитовидных железы, однако не позволяет с высокой точностью диагностировать злокачественное образование. Рентгенография, томография области шеи, трахеи также не имеют специфической картины, позволяющей заподозрить рак.

Такие методы диагностики, как компьютерная и магнитно-резонансная томография, ввиду своей дороговизны, технических трудностей, отсутствия явных преимуществ перед УЗИ, широко не используются для диагностики рака щитовидной железы. Следует применять данные методы исследования для диагностики загрудинного зоба, а также для анализа поражения окружающих тканей и органов при распространенных формах рака щитовидной железы [39, 99].

Не рекомендуется использовать сканирование щитовидной железы в качестве метода обнаружения узлов и оценки их дифференцировки. Не существует специфического характера накопления радиофармпрепарата («холодные», «теплые», «горячие» узлы), позволяющим диагностировать рак щитовидной железы [77, 99].

Согласно заключению Медицинского радиологического научного центра РАМН (2002), злокачественные и доброкачественные образования щитовидной железы в равной степени накапливают MIBI при сцинтиграфии, что указывает на низкую специфичность метода (43%) и отсутствие необходимости его применения для дифференциальной диагностики образований щитовидной железы. Однако использование сцинтиграфии с использованием MIBI позволило оценить распространенность рака щитовидной железы: накопление данного радиофармпрепарата в латеральной проекции шейной области – 100%-й признак метастазирования регионарных лимфоузлов, подтвержденный гистологически. С другой стороны, в связи с накоплением MIBI в метастазах лимфоузлов только в 48%, отсутствие его накопления не позволяет исключить метастазирование [77].

Существует метод радионуклидного исследования, позволяющий оценить повышенный метаболизм глюкозы в злокачественных клетках с повышенной метаболической активностью – позитронно-эмиссионная томография с применением такого радиофармпрепарата, как 18F-фтордезоксиглюкоза. Данный метод исследования позволяет обнаружить рецидив рака, определить локализацию регионарных и отдаленных метастазов. Согласно многим источникам, чувствительность и специфичность ПЭТ-КТ составляет 85% и 95% соответственно [343].

Так как радионуклидные методы исследования лимитированы в использовании на практике, их нельзя использовать для дифференциальной диагностики доброкачественных и злокачественных узлов щитовидной железы на амбулаторном этапе.

«Золотым стандартом» визуализации морфологии ткани щитовидной железы является биопсия опухолевого образования, широко применяющаяся на практике ввиду высокой чувствительности и специфичности [6, 23]. При применении биопсии щитовидной железы диагностика рака щитовидной железы увеличилась вдвое, а количество операций сократилось на 35-75% [51, 90].

Известны два вида биопсии щитовидной железы – тонкоигольная аспирационная биопсия и трепанобиопсия, из которых чаще используется первый

метод из-за высокой травматизации и риска развития осложнений второго метода (кровотечения и перфорация трахеи) [41], несмотря на его высокую разрешающую способность в оценке ткани опухоли щитовидной железы [90, 224].

На сегодняшний день высокой информативностью для определения тактики и объема хирургического вмешательства на щитовидной железе обладает цитологическое исследование пунктата, полученного путем пункционной аспирационной биопсии под контролем УЗИ [2, 29, 30, 33, 34].

В рекомендациях по диагностике и лечению ВДРЩЖ американской тиреоидологической ассоциации от 2015 г. пересмотрены показания для выполнения ТАБ, так как в новых рекомендациях, в отличие от 2009 г., ТАБ необходимо выполнять при узлах более 1 см с сонографическими признаками высокой и умеренной вероятности рака, более 1,5 см, если значимость признака низкая, а так же при узлах более 2 см при УЗИ признаках с очень низкой вероятностью рака щитовидной железы [116]. В клинических рекомендациях 2009 г. при УЗ-признаках высокой вероятности рака ЩЖ, ТАБ выполнялось при узловых образованиях менее 1 см, однако, данные исследований последних 4-х лет говорят о том, что данные опухоли не обладают клинической значимостью для пациента. Так же в мае 2017 г. Американское общество по профилактике заболеваний (USPSTF) опубликовала рекомендации отмены скринига рака щитовидной железы у пациентов без симптомов рака данной локализации. Рекомендация обоснована экономической целесообразностью данного подхода, в обоснование приводятся данные об отсутствии увеличения прироста смертности [333]. Однако, в статье 2017 г., опубликованной в JAMA [366] распространенность рака щитовидной железы за последние 40 лет увеличивается на 3,6% в год, причем рост заболеваемостью папиллярным раком растет на 4,4% в год. Смертность так же растет на 1,1% в год в общей группе, а в группе папиллярного рака на 2,9% в год (но в запущенных стадия).

Цитологическая картина должна быть описана по системе Bethesda [194, 347]. Данная система включает 6 групп, и в каждой из групп определен риск рака щитовидной железы. В группе однозначных ответов – при однозначно

злокачественном заключении вероятность РЩЖ 97-99%, в группе однозначно доброкачественного заключение – 0-3%. В группе атипии неясного значения риск рака ЩЖ 5-15%, тогда как в группе фоликулярной неоплазии или подозрения на фолликулярную неоплазию доходит до 15-30%. При подозрении на злокачественное поражение риск рака 60-75%. В ситуации неинформативного заключения – 1-4% [346, 348].

При анализе 367 случаев злокачественных образований щитовидной железы результаты цитологического и гистологического исследований совпадали только в 78,2% [16]. Согласно данным аналогичного исследования совпадение составило 71%, и 6% больных с цитологическим диагнозом «коллоидный зоб» имели злокачественное образование щитовидной железы [72]. Однако, по данным исследования Е.М. Трунина (2007, 2008), совпадение результатов цитологического исследования перед операцией и гистологического после оперативного вмешательства составило 96-98%. По мнению автора, несмотря на большой опыт выполнения цитологического исследования биоптата щитовидной железы, всегда есть риск ошибки. Многие исследователи предложили использование для тонкоигольной аспирационной биопсии игл разного диаметра.

Е.А. Акатова (2009) проанализировала данные обследования более 3 000 больных, а также значимость результатов ультрасонографических и цитоморфологических исследований для диагностики рака щитовидной железы. Так, чувствительность и специфичность комплексного метода обследования составила 90,2% и 62,6% соответственно, а диагностическая точность – 76,4%.

Известно, что на ценность ТАБ с цитологией биоптата как метода дифференциальной диагностики новообразований щитовидной железы влияет морфологическая структура самого узла. В исследовании П.С. Ветшева и др. (1995), специфичность ТАБ при фолликулярной аденоме составляет 87,23%, при папиллярном раке – 81,8%, при фолликулярном раке – 44,44%, а при аутоиммунном тиреоидите и коллоидном узловом зобе увеличивается до 97-100%. В своем исследовании Н.Н. Волченко и др. (2007) отметили достоверность цитологического исследования в качестве диагностики

папиллярного рака в 89,7%, наблюдая гипердиагнростику в 0,7%, а гиподиагностику в 9,6% случаев. В 10% случаев из-за неинформативности полученного биоптата верифицировать гистологическую форму рака невозможно. Согласно литературным данным, чувствительность и специфичность ТАБ как метода диагностики рака щитовидной железы находится в диапазоне 65-100% (в среднем, 83%) и 62-100% (в среднем 92%) соответственно [23, 334]. Таким образом, ценность цитологического исследования биоптата неоднозначна при диагностике различных гистологических форм рака щитовидной железы.

Данный метод исследования имеет высокую информативность в отношении диагностики таких видов рака, как папиллярный, медуллярный, низкодифференцированный рак и коллоидный зоб, благодаря патогномоничным цитологическим характеристикам. Однако, при наличии малого количества клеток в аспирате, так называемом «неинформативном материале», диагностическая ценность тонкоигольной аспирационной биопсии резко снижается [28, 30, 369].

Согласно литературным данным, неинформативный материал насчитывает 15-32% случаев [31, 32, 128], в основном за счет кистозно-измененных узлов (74,7%) [30, 328], состоящих из малого количества клеток и жидкостным внеклеточным «содержимым кисты». Для повышения качества диагностики перед хирургическим вмешательством выполняют повторную ТАБ с целью пункции стенки кисты. Однако, по данным Е.Н. Гриневой (2005), повторно выполненная ТАБ кист щитовидной железы не позволяет исключить или подтвердить злокачественный процесс (32%), что вынуждает хирурга определить показания для хирургической манипуляции. Распространенность карциномы в узлах с кистозной трансформацией колеблется до 35%, по данным литературы [128].

Согласно исследованиям Е.Н. Гриневой и др. (2004, 2005), злокачественное образование щитовидной железы обнаруживается в 16,2% случаев удаленных хирургическим путем кистозно-измененных узлов с жидкостью внутри.

С другой стороны, при отсутствии характерных для опухоли признаков в клеточном материале аспирата однозначный диагноз также поставить

затруднительно. Подобные «неопределенные» аспираты составляют группу злокачественных и доброкачественных образований, обладающих схожими цитологическими и морфологическими характеристиками: напр., фолликулярная неоплазия и фолликулярное изменение неустановленной значимости. Соответственно, провести дифференциальную диагностику таких опухолевых образований, полученных ТАБ, вызывает большие трудности. Процент результатов «неопределенных» аспиратов составляет 11-32% [97, 128]. По данным исследований ГУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина, чувствительность цитологии как метода диагностики таких заболеваний, как «зоб», «фолликулярная аденома» и «фолликулярный рак» составляет 60, 58 и 53%, соответственно [46]. В качестве «неопределенного» аспирата чаще всего выступает папиллярный рак с фоликуллярным вариантом (примерно 20% случаев). Согласно данным Z.W. Baloch et al. (2002), патогномоничная цитологическая картина классического папиллярного рака наблюдается лишь в 30% случаев. Верификация фоликуллярной формы папиллярного рака с помощью ТАБ на амбулаторном этапе составляет лишь 9,8% [210]. Диагностика рака среди узловых изменений, «подозрительных на злокачественный процесс», щитовидной железы методом ТАБ колеблется в пределах 10-50% (в среднем 20%) [30, 86]. В связи с частым обнаружением злокачественного процесса среди таких узлов и трудностью постановки верного диагноза на дооперационном этапе ввиду неинформативности цитологического материала, принимаются решения о хирургическом вмешательстве с диагностической целью [264].

Таким образом, верифицировать точный гистологический диагноз и проведение дифференциальной диагностики злокачественных и доброкачественных узлов до оперативного вмешательства возможно лишь в 70-85% случаев [327].

Чувствительность и специфичность цитологического исследования с «определенным» аспиратом составляет высокий процент: 93,9% и 97,5%, соответственно. Несмотря на это, большое количество «недиагностических» заключений ТАБ снижают специфичность метода до 52,5% [29, 33, 34]. 15-30%

случаев, при которых не удается поставить диагноз с помощью цитологического исследования биоптата, проведение дифференциальной диагностики опухолевых образований и принятие решения об объеме операции происходят на интраоперационном и иногда послеоперационном этапе [42, 105].

Трудности дифференциальной диагностики злокачественных и доброкачественных образований щитовидной железы на амбулаторном этапе требуют изучения новых методов исследования с возможностями дооперационной верификации морфологического диагноза и определения объема хирургического вмешательства.

1.3 Молекулярно-генетические онкомаркеры в диагностике высокодифференцированного рака щитовидной железы

Последние десятилетия взгляд современный онкологии был направлен на обнаружение органоспецифических маркёров злокачественных новообразований в организме человека, однако выявить их удалось для сравнительно небольшого количества опухолей. Поиск эффективной диагностической панели был поддержан и рекомендациями американской тиреоидологической ассоциации 2015 г., в которых рекомендовано проводит данное тестирование в группах цитологических заключений Bethesda III и IV, именно для этих групп пациентов получены данные об экономической эффективности дооперационного молекулярного тестирования с целью уменьшения количества диагностических операций [335]. Лишь 10-15 лет назад начали появляться первые сообщения об обнаружении специфических маркёров рака щитовидной железы [186, 218]. На данный момент поиск тиреоид-специфичных онкомаркеров в периферической крови не увенчался успехом. Наиболее перспективными кандидатами на эту роль являются HBME-1, CK-19, CK-16, Ki-67, p53, галектин-3 [152, 254, 262].

Однако их место в диагностике до сих пор остаётся неоднозначным. Например, по данным И.А. Гилязутдинова и Р.Ш. Хасанова (2004), Д.С. Ланцова (2006, 2007), Д.Л. Ротина, А.И. Павловской (2007), M. Prasad (2005) повышение значений p53, Ki-67 и цитокератина 19, как правило, указывает на наличие у пациента папиллярного рака щитовидной железы. А исследования Н.Н. Волченко и др. (2007) выявили экспрессию HBME-1 в 78% случаев папиллярного рака, в то время как при доброкачественных процессах в щитовидной железе такого обнаружено не было.

С другой стороны, анализ Д.Л. Ротина, А.И. Павловской (2007) и M. Prasad (2005) относит HBME-1 и Ki-67 к маркёрам фолликулярного рака, в случае этого новообразования они экспрессируются чаще и интенсивнее, нежели при папиллярном. А цитокератин 19 в опытах Н.Н. Волченко (2007) обнаруживается как при папиллярном раке (98%), так и при некоторых доброкачественных процессах (20%). Также были предприняты попытки оценки данных маркёров с точки зрения предикатов течения уже имеющихся форм рака щитовидной железы [186, 243]. Таким образом, была установлена прямая связь между стадией папиллярного рака [54], степенью его дифференцировки [28], размерами первичного образования, выраженностью воспалительной инфильтрации, степенью атипии ядра [47] и наличием изменённого p53, а также выраженностью его экспрессии. Кроме того, у образований с гиперэкспрессией p53 отмечается склонность к рецидивам и постоперационному метастазированию, что неизбежно приводит к снижению выживаемости больных [47, 262]. С другой стороны, в исследованиях Е.А. Коган и др. (2006) корреляции между стадией и прогнозом папиллярного рака и повышенной экспрессией p53 установлено не было.

Подобного рода противоречия оставляют открытым вопрос о значимости данных маркёров для диагностики злокачественных новообразований щитовидной железы и требуют их дальнейшего углубленного изучения. Перспективной альтернативой для предсказания прогноза рака ЩЖ могут

послужить молекулярно-генетические методы оценки генетических аномалий, которым уделяется всё больше внимания в современной онкологии.

1.3.1 Использование галектина-3 в качестве онкомаркера высокодифференцированного рака щитовидной железы

Галектин-3 – это белок из семейства лектинов, он связывается с β-галактозилом и принимает участие в следующих процессах: контроль клеточного цикла, клеточная адгезия, активация образования сосудов, метастазирования, рост и апоптоз опухолевых клеток, а также оказывает угнетающие действие на иммунную систему [216, 384]. Дезорганизация процессов экспрессии галектина-3 нарушает регуляцию апоптоза, что приводит к опухолевой трансформации клеток [3, 217]. Точное значение данной молекулы в прогрессии опухолей щитовидной железы до сих пор установить не удалось. Однако исследователи сообщают, что галектин-3 зачастую обнаруживается в онкологических клетках железы высокой степени дифференцировки, тогда как в правильно функционирующих тиреоидных клетках и в доброкачественных образованиях он практически не определяется [44, 96, 197, 213, 214, 328]. Этот факт позволяет рассматривать его в качестве потенциального инструмента в дифференциальной диагностике доброкачественных опухолей от рака щитовидной железы [167, 215, 255].

При дальнейших исследованиях были получены неоднозначные результаты. Многие исследователи отметили, что галектин-3 экспрессируется в клетках папиллярного рака с большей или меньшей активностью [221, 274, 340]. Совместная работа исследователей из Италии и Швеции была посвящена исследованию клинической значимости отрицательного результата галектина-3 у пациентов с неоднозначным цитологическим заключением. Наблюдению

подверглись 176 человек с низким уровнем галектина-3, средний срок наблюдения составил 31 месяц. За это время рост узлов наблюдался лишь у 25% пациентов. По клиническим и УЗИ результатам наблюдения хирургическое лечение потребовалось 36 пациентам, при гистологическом исследовании злокачественный процесс выявлен в 7%, т. е. ложноотрицательных результатов было 7%. В группе же пациентов с галектин-3 положительным статусом, по результатам гистологического исследования ложно положительных результатов 4% (7 из 85 пациентов). Авторы приходят к выводу, что выполнение молекулярной диагностики при неоднозначном цитологическом исследовании ТАБ является перспективной альтернативой, которая позволит уменьшить число диагностических оперативных вмешательств [181].

V.J. Bernet (2002) и его коллеги из Украины С.М. Черенько (2002) выявили значительное повышение галектина-3 как при фолликулярном раке щитовидной железы, так и при его папиллярной форме [96, 190]. В то же время ученый из Италии M.R. Sapio (2007) с соавторами лишь в 91,9% наблюдений папиллярной формы рака удалось установить повышение экспрессии галектина-3 [330]. Однако ряд авторов, такие как M.E. Herrmann (2002), M.F. Beesley (2002) и M. Niedziela (2003), зафиксировали гиперэкспрессию молекулы при аутоиммунном тиреоидите Хашимото, в данном случае такой результат можно рассматривать как ложноположительный [127, 235, 280]. В эксперименте с послеоперационным гистологическим исследованием серии галектин-3 положительных клеток A. Bartolazzi (2008) и коллеги в 75% случаев засвидетельствовали злокачественную природу образования, в 16% оно было доброкачественным, а 8% образцов определялись как «промежуточные». Таким образом, диагностическое значение маркера характеризовалось 78% чувствительностью и 93% специфичностью, положительная прогностическая значимость определялась как 82%, а отрицательная – 91% [217]. В опытах Д. Квежик (2005) при изучении степени активности папиллярного рака щитовидной железы не было обнаружено корреляции между ней и усилением экспрессии галектина-3 [101].

Особенно перспективными казались сведения некоторых авторов о галектине-3 как маркере рака фолликулярной природы. Так, его экспрессия наблюдалась почти в 100% фолликулярных опухолей и не была зафиксирована при доброкачественных вариантах [44, 111, 213, 328, 332]. По данным Н.И. Тимофеевой (2007) при использовании сочетания гистологического и иммуногистохимического методов удалось достигнуть 100% достоверности дифференциальной диагностики злокачественных образований от доброкачественных в сомнительных случаях [86]. Но последующие опыты заставили усомниться исследователей в диагностической достоверности галектина-3 как маркера рака щитовидной железы. Так, при окрашивании проб злокачественных образований фолликулярной природы О.В. Соколова (2008) сообщает о 50% положительных результатов, 33% менее интенсивных иммунный окрашиваний и 17% случаев, где тонирование можно определить как слабое. Таким образом, автор предлагает считать определяющим гистологический способом верификации такого рода опухолей (выявление инвазии в капсулу и/или сосуды), а выявление галектина-3 использовать как второстепенный [86]. При использовании иммуногистохимиии M.R. Sapio (2007) обнаружил гиперэкспрессию галектина-3 только в 75% образцов фолликулярных новооборазований ЩЖ [330].

Как упоминалось ранее, многие исследователи не обнаруживают экспрессиии галектина-3 в нормально функционирующих тиреоидных клетках и в доброкачественных образованиях [44, 213, 328]. Противоречит этим данным обнаружение Luciane Martins et al. (2002) галектина-3 в доброкачественных образцах – 45% при аденоме щитовидной железы и 17% при многоузловом зобе [220]. Эти исследования говорят о 68,6% чувствительности метода выявления галектина-3 при дифференцировке фолликулярной аденомы от фолликулярного рака [220]. Аналогичные результаты продемонстрировала Е.А. Трошина (2007) – галектин-3 не удалось обнаружить только в 45% образцов фолликулярных аденом, а локальное окрашивание определялось как слабое в 32,5% случаев [44]. Кроме того, в опытах M.R. Sapio (2007) была найдена

гиперэкспрессия галектина-3 в 27,4% доброкачественных образований ЩЖ [330]. В экспериментах с использованием антител к галектину-3 Н.Ю. Двинских с коллегами (2009) выявили отрицательный ответ большей части клеток доброкачественных образований (70%), в 12% случаев реакция была положительной (оксифильное окрашивание), а остальные 18% были расценены как сомнительные [36]. Несмотря на противоречивость работ по изучению галектина-3 как диагностического маркера рака ЩЖ, убедительные данные о его эффективности преобладают. Это указывает на необходимость дальнейших исследований в этом направлении.

1.3.2 Использование онкомаркеров в дооперационной диагностике рака щитовидной железы

В последние годы определение онкомаркеров в постоперационном периоде вывели диагностику рака ЩЖ на новый уровень. В данный момент все более перспективным становится метод определения экспрессии данных маркеров еще до проведения операции. Для оценки экспрессии онкомаркеров новообразований щитовидной железы приобретает актуальность иммуноцитохимический метод, использующий образцы менее травматичной тонкоигольной биопсии [3, 6, 7, 21, 22, 54, 57, 76, 101, 216, 330, 384]. Это позволяет совершенствовать хирургическую тактику лечения без использования высокоинвазивной трепан-биопсии [87].

Концепция фиксации антигенов с помощью антител прямо в тканях нашла реализацию уже в первой половине 40-ых годов. В дальнейшем иммуногистохимия стала незаменимым методом молекулярной клинической диагностики, благодаря открытию моноклональных антител к 70-ых годах её значение только возросло. Методы гисто- и цитохимической диагностики основываются на реакции иммунофлюоресценции. Проточная и статическая цитометрия позволяют визуализировать необходимые клетки с помощью

специальных меток. Традиционная статическая цитометрия использует конфокальные микроскопы, а также доступные системы анализа изображения, смонтированные на привычных люминесцентных микроскопах. Проточная же цитометрия требует особых приспособлений – проточных цитометров и сортеров.

Несмотря на большие затраты на оснащение, последняя имеет ряд преимуществ перед более простой статической цитометрией: 1) большая достоверность результатов, достигаемая за счет увеличения числа исследуемых клеток (более 100 000 против нескольких сотен клеток, доступных для микроскопии); 2) доступность количественной оценки с помощью изменения интенсивности рассеивания для различной длины волны; 3) способность одновременно оценить и структуру, и всевозможные характеристики компонентов одной клетки. Совершенствование автоматизации в сфере диагностических систем проточного типа позволило не только в короткие сроки внедрить цитометрию в клиническую практику, но и широко использовать её для профилактических осмотров.

Проточная цитометрия уже успешно используется в таких областях как гематология, гастроэнтерология, гинекология и урология. Кроме того, уже появились первые сообщения об использовании проточной иммуноцитометрии для определения экспрессии галектина-3 в аспирационном материале ЩЖ от команды японских исследователей H. Inohara et al. (1999) [207].

Вопреки необходимости соблюдать строгие рекомендации при воспроизведении авторской японской методики, имеющей значительные технические сложности, нельзя отрицать перспективность данного метода для клинической практики и науки. Однако скудность сведений в отношении использования проточной цитометрии для выявления экспрессии различных маркеров делает невозможным на данном этапе их внедрение в прикладную медицину. С другой стороны, уже получены данные о том, что определение галектина-3, Ki-67, HBME-1, FHL1, цитокератина 19 и p53 при тонкоигольной аспирационной биопсии позволяет увеличить её чувствительность и специфичность до 97% и 95% соответственно [6, 21, 22, 44, 74, 94, 328]. Однако

Н.Н. Волченко (2007) в своих работах утверждает, что не существует маркеров, позволяющих с высокой достоверностью говорить о малигнизации фолликулярного эпителия. Для повышения эффективности дифференцировки папиллярного рака от доброкачественного образования щитовидной железы исследователь предлагает использовать как минимум 2 онкомаркера – например, цитокератин 19 и HBME-1 [94]. Н.Н. Волченко с коллегами установили, что Ki-67 не может быть использован для дифференциальной диагностики доброкачественных узлов от папиллярного рака щитовидной железы [94].

Современные данные о дооперационной регистрации экспрессии галектина-3 в ткани узлов ЩЖ нельзя назвать исчерпывающими. В исследованиях S. Savin (2003) продемонстрирована выраженная экспрессия галектина-3 в злокачественных образованиях щитовидной железы, в то время как в нормальной ткани или аденоме ее обнаружено не было [213, 332]. С другой стороны, A. Bartolazzi (2008) удалось верно дифференцировать только 88% фолликулярных опухолей с использованием этого метода и до, и после хирургического лечения [217]. Изучая данные экспрессии галектина-3 в тканях узлов ЩЖ при помощи иммуноцитохимии, Husain A. Saleh et al. (2009) пришел к выводу, что специфичность метода в отношении обнаружения малигнизации составила 92,6%, а специфичность – 77,3%. Согласно их результатам, повышение экспрессии обнаруживалось среди 92,6% злокачественных и только в 22,7% случаев доброкачественных новообразований [196]. В исследованиях M.R. Sapio (2007) гиперэкспрессия галектина-3 при папиллярной форме рака обнаруживается в 91,9%, фолликулярной – только в 75,5%, а в 27,4% случаев был зарегистрирован положительный результат и в отношении доброкачественных новообразований [330]. По данным M.R. Sapio (2007) гиперэкспрессия галектина-3 при папиллярной форме рака обнаруживается в 91,9%, фолликулярной – только в 75,5%, а в 27,4% случаев был зарегистрирован положительный результат и в отношении доброкачественных новообразований [330]. По версии Orlandi и Saggiorato (1998) анализ экспрессии галектина-3 может быть использован в качестве дополнительной диагностической процедуры перед любыми методами

хирургического лечения тиреоидных образований [219]. E. Saggiorato (2001, 2005) называет галектин-3 универсальным маркером микрокарциномы щитовидной железы ещё до проведения операции [216, 328]. Luciane Martins et al. (2002) при использовании иммуноцитометрии для выявления галектина-3 в тканях узла щитовидной железы определяет чувствительность и специфичность метода как 93,8% и 68,6% соответственно [220].

Из вышеприведенных данных следует, что, несмотря на двойственность результатов исследований галектина-3 в качестве дооперационого предиктора злокачественности узлов тиреоидной ткани, метод является перспективным и при должном изучении может занять одно из главных мест в современной диагностике рака щитовидной железы.

1.4 Значимость BRAF-мутации при папиллярном раке щитовидной железы

В последние годы появились сведения о возможности обнаружения различных мутаций в аспиратах тонкоигольной пункционной биопсии как дополнительного инструмента для дифференциальной диагностики РЩЖ [106, 113, 176]. Ряд исследователей выявили связь между генетическими аберрациями и морфологией, с одной стороны, и клиническим поведением опухоли, с другой. Эта корреляция позволяет считать прогностически ценным выделение отдельных вариантов ПРЩЖ.

Полагают, что улучшить предоперационную диагностику РЩЖ и оптимизировать диагностическую эффективность цитологического исследования аспиратов из узлов щитовидной железы можно путем внедрение данного подхода в клиническую практику [122, 148, 172, 209, 241, 270, 308].

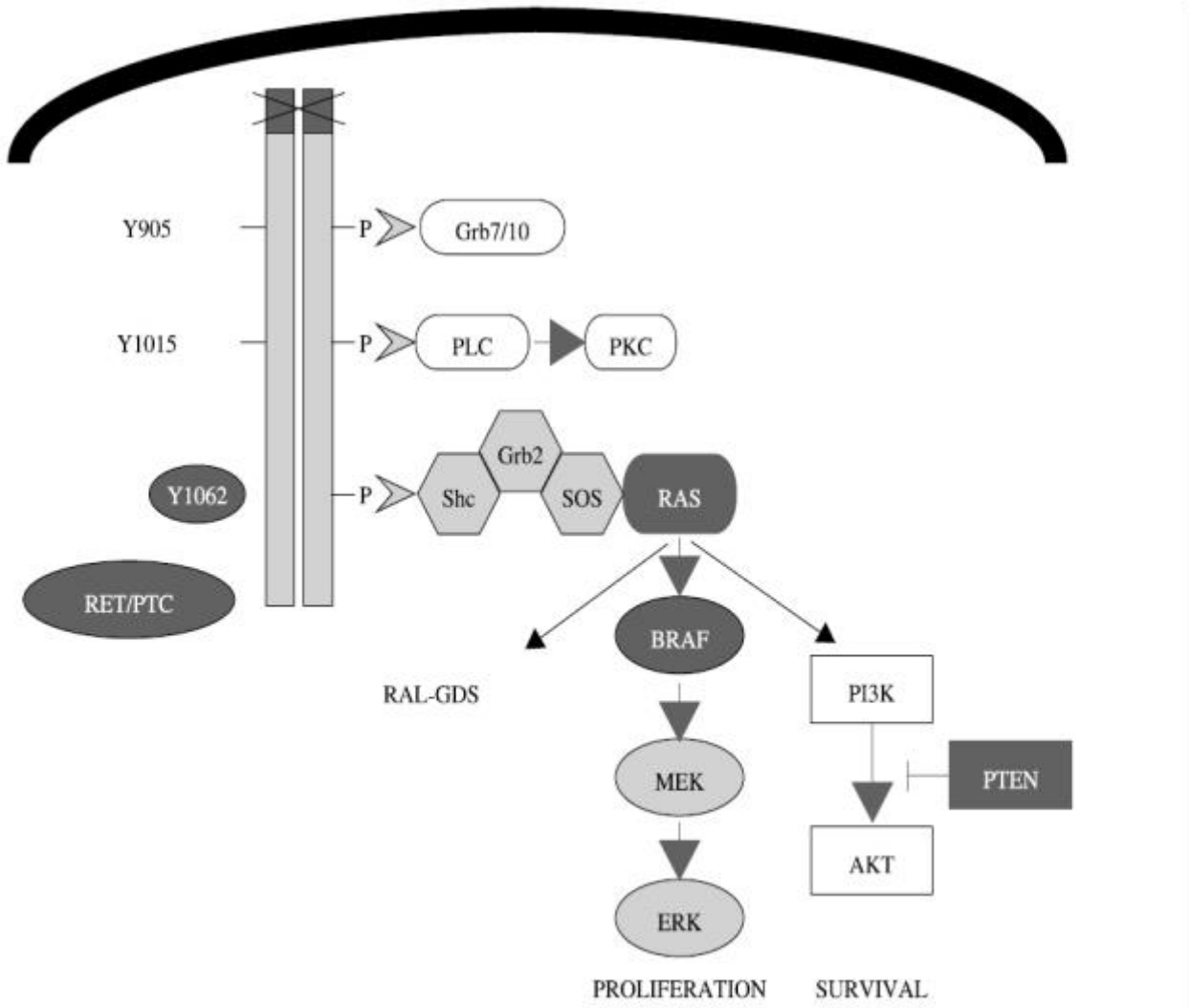
1.4.1 Молекулярная патофизиология спорадического высокодифференцированного рака щитовидной железы. Мутация гена BRAF

Понимание генетических особенностей конкретного пациента позволяет с большей достоверностью определить прогноз и сформировать персональный подход к лечению, в том числе и назначать молекулярно-генетически обоснованное лечение взамен эмпирически подобранного. Множественные исследования, проведенные в последнее время, продемонстрировали разницу в молекулярной основе наследственного рака щитовидной железы и спорадического, возникающего вследствие соматических мутаций. Подобно другим злокачественным опухолям, он проходит стадии инициации и развития, в основе которых лежат различные генетические события: активирующие и деактивирующие соматические мутации, изменение уровня экспрессии гена, аберрантное метилирование гена, дисрегуляция микроРНК. В основных генах-регуляторах при раке щитовидной железы, как при ряде других опухолей, чаще всего происходят точечные мутации и хромосомные перестройки: перестановка единственной нуклеотидной последовательности приводит к формированию дефекта или слиянию целых участков хромосом [283].

Изменения активности митоген-активируемых протеинкиназных (MAPK) каскадов считают наиболее изученным механизмам развития РЩЖ. Каскад данных вторичных посредников представляет собой цепь последовательных фосфорилирований нескольких различных протеинкиназ (ПК), результатом которого является активация одной из митоген-активированных протеинкиназ (MAPK-протеинкиназ) [130]. MAPK протеинкиназы – группа белков, состоящая из трех семейств протеинкиназ – p38, JNK/SAPK (c-Jun N-terminal kinase/ Stress activated protein kinase) и ERK (extracellular signal-regulated kinase) [147]. Активация ПК семейства ERK играет роль в клеточном цикле и стимуляции

пролиферации. Активация протеинкиназ семейства p38 и JNK, в свою очередь, связана с индукцией апоптоза [164].

Основные мишени MAPK-протеинкиназ – траскрипционные факторы, поскольку ответом на различные клеточные стимулы в клетках является изменение экспрессии тех или иных генов [326]. Важными субстратами MAPK являются транскрипционные факторы, локализованные в ядре. Однако далеко не все активированные в цитоплазме MAPK перемещаются в ядро. Большая часть MAPK остается в цитоплазме и других субклеточных компартментах. Какую роль играют ПК, находясь там, изучено гораздо меньше. Одной из функций MAPK является возможность регулировать экспрессию генов на постранскрипционном уровне. Для этого в качестве субстратов выступают цитоплазматические белки (рисунок 1.1) [287, 300, 336, 374].



Thyroid cancer genes (black) and the pathways they control. Mutually exclusive mutations of either RET/PTC, RAS or ovide compelling genetic evidence for the critical role of the MAPK pathway. Additionally, recent studies point to an t role of the PI3K/AKT pathway in thyroid tumorigenesis. Adapted from Fagin 2004.

Рисунок 1.1 – Гены, участвующие в канцерогенезе (выделены черным) и митоген-активируемые каскады. MAPK- киназный каскад, запускаемый мутациями RET/PTC, или BRAF, или RAS.

Нарушение протоонкогена RET считается одной из первых описанных генетических изменений, встречающихся при РЩЖ [107, 150]. Ген RET кодирует рецептор тирозинкиназы для фактора роста, экспрессирующегося в нейроэндокринных клетках. В ходе перестройки происходит перенос 3' конца гена RET, локализованного на хромосоме 10q11.2, на 5' конец различных генов. В результате осуществляется лиганд-независивая активация тирозинкиназного рецептора [121, 165].

Также при РЩЖ большую роль играет PI3K/AKT путь, который, по данным ряда исследований, тоже является митоген-активируемым. Медиатором конституциональной активности RET отчасти является аутофосфорилирование тирозинового остатка Y1062. Это проявляется в сигнал-независимом функционировании каскада RAS/RAF/MAPK [153]. Перенос 3'-концевого отдела гена RET происходит на так называемые PTC гены. Наиболее распространенными вариантами перестановок являются RET/PTC1 и RET/PTC3 [129, 318]. Перестановки RET/PTC наиболее часто встречаются при радиоиндуцированных РЩЖ. В педиатрической практике наблюдался прирост выявления РЩЖ после Чернобыльской катастрофы в 1986 г. Это обусловило выделение двух клинических групп рака. Первая группа характеризовалась наличием мутации RET/PTC3 и развитием заболевания с агрессивным течением у детей. Вторую группу составляли случаи с РЩЖ более благоприятного течения и более позднего развитие, а также обнаружение мутации RET/PTC1 [150, 170, 246]. Были проведены исследования на трансгенных животных (мышах) и в условиях in vitro, результатом которых стало доказательство роли RET/PTC в инициации ПРЩЖ [155].

Перестановка RET/PTC является специфичной для ПРЩЖ. Распространенность ее при радиационно-индуцированном раке составляет 30-65% и 5-15% при спорадическом раке [313]. В результате более поздних исследований были обнаружены генетические нарушения, характерные для спорадического РЩЖ. Ген BRAF является одним из наиболее широко изучаемых генов при данном заболевании [158]. Мутации в гене BRAF – наиболее распространенная генетическая аномалия при ПРЩЖ. Частота их встречаемости варьирует от 29 до 83% по данным различных исследований [154, 329]. BRAF-киназа является частью важнейшего сигнального пути MAPK и отвечает за такие внутриклеточные процессы, как дифференцировка, клеточная пролиферация, клеточное выживание и апоптоз [271, 273].

Патологическая активация данного сигнального пути может привести к активации неогенеза [171]. Точечная мутация T1799A является активирующей и

приводит изменению в конечном продукте (белке) путем замены аминокислоты валин на глутамин в позиции 600 (BRAFV600E) [136]. Данная мутация также встречается при меланоме, колоректальном раке и др. [163, 297, 323]. Ввиду недостаточно эффективной дооперационной диагностики рака щитовидной железы становится необходимым открытие новых методов, дополняющих цитологическое исследование. За последние года все большую популярность набирают сообщения о возможности молекулярного тестирования материала тонкоигольной аспирационной биопсии (ТАБ) на BRAF-мутации. Обнаружение BRAF-мутации позволит повысить диагностическую точность ТАБ за счет высоких показателей специфичности и чувствительности в образцах с «неопределенной» цитологией ложных-негативных случаях соответственно [112, 281, 362]. В исследовании I. Marchetti et al. (2012) применялся комплексный подход к диагностике: сочетание цитологического исследования и молекулярного тестирования. В сравнении с применением только цитологической диагностики, данная методика позволила увеличить выявляемость папиллярной микрокарциномы на 37%. В клинических рекомендациях по молекулярной диагностике материала ТАБ щитовидной железы европейской тиреоидологической ассоциации, опубликованных в 2017 г. [203] рекомендуется в группе цитологических заключений класса Bethesda III, IV выполнять молекулярную диагностику на выявление BRAF и RET/PTC, при возможности дополнять их PAX8/RRARG. Клиническое значение определения RAS мутации требует дальнейшего изучения. В случает однозначно доброкачественного заключения (Bethesda II) молекулярная диагностика не рекомендована, так же как и в ситуации цитологического заключения Bethesda V. Однако, далее в рекомендациях говорится о потенциальном снижении количества рецидивов ПРЩЖ при определении объема хирургического лечения, основываясь на результатах дооперационного молекулярно-генетического тестирования, в частности опрелении мутации BRAF V600E. Но это заявление, по мнению авторов, требует проведения дальнейших исследований.

Знание генетики РЩЖ позволяет выявлять и использовать молекулярные онкомаркеры в диагностике. В настоящее время считается, что успешность терапии зависит от правильности постановки диагноза на ранних этапах течения заболевания. Итак, обнаружение новых генетических мутаций и поиск методов их детекции в материале тонкоигольной аспирационной биопсии представляет собой актуальную проблему предоперационной диагностики РЩЖ.

1.4.2 BRAF мутация и гистологический вариант папиллярного рака щитовидной железы

Данные о распространенности мутаций в гене BRAF рознятся среди исследований. Одной из причин считается неоднородность исследуемых групп. Ведь образцы папиллярного рака, подвергающиеся генетическому тестированию, могут иметь различные гистологические варианты строения. В связи с этим в последнее время все чаще появляются исследования, направленные на обнаружение корреляции между наличием мутации BRAF и вариантом гистологического строения ПРЩЖ [125, 166, 272]. Так, в нескольких работах с высокой степенью достоверности показана связь наличия BRAF-мутации и определенных гистологических вариантов строения папиллярного рака щитовидной железы: классический и высококлеточный варианты строения [131, 151, 160, 179]. Такая тенденция может обуславливать столь обширный разброс распространенности BRAF-мутации у различных авторов. Невозможность включения таких работ в мета-анализ связана именно с неоднородностью гистологического строения опухоли среди групп пациентов с РЩЖ. BRAF мутации характерны исключительно для папиллярного и анапластического РЩЖ [187, 188, 341]. Для ФРЩЖ, МРЩЖ или доброкачественных образованиях (аденома, коллоидный узел) ЩЖ выявить эту мутацию не удалось [156, 184, 206, 323]. В работе J. Knauf et al. (2005), где

использовались трансгенные линии мышей, была доказана роль инициатора одиночной мутации BRAFV600E в туморогенезе ПРЩЖ in vivo [344]. Результаты исследования дают право считать мутацию гена BRAF ведущей при канцерогенезе ПРЩЖ.

Связь между генотипом и фенотипом BRAF-положительных опухолей щитовидной железы в настоящее время вызывает повышенный интерес. В ходе ряда исследований выявлена определенная связь между генетическим дефектом MAPK-киназного пути и фенотипом папиллярного рака ЩЖ [205]. Так для классического варианта ПРЩЖ наиболее характерна перестановка RET/PTC1 [124, 331], В то же время, при солидном и высококлеточном варианте ПРЩЖ, особенно при радио-индуцированном (постчернобыльский вариант), наиболее часто встречается RET/PTC3 [161, 322]. Для фолликулярного варианта ПРЩЖ наиболее распространены активирующие мутации генов семейства RAS [156]. В работе K.C. Lee et al. (2012) при классическом варианте ПРЩЖ мутация BRAFV600E была выявлена в 337 из 570 случаев (59%), при высококлеточном варианте – в 34 из 43 (79%), и 29 из 172 случаях (17%) при фолликулярном варианте ПРЩЖ. Большая часть исследований отмечает ассоциацию BRAF мутация и классического варианта или высококлеточного варианта ПРЩЖ. Много реже мутация BRAF определяется при фолликулярном варианте ПРЩЖ [134, 135, 249].

Также можно отметить результаты немногочисленных исследований, направленных на изучение встречаемости мутации BRAF среди редких вариантов гистологического строения ПРЩЖ. Так, при онкоцитарном варианте РЩЖ (гюртлеклеточная карцинома фолликулярного/папиллярного строения) среди 18 изученных больных не было обнаружено ни одного случая BRAF-положительной онкоцитарной карциномы папиллярного строения [199].

Во многих работах последних лет рассматривался вопрос наличия корреляционной связи между присутствием BRAF мутации и клинико-морфологическими признаками агрессивного течения и неблагоприятного прогноза [56, 373]. Достаточно часто удается диагностировать ПРЩЖ на этапе

микрокарциномы (МК) диаметром менее 1 см [380]. При этом, в МК с высокой частотой могут обнаруживаться признаки агрессивного течения заболевания: инвазия в капсулу железы, лимфогенное метастазирование и др. [143, 385]. Была проведена оценка распространенности выявления мутации гена BRAF в 64 случаях МК. Показано, что частота встречаемости BRAF V600E составляет 37,5%. В то же время, на меньших выборках МК получены похожие результаты. Так V. Trovisco et al. (2007, 2008), путем анализа данных о наличии BRAF мутаций в различных вариантах ПРЩЖ, было выявлено нахождение мутации BRAF в 4 случаях из 10. Спустя год в исследовании с большей выборкой авторам удалось выявить распространенность 43% BRAF-мутации при МК ЩЖ. В исследовании I. Marchetti et al. (2012) частота встречаемости данной мутации в микрокарциномах папиллярного строения составила 74%. Таким образом, тенденция расхождения информации о распространенности BRAF мутации в случаях папиллярного рака менее 1 см в диаметре диктует необходимость дальнейшего изучения проблемы. Группа исследователей оценивала связь между частотой BRAF-мутации в МК ЩЖ и более агрессивным течением и высокой частотой экстратиреоидной инвазии. В результате исследования выявлена зависимость данных клинико-гистологических характеристик с BRAF-положительными вариантами МК ЩЖ.

Однако в работе X. Zheng et al. (2013) различия в частоте рецидивов BRAF-положительных микрокарцином по сравнению с BRAF-негативными не оказались статистически значимыми. Однозначные выводы не могут быть сделаны на основе немногочисленных исследованиях и небольших по объему выборках. Изучением частоты встречаемости BRAF-мутации при редких вариантах гистологического строения ПРЩЖ было посвящено небольшое количество исследований [26, 139].

Так, исследование V. Trovisco et al. (2007, 2008) было направлено на изучение распространенности мутации гена BRAF при онкоцитарном варианте ПРЩЖ (гюртлеклеточная карцинома, которая может быть как фолликулярного, так и папиллярного строения). В работе использовалась небольшая выборка и

обнаружить BRAF-мутации удалось в 6 из 15 случаев онкоцитарного варианта ПРЩЖ (40%). Немаловажно, что во всех 6 случаях наблюдалась папиллярная архитектоника. Таким образом, варианты гистологических подгрупп ПРЩЖ следует принимать во внимание при выявлении мутации гена BRAF. Так, данная мутация наиболее часто встречается при классическом варианте строения ПРЩЖ, высококлеточном и онкоцитарном раке. Работ, направленных на изучение распространенности BRAF мутации при различных гистологических вариантах высокодифференцированного рака щитовидной железы в популяции Санкт-Петербурга, нами не было найдено.

1.4.3 Значение BRAF мутации в стратификации риска при раке щитовидной железы

ПРЩЖ протекает относительно доброкачественно и хорошо поддается лечению. Однако процент летальности остается постоянным. Зачастую это обусловлено недостаточным объемом первоначальной терапии. Изначально определить объем необходимого лечения можно путем разработки адекватной системы стратификации рисков рецидива и персистенции заболевания [8, 251, 342]. BRAF-мутация в настоящее время является потенциальным прогностическим маркером при ведении пациентов с ПРЩЖ, поскольку она играет ведущую роль в канцерогенезе ПРЩЖ, и, возможно, влияет на клинико-гистологические характеристики данного заболевания [103, 299].

То, как именно влияет мутация BRAF на фенотипические особенности опухолей щитовидной железы, является предметом многих исследований последнее время [159]. Большая часть работ отмечает корреляцию между BRAF-мутациями и одним или несколькими клинико-патологическими вариантами агрессивного течения ПРЩЖ. Также наличие BRAF-мутации многие связывают с плохим прогнозом заболевания [154, 379].

В настоящее время активно изучается корреляция между BRAF мутацией и неблагоприятным прогнозом течения рака щитовидной железы, так как современная система оценки риска рецидива, основанная на возрасте, поле пациента и стадии опухолевого развития не является достаточно достоверной. По данным множества работ, наличие BRAF мутации действительно связано с наличием клинико-морфологических признаков агрессивного течения ПРЩЖ. По результатам проведенного в 2007 году мета-анализа с 1 168 наблюдениями было доказано, что наличие BRAF мутации ассоциировано с инвазией в соседние органы и наличием регионарных метастазов, при этом не наблюдалась связь с расой, полом, возрастом и размером опухоли [249]. Согласно работе L. Yip (2013) года, мутация BRAF V600E является единственным независимым прогностическим фактором метастазов в центральную клетчатку шеи при папиллярном раке щитовидной железы [174, 299]. В исследовании Y.L. Zhou (2012) отмечается, что наличие BRAF-мутации является независимым предиктором наличия оккультных папиллярных карцином в другой доле [300]. К аргументам в пользу роли BRAF-мутации как неблагоприятного прогностического фактора можно отнести результаты исследование V. Vasko (2005), согласно которым мутация часто обнаруживается в метастатических лимфоузлах. Особый интерес вызвало выявление мутации в лимфоузлах при ее отсутствии в первичной опухоли. Это может служить признаком дедифференцировки опухоли, произошедшей вследствие данного генетического дефекта, и являться маркером неблагоприятного прогноза [229].

Однако существует ряд исследований, представляющих иное мнение [119, 282], авторы которых связывают инвазивный рост опухолей ЩЖ не с BRAF-мутацией, а с вторичными изменениями генома на фоне геномной нестабильности.

Согласно ряду исследований, проведенных в разных географических регионах среди различных этнических групп была доказана связь BRAF мутации с повышенным риском рецидива заболевания [142, 180, 357]. Важно отметить, что сильнее всего данная зависимость была среди пациентов, отнесенных согласно

существующим критериям, описанным в стандартных действующих согласительных документах и рекомендациях, к группе низкого риска [141]. Таким образом, у BRAF-положительных пациентов, отнесенных по стандартам к группе низкого риска, в ходе исследования был диагностирован рецидив РЩЖ. Важно учитывать, что распространенность BRAF-мутации в группе пациентов с рецидивами выше, чем у пациентов без рецидивов, и составляет 85% [178, 231]. В статье 2010 года M. Xing рассматриваются данные о положительной и отрицательной прогностической вероятности BRAF мутации предсказать рецидив папиллярного рака, которые составили 28% и 87%, соответственно [383]. Данные прогностические характеристики, на первый взгляд, служат достаточным основанием для использования критерия BRAF мутации для распределения пациентов по группам риска. Однако есть исследования, где отрицается связь мутации BRAF с агрессивным течением и неблагоприятным прогнозом.

Так, финские авторы приводят данные, согласно которым частота рецидивов у пациентов с BRAF-позитивными опухолями не превышает таковую у больных с BRAF-негативными образованиями [157]. В тайваньской популяции была отмечена высокая частота встречаемости BRAF-мутации, что не было, однако, ассоциировано с неблагоприятными клинико-патогенетическими типами, что отрицает возможность использования BRAF в качестве потенциального прогностического фактора [285]. В Корее BRAF-мутация была обнаружена в папиллярных микрокарциномах, но корреляция с неблагоприятным прогнозом отмечена не была [349]. Французскими исследователями, а так же в работах ряда российских авторов не была найдена связь BRAF мутации с неблагоприятным прогнозом [67, 138].

Тем не менее, существует еще одним фактор, доказывающим влияние BRAF мутации на прогноз при папиллярном раке. Согласно мета-анализу, проведенному в 2013 году M. Xing, в который вошли 1 849 пациентов из 13 центров в 7-ми странах мира, было доказано наличие связи между наличием мутации BRAF и увеличением риска рак-ассоциированной смерти пациентов. Средний срок наблюдения составил 33 месяца (13-67 месяцев). Следует отметить, что хотя

смертность от рака щитовидной железы и имеет тенденцию к росту, она остаётся весьма умеренной, что обуславливает необходимость дальнейших исследований [123]. Среди наиболее интересных работа Elisei et al. (2008), в которой было произведено наблюдение за течением ПРЩЖ после оперативного лечения у 102 пациентов в течение 15 лет, при этом пациенты были разделены по BRAF статусу. Данные этого и многих других исследований свидетельствуют, что наличие BRAF-мутации обуславливает неблагоприятного прогноза для BRAF-положительных пациентов. Такие пациенты составили группу некурабельных больных, а также пациентов с летальным исходом [358]. По данным L. Yip (2011), единственным независимым предиктором метастазов в центральную клетчатку шеи при папиллярном раке щитовидной железы является мутация BRAF V600E [154]. Торпидное течение РЩЖ позволяет исследователям продолжить работу для определения более длительного прогноза.

На сегодняшний день на основании анализа литературных данных можно говорить о том, что в связи с недостатком долгосрочных исследований невозможно достоверно оценить влияние BRAF мутации на онкоспецифичную смертность, так как папиллярный рак щитовидной железы отличается медленной прогрессией с низкой ассиоциированной смертностью [345]. На основании данных о роли мутации гена BRAF в развитии папиллярного рака щитовидной железы и прогрессировании до анапластического, можно предположить возможную эффективность воздействия, особенно в случае быстро прогрессирующих метастатических опухолей. Несмотря на то, что в случае анапластического рака можно было бы предположить рост частоты встречаемости мутации гена BRAF, этого не наблюдается и согласно опубликованным исследованиям, частота выявления мутации в таких случаях не превышает 25% [337]. В исследованиях с большей частотой выявления вопросы вызывает методика определения мутации, что не позволяет включать эти работы в мета-анализ [225]. Причиной же низкой распространенности BRAF мутации при анапластическом раке щитовидной железы может быть вовлечение иных генетических механизмов, обуславливающих прогрессирование папиллярного

рака щитовидной железы и активации каскада RAS/RAF/MEK/ ERK/MAP [208, 223, 244, 293-295, 314, 355].

Также стоит отметить, что BRAF-мутация является независимым прогностическим фактором развития оккультных папиллярных карцином в противоположной доле [287, 300]. В работе C.L. Shi et al. (2017) [177] делают вывод, что комплекс из экстратиреиодной инвазии, метастатического поражения лимфоузлов и наличие BRAF V600E обуславливает риск рецидива ПРЩЖ. В связи с этим при обнаружении BRAF мутации в папиллярных микрокарциномах ЩЖ предлагается выполнение тиреоидэктомию.

Данные о риске рецидива при наличии BRAF-мутации также подтверждаются в мета-анализе 2017 г. [104], который включает 8 исследований и 6 659 пациентов.

Интересно, что некурабельность пациентов в большинстве случаев обусловлена отсутствием способности к аккумуляции I 131. В последние годы появились данные о связи между снижением способности опухоли ЩЖ поглощать I 131 и мутацией BRAF [162, 345]. За эту способность отвечает ген SLC5A5, кодирующий натриево-йодный симпортер (NIS). Данный механизм обусловлен снижением экспрессии гена SLC5A5, что встречается с частотой до 15-20% и также может быть связано со снижением экспрессии генов TPO, TSH-R, TTF-1. Для пациента с обнаруженной радиойод-резистентностной опухолью такие генетические нарушения ассоциированы с дедифференцировкой опухоли и соответственно более плохим прогнозом [211, 265, 372].

На основе этих данных можно рассматривать BRAF-мутацию в качестве важного прогностического маркера на дооперационном этапе. Согласно клиническим рекомендациям АТА в стратификации риска рецидива заболевания нашли отражение данные всех этих исследований. Теперь критерием включения пациента в группу высокого или промежуточного риска является наличие мутации BRAF, в т.ч. BRAF положительные микрокарциномы.

Таким образом, BRAF-мутация может стать перспективным маркером. Он может использоваться как дополнительный фактор стратификации риска при

РЩЖ. Также наличие мутации BRAF может служить критерием для определения объема хирургического лечения и тактики ведения пациента в послеоперационном периоде. Однако разноречивость имеющихся данных в настоящее время не позволяет использовать данный маркер в качестве стандарта для диагностики и лечения высокодифференцированного рака щитовидной железы. Для этого требуется проведение дальнейших исследований в данном направлении.

1.5 Натрий-йодный симпортер в норме и при высокодифференцированном раке щитовидной железы

НИС является представителем семейства растворимых натриевых симпортеров. Функция данной группы белков заключается в транспорте ионов натрия по электрохимическому градиенту, что является необходимым условием переноса через мембрану йода [279]. Большая роль в изучении физиологии тироцита отводится открытию в 1996 г. и клонированию кДНК НИС мыши [185]. В настоящее время строение НИС представлено следующей моделью: белок имеет 13 трансмембранных доменов, 2 экстрацеллюлярных гликопротеидных домена и карбоксильный цитозольный домен (рисунок 1.2). Данная структура доказана экспериментально [174, 275].

Основой функционирования НИС является гидроксильная группа в 354-ой позиции белка НИС. Мутация, сопровождающаяся изменением структуры белка в данной позиции, приводит к утрате функции НИС [290, 316].

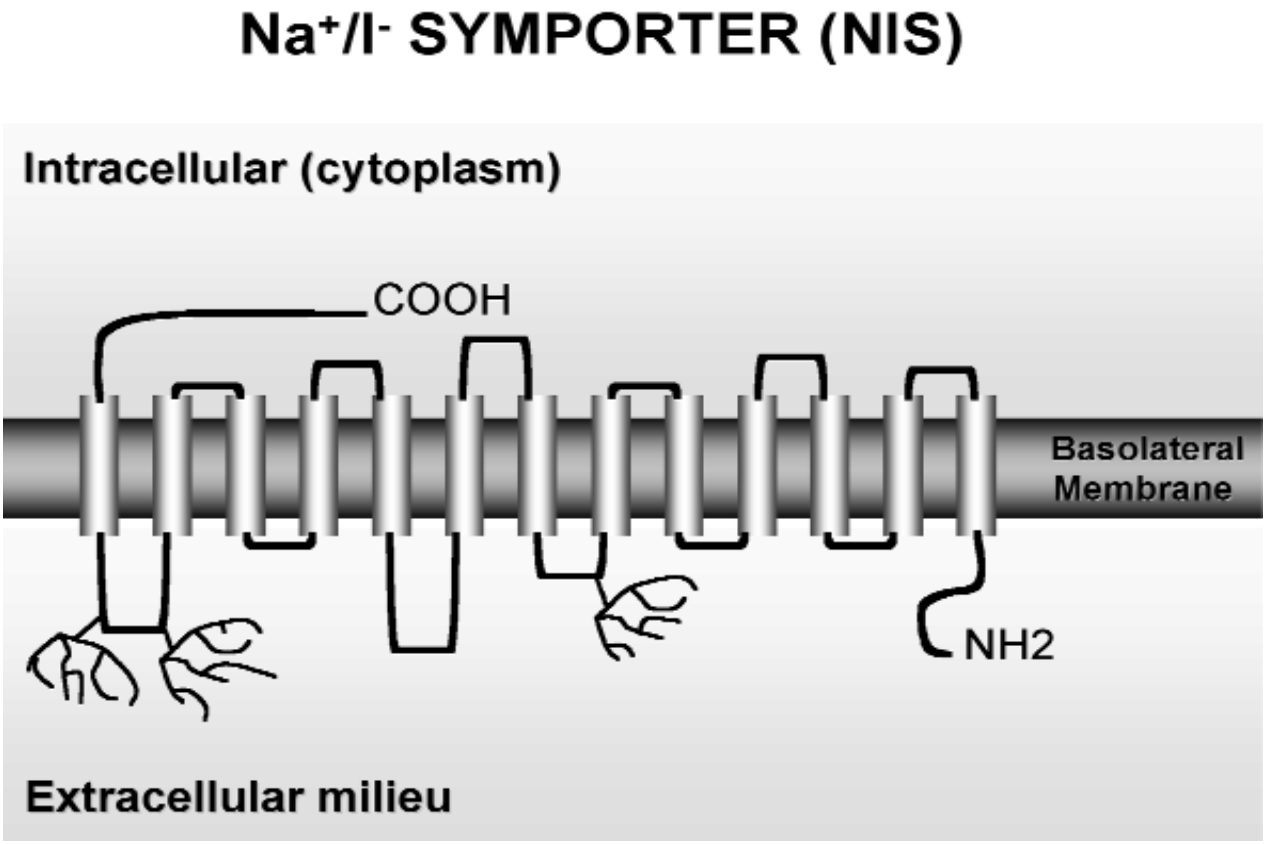


Рисунок 1.2 – Модель структуры натрий йодного симпортера (Carvalho D.P., Ferreira A.C.F., 2007).

Врожденные заболевания щитовидной железы, при которых нарушается транспорт йода через мембрану тироцита, характеризуются наличием данной мутации. На экспрессию мРНК НИС и функцию белка воздействуют различные факторы: ТТГ, йод, эстроген. Так ТТГ, активируя экспрессию гена НИС, увеличивает поглощение тироцитами йода in vivo и in vitro [276]. В экспериментах на мышах и клеточных линиях была продемонстрирована обратная корреляция между содержанием йода и уровнем экспрессии мРНК НИС, синтезом белка, а также мембранной активностью НИС [200]. Аналогичным подавляющим эффектом на функционирование НИС обладает эстроген, что было доказано на клеточной линии FRTL-5 [212]. Доказательством депрессивного влияния эстрогена на НИС является эксперимент на мышах, в котором у мышей после овариэктомии на заместительной терапии этрадиолом увеличивалась экспрессия НИС [202].

1.5.1 Синтез натрий-йодного симпортера при различных заболеваниях щитовидной железы

Исследования экспрессии НИС в доброкачественных образованиях щитовидной железы, образующихся из фолликулярного эпителия и обладающих низкой функциональной активностью, к однозначным результатам не привели. Предполагается, что это связано с использованием различных подходов к изучению. Так, снижение экспрессии мРНК зарегистрировано не было [204], однако при определении экспрессии НИС на мембране с помощью ИГХ, выявлено выраженное снижение встраивания НИС в мембрану тироцита [338]. Некоторые работы описывают нормальный уровень экспрессии НИС в мембране тироцитов доброкачественных узлов щитовидной железы [12, 118].

Экспрессия НИС и его содержание в мембране тироцита значительно увеличены при гиперфункционирующих узлах щитовидной железы или диффузноузловом токсическом зобе, что позволяет применять йод для диагностики и лечения [288, 312].

В связи со способностью клеток опухоли накапливать радиоактивный йод возможно применение РФП для диагностики рецидива или лечения локальных регионарных метастазов ВДРЩЖ. Сохранная функция НИС обеспечивает доставку в опухолевую клетку необходимой терапевтической дозы радиоактивного йода, что определяет эффективность лечения. Однако при развитии опухолевого процесса многие биохимические характеристики нормальной фолликулярной клетки зачастую теряются [12, 239]. Так, K.Y. Ryu et al. (1999) с помощью ПЦР доказали снижение экспрессии мРНК НИС опухолевой тканью щитовидной железы [191]. Снижение экспрессии НИС подтвердили другие, более поздние исследования, с применением количественной оценки РТ-ПЦР и ИГХ [198].

Нельзя не учесть, что радиойодчувствительность может определяться не только уровнем экспрессии НИС, но и степенью активности молекул,

регулирующих его внутриклеточный метаболизм: пендрин, тирозинкиназа, тиреоглобулин. По мнению многих авторов, на выраженность экспресии НИС оказывает воздействие наличие мутации гена BRAF. Так, Cristina Romei и соавторы при анализе корреляции уровня экспрессии НИС у 78 пациентов с ПРЩЖ и присутствием BRAF мутации и/или RET/PTC пришли к заключению, что снижение экспрессии НИС связано с наличием BRAF мутации и не выявили достоверной корреляции с наличием перестановки RET/PTC. Аналогичные результаты получили и другие исследователи [277, 309]. S. Barollo et al. (2010) в своем исследовании показали достоверно более высокую встречаемость BRAF мутации у пациентов с йоднегативными рецидивами папиллярного рака щитовидной железы, чем у больных с йодпозитивными формами [133]. Следует отметить, что утрата функциональной активности НИС определяется не только снижением уровня его экспрессии, но и нарушением встраивания в мембрану опухолевой клетки: на этом сделан акцент в работах последних лет. M.R. Castro и другие показали, что опухоли с минимальной концентрацией НИС в мембране по результатам ИГХ характеризовались более частым рецидивированием, персистированием и развитием радиорезистентных форм [234]. Таким образом, мембранная экспрессия НИС является определяющей в способности тироцита (либо клетки РЩЖ) к поглощению йода. Именно снижение содержания НИС в мембране является вероятной причиной РЙ резистентности ткани ВДРЩЖ. С учетом данных других исследователей, демонстрирующих отсутствие прямой корреляции между снижением экспрессии НИС и наличием BRAF мутации [232], можно предположить, что уменьшение содержания НИС в клеточной мембране не связано с МАРК киназным каскадом и отражает дедифференцировку опухолевой клетки [175]. Авторы из Турции в 2016 г. исследовали корреляцию синтеза и встраивания в мембрану НИС с наличием мутации гена BRAF [352]: при классическом варианте ПРЩЖ уровень мембраной экспрессии НИС выше у пациентов с наличием BRAF мутации, тогда как уровень синтеза НИС, оцененный по мРНК, достоверно не отличался в группах BRAF положительных и BRAF отрицательных опухолей. Исследователи из Испании показали обратную

корреляцию между уровнем трансформирующего фактора роста β и уровнем экспрессии мРНК НИС [351]. Связь BRAF мутации с неблагоприятным прогнозом и йодчувствительностью метастазов папиллярного рака щитовидной железы не была подтверждена также и французскими авторами [138]. В работе D'Agostino et al. (2014) на клеточных линиях доказано, что уменьшение экспрессии и встраивания НИС в мембрану зависит от большого числа генетических факторов [195]. Этиопатогенетическая связь между наличием мутации в гене BRAF и уровнем НИС в клетке ВДРЩЖ, согласно накопленным сведениям, отсутствует. Изучение воздействия BRAF мутации на уровень экспрессии НИС привело к следующим результатам: при отсутствии BRAF мутации уровень экспрессии мРНК НИС оставался нормальным, но было нарушено его встраивание в мембрану клетки, что говорит о влиянии посттрансляционных дефектов; при наличии же BRAF мутации экспрессия мРНК НИС резко снижалась, и при ИГХ исследовании накопление его внутри клетки не выявлялось. В работе C. Durante et al. (2007) продемонстрировано, что в опухолях с BRAF-мутацией ингибируется метаболизм йода вследствие воздействия большого количества генетических факторов, однако повышается уровень экспрессии Glut-1 и нарушается встраивание белка НИС в мембрану клетки [144]. Это снова подтверждает ведущую роль нарушений на посттрансляционном уровне в снижении активности НИС. Одна из причин нарушения встраивания НИС в клеточную мембрану – активация каскада PI3K-AKT, который, как известно, ведет к дедифференцировке ВДРЩЖ. Выявить реально функционирующие симпортеры, встроенные в мембрану, можно только с помощью ИГХ или ИЦХ исследования. ПЦР не позволяет оценить способность клетки поглощать йод. Сочетание ИГХ признаков нарушения встраивания НИС в мембрану и BRAF мутации характеризуется более неблагоприятным исходом ВДРЩЖ: более высоким риском рецидива, в том числе появлением РЙ резистентных его форм [109]. В современной литературе нам удалось найти незначительное количество работ посвященных изучению прогностического потенциала НИС [267]. В работе M.R. Castro et al. [201] предпринята попытка

выявить влияние уровня экспрессии НИС на прогноз: авторы обнаружили связь развития РЙ резистентных формы ВДРЩЖ со снижением уровня экспрессии НИС в первичной опухоли. Однако, из-за отсутствия других работ, посвященных этой проблеме, данная гипотеза требует продолжения исследований.

Подводя итог вышесказанному, можно прийти к выводу: сведения о значении НИС в агрессивности и РЙ чувствительности рака щитовидной железы носят неоднозначный характер, а имеющиеся проблемы диагностики, стратификации риска и подходы к лечению требуют совершенствования. Наиболее перспективным является исследование молекулярных маркеров, таких как BRAF мутации и НИС, с целью внедрения их в клиническую практику.

1.6 Лечение высокодифференцированного рака щитовидной железы

1.6.1 Хирургическое лечение

В соответствии с последними клиническими рекомендациями по лечению ВДРЩЖ стандартной операцией при данной патологии является тиреоидэктомия [45]. Только при наличии очага папиллярного рака менее 1 см без экстратиреоидного распространения (T1N0M0) возможно выполнение экстрафасциальной гемитиреоидэктомии [38]. Несмотря на принятые стандарты лечения, споры по поводу тактики оперативных вмешательств при ВДРЩЖ не прекращаются. Наряду с радикальным подходом к хирургическому лечению существуют многолетние статистические данные о почти 90-95% 5-летней выживаемости больных ВДРЩЖ [24], а также продолжают публиковаться статьи о возможности выполнения органосохраняющих операций при данной нозологии [70]. За последние годы возросло количество показаний к выполнению органосохраняющих операций. Они отражены в клинических рекомендации АТА 2015 г., российских согласительных документах. Органосохраняющие операции

имеют ряд преимуществ перед радикальными вмешательствами: меньший риск возникновения стойкого паралича возвратного гортанного нерва и стойкого гипопаратиреоза [234]. Главными плюсами более агрессивного хирургического лечения приверженцы данного подхода считают возможность применения послеоперационной РЙТ, а также послеоперационного мониторинга пациентов путем контроля уровня тиреоглобулина в сыворотке крови [154]. Единой точки зрения по выбору объема хирургического лечения ВДРЩЖ нет: это связано с отсутствием точных прогностических критериев по определению групп риска рецидива заболевания. pTNM в настоящее время является единственной общепризнанной послеоперационной классификацией. На ее основе с учетом возраста определяются группы риска и происходит выбор тактики ведения пациента [292]. Данную систему нельзя назвать совершенной: она применима в отношении эпидемиологических исследований, но не учитывает ряд независимых критериев риска для ВДРЩЖ и, как следствие, может привести к неадекватной оценке риска и ошибочной тактике ведения пациента после операции. За последнее время были предложены новые подходы к стратификации риска: CAEORTC, AGES, AMES, MACIS, OSU, MSKCC и NTCTCS. Основой для данных систем являются факторы, выявленные с помощью ретроспективных исследований и несущие наибольшую прогностическую значимость. Определяющими во всех классификациях являются такие факторы, как наличие регионарных метастазов, возраст пациента и размер опухоли [256, 298]. Вышеперечисленным факторам присвоена различная степень ценности, что определяется разновидностью систем стратификации риска ВДРЩЖ: риска не только смерти от ВДРЩЖ, но и риска рецидива, персистенции и развития радиойодрезистентных форм. Важно отметить, что ни одна из упомянутых систем не показала эффективность выше 80% [312]. Таким образом, распределение пациентов на группы высокого, среднего и низкого риска в настоящее время продолжает оставаться актуальной проблемой. Так, в клинических рекомендациях американской ассоциации тиреоидологов приведены критерии включения пациентов в определенные группы риска [319].

Необходимо учитывать, что в ходе лечения изначально установленная стадия pTNM остается неизменной, однако на основании клинического течения и ответа на терапию происходит переоценка рисков рецидива и рак-ассоциированной смерти, что определяет потребность в коррекции терапии. Первоначальное лечение, назначенное на основании исходных данных, в таком случае может оказаться неэффективным, что ухудшает прогноз [367].

В работе С.А. Алубаева (2009) проводится анализ факторов, определяющих объем хирургического вмешательства у 500 пациентов с ДРЩЖ. Так, выяснилось, что главной причиной отхождения от установленных рекомендаций стали ошибки при до- и интраоперационной диагностике ДРЩЖ, неправильное стадирование заболевания, что обуславливает либо недостаточное удаление ткани, либо, напротив, нерациональное расширение объема операции [144].

Так, при папиллярном раке щитовидной железы для достижения максимальной эффективности операции важно установить стадию процесса, на основании которой определяется объем вмешательства. Осуществить это с необходимой достоверностью на дооперационном этапе практически невозможно, а интраоперационное стадирование порой представляет сложности даже для опытного хирурга. Так, УЗИ шеи, выполняемое до вмешательства, редко помогает выявить экстратиреоидное распространение опухоли, а также наличие метастатического поражения лимфатических узлов, особенно микрометастазов в центральных лимфоузлах шеи [302, 309, 311, 324, 375].

Во время операции хирургу в основном доступен лишь визуальный осмотр, что также зачастую приводит к неправильной трактовке стадии заболевания. Что касается интраоперационного срочного гистологического исследования, в настоящее время данный метод подвергается существенной критике в связи с низкой диагностической ценностью. Это связано, прежде всего, с использованием замороженных срезов, имеющих низкое качество по сравнению с образцами, изготавливаемыми при плановом исследовании, и не позволяющих достоверно определить прорастание органной капсулы и микрометастазы.

На основании вышеуказанных трудностей можно сделать вывод о несостоятельности существующей системы критериев групп риска. В основном, больные с высоким риском выявляются и проходят радикальное хирургическое лечение. Однако проблема касается, прежде всего, пациентов «низкого» риска, часть которых, по результатам долговременных исследований, имели рецидив заболевания. Таким образом, можно предположить, что у данной группы больных была допущена ошибка при определении стадии и оценке риска. Следовательно, возникает потребность в поиске новых маркеров для решения вопроса о радикальном оперативном вмешательстве у таких пациентов [258, 320, 371].

Ярким примером, подтверждающим необходимость расширения системы прогностических факторов, является лечение микрокарциномы. Согласно текущим мировым стандартам, операцией выбора в данном случае считается гемитиреоидэктомия. Основанием для органосохраняющей тактики являются данные исследований, выявивших наличие микрокарциномы щитовидной железы у одной трети взрослого населения по данным аутопсии [126]. Так, анализ данных 24 аутопсийных исследований, проведенных с 1986 по 2005 год с изучением 7 663 образцов, показал, что опухоль была выявлена в 35,6% случаев [296]. Полученные результаты заложили основу для появления работ, направленных на изучение естественного течения МКЩЖ без оперативного вмешательство. Например, в статье Ito et al. (2003) года описано, что при наблюдении за прогрессией 162 микрокарцином щитовидной железы в течение 8 лет в 70% случаев роста образования не отмечалось, в 10,2% размер опухоли увеличивался более чем на 10 мм, в 1,2% были зафиксированы метастазы в боковую клетчатку шеи. Следует отметить, что в той же работе приводятся данные о распространении микрометастазов в центральные лимфоузлы шеи в 50,5% случаев [108].

Полученные за последние годы данные указывают на то, что у части пациентов через несколько лет диагностируется рецидив и/или персистенция заболевания. Так, например, в работах D. Giordano et al. при двухлетнем наблюдении эта доля составила 10% [365]. Следовательно, можно прийти

к выводу, что существующие принципы хирургического лечения требуют корректировки. В настоящее время согласие по расширению объема операции до выполнения центральной лимфодиссекции в мировой практике достигнуто не было, что обуславливает актуальность поиска новых диагностических маркеров, позволяющих достоверно определять риск метастазирования и на основании этого выполнять лечебные лимфаденэктомии [319, 376]. Возникает потребность в разработке четкой системы дооперационного обследования больных, позволяющей с высокой точностью выявлять пациентов высокого риска и на основании этого прогнозировать течение заболевания и планировать объем лечения.

1.6.2 Послеоперационная радиойодтерапия и факторы, влияющие на развитие рецидива

Несмотря на широкое применение радиойодтерапии, риск рецидивирования ВДРЩЖ остается высоким и составляет, по разным данным, от 10 до 30% [117, 201, 256]. В настоящее время индивидуальный прогноз и дальнейшее лечение определяется на основании послеоперационных данных. Согласно Национальным рекомендациям 2016 года, назначение радиойодтерапии безусловно необходимо пациентам из группы высокого риска. Относительно группы промежуточного риска имеются сомнения как относительно целесообразности использования данного метода, так и касательно оптимальных доз и методов стимуляции. Важной проблемой является отсутствие четких общепринятых критериев включения пациентов в ту или иную группу. Так, в то время как одни системы предполагают оценку риска лишь на основании гистологического исследования, другие основываются также на результатах проводимой терапии. Соответственно, последние системы, являясь динамическими, позволяют перевод пациента из одной группы риска в другую,

что сочетается с коррекцией проводимой терапии. Каждой группе соответствует определенная частота рецидивирования/персистирования заболевания: для пациентов низкого риска она составляет 3%, промежуточного – 21%, высокого – до 68% [315].

Риск рецидива заболевания, согласно последним данным, зависит от трех групп факторов: к первой относятся факторы, связанные с характером и объемом лечения, ко второй – с характеристикой опухоли, к третьей – с особенностями отдельного пациента. Факторы первой группы были рассмотрены выше. Характеристики опухоли, составляющие вторую группу, включают ее размер, инвазию капсулы опухоли/щитовидной железы, инвазию сосудов, прорастание в соседние органы, наличие регионарных и отдаленных метастазов [240, 305-307]. В последнее время особую важность среди свойств опухоли приобретают наличие или отсутствие мутации гена BRAF V600E, а также уровень экспрессии НИС. Широкое применение послеоперационной РЙТ обуславливает большой интерес к вопросу влияния последнего фактора на риск рецидива ВДРЩЖ. Так, в исследовании W.L. Gao (2012) была установлена связь между наличием BRAF мутации и сниженным уровнем экспрессии НИС при классическом типа ПРЩЖ, в случае ФВПР корреляции установлено не было, хотя и отмечалась проявившаяся в рецидиве заболевания неэффективность РЙТ у пациентов с низкой экспрессией НИС [179]. В 2013 году работа, проведенная S. Wei et al., доказала, что при склонных к рецидивированию после РЙТ агрессивных формах ПРЩЖ (высококлеточной и диффузносклерозирующей) отмечается существенное снижение экспрессии НИС, что может обуславливать необходимость в использовании больших доз I131 для улучшения прогноза [253]. Однако следует отметить, что в проведенных исследованиях отсутствуют данные о численных характеристиках снижения экспрессии НИС. Так как данный показатель может являться достаточно достоверным параметром для определения чувствительности РЩЖ к РЙТ, необходимо проведение дальнейших исследований в данной области.

Третья группа включает характеристики отдельного пациента, прежде всего, его пол и возраст. В большинстве исследований в качестве факторов риска рецидива выделяется мужской пол и пожилой возраст на момент выявления заболевания. Подобные результаты были получены, например, в работе 2014 года Yasuhiro Ito и др., в ходе которой были изучены 74 пациента с радиойодрезистентными формами ВДРЩЖ: независимыми факторами риска стали мужской пол и возраст более 60 лет [304]. К схожим выводам пришли S.H. Hsieh et al. (2012) [222], а также ряд других исследователей [108, 169]. Объяснения тому, почему мужской пол является независимым фактором риска рецидива заболевания, пока не получено и требует дополнительного изучения.

Суммируя, можно сказать, что неэффективность послеоперационной РЙТ и рецидивирование ВДРЩЖ определяют такие факторы, как стадия TNM, наличие инвазии, объем и адекватность хирургического вмешательства, мужской пол, наличие BRAF мутации. Дальнейшего изучения требует влияние снижения уровня экспрессии НИС на прогноз течения ВДРЩЖ.

Таким образом, обзор современной литературы показал несовершенство принятой на настоящий момент системе стратификации риска высокодифференцированных форм карциномы щитовидной железы, в основе которой лежит дооперационное стадирование по системе TNM. Разработке новых критериев стратификации риска посвящено много исследований, однако единого алгоритма на настоящее время нет. Исследование и внедрение новых маркеров позволит улучшить диагностику, прогнозировать течение рака, выработать индивидуальную тактику лечения и, как следствие, снизить количество рецидивов заболевания и смертность.

Глава 2
МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Организация (дизайн) исследования

В исследование вошло 804 пациента, прошедших лечение в Первом Санкт-петербургском государственном медицинском университете имени академика И.П. Павлова на отделении хирургической эндокринологии клиник общей хирургии. Включение пациентов в исследование происходило с 1991 по 2017 год. Вся работа состояла из двух этапов: на первом этапе была предпринята попытка улучшения дооперационной диагностики ВДРЩЖ, на втором этапе – исследованы прогностические возможности молекулярно-генетических маркеров ВДРЩЖ в выявлении пациентов группы высокого риска рецидива. В соответствии с этическими нормами для проведения исследований оформлялись информированные согласия с каждым из включенных в исследование пациентом (исследование одобрено Этическим комитетом ПСПбГМУ им. И.П. Павлова).

Протокол исследования предполагал единый алгоритм предоперационной подготовки: данные анамнеза, клинико-лабораторного обследования, ультразвуковой картины, результаты тонкоигольной аспирационной биопсии. Остальные методы использовались по показаниям.

Визуализация узлового образования щитовидной железы осуществлялась с использованием ультразвукового исследования. УЗИ щитовидной железы и лимфоузлов шеи производилось на аппарате экспертного класса. Все узловые образования более 1 см в максимальном измерении, а так же узловые образования меньшего диаметра с подозрительными ультразвуковыми характеристиками (гипоэхогенность, наличие кальцинатов, неровный, нечеткий контур, распространение за пределы капсулы щитовидной железы, а так же при наличии факторов риска согласно клиническим рекомендациям по ведению узлового зоба

и высокодифференцированного рака Американской ассоциации тиреоидологии 2009 и 2015 гг.) подвергались тонкоигольной аспирационной биопсии под обязательным контролем УЗИ. Верификация диагноза осуществлялась врачом-цитологом в цитологической лаборатории СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова. С 2014 года все цитологические заключения обязательно соответствовали рекомендуемой к использованию системе Bethesda, 2009 г.

Показаниями к оперативному лечению являлось однозначное цитологическое заключение о злокачественной природе узлового образования или неопределенное цитологическое заключение (фолликулярная или гюртлеклеточная опухоль, подозрение на рак). Также были эндокринные показания к операции – рецидивирующее течение тиреотоксикоза при диффузном токсическом зобе или одно-(много-)узловой токсический зоб. Ряд пациентов были оперированы по хирургическим показаниям – многоузловой нетоксическим зоб с компрессией органов шеи или косметическим дефектом.

Хирургическая тактика основывалась на действующих в момент принятия решения клинических рекомендациях Российских и зарубежных профессиональных сообществ

В случае выявления на дооперационном или интраоперационном этапах лимфоузлов, подозрительных на метастатические, операция дополнялась центральной лимфодиссекцией (VI, VII группы лимфоузлов). Боковая шейная лимфодиссекция выполнялась пациентам с цитологически доказанным на дооперационном этапе метастатическим поражением лимфоузлов боковой клетчатки шеи (таблица 2.1).

Одной из задач нашего исследования являлся поиск молекулярно-генетических маркеров высокодифференцированного рака щитовидной железы, которые могли бы использоваться для улучшения предоперационной диагностики рака. В качестве возможных диагностических онкомаркеров мы исследовали экспрессию Galectin-3 и спорадическую мутацию гена BRAF V600E.

Таблица 2.1 – Распределение пациентов по объему операции и стадии TNM

Объем операции	Стадия
Тиреоидэктомия или тиреоидэктомия с биопсией центральной клетчатки	T 1-2 N x
Тиреоидэктомия с центральной лимфодиссекцией	T 3-4 N x
Тиреоидэктомия с центральной лимфодиссекцией	T любое N 1a
Тиреоидэктомия с центральной и боковой шейной лимфодиссекцией	T любое N 1b

Для доказательства возможности использования этих маркеров в дооперационной диагностике высокодифференцированного рака щитовидной железы, первым этапом мы выполнили ретроспективное исследование в гистологических препаратах послеоперационного материала. На основании данных, полученных на первом этапе работы, мы выполнили проспективный этап работы – исследование онкомаркеров Galectin-3, BRAF V600E мутации, также панель была дополнена маркером HBME-1 в материале ТАБ и возможности их использования в диагностике высокодифференцированного рака щитовидной железы.

Вторая часть нашей работы посвящена поиску прогностических маркеров высокодифференцированного рака щитовидной железы и возможности их использования для оптимизации тактики лечения. Для этого ретроспективно в послеоперационных гистологических препаратах и, вторым этапом, проспективно в материале ТАБ исследовалась экспрессия NIS и мутация гена BRAF V600E.

Дизайн работы состоял из двух этапов (таблица 2.2).

Таблица 2.2 – Сводная таблица этапов работы, методов исследования, количества включенных в исследование пациентов

N	Содержание	Количество больных	Методы исследования и показатели
Использование молекулярно-генетической панели в диагностике			
1	Ретроспективный анализ уровня экспрессии Galectin-3 у пациентов с узловыми образованиями щитовидной железы	44	Иммунногистохимическое исследование в материале из парафиновых блоков
2	Обследование и хирургическое лечение больных с опухолевыми образованиями ЩЖ	151	Выявление уровня экспрессии онкомаркеров Galectin-3 и HBME-1 в материале ТАБ методом проточной флюороцитометрии, оценка диагностической значимости
3	Ретроспективный анализ встречаемости BRAF V600E-мутации у пациентов с ВДРЩЖ	107	Генетическое исследование в материале из парафиновых блоков
4	Обследование и хирургическое лечение больных с опухолевыми образованиями ЩЖ	210	Выявление BRAF V600E-мутации в материале ТАБ методом ПЦР, частота встречаемости BRAF V600E-мутации, определение диагностической значимости

Продолжение таблицы 2.2

N	Содержание	Количество больных	Методы исследования и показатели
Использование молекулярно-генетической панели в прогнозировании течения			
1	Ретроспективный анализ экспрессии NIS у пациентов с заболеваниями щитовидной железы	97	Иммунногистохимическое исследование в материале из парафиновых блоков
2	Обследование и хирургическое лечение больных с ВДРЩЖ	205	Исследование уровня экспрессии NIS и BRAF V600E мутации в материале ТАБ, определение прогностической ценности.

2.2 Клиническая характеристика больных и принципы разделения по группам

2.2.1 Исследование онкомаркера Galectin-3

Представленная часть работы состояла в ретроспективной и просперктивной оценке уровня экспрессии Galectin-3 у 185 пациентов (44 на ретроспективном этапе, 191 на проспективном этапе, 10 человек вошли в обе группы). Все пациенты с узловыми образованиями щитовидной железы, наблюдающиеся и оперированные в клинике общей хирургии СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова с 1991 по 2015 год. Средний возраст больных составил 48,3±13,6 лет, от 17 до 77 лет. Среди пациентов были 160 женщин и 31 мужчина, соотношение мужчин и женщин равнялось 1:6. Распределение пациентов по возрастным группам и полу представлено в таблице 2.3.

Таблица 2.3 – Распределение пациентов, включенных в исследование, по возрасту

Возраст	Пол	Количество пациентов
	женский	мужской
16-24 года	20	3
25-44 года	54	13
45-59 лет	55	14
60-74 года	27	1
75-89 лет	4	–
Старше 90 лет	–	–
ВСЕГО	160 (84%)	31 (16%)

Анализ возрастного состава исследуемых пациентов показывает, что большая часть исследуемых пациентов представлена людьми трудоспособного возраста (от 25 до 59 лет). Пациенты пожилого возраста, что по классификации ВОЗ соответствует 60-74 годам, составили лишь 14,6%. Представленные данные подчеркивают социальную значимость изучаемой проблемы.

Ретроспективный этап работы

На ретроспективном этапе работы проанализирован уровень экспрессии Galectin-3 у 44 пациентов в материале парафиновых блоков методом ИГХ анализа. В данное исследование вошли пациенты с подозрительными и неоднозначными цитологическими заключениями.

Возраст пациентов составил от 17 до 76 лет (средний возраст составил 45,6±12,7 лет), соотношение мужчин и женщин равнялось 1:4,5.

Всем пациентам выполнено оперативное вмешательство. При проведении планового гистологического исследования, выполняемого по стандартной методике на парафиновых срезах с окраской гематоксилином и эозином, у этих пациентов были установлены следующие окончательные диагнозы (таблица 2.4).

Таблица 2.4 – Распределение пациентов по результатам планового гистологического исследования

Диагноз	Количество пациентов (чел.)
ВДРЩЖ	23
Фолликулярная аденома	10
Атипичная фолликулярная аденома	1
Коллоидный узел	8
Онкоцитарная аденома	2
Всего	44

С целью выполнения ИГХ исследования выполнялся дополнительный срез материала с включением в данный срез зоны «интереса» (узлового образования). ИГХ исследование проводились в ФГУ «РНЦРХТ Россмедтехнологии» д.м.н., профессором К.М. Пожарисским. У всех 44 пациентов определяли уровень экспрессии Galectin-3 в узле ЩЖ.

Проанализирован уровень экспрессии изучаемого белка при доброкачественных узловых образованиях (коллоидные узлы, аденомы), а так же при высокодифференцированном раке ЩЖ. Результаты, полученные в ходе ретроспективного исследования, позволили перейти к выполнению проспектиного этапа работы [92].

Проспективный этап работы

На проспективном этапе работы проведен анализ уровня экспрессии специфических белков у 151 пациента, которые находились на лечении в клинике общей хирургии в 2008-2015 годах. Средний возраст больных составил 48,5±13,5 лет. Среди них преобладали женщины, соотношение мужчин и женщин равнялось 1:6.

Основной задачей второго этапа являлось изучение возможности определения экспрессии Galectin-3 и HBME-1 на дооперационном этапе с целью

ранней и своевременной диагностики ВДРЩЖ. Кроме того, немаловажным было создание и внедрение лабораторного метода определения экспрессии представленных маркеров в материале ТАБ. Для этого в алгоритм диагностики узловых образований ЩЖ кроме цитологического исследования аспирата, полученного при ТАБ, был включен усовершенствованный проточный иммуноцитометрический метод исследования экспрессии Galectin-3 и HBME-1.

Необходимо отметить, что с целью валидации методики проточной ИЦХ первым 10 пациентам выполнено ИГХ подтверждение результатов, полученных на дооперационном материале. Этим пациентам на дооперационном этапе выполнялось проточное иммуноцитометрическое исследование экспрессии Galectin-3 в пунктате из узла щитовидной железы, а после операции проведено ИГХ исследование экспрессии Galectin-3 в узловых образованиях удаленной щитовидной железы. Данные, которые были получены на гистологическом блоке, совпали с результатами, полученными из материала ТАБ.

При выполнении проспективного исследования, пациенты в зависимости от результатов цитологического исследования ТАБ, были разделены три группы. Первую – составили 69 пациентов, при цитологическом исследовании аспирата которых выявлены признаки папиллярного рака (группа Bethesda VI). Во вторую группу вошел 71 больной, у которого невозможно было подтвердить или исключить наличие рака ЩЖ по заключению ТАБ (Bethesda IV и V). Третью группу составили 11 пациентов с доброкачественными результатами цитологического исследования, включающими коллоидные узлы ЩЖ (Bethesda II). Сравнительная характеристика исследуемых групп представлена в таблице 2.5.

Окончательный диагноз у оперированных пациентов ставился на основании гистологического заключения.

Таблица 2.5 – Общая характеристика пациентов, включенных в исследование

Характеристика	I	II	III
Заключение ТАБ	папиллярный рак	фолликулярная опухоль	коллоидный узел
Количество пациентов (чел.)	69	71	11
Соотношение мужчины/женщины	1:7,6	1:6,4	1:2.3
Средний возраст пациентов (лет)	44,3	47,9	54,3

2.2.2 Определение роли мутации BRAF V600E в диагностике высокодифференцированного рака щитовидной железы

Ретроспективный этап работы

Ретроспективную группу пациентов составил 107 человек с выявленным ВДРЩЖ. По данным послеоперационного гистологического исследования у всех пациентов подтвержден ВДРЩЖ (папиллярный или фолликулярный вариант) [14].

Средний возраст пациентов составил 51,2±11,6 лет. Соотношение мужчин и женщин 1:9 (мужчин 10,3%, женщин – 89,7%). В зависимости от гистологической структуры опухоли все пациенты были разделены на три группы: папиллярный рак классический вариант – 57 больных (53,3%), папиллярный рак фолликулярный вариант – 28 больных (26,2%), фолликулярный рак – 22 пациента (20,5%) (таблица 2.6).

На данном этапе выполнялось определение наличия мутации BRAF V600E V600E в материале гистологических блоков. Для данной работы выполнялось вырезание дополнительного материала из узлового образования в специализированные эпиндорфы для дальнейшего выделения генетического материала.

Таблица 2.6 – Распределение пациентов в зависимости от гистологического заключения

Варианты	Количество	
	абс.	%
Папиллярный рак классический вариант	57	53,3
Папиллярный рак фолликулярный вариант	28	26,2
Фолликулярный рак	22	20,5

Проспективный этап работы

Проспективный этап работы заключался в определении наличия мутации гена BRAF V600E V600E в материале тонкоигольной аспирационной биопсии. На данном этапе работы нами было обследовано 210 пациентов с узловыми образованиями щитовидной железы.

Анализ возрастного состава больных: 14,4% – моложе 25 лет и 20,0% – в возрасте 25-40 лет, пациенты среднего возраста (41-55 лет) – 31,9%, пациенты пожилого возраста (56-65 лет) – 15,6%, старше 65 лет было 18,1% больных. Среди мужчин доля пациентов моложе 55 лет составила 89,7%, среди женщин – 61,1 %.

Включенные в исследование 210 пациентов разделены на группы в зависимости от результатов цитологического исследования ТАБ (таблица 2.7).

Таблица 2.7 – Распределение пациентов по цитологическому заключению

Цитологическое заключение	Количество пациентов	%
Bethesda VI	145	69
Bethesda IV	48	23
Bethesda II	17	8
Всего	210	100

По данным послеоперационного гистологического исследования диагноз ВДРЩЖ (ПР или ФР) был подтвержден у 146 пациентов (таблица 2.8).

Таблица 2.8 – Распределение пациентов в зависимости от цитологического и гистологического диагноза

Цитологическое заключение	N	Окончательный гистологический диагноз	N
Bethesda II	17	Узловой коллоидный зоб	17
Bethesda VI	145	Папиллярный рак	139
		Фолликулярный рак	1
		Фолликулярная аденома	5
Bethesda IV	48	Фолликулярная аденома	36
		Узловой коллоидный зоб	6
		Папиллярный рак	6
Всего	210		210

Учитывая особый интерес к группе «маленького» рака и микрокарциномы в связи с вариативностью хирургической тактики у данной группы пациентов, а так же в связи с необходимостью выявления агрессивно текущих форм ВДРЩЖ на ранних стадиях, группа опухолей с размером основного узлового образования до 1,0-1,5 см проанализирована отдельно.

Нашей задачей являлось выделить группу пациентов, которых размер опухоли не превышал 1,0-1,5 см (T1) и проанализировать прогностические возможности выявления BRAF V600E-мутации. Это позволит определить объем операции и дальнейшую тактику лечения. В данную подгруппу вошли 44 пациента с ПРЩЖ, размер опухоли 1,0-1,5 см. Средний возраст обследованных пациентов составил 51,9±8,5 лет. Соотношение мужчин и женщин 1:5,2 (мужчины – 15,9%, женщины – 84,1%). Половозрастное распределение пациентов представлено в таблице 2.9.

Таблица 2.9 – Возрастной и половой состав пациентов подгруппы микрокарцином (n=44)

Возраст, лет	Мужчины (n=7)		Женщины (n=37)		Всего (n=44)	
	абс.	%	абс.	%	абс.	%
Моложе 25	–	–	4	10,8	4	9,0
25-40	2	28,6	8	21,6	10	22,7
41-55	5	71,4	13	35,2	18	41,0
56-65	–	–	11	29,7	11	25,0
Старше 65	–	–	1	2,7	1	2,3
Всего	7	100	37	100	44	100

Анализ возрастного состава больных подгруппы микрокарцином свидетельствует, что большая часть исследуемой выборки представлена людьми молодого возраста, что делает проблему адекватного хирургического лечения социально значимой.

2.2.3 Исследование роли экспрессии натрий-йодного симпортера и определения BRAF V600E мутации в прогнозировании течения высокодифференцированного рака щитовидной железы

Ретроспективный этап работы

На ретроспективном этапе работы выполнено исследование уровня экспрессии натрий йодного симпортера (NIS) методом иммуногистохимии и определения мутации гена BRAF V600E методом ПЦР в парафиновых блоках [92]. В исследование включен материал от 60 пациентов, оперированных с диагнозом папиллярный рак щитовидной железы на базе кафедры общей хирургии СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова в период с 2005 по 2008 гг. Средний возраст пациентов 49±13,5 лет. В исследование вошли 12 мужчин и 48 женщины (таблица 2.10).

Таблица 2.10 – Возрастной и половой состав исследуемой группы

Пол	Возраст, лет					Всего
	моложе 25	25-40	41-55	56-65	старше 65	
Женский	2	10	14	13	9	48
Мужской	2	4	5	1	–	12
Всего, %	6,7%	23,3%	31,7%	23,3%	15%	60 (100%)

По морфологическому типу строения среди 60 пациентов в 58 случаев выявлен ПРЩЖ, в т.ч. 21 ФВПР, и у двух пациентов был ФРЩЖ.

Натрий йодный симпортер является белком ответственным за перенос йода в клетку и, таким образом, влияет на эффективность выполняемой в послеоперационном периоде радиойодтерапии (РЙТ). На основании эффективности и факта выполнения РЙТ все пациенты были разделены на три группы. В Группу 1 вошло 15 пациентов с ПРЩЖ, объем лечения этих пациентов ограничился только оперативным вмешательством. С целью стадирования процесса больным интраоперационно выполнялась биопсия клетчатки с лимфоузлами VI группы. Медиана наблюдения составила 60 месяцев. Рецидива заболевания у пациентов данной группы выявлено не было. В Группу 2 вошли 25 пациентов, которым было выполнено оперативное вмешательство, с последующей радиойодаблацией по показаниям. Рецидива заболевания в срок наблюдения до 60 месяцев у данной группы пациентов не выявлено. Группу 3 составили 20 пациентов, которые получили объем лечения, аналогичный пациентам второй группы, а именно – подверглись оперативному лечению, послеоперационной радиойодабляции. Однако в срок наблюдения до 60 месяцев у всех выявлен рецидив заболевания (структурный и/или биохимический).

Виды оперативных вмешательств, выполненных исследуемым пациентам всех трех групп, представлены в таблице 2.11.

Таблица 2.11 – Распределение больных в зависимости от объема оперативного вмешательства

Вид операции	Группа 1	Группа 2	Группа 3
Тиреоидэктомия с биопсией центральной клетчатки шеи	15	0	0
Тиреоидэктомия с центральной лимфодиссекцией	0	18	11
Тиреоидэктомия с центральной и боковой лимфодиссекцией	0	5	9
Тиреоидэктомия с двухсторонней боковой шейной лимфодиссекцией	0	2	0
Всего	15	25	20

Окончательный диагноз ставился на основании гистологического исследования материала операции. Окончательный диагноз классифицировался по системе TNM 6. Распределение больных по стадиям TNM приведены в таблице 2.12.

Таблица 2.12 – Распределение включенных в исследование пациентов по стадиям TNM

Стадия T	Стадия N	Стадия M	Количество пациентов
T1	N1a	M0	6
	N1b	M0	9
	N0	M0	8
T2	N0	M0	7
	N1a	M0	1
	N1b	M0	4

Продолжение таблицы 2.12

Стадия T	Стадия N	Стадия M	Количество пациентов
T3	N0	M0	11
	N1a	M0	11
	N1b	M0	1
T4	N0	M0	0
	N1a	M0	0
	N1b	M0	2
Всего			60

Всего 45 пациентов исследуемой группы в послеоперационном периоде получили радиойодтерапию лечебными дозами I 131. Критериями включения в исследование явились отсутствие патологического захвата радиофармпрепарата при сцинтиграфии I 131 после введения терапевтической дозы I 131 и не более 3-4% захвата от введенной дозы в ложе удаленной щитовидной железы.

Рецидив заболевания выявлен у 20 пациентов в срок наблюдения до 60 месяцев. У 16 пациентов рецидив носил локорегионарный характер, у 3-х выявлены множественные метастазы в легкие (в одном случае захват I 131 при сцинтиграфии отсутсвует), и у одной пациентки выявлен биохимический рецидив (определяется повышенный уровень тиреоглобулина (ТГ) и антител к тиреоглобулину без отмены супрессивной терапии).

Статистически на данном этапе работы выполнен поиск взаимосвязи между уровнем экспрессии NIS первичной опухоли и безрецидивной продолжительностью жизни пациента. Помимо этого, исследовалась корреляция между уровнем экспрессии NIS на мембране опухолевой клетки и наличием BRAF V600E V600E мутации.

Проспективный этап исследования

На проспективном этапе работы исследован материал ТАБ от 205 пациентов с цитологически доказанным папиллярным раком щитовидной железы для выявления мутации гена BRAF V600E и определения уровня экспрессии NIS.

Все пациенты проходили лечение на отделении хирургической эндокринологии в клинике общей хирургии СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова в период с 2009 по 2015 гг. Оценка уровня экспрессии NIS выполнялась количественным методом проточной флюороцитометрии; с целью определения BRAF V600E статуса опухоли выполнялся молекулярно-генетический анализ материала ТАБ методом ПЦР-анализа (амплификации в режиме реального времени и амплификации в режиме учета электрофоретического сигнала). Средний возраст пациентов составил 51,3±13,9 лет; соотношение мужчин и женщин – 1:7, соответственно (таблица 2.13).

Таблица 2.13 – Распределение больных по возрасту и полу в группе больных с исследованием мутации BRAF V600E и экспрессии NIS на проспективном этапе

Пол	Возраст, лет					Всего
	моложе 25	25-40	41-55	56-65	старше 65	
Женский	13	40	50	43	37	183
Мужской	–	–	9	7	6	22
Всего, %	13 (6,4%)	40 (19,6%)	59 (28,8%)	50 (24,3%)	43 (20,9%)	205 (100%)

Забор материала для проточной флюороцитометрии и генетического анализа проводился на дооперационном этапе при выполнении ТАБ узловых образований ЩЖ под ультразвуковым контролем, либо интраоперационно (на начальном этапе работы при отработке методики). Материал помимо молекулярно-генетического анализа подвергался цитологическому исследованию с целью подтверждения наличия опухолевых клеток в пунктате.

На преаналитическом этапе материал для молекулярно-генетического исследования помещался в консервирующий раствор и хранился при температуре – 18-20º С до момента транспортировки в лабораторию. Транспортировка

осуществлялась в термоконтейнере с целью предотвращения разморозки материала. Окончательная верификация диагноза, стадирование процесса и определение показаний к радиойодтерапии проводилась по данным окончательного планового гистологического исследования.

Объем и характер выполненных оперативных вмешательств 205 пациентов с ВДРЩЖ представлен в таблице 2.14.

Таблица 2.14 – Распределение больных в группе проспективного исследования в зависимости от объема оперативного вмешательства

Вид операции	Количество пациентов
Тиреоидэктомия с биопсией центральной клетчатки шеи	73
Тиреоидэктомия с центральной лимфодиссекцией	93
Тиреоидэктомия с центральной и боковой шейной лимфодиссекцией	38
Тиреоидэктомия с двухсторонней боковой шейной лимфодиссекцией	1
Всего	205

В послеоперационном периоде по результатам окончательного стадирования у 129 пациентов поставлены показания к проведению РЙТ. Срок наблюдения пациентов составил 60 месяцев с контрольными точками обследований на 6, 12, 18, 24, 36, 48 и 60 месяц послеоперационного периода. Рецидив заболевания выявлен у 49 пациентов. Ни в одном случае у пациентов из группы без РЙТ не возникло рецидива заболевания (таблица 2.15).

У всех 49 пациентов рецидив носил структурный характер, что позволило выполнить повторное оперативное вмешательство. Исследованию так же подвергался материал ТАБ из области рецидива заболевания.

Таблица 2.15 – Распределение пациентов по группам на основании течения заболевания и необходимости в послеоперационной РЙТ

	Пациенты без РЙТ	Пациенты с РЙТ без рецидива	Пациенты с РЙТ и рецидивом
Количество пациентов	76 (37%)	80 (39%)	49 (24%)

Статистически обработаны полученные данные, с целью выявления прогностического потенциала дооперационного уровня экспрессии NIS и BRAF V600E статуса опухоли в выявлении пациентов группы высокого риска рецидива заболевания. А также, в определении наиболее адекватного объема оперативного вмешательства для данной группы пациентов.

2.3 Методика иммуногистохимического определения экспрессии галектина-3

Для ИГХ исследования использовались моноклональные антитела к галектину-3 (Novocastra, Великобритания). Срезы с парафиновых блоков монтировали на предметные стекла, предварительно обработанные адгизивом. Срезы отводили от парафина путем проведения через ксилол (2 емкости) и спирт 96% (4 емкости). Срезы промывали в течение 5 минут в дистиллированной воде. Для активации молекулярных группировок применялась термическая обработка срезов (водная баня) в течение 30 минут.

Срезы промывали в дистиллированной воде в течение 5 минут. Для блокировки эндогенной пероксидазы на срезы наносили готовый раствор пероксидазы фирмы «Dako» (Дания) с экспозицией 5 минут с последующим промыванием срезов в дистиллированной воде.

Нанесение на срезы моноклональных АТ (Novocastra, Великобритания) с экспозицией 14-16 часов при температуре +40° С (разведение 1:500). После взаимодействия с АТ срезы промывали в трис-буфере. Визуализацию реакции осуществляли с помощью высокочувствительной системы детекции Envision (Dako, Дания) в течение 30 минут при температуре 25° С. Все срезы промывались дважды в течение 5 минут в трис-буфере.

На срезы наносили хромогенный субстрат, в качестве которого использовали раствор диаминобензидина в течение 3-5 минут, в результате чего происходила визуализация реакции, а именно в местах экспрессии АГ осаждался коричневый краситель. После чего срезы промывали в дистиллированной воде и их докрашивали гематоксилином. Далее препараты проводили через спирт 96% (2 емкости), пропанол (2 емкости) и ксилол (2 емкости) и заключали в бальзам (канадский) под покровное стекло.

Результат считался положительным, если экспрессия галектина-3 выявлялась в более чем 10% клеток; слабо положительным, если количество клеток, в которых определялась экспрессия данного онкомаркера, было менее или равно 10%. Результат считался отрицательным, если экспрессия галектина-3 не определялась вовсе.

2.4 Методика проточного иммуноцитометрического определения экспрессии галектина-3 и HBME-1

Удостоверение на рационализаторское предложение «Способ определения экспрессии галектина-3» № 1528 от 28 мая 2009 года. Авторы: М.Е. Борискова, Л.Е. Колоскова, Н.С. Фещенко, О.И. Филиппова.

Для заморозки аспиратов в нашем случае мы разработали оригинальный консервирующий раствор, чтобы сохранить антигенные структуры клеток при хранении и транспортировке при температуре -15º – -18º С. Для анализа образцов

был создан оригинальный протокол для определения клеток, экспрессирующих галектин-3 и HBME-1: в качестве второй метки использовали антитела к общелейкоцитарному антигену CD-45. В методике аналоге использовались антитела к тиреоглобулину.

Часть образцов, полученных методом тонкоигольной аспирационной биопсии /ТАБ/ узловых образований щитовидной железы, помещали в раствор антикоагулянта и исследовали в течение 24 часов. В качестве антикоагулянта использовали гепарин 50 ЕД на 1 мл изотонического раствора хлорида натрия.

Образцы, которые не исследовались в течение 24 часов, помещали в оригинальный раствор для фиксации и пермеабилизации клеток и замораживали при температуре -15° – -18° С. Образцы с примесью крови освобождали от эритроцитов стандартным методом лизиса /IO Test Lysing Solution, Beckman Coulter.

Для окрашивания образцов использовали:

1. Непрямой метод: неконьюгированные мышиные моноклональными антителами /МКА/ к галектину-3 человека /BD Biosciences/, и вторичные флюоресцеинконьюгированные козьими антимышиные антитела /BD Biosciences/ и прямыми коньюгатами МКА к антигену CD45 /Beckman Coulter/.

После размораживания, инкубации первичными антителами образцы «отмывали» ФБР, и инкубировались вторичными антителами, затем после отмывания» добавляли МКА к антигену CD45. Использовали титр :неконьюгированных МКА 1:25, коньюгированных – 1:100.

2. Прямые коньюгаты МКА к галектину-3 человека и HBME-1 /Set,BD Biosciences/.

В качестве отрицательного контроля для непрямого метода использовали образцы, неокрашенные первичными МКА. Для прямого метода использовали изотипический контроль /Set, BD Biosciences/.

Готовые пробы анализировались на проточном цитометре EPICS XL/MCL /Beckman Coulter/, с использованием программы System II.

Оценивали по четыре параметра: прямое светорассеяние – FS (forward side scatter), боковое светорассеяние – SS (90° light/side scatter) и два детектора флюоресцентного сигнала. Первый – FL-1 – это детектор, выявляющий красители зеленого спектора (в данном случае флюоресцеинизотиоционат, FITC), FL-2 – детектор, выявляющий красители красного спектора (в нашем исследовании фикоэрритрин, PE).

Положительным результатом считали экспрессию галектина-3 в более чем 3% клеток; отрицательным, если экспрессия галектина-3 определялась в менее 3% клеток или не определялась вовсе.

Исследование проводилось врачом-лаборантом Л.Е. Колосковой в клинической диагностической лаборатории Городской больницы № 26 под руководством заведующей лабораторией, к.м.н. Е.А. Денисовой.

2.5 Методика иммуногистохимического определения экспрессии натрий-йодного симпортера

С целью ретроспективной оценки уровня экспрессии НИС в опухолевой ткани у пациентов, оперированных с диагнозом папиллярный рак щитовидной железы, выполнялось ИГХ исследование. Исследование выполнялось на базе кафедры патологической анатомии с патологоанатомическим отделением (зав. кафедрой: д.м.н., профессор М.Г. Рыбакова). Препараты независимо оценивались специалистом гистологом и автором диссертации. При расхождении данных, привлекался дополнительно специалист гистолог для оценки препарата.

Для ИГХ исследования использовались моноклональные антитела к натрий-йодному симпортеру Anti-Sodium Iodide symporter (SPM186) (Abcam, США). Срезы с парафиновых блоков монтировали на предметные стекла, предварительно обработанные адгизивом. Срезы отводили от парафина путем проведения через ксилол (2 емкости) и спирт 96% (4 емкости). Срезы промывали в течение 5 минут

в дистиллированной воде. Для активации молекулярных группировок применялась термическая обработка срезов (водная баня) в течение 30 минут.

Срезы промывали в дистиллированной воде в течение 5 минут. Для блокировки эндогенной пероксидазы на срезы наносили готовый раствор пероксидазы фирмы «Dako» (Дания) с экспозицией 5 минут с последующим промыванием срезов в дистиллированной воде.

Нанесение на срезы моноклональных АТ НИС (Abcam, США) с экспозицией 30 минут при комнатной температуре. После взаимодействия с АТ срезы промывали в трис-буфере. Визуализацию реакции осуществляли с помощью высокочувствительной системы детекции Envision (Dako, Дания) в течение 30 минут при температуре 25° С. Все срезы промывались дважды в течение 5 минут в трис-буфере.

На срезы наносили хромогенный субстрат, в качестве которого использовали раствор диаминобензидина в течение 3-5 минут, в результате чего происходила визуализация реакции, а именно в местах экспрессии антигена осаждался коричневый краситель. После чего срезы промывали в дистиллированной воде и их докрашивали гематоксилином. Далее препараты проводили через спирт 96% (2 емкости), пропанол (2 емкости) и ксилол (2 емкости) и заключали в бальзам (канадский) под покровное стекло.

Оценку препаратов производили на Nikon Eclipce 501 с количественным подсчетом в компьютерной программе «Морфология 5.2» фирмы Видео тест.

Результат считался положительным, если экспрессия НИС выявлялась на поверхности клеточной мембраны. Результат оценивался количественно в процентном соотношении количества клеток, несущих НИС на клеточной мембране к общему количеству тироцитов в 5-ти просмотренных полях зрения.

2.6 Молекулярно-генетическое определение мутации T1799A (V600E) гена BRAF методом полимеразной цепной реакции

2.6.1 Выделение ДНК из парафиновых блоков (операционного материала)

Определение наличия мутации в гене BRAF в архивных парафиновых блоках проводилось для 60 пациентов с высокодифференцированным раком щитовидной железы. Выделение ДНК проводилось по методике с небольшими изменениями.

На предварительном этапе проводилась нарезка блоков микротом (10-12 срезов), выполнялась двойная депарафинизация срезов ксилолом при 65° С и этанолом (96% и 70%-ным) и осадки высушивали при 75° С. Далее образцы инкубировались 10 минут при 99° С с 200 мкл лизирующего раствора, содержащего в качестве детергента 2% Triton X-100, а после остывания обрабатывались протеиназой К (НПО «СибЭнзим», Новосибирск) в течение ночи при 60° С. Дальнейшее выделение заключалось в лизировании 4М раствором тиоцианата гуанидина с добавлением 1% Triton X-100 и 1% Твин-20, и осаждении ДНК сорбентным методом (Silica Gel и Diatomaceous Earth, Sigma-Aldrich, США) с дополнительным осаждением изопропиловым спиртом. Затем проводилась отмывка осадка 70% этиловым спиртом, сушка и элюирование ДНК в бидистиллированной воде. Полученный раствор использовали для постановки полимеразной цепной реакции (ПЦР).

2.6.2 Постановка полимеразной цепной реакции

Детекцию мутации T1799A (аминокислотная запись Val600Glu, международный код полиморфизма rs113488022) в гене BRAF проводили с помощью аллель-специфичной полимеразной цепной реакции (ПЦР) [330].

Принцип метода заключается в том, что для каждого образца ДНК ставятся две ПЦР-реакции с двумя олигонуклеотидными праймерами, один из которых комплиментарен только одному из вариантов мутации (в данном случае с нуклеотидами Т или А на 3'-конце), а другой универсальный. Если в образце ДНК мутация А отсутствует, то реакция пройдет только в одной пробирке где использовался праймер Т. Если же в образце ДНК мутация А есть, то ПЦР пройдет в обеих пробирках. В данном случае постановка реакции с праймером Т используется для дополнительного контроля качества и количества исходного биоматериала. Последовательности праймеров (синтезированы ЗАО «Синтол»): общий праймер, 5'-ggccaaaatttaatcagtgga-3', Т-праймер (контрольный) 5'-gtgattttggtctagctacagt-3' и А-праймер (детектирующий) 5'-gtgattttggtctagctacaga-3'.

Кроме праймеров в реакционную смесь добавляли буфер, раствор MgCl2, дезоксирибонуклеотиды и Hot-Taq полимеразу (ЗАО «Силекс»). Для предотвращения испарения раствора при высоких температурах в пробирки добавляли 50 мкл минерального масла. Добавление раствора ДНК в целях избежания контаминации проводилось в последнюю очередь в отдельном помещении.

ПЦР-реакция проводились на амплификаторе «Терцик» (ООО «ДНК-Технология», Москва) по следующему режиму циклирования: предварительная денатурация 10 минут при 95° С для активации полимеразы, и далее 40 циклов денатурации, отжига и синтеза в течение 35 секунд при температуре 95° С, 58° С и 72° С соответственно.

2.6.3 Детекция продуктов амплификации

Детекцию продуктов амплификации (ампликонов) выполняли в отдельном помещении методом электрофореза в 7% ПААГе, окрашивая раствором бромистого этидия (LOBA, Австрия) и последующей визуализацией в УФ

при 302 нм на аппарате Gel Doc (BioRad, США) с последующей фотофиксацией результата.

ПЦР-реакция считалась положительной, когда напротив соответствующей дорожке в геле был виден светящийся фрагмент размером 119 пар нуклеотидов. Для определения размеров фрагментов использовали набор ДНК-маркеров 100 bp (НПО «СибЭнзим», Новосибирск), нанесенный на тот же гель.

2.7 Методика определения экспрессии натрий-йодного симпортера методом проточной флуороцитометрии в материале тонкоигольной аспирационной биопсии

Экспрессия НИС определялась методом проточной флуоциторометрией (ПФЦ) на проточном цитометре Epics XL – MCL (Beckman Coulter) в материале ТАБ. При выполнении ТАБ материал после выполнения биопсии наносился на предметное стекло для цитологического исследования, а смывы с иглы использовали для ПФЦ определения уровня экспрессии НИС. Данная методика применялась с целью избежать определения экспрессии НИС не в опухолевой ткани.

На первом этапе суспензия клеток образцов ТАБ обрабатывалась первичными (неконъюгированным) антителами к НИС (Santa Cruz Biotechnology, Inc.), после инкубации при температуре +4º С образцы отмывались фосфатно-солевым буфером (Santa Cruz Biotechnology, Inc.).

На втором этапе образцы обрабатывались антителами, меченными FITC (Santa Cruz Biotechnology, Inc.). После инкубации при температуре +4º С образцы обрабатывались нормальной сывороткой (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) и отмывались фосфатно-солевым буфером (Santa Cruz Biotechnology, Inc.).

На третьем этапе образцы обрабатывались прямыми антителами к CD-45 меченными PE (Beckman Coulter).

Анализ готовых проб проводился программой System II (Beckman Coulter) по разработанному протоколу для оценки событий по двум каналам: FL-1 для FITC-положительных событий и FL-2 для положительных по PE.

Экспрессия NIS оценивалась в области определения CD45-позитивных клеток.

Референсные значения уровня экспрессии НИС были изучены на материале ТАБ из нормальной ткани щитовидной железы (№ 5) и щитовидной железы с признаками АИТ (№ 5) и доброкачественных узловых образований (№ 10).

Исследование проводилось в клинической диагностической лаборатории ООО «МедЛабСПб» под руководством заведующей лабораторией Л.Е. Колосковой

С целью определения референсных значений уровня экспрессии НИС изучены биоптаты из нормальной ткани щитовидной железы (№ 5), из ткани щитовидной железы с признаками АИТ (№ 5) и доброкачественных узловых образований (№ 10).

2.8 Молекулярно-генетическое определение мутации T1799A (V600E) гена BRAF методом полимеразной цепной реакции

2.8.1 Выделение ДНК из материала тонкоигольной аспирационной биопсии щитовидной железы

Полученный в результате ТАБ материал помещали в пробирку, с 2 мл буфера PBS (Santa Cruz Biotechnology, США) и 142 мкл буфера ACD-A (Haemonetics, США) и перемешивали. 300 мкл полученной суспензии центрифугировали 10 минут при 13 000 об/мин, часть супернатанта сливали, оставив 100 мкл осадка с надосадочной жидкостью. Нуклеиновые кислоты выделяли с использованием комплекта реагентов ПРОБА-НК согласно

прилагаемой инструкции (ООО «ДНК-Технология», Москва), в результате чего получали 50мкл раствора ДНК.

2.8.2 Постановка полимеразной цепной реакции и детекция продуктов амплификации

Методы постановки ПЦР и детекции амплификатов описаны в главе 2.6.2 и 2.6.3.

2.9 Статистическая обработка результатов

Статистическая обработка полученных данных выполнена на ПК при помощи пакета программ для статистической обработки данных STATISTICA for Windows 7,0. Использовали методы параметрической и непараметрической статистики. Методы описательной статистики включали в себя оценку среднего арифметического (M), средней ошибки среднего значения (m) – для признаков, имеющих непрерывное распределение, а также для частоты встречаемости признаков с дискретными значениями. Определение достоверности различий между качественными показателями сравниваемых групп проводили с помощью критерия χ^2 (хи-квадрат) с учетом поправки Йетса для сравнения частот бинарного признака в двух несвязанных группах парных сравнений.

Для определения наличия количественной характеристики выраженности связи между частотой BRAF-мутации и характеристиками заболевания (в частности, частотой поражения лимфатических узлов, мультицентричностью, частотой прорастания капсулы щитовидной железы опухолью, частотой развития рецидивов) проводили многомерный регрессионный анализ. Для данных видов анализа оценку качественных показателей проводили по системе 1 – есть, 0 – нет.

Критический уровень достоверности нулевой статистической гипотезы принимали равным 0,05.

В ходе обработки данных оценивали эффективность использованных методов диагностики путем сопоставления с референтным диагнозом, то есть установленным с помощью наиболее надежного метода.

Для таких методов дифференциальной диагностики, как тонкоигольная аспирационная биопсия с цитологическим исследованием и гистологическое исследование удаленной щитовидной железы с выявлением мутации V600E гена BRAF, оценивали чувствительность, специфичность, диагностическую точность, предсказательную ценность положительного и отрицательного результатов в соответствии с критериями, представленными в таблице 2.16.

Таблица 2.16 – Критерии оценки методов диагностики

Терминология, принятая в практике тестирования	Формула расчета	Терминология ДА
Предсказательная ценность положительного теста	$\frac{a}{a+b}$	Точность положительного диагностического правила A ---> B
Чувствительность теста	$\frac{a}{a+c}$	Полнота положительного диагностического правила A ---> B
Предсказательная ценность отрицательного теста	$\frac{d}{c+d}$	Точность отрицательного диагностического правила «Не A» ---> «Не B»
Специфичность теста	$\frac{d}{b+d}$	Полнота отрицательного диагностического правила «Не A» ---> «Не B»
Диагностическая точность метода	$\frac{a+d}{a+b+c+d}$	Среднее взвешенное точности правила A ---> B и «Не A» ---> «Не B»

Чувствительность – вероятность положительного результата теста у лиц с наличием заболевания. Как известно, чем выше чувствительность метода, тем чаще с его помощью выявляют патологические изменения, следовательно, тем более эффективен метод диагностики. Недостатком высокочувствительных методов является то, что при их использовании увеличивается количество ложноположительных результатов.

Специфичность – вероятность отрицательного результата у лиц без признаков заболевания.

Чем выше специфичность метода, тем надежнее с его помощью подтверждается заболевание, т.е. он более эффективен. Высокоспецифичные диагностические тесты называют дискриминаторами; они эффективны на заключительном этапе диагностики, когда круг предполагаемых заболеваний сужен и необходимо с уверенностью доказать наличие конкретной патологии.

Диагностическая точность – пропорция правильных результатов (положительных и отрицательных) в выборке обследованных пациентов.

Для того чтобы обозначить пределы, в которых можно доверять полученной выборочной оценке, вычисляют «доверительный интервал» (ДИ, в англоязычной литературе – CI, confidence interval).

Глава 3
ОЦЕНКА ЗНАЧЕНИЯ ПРЕДЛОЖЕННОЙ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ПАНЕЛИ В ПРЕДОПЕРАЦИОННОЙ ДИАГНОСТИКЕ ВЫСОКОДИФФЕРЕНЦИРОВАННОГО РАКА ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

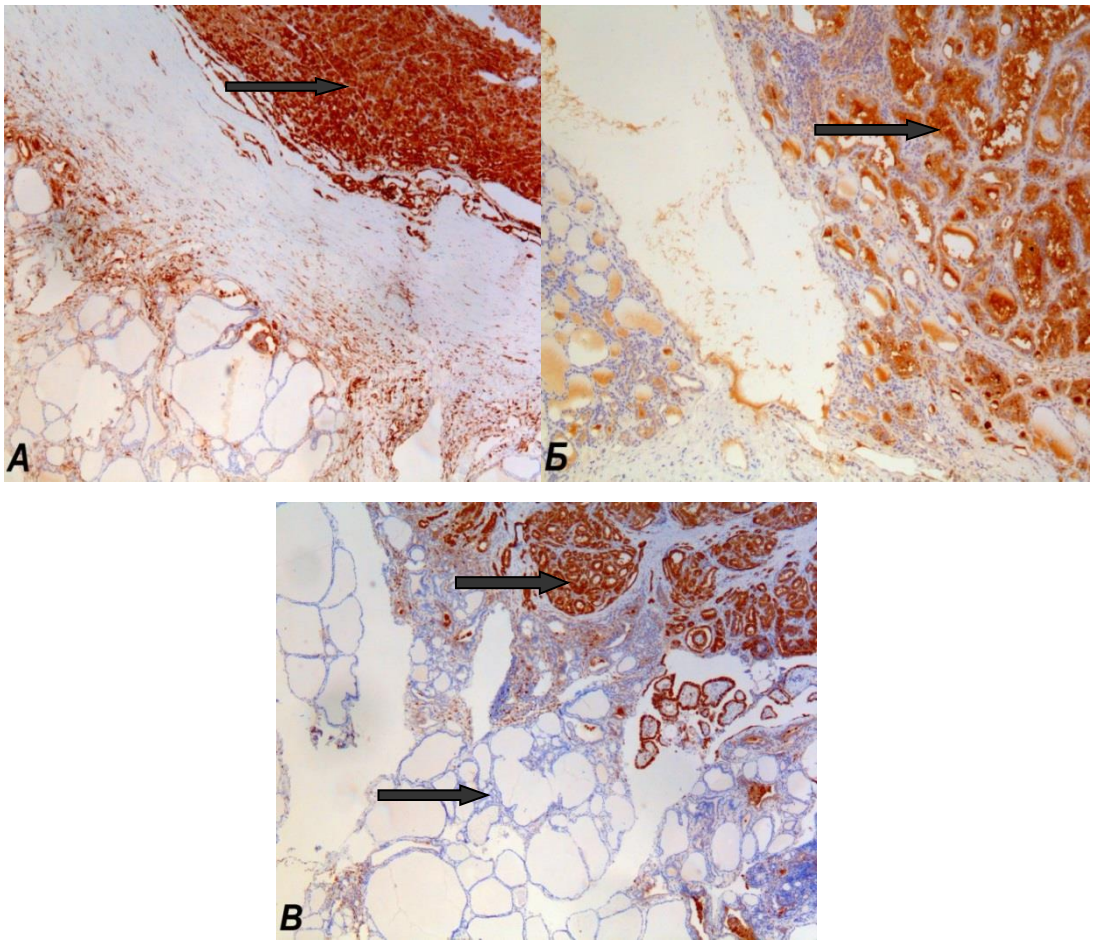
3.1 Оценка значения экспрессии Galectin-3 в дифференциальной диагностике узловых образований и папиллярного рака щитовидной железы (ретроспективный этап)

Выполнен ретроспективный анализ результатов гистологического исследования и лечения 44 пациентов, которым в послеоперационном периоде проводилось исследование экспресси Galectin-3(Gal-3) иммуногистохимическим методом. В исследование включены пациенты с диагнозом: папиллярный рак ЩЖ, фолликулярный рак ЩЖ, фолликулярная, атипичная фолликулярная или онкоцитарная аденома, коллоидный зоб. Степень выраженности экспрессии Gal-3 в образованиях ЩЖ у данных пациентов представлена в таблице 3.1.

Таблица 3.1 – Результаты ИГХ исследования экспрессии Gal-3 в узлах щитовидной железы

Результат гистологического исследования	Экспрессия Gal-3	Количество
Папиллярный рак (21)	+	19
	+/-	2
Фолликулярный рак (2)	+	2
Фолликулярная аденома (10)	-	9
	+/-	1
Атипичная фолликулярная аденома (1)	+	1
Коллоидный зоб (8)	-	6
	+/-	2
Онкоцитарная аденома (2)	-	1
	+/-	1

Экспрессия Gal-3 в опухолевых клетках преимущественно выражалась в окраске цитоплазмы, в редких случаях имелось также ядерное окрашивание. Экспрессия Gal-3 в атипичной фолликулярной аденоме определялась в виде диффузно-очагового цитоплазматического окрашивания (рисунок 3.1).



А – высокая экспрессия Gal-3 при фолликулярном раке ЩЖ; Б – Крупный фокус папиллярного рака с резкой мембранной и цитоплазматической экспрессией Gal-3; В – в опухоли ЩЖ очень слабая экспрессия Gal-3, а в нормальной ткани ЩЖ экспрессия отсутствует.

Рисунок 3.1 – Экспрессия Gal-3
при высокодифференцированном раке щитовидной железы.

Высокая экспрессия Gal-3 выявлена в 22 новообразованиях (50%), слабо положительная – в 6 (13,6%) и отрицательная – в 16 образцах ЩЖ (36,4%).

По данным ИГХ исследования экспрессия Gal-3 наблюдалась у всех пациентов с высокодифференцированным раком ЩЖ (у 21 больного

с папиллярным и 2-х пациентов с фолликулярным раком ЩЖ). В подавляющем большинстве случаев отмечена высокая экспрессия Gal-3 (21 больной – 91,3%) и только у двух пациентов с папиллярным раком ЩЖ отмечалось слабое окрашивание на Gal-3.

Отсутствие экспрессии Gal-3 при ИГХ исследовании наблюдалось у 16 (76,2%) из 21 больного с доброкачественными заболеваниями ЩЖ. У 4 (19%) пациентов экспрессия Gal-3 все же выявлялась, но была слабо выраженной. Лишь в одном случае отмечалась ярко выраженная экспрессия Gal-3 у больного с атипичной фолликулярной аденомой.

Для оценки показателей диагностической значимости результаты иммуногистохимического исследования экспрессии Gal-3 в узловых образованиях щитовидной железы были интерпретированы следующим образом (таблица 3.2):

Таблица 3.2 – Оценка результатов ИГХ исследования экспрессии Gal-3 в узловых образованиях щитовидной железы

Результат гистологического исследования	Экспрессия Gal-3		
	положительная	слабо-положительная	отрицательная
Высоко-дифференци-рованный рак ЩЖ	21	2	0
Доброкачественные образования ЩЖ	1	4	16

Положительная и слабоположительная экспрессия Gal-3 в узлах удаленной щитовидной железы с гистологически подтвержденным высокодифференцированным раком щитовидной железы считалась нами, как истинноположительный результат. В нашем исследовании было 23 таких заключений. При отсутствии экспрессии Gal-3 в этих образцах результат считался ложноотрицательным. Мы не получили таких заключений.

Положительная и слабоположительная экспрессия Gal-3 в узлах удаленной щитовидной железы с гистологически подтвержденными доброкачественными образованиями щитовидной железы считалась ложноположительным результатом (5 случаев), а отсутствие экспрессии Gal-3 – истинно отрицательным. В нашем исследовании было 16 таких заключений.

На основании полученных данных нами была определена диагностическая значимость ИГХ метода определения экспрессии Gal-3 в узловых образованиях щитовидной железы, показатели которой представлены в таблице 3.3.

Таблица 3.3 – Диагностическая значимость ИГХ определения экспрессии Gal-3 в узловых образованиях ЩЖ

Показатель диагностической значимости	%	1. ДИ%
Чувствительность	100	86-100
Специфичность	76,2	61,5-76,2
Диагностическая точность	88,6	–
Предсказательная ценность положительного теста	82,1	71,1-82,2
Предсказательная ценность отрицательного теста	100	80,7-100
Индекс согласия Каппа – 0,77 (0,49-0,77)	$p<0,05$	

В ходе проведенного анализа определена 100% чувствительность ИГХ исследования экспрессии Gal-3 в ткани удаленной щитовидной железы в выявлении высокодифференцированного рака щитовидной железы. Это означает, что данная диагностическая процедура позволяет заподозрить рак в 100% случаев. Предсказательная ценность отсутствия экспрессии Gal-3 в ткани щитовидной железы также достигает 100%. Специфичность равная 76,2% позволяет с большой долей вероятности утверждать, что применение данного метода в 76,2% случаев позволило исключить рак ЩЖ. Полученные нами данные являются статистически достоверными (коэффициента Каппа =0,77; $p<0,05$).

Таким образом, высокие показатели диагностической значимости ИГХ метода определения экспрессии Gal-3 в узловых образованиях щитовидной железы позволили нам перейти к прогностическому этапу нашей работы.

3.2 Исследование экспрессии Gal-3 проточным флюороцитометрическим методом в материале тонкоигольной аспирационной биопсии

Основной целью прогностического этапа работы являлось изучение возможности определения экспрессии Gal-3 на дооперационном этапе в пунктате из узла щитовидной железы, полученном при тонкоигольной аспирационной биопсии (ТАБ). Нами была предложена усовершенствованная методика проточного флюороцитометрического определения экспрессии Gal-3 в аспирате из узла щитовидной железы, при которой возможно сохранение, накопление и транспортировка материала в течение 10 суток с момента получения, в отличие от прототипа (удостоверение на рационализаторское предложение «Способ определения экспрессии Gal-3» № 1528 от 28 мая 2009 года.). Данная методика была добавлена в стандартный алгоритм дооперационного обследования пациентов с узловыми образованиями щитовидной железы.

С целью сравнительной оценки цитологического метода исследования пунктата из узла щитовидной железы и проточного флюороцитометрического метода определения экспрессии Gal-3 была исследована группа из 151 пациента с образованиями щитовидной железы. Результаты цитологического исследования и ПФЦ метода определения экспрессии Gal-3 в пунктате из узла щитовидной железы этих пациентов были оценены с использованием следующих критериев: чувствительность, специфичность, диагностическая точность метода, предсказательная ценность положительного и отрицательного тестов. Все пациенты были оперированы, что позволило нам провести сравнительную оценку цитологического исследования и проточного иммуноцитометрического метода

с окончательным гистологическим исследованием. На основании результатов цитологического исследования 151 пациент были разделены на подгруппы. В первой подгруппе показанием к оперативному лечению являлось по данным цитологического исследования наличие признаков злокачественности узла ЩЖ (Bethesda VI), во второй подгруппе – невозможность исключить наличие рака ЩЖ (Bethesda IV, V), а в третьей подгруппе – выявление узла большого размера, вызывающего компрессионный синдром и/или формирование косметического дефекта, но доброкачественного по результатам цитологического исследования (Bethesda II).

В таблице 3.4 представлены результаты цитологического исследования аспирата из узла щитовидной железы и гистологического исследования удаленного образования щитовидной железы.

Таблица 3.4 – Результаты морфологических исследований пациентов в исследуемых группах

Подгруппы (заключение цитологического исследования)	Заключение гистологического исследования	Количество (человек)
I Bethesda VI (69)	Папиллярный рак	67 (97%)
	Коллоидный зоб	1 (1,5%)
	Фолликулярная аденома	1 (1,5%)
II Bethesda IV и V (71)	Онкоцитарная аденома	1 (1,5%)
	Фолликулярная аденома	59 (83%)
	Коллоидный зоб	4 (5,5%)
	Папиллярный рак	5 (7%)
	Фолликулярный рак	2 (3%)
III Bethesda II (11)	Коллоидный зоб	11 (100%)

В первой подгруппе пациентов, у которых по данным цитологического исследования выявлены признаки папиллярного рака ЩЖ, диагноз высокодифференцированного рака щитовидной железы подтвердился в 97% случаев. У двух больных после операции выявлены доброкачественные заболевания щитовидной железы: коллоидный зоб и фолликулярная аденома ЩЖ.

Среди 71 пациента второй подгруппы, с дооперационным цитологическим диагнозом – фолликулярная опухоль, у 90% (64 пациентов) по данным гистологического исследования диагностированы доброкачественные образования ЩЖ: фолликулярная аденома у 59 пациентов, коллоидный зоб у 4 больных и в одном случае онкоцитарная аденома. У семи пациентов выявлен высокодифференцированный рак ЩЖ.

В третьей подгруппе пациентов, где по данным цитологического исследования аспирата из узла ЩЖ, не было получено данных о наличии рака ЩЖ, по данным гистологического исследования в 100% случаев диагноз подтвердился.

Для оценки показателей диагностической значимости результаты цитологического исследования аспирата из узловых образований щитовидной железы были интерпретированы следующим образом (таблица 3.5):

Таблица 3.5 – Оценка результатов цитологического исследования аспирата из узловых образований щитовидной железы

Результат гистологического исследования	Результат цитологического исследования аспирата из узловых образований ЩЖ, полученного при ТАБ		
	папиллярный рак ЩЖ	фолликулярная опухоль	коллоидный зоб
Высокодифферен-цированный рак ЩЖ	Истинно-положительный 67	Истинно-положительный 7	Ложно-отрицательный 0
Доброкачественные образования ЩЖ	Ложно-положительный 2	Ложно-положительный 64	Истинно-отрицательный 11

Результат оценивался как истиноположительный в случаях, когда цитологически диагностирован папиллярный рак, что подтвердилось при гистологическом исследовании (67 заключений). В этой группе в случаях выявления доброкачественных образований щитовидной железы по данным окончательного гистологического исследования результат цитологического исследования считался ложноположительным (2 заключения).

В подгруппе пациентов с цитологическим диагнозом коллоидный зоб во всех случаях нами получено цитологическое подтверждение и интерпретирован результат как истинноотрицательный (11 заключений). Случаев ложноотрицательных результатов в этой подгруппе не было.

«Неопределенный» результат цитологического исследования (Bethesda IV, V) мы интерпретировали так же, как в подгруппе пациентов со «злокачественными» заключениями цитологического исследования аспирата, так как диагноз «фолликулярная опухоль» не исключает наличие рака ЩЖ и является показанием к выполнению операции с диагностической целью. При выявлении рака ЩЖ по данным окончательного гистологического исследования результаты цитологического исследования считались истинноположительными (7 заключений). При выявлении доброкачественных изменений в щитовидной железе при гистологическом исследовании, результат считался ложноположительным (64 заключений).

Мы провели оценку диагностической значимости метода ТАБ с цитологическим исследованием у 151 пациентов. Результаты представлены в таблице 3.6.

В ходе исследования диагностической значимости цитологического исследования аспирата, полученного при ТАБ, выявлено, что при хороших показателях чувствительности метода (100%) и предсказательной значимости отрицательного теста (100%), выявлена довольно низкая специфичность (16,2%), которая привела к низкой диагностической точности (53%). Коэффициент согласия Каппа равен 0,15, что свидетельствует о слабой согласованности оценок цитологического исследования с заключением окончательного гистологического

исследования. По нашим данным, метод цитологического исследования оказался статистически недостоверным для исследуемой группы пациентов (p>0,05).

Таблица 3.6 – Диагностическая значимость ТАБ с цитологическим исследованием из узловых образований ЩЖ

Показатель диагностической значимости	%	2. ДИ%
Чувствительность	100	90,4-100
Специфичность	16,2	8,7-16,2
Диагностическая точность	53	–
Предсказательная ценность положительного теста	48,3	43,7-48,3
Предсказательная ценность отрицательного теста	100	53,5-100
Индекс согласия Каппа – 0,15 (0-0,15)	p>0,05	

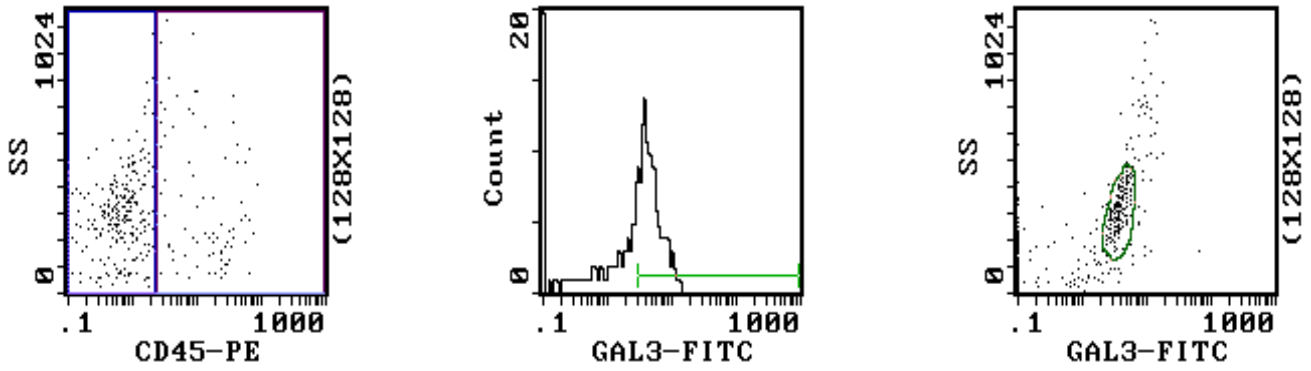
Низкая специфичность, а также статистическая недостоверность результатов связаны с тем, что подгруппа пациентов с заключением цитологического исследования Bethesda VI, V «фолликулярная опухоль» и «подозрение на рак» составили практически половину исследуемой группы (47%). Данные цитологического исследования не исключали наличие рака, поэтому пациенты были оперированы. Однако только у 7 из 71 был диагностирован высокодифференцированный рак по данным гистологического исследования. В остальных случаях диагноз рака не подтвердился, что и привело к низким показателям специфичности, диагностической точности, а достоверность метода оказалась невысокой (p>0,05).

При изучении диагностической значимости цитологического исследования у пациентов с определенными ответами, их значения соответствуют литературным данным: чувствительность – 100%, специфичность – 84%, точность – 97,3%. Коэффициент согласия Каппа составляет 0,82.

В алгоритм дооперационной диагностики узловых образований ЩЖ кроме цитологического исследования аспирата, полученного при ТАБ, с целью

улучшения диагностики рака ЩЖ у 151 пациента был включен усовершенствованный проточный флюороцитометрический метод исследования экспрессии Gal-3.

Диаграмма и гистограмма заключения ПЦФ метода определения экспрессии Gal-3 представлены на рисунках 3.2, 3.3.



1. 2. 3.

Рисунок 3.2 – Диаграммы и гистограмма двухцветного цитометрического протокола определения экспрессии Gal-3 пациента с папиллярным раком.

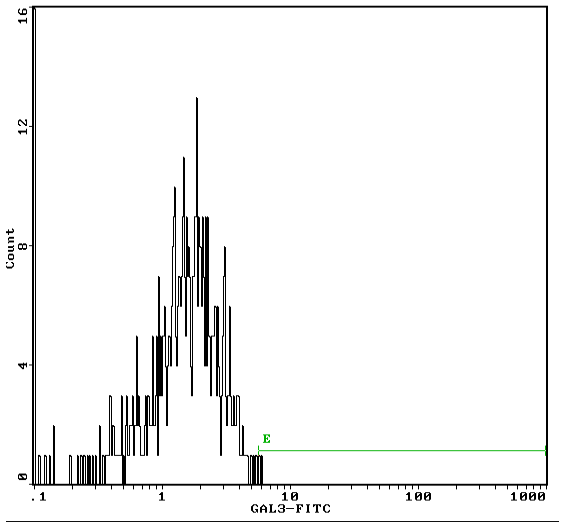


Рисунок 3.3 – Диаграмма изотипического контроля данного протокола.

При создании цитометрического протокола необходимо было разделить клетки периферической крови, попадающие в аспират при ТАБ, другие

лейкоцитарные клетки (например, при лимфоидной инфильтрации или клетки субстрата кистозного образования) от собственно клеток щитовидной железы. Эритроциты лизировались на этапе пробоподготовки и вместе с тромбоцитами отсекались при настройке протокола. Для исключения лейкоцитарных клеток использовали антитела к общелейкоцитарному антигену CD 45. На рисунке 3.2 на гистограмме 1 определяются две популяции клеток: экспрессирующих CD-45 антиген и CD-45 отрицательных клеток (клетки щитовидной железы). Экспрессия Gal-3 оценивается только в клетках не экспрессирующих общелейкоцитарный антиген – диаграмма 2. На гистограмме 3 выделена популяция галектин-положительных клеток. Так как для окраски использовали два флюорохрома – PE для антител к CD45 и FITC для антител к Gal-3, цитометрический протокол называется двухцветным.

Результаты цитологического исследования аспирата, полученного при ТАБ, проточного иммуноцитометрического метода исследования экспрессии Gal-3 и гистологического исследования представлены в таблице 3.7.

Среди 69 пациентов первой подгруппы с предоперационным диагнозом – папиллярный рак, экспрессия Gal-3 наблюдалась в 61 случае. Из них по данным гистологического исследования у 59 (96,7%) пациентов подтвержден диагноз высокодифференцированного рака щитовидной железы (у 45 пациента – классический вариант папиллярного рака ЩЖ, у 14 – фолликулярный вариант папиллярного рака ЩЖ), а у двух пациентов (3,3%) диагностированы доброкачественные заболевания щитовидной железы: коллоидный зоб и фолликулярная аденома щитовидной железы. В восьми случаях, когда экспрессия Gal-3 не определялась, по данным гистологического исследования был выявлен папиллярный рак ЩЖ.

Во второй подгруппе пациентов, у которых по данным цитологического исследования был поставлен диагноз фолликулярной опухоли ЩЖ, экспрессия Gal-3 наблюдалась у 10 (14 %) пациентов. Этим пациентам в послеоперационном периоде по данным гистологического исследования были поставлены следующие диагнозы: у семи больных выявлен высокодифференцированный рак ЩЖ,

у одного пациента – фолликулярная аденома ЩЖ, у одного больного – онкоцитарная аденома ЩЖ. Среди 61 (86%) пациентка, у которых экспрессия Gal-3 не наблюдалась, по данным гистологического исследования выявлены доброкачественные образования ЩЖ.

Таблица 3.7 – Сравнительная характеристика цитологического, гистологического исследований и результатов проточного иммуноцитометрического метода определения экспрессии Gal-3 в пунктате из узла щитовидной железы

Цитологическое исследование	Гистологическое исследование	Экспрессия Gal-3 (ИЦМ)	Кол-во
Bethesda VI	Папиллярный рак (67)	+	59
		-	8
	Коллоидный зоб (1)	+	1
	Фолликулярная аденома (1)	+	1
Bethesda IV и V	Фолликулярная аденома (59)	+	2
		-	57
	Онкоцитарная аденома (1)	+	1
	Коллоидный зоб (4)	-	4
	Папиллярный рак (5)	+	5
	Фолликулярный рак (2)	+	2
Bethesda II	Коллоидный зоб (11)	-	11

В третьей подгруппе среди 11 пациентов с доброкачественными образованиями ЩЖ, экспрессия Gal-3 не была выявлена ни у одного из больных (100%).

Таким образом, среди 74 пациентов с установленным по данным гистологического исследования диагнозом – высокодифференцированный рак ЩЖ, экспрессия Gal-3 наблюдалась у 59 больных (89,2%). Экспрессия Gal-3 отсутствовала у 8 пациентов (10,8%). Среди 77 пациентов с доброкачественными

образованиями ЩЖ по данным гистологического исследования экспрессия Gal-3 отсутствовала также у большинства – 72 пациента (93,5%), а была выявлена у трех больных с фолликулярной аденомой ЩЖ, одного пациента с коллоидным зобом и у одного больного с онкоцитарной аденомой ЩЖ.

Проведя анализ полученных данных, мы отметили, что результаты ПФЦ метода исследования экспрессии Gal-3 расходились с окончательным диагнозом лишь у 13 пациентов из 151 (8,6%). В случаях «определенных» ответов цитологического исследования результаты ПФЦ расходились с окончательным диагнозом у 10 больных из 69 (14,5%). При этом у двух пациентов ответ планового гистологического исследования был доброкачественным, несмотря на заключение цитологического исследования – «папиллярный рак» и экспрессию Gal-3 в опухолевых клетках, что и было показанием к оперативному лечению. В других 8 случаях, не смотря на «злокачественный» результат цитологического исследования аспирата, полученного при ТАБ, экспрессии Gal-3 в клетках не было, а диагноз папиллярного рака при плановом гистологическом исследовании подтвердился.

В подгруппе пациентов с «неопределенным» цитологическим заключением группы Bethesda IV, V у 61 из 71 пациента отсутствовала экспрессия Gal-3, и у всех этих пациентов по данным окончательного гистологического исследования диагностированы доброкачественные образования ЩЖ. У 10 пациентов выявлялась экспрессия Gal-3 и диагноз высокодифференцированного рака был поставлен в семи случаях.

Таким образом, благодаря методу проточного иммуноцитометрического определения экспрессии Gal-3 нам удалось в подгруппе пациентов с цитологическим заключением «фолликулярная опухоль» выделить группу пациентов с более высокой вероятностью злокачественного роста.

Оценка показателей диагностической значимости результаты ПФЦ метода исследования экспрессии Gal-3 в аспирате, полученном при ТАБ из узловых образований щитовидной железы представлена в таблице 3.8.

Таблица 3.8 – Оценка результатов проточного иммуноцитометрического исследования экспрессии Gal-3 в аспирате, полученном при ТАБ из узловых образований щитовидной железы

Результат гистологического исследования	Результат проточного иммуноцитометрического исследования экспрессии Gal-3 в аспирате из узловых образованиях ЩЖ	
	положительная	отрицательная
Высокодифферен-цированный рак ЩЖ	Истиноположительный 66	Ложноотрицательный 8
Доброкачественные образования ЩЖ	Ложноположительный 5	Истинноотрицательный 72

Положительная экспрессия Gal-3 в аспирате из узла щитовидной железы, полученном при ТАБ, с диагностированным по данным окончательного гистологического исследования папиллярным раком щитовидной железы считалась нами, как истинно положительный результат (66 заключений). При отсутствии экспрессии Gal-3 в этих образцах результат считался ложноотрицательным (8 заключения).

Положительная экспрессия Gal-3 в аспирате из узла щитовидной железы, полученном при ТАБ, с диагностированными по данным окончательного гистологического исследования доброкачественными образованиями щитовидной железы считалась ложноположительным результатом (5 заключения), а отсутствие экспрессии Gal-3 – истинноотрицательным результатом (72 заключения).

Диагностическая значимость проточного иммуноцитометрического метода определения экспрессии Gal-3 представлена в таблице 3.9. Критерий Хи-квадрат равен 103.590 (p менее 0,001), точный критерий Фишера равен 0,00000 (p менее 0,05).

Таблица 3.9 – Диагностическая значимость проточного иммуноцитометрического определения экспрессии Gal-3 в аспирате, полученном при ТАБ из узловых образований ЩЖ

Показатель диагностической значимости	%	3. ДИ%
Чувствительность	89,2	80,5-98,7
Специфичность	93,5	84,3-98,6
Диагностическая точность	90,9	–
Предсказательная ценность положительного теста	92,7	75,3-92,3
Предсказательная ценность отрицательного теста	90	83,8-98,9
Индекс согласия Каппа – 0,82 (0,59-0,92)	p<0,05	

Учитывая высокий показатель коэффициента согласия Каппа, равный 0,82, и p<0,05, можно говорить о статистической достоверности полученных данных.

Нами проведена сравнительная оценка диагностической значимости цитологического исследования и ПФЦ метода определения экспрессии Gal-3 в пунктате из узлового образования ЩЖ (таблица 3.10).

Таблица 3.10 – Диагностическая значимость цитологического исследования и ПФЦ метода определения экспрессии Gal-3 в аспирате из узлового образования ЩЖ

Показатель диагностической значимости	Цитологическое исследование (%)	ПФЦ метод (%)
Чувствительность (ДИ%)	100	89,2
Специфичность (ДИ%)	16,2	93,5
Диагностическая точность (ДИ%)	53	90,9

Продолжение таблицы 3.10

Показатель диагностической значимости	Цитологическое исследование (%)	ПФЦ метод (%)
Предсказательная ценность положительного теста (ДИ%)	48,3	92,7
Предсказательная ценность отрицательного теста (ДИ%)	100	90
Индекс согласия Каппа (ДИ)	0,15	89,2

Полученные результаты демонстрируют, что чувствительность метода цитологического исследования в выявлении рака щитовидной железы очень высокая, что позволяет не пропустить рак, но за счет большого количества диагностических операций, так как специфичность этого метода очень низкая. ПФЦ метод определения экспрессии Gal-3 обладает не только высокой чувствительностью, но и значительно более высокой специфичностью, что позволяет улучшить диагностику рака ЩЖ за счет уменьшения ложноположительных результатов.

3.3 Исследование экспрессии HBME-1 в аспирате из узловых образований щитовидной железы

Для выявления уровня экспрессии HBME-1 на дооперационном этапе обследовано 65 пациентов с узловыми образованиями щитовидной железы. Всем пациентам выполнено плановое гистологическое исследование операционного

материала. Результаты сопоставлены с заключениями цитологического исследования (таблица 3.11).

Таблица 3.11 – Результаты морфологических исследований у больных в изучаемых группах

Заключение цитологичексого исследования	Папиллярный Рак (Bethesda VI)		Фолликулярная Опухоль (Bethesda IV,V)			Коллоидный зоб (Bethesda II)
Количество пациентов	35		25			5
Заключение гистологического исследования	Папиллярный рак	АИТ	Фолликулярная аденома	Фолликулярный вариант папиллярного рака	Фолликулярный рак	Коллоидный зоб
Количество	38	2	31	6	3	5

В первой подгруппе больных, у которых по данным заключения цитологического исследования аспирата узла ЩЖ выявлены признаки папиллярного рака ЩЖ, диагноз высокодифференцированного рака щитовидной железы подтвердился в большинстве случаев, а именно, у 38 пациентов поставлен диагноз папиллярного рака ЩЖ. Диагноз рака не подтвердился у двух пациентов, когда в результате гистологического исследования был верифицирован аутоиммунный тиреоидит.

Среди 40 пациентов второй подгруппы, с дооперационным диагнозом по данным ТАБ – фолликулярная опухоль (Bethesda IV,V) , у 31 больных при гистологическом исследовании диагностированы доброкачественные образования ЩЖ: фолликулярная аденома у 28 пациентов, гюртлеклеточная аденома у 3

больных. При плановом гистологическом исследовании у 9 пациентов был диагностирован высокодифференцированный рак щитовидной железы: в трех случаях – фолликулярный рак и в шести – фолликулярный вариант папиллярного рака щитовидной железы.

В третьей подгруппе больных, где по данным цитологического исследования аспирата из узла ЩЖ был диагностирован узловой коллоидный зоб, при гистологическом исследовании диагноз подтвердился в 100% случаев.

Для проведения сравнительного анализа в алгоритм дооперационной диагностики узловых образований ЩЖ кроме цитологического исследования аспирата, полученного при ТАБ, был включен ПФЦ метод исследования экспрессии HBME-1.

Результаты цитологического исследования аспирата, полученного при ТАБ, ПФЦ метода исследования экспрессии HBME-1 представлены в таблице 3.12.

Таблица 3.12 – Сравнение данных ТАБ, гистологического исследования и результатов определения экспрессии Gal-3 и HBME-1

ТАБ	Гистологическое исследование	Экспрессия HBME-1	Кол-во
Папиллярный рак (Bethesda VI) (40)	АИТ (2)	+	0
	Папиллярный рак (38)	+	21
		-	17
Фолликулярная опухоль (Bethesda IV, V) (40)	Фолликулярная аденома (31)	+	10
		-	21
	Фолликулярный вариант папиллярного рака (6) и Фолликулярный рак (3)	+	4
		-	5
Коллоидный зоб (Bethesda II) (5)	Коллоидный зоб (5)	-	3
		+	2

Среди 40 пациентов первой подгруппы, с предоперационным диагнозом по данным ТАБ – папиллярный рак, экспрессия HBME-1 была выявлена у 21 пациента с папиллярным раком ЩЖ и не определялась у 17 больных. У пациента с верифицированным аутоиммунным тиреоидитом экспрессии выявлено не было.

Среди 40 пациентов второй подгруппы, с дооперационным диагнозом по данным ТАБ – фолликулярная опухоль (Bethesda IV, V), у 31 больных при гистологическом исследовании диагностированы доброкачественные образования ЩЖ: фолликулярная аденома у 28 пациентов, гюртлеклеточная аденома у 3 больных. При плановом гистологическом исследовании у 9 пациентов был диагностирован высокодифференцированный рак щитовидной железы: в шести случаях – фолликулярный рак и в трёх – фолликулярный вариант папиллярного рака щитовидной железы. Цитологический метод в этой группе пациентов имеет 100% чувствительность при нулевой специфичности, что диктует необходимость поиска дополнительных биомаркеров. При исследовании эффективности использования биомаркера в этой группе пациентов получены наиболее интересные данные. Экспрессия HBME-1 наблюдалась у 7 больных из 9, у которых по данным гистологического исследования был поставлен диагноз высокодифференцированного рака ЩЖ.

В третьей подгруппе среди 5 пациентов с коллоидными узлами по данным ТАБ, экспрессия HBME-1 определялась в 2-х случаях.

Оценка показателей диагностической значимости результаты ПФЦ исследования экспрессии HBME-1 в аспирате, полученном при ТАБ из узловых образований щитовидной железы представлена в таблице 3.13.

Положительная экспрессия HBME-1 в аспирате из узла щитовидной железы, полученном при ТАБ, с диагностированным по данным окончательного гистологического исследования высокодифференцированным раком щитовидной железы считалась нами, как истинноположительный результат. При отсутствии маркеров в этих образцах результат считался ложноотрицательным.

Таблица 3.13 – Оценка результатов флюороцитометрического исследования экспрессии HBME-1 в аспирате, полученном при ТАБ из узловых образований щитовидной железы

Результат гистологического исследования	Результат исследования экспрессии HBME-1 в аспирате из узловых образованиях ЩЖ	
	положительная	отрицательная
Высокодифференци-рованный рак ЩЖ	Истинноположительный	Ложноотрицательный
Доброкачественные образования ЩЖ	Ложноположительный	Истинноотрицательный

Положительная экспрессия HBME-1 в аспирате из узла щитовидной железы, полученном при ТАБ, с диагностированными по данным окончательного гистологического исследования доброкачественными образованиями щитовидной железы считалась ложноположительным результатом, а отсутствие этого маркеров – истинноотрицательным результатом.

В группе пациентов с папиллярным раком диагностическая точность использования в диагностической панели HBME1 составила 67,5%, что достоверно ниже диагностической точности цитологического метода (95%). Таким образом, использование данного метода в диагностике папиллярного рака щитовидной железы не имеет преимуществ перед использованием цитологического метода.

В группе пациентов с цитологическими заключениями (Bethesda IV, V) и послеоперационными доброкачественными заключениями гистологического исследования была выявлена экспрессия HBME-1 в 14 случаях. Сравнивая эффективность использования в панели биомаркера HBME-1 в диагностике рака в группе пациентов с неопределенным заключением ТАБ, статистически значимых результатов в сравнении с цитологическим методом не получено (таблица 3.14).

Таблица 3.14 – Диагностическая значимость определения экспрессии HBME-1 в группе пациентов с неопределенными заключениями цитологического исследования (Bethesda IV)

Показатель диагностической значимости	Цитологическое исследование (Bethesda IV)	Анализ экспрессии HBME-1
Чувствительность	98,9%	44,4%
Специфичность	0,3%	73,0%
Диагностическая точность	22,6%	67,3%
Предсказательная ценность положительного теста	25%	28,6%
Предсказательная ценность отрицательного теста	50%	84,4%
p	для p=0,003	для p=0,538

Полученные данные показывают, что определение экспрессии HBME-1 в группе пациентов с цитологическим диагнозом папиллярный рак и коллоидный узел не имеет преимуществ перед «золотым стандартом» – цитологическим методом. Сложности остаются в случаях неопределенных заключений цитологического исследования. Цитологический метод не позволяет дифференцировать фолликулярную аденому и фолликулярный рак, а нередко в эту группу попадают пациенты с фолликулярным вариантом папиллярного рака, что сводит специфичность данного метода к нулю. Мы попытались с помощью определения экспресси HBME-1 методом проточной флуороцитометрии улучшить диагностику высокодифференцированного рака в группе пациентов с неопределенным заключением ТАБ на дооперационном этапе. Однако, статистически значимых результатов при использовании в панели данного маркера не получили, в отличие от ПЦФ определения экспрессии Gal3.

В ходе проведенного анализа можно сделать вывод, что включение в диагностическую панель такого биомаркера как HBME-1 не повышает диагностическую точность метода цитологического исследования в дооперационном выявлении рака щитовидной железы на дооперационном этапе.

3.4 Частота выявления BRAF-мутации у пациентов с высокодифференцированным раком щитовидной железы (ретроспективный анализ)

Далее диагностическая панель была дополнена наиболее характерной для папиллярного рака щитовидной железы мутацией BRAF V600E. В начале было выполнено ретроспективное исследование BRAF-мутации методом фореза в гистологическом материале после депарафинизации у пациентов с различными вариантами высокодифференцированного рака щитовидной железы (ВДРЩЖ). При анализе встречаемости мутации гена BRAF у пациентов с ВДРЩЖ было выявлено, что данная мутация не встречается в случаях ФРЩЖ.

Таким образом, наши результаты соответствуют литературным данным. Частота встречаемости BRAF-мутации при ПРЩЖ оказалась равной 62,4%. Частота выявления мутации представлена в таблице 3.15.

Таблица 3.15 – Частота выявления мутации гена BRAFV600E у пациентов с ВДРЩЖ (n=107)

Окончательный гистологический диагноз	Количество случаев (n=107)	Выявлена BRAF-мутация	
		абс.	%
Папиллярный рак	85	53	62,4
Фолликулярный рак	22	–	0

Следует отметить, что полученные значения частоты встречаемости BRAF-мутации согласуются с данными других исследователей и соответствуют высокой частоте встречаемости мутации в популяции.

Мы оценили частоту встречаемости BRAF-мутации в группе больных с ПРЩЖ, при различных вариантах ПР. Получены следующие результаты. В классическом варианте ПР мутация гена BRAF была обнаружена у 40 пациентов из 57, соответственно частота встречаемости BRAF-мутации составила 70,2%. Тогда как в ФВПР данная мутация была выявлена у 13 пациентов из 28, что составило 46,4% (таблица 3.16).

Таблица 3.16 – Частота выявления мутации гена BRAFV600E у пациентов с ПРЩЖ (n=85)

Окончательный гистологический диагноз	Количество случаев (n=85)	Выявлена BRAF-мутация	
		абс.	%
Папиллярный рак лассический вариант	57	40	70,2
Папиллярный рак фолликулярный вариант	28	13	46,4

Таким образом, в нашем исследовании мы подтверждаем данные о том, что мутация гена BRAF не встречается в случаях ФРЩЖ. В исследуемой популяции Санкт-Петербурга нами была выявлена высокая частота встречаемости мутации гена BRAF. При анализе частоты встречаемости мутации BRAFV600E в различных вариантах папиллярного рака было установлено, что данная поломка достоверно чаще ($p<0,05$) встречается в случаях классического варианта, чем при фолликулярном варианте папиллярного рака. Учитывая высокую встречаемость

BRAF-мутации при ПРЩЖ, данный маркер может быть использован в диагностике ПРЩЖ.

3.5 Оценка значимости выявления BRAF-мутации в пункционном материале тонкоигольной аспирационной биопсии в диагностике папиллярного рака щитовидной железы

После подтверждения гипотезы о возможности включения мутации BRAF V600E в диагностическую панель, мы исследовали возможность определения BRAF-мутации в пункционном материале из узловых образований щитовидной железы. В зависимости от результатов цитологического исследования пациенты были разделены на 3 группы - коллоидный зоб (Bethesda II) (n=17), папиллярный рак(Bethesda VI) (n=145) и фолликулярная опухоль(Bethesda IV, V) (n=48) (таблица 3.17).

Таблица 3.17 – Распределение пациентов по группам в зависимости от цитологического диагноза

Результат ТАБ	Bethesda II	Bethesda VI	Bethesda IV,V
Количество пациентов	17	145	48

Всем больным было выполнено гистологическое исследование операционного материала, по результатам которого проведен сравнительный анализ данных цитологического и гистологического исследований (таблица 3.18).

Таблица 3.18 – Результаты планового гистологического исследования у больных контрольной и исследуемой групп

Цитологическое заключение	Окончательный гистологический диагноз	
Узловой коллоидный зоб(Bethesda II) 17	Узловой коллоидный зоб	17
Папиллярный рак(Bethesda VI) 145	Папиллярный рак	139
	Фолликулярный рак	1
	Фолликулярная аденома	5
Фолликулярная опухоль(Bethesda II) 48	Фолликулярная аденома	36
	Папиллярный рак	6
	Узловой коллоидный зоб	6
Всего 210	Узловой коллоидный зоб	23
	Фолликулярная аденома	41
	Папиллярный рак	145
	Фолликулярный рак	1

В случаях результата цитологического исследования – узловой коллоидный зоб, диагноз подтвердился у всех пациентов по результатам планового гистологического исследования. В группе пациентов с цитологическим диагнозом папиллярный рак (145 пациентов), гистологически папиллярный рак верифицирован у 139 пациентов, у одного больного был выявлен фолликулярный рак. В пяти случаях поставлен диагноз фолликулярной аденомы по результатам планового гистологического исследования.

При цитологическом диагнозе фолликулярная опухоль (48 больных), папиллярный рак был выявлен в 6 случаях, тогда как в 36 случаях диагностирована фолликулярная аденома и в 6 случаях узловой коллоидный зоб.

Таким образом, цитологический метод имеет ряд ограничений, что нередко

являетсяя причиной выполнения неадекватного объема операции. Так, в случае гипердиагностики папиллярного рака выполняется завышенный объем оперативного вмешательства. В случае же фолликулярной опухоли стандартным объемом операции является гемитиреоидэктомия, что при подтверждении рака щитовидной железы нередко требует выполнения повторной операции в объеме завершающей тиреоидэктомии. В связи с этим нами была предпринята попытка улучшить диагностику ВДРЩЖ путем внедрения в дооперационную диагностику методику определения мутации гена BRAF.

В группе пациентов с дооперационным цитологическим диагнозом «коллоидный зоб» мутантного типа гена BRAF не было выявлено ни в одном случае, что полностью совпало с данными планового гистологического послеоперационного исследования, при котором были поставлен диагноз узлового коллоидного зоба (таблица 3.19).

Таблица 3.19 – Выявление мутации гена BRAFV600E

Цитологическое заключение	Кол-во	Окончательный гистологический диагноз	Кол-во	BRAF-мутация ЕСТЬ	BRAF-мутации НЕТ
Узловой коллоидный зоб	17	Узловой коллоидный зоб	17	–	17
Папиллярный рак	145	Папиллярный рак	139	83	56
		Фолликулярный рак	1	–	1
		Фолликулярная аденома	5	–	5
Фолликулярная опухоль	48	Фолликулярная аденома	36	–	36
		Папиллярный рак	6	5	1
		Узловой коллоидный зоб	6	–	6
Всего	210		210	88	122

В группе пациентов с цитологическим ответом папиллярный рак, диагноз не подтвердился у 5-ти пациентов и ни у кого из них мутации гена BRAF выявлено не было. У пациента с фолликулярным раком по результатам гистологического исследования, мутации также выявлено не было. У 139 пациентов с подтвержденным по данным гистологии папиллярным раком мутация гена BRAF была выявлена в 83 случаях (59,7%).

Наибольший интерес представляет группа, в которую вошли пациенты с цитологическим диагнозом «фолликулярная опухоль». По данным гистологической оценки препаратов у 6 пациентов диагностирован папиллярный рак, у 36 больных был поставлен окончательный диагноз фолликулярная аденома, у 6 – узловой коллоидный зоб. Мутантный тип гена BRAF не определялся ни в одном из образцов, взятых у пациентов с фолликулярной аденомой и узловым коллоидным зобом, однако в 5 образцах, взятых у пациентов с папиллярным раком, был обнаружен мутантный тип гена BRAF. Соответственно, при наличии в материале ТАБ пациентов с фолликулярной опухолью мутации гена BRAF, мы можем утверждать, что диагностировали папиллярный рак.

Таким образом, на основании результатов нашего исследования мы можем ставить показания у ряда пациентов к операции по поводу рака ЩЖ с соответствующим объемом оперативного вмешательства и соблюдением онкологических принципов. Соответственно, это позволит выполнить радикальную операцию в один этап, то есть избавит пациента от повторной операции в объеме завершающей тиреоидэктомии. Отсутствие данной мутации позволяет выполнять у этих пациентов операцию в объеме гемитиреоидэктомии с последующим гистологическим исследованием.

Критерии достоверности выявления BRAF-мутации в дооперационной диагностике папиллярного рака были вычислены по общепринятой методике и представлены таблице 3.20.

Таблица 3.20 – Критерии достоверности метода выявления мутации V600E гена BRAF у пациентов с подозрением на рак щитовидной железы

Параметры	BRAF-мутация	Доверительный интервал
Предсказательная ценность положительного теста	100%	92-100%
Чувствительность теста	61%	52-69%
Предсказательная ценность отрицательного теста	53%	48-58%
Специфичность теста	100%	94-100%
Диагностическая точность метода	69%	62-75%

Таким образом, чувствительность данного метода исследования составила 61%, специфичность – 100% и, соответственно, диагностическая ценность составила 69%.

По данным нашего исследования наличие в образцах мутантного типа гена BRAF с вероятностью 100% свидетельствует о злокачественности процесса, тогда как отсутствие данной мутации характерно для доброкачественных заболеваний, однако не исключает наличия BRAF-негативного рака.

На основании данных нашего исследования мы можем утверждать, что мутация V600E гена BRAF является диагностическим маркером папиллярного рака щитовидной железы. Выявление мутации гена BRAFV600E в пункционном материале может быть использовано в качестве дополнительного метода дооперационной диагностики папиллярного рака щитовидной железы. Внедрение метода определения BRAF-мутации в дооперационную диагностику позволит не только улучшить выявляемость папиллярного рака щитовидной железы, но и выполнить радикальный объем оперативного вмешательства с соблюдением онкологических принципов.

3.6 Тактика хирургического лечения пациентов с узловыми образованиями щитовидной железы с применением в диагностическом алгоритме предложенной молекулярно-генетической панели

Проведенное нами исследование позволяет говорить, что используемые в настоящее время морфологические методики до- и интраоперационной диагностики обладают недостаточно высокой точностью, что приводит в ряде случаев к гипердиагностике высокодифференцированного рака ЩЖ и, как следствие, к выполнению большого количества диагностических операций и неадекватного объема хирургического вмешательства. Использование на дооперационном этапе диагностической панели, включающей ПФЦ определение экспрессии Gal-3 и ПЦР определения мутации BRAF V600E, может позволить улучшить диагностику высокодифференцированного рака ЩЖ. Данная панель обладает высокой чувствительностью в диагностике высокодифференцированного рака щитовидной железы, что позволяет нам говорить о высоком риске наличия этого заболевания у пациентов с положительной экспрессией Gal-3, а также выбрать изначально оптимальный объем хирургического лечения, при выявлении мутации гена BRAF V600E.

Высокая специфичность ПФЦ метода определения экспрессии Gal-3 в диагностике высокодифференцированного рака щитовидной железы свидетельствует о том, что при отсутствии экспрессии данного маркера, мы с высокой степенью вероятности могли предполагать наличие у пациента доброкачественного заболевания щитовидной железы, а, следовательно, выполнять органосберегающую операцию. Особо актуальный данный метод в группе пациентов с «неопределенным» заключением цитологического исследования, которым рекомендуется оперативное лечение с диагностической целью. В случае выявления экспрессии Gal-3 в узловом образовании ЩЖ можно с высокой степенью достоверности предполагать наличие

высокодифференцированного рака ЩЖ и выполнять объем операции, рекомендованный для высокодифференцированного рака щитовидной железы.

Включение в диагностическую панель определения мутации гена BRAF по данным нашего исследования позволит в случае выявления последней с вероятностью 100% говорить о злокачественности процесса.

Таким образом, в алгоритм дооперационной дифференциальной диагностики узловых образований щитовидной железы наряду с цитологическим исследованием аспирата, полученным при ТАБ, мы предлагаем включить определениея экспрессии Gal-3 и мутации гена BRAF V600E. При выявлении результатов цитологического исследования группы Bethesda VI, V для уточнения диагноза необходимо определение экспрессии Gal-3 и мутации гена BRAF. Соответственно, включение в алгоритм дооперационного обследования пациента такого метода позволит улучшить диагностику высокодифференцированного рака щитовидной железы на дооперационном этапе и, следовательно, оптимизировать тактику хирургического вмешательства.

Глава 4
РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ПРОГНОСТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ ВЫСОКОДИФФЕРЕНЦИРОВАННОГО РАКА ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ
Ретроспективный анализ

4.1 Анализ распределения натрий-йодного симпортера во внутренних компартментах тиреоцита

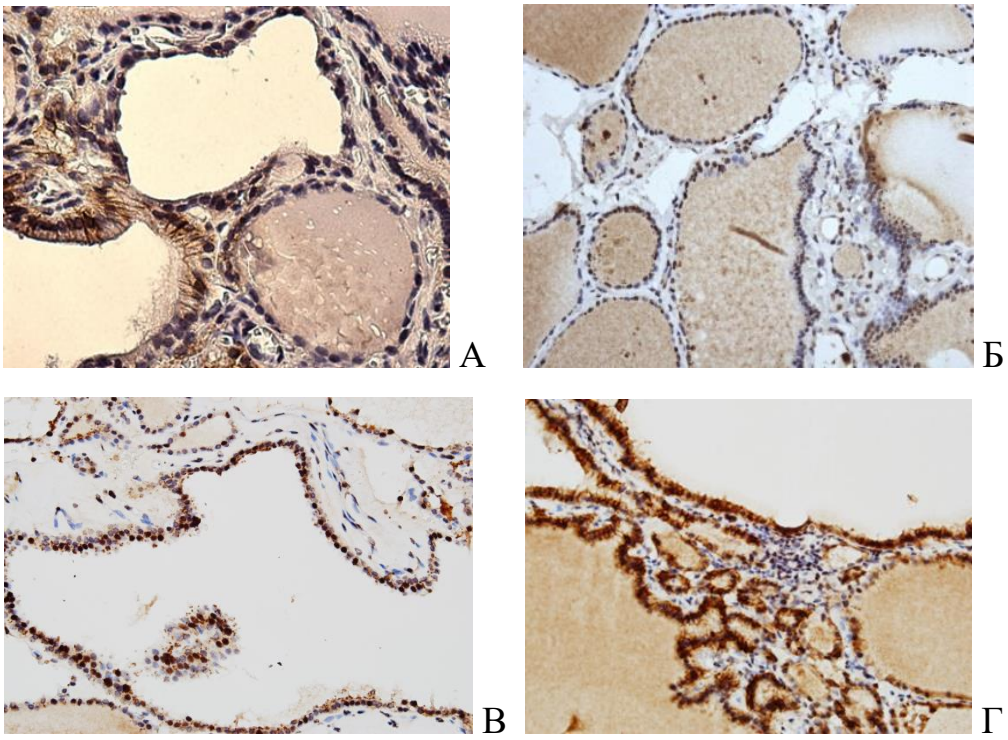
После открытия натрий-йодного симпортера много исследований было посвящено исследованию его роли в транспорте йонов йода в клетки щитовидной железы. Нами был выбран ИГХ метод визуализации белка НИС и его локализации в клетках щитовидной железы [68, 92].

Мы изучили особенности иммуногистохимической картины в нормальной ткани железы и при различных патологических состояниях, связанных с повышенной функцией щитовидной железы (диффузный токсический зоб, узловой токсический зоб), и в опухолевой ткани (рисунок 4.1).

При изучении распределения белка в клетке нормально функционирующей железы максимальная концентрация белка НИС наблюдалась на мембране клетки, тогда как в цитоплазме белок определялся в незначительном количестве. Мы объяснили это тем, что для выполнения функции белок должен встраиваться в мембрану клетки для осуществления транспорта ионов йода в клетку. Цитоплазма клетки является местом синтеза и транспорта белка НИС к клеточной мембране, куда он встраивается для выполнения своей функции. Мы исследовали экспрессию НИС в 10 образцах нормальной ткани щитовидной железы и в среднем около 50% клеток в поле зрения имели мембранную экспрессию НИС.

Мы сравнили локализацию и уровень экспрессии исследуемого белка при патологических состояниях, сопряженных с повышенным захватом йода клетками (болезнь Грейвса, токсическая аденома), когда при сцинтиграфии мы видим повышенный захват РФП и состояния, при которых мы видим картину

«холодного узла» при сцинтиграфии. Так, в случае болезни Грейвса максимальное накопление так же как и в нормальной ткани наблюдалось на клеточной мембране, при минимальном накоплении НИС во внутренних компартментах. Но процент клеток, экспрессирующих НИС, был выше, чем в нормальной ткани и достигал 75%. Таким образом, при тиреотоксикозе, проявляющемся повышенной продукцией гормонов щитовидной железы, имеет место повышенный захват йода тиреоцитами для синтеза гормонов. Это требует увеличения транспорта йода в клетку, что, как мы видим, сопровождается повышенной экспрессией белка-переносчика.



А – диффузный токсический зоб – ИГХ окрашивание НИС только на клеточной мембране, ×40; Б – нормальная ткань щитовидной железы – ИГХ окрашивание НИС так же только на клеточной мембране, ×20; В – фолликулярная аденома щитовидной железы, клинически протекающая на фоне эутиреоза, уровень НИС на мембране снижен, наблюдается внутриклеточное расположение НИС («холодный узел»), ×40; Г – фолликулярная аденома, клинически протекающая на фоне тиреотоксикоза, уровень экспрессии НИС на мембране повышен («горячий узел»), ×40.

Рисунок 4.1 – Экспрессия натрий-йодного симпортера в нормальной ткани щитовидной железы и при доброкачественных заболеваниях щитовидной железы.

Для подтверждения связи между уровнем экспрессии НИС и способности тиреоцита к захвату йода мы исследовали экспрессию НИС в образцах ткани фолликулярной аденомы щитовидной железы, в пяти случаях при этом имел место тиреотоксикоз и узел был «горячим» по данным сцинтиграфии. В пяти случаях имел место эутиреоз и имела место картина «холодного» узла при сцинтиграфии. При ИГХ-исследовании «горячего» узла имела место повышенная экспрессия НИС и картина соответствовала таковой при болезни Грейвса. В то время как при исследовании «холодного» узла имело место снижение количества клеток с мембранным расположением НИС и увеличением его депонирования во внутренних компартментах клетки. Количество клеток с мембранной экспрессией НИС снижалось до 15-20%.

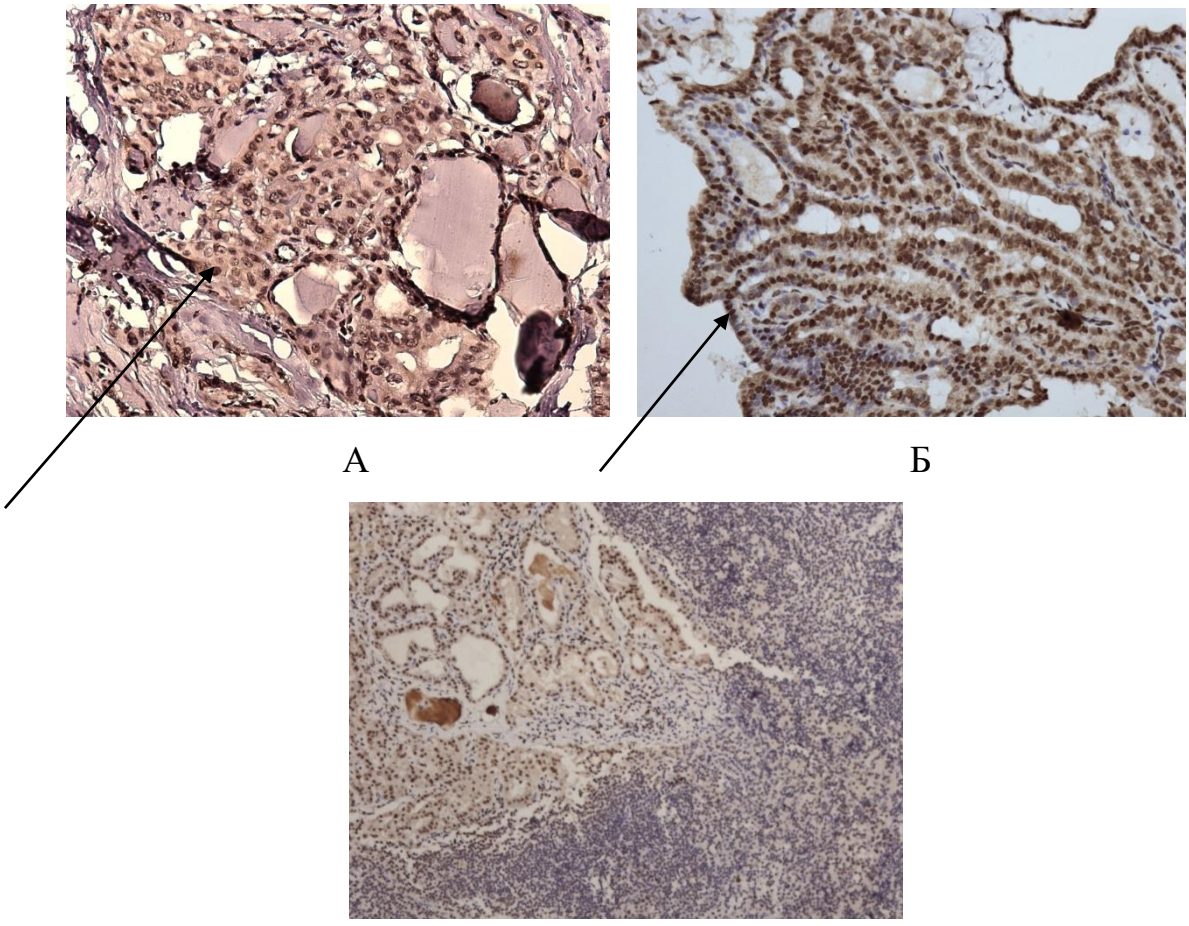
Таким образом, нами была выявлена закономерность – чем выше мембранная экспрессия НИС, тем выше способность тиреоцитов к захвату йода, что подтверждается данными сцинтиграфии. В случае заболеваний, сопровождающихся тиреотоксикозом и требующих повышенного потребления клетками йода для синтеза гормонов, что подтверждается данными сцинтиграфии и захвата йода, имеет место повышенная мембранная экспрессия НИС. Тогда как в «холодных» узлах наблюдается снижение мембранной экспрессии НИС. Полученные данные позволили нам предположить, что по степени мембранной экспрессии НИС мы можем прогнозировать чувствительность опухолевой ткани к захвату радиойода.

Выполненное исследование показало, что уровень экспрессии НИС в нормальной ткани щитовидной железы составил от 30% до 60% всех клеток, при диффузном токсическом зобе (болезнь Грейвса) или узловом токсическом зобе повышается до 70-75%, а при «холодных» узлах – может снижаться до 15-20%.

Следующим этапом была исследована экспрессия НИС в ткани высокодифференцированного раке щитовидной железы [68, 92].

При проведении ИГХ исследования 60 образцов опухолевой ткани были получены интересные данные – экспрессия НИС не снижается, изменяется распределение симпортера в клетках. Наблюдается накопление белка во внутренних компартментах клетки, тогда как мембранная экспрессия значительно снижается.

Как было показано выше лишь уровень мембранной экспрессии отражает способность клетки к захвату йода. Однако наряду с опухолевыми клетками, проявившими максимальное накопление НИС внутри клетки, имеются клетки с мембранной его экспрессией. Можно предположить, что количество клеток с мембранной экспрессией НИС отражает степень дифференцировки опухоли и косвенным маркером дедифференцировки и неспособности к захвату йода может служить снижение мембранной экспрессии НИС (рисунок 4.2).



А Б

В

А – папиллярный рак щитовидной железы с низким уровнем экспрессии НИС на мембране; Б – папиллярный рак щитовидной железы с хорошим уровнем экспрессии НИС на мембране; В – метастаз папиллярного рака в лимфоузел центральной клетчатки шеи (VI группа) – определяется лишь фоновое окрашивание, отчетливо экспрессии НИС на мембране клеток не определяется.

Рисунок 4.2 – Экспрессия натрий йодного симпортера при папиллярном раке щитовидной железы.

При оценке уровня мембранной экспрессии НИС при папиллярном раке щитовидной железы получены следующие данные: максимальное количество экспрессирующих клеток не превышает 10% и в среднем равняется 4,5%.

Таким образом, оценка мембранной экспрессии НИС в ткани ВДРЩЖ позволяет определять способность опухоли к захвату йода, то есть прогнозировать радиойодчувствительность.

4.2 Оценка среднего значения экспрессии натрий-йодного симпортера по группам

Мы исследовали корреляцию уровня экспрессии НИС и развитие рецидива [68, 92].

У пациентов, чей объем лечения ограничился лишь хирургическим вмешательством и не наблюдалось развития рецидива в сроки до 60 месяцев, уровень экспрессии НИС был максимальным и доходил до 16%, средний же уровень экспрессии составил 6,7% (таблица 4.1).

Таблица 4.1 – Характеристика экспрессии натрий – йодного симпортера у пациентов после оперативного вмешательства и без выявленного рецидива заболевания в срок наблюдения до 60 месяцев

Всего	Экспрессия НИС
2	НИС менее 2%
5	НИС более 2%
8	НИС более 6%
15	ВСЕГО

Во второй группе больных (пациенты без рецидива заболевания в срок наблюдения до 60 месяцев после оперативного вмешательства

и радиойодтерапии) средний уровень экспрессии НИС первичной опухоли составил 2,8% (таблица 4.2).

Таблица 4.2 – Характеристика экспрессии натрий – йодного симпортера у пациентов без рецидива заболевания в срок наблюдения до 60 месяцев после оперативного вмешательства и радиойодтерапии

Всего	Экспрессия НИС
9	НИС менее 2%
14	НИС более 2%
2	НИС более 6%
25	ВСЕГО

У пациентов с развившимся рецидивом после оперативного лечения и радиойодтерапии наблюдался наиболее низкий уровень экспрессии НИС – в среднем до 1% по данным ИГХ исследования (таблица 4.3).

Таблица 4.3 – Характеристика экспрессии натрий – йодного симпортера у пациентов с рецидивом заболевания в срок наблюдения до 60 месяцев после оперативного вмешательства и радиойодтерапии

Всего	Экспрессия НИС
13	НИС менее 1%
2	НИС более 1%
5	НИС более 2%
20	ВСЕГО

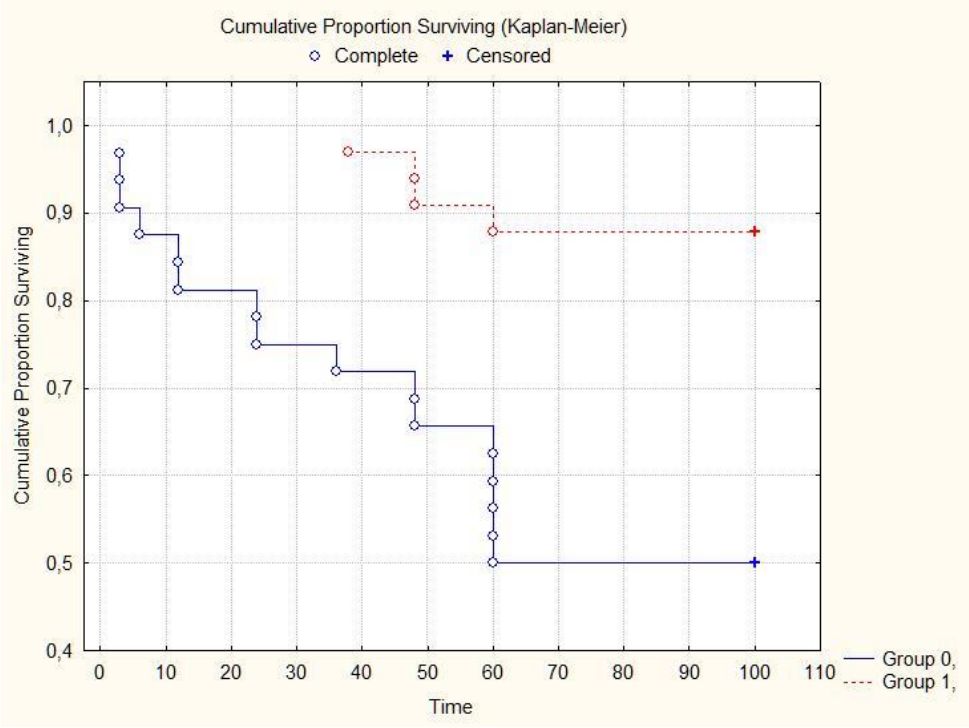
Сравнительный анализ показал, что наименьший уровень экспрессии НИС выявлен в группе пациентов с рецидивом заболевания после операции и РЙТ ($p=0,00083$) и критичным для развития рецидива явилось снижение уровня экспрессии НИС до 1%.

Проведенное исследование показывает, что одной из причин развития рецидива является снижение экспрессии НИС и развитие радиойодрезистентности.

4.3 Влияние уровня экспрессии натрий-йодного симпортера на прогноз течения высокодифференцированного рака щитовидной железы

4.3.1 Влияние уровня экспрессии натрий-йодного симпортера на развитие рецидива заболевания

Полученные результаты о различиях в уровне экспрессии НИС в опухолях папиллярного рака щитовидной железы позволили провести анализ влияния экспрессии НИС на время развития рецидива и его тяжесть. Так, нами была выявлена достоверная зависимость времени наступления рецидива от уровня экспрессии НИС. Чем ниже уровень экспрессии НИС, тем меньше срок безрецидивного выживания, и критичной считается отметка в 1% (рисунок 4.3)



Группа 0 – пациенты с уровнем экспрессии НИС менее или 1%; Группа 1 – пациенты с уровнем экспрессии НИС более 1%; Time – время до наступления рецидива указано в месяцах; Cumulative proportional surviving – кумулятивная выживаемость.

Рисунок 4.3 – Кривые без рецидивной выживаемости больных в зависимости от уровня экспрессии натрий-йодного симпортера.

Таким образом, при снижении экспрессии НИС в первичной опухоли менее 1% с высокой долей вероятности можем прогнозировать наступление рецидива заболевания. Связано это, вероятнее всего, со снижением дифференцировки опухоли, проявлением которой может служить уровень экспрессии НИС.

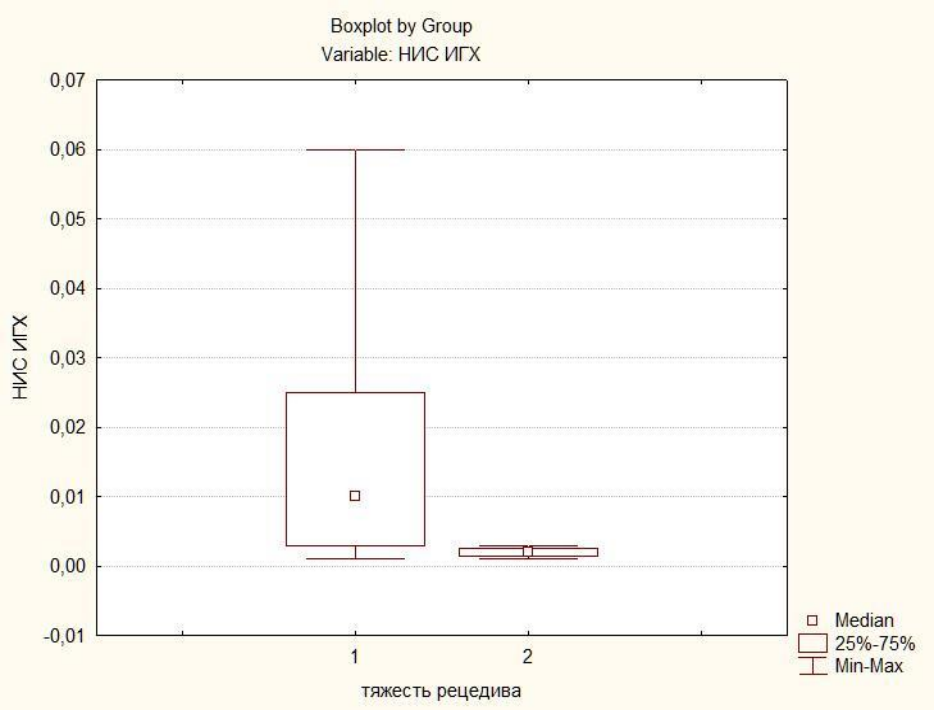
Мы проанализировали возможное влияние экспрессии НИС на тяжесть рецидива – локорегионарный или отдаленное метастазирование в группе больных с рецидивом рака щитовидной железы после РЙТ (таблица 4.4) методом Mann – Whitney U test.

Таблица 4.4 – Уровень экспрессии натрий – йодного симпортера у больных группы рецидива заболевания после радиойод терапии в зависимости от характера рецидива

Рецидив	Местный	Отдаленный
Количество человек	16	4
НИС минимальный (%)	0,2	0,1
НИС максимальный (%)	6,0	0,3

Проведенный анализ показал статистически значимое ($p<0,05$) влияние уровня экспрессии НИС на тяжесть рецидива (рисунок 4.4).

Полученные данные свидетельствуют, что чем ниже мембранная экспрессия НИС, тем выше вероятность появления отдаленных метастазов. Объяснением данного явления может служить дедифференцировка опухоли, отражением которой является снижение специфической функции тиреоцита – способности к захвату йода, косвенным проявлением которого является экстремально сниженный уровень экспрессии НИС.



Группа 1 – пациенты с локорегионарными метастазами;
Группа 2 – пациенты с отдаленными метастазами; НИС ИГХ – Натрий-йодный симпортер, определенный иммуногистохимическим методом, измеренный в %.

Рисунок 4.4 – Влияние уровня экспрессии НИС на тяжесть рецидива.

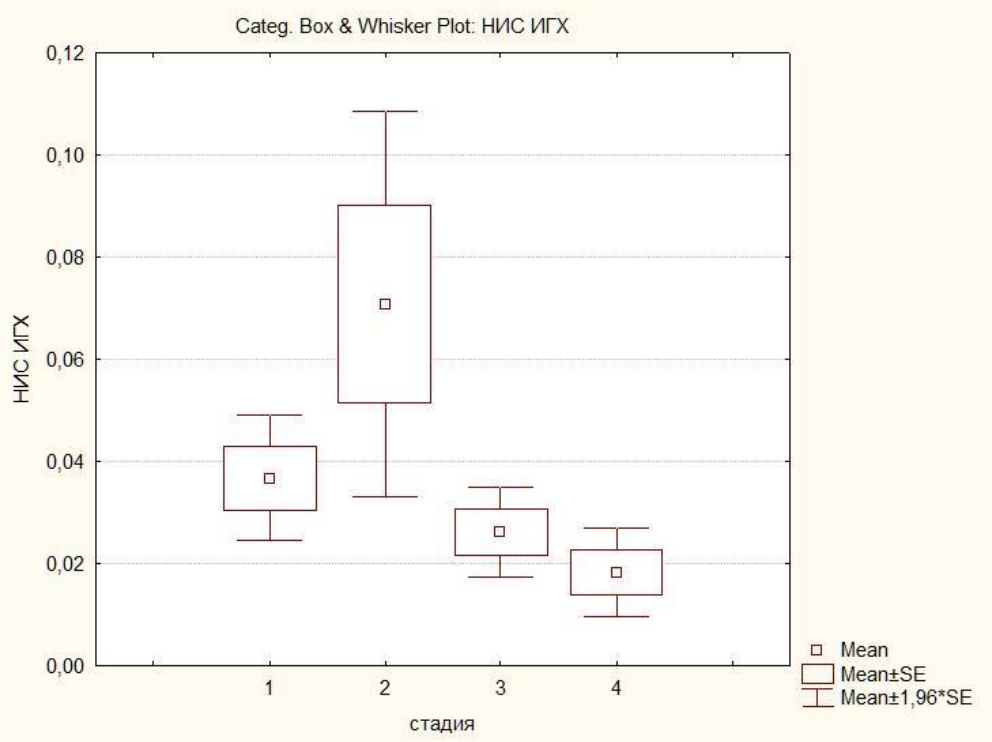
4.3.2 Уровень экспрессии натрий-йодного симпортера и стадия опухоли

При изучении взаимосвязи между уровнем экспрессии НИС и стадией опухоли были выявлена статистически значимая ($p<0,05$) корреляция между стадией опухолевого процесса и уровнем экспрессии НИС первичной опухоли (рисунок 4.5).

Так, при стадии I средний уровень экспрессии НИС достигал 3,7%, тогда как при IV стадии не превышал 0,8%. Таким образом, полученные данные наглядно демонстрируют, что чем более распространенный процесс, чем выше стадия, тем ниже уровень экспрессии НИС.

Снижение экспрессии НИС опухолевой тканью в случаях более распространенного опухолевого процесса служит подтверждением роли НИС,

как возможного маркера дифференцировки опухоли щитовидной железы. Таким образом, снижение экспрессии НИС в первичной опухоли или метастазах может служить прогностическим маркером агрессивности течения опухолевого процесса.



Стадия 1, 2, 3, 4 – соответствуют 1, 2, 3 и 4 стадии процесса по классификации TNM 7.

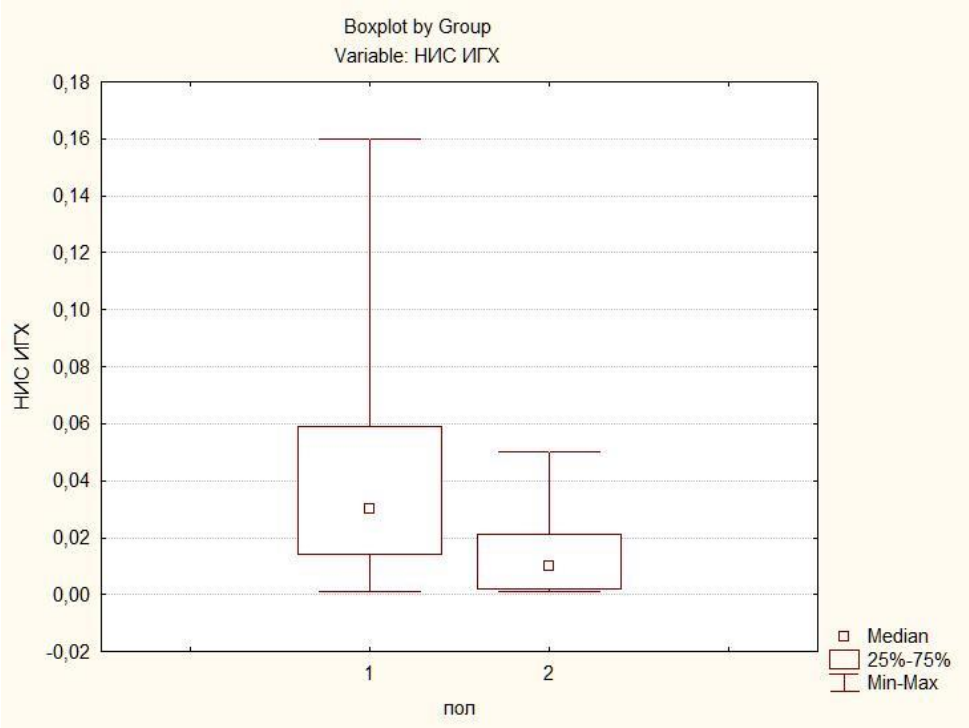
Рисунок 4.5 – Влияние стадии процесса на уровень экспрессии натрий-йодного симпортера.

4.3.3 Взаимосвязь между полом и уровнем натрий-йодного симпортера

Оценивая уровень экспрессии НИС у женщин и мужчин, мы получили достоверные различия (таблица 4.5). Средняя экспрессия НИС у мужчин равнялась 1,4%, тогда ка у женщин – 4,3% ($p<0,001$) (рисунок 4.6). Соответственно, мужской пол является фактором риска низкой экспрессии НИС и, как следствие, более низкой дифференцировки опухоли и более агрессивного ее течения.

Таблица 4.5 – Зависимость течения заболевания от пола и уровня экспрессии натрий-йодного симпортера

Исследуемые группы	Женщины		Мужчины	
	НИС менее 1%	НИС более 1%	НИС менее 1%	НИС более 1%
Группа 1	2	13	0	0
Группа 2	4	19	1	1
Группа 3	6	4	7	3
Всего	12	36	8	4
Примечание – Группа 1 – пациенты без рецидива заболевания после оперативного лечения; Группа 2 – пациенты без рецидива заболевания после операции и РЙТ; Группа 3 – пациенты с рецидивом заболевания после операции и РЙТ.				

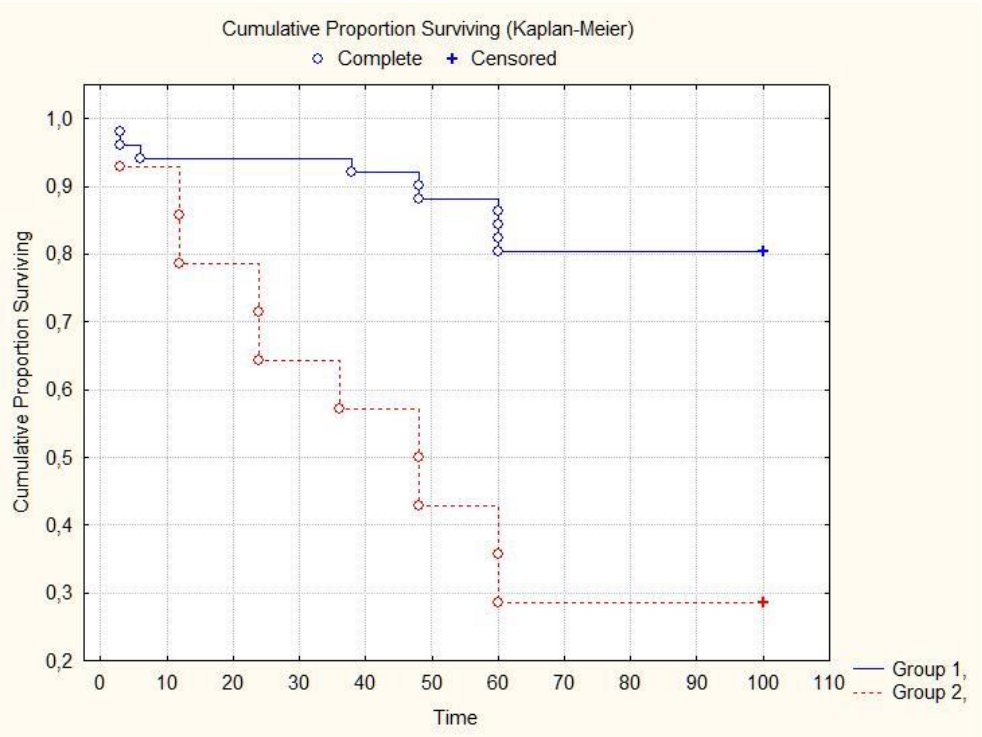


Mann – Whitney U test, p=0,001; пол 1 – женский пол; пол 2 – мужской пол.

Рисунок 4.6 – Влияние пола на уровень экспрессии натрий-йодного симпортера.

Полученные данные достоверно подтверждают, что у мужчин наблюдается более низкий уровень экспрессии НИС.

Мы проанализировали влияние пола на безрецидивную выживаемость. Для этого выполнено построение кривых Каплан-Мейера (рисунок 4.7).



Группа 1 – женщины; Группа 2 – мужчины; Time – время до рецидива, измеренное в месяцах; Cumulative proportional surviving – кумулятивная выживаемость. p<0,001.

Рисунок 4.7 – Кривые безрецидивной выживаемости в зависимости от пола.

Средний срок наступления рецидива у женщин равнялся 38,6±20,9 месяцев, тогда как у мужчин – 27,9±17,7 месяцев (p<0,001), то есть безрецидивная выживаемость у мужчин достоверно ниже, чем у женщин, что может служить еще одним объяснением более агрессивного течения папиллярного рака у пациентов мужского пола.

Мы провели анализ зависимости пола и экспрессии НИС и не получили статистически достоверной корреляции (p=0,9).

Таким образом, уровень мембранной экспрессии НИС может быть использован как маркер степени дифференцировки опухоли и агрессивности

опухолевой прогрессии. Чем ниже уровень экспрессии НИС, тем выше риск развития рецидива, и критичным является уровень экспрессии менее 1%.

Так же уровень экспрессии НИС коррелирует со стадией опухолевого процесса, тяжестью рецидива (появление отдаленных метастазов), что может быть использовано как один из маркеров дедифференцировки опухоли. Так же было показано, что уровень экспрессии НИС достоверно ниже у пациентов мужского пола, что может объяснять более агрессивное течение ВДРЩЖ у мужчин.

4.4 Влияние BRAF мутации на течение папиллярного рака щитовидной железы

В работе мы изучили встречаемость BRAF-мутации в исследуемых группах на ретроспективном материале (в парафинизированных препаратах) и проанализировали ее корреляцию с экспрессией НИС [66, 68, 92].

Как было показано ранее, BRAF мутация характерна для папиллярного рака, особенно для агрессивных его форм и не встречается при фолликулярном раке. Мы исключили на данном этапе исследования пациентов с фолликулярным раком, что не повлияло на статистическую достоверность, так как более 96% высокодифференцированного рака представлено папиллярным раком.

В группе больных, где лечение ВДРЩЖ ограничилось лишь операцией и рецидива заболевания в срок до 60 месяцев не выявлено, мутация была выявлена у 7 из 15 пациентов, что составило 46,7% (таблица 4.6).

Таким образом, в исследуемую группу вошли пациенты с минимальной стадией заболевания, не требующей проведения РЙТ, и встречаемость BRAF мутации у них оказалась наименьшей.

При анализе корреляции между встречаемостью BRAF-мутации и экспрессией НИС статистически достоверной зависимости в исследуемой группе выявлено не было.

Таблица 4.6 – Характеристика пациентов после оперативного вмешательства и без рецидива заболевания в срок наблюдения до 60 месяцев

Уровень экспрессии НИС	НИС менее 2%	НИС более 2%	НИС более 6%	ВСЕГО
BRAF положительный	1	2	4	7
BRAF отрицательный	1	3	4	8

В группе пациентов без развития рецидива после операции и РЙТ встречаемость BRAF мутации составила 56% (таблица 4.7).

Таблица 4.7 – Характеристика пациентов с радиойодтерапией после оперативного вмешательства и без выявленного рецидива заболевания в срок наблюдения до 60 месяцев

Уровень экспрессии НИС	НИС менее 2%	НИС более 2%	НИС более 6%	ВСЕГО
BRAF положительный	5	8	1	14
BRAF отрицательный	4	6	1	11

В данную группу вошли пациенты, которым ввиду распространенности процесса было показано проведение РЙТ, но развития рецидива в срок до 60 месяцев у них не наблюдалось. Мы выявили у них более частую встречаемость BRAF мутации, чем в предыдущей группе. Корреляции между выявлением BRAF-мутации и экспрессией НИС также выявлено не было.

Максимальную частоту встречаемости – 65% мы выявили в группе пациентов, которым ввиду распространенности процесса была проведена РЙТ и в сроки до 60 месяцев мы выявили рецидив заболевания (таблица 4.8).

Таблица 4.8 – Характеристика пациентов с радиойодтерапией после оперативного вмешательства и с выявленным рецидивом заболевания в срок наблюдения до 60 месяцев

Уровень экспрессии НИС	НИС менее 1%	НИС более 1%	НИС более 2%	ВСЕГО
BRAF положительный	7	2	4	13
BRAF отрицательный	6	0	1	7

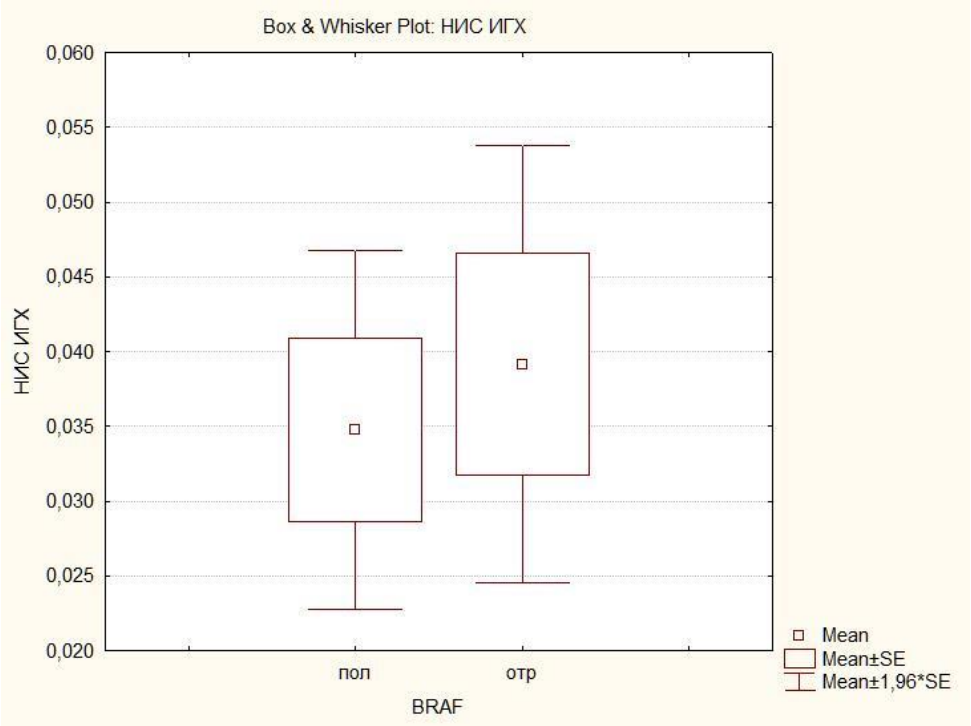
В эту группу вошли пациенты с наиболее агрессивным течением заболевания и рецидивом после операции и РЙТ. Соответственно, наибольшую встречаемость BRAF мутации мы выявили в группе пациентов с максимально агрессивным поведением опухоли. Корреляции между мутацией BRAF и экспрессией НИС в этой группе также выявлено не было.

Таким образом, при одномерном анализе нами были получены достоверные доказательства влияния BRAF мутации на агрессивность течения опухолевого процесса (p=0,0049). Однако статистически значимого влияния наличия BRAF мутации на развитие рецидива нами не получено (p=0,68).

Неожиданным оказался факт отсутствия зависимости (p=0,65) уровня экспрессии НИС от наличия BRAF мутации (рисунок 4.8).

Нами было выявлено отсутствие корреляции между BRAF мутацией и уровнем экспрессии НИС, хотя по нашим данным оба маркера могут служить признаком неблагоприятного прогноза. Полученный результат может свидетельствовать, что эти маркеры являются независимыми прогностическими признаками, так как участвуют в различных путях онкогенеза.

Таким образом, в нашем исследовании мы доказали связь между BRAF-мутацией и агрессивным течением рака щитовидной железы.



НИС ИГХ – уровень экспрессии НИС, определенный методом иммуногистохимии; BRAF отр – отсутствие BRAF мутации; BRAF пол – положительная мутация гена BRAF.

Рисунок 4.8 – Влияние BRAF мутации на уровень экспрессии НИС.

Проспективный этап

4.5 Оценка прогностической ценности метода выявления BRAF-мутации при раке щитовидной железы

На основании выполненного ретроспективного анализа влияния BRAF мутации на течение ВДРЩЖ выработан стандартизированный подход к объему оперативного вмешательства на кафедре общей хирургии ПСПбГМУ им. И.П. Павлова [14, 59]. Так в ситуации BRAF положительного статуса первичной опухоли, по согласованию с пациентом, предлагается выполнение тиреоидэктомии с центральной шейной лимфодиссекцией. В нашей работе с целью стадирования при BRAF-негативной опухоли выполнялась биопсия центральной клетчатки шеи на стороне поражения.

С целью оценки влияния мутации гена BRAF на течение папиллярного рака щитовидной железы в проспективной группе пациентов были проанализированы следующие признаки течения опухолевого процесса: мультицентричность, регионарное метастазирование и рецидив.

На основании этих данных в настоящее время принимается решение об объеме оперативного вмешательства.

4.5.1 Изучение частоты выявления BRAF-мутации в зависимости от прорастания капсулы щитовидной железы

В нашем исследовании из 205 пациентов с папиллярным раком щитовидной железы прорастание капсулы органа, то есть стадия T3, T4, встречалась у 74 больных. BRAF-мутация определялась у 50 из 74 больных, что составило 67%. В то время как у пациентов без признаков органной инвазии (стадия T1, T2), данная мутация определялась у 49 из 131 больных, что составило 37%. Сравнение частоты обнаружения прорастания капсулы щитовидной железы показало, что инвазия органной капсулы достоверно коррелирует с наличием BRAF мутации (таблица 4.9).

Таблица 4.9 – Корреляция наличия BRAF мутации и прорастания органной капсулы папиллярного рака щитовидной железы

p<0,05	BRAF положительный	BRAF отрицательный	Всего, чел.
T1-2, чел	49 (31%)	84 (69%)	131
T3-4, чел	50 (67%)	22 (26%)	74
Всего	99	106	205

Таким образом, выявление BRAF-мутации в материале ТАБ с высокой долей вероятности позволяет предположить прорастание органной капсулы или экстратиреоидное распространение.

4.5.2 Изучение частоты выявления BRAF-мутации в зависимости от наличия мультицентричности опухолевого роста

В настоящее время стандартной операцией при размере опухоли менее 2 см (опухоль размером Т1) является гемитиреоидэктомия. В тоже время в литературе неоднократно появлялись сообщения о высокой частоте мультицентричности опухолевого роста при папиллярном раке щитовидной железы, что заведомо делает такой объем операции не радикальным. С целью поиска прогностического маркера мультицентричного опухолевого роста мы выполнили попытку поиска корреляции между наличием BRAF-мутации и мультицентричным ростом.

При изучении мультицентричности опухоли, были получены статистически значимая корреляция наличия BRAF мутации и билобарного поражения щитовидной железы (таблица 4.10).

Таблица 4.10 – Корреляция наличия BRAF мутации и мультицентричности высокодифференцированного рака щитовидной железы

p=0,0001	BRAF положительный	BRAF отрицательный	Всего, чел.
Мультицентричности нет, чел	76 (76,8%)	101 (95,3%)	177
Мультицентричность есть, чел	23 (23,2%)	5 (4,7%)	28
Всего	99	106	205

Т.е. при выявлении мутации гена BRAF достоверно чаще встречается мультицентричное поражение щитовидной железы. Следует отметить, что в группу вошли также пациенты с «маленьким раком», у кого размер узлового образования не превышал 1,5 см. Данная тенденция сохраняется и для этой группы пациентов. Выполнение в случае «маленького рака» с BRAF-положительным статусом гемитиреоидэктомии (что считается возможным по ряду согласительных документов), приведет к персистенции высокодифференцированного рака щитовидной железы. В то время как выполненный первоначальный объем оперативного вмешательства будет неадекватным.

Таким образом, пациентам с выявленной BRAF-мутацией мы можем с высокой долей вероятности прогнозировать мультицентричность опухоли, что позволит планировать адекватный объем операции.

4.5.3 Изучение частоты выявления BRAF-мутации в зависимости от поражения регионарных лимфатических узлов

Наиболее дискутабельным вопросом хирургической тактики лечения папиллярного рака щитовидной железы является вопрос выполнения профилактической центральной лимфодиссекции. С одной стороны, высокая частота обнаружения метастатического поражения лимфоузлов VI группы, неопределяемое доступными до- и интраоперационными методами. С другой стороны, высокий риск операционных осложнений в виде гипопаратиреоза и парезов гортани. Эти аргументы привели к тому, что эксперты российских рекомендаций не пришли к консенсусу по данному вопросу. В нашем исследовании мы попытались выявить связь между наличием мутации гена BRAF и развитием регионарного лимфогенного метастазирования.

Из 205 пациентов регионарное метастазирование было диагностировано у 87 больных. При определении влияния наличия BRAF мутации на наличие

регионарных метастатических лимфатических узлов, так же получена статистически значимая корреляция (p=0,005) (таблица 4.11).

Таблица 4.11 – Корреляция наличия BRAF мутации и метастатического поражения регионарных лимфатических узлов

p=0,005	ЛУ без мтс, чел.	ЛУ с мтс, чел.	Всего, чел.
BRAF отрицательный	71 (67%)	35 (33%)	106
BRAF положительный	47 (48%)	52 (52%)	99
Всего	118	87	205
Примечание – ЛУ без мтс – лимфатические узлы не пораженные метастатическим процессом; ЛУ с мтс – лимфатические узлы пораженные метастатическим процессом.			

Таким образом, в случае BRAF положительного статуса первичной опухоли в более чем половине случаев (52%) следует ожидать наличия метастатических регионарных лимфатических узлов. Т.е. адекватным объемом оперативного лечения у этой группы пациентов будет считаться тиреоидэктомия с центральной лимфодиссекцией. Следует подчеркнуть, что в более половине случаев данная лимфодиссекция будет носить лечебный характер и не приведет к персистенции заболевания. В связи с отсутствием в современных клинических рекомендациях и согласительных документах четких критериев и показаний к выполнению профилактической центральной лимфодиссекции, данный вопрос всегда остаётся нерешенным. Таким образом, внедрение молекулярно-генетических маркеров, способных предсказать степень агрессивности течения ВДРЩЖ на дооперационном этапе в клиническую практику, позволит планировать объем оперативного лечения, который позволит минимизировать риск персистенции и рецидива заболевания.

Соответственно, мы выявили корреляцию между наличием мутации гена BRAF и развитием лимфогенных метастазов. Таким образом, при выявлении

BRAF-мутации мы можем с высокой долей вероятности прогнозировать поражение регионарных лимфоузлов и, соответственно, ставить показания к выполнению центральной лимфодиссекции. Это позволит, с одной стороны, стадировать процесс и планировать дальнейшую радиойодтерапию. С другой стороны, радикальное оперативное вмешательство позволит избежать рецидива заболевания.

4.5.4 Изучение частоты обнаружения BRAF-мутации в зависимости от выявления отдаленных метастазов

Изучение частоты обнаружения мутации у больных с метастазами высокодифференцированного рака ЩЖ показало, что BRAF-мутация была выявлена у всех пациентов с отдаленными метастазами (n=3), то есть в 100% случаев. Эти случаи были представлены метастазами опухоли в легкие. У пациентов без метастазов значение данного показателя было существенно ниже – 60,2% (рисунок 4.9).

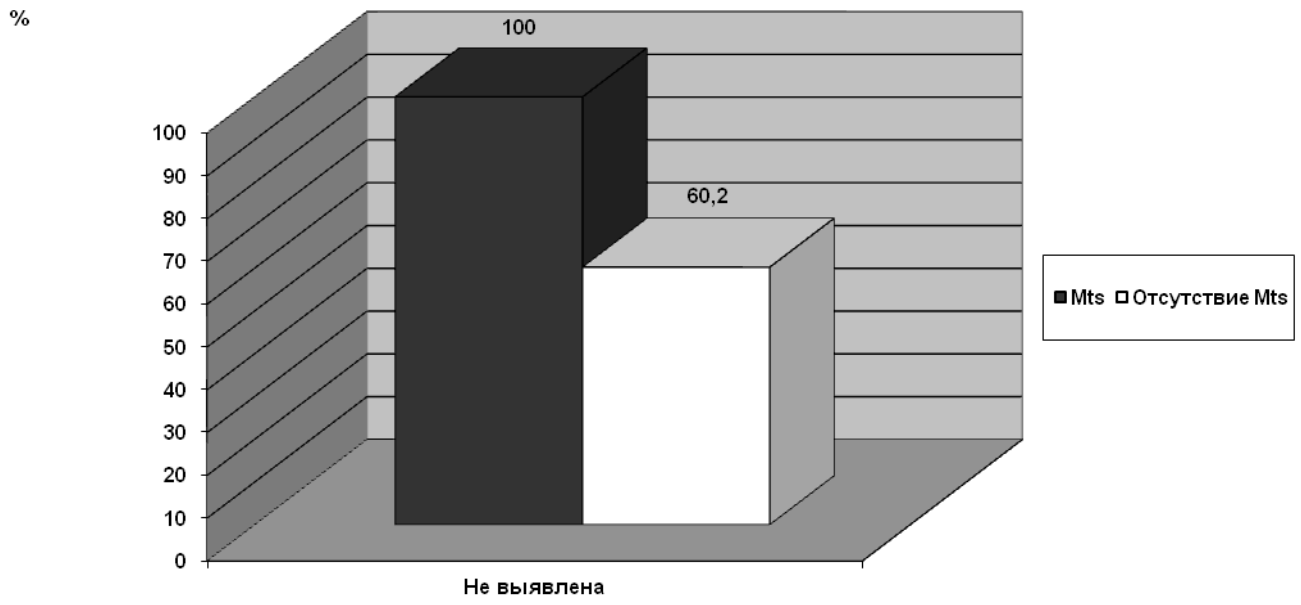


Рисунок 4.9 – Частота выявления BRAF-мутации в зависимости от выявления отдаленных метастазов.

Однако следует отметить, что выборка пациентов была незначительной, что не позволяет сделать однозначный вывод о прогностической значимости данного признака в отношении такой характеристики неблагоприятного течения исследуемого заболевания, как обнаружение гематогенных метастазов.

4.5.5 Изучение частоты выявления BRAF-мутации в зависимости от развития рецидивов

При изучении же влияния мутации гена BRAF на рецидив заболевания, в т.ч. после выполнения РЙТ, статистически значимой корреляции не получено (таблица 4.12).

Таблица 4.12 – Корреляция наличия BRAF мутации и рецидива папиллярного рака щитовидной железы

p=0,42018	Нет рецидива	Есть рецидив	Всего, чел.
BRAF отрицательный	75 (70,8%)	31 (29,2%)	106
BRAF положительный	80 (80,8%)	19 (19,2%)	99
Всего, чел.	155	50	205
Примечание – p≥0,05 – результат статистически незначим.			

Как видно из таблицы BRAF-мутация не является фактором риска для развития рецидива при папиллярном раке щитовидной железы.

Проведенное исследование возможности использования BRAF-мутации в качестве прогностического фактора при папиллярном раке щитовидной железы показало, что данный маркер является фактором риска агрессивного поведения опухоли. Агрессивность течения ВДРЩЖ, включающая такие характеристики, как органная инвазия, мультицентричность и локорегионарное метастазирование

статистически значимо коррелирует с наличием мутации гена BRAF. В тоже время данная мутация не коррелирует с развитием рецидива опухоли. То есть, необходим другой, дополнительный маркер, прогнозирующий риск рецидива опухоли. Как видно из вышеприведенных данных на рецидив заболевания и длительность безрецидивного выживания влияет уровень экспрессии НИС.

4.5.6 Изучение частоты выявления BRAF-мутации в зависимости от пола и возраста больных

По литературным данным мужской пол и возраст старше 45 лет является фактором неблагоприятного прогноза при высокодифференцированном раке щитовидной железы. В нашем исследовании мы не нашли зависимости частоты выявления мутации от возраста пациентов. Исследование распределения больных по полу в зависимости от частоты выявления BRAF-мутации показало, что данный признак выявлялся у 15 из 23 (65%) обследованных мужчин и у 84 из 182 (46%) женщин. Таким образом, частота обнаружения мутации у мужчин была достоверно ($p<0,05$) выше.

Достоверно более частая встречаемость BRAF-мутации у лиц мужского пола объясняет тот факт, что папиллярный рак щитовидной железы у мужчин имеет более агрессивное течение и менее благоприятный прогноз.

4.6 Частота встречаемости BRAF-мутации при микрокарциномах щитовидной железы

Помимо сложности дифференциальной диагностики пальпируемых узловых образований имеются определенные сложности в выявлении так называемого

«скрытого» рака щитовидной железы. К «скрытому», или «маленькому» раку относятся опухоли величиной до 10-15 мм, которые клинически не проявляются и не пальпируются [18]. Нередко такие опухоли являются случайной находкой или обнаруживаются при выявлении метастазов. По литературным данным, частота обнаружения микрокарцином щитовидной железы составляет от 18,2% до 34% от всех карцином щитовидной железы.

В нашем исследовании опухоли по своим характеристикам соответствующие «маленькому» раку были выявлены у 44 больных [58]. Частота выявления мутации гена BRAF во всех случаях микрокарцином щитовидной железы составила 68,2% (в 30 из 44 образцов). Следует отметить, что частота встречаемости BRAF мутации в нашей выборке МКЩЖ сопоставима с таковой в общем пуле папиллярного рака щитовидной железы, что опровергает имеющиеся данные о более высокой частоте встречаемости мутации среди микрокарцином щитовидной железы [287].

Мы исследовали прогностические возможности выявления BRAF-мутация в группе пациентов с микрокарциномами папиллярного строения. Для этого был проведен анализ влияния наличия BRAF-мутации на агрессивное поведение опухоли, а именно, таких характеристик как инвазия органной капсулы, мультицентричность, регионарное и отдаленное метастазирование, а также развитие рецидивов.

Прорастание капсулы щитовидной железы было выявлено у 8 пациентов с микрокарциномами щитовидной железы. При определении зависимости фактора инвазии в органную капсулу и наличия BRAF мутации получены следующие результаты: из 8 пациентов с прорастанием капсулы щитовидной железы (стадированных по результатам окончательного гистологического исследования как T3), семь пациентов имели BRAF положительный статус (87,5%).

Регионарные лимфогенные метастазы были диагностированы у 15 пациентов из 44 больных с микрокарциномами. BRAF-мутация была выявлена у 11 из 15 пациентов с регионарными метастазами (73,3%). Метастатическое поражение центральной клетчатки шеи было выявлено у 9 больных, из них в 7 случаях была

выявлена BRAF-мутация (77,8%). Из 6 пациентов с диагностированными метастазами в боковую клетчатку шеи у 4 выявлена мутация гена BRAF.

При анализе такого критерия как мультицентричность, множественные локусы папиллярного рака были выявлены в 8 случаях микрокарцином. При этом в 87,5% случаев мультицентричного роста микрокарцинома была BRAF положительной (в 7 случаях из 8).

В случаях, когда ни один из факторов агрессивного течения опухолевого процесса (капсульная инвазия, мультицентричностть, регионарное и отдаленное метастазирование) не был выявлен, то есть опухоль стадирована как T1aN0M0, BRAF-мутация определялась в 3-х случаях из 13 (23,1%). Полученные данные представлены в таблице 4.13.

Таблица 4.13 – Зависимость клинико-морфологических характеристик от BRAF-статуса опухоли при микрокарциномах щитовидной железы

Признак		Количество пациентов	Частота выявления BRAF-мутации	
			абс.	%
Мультицентричность		8	7	87,5
Инвазия капсулы	опухолевой	12	11	91,7
	органной	8	7	87,5
Метастазы	центральные лимфоузлы	9	7	77,8
	боковые лимфоузлы	6	4	66,7
Рецидив		6	6	100
T1aN0M0		13	3	23,1

В нашем исследовании из 6 случаев рецидива опухолевого роста, 6 опухолей (100%) имели BRAF-положительный статус.

Следует отметить, что в 2 случаях (33%) рецидив папиллярного рака после операции по поводу микрокарциномы щитовидной железы был на фоне первичной операции в объеме гемитиреоидэктомии. В обоих случаях первичная опухоль носила BRAF положительный статус. Таким образом, можно говорить о неадекватной первичной операции в объеме гемитиреоидэктомии при BRAF положительной микрокарциноме.

При проведении одномерного корреляционного анализа зависимости между наличием BRAF-мутации и одним из признаков агрессивного течения заболевания (мультицентричность, капсульная инвазия, регионарное метастазирование и рецидив), выявлено не было. Однако многомерный анализ показал, что при наличии BRAF-мутации мы с одинаковой степенью вероятности можем ожидать наличие у пациента одного или нескольких признаков агрессивного течения опухоли.

Полученные результаты подтверждают данные о том, что микрокарциномы щитовидной железы являются гетерогенной группой опухолей, объединённых лишь размером узлового образования, и не отражают биологической активности опухоли. Таким образом, размер опухолевого узла не может определять объем оперативного лечения.

Согласно рекомендациям ETA при размерах опухоли T1 возможно ограничиться меньшим объемом вмешательства (гемитиреоидэктомией). Однако по данным нашего исследования при выявлении BRAF-мутации в микрокарциномах мы с высокой долей вероятности можем ожидать любой из признаков агрессивного течения (инвазия органной капсулы, регионарное метастазирование, мультицентричность, рецидив). Соответственно, наличие любого из этих признаков является показанием к расширению объема операции до экстирпации щитовидной железы, а высокая вероятность регионарного метастазирования требует выполнения центральной лимфодиссекции. Таким образом, выявление BRAF-мутации является показанием к выполнению тиреоидэктомии и центральной лимфодиссекции не зависимо от размера первичной опухоли.

В целом результаты, полученные в ходе выполнения настоящей работы, свидетельствуют в пользу того, что точечная мутация гена BRAF является характерной для папиллярного рака щитовидной железы в популяции Санкт-Петербурга. Наше исследование подтвердило имеющиеся данные о том, что данная мутация не встречается при фолликулярном раке.

Результаты проведенных исследований свидетельствуют, что выявление мутации гена BRAFV600E может быть использовано в качестве дополнительного метода не только дооперационной диагностики папиллярного рака щитовидной железы. Наличие BRAF-мутации в материале ТАБ позволяет прогнозировать стадию опухолевого процесса и на дооперационном этапе индивидуально планировать объем операции.

4.7 Проспективный анализ экспрессии натрий-йодного симпортера

Проведенный первый этап исследования показал, что натрий-йодный симпортер является чувствительным маркером способности клеток к захвату радиойода. Результатом анализа внутриклеточного распределения НИС стал вывод о том, что именно мембранная экспрессия белка отражает функциональную активность, а именно – способность к захвату ионов йода. Соответственно, задачей второго этапа был поиск метода определения мембранной экспрессии НИС в материале ТАБ на дооперационном этапе. В связи с этим нами была использована методика проточной цитофлюорометрии, которая позволяет определять белок, локализующийся на мембране. В то время как внутриклеточно локализованный белок, который является функционально неактивным, не определяется. В литературе мы не нашли описания использования проточной цитофлюорометрии для выявления экспрессии НИС в материале ТАБ. В связи с этим нами была отработана методика определения НИС в материале ТАБ при высокодифференцированном раке щитовидной железы методом проточной цитофлюорометрии [66, 68, 92].

Полученные данные были проанализированы для определения прогностической ценности НИС при папиллярном раке щитовидной железы.

4.7.1 Оценка среднего значения экспрессии натрий-йодного симпортера по группам

В целом уровень экспрессии НИС, определенный методом проточной флюороцитометрии в материале ТАБ, соответствовал данным, полученным на первом этапе нашей работы при ИГХ-исследовании. При изучении экспрессии НИС в дооперационном материале высокодифференцированного рака мы так же получили снижение мембранной экспрессии НИС. Однако изучаемая когорта пациентов была разнородна по уровню экспрессии НИС, что также соответствовало данным, полученным на первом этапе нашей работы. Так, уровень экспрессии колебался от 0% до 11,6%. Для изучения корреляции уровня экспрессии НИС в первичной опухоли и риском рецидива заболевания проведен анализ среднего значения уровня экспрессии НИС по группам.

В первой группе пациентов (75 больных, чей объем лечения ограничился только оперативным вмешательством) уровень экспрессии НИС был максимальным и доходил до 11,6%, средний же уровень экспрессии составил 4,7% (таблица 4.14).

Во второй группе больных (80 пациентов без рецидива заболевания в срок наблюдения до 60 месяцев после оперативного вмешательства и радиойодтерапии) средний уровень экспрессии НИС первичной опухоли составил 4,7% (таблица 4.15).

Наибольший интерес представляет третья группа больных – 50 пациентов с рецидивом заболевания после радиойодтерапии и оперативного вмешательства в срок наблюдения до 48 месяцев. При оценке уровня экспрессии НИС первичной опухоли выявлено значительное снижение уровня экспрессии НИС в среднем до 2% по данным проточного флюороцитометрического исследования (таблица 4.16).

Таблица 4.14 – Характеристика экспрессии натрий – йодного симпортера у пациентов после оперативного вмешательства и без выявленного рецидива заболевания в срок наблюдения до 60 месяцев

Уровень экспрессии НИС	Всего
НИС менее 2%	28
НИС более 2%	22
НИС более 6%	25
ВСЕГО	75

Таблица 4.15 – Характеристика экспрессии натрий – йодного симпортера у пациентов без рецидива заболевания в срок наблюдения до 60 месяцев после оперативного вмешательства и радиойодтерапии

Уровень экспрессии НИС	Всего
НИС менее 2%	41
НИС более 2%	16
НИС более 6%	23
ВСЕГО	80

Таблица 4.16 – Характеристика экспрессии натрий – йодного симпортера у пациентов с рецидивом заболевания в срок наблюдения до 48 месяцев после оперативного вмешательства и радиойодтерапии

Уровень экспрессии НИС	Всего
НИС менее 1%	31
НИС более 1%	10
НИС более 2%	19
ВСЕГО	50

Как видно из таблицы 4.16 более 50% пациентов с рецидивом заболевания имели уровень экспрессии НИС менее 1%.

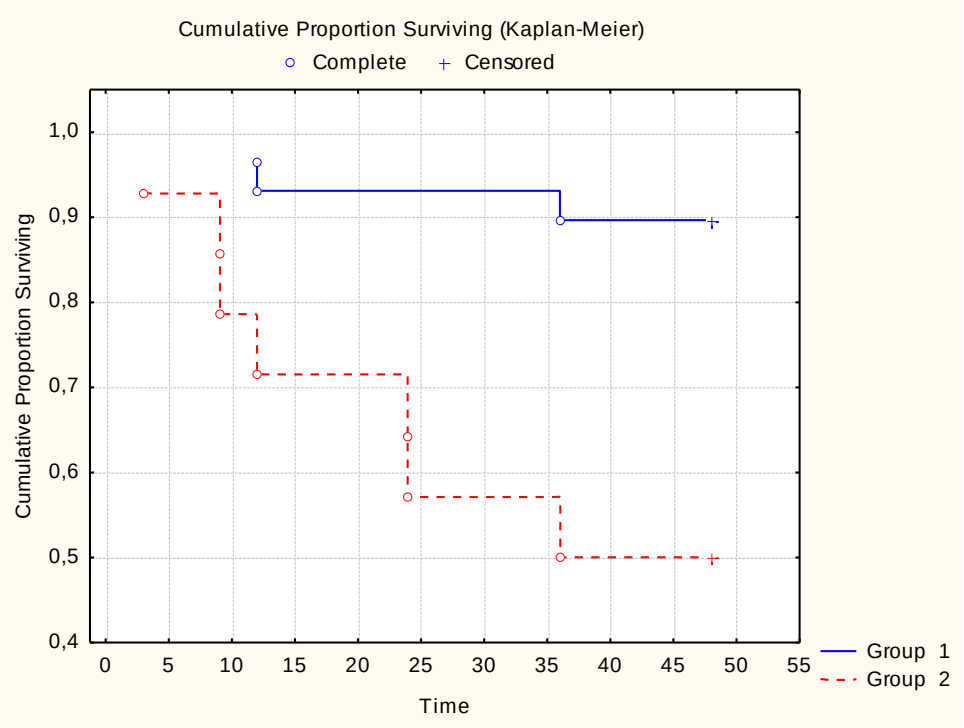
Таким образом, полученные данные согласуются с результатами первого этапа работы. Наименьший средний уровень экспрессии НИС наблюдался в группе больных с рецидивом заболевания после радиойодтерапии (p=0,0000) и критичным для развития рецидива явилось снижение уровня экспрессии НИС до 1-2% и ниже. Так, в первой группе больных, где не было рецидива и показаний к РЙТ, то есть стадия заболевания T1-2 N0 M0, уровень экспрессии НИС был максимальный и равнялся 4,7%. Во второй группе, где были показания к РЙТ, но рецидива не последовало стадия (T1-4, N0-1, M0), уровень экспрессии НИС был идентичный. В третьей группе пациентов с рецидивом после РЙТ уровень экспрессии НИС был достоверно самый низкий и в среднем не превышал 1-2%.

Проведенное исследование позволяет говорить, что чем ниже экспрессия НИС, тем более агрессивное поведение опухоли, что может свидетельствовать о дедифференцировке со снижением способности к захвату йода.

4.7.2 Влияние уровня экспрессии натрий-йодного симпортера на безрецидивную выживаемость пациентов с высокодифференцированным раком щитовидной железы

Мы проанализировали влияние уровня экспрессии НИС на безрецидивную выживаемость у пациентов с ВДРЩЖ. При построении регрессионной модели Кокса в качестве группирующего фактора было использовано значение уровня экспрессии НИС меньшее или большее 1%. Проведенный анализ показал, что длительность безрецидивной выживаемости отличается значимо в данных двух группах (p=0,00392).

При построении кривых дожития Каплан-Мейера видно, что период безрецидивного выживания пациентов с уровнем экспрессии НИС менее 1% достоверно ниже (рисунок 4.10).



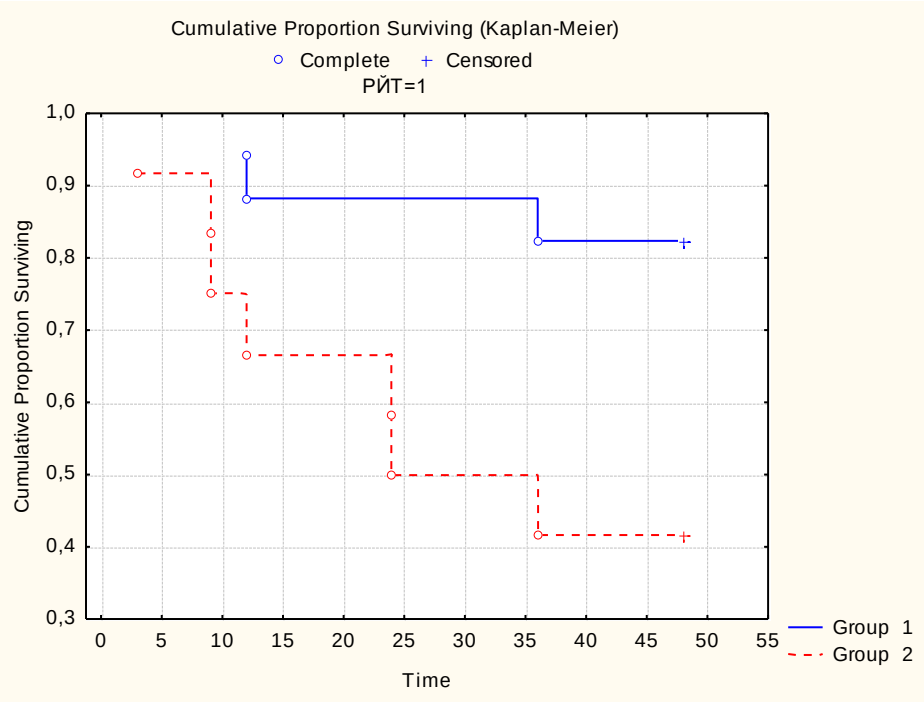
Группа 1 (синий) – натрий-йодный симпортер более 1%; Группа 2 (красный) – уровень экспрессии натрий-йодного симпортера менее или равен 1%; Time – время до рецидива, измеренное в месяцах; Cumulative proportional surviving – кумулятивная выживаемость. p=0,00392.

Рисунок 4.10 – Кривые безрецидивной выживаемости пациентов в зависимости от уровня экспрессии натрий-йодного симпортера.

Таким образом, при проспективном анализе влияния уровня экспрессии НИС на безрецидивную выживаемость в группе больных с уровнем экспрессии НИС более 1% рецидив заболевания развился лишь в 10% случаев, тогда как в группе больных с уровнем экспрессии НИС менее 1% частота рецидивов достигла 50%. Следует отметить, что все пациенты с рецидивами заболевания прошли терапию радиоактивным йодом. Таким образом, получается, что в каждом втором случае при уровне экспрессии менее 1% в первичной опухоли в срок до 48 месяцев мы можем ожидать рецидива/прогрессирования заболевания после выполнения РЙТ.

Полученные данные подтверждают, что именно мембранная экспрессия НИС отвечает за количество функционально активного симпортера. Однако, для

получения достоверного доказательства влияния экспрессии НИС на чувствительность к радиойоду, анализ безрецидивной выживаемости проведен изолированно в группах больных после получения лечебных доз I 131 в послеоперационном периоде. При составлении кривых безрецидивной выживаемости так же в двух группах больных – с уровнем экспрессии НИС менее и более 1% – результаты аналогичны, результатам у всех пациентов. Т.е. у пациентов, с уровнем экспрессии НИС первичной опухоли менее 1%, срок безрецидивной выживаемости после радиойодтерапии значительно ниже, в сравнении с пациентами так же получивших РЙТ, но чей уровень экспрессии НИС был более 1% (рисунок 4.11).



Группа 1 (синий) – натрий-йодный симпортер более 1%; Группа 2 (красный) – уровень экспрессии натрий-йодного симпортера менее или равен 1%; Time – время до рецидива, измеренное в месяцах; Cumulative proportional surviving – количество пациентов (×100), указанное в %.

Рисунок 4.11 – Кривые безрецидивной выживаемости пациентов после радиойодтерапии в зависимости от уровня экспрессии натрий-йодного симпортера.

Таким образом, можно предположить, рецидив в группе больных после радиойодтерапии и уровнем экспрессии НИС менее 1% связан со сниженной чувствительностью опухоли к радиоактивному йоду.

Т.е. при выявлении на дооперационном этапе уровня экспрессии НИС менее 1%, мы можем предположить нечувствительность опухоли к РЙТ при ее необходимости. Как правило, окончательное стадирование по TNM происходит по результатам планового гистологического исследования и, соответственно, показания для РЙТ будут поставлены в послеоперационном периоде. В случае низкой экспрессии НИС, проведение лечения радиоактивным йодом будет неэффективным и может потребовать повторного оперативного вмешательства, сопряженного с повышенным риском осложнений. Соответственно, в случае рецидива или прогрессирования у данной группы больных опухоль будет резистентна к радиойоду и хирургический метод лечения будет единственно доступным. Таким образом, с целью предотвращения рецидива и/или персистирования ВДРЩЖ, при выявлении на дооперационном этапе снижения уровня экспрессии НИС в первичной опухоли менее 1%, целесообразно выполнение профилактической центральной шейной лимфодиссекции.

4.7.3 Зависимость экспрессии натрий-йодного симпортера от стадии опухоли

В нашем исследовании мы выполнили попытку поиска корреляции между уровнем экспрессии НИС и такими факторами агрессивности течения опухоли как инвазия органной капсулы, регионарное метастазирование, мультицентричность.

Зависимости уровня экспрессии НИС от стадии Т, а именно, инвазии органной капсулы, получено не было (таблица 4.17).

Таблица 4.17 – Корреляция экспрессии Нис и инвазии органной капсулы высокодифференцированного рака щитовидной железы

p>0,05	Инвазии нет	Инвазия есть	Всего
НИС<1	68 (100%)	42 (0,00%)	110
НИС>1	63 (81,82%)	32 (18,18%)	95
Всего	131	74	205

Также нами не было получено данных о корреляции между экспрессией НИС и мультицентричностью (таблица 4.18).

Таблица 4.18 – Корреляция экспрессии Нис и мультицентричности для высокодифференцированного рака щитовидной железы

p>0,05	Мультицентричности нет	Мультицентричность есть	Всего
НИС<1	101 (100%)	9 (0,00%)	110
НИС>1	76 (81,82%)	19 (18,18%)	95
Всего	177	28	205

При анализе зависимости экспрессии НИС от наличия метастазов в регионарные лимфоузлы, также не было получено достоверной корреляции (таблица 4.19).

Таблица 4.19 – Корреляция экспрессии Нис и регионарным метастазированием для высокодифференцированного рака щитовидной железы

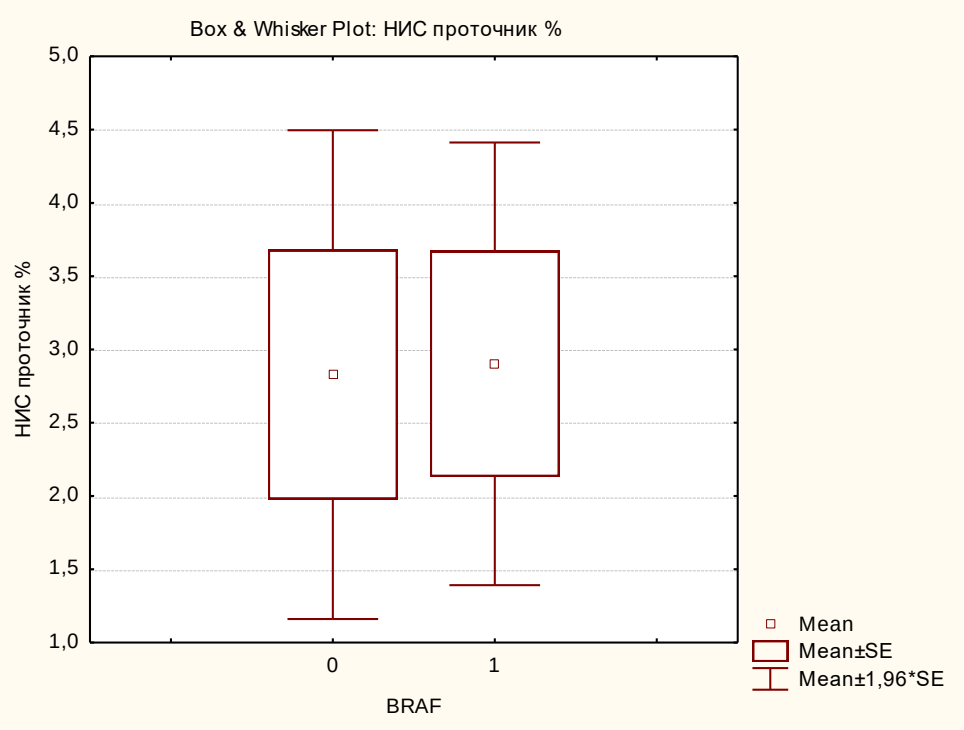
p>0,05	Мтс нет	Мтс есть	Всего
НИС<1	62 (100%)	48 (0,00%)	110
НИС>1	56 (81,82%)	39 (18,18%)	95
Всего	118	87	205

Таким образом, проведенное исследование показало, что в отличие от такого маркера как BRAF-мутация, для уровня экспрессии НИС не было выявлено зависимости от стадии опухолевого процесса, а именно, от таких признаков распространенности опухоли как инвазия органной капсулы, регионарное метастазирование, мультицентричности. Следует подчеркнуть, что именно эти характеристики опухоли учитываются при принятии решения об объеме операции. Соответственно, определяя мутацию гена BRAF, мы можем прогнозировать стадию и на основании этого планировать объем операции. Экспрессия НИС, согласно нашему исследованию, не позволяет прогнозировать стадию опухоли, однако этот маркер позволяет прогнозировать рецидив заболевания и чувствительность к РЙТ.

4.7.4 Влияние мутации гена BRAF на уровень экспрессии натрий-йодного симпортера

Следующим этапом нашей работы мы изучили влияние наличия мутации гена BRAF на уровень экспрессии НИС. При оценке количественной характеристики НИС (без разделения на группы более и менее 1%) и корреляции с наличием мутации гена BRAF статистически значимых отличий не получено (p=0,9490) (рисунок 4.12).

Аналогичные данные сохраняются, если в качестве группирующего фактора применить уровень экспрессии НИС в 1% (таблица 4.20).



НИС проточник, % – уровень экспрессии НИС, определенный методом проточной цитофлюорометрии, измеренный в %; BRAF 0 – отсутствие BRAF мутации; BRAF 1 – положительная мутация гена BRAF.

Рисунок 4.12 – Взаимосвязь между наличием BRAF мутации и уровнем экспрессии НИС.

Таблица 4.20 – Корреляция наличия BRAF мутации и уровня экспрессии натрий-йодного симпортера

p=0,44	НИС более 1%, чел.	НИС менее 1%, чел.	Всего, чел.
BRAF отрицательный	71 (67)	35 (33%)	106
BRAF положительный	74 (75%)	25 (25%)	99
Всего	145	60	205

Таким образом, вновь подтверждаются полученные нами на ретроспективном этапе данные, об отсутствии корреляции уровня экспрессии НИС на мембране клетки с наличием мутации гена BRAF. Соответственно, оба

исследуемых маркера являются независимыми прогностическими факторами неблагоприятного течения высокодифференцированного рака щитовидной железы. Данные результаты диктуют необходимость совместного определения обоих маркеров на дооперационном этапе. Помимо этого, есть еще один аргумент в пользу использования обоих маркеров. BRAF-мутация характерна только для папиллярного рака щитовидной железы, в то время как экспрессия НИС может быть использована как при папиллярном, так и при фолликулярном раке, а также при низкодифференцированных формах рака щитовидной железы.

Проведенное исследование позволяет говорить так же и о том, что при определении на дооперационном этапе низкой мембранной экспрессии НИС и, как следствие, сниженной чувствительности к РЙТ, необходимо расширять показания к выполнению профилактической центральной шейной лимфодиссекции. А учитывая тот факт, что в нашем исследовании не получено статистически достоверной корреляции наличия мутации гена BRAF и снижения уровня экспрессии НИС, то включения обоих маркёров в дооперационную лечебно-диагностическую панель является обоснованным.

На основании всего вышеизложенного, при выявлении на дооперационном этапе наличия мутации гена BRAF и/или снижения уровня экспрессии НИС менее 1% обоснованным является выполнение тиреоидэктомии с профилактической центральной лимфодиссекцией.

Глава 5
ПРОГНОСТИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ И ХИРУРГИЧЕСКАЯ ТАКТИКА ЛЕЧЕНИЯ ВЫСОКОДИФФЕРЕНЦИРОВАННОГО РАКА ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

На основании данных, полученных при изучении молекулярно-генетических маркеров, таких как BRAF-мутации, экспрессии NIS, мы выявили возможность использования их в качестве прогноза таких критериев опухолевого роста, как мультицентричность, инвазивность, метастазирование. Одним из актуальных прогностических факторов для высокодифференцированного рака является прогноз рецидива. Следует отметить, что ВДРЩЖ в целом характеризуется доброкачественным течением, низкой смертностью и 5-летняя выживаемость достигает 97%, в то время как количество рецидивов в те же сроки растет и достигает 30%. Диагностика рецидива влечет за собой повторную операцию, что сопряжено с повышенным риском осложнений и приводит к ухудшению качества жизни. В связи с этим актуальным представляется прогнозирование рецидива и его профилактика.

В наше исследование вошли 205 пациентов, опухолевая ткань которых была типирована на наличие BRAF-мутации и экспрессии NIS в материале ТАБ. Нами не было получено статистически достоверного влияния наличия мутации в гене BRAF на частоту и время развития рецидива. Тогда как уровень экспрессии НИС достоверно коррелировал с развитием рецидива. Но на развитие рецидива влияет не только биологический потенциал опухоли, но и лечение, которое получают пациенты. В связи с этим мы провели многофакторный анализ, включающий в качестве факторов, влияющих на время развития рецидива, не только исследуемые молекулярно-генетические маркеры, но и объем оперативного вмешательства.

Все пациенты были разбиты на 4 группы:

Группа	BRAF	НИС	Количество пациентов
I	отрицательный	высокий (>1%)	68
II	положительный	высокий (>1%)	77
III	отрицательный	низкий (<1%)	38
IV	положительный	низкий (<1%)	22

В зависимости от объема оперативного вмешательства мы сформировали три типа операций.

Первый тип – Гемитиреоидэктомия или тиреоидэктомия без выполнения центральной лимфодиссекции шеи.

Второй тип – тиреоидэктомия с центральной лимфодиссекцией шеи.

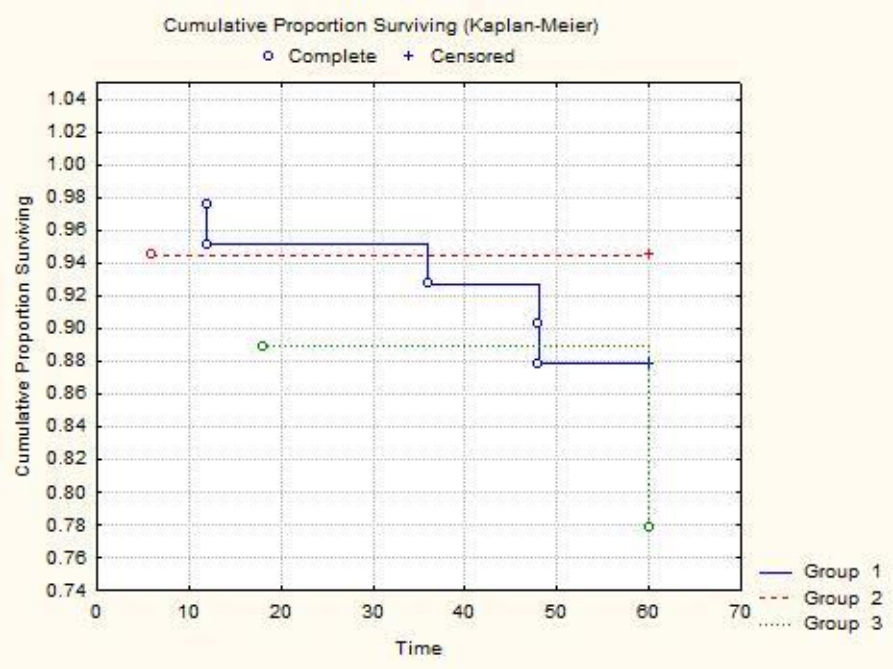
Третий тип – тиреоидэктомия с центральной и боковой лимфодиссекцией шеи.

В I группе пациентов, у которых по данным молекулярно-генетического анализа, не было выявлено мутации в гене BRAF и определялась высокая экспрессия НИС, зависимости времени наступления рецидива от объема операции выявлено не было (таблица 5.1).

Таблица 5.1 – Время развития рецидива в зависимости от объема оперативного вмешательства в I группе пациентов

Тип операции	Время развития рецидива (мес.)
Геми- или тиреоидэктомия	56
Тиреоидэктомия с ЦЛД	57
Тиреоидэктомия с ЦЛД и боковой лимфодиссекцией	55
Примечание – p>0,05.	

По данным нашего исследования – это наиболее благоприятный по биологическому потенциалу тип опухоли. Полученные данные показывают, что расширение объема операции не приводят к увеличению безрецидивного периода (рисунок 5.1). Наступление рецидива у пациентов с третим типом операции связано с распространенностью процесса. Отсутствие разницы между временем наступления рецидива при увеличении объема операции до тиреоидэктомии с ЦЛД, может свидетельствовать о том, что в случае выявления опухоли с положительным BRAF-статусом и высоким уровнем экспрессии НИС, возможно выполнение гемитиреоидэктомии или тиреоидэктомии без профилактической лимфодиссекции.



Group 1 – 1 тип операции; Group 2 – 2 тип операции; Group 3 – 3 тип операции.

Рисунок 5.1 – Кривые безрецидивной выживаемости пациентов в зависимости от объема операции у пациентов I группы.

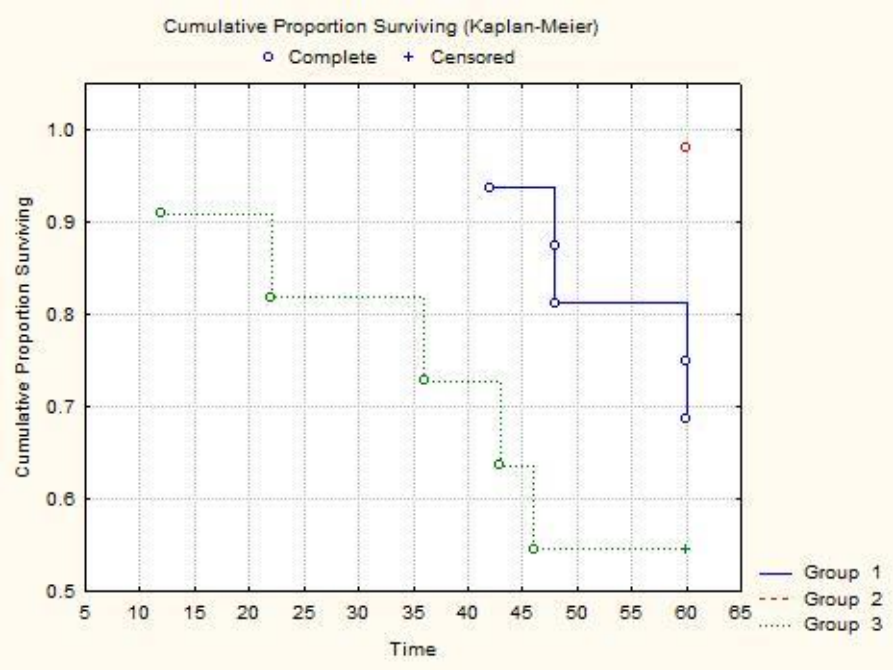
Во второй группе, пациенты которой имели положительный BRAF-статус и высокую экспрессию НИС, были получены следующие результаты (таблица 5.2).

Мы получили достоверно более быстрое время наступления рецидива у пациентов с третьим типом операции, что вполне объяснимо распространенностью процесса. Различий между первым и вторым типом операции были не достоверны,

хотя наблюдается тенденция к увелечению безрецидивной выживаемости при увелечениии объема операции до тиреоидэктомии с ЦЛД (рисунок 5.2).

Таблица 5.2 – Время развития рецидива в зависимости от объема оперативного вмешательства во II группе пациентов

Тип операции	Время развития рецидива (мес.)
Геми- или тиреоидэктомия	57
Тиреоидэктомия с ЦЛД	60
Тиреоидэктомия с ЦЛД и боковой лимфодиссекцией	47
Примечание – p=0,0005.	



Group 1 – 1 тип операции; Group 2 – 2 тип операции; Group 3 – 3 тип операции.

Рисунок 5.2 – Кривые безрецидивной выживаемости пациентов в зависимости от объема операции у пациентов II группы.

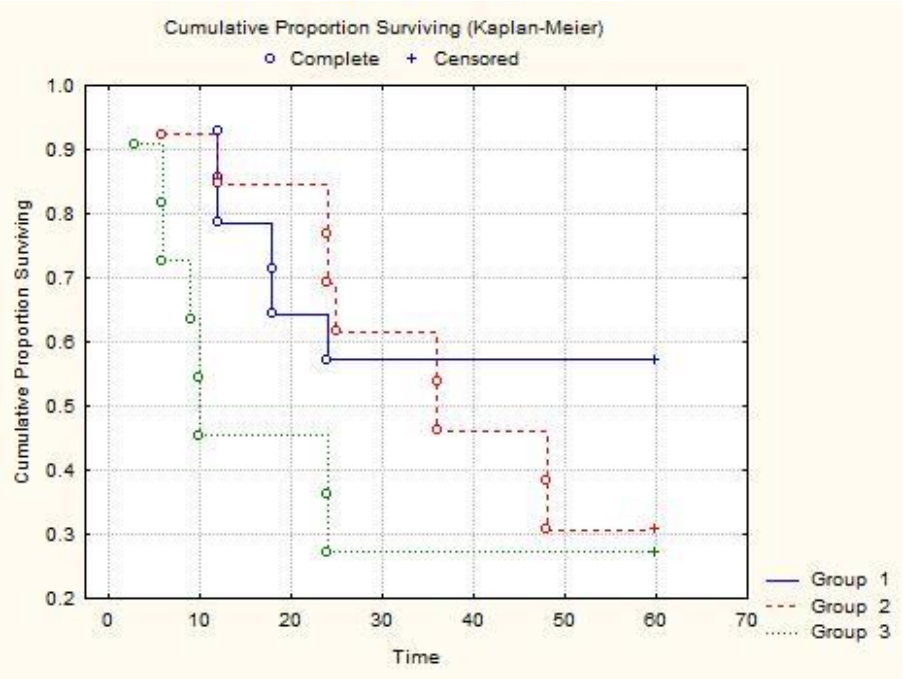
Таким образом, наиболее неблагоприятный прогноз в этой группе имеют пациенты с изначально более запущенной стадией заболевания.

У пациентов III группы с BRAF отрицательным статусом и низкой экспрессией НИС рецидив также наступал раньше при третьем типе операции (таблица 5.3).

Таблица 5.3 – Время развития рецидива в зависимости от объема оперативного вмешательства в III группе пациентов

Тип операции	Время развития рецидива (мес.)
Геми- или тиреоидэктомия	41
Тиреоидэктомия с ЦЛД	38
Тиреоидэктомия с ЦЛД и боковой лимфодиссекцией	24
Примечание – p=0,09.	

Достоверных различий во времени наступления рецидива при первом и втором типе операции выявлено не было (рисунок 5.3).



Group 1 – 1 тип операции; Group 2 – 2 тип операции; Group 3 – 3 тип операции.

Рисунок 5.3 – Кривые безрецидивной выживаемости пациентов в зависимости от объема операции у пациентов III группы.

Интересными оказались результаты у пациентов IV группы с положительным BRAF-статусом и низкой экспрессией НИС. Это наиболее агрессивный тип опухоли по данным нашего исследования (таблица 5.4).

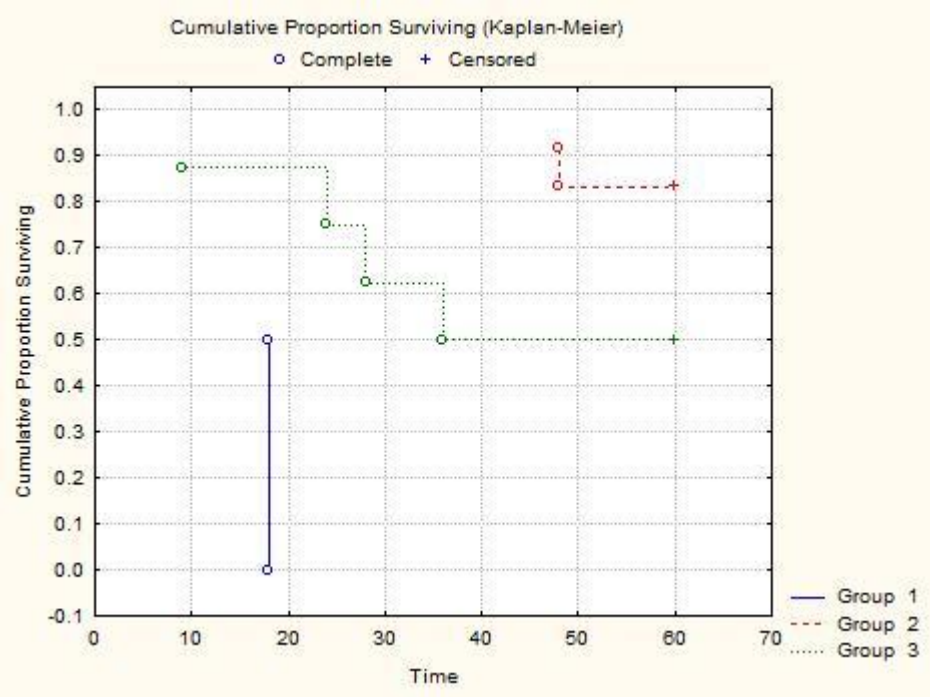
Таблица 5.4 – Время развития рецидива в зависимости от объема оперативного вмешательства в IV группе пациентов

Тип операции	Время развития рецидива (мес.)
Геми- или тиреоидэктомия	18
Тиреоидэктомия с ЦЛД	58
Тиреоидэктомия с ЦЛД и боковой лимфодиссекцией	48
Примечание – p=0,001.	

Также наблюдается достоверно более раннее наступление рецидива у пациентов с расширенной лимфодиссекцией, что объяснимо запущенностью процесса. Однако достоверно более раннее наступление рецидива выявлено у пациентов с первым типом операции, то есть выполнение геми- или тиреоидэктомии без профилактической лимфодиссекции приводит к более быстрому рецидиву. Расширение объема операции до тиреоидэктомии с ЦЛД у пациентов с биологически более агрессивной опухолью приводит к достоверно большему безрецидивному периоду (рисунок 5.4).

Таким образом, проведенное исследование показало, что изучаемые молекулярно-генетические маркеры являются индикатором агрессивного поведения опухоли и требуют изменения хирургической тактики. Определяя на дооперационном этапе в материале ТАБ наличие BRAF мутации и уровень экспрессии НИС, мы можем прогнозировать у данного пациента поведение опухоли и определять соответствующий объем операции. Так, наличие BRAF мутации и низкой экспрессии НИС, можно предположить больший потенциал

агрессивности и у данного пациента расширить объем операции до тиреоидэктомии с центральной лимфодиссекцией.



Group 1 – 1 тип операции; Group 2 – 2 тип операции; Group 3 – 3 тип операции.

Рисунок 5.4 – Кривые безрецидивной выживаемости пациентов в зависимости от объема операции у пациентов IV группы.

При выявлении в материале ТАБ высокого уровня экспрессии НИС и отсутствие мутации в гене BRAF, мы можем думать о доброкачественном течении папиллярного рака щитовидной железы и выполнить у данных пациентов гемитиреоидэктомию или тиреоидэктомию без профилактической центральной лимфодиссекции. У пациентов с отсутствием мутации в гене BRAF и низкой экспрессией НИС, а также с наличием BRAF мутации и высокой экспрессией НИС, не было получено убедительных доказательств в зависимости безрецидивного периода от объема операции. По-видимому, на биологическое поведение опухоли у этой категории больных оказывают влияние другие факторы и расширение молекулярно-генетической панели в дальнейшем позволит более точно формировать группы риска и индивидуальный план лечения.

5.1 Проспективная оценка предложенной тактики хирургического лечения у пациентов с папиллярным раком щитовидной железы

Проведенное исследование прогностических возможностей исследуемых молекулярно-генетических маркеров показало, что их можно использовать при определении тактики лечения пациентов с папиллярным раком щитовидной железы. В исследовании было доказано, что в зависимости от уровня экспрессии НИС и выявления мутации в гене BRAF можно определять тактику хирургического лечения папиллярного рака щитовидной железы. Так, с 2009 года в алгоритм обследования пациентов с папиллярным раком щитовидной железы входило определение мутации гена BRAF и уровня экспрессии НИС в материале ТАБ из опухолевого узла в щитовидной железе и/или лимфоузле. В зависимости от результата молекулярно-генетического тестирования выбиралась тактика хирургического лечения. При выявлении в пунктате из опухоли на этапе дооперационного обследования наличия мутации BRAF и низкой экспрессии НИС, выбиралась по согласованию с пациентом более агрессивная хирургическая тактика, а именно, выполнение тиреоидэктомии с центральной лимфодиссекцией. В случае, если опухоль имела отрицательный BRAF статус и высокий уровень экспрессии НИС, выполнялась гемитиреоидэктомия или тиреоидэктомия без профилактической ЦЛД. Таким образом, критерием рандомизации был принят год выполнения операции. Критериями включения в исследуемые группы явились такие признаки, как отсутствие клинически и инструментально определяемых на дооперационном этапе признаков регионарного и отдаленного метастазирования, инвазии органной капсулы. При клинически определяемых регионарных метастазах объем операции определялся распространенностью процесса и расширялся до тиреоидэктомии с центральной и боковой лимфодиссекцией. Эти пациенты не были включены в исследуемые группы.

В исследуемую группу вошли пациенты с папиллярным раком щитовидной железы, оперированных в клинике с 2009 по 2016 гг. с применением

предложенного алгоритма обследования и хирургической тактики. В качестве группы сравнения вошли пациенты с папиллярным раком щитовидной железы, оперированных в клинике с 2007 по 2009 гг., где объем хирургического вмешательства определялся Российскими и Европейскими Клиническими рекомендациями. У всех пациентов был определен BRAF статус опухоли и уровень экспрессии НИС.

BRAF-позитивный статус имели 80 пациентов, из них 18 больных были оперированы до 2009 года, 62 – после 2009 года с применением выработанной тактики лечения.

При выполнении гемитиреоидэктомии или тиреоидэктомии без ЦЛД у пациентов с BRAF-позитивной опухолью без признаков прорастания органной капсулы и неопределяемыми лимфоузлами на этапе дооперационного обследования, мы получили рецидив заболевания у 7 из 18 пациентов.

С 2009 года мы выполняли тиреоидэктомию с ЦЛД пациентам с BRAF позитивным статусом и опухолью папиллярного строения без признаков органной инвазии и регионарного или отдаленного метастазирования на дооперационном этапе. Из 62 пациентов исследуемой группы мы получили развитие рецидива в трех случаях в сроки до 60 месяцев (таблица 5.5).

Таблица 5.5 – Зависимость рецидива от сочетания факторов BRAF и объем операции

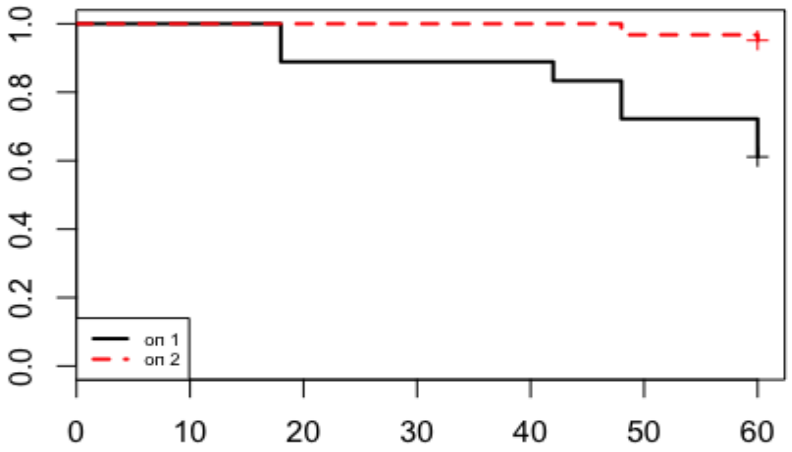
Тип операции	Отсутствие рецидива	Рецидив
1 – Геми или ТЭ без ЦЛД	11	7
2 – ТЭ с ЦЛД	59	3
Примечание – p=0,0005.		

Таким образом, при объеме операции 1(геми или тиреоидэктомия без ЦЛД) вероятность рецидива при BRAF в два раза больше, а при операции 2 (тиреоидэктомия с ЦЛД), наоборот при BRAF позитивном статусе намного меньше.

Мы проанализировали время безрецидивной выживаемости у пациентов с BRAF позитивным статусом в зависимости от выбранной хирургической тактики. Нами был получен результат, согласно которому время безрецидивной выживаемости достоверно длиннее у пациентов, оперированных после 2009 г. согласно выработанной хирургической тактике в объеме тиреоидэктомии с ЦЛД (таблица 5.6, рисунок 5.5).

Таблица 5.6 – Характеристики безрецидивной выживаемости у пациентов исследуемых групп.

Исследуемые группы	Кол-во	Рецидив	Время до развития рецидива	Стандартное отклонение
Пациенты, оперированные до 2009 г. (Gr=1)	18	7	53,00	3,17
Пациенты, оперированные после 2009 г. (Gr=2)	62	3	59,61	0,27
Примечание – p=0,00005.				



Оп1 – группа больных, оперированных до 2009 года;

Оп2 – группа больных, оперированных после 2009 года.

Рисунок 5.5 – Кривые безрецидивной выживаемости у пациентов исследуемых групп.

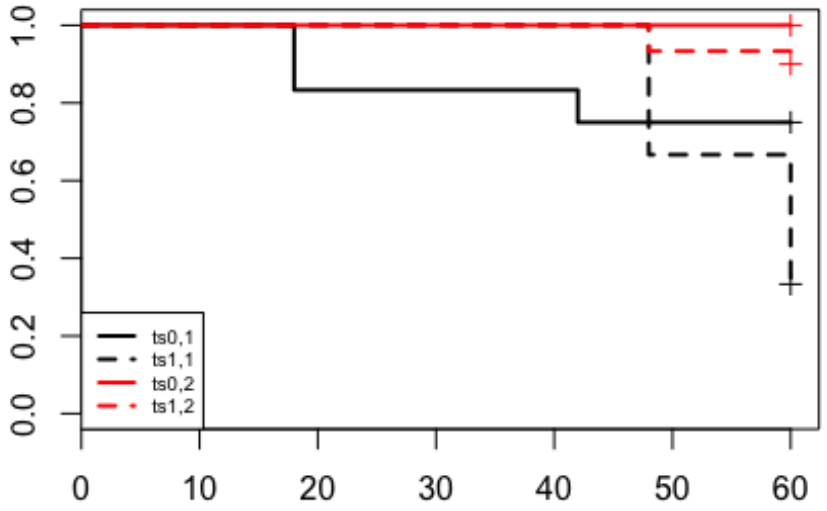
Как видно из вышеприведенных графиков у пациентов с BRAFпозитивным статусом опухоли, выполнение органосохраняющей операции или тиреоидэктомии без ЦЛД приводит к достоверно более частому и более быстрому наступлению рецидива. Выполнение же у этой категории больных (BRAFположительный статус) операции в объеме тиреоидэктомии с ЦЛД достоверно снижает риск развития рецидива.

В настоящее время одним из определяющих факторов в принятии решения о хирургической тактике лечения папиллярного рака щитовидной железы является размер опухоли и органная инвазия, то есть стадия Т по классификации TNM. Мы проанализировали взаимосвязь стадии опухолевого процесса и объем операции у BRAF позитивных пациентов в исследуемых группах. Так как стадия Т1-2 согласно последним Рекомендациям позволяет выполнять органосохраняющую операцию и не делать ЦЛД, мы объединили пациентов в две группы в зависимости от размера опухоли или капсульной инвазии – это Т1,2 и Т3,4. Мы проанализировали, имеет значение характеристика Т для выбор хирургического вмешательства при BRAF позитивном статусе (таблица 5.7, рисунок 5.6).

Таблица 5.7 – Характеристики выживаемости при BRAF позитивном статусе в зависимости от стадии Т и хирургической тактики

Группы	Общее количество	Рецидив	Время развития рецидива	Стандартное отклонение
Gr=0	12	3	51,5	4,55
Gr=1	6	4	56,0	2,31
Gr=2	32	0	60,0	0,00
Gr=3	30	3	59,2	0,55
Примечание – p=0,00004; Gr=0 – стадия Т1-2 и объем операции (геми)тиреоидэктомия без ЦЛД; Gr=1 – стадия Т3-4 и объем операции (геми)тиреоидэктомия без ЦЛД; Gr=2 – стадия Т1-2 и объем операции тиреоидэктомия с ЦЛД; Gr=3 – стадия Т3-4 и объем операции тиреоидэктомия с ЦЛД.				

Как видно из таблицы, при любой стадии Т у BRAF позитивной опухоли более оправдана предложенная нами хирургическая тактика, а именно, выполнение тиреоидэктомии с ЦЛД.



Ts0,1 – стадия Т1,2, тип операции 1; Ts1,1 – стадия Т3,4, тип операции 1;
Ts0,2 – стадия Т1,2, тип операции 2; Ts1,2 – стадия Т3,4, тип операции 2.

Рисунок 5.6 – Кривые дожития пациентов с BRAF позитивным статусом в зависимости от стадии Т и объема операции.

Таким образом, при выявлении на дооперационном этапе мутации гена BRAF, мы рекомендуем выполнение тиреоидэктомии с ЦЛД вне зависимости от размера опухоли и наличия капсульной инвазии.

5.2 Тактика лечения пациентов папиллярным раком щитовидной железы при BRAF негативных опухолях

В случае, когда на дооперационном этапе был выявлен BRAF негативный статус опухоли, ведущую роль в прогнозировании рецидива имеет выявление экспрессии НИС. Как было показано выше, чем выше экспрессия НИС, тем выше

дифференцировка опухоли, тем более благоприятный прогноз и ниже риск рецидива. Мы проанализировали, влияет ли увеличение объема операции у BRAF негативных опухолей на прогноз и риск рецидива. Мы исключили из исследуемой группы пациентов с запущенной стадией заболевания, а именно, пациентов с поражением боковых шейных лимфоузлов (стадия N2), где объем операции определялся распространенностью процесса и расширялся до тиреоидэктомии с центральной и боковой шейной лимфодиссекцией.

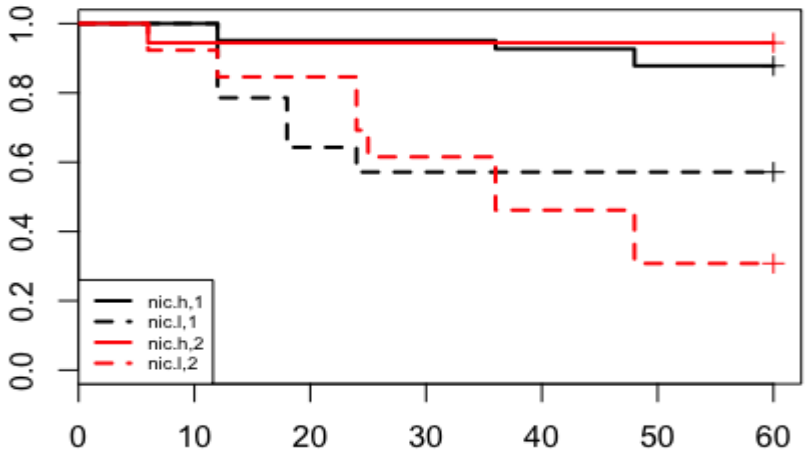
По нашим данным пациенты с высоким уровнем экспрессии НИС имеют низкий риск развития рецидива и объем операции не оказывает влияния на развитие рецидива (таблица 5.8).

Таблица 5.8 – Характеристики выживаемости при BRAF негативном статусе в зависимости от уровня экспрессии НИС и объема операции

Группы	Общее количество	Рецидив	Безрецидивная выживаемость	Стандартное отклонение
Gr=0	**41**	**5**	**56,49**	**1,72**
Gr=1	14	6	41,14	5,87
Gr=2	18	1	57,00	2,92
Gr=3	13	9	38,38	5,10
Примечание – Gr=0 – высокая экспрессия НИС и объем операции (геми)тиреоидэктомия без ЦЛД; Gr=1 – низкая экспрессия НИС и объем операции (геми)тиреоидэктомия без ЦЛД; Gr=2 – высокая экспрессия НИС и объем операции тиреоидэктомия с ЦЛД; Gr=3 – низкая экспрессия НИС и объем операции тиреоидэктомия с ЦЛД.				

Как видно из таблицы, у пациентов с низкой экспрессией НИС(Gr1и3) более частое и быстрое наступление рецидива. Развитие рецидива и время его наступления не зависит от объема операции. То есть, увеличив объем операции у BRAF негативных пациентов с низкой экспрессией НИС до тиреоидэктомии с ЦЛД, мы не уменьшаем риск рецидива.

На рисунке 5.7 достоверно показано, что кривые безрецидивной выживаемости достоверно ниже у пациентов с низкой экспрессией НИС и объем операции не влияет на время безрецидивного дожития.



BRAF 0

nic h,1- нис высокий, 1 тип операции; nic l,1 – нис низкий, 1 тип операции; nic h,2 – нис высокий, 2 тип операции; nic l,2 – нис низкий, 2 тип операции

Рисунок 5.7 – Кривые безрецидивной выживаемости при BRAF негативном статусе в зависимости от уровня экспрессии НИС и объема операции.

Таким образом, увеличение объема операции до тиреоидэктомии с ЦЛД у BRAF негативных опухолей с высоким уровнем экспрессии НИС при отсутствии клинических и инструментальных признаков регионарного и отдаленного метастазирования, не улучшает результатов лечения, а именно, не уменьшает риск рецидива. Эти результаты позволяют рекомендовать у этой группы пациентов выполнение органосохраняющих операций.

У пациентов с низкой экспрессией НИС наиболее высокий риск развития рецидива и в случае BRAF негативного статуса опухоли, расширение объема операции не улучшает результаты. Это дает основание предположить, что для лечения этих пациентов необходимо искать другие пути воздействия на опухоль, а именно, фармакологическое воздействие, возможно, с целью повышения чувствительности клетки к радиойодтерапии, то есть воздействуя на НИС.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Рак щитовидной железы самая часто встречающаяся опухоль эндокринной системы. Особенности гистогенеза органа определяют во многом многообразие опухолей щитовидной железы и, как следствие, сложности в диагностике. Многообразие морфологических форм определяет различное клиническое проявление, течение, прогноз и исходы. Современная онкотироидология основывается на данных дооперационной цитологической диагностики и клинико-лабораторных характеристиках, таких как размер опухоли и признаки органной инвазии, наличие регионарного и отдаленного метастазирования для определения тактики лечения. В то же время современное представление об онкогенезе диктует новые требования, а именно, поиск онкомаркеров поломки на молекулярном, генетическом уровне, определяющих индивидуальный прогноз опухолевой прогрессии и, как следствие, лечебную тактику.

Понимание неоднородности наиболее часто встречающейся группы опухолей, объединенной названием высокодифференцированный рак щитовидной железы, позволило нам предпринять попытку поиска маркеров, которые бы могли быть использованы в диагностике, с одной стороны. Так как не смотря на хорошие возможности цитологического метода в диагностике папиллярного рака, есть группа пациентов с непределенными результатами ТАБ, достигающая 30%, которым операция выполняется с диагностической целью. В ряде случаев это приводит к тому, что выполняется неадекватный объем операции при диагностике рака на этапе гистологического исследования, что влечет за собой выполнение повторных операций с повышенным риском хирургических осложнений, эмоциональной нагрузки для пациента и экономически не целесообразно.

С другой стороны, даже группа хорошо диагностируемых папиллярных карцином представляется крайне разнообразной при гистологической верификации, клиническому течению и исходам. То есть поиск прогностических критериев высокодифференцированного рака щитовидной железы на основании

понимания онкогенеза данной опухоли, позволит определять индивидуальный прогноз и, как следствие, планировать индивидуальную лечебную и, в частности, хирургическую, тактику.

В связи с этим целью работы явилось улучшение результатов лечения высокодифференцированного рака щитовидной железы за счет совершенствования хирургической тактики лечения путем улучшения диагностики и прогнозирования течения заболевания.

Первая часть работы заключалась в поиске диагностических маркеров высокодифференцированного рака щитовидной железы. Мы изучили диагностическую значимость таких белков как галектин-3, HBME-1 и спорадической мутации в гене BRAF. Первым этапом выполнена ретроспективная оценка исследуемых маркеров в гистологическом материале. Затем отработана методика и проведено исследование данных онкомаркеров в материале ТАБ.

Вторая часть работы посвящена изучению прогностических возможностей определения BRAF мутации и экспрессии НИС в дооперационном материале. На основании выполненного исследования выработана хирургическая тактика, позволившая улучшить результаты лечения высокодифференцированного рака щитовидной железы.

Для определения значения выявления белка галектин-3 в диагностике ВДРЩЖ мы проанализировали результаты обследования и лечения 106 пациентов с узловыми образованиями щитовидной железы. Средний возраст больных составил 46,6±12,1 лет, от 17 до 77 лет, большинство пациентов были женщины.

На проспективном этапе было проведено исследование экспрессии галектин-3 методом ИГХ у 44 пациентов с УОЩЖ. При гисологическом исследовании операционного материала было диагностировано: папиллярный рак ЩЖ у 21 больного, фолликулярный рак ЩЖ у двух пациентов, фолликулярная аденома – у 10 больных, у 8 пациентов – коллоидный зоб, у двух – онкоцитарная аденома, у одного – атипичная фолликулярная аденома.

При ИГХ исследовании, из 23 пациентов с высокодифференцированным раком ЩЖ экспрессия галектина-3 наблюдалась у всех. Из 21 пациента с доброкачественными изменениями экспрессия галектина-3 наблюдалась лишь у 5 пациентов.

Оценивая диагностическую значимость определения экспрессии галектина-3, мы получили следующие результаты. Чувствительность метода в выявлении рака щитовидной железы составила 100% (доверительный интервал 86-100%). Несмотря на то, что среди больных с доброкачественными заболеваниями ЩЖ у 5 пациентов экспрессия галектина-3 все же выявлялась, показатели специфичности метода и диагностической точности оказались также высоки и равны 76,2% (ДИ 61,5-76,2%) и 88,6%, соответственно.

Высокие показатели диагностической точности явились основанием для разработки дооперационых методов определения экспрессии галектина-3. Мы использовали методику проточной флюороцитометрии для определения экспрессии галектина-3 в материале ТАБ, усовершенствовав ее таким образом, что стало возможно сохранение, накопление и транспортировка материала в течение 10 суток с момента его получения (Удостоверение на рационализаторское предложение «Способ определения экспрессии галектина-3» № 1 528 от 28 мая 2009 года.). Исследование было выполнено у 66 пациентов, оперированных в клинике общей хирургии. Средний возраст больных составил 46,9±11,9 лет, среди них преобладали женщины.

На основании результатов цитологического исследования пациенты были разделены на подгруппы: «папиллярный рак ЩЖ», фолликулярная опухоль или «неопределенный» ответ цитологического исследования, доброкачественные изменения.

Практически половине пациентов (47%) по результатам цитологического исследования поставлен диагноз фолликулярной неоплазии, что послужило основанием к выполнению оперативного вмешательства. Диагноз рака по данным окончательного гистологического исследования был подтвержден у двух больных. Соответственно, остальные пациенты были оперированы

с диагностической целью. У пациентов с цитологическим ответом папиллярный рак, диагноз не подтвердился в двух случаях.

При оценке диагностической значимости цитологического исследования были получены следующие результаты. Чувствительность составила 100% (ДИ 90,4-100%), специфичность – 16,2% (ДИ 8,7-16,2%), диагностическая точность – 53%, предсказательная ценность положительного и отрицательного тестов – 48,3% (ДИ 43,7-48,3%) и 100% (ДИ 53,5-100%) соответственно. Метод обладает высокой чувствительностью, но низкой специфичностью, что обусловлено ограничением метода в выявлении фолликулярного рака и зачастую сложностями в диагностике папиллярного рака, что приводит к большой доле неопределенных результатов, диктующих показания к выполнению операции с диагностической целью.

Для повышения специфичности дооперационной диагностики мы исследовали экспрессию онкомаркера галектин-3 в пунктате из узловых образований щитовидной железы.

Экспрессия галектина-3 была выявлена в 93,1% (27 пациентов) с ВДРЩЖ, лишь в двух случаях рака экспрессия оказалась не высокой. Среди 37 больных с доброкачественными изменениями экспрессия галектина-3 была выявлена лишь у трех больных, тогда как у 33 (89,2%) пациентов она была низкой.

Таким образом, мы получили следующие показатели диагностической значимости ПФЦ метода определения экспрессии галектина-3 в выявлении высокодифференцированного рака ЩЖ: чувствительность метода составила 93,1% (ДИ 80,5-98,7%), специфичность – 89,2% (ДИ 79,3-93,6%), диагностическая точность – 90,9%, предсказательная ценность положительного и отрицательного теста – 87,1% (ДИ 75,3-92,3%) и 94,3% (83,8-98,9%) соответственно.

В 49 случаях мы выполнили срочное гистологическое исследование для уточнения диагноза, из них в 9 случаях ответ был неопределенным, а в одном случае – ложноположительным. Диагноз рака не подтвердился при плановом гистологическом исследовании. Чувствительность срочного гистологического исследования составила 100% (ДИ 84,8-100%), специфичность

– 78,6% (ДИ 67,2-78,6%), диагностическая точность – 87,8%, предсказательная ценность положительного и отрицательного тестов – 77,8% (ДИ 66-77,8%) и 100% (ДИ 85,5-100%) соответственно.

Таким образом, метод срочного гистологического исследования не позволяет повысить специфичность диагностики рака.

Мы сравнили показатели диагностической значимости методов цитологического исследования, срочного гистологического исследования и ПФЦ метода определения экспрессии галектина-3.

Анализ полученных данных показывает, что чувствительность всех исследуемых методов дифференциальной диагностики достоверно не отличается и достигает 100%. В тоже время показатели специфичности имеют достоверные различия и максимальны у ПФЦ метода выявления экспрессии галектина-3. Особенно актуальным применения данной методики видится у пациентов с неопределенными заключениями цитологического исследования. Достоверно более высоким показатель оказался для проточного флюороцитометрического определения экспрессии галектина-3 в пунктате из узла ЩЖ и достигает 93,1%. Диагностическая точность в выявлении рака наиболее высока также для проточного иммуноцитометрического исследования и равна 93,5%. Полученные данные позволили нам рекомендовать применение метода ПФЦ определения экспрессии галектина-3 в алгоритме дооперационной диагностики высокодифференцированного рака ЩЖ, что особенно актуально при «неопределенных» и подозрительных на рак результатах цитологического исследования ТАБ.

Проведенное исследование показало, что определение экспрессии галектина-3 может быть дополнительным, уточняющим маркером в диагностике ВДРЩЖ. Соответственно, используя в рутинной практике более простой, экономически выгодный и обладающий высокой чувствительностью метод цитологического исследования, мы можем в диагностически сложных случаях, а именно, неопределенных или подозрительных на рак цитологических заключениях, использовать более специфичный метод определения экспрессии

галектина-3 методом ПФЦ. Выявление повышенной экспрессии данного онкомаркера позволит на дооперационном этапе в ряде случаев поставить диагноз рака и сделать показание к оперативному вмешательству более обоснованным.

Таким образом, ПФЦ определение экспрессии галектина-3 в материале ТАБ из узлового образования щитовидной железы, обладая высокой диагностической точностью, может быть включен в алгоритм дооперационного диагностики пациентов с неопределенными результатами цитологического исследования (BETHESDA III, IV, V) с целью стратификации рисков.

Нами было выполнено исследование диагностической значимости уровня экспрессии HBME-1 в дооперационной диагностике высокодифференцированного рака щитовидной железы у 65 пациентов.

В группе пациентов с папиллярным раком диагностическая точность использования в диагностической панели HBME1 составила 67,5%, что достоверно ниже диагностической точности цитологического метода (95%). Таким образом, использование дополнительных методов в диагностике папиллярного рака щитовидной железы не имеет преимуществ перед использованием цитологического метода.

В группе пациентов с неопределёнными цитологическими заключениями и послеоперационными доброкачественными заключениями гистологического исследования была выявлена экспрессия HBME-1 в 14 случаях. При сравнении эффективности использования в панели биомаркера HBME-1 в диагностике рака в группе пациентов с неопределенным заключением ТАБ, статистически значимых результатов в сравнении с цитологическим методом не получено.

Таким образом, включение в диагностическую панель такого биомаркера как HBME-1, в отличие от галектин-3, не улучшает диагностическую точность метода цитологического исследования в диагностике рака щитовидной железы на дооперационном этапе.

Мы также исследовали возможность использования наличия BRAF мутации в диагностике папиллярного рака щитовидной железы. Для этого мы сначала провели ретроспективную оценку частоты встречаемости мутации гена BRAF

у 107 пациентов, оперированных в клинике общей хирургии с диагнозом высокодифференцированный рак щитовидной железы – папиллярный и фолликулярный. В нашей работе было подтверждено, что мутация в гене BRAF встречается при папиллярном раке и никогда не наблюдается в случае фолликулярного рака. Частота встречаемости данной мутации равна 62,4%, что согласуется с данными многочисленных метаанализов.

Исследуемая когорта пациентов папиллярным раком была представлена двумя вариантами – классическим и фолликулярным. При сравнении частоты встречаемости BRAF мутации в различных вариантах мы получили достоверные различия. В случаях классического варианта мутация была выявлена в 70,2%, в то время как при фолликулярном варианте – 46,4%. Полученные данные о генетической неоднородности папиллярного рака щитовидной железы объясняют его морфологическую неоднородность, представленную большим количеством вариантов строения, что влечет за собой различия в клиническом проявлении, динамике роста, метастазирования и, соответственно, прогнозе.

Для определения диагностической значимости BRAF мутации у 210 пациентов с узловыми образованиями щитовидной железы в материале ТАБ выполнялось выявление BRAFмутации метом ПЦР.

В случаях коллоидного зоба, подтвержденного гистологическим исследованием, мутация гена BRAF не была выявлена ни в одном случае.

В группе пациентов с цитологическим диагнозом папиллярный рак по данным гистологического исследования диагноз рака не подтвердился в пяти случаях и ни у кого из них мутации выявлено не было. У 139 пациента с гистологически подтвержденным папиллярным раком мутация гена BRAF была выявлена в 83 случаях (59,7%).

В группе пациентов с неопределенным заключением ТАБ мутантный тип гена BRAF не определялся ни в одном из образцов, взятых у пациентов с фолликулярной аденомой и узловым коллоидным зобом по данным окончательного гистологического исследования. Интересным оказался факт, что в пяти образцах, в которых был обнаружен мутантный тип гена BRAF, по данным

гистологии верифицирован папиллярный рак. Соответственно, если в материале ТАБ мы выявляем BRAF мутацию, то мы можем считать, что диагностировали папиллярный рак.

По данным нашего исследования наличие в образцах мутантного типа гена BRAF с вероятностью 100% свидетельствует о злокачественности процесса.

Таким образом, на основании данных нашего исследования мы можем утверждать, что мутация V600E гена BRAF является диагностическим маркером папиллярного рака щитовидной железы. Выявление мутации гена BRAFV600E в пункционном материале может быть использовано в качестве дополнительного метода дооперационной диагностики папиллярного рака щитовидной железы. Внедрение метода определения BRAF-мутации в дооперационную диагностику позволит не только улучшить дооперационную диагностику папиллярного рака щитовидной железы, но и выполнить радикальный объем оперативного вмешательства с соблюдением онкологических принципов.

Помимо диагностических возможностей, мы оценили прогностические характеристики BRAF-мутации, а также экспрессии НИС.

Для оценки возможности использования в качестве прогностического маркера НИС мы исследовали особенности экспрессии натрий-йодного симпортера в клетках щитовидной железы в норме и при различных патологических состояниях. Для проведения работы мы выбрали иммунногистохимический метод исследования, который позволил не только оценить уровень экспрессии, но и изучить характер распределения изучаемого белка внутри клетки.

Исследование белка НИС методом ИГХ показало, что данный белок локализуется на клеточной мембране, тогда как концентрация его в местах синтеза незначительна. Количество клеток с мембранной экспрессией НИС достигало в среднем 50%.

Мы изучили экспрессию НИС при состояниях, требующих повышенного поступления йода в клетку, в частности, при гиперпродукции тиреоидных гормонов – болезни Грейвса и узловом токсическом зобе. Подтверждением

повышенного захвата йода клеткой служат данные сцинтиграфии, где наблюдается повышенное накопление радиофармпрепарата. При исследовании захвата радиойода, определяется повышенный захват РФП. ИГХ-исследование экспрессии НИС при состояниях, сопровождающихся тиреотоксикозом, показало, что количество клеток с мембранной экспрессией симпортера было повышено, по сравнению с нормально функционирующей тканью и достигало уровня 75%.

При изучении экспрессии НИС в холодных узлах по данным сцинтиграфии, уровень мембранной экспрессии НИС в этих опухолях был снижен. Количество клеток с мембранной экспрессией не превышало 15-20%.

Таким образом, нами была выявлена закономерность – чем выше мембранная экспрессия НИС, тем выше способность тиреоцитов к захвату йода, что подтверждается данными сцинтиграфии. В случае заболеваний, сопровождающихся тиреотоксикозом и требующих повышенного потребления клетками йода для синтеза гормонов, что подтверждается данными сцинтиграфии и захвата йода, имеет место повышенная мембранная экспрессия НИС. Тогда как в «холодных» узлах наблюдается снижение мембранной экспрессии НИС. Полученные данные позволили нам предположить, что по степени мембранной экспрессии НИС мы можем прогнозировать чувствительность опухолевой ткани к захвату радиойода. Интересные данные были получены при изучении экспрессии НИС внутри опухолевой клетки. Синтез белка оставался на прежнем уровне, однако уменьшалось количество встроенного в мембрану белка и он накапливался во внутренних компартментах клетки. Функциональную нагрузку может нести белок, находящийся на клеточной мембране, поэтому оценку экспрессии НИС правомерно считать только по мембранной экспрессии. При количественной оценке мембранной экспрессии в клетках различных опухолей мы получили большой разброс данных, что соответствует представлению о том, что различные опухоли имеют разную чувствительность к радиойоду.

Мы провели ретроспективный анализ на основании гистологических препаратов 60 пациентов с папиллярным раком, исследовав экспрессию НИС и методом ИГХ и выявление BRAFмутации методом ПЦР. В нашем исследовании

получены данные, что количество клеток с мембранной экспрессией НИС при высокодифференцированном раке щитовидной железы снижено. При изучении мембранной экспрессии НИС в клетках ВДРЩЖ было показано, что количество клеток с мембранной экспрессией не превышало 10%. Мы сравнили экспрессию НИС у пациентов, которым не показано лечение радиойодом, пациентов после РЙТ без рецидива и пациентов с рецидивом заболевания после РЙТ. В группе пациентов с наиболее доброкачественным течением заболевания экспрессия НИС оказалась максимальной – 6,7%. У пациентов, получивших РЙТ и без развития рецидива в сроки до 60 месяцев наблюдалась сниженная экспрессия НИС – 2,8%. Пациенты, у которых имел место рецидив заболевания в сроки до 60 месяцев после РЙТ, имели максимально низкую экспрессию НИС – 1%. Полученные данные позволили сделать вывод, что чем ниже мембранная экспрессия НИС, тем ниже способность опухоли к захвату радиойода и тем более агрессивна опухоль. То есть снижение мембранной экспрессии НИС может служить одним из маркеров дедифференцировки опухоли.

В группе пациентов с рецидивом заболевания уровень экспрессии НИС был менее 1% более чем у половины больных.

Критичным для развития рецидива явилось снижение уровня экспрессии НИС до 1%. Сравнительный анализ показал, что одной из причин рецидива является неэффективность РЙТ, что объясняется неспособностью опухолевый клеток к захвату радиойода, что подтверждается данными о снижении экспрессии НИС.

Этот вывод подтверждается данными о том, что у пациентов с уровнем экспрессии НИС менее 1% в первичной опухоли риск рецидива заболевания в срок до 60 месяцев достоверно выше. Обусловлено данное явление резистентностью опухоли к РЙТ.

При анализе вероятности развития отдаленных метастазов выявилось, что чем ниже уровень экспрессии НИС в первичной опухоли щитовидной железы, тем вероятность отдаленного метастазирования, даже после выполнения РЙТ,

выше. Данный факт является еще одним подтверждением того, что снижение экспрессии НИС является маркером дедифференцировки опухоли.

Таким образом, снижение экспрессии НИС может служить прогностическим маркером агрессивности течения опухолевого процесса.

При анализе экспрессии НИС в зависимости от пола было показано, что у мужчин наблюдается более низкая экспрессия НИС, что может быть одной из причин более агрессивного течения ВДРЩЖ у мужчин.

Далее на ретроспективном материале мы исследовали прогностическую значимость мутации гена BRAF для папиллярного рака щитовидной железы. Как и в случае с экспрессией НИС мы получили максимальные изменения, а именно, максимальная частота выявления мутации, была в группе пациентов с рецидивом заболевания после РЙТ и доходила до 65%. При послеоперационном стадировании заболевания эти пациенты оказались с наиболее запущенной стадией заболевания. В группе больных, которые подверглись только хирургическому лечению и в сроки до 60 месяцев не имели развития рецидива, встречаемость BRAF мутации была достоверно ниже и составила 46,7%. Таким образом, BRAF позитивный статус опухоли является предиктом агрессивного течения опухолевого процесса.

Неожиданным оказался факт, что статистически значимого влияния наличия BRAF мутации на рецидив получено не было (p=0,68). Отсюда следует, что для прогнозирования рецидива необходим другой маркер.

Интересным оказался тот факт, что мы не выявили зависимости уровня экспрессии НИС от наличия BRAF мутации (p=0,65). Отсутствие корреляции между двумя исследуемыми маркерами может говорить о том, что они участвуют в различных независимых молекулярных путях онкогенеза.

Следующей задачей нашей работы было проспективное исследование прогностической значимости мутации гена BRAF для папиллярного рака щитовидной железы.

Мы предприняли попытку найти зависимость между BRAFстатусом опухоли и развитием таких признаков опухолевой распространенности,

как мультицентричность, регионарное и отдаленное метастазирование, прорастание капсулы органа, а также рецидив заболевания. На основании этих данных в настоящее время принимается решение об объеме оперативного вмешательства.

Стадирование на дооперационном этапе имеет ряд затруднений, а именно, стадия Т определяется, как правило, на основании размера опухоли, а данные об экстратиреоидной инвазии мы получаем на интра- или послеоперационном этапе. Прогнозирование данного признака на дооперационном этапе позволит планировать радикальную операцию. Анализ частоты встречаемости BRAF-мутации у пациентов с наличием капсульной инвазии и экстратиреоидного распространения и без, показал достоверные различия ($p<0,05$).

Таким образом, определение BRAF-мутации в материале ТАБ на дооперационном этапе с высокой долей вероятности позволяет предположить прорастание органной капсулы.

По литературным данным ряда мультицентричность в случае папиллярного рака достигает 60-80%. Всвязи с этим высказывалась позиция при которой предлагалось выпонять тиреоидэктомию не зависимо от размера опухолевого узла. В то же время в последнее время наблюдается отчетливая тенденция к выполнению органосохраняющих операций при дооперационном стадировании как T1-2N0M0. Однако в случае мультицентричности опухолевого роста такой объем операции будет носить заведомо не радикальный характер. Мы проанализировали BRAF мутации у пациентов с мультицентричным ростом опухоли. Сравнение частоты обнаружения мультицентричности опухоли продемонстрировало достоверные различия ($p<0,05$) по данному признаку между группами пациентов с обнаруженной BRAF-мутацией и без нее.

Таким образом, пациентам с выявленной BRAF-мутацией мы можем с высокой долей вероятности прогнозировать мультицентричность опухоли, что позволит планировать адекватный объем операции, а именно, тиреоидэктомию не зависимо от размера опухоли.

Наиболее сложным остается вопрос о показаниях к центральной лимфодиссекции – выполнять ее профилактически всем в случае доказанного папиллярного рака или только при клинически выявляемых лимфоузлах центральной группы. С одной стороны, литературные данные о встречаемости микрометастазов в лимфоузлы VI группы, достигающаей по некоторым данным 80%, склоняет в пользу выполнения профилактической лимфодиссекции. С другой стороны, растет частота специфических осложнений – гипопаратиреоза и парез гортани. Всвязи с этим актуальным становится поиск прогностических маркеров метастазирования в лимфоузлы центральной группы для того, чтобы все лимфодиссекции носили лечебный характер, дискутабельным вопросом хирургической тактики лечения папиллярного рака щитовидной железы является вопрос выполнения профилактической центральной лимфодиссекции. По данным нашего исследования в случае BRAF положительного статуса первичной опухоли в более чем половине случаев (52%) следует ожидать наличия метастатических регионарных лимфатических узлов. Это позволило нам утверждать, что пациентам с BRAF положительным статусом опухоли показано выполнение ЦЛД и в более половины случаев данная лимфодиссекция будет носить лечебный характер, и не приведет к персистенции заболевания.

Таким образом, при выявлении BRAF-мутации мы можем с высокой долей вероятности прогнозировать поражение регионарных лимфоузлов и, соответственно, ставить показания к выполнению центральной лимфодиссекции. Это позволит, с одной стороны, стадировать процесс и планировать дальнейшую радиойодтерапию. С другой стороны, радикальное оперативное вмешательство позволит избежать рецидива заболевания.

Изучение частоты обнаружения мутации у больных с метастазами высокодифференцированного рака ЩЖ показало, что BRAF-мутация была выявлена у всех пациентов с отдаленными метастазами. Однако следует отметить, что выборка пациентов была незначительной, что не позволяет сделать однозначный вывод о прогностической значимости данного признака

в отношении такой характеристики неблагоприятного течения исследуемого заболевания, как обнаружение гематогенных метастазов.

В проспективном исследовании нами также выявлено не было статистически значимой зависимости между возрастом, развитием рецидива и наличием BRAF-мутации, тогда как для мужского пола выявлена достоверно более частая встречаемость. Таким образом, проведенное исследование показало, что исследуемые признаки опухолевой распространенности, как метастазирование, мультицентричность, органная инвазия имеют прямую корреляционную зависимость с наличием BRAF-мутации. Соответственно, в нашем исследовании подтверждается предположение, что BRAF-мутация является фактором неблагоприятного прогноза при папиллярном раке щитовидной железы.

В последнее время наметилась тенденция к расширению показаний к выполнению гемитиреоидэктомии, а именно, стадия T1-2N0M0 позволяет выполнить гемитиреоидэктомию, В тоже время стадирование на дооперационном этапе имеет ряд ограничений, в частности, опухоль, клинически диагностируемая как микрокарцинома, может по данным гистологии иметь признаки экстратиреоидной инвазии и микрометастазирования. Рекомендуемый обьем операции в данном случае будет носить заведомо нерадикальный характер. Мы проанализировали результаты лечения 44 больных с опухолями по своим характеристикам соответствующие «маленькому» раку. Мы исследовали прогностические возможности выявления BRAF-мутация в группе пациентов с микрокарциномами папиллярного строения. При проведении многомерного анализа было показано, что при выявлении BRAF-мутации мы с одинаковой степенью вероятности можем прогнозировать инвазию органной капсулы, регионарное метастазирование, мультицентричность. Соответственно, наличие любого из этих признаков является показанием к расширению объема операции до тиреоидэктомии, а высокая вероятность регионарного метастазирования требует выполнения центральной лимфодиссекции.

Полученные результаты подтверждают данные о том, что микрокарциномы щитовидной железы являются гетерогенной группой опухолей, объединённых лишь размером узлового образования, и не отражают биологического потенциала опухоли.

Помимо BRAF мутации, мы исследовали прогностические возможности определения экспрессии НИС в дооперационном материале. Полученные на ретроспективном этапе данные понимания локализации и функции симпортера позволили нам применить метод проточной цитофлюорометрии, которая позволяет определять только тот белок, который локализуется на мембране. Тогда как внутриклеточную фракцию белка, которая не несет функциональной нагрузки, не определяется. Для этого нами была отработана методика определения НИС в пунктате из узла щитовидной железы методом проточной флюороцитометрии.

На проспективном этапе, изучая экспрессию НИС методом ПФЦ мы так же получили снижение мембранной экспрессии. Разброс данных об уровне экспрессии НИС у пациентов с одинаковым диагнозом папиллярная карцинома, был достаточно большим, что также соответствовало данным, полученным ИГХ методом. Для изучения корреляции уровня экспрессии НИС в первичной опухоли и риском рецидива заболевания проведен анализ среднего значения уровня экспрессии НИС по группам.

В первой группе пациентов (75 больных, чей объем лечения ограничился только оперативным вмешательством) средний уровень экспрессии НИС был максимальным и составил 4,7%. Во второй группе больных (80 пациентов без рецидива заболевания в срок наблюдения до 60 месяцев после оперативного вмешательства и радиойодтерапии) средний уровень экспрессии НИС первичной опухоли составил 4,7%. В третьей группе больных (50 пациентов с рецидивом заболевания после радиойодтерапии и оперативного вмешательства в срок наблюдения до 48 месяцев) уровень экспрессии НИС был снижен до 2%.

На ретроспективном этапе работы были получены данные, подтверждающие ведущую роль НИС в способности клетки к захвату йода.

Соответственно, при снижении НИС уменьшается способность клетки к захвату йода и, как следствие, развивается радиойодрезистентность, что приводит к рецидиву заболевания даже после проведения РЙТ. С целью определения прогностической значимости в развитии рецидива снижения уровня НИС была проанализирована зависимость уровня снижения НИС (определенного методом проточной цитофлюорометрии) с риском развития рецидива заболевания после выполнения РЙТ. Анализ влияния уровня экспрессии НИС на безрецидивную выживаемость в группе больных с экспрессией НИС более 1-2% показал, что рецидив заболевания развился лишь в 10% случаев. Тогда как в группе больных с уровнем экспрессии НИС менее 1% частота рецидивов достигла 50%. При этом все пациенты с рецидивами заболевания прошли терапию радиоактивным йодом. Таким образом, получается, что в половине случаев при уровне экспрессии менее 1-2% в первичной опухоли в срок до 48 месяцев мы можем ожидать рецидива заболевания после выполнения РЙТ.

Таким образом, низкая экспрессия НИС предполагает нечувствительность опухоли к лечению радиойодом. Предполагая возможную радиойодрезистентность опухоли на этапе первичной диагностики, мы можем планировать заведомо более расширенный обьем операции, так как проведение лечения радиоактивным йодом будет неэффективным и может потребовать повторного оперативного вмешательства, сопряженного с повышенным риском осложнений. Соответственно, в случае рецидива или прогрессирования у данной группы больных, опухоль будет не чувствительна к радиойоду. Таким образом, с целью предотвращения рецидива и/или персистирования ВДРЩЖ, при выявлении на дооперационном этапе снижения уровня экспрессии НИС в первичной опухоли менее 1-2%, целесообразно выполнение профилактической центральной шейной лимфодиссекции.

Изучая прогностические возможности таких маркеров, как экспрессия НИС и наличие BRAF мутации, мы получили разноречивые данные о влиянии их на развитие рецидива. Нами не было получено статистически достоверного влияния наличия мутации в гене BRAF на частоту и время развития рецидива. Тогда как

уровень экспрессии НИС достоверно коррелировал с развитием рецидива. Но на развитие рецидива влияет не только биологический потенциал опухоли, но и лечение, которое получают пациенты. В связи с этим мы провели многофакторный анализ, включающий в качестве факторов, влияющих на время развития рецидива, не только исследуемые молекулярно-генетические маркеры, но и объем оперативного вмешательства.

Проведенный анализ достоверно показал, что у пациентов с BRAF позитивным статусом и низкой экспрессией НИС увеличение объема операции до тиреоидэктомии с ЦЛД приводит к снижению количества рецидивов и увеличению времени безрецидивной выживаемости. Та же тенденция наблюдается у пациентов с BRAF позитивным статусом и высокой экспрессией НИС. В случае же отсутствия мутации в гене BRAF и высокой экспрессии НИС расширение объема операции до тиреоидэктомии с ЦЛД не уменьшает безрецидивную выживаемость.

Проведенное исследование показало, что изучаемые молекулярно-генетические маркеры являются индикатором агрессивного поведения опухоли и требуют изменения хирургической тактики. Определяя на дооперационном этапе в материале ТАБ наличие BRAF мутации и уровень экспрессии НИС, мы можем прогнозировать у данного пациента поведение опухоли и определять соответствующий объем операции. Так, наличие BRAF мутации и низкой экспрессии НИС, можно предположить больший потенциал агрессивности и у данного пациента расширить объем операции до тиреоидэктомии с центральной лимфодиссекцией. При выявлении в материале ТАБ высокого уровня экспрессии НИС и отсутствие мутации в гене BRAF, мы можем думать о доброкачественном течении папиллярного рака щитовидной железы и выполнить у данных пациентов органосохраняющую операцию. У пациентов с отсутствием мутации в гене BRAF и низкой экспрессией НИС, а также с наличием BRAF мутации и высокой экспрессией НИС, не было получено убедительных доказательств в зависимости безрецидивного периода от объема операции. По-видимому, на биологическое поведение опухоли у этой категории больных оказывают влияние другие факторы

и расширение молекулярно-генетической панели в дальнейшем позволит более точно формировать группы риска и индивидуальный план лечения.

Таким образом, на основании проведенного исследования нами была разработана следующя хирургическая тактика: при выявлении BRAF положительной первичной опухоли адекватным объемом первичного оперативного лечения является тиреоидэктомия с центральной лимфодиссекцией; а так же при выявлении снижения уровня экспрессии НИС менее 1% в первичной опухоли обоснованным будет выполнение профилактической центральной лимфодиссекции.

Полученные результаты позволили выполнить проспективное исследование по изучению результатов использования выработанной тактики лечения высокодифференцированного рака щитовидной железы. Мы провели сравнительный анализ результатов лечения пациентов, оперированных до 2009 года и после, когда стала применяться предложенная тактика лечения.

Критерием разделения был принят год выполнения операции. Критериями включения в исследуемые группы явились такие признаки, как отсутствие клинически и инструментально определяемых на дооперационном этапе признаков регионарного и отдаленного метастазирования, инвазии органной капсулы. При клинически определяемых регионарных метастазах объем операции определялся распространенностью процесса и расширялся до тиреоидэктомии с центральной и боковой лимфодиссекцией. Эти пациенты не были включены в исследуемые группы.

BRAF-позитивный статус имели 80 пациентов, из них 18 больных были оперированы до 2009 года, 62 – после 2009 года с применением выработанной тактики лечения.

В группе пациентов, оперированных до 2009 года, при выполнении гемитиреоидэктомии или тиреоидэктомии без ЦЛД у пациентов с BRAF-позитивной опухолью без признаков прорастания органной капсулы и неопределяемыми лимфоузлами на этапе дооперационного обследования, мы получили рецидив заболевания у 7 из 18 пациентов.

С 2009 года у пациентов с BRAF позитивным статусом опухоли мы выполняли тиреоидэктомию с ЦЛД. Из 62 пациентов исследуемой группы мы получили развитие рецидива в трех случаях в сроки до 60 месяцев.

Таким образом, выработанная хирургическая тактика позволила достоверно снизить количество рецидивов и увеличить время безрецидивной выживаемости у пациентов с BRAF положительным статусом опухоли.

Интересным оказался факт, что время безрецидивной выживаемости не зависит от стадии Т, то есть при выявлении BRAF мутации в опухоли, показано выполнение тиреоидэктомии с ЦЛД вне зависимости от размера опухоли и наличия капсульной инвазии.

В случае, когда на дооперационном этапе был выявлен BRAF негативный статус опухоли, ведущую роль в прогнозировании рецидива имеет выявление экспрессии НИС. Как было показано выше, чем выше экспрессия НИС, тем выше дифференцировка опухоли, тем более благоприятный прогноз и ниже риск рецидива. Мы проанализировали, влияет ли увеличение объема операции у BRAF негативных опухолей на прогноз и риск развития рецидива.

Нами были получены следующие данные. Увеличение объема операции до тиреоидэктомии с ЦЛД у пациентов с BRAF негативным статусом и неопределяемыми метастазами и органной инвазией на дооперационном этапе в случае высокой экспрессии НИС не уменьшает риск рецидива. То есть у этой категории больных можно обоснованно рекомендовать выполнение органосохраняющих операций. В случае же низкой экспрессии НИС при негативном BRAF статусе расширение объема операции не приводит к снижению риска рецидива.

Таким образом, в случае выявления на дооперационном этапе BRAF мутации мы можем рекомендовать выполнение тиреоидэктомии с ЦЛД.

Увеличение объема операции до тиреоидэктомии с ЦЛД у BRAF негативных опухолей с высоким уровнем экспрессии НИС при отсутствии клинических и инструментальных признаков регионарного и отдаленного метастазирования, не улучшает результатов лечения, а именно, не уменьшает

риск рецидива. Эти результаты позволяют рекомендовать у этой группы пациентов выполнение органосохраняющих операций.

У пациентов с низкой экспрессией НИС наиболее высокий риск развития рецидива и в случае BRAF негативного статуса опухоли, расширение объема операции не улучшает результаты. Это дает основание предположить, что для лечения этих пациентов необходимо искать другие пути воздействия на опухоль, а именно, фармакологическое воздействие, возможно, с целью повышения чувствительности клетки к радиойодтерапии, то есть, воздействуя на НИС.

Таким образом, проведенное исследование позволило утверждать, что группа пациентов с высокодифференцированным раком щитовидной железы является гетерогенной группой, как клинически, так и на молекулярно-генетическом уровне. Такая неоднородность ведет к различиям в клинических проявлениях и прогнозе, что, соответственно, диктует необходимость подбирать индивидуальный подход к хирургической и лечебной тактике. Такой подход требует наличие высокотехнологичных методик и опыта, что возможно в условиях специализированных отделений.

Внедрение в алгоритм дооперационного обследования молекулярно-генетической панели позволяет осуществить индивидуальный подход к выбору хирургической тактики в рамках принятых стандартов и улучшить результаты лечения высокодифференцированного рака щитовидной железы.

ВЫВОДЫ

1. У пациентов с цитологическим заключением Bethesda IV выявление повышенного уровня экспрессии галектин-3 методом ПФЦ позволяет прогнозировать высокодифференцированный рак щитовидной железы за счет повышения диагностической точности метода до 90,9%. Определение экспрессии HBME-1 не улучшает диагностическую ценность метода.
2. Выявление BRAF мутации позволяет со 100% вероятностью утверждать, что диагностирован папиллярный рак и может быть использовано в качестве дополнительного диагностического дооперационного маркера папиллярного рака щитовидной железы. Мутация гена BRAF V600E не встречается при фолликулярном раке и доброкачественных образованиях.
3. Уровень экспрессии НИС определяет способность клетки к захвату йода и позволяет прогнозировать радиойодчувствительность.
4. Определение уровня снижения экспрессии НИС может быть использовано в качестве прогностического маркера рецидива после проведения радиойодтерапии, и для количественной оценки мембранной экспрессии НИС на дооперационном этапе целесообразно использование проточной флуороцитометрии.
5. Выявление мутации гена BRAF и снижения уровня экспрессии НИС ниже 1% являются независимыми факторами риска агрессивного течения высокодифференцированного рака щитовидной железы, что обусловливает необходимость определения наличия мутации гена BRAF и уровня экспрессии НИС с целью формирования на дооперационном этапе группы высокого риска рецидива/персистенции заболевания.
6. Адекватным объемом оперативного вмешательства для пациентов с BRAF положительным статусом первичной опухоли или снижением уровня экспрессии НИС ниже 1% является тиреоидэктомия с профилактической центральной лимфодиссекцией.
7. При высокой экспрессии НИС и BRAF негативном статусе опухоли рекомендовано выполнение органосохраняющей операции при отсутствии экстратиреоидного распространения и метастазирования.

8. Применение в лечебной тактике предложенной молекулярно-генетической панели позволяет улучшить результаты лечения за счет увеличения безрецидивной выживаемости.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. При получении заключения цитологического исследования Bethesda IV считаем обоснованным ориентироваться на данные экспрессии галектина-3 в аспирате, полученном при ТАБ. Выявление повышения экспрессии галектина-3 позволяет делать более обоснованным хирургическое вмешательство, выполняемое в этой группе пациентов с диагностической целью.
2. Всем пациентам с ВДРЩЖ показано дооперационное определение уровня экспрессии НИС и наличия мутации гена BRAF
3. При планировании объема хирургической лечения ВДРЩЖ необходимо основываться на результатах дооперационных методов обследования и принятых стандартах лечения и для индивидуализации лечения использовать предложенную молекулярно-генетическую панель.
4. При выявлении мутации гена BRAF и снижения уровня экспрессии НИС менее 1% адекватным объемом оперативного вмешательства будет выполнение тиреоидэктомии с профилактической центральной лимфодиссекцией.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АРЩЖ – анапластический рак щитовидной железы
ВДРЩЖ – высокодифференцированный рак щитовидной железы
ДРЩЖ – дифференцированный рак щитовидной железы
ИГХ – иммуногистохимическое исследование
ИЦХ – иммуноцитохимическое исследование
МК – микрокарцинома
НИС – натрий-йодный симпортер
НРЩЖ – низкодифференцированный рак щитовидной железы
ПК – протеинкиназа
ПР – папиллярный рак
ПРЩЖ – папиллярный рак щитовидной железы
ПЦР – полимеразная цепная реакция
ПФЦ – проточная флюороцитометрия
ПЭТ – позитронно-эмиссионная томография с 18F-фтордезоксиглюкозой
РЙ – радиоактивный йод
РЙТ – радиойодтерапия
РФП – радиофармпрепарат
РЩЖ – рак щитовидной железы
ТАБ – тонкоигольная аспирационная биопсия
УЗИ – ультразвуковое исследование
ФРЩЖ – фолликулярный рак щитовидной железы
АТА – Американская Тиреодологическая Ассоциация

ЕТА – Европейская Тиреодологическая Ассоциация

МАРК – митоген-активируемые протеинкиназные каскады

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Агеев, И.С. Доброкачественные образования и рак щитовидной железы / И.С. Агеев, А.У. Минкин, В.И. Копылов // Вопр. онкологии. – 1987. – № 2. – С. 106-107.
2. Акатова, Е.А. Диагностика рака щитовидной железы малого диаметра / Е.А. Акатова, Я.Н. Шойхет, А.А. Баженов // Рак щитовидной железы: современные принципы диагностики и лечения : материалы Междунар. науч. форума. – СПб., 2009. – С. 5-8.
3. Александрова, С.А. Влияние галектина-3 на Fas-опосредованный апоптоз в клетках опухолей щитовидной железы человека / С.А. Александрова, Л.Б. Гинкул, М.Е. Борискова // Вопр. онкологии. – 2008. – Т. 54, № 2. – С. 4.
4. Алиев, З.О. Дифференциальная диагностика узловых эутиреоидных образований щитовидной железы и выбор объема оперативного вмешательства : автореф. дис. … канд. мед. наук: 14.00.27 / Алиев З.О. – М., 2000. – 19 с.
5. Антонив, В.Р. Диагностическое значение ультразвуковой допплерографии у больных с лимфаденопатией и метастазами рака щитовидной железы в регионарных лимфатических узлах шеи / В.Р. Антонив, О.Б. Дынник, А.Н. Кориченский // Украинский мед. журн. – 2001. – Т. 22, № 2. – С. 127-129.
6. Афанасьева, З.А. Иммуноморфологические исследования в диагностике опухолей щитовидной железы: обзор / З.А. Афанасьева, С.В. Петров, Р.Ш. Хасанов // Рос. онкол. журн. – 2005. – № 5. – С. 50-54.

7. Афанасьева, З.А. Организация специализированных диагностических центров для больных опухолями щитовидной железы / З.А. Афанасьева, Р.Ш. Хасанов, Р.Г. Хамидуллин // Современные аспекты хирургический эндокринологии. – 2003. – Т. 1. – С. 16-18.
8. Барчук, А.С. Рецидивы дифференцированного рака щитовидной железы / А.С. Барчук // Практ. онкология. – 2007. – Т. 8, № 1. – С. 35-41.
9. Белобородов, В.А. Возможности ультразвуковой диагностики заболеваний щитовидной железы / В.А. Белобородов, С.Б. Пинский, В.Г. Мясников // Современные аспекты хирургической эндокринологии : материалы X(XII) Рос. симп. по хирургической эндокринологи. – Смоленск, 2002. – С. 49-51.
10. Берштейн, Л.М. Рак щитовидной железы: эпидемиология, эндокринология, факторы и механизмы канцерогенеза / Л.М. Берштейн // Практ. онкология. – 2007. – Т. 8, № 1. – С. 1-8.
11. Бомаш, Н.Ю. Морфологическая диагностика заболеваний щитовидной железы / Н.Ю. Бомаш. – М.: Медицина, 1981. – 176 с.
12. Бондаренко, О.О. Экспрессия Na+/I-симпортера в новообразованиях щитовидной железы: иммуногистохимическое исследование / О.О. Бондаренко, И.С. Шпонка, В.И. Шпонка // Морфологія. – 2009. – Т. III, № 1. – С. 28-31.
13. Бржезовский, В.Ж. Диагностика и лечение медуллярного рака щитовидной железы / В.Ж. Бржезовский, В.Л. Любаев // Практ. онкология. – 2007. – Т. 8, № 1. – С. 29-35.
14. Быков, М.А. Мутация гена brafv600e: возможности использования в лечении папиллярного рака щитовидной железы : дис. … канд. мед. наук: 14.01.17 / Быков М.А. – СПб., 2015. – 119 с.
15. Валдина, Е.А. Вопросы диагностики и лечения больных раком щитовидной железы / Е.А. Валдина, Л.И. Архипова // Вопр. онкологии. – 1987. – № 6. – С. 111-113.
16. Валдина, Е.А. Заболевания щитовидной железы : рук. / Е.А. Валдина. – 3-е изд. – СПб.: Питер, 2006. – 368 с.

17. Валдина, Е.А. Объем оперативного вмешательства при высокодифференцированном раке щитовидной железы / Е.А. Валдина // Вопр. онкологии. – 2006. – Т. 52, № 1. – С. 119-121.
18. Васьков, В.М. Микрокарциномы щитовидной железы / В.М. Васьков, П.В. Панов, Т.А. Масальская // Современные аспекты хирургической эндокринологии : материалы XI (XIII) Рос. симп. по хирургической эндокринологии. – СПб., 2003. – С. 54-55.
19. Ветшев, П.С. Заболевания щитовидной железы / П.С. Ветшев, Г.А. Мельниченко, Н.С. Кузнецов. – М., 1995. – 25 с.
20. Ветшев, П.С. Сравнительная оценка методов исследования при аденомах щитовидной железы / П.С. Ветшев, К.Е. Чилингариди, В.Б. Лощенов // Современные аспекты хирургической эндокринологии : материалы X (XII) Рос. симп. по хирургической эндокринологии. – Смоленск, 2002. – С. 92-94.
21. Возможности иммуноцитохимии в дифференциальной диагностике рака щитовидной железы и его метастазов / З.А. Афанасьева [и др.] // Казанский мед. журн. – 2000. – Т. 81, № 4. – С. 276-280.
22. Волченко, Н.Н. Иммуноцитохимическая диагностика опухолей эндокринных органов и органов-мишеней / Н.Н. Волченко, М.В. Савостикова // Клиническая морфология новообразований эндокринных желез : сб. науч. тр. II науч. конф. – М.: МВД, 2007. – С. 24-27.
23. Воробьев, С.Л. Сравнительная оценка результатов цитологического исследования материала, полученного при дооперационной тонкоигольной аспирационной биопсии и интраоперационных мазков-отпечатков при одиночных узлах щитовидной железы / С.Л. Воробьев // Клиническая морфология новообразований эндокринных желез : сб. науч. тр. II науч. конф. – М.: МВД, 2007. – С. 30-33.
24. Вырупаев, С.В. О раке щитовидной железы и лимфогенных метастазах в легкие / С.В. Вырупаев // Рак щитовидной железы: современные принципы диагностики и лечения : материалы Междунар. науч. форума. – СПб., 2009. – С. 38-39.

25. Гарбузов, П.И. Наблюдение за больными дифференцированным раком щитовидной железы: современные аспекты / П.И. Гарбузов // Проблемы эндокринологии. – 2002. – Т. 48, № 4. – С. 20-23.
26. Генетические аспекты рака щитовидной железы / Р.Ф. Гарькавцева [и др.] // Проблемы эндокринологии. – 2002. – Т. 48, № 4. – С. 16-21.
27. Герасимов, Г.А. Чернобыль: двадцать лет спустя / Г.А. Герасимов, Д. Фиге // Клин. и эксперим. тиреодология. – 2006. – № 2. – С. 15-39.
28. Гилязутдинов, И.А. Опухоли гормонально-зависимых и гормонопродуцирующих органов / И.А. Гилязутдинов, Р.Ш. Хасанов. М.: МЕДпрессинформ, 2004. – 464 с.
29. Гринева, Е.Н. Кистозно-измененные узлы: проблемы диагностики и врачебной тактики / Е.Н. Гринева // Клин. тиреодология. – 2004. – Т. 2, № 3. – С. 38-42.
30. Гринева, Е.Н. Роль тонкоигольной аспирационной биопсии в диагностике узловых образований щитовидной железы / Е.Н. Гринева, Т.В. Малахова, Е.В. Горюшкина // Проблемы эндокринологии. – 2005. – Т. 51, № 1. – С. 10-15.
31. Гринева, Е.Н. Тонкоигольная аспирационная биопсия щитовидной железы / Е.Н. Гринева // Врач. – 2003. – № 6. – С. 40-43.
32. Гринева Е.Н. Узловые образования щитовидной железы. Диагностика и врачебная тактика / Е.Н. Гринева // Проблемы эндокринологии. – 2003. – Т. 49, № 6. – С. 59-62.
33. Гринева, Е.Н. Узловые образования щитовидной железы. Диагностика и лечебная тактика : автореф. дис. … д-ра мед. наук: 14.00.03 / Гринева Е.Н. – СПб., 2004. – 41 с.
34. Гринева, Е.Н. Фолликулярные и гюртлеклеточные опухоли щитовидной железы. Возможности дифференциальной диагностики на дооперационном этапе / Е.Н. Гринева, Е.В. Горюшкина, Т.В. Малахова // Вопр. онкологии. – 2004. – Т. 50, № 1. – С. 41-45.

35. Давыдов, М.И. Статистика злокачественных новообразований в России и странах СНГ в 2005 году / М.И. Давыдов, Е.М. Аксель // Вестн. РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН. – 2007. – Т. 18, № 2, прил. 1. – С. 156.
36. Двинских, Н.Ю. Аденома или рак щитовидной железы? (иммуноморфологическое исследование потенциала злокачественности инкапсулированных опухолей фолликулярного строения) / Н.Ю. Двинских, А.Ю. Абросимов // Рак щитовидной железы: современные принципы диагностики и лечения : материалы Междунар. науч. форума. – СПб., 2009. – С. 45-48.
37. Демидов, В.П. Ошибки в диагностике и лечении рака щитовидной железы / В.П. Демидов, С.А. Сергеев, Е.Д. Панов // Вопр. онкологии. – 1990. – Т. 36, № 5. – С. 568-571.
38. Диагностика и лечение дифференцированного рака щитовидной железы. Национальные клинические рекомендации, принятые на IX Российском онкологическом конгрессе и IV Всероссийском тиреодологическм конгрессе // Эндокринная хирургия. – 2008. – Т. 2, № 12. – С. 3-5.
39. Заболотская, Н.В. Применение ультразвукового исследования для оценки состояния поверхностных групп лимфатических узлов / Н.В. Заболотская // Sonoace International. – 1999. – № 5. – С. 42-45.
40. Значение выявления мутации гена BRAF в дооперационной диагностике рака щитовидной железы / Д.Ю. Семенов [и др.] // Клин. и эксперим. тиреоидология. – 2009. – Т. 5, № 4. – С. 33-37.
41. Зубеев, П.С. Расширение возможностей тонкоигольной аспирационной биопсии под контролем УЗИ в диагностике узловых образований щитовидной железы / П.С. Зубеев, Ю.П. Потехина, В.А. Коновалов // Клин. тиреодология. – 2004. – Т. 2, № 3. – С. 15-18.
42. Интраоперационная диагностика патологии щитовидной железы: шестилетний опыт специализированной клиники / И.Л. Аветисьян [и др.] // Украинский мед. журн. – 2001. – Т. 26, № 6. – С. 125-131.

43. Использование галектина-3 в диагностике рака щитовидной железы / Д.Ю. Семенов [и др.] // Вопр. онкологии. – 2008. – Т. 54, № 3. – С. 321-323.
44. Клинические, морфологические и иммуногистохимические особенности фолликулярных опухолей щитовидной железы: результаты ретроспективного исследования / Е.А. Трошина [и др.] // Клиническая морфология новообразований эндокринных желез : сб. науч. тр. II науч. конф. – М.: МДВ, 2007. – С. 153-158.
45. Клинические рекомендации. Онкология / под ред. В.И. Чиссова, С.Л. Дарьяловой. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2006. – 720 с.
46. Кондратьева, Т.Т. Морфологическая диагностика узловых образований щитовидной железы / Т.Т. Кондратьева, А.И. Павловская, Е.А. Врублевская // Практ. онкология. – 2007. – Т. 8, № 1. – С. 9-16.
47. Лазарев, А.Ф. Клиническое значение экспрессии Ki-67, p53, bcl-2 в первичном опухолевом очаге при оценке прогноза почечно-клеточного рака / А.Ф. Лазарев, В.С. Дорошенко, С.А. Варламов // Вопр. онкологии. – 2008. – Т. 54, № 2. – С. 15.
48. Ланцов, Д.С. Пролиферативная активность папиллярной микрокарциномы щитовидной железы / Д.С. Ланцов // Клиническая морфология новообразований эндокринных желез : сб. науч. тр. II науч. конф. – М.: МВД, 2007. – С. 98-103.
49. Липская, Е.В. Хирургическая тактика диагностики и лечения больных с дифференцированным раком щитовидной железы / Е.В. Липская, А.Ф. Романчишен, В.А. Колосюк // Вестн. хирургии. – 2004. – Т. 163, № 1. – С. 11-15.
50. Лушников, Е.Ф. Рак щитовидной железы в России после Чернобыля / Е.Ф. Лушников, А.Ф. Цыб, С. Ямасита. – М.: Медицина, 2006. – 128 с.
51. Майор, Н.Н. Пункционная цитологическая диагностика заболеваний щитовидной железы: возможности и ограничения метода / Н.Н. Майор, Л.Б. Цодикова // Арх. патологии. – 1996. – Т. 58, № 2. – С. 74-78.

52. Михнин, А.Е. Рак щитовидной железы: диагностика, классификация, стадирование / А.Е. Михнин // Практ. онкология. – 2007. – Т. 8, № 1. – С. 17-25.
53. Можжухина, И.Н. Зависимость изменений в щитовидной железе от вида и дозы радиационного воздействия (обзор литературы) / И.Н. Можжухина // Вестн. рентгенологии и радиологии. – 2004. – № 5. – С. 45-52.
54. Молекулярно-генетические аспекты новообразований щитовидной железы / И.И. Дедов [и др.] // Проблемы эндокринологии. – 2000. – Т. 46, № 2. – С. 22-30.
55. Назаров, В.А. Хирургическое лечение дифференцированного рака щитовидной железы у больных молодого возраста / В.А. Назаров, С.А. Вон // Рак щитовидной железы: современные принципы диагностики и лечения : материалы Междунар. науч. форума. – СПб., 2009. – С. 32-34.
56. Определение мутации гена BRAF в дооперационной диагностике папиллярного рака щитовидной железы. / Е.Ю. Кирс [и др.] // Вестн. Новосибирского гос. ун-та. Серия: Биология, клиническая медицина. – 2011. – Т. 9, № 3. – С. 119-123.
57. Определение содержания тиреоглобулина в биопунктате лимфоузлов шеи для диагностики метастазов папиллярного рака щитовидной железы / П.О. Румянцев [и др.] // Рос. онкол. журн. – 1999. – № 2. – С. 19-21.
58. Определение BRAF-Мутации в папиллярных микрокарциномах щитовидной железы – дополнительный маркер стратификации риска / Д.Ю. Семенов [и др.] // Клин. и эксперим. тиреоидология. – 2014. – Т. 10. № 3. – С. 36-40.
59. Оптимизация хирургической тактики лечения braf-положительного папиллярного рака щитовидной железы / М.Е. Борискова [и др.] // Клин. и эксперим. тиреоидология. – 2018. – Т. 14, № 1. – С. 25-33.
60. Особенности клинического течения и хирургической тактики при заболеваниях щитовидной железы у мужчин / Л.В. Поташов [и др.] // Ученые записки СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова. – 2002. – Т. 9, № 2. – С. 83-86.

61. Пачес, А.И. Опухоли головы и шеи / А.И. Пачес. – 4-е изд. – М.: Медицина, 2000. – С. 379-407.
62. Пачес, А.И. Рак щитовидной железы / А.И. Пачес, Р.М. Пропп. – М.: Центр внедрения достижений науки и техники, 1995. – 372 с.
63. Перспективы применения лазерной спектроскопии в диагностике и лечении заболеваний щитовидной железы / П.С. Ветшев [и др.] // Современные аспекты хирургической эндокринологии : материалы XI (XIII) Рос. симп. по хирургической эндокринологии. – СПб., 2003. – Т. 1. – С. 68-72.
64. Петров, В.Г. Тактика диагностики и лечения узловых образований щитовидной железы / В.Г. Петров, А.В. Махнеев, А.А. Некаева // Проблемы эндокринологии. – 2002. – Т. 48, № 5. – С. 3-6.
65. Пинский, С.Б. Диагностика заболеваний щитовидной железы / С.Б. Пинский, А.П. Калинин, В.А. Белобородов. – М.: Медицина, 2005. – 192 с.
66. Прогнозирование течения высокодифференцированного рака щитовидной железы на основании дооперационного определения уровня экспрессии натрий-йодного симпортера / М.Е. Борискова [и др.] // Клин. и эксперим. тиреоидология. – 2015. – Т. 11, № 3. – С. 54-59.
67. Прогностическая ценность BRAFV600E у пациентов с папиллярной карциномой щитовидной железы / Р.А. Черников [и др.] // Вестн. СПбУ. Серия 11: Медицина. – 2014. – № 2. – С. 146-153.
68. Прогностическое значение экспрессии натрий-йодного симпортера для высокодифференцированного рака щитовидной железы / Д.Ю. Семенов [и др.] // Клин. и эксперим. тиреоидология. – 2015. – Т. 11, № 1. – С. 50-58.
69. Рак щитовидной железы / В.Э. Ванушко [и др.] // Пробл. эндокринологии. – 2005. – № 4. – С. 43-52.
70. Результаты применения гемитиреоидэктомии при лечении больных дифференцированным раком щитовидной железы / С.А. Алубаев [и др.] // Рак щитовидной железы: современные принципы диагностики и лечения : материалы Междунар. науч. форума. – СПб., 2009. – С. 10-11.

71. Роль цитологической диагностики в практике хирургического лечения заболеваний ЩЖ / Е.М. Трунин [и др.] // Современные проблема клинической цитоморфологии : Всерос. конф. с междунар. участием. Ученые чтения, посвящ. памяти чл.-корр. РАМН, з.д.н. РФ, проф. О.К. Хмельницкому и 25-летию курса цитологии кафедры патанатомии СПбМАПО. – СПб., 2007. – С. 111-113.
72. Романчишен, А.Ф. Щитовидная железа / А.Ф. Романчишен // Хирургическая эндокринология / под ред. А.П. Калинина, Н.А. Майстренко, П.С. Ветшева. – СПб.: Питер, 2004. – С. 82-268.
73. Российские клинические рекомендации по диагностике и лечению высокодифференцированного рака щитовидной железы у взрослых, 2017 год / Д.Г. Бельцевич // Эндокринная хирургия. – 2017. – Т. 11, № 1. – С. 6-27.
74. Ротин, Д.Л. Актуальные аспекты морфологической и иммуногистохимической диагностики узловых образований щитовидной железы / Д.Л. Ротин, А.И. Павловская // Клиническая морфология новообразований эндокринных желез : сб. науч. тр. II науч. конф. – М.: МДВ, 2007. – С. 149-153.
75. Румянцева, У.В. Клинико-генетические аспекты спорадического немедуллярного рака щитовидной железы / У.В. Румянцева, П.О. Румянцев, А.А. Ильин // Клин. и эксперим. тиреодология. – 2006. – Т. 2, № 1. – С. 16-20.
76. Савостикова, М.В. Иммуноцитохимическое исследование в диагностике и оценке важнейших факторов прогноза злокачественных и доброкачественных образований : автореф. дис. … канд. мед. наук: 14.00.14 / Савостикова М.В. – М., 2006. – 17 с.
77. Северская, Н.В. Оценка значимости лучевых и нелучевых методов диагностики рака щитовидной железы : автореф. дис. … канд. мед. наук: 14.00.19 / Северская Н.В. – Обнинск, 2002. – 22 с.
78. Семейный дифференцированный рак щитовидной железы / У.В. Румянцева [и др.] // Вопр. онкологии. – 2006. – Т. 52, № 1. – С. 42-46.

79. Семиков, В. Современные принципы лечения больных с узловым зобом / В. Семиков // Врач. – 2002. – № 7. – С. 7-12.
80. Соколова, О.В. Дифференциально-диагностические критерии фолликулярных опухолей щитовидной железы разной степени злокачественности : автореф. дис. … канд. мед. наук: 14.00.15 / Соколова О.В. – СПб., 2009. – 22 с.
81. Состояние онкологической помощи населению России в 2010 году / под ред. В.И. Чиссова, В.В. Старинского, Г.В. Петровой. – М., 2014. – 188 с.
82. Состояние онкологической помощи населению России в 2011 году / под ред. В.И. Чиссова, В.В. Старинского, Г.В. Петровой. – М., 2010. – 240 с.
83. Состояние онкологической помощи населению России в 2013 году / под ред. А.Д. Каприна, В.В. Старинского, Г.В. Петровой. – М., 2014. – 236 с.
84. Состояние онкологической помощи населению России в 2017 году / под ред. А.Д. Каприна, В.В. Старинского, Г.В. Петровой. – М., 2018. – 235 с.
85. Способ дооперационного определения объема хирургического лечения высокодифференцированного рака щитовидной железы: пат. 2548783 Рос. Федерация / Д.Ю. Семенов, М.Е. Борискова, Л.Е. Колоскова, У.В. Фарафонова; заявитель и патентообладатель ГБОУ ВПО ПСПбГМУ им. И.П. Павлова. – № 2014121906/15; заявл. 29.05.2014; опубл. 20.04.15. – Бюл. № 11. – 10 с.
86. Тимофеева, Н.И. Современный алгоритм дифференциальной диагностики и оптимизация тактики хирургического лечения у больных с узловыми образованиями щитовидной железы : автореф. дис. … канд. мед. наук: 14.00.27 / Тимофеева Н.И. – СПб., 2007. – 20 с.
87. Тонкоигольная пункционная биопсия и методы визуализации щитовидной железы в диагностике узловых форм зоба / С.Л. Внотченко [и др.] // Проблемы эндокринологии. – 1993. – Т. 39, № 6. – С. 30-33.
88. Точильников, Г.В. Особенности клинического течения заболеваний щитовидной железы у мужчин и их хирургическое лечение : автореф. дис. … канд. мед. наук: 14.00.27 / Точильников Г.В. – СПб., 2004. – 15 с.

89. Трунин, Е.М. Аспирационная биопсия щитовидной железы иглами разного диаметра / Е.М. Трунин, Э.С. Керимов, Л.Л. Мурт // Новости клин. цитологии России. – 2008. – Т. 12, № 3-4. – С. 7-10.
90. Узловой зоб. Диагностика. Тактика лечения : пособие для врачей / А.Н. Бубнов [и др.]. – СПб., 1997. – 95 с.
91. Ультразвуковая диагностика рака щитовидной железы / Е.Ю. Трофимова [и др.] // Визуализация в клинике. – 2000. – Т. 17, № 12. – С. 37-47.
92. Фарафонова, У.В. Значение выявления мутации гена braf и экспрессии натрий-йодного симпортера в определении хирургической тактики лечения высокодифференцированного рака щитовидной железы : дис. … канд. мед. наук: 14.01.17 / Фарафонова У.В. – СПб., 2015. – 119 с.
93. Фещенко, Н.С. Определение экспрессии галектина-3 для улучшения диагностики и совершествования тактики хирургического лечения высокодифференцированного рака щитовидной железы : дис. … канд. мед. наук: 14.00.01 / Фещенко Н.С. – СПб., 2010. – 120 с.
94. Цитологическая диагностика папиллярного рака щитовидной железы с использованием современных методов исследования / Н.Н. Волченко [и др.] // Клиническая морфология новообразований эндокринных желез : сб. науч. тр. II науч. конф. – М.: МВД, 2007. – С. 27-29.
95. Частота мутации гена BRAFV600E (T1799A) при папиллярном раке щитовидной железы в сибирском регионе России / Е. Буравлева [и др.] // Вестн. РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН. – 2009. – Т. 20, № S2. – С. 9-10.
96. Черенько, С.М. Молекулярные маркеры высокодифференцированного рака щитовидной железы / С.М. Черенько, М.Б. Горобейко, В.Г. Савченко // Experimental Oncology. – 2002. – Т. 24. – С. 83-88.
97. Шапиро, Н.А. Цитологическая диагностика заболеваний щитовидной железы. Цветной атлас / Н.А. Шапиро, Т.Н. Камнева. – М.: Репроцентр, 2003. – 172 с.

98. Шойхет, Я.Н. Диагностика микрокарцином щитовидной железы / Я.Н. Шойхет, Е.А. Баженова, А.А. Баженов // Проблемы клин. медицины. – 2005. – № 2. – С. 21-25.
99. Шустов, С.Б. Функциональная и топическая диагностика в эндокринологии / С.Б. Шустов, Ю.Ш. Халимов. – СПб.: ЭЛБИ СПб., 2001. – 239 с.
100. Экспрессия галектина-3 в дооперационной диагностике высокодифференцированного рака щитовидной железы / Д.Ю. Семенов [и др.] // Проблемы эндокринологии. – 2010. – Т. 56, № 4. – С. 9-15.
101. Экспрессия галектина-3 и ядерного антигена пролиферирующих клеток (PCNA) в папиллярных карциномах щитовидной железы человека / Д. Квежик [и др.] // Experimental Oncology. – 2005. – Т. 27, № 3. – С. 210-214.
102. Яйцев, С.В. Клинико-эпидемиологическая характеристика, пути профилактики и прогнозирование рака щитовидной железы : автореф. дис. … д-ра мед. наук: 14.00.27 / Яйцев С.В. – Челябинск, 2000. – 20 с.
103. A combined molecular-pathologic score improves risk stratification of thyroid papillary microcarcinoma / L.A. Niemeier [et al.] // Cancer. – 2012. – Vol. 118, № 8. – P. 2069-2077.
104. A meta-analysis of prognostic roles of molecular markers in papillary thyroid carcinoma / H.G. Vuong [et al.] // Endocr. Connect. – 2017. – Vol. 6, № 3. – P. R8-R17.
105. A molecular computational model improves the preoperative diagnosis of thyroid nodules / S. Tomei [et al.] // BMC Cancer. – 2012. – Vol. 12, № 396. – P. 1471-1477.
106. A novel combination of withaferin A and sorafenib shows synergistic efficacy against both papillary and anaplastic thyroid cancers / S.M. Cohen [et al.] // Am. J. Surg. – 2012. – Vol. 204, № 6. – P. 895-901.
107. A new oncogene in human thyroid papillar carcinomas and their lymph-nodal metastases / A. Fusco [et al.] // Nature. – 1987. – Vol. 238. – P. 170-172.

108. A study of recurrence and death from papillary thyroid cancer with 27 years of median follow-up / R.H. Grogan [et al.] // Surgery. – 2013. – Vol. 154, № 6. – P. 1436-1446.
109. Advanced radioiodine-refractory differentiated thyroid cancer: the sodium iodide symporter and other emerging therapeutic targets / C. Spitzweg [et al.] // Lancet Diabetes Endocrinol. – 2014. – Vol. 2, № 10. – P. 830-842.
110. Ahn, D. Surgical complications and recurrence after central neck dissection in cN0 papillary thyroid carcinoma / D. Ahn, J.H. Sohn, J.Y. Park // Auris Nasus Larynx. – 2014. – Vol. 41, № 1. – P. 63-68.
111. Al-Sharaky, D.R. Sensitivity and Specificity of Galectin-3 and Glypican-3 in Follicular-Patterned and Other Thyroid Neoplasms / D.R. Al-Sharaky, S.F. Younes // J. Clin. Diagn. Res. – 2016. – Vol. 10, № 3. – P. EC06-10.
112. Albarel, F. From nodule to differentiated thyroid carcinoma: contributions of molecular analysis in 2012 / F. Albarel, D. Conte-Devolx, C. Oliver // Ann. Endocrinol. (Paris). – 2012. – Vol. 73, № 3. – P. 155-164.
113. Allelic loss of susceptibility loci and the occurrence of BRAF and RAS mutations in patients with familial non-medullary thyroid cancer / K.Y. Na [et al.] // J. Surg. Oncol. – 2012. – Vol. 105, № 1. – P. 10-14.
114. Alternative mutations of BRAF, RET and NTRK1 are associated with similar but distinct gene expression patterns in papillary thyroid cancer / M. Frattini [et al.] // Oncogene. – 2004. – Vol. 23. – P. 7436-7440.
115. American Thyroid Association Guidelines on the Management of Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer Task Force Review and Recommendation on the Proposed Renaming of Encapsulated Follicular Variant Papillary Thyroid Carcinoma Without Invasion to Noninvasive Follicular Thyroid Neoplasm with Papillary-Like Nuclear Features / B.R. Haugen [et al.] // Thyroid. – 2017. – Vol. 27, № 4. – P. 481-483.
116. American Thyroid Association Management Guidelines for Adult Patients with Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer: The American Thyroid

Association Guidelines Task Force on Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer / B.R. Haugen [et al.] // Thyroid. – 2016. – Vol. 26, № 1. – P. 1-133.

117. An observation trial without surgical treatment in patients with papillary microcarcinoma of the thyroid / Y. Ito [et al.] // Thyroid. – 2003. – Vol. 13, № 4. – P. 381-387.
118. Analysis of the sodium iodide symporter expression in histological slides from a nodular goiter / A. Syrenicz [et al.] // Arch. Med. Res. – 2007. – Vol. 38, № 2. – P. 219-226.
119. Anaplastic thyroid cancer: a review of epidemiology, pathogenesis, and treatment / G. Nagaiah [et al.] // J. Oncol. – 2011. – Vol. 542. – P. 358.
120. Asquisiton of BRAF gene mutations is not a requirement for nodal metastasis of papillary thyroid carcinoma / V. Trovisco [et al.] // Clin. Endocrinol. (Oxf). – 2008. – Vol. 69, № 4. – P. 683-685.
121. Assessment of BRAF V600E mutation status by immunohistochemistry with a mutation-specific monoclonal antibody / D. Capper [et al.] // Acta Neuropathol. – 2011. – Vol. 122, № 1. – P. 11-19.
122. Assessment of molecular testing in fine-needle aspiration biopsy samples: an experience in a Chinese population / S. Liu [et al.] // Exp. Mol. Pathol. – 2014. – Vol. 97. – P. 292-297.
123. Association between BRAF V600E mutation and mortality in patients with papillary thyroid cancer / M. Xing [et al.] // JAMA. – 2013. – Vol. 309, № 14. – P. 1493-1501.
124. Association of the T1799A BRAF mutation with tumor extrathyroidal invasion, higher peripheral platelet counts, and over-expression of platelet-derived growth factor-B in papillary thyroid cancer / Y. Wang [et al.] // Endocr. Relat. Cancer. – 2008. – Vol. 15, № 1. – P. 183-190.
125. Bales, S.R. Targeted treatment of differentiated and medullary thyroid cancer / S.R. Bales, I.J. Chopra // J. Thyroid Res. – 2011. – Vol. 2011. – P. 102636.
126. Baloch, Z.W. Review Microcarcinoma of the thyroid / Z.W. Baloch, V.A. LiVolsi // Adv. Anat Pathol. – 2006. – Vol. 13, № 2. – P. 69-75.

127. Beesley, M.F. Cytokeratin 19 and galectin-3 immunohistochemistry in the differential diagnosis of solitary thyroid nodules / M.F. Beesley, K.M. McLaren // Histopathology. – 2002. – Vol. 41. – P. 236-243.
128. Belfiore, A. The Use of Fine Needle Aspiration Biopsy in Thyroid Disease / A. Belfiore // Thyroid international. – 2002. – № 2. – P. 1-17.
129. Berghoff, A.S. Lack of BRAF V600E Protein Expression in Primary Central Nervous System Lymphoma / A.S. Berghoff, D. Capper, M. Preusser // Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol. – 2013. – Vol. 21, № 4. – P. 351-353.
130. Bhaijee, F. Molecular analysis of thyroid tumors / F. Bhaijee, Y.E. Nikiforov // Endocr. Pathol. – 2011. – Vol. 22, № 3. – P. 126-133.
131. Both BRAF V600E mutation and older age (65 years) are associated with recurrent papillary thyroid cancer / G.M. Howell [et al.] // Ann. Surg. Oncol. – 2011. – Vol. 18, № 13. – P. 3566-3571.
132. BRAF, a tool in the decision to perform elective neck dissection? / S.E. Dutenhefner [et al.] // Thyroid. – 2013. – Vol. 23, № 12. – P. 1541-1546.
133. BRAF in primary and recurrent papillary thyroid cancers: the relationship with 131I and 2-[18F] fluoro-2-deoxy-D-glucose uptake ability / S. Barollo [et al.] // Eur. J. Endocrinol. – 2010. – Vol. 163, № 4. – P. 659-663.
134. BRAF mutation and RASSF1A expression in thyroid carcinoma of southern Italy / A. Santoro [et al.] // J. Cell Biochem. – 2012. – Vol. 114, № 5. – P. 1174-1182.
135. BRAF mutation detection in indeterminate thyroid cytology specimens: Underlying cytologic, molecular, and pathologic characteristics of papillary thyroid carcinoma / N.P. Ohori [et al.] // Cancer Cytopathol. – 2013. – Vol. 121, № 4. – P. 197-205.
136. BRAF mutation in papillary thyroid cancer and its value in tailoring initial treatment: a systematic review and meta-analysis / R.P. Tufano [et al.] // Medicine (Baltimore). – 2012. – Vol. 91, № 5. – P. 274-286.
137. BRAF mutation in papillary thyroid carcinoma in a Japanese population: its lack of correlation with high-risk clinicopathological features and disease-free survival of patients / Y. Ito [et al.] // Endocr. J. – 2009. – Vol. 56, № 1. – P. 89-97.

138. BRAF mutation in papillary thyroid carcinoma: Predictive value for long-term prognosis and radioiodine sensitivity / A. Zoghlami [et al.] // Eur. Ann. Otorhinolaryngol. Head Neck Dis. – 2013. – Vol. 8 – P. 668-673.
139. BRAF mutation in papillary thyroid carcinoma / X. Li [et al.] // Int. J. Clin. Exp. Med. – 2012. – Vol. 5, № 4. – P. 310-315.
140. BRAF mutation in papillary thyroid carcinoma / Y. Cohen [et al.] // J. Natl. Cance rInst. – 2003. – Vol. 95. – P. 625-627.
141. BRAF mutation predicts a poorer clinical prognosis for papillary thyroid cancer / M. Xing [et al.] // J. Clin. Endocrinol. Metab. – 2005. – Vol. 90, № 12. – P. 6373-6379.
142. BRAF mutation testing of thyroid fine-needle aspiration biopsy specimens for preoperative risk stratification in papillary thyroid cancer / M. Xing [et al.] // J. Clin. Oncol. – 2009. – Vol. 27, № 18. – P. 2977-2982.
143. BRAF mutations in papillary thyroid carcinoma and emerging targeted therapies (review) / G.C. Leonardi [et al.] // Mol. Med. Report. – 2012. – Vol. 6, № 4. – P. 687-694.
144. BRAF Mutations in Papillary Thyroid Carcinomas Inhibit Genes Involved in Iodine Metabolism / C. Durante [et al.] // J. Clin. Endocrinol. Metabolism. – 2007. – Vol. 92, № 7. – P. 2840-2843.
145. BRAF mutations in thyroid tumors are restricted to papillary carcinomas and anaplastic or poorly differentiated carcinomas arising from papillary carcinomas / M.N. Nikiforova [et al.] // J. Clin. Endocrinol. Metab. – 2003. – Vol. 88. – P. 5399-5404.
146. BRAF mutations in thyroid tumors from an ethnically diverse group / H.J. Schulten [et al.] // Hered Cancer Clin. Pract. – 2012. – Vol. 10, № 1. – P. 1186-1897.
147. BRAF, p53 and SOX2 in anaplastic thyroid carcinoma: evidence for multistep carcinogenesis / G. Gauchotte [et al.] // Pathology. – 2011. – Vol. 43, № 5. – P. 447-452.

148. BRAF (V600E) associates with cytoplasmatic localization of p27kip1 and higher cytokeratin 19 expression in papillary thyroid carcinoma / A. Guerra [et al.] // Endocrine. – 2013. – Vol. 44, № 1. – P. 165-171.
149. BRAF (V600E) Mutation Analysis in Papillary Thyroid Carcinomas by Peptide Nucleic Acid Clamp Real-time PCR / D. Jeong [et al.] // Ann. Surg. Oncol. – 2013. – Vol. 20, № 3. – P. 759-766.
150. BRAF (V600E) mutation analysis on liquid-based cytology-processed aspiration biopsies predicts bilaterality and lymph node involvement in papillary thyroid microcarcinoma / E.D. Rossi [et al.] // Cancer Cytopathol. – 2013. – Vol. 121, № 6. – P. 291-297.
151. BRAF(V600E) mutation analysis of liquid-based preparation-processed fine needle aspiration sample improves the diagnostic rate of papillary thyroid carcinoma / H. Chang [et al.] // Hum. Pathol. – 2012. – Vol. 43, № 1. – P. 89-95.
152. BRAF(V600E) mutation and expression of proangiogenic molecular markers in papillary thyroid carcinomas / C. Durante [et al.] // Eur. J. Endocrinol. – 2011. – Vol. 165, № 3. – P. 455-463.
153. BRAF V600E mutation and Its Association with Clinicopathological Features of Papillary ThyroidCancer: A Meta-Analysis / C. Li [et al.] // J. Clin. Endocrinol. Metab. – 2012. – Vol. 97, № 12. – P. 4559-4570.
154. BRAF(V600E) mutation and outcome of patients with papillary thyroid carcinoma: a 15-year median follow-up study / R. Elisei [et al.] // J. Clin. Endocrinol. Metab. – 2008. – Vol. 93, № 10. – P. 3943-3949.
155. BRAF(V600E) mutation and the biology of papillary thyroid cancer / F. Frasca [et al.] // Endocr. Relat. Cancer. – 2008. – Vol. 15, № 1. – P. 191-205.
156. BRAFV600E mutation does not mean distant metastasis in thyroid papillary carcinomas / V. Sancisi [et al.] // J. Clin. Endocrinol. Metab. – 2012. – Vol. 97, № 9. – P. 1745-1749.
157. BRAF V600E mutation does not predict recurrence after long-term follow-up in TNM stage I or II papillary thyroid carcinoma patients / H. Pelttari [et al.] // APMIS. – 2012. – Vol. 120, № 5. – P. 380-386.

158. BRAFV600E mutation does not serve as a prognostic factor in Korean patients with papillary thyroid carcinoma / D. Ahn [et al.] // Auris Nasus Larynx. – 2012. – Vol. 39, № 2. – P. 198-203.
159. BRAF(V600E) mutation in papillary thyroid microcarcinoma: a genotype-phenotype correlation / R. Virk [et al.] // Mod. Pathol. – 2013. – Vol. 26. – P. 62-70.
160. BRAF V600E Mutation Independently Predicts Central Compartment Lymph Node Metastasis in Patients with Papillary Thyroid Cancer / G.M. Howell [et al.] // Ann. Surg. Oncol. – 2013. – Vol. 20, № 1. – P. 47-52.
161. BRAF (V600E) mutation is associated with an increased risk of nodal recurrence requiring reoperative surgery in patients with papillary thyroid cancer / C.J. O'Neill [et al.] // Surgery. – 2010. – Vol. 148, № 6. – P. 1139-1145.
162. BRAF V600E mutation is associated with tumor aggressiveness in papillary thyroid cancer / S.J. Kim [et al.] // World J. Surg. – 2012. – Vol. 36, № 2. – P. 310-317.
163. BRAFV600E mutation testing in fine needle aspirates of thyroid nodules: potential value of real-time PCR / J.Y. Kwak [et al.] // Ann. Clin. Lab. Sci. – 2012. – Vol. 42, № 3. – P. 258-265.
164. BRAFV600E mutation, TIMP-1 upregulation, and NF-kB activation: closing the loop on the papillary thyroid cancer trilogy / A. Bommarito [et al.] // Endocr. Relat. Cancer. – 2011. – Vol. 18, № 6. – P. 669-685.
165. B-RAF V600E mutational analysis of fine needle aspirates correlates with diagnosis of thyroid nodules / B.G. Bentz [et al.] // Otolaryngol. Head Neck Surg. – 2009. – Vol. 140, № 5. – P. 709-714.
166. BRAF(V600E) status adds incremental value to current risk classification systems in predicting papillary thyroid carcinoma recurrence / J.D. Prescott [et al.] // Surgery. – 2012. – Vol. 152, № 6. – P. 984-990.
167. Can galectin-3 be a useful marker for conventional papillary thyroidmicrocarcinoma? / H.M. Gweon [et al.] // Diagn. Cytopathol. – 2016. – Vol. 44, № 2. – P. 103-107.

168. Cancer of The Thyroid [Electronic resource]. – SEERStatFactSheets. – Available at: http://seer.cancer.gov/statfacts/html/thyro.html.
169. Cancer statistics, 2010, CA: A Cancer / A. Jemal [et al.] // J. Clin. – 2010. – Vol. 60, № 5. – P. 277-300.
170. Caronia, L.M. Role of BRAF in thyroid oncogenesis / L.M. Caronia, J.E. Phay, M.H. Shah // Clin. Cancer Res. – 2011. – Vol. 17, № 24. – P. 7511-7517.
171. Castellone, M.D. Dysregulated RET Signaling in thyroid Cancer / M.D. Castellone, M. Santoro // Endocrinol. Metab. Clin. North Am. – 2008. – Vol. 37. – P. 363-374.
172. Centralized molecular testing for oncogenic gene mutations complements the local cytopathologic diagnosis of thyroid nodules / S. Beaudenon-Huibregtse [et al.] // Thyroid. – 2014. – Vol. 24. – P. 1479-1487.
173. Changes in standardized mortality rates from thyroid cancer in Korea between 1985 and 2015: Analysis of Korean national data / Y.M. Choi [et al.] // Cancer. – 2017. – Vol. 123, № 24. – P. 4808-4814.
174. Characterization of the thyroid Na+/I- symporter with an anti-COOH terminus antibody / O. Levy [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1997. – Vol. 94. – P. 5568-5573.
175. Chung, J.K. Radioiodine therapy in differentiated thyroid cancer: the first targeted therapy in oncology / J.K. Chung, G.J. Cheon // Endocrinol. Metab. (Seoul). – 2014. – Vol. 29, № 3. – P. 233-239.
176. Ciampi, R. RET/PTC rearrangement and BRAF mutation in thyroid tumorogenesis / R. Ciampi, Y.E. Nikiforov // Endocrinology. – 2007. – Vol. 148. – P. 936-941.
177. Clinical pathological characteristics of resectable papillary thyroidmicrocarcinoma / C.L. Shi [et al.] // Zhonghua Zhong Liu Za Zhi. – 2017. – Vol. 39, № 5. – P. 361-366.
178. Clinical significance of BRAF (V600E) mutation and Ki-67 labeling index in papillary thyroid carcinomas / H. Nakayama [et al.] // Anticancer Res. – 2007. – Vol. 27, № 5B. – P. 3645-3649.

179. Clinical significance of metastasis to the central compartment from papillary microcarcinoma of the thyroid / Y. Ito [et al.] // World J. Surg. – 2006. – Vol. 30. – P. 91-99.
180. Clinicopathological analysis of papillary thyroid cancer with PIK3CA alterations in a Middle Eastern population / J. Abubaker [et al.] // J. Clin. Endocrinol. Metab. – 2008. – Vol. 93, № 2. – P. 611-618.
181. Combined clinical and ultrasound follow-up assists in malignancy detection in Galectin-3 negative Thy-3 thyroid nodules / S. Sciacchitano [et al.] // Endocrine. – 2016. – Vol. 54, № 1. – P. 139-147.
182. Correlation between genetic alterations and microscopic features, clinical manifestations, and prognostic characteristics of thyroid papillary carcinomas / A. Adeniran [et al.] // Am. J. Surg. Pathol. – 2006. – Vol. 30. – P. 216-222.
183. Curado, M.P. Cancer Incidencein Five Continents / M.P. Curado, B. Edwards, H.R. Shinetal // Vol. 9 of IARC Scientific Publications. – IARC, Lyon, France, 2007. – № 160. – 961 p.
184. Cytological and molecular features of papillary thyroid carcinoma with prominent hobnail features: a case report / C. Bellevicine [et al.] // Acta Cytol. – 2012. – Vol. 56, № 5. – P. 560-564.
185. Dai, G. Cloning and characterization of the thyroid iodide transporter / G. Dai, O. Levy, N. Carrasco // Nature. – 1996. – Vol. 379. – P. 458-460.
186. DeLellis, R.A. Pathology and genetics of thyroid carcinoma / R.A. DeLellis // J. Surg. Oncol. – 2006. – Vol. 94, № 8. – P. 662-669.
187. Detection of BRAF(V600E) Mutations in Papillary Thyroid Carcinomas by Peptide Nucleic Acid Clamp Real-Time PCR: A Comparison with Direct Sequencing / D. Jeong [et al.] // Korean J. Pathol. – 2012. – Vol. 46, № 1. – P. 61-67.
188. Detection of BRAF V600E mutation in thyroid fine-needle aspiration specimens by High Resolution Melting (HRM) analysis / A. Nechifor-Boily [et al.] // Rom. J. Morphol. Embryol. – 2012. – Vol. 53, № 2. – P. 263-267.

189. Detection of the BRAF(V600E) mutation in fine needle aspiration cytology of thyroid papillary microcarcinoma cells selected by manual macrodissection: an easy tool to improve the preoperative diagnosis / I. Marchetti [et al.] // Thyroid. – 2012. – Vol. 22, № 3. – P. 292-298.
190. Determination of galectin-3 messenger ribonucleic Acid overexpression in papillary thyroid cancer by quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction / V.J. Bernet [et al.] // J. Clin. Endocrinol. Metab. – 2002. – Vol. 87, № 10. – P. 4792-4796.
191. Development of reverse transcription-competitive polymerase chain reaction method to quantitate the expression levels of human sodium iodide symporter / K.Y. Ryu [et al.] // Thyroid. – 1999. – Vol. 9, № 4. – P. 405-409.
192. Diagnosis of «follicular neoplasm»: a gray zone in thyroid fine-needle aspiration cytology / Z.W. Baloch [et al.] // Diagnostic Cytopathology. – 2002. – Vol. 26, № 1. – P. 41-44.
193. Diagnostic Limitation of Fine-Needle Aspiration (FNA) on IndeterminateThyroid Nodules Can Be Partially Overcome by Preoperative Molecular Analysis: Assessment of RET/PTC1 Rearrangement in BRAF and RAS Wild-Type Routine Air-Dried FNA Specimens / Y.S. Ko [et al.] // Int. J. Mo.l Sci. – 2017. – Vol. 18, № 4. – P. 2-13.
194. Diagnostic terminology and morphologic criteria for cytologic diagnosis of thyroid lesions: a synopsis of the National Cancer Institute Thyroid FineNeedle Aspiration State of the Science Conference / Z.W. Baloch [et al.] // Diagn. Cytopathol. – 2008. – Vol. 36. – P. 425-437.
195. Different expression of TSH receptor and NIS genes in thyroid cancer: role of epigenetics / M. D'Agostino [et al.] // J. Mol. Endocrinol. – 2014. – Vol. 52, № 2. – P. 121-131.
196. Differential expression of galectin-3, CK19, HBME1, and Ret oncoprotein in the diagnosis of thyroid neoplasms by fine needle aspiration biopsy / H.A. Saleh [et al.] // CytoJournal. – 2009. – Vol. 6, № 18. – P. 25-31.

197. Differential expression of galectin-3 in papillary projections of malignant and non-malignant hyperplastic thyroid lesions / D. Cvejic // Acta Chir Iugosl. – 2003. – Vol. 50, № 3. – P. 67-70.
198. Differential expression of the Na(+)/I(-) symporter protein in thyroid cancer and adjacent normal and nodular goiter tissues / S. Wang [et al.] // Oncol. Lett. – 2013. – Vol. 5, № 1. – P. 368-372.
199. Encapsulated papillary oncocytic neoplasms of the thyroid: morphologic, immunohistochemical, and molecular analysis of 18 cases / R.L. Woodford [et al.] // Am. J. Surg. Pathol. – 2010. – Vol. 34, № 11. – P. 1582-1590.
200. Escape from the acute Wolff-Chaikoff effect is associated with a decrease in thyroid sodium/iodide symporter messenger ribonucleic acid and protein / P. Eng [et al.] // Endocrinology. – 1999. –Vol. 140. – P. 3404-3410.
201. Estimating risk of recurrence in differentiated thyroid cancer after total thyroidectomy and radioactive iodine remnant ablation: using response to therapy variables to modify the initial risk estimates predicted by the new American Thyroid Association staging system / R.M. Tuttle [et al.] // Thyroid. – 2010. – Vol. 20. – P. 1341-1349.
202. Estrogen effects on thyroid iodide uptake and thyroperoxidase activity in normal and ovariectomized rats / L.P. Lima [et al.] // Steroids. – 2006. – Vol. 71, № 8. – P. 653-659.
203. European Thyroid Association Guidelines 55 regarding Thyroid Nodule Molecular Fine-Needle Aspiration Cytology Diagnostics / R. Paschke [et al.] // Eur. Thyroid J. – 2017. – Vol. 6, № 3. – P. 115-129.
204. Evidence for transcriptional and posttranscriptional alterations of the sodium/iodide symporter expression in hypofunctioning benign and malignant thyroid tumors / S. Trouttet-Masson [et al.] // Am. J. Pathol. – 2004. – Vol. 165, № 1. – P. 25-34.
205. Expression of BRAF and its extracellular signal-regulated kinase 1/2 signal pathway in papillary thyroid cancer / W. Yi [et al.] // Endocr. Relat. Cancer June. – 2012. – Vol. 37, № 9. – P. 889-894.

206. Expression of BRAF V600E mutation in different thyroid lesions / W. Wang [et al.] // Zhonghua Zhong Liu Za Zhi. – 2011. – Vol. 33, № 5. – P. 354-357.
207. Expression of Galectin-3 in Fine-Needle Aspirates as a Diagnostic Marker Differentiating Benign from Malignant Thyroid Neoplasms / H. Inohara [et al.] // Cancer. – 1999. – Vol. 85, № 11. – P. 2475-2484.
208. Expression of PAX8-PPAR gamma 1 rearrangements in both follicular thyroid carcinomas and adenomas / A.R. Marques [et al.] // J. Clin. Endocrinol. Metab. – 2002. – Vol. 87. – P. 3947-3952.
209. Eze, O.P. The role of epigenetic alterations in papillary thyroid carcinogenesis / O.P. Eze, L.F. Starker, T. Carling // J. Thyroid Res. – 2011. – Vol. 2011. – 7 p.
210. Follicular variant of papillary thyroid carcinoma: comparative study of histopathologic features and cytology resalts in 141 patients / J.M. Khan [et al.] // Endocr. Pract. – 2001. – Vol. 7, № 2. – P. 139-142.
211. Functional characterization of the novel BRAF complex mutation, BRAF(V600delinsYM), identified in papillary thyroid carcinoma / M. Matsuse [et al.] // Int. J. Cancer. – 2013. – Vol. 132, № 3. – P. 738-743.
212. Furlanetto, T.W. Estrogen increases proliferation and down-regulates the sodium/iodide symporter gene in FRTL-5 / T.W. Furlanetto, L.Q. Nguyen, J.L. Jameson // Endocrinology – 1999. – Vol. 140 – P. 5705-5711.
213. Galectin-3 and CD44v6 Isoforms in the Preoperative Evaluation of Thyroid Nodules / A. Gasbarri [et al.] // J. Clin. Oncology. – 1999. – Vol. 17, № 11. – P. 3494-3502.
214. Galectin-3 and HBME-1 expression in well-differentiated thyroid tumors with follicular architecture of uncertain malignant potential / M. Papotti [et al.] // Modern Pathology. – 2005. – Vol. 18. – P. 541-546.
215. Galectin-3 and Ki-67 expression in multiglandular parathyroid lesions / E. Saggiorato [et al.] // Am. J. Clin. Pathol. – 2006. – Vol. 126, № 1. – P. 59-66.
216. Galectin-3 as a presurgical immunocytodiagnostic marker of minimally invasive follicular thyroid carcinoma / E. Saggiorato [et al.] // J. Clin. Endocrin Met. – 2001. – Vol. 86, № 11. – P. 5152-5158.

217. Galectin-3-expression analysis in the surgical selection of follicular thyroid nodules with indeterminate fine-needle aspiration cytology: a prospective multicentre study / A. Bartolazzi [et al.] // Lancet Oncol. – 2008. – № 9. – P. 543-549.
218. Galectin-3, fibronectin-1, CITED-1, HBME1 and cytokeratin-19 immunohistochemistry is useful for the differential diagnosis of thyroid tumors / M. Prasad [et al.] // Modern Pathology. – 2005. – Vol. 18. – P. 48-57.
219. Galectin-3 is a presurgical marker of human thyroid carcinoma / F. Orlandi [et al.] // Cancer Res. – 1998. – Vol. 58. – P. 3015-3020.
220. Galectin-3 Messenger Ribonucleic Acid and Protein Are Expressed in Benign Thyroid Tumors / L. Martins [et al.] // J. Clin. Endocrinol. Metabolism. – 2002. – Vol. 87, № 10. – P. 4806-4810.
221. Galectin-3 Performance in Histologic a Cytologic Assessment of Thyroid Nodules: A Systematic Review and Meta-Analysis / P. Trimboli [et al.] // Int. J. Mol. Sci. – 2017. – Vol. 18, № 8. – P. 1-11.
222. Gender-Specific Variation in the Prognosis of Papillary Thyroid Cancer TNM Stages II to IV / S.H. Hsieh [et al.] // Int. J. Endocrinol. – 2012. – Vol. 37. – P. 90-97.
223. Genetic and biological subgroups of low-stage follicular thyroid cancer / C. French [et al.] // Am. J. Pathol. – 2003. – Vol. 162. – P. 1053-1060.
224. Gerard, E.M. Surgical Endocrinology / E.M. Gerard, D. Skogseid, B. Skogseid. – Philadelphia, 2000. – 618 p.
225. Gómez Sáez, J.M. Diagnostic and prognostic markers in differentiated thyroid cancer / J.M. Gómez Sáez // Curr. Genomics. – 2011. – Vol. 12, № 8. – P. 597-608.
226. Hagag, P. Role of ultrasoundguided fine-needle aspiration biopsy in evaluation of nonpalpable thyroid nodules / P. Hagag, S. Strauss, M. Weiss // Thyroid. – 1998. – Vol. 8. – P. 989-995.
227. Harach, H.R. Occult papillary carcinoma of the thyroid. A «normal» finding in Finland. A systematic autopsy study / H.R. Harach, K.O. Franssila, V.M. Wasenius // Cancer. – 1985. – Vol. 56, № 3. – P. 531-538.

228. Hay, I.D. Managing patients with papillary thyroid carcinoma: insights gained from the Mayo Clinic's experience of treating 2512 consecutive patients during 1940 through 2000 / I.D. Hay, W.M. McConahey, J.R. Goellner // Trans. Am. Lin. Clin. Assoc. – 2002. – Vol. 113. – P. 241-260.
229. High prevalence and possible de novo formation of BRAF mutation in metastasized papillary thyroid cancer in lymph nodes / V. Vasko [et al.] // J. Clin. Endocrinol. Metab. – 2005. – Vol. 90. – P. 5265-5269.
230. High prevalence of BRAF mutations in thyroid cancer: genetic evidence for constitutive activation of the RET/PTC-RAS-BRAF signaling pathway in papillary thyroid carcinoma / E.T. Kimura [et al.] // Cancer Res. – 2003. – Vol. 63. – P. 1454-1457.
231. High rate of BRAF and RET/PTC dual mutations associated with recurrent papillary thyroid carcinoma / Y.C. Henderson [et al.] // Clin. Cancer Res. – 2009. – Vol. 15, № 2. – P. 485-491.
232. Hypermethylation of a New Distal Sodium/Iodide Symporter (NIS) enhancer (NDE) is associated with reduced NIS expression in thyroid tumors / A.L. Galrão [et al.] // J. Clin. Endocrinol. Metab. – 2014. – Vol. 99, № 6. – P. 944-952.
233. Immunocytochemistry of cytokeratins in primary human liver tumors / P. Eyken [et al.] // APMIS. – 1991. – Vol. 23, suppl. – P. 77-85.
234. Immunohistochemical analysis of sodium iodide symporter expression in metastatic differentiated thyroid cancer: correlation with radioiodine uptake / M.R. Castro [et al.] // J. Clin. Endocrinol. Metab. – 2001. – Vol. 86, № 11. – P. 5627-5632.
235. Immunohistochemical expression of galectin-3 in benign and malignant thyroid lesions / M.E. Herrmann [et al.] // Arch. Pathol. Lab. Med. – 2002. – Vol. 126. – P. 710-713.
236. Incidence of thyroid cancer in Italy, 1991-2005: time trends and age-period-cohorteffects / L. Maso [et al.] // Ann. Oncology. – 2011. – Vol. 22, № 4. – P. 957-963.

237. Increased incidence of differentiated thyroid carcinoma and detection of subclinical disease / W.D.T. Kent [et al.] // Canadian Med. Association J. – 2007. – Vol. 177, № 11. – P. 1357-1361.
238. Increasing incidence of thyroid cancer is due to increased pathologic detection / S. Grodski [et al.] // Surgery. – 2008. – Vol. 144, № 6. – P. 1038-1043.
239. Inhibiting β-catenin expression promotes efficiency of radioiodine treatment in aggressive follicular thyroid cancer cells probably through mediating NIS localization / L. Lan [et al.] // Oncol. Rep. – 2017. – Vol. 37, № 1. – P. 426-434.
240. Initial therapy with either thyroid lobectomy or total thyroidectomy without radioactive iodine remnant ablation is associated with very low rates of structural disease recurrence in properly selected patients with differentiated thyroid cancer / F. Vaisman [et al.] // Clin. Endocrinol. (Oxf). – 2011. – Vol. 75, № 1. – P. 112-119.
241. Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) is upregulated in aggressive papillary thyroid carcinoma / D. Buitrago [et al.] // Ann. Surg. Oncol. – 2012. – Vol. 19, № 3. – P. 973-980.
242. International patterns and trends in thyroid cancer incidence, 1973-2002 / B. Kilfoy [et al.] // Cancer Causes and Control. – 2009. – Vol. 20, № 5. – P. 525-531.
243. Investigation of BRAF V600E Mutation in Papillary Thyroid Carcinoma and Tumor-Surrounding Nontumoral Tissues / A. Daclar-Aday [et al.] // DNA Cell Biol. – 2013. – Vol. 32, № 1. – P. 13-18.
244. Involvement of the PAX8/peroxisome proliferator-activated receptor gamma rearrangement in follicular thyroid tumors / T. Dwight [et al.] // J. Clin. Endocrinol. Metab. – 2003. – Vol. 88. – P. 4440-4445.
245. Iodic symporter gene expression in human thyroid rumors / F. Arturi [et al.] // J. Clin. Endocrinol. Metab. – 1998. – Vol. 83. – P. 2493.
246. Is the BRAF(V600E) mutation useful as a predictor of preoperative risk in papillary thyroid cancer? / J.K. Nam [et al.] // Am. J. Surg. – 2012. – Vol. 203, № 4. – P. 436-441.
247. Ito, Y. Is surgery necessary for papillary thyroid microcarcinomas? / Y. Ito, A. Miyauchi // Nat. Rev. Endocrinol. – 2012. – Vol. 8, № 1. – P. 9-25.

248. Kumar, A. Fine-needle aspiration cytology, onography and radionuclide scanning in solitary thyroid nodule / A. Kumar, M.M. Ahuja, T.K. Chattopadhyay // J. Assoc. Physicians India. – 1992. – Vol. 40, № 5. – P. 302-306.
249. Lee, J.H. Clinicopathologic significance of BRAF V600E mutation in papillary carcinomas of the thyroid: a meta-analysis / J.H. Lee, E.S. Lee, Y.S. Kim // Cancer. – 2007. – Vol. 110, № 1. – P. 38-46.
250. Lewis, M.H. The locality rule and the physician's dilemma: local medical practices vs the national standard of care / M.H. Lewis, J.K. Gohagan, D.J. Merenstein // JAMA. – 2007. – Vol. 297. – P. 2633-2637.
251. Lin, K.L. Screening of high-risk patients with papillary thyroid microcarcinoma by preoperative BRAF gene-mutation detection / K.L. Lin, X.H. Zhang, X.X. Dai // Zhonghua Zhong Liu Za Zhi. – 2011. – Vol. 33, № 2. – P. 130-131.
252. Lopes, J.P. BRAF gene mutation in the natural history of papillary thyroid carcinoma: diagnostic and prognostic implications / J.P. Lopes, E. Fonseca // Acta Med. Port. – 2011. – Vol. 24, suppl. 4. – P. 855-868.
253. Low expression of sodium iodide symporter expression in aggressive variants of papillary thyroid carcinoma / S. Wei [et al.] // Int. J. Clin. Oncol. – 2013. – Vol. 4. – P. 35-40.
254. Management Guidelines for patients with thyroid nodules and differentiated thyroid cancer / D.S. Cooper [et al.] // Thyroid. – 2006. – Vol. 16, № 2. – P. 1-33.
255. Matesa, N. Galectin-3 and CD44v6 positivity by RT-PCR method in fine needle aspirates of benign thyroid lesions / N. Matesa, I. Samija, Z. Kusić // Cytopathology. – 2007. – Vol. 18, № 2. – P. 112-116.
256. Mazzaferri, E.L. Long-term impact of initial surgical and medical therapy on papillary and follicular thyroid cancer / E.L. Mazzaferri, S.M. Jhiang // Am. J. Med. – 1997. – Vol. 97. – P. 418-428.
257. Mazzaferri, E.L. Management of a solitary thyroid nodule / E.L. Mazzaferri // New Engl. J. Med. – 1993. – Vol. 328, № 8. – P. 553-559.
258. Mazzaferri, E.L. Management of low-risk differentiated thyroid cancer / E.L. Mazzaferri // Endocr. Pract. – 2007. – Vol. 13. – P. 498-512.

259. Mazzaferri, E.L. Managing thyroid microcarcinomas / E.L. Mazzaferri // Yonsei Med. J. – 2012. – Vol. 53, № 1. – P. 1-14.
260. Mazzaferi, E.L. Solitary thyroid nodule / E.L. Mazzaferri // Postgrad. Med. – 1981. – Vol. 70, № 1. – P. 98-103.
261. Mehta, V. Use of molecular biomarkers in FNA specimens to personalize treatment for thyroid surgery / V. Mehta, Y.E. Nikiforov, R.L.Ferris // Head Neck. – 2013. – Vol. 35, № 10. – P. 1499-1506.
262. Melck, A.L. Predicting malignancy in thyroid nodules: molecular advances / A.L. Melck, L. Yip // Head Neck. – 2012. – Vol. 34, № 9. – P. 1355-1361.
263. Methylation levels of sodium-iodide symporter (NIS) promoter in benign and malignant thyroidtumors with reduced NIS expression / A.L. Galrio [et al.] // Endocrine. – 2013. – Vol. 43, № 1. – P. 225-229.
264. MicroRNA expression profile helps to distinguish benign nodules from papillary thyroid carcinomas starting from cells of fine-needle aspiration / P. Agretti [et al.] // Eur. J. Endocrinol. – 2012. – Vol. 167, № 3. – P. 393-400.
265. MicroRNA signature distinguishes the degree of aggressiveness of papillary thyroid carcinoma / L. Yip [et al.] // Ann. Surg. Oncol. – 2011. – Vol. 18, № 7. – P. 2035-2041.
266. Modifications in the papillary thyroid cancer gene profile over the last 15 years / C. Romei [et al.] // J. Clin. Endocrinol. Metab. – 2012. – Vol. 97, № 9. – P. 1758-1765.
267. Modulation of sodium iodide symporter in thyroid cancer / A. Lakshmanan [et al.] // Horm Cancer. – 2014. – Vol. 5, № 6. – P. 363-373.
268. Molecular genetics of papillary thyroid carcinoma: great expectations / V. Trovisco [et al.] // Arq. Bras. Endocrinol. Metabol. – 2007. – Vol. 51, № 5. – P. 643-653.
269. Molecular profile and clinical-pathologic features of the follicular variant of papillary thyroid carcinoma. An unusually high prevalence of ras mutations / Z. Zhu [et al.] // Am. J. Clin. Pathol. – 2003. – Vol. 120. – P. 71-77.

270. Molecular testing for mutations in improving the fine-needle aspiration diagnosis of thyroid nodules / Y.E. Nikiforov [et al.] // J. Clin. Endocrinol. Metab. – 2009. – Vol. 94. – P. 2092-2098.
271. Monocarboxylate transporter 8 deficiency: altered thyroid morphology and persistent high triiodothyronine/thyroxine ratio after thyroidectomy / E.K. Wirth [et al.] // Eur. J. Endocrinol. – 2011. – Vol. 165, № 4. – P. 555-561.
272. mRNA BRAF expression helps to identify papillary thyroid carcinomas in thyroid nodules independently of the presence of BRAFV600E mutation / P.P. Araujo [et al.] // Pathol. Res. Pract. – 2012. – Vol. 208, № 8. – P. 489-492.
273. Mutationally activated BRAF(V600E) elicits papillary thyroid cancer in the adult mouse / R.P. Charles [et al.] // Cancer Res. – 2011. – Vol. 71, № 11. – P. 3863-3871.
274. Muzafar, A. A study of Galactin-3 on fine needle aspiration as a diagnostic marker differentiating benign from malignant thyroid neoplasm / A. Muzafar, M.H. Bukhari, I.U. Qureshi // Pak. J. Med. Sci. – 2017. – Vol. 33, № 3. – P. 726-731.
275. N-linked glycosylation of the thyroid Na+/I- symporter (NIS). Implications for its secondary structure model / O. Levy [et al.] // J. Biol. Chem. – 1998. –Vol. 273. – P. 22657-22663.
276. Na+/I symporter activity is present in membrane evesicles from thyrotropin – deprivednon-I- transport in cultured thyroid cells / S.M. Kaminsky [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1994. – Vol. 91. – P. 3789-3793.
277. NADPH Oxidase NOX4 Is a Critical Mediator of $BRAF^{V600E}$-Induced Downregulation of the Sodium/Iodide Symporter in Papillary Thyroid Carcinomas / N. Azouzi [et al.] // Antioxid Redox Signal. – 2017. – Vol. 26, № 15. – P. 864-877.
278. Namba, H. Point mutations of ras oncogenes are an early event in thyroid tumorigenesis / H. Namba, S.A. Rubin, J.A. Fagin // Mol. Endocrinol. – 1990. – Vol. 4. – P. 1474-1479.

279. Nicola, J.P. Physiological sodium concentrations enhance the iodide affinity of the Na+/I- symporter / J.P. Nicola, N. Carrasco, L.M. Amzel // Nat. Commun. – 2014. – Vol. 3-5. – P. 3948.
280. Niedziela, M. Authors' Response: Methodological Considerations Regarding the Use of Galectin-3 Expression Analysis in Preoperative Evaluation of Thyroid Nodules / M. Niedziela, E. Korman // J. Clin. Endocrinol. Metabolism. – 2003. – Vol. 88, № 2. – P. 950-951.
281. Nikiforov, Y.E. Molecular diagnostics and predictors in thyroid cancer / Y.E. Nikiforov, M.N. Nikiforova // Thyroid. – 2009. – Vol. 19, № 12. – P. 1351-1361.
282. Nikiforov, Y.E. Molecular diagnostics of thyroid tumors / Y.E. Nikiforov // Arch. Pathol. Lab. Med. – 2011. – Vol. 135, № 5. – P. 569-577.
283. Nikiforov, Y.E. Molecular genetics and diagnosis of thyroid cancer / Y.E. Nikiforov, M.N. Nikiforova // Nat. Rev. Endocrinol. – 2011. – Vol. 7, № 10. – P. 569-580.
284. NIS mediates iodide uptake in the female reproductive tract and is a poor prognostic factor in ovarian cancer / G. Riesco-Eizaguirre [et al.] // J. Clin. Endocrinol. Metab. – 2014. – Vol. 99, № 7. – P. E1199-1208.
285. No correlation between BRAFV600E mutation and clinicopathological features of papillary thyroid carcinomas in Taiwan / R.T. Liu [et al.] // Clin. Endocrinol. (Oxf). – 2005. – Vol. 63, № 4. – P. 461-466.
286. Non-operative management of differentiated thyroid cancer in california: a population level analysis of 29,978 patients / E.J. Kuo [et al.] // Endocr. Pract. – 2017. – Vol. 23, № 10. – P. 1262-1269.
287. Overexpression of miR-221 is associated with aggressive clinicopathologic characteristics and the BRAF mutation in papillary thyroid carcinomas / Y.L. Zhou [et al.] // Med. Oncol. – 2012. – Vol. 29, № 5. – P. 3360-3366.
288. Padma, S. Radioiodine as an adjuvant therapy and its role in follow-up of differentiated thyroid cancer / S. Padma, P.S. Sundaram // J. Cancer Res. Ther. – 2016. – Vol. 12, № 3. – P. 1109-1113.

289. Papillary Microcarcinoma of the Thyroid: Clinical Characteristics and BRAF(V600E) Mutational Status of 977 Cases / X. Zheng [et al.] // Ann. Surg. Oncol. – 2013. – Vol. 20, № 7. – P. 2266-2273.
290. Papillary thyroid cancer in a patient with congenital goitrous hypothyroidism due to a novel deletion in NIS gene / P. Agretti [et al.] // Endocrine. – 2016. – Vol. 54, № 1. – P. 256-258.
291. Papini, E. A prospective randomized trial of levothyroxine suppressive therapy for solitary thyroid nodules / E. Papini, V. Bacci, C. Panunzi // Clin. Endocrinol. (Oxf). – 1993. – Vol. 38. – P. 507-513.
292. Pathological tumor – node -metastasis (pTNM) staging for papillary and follicular thyroid carcinomas: a retrospective analysis of 700 patients / K.C. Loh [et al.] // J. Clin. Endocrinol. Metab. – 1997. – Vol. 82. – P. 3553-3562.
293. PAX8-PPARgamma rearrangement in thyroid tumors: RT-PCR and immunohistochemical analyses / M.N. Nikiforova [et al.] // Am. J. Surg. Pathol. – 2002. – Vol. 26. – P. 1016-1023.
294. PAX8-PPARgamma rearrangement is frequently detected in the follicular variant of papillary thyroid carcinoma / P. Castro [et al.] // J. Clin. Endocrinol. Metab. – 2006 – Vol. 91. – P. 213-220.
295. PAX8-PPARgamma1 fusion oncogene in human thyroid carcinoma [corrected] / T.G. Kroll [et al.] // Science. – 2000. – Vol. 289. – P. 1357-1360.
296. Pazaitou-Panayiotou, K. Clinical features and therapeutic implication of papillary thyroid microcarcinoma / K. Pazaitou-Panayiotou, M. Capezzone, F. Pacini // Thyroid. – 2007. – Vol. 17. – P. 1085-1092.
297. Pratilas, C.A. Targeting oncogenic BRAF in human cancer / C.A. Pratilas, F. Xing, D.B. Solit // Curr. Top. Microbiol. Immunol. – 2012. – Vol. 355. – P. 83-98.
298. Predicting outcome in papillary thyroid carcinoma: development of a reliable prognostic scoring system in a cohort of 1779 patients surgically treated at one institution during 1940 through 1989 / I.D. Hay [et al.] // Surgery. – 1993. – Vol. 114. – P. 1050-1057.

299. Prediction of occult central lymph node metastasis in papillary thyroid carcinoma by preoperative BRAF analysis using fine-needle aspiration biopsy: a prospective study / J.Y. Joo [et al.] // J. Clin. Endocrinol. Metab. – 2012. – Vol. 97, № 11. – P. 3996-4003.
300. Preoperative BRAF mutation is predictive of occult contralateral carcinoma in patients with unilateral papillary thyroid microcarcinoma / Y.L. Zhou [et al.] // Asian Pac. J. Cancer Prev. – 2012. – Vol. 13, № 4. – P. 1267-1272.
301. Preoperative Diagnosis of Thyroid Cancer: towards avoiding a two stage approach / P. Mehrotra [et al.] // Am. Soc. Clin. Oncology. – 1999. – Vol. 76, № 12. – P. 1527-1535.
302. Preoperative staging of thyroid papillary carcinoma with ultrasonography / K. Shimamoto [et al.] // Eur. J. Radiol. – 1998. – Vol. 29. – P. 4-10.
303. Prevalence of activating ras mutations in morphologically characterized thyroid nodules / S. Ezzat [et al.] // Thyroid. – 1996. – Vol. 6. – P. 409-416.
304. Prognosis and prognostic factors of differentiated thyroid carcinoma after the appearance of metastasis refractory to radioactive iodine therapy / Y. Ito [et al.] // Endocr. J. – 2014. – Vol. 61, № 8. – P. 821-824.
305. Prognostic factors affecting neck lymph node recurrence and distant metastasis in papillary microcarcinoma of the thyroid: results of a study in 445 patients / G. Mercante [et al.] // Thyroid. – 2009. – Vol. 19. – P. 707-716.
306. Prognostic factors for recurrence of papillary thyroid carcinoma in the lymph nodes, lung, and bone: analysis of 5,768 patients with average 10-year follow-up / Y. Ito [et al.] // World J. Surg. – 2012. – Vol. 36, № 6. – P. 1274-1278.
307. Prognostic factors in patients with multiple recurrences of well-differentiated thyroid carcinoma / T. Holler [et al.] // J. Oncol. – 2009. – Vol. 2009. – P. 650340.
308. Prognostic Implications of miR-146b Expression and Its Functional Role in Papillary Thyroid Carcinoma / C.K. Chou [et al.] // J. Clin. Endocrinol. Metab. – 2013. – Vol. 98, № 2. – P. E196-205.

309. Prognostic prediction of BRAF (V600E) and its relationship with sodium iodide symporter in classic variant of papillary thyroid carcinomas / W.L. Gao [et al.] // Clin. Lab. – 2012. – Vol. 58, № 9-10. – P. 919-926.
310. Progression of solitary and multifocal papillary thyroid carcinoma – a retrospective study of 368 patients / X.Q. Zheng [et al.] // Chin. Med. J. – 2012. – Vol. 125, № 24. – P. 4434-4439.
311. Prophylactic Lymph Node Dissection for Papillary Thyroid Cancer Less than 2 cm: Implications for Radioiodine Treatment / S. Bonnet [et al.] // J. Clin. Endocrinol. Metab. – 2008 – Vol. 32. – P. 552-556.
312. Prospective multicenter study of thyroid carcinoma treatment: initial analysis of staging and outcome. National Thyroid Cancer Treatment Cooperative Study Registry Group / S.I. Sherman [et al.] // Cancer. – 1998. – Vol. 83. – P. 1012-1021.
313. Radiation exposure and thyroid cancer: a review / M.L. Iglesias [et al.] // Arch. Endocrinol. Metab. – 2017. – Vol. 61, № 2. – P. 180-187.
314. RAS point mutations and PAX8-PPAR gamma rearrangement in thyroid tumors: evidence for distinct molecular pathways in thyroid follicular carcinoma / M.N. Nikiforova [et al.] // J. Clin. Endocrinol. Metab. – 2003. – Vol. 88. – P. 2318-2326.
315. Recurrence of differentiated thyroid cancer in the elderly / C.S. Hollenbeak [et al.] // Eur. J. Endocrinol. – 2013. – Vol. 168. – P. 549-556.
316. Recurrent T354P mutation of the Na+/I- symporter in patients with iodide transport defect / H. Fujiwara [et al.] // J. Clin. Endocrinol. Metab. – 1998. – Vol. 83, № 8. – P. 2940-2943.
317. Reflex BRAF testing in thyroid fine-needle aspiration biopsy with equivocal and positive interpretation: a prospective study / A.J. Adeniran [et al.] // Thyroid. – 2011. – Vol. 21, № 7. – P. 717-723.
318. *RET*/*PTC* rearrangement affects multifocal formation of papillary thyroid carcinoma / X. Zhang [et al.] // Zhonghua Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi. – 2017. – Vol. 52, № 6. – P. 435-439.

319. Revised American Thyroid Association Management Guidelines for Patients with Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer / S. David [et al.] // Thyroid. – 2009. – Vol. 19, № 11. – P. 1167-1214.
320. Riesco-Eizaguirre, G. A perspective view of sodium iodide symporter research and its clinical implications / G. Riesco-Eizaguirre, P. Santisteban // Eur. J. Endocrinol. – 2006. – Vol. 155. – P. 495-512.
321. Rising thyroid cancer incidence in the United States by demographic and tumor characteristics, 1980-2005 / L. Enewold [et al.] // Cancer Epidemiol. Biomarkers Prevention. – 2009. – Vol. 18, № 3. – P. 784-791.
322. Risk of malignancy in nonpalpable thyroid nodules: Predictive value of ultrasound and color-Doppler features / E. Papini [et al.] // J. Clin. Endocrinol. Metab. – 2002. – Vol. 87. – P. 1941-1946.
323. Role of B-RAFV600E in differentiated thyroid cancer and preclinical validation of compounds against B-RAFV600E / C. Nucera [et al.] // Biochim. Biophys Acta. – 2009. – Vol. 1795. – P. 152-161.
324. Role of preoperative ultrasonography in the surgical management of patients with thyroid cancer / M.A. Kouvaraki [et al.] // Surgery. – 2003. – Vol. 134. – P. 946-954.
325. Role of ras mutation in the progression of thyroid carcinoma of follicular epithelial origin / N. Motoi [et al.] // Pathol. Res. Pract. – 2000 – Vol. 196. – P. 1-7.
326. Rousset, B. Molecular analyses of thyroid tumors for diagnosis of malignancy on fine-needle aspiration biopsies and for prognosis of invasiveness on surgical specimens / B. Rousset, L. Ziercher, F. Borson-Chazot // Ann. Endocrinol. (Paris). – 2011. – Vol. 72, № 2. – P. 125-128.
327. Rusinek, D. Gene expression profile of human thyroid cancer in relation to its mutational status / D. Rusinek, S. Szpak-Ulczok, B. Jarzab // J. Mol. Endocrinol. – 2011. – Vol. 47, № 3. – P. 91-103.
328. Saggiorato, E. Characterization of thyroid 'follicular neoplasms' in fine needle aspiration cytological specimen using a panel of immunohistochemical markers:

a proposal for clinical application / E. Saggiorato, R. De Pompa, M. Volante // Endocr. Relat. Cancer. – 2005. – Vol. 12, № 2. – P. 305-317.

329. Santoro, M. RET/PTC activation in papillary thyroid carcinoma: European Journal of Endocrinology Prize Lecture / M. Santoro, R.M. Melillo, A. Fusco // Eur. J. Endocrinol. – 2006. – Vol. 155. – P. 645-653.
330. Sapio, M.R. Combined analysis of galectin-3 and BRAFV600E improves the accuracy of fine-needle aspiration biopsy with cytological findings suspicious for papillary thyroid carcinoma / M.R. Sapio, A. Guerra, D. Posca // Endocrine-Related Cancer. – 2007. – Vol. 14, № 4. – P. 1089-1097.
331. Sarne, D.H. A piece of the puzzle: what does BRAF status mean in the management of patients with papillary thyroid carcinoma? / D.H. Sarne // J. Clin. Endocrinol. Metab. – 2012. – Vol. 97, № 9. – P. 3094-3096.
332. Savin, S.B. Expression of Galectin-1 and Galectin-3 in Human Fetal Thyroid Gland / S.B. Savin, D.S. Cveji, M.M. Jankovi / J. Histochemistry and Cytochemistry. – 2003. – Vol. 51. – P. 479-483.
333. Screening for Thyroid CancerUS Preventive Services Task Force Recommendation Statement / K. Bibbins-Domingo [et al.] // JAMA. – 2017. – Vol. 317, № 18. – P. 1882-1887.
334. Serum Thyrotropin Concentration as a Novel Predictor of Malignancy in Thyroid Nodules Investigated by Fine-Needle Aspiration / K. Boelaert [et al.] // J. Clin. Endocrinol. Metabolism. – 2006. – Vol. 91, № 11. – P. 4295-4301.
335. Sherman, S.I. Thyroid carcinoma / S.I. Sherman // Lancet. – 2003. – Vol. 361. – P. 501-511.
336. Signaling pathways in follicular cell-derived thyroid carcinomas (Review) / M. Romitti [et al.] // Int. J. Oncol. – 2013. – Vol. 42, № 1. – P. 19-28.
337. Smallridge, R.C. Anaplastic thyroid cancer: molecular pathogenesis and emerging therapies / R.C. Smallridge, L.A. Marlow, J.A. Copland // Endocr. Relat.Cancer. – 2009. – Vol. 16. – P. 17-44.
338. Sodium iodide symporter and pendrin expression in human thyroid tissues / C. Mian [et al.] // Thyroid. – 2001. – Vol. 11, № 9. – P. 825-830.

339. Study of peripheral BRAF(V600E) mutation as a possible novel marker for papillary thyroidcarcinomas / J.Y. Kwak [et al.] // Head Neck. – 2013. – Vol. 35, № 11. – P. 1630-1633.
340. Sumana, B.S. Galectin-3 Immunohistochemical Expression in Thyroid Neoplasms / B.S. Sumana, S. Shashidhar, A.S. Shivarudrappa // J. Clin. Diagn. Res. – 2015. – Vol. 9, № 11. – P. EC07-11.
341. Sunitinib inhibits papillary thyroid carcinoma with RET/PTC rearrangement but not BRAF mutation / W.J. Jeong [et al.] // Cancer Biol. Ther. – 2011. – Vol. 12, № 5. – P. 458-465.
342. Synergistic action of a RAF inhibitor and a dual PI3K/mTOR inhibitor in thyroid cancer / N. Jin [et al.] // Clin. Cancer Res. – 2011. – Vol. 17, № 20. – P. 6482-6489.
343. Talbot, J.N. PET in thyroid cancers / J.N. Talbot, F. Montravers, N. Younsi // Presse Med. – 2006. – Vol. 353, № 9. – P. 1377-1385.
344. Targeted expression of BRAF V600E in thyroid cells of transgenic mice results in papillary thyroid cancers that undergo dedifferentiation / J.A. Knauf [et al.] // Cancer Res. – 2005. – Vol. 65. – P. 4238-4245.
345. The association of the BRAFV600E mutation with prognostic factors and poor clinical outcome in papillary thyroid cancer. A meta-analysis / T.H. Kim [et al.] // Cancer. – 2012. – Vol. 118, Iss. 7. – P. 1764-1773.
346. The Bethesda System for Reporting Thyroid Cytopathology: a meta-analysis / M. Bongiovanni [et al.] // Acta Cytol. – 2012. – Vol. 56. – P. 333-339.
347. The Bethesda System for reporting thyroid fine-needle aspiration specimens / S. Crippa [et al.] // Am. J. Clin. Pathol. – 2010. – Vol. 134. – P. 343-344.
348. The Bethesda thyroid fine-needle aspiration classification system: year 1 at an academic institution / C.G. Theoharis [et al.] // Thyroid. – 2009. – Vol. 19. – P. 1215-1223.
349. The BRAF mutation is not associated with poor prognostic factors in Korean patients with conventional papillary thyroid microcarcinoma / T.Y. Kim [et al.] // Clin. Endocrinol. (Oxf). – 2005. – Vol. 63, № 5. – P. 588-593.

350. The BRAFV600E Mutation Is an Independent, Poor Prognostic Factor for the Outcome of Patients with Low-Risk Intrathyroid Papillary Thyroid Carcinoma: Single-Institution Results from a Large Cohort Study / R. Elisei [et al.] // J. Clin. Endocrinol. Metab. – 2012. – Vol. 97, № 12. – P. 4390-4398.
351. The BRAFV600E oncogene induces transforming growth factor beta secretion leading to sodium iodide symporter repression and increased malignancy in thyroid cancer / G. Riesco-Eizaguirre [et al.] // Cancer Res. – 2009. – Vol. 69, № 21. – P. 8317-8325.
352. The correlation of sodium iodide symporter and BRAF(V600E) mutation in classical variant papillary thyroid carcinoma / A. Yazgan [et al.] // Ann. Diagn. Pathol. – 2016. – Vol. 22. – P. 58-62.
353. The impact of subclinical disease and mechanism of detection on the rise in thyroid cancer incidence: a population-based study in Olmsted County, Minnesota during 1935 through 2012 / J.P. Brito [et al.] // Thyroid. – 2015. – Vol. 25. – P. 999-1007.
354. The influence of the BRAF V600E mutation in thyroid cancer cell lines on the anticancer effects of 5-aminoimidazole-4-carboxamide-ribonucleoside / H.J. Choi [et al.] // J. Endocrinol. – 2011. – Vol. 211, № 1. – P. 79-85.
355. The PAX8/PPARgamma fusion oncoprotein transforms immortalized human thyrocytes through a mechanism probably involving wild-type PPARgamma inhibition / J. Gregory Powell // Oncogene. – 2004. – Vol. 23. – P. 3634-3641.
356. The preeminence of growth pattern and invasiveness and the limited influence of BRAF and RAS mutations in the occurrence of papillary thyroid carcinoma lymph node metastases / C. Eloy [et al.] // Virchows Arch. – 2011. – Vol. 459, № 3. – P. 265-276.
357. The prevalence and prognostic value of BRAF mutation in thyroid cancer / E. Kebebew [et al.] // Ann. Surg. – 2007. – Vol. 246, № 3. – P. 466-470.
358. The relationship of the BRAF(V600E) mutation and the established prognostic factors in papillary thyroid carcinomas / B. Kurt [et al.] // Endocr. Pathol. – 2012. – Vol. 23, № 3. – P. 135-140.

359. The sodium/iodide symporter (NIS): characterization, regulation, and medical significance / O. Dohan [et al.] // Endocr. Rev. – 2003. – Vol. 24. – P. 48-77.
360. The Sodium/Iodide Symporter (NIS): Molecular Physiology and Preclinical and Clinical Applications / S. Ravera [et al.] // Annu Rev Physiol. – 2017. – Vol. 79. – P. 261-289.
361. The Thyroid Na+/I- Symporter: Molecular Characterization and Genomic Regulation / S. Lee [et al.] // Mol. Imaging Radionucl. Ther. – 2017. – Vol. 1. – P. 92-101.
362. Theoharis, C. The molecular diagnosis and management of thyroid neoplasms / C. Theoharis, S. Roman, J.A. Sosa // Curr. Opin. Oncol. – 2012. – Vol. 24, № 1. – P. 35-41.
363. Time trends for thyroid cancer in northwestern Spain: true rise in the incidence of micro and larger forms of papillary thyroid carcinoma / A. Rego-Iraeta [et al.] // Thyroid. – 2009. – Vol. 19, № 4. – P. 333-340.
364. Topstad, D. Thyroid cancer incidence in Canada: a national cancer registry analysis / D. Topstad, J.F. Dickinson // CMAJ Open. – 2017. – Vol. 5, № 3. – P. E612-E616.
365. Treatment and prognostic factors of papillary thyroid microcarcinoma / D. Giordano [et al.] // Clin. Otolaryngol. – 2010. – Vol. 35, № 2. – P. 118-124.
366. Trends in Thyroid Cancer Incidence and Mortality in the United States, 1974-2013 / H. Lim [et al.] // JAMA. – 2017. – Vol. 317, № 13. – P. 1338-1348.
367. Tuttle, R.M. Follow up approaches in thyroidcancer: a risk adapted paradigm / R.M. Tuttle, R. Leboeuf // Endocrinol. Metab. Clin. North Am. – 2008. – Vol. 37. – P. 419-435.
368. Tuttle, R.M. Perrier Updated American Joint Committee on Cancer/Tumor-Node-Metastasis Staging System for Differentiated and Anaplastic Thyroid Cancer (Eighth Edition): What Changed and Why? / R.M. Tuttle, B. Haugen, N.D. Perrier // Thyroid. – 2017. – Vol. 27, № 6. – P. 751-756.
369. Thyroid Cancer. A comprehensive Guide to Clinical Management / J. Figge [et al.] // Humana Press. – 2006. – Vol. 122. – P. 63-84.

370. Thyroid incidentaloma detected by fluorodeoxyglucose positron emission tomography/computed tomography: practical management algorithm / I.L. Nilsson [et al.] // World J. Surg. – 2011. – Vol. 35, № 12. – P. 2691-2697.
371. Thyroid papillary microcarcinoma: a descriptive and meta-analysis study / E. Roti [et al.] // Eur. J. Endocrinol. – 2008. – Vol. 159. – P. 659-679.
372. Thyroid stimulating hormone increases iodine uptake by thyroid cancer cells during BRAF silencing / D.A. Kleiman [et al.] // J. Surg. Res. – 2013. – Vol. 182, № 1. – P. 85-93.
373. Udelsman, R. Is total thyroidectomy the best possible surgical management for well – differentiated thyroid cancer? / R. Udelsman, A.R. Shaha // Lancet Oncology. – 2005. – Vol. 6, № 7. – P. 529-531.
374. Utilization of a MAB for BRAFV600E detection in papillary thyroid carcinoma / M. Bullock [et al.] // Endocr. Relat. Cancer. – 2012. – Vol. 19, № 6. – P. 779-784.
375. Value of preoperative ultrasonography in the surgical management of initial and reoperative papillary thyroid cancer / J.M. Stulak [et al.] // Arch. Surg. – 2006. – Vol. 141. – P. 489-494.
376. Venkat, R. Recent advances in the surgical treatment of differentiated thyroid cancer: a comprehensive review / R. Venkat, M.A. Guerrero // Scientific. World J. – 2013. – Vol. 8 – P. 324-327.
377. Visually discernible [18F]fluorodeoxyglucose uptake in papillary thyroid microcarcinoma: a potential new risk factor / M. Yun [et al.] // J. Clin. Endocrinol. Metabolism. – 2010. – Vol. 95, № 7. – P. 3182-3188.
378. Worldwide increasing incidence of thyroid cancer: update on epidemiology and risk factors / G. Pellegriti [et al.] // J. Cancer Epidemiol. – 2013. – Vol. 2013. – P. 965212.
379. Woyach, J.A. New therapeutic advances in the management of progressive thyroid cancer / J.A. Woyach, M.H. Shah // Endocrine-Related Cancer. – 2009. – Vol. 16. – P. 715-731.

380. Wu, L.S. Management of microcarcinomas (papillary and medullary) of the thyroid / L.S. Wu, S.A. Milan // Curr. Opin. Oncol. – 2013. – Vol. 25, № 1. – P. 27-32.
381. Xing, M. BRAF mutation in thyroid cancer / M. Xing // Endocr. Relat. Cancer. – 2005 – Vol. 12 – P. 245-262.
382. Xing, M. BRAFV600E mutation and papillary thyroid cancer: chicken or egg? / M. Xing // J. Clin. Endocrinol. Metab. – 2012. – Vol. 97, № 7. – P. 2295-2298.
383. Xing, M. Prognostic utility of BRAF mutation in papillary thyroid cancer / M. Xing // Mol. Cell. Endocrinol. – 2010. – Vol. 321, № 1. – P. 86-93.
384. Yu, L.G. Galectin-3 interaction with Thomsen-Friedenreich disaccharide on cancer-associated MUC1 causes increased cancer cell endothelial adhesion / L.G. Yu, N. Andrews, Q. Zhao // J. Biol. Chem. – 2007. – Vol. 282, № 1. – P. 773-781.
385. Zeiger, M.A. BRAF V600E Mutation Independently Predicts Central Compartment Lymph Node Metastasis in Patients with Papillary Thyroid Cancer / M.A. Zeiger, E.B. Schneider // Ann. Surg. Oncol. – 2013. – Vol. 20, № 1. – P. 3-4.

ПРИЛОЖЕНИЕ

Приложение А

(справочное)

Патент № 2548783

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

ПАТЕНТ

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2548783

СПОСОБ ДООПЕРАЦИОННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОБЪЕМА ХИРУРГИЧЕСКОГО ЛЕЧЕНИЯ ВЫСОКОДИФФЕРЕНЦИРОВАННОГО РАКА ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Патентообладатель(ли): ***государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования "Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.И. Павлова" Министерства здравоохранения Российской Федерации (RU)***

Автор(ы): ***см. на обороте***

Заявка № **2014121906**

Приоритет изобретения **29 мая 2014 г.**

Зарегистрировано в Государственном реестре изобретений Российской Федерации ***24 марта 2015 г.***

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(19) **RU** (11) **2 548 783** (13) **C1**

(51) МПК
G01N 33/50 (2006.01)

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: **2014121906/15, 29.05.2014**

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
29.05.2014

Приоритет(ы):
(22) Дата подачи заявки: **29.05.2014**

(45) Опубликовано: **20.04.2015** Бюл. № **11**

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: **БЕРШТЕЙН Л.М. Рак щитовидной железы: эпидемиология, эндокринология, факторы и механизмы канцерогенеза. Практическая онкология. Т. 8, N 1, 2007, с. 1-8. UA 60699 U (ГОСУДАРСТВЕННОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ "ИНСТИТУТ ЭНДОКРИНОЛОГИИ И ОБМЕНА ВЕЩЕСТВ ИМ. В. П. КОМИССАРЕНКО НАМН УКРАИНЫ) 25.06.2011 . MELLER J, BECKER W. The continuing importance of thyroid** (см. прод.)

Адрес для переписки:
197022, Санкт-Петербург, ул. Льва Толстого, 6-8, ПСПбГМУ им. И.П. Павлова, отдел правой охраны ОИС, Сахновской Г.Б.

(72) Автор(ы):
Семенов Дмитрий Юрьевич (RU),
Борискова Марина Евгеньевна (RU),
Колоскова Людмила Евгеньевна (RU),
Фарафонова Ульяна Валентиновна (RU)

(73) Патентообладатель(и):
государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования "Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.И. Павлова" Министерства здравоохранения Российской Федерации (RU)

RU 2548783 C1

RU 2548783 C1

(54) СПОСОБ ДООПЕРАЦИОННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОБЪЕМА ХИРУРГИЧЕСКОГО ЛЕЧЕНИЯ ВЫСОКОДИФФЕРЕНЦИРОВАННОГО РАКА ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

(57) Реферат:

Изобретение относится к медицине, к хирургии, к онкологии и может быть использовано при дооперационном определении объема хирургического лечения высокодифференцированного рака щитовидной железы. Сущность способа: в материале опухоли, взятом тонкоигольной аспирационной биопсией, определяют экспрессию натрий-йодного симпортера на мембране опухолевой клетки и при экспрессии менее 1% в объем операции дополнительно включают центральную лимфодиссекцию. Экспрессию натрий-йодного симпортера на мембране опухолевой клетки определяю методом проточной флуороцитометрии. Способ позволяет на основе дооперационного определения экспрессии натрий-йодного симпортера на мембране опухолевой клетки достоверно установить объем хирургического лечения высокодифференцированных раков щитовидной железы - папиллярного и фолликулярного. 1 з.п. ф-лы, 2 ил., 2 пр.

(56) (продолжение):
scintigraphy in the era of high-resolution ultrasound. Eur J Nucl Med Mol Imaging. 2002 Aug;29 Suppl 2:S425-38. Epub 2002 May 15. Найдено в PubMed, PMID: 12192542. FAGGIANO A. et al. A decrease