

Государственное образовательное учреждение
высшего профессионального образования
«Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский
Университет имени академика И.П. Павлова»
Министерства здравоохранения Российской Федерации

На правах рукописи

Фарафонова Ульяна Валентиновна

**РОЛЬ МУТАЦИИ ГЕНА BRAF И ЭКСПРЕССИИ НАТРИЙ-ЙОДНОГО
СИМПОРТЕРА В ОПРЕДЕЛЕНИИ ХИРУРГИЧЕСКОЙ ТАКТИКИ
ЛЕЧЕНИЯ ВЫСОКОДИФФЕРЕНЦИРОВАННОГО РАКА ЩИТОВИДНОЙ
ЖЕЛЕЗЫ**

Специальность - 14.01.17 – хирургия

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:
доктор медицинских наук,
профессор **Д.Ю.Семенов**

Санкт-Петербург

2015 год

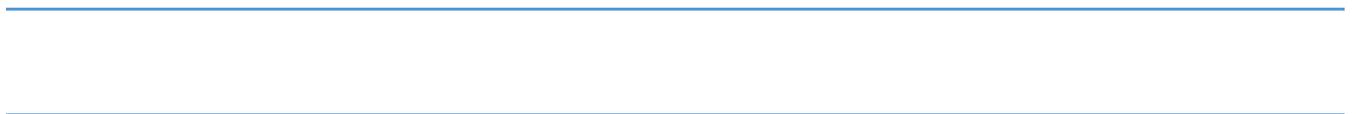
ОГЛАВЛЕНИЕ

Оглавление	2
Введение.....	6
Глава 1. Высокодифференцированный рак щитовидной железы: молекулярный патогенез, лечение и определение групп риска рецидива (литературный обзор)	13
1.1. Эпидемиология рака щитовидной железы.....	13
1.2. Лечение высококодифференцированного рака щитовидной железы.....	16
1.2.1. Хирургическое лечение.....	16
1.2.2. Послеоперационная радиойодтерапия и факторы, влияющие на развитие рецидива.....	21
1.3. Молекулярная патофизиология спорадического высококодифференцированного рака щитовидной железы.....	22
1.3.1. Мутация гена BRAF.....	25
1.4. Натрий йодный симпортер в норме и при высококодифференцированном раке щитовидной железы.....	30
1.4.1. Молекулярная характеристика НИС.....	31
1.4.2. Экспрессия НИС при различных заболеваниях щитовидной железы	32
Глава 2. Материалы и методы.....	37
2.1. Общая характеристика исследованных больных.....	37

2.2. Ретроспективный этап работы.....	39
2.2.1. Принципы разделения пациентов по группам.....	39
2.2.2. Методика иммуногистохимического определения экспрессии натрий-йодного симпортера.....	45
2.2.3. Молекулярно-генетическое определение мутации T1799A (V600E) в гене BRAF методом полимеразной цепной реакции.....	46
2.2.3.1. Выделение ДНК из парафиновых блоков.....	48
2.2.3.2. Постановка ПЦР.....	49
2.2.3.3. Определение продуктов амплификации.....	49
2.3. Проспективный этап работы.....	49
2.3.1. Характеристика включённых в исследование пациентов.....	49
2.3.2. Методика определения экспрессии НИС методом проточной флуориметрии в материале тонкоигольной аспирационной биопсии	53
2.3.3. Молекулярно-генетическое определение мутации T1799A (V600E) в гене BRAF методом полимеразной цепной реакции.....	54
2.3.3.1. Выделение ДНК из материала тонкоигольной аспирационной биопсии щитовидной железы.....	54
2.3.3.2. Постановка ПЦР и определение продуктов амплификации.....	54
2.4. Статистическая обработка результатов.....	54
Глава 3. Результаты исследования и их анализ.....	55
3.1. Ретроспективный анализ.....	55

3.1.1. Анализ распределения натрий-йодного симпортера во внутренних отделах тиреоцита.....	55
3.1.2. Оценка среднего значения экспрессии НИС по группа.....	60
3.1.3. Влияние уровня экспрессии НИС на прогноз течения ВДРЦЖ.....	62
3.1.3.1. Влияние уровня экспрессии НИС на развитие рецидива заболевания.....	62
3.1.3.2. Связь уровня экспрессии НИС и стадии опухоли.....	65
3.1.4. Взаимосвязь между уровнем экспрессии НИС и полом.....	67
3.1.5. Влияние BRAF мутации на течение ПРЦЖ.....	71
3.2. Проспективный анализ.....	76
3.2.1. Оценка среднего значения экспрессии НИС по группам.....	77
3.2.2. Влияние уровня экспрессии НИС на безрецидивную выживаемость пациентов с ВДРЦЖ.....	80
3.2.3. Изучение влияния BRAF на течение папиллярного высокодифференцированного рака щитовидной железы.....	83
3.2.4. Влияние мутации гена BRAF на уровень экспрессии НИС.....	88
Глава 4. Заключение.....	91
Выводы.....	103
Практические рекомендации.....	104

Список сокращений.....	105
Список литературы.....	106



ВВЕДЕНИЕ

АКТУАЛЬНОСТЬ ПРОБЛЕМЫ

Рак щитовидной железы (РЩЖ) – это наиболее часто встречающаяся опухоль эндокринной системы [17] с благоприятным прогнозом при своевременной диагностике и лечении. Наиболее часто встречается высокодифференцированные формы РЩЖ, происходящие из фолликулярных клеток, к которым относятся фолликулярный рак (ФР) и папиллярный рак (ПР).

С 2000 по 2013 гг. заболеваемость РЩЖ в РФ выросла более чем в два раза с 47.3 до 93.2 на 100 тыс. населения в год [76]. По темпу прироста РЩЖ занимает первое место среди злокачественных опухолей, варьируя в последние годы от 3 до 5% в год. Показательны статистические данные по Санкт-Петербургу: в период между 2010 и 2013 гг. показатели заболеваемости раком ЩЖ возросли от 72,9 до 84,9 случаев на 100000 населения [27]. Так же необходимо отметить, что рак щитовидной железы - это заболевание, которое поражает людей трудоспособного возраста с пиком заболеваемости, приходящим на 50 – 60 лет, что делает данную проблему социально значимой.

Прогноз для ВДРЩЖ благоприятный, однако в 7 – 10 % случаев имеет место персистенция заболевания и рецидивирование более чем через 5 лет после операции. Выделить эту группу пациентов на дооперационном этапе в настоящее время весьма затруднительно. Поэтому в хирургической тактике лечения остаются спорные вопросы. По данным литературы частота встречаемости мультицентричности ВДРЩЖ доходит до 45% [78], что позволяет рекомендовать тиреоидэктомию в случаях выявления ВДРЩЖ. С другой стороны, по принятым в настоящее время стандартам лечения рекомендуется выполнение гемитиреоидэктомии в случаях выявления опухоли на стадии T1aN0M0.

Относительно необходимости выполнения профилактической центральной лимфодиссекции не существует консенсуса, как в России, так и зарубежом. Следует отметить, что выполнение центральной лимфодиссекции увеличивает риск развития как транзиторного, так и стойкого гипопаратиреоза с 3% до 14.3%; увеличивается риск повреждения возвратного нерва [101]. Соответственно, риск осложнений не позволяет рекомендовать выполнение центральной лимфодиссекции всем пациентам. В то же время по данным зарубежных авторов частота occultных метастазов центральной клетчатки шеи (не определяемые на УЗИ до операции и не выявленные интраоперационно) колеблется от 20 до 80%, что может стать причиной персистенции заболевания, либо его рецидива [59].

Сложности остаются и в определении показаний к радиоiodтерапии. В стандарты лечения ВДРЩЖ входит РЙТ у пациентов высокого риска рецидива/персистенция заболевания. Для пациентов же промежуточного риска единой точки зрения нет. Следует отметить, что неоднозначными являются и критерии отбора групп риска, что диктует необходимость поиска новых, более достоверных маркеров прогрессирования течения ВДРЩЖ, а именно рецидивирования (как местного, так и отдаленного), так и персистенции заболевания.

Помимо этого, существует еще одна, не менее сложная проблема - до 10% всех высокодифференцированных раков щитовидной железы в процессе дедифференцировки теряют способность накапливать радиоактивный йод внутри клетки, что делает невозможным выполнить радиоiodабляцию. Однако выделить эту группу пациентов на дооперационном этапе не представляется возможным и этим больным проводится радиоiodтерапия. Представляется актуальным поиск маркеров, которые бы позволили на дооперационном этапе прогнозировать радиоiodрезистентность и планировать радикальный объем операции.

В последние годы в ряде работ зарубежных авторов появились исследования, посвященные поиску возможной связи между мутацией гена BRAF

и менее благоприятным прогнозом течения ВДРЦЖ, а именно ПР. Итальянские авторы проведя 15-летнее ретроспективное мультицентричное исследование пришли к выводу, что наличие BRAF мутации достоверно коррелировало с более высоким риском рецидива, метастазирования и снижением способности к захвату РЙ [41].

Возможность захвата йода определяется наличием на мембране клетки белка-переносчика ионов йода - натрий-йодного симпортера (НИС). Существуют немногочисленные работы, предполагающие наличие прямой корреляционной связи между мутацией гена BRAF и снижением уровня экспрессии на мембране клетки НИС [53, 117, 137]. Так же после открытия и клонирования в 1996г человеческого НИС начали появляться работы по изучению физиологии НИС и патофизиологии в опухолевых структурах. В мировой литературе была найдена лишь одна работа, в которой исследовалась корреляция между уровнем экспрессии НИС в первичной опухоли и прогнозом РЙ чувствительности метастазов ВДРЦЖ [28]. Но, эти работы требуют расширения и продолжения исследований.

Таким образом, актуальным является определение хирургической тактики лечения пациентов, основываясь на молекулярно-генетическом профиле опухоли, а именно совместном определении BRAF статуса опухоли и уровня экспрессии НИС, а так же прогнозирование развития РЙ резистентности ВДРЦЖ.

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ – оптимизация тактики лечения ВДРЦЖ путем внедрения в дооперационную диагностику определения мутации гена BRAF и экспрессии натрий - йодного симпортера.

ЗАДАЧИ ИССЛЕДОВАНИЯ

1. Определить взаимосвязь между уровнем экспрессии НИС на мембране тироцита и способностью к захвату йода;
2. Разработать и апробировать методику определения уровня экспрессии НИС методом проточной флуориметрии (ПФЦ) с количественной оценкой;
3. Определить характер корреляции уровня экспрессии НИС, наличия мутации гена BRAF и агрессивностью течения ВДРЩЖ;
4. Разработать молекулярно-генетические критерии риска рецидива ВДРЩЖ и определить связь данных критериев с тактикой хирургического лечения.

ОСНОВНЫЕ ПОЛОЖЕНИЯ, ВЫНОСИМЫЕ НА ЗАЩИТУ

1. Хирургическая тактика в лечении ВДРЩЖ должна основываться на принятых стандартах лечения, но необходимо учитывать биологический характер опухоли при формировании групп риска рецидива/персистенции заболевания
2. Наличие BRAF мутации и снижение мембранной экспрессии НИС являются независимыми факторами неблагоприятного прогноза высокодифференцированного рака щитовидной железы
3. Пациентам группы высокого риска рецидива/персистенции заболевания показано выполнение профилактической центральной лимфодиссекции.

НАУЧНАЯ НОВИЗНА

В работе проанализированы уровни экспрессии НИС в ткани щитовидной железы, при различных заболеваниях с формированием придельных значений, для исследованных групп. Достоверно доказано снижение уровня экспрессии НИС при РЩЖ. Наиболее низкие значения наблюдались у пациентов с

рецидивным течением ВДРЦЖ после выполнения РЙТ. Полученные данные легли в основу понимания РЙ резистентности. Впервые в работе проанализировано значение определения уровня экспрессии НИС методом ПФЦ в первичной опухоли для оценки риска РЙ резистентности метастазов ВДРЦЖ.

Оценена корреляция уровня экспрессии НИС и мутации гена BRAF V600E. Достоверно доказано отсутствие корреляции между наличием BRAF мутации и уровнем экспрессии НИС, что позволило предположить иной характер онкогенеза, приводящий к снижению уровня экспрессии НИС, что диктует необходимость совместного определения BRAF мутации и уровня экспрессии НИС.

Доказано, что при ВДРЦЖ и принятых объемах хирургического вмешательства в группе высокого риска неэффективность РЙТ объясняется изначально низким значением уровня экспрессии НИС, что диктует необходимость расширения объема хирургического вмешательства. Оформлен и получен патент № 2548783 [15] «Способ дооперационного определения объема хирургического лечения высокодифференцированного рака щитовидной железы».

НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ РАБОТЫ

В исследовании проанализирована диагностическая значимость дооперационного определения уровня экспрессии НИС и BRAF статуса опухоли в определении группы риска рецидива/персистенции заболевания для пациентов с ВДРЦЖ. На основании этого разработаны рекомендации по дооперационному определению BRAF мутации и уровня экспрессии НИС с целью индивидуализации объема хирургического лечения, базирующейся на выявленных признаках. Так же определены предельные значения уровня экспрессии НИС в группах высокого, промежуточного и низкого рисков.

Разработан и апробирован метод определения уровня экспрессии НИС в материале ТАБ с использованием ПФЦ.

РЕАЛИЗАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Предлагаемый метод определения уровня экспрессии НИС и мутации гена BRAF V600E используется в практической работе онкологического отделения клиники общей хирургии ПСПбГМУ имени акад. И.П. Павлова (СПб., ул.Л.Толстого 6-8). Полученные результаты используются при подготовке студентов, аспирантов, врачей-интернов и клинических ординаторов на кафедре общей хирургии (СПб., ул.Л.Толстого 6-8).

АПРОБАЦИЯ РАБОТЫ

1. Европейский конгресс эндокринологов 24 – 28 апреля 2010 г., Прага, Чешская Республика
2. 14 Международный Европейский тиреодологический конгрессе 11-16 сентября 2010г, Париж, Франция
3. II Всероссийский конгресс с участием стран СНГ «Инновационные технологии в эндокринологии», Москва, 25-28 мая 2014 года,
4. 38 Ежегодный европейский тиреодологический конгресс 6-10 сентября 2014г., Сантьяго де Компостелло, Испания.
5. 2445 заседание Хирургического общества Пирогова 25 февраля 2015 года, Санкт-Петербург, Россия

СТРУКТУРА И ОБЪЕМ РАБОТЫ.

Диссертация состоит из введения, пяти глав, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка литературы. Объем работы составляет 119 страниц машинописи, из них 105 страницы основного текста и 14 страниц списка литературы. Работа иллюстрирована 24 таблицами, 3 рисунками, 10 графиками. Библиографический указатель содержит 20 отечественных и 129 зарубежных источников.

Глава 1.

ВЫСОКОДИФФЕРЕНЦИРОВАННЫЙ РАК ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ: МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ПАТОГЕНЕЗ, ЛЕЧЕНИЕ И ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГРУПП РИСКА РЕЦИДИВА (ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР)

1.1. Эпидемиология рака щитовидной железы.

Рак щитовидной железы самая частая опухоль эндокринной системы. В последние три декады отмечается неуклонный рост заболеваемости раком щитовидной железы во всем мире [33]. Данная тенденция прослеживается на всех континентах, за исключением Африки, где вероятно страдает диагностика [113]. По современным данным рак щитовидной железы является пятой по распространенности злокачественной опухолью у женщин [72], в Италии рак щитовидной железы вторая по частоте злокачественная опухоль среди женщин до 45 лет [92]. И только в Норвегии и Швеции заболеваемость раком щитовидной железы имеет тенденцию к снижению [77].

С 2000 по 2013 гг. заболеваемость РЩЖ в РФ выросла более чем в два раза (с 47.3 до 93.2 на 100 тыс.) и в 2010 году составила 93.2 случая на 100 тыс. населения в год [17]. По темпу прироста РЩЖ занимает первое место среди злокачественных опухолей, варьируя в последние годы от 3 до 5% в год. Показательны статистические данные по Санкт-Петербургу: в период между 2010 и 2013 гг. показатели заболеваемости раком ЩЖ возросли от 72,9 до 84,9 случаев на 100000 населения [18]. Так же необходимо отметить, что рак щитовидной железы - это заболевание, которое поражает людей трудоспособного возраста с пиком заболеваемости, приходящим на 50 – 60 лет, что делает данную проблему социально значимой. Увеличение заболеваемости раком щитовидной железы происходит практически только за счет увеличения количества выявленных папиллярных раков щитовидной железы, при сохранении относительно

стабильного уровня заболеваемости медуллярным, фолликулярным и анапластическим раком щитовидной железы. Следует отметить, что не смотря на значительное увеличение количества выявляемых микрокарцином, также растет и количество впервые выявленных опухолей большего размера [42, 17). Не смотря на устойчивый рост заболеваемости, рост смертности от рака щитовидной железы весьма умеренный, и составляет около 0.5 на 100 000 населения. Основная тенденция, выявленная в отчете Национального института онкологии США о заболеваемости и смертности населения от рака щитовидной железы за период наблюдения с 1975 по 2010 года, заключалась в выявлении неуклонного роста смертности от рака щитовидной железы среди мужчин, несмотря на более раннюю выявляемость и более агрессивное лечение групп высокого риска (18). Возможно данная тенденция сохранится и нам следует ожидать виража по уровню смертности, если принять во внимание медленное развитие рака щитовидной железы и значительный рост заболеваемости за последние три десятилетия.

Мнения экспертов относительно причин роста частоты заболеваемости раком щитовидной железы разделились. Часть ученых полагают, что использование таких чувствительных методик как УЗИ, МСКТ, МРТ, ПЭТ и др. привели к увеличению частоты выявления маленьких асимптомных раков щитовидной железы [56]. Следует отметить, что узловые образования щитовидной железы встречаются у 20 – 50 % всего взрослого населения [93]. Рак же щитовидной железы часто протекает под маской узлового нетоксического зоба, что диктует необходимость исследования всех выявляемых узловых образований. Последнее время увеличилось и количество так называемых инциденталом: опухолей выявляемых случайно при проведении диагностического обследования по поводу другого заболевания. Узловые образования щитовидной железы могут быть выявлены при проведении доплерографии сосудов шеи, выполнении ПЭТ [111, 145]. Внедрение УЗИ области шеи, как скринингового метода исследования, приводит к выявлению микрокарцином, которые, учитывая

торпидное течение высокодифференцированного рака щитовидной железы, могли существовать у пациента годами или даже десятилетиями. Эти данные подтверждаются аутопсийными исследованиями, которые обнаруживают микрокарциномы без признаков экстрагитреоидного распространения в 2.9 – 39 % случаев [59, 94]. Данные аутопсийные исследования привели к появлению работ, описывающих натуральное течение микрокарцином щитовидной железы [71]. В работе Ito Y. and all описывается натуральное течение 162 микрокарцином щитовидной железы. В 70% случаев при наблюдении размер узлового образования не изменился от первоначально выявленного. В 10.2% случаев размер узлового образования увеличился более чем на 10 мм и метастазы в боковую клетчатку шеи были выявлены у 1.2% наблюдавшихся. Данные исследования вскрывают проблему гипердиагностики микрокарцином щитовидной железы на фоне отсутствия на данный момент точных предикторов биологического потенциала высокодифференцированного рака щитовидной железы, в частности, опухолей менее 1 см в диаметре.

С другой стороны, доводы ученых, полагающих, что увеличение количества заболевших высокодифференцированным раком щитовидной железы происходит не только вследствие научно-технического прогресса в медицине, звучат весьма убедительно. Так, в настоящее время рост выявляемости рака щитовидной железы происходит среди опухолей всех размеров и стадий. В США с 1992 по 2005 гг. вклад опухолей менее 1 см в диаметре в увеличение заболеваемости высокодифференцированным раком щитовидной железы составил 50 %, от 1,1 см до 2 см – 30%, и 20 % группа опухолей более 2 см в диаметре [43]. В другом исследовании W. D. T. Kent and all. 2007г. показано увеличение заболеваемости в группах опухолей менее 2 см и более 4 см, при сохранении частоты выявления опухолей от 3 до 4 см на прежнем уровне [76]. В Испании с 1978 по 2001 год увеличилась выявляемость как микрокарцином, так и опухолей большего диаметра [115]. Следует так же отметить, как упоминалось выше, увеличение заболеваемости происходит преимущественно за счет папиллярного рака

щитовидной железы, в то время как при увеличении заболеваемости, за счет улучшения диагностики, должны были бы пропорционально увеличиваться все гистологические варианты рака щитовидной железы.

Что же касается гендерного фактора, рак щитовидной железы, как впрочем, и узловой зоб, чаще наблюдается у женщин, предрасположенных к гиперпластическим процессам. По данным Санкт-Петербургского городского онкологического диспансера женщины страдают раком ЩЖ в 5 раза чаще, чем мужчины [8]. Заболеваемость раком ЩЖ среди женщин наблюдается во всех возрастных группах, но особенно часто в возрасте 40-49 лет [7; 10]. В то же время доля рака щитовидной железы среди узловых образований у мужчин выше в 2-3 раза, чем у женщин [5, 16]. По данным ряда авторов среди запущенных и распространенных форм тиреоидной карциномы почти 35% случаев составляют больные мужского пола [1], при этом отмечается более агрессивное течение РЩЖ у мужчин [19].

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

1.2. Лечение высокодифференцированного рака щитовидной железы

1.2.1 Хирургическое лечение

Согласно современным рекомендациям по лечению высокодифференцированного рака щитовидной железы (ВДРЩЖ), стандартной операцией при данной патологии является тиреоидэктомия [13, 14]. Только при определенных условиях возможно выполнение экстрафасциальной гемитиреоидэктомии – при наличии очага папиллярного рака менее 1 см без экстратиреоидного распространения (T1N0M0) [11]. Несмотря на принятые согласительные документы по диагностике и лечению ВДРЩЖ, одобренные

ведущими онкологами и хирургами страны, не прекращаются споры по некоторым вопросам, в частности, о выборе объема хирургического вмешательства при этом заболевании. Радикализм некоторых авторов не сходится с многолетними статистическими данными о почти 90-95% 5-летней выживаемости больных ВДРЩЖ [9] и продолжающимися публикациями о возможности выполнения органосохраняющих операций при этой нозологии [2].

К преимуществам органосохраняющих операций относят меньший риск возникновения послеоперационных осложнений (стойкие паралич возвратного гортанного нерва и стойкого гипопаратиреоз) [29]. Основными аргументами для более агрессивного хирургического лечения больных являются сообщения о снижении частоты рецидивов рака ЩЖ [60], а также возможность послеоперационного мониторинга пациентов путем контроля уровня тиреоглобулина в сыворотке крови и сцинтиграфии всего тела с I 131 [41].

Отсутствие точных прогностических критериев определения групп риска рецидива заболевания является причиной отсутствия единого подхода к выбору объема хирургического лечения ВДРЩЖ.

На данный момент единственной общепризнанной послеоперационной классификацией является pTNM, на основе которой с учетом возраста основывается определение группы риска и выбор тактики ведения пациента [90]. Данная система удобна для эпидемиологических исследований, но не учитывает ряда независимых критериев риска для ВДРЩЖ, что может привести к недостаточной оценке риска и неадекватное послеоперационное ведение. Последнее время было предложено определенное количество новых классификаций стратификации риска, такие как CAEORTC, AGES, AMES, MACIS, OSU, MSKCC и NTCTCS. Эти системы основаны на факторах, выявленных при ретроспективных исследованиях и несущие наибольшую прогностическую ценность, основными во всех системах являются такие факторы, как наличие регионарных метастазов, возраст пациента и размер

опухоли [61, 95]. Вышеперечисленные факторы оценены по-разному, в зависимости от системы стратификации риска ВДРЦЖ: риска не только смерти от ВДРЦЖ, но и риска рецидива, персистенции и развития радиойодрезистентных форм. Следует отметить, что ни одной из перечисленных выше систем не удалось продемонстрировать эффективность выше 80 % [123]. Определение пациентов группы высокого, низкого и промежуточного рисков на сегодняшний день представляет определенную проблему. Так, в клинических рекомендациях американской ассоциации тиреоидологов приведены критерии в группах риска пациентов [37]. Однако следует отметить, что стадия pTNM, выставленная пациенту, основываясь на клиничко-гистологических признаках, не меняется со времени. Но в зависимости от клинического течения болезни, ответа на терапию, с течением времени у пациента могут измениться риски рецидива и риск ассоциированной смерти, что требует коррекции терапии, а первоначальное лечение может оказаться недостаточным, что ухудшает прогноз [130].

Алубаев С.А. и др. (2009) провел анализ факторов, влияющих на выбор объема вмешательства у более 500 больных ДРЦЖ. Основной причиной расхождения тактики лечения с предлагаемыми в литературе рекомендациями явились сложность до- и интраоперационной диагностики ДРЦЖ, неправильная трактовка стадии заболевания, что приводит к неадекватному объему операции, как в сторону расширения, так и в сторону уменьшения [39]. Так, в случае дооперационной диагностики папиллярного рака щитовидной железы, принятые стандарты операции зависят от стадии процесса, оценить который практически невозможно на дооперационном этапе и представляет зачастую значительные сложности и во время операции даже для опытного хирурга. Выполняемое на дооперационном этапе УЗИ шеи, как правило, не дает представление об экстратиреоидном распространении опухоли и наличии метастатического поражения лимфоузлов, особенно микрометастазов в центральные лимфоузлы шеи [26, 51, 82, 124, 127]. Интраоперационное обследование заключается, как правило, в макроскопической оценке, что зачастую приводит к неправильной

трактовке стадии заболевания и, как следствие, выполнению неадекватного объема операции. Использование интраоперационного срочного гистологического исследования замороженных срезов имеет в настоящее время все меньше сторонников, в связи с низким качеством замороженных препаратов, что сводит практически к нулю диагностическую ценность данного метода в выявлении прорастания органной капсулы и микрометастазов. Таким образом, объективные диагностические трудности приводят к тому, что существующая система критериев групп риска неполноценна. В ряде случаев она позволяет выявить пациентов высокого риска и выполнить радикальный объем операции. В то же время долгосрочные наблюдения показали, что часть пациентов из группы низкого риска имели рецидив заболевания, что доказывает неадекватную трактовку стадии заболевания и оценку прогностических критериев риска. Таким образом, актуальным представляется вопрос о поиске новых прогностических маркеров у пациентов низкого риска для решения вопроса о выполнении радикального оперативного вмешательства [53, 97, 121].

Особенно актуальной представляется проблема оценки прогностических факторов у пациентов с микрокарциномой. Существующие в настоящее время стандарты диктуют выполнять у этой категории больных гемитиреоидэктомию. В качестве аргумента в пользу органосохраняющей тактики приводятся данные аутопсийных исследований, по данным которых микрокарцинома щитовидной железы была выявлена примерно у одной трети взрослого населения [24]. Razaitou-Panayiotou, et al. [112] провели анализ 24 аутопсийных исследований в период с 1986 по 2005г с включением 7663 образцов, при которых частота выявления микрокарциномы щитовидной железы достигла 35.6%. Данные исследования привели к появлению работ, описывающих натуральное течение МКЩЖ без оперативного лечения. В 2003 году Ito et al. опубликовали статью, в которой было описано наблюдение течения 162 микрокарцином щитовидной железы. В 70% случаев при наблюдении размер узлового образования не изменился от первоначально выявленного. В 10.2% случаев размер узлового

образования увеличился более чем на 10 мм и метастазы в боковую клетчатку шеи были выявлены у 1.2% наблюдавшихся. Однако в том же исследовании приводятся данные о частоте микрометастазов в центральные лимфоузлы шеи, достигающие уровня 50,5% [57].

В последнее время накапливается все больше данных, что при долгосрочном наблюдении у определенной части этих пациентов диагностируется персистенция и/или рецидив заболевания.

В исследованиях D Giordano and al 2010 года частота рецидивов при наблюдении в среднем 48 месяцев после операций по поводу микрокарцином щитовидной железы достигает 10% [34].

На основании приведенных данных можно говорить, что существующая хирургическая тактика в отношении микрокарцином щитовидной железы требует совершенствования. В настоящее время консенсус по объему операции, а именно – выполнению центральной лимфодиссекции, достигнут не был ни в России, ни за рубежом [37, 135].

Таким образом, актуальным представляется поиск новых методов диагностики и прогнозирования микрометастазов рака щитовидной железы, для того чтобы все лимфаденэктомии были лечебными.

Как видно из приведенного выше, насущной клинической проблемой является дооперационная достоверная система определения пациентов группы высокого риска рецидива/персистенции ВДРЩЖ, основываясь на которой возможно прогнозировать течение заболевания и планировать объем оперативного лечения.

1.2.2 Послеоперационная радиойодтерапия и факторы, влияющие на развитие рецидива

Не смотря на довольно широкое распространение терапии РЙ, уровень рецидивирования ВДРЦЖ сохраняется на довольно высоком уровне от 10 % до 30 %, по данным некоторых исследователей [70, 96, 131].

На основании послеоперационных данных на сегодняшний момент происходит определение стадии заболевания, что необходимо для оценки индивидуального прогноза и выбора протокола дальнейшего ведения пациента, о чем было сказано выше. На основании Национальных клинических рекомендаций по диагностике и лечению дифференцированного рака щитовидной железы от 2007г. на сегодняшний момент нет сомнений в необходимости проведения послеоперационной терапии РЙ у пациентов группы высокого риска. Однако, в группе пациентов промежуточного риска нет однозначного мнения о необходимости РЙТ, оптимальных дозах и методах стимуляции. Нет так же и согласия среди исследователей о критериях включения пациентов в ту или иную группу. Так в одних системах стратификация риска носит статичный характер и определяется на основании планового гистологического исследования. Другие же системы являются динамическими и помимо TNM стадирования включают в стратификацию риска ответ пациента на послеоперационную терапию, что позволит перевести пациента в другую группу риска, и начать адекватное лечение раньше. Так же, следует отметить, что риск развития рецидива или персистенции заболевания варьирует в зависимости от группы. Так у пациентов низкого риска частота рецидивирования/персистирования составляет 3 %, промежуточного риска – 21 %, для группы же высокого риска доходит до 68 % [63].

На основании исследований последнего времени, можно выделить три группы факторов, вносящих вклад в развитие рецидива заболевания: факторы, относящиеся к характеру и объему лечения, к опухоли и к пациенту.

Так факторы относящиеся к характеру и объему лечения освещены в предыдущей главе.

Факторы, относящиеся к опухолям – являются наиболее изученными. Это такие факторы, как размер опухоли, инвазия капсулы опухоли/щитовидной железы, инвазия в сосуды, инвазия в окружающие структуры, метастатическое поражение регионарное или отдаленное [64, 67, 98, 133]. В последнее время все больше исследователей, как было написано выше, относят к этому перечню еще и наличие мутации гена BRAF V600E. Следует отметить, что в связи с широким применением, особенно за рубежом, послеоперационной РИТ последнее время появились работы описывающие влияние уровня экспрессии НИС на развитие рецидива ВДРЩЖ после РИТ. В работе Gao WL 2012г. было проанализировано влияние уровня экспрессии НИС и наличия BRAF мутации на развитие рецидива заболевания после РИТ [69]. В этой работе автор нашел корреляцию снижения уровня экспрессии НИС и наличия BRAF мутации только для классического типа ПРЩЖ. В случае же ФВПР данной корреляции не наблюдалось, хотя у пациентов выявлено снижение уровня экспрессии НИС и неэффективность РИТ, проявившаяся в рецидиве заболевания. В связи с выявленным влиянием уровня экспрессии НИС на безрецидивную выживаемость пациентов с РЩЖ в 2013 году Wei S с коллегами опубликовали статью, в которой проанализировали уровень экспрессии НИС в агрессивных формах ПРЩЖ (высококлеточной и диффузносклерозирующей) с рецидивирующим течением после РИТ [138]. Выявив значительно более низкую экспрессию НИС в агрессивных формах ПРЩЖ, ученые предположили, что группа пациентов со сниженной экспрессией НИС, с целью улучшения прогноза, нуждается в больших дозах I 131.

Однако, следует отметить, что ни в одном исследовании нам не удалось найти численных характеристик уровня снижения экспрессии НИС. Учитывая возможность использования НИС в качестве прогностического маркера чувствительности РЩЖ в терапии РИ исследования в этом направлении являются перспективными.

Что же касается факторов, относящихся к пациенту, большинство исследователей сходятся на том, что пожилой возраст на момент постановки

диагноза и мужской пол являются факторами риска рецидива заболевания. Так Yasuhiro Ito и др. в работе, опубликованной в 2014г. и в которую вошло 74 пациента с радиойодрезистентными формами ВДРЩЖ, выявил, что независимыми факторами риска стали мужской пол пациентов и возраст более 60 лет, на момент постановки диагноза [68]. Так же и Hsieh S.H. с соавторами в статье 2012г. пришли к выводу, что мужской пол является независимым фактором риска рецидивирования и рак специфической смертности среди пациентов с ВДРЩЖ [65]. Следует отметить, что еще ряд исследователей сходятся во мнении о мужском поле, как независимом факторе риска рецидива/прогрессирования заболевания [58, 72], но так и не удалось найти исследований, объясняющих данный феномен. Данный факт так же является весьма любопытным и требует дальнейших исследований.

Таким образом на неэффективность послеоперационной РИТ и рецидивирование ВДРЩЖ могут повлиять такие факторы, как прогрессивная стадия TNM, инвазивный рост опухоли, неадекватный первичный объем хирургического лечения, мужской пол. А так же наличие BRAF мутации и снижение уровня экспрессии НИС, однако, последняя гипотеза требует дальнейших изучений.

1.3 Молекулярная патофизиология спорадического высокодифференцированного рака щитовидной железы

Причины увеличения заболеваемости раком щитовидной железы остаются неясными. Вероятным представляется мультифакториальное воздействие вместе с улучшением диагностики. Развитие ядерной медицины, ионизирующее излучение, как фактор риска развития рака щитовидной железы, приводящий к дестабилизации генома и появлению генетических дефектов, детерминирующих развитие опухоли. На генетические события могут воздействовать как природные канцерогены, так и эндогенные факторы (ТТГ, аутоиммунный тиреоидит). Имея представление о характере «поломки» генетического материала каждого

конкретного пациента, можно определить индивидуальный подход к лечению, прогнозированию течения, послеоперационному ведению, и, при необходимости, назначение не эмпирически подобранного, а молекулярно-генетически обоснованного лечения.

Молекулярные исследования последних лет привели к накоплению знаний о молекулярных различиях наследственно детерминированного и спорадического, обусловленного соматическими мутациями, рака щитовидной железы. Все эти генетические события отражают биологический потенциал каждой из исследуемых опухолей.

Как и все злокачественные опухоли, рак щитовидной железы проходит стадии инициации и развития, которые являются причиной разнообразных генетических событий: активирующих и деактивирующих соматических мутаций, изменений уровня экспрессии гена, аберрантное метилирование гена и дисрегуляция микроРНК. Рак щитовидной железы относится к такому виду опухолей, у которых основные гены-регуляторы часто подвергаются двум молекулярным событиям – точковым мутациям и хромосомным перестановкам. Выше упомянутые события являются перестановкой единственной нуклеотидной последовательности, которая однако приводит к значительным генетическим событиям с дефектам или слияниями целых участков одной или различных хромосом [107].

Большинство мутаций при раке щитовидной железы затрагиваются два основных внутриклеточных каскада MAPK и PI3K-AKT. Мутация в каскаде MAPK является основной при инициации опухолевого процесса. Мутировавшие гены, участвующие в запуске вышеперечисленных каскадов, кодируют клеточные рецепторы RET и NTRK1, либо внутриклеточные передаточные белки BRAF и RAS [45, 105, 103, 147]. Эти мутации характерны для папиллярного рака щитовидной железы и встречаются практически в 80 % случаев [81, 46, 3], а так же отвечают за клиническое течение, гистологическое строение и биологический

потенциал опухоли [22]. Для фолликулярного рака щитовидной железы помимо мутации RAS характерна перестановка PAX8-PPR γ . Для прогрессирования и дедифференцировки рака щитовидной железы характерно появление активирующих мутации в каскаде PI3K-AKT.

1.3.1 Мутация гена BRAF

BRAF- это серин-тираниновая киназа, которая перемещается к клеточной мембране после связывания и активации с RAS. Активация BRAF приводит к дальнейшей передаче сигнала по MAPK каскаду. При раке щитовидной железы BRAF может быть активирована без связи с RAS, наиболее часто это происходит при наличии точковой мутации гена b-RAF в позиции 1799, что ведет к замене валина на глутамин в 600 группе белка BRAF. Данная мутация гена BRAF при папиллярном раке щитовидной железы определяется в 98-99 % случаев. На долю же других мутаций гена b-RAF приходится не более 2% [32]. BRAF мутация наиболее часто встречающийся генетический дефект при папиллярном раке щитовидной железы. Частота его варьирует от 29 — 83 % по данным литературы [6, 12, 143]. Так же данная мутация встречается в 20 – 40 % случаев низкодифференцированного рака и до 25 % анапластического [108].

В последнее время увеличивается количество работ, посвященных поиску корреляции наличия BRAF мутации и варианта гистологического строения ПРЦЖ. Так в ряде работ было с высокой степенью достоверности показано, что наличие BRAF мутации коррелирует с гистологическим вариантом строения ПРЦЖ и наиболее часто соответствует классическому и высококлеточному вариантам строения папиллярного рака щитовидной железы [66]. Этот факт может быть причиной столь обширного разброса частоты встречаемости BRAF мутации в исследованиях различных авторов, т.к. группы анализируемых ПРЦЖ зачастую неоднородны по своему гистологическому составу, что делает невозможным включение таких работ в мета-анализ.

Корреляция между генотипом и фенотипом BRAF положительных опухолей щитовидной железы является предметом интенсивного изучения последние несколько лет. Так большинство исследований последних лет было посвящено изучению корреляционной связи наличия BRAF мутации с одним или несколькими клинико-морфологическими признаками агрессивного течения ПРЩЖ и/или плохого прогноза [12, 132]. В мета-анализе, объединившем 12 исследований и включившем 1168 пациентов, Lee J.H. and all 2007 г определили, что мутация BRAFV600E была выявлена в 337 из 570 случаев классического варианта ПРЩЖ (59%), 34 из 43 высококлеточного варианта (79%), и 29 из 172 случаях (17%) фолликулярного варианта ПРЩЖ. Таким образом, BRAF мутация ассоциирована с классическим и высококлеточным вариантом гистологического строения ПРЩЖ и значительно реже встречается при фолликулярном варианте ПРЩЖ [85].

Небольшое количество исследований были посвящены изучению распространения BRAF мутации среди редких вариантов гистологического строения ПРЩЖ. Была изучена встречаемость мутации гена BRAF в онкоцитарном варианте РЩЖ (гюртлеклеточная карцинома, которая может быть, как фолликулярного, так и папиллярного строения). Исследование проводилось на небольшой выборке, однако следует отметить, что ни в одном из 18 случаев не выявлено BRAF положительной онкоцитарной карциномы щитовидной железы папиллярного строения [139].

Последние годы активно ведется поиск наличия зависимости между BRAF мутации и агрессивными клинико-гистологическими характеристиками ПРЩЖ. Поиск наличия зависимости BRAF мутации и неблагоприятным прогнозом течения рака щитовидной железы является актуальным, в связи с неудовлетворенностью существующими системами определения пациентов высокого риска рецидива заболевания, основанных на возрасте, поле и стадии опухолевого процесса (размер опухоли, наличие экстрагиреоидной инвазии, регионарных лимфогенных и отдаленных гематогенных метастазов). Множество

исследований продемонстрировали зависимость наличия BRAF мутации с одним или несколькими клинико-морфологическими признаками агрессивного течения ПРЩЖ или неблагоприятного прогноза. Так, в 2007 году был выполнен мета-анализ 12 работ с общим числом наблюдений 1168 [85]. Его результаты однозначно показали, что наличие BRAF мутации имеет прямую зависимость с экстракраниальной инвазией и более высоким потенциалом к регионарному метастазированию, но не связана с расой, возрастом, полом и размером опухоли.

По данным Yip L (2013) мутация BRAF V600E является единственным независимым предиктором метастазов в центральную клетчатку шеи при папиллярном раке щитовидной железы [86, 73]. В исследовании Zhou YL (2012) показано, что наличие BRAF-мутации является независимым прогностическим фактором наличия оккультных папиллярных карцином в другой доле [146].

Еще одним возможным доказательством роли BRAF-мутации как неблагоприятного прогностического фактора явилось исследование Vasko V (2005), в котором приводятся данные о высокой частоте выявления мутации в метастатических лимфоузлах. Интересным оказался факт выявления мутации в лимфоузлах в случаях, когда она отсутствовала в первичной опухоли. Это служит косвенным доказательством роли данной генетической поломки в дедифференцировке опухоли и, как следствие, неблагоприятном прогнозе [134].

Во многих исследованиях из различных этнических и географических регионов была показана зависимость BRAF мутации и рецидива заболевания [21, 75, 141]. Интересным явился тот факт, что данная зависимость была более сильная в группе пациентов низкого риска рецидива. Критерии были определены по стандартным действующим согласительным документам и рекомендациям. Т.е. у тех BRAF положительных пациентов, которых по стандартному протоколу отнесли к группе низкого риска, в ходе исследования диагностирован рецидив РЩЖ [142].

Встречаемость BRAF-мутации в группе пациентов с рецидивами папиллярного рака достигала 85%, что достоверно выше чем в популяции пациентов без рецидива [104, 62].

В обзоре Xing M. (2010) приведены сводные данные о положительной и отрицательной прогностической вероятности BRAF мутации предсказать рецидив папиллярного рака, которые составили 28% и 87%, соответственно [144]. Полученные прогностические характеристики BRAF мутации могли бы позволить использовать ее в системе распределения пациентов на группы риска рецидива папиллярного рака щитовидной железы.

Однако в ряде исследований не было найдено связи BRAF-мутации с более агрессивным течением папиллярного рака щитовидной железы, в частности, финскими авторами приводятся данные о том, что частота рецидивов у пациентов с BRAF-положительными опухолями не отличается от BRAF-негативных [114]. В тайваньской популяции была выявлена высокая частота встречаемости BRAF-мутации, однако связи с неблагоприятными клинико-патогенетическими типами выявлено не было и не является потенциальным прогностическим фактором [89]. В корейской популяции BRAF-мутация выявлена в папиллярных микрокарциномах, но связи с неблагоприятным прогнозом доказано не было [80].

Французскими авторами не было найдено корреляции BRAF мутации с неблагоприятным прогнозом [148]. Так же в исследованиях ряда российских авторов [20].

Еще одним фактом, доказывающим влияние BRAF мутации на прогноз при папиллярном раке является наличие связи данной мутации с рак-специфичной смертью. Xing M. (2013г) провел мета-анализ, в который вошли 1849 пациентов из 13 центров в 7-ми странах мира. Целью исследования явилось определение наличия связи BRAF положительного статуса опухоли щитовидной железы и увеличение рак-ассоциированной смерти пациентов. Средний срок наблюдения составил 33 месяца (13 – 67 месяцев). Результатом исследования стало

подтверждение более высокого риска рак-ассоциированной смерти у пациентов с BRAF положительной карциномой щитовидной железы. Однако, следует отметить, что всё же смертность от рака щитовидной железы хоть и имеет тенденцию к росту, но остаётся весьма умеренной, что диктует необходимость дальнейших исследований [140].

Интересным проспективным исследованием является работа Elisei and all (2008), в которой наблюдали за течением ПРЩЖ после оперативного лечения у 102 пациентов течение 15 лет, разделяя пациентов по BRAF статусу. Данное исследование ясно показало, что наличие BRAF мутации является независимым прогностическим маркером неблагоприятного прогноза для BRAF положительных пациентов, которые оказались не только в группе некурабельных, но и чьей причиной смерти явился ПРЩЖ [41]. Но, учитывая торпидное течение РЩЖ, исследователи продолжают исследование, для определения более длительного прогноза.

На сегодняшний день анализ литературных данных позволяет говорить, что достаточное количество долгосрочных наблюдений еще не получено и достоверно оценить влияние BRAF мутации на онкоспецифичную смертность невозможно, так как папиллярный рак щитовидной железы является медленно прогрессирующим раком с низким уровнем смертности [79].

Основываясь на данных, что мутация гена BRAF участвует в развитии папиллярного рака щитовидной железы и прогрессировании до анапластического, данное генетическое событие становится притягательной целью для воздействия, особенно в случае быстро прогрессирующих метастатических опухолей. Следовало бы ожидать в случае анапластического рака увеличение частоты встречаемости мутации гена BRAF, чего не отмечено в опубликованных исследованиях, где частота выявления мутации не превышает 25 % [125]. В тех исследованиях, где частота выявления выше, много вопросов вызывает методика определения мутации, что не позволяет включать эти работы в мета-анализ [54].

Причиной столь низкого процента выявления BRAF мутации в анапластическом раке щитовидной железы может быть вовлечение иных генетических механизмов в прогрессирование папиллярного рака щитовидной железы и активации каскада RAS/RAF/MEK/ ERK/MAP [83, 55, 47, 40, 91, 30, 109, 110].

Таким образом, BRAF-мутация может быть новым перспективным маркером, который может быть использован как дополнительный фактор определения группы риска рецидива при РЩЖ, а также для определения объема оперативного лечения и тактики ведения пациента в послеоперационном периоде.

Однако немногочисленность данных не позволяют включить данный маркер в стандарты диагностики и лечения высокодифференцированного рака щитовидной железы, что требует проведения дальнейших исследований в этом направлении.

Ключевым белком, изменение экспрессии которого критически сказывается на прогнозе для пациента, является трансмембранный белок натрий-йодный симпортер (НИС).

1.4. Натрий йодный симпортер в норме и при высокодифференцированном раке щитовидной железы

Натрий-йодный симпортер (НИС) это интегральный трансмембранный гликопротеин, наиболее часто описывающийся и изучающийся в фолликулярных клетках щитовидной железы. НИС осуществляет активный транспорт йода внутрь клетки, что является основополагающим моментом для синтеза йодсодержащих гормонов щитовидной железы. НИС определяется не только в клетках щитовидной железы, но и в слизистой желудка, слюнных железах и лактирующей молочной железе. Если в слизистой желудка биологическая роль НИС не известна, то в лактирующей молочной железе НИС выделяет в грудное молоко йод для обеспечения синтеза йодсодержащих гормонов в организме новорожденного самостоятельно. Так же недавно было доказано появление НИС

при раке яичников в эксперименте на мышах, что открывает новые диагностические и лечебные возможности [116].

Способность тироцитов накапливать йод является основой для выполнения диагностических манипуляций - сцинтиграфии с йод 123 и 131, а так же терапевтических процедур – абляция при помощи йод 131 гиперфункционирующей тиройдной ткани (болезнь Грейвса) и метастазов радиойодчувствительного рака щитовидной железы. Влияние на синтез и распределение НИС оказывает ТТГ. Последний оказывает воздействие на симпортер через активацию аденилат циклазы, что ведёт к увеличению транскрипции и синтеза НИС. Так же считается, что ТТГ влияет на посттрансляционные изменения НИС и на доставку его к мембране, где и происходит его встраивание [38].

1.4.1 Молекулярная характеристика НИС

НИС относится к семейству растворимых натриевых симпортеров. Все представители этого семейства имеют одинаковую характеристику – перенос натрия по электрохимическому градиенту, что является основной транспортной силой для транспорта иона йода через мембрану [106]. Существенный прорыв в изучении физиологии тироцита произошел после открытия в 1996г и клонирования кДНК НИС мыши [36]. На сегодняшний день модель структуры НИС выглядит следующим образом: белок имеет 13 трансмембранных доменов, 2 экстрацеллюлярных гликопротеидных домена и карбоксильный цитозольный домен (Рис.1). Данная структура подтверждена экспериментально [86, 87].

Рисунок 1.

Модель структуры натрий йодного симпортера

Na⁺/I⁻ SYMPORTER (NIS)

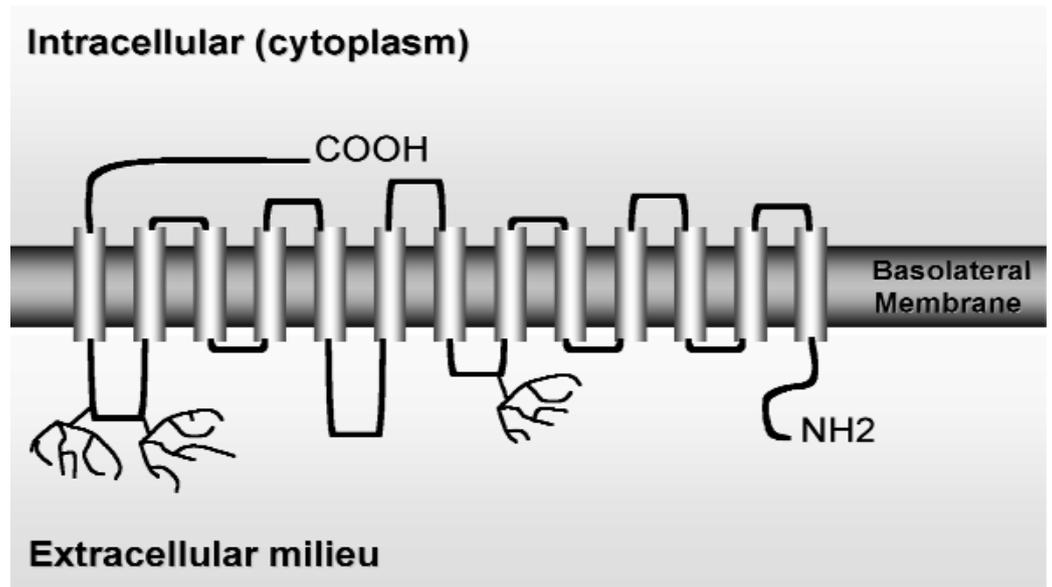


Рисунок 1. (DENISE P. CARVALHO, ANDREA C.F. FERREIRA Arq Bras Endocrinol Metab 2007)

Изучение функционирования НИС показало, что гидроксильная группа в позиции 354 белка НИС является основной для его функционирования. При выявлении мутации, приводящей к замене структуры белка в данной позиции, функциональная активность НИС отсутствует [48]. Данная мутация встречается при врожденных заболеваниях щитовидной железы, сопровождающихся отсутствием способности тироцитов к транспорту йода в клетку.

Многие факторы воздействуют на экспрессию мРНК НИС и функцию белка. Основные факторы - это ТТГ, йод, эстроген. Так ТТГ стимулирует экспрессию гена НИС и увеличивает захват тироцитами йода *in vivo* и *in vitro* [74]. Йод в экспериментах на мышах и клеточных линиях показал эффект в виде снижения экспрессии мРНК НИС и синтеза белка, а так же снижению мембранной активности НИС [44]. Подобным же эффектом обладает и эстроген на функцию НИС, что было доказано на клеточной линии FRTL-5 [49]. Доказательством

депрессивного влияния эстрогена на НИС является эксперимент на мышах, в котором у мышей после овариэктомии на заместительной терапии эстрадиолом увеличивалась экспрессия НИС [88].

1.4.2. Экспрессия НИС при различных заболеваниях щитовидной железы

При изучении экспрессии НИС доброкачественных гипофункционирующих образований щитовидной железы, происходящих из фолликулярного эпителия, получают неоднозначные результаты. Вероятно, это связано с методологическими особенностями. Так, при изучении экспрессии мРНК НИС данных о снижении данного показателя не получено [129], но при ИГХ определении экспрессии НИС на мембране, отмечено значительное снижение встраивания НИС в мембрану тироцита [100]. Однако, эти данные неоднозначны и существуют работы, описывающие нормальный уровень экспрессии НИС в мембране тироцитов доброкачественных узлов щитовидной железы [4, 128].

При гиперфункционирующих узлах щитовидной железы или диффузно-узловом токсическом зобе, значительно повышена экспрессия НИС и его концентрация в мембране, что делает столь эффективным применение йода с диагностическими и лечебными целями [123].

В случае ВДРЦЖ диагностика рецидива или лечение локорегионарных метастазов с использованием радиоактивного йода осуществимо в связи с возможностью опухоли аккумулировать внутри клетки РФП. Эффективность РЙТ зависит от эффективной дозы РФП внутри клетки, что возможно лишь при сохранении функции НИС опухолевой ткани. Однако, следует отметить, что при развитии опухолевого процесса и дедифференцировки опухолевой ткани большинство биохимических характеристик нормальной фолликулярной клетки теряются [4].

Ryu K. Y. и другие (1999) при использовании ПЦР доказали снижение экспрессии мРНК НИС опухолевой ткани щитовидной железы [122]. Другие, более поздние исследования, используя количественную оценку РТ-ПЦР и ИГХ, подтвердили снижение экспрессии НИС [136]. В то же время существует точка зрения, что радиочувствительность зависит не только от уровня экспрессии НИС, но и от снижения уровня активности молекул, регулирующих его внутриклеточный метаболизм, в частности, пендрин, тирозинкиназа, тиреоглобулин [99].

Влиять на уровень экспрессии НИС по мнению многих авторов может наличие мутации гена BRAF. Так Cristina Romei и соавторы при анализе корреляции уровня экспрессии НИС у 78 пациентов с ПРЦЖ с наличием BRAF мутации и/или RET/PTC пришли к выводу, что снижение экспрессии НИС коррелирует с наличием BRAF мутации и не выявили достоверной связи с наличием перестановки RET/PTC [120]. Схожие данные получили и другие исследователи [52]. Barollo S. et al. (2010) в своем исследовании показали достоверно более высокую встречаемость BRAF мутации в случаях йоднегативных рецидивов папиллярного рака щитовидной железы, чем йодпозитивных [25]. Однако необходимо отметить, что в работах последних лет исследователи отмечают не только снижение экспрессии мРНК НИС, но и нарушение встраиваемости НИС в мембрану опухолевой клетки, что делает невозможным выполнение им своих функций. Castro MR и другие отметили, что опухоли, которые при ИГХ исследовании показывали минимальную концентрацию НИС в клеточной мембране, имели тенденцию к более частому рецидивированию, персистированию и развитию радиорезистентных форм [29]. Эти данные говорят о том, что мембранная экспрессия НИС является определяющей в способности тироцита (либо клетки РЦЖ) к захвату йода. Именно снижение концентрации НИС на мембране будет говорить о возможной РЙ резистентности ткани ВДРЦЖ.

Но учитывая данные других исследователей, о снижении или отсутствии экспрессии НИС без прямой корреляции с наличием BRAF мутации [102, 50] возможно предположить, что снижение уровня НИС в клеточной мембране является ранним событием, отражающим дедифференцировку опухолевой клетки, без связи с MAPK киназным каскадом [31]. К подобному же выводу пришли исследователи из Испании, продемонстрировав обратную корреляцию уровня трансформирующего фактора роста β и уровня экспрессии мРНК НИС [118]. Французскими авторами так же не было доказано взаимосвязи BRAF мутации с неблагоприятным прогнозом и йод-чувствительностью метастазов папиллярного рака щитовидной железы [149]. В работе D'Agostino и соавторов 2014г. на клеточных линиях доказано, что в снижении уровня экспрессии НИС и встраивания его в мембрану принимают участие множество генетических событий [35]. Накапливающиеся данные позволяют говорить об отсутствии этиопатогенетической связи наличия мутации BRAF и уровня НИС в клетке ВДРЦЖ.

При изучении влияния BRAF мутации на уровень экспрессии НИС некоторые авторы отмечали следующую тенденцию: при отсутствии BRAF мутации уровень экспрессии мРНК НИС оставался ненарушенным, но не происходило его встраивания в мембрану клетки, что в свою очередь отражает посттрансляционные нарушения; при наличии же BRAF мутации резко снижается экспрессия мРНК НИС и при ИГХ исследовании не удается выявить его накопления внутри клетки [119]. В работе Durante С и соавторов (2007) показано, что в BRAF-позитивных опухолях подавляется метаболизм йода, за счет активации целого ряда генетических событий, но повышается уровень экспрессии Glut-1 и нарушается встраивание белка НИС в мембрану клетки [39], что еще раз подтверждает ведущим фактором в снижении активности НИС являются нарушения на посттрансляционном уровне. Одной из причин нарушения встраиваемости НИС в клеточную мембрану называют активацию каскада PI3K-АКТ, который, как известно, ведет к дедифференцировке ВДРЦЖ.

По-видимому, лишь ИГХ или ИЦХ исследования могут отразить реально существующие функционирующие интрамембранные симпортеры, а применение же ПЦР не отражает потенциал клетки к аккумуляции йода. Так же, при наличии ИГХ признаков нарушения встраивания НИС в мембрану и BRAF мутации можно ожидать более неблагоприятного исхода ВДРЩЖ, а именно более высокого риска рецидива, в том числе появление РЙ резистентных его форм [126].

В современной литературе нам удалось найти незначительное количество работ посвященных изучению прогностического потенциала НИС [84] Так в работе Castro M.R. and all. [131], в которой авторы выявили связь развития РЙ резистентных формы ВДРЩЖ со снижением уровня экспрессии НИС в первичной опухоли. Т.е. предпринята попытка выявить прогностический потенциал уровня экспрессии НИС. Однако, в виду отсутствия работ посвященных этой проблеме, данная гипотеза требует дальнейших исследований и изучения.

Таким образом, анализ имеющихся на настоящий момент литературных данных о роли НИС в агрессивности и РЙ чувствительности рака щитовидной железы носят противоречивый характер, а имеющиеся проблемы диагностики, стратификации риска и стандарты лечения требуют совершенствования. Наиболее актуальным видится исследование молекулярных маркеров, в частности, BRAF мутации и НИС, для внедрения их в клиническую практику.

Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Общая характеристика исследованных больных.

В настоящее исследование вошло 103 пациента с высокодифференцированным раком щитовидной железы, оперированных в клинике общей хирургии за период с 2005 по 2010 год. У всех больных применялся единый алгоритм предоперационного обследования, включавший данные анамнеза, клинико-лабораторного обследования, ультразвуковой картины, результаты тонкоигольной аспирационной биопсии. Изотопные и лучевые методы исследования выполнялись по показаниям.

В настоящее время основным методом визуализации узлового образования в ткани щитовидной железы служит ультразвуковое исследование. УЗИ щитовидной железы и лимфоузлов шеи производилось на аппарате FFsonic FUKUDA DENSHI с использованием стандартных линейных датчиков 7,5 Мгц в кабинете ультразвуковой диагностики клиники общей хирургии СПбГМУ им. акад. И.П.Павлова (зав. отделением ультразвуковой диагностики Т.В. Малахова).

Основным методом дооперационной морфологической диагностики узловых образований щитовидной железы является тонкоигольная аспирационная биопсия узла с последующим цитологическим исследованием аспирата. Показанием для пункционной биопсии, согласно клиническим рекомендациям по ведению узлового зоба и высокодифференцированного рака Американской ассоциации тиреологии от 2009г (American Thyroid Association (ATA) Guidelines Taskforce on Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer, Cooper DS, Doherty GM, Haugen BR, Kloos RT, Lee SL, Mandel SJ, Mazzaferri EL, McIver B, Pacini F, Schlumberger M, Sherman SI, Steward DL, Tuttle RM. Revised American Thyroid Association management guidelines for patients with thyroid nodules and differentiated thyroid cancer. *Thyroid*. 2009 Nov;19(11):1167-214.), являются наличие узлового образования в ЩЖ более 1 см, а так же узловые образования щитовидной железы

вне зависимости от размера, имеющие подозрительные ультразвуковые признаки возможной злокачественной природы узла. Цитологическое исследование аспирата проводилось в цитологической лаборатории СПбГМУ им. акад. И.П.Павлова (зав. цитологической лабораторией, к.м.н. Н.М. Соколова).

Все 103 пациента были оперированы. Показаниями к оперативному лечению являлись: однозначное цитологическое заключение о злокачественной природе узлового образования.

Хирургическая тактика основывалась на клинических рекомендациях по диагностике и лечению узлового зоба Европейской Тиреологической Ассоциации 2006 года, рекомендаций Российской Ассоциации Эндокринологов 2004 года, клинических рекомендаций согласительной комиссии по диагностике и лечению дифференцированного рака щитовидной железы 2008 года и клинических рекомендациях по ведению узлового зоба и высокодифференцированного рака Американской ассоциации тиреологии от 2009г.

Оперативное лечение у всех больных с высокодифференцированным раком щитовидной железы в случае узлового образования более 1 см в диаметре выполнено в объеме тиреоидэктомии. В случае выявления на дооперационном или интраоперационном этапах лимфоузлов, подозрительных на метастатические, операция дополнялась центральной лимфодиссекцией (VI, VII группы лимфоузлов). Боковая шейная лимфодиссекция выполнялась пациентам с цитологически доказанным на дооперационном этапе метастатическим поражением лимфоузлов боковой клетчатки шеи (Таблица 1).

Таблица 1.

Объем операции в зависимости от TNM

Стадия	Объем операции	
--------	----------------	--

$T_{1-2} N_x$	Тиреоидэктомия	
$T_{3-4} N_x$	Тиреоидэктомия с центральной шейной лимфодиссекцией	
$T_{\text{любое}} N_{1a}$	Тиреоидэктомия с центральной шейной лимфодиссекцией	
$T_{\text{любое}} N_{1b}$	Тиреоидэктомия с центральной и боковой шейной лимфодиссекцией	

Наше исследование разделено на два этапа.

2.2. Ретроспективный этап работы.

2.2.1. Принципы разделения пациентов по группам

На первом этапе выполнено ретроспективное исследование уровня экспрессии НИС методом иммуногистохимии (ИГХ) и определения мутации гена BRAF методом аллель-специфичной полимеразной цепной реакции (ПЦР) с детекцией продуктов амплификации в полиакриламидном геле у 60 пациентов с высокодифференцированным раком щитовидной железы, оперированных на базе кафедры общей хирургии в период с 2005 по 2008г. Средний возраст пациентов $49 \pm 13,5$ лет. В исследование вошли 12 мужчин и 48 женщины (Таблица 2).

Таблица 2.

Распределение больных по возрасту и полу в группе больных высокодифференцированным раком щитовидной железы.

ПОЛ	возраст, лет					ВСЕГО
	моложе	25 – 40	41 – 55	56 – 65	старше	

	25				65	
женский	2	10	14	13	9	48
мужской	2	4	5	1	-	12
	6.7 %	23.3 %	31.7 %	23.3 %	15 %	60 (100%)

По гистологическому строению среди 60 пациентов в 58 случаев выявлен ПРЦЖ, в т.ч. 21 ФВПР, и у двух пациентов был ФРЦЖ.

Пациенты были разделены на 3 группы: в первую вошли 15 пациентов с высокодифференцированным раком щитовидной железы T1-2N0M0. Объем лечения этих пациентов ограничился только оперативным вмешательством и послеоперационной супрессивной терапией. С целью стадирования процесса больным интраоперационно выполнялась биопсия клетчатки с лимфоузлами VI группы. В срок наблюдения до 60 месяцев рецидивов у них не выявлено. Характеристика выполненных оперативных вмешательств представлена в таб. 3.

Таблица 3.

Распределение больных в группе с больных без рецидива и РИТ в зависимости от объема оперативного вмешательства

Вид операции	Количество пациентов
Тиреоидэктомия с биопсией центральной клетчатки шеи	15
Тиреоидэктомия с центральной шейной лимфодиссекцией	0

Тиреоидэктомия с центральной и боковой шейной лимфодиссекцией	0
Тиреоидэктомия с боковой шейной лимфодиссекцией с двух сторон	0
Всего	15

Во вторую группу вошли 25 пациентов с ВДРЦЖ T1–4N1a-1bM0, которым было выполнено оперативное вмешательство, с последующим гистологическим исследованием материала по результатам которого поставлены показания и выполнена радиойодабляция. В дальнейшем проводилась супрессивная терапия препаратами тироксина. Рецидива заболевания в срок наблюдения до 60 месяцев у данной группы пациентов не выявлено. Характеристика выполненных оперативных вмешательств представлена в таб.4.

Таблица 4.

Распределение больных в группе без рецидива после РЙТ в зависимости от объема оперативного вмешательства

Вид операции	Количество пациентов
Тиреоидэктомия	0
Тиреоидэктомия с центральной шейной лимфодиссекцией	18
Тиреоидэктомия с центральной и боковой шейной лимфодиссекцией	5
Тиреоидэктомия с боковой шейной	2

лимфодиссекцией с двух сторон	
Всего	25

Третью группу составили 20 пациентов с ВДРЦЖ T1–4N1a-1bM0, которые получили объем лечения, аналогичный пациентам второй группы, а именно - подверглись оперативному лечению, послеоперационной радиойодабляции и супрессивной терапии. Однако в срок наблюдения до 60 месяцев у всех выявлен рецидив заболевания. Характеристика выполненных оперативных вмешательств представлена в таб.5.

Таблица 5.

Распределение больных в группе с рецидивом после РИТ в зависимости от объема оперативного вмешательства

Вид операции	Количество пациентов
Тиреоидэктомия	0
Тиреоидэктомия с центральной шейной лимфодиссекцией	11
Тиреоидэктомия с центральной и боковой шейной лимфодиссекцией	9
Тиреоидэктомия с боковой шейной лимфодиссекцией с двух сторон	0
Всего	20

Диагноз после операции ставился на основании гистологического исследования парафиновых блоков. Окончательный диагноз классифицировался по системе TNM. Распределение больных раком щитовидной железы по стадиям TNM приведены в таблице 6.

Таблица 6.

Распределение больных раком щитовидной железы по стадиям TNM.

Стадия T	Стадия N	Стадия M	Количество пациентов
T ₁	N _{1a}	M ₀	6
	N _{1b}	M ₀	9
	N ₀	M ₀	8
T ₂	N ₀	M ₀	7
	N _{1a}	M ₀	1
	N _{1b}	M ₀	4
T ₃	N ₀	M ₀	11
	N _{1a}	M ₀	11
	N _{1b}	M ₀	1
T ₄	N ₀	M ₀	0
	N _{1a}	M ₀	0
	N _{1b}	M ₀	2

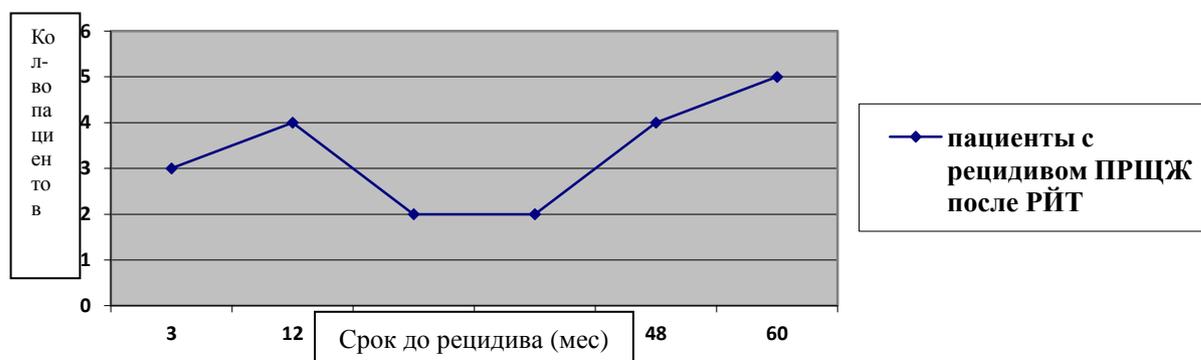
Всего		60
--------------	--	----

По показаниям 45 пациентам в послеоперационном периоде назначалась радиоiodтерапия лечебными дозами I 131. Критериями включения в исследование явились отсутствие патологического захвата радиофармпрепарата при сцинтиграфии после введения терапевтической дозы I 131 и не более 3 - 4 % захвата от введенной дозы в ложе удаленной щитовидной железы.

В срок наблюдения до 60 месяцев рецидив заболевания выявлен у 20 пациентов (График 1).

График 1.

Распределение больных с рецидивом ВДРЩЖ после получения РИТ в зависимости от времени выявления рецидива



У 16 пациентов рецидив носил локорегионарный характер, у 3-х выявлены множественные метастазы в легкие (в одном случае захват I 131 при сцинтиграфии отсутствует), и у одной пациентки определяется повышенный уровень тиреоглобулина (ТГ) и антител к тиреоглобулину без отмены супрессивной терапии, однако топически верифицировать очаг не удалось.

Первый этап работы заключался в выявлении корреляции между уровнем экспрессии НИС в первичной опухоли и оценкой безрецидивной выживаемости

пациента. Снижение возможности захвата радиойода в метастатическом очаге считалось достоверным при возникновении рецидива заболевания после проведения РЙТ по стандартной методике и отрицательного результата сцинтиграфии всего тела с I 131 после терапии. Помимо этого, исследовалась корреляция между снижением уровня экспрессии НИС на мембране опухолевой клетки и наличием BRAF мутации.

2.2.2. Методика иммуногистохимического определения экспрессии натрий-йодного симпортера

С целью ретроспективной оценки уровня экспрессии НИС в опухолевой ткани от пациентов, оперированных с диагнозом папиллярный рак щитовидной железы, выполнялось ИГХ исследование. Для ИГХ исследования использовались моноклональные антитела к натрий-йодному симпортеру Anti-Sodium Iodide symporter (SPM186) (Abcam, США). Срезы с парафиновых блоков монтировали на предметные стекла, предварительно обработанные адгизивом. Срезы отводили от парафина путем проведения через ксилол (2 емкости) и спирт 96% (4 емкости). Срезы промывали в течение 5 минут в дистиллированной воде. Для активации молекулярных группировок применялась термическая обработка срезов (водная баня) в течение 30 минут.

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

Нанесение на срезы моноклональных АТ НИС (Abcam, США) с экспозицией 30 минут при комнатной температуре. После взаимодействия с АТ срезы промывали в трис-буфере. Визуализацию реакции осуществляли с помощью высокочувствительной системы детекции Envision (Dako, Дания) в течение 30 минут при температуре 25 С⁰. Все срезы промывались дважды в течение 5 минут в трис-буфере.

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

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

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

В виду не изученности патофизиологии симпортера при злокачественном процессе в ткани щитовидной железы и разноречивости получаемых данных других исследователей, в исследование включено определение характера распределения НИС в нормальной ткани щитовидной железы, при диффузном токсическом зобе и фолликулярной аденоме щитовидной железы. С целью изучения характера распределения НИС в ткани щитовидной железы при отличных от рака нозологиях дополнительно изучено 5 образцов нормальной ткани щитовидной железы (в т.ч 2 на фоне аутоиммунного тиреоидита), 6 образцов доброкачественных образований щитовидной железы (фолликулярные аденомы) и 3 образца ткани пациентов с болезнью Грейвса (диффузным токсическим зобом).

2.2.3. Молекулярно-генетическое определение мутации T1799A (V600E) в гене BRAF методом полимеразной цепной реакции

2.2.3.1. Выделение ДНК из парафиновых блоков

Определение наличия мутации в гене BRAF в парафиновых блоках (операционном материале) выполнялась у 60 пациентов с высокодифференцированным раком щитовидной железы. Методика выделения ДНК заключалась в депарафинизации срезов ксилолом и этанолом и последующей обработке образца протеиназой К в течение ночи. Дальнейшее выделение ДНК проводилось сорбентным методом с использованием гуанидина [1].

Для депарафинизации брали 10-12 срезов парафинового блока материала от одного пациента толщиной 5-10 мкм, которые после нарезки переносились в эппендорф. Для предотвращения перекрестной контаминации генетическим материалом образцов, после нарезки каждого образца микротомный нож тщательно очищался ксилолом. Далее к образцам добавляли по 1мл ксилола, перемешивали на вортексе и инкубировали в термостате при 65°C. Затем после центрифугирования образцов 1 минуту при 13000об/мин прозрачную часть супернатанта удаляли. Данную процедуру повторяли еще один раз, а затем проводили аналогичные последовательные отмывки 96% и 70%-ным этиловым спиртом. После последней отмывки осадок высушивали при 75°C до исчезновения запаха, добавляли 200мкл лизирующего раствора, содержащего в качестве детергента 2% Triton X-100, перемешивали на вортексе и инкубировали 10 минут при 99°C. После остывания к реакционной смеси добавляли 15мкл водного раствора протеиназы К (НПО "СибЭнзим", Новосибирск), перемешивали на вортексе, помещали пробы в ротатор в режиме вращения и инкубировали при 60°C в течение ночи.

Для выделения ДНК из полученного раствора на следующий день к образцам добавляли лизирующий раствор, содержащий 4М тиоционата гуанидина, 1% Triton X-100 и 1% Твин-20, а также смесь сорбентов Silica Gel и Diatomaceous Earth (Sigma-Aldrich, США). После перемешивания на вортексе и инкубации в термостате при 80°C в течение 15 минут пробы помещались в ротатор на 15 минут для связывания ДНК с сорбентом. Затем добавляли холодный изопропиловый спирт и центрифугировали пробы 10 минут при 13000 об/мин для

дополнительного осаждения ДНК, после чего надосадочную жидкость удаляли и проводили 2-х кратную отмывку осадка 70% этиловым спиртом. После отмывки осадок высушивали 10 минут при 75°C и элюировали ДНК в бидистиллированной воде при таких же условиях. Полученный раствор центрифугировали для осаждения сорбента, а супернатант, содержащий раствор ДНК, переносили в чистый эппендорф и использовали для постановки полимеразной цепной реакции (ПЦР).

2.2.3.2. Постановка ПЦР

Определение мутации T1799A (V600E) в гене BRAF как в случае ДНК из парафиновых блоков, так и в случае материала аспирационной биопсии проводили с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием аллель-специфичных праймеров [2].

Суть метода состоит в том, что для каждого образца ДНК ставятся параллельно две реакции ПЦР, в каждой из которых используется праймер, комплиментарный одному из вариантов типизируемой мутации. В случае если в ДНК пациента мутация отсутствует, то ПЦР проходит только в одной пробирке, где использовался праймер, комплиментарный аллелю нормы. Если же в ДНК пациента мутация есть, то ПЦР пройдет в обеих пробирках.

Общий праймер, используемый в обеих реакциях, имел нуклеотидную последовательность 5'-ggcscaaaatttaatcagtggga-3'. В качестве специфичного праймера для детекции аллеля нормы (аллель «Т»), а также оценки адекватности забранного материала, использовался праймер с последовательностью 5'-gtgattttgtctagctacagt-3', а для мутантного аллеля «А» праймер 5'-gtgattttgtctagctacaga-3' (все праймеры синтезированы ЗАО «Синтол»).

ПЦР проводились на амплификаторе «Терцик» (ООО «ДНК-Технология», Москва). В качестве фермента для амплификации ДНК использовалась Hot-Taq полимеразы производства ЗАО «Силекс». После приготовления амплификационной смеси в пробирки добавляли 50мкл минерального масла для предотвращения испарения во время реакции. ПЦР состояла из 40 циклов с

предварительной денатурацией в течение 9 минут при 95°C для активации полимеразы. Дальнейшие этапы денатурации, отжига и синтеза происходили в течение 35 секунд при 95°C, 58°C и 72°C соответственно.

2.2.3.3. Определение продуктов амплификации

Детекцию продуктов амплификации осуществляли с помощью электрофореза в 7% полиакриламидном геле с окрашиванием раствором бромистого этидия (LOBA, Австрия) и последующей визуализацией в УФ-свете при длине волны 302нм на приборе Gel Doc (BioRad, США). Считалось, что ПЦР прошла, если в соответствующей дорожке на геле наблюдался фрагмент весом 119 пар нуклеотидов. В качестве маркера молекулярного веса использовали ДНК-маркеры 100 bp (НПО “СибЭнзим”, Новосибирск).

2.3. Проспективный этап работы

2.3.1. Характеристика включённых в исследование пациентов

В ходе второго проспективного этапа работы были исследованы уровень экспрессии НИС и наличие мутации BRAF V600E в материале тонкоигольной аспирационной биопсии (ТАБ) больных с высокодифференцированным раком щитовидной железы проходивших лечение в клинике общей хирургии СПбГМУ им. акад. И.П.Павлова в период с 2009г по 2010г. Уровень экспрессии НИС оценивался количественно методом проточной флуоцитометрии (ПФЦ), а также был выполнен молекулярно-генетический анализ материала ТАБ методом ПЦР-анализа с целью определения BRAF статуса опухоли. Средний возраст пациентов составил 47.4 ± 13.9 лет; соотношение мужчин и женщин – 1 : 7, соответственно (Таблица 7).

Таблица 7.

Распределение больных по возрасту и полу в группе больных с исследованием мутации BRAF V600E и экспрессии НИС в материале ТАБ

ПОЛ	возраст, лет					всего
	моложе 25	25 – 40	41 – 55	56 – 65	старше 65	
Женский	5	7	11	8	7	38
Мужской			3		2	5
	5	7	14	8	9	43
	11.6 %	16.3 %	32.6 %	18.6 %	20.9 %	(100%)

До операции всем пациентам была выполнена тонкоигольная аспирационная биопсия под контролем УЗИ с последующим цитологическим исследованием аспирата. Пункционная тонкоигольная биопсия проводилась под контролем ультразвукового исследования. Забор материала для ПФЦ и генетического анализа проводился на дооперационном этапе при выполнении ТАБ узловых образований ЩЖ под ультразвуковым контролем, либо интраоперационно (на начальном этапе работы при отработке методики). Пунктат, полученный при ТАБ, подвергался цитологическому исследованию (с целью подтверждения наличия опухолевых клеток в пунктате), а смывы из иглы были использованы для выполнения генетического и иммуноцитометрического исследований. Далее материал для проточной цитометрии помещался в консервирующий раствор (фосфатный буфер и антикоагулянт) и хранился при температуре – 18 - - 20 С⁰ до момента исследования, но не более 10 дней. Материал для молекулярно-генетического исследования сразу же направлялся в лабораторию, где выполнялось выделение ДНК, выделенная ДНК замораживалась до момента исследования и хранилась

при температуре – 20 С⁰. Окончательная верификация диагноза, стадирование процесса и определение показаний к радиойодтерапии проводилась по данным окончательного планового гистологического исследования.

Все пациенты были оперированы. Хирургическая тактика основывалась на клинических рекомендациях по диагностике и лечению узлового зоба Европейской Тиреоидологической Ассоциации 2006 года, национальных клинических рекомендаций Российской Ассоциации Эндокринологов 2004 года, клинических рекомендаций согласительной комиссии по диагностике и лечению дифференцированного рака щитовидной железы 2008 года и клинических рекомендациях по ведению узлового зоба и высокодифференцированного рака Американской ассоциации тиреоидологии от 2009г. А так же при выявлении на дооперационном этапе положительного BRAF статуса опухоли по согласованию с пациентом выполнялась тиреоидэктомия с центральной лимфодиссекцией.

В исследование вошли 43 пациента с высокодифференцированным раком щитовидной железы. Объем и характер выполненных оперативных вмешательств представлен в таблице 8.

Таблица 8.

Распределение больных в группе проспективного исследования в зависимости от объема оперативного вмешательства

Вид операции	Количество пациентов
Тиреоидэктомия с биопсией центральной клетчатки шеи	12
Тиреоидэктомия с центральной шейной лимфодиссекцией	18
Тиреоидэктомия с центральной и боковой	12

шейной лимфодиссекцией	
Тиреоидэктомия с боковой шейной лимфодиссекцией с двух сторон	1
Всего	43

По результатам планового гистологического исследования у 28-и пациентов поставлены показания к проведению РЙТ. В срок наблюдения до 48 месяцев рецидив заболевания был диагностирован в 10-и случаях. Ни в одном случае у пациентов из группы без РЙТ не возникло рецидива заболевания (Таблица 9).

Таблица 9.

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

	Пациенты без РЙТ	Пациенты с РЙТ без рецидива	Пациенты с РЙТ и рецидивом
Количество пациентов	15 (34,9 %)	18 (41,7 %)	10 (23,4 %)

РЙТ - радиойодтерапия.

Во всех десяти случаях рецидив носил локорегионарный характер. Все пациенты были повторно оперированы. Исследованию так же подвергался материал ТАБ из области рецидива заболевания.

Второй этап работы заключался в доказательстве возможности использования определения на дооперационном этапе уровня экспрессии НИС в

первичной опухоли и BRAF статуса с целью выявления пациентов группы высокого риска и определения адекватного объема оперативного вмешательства.

2.3.2. Методика определения экспрессии NIS методом проточной флуориметрии в материале тонкоигольной аспирационной биопсии

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

На первом этапе суспензия клеток образцов ТАБ обрабатывалась неконъюгированными антителами к NIS (Santa Cruz Biotechnology, Inc.), после инкубации при температуре +4°C образцы отмывались фосфатно-солевым буфером (Santa Cruz Biotechnology, Inc.).

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

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

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

Экспрессия NIS оценивалась в области определения CD45- клеток.

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

2.3.3. Молекулярно-генетическое определение мутации T1799A (V600E) в гене BRAF методом полимеразной цепной реакции

2.3.3.1. Выделение ДНК из материала тонкоигольной аспирационной биопсии щитовидной железы

После выполнения биопсии полученный материал помещали в стерильную пробирку, содержащую 2мл PBS-буфера (Santa Cruz Biotechnology, США) и 142мкл ACD-A-буфера (Haemonetics, США) и перемешивали переворачиванием. Затем 300 мкл полученного раствора аспирата откручивали при 13000 об/мин в течение 10 минут, супернатант частично удаляли, оставив для выделения осадок и 100 мкл надосадочной жидкости. Выделение ДНК осуществляли с помощью комплекта реагентов ПРОБА-НК (ООО «ДНК-Технология», Москва) согласно прилагаемой инструкции.

2.3.3.2. Постановка ПЦР и определение продуктов амплификации

Этапы постановки ПЦР и определения продуктов амплификации описаны выше и не отличаются от аналогичных этапов ретроспективной части исследования. Описание в главе 2.2.3.2 и 2.2.3.3.

2.4. Статистическая обработка результатов.

Для проведения стандартного статистического анализа и оценки эффективности методов диагностики использована компьютерная программа Statistica 7.0.

ГЛАВА 3

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ АНАЛИЗ

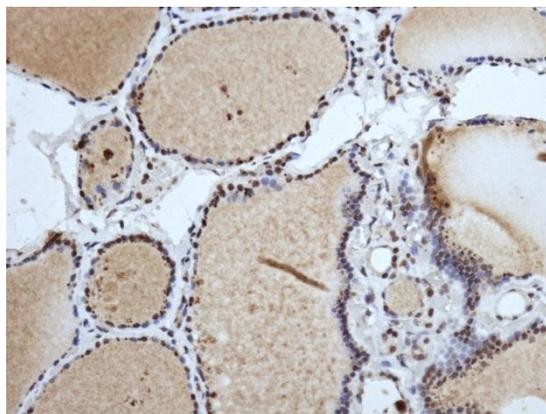
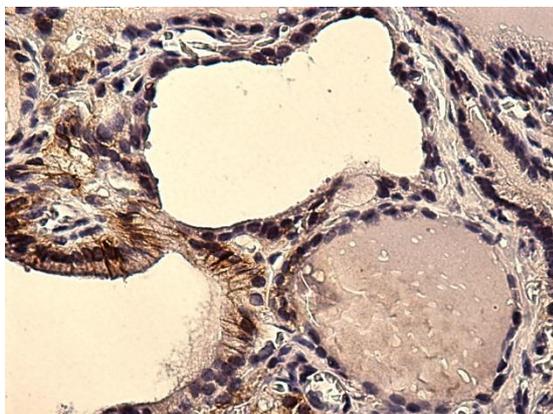
3.1. Ретроспективный анализ

3.1.1. Анализ распределения натрий-йодного симпортера во внутренних отделах тиреоцита

Ввиду малой изученности биологии НИС, а именно - особенностей иммуногистохимической картины при различных заболеваниях щитовидной железы, наше исследование было начато с изучения характера распределения НИС во внутренних компартментах клетки. Изучен характер экспрессии и распределения НИС при неопухолевых заболеваниях щитовидной железы (диффузный токсический зоб), в нормальной ткани щитовидной железы и при опухолях щитовидной железы. Рисунок 2.

Рисунок 2.

Экспрессия натрий-йодного симпортера в нормальной ткани щитовидной железы и при доброкачественных заболеваниях щитовидной железы



А

Б

*А. Диффузный токсический зоб – ИГХ окрашивание НИС только на клеточной мембране; * 200*

*Б. Нормальная ткань щитовидной железы – ИГХ окрашивание НИС так же только на клеточной мембране; * 100*

При исследовании нормальной ткани щитовидной железы максимальная концентрация белка НИС наблюдалась на мембране клетки, тогда как в цитоплазме белок накапливался в небольшом количестве. Данный факт совпадает с теоретическими рассуждениями о том, что белок НИС должен встраиваться в мембрану клетки для осуществления транспорта ионов йода в клетку. Внутренние компартменты клетки являются местом синтеза и транспорта НИС к мембране клетки, куда он встраивается и может выполнять свою функцию. При исследовании 5 образцов нормальной ткани щитовидной железы были получены данные, что в среднем около 50% клеток в поле зрения имеют мембранную экспрессию НИС.

При изучении экспрессии НИС в клетках патологически измененной ткани был выявлен различный характер внутриклеточного распределения белка. Так, в случае диффузного токсического зоба максимальное накопление (ИГХ окрашивание) так же наблюдалось на клеточной мембране, при минимальном накоплении НИС в ядре и цитоплазме клетки. Однако количество клеток, экспрессирующих НИС, повышается в сравнении с нормальной тканью щитовидной железы, и достигает 75%. Этот факт имеет патогенетическое обоснование, так как при болезни Грейвса имеет место гиперпродукция гормонов щитовидной железы, что требует повышенного расхода йода. В связи с этим при этой нозологии имеет место повышенный захват йода, который мы видим при выполнении сцинтиграфии с изотопами йода.

При доброкачественных опухолях щитовидной железы были получены разноречивые данные. В исследование было включено 6 образцов ткани по гистологическому исследованию представленной фолликулярной аденомой щитовидной железы. Клинически в трех случаях имел место тиреотоксикоз, в трех – эутиреоз. При ИГХ-исследовании 3 образца опухолевой ткани имели сниженное количество клеток с мембранным расположением НИС и увеличением его депонирования во внутренних компартментах клетки. Клинически имела место нормальная функция щитовидной железы, а при сцинтиграфии – фолликулярная аденома была представлена “холодным” узлом. Количество клеток с мембранной экспрессией НИС снижалось до 15 – 20%. В то время как три образца имели повышенное количество клеток, с мембранной экспрессией НИС, аналогичной диффузному токсическому зобу. Клинически в этих случаях имела место токсическая аденома. При сцинтиграфии с радиоизотопом йода у пациентов с токсической аденомой был выявлен “горячий узел” и повышенный захват радиофармпрепарата. Количество клеток с мембранной экспрессией НИС повышалось до 70 – 75 %.

Таким образом, в нашем исследовании было показано, что мембранная экспрессия НИС является прямым индикатором способности ткани щитовидной железы к захвату радиойода. При увеличении мембранной экспрессии НИС имеет место повышенный захват йода, что подтверждается данными сцинтиграфии при болезни Грейвса и узлом токсическом зобе (токсическая аденома). Тогда как при снижении мембранной экспрессии НИС имеет место “холодный узел” по данным сцинтиграфии, то есть данный участок ткани щитовидной железы не захватывает РФП. Соответственно, оценивая мембранную экспрессию НИС мы можем прогнозировать способность ткани к захвату изотопов йода и, как следствие, чувствительность опухолевой ткани к лечению радиоактивным йодом.

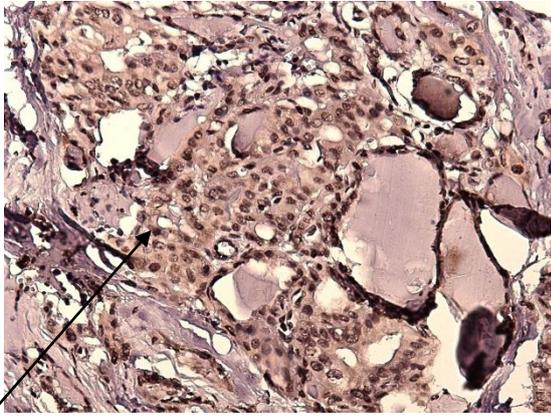
Таким образом, была изучена экспрессия и определены референсные значения уровня экспрессии НИС для выше описанных состояний. Уровень экспрессии НИС в нормальной ткани щитовидной железы составил от 30% до

60% всех клеток, при диффузном токсическом зобе (болезнь Грейвса) повышается до 70 – 75 %, а при доброкачественных опухолях щитовидной железы может снижаться до 15 - 20% в случае “холодного узла” или повышаться в случае узлового токсического зоба.

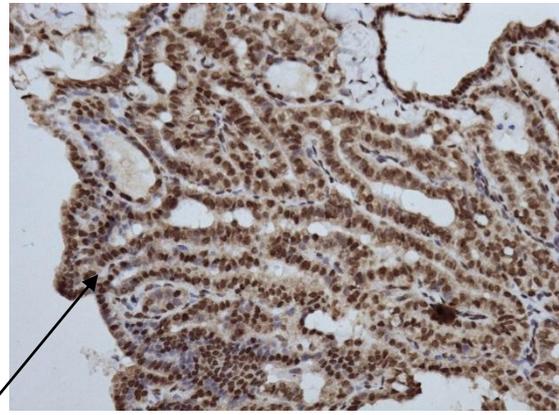
Следующим этапом была исследована экспрессия НИС при раке щитовидной железы. В ходе выполнения первого этапа работы по определению уровня экспрессии НИС на гистологическом ретроспективном материале от 60 пациентов с ВДРЩЖ методом ИГХ были выявлены особенности перераспределения симпортера внутри опухолей клетки. При оценке препаратов выявлено преимущественное накопление белка либо внутри клетки, либо на ядерной мембране, тогда как мембранная экспрессия была значительно снижена в сравнении с нормальной тканью. Внутриклеточный уровень экспрессии, выявленный в нашем исследовании, не был снижен, однако нарушено встраивание НИС в клеточную мембрану, что, по всей вероятности, происходит вследствие посттрансляционных нарушений. Данное изменение ведет к значительному уменьшению функциональной активности белка, в виду невозможности выполнения транспорта йода внутрь клетки. Но необходимо отметить, что наряду с опухолевыми клетками, проявившими максимальное накопление НИС во внутренних компартментах, имеются клетки с мембранной его экспрессией. Можно предположить, что чем выше дифференцировка опухоли, тем выше мембранная экспрессия НИС, тогда как при дедифференцировке опухоли происходит снижение функционально активного, расположенного на клеточной мембране, белка-переносчика йода. Таким образом, оценка экспрессии производилась именно по мембранной экспрессии НИС, что должно отражать именно функциональный потенциал опухолевой клетки к захвату радиоактивного йода. Рисунок 3.

Рисунок 3.

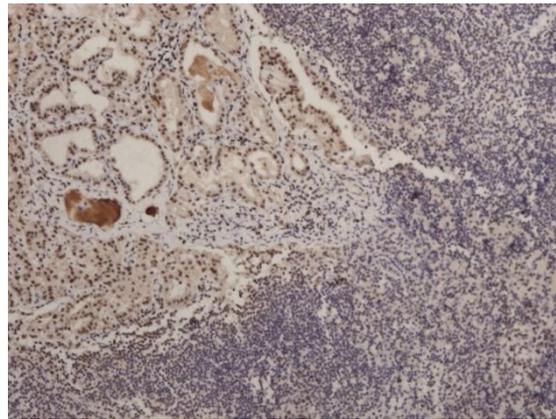
Экспрессия натрий йодного симпортера при папиллярном раке щитовидной железы



A



B



C

*A. Высокодифференцированный рак щитовидной железы с низким уровнем экспрессии НИС на мембране; *200*

*B. Высокодифференцированный рак щитовидной железы с хорошим уровнем экспрессии НИС на мембране; * 200*

*C. Метастаз высокодифференцированного рака в лимфоузел центральной клетчатки шеи (VI группа) – определяется лишь фоновое окрашивание, отчетливо экспрессии НИС на мембране клеток не определяется; * 100*

При изучении уровня экспрессии НИС на клеточной мембране при папиллярном раке щитовидной железы среднее значение не превышает 4,5 %, а максимальное доходит до 10 %. Эти данные подтверждают, что измерение именно мембранной экспрессии НИС при высокодифференцированном раке щитовидной железы является перспективным в оценке функциональной активности НИС и, как следствие, позволит сделать предположение о радиойодчувствительности опухоли.

3.1.2. Оценка среднего значения экспрессии НИС по группам

Для изучения корреляции уровня экспрессии НИС в первичной опухоли и риском рецидива заболевания проведен анализ среднего значения уровня экспрессии НИС по группам.

В первой группе пациентов (группа больных, чей объем лечения ограничился только оперативным вмешательством) уровень экспрессии НИС был максимальным и доходил до 16%, средний же уровень экспрессии составил 6.7% (Таб.10).

Таблица 10.

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

	Всего
НИС менее 2 %	2
НИС более 2 %	5
НИС более 6 %	8

ВСЕГО	15
--------------	-----------

Во второй группе больных (пациенты без рецидива заболевания в срок наблюдения до 60 месяцев после оперативного вмешательства и радиойодтерапии) средний уровень экспрессии НИС первичной опухоли составил 2.8% (Таб.11).

Таблица 11.

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

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

Наибольший интерес представляет третья группа больных – пациенты с радиойодтерапией после оперативного вмешательства и с выявленным рецидивом заболевания в срок наблюдения до 60 месяцев. При оценке уровня экспрессии НИС первичной опухоли выявлено значительное снижение уровня экспрессии НИС в среднем до 1% по данным ИГХ исследования (Таб.12).

Таблица 12.

Характеристика экспрессии натрий – йодного симпортера у

пациентов с рецидивом заболевания в срок наблюдения до 60 месяцев после оперативного вмешательства и радиойодтерапии

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

Как видно из таблицы более 60% пациентов с рецидивом заболевания имели уровень экспрессии НИС менее 1%. Таким образом, представленные данные наглядно показывают, что наименьший средний уровень экспрессии НИС наблюдался в группе больных с рецидивом заболевания после радиойодтерапии ($p = 0.00083$). Проведенное исследование показало, что критичным для развития рецидива явилось снижение уровня экспрессии НИС до 1%.

Полученные данные позволяют предположить, что причиной рецидива у пациентов после РЙТ явилось снижение экспрессии НИС до 1% и ниже вследствие дедифференцировки опухоли, что послужило причиной резистентности к радиойоду.

3.1.3. Влияние уровня экспрессии НИС на прогноз течения ВДРЦЖ

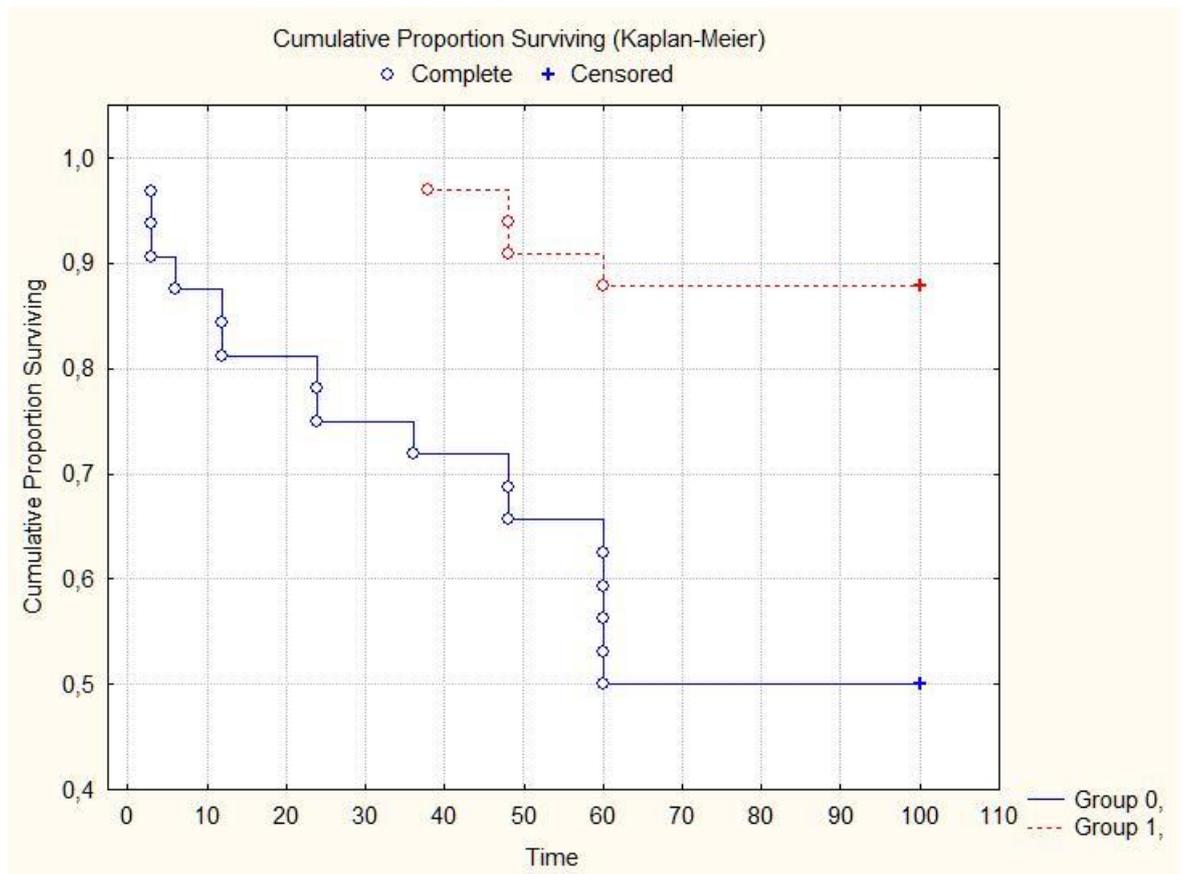
3.1.3.1. Влияние уровня экспрессии НИС на развитие рецидива заболевания

В нашем исследовании мы проанализировали влияние экспрессии НИС на время развития рецидива и его тяжесть. При анализе значения уровня экспрессии

НИС, определенного в процентах, на безрецидивную выживаемость, оцененную с помощью регрессионной модели Кокса с построением кривых Каплан-Мейера, получен однозначный статистически значимый результат ($p < 0.005$): чем ниже уровень экспрессии НИС, тем меньше срок безрецидивного выживания, и критичной считается отметка в 1 % (график №2).

График 2.

Кривые без рецидивной выживаемости больных в зависимости от уровня экспрессии натрий – йодного симпортера



Группа 0 – пациенты с уровнем экспрессии НИС менее или 1 %;

Группа 1 – пациенты с уровнем экспрессии НИС более 1 %;

Time - время до наступления рецидива указано в месяцах; Cumulative proportional surviving – кумулятивная выживаемость.

Таким образом, у пациентов с уровнем экспрессии НИС менее 1% в первичной опухоли следует ожидать рецидива заболевания в срок до 60 месяцев с более высокой вероятностью. Обусловлено данное явление сниженной чувствительностью опухолевой клетки к РИТ.

В группе больных с рецидивом рака щитовидной железы после РИТ (Таб. 13) мы изучили влияние уровня экспрессии НИС на тяжесть рецидива (локорегионарный или отдаленное метастазирование) методом Mann – Whitney U test. Проведенный анализ показал статистически значимое ($p < 0.05$) влияние уровня экспрессии НИС на тяжесть рецидива (график 3).

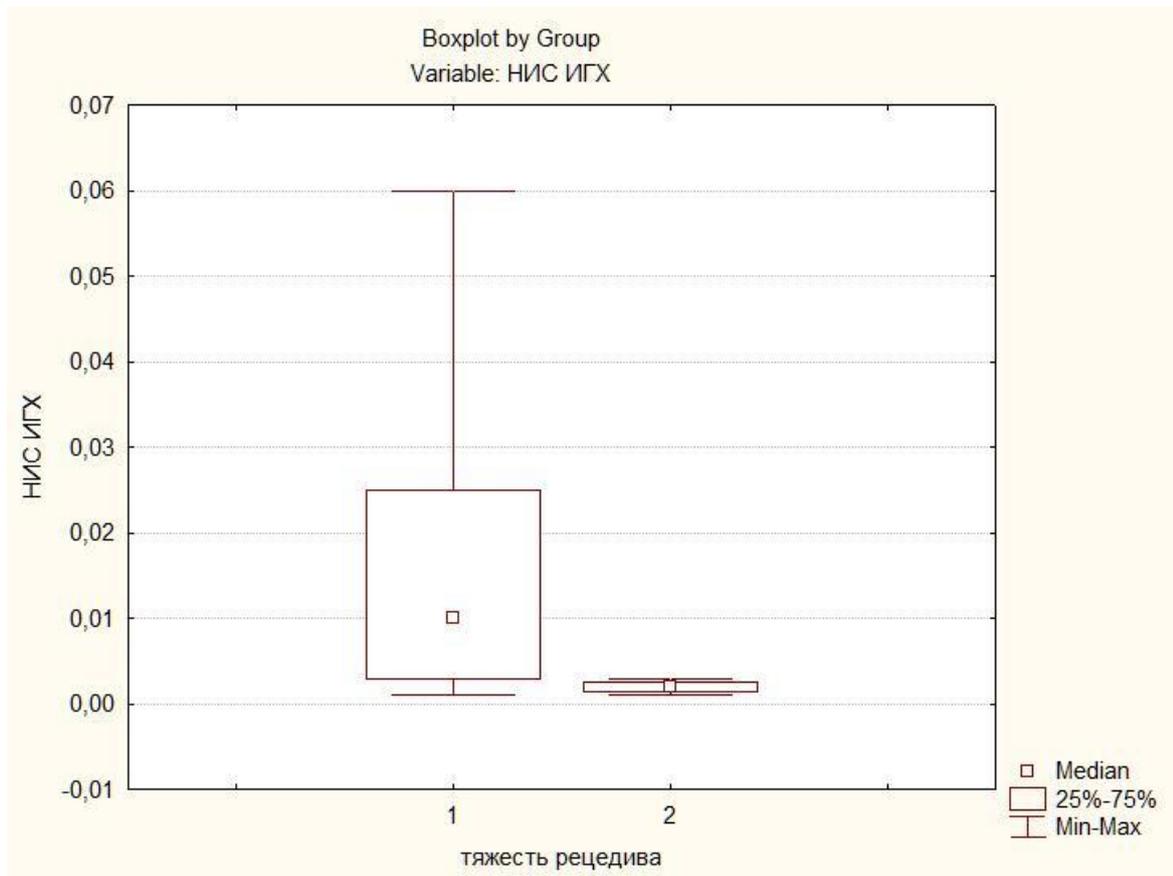
Таблица 13.

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

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

График 3.

Влияние уровня экспрессии НИС на тяжесть рецидива



Группа 1 – пациенты с локорегионарными метастазами;

Группа 2 – пациенты с отдаленными метастазами;

НИС ИГХ - Натрий-йодный симпортер, определенный иммуногистохимическим методом, измеренный в %.

Т.е. чем ниже уровень экспрессии НИС в первичной опухоли щитовидной железы, тем вероятность появления отдаленных метастазов, даже после выполнения РЙТ, выше. Данное явление вероятно связано с более глубокими процессами дедифференцировки опухолевых клеток, косвенным проявлением которого является экстремально сниженный уровень экспрессии НИС.

3.1.3.2. Связь уровня экспрессии НИС и стадии опухоли

При изучении взаимосвязи между уровнем экспрессии НИС и стадией

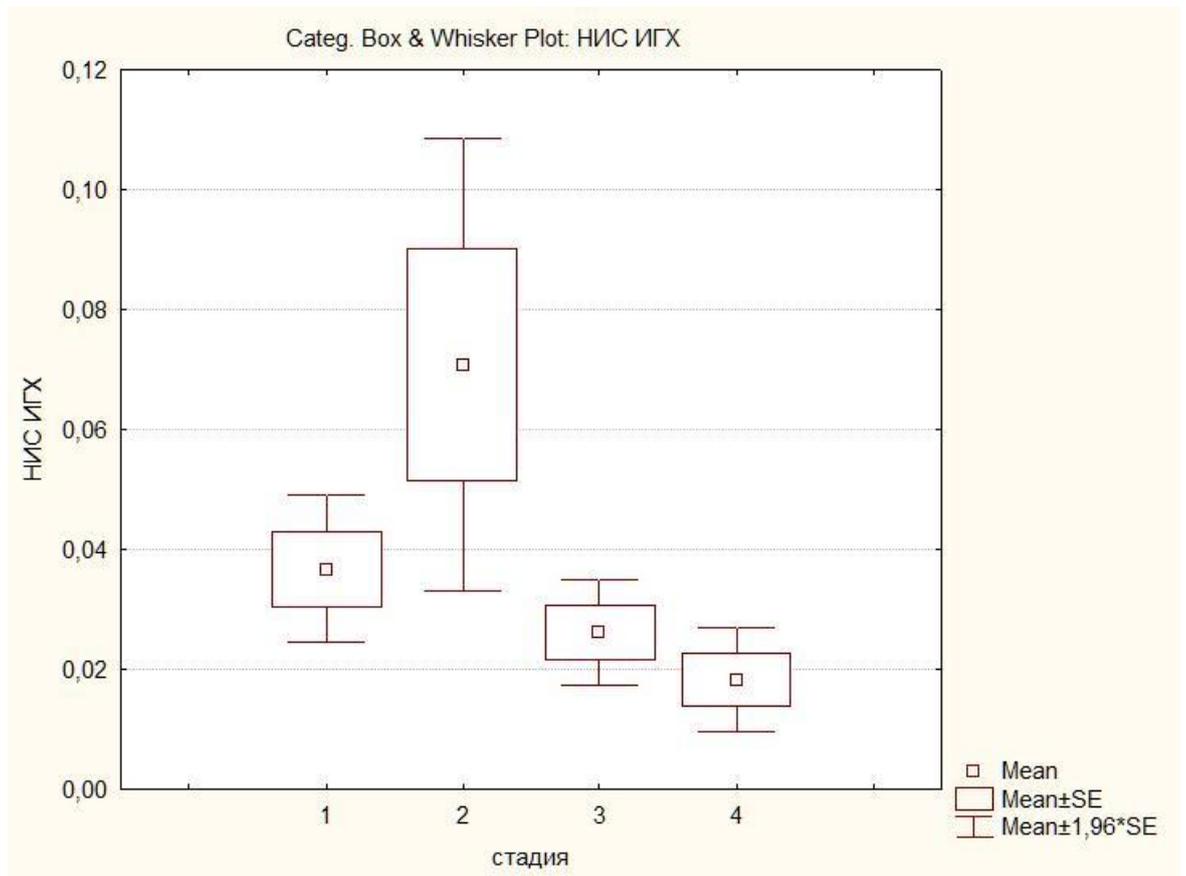
опухоли были выявлены следующие закономерности. Выявлена статистически значимая ($p < 0.05$) корреляция между стадией опухолевого процесса и уровнем экспрессии НИС первичной опухоли (График 4).

Так, при стадии I средний уровень экспрессии НИС достигал 3,7 %, при второй – 7,1 %, при третьей – 2,6 %, тогда как при IV стадии не превышал 0,8 %. Таким образом, нами были получены статистически достоверные данные, что чем более распространенный процесс, чем выше стадия, тем ниже уровень экспрессии НИС.

Уменьшение уровня экспрессии НИС клетками опухолевой ткани в зависимости от стадии опухолевого процесса еще раз подтверждает ранее высказанную гипотезу о НИС как чувствительном внутреннем маркере дедифференцировки опухоли. Таким образом, снижение экспрессии НИС может служить прогностическим маркером агрессивности течения опухолевого процесса.

График 4.

Влияние стадии процесса на уровень экспрессии натрий – йодного симпортера



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

3.1.4. Взаимосвязь между уровнем экспрессии НИС и полом

При анализе влияния пола на уровень экспрессии НИС были получены интересные результаты (Таб. 14), о том, что мужской пол является фактором риска более низкой экспрессии НИС (график 5) и, как результат, неблагоприятного течения высокодифференцированного рака щитовидной железы. Так, средний уровень экспрессии НИС у мужчин оказался равным 1,4 %, что достоверно ниже среднему уровню экспрессии у женщин – 4,3 % ($p < 0,001$).

Таким образом, имеющие в литературе данные об относительно более агрессивном течении высокодифференцированного рака щитовидной железы у мужчин, могут быть связаны с более низким уровнем экспрессии НИС и, в связи с этим, более низким ответом данной категории больных на РЙТ.

Таблица 14.

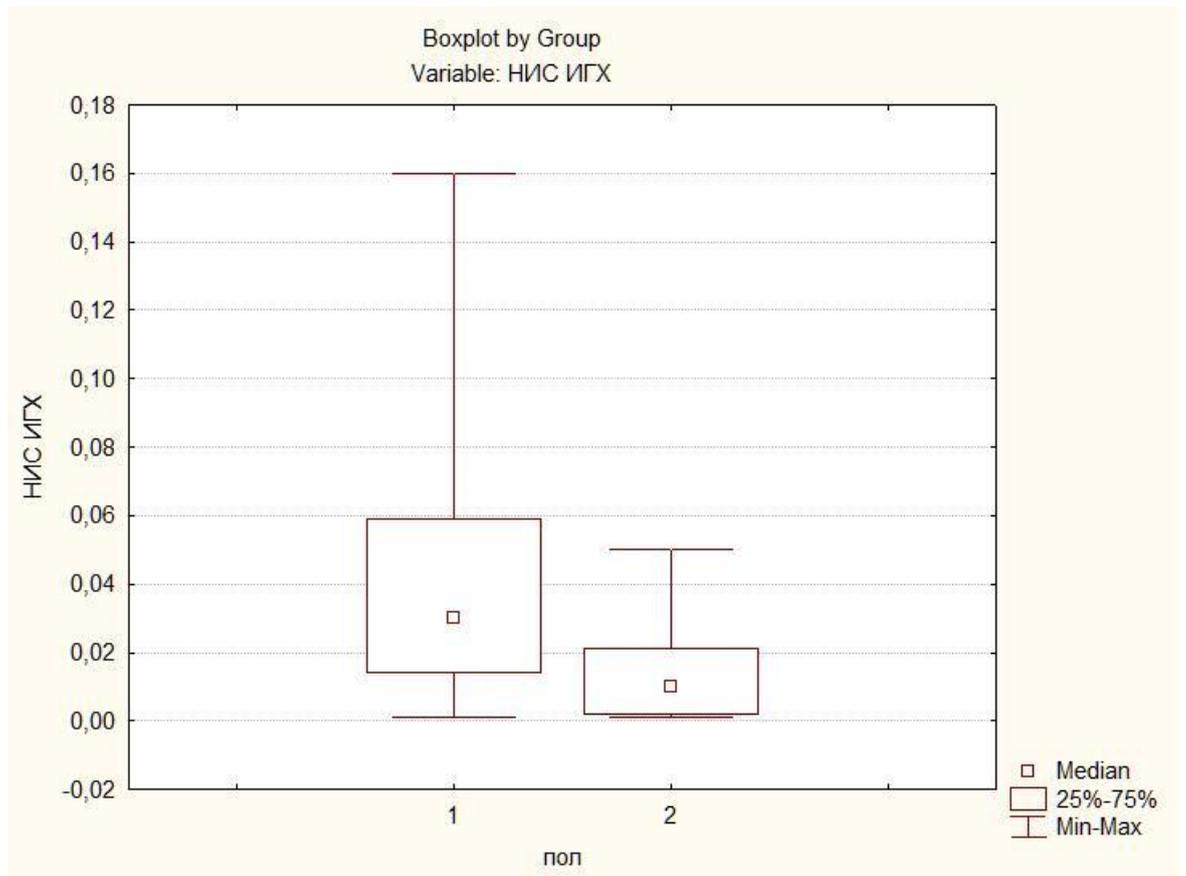
Зависимость течения заболевания от пола и уровня экспрессии натрий – йодного симпортера

	Мужчины		Женщины	
	НИС менее 1 %	НИС более 1 %	НИС менее 1 %	НИС более 1 %
Группа 1	0	0	2	13
Группа 2	1	1	4	19
Группа 3	7	3	6	4
Всего	8	4	12	36

Группа 1 – пациенты без рецидива заболевания после оперативного лечения; **Группа 2** – пациенты без рецидива заболевания после операции и РЙТ; **Группа 3** – пациенты с рецидивом заболевания после операции и РЙТ.

График 5.

Влияние пола на уровень экспрессии натрий – йодного симпортера



Mann – Whitney U test, $P = 0.001$

Пол 1 – женский пол;

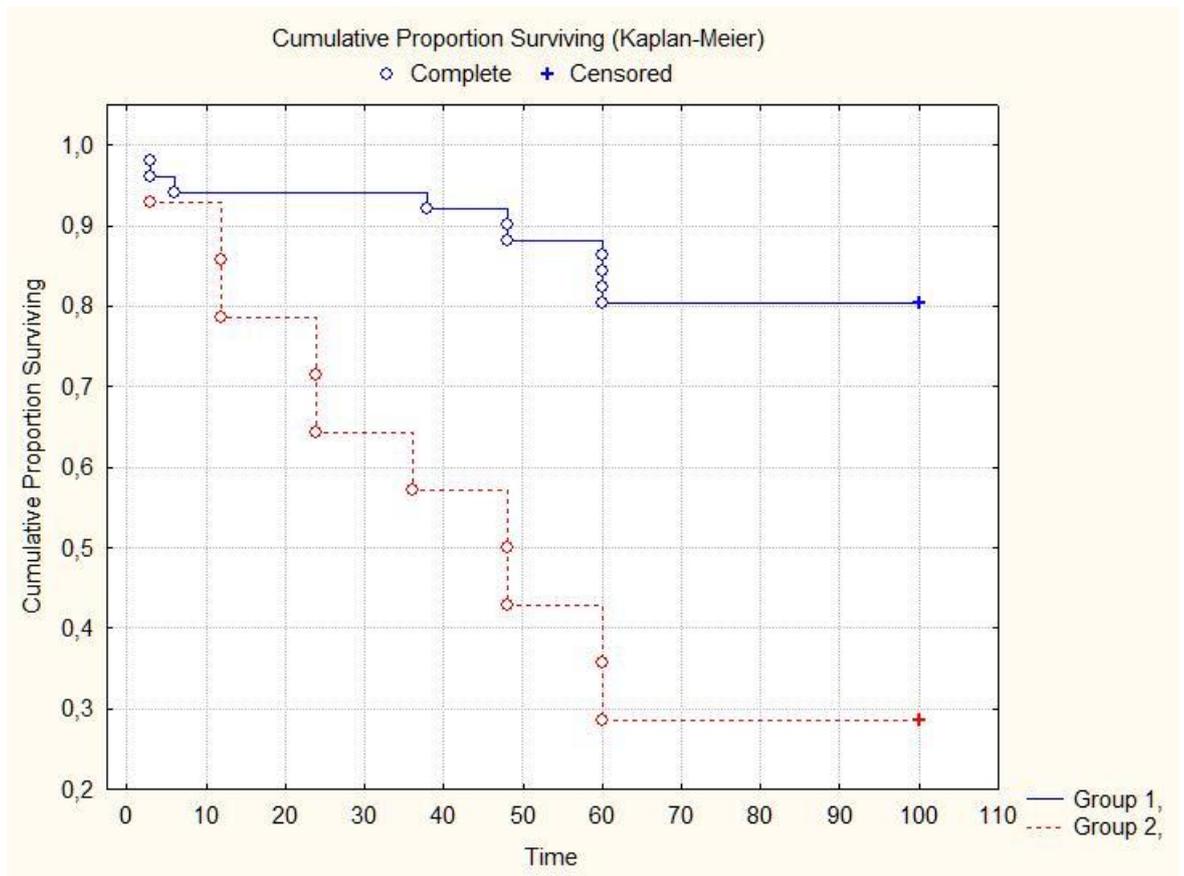
Пол 2 – мужской пол;

Как видно из представленных данных, у мужчин имеет место достоверно более низкий уровень экспрессии НИС.

Мы проанализировали влияние пола на безрецидивную выживаемость. Для этого выполнено построение кривых Каплан-Мейера (график 6).

График 6.

Кривые безрецидивной выживаемости в зависимости от пола



$p < 0.001$. Группа 1 – женщины; Группа 2 – мужчины;

Time - время до рецидива, измеренное в месяцах; *Cumulative proportional surviving* – кумулятивная выживаемость.

На графике видно, что безрецидивная выживаемость мужчин статистически ниже безрецидивной выживаемости женщин ($p < 0.001$). Так, средний срок наступления рецидива у женщин равнялся $38,6 \pm 20,9$ месяцев, тогда как у мужчин – $27,9 \pm 17,7$ месяцев (отличия достоверны). Этот факт еще раз подтверждает более агрессивное течение ВДРЦЖ у мужчин, что по нашим данным связано с достоверно более низким уровнем экспрессии НИС у пациентов мужского пола.

Следует отметить, что при проведении анализа зависимости уровня экспрессии НИС от возраста, статистически значимой корреляции не получено (p

= 0.9).

Таким образом, НИС является чувствительным и ранним маркером, отражающим агрессивность течения ВДРЦЖ. Однако следует отметить, что именно мембранно экспрессируемый НИС отражает количество функционально активного симпортера. У пациентов с низким уровнем экспрессии НИС достоверно чаще развивается рецидив заболевания после выполнения РЙТ, и критичным является уровень экспрессии менее 1 %.

Так же степень снижения уровня экспрессии коррелирует со стадией опухолевого процесса и тяжестью рецидива (появление отдаленных метастазов), что косвенно свидетельствует о возможности использовать НИС, в качестве раннего и чувствительного маркера дедифференцировки опухоли.

Еще одним интересным выводом, можно считать полученные данные о том, что уровень экспрессии НИС достоверно ниже у пациентов мужского пола, что возможно является одной из причин более тяжелого течения рака щитовидной железы именно у этой группы пациентов.

3.1.5 Влияние BRAF мутации на течение ПРЦЖ

В нашей работе мы провели не только исследование экспрессии натрий-йодного симпортера, но изучили встречаемость BRAF-мутации в исследуемых группах на ретроспективном материале (в парафинизированных препаратах). По данным литературы, мутация гена BRAF характерна для папиллярного рака. Многими исследователями подтверждается более частая встречаемость данной мутации при агрессивном течении опухолевого процесса, а именно – при наличии метастазов, экстра tireоидной инвазии, рецидивах. В последние годы появились сообщения о корреляции между выявлением BRAF-мутации и сниженной экспрессией НИС. Мы исследовали встречаемость BRAF-мутации и проанализировали ее корреляцию с экспрессией НИС. Как известно, BRAF мутация характерна для папиллярного рака, особенно для агрессивных его форм и

не встречается при фолликулярном раке. Мы исключили из статистического анализа пациентов с фолликулярным раком на этом этапе работы, что не сильно повлияло на численность исследуемых групп и статистическую достоверность, так как более 96 % высокодифференцированного рака представлено папиллярным раком. Следует отметить, что во всех случаях фолликулярного рака мутация гена BRAF не определялась.

В общей когорте пациентов папиллярным раком щитовидной железы встречаемость мутации гена BRAF оказалась равной 56,7 %, что в целом согласуется с литературными данными. Далее мы изучили встречаемость мутации в исследуемых группах.

В группе больных, где лечение ВДРЩЖ ограничилось лишь операцией и рецидива заболевания в срок до 60 месяцев не выявлено, частота выявления BRAF мутации была минимальна в нашем исследовании и составила 46.7 % (7 из 15 пациентов) (Таб.15).

Таблица 15.

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

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

Следует отметить, что в данную группу вошли пациенты, у которых не было показаний к проведению РЙТ, то есть стадия заболевания соответствовала T1-2N0M0. Таким образом, в группе больных с наименьшей стадией заболевания мы выявили минимальную встречаемость мутации. В исследуемой группе пациентов рецидива в сроки наблюдения до 60 месяцев выявлено не было.

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

В группе больных с отсутствием рецидива после операции и РЙТ встречаемость BRAF мутации составила 56 % (14 из 25 пациентов) (Таб.16).

Таблица 16.

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

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

Как видно из приведенных данных, частота выявления мутации гена BRAF в группе пациентов без рецидива заболевания после РЙТ выше, чем в группе пациентов без рецидива после хирургического лечения, у которых не было

показаний к РЙТ. В данную группу вошли пациенты со стадией заболевания T1-3 N0-1 M0, то есть это были пациенты с более тяжелой стадией заболевания на момент постановки диагноза и встречаемость мутации BRAF у них был достоверно чаще.

Корреляции между выявлением BRAF-мутации и экспрессией НИС выявлено не было.

При изучении распределения BRAF мутации в зависимости от характера течения ВДРЦЖ в группе больных, подвергшихся послеоперационной радиойодобляции, с рецидивом заболевания уровень встречаемости был максимален и составил 65 % (у 13 из 20 пациентов) (Таб.17).

Таблица 17.

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

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

В эту группу вошли пациенты с наиболее агрессивным течением заболевания – со стадией T1-4 N0-1 M0 и рецидивом после операции и РЙТ. Соответственно, у пациентов с наиболее агрессивным течением заболевания, мы

выявили наиболее высокую частоту встречаемости мутации.

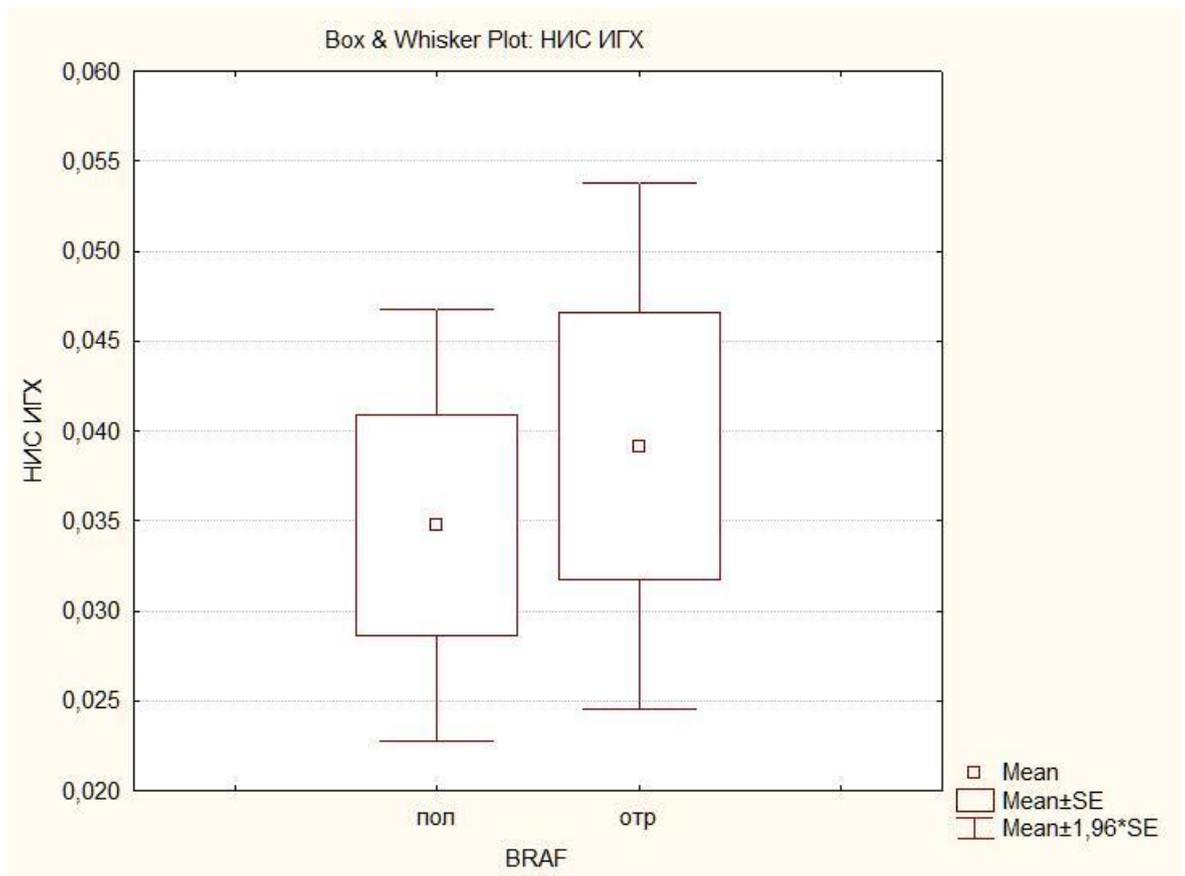
Корреляции между мутацией BRAF и экспрессией НИС в этой группе также выявлено не было.

Таким образом, при одномерном анализе нами были получены достоверные доказательства влияния BRAF мутации на агрессивность течения опухолевого процесса ($p = 0.0049$). Однако, следует отметить, что статистически значимого влияния наличия BRAF мутации на рецидив получено не было ($p = 0.68$).

В отличие от подавляющего большинства зарубежных авторов в нашем исследовании не было выявлено зависимости ($p = 0.65$) уровня экспрессии НИС от наличия BRAF мутации (график 7).

График 7.

Влияние BRAF мутации на уровень экспрессии НИС



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

Отсутствие корреляции между двумя исследуемыми маркерами может говорить о том, что они участвуют в различных независимых молекулярных путях онкогенеза. Другой возможной причиной отсутствия корреляции может быть следующий факт. В подавляющем большинстве исследований, определяется суммарная активность НИС, без разделения на мембранную и цитоплазматическую, что, как показано в нашем исследовании, не отражает уровень реально функционирующих симпортеров в мембране. Возможно, различия в методиках определения, сказываются на полученных результатах.

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

3.2. Проспективный анализ

Проведенный первый этап исследования показал, что натрий-йодный симпортер является чувствительным маркером способности клеток к захвату радиойода. Результатом анализа внутриклеточного распределения НИС стал вывод о том, что именно мембранная экспрессия белка отражает функциональную активность, а именно – способность к захвату ионов йода. Соответственно, задачей второго этапа был поиск метода определения мембранной экспрессии НИС в материале ТАБ на дооперационном этапе. В связи с этим нами была использована методика проточной цитофлуорометрии, которая позволяет определять белок, локализующийся на мембране. В то время как внутриклеточно локализованный белок, который является функционально неактивным, не

определяется. В литературе мы не нашли описания использования проточной цитофлюорометрии для выявления экспрессии НИС в материале ТАБ. В связи с этим нами была отработана методика определения НИС в материале ТАБ при высокодифференцированном раке щитовидной железы методом проточной цитофлюорометрии. Полученные данные были проанализированы для определения прогностической ценности НИС при папиллярном раке щитовидной железы.

3.2.1. Оценка среднего значения экспрессии НИС по группам

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

В первой группе пациентов (15 больных, чей объем лечения ограничился только оперативным вмешательством) уровень экспрессии НИС был максимальным и доходил до 11,6 %, средний же уровень экспрессии составил 6,2 % (Таб.18).

Таблица 18.

Характеристика экспрессии натрий – йодного симпортера у пациентов после оперативного вмешательства и без выявленного рецидива заболевания в срок наблюдения до 48 месяцев

	Всего
НИС менее 2 %	5
НИС более 2 %	7
НИС более 6 %	3
ВСЕГО	15

Во второй группе больных (18 пациентов без рецидива заболевания в срок наблюдения до 48 месяцев после оперативного вмешательства и радиойодтерапии) средний уровень экспрессии НИС первичной опухоли составил 4.9 % (Таб.19).

Таблица 19.

Характеристика экспрессии натрий – йодного симпортера у пациентов без рецидива заболевания в срок наблюдения до 48 месяцев после оперативного вмешательства и радиойодтерапии

	Всего
НИС менее 2 %	10
НИС более 2 %	3
НИС более 6 %	5
ВСЕГО	18

Наибольший интерес представляет третья группа больных – 10 пациентов с рецидивом заболевания после радиойодтерапии и оперативного вмешательства в

срок наблюдения до 48 месяцев. При оценке уровня экспрессии НИС первичной опухоли выявлено значительное снижение уровня экспрессии НИС в среднем до 1 % по данным проточного флюороцитометрического исследования (Таб. 20).

Таблица 20.

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

	Всего
НИС менее 1 %	6
НИС более 1 %	3
НИС более 2 %	1
ВСЕГО	10

Как видно из таблицы 60% пациентов с рецидивом заболевания имели уровень экспрессии НИС менее 1%.

Таким образом, полученные данные согласуются с результатами первого этапа работы. Наименьший средний уровень экспрессии НИС наблюдался в группе больных с рецидивом заболевания после радиойодтерапии ($p = 0.0028$) и критичным для развития рецидива явилось снижение уровня экспрессии НИС до 1% и ниже. Так, в первой группе больных, где не было рецидива и показаний к РЙТ, то есть стадия заболевания T1-2 N0 M0, уровень экспрессии НИС был максимальный и равнялся 6,2 %. Во второй группе, где были показания к РЙТ, но рецидива не последовало стадия (T1-4, N0-1, M0), уровень экспрессии НИС был ниже, но не достигал критического значения 1% и ниже. В третьей группе пациентов с рецидивом после РЙТ уровень экспрессии НИС был достоверно

самый низкий и в среднем не превышал 1%.

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

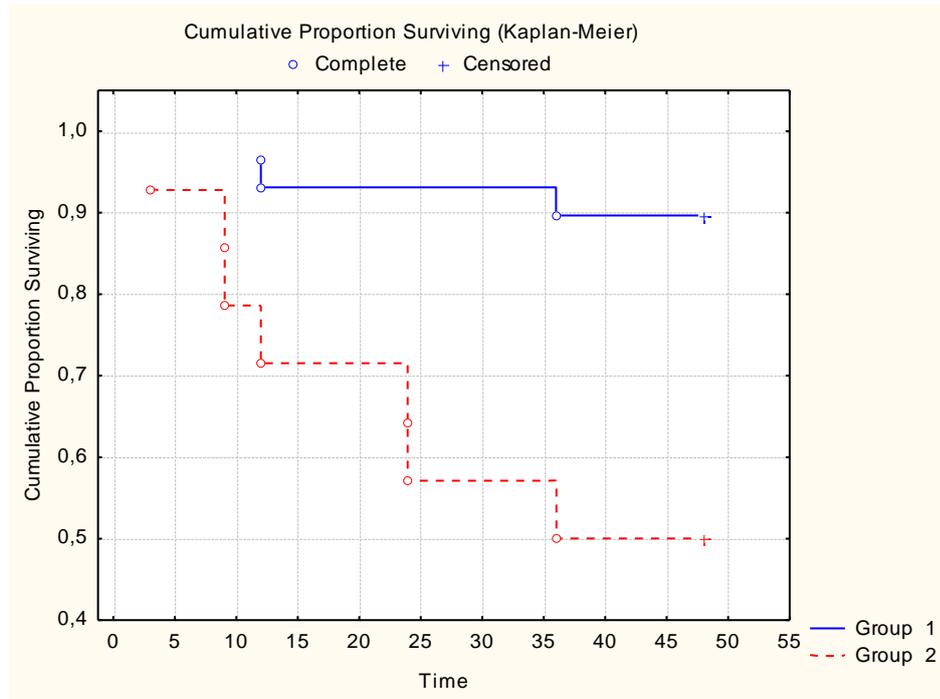
3.2.2. Влияние уровня экспрессии НИС на безрецидивную выживаемость пациентов с ВДРЦЖ

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

При построении кривых дожития Каплан-Мейера видно, что период безрецидивного выживания пациентов с уровнем экспрессии НИС менее 1 % достоверно ниже. График 8.

График 8.

Кривые безрецидивной выживаемости пациентов в зависимости от уровня экспрессии натрий-йодного симпортера



$p = 0.00392$. Группа 1 (синий) – натрий-йодный симпортер более 1 %; Группа 2 (красный) – уровень экспрессии натрий-йодного симпортера менее или равен 1 %;

Time - время до рецидива, измеренное в месяцах; *Cumulative proportional surviving* – кумулятивная выживаемость.

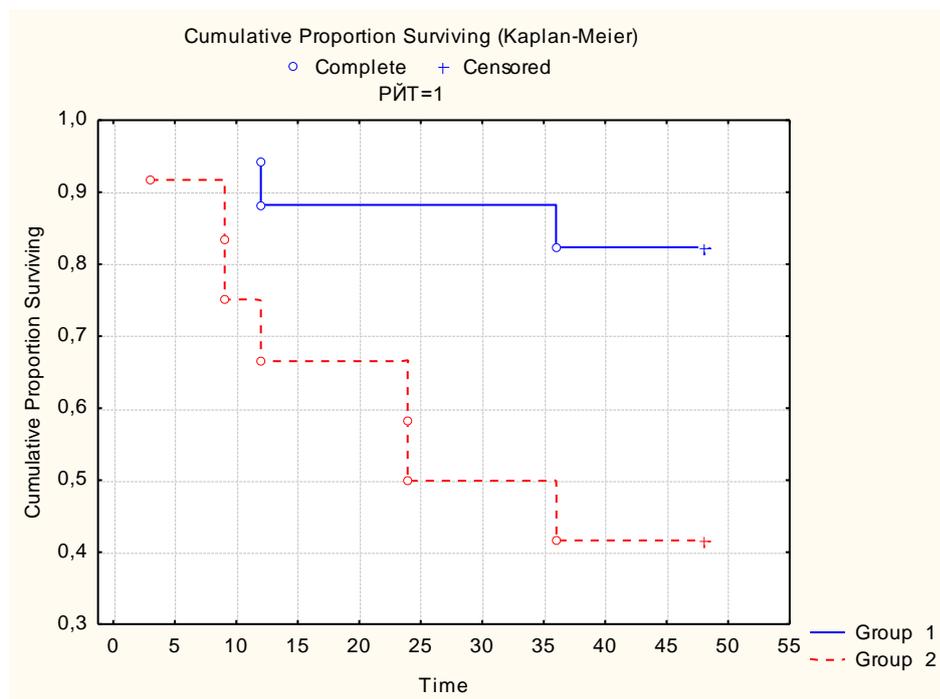
Таким образом, при проспективном анализе влияния уровня экспрессии НИС на безрецидивную выживаемость в группе больных с уровнем экспрессии НИС более 1 % рецидив заболевания развился лишь в 10 % случаев, тогда как в группе больных с уровнем экспрессии НИС менее 1 % частота рецидивов достигла 50 %. Следует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

Учитывая проспективный этап работы, мы доказали, что именно мембранная экспрессия НИС отвечает за количество реально функционирующего симпортера. Однако, для получения достоверного доказательства влияния

экспрессии НИС на чувствительность к радиоiodу, анализ безрецидивной выживаемости проведен изолированно в группах больных после получения лечебных доз I 131 в послеоперационном периоде. При составлении кривых безрецидивной выживаемости так же в двух группах больных – с уровнем экспрессии НИС менее и более 1 % - результаты аналогичны, результатам у всех пациентов. Т.е. у пациентов, с уровнем экспрессии НИС первичной опухоли менее 1 %, срок безрецидивной выживаемости после радиоiodтерапии значительно ниже, в сравнении с пациентами так же получивших РЙТ, но чей уровень экспрессии НИС был более 1 %. График 9.

График 9.

Кривые безрецидивной выживаемости пациентов после радиоiodтерапии в зависимости от уровня экспрессии натрий-йодного симпортера



Группа 1 (синий) – натрий-йодный симпортер более 1 %; Группа 2 (красный) – уровень экспрессии натрий-йодного симпортера менее или равен 1 %;

Time - время до рецидива, измеренное в месяцах; Cumulative proportional

surviving – количество пациентов (*100), указанное в %.

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

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

3.2.3. Изучение влияния BRAF на течение папиллярного высококодифференцированного рака щитовидной железы

Проведенное ранее на базе кафедры общей хирургии исследование, а также литературные данные, свидетельствуют о том, что наличие BRAF-мутации является прогностически неблагоприятным фактором для папиллярного рака щитовидной железы. В литературе встречаются данные о корреляции экспрессии НИС и наличия BRAF-мутации при папиллярном раке щитовидной железы. Мы

провели анализ влияния данных маркеров в проспективном исследовании.

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

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

Так, при изучении такого фактора агрессивности течения, как мультицентричность опухоли, были получены статистически значимая корреляция наличия BRAF мутации и билобарного поражения щитовидной железы. Таблица 21.

Таблица 21.

**Корреляция наличия BRAF мутации и мультицентричности
высокодифференцированного рака щитовидной железы**

P = 0.04019	Мультицентричности нет, чел	Мультицентричность есть, чел	Всего, чел
BRAF отрицательный	21 (100 %)	0 (0, 00 %)	21
BRAF	18	4	22

положительный	(81,82 %)	(18,18 %)	
Всего	39	4	43

Т.е. при выявлении мутации гена BRAF достоверно чаще встречается мультицентричное поражение щитовидной железы. Следует отметить, что в группу вошли и пациенты с «маленьким раком», у кого размер узлового образования не превышал 1.5 см. Данная тенденция сохраняется и для этой группы пациентов. Выполнение в случае «маленького рака» с BRAF-положительным статусом гемитиреоидэктомии (что считается возможным по ряду согласительных документов), приведет к персистенции высококодифференцированного рака щитовидной железы. В то время как выполненный первоначальный объем оперативного вмешательства будет неадекватным.

При определении влияния наличия BRAF мутации на еще один маркер агрессивности течения высококодифференцированного рака щитовидной железы, а именно наличие регионарных метастатических лимфатических узлов, так же получена статистически значимая корреляция ($p = 0.04397$). Таблица 22.

Таблица 22.

Корреляция наличия BRAF мутации и метастатического поражения регионарных лимфатических узлов

P = 0.04397	ЛУ без мтс, Чел	ЛУ с мтс, Чел	Всего, чел
BRAF отрицательный	13 (61,9 %)	8 (38.1 %)	21

BRAF	8	14	22
положительный	(36.4 %)	(63.6 %)	
Всего	21	22	43

ЛУ без мтс – лимфатические узлы не пораженные метастатическим процессом; ЛУ с мтс – лимфатические узлы пораженные метастатическим процессом.

Таким образом, в случае BRAF положительного статуса первичной опухоли в более чем половине случаев (63.6 %) следует ожидать наличия метастатических регионарных лимфатических узлов. Т.е. адекватным объемом оперативного лечения у этой группы пациентов будет считаться тиреоидэктомия с центральной лимфодиссекцией. Следует подчеркнуть, что в более чем половине случаев данная лимфодиссекция будет носить лечебный характер и не приведет к персистенции заболевания. В связи с отсутствием в современных клинических рекомендациях и согласительных документах четких критериев и показаний к выполнению профилактической центральной лимфодиссекции, данный вопрос всегда остаётся нерешенным. Таким образом, внедрение молекулярно-генетических маркеров, способных предсказать степень агрессивности течения ВДРЦЖ на дооперационном этапе в клиническую практику, позволит планировать объем оперативного лечения, который позволит минимизировать риск персистенции и рецидива заболевания.

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

Таблица 23.

Таблица 23.

Корреляция наличия BRAF мутации и рецидива папиллярного рака щитовидной железы

P = 0.42018	НЕТ РЕЦИДИВА	ЕСТЬ РЕЦИДИВ	Всего, чел
BRAF отрицательный	15 (71.4 %)	6 (28.6 %)	21
BRAF положительный	18 (81.8 %)	4 (18.2 %)	22
Всего, чел.	33	10	43

$P \geq 0.05$ – результат статистически незначим

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

Проведенное исследование возможности использования BRAF-мутации в качестве прогностического фактора при папиллярном раке щитовидной железы показало, что данный маркер является фактором риска агрессивного поведения опухоли. Агрессивность течения ВДРЩЖ, включающая такие характеристики, как мультицентричность и локорегионарное метастазирование статистически значимо коррелирует с наличием мутации гена BRAF. В тоже время данная мутация не коррелирует с развитием рецидива опухоли. То есть, необходим другой, дополнительный маркер, прогнозирующий риск рецидива опухоли. Как видно из вышеприведенных данных на рецидив заболевания и длительность безрецидивного выживания влияет уровень экспрессии НИС.

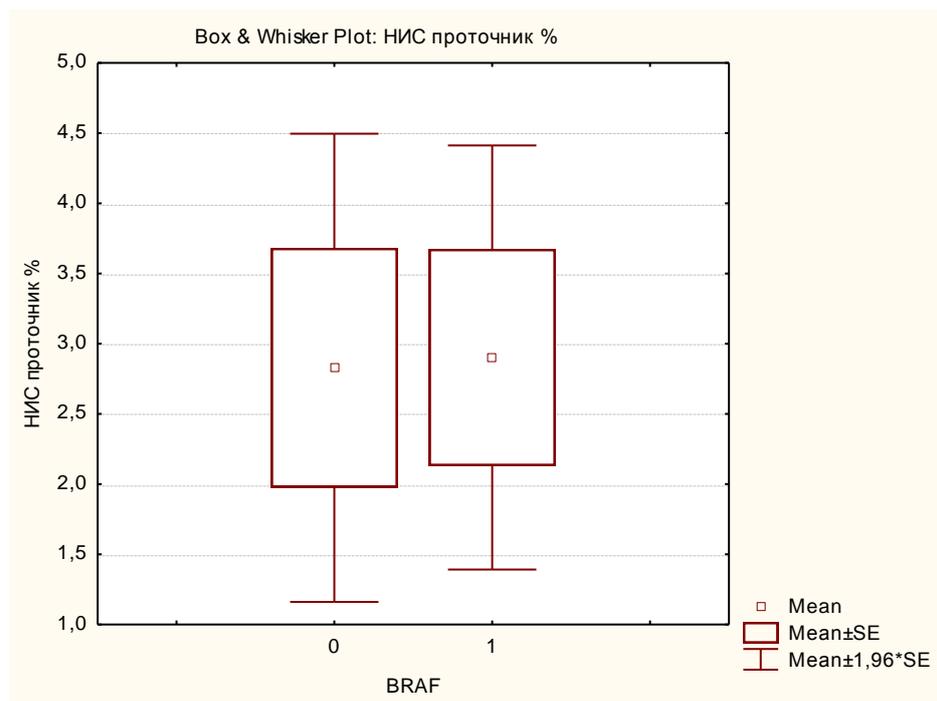
Таким образом, при выявлении BRAF положительной первичной опухоли адекватным объемом первичного оперативного лечения, по данным нашего исследования является тиреоидэктомия с центральной лимфодиссекцией. А так же при выявлении снижения уровня экспрессии НИС менее 1 % в первичной

опухоли, на наш взгляд, с целью профилактики рецидива заболевания и появления радиойодрезистентных форм заболевания обоснованным будет предложить выполнение профилактической центральной лимфодиссекции.

3.2.4. Влияние мутации гена BRAF на уровень экспрессии НИС

Следующим этапом нашей работы мы изучили влияние наличия мутации гена BRAF на уровень экспрессии НИС. При оценке количественной характеристики НИС (без разделения на группы более и менее 1 %) и корреляции с наличием мутации гена BRAF статистически значимых отличий не получено ($p = 0.9490$). График 9.

График 10.



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

Аналогичные данные сохраняются, если в качестве группирующего фактора применить уровень экспрессии НИС в 1 %. Таблица 24.

Корреляция наличия BRAF мутации и уровня экспрессии натрий – йодного симпортера

P = 0.44	НИС более 1 %, чел	НИС менее 1 %, чел	Всего, чел
BRAF отрицательный	13 (61.9 %)	8 (38.1 %)	21
BRAF положительный	16 (72.7 %)	6 (27.3 %)	22
Всего	29	14	43

Таким образом, вновь подтверждаются полученные нами на ретроспективном этапе данные, об отсутствии корреляции уровня экспрессии НИС на мембране клетки с наличием мутации гена BRAF. Соответственно, оба исследуемых маркера являются независимыми прогностическими факторами неблагоприятного течения высокодифференцированного рака щитовидной железы. Данные результаты диктуют необходимость совместного определения обоих маркеров на дооперационном этапе. Помимо этого, есть еще один аргумент в пользу использования обоих маркеров. BRAF-мутация характерна только для папиллярного рака щитовидной железы, в то время как экспрессия НИС может быть использована как при папиллярном, так и при фолликулярном раке, а также при низкодифференцированных формах рака щитовидной железы.

Таким образом, проведенное исследование показало, что исследуемые признаки агрессивности опухоли, такие как регионарные и отдаленные метастазы, мультицентричность, имеют прямую корреляционную зависимость с наличием

BRAF-мутации. Соответственно, в нашем исследовании подтверждается предположение, что BRAF-мутация является фактором неблагоприятного течения при папиллярном раке щитовидной железы.

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

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

ГЛАВА 4

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В последние годы в литературе появились данные об исследовании белка, ответственного за перенос йонов йода в клетках щитовидной железы. Интерес к изучению этого белка связан с его функциональными особенностями, а именно – способностью к переносу через клеточную мембрану йода. В норме в организме этот белок локализуется только в тиреоцитах и клетках лактирующей молочной железы. Уникальность в локализации и функциях этого белка вызывает интерес у ученых в связи с возможностью его использования в онкологии. В частности, активно исследуется его возможности в лечении радиоактивным йодом рака щитовидной железы. Исследования НИС носят в основном фундаментальный характер. Мы предприняли попытку на основании ИГХ-исследований и ретроспективного анализа выявить закономерности экспрессии НИС в норме и при различных заболеваниях щитовидной железы. Полученные данные позволили выполнить проспективное исследование по изучению возможности использования значения экспрессии НИС в практической онкологии. В настоящее время большой интерес представляет прогнозирование течения рака, в частности, рака щитовидной железы. Немаловажная роль отводится исследованиям молекулярно-генетических механизмов онкогенеза. Так, активно исследуется BRAF-мутация и ее связь с неблагоприятными формами рака щитовидной железы. Появились немногочисленные исследования по корреляции между мутацией гена BRAF и экспрессией НИС и их связи с агрессивным течением высокодифференцированного рака щитовидной железы. Однако разноречивый характер и немногочисленность работ требует проведения дальнейших исследований. Особый интерес представляет внедрение полученных данных в практическую деятельность.

Первым этапом нашей работы мы исследовали особенности экспрессии натрий-йодного симпортера в клетках щитовидной железы в норме и при

различных патологических состояниях. Для проведения работы мы выбрали иммуногистохимический метод исследования, который позволил не только оценить уровень экспрессии, но и изучить характер распределения изучаемого белка внутри клетки.

В работе было показано, что в нормальном тиреоците экспрессируемый белок локализуется в основном на клеточной мембране. Внутренние же компартменты клетки являются местом синтеза и транспорта белка и концентрация его в них незначительна. Количество клеток с мембранной экспрессией НИС достигало в среднем 50%. Данный факт совпадает с теоретическими рассуждениями о том, что белок НИС должен встраиваться в мембрану клетки для осуществления транспорта йонов йода в клетку. Внутренние компартменты клетки являются местом синтеза и транспорта НИС к мембране клетки, куда он встраивается и может выполнять свою функцию.

Далее мы исследовали экспрессию НИС при состояниях, сопряженных с тиреотоксикозом – болезнью Грейвса и узловым токсическим зобом. Тиреотоксикоз при этих состояниях сопровождается повышенным потреблением йода тиреоцитами, что подтверждается данными сцинтиграфии, где наблюдается повышенное накопление радиофармпрепарата. При исследовании захвата радиойода, определяется повышенный захват РФП. При ИГХ-исследовании экспрессии НИС при этих заболеваниях мы выявили, что симпортер локализовался в основном на клеточной мембране. Количество клеток с мембранной экспрессией белка было повышено, чем в ткани железы с нормальной функцией и достигало уровня 75%.

Мы исследовали экспрессию НИС в клетках фолликулярной аденомы щитовидной железы, представленных холодным узлом по данным сцинтиграфии. Уровень мембранной экспрессии НИС в этих опухолях был снижен. Количество клеток с мембранной экспрессией не превышало 15 – 20%.

Таким образом, в нашем исследовании было показано, что мембранная

экспрессия НИС является прямым индикатором способности ткани щитовидной железы к захвату радиойода. При увеличении мембранной экспрессии НИС имеет место повышенный захват йода, что подтверждается данными сцинтиграфии при болезни Грейвса и узлом токсическом зобе (токсическая аденома). Тогда как при снижении мембранной экспрессии НИС имеет место “холодный узел” по данным сцинтиграфии, то есть данный участок ткани щитовидной железы не захватывает РФП. Соответственно, оценивая мембранную экспрессию НИС мы можем прогнозировать способность ткани к захвату изотопов йода и, как следствие, чувствительность опухолевой ткани к лечению радиоактивным йодом.

При изучении экспрессии НИС в клетках ВДРЦЖ методом ИГХ были выявлены особенности перераспределения симпортера внутри опухолевой клетки. В отличие от данных литературы, в нашем исследовании было показано, что экспрессия НИС в раковых клетках не была снижена. Было выявлено преимущественное накопление белка внутри клетки, тогда как мембранная экспрессия была значительно снижена в сравнении с нормальной тканью. Полученные данные позволили сделать вывод о том, что внутриклеточная экспрессия НИС сохранена, нарушено встраивание белка в клеточную мембрану, что, по всей вероятности, происходит вследствие посттрансляционных нарушений. Данное изменение ведет к значительному уменьшению функциональной активности белка, в виду невозможности выполнения транспорта йода внутрь клетки. Но необходимо отметить, что наряду с опухолевыми клетками, проявившими максимальное накопление НИС во внутренних компартментах, имеются клетки с мембранной его экспрессией. Можно предположить, что чем выше дифференцировка опухоли, тем выше мембранная экспрессия НИС, тогда как при дедифференцировке опухоли происходит снижение функционально активного, расположенного на клеточной мембране, белка-переносчика йода. Таким образом, оценка экспрессии производилась именно по мембранной экспрессии НИС, что должно отражать именно функциональный потенциал опухолевой клетки к захвату радиоактивного

йода.

В нашем исследовании получены данные, что количество клеток с мембранной экспрессией НИС при высокодифференцированном раке щитовидной железы не превышал 10%. При исследовании экспрессии НИС по группам были получены следующие результаты. В группе пациентов, у которых заболевание протекало наиболее доброкачественно, их стадия заболевания не требовала лечения радиоiodом и при наблюдении до 60 месяцев не возникло рецидива, уровень экспрессии НИС был максимальный и в среднем равнялся 6,7%. В группе пациентов, которым потребовалось лечение радиоiodом, но рецидива в сроки до 60 месяцев не выявлено, уровень экспрессии НИС был ниже и равнялся 2,8%. В группе же пациентов с рецидивом заболевания после РЙТ уровень экспрессии был минимальным и равнялся 1%. Таким образом, на примере сравнения уровня экспрессии НИС по группам мы видим, что чем более агрессивное поведение имеет опухоль, тем ниже экспрессия симпортера. Соответственно, снижение уровня экспрессии НИС может служить маркером дедифференцировки опухоли.

Проведенное исследование показало, что более 60% пациентов с рецидивом заболевания имели уровень экспрессии НИС менее 1%. Критичным для развития рецидива явилось снижение уровня экспрессии НИС до 1%. Полученные данные позволяют предположить, что причиной рецидива у пациентов после РЙТ явилось снижение экспрессии НИС до 1% и ниже вследствие дедифференцировки опухоли, что послужило причиной резистентности к радиоiodу.

При оценке влияния уровня экспрессии НИС на развитие рецидива было показано, что у пациентов с уровнем экспрессии НИС менее 1% в первичной опухоли следует ожидать рецидива заболевания в срок до 48 месяцев с более высокой вероятностью. Обусловлено данное явление сниженной чувствительностью опухолевой клетки к РЙТ.

Было показано, что чем ниже уровень экспрессии НИС в первичной

опухоли щитовидной железы, тем вероятнее появление отдаленных метастазов, даже после выполнения РЙТ, выше. Данное явление вероятно связано с более глубокими процессами дедифференцировки опухолевых клеток, косвенным проявлением которого является экстремально сниженный уровень экспрессии НИС.

При оценке взаимосвязи между уровнем экспрессии НИС и стадией опухолевого процесса нами были получены статистически достоверные данные, что чем более распространен процесс, чем выше стадия, тем ниже уровень экспрессии НИС.

Уменьшение уровня экспрессии НИС клетками опухолевой ткани в зависимости от стадии опухолевого процесса еще раз подтверждает ранее высказанную гипотезу о НИС как чувствительном внутреннем маркере дедифференцировки опухоли. Таким образом, снижение экспрессии НИС может служить прогностическим маркером агрессивности течения опухолевого процесса.

При анализе влияния пола на уровень экспрессии НИС было показано, что мужской пол является фактором риска более низкой экспрессии НИС и, как результат, неблагоприятного течения высокодифференцированного рака щитовидной железы. Таким образом, имеющие в литературе данные об относительно более агрессивном течении высокодифференцированного рака щитовидной железы у мужчин, могут быть связаны с более низким уровнем экспрессии НИС и, в связи с этим, более низким ответом данной категории больных на РЙТ. Безрецидивная выживаемость мужчин статистически ниже безрецидивной выживаемости женщин. Этот факт еще раз подтверждает более агрессивное течение ВДРЦЖ у мужчин, что по нашим данным связано с достоверно более низким уровнем экспрессии НИС у пациентов мужского пола.

Следует отметить, что при проведении анализа зависимости уровня экспрессии НИС от возраста, статистически значимой корреляции не получено (р

= 0.9).

В задачи нашей работы входило исследование прогностической значимости мутации гена BRAF для высокодифференцированного рака щитовидной железы. Как известно, данная мутация характерна для папиллярного рака, особенно для агрессивных его форм и не встречается при фолликулярном раке. Мы исключили из статистического анализа пациентов с фолликулярным раком на этом этапе работы, что не сильно повлияло на численность исследуемых групп и статистическую достоверность, так как более 96 % высокодифференцированного рака представлено папиллярным раком.

В нашем исследовании в общей когорте пациентов встречаемость BRAF мутации равна 56,7 %, что согласуется с данными многочисленных метаанализов. При рассмотрении частоты выявления BRAF мутации по группам получены данные, что максимальная частота выявления мутации была в группе пациентов с рецидивом заболевания после РЙТ и доходила до 65 %. Следует отметить, что именно в этой группе пациентов по данным послеоперационной гистологической верификации определялись наиболее прогрессивные стадии заболевания. В группе больных, чей объем лечения ограничился только хирургическим, встречаемость BRAF мутации была достоверно ниже и составила 46,7 %. Таким образом, были получены достоверные доказательства влияния BRAF мутации на агрессивность течения опухолевого процесса.

Интересным оказался факт, что статистически значимого влияния наличия BRAF мутации на рецидив получено не было ($p = 0.68$). Данный результат говорит о необходимости дополнительного прогностического маркера, отражающего такую характеристику агрессивности течения заболевания, как рецидив рака.

В отличие от подавляющего большинства зарубежных исследований, нами не было выявлено зависимости уровня экспрессии НИС от наличия BRAF мутации ($p = 0.65$). Отсутствие корреляции между двумя исследуемыми

маркерами может говорить о том, что они участвуют в различных независимых молекулярных путях онкогенеза и нарушение встраивания в мембрану тироцита регулируется другими механизмами, не связанными с MAP-киназным путем.

Таким образом, в нашем исследовании мы доказали связь между BRAF-мутацией и агрессивным течением рака щитовидной железы, что подтверждает данные предыдущих исследований, в т.ч на базе кафедры общей хирургии. Проведенное исследование экспрессии НИС на ретроспективном материале показало, что экспрессия симпортера достоверно коррелирует со стадией заболевания, агрессивностью течения и безрецидивной выживаемостью. Соответственно, логичным кажется возможность использования НИС в качестве прогностического маркера. Однако корреляции между BRAF-мутацией и экспрессией НИС выявлено не было. Этот факт позволил нам сделать вывод, что изученные маркеры – BRAF-мутация и экспрессия НИС, могут быть использованы в качестве независимых прогностических маркеров течения высокодифференцированного рака щитовидной железы. Полученные результаты ретроспективного анализа послужили основанием для выполнения второго, проспективного этапа работы.

Соответственно, задачей второго этапа был поиск метода определения мембранной экспрессии НИС в материале ТАБ на дооперационном этапе. Для решения этой задачи нами была использована методика проточной цитофлюорометрии, которая позволяет определять белок, локализующийся на мембране. В то время как внутриклеточно локализованный белок, который является функционально неактивным, не определяется. В литературе мы не нашли описания использования проточной цитофлюорометрии для выявления экспрессии НИС в материале ТАБ. В связи с этим нами была отработана методика определения НИС в материале ТАБ при высокодифференцированном раке щитовидной железы методом проточной цитофлюорометрии. Полученные данные были проанализированы для определения прогностической ценности НИС при высокодифференцированном раке щитовидной железы.

При изучении экспрессии НИС в дооперационном материале высокодифференцированного рака мы так же получили снижение мембранной экспрессии НИС. Изучаемая когорта пациентов была разнородна по уровню экспрессии НИС, что также соответствовало данным, полученным на первом этапе нашей работы. Для изучения корреляции уровня экспрессии НИС в первичной опухоли и риском рецидива заболевания проведен анализ среднего значения уровня экспрессии НИС по группам.

В первой группе пациентов: 15 больных, чья стадия заболевания T1-2 N0 M0 и объем лечения ограничился только оперативным вмешательством -средний уровень экспрессии был максимальным и составил 6,2 %. Во второй группе больных (18 пациентов, где были показания к РЙТ, но рецидива не последовало стадия (T1-4, N0-1, M0) средний уровень экспрессии НИС первичной опухоли составил 4.9 %. Наибольший интерес представляет третья группа больных – 10 пациентов с рецидивом заболевания после радиойодтерапии и оперативного вмешательства в срок наблюдения до 48 месяцев. При оценке уровня экспрессии НИС первичной опухоли выявлено значительное снижение уровня экспрессии НИС в среднем до 1 % по данным проточного флюороцитометрического исследования. Эти данные сопоставимы с данными ретроспективного этапа исследования, что подтверждает возможность использования метода проточной цитофлюорометрии на дооперационном этапе. Т.е. наименьший средний уровень экспрессии НИС наблюдался в группе больных с рецидивом заболевания после радиойодтерапии ($p = 0.0028$) и критичным для развития рецидива явилось снижение уровня экспрессии НИС до 1% и ниже.

С целью определения прогностической значимости снижения уровня НИС была проанализирована зависимость уровня снижения НИС (определенного методом проточной цитофлюорометрии) с риском развития рецидива заболевания после выполнения РЙТ. При проспективном анализе влияния уровня экспрессии НИС на безрецидивную выживаемость в группе больных с экспрессией НИС более 1 %, рецидив заболевания развился лишь в 10 % случаев. Тогда как в группе

больных с уровнем экспрессии НИС менее 1 % частота рецидивов достигла 50 %. Следует отметить, что все пациенты с рецидивами заболевания прошли терапию радиоактивным йодом. Таким образом, получается, что в каждом втором случае при уровне экспрессии менее 1 % в первичной опухоли в срок до 48 месяцев мы можем ожидать рецидива заболевания после выполнения РЙТ.

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

Ранее на базе кафедры общей хирургии было проведено исследование влияния мутации гена BRAF на течение папиллярного рака щитовидной железы, так же ретроспективный этап работы включает исследование данного генетического события и его влияния на уровень экспрессии НИС. Полученные данные, свидетельствуют о том, что наличие BRAF-мутации является прогностически неблагоприятным фактором для папиллярного рака щитовидной железы. При анализе современной литературы встречаются данные о корреляции экспрессии НИС и наличия BRAF-мутации при папиллярном раке щитовидной железы, однако на ретроспективном этапе нашего исследования эти данные были опровергнуты.

Таким образом, на проспективном этапе работы с целью оценки влияния мутации гена BRAF на течение папиллярного рака щитовидной железы были проанализированы следующие признаки агрессивного течения опухолевого процесса: мультицентричность, регионарное метастазирование и рецидив, а также оценена корреляционная связь экспрессии НИС и наличия мутации гена BRAF.

Так, при изучении такого фактора агрессивности течения, как мультицентричность опухоли, были получены статистически значимая корреляция наличия BRAF мутации и билобарного поражения щитовидной железы. Данная тенденция сохраняется и для «маленького» рака щитовидной железы с размером узлового образования до 1.5 см. Т.е. выполнение в случае BRAF положительного «маленького» рака гемитиреоидэктомии, что по данным ряда согласительных документов и рекомендаций тактически оправдано, может привести к персистенции и закономерному рецидиву заболевания.

При определении влияния наличия BRAF мутации на еще один маркер агрессивности течения высокодифференцированного рака щитовидной железы, а именно наличие регионарных метастатических лимфатических узлов, так же получена статистически значимая корреляция. В нашем исследовании в случае BRAF положительного статуса первичной опухоли в более чем половине случаев (63.6 %) выявлены метастатические регионарные лимфатические узлы (лимфоузлы центральной группы). Т.е. адекватным объемом оперативного лечения у этой группы пациентов будет считаться тиреоидэктомия с центральной лимфодиссекцией. Следует подчеркнуть, что в более чем половине случаев данная лимфодиссекция носит лечебный характер и позволит избежать персистенции заболевания. В связи с отсутствием в современных клинических рекомендациях и согласительных документах четких критериев и показаний к выполнению профилактической центральной лимфодиссекции, данный вопрос носит дискуссионный характер, а поиск подходов к его решению является приоритетной задачей современной хирургической тиреодологии. Таким образом,

внедрение молекулярно-генетических маркеров, способных предсказать степень агрессивности течения ВДРЩЖ на дооперационном этапе в клиническую практику, позволит планировать объем оперативного лечения, который позволит минимизировать риск персистенции и рецидива заболевания.

Интересными являются данные об отсутствии влияния BRAF мутации на рецидив заболевания, в т.ч. после выполнения РЙТ, полученные как на проспективном, так и на ретроспективном этапах работы. То есть, необходим другой, дополнительный маркер, прогнозирующий риск рецидива опухоли. Как видно из вышеприведенных данных на рецидив заболевания и длительность безрецидивного выживания влияет уровень экспрессии НИС.

Следующим этапом нашей работы было изучено влияние наличия мутации гена BRAF на уровень экспрессии НИС на проспективном материале. Полученные нами данные вновь подтверждают отсутствие корреляции уровня экспрессии НИС на мембране клетки с наличием мутации гена BRAF, как и на ретроспективном этапе работы. Соответственно, оба исследуемых маркера являются независимыми прогностическими факторами неблагоприятного течения высокодифференцированного рака щитовидной железы. Данные результаты диктуют необходимость совместного определения обоих маркеров на дооперационном этапе. Помимо этого, есть еще один аргумент в пользу использования обоих маркеров. BRAF-мутация характерна только для папиллярного рака щитовидной железы, в то время как экспрессия НИС может быть использована как при папиллярном, так и при фолликулярном раке, а также при низкодифференцированных формах рака щитовидной железы.

Таким образом на основании нашего исследования возможно предложить следующую хирургическую тактику: при выявлении BRAF положительной первичной опухоли адекватным объемом первичного оперативного лечения является тиреоидэктомия с центральной лимфодиссекцией; а так же при выявлении снижения уровня экспрессии НИС менее 1 % в первичной опухоли, на

наш взгляд, с целью профилактики рецидива заболевания и появления радиойодрезистентных форм заболевания обоснованным будет выполнение профилактической центральной лимфодиссекции.

ВЫВОДЫ.

1. Способность тиреоцитов к захвату йода определяется уровнем именно мембранной экспрессии НИС, и уровень экспрессии НИС значительно снижается при ВДРЦЖ, и критическим в развитии рецидива заболевания после выполнения РЙТ является снижение менее 1 %.
2. Определение уровня снижения экспрессии НИС может быть использовано в качестве прогностического маркера рецидива после проведения РЙТ, и для количественной оценки мембранной экспрессии НИС на дооперационном этапе целесообразно использование проточной флюороцитометрии.
3. Выявление мутации гена BRAF и снижения уровня экспрессии НИС менее 1 % являются независимыми факторами риска агрессивного течения высокодифференцированного рака щитовидной железы и с целью формирования на дооперационном этапе группы высокого риска рецидива/персистенции заболевания целесообразно определение наличия мутации гена BRAF и уровня экспрессии НИС.
4. Адекватным объемом оперативного вмешательства для пациентов с BRAF положительным статусом первичной опухоли или снижением уровня экспрессии НИС менее 1 % является тиреоидэктомия с профилактической центральной лимфодиссекцией.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Всем пациентам с ВДРЩЖ показано дооперационное определение уровня экспрессии НИС и наличия мутации гена BRAF
2. При планировании объема хирургической лечения ВДРЩЖ необходимо основываться на результатах дооперационных методов обследования и принятых стандартах лечения
3. При выявлении мутации гена BRAF и снижения уровня экспрессии НИС менее 1% адекватным объемом оперативного вмешательства будет выполнение тиреоидэктомии с профилактической центральной лимфодиссекцией.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.

АТА – Американская Тиреодологическая Ассоциация;

ВДРЦЖ – высокодифференцированный рак щитовидной железы

ИГХ – иммуногистохимическое исследование;

ИЦХ – иммуноцитохимическое исследование;

КТ – компьютерная томография;

МРТ – магнитно-резонансная томография;

НИС – натрий йодный симпортер

ПЦР – полимеразная цепная реакция

РЙ – радиоiod (131 I)

РЙТ – радиоiod терапия

РЦЖ – рак щитовидной железы;

ТАБ – тонкоигольная аспирационная биопсия;

ЩЖ – щитовидная железа;

Список литературы

1. Агеев И.С., Минкин А.У., Копылов В.И. Доброкачественные образования и рак щитовидной железы // Вопросы онкологии.- 1987.- №2.- С.106-107. – 33
2. Алубаев С.А., Лукьянов С.В., Парзян Ф.Г., Светова Э.В. Результаты применения гемитиреоидэктомии при лечении больных дифференцированным раком щитовидной железы // Рак щитовидной железы: современные принципы диагностики и лечения. Материалы Международного научного форума.- Санкт-Петербург.- 2009.- С.10-11 – 39
3. Берштейн Л.М. Рак щитовидной железы: эпидемиология, эндокринология, факторы и механизмы канцерогенеза. Практическая онкология 2007. Т. 8, № 1 – 143
4. Бондаренко О.О., Шпонка И.С., Шпонка В.И. Экспрессия Na⁺/I⁻-симпортера в новообразованиях щитовидной железы: иммуногистохимическое исследование. Морфология. 2009. Т. III. № 1. С.28-31. – 139
5. Бубнов А.Н., Кузмичев А.С., Гринева Е.Н., Трунин Е.М. Узловой зоб. Диагностика. Тактика лечения: Пособие для врачей.- СПб.- 1997.- 95с. - 31
6. Буравлева Е., Малахина Е., Храпов Е., Филипенко М., Шевченко С., Лифшиц Г. Частота мутации гена BRAFV600E (T1799A) при папиллярном раке щитовидной железы в сибирском регионе России. Вестник РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН. 2009. Т. 20. № S2. С. 9-10. – 141
7. Валдина Е.А. Заболевания щитовидной железы: Руководство. 3-е изд. СПб. - Питер.- 2006.- 368с. - 29
8. Валдина Е.А., Архипова Л.И. Вопросы диагностики и лечения больных раком щитовидной железы // Вопросы онкологии. -1987.-№6.- С.111-113 - 28
9. Вырупаев С.В. О раке щитовидной железы и лимфогенных метастазах в легкие // Рак щитовидной железы: современные принципы диагностики и лечения. Материалы Международного научного форума - Санкт-Петербург. - 2009.- С.38-39 – 38
10. Давыдов М.И., Аксель Е.М. Статистика злокачественных новообразований в России и странах СНГ в 2005 году // Вестник РОНЦ им.Н.Н. Блохина РАМН. - 2007.- Т.18.- №2 (приложение 1).- 156с. - 30
11. Диагностика и лечение дифференцированного рака щитовидной железы. Национальные клинические рекомендации, принятые на IX Российском

- онкологическом конгрессе и IV Всероссийском тиреодологическом конгрессе // Эндокринная хирургия - май 2008.- №1[2].- С.3-5 – 37
12. Кирс Е.Ю., Лифшиц Г.И., Малахина Е.С., Филипченко М.Л., Шевченко С.П., Карпинская Е.В. Определение мутации гена BRAF в дооперационной диагностике папиллярного рака щитовидной железы. Вестник Новосибирского государственного университета. Серия: Биология, клиническая медицина. 2011. Т. 9. № 3. С. 119-123. – 142
 13. Клинические рекомендации. Онкология/ под ред. В.И. Чиссова, С.Л. Дарьяловой - М.: ГЭОТАР- Медиа, 2006, 720с – 35
 14. Клинические рекомендации. Онкология/ под ред. В.И. Чиссова, С.Л. Дарьяловой - М.: ГЭОТАР- Медиа, 2006, 720с – 36
 15. Пат. № 2548783 Российская Федерация, МПК G 01 N 33/50. Способ дооперационного определения объема хирургического лечения высококодифференцированного рака щитовидной железы [Текст] / Семенов Д.Ю., Борискова М.Е., Колоскова Л.Е., Фарафонова У.В.; заявитель и патентообладатель ГБОУ ВПО ПСПБГМУ им. акад. Павлова. - № 2014121906/15; заявл. 29.05.2014; опубл. 20.04.15, Бюл. № 11 – 10с. - 149
 16. Поташов Л.В., Фигурин Т.Д., Сечкарева В.Н., Точильников Г.В. Особенности клинического течения и хирургической тактики при заболеваниях щитовидной железы у мужчин // Ученые записки СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова. - 2002. - Т.9. - №2. - С.83-86. - 32
 17. Состояние онкологической помощи населению России в 2010 году // Федеральное государственное учреждение «Московский научно-исследовательский онкологический институт им. П.А. Герцена» Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации, Российский Центр информационных технологий и эпидемиологических исследований в области онкологии, под редакцией В.И. ЧИССОВА, В.В. СТАРИНСКОГО, Г.В. ПЕТРОВОЙ. Москва, 2014г - 01
 18. Состояние онкологической помощи населению России в 2011 году // Федеральное государственное учреждение «Московский научно-исследовательский онкологический институт им. П.А. Герцена» Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации, Российский Центр информационных технологий и эпидемиологических исследований в области онкологии, под редакцией В.И. ЧИССОВА, В.В. СТАРИНСКОГО, Г.В. ПЕТРОВОЙ. Москва, 2010г - 02
 19. Точильников Г.В. Особенности клинического течения заболеваний щитовидной железы у мужчин и их хирургическое лечение: Автореф. дис. канд. мед. наук.-СПб., 2004.- 15с. – 34

20. Черников Р.А., Павлова И.Е., Воробьев С.Л., Семенов А.А., Слепцов И.В., Чинчук И.К., Макарьин В.А., Куляш А.Г., Успенская А.А., Тимофеева Н.И., Новокшенов К.Ю., Карелина Ю.В., Федоров Е.А., Федотов Ю.Н., Бубнов А.Н. Прогностическая ценность BRAFV600E у пациентов с папиллярной карциномой щитовидной железы. Вестник Санкт-Петербургского университета. Серия 11: Медицина. 2014. № 2. С. 146-153. – 140
21. Abubaker J, Jehan Z, Bavi P, Sultana M, Al-Harbi S, Ibrahim M, Al-Nuaim A, Ahmed M, Amin T, Al-Fehaily M, Al-Sanea O, Al-Dayel F, Uddin S, Al-Kuraya KS. Clinicopathological analysis of papillary thyroid cancer with PIK3CA alterations in a Middle Eastern population. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008 Feb; 93(2):611-8 – 90
22. Adeniran A. J. Et al. Correlation between genetic alterations and microscopic features, clinical manifestations, and prognostic characteristics of thyroid papillary carcinomas. *Am. J. Surg. Pathol.* 2006 v.30, 216–222 – 76
23. Ahn D, Sohn JH, Park JY. Surgical complications and recurrence after central neck dissection in cN0 papillary thyroid carcinoma. *Auris Nasus Larynx.* 2014 Feb;41(1):63-8. 05
24. Baloch ZW, LiVolsi VA. Review Microcarcinoma of the thyroid. *Adv Anat Pathol.* 2006 Mar; 13(2):69-75 – 56
25. Barollo S., Pennelli G., Vianello F., Fernando S. and all. BRAF in primary and recurrent papillary thyroid cancers: the relationship with 131I and 2-[18F] fluoro-2-deoxy-D-glucose uptake ability. *Eur J Endocrinol* October 1, 2010. P.659-663 – 130
26. Bonnet S, Hartl D, Leboulleux S, et al. Prophylactic Lymph Node Dissection for Papillary Thyroid Cancer Less than 2 cm: Implications for Radioiodine Treatment. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008 v.32 p/552 -556 – 52
27. Cancer of The Thyroid - SEERStatFactSheets, доступно на сайте с 10.12.2012г <http://seer.cancer.gov/statfacts/html/thyro.html> - 18
28. Castro MR, Bergert ER, Goellner JR, Hay ID, Morris JC. Immunohistochemical analysis of sodium iodide symporter expression in metastatic differentiated thyroid cancer: correlation with radioiodine uptake. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001 Nov;86(11):5627-32. - 10M. P. Curado, B. Edwards, H. R. Shinetal., *Cancer Incidence in Five Continents*, vol. 9 of IARC Scientific Publications, No. 160, IARC, Lyon, France, 2007. - 10
29. Castro MR, Bergert ER, Goellner JR, Hay ID, Morris JC. Immunohistochemical analysis of sodium-iodide symporter expression in metastatic differentiated thyroid cancer: correlation with radioiodine uptake. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001 Nov;86(11):5627-32 – 131

30. Castro, P. et al. PAX8-PPARgamma rearrangement is frequently detected in the follicular variant of papillary thyroid carcinoma. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2006 v.91, 213–220 - 110
31. Chung JK, Cheon GJ. Radioiodine therapy in differentiated thyroid cancer: the first targeted therapy in oncology. *Endocrinol Metab (Seoul)*. 2014 Sep;29(3):233-9. – 144
32. Cohen, Y. et al. BRAF mutation in papillary thyroid carcinoma. *J. Natl Cancer Inst* 2003 v.95, p.625–627 – 81
33. Curado M. P., B. Edwards, H. R. Shin et al., *Cancer Incidence in Five Continents*, vol. 9 of IARC Scientific Publications, No. 160, IARC, Lyon, France, 2007 – 11
34. D Giordano, P Gradoni, G Oretti, E Molina, T Ferri. Treatment and prognostic factors of papillary thyroid microcarcinoma. *ClinOtolaryngol*. 2010 Apr ;35 (2):118-24 – 58
35. D'Agostino M, Sponziello M, Puppini C, Celano M, Maggisano V, Baldan F, Biffoni M, Bulotta S, Durante C, Filetti S, Damante G, Russo D. Different expression of TSH receptor and NIS genes in thyroid cancer: role of epigenetics. *J Mol Endocrinol*. 2014 v.30; 52(2):121-31 – 136
36. Dai G, Levy O, Carrasco N. Cloning and characterization of the thyroid iodide transporter. *Nature* 1996 v.379:458–460 – 114
37. David S. Cooper, Gerard M. Doherty, Bryan R. Haugen, Richard T. Kloos, Stephanie L. Lee, Susan J. Mandel, Ernest L. Mazzaferri, Bryan McIver, Furio Pacini, Martin Schlumberger, Steven I. Sherman, David L. Steward, R. Michael Tuttle. Revised American Thyroid Association Management Guidelines for Patients with Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer. *Thyroid*. Volume 19, Number 11, 2009 – 46
38. Dohan O, De la Vieja A, Paroder V, Riedel C, Artani M, Reed M, et al. The sodium/iodide symporter (NIS): characterization, regulation, and medical significance. *Endocr Rev* 2003; v.24:48-77 – 113
39. Durante C., E. Puxeddu, E. Ferretti, R. Morisi, S. Moretti, R. Bruno, F. Barbi, N. Avenia, A. Scipioni, A. Verrienti, E. Tosi, A. Cavaliere, A. Gulino, S. Filetti and D. Russo BRAF Mutations in Papillary Thyroid Carcinomas Inhibit Genes Involved in Iodine Metabolism. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* July 1, 2007 vol. 92 no. 7 2840-2843 – 138
40. Dwight, T. et al. Involvement of the PAX8/peroxisome proliferator-activated receptor gamma rearrangement in follicular thyroid tumors. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2003 v.88, 4440–4445 - 108.
41. Elisei R, Ugolini C, Viola D, Lupi C, Biagini A, Giannini R, Romei C, Miccoli P, Pinchera A, Basolo F. BRAF(V600E) mutation and outcome of patients with papillary thyroid carcinoma: a 15-year median follow-up study. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008 Oct;93(10):3943-9. - 06

42. Enewold L., K. Zhu, E. Ron et al., "Rising thyroid cancer incidence in the United States by demographic and tumor characteristics, 1980–2005," *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, vol. 18, no. 3, pp. 784–791, 2009 - 16
43. Enewold L., K. Zhu, E. Ron et al., "Rising thyroid cancer incidence in the United States by demographic and tumor characteristics, 1980–2005," *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, vol. 18, no. 3, pp. 784–791, 2009 - 26
44. Eng P, Cardona GR, Fang SL, Previti M, Alex S, Carrasco N et al. Escape from the acute Wolff-Chaikoff effect is associated with a decrease in thyroid sodium/iodide symporter messenger ribonucleic acid and protein. *Endocrinology* 1999; v.140: p.3404-10 – 119
45. Ezzat, S. et al. Prevalence of activating ras mutations in morphologically characterized thyroid nodules. *Thyroid* 1996 v.6, p.409–416 - 78.
46. Frattini, M. et al. Alternative mutations of BRAF, RET and NTRK1 are associated with similar but distinct gene expression patterns in papillary thyroid cancer. *Oncogene* 23, 7436–7440, 2004 – 75
47. French C. A. et al. Genetic and biological subgroups of low-stage follicular thyroid cancer. *Am. J. Pathol.* 2003 v.162, 1053–1060 - 107.
48. Fujiwara H, Tatsumi K, Miki K, Harada T, Okada S, Nose O, et al. Recurrent T354P mutation of the Na⁺/I⁻ symporter in patients with iodide transport defect. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; v.83(8):2940-3 – 117
49. Furlanetto TW, Nguyen LQ, Jameson JL. Estrogen increases proliferation and down-regulates the sodium/iodide symporter gene in FRTL-5. *Endocrinology* 1999;140:5705-11 – 120
50. Galvão AL, Camargo RY, Friguglietti CU, Moraes L, Cerutti JM, Serrano-Nascimento C, Suzuki MF, Medeiros-Neto G, Rubio IG. Hypermethylation of a New Distal Sodium/Iodide Symporter (NIS) enhancer (NDE) is associated with reduced NIS expression in thyroid tumors. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014; v.99(6):p.944-52 – 133
51. Gao WL, Wie LL, Chao YG, Wie L, Song TL. Prognostic prediction of BRAF (V600E) and its relationship with sodium iodide symporter in classic variant of papillary thyroid carcinomas. *Clin Lab.* 2012; 58:919-926 – 67
52. Gao WL, Wie LL, Chao YG, Wie L, Song TL. Prognostic prediction of BRAF(V600E) and its relationship with sodium iodide symporter in classic variant of papillary thyroid carcinomas. *Clin Lab.* 2012; v.58(9-10):919-26 – 129
53. Garcilaso Riesco-Eizaguirre, Pilar Santisteban. A perspective view of sodium iodide symporter research and its clinical implications. *European Journal of Endocrinology* 2006. V.155 495–512. - 09

54. Gómez Sáez JM Diagnostic and prognostic markers in differentiated thyroid cancer. *Curr Genomics*. 2011 Dec;12(8):597-608 – 104
55. Gregory Powell, J. et al. The PAX8/PPARgamma fusion oncoprotein transforms immortalized human thyrocytes through a mechanism probably involving wild-type PPARgamma inhibition. *Oncogene* 2004 v.23, 3634–3641 – 106
56. Grodski S., T. Brown, S. Sidhu et al., “Increasing incidence of thyroid cancer is due to increased pathologic detection,” *Surgery*, vol. 144, no. 6, pp. 1038–1043, 2008. - 19
57. Grogan RH, Kaplan SP, Cao H, Embia O, Weiss RE, Simon C, Degroot L, Angelos P, Kaplan EL, Brown RL. 27 year follow-up of patients with papillary thyroid cancer: the importance of a long-term study. Presented at American Association of Endocrine Surgeons. 34th Annual Meeting, 2013 – 62
58. Grogan RH, Kaplan SP, Cao H, Embia O, Weiss RE, Simon C, Degroot L, Angelos P, Kaplan EL, Brown RL. 27 year follow-up of patients with papillary thyroid cancer: the importance of a long-term study. Presented at American Association of Endocrine Surgeons. 34th Annual Meeting, 2013 – 72
59. Harach H. R., K. O. Franssila, and V. M. Wasenius, “Occult papillary carcinoma of the thyroid. A “normal” finding in Finland. A systematic autopsy study,” *Cancer*, vol. 56, no. 3, pp. 531–538, 1985. - 23
60. Hay I.D., McConahey W.M., Goellner J.R. Managing patients with papillary thyroid carcinoma: insights gained from the Mayo Clinic’s experience of treating 2512 consecutive patients during 1940 through 2000.// *TransAmLinClinAssoc.*- 2002.- V.113.- P.241-260 – 40
61. Hay ID, Bergstralh EJ, Goellner JR, Ebersold JR, Grant CS Predicting outcome in papillary thyroid carcinoma: development of a reliable prognostic scoring system in a cohort of 1779 patients surgically treated at one institution during 1940 through 1989. *Surgery* 1993 v.114:1050–1057 – 43
62. Henderson YC, Shellenberger TD, Williams MD, El-Naggar AK, Fredrick MJ, Cieply KM, Clayman GL. High rate of BRAF and RET/PTC dual mutations associated with recurrent papillary thyroid carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2009 Jan 15;15(2):485-91 – 95
63. Hollenbeak CS, Boltz MM, Schaefer EW, Saunders BD, Goldenberg D. Recurrence of differentiated thyroid cancer in the elderly. *Eur J Endocrinol*. 2013; 168:549-556 – 61
64. Holler T, Theriault J, Payne RJ, Clark J, Eski S, Freeman JL. Prognostic factors in patients with multiple recurrences of well-differentiated thyroid carcinoma. *J Oncol*. 2009; 2009:650340 – 66

- 65.Hsieh SH, Chen ST, Hsueh C, Chao TC, Lin JD. Gender-Specific Variation in the Prognosis of Papillary Thyroid Cancer TNM Stages II to IV. *Int J Endocrinol.* 2012 V.37, p 90-97 – 70
- 66.Ito Y and all. BRAF mutation in papillary thyroid carcinoma in a Japanese population: its lack of correlation with high-risk clinicopathological features and disease-free survival of patients. *EndocrJ.* 2009; v.56(1):89-97 – 84
- 67.Ito Y, Kudo T, Kobayashi K, Miya A, Ichihara K, Miyauchi A. Prognostic factors for recurrence of papillary thyroid carcinoma in the lymph nodes, lung, and bone: analysis of 5,768 patients with average 10-year follow-up. *World J Surg.* 2012 Jun;36(6):1274-8 – 71
- 68.Ito Y, Miyauchi A, Ito M, Yabuta T, Masuoka H, Higashiyama T, Fukushima M, Kobayashi K, Kihara M, Miya A. Prognosis and prognostic factors of differentiated thyroid carcinoma after the appearance of metastasis refractory to radioactive iodine therapy. *Endocr J.* 2014 Vol. 61 (2014) No. 8 p. 821-824 – 69
- 69.Ito Y, Tomoda C, Uruno T, et al. Clinical significance of metastasis to the central compartment from papillary microcarcinoma of the thyroid. *World J Surg.* 2006;30:91–9 – 51
- 70.Ito Y, Uruno T, Nakano K, Takamura Y, Miya A, Kobayashi K, Yokozawa T, Matsuzuka F, Kuma S, Kuma K, Miyauchi A. An observation trial without surgical treatment in patients with papillary microcarcinoma of the thyroid. *Thyroid.* 2003 Apr; 13(4):381-7 – 57
- 71.Ito Y. and A. Miyauchi, “Is surgery necessary for papillary thyroid microcarcinomas?” *Nature Reviews Endocrinology*, vol.8, no. 1, p. 9, 2012. – 25
- 72.Jemal A., R. Siegel, J. Xu, and E. Ward, “Cancer statistics, 2010,” *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, vol. 60, no. 5, pp. 277–300, 2010 - 13;
- 73.Joo JY, Park JY, Yoon YH, Choi B, Kim JM, Jo YS, Shong M, Koo BS. Prediction of occult central lymph node metastasis in papillary thyroid carcinoma by preoperative BRAF analysis using fine-needle aspiration biopsy: a prospective study. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012 v.97(11):3996-4003 – 87
- 74.Kaminsky S.M., Levy O., Salvador C., Dai G., Carrasco N. Na⁺/I symporter activity is present in membrane vesicles from thyrotropin –deprived non-I-transport in cultured thyroid cells. *ProcNatlAcadSciUSA* 1994;91:3789-93 – 118
- 75.Kebebew E, Weng J, Bauer J, Ranvier G, Clark OH, Duh QY, Shibus D, Bastian B, Griffin A. The prevalence and prognostic value of BRAF mutation in thyroid cancer. *Ann Surg.* 2007 Sep;246(3):466-70 – 92
- 76.Kent W. D. T., S. F. Hall, P. A. Isotalo, R. L. Houlden, R. L. George, and P. A. Groome, “Increased incidence of differentiated thyroid carcinoma and

- detection of subclinical disease,” *Canadian Medical Association Journal*, vol. 177, no. 11, pp. 1357–1361, 2007 – 17
77. Kilfoy B. A., T. Zheng, T. R. Holford et al., “International patterns and trends in thyroid cancer incidence, 1973–2002,” *Cancer Causes and Control*, vol. 20, no. 5, pp. 525–531, 2009. - 15
78. Kim KJ, Kim SM, Lee YS, Chung WY, Chang HS, Park CS. Prognostic Significance of Tumor Multifocality in Papillary Thyroid Carcinoma and its Relationship with Primary Tumor Size: A Retrospective Study of 2,309 Consecutive Patients. *Ann Surg Oncol*. 2014 Aug 5. - 03
79. Kim T. H., Young Joo Park, Jung Ah Lim, Hwa Young Ahn, Eun Kyung Lee, You Jin Lee, Kyung Won Kim, Seo Kyung Hahn, Yeo Kyu Youn, Kwang Hyun Kim, Bo Youn Cho, Do Joon Park. The association of the BRAFV600E mutation with prognostic factors and poor clinical outcome in papillary thyroid cancer. A meta-analysis. *Cancer*. 2012 Vol.118, Issue 7, pages 1764–1773 – 102
80. Kim TY, Kim WB, Song JY, Rhee YS, Gong G, Cho YM, Kim SY, Kim SC, Hong SJ, Shong YK. The BRAF mutation is not associated with poor prognostic factors in Korean patients with conventional papillary thyroid microcarcinoma. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2005 Nov;63(5):588-93 – 99
81. Kimura, E. T. et al. 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. *Cancer Res*. 2003 v.63, 1454–1457 – 74
82. Kouvaraki MA, Shapiro SE, Fornage BD, et al. Role of preoperative ultrasonography in the surgical management of patients with thyroid cancer. *Surgery*. 2003;v.134:946–54 – 49
83. Kroll, T. G. et al. PAX8-PPARGgamma1 fusion oncogene in human thyroid carcinoma [corrected]. *Science* 2000 v.289, 1357–1360 - 105.
84. Lakshmanan A, Scarberry D, Shen DH, Jhiang SM. Modulation of sodium iodide symporter in thyroid cancer. *Horm Cancer*. 2014 Dec;5(6):363-73 – 145
85. Lee JH, Lee ES, Kim YS. Clinicopathologic significance of BRAF V600E mutation in papillary carcinomas of the thyroid: a meta-analysis. *Cancer*. 2007 Jul 1;110(1):38-46 - 85
86. Levy O, Dai G, Riedel C, Ginter CS, Paul EM, Lebowitz AN, et al. Characterization of the thyroid Na⁺/I⁻ symporter with an anti-COOH terminus antibody. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; v.94:5568-73 – 115
87. Levy O, De la Vieja A, Ginter CS, Riedel C, Dai G, Carrasco N. N-linked glycosylation of the thyroid Na⁺/I⁻ symporter (NIS). Implications for its secondary structure model. *J Biol Chem* 1998; v.273:22657-63 – 116

88. Lima LP, Barros IA, Lisboa PC, Araújo RL, Silva AC, Rosenthal D et al. Estrogen effects on thyroid iodide uptake and thyroperoxidase activity in normal and ovariectomized rats. *Steroids* 2006; 71(8): 653-9 – 121
89. Liu RT, Chen YJ, Chou FF, Li CL, Wu WL, Tsai PC, Huang CC, Cheng JT. No correlation between BRAFV600E mutation and clinicopathological features of papillary thyroid carcinomas in Taiwan. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2005 Oct;63(4):461-6 – 98
90. Loh KC, Greenspan FS, Gee L, Miller TR, Yeo PP Pathological tumor – node –metastasis (pTNM) staging for papillary and follicular thyroid carcinomas: a retrospective analysis of 700 patients. *J Clin Endocrinol Metab* 1997 v.82 pp:3553–3562 – 42
91. Marques, A. R. et al. Expression of PAX8-PPAR gamma 1 rearrangements in both follicular thyroid carcinomas and adenomas. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2002 v.87, 3947–3952 - 109
92. Maso L. dal, M. Lise, P. Zambon et al., “Incidence of thyroid cancer in Italy, 1991–2005: time trends and age-period-cohort effects,” *Annals of Oncology*, vol. 22, no. 4, pp. 957–963, 2011. - 14
93. Mazzaferri E. L., “Management of a solitary thyroid nodule,” *The New England Journal of Medicine*, vol. 328, no. 8, pp. 553–559, 1993. - 20
94. Mazzaferri E. L., “Managing thyroid microcarcinomas,” *Yonsei Medical Journal*, vol. 53, no. 1, pp. 1–14, 2012. - 24
95. Mazzaferri EL, Jhiang SM. Long-term impact of initial surgical and medical therapy on papillary and follicular thyroid cancer. *AmJMed* 1997 v.97:418–428 – 44
96. Mazzaferri EL, Jhiang SM: Long-term impact of initial surgical and medical therapy on papillary and follicular thyroid cancer. *Am J Med* 1997 (5): 418-28 – 60
97. Mazzaferri EL. Management of low-risk differentiated thyroid cancer. *Endocr Pract.*2007;13:498–512 – 54
98. Mercante G, Frasoldati A, Pedroni C, Formisano D, Renna L, Piana S, Gardini G, Valcavi R, Barbieri V. Prognostic factors affecting neck lymph node recurrence and distant metastasis in papillary microcarcinoma of the thyroid: results of a study in 445 patients. *Thyroid*. 2009; 19:707-716 – 64
99. Mian C, Barollo S, Pennelli G, Pavan N, Rugge M, Pelizzo MR, Mazzarotto R, Casara D, Nacamulli D, Mantero F, Opocher G, Busnardo B, Girelli ME. Molecular characteristics in papillary thyroid cancers (PTCs) with no 131I uptake. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2008 v.68(1):108-16 – 127
100. Mian C, Lacroix L, Alzieu L, Nocera M, Talbot M, Bidart JM, et al. Sodium iodide symporter and pendrin expression in human thyroid tissues. *Thyroid* 2001; v.11(9): p.825-30 – 123

101. Monacelli M, Lucchini R, Polistena A, Triola R, Conti C, Avenia S, Di Patrizi MS, Barillaro I, Boccolini A, Sanguinetti A, Avenia N. Total thyroidectomy and central lymph node dissection. Experience of a referral centre for endocrine surgery. *G Chir.* 2014 May-Jun;35(5-6):117-21. - 04
102. Morari EC, Marcello MA, Guilhen AC, Cunha LL, Latuff P, Soares FA, Vassallo J, Ward LS. Use of sodium iodide symporter expression in differentiated thyroid carcinomas. *ClinEndocrinol (Oxf).* 2011 v;75(2):247-54 – 132
103. Motoi, N. et al. Role of ras mutation in the progression of thyroid carcinoma of follicular epithelial origin. *Pathol. Res. Pract.* 2000 v.196, 1–7 - 77
104. Nakayama H, Yoshida A, Nakamura Y, Hayashi H, Miyagi Y, Wada N, Rino Y, Masuda M, Imada T. Clinical significance of BRAF (V600E) mutation and Ki-67 labeling index in papillary thyroid carcinomas. *Anticancer Res.* 2007 Sep-Oct;27(5B):3645-9 – 94
105. Namba, H., Rubin, S. A. & Fagin, J. A. Point mutations of ras oncogenes are an early event in thyroid tumorigenesis. *Mol. Endocrinol.* 1990 v.4, p.1474–1479 - 80
106. Nicola JP, Carrasco N, Amzel LM. Physiological sodium concentrations enhance the iodide affinity of the Na⁺/I⁻ symporter. *Nat Commun.* 2014 v. 3-5:3948. – 147
107. Nikiforov YE, Nikiforova MN. Molecular genetics and diagnosis of thyroid cancer. *Nat Rev Endocrinol.* 2011 Aug 30;7(10):569-80 – 73
108. Nikiforova, M. N. et al. BRAF mutations in thyroid tumors are restricted to papillary carcinomas and anaplastic or poorly differentiated carcinomas arising from papillary carcinomas. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2003 v.88, p.5399–5404 – 83
109. Nikiforova, M. N. et al. RAS point mutations and PAX8-PPAR gamma rearrangement in thyroid tumors: evidence for distinct molecular pathways in thyroid follicular carcinoma. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2003 v.88, 2318–2326 - 111
110. Nikiforova, M.N.; Biddinger, P.W.; Caudill, C.M.; Kroll, T.G.; Nikiforov, Y.E. PAX8-PPARgamma rearrangement in thyroid tumors: RT-PCR and immunohistochemical analyses. *Am. J. Surg. Pathol.*, 2002, 26, 1016–1023 - 112
111. Nilsson I. L., F. Arnberg, J. Zedenius, and A. Sundin, “Thyroid incidentaloma detected by fluorodeoxyglucose positron emission tomography/computed tomography: practical management algorithm,” *World Journal of Surgery*, vol. 35, no. 12, pp. 2691–2697, 2011. - 21

112. Pazaitou-Panayiotou K, Capezzone M, Pacini F. Clinical features and therapeutic implication of papillary thyroid microcarcinoma. *Thyroid*. 2007;17:1085–92 – 53
113. Pellegriti G, Frasca F, Regalbuto C, Squatrito S, Vigneri R. Worldwide increasing incidence of thyroid cancer: update on epidemiology and risk factors. *J Cancer Epidemiol*. 2013;96521-2 - 12
114. Pelttari H, Schalin-Jääntti C, Arola J, Löyttyniemi E, Knuutila S, Välimäki MJ. BRAF V600E mutation does not predict recurrence after long-term follow-up in TNM stage I or II papillary thyroid carcinoma patients. *APMIS*. 2012 May;120(5):380-6 – 97
115. Rego-Iraeta A., L. F. P´erez-M´endez, B. Mantinan, and R. V.Garcia-Mayor, “Time trends for thyroid cancer in northwestern Spain: true rise in the incidence of micro and larger forms of papillary thyroid carcinoma,”*Thyroid*, vol. 19, no. 4, pp. 333–340, 2009. - 27
116. Riesco-Eizaguirre G, Leoni SG, Mendiola M, Estevez-Cebrero MA, Gallego MI, Redondo A, Hardisson D, Santisteban P, De la Vieja A. NIS mediates iodide uptake in the female reproductive tract and is a poor prognostic factor in ovarian cancer. *J Clin Endocrinol Metab*. 2014 v;99(7):E1199-208 – 148
117. Riesco-Eizaguirre G, P Gutie´rrez-Marti´nez, M A Garcı´a-Cabezas, M Nistal, P Santisteban. The oncogene BRAFV600E is associated with a high risk of recurrence and less differentiated papillary thyroid carcinoma due to the impairment of Na⁺/I^x targeting to the membrane. *Endocrine-Related Cancer* 2006 v.13 257–269 - 08
118. Riesco-Eizaguirre G, Rodrı´guez I, De la Vieja A, Costamagna E, Carrasco N, Nistal M, Santisteban P. The BRAFV600E oncogene induces transforming growth factor beta secretion leading to sodium iodide symporter repression and increased malignancy in thyroid cancer. *Cancer Res*. 2009 Nov 1;69(21):8317-25 – 134
119. Riesco-Eizaguirre, P Gutie´rrez-Marti´nez, M A Garcı´a-Cabezas, MNistal, PSantisteban. The oncogene BRAFV600E is associated with a high risk of recurrence and less differentiated papillary thyroid carcinoma due to the impairment of Na⁺/I^x targeting to the membrane. *Endocrine-Related Cancer* (2006) v.13 p.257–269 – 137
120. Romei C, Ciampi R, Faviana P, Agate L, Molinaro E, Bottici V, Basolo F, Miccoli P, Pacini F, Pinchera A, Elisei R. BRAFV600E mutation, but not RET/PTC rearrangements, is correlated with a lower expression of both thyroperoxidase and sodium iodide symporter genes in papillary thyroid cancer. *Endocr Relat Cancer*. 2008; v.15(2):511-20 – 128

121. Roti E, degli Uberti EC, Bondanelli M, Braverman LE. Thyroid papillary microcarcinoma: a descriptive and meta-analysis study. *Eur J Endocrinol.* 2008;159:659–79 – 55
122. Ryu KY, Senokozlieff ME, Smanik PA, Wong MG, Siperstein AE, DuhQY et al. Development of reverse transcription-competitive polymerase chain reaction method to quantitate the expression levels of human sodium iodide symporter. *Thyroid* 1999; 9(4): 405-9 – 125
123. Sherman SI, Brierley JD, Sperling M, Ain KB, Bigos ST, CooperDS, HaugenBR, HoM, KleinI, LadensonPW, RobbinsJ, RossDS, SpeckerB, TaylorT, MaxonHR 3rd Prospective multicenter study of thyroid carcinoma treatment: initial analysis of staging and outcome. National Thyroid Cancer Treatment Cooperative Study Registry Group. *Cancer* v.83:1012–1021 – 45
124. Shimamoto K, Satake H, Sawaki A, Ishigaki T, Funahashi H, Imai T. Preoperative staging of thyroid papillary carcinoma with ultrasonography. *Eur J Radiol.* 1998;29:4–10 – 48
125. Smallridge RC, Marlow, L.A.; Copland, J.A. Anaplastic thyroid cancer: molecular pathogenesis and emerging therapies. *Endocr. Relat. Cancer*, 2009, 16, 17-44 – 103
126. Spitzweg C, Bible KC, Hofbauer LC, Morris JC. Advanced radioiodine-refractory differentiated thyroid cancer: the sodium iodide symporter and other emerging therapeutic targets. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2014 Oct;2(10):830-42 – 146
127. Stulak JM, Grant CS, Farley DR, et al. Value of preoperative ultrasonography in the surgical management of initial and reoperative papillary thyroid cancer. *Arch Surg.* 2006;141:489–94 – 50
128. Syrenicz A, Wolny M, Kram A, Sworczak K, Syrenicz M, Garanty-Bogacka B, Walczak M. Analysis of the sodium iodide symporter expression in histological slides from a nodular goiter. *Arch Med Res.* 2007 Feb;38(2):219-26 – 124
129. Trouttet-Masson S, Selmi-Ruby S, Bernier-Valentin F, Porra V, Berger-DutrieuxN, DecaussinM, et al. Evidence for transcriptional and posttranscriptional alterations of the sodium/iodide symporter expression in hypofunctioning benign and malignant thyroid tumors. *Am J Pathol* 2004; v.165(1): p.25-34 – 122
130. Tuttle RM, Leboeuf R. Follow up approaches in thyroid cancer: a risk adapted paradigm. *Endocrinol Metab Clin North Am* 37:419–435. 2008 – 47
131. Tuttle RM, Tala H, Shah J, Leboeuf R, Ghossein R, Gonen M, Brokhin M, Omry G, Fagin JA, Shaha A. 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. *Thyroid*. 2010; 20:1341-1349 – 63
132. Udelsman R., Shaha A.R. Is total thyroidectomy the best possible surgical management for well – differentiated thyroid cancer?// *The Lancet Oncology*.- 2005.- V.6.- N.7.- P.529-531 – 41
 133. Vaisman F, Shaha A, Fish S, Tuttle R. 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. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2011 Feb 8 – 65
 134. Vasko V, Hu S, Wu G, Xing JC, Larin A, Savchenko V, Trink B, Xing M. High prevalence and possible de novo formation of BRAF mutation in metastasized papillary thyroid cancer in lymph nodes. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;v.90 p.5265–5269 – 89
 135. Venkat R, Guerrero MA. Recent advances in the surgical treatment of differentiated thyroid cancer: a comprehensive review. *ScientificWorldJournal*. 2013 v.8 p.324-7 – 59
 136. Wang S, Liang J, Lin Y, Yao R. Differential expression of the Na(+)/I(-) symporter protein in thyroid cancer and adjacent normal and nodular goiter tissues. *Oncol Lett*. 2013 Jan;5(1):368-372 – 126
 137. Wei Li, Kenneth B Ain. Human sodium–iodide symporter (hNIS) gene expression is inhibited by a trans-active transcriptional repressor, NIS-repressor, containing PARP-1 in thyroid cancer cells. *Endocrine-Related Cancer* (2010) 17 383–398 - 07
 138. Wei S, Gao M, Zhao C, Pan Y, Li H, Li J, Li X. Low expression of sodium iodide symporter expression in aggressive variants of papillary thyroid carcinoma *Int J Clin Oncol*. 2013 v.4 p.35-40 – 68
 139. Woodford RL, Nikiforov YE, Hunt JL, Bellizzi AM, Zhang X, Mills SE, Stelow EB. Encapsulated papillary oncocytic neoplasms of the thyroid: morphologic, immunohistochemical, and molecular analysis of 18 cases. *AmJSurgPathol*. 2010 Nov; v.34(11):1582-90 – 86
 140. Xing M and all. Association between BRAF V600E mutation and mortality in patients with papillary thyroid cancer. *JAMA*. 2013 Apr 10;309(14):1493-501 – 101
 141. Xing M, Clark D, Guan H, Ji M, Dackiw A, Carson KA, Kim M, Tufaro A, Ladenson P, Zeiger M, Tufano R. BRAF mutation testing of thyroid fine-needle aspiration biopsy specimens for preoperative risk stratification in papillary thyroid cancer. *J Clin Oncol*. 2009 Jun 20;27(18):2977-82 – 91
 142. Xing M, Westra WH, Tufano RP, Cohen Y, Rosenbaum E, Rhoden KJ, Carson KA, Vasko V, Larin A, Tallini G, Tolaney S, Holt EH, Hui P, Umbricht CB, Basaria S, Ewertz M, Tufaro AP, Califano JA, Ringel MD,

- Zeiger MA, Sidransky D, Ladenson PW. BRAF mutation predicts a poorer clinical prognosis for papillary thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005 Dec;90(12):6373-9 – 93
143. Xing M. BRAF mutation in thyroid cancer *Endocr Relat Cancer* 2005 v.12 p.245-262 – 82
144. Xing M. Prognostic utility of BRAF mutation in papillary thyroid cancer. *Mol Cell Endocrinol.* 2010 May 28;321(1):86-93 – 96
145. Yun M., T. W. Noh, A. Cho et al., “Visually discernible [18F]fluorodeoxyglucose uptake in papillary thyroid microcarcinoma: a potential new risk factor,” *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, vol. 95, no. 7, pp. 3182–3188, 2010. - 22
146. Zhou YL, Zhang W, Gao EL, Dai XX, Yang H, Zhang XH, Wang OC. Preoperative BRAF mutation is predictive of occult contralateral carcinoma in patients with unilateral papillary thyroid microcarcinoma. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2012;13 (4):1267-72 – 88
147. Zhu, Z., Gandhi, M., Nikiforova, M. N., Fischer, A. H. & Nikiforov, Y. E. Molecular profile and clinical-pathologic features of the follicular variant of papillary thyroid carcinoma. An unusually high prevalence of ras mutations. *Am. J. Clin. Pathol.* 2003 v.120, p.71–77 - 79.
148. Zoghlami A, Roussel F, Sabourin JC, Kuhn JM, Marie JP, Dehesdin D, Choussy O. BRAF mutation in papillary thyroid carcinoma: Predictive value for long-term prognosis and radioiodine sensitivity. *Eur Ann Otorhinolaryngol Head Neck Dis.* 2013 v.8 p. 668 - 673 – 100
149. Zoghlami A, Roussel F, Sabourin JC, Kuhn JM, Marie JP, Dehesdin D, Choussy O. BRAF mutation in papillary thyroid carcinoma: Predictive value for long-term prognosis and radioiodine sensitivity. *Eur Ann Otorhinolaryngol Head Neck Dis.* 2013, v.8 p.332-340 – 135