

На правах рукописи

РОГОВА Марина Олеговна

**МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ В
ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ ДИАГНОСТИКЕ СИНДРОМА
УЗЛОВОГО ЗОБА**

14.01.02. Эндокринология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Москва – 2022

Работа выполнена в федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования Первом Московском государственном медицинском университете имени И. М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский университет)

Научный руководитель:

Петунина Нина Александровна, доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАН

Научный консультант:

Донников Андрей Евгеньевич, кандидат медицинских наук

Официальные оппоненты:

Свириденко Наталья Юрьевна - доктор медицинских наук, профессор, заместитель директора Института клинической эндокринологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр эндокринологии» Минздрава России;

Бирюкова Елена Валерьевна - доктор медицинских наук, профессор кафедры эндокринологии и диабетологии лечебного факультета ФГБОУ ВО «Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.Е. Евдокимова» Минздрава России.

Ведущая организация – ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Минздрава России.

Защита состоится «14» сентября 2022 года в 15 часов на заседании Диссертационного совета Д 208.071.05 на базе ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава России по адресу: 125995, г. Москва, ул. Баррикадная, д. 2/1, стр. 1

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу: 125445, г. Москва, ул. Беломорская, д. 19 и на сайте <http://www.rmapo.ru/>

Автореферат разослан « _____ » _____ 2022 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета

Самсонова Любовь Николаевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы диссертации

Синдром узлового зоба объединяет в себе все очаговые образования в щитовидной железе (ЩЖ), отличающиеся друг от друга морфологической структурой, включая коллоидный зоб, фолликулярную аденому, кисты, рак щитовидной железы (РЩЖ), аутоиммунный тиреоидит с псевдоузобразованием и др. [Балаболкин М. И. и др. 2002]. В последние десятилетия отмечается рост частоты встречаемости рака щитовидной железы (РЩЖ), в основном, за счет высокодифференцированного папиллярного рака, на долю которого приходится 90% всех случаев среди мужчин и женщин [Маколина Н. П., Платонова Н. М. 2011; Черников Р. А. и др., 2013].

Успех лечения зависит от точной стратификации риска развития РЩЖ при первичной диагностике синдрома узлового зоба. Зачастую, именно врачи-эндокринологи сталкиваются с пациентами с впервые выявленной узловой патологией ЩЖ и, соответственно, определяют алгоритм первичной диагностики и дальнейшего ведения, а также проводят динамическое наблюдение за пациентом в послеоперационном периоде. Золотым стандартом в диагностике злокачественных образований ЩЖ является ТАБ с последующим цитологическим исследованием пунктата. Однако, около 25% результатов ТАБ имеют «неопределенное» цитологическое заключение (Bethesda III, IV, V). Наиболее актуальной проблемой на сегодняшний день являются категории III, IV по Bethesda (атипия неопределенного значения и фолликулярная неоплазия/подозрение на фолликулярную неоплазию), где риск рака широко варьирует от 6 до 40 % [Dimpi Desai et al., 2020]. Данной когорте пациентов проводятся повторные ТАБ, а в некоторых случаях – диагностические операции, что сопряжено, помимо экономических затрат, с риском серьёзных послеоперационных осложнений (2–10%), а в большинстве случаев – с необходимостью пожизненной заместительной терапии левотироксином и, как следствие, снижением качества жизни [Haugen B. R., et al. 2015; Семкина Г. В.,

Абросимов А. Ю., Абдулхабирова Ф. М., Ванушко В. Э. 2014; Моргунова Т. Б., и др. 2010]. В связи с этим не вызывает сомнения необходимость улучшения диагностической ценности методик предоперационной диагностики у пациентов с узловым зобом, особенно в случае с «неопределенным» цитологическим диагнозом, с целью своевременного выявления злокачественных образований.

Степень разработанности темы исследования

В настоящее время остаются вопросы, касающиеся предоперационной диагностики, а также лечебной тактики в отношении узловых образований, подозрительных на РЩЖ. В последние годы появились работы, показывающие возможность применения молекулярно-генетического исследования в качестве дополнительного диагностического метода при РЩЖ в случае «неопределённых» цитологических диагнозов [Bellevicine C. et al. 2020; Desai D., Lere M. et al. 2020; Сергейко С. В. и др. 2020]. В клинических рекомендациях Американской тиреоидологической ассоциации 2015 г. и Минздрава России от 2017 г., а затем в обновлении 2020 г., в качестве дополнительных диагностических методов исследования рекомендовано использовать молекулярно-генетическое тестирование на определение мутации V600E в генах BRAF, а также других генетических маркеров (RAS, RET/PTC, PAX8/PPAR- γ , TERT и т. д.). По настоящее время обсуждаются прогностические возможности данных маркеров в отношении РЩЖ на дооперационном этапе [Vinagre J. et al., 2013].

Таким образом, тенденция последних лет направлена не только на диагностику, но и на поиск надежных прогностических маркеров РЩЖ. Одним из перспективных направлений в этой области на сегодняшний день является исследование уровня экспрессии miRNA, который может служить универсальным диагностическим и прогностическим маркером РЩЖ [Лукьянов С. А. и др., 2020; He H. et al. 2005].

В связи с вышеизложенным представляется актуальным изучение определения экспрессии miRNA у пациентов с узловым зобом при подозрении

на РЩЖ. Изучение корреляции молекулярно-генетических маркеров со злокачественным потенциалом опухоли помогут оптимизировать современные диагностические и терапевтические подходы у пациентов с синдромом узлового зоба в случае «неопределенного цитологического диагноза».

Цель исследования

Оптимизация подходов к дифференциальной диагностике и терапии узлового зоба с учетом определения диагностических и прогностических факторов риска рака щитовидной железы путем проведения молекулярно-генетического тестирования.

Задачи исследования

1. Выявить частоту встречаемости злокачественных и доброкачественных образований щитовидной железы по данным гистологического исследования, в группе больных с цитологическим диагнозом из категории III–VI по классификации Bethesda, направленных на оперативное лечение.

2. Выявить ультразвуковые характеристики, коррелирующие с риском злокачественного образования щитовидной железы у пациентов с узловым зобом.

3. Определить частоту встречаемости цитологических диагнозов, относящихся к III, IV категориям согласно Bethesda Thyroid Classification по данным тонкоигольной аспирационной биопсии.

4. Провести сравнительный анализ послеоперационных образцов путем проведения молекулярно-генетического тестирования (определение уровня экспрессии miRNA и HMGA2, мутации V600E в гене BRAF) в группах доброкачественных и злокачественных образований ЩЖ.

5. Оценить возможную корреляцию данных маркеров (miRNA, HMGA2, BRAFV600E) с неблагоприятным онкологическим прогнозом.

Объект и предмет исследования: Объект исследования – пациенты, прооперированные с подозрением на РЩЖ по данным цитологического заключения (Bethesda III-VI). Предмет исследования – клиничко-лабораторные и

молекулярно-генетические маркеры диагностики и прогнозирования течения РЩЖ.

Научная новизна. Доказана эффективность использования молекулярно-генетических маркеров в диагностике и прогнозировании течения рака щитовидной железы у пациентов с узловым зобом. Установлена связь между наличием мутации BRAFV600E, профилем экспрессии miRNA и риском злокачественности узлового образования и агрессивного течения рака щитовидной железы. Разработана диагностическая и прогностическая модель на основе определения уровня экспрессии miRNA.

Теоретическая и практическая значимость

Разработана научная концепция о взаимосвязи между молекулярно-генетическим профилем и злокачественным потенциалом узлового образования ЩЖ. Уточнена роль молекулярно-генетических маркеров в развитии РЩЖ.

Усовершенствованы диагностические и лечебные подходы к ведению пациентов с синдромом узлового зоба на основании изучения молекулярно-генетических маркеров.

Решена научная задача по созданию диагностической и прогностической панелей на основе определения уровня экспрессии miRNA (miR145, miR451 и miR7) для дифференциальной диагностики доброкачественных и злокачественных образований у пациентов с синдромом узлового зоба, а также для определения агрессивного потенциала опухоли в случае подтверждения РЩЖ.

Методология и методы исследования

В ходе выполнения исследования был применен комплексный методологический подход с использованием общеклинических, инструментальных, лабораторных, а также аналитических, статистических и специальных (определение экспрессии 12 miRNA и гена HMGA2, мутации V600E в гене BRAF) методов. На основании анализа научной литературы

отечественных и зарубежных авторов сконструирована исследовательская деятельность.

Положения, выносимые на защиту

1. Неопределенный цитологический диагноз (Bethesda III, IV) имеет высокую частоту встречаемости (57%) у пациентов с узловым зобом, что требует дальнейшего усовершенствования методов дифференциальной диагностики.

2. BRAF мутация является специфическим диагностическим маркером папиллярного рака щитовидной железы, но не коррелирует с неблагоприятными гистологическими характеристиками.

3. Предложенные диагностическая и прогностическая модели, включающие 3 miRNA более эффективны в дифференциальной диагностике узловой патологии щитовидной железы по сравнению с отдельными молекулярно-генетическими маркерами, и могут быть использованы для стратификации риска рака щитовидной железы, а также более просты и экономичны в применении по сравнению с панелями, включающими большое количество молекулярно-генетических маркеров.

Личный вклад автора. Соискателем проведен поиск научной литературы, сформулирована проблема и научная идея диссертационной работы, выполнено планирование исследования, статистическая обработка и научное обобщение полученных результатов. Автором лично проведен анализ медицинской документации, отбор пациентов для включения в исследование, а также отбор цитологических препаратов для пересмотра одним специалистом морфологом. В ходе выполнения исследования соискателем проводилось клиническое ведение пациентов, выполнение инструментальных методов исследования, а также пункционной биопсии узловых образований щитовидной железы, совместно со специалистом ультразвуковой диагностики.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности. Научные положения диссертации соответствуют специальности 14.01.02. Эндокринология, полученные результаты соответствуют области исследования

по специальности, пунктам 3, 4, 5 паспорта специальности: п. № 3. Цитогенетика эндокринных заболеваний: идентификация генов гормонов, генов рецепторов гормонов и генов других молекул, идентификация генетических дефектов, обуславливающих развитие эндокринных заболеваний. Выявление молекулярно-генетических маркеров предрасположенности к эндокринным болезням, разработка методов прогнозирования и ранней диагностики эндокринных заболеваний; п. № 4. Этиология и патогенез эндокринных заболеваний, клинические проявления, методы диагностики заболеваний эндокринной системы с использованием клинических, лабораторных, инструментальных и других методов исследования, дифференциальная диагностика различных форм нарушения гормональной регуляции; п. № 5. Лечение эндокринных заболеваний: гормонотерапия, химиотерапия, хирургическая коррекция, лучевая терапия, патогенетическая терапия. Разработка новых методов лечения эндокринных заболеваний (генотерапия, поиск локаторов и стимуляторов секреции гормонов и др.).

Степень достоверности и апробация результатов исследования

Проведение исследования было одобрено локальным комитетом по этике Первого МГМУ имени И. М. Сеченова (регистрационный номер № 07-21, дата проведения заседания 28.04.2021). Достоверность результатов исследования подтверждается использованием современных методов исследования, соответствующих цели и задачам и подкреплены адекватной статистической обработкой данных 140 пациентов. Выводы и практические рекомендации закономерно вытекают из результатов исследования и подтверждают положения, выносимые на защиту. Диссертационная работа прошла апробацию на заседании кафедры эндокринологии ИКМ им. Н. В. Склифосовского ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И. М. Сеченова Минздрава России 22.01.2021, протокол заседания № 8. Основные положения диссертации были представлены и обсуждены на научно-практических конференциях: Российская конференция с международным участием «Эндокринология: вызовы 21-го века» (г. Москва,

28.10.2020), 43rd Annual Meeting of the European Thyroid Association (Virtual Conference, 2021 September 4–7).

Внедрение результатов исследования в практику. Полученные данные используются при подготовке студентов, клинических ординаторов, аспирантов и при повышении квалификации врачей на кафедре эндокринологии Институт клинической медицины им. Н. В. Склифосовского Сеченовского университета. Алгоритм ведения пациентов с подозрением на рак щитовидной железы используется в практической работе ГКБ 67 им Л. А. Ворохобова г. Москвы и ДКЦ№1 ДЗМ.

Публикации: По теме диссертации опубликовано 6 статей в ведущих рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК РФ, включая 3 статьи в журналах, индексируемом в международной базе Scopus.

Структура и объем диссертации

Диссертационное исследование изложено на 95 страницах, состоит из введения, обзора литературы, результатов собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций и списка используемой литературы.

Работа включает 11 таблиц и 6 рисунков. Список литературы состоит из 141 библиографического источника, 118 иностранных публикаций и 23 отечественных.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материал и методы исследования

Работа была проведена в два этапа. На I этапе ретроспективно изучены данные 140 пациентов, которые были распределены по группам согласно дизайну исследования. На II этапе проведено молекулярно-генетическое исследование послеоперационных гистологических образцов (Рисунок 1). Основным критерием исключения было недостаточное количество клеточного материала для проведения молекулярно-генетического исследования.

Всем пациентам проводилось дооперационное цитологическое исследование с интерпретацией результатов согласно современной международной цитологической классификации (Bethesda Thyroid Classification, 2009, 2017), УЗИ ЩЖ, оценка тиреоидного статуса. Результаты цитологического исследования, а также клиничко-лабораторные данные были сопоставлены с данными гистологического исследования. Показанием к операции явились результаты цитологического исследования (Bethesda III–VI), а также наличие узла большого размера, вызывающего компрессионный синдром (сдавление и смещение трахеи, пищевода). Ультразвуковое исследование ЩЖ проводили в кабинете функциональной диагностики УКБ №1 на аппарате Medison SonoAceX8c линейным датчиком 7–10 МГц.

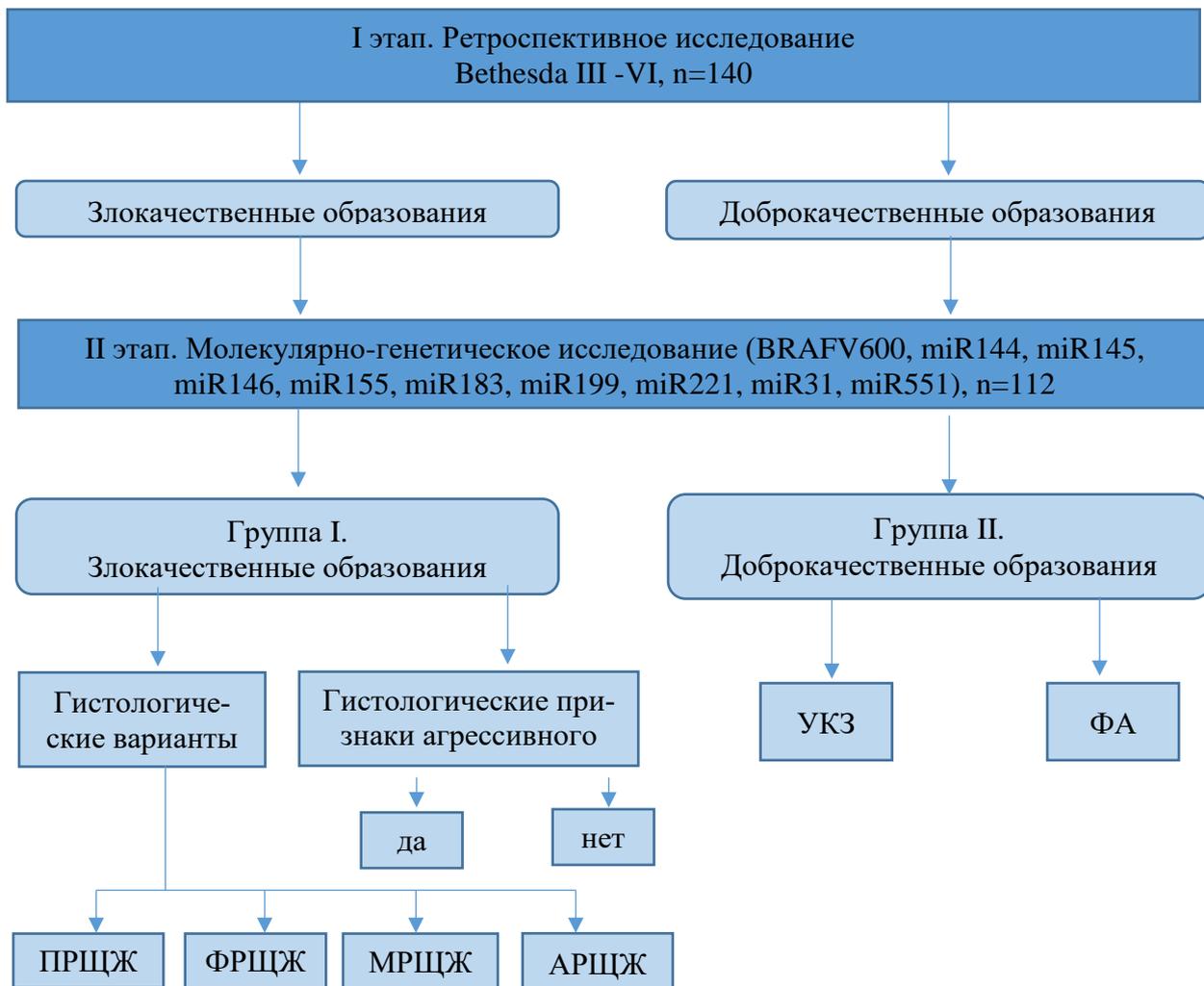


Рисунок 1 - Группы исследования

Функцию ЩЖ оценивали путем анализа уровня ТТГ сыворотки крови по данным истории болезни. Исследование проводилось иммунохемилюминисцентным методом при помощи автоматического анализатора Immulite-200 (Diagnostic Products Corporation, США). За референсные значения принимали уровень ТТГ 0,4–4 мЕд/л.

Результат цитологического исследования, полученного в ходе ТАБ, оценивали согласно системе Bethesda Thyroid Classification, 2009, 2017.

Окончательный диагноз был установлен на основании гистологического заключения. Все образцы цитологического и гистологического исследования были верифицированы одним специалистом (зав. Централизованным патологоанатомическим отделением Сеченовского университета, доцент, к. м. н. Парамонова Н. Б). Все случаи РЩЖ классифицированы клинически по системе TNM (Американский объединенный комитет по раку (AJCC), 8-е издание, 2017 г.)

На базе Института молекулярной и клеточной биологии Сибирского отделения Российской академии наук (ИМКБ СО РАН) было проведено молекулярно-генетическое тестирование 112 послеоперационных гистологических образцов для исследования следующих маркеров: уровни экспрессии гена HMGA2, 12 miRNA (miR144, miR145, miR146, miR155, miR183, miR199, miR221, miR31, miR551, miR375, miR451, miR7); мутация V600E в гене BRAF.

Статистический обработка данных выполнялась с помощью пакета статистических программе «Excel» («Microsoft») и с помощью программы «Statistica 8» («Statsoft Inc»).

Результаты исследования и их обсуждение

На I этапе были проанализированы данные 140 пациентов с узловым зобом, прооперированных в одном центре за 2018 г. с подозрением на РЩЖ, было выявлено, что среди пациентов преобладали женщины, с соотношением

мужчины и женщины 1: 3,6. Средний возраст включенных пациентов составил 49 [19; 79] лет (Таблица 1). Анализ возрастного состава больных свидетельствовал о значительной доле пациентов молодого возраста (18–44 года) – 40%. На долю пациентов средней возрастной группы (45–59 лет) приходилось 35,8%. Доля пациентов в возрасте 60–74 лет составила 17,1%, старше 75 лет – 7,1%. Таким образом, большая часть – это пациенты трудоспособного возраста, что говорит о социальной значимости изучаемой проблемы. Большинство пациентов имели узлы более 1 см. Обращает на себя внимание, что 19,2% прооперированных имели узел менее 1 см. Оценка тиреоидного статуса показала, что 120 пациентов находились в эутиреозе без терапии со средним уровнем ТТГ $1,8 \pm 1,1$ мкМЕ/мл, 6 пациентов – с гипофункцией ЩЖ и 20 пациентов – с гиперфункцией ЩЖ. Средний объем ЩЖ составил $33,0 \pm 27,2$ мл.

Таблица 1 – Общая характеристика пациентов

Характеристика		Всего n = 140	%
Пол*	муж	30	21,4
	жен	110	78,5
Средний возраст, лет	49 [19; 79]		
Размер узла, см*	< 1	27	19,2
	≥ 1	113	80,7
Средний объем ЩЖ, см ³ **		33,0±27,2	
Средний размер узла, мм		20 [1; 72,4]	
<i>Примечание.</i> * – данные представлены как абсолютные значения и %; ** – данные представлены как среднее ± стандартное отклонение			

Всем пациентам было проведено хирургическое лечение. Объем операции зависел от размера узла, количества узлов, признаков метастатического поражения регионарных лимфоузлов по данным УЗИ ЩЖ, а также результатов цитологического исследования. В 60% случаев была проведена тиреоидэктомия, из которых 55,9% – с лимфодиссекцией, 40% случаев – гемитиреоидэктомия. В ходе анализа результатов послеоперационного гистологического исследования рак был подтвержден у 98 пациентов (71,5%). Основная доля приходилась на

ПРЦЖ – 87,7%, 6,1% – ФРЦЖ, 4,5% – МРЦЖ и 1,7%. Остальные 42 пациента (28,5%) после оперативного лечения имели доброкачественный заключительный гистологический диагноз, среди которого 90,5% приходилось на фолликулярную аденому и 9,5% на узловой коллоидный зоб.

Анализ распределения пациентов со злокачественными образованиями ЩЖ по стадиям TNM показал, что большинство пациентов имели стадию T1 или T2 без регионарных или отдаленных метастазов (Таблица 2). У 13 (13,4%) пациентов отмечалась инвазия в капсулу узла, 4 пациента (4%) имели инвазию в лимфатические сосуды, а в 12,2% случаев отмечалась мультицентричность. Метастатическое поражение лимфоузлов отмечалось у 30,5% пациентов, отдаленные метастазы выявлены у одного пациента с АРЦЖ.

Таблица 2 – Распределение пациентов с РЦЖ по стадиям TNM – классификация 8-го пересмотра (n = 98)

Стадия T	Стадия N	Стадия M	Количество пациентов
T1	N0	M0	47 (47,9%)
	N1	M0	10 (10,2%)
T2	N0	M0	12 (12,2%)
	N1	M0	8 (8,1%)
T3	N0	M0	7 (7,1%)
	N1	M0	11 (11,2%)
T4	N0	M0	1 (1,02%)
	N1	M0	1 (1,02%)
	N1	M1	1 (1,02%)

Примечание. Данные представлены как абсолютные значения и %

По результатам гистологического исследования пациенты были разделены на две группы – с РЦЖ (98 пациентов) и доброкачественными образованиями ЩЖ (42 пациента). Анализ подгрупп не выявил достоверной разницы в уровне предоперационного ТТГ, объеме ЩЖ и локализации узлов (Таблица 3). Размер узлов оказался достоверно больше в группе с доброкачественными образованиями, $[24,1 \pm 1,88]$ мм против $[17,9 \pm 1,37]$ мм ($p = 0,001$). При сравнении ультразвуковых характеристик узлов, ассоциированных с признаками злокачественности узла, значимыми оказались наличие кальцинатов в узле, 14,2% против 35,7% ($p = 0,018$);

неровность/нечеткость контуров узлового образования, 9,5% против 56,7% ($p = 0,001$); гипоехогенность узла, 38% против 82% ($p = 0,001$). В группе пациентов с цитологическим заключением Bethesda III чаще выявлялись доброкачественные образования, в группе пациентов Bethesda IV достоверно чаще встречались злокачественные образования. Случаев отягощенной наследственности по РЩЖ у пациентов, включенных в исследование, не было выявлено.

На II этапе было выполнено молекулярно-генетическое исследование включенных в исследование послеоперационных гистологических образцов. На основе данных гистологического исследования образцы были разделены на 2 группы: I группа представлена злокачественными образованиями ЩЖ ($n = 54$). Во II группу (группа контроля) вошли доброкачественные образования ЩЖ ($n = 58$): фолликулярная аденома – 30, коллоидный зоб – 28. Пациенты первой группы были разделены согласно гистологическим вариантам РЩЖ: ПРЩЖ ($n = 47$), ФРЩЖ ($n = 3$), МРЩЖ ($n = 2$), анапластический РЩЖ ($n = 2$). Также пациенты II группы разделены по факту наличию/отсутствию гистологических признаков агрессивного течения РЩЖ: (1) подгруппа с наличием одного и более признаков ($n = 31$): мультицентричность, инвазия в капсулу узла и капсулу щитовидной железы, инвазия в лимфатические сосуды, наличие регионарных или отдаленных метастазов; (2) подгруппа с отсутствием признаков агрессивного течения опухоли ($n = 23$). Отдельно оценивали все известные случаи рецидива 13% ($n = 8$).

Таблица 3 – Сравнительный анализ групп пациентов с доброкачественными и злокачественными образованиями щитовидной железы

	Доброкачественные образования ($n = 42$)	РЩЖ ($n = 98$)	p
Размер узлов, мм*	24,1±1,9	17,9±1,4	0,001
Общий объем, мл*	38,9±5,3	30,8±2,4	0.1
Кальцинаты	6 (14,3%)	35 (35,7%)	0,018
Локализация узла:			
– доля**	39 (92,9%)	87 (88,7%)	0,56

– перешеек**	1 (2,4%)	5 (5,1%)	0,33	
Нечеткость/неровность контуров**	5 (11,9%)	55 (56,1%)	0,001	
Гипоэхогенность узла**	16 (38%)	80 (81,6%)	0,001	
ТТГ, мкМЕ/мл*	1,7±0,3	1,8±0,2	0,702	
Bethesda**	III	3 (75,0%)	1 (25,0%)	0,001
	IV	36 (47,3%)	40 (52,7%)	0,004
	V	3 (10,7%)	25 (89,3%)	0,001
	VI	–	32 (100%)	–
<i>Примечание.</i> * – данные представлены как среднее ± стандартное отклонение, t-тест; ** – данные представлены как абсолютные значения и %, χ^2 -тест. Уровень статистической значимости различий между группами $p < 0,05$				

По результатам дооперационного цитологического исследования 76 человек имели образования из категории Bethesda IV, 32 человек – Bethesda VI, 28 человек – Bethesda V и 4 пациента – Bethesda III.

По результатам гистологического исследования в группе Bethesda III у трех пациентов диагностирована фолликулярная аденома, и папиллярный рак в одном случае. Риск рака для пациентов из группы с цитологическим диагнозом Bethesda III составил 25,0%. В группе Bethesda IV рак ЩЖ определен у 40 человек, у 4 пациентов – узловой коллоидный зоб, у 32 – фолликулярные аденомы. Риск РЩЖ составил 52,6%. В группе Bethesda V рак ЩЖ верифицирован у 25 пациентов, из которых 21 имели ПРЩЖ, а в трех случаях диагностирована фолликулярная аденома с низким злокачественным потенциалом, 3 случая МРЩЖ и в 1 случае – АРЩЖ. Риск рака ЩЖ составил 85%. В группе Bethesda VI все пациенты имели гистологически верифицированный РЩЖ, из них 28 – ПРЩЖ, 2 – АРЩЖ, 1 – ФРЩЖ и 1 – МРЩЖ.

Таким образом, 80 пациентов (57%) имели неопределенный цитологический диагноз – атипия неопределенного значения или подозрение на фолликулярную неоплазию (Bethesda III и Bethesda IV), из них 41 пациент (51%) в результате окончательного гистологического диагноза имели злокачественное образование, а остальные 39 пациентов (49%) прооперированы с

доброкачественными узлами (фолликулярная аденома и узловой коллоидный зоб).

Мутация BRAFV600E. Проведен молекулярно-генетический анализ 112 образцов послеоперационного гистологического исследования на наличие мутации BRAFV600E. В ходе дальнейшего исследования был проведен корреляционный анализ BRAFV600E с характеристиками опухоли и клинико-анамнестическими данными пациентов с верифицированным ПРЦЖ (Таблица 4).

Выявлено, что мутация V600E в гене BRAF в 68% случаев определялась лишь в группе с гистологическим диагнозом папиллярная карцинома. При других гистологических вариантах ПРЦЖ мутации BRAF V600E не была нами определена.

Достоверной связи между метастатическим поражением лимфоузлов, а также гистологическими агрессивными характеристиками опухоли и статусом BRAF в нашем исследовании не было выявлено.

Таблица 4 – Определение мутации BRAFV600E в гистологических образцах, n = 112

<i>Гистологический диагноз</i>	<i>Количество случаев</i>	<i>Процент от общей выборки</i>	<i>Наличие мутации, n (%)</i>
Фолликулярная аденома	30	26,7	—
Коллоидный зоб	28	25,15	—
Фолликулярный рак	3	2,67	—
Папиллярный рак	47	41,9	32 (68%)
Медуллярный рак	2	1,78	—
Анапластический рак	2	1,8	—
<i>Примечание. * – данные представлены как абсолютное значение и %</i>			

В ходе исследования не было получено данных о взаимосвязи BRAF-положительных опухолей и возраста пациентов. Интересно, что BRAF положительный статус определялся достоверно чаще в микрокарциномах (80%) и реже в опухолях более 1,0 см (52,6%), $p = 0,015$.

Достоверной связи между BRAF положительным статусом и агрессивными характеристиками опухоли не было выявлено.

В рамках данного исследования не было получено достоверных данных за корреляцию между BRAF-положительным статусом и изменением профиля miRNA.

При анализе полученных данных не было выявлено достоверной связи между уровнем экспрессии гена HMGA2 и значимыми характеристиками исследуемых групп.

Экспрессия miRNA. Проведен молекулярно-генетический анализ 112 образцов с исследованием профиля экспрессии 12 mRNA (miR144, miR145, miR146, miR155, miR183, miR199, miR221, miR31, miR551, miR375, miR451, miR7). По результатам сравнительного анализа в группах злокачественных и доброкачественных образований были выявлены статистически значимые различия по уровню экспрессии miRNA.

В группе злокачественных образований отмечалось повышение экспрессии онкогенных miR146, miR221, miR155, miR375, miR31, miR551, и понижение онкосупрессорных miR7 и miR145 ($p = 0,0001$) по сравнению с группой доброкачественных образований ЩЖ (Таблица 5).

Таблица 5 – Сравнительный анализ уровней экспрессии различных miRNA в группах доброкачественных и злокачественных образований ЩЖ

<i>miRNA</i>	<i>Доброкачественные</i>	<i>Злокачественные</i>	<i>p-уровень</i>
551	–	+	0,0001
375	–	+	0,0001
155	–	+	0,0001
146	–	+	0,0001
221	–	+	0,03
31	–	+	0,0001
145	+	–	0,0001
7	+	–	0,0001

Примечание. (+) – повышение; (-) – снижение экспрессии

С целью прогнозирования эффективности дифференциально-диагностической способности уровней экспрессии различных miRNA был

проведен ROC-анализ показателей, по которым выявлены межгрупповые различия (Рисунок 2).

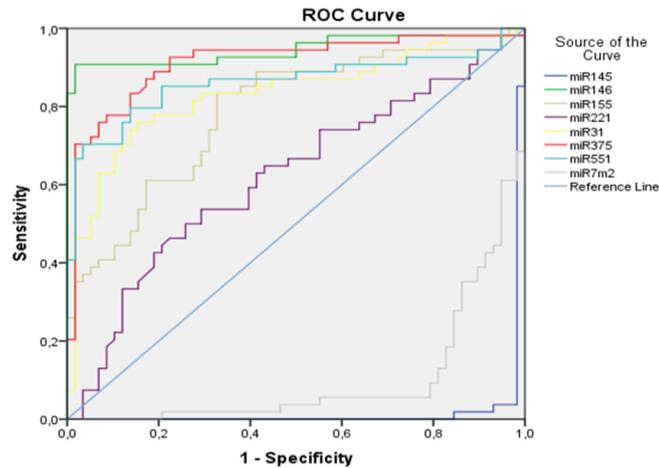


Рисунок 2 – ROC-анализ изменения уровня экспрессии различных miRNA в группе доброкачественных и злокачественных образований ЦЖ

Наибольшую диагностическую значимость показал уровень экспрессии miR145 площадь под кривой (AUC) – 0,982 (CI 0,953–1,0), miR146 площадь под кривой (AUC) – 0,945 (CI 0,896–0,994), miR375 – (AUC) – 0,913 (CI 0,855–0,971) и уровень экспрессии miR7 (AUC) – 0,900 (CI 0,842–0,958). Остальные miRNA показали меньшую диагностическую значимость, для miR 551 это значение составило – 0,862 (CI 0,786–0,938), miR31– 0,832 (CI 0,753–0,912), miR155 – 0,785 (CI 0,700–0,871). Полученные представлены в Таблице 6.

Таблица 6 – ROC-анализ: диагностическая значимость уровней экспрессии различных miRNA

miRNA	AUC	Чувствительность	Специфичность
145	0,982	96,2%	98,3%
146	0,945	89,0%	99%
375	0,913	85,5%	97,1%
7	0,900	94,0%	79,3%
551	0,862	78,6%	93,8%
31	0,832	75,3%	91,2%
155	0,785	70,0%	87%

В ходе многомерного анализа была построена модель, позволяющая сделать заключение о риске наличия злокачественного процесса по профилю экспрессии

miRNA. В результате проведённого анализа в модель были включены уровни экспрессии двух miRNA (Таблица 7).

Таблица 7 – Коэффициенты (B) классифицирующей дискриминантной функции (Z)

Предиктор	Коэффициент B
miR145	-1,596
miR7	-0,041
Константа	-5,370

Площадь под ROC кривой составила 0,99 (0,96–1,00) ($p = 1,2^{-28}$), коэффициент Наделькеркеса – 87,5%, что свидетельствует о высокой диагностической ценности полученной модели (Рисунок 3).

Чувствительность (Se) полученной модели составила 98,1 (89,9–100) %, специфичность (Sp) – 96,6 (88,1–99,6) %. Предсказательная ценность положительного (PPV) и отрицательного (NPV) результатов составили 98,2 (90,6–100) % и 96,3 (87,3–99,5) % соответственно. Диагностическая точность модели (De) составила 97,3 (92,3–99,4) %.

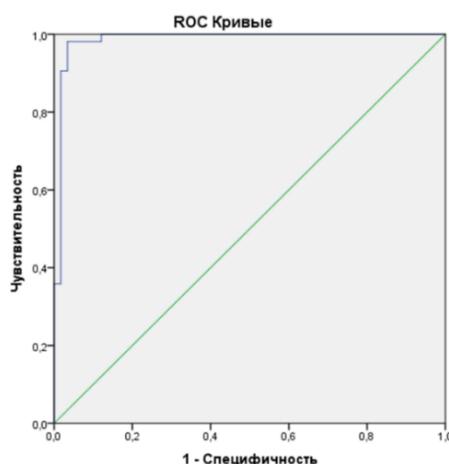


Рисунок 3 – ROC анализ диагностической значимости определения экспрессии miRNA

Таким образом, профиль экспрессии miR145 и miR7 обладает высокой диагностической ценностью при выявлении злокачественного процесса. При этом основной вклад в модель вносит уровень экспрессии miR145.

Для оценки прогностической ценности профиля экспрессии miRNA в качестве исхода рассматривали агрессивное течение опухолевого процесса. В результате

проведённого анализа в модель были включены уровни экспрессии двух miRNA (Таблица 8).

Таблица 8. Коэффициенты (B) классифицирующий дискриминантной функции (Z).

<i>Предиктор</i>	<i>Коэффициент B</i>
miR451	0,147
miR7	-0,015
Константа	-1,631

Площадь под ROC кривой составила 0,80 (0,68-0,92) ($p= 0,0001$), коэффициент Наделькеркеса – 34%, что свидетельствует об умеренной прогностической ценности полученной модели (Рисунок 4).

Чувствительность (Se) полученной модели составила 66,7 (47,2–82,7) %, специфичность (Sp) – 80 (59,3–93,2) %. Предсказательная ценность положительного (PPV) и отрицательного (NPV) результатов составили 80 (59,3–93,2) % и 66,7 (47,2–82,7) % соответственно. Диагностическая точность модели (De) составила 72,7 (59–83,9) %. Таким образом, значения уровней экспрессии miR7 и miR451 могут быть использованы в качестве прогностического маркера агрессивного поведения опухоли.

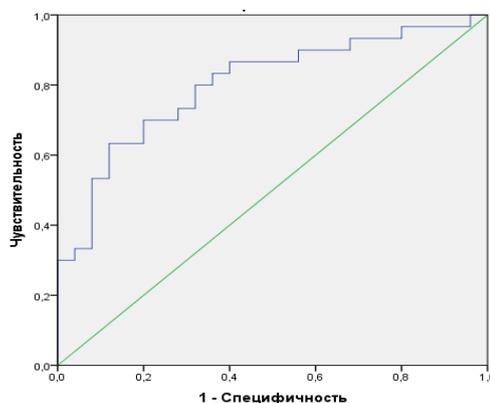


Рисунок 4. ROC –анализ прогностической ценности для предсказания агрессивного течения по профилю экспрессии miRNA.

Разработан алгоритм дифференцированного определения рисков у пациентов с синдромом узлового зоба в случае атипичии неопределенного значения, фолликулярной неоплазии или подозрении на фолликулярную неоплазию, подозрения на злокачественную опухоль (Рисунок 5). Данный

алгоритм может быть использован хирургами при решении вопроса об объёме оперативного лечения.

Заключение

Таким образом, в работе показана высокая частота встречаемости наиболее проблемных в плане предоперационной диагностики цитологических диагнозов (Bethesda III и IV) на примере одного центра. Проведен анализ факторов риска развития РЦЖ, по результатам которого были выявлены и подтверждены ранее известные ультразвуковые признаки, ассоциированные с риском злокачественности узлового образования. В ходе исследования при изучении корреляции факторов риска РЦЖ с молекулярно-генетическими маркерами были получены диагностическая и прогностическая модели на основании определения уровней экспрессии miRNA (miR145, miR7, miR451), обладающие высокой чувствительностью и специфичностью. Использование молекулярно-генетического анализа улучшает предоперационную диагностику, способствует оптимизации тактики лечения и ведения пациентов с узловым зобом, снижает риски рецидива заболевания, тем самым способствует улучшению качества жизни пациентов.

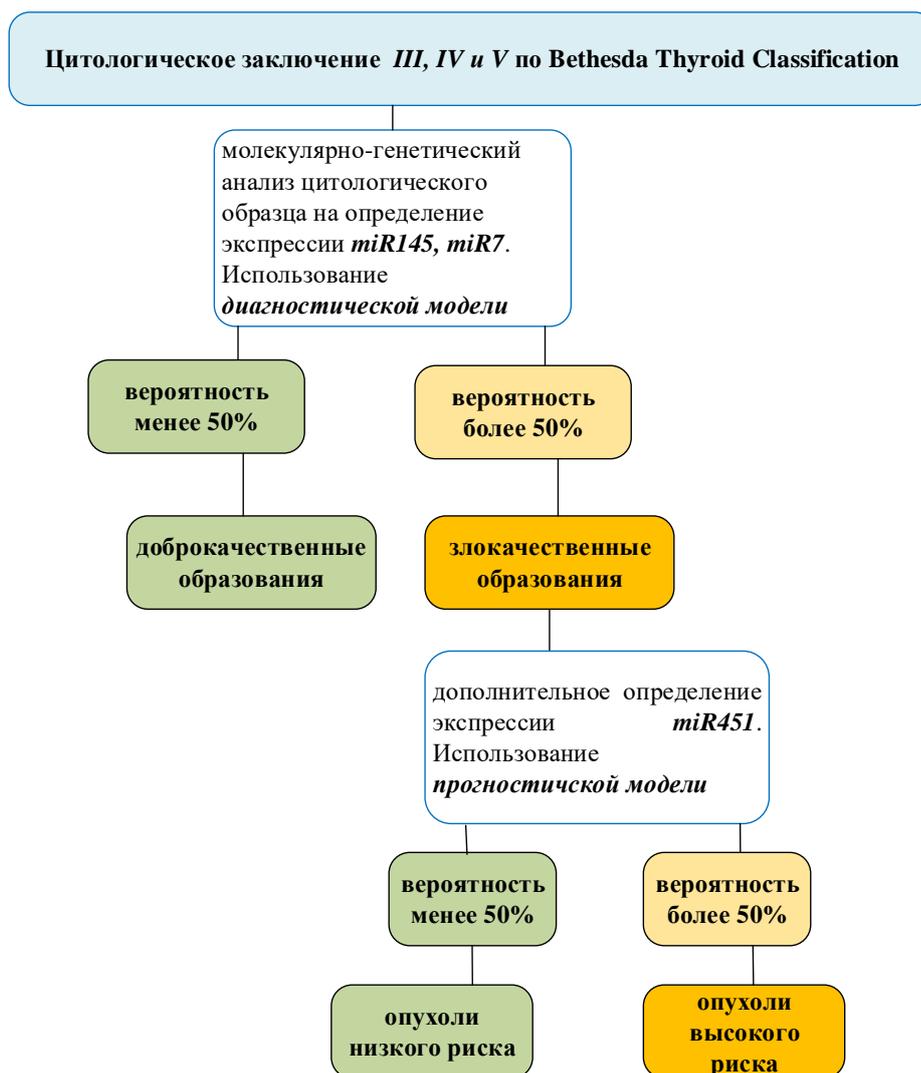


Рисунок 5 – Алгоритм дифференцированного определения рисков у пациента с синдромом узлового зоба при подозрении на злокачественный процесс

Выводы

1. У пациентов с узловым зобом, прооперированных с подозрением на злокачественность (Bethesda III-VI), частота рака по результатам гистологического исследования составила 71,5%. Основная доля при этом приходилась на папиллярный рак щитовидной железы (62,1%).

2. Выявленные ультразвуковые признаки: гипоэхогенность, наличие кальцинатов, нечеткость и неровность контуров ассоциированы с злокачественностью узлового образования щитовидной железы вне зависимости от размеров узла.

3. При анализе цитологических заключений показана высокая частота встречаемости диагнозов (57%), относящихся к III, IV категориям согласно Bethesda Thyroid Classification в рамках одного лечебного учреждения.

4. При сравнительном анализе результатов молекулярно-генетического тестирования в группах исследования мутация BRAF V600E определялась в 68% случаев папиллярной карциномы, при этом не было зафиксировано случаев обнаружения ее при других гистологических вариантах рака, а также доброкачественных образованиях щитовидной железы, что говорит о возможности применения данного генетического исследования в качестве диагностического маркера папиллярного рака щитовидной железы. Не выявлено корреляций BRAF мутации с агрессивными гистологическими характеристиками рака щитовидной железы, в связи с этим, данный маркер не может служить прогностическим критерием.

5. При сравнительном анализе результатов уровня экспрессии miRNA в группах исследования были выявлены наиболее чувствительные маркеры (miR145 и miR7), на основании которых создана диагностическая модель, позволяющая с высокой чувствительностью (98,1%) и специфичностью (96,6%) определить вероятность наличия злокачественного процесса у пациентов с синдромом узлового зоба.

6. При корреляционном анализе уровня экспрессии miRNA с признаками неблагоприятного онкологического прогноза, выявлены наиболее чувствительные маркеры (miR451 и miR7), на основании которых создана прогностическая модель, позволяющая с высокой чувствительностью (66,7%) и специфичностью (80%) определить вероятность неблагоприятного течения злокачественного процесса у пациентов с раком щитовидной железы.

Практические рекомендации

1. Следует учитывать, как неблагоприятные, следующие ультразвуковые параметры риска развития рака: гипоэхогенность, наличие кальцинатов,

нечеткость и неровность контуров вне зависимости от размера узлового образования ЩЖ.

2. Рекомендуется использовать определение уровня экспрессии miR145 и miR7 в качестве дополнительного маркера дифференциальной диагностики доброкачественных и злокачественных образований ЩЖ, в том числе на дооперационном этапе.

3. Рекомендуется использование модели на основе определения уровня экспрессии miR7 и miR451 в качестве дополнительного прогностического маркера определения рисков агрессивного поведения опухоли в целях выбора оптимального объема оперативного лечения.

Список опубликованных работ

1. Рогова М.О. Молекулярно-генетические маркеры как факторы риска развития рака щитовидной железы [Текст] / М.О. Рогова, С.В. Новосад, Н.С. Мартиросян, Л.В. Трухина, Н.А. Петунина // Терапевтический архив (ИФ-1,269). – 2019. – Т. 91, № 10. – С. 119–123. -5/1с.

2. Рогова М.О. Современные прогностические модели стратификации риска рака щитовидной железы [Текст] / С.В. Новосад, Н.С. Мартиросян, Н.А. Петунина, М.О. Рогова // Доктор.Ру. (ИФ-1,426). – 2016. – № 8–9 (125–126). – С. 52–56-5/1,25с.

3. Рогова М.О. Стратификация риска рецидива папиллярного рака щитовидной железы на основании результатов молекулярно-генетических исследований [Текст] / С.А. Лукьянов, С.В. Сергейко, С.Е. Титов, И.В. Решетов, Ю.А. Веряскина, А. В. Важенин, А.В. Гостимский, Л.И. Ипполитов, М.О. Рогова // Опухоли головы и шеи. (ИФ-0,4). – 2020. – Т. 10, № 1. – С. 93–100-8/0,9с.

4. Рогова М.О. Хирургическое лечение болезни Грейвса: консенсус эндокринолога и хирурга [Текст] / Н. А. Петунина, Л. В. Трухина, Н.С. Мартиросян, Ф.А. Уциева, Г.Н. Иванова, Н.В. Бревнова, М.О. Рогова // Доктор.Ру. (ИФ-1,426). – 2019. – № 4 (159). – С. 46–48-3/0,42с.

5. Рогова М.О. Рак щитовидной железы: ретроспективный анализ прооперированных пациентов (опыт одного центра) [Текст] / М.О., Рогова Н.С. Мартиросян, Л.В. Трухина, Н.Б. Парамонова, К.Э. Слободин, Л.И. Ипполитов, Н.А. Петунина // Медицинский совет. (ИФ-0,658). – 2020. – № 9. – С. 283–288-6/0,85с.

6. Рогова М.О. Молекулярно-генетический анализ в стратификации риска рака щитовидной железы [Текст] / М.О. Рогова, Н. С. Мартиросян, Л.В. Трухина, Н.Б. Парамонова, Л.И. Ипполитов, М.Э. Тельнова, Н.А. Петунина, С.Е. Титов, Ю.А. Веряскина // Эффективная фармакотерапия. (ИФ-0,288). – 2020 – Т. 16, № 26. – С. 32–36-5/0,55.

7. The role of miRNAs expression in thyroid cancer/ Marina Rogova, Narine Martirosian, Andrey Donnikov, Sergey Titov, Yulia Veryaskina, Leonid Ippolitov, Nina Petunina // Abstracts: 43rd Annual Meeting of the European Thyroid Association. Virtual Conference, September 4–7, 2021. Eur Thyroid J 2021;10(suppl 1):1–56 с - С. 35. DOI: 10.1159/000517526

Список сокращений

ЩЖ – щитовидная железа

РЩЖ – рак щитовидной железы

АРЩЖ – анапластический рак щитовидной железы

МРЩЖ – медуллярный рак щитовидной железы

ПРЩЖ – папиллярный рак щитовидной железы

ФРЩЖ – фолликулярный рак щитовидной железы

УКЗ – узловой коллоидный зоб

ФА – фолликулярная аденома

ТАБ – тонкоигольная аспирационная (пункционная) биопсия

УЗИ – ультразвуковое исследование

ТТГ – тиреотропный гормон

miRNA, мкРНК – микроРНК

ПЦР-РВ - полимеразная цепная реакция в режиме реального времени.