

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования Первый Московский государственный
медицинский университет имени И. М. Сеченова
Министерства здравоохранения Российской Федерации

На правах рукописи

Рогова Марина Олеговна

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

14.01.02. – эндокринология

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:
Петунина Нина Александровна,
доктор медицинских наук, профессор,
член-корреспондент РАН
Научный консультант:
Донников Андрей Евгеньевич,
кандидат медицинских наук

Москва – 2022

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
Глава 1. СИНДРОМ УЗЛОВОГО ЗОБА И РАК ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ: СОВРЕМЕННЫЙ ВЗГЛЯД НА ПРОБЛЕМУ (обзор литературы)	122
1.1. Этиология и патогенез синдрома узлового зоба	122
1.2. Классификация опухолей щитовидной железы	133
1.3. Эпидемиология. Международные тенденции заболеваемости раком щитовидной железы	166
1.4. Диагностика узлового зоба.....	188
1.5. Молекулярно-генетические основы рака щитовидной железы.....	222
1.5.1. <i>BRAF</i> мутация	266
1.5.2. <i>RAS</i> мутации.....	277
1.5.3. <i>RET/PTC</i> перестройки	288
1.5.4. <i>Pax8 / PPARγ</i> перегруппировка.....	300
1.5.5. <i>TERT</i> мутация.....	300
1.6. Методы лечения рака щитовидной железы. Современные тенденции.	333
1.7. Ведение пациента в послеоперационном периоде.....	344
1.7.1. Лечение радиоактивным йодом.....	366
1.7.2. Послеоперационная терапия левотироксином натрия.....	377
1.7.3. Динамическое наблюдение.....	377
Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	411
2.1. Дизайн проведенного исследования	411
2.2. Характеристика выборки пациентов	42
2.3. Характеристика методов исследования	43
2.3.1. Ультразвуковое исследование щитовидной железы.....	433
2.3.2. Гормональное исследование	444
2.3.3. Цитологическое исследование	444
2.3.4. Гистологическое исследование	444
2.3.5. Молекулярно-генетическое тестирование.....	444
2.4. Статистическая обработка.....	466
Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ	49
3.1. Оценка клинико-анамнестических и лабораторных данных пациентов	49
3.2. Определение мутации V600E в гене <i>BRAF</i>	533
3.3. Определение уровня экспрессии гена <i>HMGA2</i>	555
3.4. Определение уровня экспрессии miRNA: miR144, miR145, miR146, miR155, miR183, miR199, miR221, miR31, miR551, miR375, miR451, miR7.....	566
Глава 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ	65
4.1. Оценка распространенности рака щитовидной железы в различных подгруппах цитологического диагноза	65
4.2. Изучение показателей, ассоциированных с риском злокачественности узлового образования щитовидной железы.....	67

4.3. Определение мутация V600E в гене BRAF в качестве диагностического и прогностического маркера рака щитовидной железы.....	68
4.4. Определение уровня экспрессии гена HMGA2, 12 miRNA -144,-145, -146, -155, -183, -199, -221, -31, -551, -375, -451, -7 в гистологических образцах	72
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	766
ВЫВОДЫ.....	766
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	767
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	789
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	80
Приложение А (обязательное). Алгоритм дифференцированного определения рисков у пациента с синдромом узлового зоба при подозрении на злокачественный процесс	955

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

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. [1]. Это междисциплинарная патология, которой сегодня занимаются не только эндокринологи, но и врачи других специальностей, хирурги, онкологи, радиологи, медицинские генетики. Любое выявленное новообразование ЩЖ требует дифференциальной диагностики между доброкачественным и злокачественным образованием с целью определения дальнейшей оптимальной тактики ведения каждого конкретного пациента.

Среди всех злокачественных заболеваний эндокринной системы наиболее распространен РЩЖ. При этом, в последние десятилетия отмечается рост частоты встречаемости данной патологией, в основном за счет высокодифференцированного папиллярного рака, на долю которого приходится 90% всех случаев среди мужчин и женщин [2; 3]. Факт роста данной патологии скорее всего обусловлен улучшением доступности медицинской помощи, в том числе высокочувствительных методов диагностики, таких как ультразвуковое исследование (УЗИ) и тонкоигольная аспирационная биопсия (ТАБ). Обсуждается роль факторов окружающей среды – ионизирующего излучения, уровня йодного обеспечения региона, а также таких факторов как уровень тиреотропного гормона (ТТГ), аутоиммунные заболевания ЩЖ, пол, эстрогены, ожирение, изменения образа жизни, генетические нарушения и наследственность [3; 4].

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. В настоящее время это осуществляется главным образом на основе

оценки клинико-патологических характеристик, которая в последние годы значительно повысила точность с помощью комплексных клинических подходов [5–8]. Тем не менее, споры о выборе тактики лечения для каждого конкретного пациента с узловой патологией ЩЖ при подозрении на злокачественный процесс, по-прежнему, часто встречаются в клинической практике и научных сообществах. Основная проблема заключается в том, что классическая клинико-патологическая оценка риска, в том числе цитологическая диагностика методом ТАБ, часто недостаточно точна при РЩЖ. На сегодняшний день остается открытым вопрос о выборе объема оперативного лечения на дооперационном этапе.

Сегодня золотым стандартом в диагностике злокачественных образований ЩЖ является ТАБ с последующим цитологическим исследованием пунктата. Однако даже в руках высоко опытных специалистов и под ультразвуковым контролем не всегда по итогам пункционной биопсии можно получить окончательный цитологический диагноз. В итоге, около 25% результатов ТАБ имеют «неопределенное» цитологическое заключение. 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 %. Данной когорте пациентов проводятся повторные ТАБ, а в некоторых случаях диагностические операции, что сопряжено, помимо экономических затрат, с риском серьезных послеоперационных осложнений (2–10%), а в большинстве случаев – с необходимостью пожизненной заместительной терапии левотироксином и, как следствие, снижением качества жизни [3; 4; 5; 7; 9]. 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. Рядом исследователей была продемонстрирована возможность использования молекулярно-генетического исследования в качестве вспомогательных диагностических методов для пациентов с узловыми образованиями ЩЖ в случае неопределённых и сомнительных результатов цитологического исследования [10–14].

Внедрение молекулярно-генетического исследования в качестве дополнительного метода диагностики РЩЖ проводится, начиная с 2000 гг. С течением времени открытие новых генетических мутаций, накопленный опыт результатов многочисленных исследований, позволил создать специализированные мутационные панели для диагностики высокодифференцированного рака щитовидной железы (ВДРЩЖ) [10; 15]. В ряде исследований показана корреляция молекулярно-генетических маркеров с агрессивными свойствами РЩЖ, в частности мутации генов BRAF и TERT [16; 18]. Тем не менее далеко не все ученые поддерживают эту точку зрения. В мировой литературе представлены противоречивые результаты исследования по корреляции генетических маркеров (BRAF и TERT) с прогнозом РЩЖ. 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 [11; 18].

Степень разработанности темы исследования

До настоящего времени 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 и сомнительных цитологических диагнозах [19–21].

В клинических рекомендациях Американской тиреологической ассоциации 2015 г и Минздрава Российской Федерации 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 определение 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 [5; 7; 8]. Одним из перспективных направлений в этой области на сегодняшний день является исследование уровня экспрессии miRNA, который может

служить универсальным диагностическим и прогностическим маркером у пациентов с узловым зобом.

В связи с вышеизложенным представляется актуальным изучение определения уровня экспрессии miRNA у пациентов с синдромом узлового зоба в качестве диагностического и прогностического маркера, с целью своевременного выявления РЩЖ и определения оптимальной тактики ведения и, как следствие, улучшения качества жизни у таких пациентов.

Дальнейшее изучение и внедрение молекулярно-генетического анализа позволит снизить число неоправданных хирургических вмешательств по поводу доброкачественных образований и опухолей низкого риска с целью сохранения более высокого качества жизни, для остальных – выбрать более агрессивный подход к терапии во избежание рецидивов заболевания и улучшения прогноза для пациента.

Наличие в арсенале современного врача различных дополнительных методов диагностики узлового зоба расширяет его возможности для оказания своевременной и квалифицированной помощи таким пациентам.

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 эндокринологии: 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.

Глава 1. СИНДРОМ УЗЛОВОГО ЗОБА И РАК ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ: СОВРЕМЕННЫЙ ВЗГЛЯД НА ПРОБЛЕМУ (обзор литературы)

1.1. Этиология и патогенез синдрома узлового зоба

Согласно клинической точке зрения, узловой зоб – это собирательное клиническое понятие, которое объединяет в себе различные по морфологии объемные образования ЩЖ, выявляемые пальпаторно и с использованием УЗИ, равные, а также превышающие 1 см в диаметре. Синдром узлового зоба – это междисциплинарная проблема. Актуальным, среди пациентов с узловыми образованиями ЩЖ, представляется своевременное выявление рака, заболеваемость которым неуклонно растет, преимущественно за счет дифференцированных форм. Дифференцированный рак щитовидной железы (ДРЩЖ) – злокачественная опухоль из фолликулярных клеток ЩЖ, сохранивших присущие им признаки дифференцировки [22; 23].

ДРЩЖ представлен эпителиальными опухолями, фолликулярно-клеточного (папиллярный, фолликулярный), и парафолликулярно-клеточного (медулярный) происхождения, также выделяют Hurthle-клеточный рак. Одним из самых распространенных видов РЩЖ является папиллярный, на долю которого приходится 80–90%. Папиллярный рак щитовидной железы (ПРЩЖ) состоит из гетерогенной группы с более чем 10 фенотипами (то есть вариантами). Из них наиболее распространенными вариантами являются классический вариант, фолликулярный вариант и папиллярная микрокарцинома. ПРЩЖ, как правило, имеет благоприятное течение. Второе место по распространенности занимает фолликулярный рак щитовидной железы (ФРЩЖ), что составляет 5–10% среди всех злокачественных образований ЩЖ. Промежуточное положение между дифференцированным и недифференцированным раком занимает низкодифференцированный рак щитовидной железа (НДРЩЖ) [2; 24; 25].

К недифференцированным формам относится анапластический рак щитовидной железы (АРЩЖ), который встречается достаточно редко. АРЩЖ относится к агрессивным видам РЩЖ и характеризуется присутствием недифференцированных клеток с высоким уровнем митозов, стремительным развитием заболевания с

неблагоприятным клиническим исходом. АРЩЖ встречается у лиц старшего возраста и зачастую возникает при длительно текущим ВДРЩЖ в процессе накопления мутаций, также может сосуществовать с ДРЩЖ. НДРЩЖ, АРЩЖ и медуллярный рак щитовидной железы (МРЩЖ) не так широко распространены, на их долю приходится всего 2–3% от всех злокачественных новообразований ЩЖ. Большая часть пациентов с диагнозом АРЩЖ погибает на 1 году после установления диагноза со средней продолжительностью жизни 3–5 месяцев. В литературе встречаются единичные данные о 10-летней выживаемости таких пациентов. Несмотря на плохой прогноз, сообщаются многообещающие результаты по лечению BRAF-положительного АРЩЖ с использованием BRAF- и MEK-ингибиторов, но эти данные требуют дальнейшего изучения. Также исследуются иммунотерапевтические методы лечения [26; 27]. ФРЩЖ, гюртлеклеточный РЩЖ и НДРЩЖ – это опухоли высокого риска, которые имеют тенденцию к гематогенному метастазированию в отдаленные органы, в частности, в легкие и кости [28]. В отличие от дифференцированных форм, МРЩЖ возникает из парафолликулярных нейроэндокринных клеток ЩЖ. Чаще представляет собой солитарную опухоль и диагностируется в возрасте 40–60 лет. Нейроэндокринный с-клеточный МРЩЖ встречается достаточно редко, с частотой 4–6%, а в некоторых странах при своевременном скрининге частота встречаемости снижается до 1–3% [29; 30]. Несмотря на современные высокочувствительные лабораторные и инструментальные методы исследования МРЩЖ первым клиническим признаком заболевания является шейная лимфаденопатия, или, другими словами, более чем в 50% случаев диагноз впервые устанавливается на III–IV стадии заболевания. Четверть случаев МРЩЖ приходится на пациентов с синдромом наследственной множественной эндокринной неоплазии (МЭН), в остальных случаях – это спорадическое заболевание [31].

1.2. Классификация опухолей щитовидной железы

В 2017 году была пересмотрена и обновлена классификация ВОЗ (WHO Classification of Tumors of Endocrine Organs) опухолевых образований эндокринной системы – 4-е издание (Таблица 1).

Таблица 1 – Классификация TNM 2017 г (8-е издание) по степени распространенности РЩЖ (Американский объединённый комитет по раку).

T – Первичная опухоль	
TX	Недостаточно данных для диагностики первичной опухоли
T0	Первичная опухоль не определяется
T1	образование до 2 см в наибольшем диаметре, в пределах ткани ЩЖ
T1a	образование < 1 см, в пределах ткани ЩЖ
T1b	>1 см, но < 2 см в диаметре, ограниченная тканью щитовидной железы
T2	Опухоль > 2 см, но > 4 см в наибольшем диаметре измерения, в пределах ткани ЩЖ
T3	Опухоль > 4 см в наибольшем измерении, ограниченная тканью ЩЖ или опухоль любого размера с минимальным распространением за пределы капсулы ЩЖ (в m.sternothyroid или мягкие ткани около ЩЖ)
<i>Все анапластические раки рассматриваются как T4 опухоли</i>	
T4a	С прорастанием капсулы ЩЖ и дальнейшим распространением: подкожные мягкие ткани, гортань, трахея, пищевод, возвратный нерв
T4b	Распространение опухоли на предпозвоночную фасцию, сосуды средостения или оболочку сонной артерии
T4a	Опухоль (любого размера), ограниченная пределами ЩЖ
T4b	Опухоль (любого размера), распространяется за пределы капсулы ЩЖ
Символ N – наличие или отсутствие регионарных метастазов	
Nx	Недостаточно данных для оценки регионарных лимфатических узлов
N0	без признаков метастатического поражения регионарных лимфатических узлов
N1	Имеется поражение регионарных лимфатических узлов метастазами
N1a	Метастазы в лимфатических узлах VI уровня (претрахеальные и паратрахеальные, преларенгиальные)
N1b	Метастазы в шейные лимфатические узлы одно или двухсторонние, или на противоположной стороне, верхние/передние медиастинальные
Символ M характеризует наличие или отсутствие метастатического поражения	
M0	без признаков отдалённых метастазов
M1	наличие отдалённых метастазов

В этой классификации 3 вида РЩЖ были переклассифицированы в новую группу «пограничных опухолей» – «другие инкапсулированные опухоли фолликулярного строения», в которую вошли:

1) «неинвазивные фолликулярные новообразования щитовидной железы с папиллярно-подобными ядерными признаками» (NIFTP);

2) «высокодифференцированная опухоль с неопределенным злокачественным потенциалом»;

3) «фолликулярная опухоль с неопределенным злокачественным потенциалом».

До 2017 года последний (третий) пересмотр данной классификации осуществлялся в 2004 году [33].

Международная гистологическая классификация опухолей щитовидной железы (классификация Всемирной организации здравоохранения, 4-е издание, 2017 г):

- фолликулярная аденома;
- гиалинизирующая трабекулярная опухоль;
- фолликулярная опухоль неясного злокачественного потенциала;
- высокодифференцированная опухоль с неясным злокачественным потенциалом;
- фолликулярная неоплазма (неинвазивная) с папиллярноподобными ядерными изменениями;
- фолликулярная аденокарцинома;
- фолликулярный рак (с минимальной инвазией; инкапсулированный с сосудистой инвазией);
- оксифильная аденома;
- оксифильная аденокарцинома;
- папиллярная аденокарцинома;
- папиллярный рак: (1) фолликулярный вариант, (2) инкапсулированный, (3) цилиндроклеточный, (4) из оксифильных клеток;
- папиллярная микрокарцинома;
- фолликулярный рак: (1) минимально инвазивный, (2) инкапсулированный, (3) с сосудистой инвазией;
- недифференцированный рак;
- анапластический рак;
- плоскоклеточный рак.

Выделяют следующие гистологические типы карцином ЩЖ:

- папиллярная;
- фолликулярная;
- медуллярная;
- гюртлеклеточная;
- низкодифференцированная;
- недифференцированная (анапластическая) [8; 34].

Также в новых российских клинических рекомендациях от 2020 года, как и в рекомендациях АТА 2015 года, освещается стадирование ДРЩЖ согласно возрасту (граница 55 лет), размеру опухоли и наличию/отсутствию признаков метастатического поражения (лимфатические узлы и/или отдаленные органы);

1. До 55 лет выделяют 2 стадии;

1) к I стадии относятся опухоли любого размера, с наличием или без регионарного метастазирования, отдаленные метастазы отсутствуют;

2) II стадия определяется независимо от размера опухоли и состояния регионарных лимфатических узлов, выявляются отдаленные метастазы.

От 55 лет включительно и у старшей возрастной категории выделяют 4 стадии:

1) I ст. – T1N0/NxM0; T2N0M0;

2) II ст. – T1N1M0; T3a/bN(любая)M0;

3) III ст – T4aN1M0;

4) IV ст. – (T4aN1M0/M1) подразделяется на подгруппы a/b по наличию/отсутствию признаков метастазирования в отдаленные органы соответственно. Все случаи анапластического рака принято относить к стадии IV независимо от размера опухоли и наличия/отсутствия метастатического процесса [5; 8].

1.3. Эпидемиология. Международные тенденции заболеваемости раком щитовидной железы

Заболеваемость РЩЖ продолжает расти во всем мире, преимущественно за счет дифференцированных форм.

По данным исследований последних лет рядом авторов было установлено, что динамика заболеваемости РЦЖ связана с мировыми тенденциями к гипердиагностике. Тем не менее, летальность от РЦЖ остается на достаточно низком уровне и в связи с этим, в последнее время отмечается снижение радикальности в тактике ведения данной категории пациентов.

На конец 2017 г., согласно статистическим данным Российской Федерации, заболеваемость злокачественными новообразованиями ЩЖ составила 2%, средний показатель возраста заболевших – 54 года. Стандартизированная заболеваемость РЦЖ по России за 2017 г. – 6 случаев на 100 тыс. населения, при этом женщины чаще болели (9,16), по сравнению с мужчинами (2,25). Смертность от РЦЖ – 0,38 случая на 100 тыс. населения (0,35 – среди мужчин; 0,39 – среди женщин) [35].

Согласно данным других странах мира также продолжается рост заболеваемости РЦЖ. Так, например, в США заболеваемость РЦЖ до середины 1990-х годов была относительно стабильной – около 5/100 000. Следует отметить, что наибольший рост заболеваемости был отмечен среди женщин. В 2014 году было зарегистрировано 22,2 новых случаев заболевания на 100 000 человек. В основном, рост заболеваемости был также обусловлен наиболее распространенным гистологическим типом – ПРЦЖ [36].

Высокий уровень заболеваемости РЦЖ, обусловленный гипердиагностикой, был также описан и за пределами Соединенных Штатов. Vaccarella S. и соавторами было продемонстрировано, что заболеваемость РЦЖ у южнокорейских женщин в возрасте 50–59 лет в 2003–2007 годах составила 120 случаев на 100 000 (по сравнению с 22,2 в США за 2014 год) [36]. Аналогичный значительный рост заболеваемости наблюдался и в других развитых странах, где пациенты имеют высокий доступ к медицинскому обслуживанию, что, по мнению многих исследователей, является главным фактором, способствующим росту числа случаев выявления заболевания. В 2015 г по данным Ahn H.S. и соавторов в Южной Корее спонтанно снизилась частота тиреоидэктомий, несмотря на то, что рост заболеваемости там был наиболее значимым [37].

Lim H и соавторы опубликовали данные по частоте случаев смертности в Соединенных Штатах от различных гистологических вариантов РЦЖ, согласно которой смертность увеличилась со среднего значения 0,40 на 100 000 человеко-лет в течение 1994–1997 гг. всего лишь до среднего значения 0,46 на 100 000 человеко-лет в течение 2010–2013 гг. Таким образом средний относительный ежегодный прирост смертности составил 1,1% в год. Общий темп изменения смертности не был значимым для лиц с папиллярным раком, за исключением пациентов с прогрессирующим ПРЦЖ на момент постановки диагноза. Авторы пришли к выводу, что наряду с увеличением заболеваемости из-за гипердиагностики, также имеет место истинный рост заболеваемости ПРЦЖ, который, как они предположили, может быть вызван факторами окружающей среды [38; 39].

Обобщая выше сказанное, отмечается мировая тенденция к росту заболеваемости ВРЦЖ, в основном за счет ПРЦЖ. В тоже время, смертность от РЦЖ за последние пятьдесят лет изменилась незначительно.

Задача, стоящая перед специалистами направлена на оптимизацию терапевтического подхода, обеспечивая пациентам в случае РЦЖ низкого риска или же доброкачественными узлами менее агрессивную тактика лечения. В то же время отмечается необходимость раннего выявления пациентов высокого риска, которые нуждаются в более агрессивном подходе к оперативному лечению для предупреждения рецидивов заболевания.

1.4. Диагностика узлового зоба.

РЦЖ представляет собой широкий спектр клинических проявлений от скрытых форм с низкой частотой смертности, в большинстве случаев, до очень агрессивных злокачественных новообразований, например, как при АРЦЖ. Поэтому проведение адекватной диагностики на дооперационном этапе имеет решающее значение для выбора тактики ведения пациента и, как следствие, дальнейшего прогноза. На первом этапе ЩЖ и регионарные лимфатические узлы исследуются пальпаторно, обращая внимание на изменение формы шеи, голоса, а также выясняется

наличие/отсутствия отягощенной наследственности по злокачественным новообразованиям ЩЖ и других факторов риска. Следует отметить, что пальпации ЩЖ имеет весьма низкую диагностическая ценность в отношении выявления РЩЖ, в сравнении с ультразвуковой диагностикой [3; 4; 8; 26; 27].

ДРЩЖ подобно узловому зобу, как правило, не имеет каких-либо клинических проявлений. Метастатическое поражение при ДРЩЖ, в основном происходит на регионарном уровне, чаще – это шейные лимфатические узлы, крайне редко ДРЩЖ дает отдаленные метастазы [8].

У пациентов с АРЩЖ на поздних стадиях при физикальном обследовании часто выявляются осиплость, дисфагия, одышка. АРЩЖ часто дает регионарные и отдаленные метастазы. Наиболее распространенным местом отдаленного метастатического поражения являются легкие, за которыми следуют кости и головной мозг [8; 26; 27].

С целью раннего выявления медуллярного рака, всем пациентам с узловыми образованиями ЩЖ рекомендуется проводить определение уровня кальцитонина. Также, всем пациентам с узловыми образованиями ЩЖ исследуется уровень тиреотропного гормона (ТТГ) [8].

Золотым стандартом в диагностике узловых образований остается ТАБ, которая позволяет достаточно быстро и безопасно оценить цитологию узла ЩЖ в предоперационном периоде. В 2009 г результаты цитологического исследования были объединены в международную классификацию (Bethesda Thyroid Classification, 2009, 2017) для адекватной оценки образцов ТАБ узловых образований ЩЖ. Система Bethesda выделяет шесть стандартных диагностических категорий, в каждой из которой оценивается риск развития РЩЖ:

- 1) I категория – неинформативный пунктат;
- 2) II категория – доброкачественное образование (коллоидный узловой зоб, аденоматозные узлы, ХАИТ, подострый тиреоидит);
- 3) III категория – атипия неопределенного значения (среди категории с подозрением на опухолевое образование наиболее сложна в плане диагностики);

4) IV категория – фолликулярная неоплазия или подозрение на фолликулярную неоплазию;

5) V категория – подозрение на злокачественную опухоль (подозрение на ПРЩЖ, МРЩЖ, метастатическая опухоль, лимфому);

6) VI категория – злокачественное образование (ПРЩЖ, НДРЩЖ, МРЩЖ, АРЩЖ).

Группы III–V по Bethesda относятся к категории «неопределенного цитологического диагноза». С целью получения информативного пунктата пункционную биопсию рекомендуется выполнять под контролем ультразвука опытным специалистом, владеющим данной диагностической методикой [8; 40; 41].

Начиная, примерно, с 2015 года предпринимаются различные попытки для снижения гипердиагностики, влияющей на рост заболеваемости РЩЖ.

Рекомендации последних лет по ведению пациентов с синдромом узлового зоба не приветствуют широкое проведение ТАБ, призывая к более рандомизированному назначению данной диагностической процедуры.

Показаниями для пункционной биопсии на сегодняшний день являются:

- все узловых образований равные 1 см и более,
- узлы ЩЖ менее 1 см, в том случае, если пациент находится в группе риска

по развитию агрессивных форм РЩЖ, при наличии следующих факторов:

- концентрация кальцитонина (базального или стимулированного) >100 пг/мл;
- региональная лимфаденопатия;
- лучевое воздействие на область головы и шеи в анамнезе;
- РЩЖ у родственников;
- паралич голосовой складки;
- узловые образования ЩЖ, случайно обнаруженные в ходе проведения позитронно-эмиссионной томографии;
- пациенты моложе 20 лет;
- динамические изменения ультразвуковой картины доброкачественных образований ЩЖ в ходе наблюдения [43–45].

Ключевую роль в определении показаний к пункционной биопсии играет размер узловых образований, а также ультразвуковые признаки косвенно указывающие на злокачественный процесс, такие как гипоехогенность, нечеткость/неровность контуров, микрокальцинаты, «высота» больше, чем «ширина» и конечно же выявленные в ходе исследования признаки экстратиреоидного распространения и/или шейная лимфаденопатия и др. В 2009 году E. Horvath с соавторами опубликовали результаты исследования, которое проводилось в течении 8 лет с целью создания унифицированного УЗИ-классификатора. На основе полученных результатов была создана классификация TI-RADS (Thyroid Imaging Reporting and Data System). В рамках данной классификации при помощи УЗИ ЩЖ можно спрогнозировать вероятность РЩЖ, а также определиться необходимость проведения пункционной биопсии и регулярность дальнейшего динамического наблюдения. По классификации TI-RADS выделяют 5 категорий:

- 1 – отсутствие узловой патологии;
- 2 – кистозные образования и губчатые узлы (изо- и гиперэхогенной структуры) без риска злокачественного процесса (0%), в данном случае ТАБ не показана, но может быть выполнена с целью эвакуации содержимого кисты;
- 3 – образования без каких-либо подозрительных ультразвуковых признаков с риском злокачественности 2–4%. ТАБ проводится при условии размера узла ≥ 10 мм;
- 4 – гипоехогенные узлы при отсутствии других подозрительных признаков с риском злокачественности 6–17%. Пункционная биопсия также проводится при узлах размером ≥ 10 мм;
- 5 – при наличии одного из неблагоприятных ультразвуковых признаков, узловое образование относится к 5-й категории с высокой вероятностью злокачественного процесса (26–87%). ТАБ выполняется при размере узла ≥ 10 мм. В случае если узел меньше 1 см, рекомендуется динамическое наблюдение с УЗИ ЩЖ не реже 1 раза в 6 месяцев [8; 42].

Необходимо также учитывать сопутствующие клинические факторы риска развития РЩЖ, к которым относятся наличие таких признаков как боли в шее, кашель, изменение голоса и наличие в анамнезе данных за облучение головы и шеи

или отягощенного семейного анамнеза по РЩЖ. В этих случаях проведение ТАБ может рассматриваться независимо от размера и ультразвуковой картины [8; 42].

1.5. Молекулярно-генетические основы рака щитовидной железы

В последние годы был достигнут впечатляющий прогресс в понимании молекулярного патогенеза РЩЖ, что лучше всего иллюстрируется определением фундаментальной роли нескольких основных сигнальных путей и связанных с ними молекулярных нарушений. Центральное место в этих механизмах занимают генетические и эпигенетические изменения, такие как мутации, увеличение числа копий гена и aberrантное метилирование гена (Рисунок 1). Многие из этих молекулярных изменений представляют собой новые диагностические и прогностические молекулярные маркеры, а также терапевтические мишени для РЩЖ, которые предоставляют беспрецедентные возможности для проведения дальнейших исследований и клинической разработки новых стратегий лечения этого рака.

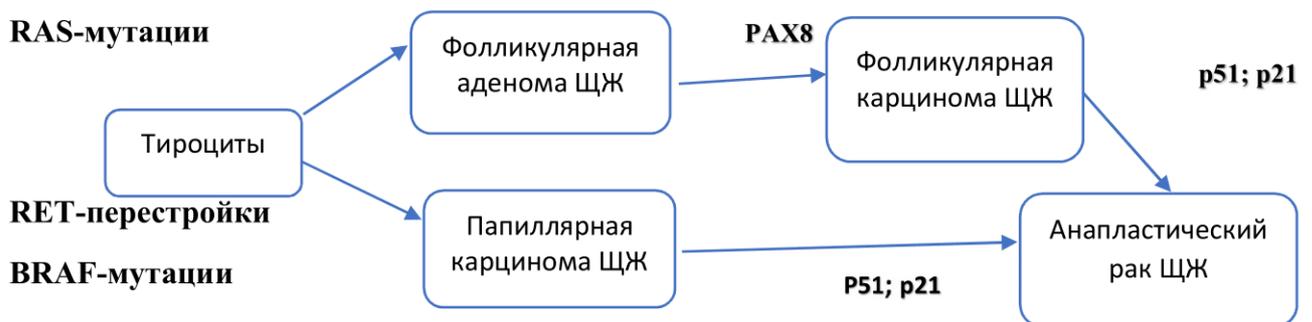


Рисунок 1 – Модифицированная упрощенная схема канцерогенеза РЩЖ (E. Chmielik, 2018)

За исключением семейных форм МРЩЖ, в большинстве случаев причиной РЩЖ являются спорадические мутации. У основной доли РЩЖ мутации происходят по митоген-активированной протеинкиназе клеточного сигнального пути (МАРК), который передает сигналы роста от плазматической мембраны к ядру и играет фундаментальную роль в регуляции пролиферации и выживания клеток, а также в онкогенезе человека. Важность этого пути была четко установлена в онкогенезе ЩЖ, в частности, для ПРЩЖ (Рисунок 2.). Прогрессирование РЩЖ – это

процесс накопления генетических и эпигенетических изменений с соответствующими прогрессирующими нарушениями сигнальных путей. Они сопровождаются многочисленными вторичными молекулярными изменениями как в клетке, так и в микроокружении опухоли, которые, действуя совместно, усиливают и синергизируют свое влияние на туморогенез [46; 47]. Путь PI3K – АКТ также играет фундаментальную роль в генезе опухолей ЩЖ [48;49]. Ранние доказательства, подтверждающие роль этого пути в онкогенезе ЩЖ, были получены из открытия, в котором было доказано, что синдром Каудена (Cowden), вызванный мутациями PTEN, был связан с фолликулярной аденомой и фолликулярной карциномой ЩЖ [50].

Амплификация онкогенного гена или увеличение числа копий являются дополнительными важными генетическими механизмами в опухолевом генезе ЩЖ. Это особенно важно для генов, кодирующих рецепторные тирозинкиназы (RTK) [51]. Увеличение числа копий также характерно для генов, кодирующих участников пути PI3K – АКТ, включая PIK3CA, PIK3CB, 3-фосфоинозитидзависимую протеинкиназу-1 (PDK1; также известную как PDK1), АКТ1 и АКТ2. В целом, увеличение числа копий этих генов более распространено при АРЩЖ, чем при дифференцированных формах, что позволяет предположить, что эти генетические изменения играют роль в прогрессировании и агрессивности РЩЖ. Увеличение числа копий этих генов в АРЩЖ может происходить либо из-за генетической амплификации, либо из-за хромосомной нестабильности. Важным и ожидаемым следствием увеличения числа копий является активация нижестоящих сигнальных путей, что подтверждается ассоциацией увеличения числа копий генов, кодирующих RTK, с повышенным фосфорилированием АКТ и ERK при РЩЖ [51].

Увеличение числа копий IQ-мотив-содержащих GTP-активирующего белка 1 (IQGAP1) – другое важное генетическое событие, которое относительно недавно было обнаружено при РЩЖ [52]. IQGAP1 – это многофункциональный каркасный белок, который играет важную роль в онкогенезе человека. Было обнаружено, что амплификация IQGAP1 увеличивает экспрессию белка и связана с инвазивностью клеток РЩЖ. Интересно, что сосуществование увеличения числа копий IQGAP1 и мутации BRAF V600E было часто связано с высокой частотой рецидивов ПРЩЖ [52].

В 2005 г было обнаружено, что miRNA (небольшие молекулы РНК, регулирующие экспрессию многих генов на посттранскрипционном уровне) участвуют в развитии нескольких типов рака человека в основном за счет аномальных уровней экспрессии зрелых транскриптов miRNA в опухолях по сравнению с соответствующими незатронутыми тканями [53].

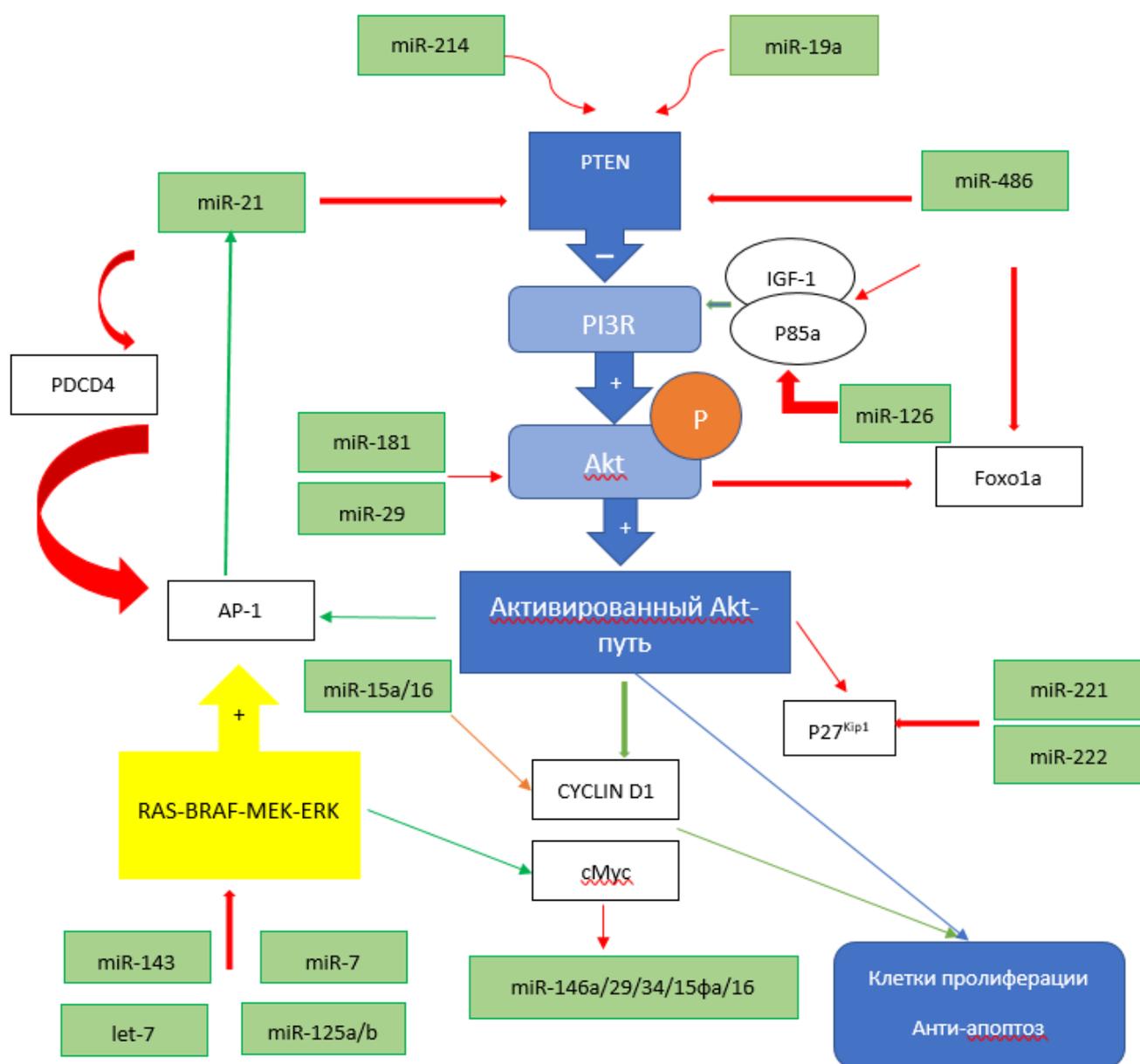


Рисунок 2 – Регуляция пути PTEN/PI3K/AKT miRNA. Стрелки обозначают положительную (зеленую) или отрицательную (красную) регуляцию генов (доработанная схема Albert de la Chapelle, 2011)

Дифференцированный рак щитовидной железы и Анапластический рак щитовидной железы. Молекулярно-генетические основы

В 2014 году в Атласе генома рака (TCGA) были описаны всеобъемлющие геномные характеристики ПРЩЖ. 97% ПРЩЖ имеют уникальные молекулярные изменения, из них 74% вариантов – с одним нуклеотидом (например, BRAF или RAS мутации), 15% – слияния, 7% – с изменениями числа копий и 1% – с делециями. Только 3% ПРЩЖ характеризуются как неизвестные молекулярные события, лежащие в основе туморогенеза и требующие дальнейшего изучения [54].

Наиболее частой мутацией при немедулярном (дифференцированном) РЩЖ является мутация в гене BRAF. RAS-мутации наиболее часто встречаются при ФРЩЖ и фолликулярном варианте ПРЩЖ. При РЩЖ также происходят хромосомные транслокации. Эти геномные перестройки приводят к экспрессии новых онкогенов, слияния которых инициируют определенные события. Во многих случаях РЩЖ выявляется Pax8 – гамма-рецептор, активируемый пролифераторами пероксисом (PPAR γ), транслокация происходит примерно в 30% случаев ФРЩЖ [55], в то время как семейство – RET встречается примерно в 7% случаев ПРЩЖ [56]. Менее распространенные транслокационные гены-партнеры включают семейство NTRK, генов ALK и THADA [56]. Например, по данным некоторых исследователей сообщается о возможной связи перегруппировок с клинически агрессивными случаями РЩЖ [57]. Наличие мелкомолекулярных ALK и NTRK показало клиническую перспективность в отношении перестроечно-позитивных опухолей при других видах рака [58; 59], таким образом, выявление этих перестроек может иметь прямое терапевтическое значение для пациентов с заболеваниями ЩЖ.

Медулярный рак щитовидной железы

В отличие от других видов рака МРЩЖ имеет нейроэндокринную основу. В связи с этим сильно отличаются подходы к его диагностике и лечению. В большинстве случаев причиной МРЩЖ являются RET мутации в протоонкогене, и лишь небольшая часть медулярных опухолей ЩЖ вызвана спорадическими RAS-мутациями. RET мутации могут возникать спорадически как соматические заболевания или как наследуемые по аутосомно-доминантному типу [29; 30; 60–63].

Герминативные мутации гена RET в 10-й хромосоме могут предрасполагать

пациентов к первичному развитию МРЩЖ как компонента МЭН2 (20–25% всех случаев МРЩЖ) типа А (синдром Сипла) и типа В (синдром Горлина). Таким образом, пациенты, у которых заболевание манифестировало в молодом возрасте, скорее всего имеют наследственный тип заболевания. Наиболее распространённым является синдром Сипла. МРЩЖ в рамках синдрома типа I (Сипла) начинает свою манифестацию в возрасте 5–25 лет. В возрасте 55–75 лет может развиваться феохромоцитомы и гиперпаратиреоз с вероятностью 15–30% соответственно. При синдроме Горлина МРЩЖ отличается более агрессивным течением, при этом манифестация феохромоцитомы имеет более раннее начало (12 лет). Поскольку 1–7% пациентов, страдающих спорадическим МРЩЖ, являются носителями герминальных мутаций RET, оценка наличия наследуемой мутации должна быть рекомендована всем пациентам с МРЩЖ независимо от их семейного анамнеза и возраста [29].

Последние российские клинические рекомендации по дифференцированному РЩЖ (2020 г), а ранее клинические рекомендации Американской тиреологической ассоциации (American Thyroid Association, ATA) 2015 г. рекомендуют определение мутаций в генах BRAF, NRAS, HRAS, KRAS, RET/PTC1, RET/PTC3, PAX8/PPAR γ , TERT и др. в качестве дополнительного метода для стратификации риска малигнизации узловых образований в случае неопределённого заключения цитологического исследования (группы III, IV, V по Bethesda) [5; 8]. В течении последних лет были разработаны диагностические панели, такие как AFIRMA и ThyroSeq v3, которые показали высокую чувствительность и специфичность для диагностики рака среди больных с узловыми образованиями ЩЖ в случае «неопределённого» цитологического диагноза. Наиболее изученными мутациями при ПРЩЖ на сегодняшний день являются точечные мутации генов BRAF и RAS, а также RET/PTC-перестановки [29; 63].

1.5.1. BRAF мутация

Мутация V600 в гене BRAF наиболее часто выявляется при ПРЩЖ (40–45% случаев) [64; 65]. BRAF-мутация – это серин/треонин-киназа семейства белков

RAF, которая является одним из участников Ras-Raf-МАРК-сигнального пути. Мутации BRAF обычно содержат нуклеотид 1799, способствующий замене валина на глутамин в остатке 600 (V600E) [66]. Вторая по частоте V600K, значительно реже встречаются V600D и V600R. Мутация V600E способствует активации BRAF-киназу, что, в свою очередь, приводит к продолжительной стимуляции МАРК пути и, в конечном итоге, туморогенезу [67]. После открытия роли мутаций гена BRAF в патогенезе опухолей, были разработаны специфические препараты – низкомолекулярные ингибиторы фермента BRAF, которые блокируют патологически активированный сигнальный каскад и тормозят развитие опухоли. К BRAF-ингибиторам относятся вемурафениб (зелбораф) и дабрафениб. Впервые BRAF-мутация была описана для меланомы, а позже и других видов рака, в частности для ЩЖ. Мутация BRAF V600E встречается чаще при классическом и высококлеточном вариантах ПРЩЖ; реже – при фолликулярной карциноме [66]. Эта мутация также была выявлена при низкодифференцированных карциномах и АРЩЖ [68]. Определение точечных мутаций BRAF в высокодифференцированных и в низкодифференцированных опухолях может свидетельствовать о том, что данная мутация происходит в начальных этапах онкогенеза. В фолликулярных карциномах, а также доброкачественных образованиях ЩЖ BRAF V600E-мутация не была идентифицирована, что может свидетельствовать о том, что данная мутация является специфическим маркером для ПРЩЖ [66]. Другие мутации BRAF, в том числе точечная мутация K601E и AKAP9/BRAF перестройки гораздо реже встречаются при папиллярных карциномах (1–2%) [69; 70]. BRAF V600E также может быть независимым прогностическим фактором неблагоприятного исхода в лечении и рецидива опухоли, даже на первых стадиях заболевания [71], а также независимым фактором риска смертности, связанной с опухолью [72].

1.5.2. RAS мутации

Мутации RAS являются второй наиболее распространенной мутацией, обнаруженной в образцах ТАБ узлов ЩЖ. Семейство человеческих генов RAS включает в себя гены HRAS, KRAS и NRAS. Эти гены кодируют внутриклеточные G-

белки, проводящие сигналы от клеточного рецептора тирозинкиназы и G-сопряженных рецепторов по MAPK, PI3K/AKT и другим сигнальным путям. Активирующие точечные мутации в генах RAS распространены в опухолях человека: мутации KRAS в кодонах 12/13 преобладают в большинстве видов рака, в то время как мутации NRAS в кодоне 61 и HRAS в кодоне 61 мутации чаще выявляются в опухолях ЩЖ. При этом мутации генов RAS имеют место при всех типах злокачественных опухолей ЩЖ эпителиального происхождения. Мутации RAS выявляются как в злокачественных, так и в доброкачественных новообразованиях ЩЖ, представлены в 40–50% фолликулярных карцином и 20–40% фолликулярных аденом [73].

Реже RAS мутации выявляются в онкоцитарных вариантах фолликулярных поражений. Эти мутации чаще встречаются при фолликулярном раке и фолликулярном варианте папиллярного рака. Мутации RAS встречаются в 10–20% папиллярных карцином щитовидной железы, практически все из которых относятся к фолликулярному варианту [74–76].

Ряд исследований показал высокую частоту мутации RAS в низкодифференцированном и недифференцированном папиллярном раке ЩЖ, по сравнению с высокодифференцированным, однако небольшая выборка пациентов в этих исследованиях не позволяет установить прогностическую роль. Тем не менее, мутация гена RAS может предрасполагать по некоторым данным к дедифференцировке и агрессивному поведению высокодифференцированного рака, оправдывая хирургическое удаление RAS-положительных фолликулярных аденом [74; 76].

1.5.3. RET/PTC перестройки

RET/PTC-положительные папиллярные карциномы, как правило, обнаруживаются в более молодом возрасте, имеют классическое папиллярное гистологическое строение и часто метастазируют в лимфатические узлы [75]. RET протоонкоген кодирует клеточную мембрану рецептора тирозинкиназы и хорошо экспрессируется в парафолликулярных или С-клетках ЩЖ. В фолликулярных клетках RET

может быть активирован с помощью хромосомной перестройки RET/PTC, что способствует активации MAPK сигнального пути. Из 11 известных RET/PTC перестроек, наиболее часто в тиреоидных карциномах встречаются RET/PTC1 и RET/PTC3 [77]. RET/PTC1 встречается в 60–70% всех случаев RET/PTC-положительных карцином, RET/PTC3 присутствует в 20–30% случаев, а на остальные перегруппировки приходится около 5% [78].

Данные о распространенности RET/PTC в опухолях щитовидной железы сильно варьируются. Это несоответствие может быть связано с неоднородным распределением RET/PTC перестроек внутри опухоли, различной чувствительности методик обнаружения, а также разными географическими и этническими группами [79]. RET/PTC1 наиболее часто встречается при классическом гистологическом варианте папиллярного рака ЩЖ, в то время как RET/PTC3 перестройка при солидном варианте, характеризующемся более агрессивным течением при манифестации [80]. RET/PTC перестройки часто встречаются при раке щитовидной железы после радиационного воздействия (50–80%), а также у детей и лиц молодого возраста (40–70%).

В частности, RET/PTC3 часто встречался в случаях детского папиллярного рака ЩЖ после аварии на Чернобыльской атомной электростанции [81]. Перестройки RET/PTC также определялись в фолликулярном варианте папиллярного и фолликулярного рака ЩЖ. Прогностическая роль RET/PTC не до конца изучена, однако опухоли, несущие перестройки RET/PTC, редко прогрессируют до низкодифференцированного и недифференцированного рака ЩЖ.

По некоторым данным, обнаружение RET/PTC1 связано с благоприятным поведением папиллярного рака [82]. В отличие от BRAF и RAS мутаций, RET/PTC1 перегруппировки связаны с очень низкой вероятностью дедифференцировки в папиллярных карциномах [78], однако RET/PTC3 перегруппировка может предрасполагать к дедифференцировке и более агрессивному течению [83].

Корреляция между RET/PTC перегруппировкой и прогнозом папиллярного рака ЩЖ требует дальнейшего уточнения.

1.5.4. Pax8 / PPAR γ перегруппировка

Pax8/PPAR γ перегруппировка происходит в результате транслокации t (2; 3) (Q13, P25), что приводит к слиянию гена Pax8 и рецептора гена активатора пролиферации пероксисом (PPAR γ) [84].

Эта перегруппировка идентифицируется в 30–40% случаев обычных фолликулярных карцином и реже в онкоцитарных вариантах. Pax8/PPAR γ -положительные фолликулярные карциномы чаще выявляются в более молодом возрасте, имеют небольшой размер, и чаще дают сосудистую инвазию [85; 86]. Pax8/PPAR γ перегруппировка также присутствует в небольшом проценте случаев фолликулярного варианта папиллярных карцином [86] и фолликулярных аденом [85]. Pax8/PPAR γ -положительные фолликулярные аденомы обычно имеют толстую капсулу и иммунофенотипическую характеристику злокачественных новообразований ЩЖ, предполагается, что эти опухоли представляют собой рак *in situ* или ранее недиагностированную фолликулярную карциному [85].

Pax8/PPAR γ и RAS точечные мутации являются непересекающимися мутациями в фолликулярных карциномах, что говорит о том, что эти злокачественные опухоли возникают по двум различным молекулярным путям, каждый из которых иницирован либо Pax8/PPAR γ перегруппировкой, либо мутацией RAS [85].

В некоторых исследованиях перегруппировка ассоциировалась с мультифокальным течением и сосудистой инвазией, однако нет достаточных данных о прогностической роли Pax8/PPAR γ при высокодифференцированном раке [87]. Присутствие Pax8/PPAR γ в фолликулярных опухолях не всегда может указывать на злокачественное поражение, но является основанием для тщательного поиска сосудистой или капсульной инвазии [85].

1.5.5. TERT мутация

В 2013 г впервые была описана мутация TERT при различных вариантах рака щитовидной железы [88]. Частота точечных мутаций TERT C228T и C250T при дифференцированном раке ЩЖ по данным различных авторов достигает 7,5–25%,

эта частота выше при низкодифференцированных и недифференцированных карциномах, что может указывать на агрессивное течение опухоли. Исследование T. Liu и соавт. показало отсутствие мутации C228T в доброкачественных опухолях и при медуллярном раке ЩЖ. При этом мутация C228T определялась в 11,7% случаев папиллярных карцином, 11,4% фолликулярных карцином, в 37,5% случаев низкодифференцированных раков и 42,6% анапластических карцином. Мутация C250T встречается намного реже [88].

В крупном исследовании было показано, что сосуществование BRAF V600E и TERT мутаций связано с агрессивным течением рака ЩЖ и плохими клиническими исходами папиллярного рака ЩЖ [89].

В американской и китайской когортах пациентов была отмечена связь мутации промотора TERT и мутации BRAFV600E с ПРЩЖ, кроме того, отмечено частое сосуществование в опухолях обеих мутаций [90; 91]. Аналогичные данные наблюдались в португальской популяции [92].

Однако ряд исследований показал обратную зависимость между мутациями промотора TERT и BRAF V600E, а сосуществование TERT и BRAFV600E мутаций не было ассоциировано с повышенной агрессивностью или худшими исходами по сравнению с наличием только мутации TERT [93].

Таким образом, молекулярное тестирование на распространенные мутации в образцах ткани ЩЖ, полученных методом тонкоигольной аспирационной биопсии может значительно повысить точность цитологической диагностики узловых образований ЩЖ. Однако данная методика требует валидации на каждой популяции. Наиболее перспективным является возможность использования молекулярно-генетического анализа при цитологическом заключении «атипия неопределенного значения» или «фолликулярных поражениях».

Ohori и соавт. оценили наличие BRAF и RAS мутаций, RET/PTC и Pax8/PPAR γ перестроек в 117 образцах ТАБ ЩЖ. Молекулярный анализ и последующая морфологическая верификация показали, что вероятность РЩЖ при атипии неопределенного значения у пациентов с любой из этих мутаций в узле состав-

вила 100% в то время, как без какой-либо мутации лишь 7,6%. Эти данные позволяют предположить, что молекулярно-генетическое тестирование образцов ТАБ может служить дополнительным надежным диагностическим критерием в случае образцов с неопределенным цитологическим диагнозом [87].

На сегодняшний день наиболее распространенные генетические маркеры включают мутацию гена BRAF, точечные мутации RAS и RET/PTC, а также Pax8/PPAR γ перегруппировки. Последние рекомендации АТА, опубликованные в 2016 году показали целесообразность использования молекулярно-генетической диагностики образца, полученного методом ТАБ, с использованием панели, состоящей из генов BRAF, NRAS, HRAS, KRAS, RET/PTC1, RET/PTC3, PAX8/PPAR γ как дополнительного метода для стратификации риска малигнизации узлового образования в случае «неопределенной» цитологии [5].

Несмотря на широкую распространенность генетических маркеров, их роль в диагностике злокачественных новообразований ЩЖ все еще обсуждается в мировой литературе. На сегодняшний день продолжается поиск высокочувствительных маркеров, способных улучшить предоперационную диагностику узловых образований ЩЖ и повлиять на тактику предоперационного и послеоперационного ведения больных с РЩЖ.

В качестве универсального диагностического и прогностического маркера могут быть рассмотрены микроРНК, представляющие собой небольшие (19–25 нуклеотидов), не кодирующие молекулы РНК, которые обычно функционируют как отрицательные регуляторы экспрессии генов, кодирующих белок [53].

В 2005 г. было обнаружено, что miRNA участвуют в развитии нескольких типов рака человека в основном за счет аномальных уровней экспрессии зрелых транскриптов miRNA в опухолях по сравнению с соответствующими незатронутыми тканями [94].

Исследователи показали, что как стимуляция онкогенных miRNA (например, мир155, мир21), так и подавление miRNA, функционирующих как супрессоры опухолевого роста (например, miR15a, miR16), способствуют развитию рака [95–97].

He H. и соавторы [94] получили предварительные доказательства потенциальной роли miRNA при ПРЦЖ. Авторы заметили сверхэкспрессию нескольких miRNA в опухолевой ткани по сравнению со здоровой тканью ЩЖ. В список активирующих miRNA (до 19,3 раза) вошли miR146, miR221/222, miR155, miR34 и miR181 и вскоре эти данные были подтверждены рядом других авторов [95]. Исследователи пришли к выводу, что в патогенезе ПРЦЖ участвуют повышенная регуляция нескольких miRNA и измененное ингибирование их мишеней, измененная последовательность генов, направленных на miRNA, могут способствовать их регуляции [95; 96]. Различные miRNA дисрегулируются при ФРЦЖ и анапластической карциноме ЩЖ [98; 99], еще раз доказывая, что каждый тип РЦЖ содержит специфические признаки экспрессии определенных miRNA.

1.6. Методы лечения рака щитовидной железы. Современные тенденции.

Рекомендации по диагностике и ведению ВДРЦЖ периодически пересматриваются с учетом того, что многие виды РЦЖ относятся к группе низкого риска и требуют менее агрессивной хирургической тактики.

Оценка риска перед оперативным лечением для пациентов с ДРЦЖ включает проведение УЗИ ЩЖ, которое играет важную роль, предоставляя хирургам фундаментальную информацию о размере, расположении, количестве опухолевых образований и состоянии лимфатических узлов, а также местной инвазии в окружающие ткани. У 1/3 пациентов с ДРЦЖ поражения выявляются на предоперационном УЗИ и в 2/3 этих случаев полученные результаты приводят к пересмотру хирургического плана [8; 100; 101].

Предоперационное цитологическое исследование имеет не менее важное значения для определения хирургической тактики. В российских клинических рекомендациях освещаются более консервативные подходы к лечению [8]. При получении III цитологической категории по результатам ТАБ необходимо провести повторную пункционную биопсию с целью определения риска злокачественности узлового образования ЩЖ. Объем первоначального хирургического лечения в случае III-IV категорий может обсуждаться в индивидуальном порядке и, как правило,

зависит от тактики, принятой в конкретном лечебном учреждении, но окончательный объем операции определяется по результатам планового послеоперационного гистологического исследования. Оперативное лечение в режиме субтотальной тиреоидэктомии рекомендовано пациентам с ПРЦЖ низкого риска (при отсутствии случаев РЦЖ в семье и облучения головы и шеи в анамнезе). Для опухолей менее 4 см, без признаков экстра tireоидного распространения и метастатического поражения лимфатических узлов возможно выполнение как тиреоидэктомии так и гемитиреоидэктомии [8].

Результаты нескольких крупных исследований [102; 103], показали, что, пациенты после субтотальной и тотальной тиреоидэктомии имеют одинаковую выживаемость. В этих случаях общая выживаемость также не зависит от наличия метастазов в регионарные лимфатические узлы [104].

При выполнении органосохраняющих операций многие пациенты могут избежать пожизненной заместительной гормональной терапии левотироксином и как следствие, сохранить качество жизни на более высоком уровне. Что касается послеоперационных осложнений, то после проведения субтотальной тиреоидэктомии, таковые регистрируются в 2 раза реже по сравнению с тотальной тиреоидэктомией [105].

При выявлении регионарных метастазов в ходе дооперационного обследования или интраоперационно показано удаление лимфатических узлов центральной зоны (VI уровень) с целью снижения рецидивирования и повышения выживаемости пациентов [8].

1.7. Ведение пациента в послеоперационном периоде

По результатам послеоперационного гистологического и лабораторного исследований оцениваются риски рецидива заболевания, на основании которых принимается решение о необходимости проведения радиоiodтерапии, назначении терапии левотироксином натрия в супрессивной или заместительной дозах. Традиционно, оценка рисков осуществляется согласно системе TNM (Таблица 1). Однако

для прогнозирования рисков рецидива, данная система работает не столь эффективно [106]. В 2009 году АТА предложила оценивать риск рецидива с помощью новой системы стадирования, в которой выделяют 3 категории риска рецидивирования: высокий, промежуточный и низкий [3]. В российских рекомендациях от 2020 года также придерживаются данной системы [8].

В настоящее время признаны данные, подтверждающие безопасность активного наблюдения за РЦЖ низкого риска. Опухоли, ранее классифицируемые как инкапсулированный фолликулярный вариант ПРЦЖ, теперь рекомендуется называть неинвазивными фолликулярными опухолями ЩЖ с папиллярными ядерными признаками.

Ниже представлены параметры, по которым пациента можно отнести к одной из 3 групп наблюдения:

1) 1-я группа (низкий риск): ПРЦЖ со всеми перечисленными ниже признаками: без регионарных или отдаленных метастазов; удалена вся опухолевая ткань; отсутствие экстра tireоидной и сосудистой инвазии, гистологически неагрессивный вариант; отсутствие признаков метастатического поражения по результатам 1-й сцинтиграфии с ^{131}I . Без регионарного метастазирования или p N1 при условии поражения не более 5 лимфатических узлов, очаги микрометастазов (размером $< 0,2$ см в наибольшем измерении); интратиреоидный фолликулярный ВДРЦЖ с капсулярной инвазией или без нее и минимальной сосудистой инвазией (< 4 очагов); интратиреоидный папиллярный рак размером < 4 см при отсутствии мутации BRAF V600E; интратиреоидная папиллярная микрокарцинома, унифокальная или мультифокальная, независимо от наличия мутации BRAF V600E;

2) 2-я группа (промежуточный риск): агрессивный тип гистологии; ПРЦЖ без экстра tireоидного распространения < 4 см в диаметре при наличии BRAF V600E мутации; с N 1 или p N1 при поражении > 5 лимфатических узлов, макрометастазы (размером < 3 см в наибольшем измерении); фокусы экстра tireоидной инвазии при микроскопическом исследовании; ПРЦЖ с признаками сосудистой инвазии; мультифо-

кальная папиллярная микрокарцинома с микроскопической экстратиреоидной инвазией и мутацией BRAF V600E; наличие метастатических очагов на шее, накапливающих радиоактивный йод по данным 1-й сцинтиграфии с ^{131}I ;

3) 3-я группа (высокого риск): резидуальная опухоль; опухоль при сочетании индуцирующих агрессивное течение мутаций (TERT \pm BRAF); pN1 с любым метастатическим лимфатическим узлом размером > 3 см в наибольшем изменении; макроскопическая экстратиреоидная инвазия; широко инвазивный фолликулярный рак (>4 очагов); доказанные отдаленные метастазы; высокая концентрация ТГ в крови, характерная для отдаленных метастазов. После выполнения гемитиреоидэктомии в случаях, если выясняется, что пациент при дальнейшей стратификации риска рецидива относится к группе промежуточного или высокого риска, рекомендуется выполнение окончательной тиреоидэктомии для последующего лечения радиоактивным йодом [3; 8].

1.7.1. Лечение радиоактивным йодом

При наличии показаний, принимается решение о проведении радионуклеидной терапии для разрушения очагов опухоли, накапливающих радиоактивный йод и оставшейся тиреоидной ткани, которые способны продуцировать тиреоглобулин, что осложняет динамическое наблюдение за пациентами в послеоперационном периоде посредством ОФЭКТ-КТ или ^{131}I -сцинтиграфии ЩЖ. По данным некоторых источников в результате проведения радионуклеидной терапии увеличиваются риски возникновения вторичных онкологических заболеваний [107; 108]. В настоящее время рекомендуется более рандомизированное использование радиоактивного йода, основанное на индивидуальном подходе с использованием минимально эффективной дозы, необходимой для обеспечения успешного лечения. Радиойодтерапия (РЙТ) рекомендована пациентам промежуточного и высокого риска с целью снижения рисков рецидивирования и прогрессирования. Доза подбирается в зависимости от группы риска и индивидуальных показаний. Учитывая соотношение риска и пользы, пациентам группы низкого риска радиойодтерапия не показана [8].

1.7.2. Послеоперационная терапия левотироксином натрия

Терапия левотироксином натрия в заместительных дозах направлена на коррекцию послеоперационного дефицита гормонов ЩЖ, в супрессивных дозах – на подавление ТТГ-зависимого роста остаточных клеток опухоли ЩЖ. Повышенный уровень ТТГ способствует стимуляции пролиферацию нормальных тироцитов, а также раковых клеток ЩЖ [109]. По этой причине в послеоперационном периоде у пациентов, которые находятся в группе промежуточного и высокого риска, а также при наличии признаков лабораторного рецидива, как правило, используются ТТГ-супрессивные дозы левотироксина натрия. Такой подход значительно снижает риски рецидива и смертности у пациентов с ДРЩЖ [110].

Дискутабельным остается вопрос о целевых уровнях ТТГ, влиянии их на пациента с позиции соотношения риска и пользы. У пациентов высокого риска, снижение уровня ТТГ до 0,1 МЕ может способствовать улучшению клинических исходов [111]. В тоже время, есть данные, показывающие, что умеренное снижение от субнормальных до нормальных уровней ТТГ также улучшает исходы [112]. С другой стороны, индуцированный субклинический гипертиреоз может негативно влиять на фосфорно-кальциевый обмен, способствуя развитию остеопороза у женщин в постменопаузальном периоде, а также на сердечно-сосудистую систему [113]. Согласно новым клиническим рекомендациям 2020 года у пациентов высокого риска с сопутствующей фибрилляцией предсердий проводится мягкая супрессивная терапия [8].

В новых российских клинических рекомендациях от 2020 г целевые показатели ТТГ в трех режимах остаются в прежних диапазонах: супрессивная терапия: ТТГ менее 0,1 мЕд/л, свТ4 не выше верхней границы нормы; мягкая супрессия: ТТГ 0,1–0,5 мЕд/л, заместительная терапия: ТТГ 0,5–2,0 мЕд/л. [1; 6; 8; 37]

1.7.3. Динамическое наблюдение

На сегодняшний день, наиболее чувствительным послеоперационным маркером ПРЩЖ и ФРЩЖ является тиреоглобулин (ТГ). Определение уровня данных

маркеров рекомендуется выполнять не ранее, чем через 3 месяца после оперативного лечения или РЙТ, далее каждые 6–12 месяцев, а в группе биохимической ремиссии срок может быть увеличен до 12–24 месяцев.

В ходе динамического наблюдения после оперативного лечения у пациентов с РЩЖ, через 6–12 месяцев тактика ведения пациента с учетом индивидуальных рисков может быть пересмотрена [114; 115]. Перечень обязательных исследований в послеоперационном периоде включает определение концентрации тиреоглобулина (стимулированного и нестимулированного), антител к тиреоглобулину (АТ-ТГ), УЗИ органов шеи и другие исследования по мере необходимости (компьютерная томография и сцинтиграфия всего тела). Полученные результаты имеют важное значение для дальнейшей тактики ведения пациента, поскольку рецидивы в 77% случаев наблюдения выявляются в течение первых 5 лет после операции [116]. При таком подходе значительная доля пациентов с ДРЩЖ в любой момент может быть переклассифицирована в другую категорию.

Свежие клинические рекомендации 2020 предлагают делить пациентов в послеоперационном периоде на 4 группы согласно лабораторным данным по биохимическому анализу крови, а также по структурным изменениям независимо от биохимических показателей (ТГ и АТ-ТГ) (Таблица 2).

Таблица 2 – Группы пациентов в послеоперационном периоде в ходе динамического наблюдения

№	Группы	УЗИ	СВТ	КТ	Нестимулированный ТГ (нг/мл)	ТГ после стимуляции (нг/мл)	АТ-ТГ
1	Биохимическая ремиссия	–	–	–	< 0,2	< 1	–
2	Биохимический рецидив	–	–	–	> 1	> 10	+
3	Неопределенный опухолевый статус	–	–	–	>0,2, но < 1	>1, но < 10	↓
4	Структурный рецидив	признаки опухоли (структурные или функциональные) независимо от показателей ТГ и АТ-ТГ.					

В группе биохимической ремиссии риск рецидива составляет 1–4%, при этом концентрация нестимулированного и стимулированного ТГ не превышают рекомендуемого значения (Таблица 2). В случае биохимического рецидива наблюда-

ется повышение уровня концентрации ТГ (нестимулированного и стимулированного), а также отмечается вираж АТ-ТГ. В рамках данной группы у 30% пациентов показатели маркеров самостоятельно снижаются, у 20% – наступает ремиссия после проведения РЙТ, у 20% проявляется структурным рецидивированием. Смертность от РЦЖ в группе биохимического рецидива менее 1%. При сохранении стабильной концентрации ТГ или ее снижении предусматривается наблюдательная тактика, при отсутствии противопоказаний предпочтение отдается супрессивной терапии. При дальнейшем нарастании уровня ТГ и АТ-ТГ рекомендуется проведение тщательного обследования и РЙТ. Третья группа занимает промежуточное положение и имеет название «неопределенный опухолевый статус». Пациенты, относящиеся к этой группе, имеют отрицательные результаты по данным инструментального обследования: УЗИ, СВТ, КТ. Уровень ТГ имеет пограничные значения – «серая зона»; АТ-ТГ – стабильный уровень или тенденция к снижению. В четвертой группе структурного рецидива, 50–60% больных, несмотря на дополнительные методы лечения, ремиссии не наступает (Таблица 2).

УЗИ органов шеи в сочетании с определением сывороточного тиреоглобулина являются достаточно чувствительными диагностическими методами, применяемыми для динамического наблюдения за пациентами в послеоперационном периоде. На сегодняшний день УЗ-диагностика является более выгодным методом исследования, с точки зрения экономического вопроса, радиационного воздействия, а также отсутствия побочных эффектов [117]. Периодичность УЗ-контроля составляет 6–12 месяцев в зависимости от принадлежности к определенной группе риска, а также уровня ТГ, АТ-ТГ. В случае, если в ходе УЗ-контроля выявляются лимфатические узлы с подозрительными признаками с размером более 8–10 мм в диаметре, рекомендуется выполнение прицельной пункционной биопсии с определением тиреоглобулина в смыве иглы, при меньшем размере лимфатических узлов возможно продолжить динамическое наблюдение [8; 118; 119].

У пациентов, относящихся к группам высокого и промежуточного риска, у которых не удалось достичь ремиссии по биохимическим показателям и с персистенцией заболевания после проведения РЙТ через 6–12 месяцев рекомендуется

провести сцинтиграфию костей всего тела. КТ и МРТ проводится по показаниям с целью адекватной оценки степени распространения заболевания [8].

С учетом того, что многие виды ДРЦЖ требуют более консервативного подхода, стратификация рисков для пациентов с ДРЦЖ должна способствовать уменьшению числа тиреоидэктомии, сокращению использования радиоактивного йода и рандомизации показаний к назначению супрессивной терапии. Молекулярная характеристика различных видов РЦЖ начала оказывать положительное влияние на диагностику и лечение РЦЖ. Мы ожидаем, что дальнейшее совершенствование и активное практическое применение данных тестов приведет к сокращению необоснованных методов лечения РЦЖ из группы низкого риска и улучшению результатов лечения у пациентов с клинически агрессивными формами.

Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Дизайн проведенного исследования

Исследование проводилось на базе кафедры эндокринологии ИКМ им Н.В. Склифосовского Сеченовского Университета. В рамках запланированной диссертационной работы проведено ретроспективное исследование типа случай–контроль. На I этапе в ходе анализа данных историй болезни включены 140 пациентов с узловым зобом, прооперированных с подозрением на РЦЖ в УКБ 1 Сеченовского Университета в 2018 г (Рисунок 3). Целью этапа явилось определение распространенности доброкачественных и злокачественных образований ЩЖ среди пациентов с узловым зобом, направленных на оперативное лечение с результатами цитологического исследования Bethesda III–VI.

На II этапе проведено молекулярно-генетическое исследование послеоперационных гистологических образцов с целью дифференциальной диагностики доброкачественных и злокачественных образований ЩЖ, различных гистологических вариантов РЦЖ, а также анализа наличия ассоциации данных маркеров с признаками агрессивного течения РЦЖ.

Критерии включения для всех участников исследования:

- мужчины и женщины 18–80 лет;
- заключение Bethesda III–VI по данным ТАБ;
- наличие морфологически верифицированного диагноза;
- наличие цитологического и гистологического образцов, амбулаторной карты пациентов.

Критерии невключения для всех участников исследования:

- недостаточное количество клеточного материала для молекулярно-генетического исследования, неинформативный пунктат (Bethesda I).

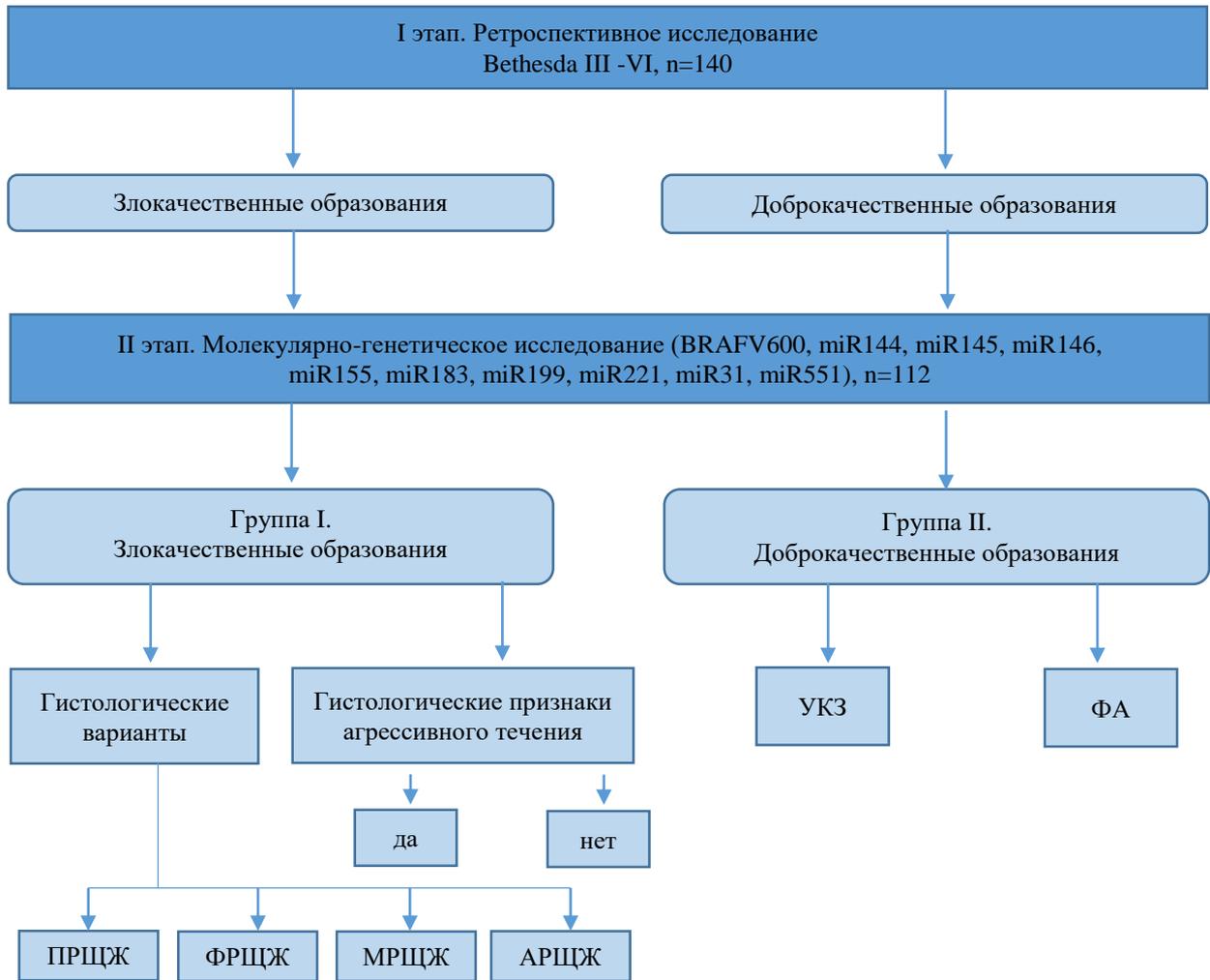


Рисунок 3 – Группы исследования

Этап I. Анализ данных истории болезни

2.2. Характеристика выборки пациентов

В соответствии с поставленными задачами нами были проанализированы данные историй болезни пациентов, прооперированных в отделение онкологической хирургии УКБ№1 Сеченовского университета за 2018 г. В исследование вошло 140 пациентов, 30 мужчин и 110 женщин. Данные цитологического исследования сопоставлены с заключительным гистологическим диагнозом. Отдельно анализировались случаи рецидива опухоли ($n = 8$).

Исследование проводилось с соблюдением принципов добровольности и конфиденциальности в соответствии с «Основами законодательства РФ об охране здоровья граждан» (Указ Президента РФ от 24.12.1993 № 2288).

Проведение исследования было одобрено локальным комитетом по этике Первого МГМУ имени И.М. Сеченова (регистрационный номер № 02-17, дата проведения заседания 15.03.2017).

2.3. Характеристика методов 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:

- 1) результаты цитологического исследования (Bethesda III–VI),
- 2) наличие узла большого размера, вызывающего компрессионный синдром (сдавление и смещение трахеи, пищевода).

2.3.1. Ультразвуковое исследование щитовидной железы

Ультразвуковое исследование ЩЖ проводили в кабинете функциональной диагностики УКБ№1 на аппарате Medison SonoAceX8c линейным датчиком 7–10 МГц. Были проанализированы протоколы УЗИ, согласно которым оценивали общий объем ЩЖ и размер и характеристики узловых образований.

Расчет объема ЩЖ (см³) производился по следующей формуле (Brunn, 1981):

$$\text{Объем ЩЖ} = (\text{объем правой доли} + \text{объем левой доли}) \times 0,479 \quad (1)$$

где *объем правой доли* = *ширина* × *длина* × *толщина правой доли*;
объем левой доли = *ширина* × *длина* × *толщина левой доли*;
 0,479 – коэффициент для поправки на эллипсоидную форму.

За нормальный объем ЩЖ принимали значения у женщин до 18 см³, у мужчин до 25 см³.

В качестве неблагоприятных прогностических ультразвуковых признаков были оценены следующие доступные показатели:

- наличие кальцинатов,
- неровность/нечеткость контура,
- гипоехогенность узлового образования.

2.3.2. Гормональное исследование

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.

2.3.3. Цитологическое исследование

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

2.3.4. Гистологическое исследование

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.)

2.3.5. Молекулярно-генетическое тестирование

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: уровней экспрессии гена HMGA2, 12 miRNA, miR144, miR145, miR146, miR155, miR183, miR199, miR221, miR31, miR551, miR375, miR451, miR7; мутации V600E в гене BRAF.

Выделение ДНК и РНК из биологического материала. Из материала гистологических препаратов выделяли суммарную НК (ДНК и РНК). Выделение суммарной НК проводили как описано в (Titov, 2016) с модификацией, а именно: высушенный цитологический препарат смывали в пробирку тремя порциями лизирующего буфера по 200 мкл каждая. Концентрации тотальной РНК находились в диапазоне 3,1–97,5 нг/мкл (в среднем 25,2 нг/мкл).

Выявление miRNA. Детекцию уровня экспрессии гена 12 miRNA miR144, miR145, miR146, miR155, miR183, miR199, miR 221, miR31, miR 551, miR375, miR451, miR7 с помощью ОТ-ПЦР-РВ проводили для всех типов опухолей и образований. Для выявления зрелых miRNA использовали метод stem-loop RT-PCR (Chen C., 2005). Реакцию обратной транскрипции и ПЦР в реальном времени проводили как описано в (Titov, 2016). Для каждой miRNA отдельно проводили реакцию обратной транскрипции с последующей ПЦР-РВ. Для каждого образца анализ проводили в одном повторе. Нормировку содержания miRNA проводили на геометрические средние содержания трех референсных мРНК с помощью метода 2- Δ Cq (Livak, 2001). Уровень относительной экспрессии miRNA рассчитывали с помощью метода 2- Δ Cq. Повышенным или пониженным уровнем miRNA в исследуемом образце считали изменение уровня в пять раз или более по отношению к нормальному (контрольному образцу), соответственно, в большую или меньшую сторону.

Выявление мутации V600E в гене BRAF. Все образцы были проанализированы на наличие соматической мутации V600E в гене BRAF. Для проведения Real-Time PCR и Real-Time RT-PCR использовали термоциклер CFX96 (Bio-Rad Laboratories, США) и лиофилизованные готовые реакционные смеси «Мастер-микс ОТ-ПЦР» и «Мастер-микс ОТ-ПЦР» (АО «Вектор-Бест»). Стандартная концентрация праймеров во всех реакциях – 0,5 мкМ, флуоресцентно-меченого зонда – 0,25 мкМ. Детекцию соматической мутации проводили с помощью аллель-специфичной ПЦР с гидролизуемым зондом. Протокол ПЦР: предварительный прогрев при 95 °C – 2 мин, 50 циклов: денатурация при 94 °C – 10 сек, отжиг и элонгация: 60 °C – 15 сек. Использовали два аллель-специфичных олигонуклеотидных зонда –

один для нормальной последовательности, второй – для мутации. Вычисляли разницу пороговых циклов (dCt) между ними. $dCt < 9$ свидетельствовало о наличии мутации, $dCt \geq 9$ – норма.

Полуколичественная оценка содержания матричных РНК. Полуколичественную оценку содержания мРНК проводили методом ОТ-ПЦР-РВ со специфическими праймерами и флуоресцентно-мечеными зондами для выявления мРНК HMGA2 и гена домашнего хозяйства PGK1 (фосфоглицераткиназа), используемого в качестве нормировочного. Протокол RT-PCR: инкубация при 45 °C – 30 мин, прогрев при 95 °C – 2 мин, 50 циклов: денатурация при 94 °C – 10 сек, отжиг и элонгация: 60 °C – 20 сек. Уровень относительной экспрессии рассчитывали с помощью метода 2- ΔCq .

Определение соотношения количества копий митохондриальной и ядерной ДНК. Выявление митохондриальной и ядерной ДНК проводили с помощью Real-Time PCR, протокол ПЦР: предварительный прогрев при 95 °C – 2 мин, 50 циклов: денатурация при 94 °C – 10 сек, отжиг и элонгация: 60 °C – 20 сек. Определение соотношения осуществляли с помощью метода 2- ΔCq .

2.4. Статистическая обработка

Статистическую обработку результатов исследования проводили с использованием методов непараметрической статистики с использованием пакета программ IBM SPSS Statistics 23. Исследованные количественные показатели, подчинявшиеся нормальному распределению, представляли в виде $M \pm m$, где M – среднее арифметическое, а m – стандартное отклонение. Данные, не подчиняющиеся нормальному распределению, представляли в виде $Me [Q1; Q3]$, где Me – медиана, $Q1$ и $Q3$ 1-й и 3-й квартили соответственно. Для сравнения групп по количественным признакам использованы: U-критерий Манна – Уитни и критерий Краскала – Уоллиса. Для сравнения частот использовался χ^2 -тест и точный критерий Фишера. Различие между группами считали статистически значимым при уровне значимости $p < 0,05$.

Для выбора порогового уровня показателей (cut-off) и расчета чувствительности и специфичности был проведен ROC-анализ. Критерием выбора значения cut-off принято требование максимально суммарной чувствительности и специфичности.

Для построения модели прогноза вероятности события в зависимости от значения нескольких предикторов использовался метод бинарной логистической регрессии. Поскольку прогнозируемый исход является дихотомическим (бинарным), линейное регрессионное уравнение с зависимой дихотомической переменной Z , не будет адекватно поставленной задаче, так как в классическом уравнении регрессии предполагается, что Z – непрерывная переменная. Поэтому вместо предсказания бинарной переменной, мы предсказываем непрерывную переменную со значениями на отрезке $[0,1]$ при любых значениях независимых переменных. Это достигается применением логит-преобразования (2):

$$P = \frac{1}{1 + e^{-z}}, \quad (2)$$

где P – вероятность принадлежности наблюдения к определенному классу при полученном значении функции z ;

z – классифицирующая дискриминантная функция вида (3)

$$z = a + b_1X_1 + b_2X_2 + \dots + b_nX_n, \quad (3)$$

где a – некоторая константа;

X_i – независимые переменные (предикторы);

b_i – коэффициенты, расчёт которых является задачей бинарной логистической регрессии.

При построении бинарной логистической регрессионной модели использовался метод обратной селекции. Качество приближения регрессионных моделей при каждом последующем шаге оценивалось при помощи функции подобия – отрицательного удвоенного значения логарифма этой функции (-2LL). Исходя из того, что значением функции является вероятность принадлежности анализируемого значения к определенному классу, то, если значение p меньше 0,5, то делается вывод, что событие скорее всего не наступит; в противном случае предполагается наступление события.

Часть дисперсии, объяснимая с помощью логистической регрессии, вычислялась по методу Наделькеркса.

Оценка качества полученных моделей проводилась с помощью ROC-анализа по площади под характеристической кривой. Значение площади приведено с 95% доверительным интервалом. Приблизительная шкала значений AUC, отражающая качество диагностического теста такова:

AUC = 0,9–1,0 – отличное качество

AUC = 0,8–0,9 – высокое качество

AUC = 0,7–0,8– хорошее качество

AUC = 0,6–0,7– среднее качество

AUC = 0,5–0,6– плохое (неудовлетворительное) качество.

В представленной работе значение $AUC \geq 0.7$ принято достаточным для исследуемого классификатора в качестве диагностического теста.

Для значений операционных характеристик вычисляли 95%-й доверительный интервал по методу Уилсона.

Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1. Оценка клинико-anamnestических и лабораторных данных пациентов

Проанализированы данные 140 пациентов с узловым зобом, прооперированных в одном центре за 2018 г. с подозрением на РЩЖ. Среди пациентов преобладали женщины, с соотношением мужчины и женщины 1: 3,6. Средний возраст включенных пациентов составил 49 [19; 79] лет (Таблица 3). 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 гипотиреозом и 20 пациентов – с гипертиреозом. Средний объем ЩЖ составил $33,0 \pm 27,2$ мл.

Таблица 3 – 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 ПРЩЖ – 87,7%, 6,1% – ФРЩЖ, 4,5% – МРЩЖ 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 4). 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 АРЩЖ.

Таблица 4 – Распределение пациентов с РЩЖ по стадиям TNM – классификация 8-го пересмотра (n = 98)

<i>Стадия T</i>	<i>Стадия N</i>	<i>Стадия M</i>	<i>Количество пациентов</i>
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%)
<i>Примечание. Данные представлены как абсолютные значения и %</i>			

Включенные в исследование послеоперационные гистологические образцы, которым было выполнено молекулярно-генетическое исследование, 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). Пациенты II группы разделены по факту наличию/отсутствию признаков гистологически агрессивного течения РЩЖ: 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 и подгруппа с отсутствием признаков агрессивного течения опухоли (n = 23). Отдельно оценивали все известные случаи рецидива 13% (n = 8).

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).

По результатам гистологического исследования пациенты были разделены на две группы – с РЩЖ (98 пациентов) и доброкачественными образованиями ЩЖ (42 пациента). Анализ подгрупп не выявил достоверной разницы в уровне предоперационного ТТГ, объема ЩЖ и локализации узлов (Таблица 5).

Таблица 5 – 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%)	–

Примечание. * – данные представлены как среднее ± стандартное отклонение, t-тест; ** – данные представлены как абсолютные значения и %, χ^2 -тест. Уровень статистической значимости различий между группами, $p < 0,05$

Размер узлов оказался достоверно больше в группе с доброкачественными образованиями, [24,1±1,88] мм против [17,9±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% ($p = 0,001$), гипоэхогенность 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.

3.2. Определение мутации V600E в гене BRAF

В исследовании были включены послеоперационные образцы тканей 112 больных, прооперированных с подозрением на РЩЖ (с цитологическим заключением Bethesda III–VI) в период с 2018 г по 2019 гг. на базе отделения онкологической хирургии №1 УКБ №1 Сеченовского Университета.

Включенные в исследование послеоперационные гистологические образцы были разделены на 2 группы: I группа представлена злокачественными образованиями ЩЖ (n = 54) с выделением подгрупп. Подгруппа IA распределена согласно гистологическим вариантам РЩЖ: ПРЩЖ (n = 47), ФРЩЖ (n = 3), МРЩЖ (n = 2), анапластический РЩЖ (n = 2) и подгруппа IB с наличием одного и более признаков гистологически агрессивного течения РЩЖ (n = 31): мультицентричность, инвазия в капсулу узла и капсулу щитовидной железы, инвазия в лимфатические сосуды, наличие регионарных или отдаленных метастазов и подгруппа с отсутствием признаков агрессивного течения опухоли (n = 23). Отдельно оценивали все известные случаи рецидива 13% (n = 8). Во II группу (группа контроля) вошли доброкачественные образования ЩЖ (n = 58): фолликулярная аденома – 30, коллоидный зоб – 28.

Средний возраст исследованных пациентов с диагнозом РЩЖ составил 51,3 [19; 79] года. По проанализированным данным в I группе РЩЖ преобладали женщины 46 (85,1%), доля мужчин составила 14,8% (n = 8). Большинство пациентов (68,5%) имели узлы более 1 см. Обращает на себя внимание, что 31,4% прооперированных пациентов по поводу РЩЖ имели узел менее 1 см. Исследование показало, что средний объем ЩЖ составил $33,0 \pm 27,2$ мл. Выбор объема операции был связан с размером и количеством узлов, наличием или отсутствием признаков метастатического поражения регионарных лимфоузлов, а также учитывались данные цитологического исследования. В 70,3% случаев выполнено оперативное лечение в объеме тиреоидэктомии, из которых 42,6% с применением лимфодиссекции, в 29,6% случаев – гемитиреоидэктомия.

Нами был проведен молекулярно-генетический анализ 112 образцов послеоперационного гистологического исследования на наличие мутации BRAFV600E. В ходе дальнейшего исследования нами был проведен корреляционный анализ BRAFV600E с характеристиками опухоли и клинико-анамнестическими данными пациентов с верифицированным РЩЖ (Таблица 6).

Таблица 6 – 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>			

По данным нашего исследования мутация V600E в гене BRAF в 68% случаев определялась лишь в группе с гистологическим диагнозом папиллярная карцинома. При других гистологических вариантах РЩЖ 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.

Распределение пациентов в рамках нашего исследования по половому признаку показало следующие результаты в зависимости от BRAF-положительного статуса: у 7 из 8 мужчин (87,5%) была выявлена данная мутация, у 25 из 32 женщин (52%). В ходе нашего 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%), $p = 0,015$.

У 6 из 12 пациентов (50%) с микрокарциномами имела место инвазия в капсулу узла ЩЖ, у 41,6% (5 пациентов) опухоль не выходила за пределы капсулы, в 3 случаях (25%) – мультицентричное распространение опухоли, инвазия в капсулу ЩЖ – 2 пациента (16,6%), и лишь у 1 (8,3%) пациента зафиксированы метастазы в регионарные лимфоузлы, 1 пациент (8,3%) – инвазия в лимфатические сосуды.

3.3. Определение уровня экспрессии гена HMGA2

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

В ходе дальнейшего исследования был проведен анализ исследуемых маркеров и характеристик узловых образований щитовидной железы. В случае опухолей с таким ультразвуковым признаком как «нечеткость/неровность контуров» с достоверно большей частотой ($p = 0,01$) определялась экспрессия гена HMGA2 и повышенная экспрессия miR31 ($p = 0,02$). Гипоэхогенная структура была связана с пониженной экспрессией miR144 ($p = 0,01$) и miR155 ($p = 0,006$). В случае метастатического поражения регионарных лимфатических узлов с высокой достоверностью ($p = 0,0001$) отмечалась пониженная экспрессия miR7 в сравнении с опухолями без экстратиреоидного распространения. Также и в случае рецидивирующего течения была выявлена пониженная экспрессия miR7 ($p = 0,003$).

Таким образом, уровень экспрессии miR7 был достоверно связан с рецидивированием (Рисунок 4) и метастатическим поражением лимфатических узлов. В ходе исследования проведен ROC-анализ корреляции miR7 с рецидивами, площадь под кривой (AUC) составила 0,165 (CI 0,44–0,285).

По гендерным характеристикам были выявлены следующие данные: HMGA2 определялся достоверно с более высокой частотой у мужчин ($p = 0,008$), экспрессия трех miR146, miR221 и miR551 была выше у мужчин, чем у пациентов женского пола с достоверностью $p = 0,001$, $p = 0,03$ и $p = 0,02$ соответственно. Корреляцию с возрастом показали miR144, miR183, miR221 и miR451. У категории пациентов 45 лет и старше отмечалась повышенная экспрессия 221 с достоверностью $p = 0,035$,

в то время как экспрессия miR144 и miR451 у данной категории пациентов была достоверно снижена ($p = 0,06$ и $p = 0,017$ соответственно).

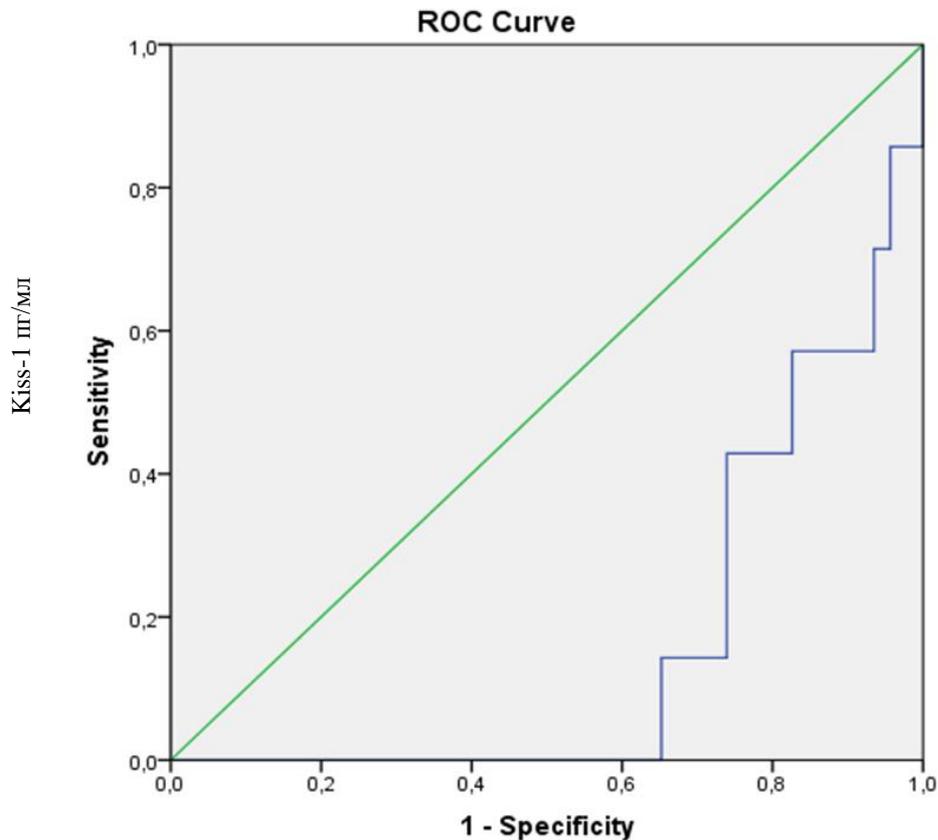


Рисунок 4 – ROC-анализ корреляции miR7 с рецидивирующим течением заболевания

3.4. Определение уровня экспрессии miRNA: miR144, miR145, miR146, miR155, miR183, miR199, miR221, miR31, miR551, miR375, miR451, miR7

При распределении образцов по гистологическим характеристикам в нашем исследовании были выявлены онкогенные и онкосупрессорные miRNA для каждого из гистологических диагнозов.

По полученным данным в ходе исследования нами были определены онкогены ПРЦЖ miR31, miR155, miR551, miR146, ФРЦЖ-miR183, МРЦЖ-miR7 и miR375. В случае узлового коллоидного зоба, с высокой достоверностью, отмечалась повышенная экспрессия онкосупрессорных miR199, miR145 и miR7, фолликулярной аденомы – повышенный уровень экспрессии miR145 и miR7 (Таблица 7).

Таблица 7 – Сравнительный анализ уровня экспрессии miRNA в различных гистологических вариантах узловых образований щитовидной железы

miRNA	УКЗ	ФА	ПРЦЖ	ФРЦЖ	МРЦЖ	p-уровень
145	+	+	–	–	–	0,0001
31	–	–	+	–	–	0,0001
155	–	–	+	–	–	0,0001
183	–	–	–	+	–	0,0020
551	–	–	+	–	–	0,0001
146	–	–	+	–	–	0,0001
7	+	+	–	–	+	0,0001
199	+	–	–	–	–	0,0080
375	–	–	–	–	+	0,0001
<i>Примечание.</i> (+) – повышение; (-) – снижение экспрессии						

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 8).

Таблица 8 – Сравнительный анализ уровней экспрессии различных miRNA в группах доброкачественных и злокачественных образований ЩЖ.

miRNA	Доброкачественные	Злокачественные	p-уровень
551	–	+	0,0001
375	–	+	0,0001
155	–	+	0,0001
146	–	+	0,0001
221	–	+	0,03
31	–	+	0,0001
145	+	–	0,0001
7	+	–	0,0001
<i>Примечание.</i> (+) – 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 5).

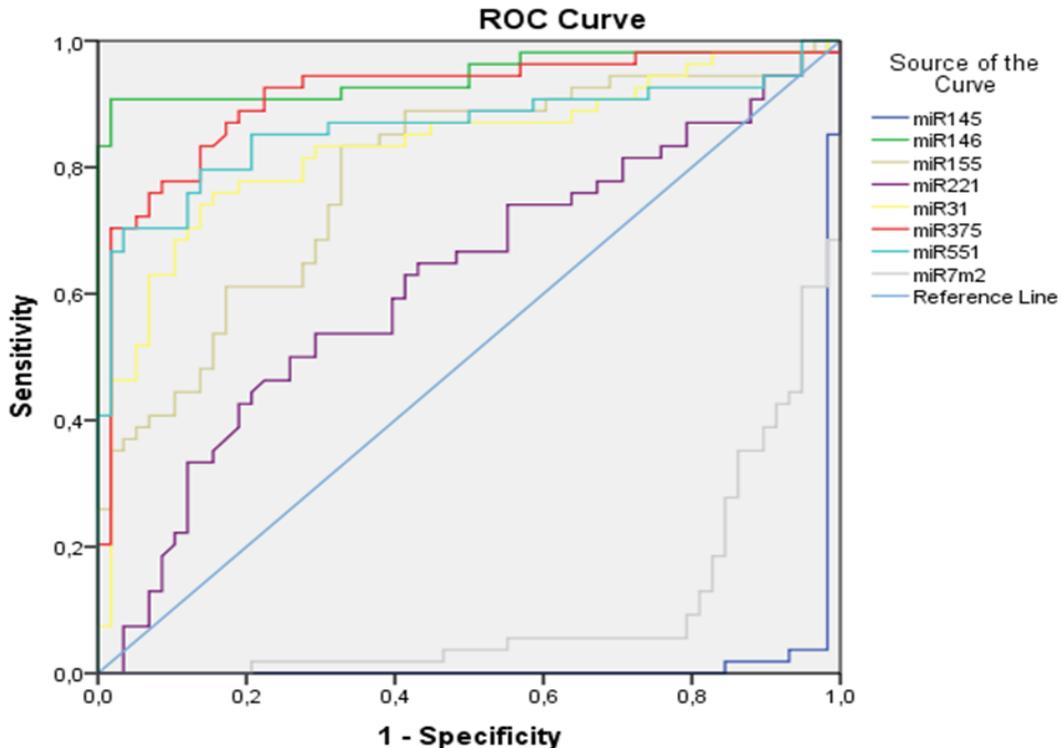


Рисунок 5 – ROC- анализ изменения уровня экспрессии различных miRNA в группе доброкачественных и злокачественных образований ЦЖ

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 9.

Таблица 9 – ROC-анализ: диагностическая значимость уровней экспрессии различных miRNA

<i>miRNA</i>	<i>AUC</i>	<i>Чувствительность</i>	<i>Специфичность</i>
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 наличии злокачественного процесса по профилю экспрессии miRNA. В результате проведенного анализа в модель были включены уровни экспрессии 2 miRNA (Таблица 10).

Таблица 10 – Коэффициенты (B) классифицирующий дискриминантной функции (Z)

<i>Предиктор</i>	<i>Коэффициент B</i>
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 Наделькеркса – 87,5%, что свидетельствует о высокой диагностической ценности полученной модели (Рисунок 6).

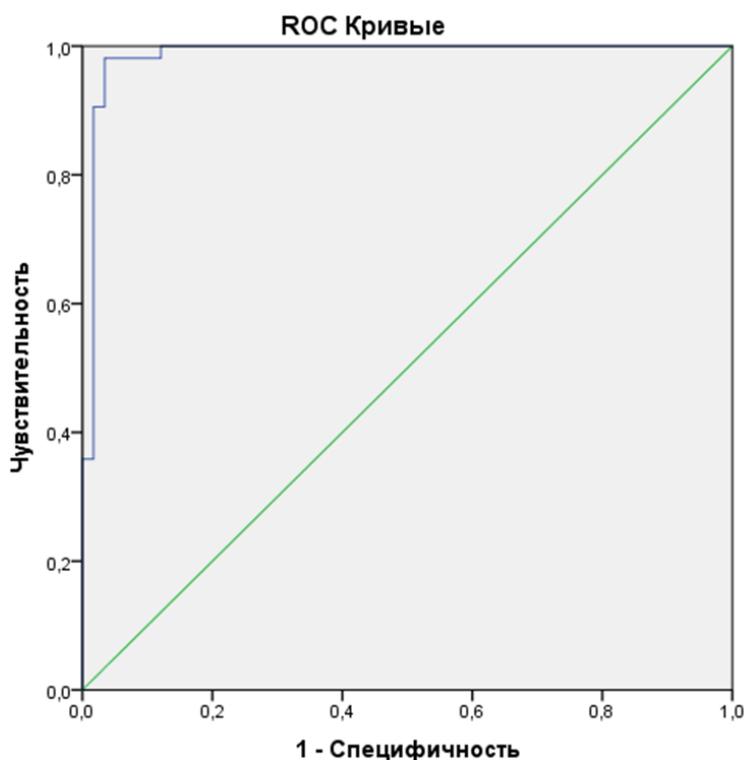


Рисунок 6 – ROC анализ диагностической значимости определения экспрессии miRNA

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%).

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.

Ниже приведены примеры использования диагностической модели на основании значений miRNA в клинической практике (использовали калькулятор, созданный в программе Excel на основании формулы).

Клинический случай №1.

Пациент А. 59 лет. Больным считает себя с момента, когда отметил появление увеличенных лимфатических узлов шеи. При проведении биопсии лимфатического узла шеи выявлен метастаз папиллярного рака щитовидной железы. Далее, при обращении в отделение УКБ№1 по результатам цитологического исследования

подтвердился диагноз папиллярный рак щитовидной (Bethesda IV) железы с метастатическим поражением лимфатических узлов шеи с обеих сторон. 07.06.2018 пациенту проведено хирургическое лечение в объеме расширенная тиреоидэктомия с резекцией возвратных гортанных нервов с обеих сторон. Расширенная лимфаденэктомия на шее справа с удалением клетчатки задней поверхности шеи. Удаление клетчатки пре- и паратрахеальных областей с обеих сторон и передне-верхнего средостения. Пластика операционного дефекта перемещенными кожно-жировыми лоскутами. Трахеостомия. По результатам гистологии множественные узлы представлены очагами папиллярно рака щитовидной железы, с участками фолликулярного строения, опухоль прорастает капсулу щитовидной железы. 18.07.18 проведен курс радиотерапии активностью 3,7 ГБк. В августе 2018 г выявлен увеличенный яремный лимфатический узел, по результатам биопсии – метастаз папиллярно рака. Проведена повторная операция на лимфатических путях шеи справа. Пациент находится на супрессивной терапии под наблюдением онколога и эндокринолога.

При исследовании послеоперационного материала уровень экспрессии miR145 составил 7,29 усл. ед., miR7m2 – 460,36 усл. ед. При вычислении дискриминантной функции получено значение;

$$-1,596 \times (-7,29) - 0,041 \times (-160,36) - 5,370 = 12,84.$$

После логит-преобразования получена вероятность злокачественного образования $P = 1/(1+e^{-12,84}) = 99,99\%$.

Клинический случай №2.

Пациентка С., 30 лет. В анамнезе правосторонний эутиреоидный зоб. По результатам цитологии – Bethesda IV. Выполнено оперативное лечение в объеме правосторонней гемитиреоидэктомии. По результатам гистологии – фолликулярная аденома на фоне многоузлового зоба.

При исследовании послеоперационного материала уровень экспрессии miR145 составил 2,12 усл. ед., miR7m2 – 21,64 усл. ед. При вычислении дискриминантной функции получено значение:

$$-1,596 \times (-2,12) - 0,041 \times (-21,64) - 5,370 = -1,099.$$

После логит-преобразования получена вероятность злокачественного образования $P = 1/(1+e^{1,099}) = 24,99\%$.

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 2 miRNA.

Таблица 11 – Коэффициенты (B) классифицирующий дискриминантной функции (Z)

Предиктор	Коэффициент B
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 7).

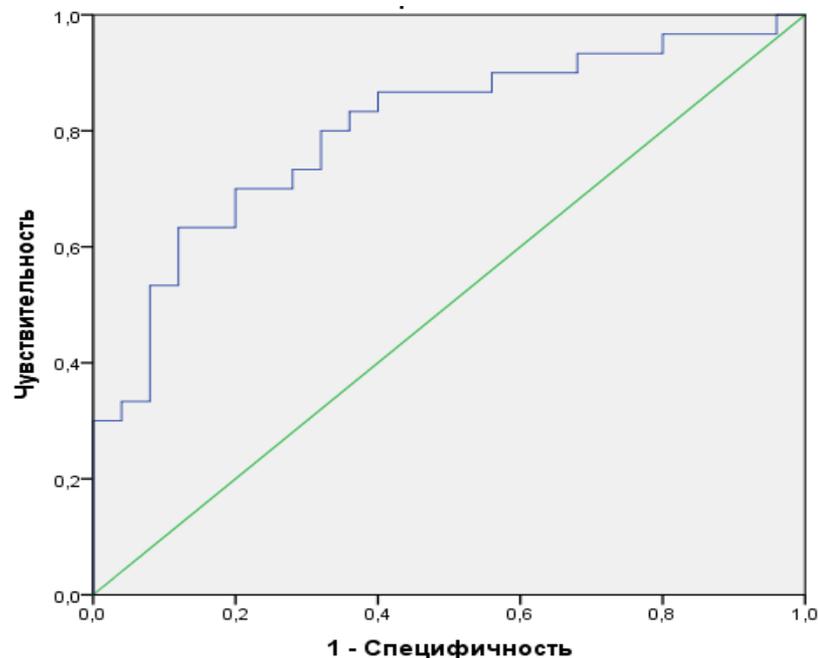


Рисунок 7 – ROC –анализ прогностической ценности для предсказания агрессивного течения по профилю экспрессии miRNA.

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%).

Ниже приведены примеры использования прогностической модели на основании значений miRNA в клинической практике (использовали калькулятор, созданный на основании формулы в программе Excel).

Клинический случай №1.

Пациентка П. 44 лет обратилась к врачу с жалобами на «чувство кома в горле», дискомфорт в области шеи, изменение тембра голоса. При обследовании выявлен узел правой доли с лимфаденопатией в боковом шейном треугольнике с ипсилатеральной стороны по результатам ультразвуковой диагностики. По результатам ТАБ получена «атипия неопределенного значения» (Bethesda III). После проведения повторной ТАБ получена цитологическая картина, соответствующая раку, вероятнее папиллярному, в лимфатическом узле – метастаз рака, вероятнее папиллярного. Проведено хирургическое лечение в объеме расширенная тиреоидэктомия с фасциально-фулярным иссечением клетчатки шеи справа. По результатам гистологии – папиллярный рак (классический вариант), опухоль прорастает ее капсулу без выхода за ее пределы. Проведен курс радиойодтерапии. Пациентка получает левотироксин натрия в супрессивной дозе под наблюдением эндокринолога и онколога. При исследовании послеоперационного материала уровень экспрессии miR451a_{m2} составил 3,885 усл. ед., miR7m2 – 172,698 усл. ед. При вычислении дискриминантной функции получено значение $0,147 \times 3,885 - 0,015 \times (-172,698) - 1,631 = 1,530$. После логит-преобразования получена вероятность агрессивного течения злокачественного образования $P = 1/(1+e^{-1,530}) = 82,2\%$.

Клинический случай №1.

Пациентка Т., 61 год, длительное время наблюдалась у эндокринолога по поводу многоузлового зоба, по результатам ультразвуковой диагностики узловые образования не превышали 2 см, и цитологическая картина соответствовала узловому коллоидному зобу. При очередном ультразвуковом контроле отмечено увеличение узлового образования до 3,5 см. В связи с чем была проведена повторная пункционная

биопсия узлового образования с отрицательной динамикой. По результатам ТАБ получена цитологическая картина, подозрительная в отношении рака щитовидной железы (Bethesda V). Проведено оперативное лечение в объеме тиреоидэктомии с микрохирургическим невролизом возвратных гортанных нервов, центральная шейная лимфаденэктомия. По результатам гистологического исследования – морфология папиллярно-фолликулярного рака солидного строения на фоне фолликулярной аденомы. В 3 лимфоузлах – гистиоцитоз синусов, атипичных клеток не найдено. Жировая клетчатка с участками кровоизлияния. При исследовании послеоперационного материала уровень экспрессии miR451 составил 4,489 усл. ед., miR7 – 9,212 усл. ед. При вычислении дискриминантной функции получено значение $0,147 \times 4,489 - 0,015(-9,212) - 1,631 = -0,833$. После логит-преобразования получена вероятность агрессивного течения злокачественного образования $P = 1/(1+e^{0,833}) = 30,3\%$.

Глава 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

4.1. Оценка распространенности рака щитовидной железы в различных подгруппах цитологического диагноза

Узловой зоб является широко распространенной патологией. Во всем мире продолжается неуклонный рост РЩЖ. На сегодняшний день сохраняются диагностические трудности и спорные вопросы в отношении выбора тактики ведения и лечения пациентов с синдромом узлового зоба, особенно в группе пациентов с «неопределенным» цитологическим диагнозом (группа III–V по Bethesda).

Позиция в отношении лечебной тактики узлового зоба, в частности, РЩЖ на протяжении нескольких десятилетий была и остается неоднозначной. Длительное время доминирующую позицию занимала более агрессивная хирургическая тактика для все пациентов с РЩЖ. Но исследования последних лет показывают, что большое количество пациентов низкого риска, а также пациенты с доброкачественными образованиями подвергаются радикальным оперативным методам лечения, что сопряжено с риском осложнений и как следствия снижением качества жизни. Данные, полученные нами по оценке распространенности доброкачественных и злокачественных образований в различных группах цитологического диагноза подтверждают вышесказанное.

Результаты проведенного исследования показали, что доля пациентов с наиболее неоднозначными предоперационными цитологическими диагнозами (III, IV категории по Bethesda) в рамках конкретного лечебного учреждения составила 57%. По проанализированным данным в данной подгруппе пациентов (III, IV категории по Bethesda) по результатам ТАБ было выявлено, что риск РЩЖ для этой группы пациентов составляет 51%, а 49% прооперированных имели доброкачественное образование [11].

По результатам исследований разных авторов, неопределенный цитологический диагноз имеет различный риск злокачественного процесса (5–37%). В исследование Allen S. Но, 2014 г. было продемонстрировано, что риск злокачественности в группе Bethesda III составил 26 – 37%, аналогичный тому, который был проде-

монстрирован в цитологической категории Bethesda IV (15–30%) [120]. В ходе данного исследования было выявлено, что 22 пациента (40,7%) на дооперационном этапе имели цитологическое заключение Bethesda IV, у 14 – Bethesda V (25,9%). В группе Bethesda III риск рака составил 25%, Bethesda IV – 52,7%, Bethesda V – 89,3%. В группе с цитологическим диагнозом Bethesda VI все пациенты (100%) по результатам гистологического исследования имели злокачественные образования.

По полученным данным при анализе выборки пациентов, прооперированных с подозрением на РЩЖ, было выявлено, что распространённость рака по результатам гистологического исследования составила 70%. Основная доля при этом приходится на ПРЩЖ (87,8%), что совпадает с результатами данных мировой статистики.

По данным анализа распределения пациентов со злокачественными образованиями ЩЖ (n = 54) по системе стадирования TNM было установлено, что большинство пациентов имели стадию T1 (n = 28) или T2 (n = 4), а остальные 22 пациента имели T3 и T4 стадии. По проанализированным данным были выявлены следующие гистологически агрессивным характеристикам опухоли: 7 (13,7%) пациентов имели инвазию в капсулу узла, 3 пациента (5,8%) – инвазию в лимфатические сосуды, в 15,6% (n = 8) случаев отмечалась мультицентричность и у 8 пациентов (15%) опухоль проросла в капсулу органа (ЩЖ). Метастатическое поражение регионарных лимфоузлов отмечалось у 20 пациентов (38,9%), у 61,1% пациентов не было выявлено данных за метастатический процесс. Отдаленные метастазы выявлены в одном случае у пациента с АРЩЖ.

Научная оценка полученных результатов свидетельствует о высокой частоте встречаемости «неопределенного» цитологического диагноза по данным тонкоигольной аспирационной биопсии и большом проценте доброкачественных образований среди прооперированных больных с данной цитологической категорией. Полученные нами данные указывают на необходимость поиска новых высокочувствительных маркеров РЩЖ, позволяющих оптимизировать лечебную тактику у данной категории пациентов.

В настоящее время нет единого мнения о тактике ведения данной категории пациентов, зачастую, бывает сложно определить оптимальный объем оперативного лечения на дооперационном этапе. Такие пациенты, подвергаются диагностическим и, в некоторых случаях, повторным тиреоидэктомиям, что сопряжено не только с экономическими тратами, но и с риском серьезных хирургических осложнений в 2–10% случаев [12]. В связи с этим остается открытым вопрос о необходимости совершенствования методов ранней диагностики РЩЖ у пациентов с синдромом узлового зоба. Это особенно важно с практической точки зрения и перспективно для высокодифференцированных форм РЩЖ с учетом их широкой распространенности.

У данной категории пациентов особенно выгодно выполнение дополнительного молекулярно-генетического анализа на дооперационном этапе с целью уточнения плана дальнейшей тактики. На примере гистологических образцов нами была продемонстрирована возможность использования miRNA в качестве дополнительно диагностического, а также прогностического критерия в клинической практике.

4.2. Изучение показателей, ассоциированных с риском злокачественности узлового образования щитовидной железы

Важную роль в диагностике узловой патологии ЩЖ играет ультразвуковая диагностика. Роль ультразвукового протокола, в значительной степени, зависит от опыта специалиста, а также полноты и информативности осмотра. Неполные ультразвуковые исследования в конечном счете влияют на неточную стратификацию риска злокачественного процесса и, в последующем, принятие неправильно терапевтического решения.

На протяжении многих лет предпринимаются усилия по унификации результатов УЗИ ЩЖ и повышению их диагностической ценности. Horvath и соавторы разработали классификацию для стандартизации показателей данных по визуализации ЩЖ при помощи ультразвука – система TIRADS [121]. Кроме того, рекомендации РАЭ, АТА предусматривают конкретные показатели, которые, как минимум,

должны быть описаны в заключениях УЗИ [5; 22; 122]. Все эти рекомендации, несмотря на некоторые различия, придерживаются одного принципа, согласно которому все протоколы УЗИ ЩЖ должны четко описывать признаки, которые влияют на терапевтическую тактику. На сегодняшний день, несмотря на предпринятые усилия, в клинической практике унификация всех заключений представляется сложной задачей, и результаты УЗ-протоколов во многих случаях по-прежнему опираются на субъективное видение каждого конкретного специалиста.

В рамках проведенного исследования не было получено корреляции злокачественных характеристик опухоли ЩЖ с гендерными признаками, возрастом, локализацией узлового образования, функцией ЩЖ, а также уровнем ТТГ. В нашей работе были подтверждены данные ряда исследователей (8) по ассоциации РЩЖ с ультразвуковыми признаками злокачественности узла, такими как: гипоэхогенность, наличие кальцинатов, нечеткость и неровность контуров. Интересными и важными с практической точки зрения, в рамках нашего исследования, являются данные, которые демонстрируют, что большой размер узла не ассоциировался с риском РЩЖ, хотя это противоречит мнению других исследователей. Эти данные еще раз подтверждают, что вне зависимости от размера узлового образования ЩЖ, необходимо учитывать «подозрительные» ультразвуковые признаки, указывающие на возможный злокачественный потенциал опухоли и другие важные клинические и анамнестические данные.

Ультразвуковая диагностика в сочетании с цитологией и молекулярно-генетическим анализом в сомнительных случаях способствует усовершенствованию предоперационной диагностики больных с синдромом узлового зоба.

4.3. Определение мутация V600E в гене BRAF в качестве диагностического и прогностического маркера рака щитовидной железы

По данным мировых исследований распространенность РЩЖ со временем возросла, наиболее распространенным видом среди дифференцированных форм является папиллярная карцинома ЩЖ, которая является гетерогенной по поведению опухоли и прогнозу. По данным разных авторов частота встречаемости BRAF-мутации

значимо разнится, что скорее всего связано с неоднородностью ПРЦЖ по гистологическому строению. С более высокой частотой BRAF-мутация определяется в случае ПРЦЖ с классическим и высококлеточным вариантом строения, как было показано в работе Н. Chang и соавторов в 2012 г [123; 124]. Несмотря на то, что большинство ПРЦЖ успешно дают ответ на комбинацию хирургического лечения, терапии левотироксином натрия в супрессивной дозе, а также РЙТ, определенная доля пациентов с ПРЦЖ не отвечает на проводимое лечение и приводит, в конечном итоге, к коморбидности и смертности. Поэтому крайне важно дальнейшее выяснение патогенеза ПРЦЖ относительно прогноза на молекулярном уровне.

В ПРЦЖ перестройки RET/PTC и NTRK, а также точечные мутации в генах RAS и BRAF активируют путь митоген-активированной протеинкиназы (МАРК) и выявляются более чем в 70% ПРЦЖ [64; 125]. Многочисленные клинико-патологические и молекулярные исследования предоставляют убедительные доказательства того, что активация сигнального пути МАРК является ключевым компонентом трансформации тироцитов при ПРЦЖ. Среди множества генетических изменений наиболее распространенной является точечная мутация BRAFV600E. По данным некоторых научных работ была показана связь данной мутации с экстратиреоидальной инвазией, метастазированием в лимфатические узлы и рецидивом опухоли при ПРЦЖ [126]. В 2010 г Ohori и соавторы провели исследование, в котором оценивали статус BRAF и RAS мутаций, RET/PTC и Pax8/PPAR γ перестроек в 117 образцах ЩЖ, полученных методом ТАБ. В ходе проведения молекулярно-генетического тестирования было показано, что вероятность РЦЖ при «неопределенном цитологическом диагнозе» у пациентов с любой из этих мутаций в узле составила 100% в то время, как без какой-либо мутации лишь 7,6% [87]. Basolo F. и соавторы в своем исследовании от 2010 г показали связь BRAF V600E-мутации с агрессивным течением опухоли, а именно с экстратиреоидным распространением, поздней стадией на момент постановки диагноза, метастазированием в лимфатические узлы, а также отдаленными метастазами [127]. В исследовании Howell GM и соавт., включившем 156 пациентов с ПРЦЖ, была показана ассоциация BRAF мутации с риском метастазирования в лимфатические узлы центрального компонента [128].

O'Neill и соавт. показали большой риск повторных хирургических вмешательств у пациентов с BRAF V600E-положительными опухолями [129]. В исследовании Yip и соавт. BRAF-положительные пациенты чаще нуждались в повторной операции по поводу рецидива/персистенции заболевания по сравнению с BRAF-отрицательными пациентами, в связи с чем было высказано предположение, что дооперационное определение мутации BRAF V600E может быть показанием для расширения первоначального плана хирургического лечения, послеоперационной радиойодотерапии в более высокой дозировке, супрессивной терапии, более тщательного наблюдения [130; 131]. В систематическом обзоре и мета-анализе 14 публикаций, включивших 2470 пациентов с ПРЦЖ из 9 разных стран, было показано, что пациенты с BRAF V600E положительными опухолями чаще имели корреляцию с высоким риском рецидивов по сравнению с пациентами без мутаций (24,9% против 12,6%), риск рецидива у пациентов с данной мутацией варьировал от 11% до 40% (в среднем 26,5%), в то время как у пациентов без мутаций – от 2% до 35% (в среднем 9,5%) [132].

Однако связь BRAF V600E с агрессивным течением и плохим прогнозом при ПРЦЖ на сегодняшний день все еще является предметом обсуждения. Далеко не все исследования подтверждают данные того, что точечная мутация BRAF V600E является независимым предиктором стадии или исхода заболевания. Некоторые исследования считают ее вообще не прогностическим маркером [133; 18], другие же считают его значимым только в одномерном, но не в многомерном анализе [134], а по данным других авторов он может быть полезным в дополнение к другим специфическим методам диагностики на основе клинических и гистологических характеристик [135]. Sancisi V. И соавторы в 2012 году [136] провели исследование, в котором изучили корреляцию мутации BRAF V600E с высокоагрессивным ПРЦЖ с очагами метастазирования в отдаленные органы. В исследование вошли 47 образцов от пациентов с ПРЦЖ с отдаленными метастазами и 75 контрольных образцов от пациентов без признаков метастазирования, рецидивирования в течении минимум 7 лет наблюдения. По результатам исследования было выявлено, что BRAF-мутация присутствовала в 29,8% ПРЦЖ с отдаленными метастазами и в 44,0%

контрольных опухолей. Тем самым исследователи сделали, что мутация BRAF не связана с развитием отдаленных метастазов или летальным исходом при ПРЦЖ и не может предсказывать агрессивное поведение при этом типе опухоли. Также в 2012 году, Guerra A. и соавторы [137] продемонстрировали, что клональный BRAF(V600E) является более редким явлением при ПРЦЖ, несмотря на то что, этот рак чаще представлен комбинацией опухолевых клеток дикого и мутантным типом гена BRAF. Данные результаты свидетельствуют о том, что мутация BRAF в ПРЦЖ является более поздним субклональным событием, внутри опухолевая гетерогенность которой может препятствовать эффективности целенаправленной фармакотерапии, и связь BRAF мутации с более агрессивным течением заболевания должна быть пересмотрена.

По полученным данным в ходе нашего исследования установлено, что мутация V600E в гене BRAF является диагностическим маркером ПРЦЖ. Эти данные совпадают с мнением других исследователей, показавших диагностическую ценность BRAF-мутации для выявления ПРЦЖ. При проведении многофакторного анализа наличие или отсутствие BRAF-мутации не показало существенного изменения диагностических характеристик и было исключено из модели, что согласуется с данными [134]. Не было выявлено ассоциации BRAF мутации с агрессивными гистологическими характеристиками ПРЦЖ, поэтому данный маркер не может быть рекомендован для использования в качестве прогностического критерия, что согласуется с ранее полученными данными многих исследователей [11].

Полученные данные по выявлению BRAF мутации в ПРЦЖ, соответствуют аналогичным результатам других исследователей на Российской популяции, так в исследовании Быкова М.А., проведенном в 2015 году, частота определения BRAF мутации при ПРЦЖ составила 59,4%, однако автором также показана достоверная связь данной мутации с агрессивными характеристиками опухоли, что противоречит нашим результатам.

Приведенные выше данные подтверждают, что присутствие единственной BRAF мутация не может быть фундаментальным событием в опухолевом генезе

или достоверным прогностическим маркером. Таким образом, необходимо продолжить поиск дополнительного маркера, связанного с BRAF-позитивными опухолями и плохим клиническим прогнозом, который в дальнейшем может стать новой терапевтической мишенью и прогностическим маркером ПРЦЖ.

Выполненное исследование по выявлению BRAF- мутации было проведено ретроспективно с использованием гистологического послеоперационного материала. Это же исследование возможно успешно применить и на цитологическом материале в предоперационном периоде, что может служить дополнительным диагностическим маркером РЦЖ в случае «неопределенного» цитологического диагноза у пациентов с синдромом узлового зоба [21; 138].

4.4. Определение уровня экспрессии гена HMGA2, 12 miRNA -144,-145, -146, -155, -183, -199, -221, -31, -551, -375, -451, -7 в гистологических образцах

ПРЦЖ является наиболее распространенным подтипом опухоли РЦЖ. Хорошо известные клинические прогностические факторы включают в себя размер опухоли, региональные и отдаленные метастазы, а также экстра tireоидное распространение. Известно, что в патогенезе ПРЦЖ участвует молекулярный сигнальный каскад RET/PTC-RAS-BRAF. В работах последних лет miRNA были представлены как перспективные молекулярные прогностические маркеры при нескольких типах опухолей.

Недавние исследования по дисрегуляции miRNA продемонстрировали повышенную экспрессию miRNA (в частности, miR222, miR221 и miR146b) в ПРЦЖ по сравнению с таковой в нормальных тканях ЩЖ [97; 98]. Эти данные указывают на отчетливую связь профиля miRNA с канцерогенезом ПРЦЖ. Кроме того, дисрегуляция или аберрантная экспрессия нескольких miRNA в ПРЦЖ была вовлечена в развитие, прогрессирование и прогноз заболевания [97; 98]. Исследование множества miRNA [139] показало, что дисрегуляция микроРНК146b (miR146b) была достоверно связана с агрессивным поведением опухоли в BRAF-позитивных образцах ПРЦЖ. В ретроспективном исследовании Chou С.К. и соавторами в 2010 году

было показано, что некоторые miRNA (miR221/222 и miR146b) были связаны с клинически агрессивными видами ПРЩЖ, также было замечено, что пациенты с мутациями BRAF имели более высокий уровень экспрессии miR146b, чем у пациентов с BRAF дикого типа [140]. Geraldo и соавторы [141] показали, что трансформация мутации BRAF приводит к значительному повышению уровня miR146b. В рамках данного исследования корреляции между BRAF-мутацией и miRNA среди пациентов с агрессивным течением опухоли не было выявлено.

Определение уровня экспрессии гена HMGA2 не выявило достоверной корреляции с клинически значимыми показателями.

Проведенное исследование позволило оценить возможность использования широкой панели, включающей 12 различных miRNA в дифференциальной диагностике доброкачественных и злокачественных образований ЩЖ.

Согласно полученным данным в рамках нашего исследования, при проведении одномерного анализа наибольшую диагностическую значимость для выявления онкологического процесса показала miR145, miR146, miR375 и miR7. Ценностью нашего исследования является модель, полученная в ходе многомерного анализа, включающая 2 miRNA: miR145 и miR7. Данная модель с высокой диагностической точностью способна выявить злокачественный процесс. По итогам применения модели, мы получаем вероятность злокачественного процесса в образованиях ЩЖ. Вероятность считается высокой при получении значения 50% и выше.

Проведенное нами исследование позволило также оценить возможность использования miRNA в качестве прогностических фактов.

Определение уровня экспрессии miR7 при однофакторном анализе достоверно коррелировало с рецидивами и метастатическим поражением лимфатических узлов.

При проведении многомерного анализа получена модель на основе 2 miRNA (miR451 и miR7). Примечательно, что уровень экспрессии miR7 вошел в обе модели. В случае получения значения $\geq 50\%$ согласно данной прогностической модели можно сделать заключение о высокой вероятности агрессивного поведения опухоли, что является определяющим в выборе объема оперативного лечения.

Маркеры, которые входят в данную модель, позволяют уточнить объем оперативного лечения на дооперационном этапе, что особенно важно для пациентов с неопределенным цитологическим диагнозом (Bethesda III, IV, V).

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 А.1). Данный алгоритм может быть использован хирургами при решении вопроса об объеме оперативного лечения.

Наличие в арсенале современного врача дополнительных методов диагностики расширяет его возможности по планированию дальнейшего ведения пациента с узловым зобом на дооперационном этапе, особенно в случае неопределенного цитологического диагноза. Полученные в исследовании данные о диагностической и прогностической роли, будут полезны для индивидуализации ведения пациента с узловым зобом.

Совершенствование методов дооперационной диагностики РЩЖ у пациентов с синдромом узлового зоба должно способствовать выбору оптимального объема оперативного лечения, уменьшению количества диагностических и повторных операций.

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 РЩЖ, 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 РЩЖ 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.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

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 СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

ЩЖ – щитовидная железа

РЩЖ – рак щитовидной железы

АРЩЖ – анапластический рак щитовидной железы

ДРЩЖ – дифференцированный рак щитовидной железы

МРЩЖ – медуллярный рак щитовидной железы

НРЩЖ – низкодифференцированный рак щитовидной железы

ПРЩЖ – папиллярный рак щитовидной железы

ФРЩЖ – фолликулярный рак щитовидной железы

ВДРЩЖ – высокодифференцированного рака щитовидной железы

УКЗ – узловой коллоидный зоб

ФА – фолликулярная аденома

ТАБ – тонкоигольная аспирационная (пункционная) биопсия

УЗИ – ультразвуковое исследование

КТ – компьютерная томография

МРТ – магнитно-резонансная томография

ТГ – тироглобулин

ТТГ – тиротропный гормон

miRNA, мкРНК – микроРНК

АТА, American Thyroid Association – Американская Тиреологическая Ассоциация

РАЭ – Российская ассоциация эндокринологов

РЭА – раковый эмбриональный антиген

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Балаболкин, М. И. Дифференциальная диагностика и лечение эндокринных заболеваний. Руководство / М. И. Балаболкин, Е. М. Клебанова, В. М. Креминская. – М., 2008. – 752 с.
2. Маколина, Н. П. Современная парадигма послеоперационного ведения больных с дифференцированным раком щитовидной железы / Н. П. Маколина, Н. М. Платонова // Клиническая и экспериментальная тиреоидология. – 2011. – Т. 7, № 3. – С. 8–21.
3. Узловой зоб (эпидемиология, методы выявления, диагностическая тактика) / Р. А. Черников, С. Л. Воробьев, И. В. Слепцов [и др.] // Клиническая и экспериментальная тиреоидология. – 2013. – № 2. – С. 29–35.
4. Risk Factors for Thyroid Cancer: What Do We Know So Far? / Т. Bogović Crnčić, М. Ilić Tomaš [et al.]. – DOI 10.20471/acc.2020.59.s1.08 // Acta Clin. Croat. – 2020. – № 59. – P. 66–72.
5. 2015 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 / В. R. Haugen, E. K. Alexander, K. C. Bible [et al.]. – DOI 10.1089/thy.2015.0020 // Thyroid. – 2016. – № 26 (1). – P. 1–133.
6. Бельцевич, Д. Г. Современные аспекты диагностики узлового зоба / Д. Г. Бельцевич, В. Э. Ванушко // Эндокринная хирургия. – 2014. – № 3. – С. 5–13.
7. Оценка результатов повторных ТАБ у пациентов с узловым коллоидным зобом (анализ собственных данных и обзор литературы) / Г. В. Семкина, А. Ю. Абросимов, Ф. М. Абдулхабирова, В. Э. Ванушко // Клиническая и экспериментальная тиреоидология. – 2014. – № 2. – С. 32–37.
8. Клинические рекомендации до дифференцированному раку щитовидной железы 2020 г. Министерства Здравоохранения РФ.
9. Качество жизни пациентов с гипотиреозом / Т. Б. Моргунова, Ю. А. Мануйлова, М. Ш. Мадиярова [и др.] // Клиническая и экспериментальная тиреоидология. – 2010. – № 6 (2). – С. 62–67.

10. Генетические маркеры в диагностике рака щитовидной железы / А. С. Аметов, Т. И. Дэпюи, Н. В. Позднякова [и др.]. – DOI 10.24411/2304-9529-2018-00004 // Эндокринология: Новости. Мнения. Обучение. – 2018. – № 1 (22). – С. 42–49.
11. Молекулярно-генетический анализ в стратификации риска рака щитовидной железы / М. О. Рогова, Н. С. Мартиросян, Л. В. Трухина. [и др.] // Эффективная фармакотерапия. – 2020 – Т. 16, № 26. – С. 32–36
12. Cancer Incidence and Survival Trends by Subtype Using Data from the Surveillance Epidemiology and End Results Program, 1992–2013 / A. M. Noone, K. A. Cronin, S. F. Altekruse [et al.]. – DOI 10.1158/1055-9965.EPI-16-0520 // Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. – 2017 Apr. – № 26(4). – P. 632–641.
13. Nikiforov, Y. E. Thyroid tumors: Classification and general considerations / Y. E. Nikiforov // Diagnostic pathology and molecular genetics of the thyroid / Y. E. Nikiforov, P. W. Biddinger, Thompson L. D. R., eds. – Baltimore : Lippincott Williams & Wilkins, 2009. – P. 94–102.
14. Nikiforova, M. N. Molecular diagnostics and predictors in thyroid cancer / M. N. Nikiforova, Y. E. Nikiforov // Thyroid. – 2009. – Vol. 19 (12). – P. 1351–1361.
15. Молекулярно-генетические маркеры как факторы риска развития риска рака щитовидной железы / М. О. Рогова, С. В. Новосад, Н. С. Мартиросян [и др.] // Терапевтический архив. – 2019. – Т. 91, № 10. – С. 119–123.
16. BRAF mutation predicts a poorer clinical prognosis for papillary thyroid cancer / M. Xing, W. H. Westra, R. P. Tufano [et al.] // J. Clin. Endocrinol. Metab. – 2005. – № 90 (12). – P. 6373–6379.
17. BRAF(V600E) mutation and outcome of patients with papillary thyroid carcinoma: a 15-year median follow-up study / R. Elisei, C. Ugolini, D. Viola [et al.] // J. Clin. Endocrinol. Metab. – 2008. – № 93 (10). – P. 3943–3949.
18. Стратификация риска рецидива папиллярного рака щитовидной железы на основании результатов молекулярно-генетических исследований / С. А. Лукьянов, С. В. Сергийко, С. Е. Титов [и др.]. – DOI 10.17650/2222-1468-2020-10-1-93-100 // Опухоли головы и шеи. – 2020. – № 10 (1). – С. 93–100.

19. Evaluation of BRAF, RAS, RET/PTC, and PAX8/PPAR γ Alterations in Different Bethesda Diagnostic Categories: A Multicentric Prospective Study on the Validity of the 7-Gene Panel Test in 1172 Thyroid FNAs Deriving From Different Hospitals in South Italy / C. Bellevicine, I. Migliatico [et al.]. – DOI 10.1002/cncy.22217 // *Cancer Cytopathology*. – 2020. – P. 107–118.

20. ThyroSeq v3 for Bethesda III and IV: An institutional experience / D. Desai, M. Lepe [et al.]. – DOI 10.1002/cncy.22362. // *Cancer Cytopathology*. – 2021 Feb. – № 129 (2). – P. 164–170.

21. Молекулярно-генетическое тестирование в дифференциальной диагностике узловых образований щитовидной железы с цитологическим заключением «фолликулярная опухоль Bethesda IV / С. В. Сергийко, С. А. Лукьянов, С. Е. Титов, Ю. А. Веряскина // *Практическая медицина*. – 2019. – № 17 (4). – С. 149–152. = Molecular-genetic testing in differential diagnostics of node lesions in thyroid gland with cytological conclusion of “follicular tumor Bethesda IV / S. V. Sergiyko, S. A. Lukyanov, S. E. Titov, Yu. A. Veryaskina // *Prakticheskaya meditsina = Practical Medicine*. – 2019. – № 17 (4). – P. 149–152.

22. Российские клинические рекомендации по диагностике и лечению высокодифференцированного РЩЖ у взрослых, 2017 г. / Д. Г. Бельцевич, В. Э. Ванушко, П. О. Румянцев [и др.]. – DOI 10.14341/serg201716-27 // *Эндокринная хирургия*. – 2017. – № 11 (1). – С. 6–27.

23. Петунина, Н. А. Болезни щитовидной железы / Н. А. Петунина, Л. В. Трухина. – М. : ГЭОТАР-Медиа, 2011. – 216 с. – (Библиотека врача-специалиста).

24. Heterogeneity of Thyroid Cancer / E. Chmielik, D. Rusinek, M. Oczko-Wojciechowska [et al.]. – DOI 10.1159/000486422 // *Pathobiology*. – 2018. – № 85 (1-2). – P. 117–129.

25. Нечаева, О. А. Дифференцированный рак щитовидной железы: современные подходы к диагностике, терапии и динамическому наблюдению (обзор) / О. А. Нечаева, Л. Г. Бавыкина, А. В. Древаль // *РМЖ*. – 2016. – № 1. – С. 9–12.

26. Гостимский, А. В. Недифференцированный рак щитовидной железы / А. В. Гостимский, А. Ф. Романчишен, М. В. Гавщук // Вестник хирургии. – 2016. – Т. 175, № 1. – С. 113–117.
27. Diagnosis and Management of Anaplastic Thyroid Cancer / A. V. Chintakuntlawar, R. L. Foote [et al.]. – DOI 10.1016/j.ecl.2018.10.010 // Endocrinol. Metab. Clin. North Am. – 2019 Mar. – № 48 (1). – P. 269–284.
28. Рак щитовидной железы: ретроспективный анализ прооперированных пациентов (опыт одного центра) / М. О. Рогова, Н. С. Мартиросян, Л. В. Трухина [и др.] // Медицинский совет. – 2020. – № 9. – С. 283–288.
29. Revised American Thyroid Association guidelines for the management of medullary thyroid carcinoma / S. A. Wells Jr., S. L. Asa, H. Dralle [et al.] // Thyroid. – 2015. – № 25. – P. 567–610.
30. Клинические рекомендации по медуллярному раку щитовидной железы 2020 г. Министерства здравоохранения РФ.
31. Moley, J. F. Medullary thyroid carcinoma: management of lymph node metastases / J. F. Moley // J. Natl. Compr. Canc. Netw. – 2010. – № 8. – P. 549–556.
32. Nomenclature Revision for Encapsulated Follicular Variant of Papillary Thyroid Carcinoma: A Paradigm Shift to Reduce Overtreatment of Indolent Tumors / Y. E. Nikiforov, R. R. Seethala, G. Tallini [et al.] // JAMA oncology. – 2016. – № 2 (8). – P. 1023–1029.
33. Абросимов, А. Ю. Инкапсулированные фолликулярные опухоли щитовидной железы неопределенного злокачественного потенциала в новой международной гистологической классификации / А. Ю. Абросимов // Клиническая и экспериментальная тиреоидология. – 2017. – Т. 13, № 4.– С. 9–15.
34. Measurement of Basal Serum Calcitonin for the Diagnosis of Medullary Thyroid Cancer / S. Allelein, M. Ehlers, C. Morneau [et al.] // Hormone and Metabolic Research. – 2017. – № 50 (01). – P 23–28.
35. Каприн, А. Д. Злокачественные новообразования в России в 2015 году (заболеваемость и смертность) / А. Д. Каприн, В. В. Старинский. – М. : МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ НМИРЦ Минздрава России, 2017. – 331 с.

36. Worldwide Thyroid-Cancer Epidemic? The Increasing Impact of Overdiagnosis / S. Vaccarella, S. Franceschi, F. Bray [et al.] // *N. Engl. J. Med.* – 2016. – № 375 (7). – P. 614–617.

37. Ahn, H. S. South Korea's Thyroid-Cancer "Epidemic"–Turning the Tide / H. S. Ahn, H. G. Welch // *N. Engl. J. Med.* – 2015. – № 373 (24). – P. 2389–2390.

38. Trends in Thyroid Cancer Incidence and Mortality in the United States, 1974–2013 / H. Lim, S. S. Devesa, J. A. Sosa [et al.]. – DOI 10.1001/jama.2017.2719. // *JAMA.* – 2017. – № 317 (13). – P. 1338–1348.

39. Trends in Thyroid Cancer Incidence and Mortality in the United States, 1974–2013 / H. Lim, S. S. Devesa, J. A. Sosa [et al.]. – DOI 10.1001/jama.2017.2719 // *JAMA.* – 2017. – № 317 (13). – P. 1338–1348.

40. Cibas, E. S. NCI Thyroid FNA State of the Science Conference. The Bethesda System For Reporting Thyroid Cytopathology / E. S. Cibas, S. Z. Ali. – DOI 10.1309/AJCPPHLWMI3JV4LA // *Am. J. Clin. Pathol.* – 2009 Nov. – № 132 (5). – P. 658–665.

41. Абросимов, А. Ю. Система классификации цитопатологии щитовидной железы Бетесда (пересмотр 2017 г.). Перспективы диагностики опухолей щитовидной железы и оптимизация тактики ведения пациентов / А. Ю. Абросимов, Ф. М. Абдулхабирова // *Новости клинической цитологии России.* – 2017. – № 21 (3-4). – С. 23–31.

42. European Thyroid Association Guidelines for Ultrasound Malignancy Risk Stratification of Thyroid Nodules in Adults: The EU-TIRADS / G. Russ, S. J. Bonnema, M. F. Erdogan [et al.]. – DOI 10.1159/000478927 // *Eur. Thyroid. J.* – 2017 Sep. – № 6 (5). – P. 225–237.

43. Злокачественные опухоли головы и шеи / под ред. С. О. Подвязникова [и др.] // *Клинические рекомендации по лечению опухолей головы и шеи Общенациональной онкологической сети (США).* – М. : АБВпресс, 2019.

44. Рак щитовидной железы: современные подходы к диагностике и лечению / П. О. Румянцев, А. А. Ильин, У. В. Румянцева, В. А. Саенко. – М. : ГЭОТАР-Медиа, 2009. – 448 с.

45. Hanahan, D. Hallmarks of cancer: the next generation / D. Hanahan, R. A. Weinberg // *Cell*. – 2011. – № 144. – P. 646–74.
46. Kondo, T. Pathogenetic mechanisms in thyroid follicular-cell neoplasia / T. Kondo, S. Ezzat, S. L. Asa // *Nat. Rev. Cancer*. – 2006 Apr. – № 6 (4). – P. 292–306.
47. Xing, M. Recent advances in molecular biology of thyroid cancer and their clinical implications / M. Xing // *Otolaryngol. Clin. North Am.* – 2008 Dec. – № 41 (6). – P. 1135–1146, ix.
48. Xing, M. Genetic alterations in the phosphatidylinositol-3 kinase/Akt pathway in thyroid cancer / M. Xing // *Thyroid*. – 2010 Jul. – № 20 (7). – P. 697–706.
49. Saji, M. The PI3K-Akt-mTOR pathway in initiation and progression of thyroid tumors / M. Saji, M. D. Ringel // *Mol. Cell Endocrinol.* – 2010 May 28. – № 321 (1). – P. 20–28.
50. Germline mutations of the PTEN gene in Cowden disease, an inherited breast and thyroid cancer syndrome / D. Liaw, D. J. Marsh, J. Li [et al.] // *Nat. Genet.* – 1997 May. – № 16 (1). – P. 64–67.
51. Highly prevalent genetic alterations in receptor tyrosine kinases and phosphatidylinositol 3-kinase/akt and mitogen-activated protein kinase pathways in anaplastic and follicular thyroid cancers / Z. Liu [et al.] // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 2008. – № 93. – P. 3106–3116.
52. IQGAP1 plays an important role in the invasiveness of thyroid cancer / Z. Liu [et al.] // *Clin. Cancer Res.* – 2010. – № 16. – P. 6009–6018.
53. Bartel, D. P. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions / D. P. Bartel // *Cell*. – 2009. – № 136. – P. 215–233.
54. Integrated genomic characterization of papillary thyroid carcinoma / Cancer Genome Atlas Research Network // *Cell*. – 2014 Oct 23. – № 159 (3). – P. 676–690.
55. Raman, P. Pax-8-PPAR-gamma fusion protein in thyroid carcinoma / P. Raman, R. J. Koenig // *Nat. Rev. Endocrinol.* – 2014. – № 10. – P. 616–623.
56. Integrated genomic characterization of papillary thyroid carcinoma / Cancer Genome Atlas Research Network // *Cell*. – 2014. – № 159. – P. 676–690.

57. Identification of the transforming STRN–ALK fusion as a potential therapeutic target in the aggressive forms of thyroid cancer / L. M. Kelly, G. Barila, P. Liu [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2014. – № 111. – P. 4233–4238.

58. Clinical safety and activity from a phase I study of LOXO-101, a selective TRKA/B/C inhibitor, in solid-tumor patients with NTRK gene fusions / D. S. Hong, A. F. Farago, M. S. Brose [et al.] // 97th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research (New Orleans, LA, 2016 April 16). – Abstract CT008.

59. Remarkable response to crizotinib in woman with anaplastic lymphoma kinase-rearranged anaplastic thyroid carcinoma / Y. Godbert, B. Henriques de Figueiredo, F. Bonichon [et al.] // J. Clin. Oncol. – 2015. – № 33. – P. e84–87.

60. Evidence of a low prevalence of RAS mutations in a large medullary thyroid cancer series / R. Ciampi, C. Mian, L. Fugazzola [et al.] // Thyroid. – 2013. – № 23. – P. 50–57.

61. Twenty years of lesson learning: how does the RET genetic screening test impact the clinical management of medullary thyroid cancer? / C. Romei, A. Tacito, E. Molinaro [et al.] // Clin. Endocrinol. (Oxf.). – 2015. – № 82. – P. 892–899.

62. RET genetic screening of sporadic medullary thyroid cancer (MTC) allows the preclinical diagnosis of unsuspected gene carriers and the identification of a relevant percentage of hidden familial MTC (FMTC) / C. Romei, B. Cosci, G. Renzini [et al.] // Clin. Endocrinol. (Oxf.). – 2011. – № 74. – P. 241–247.

63. Analytical Performance of the ThyroSeq v3 Genomic Classifier for Cancer Diagnosis in Thyroid Nodules / M. N. Nikiforova, S. Mercurio, A. I. Wald [et al.]. – DOI 10.1002/cncr.31245 // Cancer. – 2018.

64. 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, M. N. Nikiforova, Z. Zhu [et al.] // Cancer Res. – 2003. – № 63 (7). – P. 1454–1457.

65. Haroon Al Rasheed, M. R. Molecular Alterations in Thyroid Carcinoma / M. R. Haroon Al Rasheed, B. Xu. – DOI 10.1016/j.path.2019.08.002. – PMID: 31672298. – PMCID: PMC6883923 // Surg. Pathol. Clin. – 2019 Dec. – № 12 (4). – P. 921–930.

66. Xing, M. BRAF mutation in thyroid cancer / M. Xing // *Endocr. Relat. Cancer.* – 2005. – № 12 (2). – P. 245–262.
67. Targeted expression of BRAFV600E in thyroid cells of transgenic mice results in papillary thyroid cancers that undergo dedifferentiation / J. A. Knauf, X. Ma, E. P. Smith [et al.] // *Cancer Res.* – 2005. – № 65 (10). – P. 4238–4245.
68. Clinical implication of hot spot BRAF mutation, V599E, in papillary thyroid cancers / H. Namba, M. Nakashima, T. Hayashi [et al.] // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – № 88 (9). – P. 4393–4397. – 2003.
69. Genetic alterations and their relationship in the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway in thyroid cancer / P. Hou, D. Liu, Y. Shan [et al.] // *Clin. Cancer Res.* – 2007. – № 13(4). – P. 1161–1170.
70. BRAF mutations and RET/ PTC rearrangements are alternative events in the etiopathogenesis of PTC / P. Soares, V. Trovisco, A. S. Rocha [et al.] // *Oncogene.* – 2003. – № 22 (29). – P. 4578–4580.
71. BRAF mutation predicts a poorer clinical prognosis for papillary thyroid cancer / M. Xing, W. H. Westra, R. P. Tufano [et al.] // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 2005. – № 90 (12). – P. 6373–6379.
72. BRAF(V600E) mutation and outcome of patients with papillary thyroid carcinoma: a 15-year median follow-up study / R. Elisei, C. Ugolini, D. Viola [et al.] // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 2008. – № 93 (10). – P. 3943–3949.
73. Prevalence of RAS mutations in thyroid neoplasia / C. T. Esapa, S. J. Johnson, P. Kendall-Taylor [et al.] // *Clin. Endocrinol. (Oxf.)*. – 1999. – № 50 (4). – P. 529–535.
74. N-RAS mutation in poorly differentiated thyroid carcinomas: correlation with bone metastases and inverse correlation to thyroglobulin expression / F. Basolo, F. Pisaturo, L. E. Pollina [et al.] // *Thyroid.* – 2000. – № 10 (1). – P. 19–23.
75. Correlation between genetic alterations and microscopic features, clinical manifestations, and prognostic characteristics of thyroid papillary carcinomas / A. J. Adeniran, Z. Zhu, M. Gandhi [et al.] // *Am. J. Surg. Pathol.* – 2006. – № 30 (2). – P. 216–222.

76. Molecular profile and clinical-pathologic features of the follicular variant of papillary thyroid carcinoma. An unusually high prevalence of RAS mutations / Z. Zhu, M. Gandhi, M. N. Nikiforova [et al.] // *Am. J. Clin. Pathol.* – 2003. – № 120 (1). – P. 71–77.

77. The RET/PTC3 oncogene: metastatic solid-type papillary carcinomas in murine thyroids / D. J. Powell Jr., J. Russell, K. Nibu [et al.] // *Cancer Res.* – 1998. – № 58 (23). – P. 5523–5528.

78. RET/PTC oncogene activation defines a subset of papillary thyroid carcinomas lacking evidence of progression to poorly differentiated or undifferentiated tumor phenotypes / G. Tallini, M. Santoro, M. Helie [et al.] // *Clin. Cancer Res.* – 1998. – № 4 (2). – P. 287–294.

79. Nikiforov, Y. E. RET/PTC Rearrangement in Thyroid Tumors / Y. E. Nikiforov // *Endocr. Pathol.* – 2002. – № 13 (1). – P. 3–16.

80. Distinct multiple RET/PTC gene rearrangements in multifocal papillary thyroid neoplasia / S. L. Sugg, S. Ezzat, I. B. Rosen [et al.] // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 1998. – № 83 (11). – P. 4116–4122.

81. RET/PTC rearrangements in thyroid nodules: studies in irradiated and not irradiated, malignant and benign thyroid lesions in children and adults / R. Elisei [et al.] // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 2001 Jul. – № 86 (7). – P. 3211–3216.

82. Amiodarone-induced thyrotoxicosis and thyroid cancer: clinical, immunohistochemical, and molecular genetic studies of a case and review of the literature / A. Saad, M. Falciglia, D. L. Steward, Y. E. Nikiforov // *Arch. Pathol. Lab. Med.* – 2004. – № 128 (7). – P. 807–810.

83. RET rearrangements and BRAF mutation in undifferentiated thyroid carcinomas having papillary carcinoma components / K. Mochizuki, T. Kondo, T. Nakazawa [et al.] // *Histopathology.* – 2010. – № 57 (3). – P. 444–450.

84. PAX8-PPAR γ 1 fusion oncogene in human thyroid carcinoma [corrected] / T. G. Kroll, Sarraf P., Pecciarini L. [et al.] // *Science.* – 2000. – № 289 (5483). – P. 1357–1360.

85. RAS point mutations and PAX8-PPAR γ rearrangement in thyroid tumors: evidence for distinct molecular pathways in thyroid follicular carcinoma / M. N.

Nikiforova, R. A. Lynch, P. W. Biddinger [et al.] // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 2003. – № 88 (5). – P. 2318–2326.

86. Genetic and biological subgroups of low-stage follicular thyroid cancer / C. A. French, E. K. Alexander, E. S. Cibas [et al.] // *Am. J. Pathol.* – 2003. – № 162 (4). – P. 1053–1060.

87. Contribution of molecular testing to thyroid fine-needle aspiration cytology of “follicular lesion of undetermined significance/atypia of undetermined significance” / N. P. Ohori, M. N. Nikiforova, K. E. Schoedel [et al.] // *Cancer. Cytopathol.* – 2010. – № 118 (1). – P. 17–23.

88. The age- and shorter telomere-dependent TERT promoter mutation in follicular thyroid cell-derived carcinomas / Liu [et al.]. – DOI 10.1038/onc.2013.446. // *Oncogene.* – 2014 Oct 16. – № 33 (42). – P. 4978–4984.

89. BRAF V600E and TERT promoter mutations cooperatively identify the most aggressive papillary thyroid cancer with highest recurrence / Xing [et al.]. – DOI 10.1200/JCO.2014.55.5094. // *J. Clin. Oncol.* – 2014 Sep 1. – № 32 (25). – P. 2718–2726.

90. Highly prevalent TERT promoter mutations in aggressive thyroid cancers / X. Liu, J. Bishop, Y. Shan [et al.]. – DOI 10.1530/ERC-13-0210 // *Endocr. Relat. Cancer.* – 2013. – № 20.4. – P. 603–610.

91. TERT Promoter mutations and their association with BRAF V600E mutation and aggressive clinicopathological characteristics of thyroid cancer / X. Liu, S. Qu, R. Liu [et al.]. – DOI 10.1210/jc.2013-4048 // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 2014. – № 99.6. – P. 1130–1136.

92. Frequency of TERT promoter mutations in human cancers / J. Vinagre, A. Almeida, H. Pópulo [et al.]. – DOI 10.1038/ncomms3185 // *Nat. Commun.* – 2013. – № 4. – P. 2185.

93. TERT. Promoter mutations are a major indicator of poor outcome in differentiated thyroid carcinomas / M. Melo, A. G. da Rocha, J. Vinagre [et al.] // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 2014. – № 99. – P. e754–e765.

94. Micro RNA expression profiles classify human cancers / J. Lu, G. Getz, E. A. Miska [et al.] // *Nature.* – 2005. – № 435. – P. 834–838.

95. Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia / G. A. Calin, C. D. Dumitru, M. Shimizu [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2002. – № 99. – P. 15524–15529.

96. Accumulation of miR-155 and BIC RNA in human B cell lymphomas / P. S. Eis, W. Tam, L. Sun [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2005. – № 102. – P. 3627–3632.

97. The role of microRNA genes in papillary thyroid carcinoma / H. He, K. Jazdzewski, W. Li [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2005. – № 102. – P. 19075–19080.

98. A Micro RNA deregulation in human thyroid papillary carcinomas / P. Pallante, R. Visone, M. Ferracin [et al.] // *Endocr. Relat. Cancer.* – 2006. – № 13. – P. 497–508.

99. Specific microRNAs are downregulated in human thyroid anaplastic carcinomas / R. Visone, P. Pallante, A. Vecchione [et al.] // *Oncogene.* – 2007. – № 26. – P. 7590–7595.

100. Role of preoperative ultrasonography in the surgical management of patients with thyroid cancer / M. A. Kouvaraki, S. E. Shapiro, B. D. Fornage [et al.] // *Surgery.* – 2003. – № 134. – P. 946–954.

101. The utility of routine preoperative cervical ultrasonography in patients undergoing thyroidectomy for differentiated thyroid cancer / K. O’Connell, T. W. Yen, F. Quiroz [et al.] // *Surgery.* – 2013. – № 154. – P. 697–701.

102. Haigh, P. I. Extent of thyroidectomy is not a major determinant of survival in low- or high-risk papillary thyroid cancer / P. I. Haigh, D. R. Urbach, L. E. Rotstein // *Ann. Surg. Oncol.* – 2005. – № 12. – P. 81–89.

103. Extent of surgery for papillary thyroid cancer is not associated with survival: an analysis of 61,775 patients / M. A. Adam, J. Pura, L. Gu [et al.] // *Ann. Surg.* – 2014. – № 260. – P. 601–605.

104. The prognostic significance of nodal metastases from papillary thyroid carcinoma can be stratified based on the size and number of metastatic lymph nodes, as well as the presence of extranodal extension / G. W. Randolph, Q. Y. Duh, K. S. Heller [et al.] // *Thyroid.* – 2012. – № 22. – P. 1144–1152.

105. Total thyroidectomy is associated with increased risk of complications for low- and high-volume surgeons / A. Hauch, Z. Al-Qurayshi, G. Randolph, E. Kandil // *Ann. Surg. Oncol.* – 2014. – № 21. – P. 3844–3852.

106. A comparison of different staging systems predictability of patient outcome. Thyroid carcinoma as an example / J. D. Brierley, T. Panzarella, R. W. Tsang [et al.] // *Cancer.* – 1997. – № 79. – P. 2414–2423.

107. Van Nostrand, D. The benefits and risks of I-131 therapy in patients with well-differentiated thyroid cancer / D. Van Nostrand // *Thyroid.* – 2009. – № 19. – P. 1381–1391.

108. Second primary malignancy risk after radioactive iodine treatment for thyroid cancer: a systematic review and meta-analysis / A. M. Sawka, L. Thabane, L. Parlea [et al.] // *Thyroid* – 2009. – № 19. – P. 451–457.

109. Biondi, B. Thyroid-hormone therapy and thyroid cancer: a reassessment / B. Biondi, S. Filetti, M. Schlumberger // *Nat. Clin. Pract. Endocrinol. Metab.* – 2005. – № 1. – P. 32–40.

110. Mazzaferri E. L., Kloos R. T. Clinical review 128: current approaches to primary therapy for papillary and follicular thyroid cancer / E. L. Mazzaferri, R. T. Kloos // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 2001. – № 86. – P. 1447–1463.

111. Outcomes of patients with differentiated thyroid carcinoma following initial therapy / J. Jonklaas, N. J. Sarlis, D. Litofsky [et al.] // *Thyroid.* – 2006. – № 16. – P. 1229–1242.

112. Long-term outcomes following therapy in differentiated thyroid carcinoma: NTCTCS registry analysis 1987–2012 / A. A. Carhill, D. R. Litofsky, D. S. Ross [et al.] // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 2015. – № 100. – P. 3270–3279.

113. Cooper, D. S. Subclinical thyroid disease / D. S. Cooper, B. Biondi // *Lancet.* – 2012. – № 379. – P. 1142–1154.

114. 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, A. Shaha, S. Fish, R. Michael Tuttle // *Clin. Endocrinol. (Oxf.).* – 2011. – № 75. – P. 112–119.

115. 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, H. Tala, J. Shah [et al.] // *Thyroid*. – 2010. – № 20. – P. 1341–1349.

116. Papillary thyroid cancer: time course of recurrences during postsurgery surveillance / C. Durante, T. Montesano, M. Torlontano [et al.] // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 2013. – № 98. – P. 636–642.

117. Durante, C. Management of papillary thyroid cancer patients in absence of postoperative radioiodine remnant ablation: tailoring follow-up by neck sonography / C. Durante, S. Filetti // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 2011. – № 96. – P. 3059–3061.

118. Serum thyroglobulin and ¹³¹I whole body scan after recombinant human TSH stimulation in the follow-up of low-risk patients with differentiated thyroid cancer / M. Torlontano, U. Crocetti, L. D'Aloiso [et al.] // *Eur. J. Endocrinol.* – 2003. – № 148. – P. 19–24.

119. Recombinant human thyrotropin-stimulated serum thyroglobulin combined with neck ultrasonography has the highest sensitivity in monitoring differentiated thyroid carcinoma / F. Pacini, E. Molinaro, M. G. Castagna [et al.] // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 2003. – № 88. – P. 3668–3673.

120. Malignancy rate in thyroid nodules classified as Bethesda category III (AUS/FLUS) / A. S. Ho, E. E. Sarti, K. S. Jain [et al.]. – DOI10.1089/thy.2013.0317 // *Thyroid*. – 2014. – № 24 (5). – P. 832–839.

121. An ultrasonogram reporting system for thyroid nodules stratifying cancer risk for clinical management / E. Horvath, S. Majlis, R. Rossi [et al.] // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 2009 May. – № 94(5). – P. 1748–1751.

122. Medical guidelines for clinical practice for the diagnosis and management of thyroid nodules – 2016 update / H. Gharib, E. Papini, J. R. Garber [et al.] ; AACE/ACE/AME Task Force on Thyroid Nodules: American Association of Clinical Endocrinologists, American College of Endocrinology, and Associazione Medici Endocrinologi // *Endocr. Pract.* – 2016 May. – № 22 (5). – P. 622–639.

123. The increase in thyroid cancer incidence during the last four decades is accompanied by a high frequency of BRAF mutations and a sharp increase in RAS mutations / C. K. Jung, M. P. Little, J. H. Lubin [et al.] // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 2014. – № 99. – E276–E285.

124. Sipos, J. A. Thyroid cancer epidemiology and prognostic variables / J. A. Sipos, E. L. Mazzaferri // *Clin. Oncol.* – 2010. – № 22. – P. 395–404.

125. No correlation between BRAFV600E mutation and clinicopathological features of papillary thyroid carcinomas in Taiwan / R. T. Liu, Y. J. Chen, F.F. Chou [et al.] // *Clin. Endocrinol.* – 2005. – № 63. – P. 461–466.

126. Xing, M. BRAF mutation in papillary thyroid cancer: Pathogenic role, molecular bases, and clinical implications / M. Xing // *Endocr. Rev.* – 2007. – № 28. – P. 742–762.

127. Correlation between the BRAF V600E mutation and tumor invasiveness in papillary thyroid carcinomas smaller than 20 millimeters: analysis of 1060 cases / F. Basolo, L. Torregrossa, R. Giannini [et al.] // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 2010. – № 95 (9). – P. 4197–4205.

128. BRAF V600E mutation independently predicts central compartment lymph node metastasis in patients with papillary thyroid cancer / G. M. Howell, M. N. Nikiforova, S. E. Carty [et al.]. – DOI 10.1245/s10434-012-2611-0. – PMID: 22941165 // *Ann. Surg. Oncol.* – 2013 Jan. – № 20 (1). – P. 47–52.

129. 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, M. Bullock, A. Chou [et al.] // *Surgery.* – 2010. – № 148 (6). – P. 1139–1145, discussion 1145–1146.

130. Optimizing surgical treatment of papillary thyroid carcinoma associated with BRAF mutation / L. Yip, M. N. Nikiforova, S. E. Carty [et al.] // *Surgery.* – 2009. – № 146 (6). – P. 1215–1223.

131. Xing, M. Prognostic utility of BRAF mutation in papillary thyroid cancer / M. Xing // *Mol. Cell Endocrinol.* – 2010. – № 321 (1). – P. 86–93.

132. Xing, M. BRAF V600E mutation and papillary thyroid cancer / M. Xing. – DOI 10.1001/jama.2013.8592// *JAMA.* – 2013 Aug 7. – № 310 (5). – P. 535.

133. Correlation between B-RAFV600E mutation and clinico-pathologic parameters in papillary thyroid carcinoma: Data from a multicentric Italian study and review of the literature / L. Fugazzola, E. Puxeddu, N. Avenia [et al.] // *Endocr. Relat. Cancer.* – 2006. – № 13. – P. 455–464.

134. Handkiewicz-Junak, D. Molecular prognostic markers in papillary and follicular thyroid cancer: Current status and future directions / D. Handkiewicz-Junak, A. Czarniecka, B. Jarzab // *Mol. Cell. Endocrinol.* – 2010. – № 322. – P. 8–28.

135. Ricarte-Filho, J. Papillary thyroid carcinomas with cervical lymph node metastases can be stratified into clinically relevant prognostic categories using oncogenic BRAF, the number of nodal metastases, and extra-nodal extension / J. Ricarte-Filho, I. Ganly, M. Rivera [et al.] // *Thyroid.* – 2012. – № 22. – P. 575–584.

136. BRAFV600 mutation does not mean distant metastasis in thyroid papillary carcinomas / V. Sancisi, D. Nicoli, M. Ragazzi [et al.] // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 2012. – № 97. – P. e1745–e1749.

137. The primary occurrence of BRAFV600 is a rare clonal event in papillary thyroid carcinoma / A. Guerra, M. R. Sapio, V. Marotta [et al.] // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 2012. – № 97. – P. 517–524.

138. Значение выявления мутации гена BRAF в дооперационной диагностике рака щитовидной железы / Д. Ю. Семенов, М. И. Зарайский, М. Е. Борискова [и др.] // *Клиническая и экспериментальная тиреоидология.* – 2009. – № 4. – С. 33–37.

139. MicroRNA signature distinguishes the degree of aggressiveness of papillary thyroid carcinoma / L. Yip, L. Kelly, Y. Shuai [et al.] // *Ann. Surg. Oncol.* – 2011. – № 18. – P. 2035–2041.

140. miR-146b is highly expressed in adult papillary thyroid carcinomas with high risk features including extrathyroidal invasion and the BRAF(V600E) mutation / C. K. Chou, R. F. Chen, F. F. Chou [et al.] // *Thyroid.* – 2010. – № 20. – P. 489–494.

141. Geraldo, M. V. MicroRNA miR-146b-5p regulates signal transduction of TGF- β by repressing SMAD4 in thyroid cancer / M. V. Geraldo, A. S. Yamashita, E. T. Kimura // *Oncogene.* – 2012. – № 31. – P. 1910–1922.

Приложение А (обязательное).

Алгоритм дифференцированного ведения пациента с синдромом узлового зоба при подозрении на злокачественный процесс

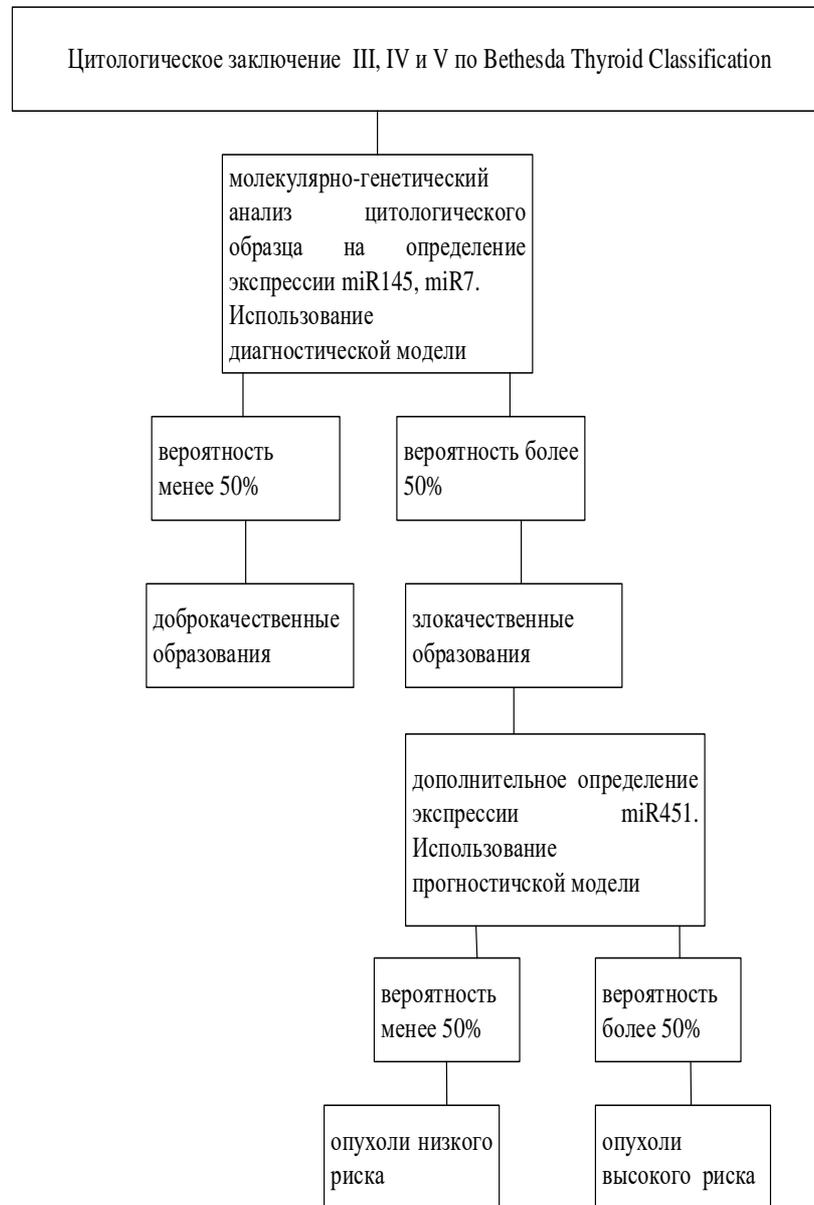


Рисунок А.1 – Алгоритм дифференцированного определения рисков у пациента с синдромом узлового зоба при подозрении на злокачественный процесс