

НАО «Казахский национальный медицинский университет  
имени С.Д. Асфендиярова»

УДК: 616-006:616.441(574)

На правах рукописи

**ТЛЕГЕНОВ АСКАР ШЫНДАЛЫЕВИЧ**

**OMICS - исследования злокачественных и узловых новообразований  
щитовидной железы в Казахстане**

6D110100–Медицина

Диссертация на соискание степени  
доктора философии (PhD)

Научный руководитель:  
доктор медицинских наук,  
профессор Ж. Абылайулы,  
Научный консультант:  
доктор медицинских наук,  
профессор Г.Б. Адильбаев  
Зарубежный научный консультант:  
PhD, Associate Prof. V.A. Saenko,

Республика Казахстан  
Алматы, 2021

## СОДЕРЖАНИЕ

<b>НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ</b>	4
<b>ОПРЕДЕЛЕНИЯ</b>	5
<b>ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ</b>	6
<b>ВВЕДЕНИЕ</b>	7
<b>1 OMICS – ИССЛЕДОВАНИЯ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ И УЗЛОВЫХ НОВООБРАЗОВАНИЙ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ В КАЗАХСТАНЕ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)</b>	
1.1 Рак щитовидной железы	15
1.2 Современные подходы к диагностике рака щитовидной железы	22
1.3 Тонкоигольная аспирационная пункционная биопсия щитовидной железы	25
1.4 Ультразвуковое исследование щитовидной железы	27
1.5 Молекулярно – генетические OMICS исследования	30
1.6 Метаболомика, определение, особенности, подходы и применение в мировой практике	31
1.7 Диагностическая значимость BRAF мутации в диагностике рака щитовидной железы	37
<b>2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ</b>	
2.1 Дизайн исследования и клиническая характеристика материалов исследования	42
2.2 Методы исследования	46
2.3 Методика исследования спектра метаболитов в крови у больных с узловыми новообразованиями щитовидной железы, основы эксперимента	47
2.3.1 Лабораторные методы	47
2.3.2 Протокол экстракции метаболитов из сыворотки	48
2.3.3 Условия и характер исследования	48
2.4 Методика выявления мутантного белка BRAF или мутации гена BRAF	49
2.4.1 Выявление мутантного белка BRAF в гистологических препаратах фиксированной ткани опухоли щитовидной железы	49
2.4.2 Выделение ДНК материала из материала тонкоигольной аспирационной биопсии узла щитовидной железы и проведение ПЦР анализа	50

2.5 Статистическая обработка результатов исследования	51
<b>3 СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ</b>	
3.1 Оценка исследования спектра метаболитов в крови у больных со злокачественными и узловыми новообразованиями щитовидной железы	52
3.1.1 Сравнение между группами 0-2 (Контроль-Рак ЩЖ)	53
3.1.2 Сравнение между группами 0-1(Контроль-Доброкачественный узел)	58
3.1.3 Сравнение между группами 1-2 (Доброкачественный узел – Рак ЩЖ)	62
3.2 Исследование частоты случаев встречаемости мутантного белка BRAF (гистологические препараты), и его связь с клинико-морфологическими характеристиками опухоли	67
3.3 Оценка частоты случаев встречаемости мутации гена BRAF (пункционный материал тонкоигольной аспирационной биопсии)	72
<b>ЗАКЛЮЧЕНИЕ</b>	75
<b>СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ</b>	83
<b>ПРИЛОЖЕНИЯ</b>	

## НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ

В настоящей диссертации использованы ссылки на следующие стандарты:  
Конституция Республики Казахстан: принята 30 августа 1995г. (с изменениями и дополнениями по состоянию на 10 марта 2017г.).

Закон Республики Казахстан. Об охране здоровья граждан: принят 07 июля 2006 года.

Кодекс Республики Казахстан. О здоровье народа и системе здравоохранения: принят 18 сентября 2009 года.

Хельсинкская декларация Всемирной Медицинской Ассоциации. Этические принципы проведения медицинских исследований с участием человека в качестве субъекта: утв. 18-й Генеральной Ассамблее ВМА, Хельсинки, Финляндия, июнь 1964 г. (последние изменения внесены на 64-й Генеральной Ассамблее ВМА, Форталеза, Бразилия, октябрь 2013г).

Постановление Правительства Республики Казахстан. Об утверждении Плана мероприятий по реализации Государственной программы развития здравоохранения Республики Казахстан «Саламатты Қазақстан» на 2011-2015 годы: утв. 29 января 2011 года, №41.

Указ Президента Республики Казахстан. Государственная программа реформирования и развития здравоохранения Республики Казахстан на 2005-2010 годы: утв. 13 сентября 2004, №1438.

Указ Президента Республики Казахстан. Государственная программа развития образования в Республике Казахстан на 2005-2010 годы: утв. 11 октября 2004 года, №1459.

ГОСТ 7.32–2001 (Межгосударственный стандарт). Система стандартов по информации, библиотечному и издательскому делу. Отчет о научно–исследовательской работе. Структура и правила оформления.

ГОСТ 15.101–98 (Межгосударственный стандарт). Система разработки и постановки продукции на производство. Порядок выполнения научно–исследовательских работ.

ГОСТ 7.1–84. Система стандартов по информации, библиотечному и издательскому делу. Библиографическое описание документа. Общие требования и правила составления.

ГОСТ 7.9–95 (ИСО 214–76). Система стандартов по информации, библиотечному и издательскому делу. Реферат и аннотация. Общие требования.

ГОСТ 7.12–93. Система стандартов по информации, библиотечному и издательскому делу. Библиографическая запись. Сокращение слов на русском языке. Общие требования и правила.

ГОСТ 7.54–88. Система стандартов по информации, библиотечному и издательскому делу. Представление численных данных о свойствах веществ и материалов в научно-технических документах. Общие требования.

## ОПРЕДЕЛЕНИЯ

В настоящей диссертации применяют следующие термины с соответствующими определениями:

**Узловые образования (УОЩЖ)** – кисты, доброкачественные и злокачественные опухоли, коллоидные и паренхиматозные очаги, фокальные изменения ткани.

**Доброкачественные узловые новообразования (ДУОЩЖ)** – кисты, и доброкачественные опухоли, коллоидные и паренхиматозные очаги, фокальные изменения ткани.

**Рак щитовидной железы (РЩЖ)** - злокачественная опухоль щитовидной железы, развивающаяся из фолликулярных или С-клеток.

**ОМИКС-технологии** это комплекс высокопроизводительных постгеномных методов, применяемых для изучения совокупности молекул, входящих в крупные функциональные группы (например, нуклеиновые кислоты, белки, метаболиты) с целью получения как можно более полной характеристики состояния данной группы на уровне клетки, ткани или всего организма. Технологии широко применяются для выявления биомаркеров различных состояний и заболеваний, включая онкологические.

**Метаболомика** (от англ. metabolomics, греч. Metabolism + суффикс –omics –«полный, целый, весь») – научная область, изучающая совокупность и количественное содержание всех исходных, промежуточных и конечных продуктов метаболизма на клеточном, тканевом или организменном уровне.

**Иммуногистохимическое исследование (ИГХ)** – лабораторное микроскопическое исследование биологического материала, полученного в ходе биопсии, при котором мишень (антиген) выявляется на гистологических срезах ткани с помощью специфических к нему антител, конъюгированных с ферментами, способными производить окрашивание ин ситу.

**Полимеразная цепная реакция (ПЦР)** – метод значительного увеличения концентрации определённых целевых фрагментов ДНК.

**Протоонкоген BRAF**– ген, кодирующий внутриклеточную серин - треониную протенкиназу BRAF, компонент MAP - киназного (от англ. Mitogen – Activated Protein Kinase) сигнального каскада, фосфорилирующую MEK1/2 киназы. В норме активация BRAF происходит после связывания ряда ростовых факторов с соответствующими рецепторами на поверхности клетки, которые опосредованно передают сигнал на BRAF, являясь управляемым пролиферативным стимулом.

**Онкогенная мутация BRAF** – изменение нуклеотидной последовательности гена, приводящее к изменению состава аминокислот в белке BRAF с приобретением им конститутивной киназной активности. Наиболее частой мутацией является трансверсия T1799A в 15-мэксоне гена BRAF, приводящая к замене валина (V) на глутаминовую кислоту (E) в 600-м аминокислотном остатке, обозначается BRAF<sup>V600E</sup>. Белок BRAF<sup>V600E</sup> активирует MAP - киназный каскад, что приводит к неконтролируемой пролиферации клеток и повышает их выживаемость.

## ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

ЖХ	–	жидкостная хроматография
МАИР	–	Международное агентство по изучению рака
МЗ	–	Министерство Здравоохранения
МИ	–	метаболомные исследования
МРЦЖ	–	медуллярный рак щитовидной железы
МС	–	масс-спектрометрия
МСГ	–	Меланин стимулирующий гормон
МФ	–	метаболический фингерпринтинг
НДРЦЖ	–	низкодифференцированный рак щитовидной железы
НИИ ФПМ	–	Научно-исследовательский институт фундаментальной и прикладной медицины
НИИОиР	–	Научно-исследовательский институт онкологии и радиологии
ПРЦЖ	–	папиллярный рак щитовидной железы
РК	–	Республика Казахстан
РЦЖ	–	рак щитовидной железы
ТАПБ	–	тонкоигольная аспирационная биопсия
ТТГ	–	тиреотропный гормон
УЗ	–	ультразвук
УЗИ	–	ультразвуковое исследование
УОЩЖ	–	узловое образование щитовидной железы
ФРЦЖ	–	фолликулярный рак щитовидной железы
ЩЖ	–	щитовидная железа
ЯМР	–	ядерный магнитный резонанс
ММСА	–	метаболит-метаболит корреляционный анализ
SD	–	стандартное отклонение
TNF	–	фактор некроза опухолей

## ВВЕДЕНИЕ

**Актуальность темы.** Злокачественные новообразования, способные к инвазии в окружающие и отдаленные ткани, и развивающиеся из эпителиальных клеток желез внутренней секреции, относят к раку органов эндокринной системы.

Среди всех органов эндокринной системы, наиболее часто встречающимся видом онкологического заболевания является рак щитовидной железы [1].

Рак щитовидной железы (РЩЖ) представляет собой злокачественный процесс, возникающий в паренхиме тиреоидной ткани, характеризующийся специфической и многообразной морфологической архитектурой, особенностями роста и метастазированием.

Многообразные характерные особенности РЩЖ и ежегодный рост данного заболевания по всему миру обуславливают на сегодняшний день ее общую актуальность, а также дифференциальную диагностику, в особенности на раннем дооперационном этапе [2].

Согласно данным Международного агентства по исследованию рака (МАИР), в 2018 году во всем мире зарегистрировано 567 233 новых случаев РЩЖ. В географическом распределении, как показано на Рисунке 1, из них более половины, а именно 59,8% приходится на страны Азии. В Европе данный показатель составляет 13,9%, по регионам Америки 22,2%, и наименьший, около 3,2%, приходится на Африканский континент [3].

Таким образом, лидирующими регионами по частоте встречаемости РЩЖ являются Азия и Америка.

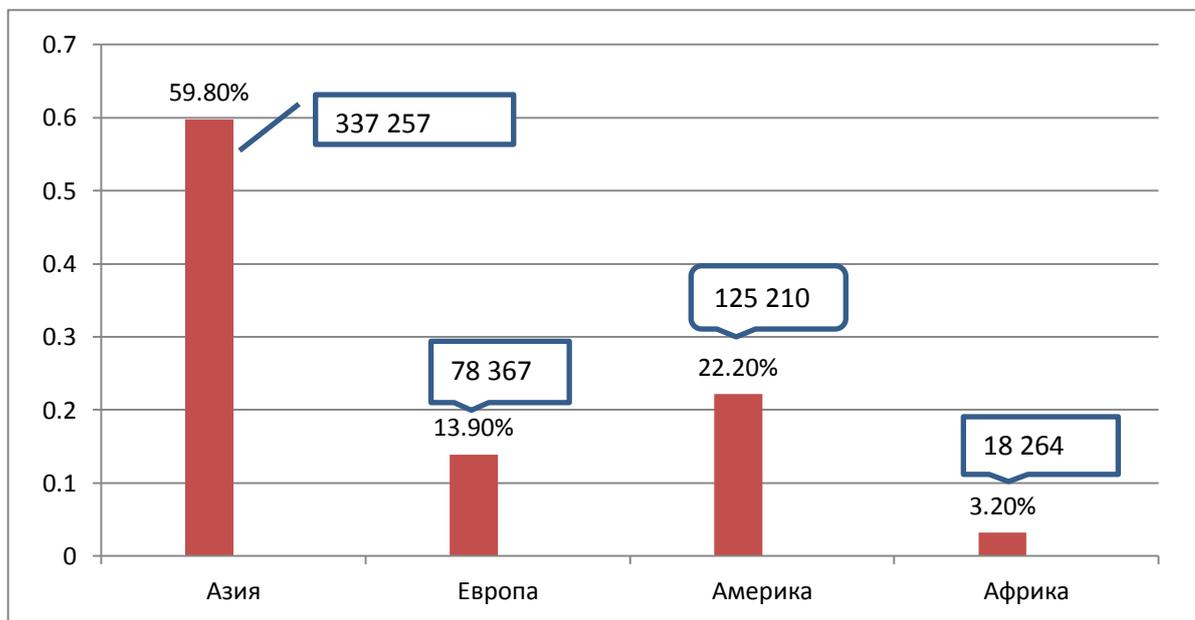


Рисунок 1 - Количество новых случаев рака щитовидной железы в 2018 году по данным МАИР, оба пола всех возрастов

По данным той же организации, в географическом распределении среди Азиатских стран, лидирующими по количеству случаев РЦЖ, как показано в таблице 1, странами являются Китай и Южная Корея. В этих странах в 2018 году диагностировано 194232 и 44497 новых случаев соответственно. В Казахстане было выявлено 486 новых случаев. Для сравнения, показатели для США составили 60845 и 11179 новых случаев РЦЖ для России. [4]

Таблица 1 Расчетное количество новых случаев РЦЖ, стандартизированный показатель заболеваемости и доля РЦЖ в структуре онкозаболеваемости в 2018г в разных странах по данным МАИР (оба пола всех возрастов)

Страна	Кол-во случаев	ASR	% РЦЖ
Китай	194 232	10,1	4,5
Ю.Корея	44 497	60,7	5,2
США	60 845	14,5	2,8
Россия	11 179	5,5	3,0
Казахстан	486	2,4	1,4
Япония	17 479	7,8	2,0
Индия	18 688	1,4	1,6
Бразилия	21 470	8,6	3,8
Кыргызстан	96	1,7	1,5
Узбекистан	186	0,6	0,7
Весь мир	567 233	6,7	3,1

Стандартизированный по возрасту показатель заболеваемости (англ. ASR, Age-standardized Rate) РЦЖ на 100 000 населения в рассмотренных странах демонстрируют следующие данные (таблица 1). Наибольший показатель, 60,7, наблюдается в Южной Корее, что, вероятно, связано с программами ультразвукового скрининга в стране [5]. В Китае стандартизированная заболеваемость составляет 10,1, что несколько ниже, чем в США, 14,5, но почти вдвое выше, чем в России, 5,5. В Казахстане стандартизированный показатель заболеваемости РЦЖ 2,4. В целом мировой стандартизированный показатель заболеваемости по данным МАИР составляет 6,7 случаев на 100 000 населения [6].

В общей структуре онкозаболеваемости как показано на рисунке 2 (оба пола всех возрастов, 2018 год) РЦЖ занимает 10-е место в мире, на него приходится 3,1% всех случаев первичных злокачественных образований [7].

Estimated number of new cases in 2018, worldwide, all cancers, both sexes, all ages

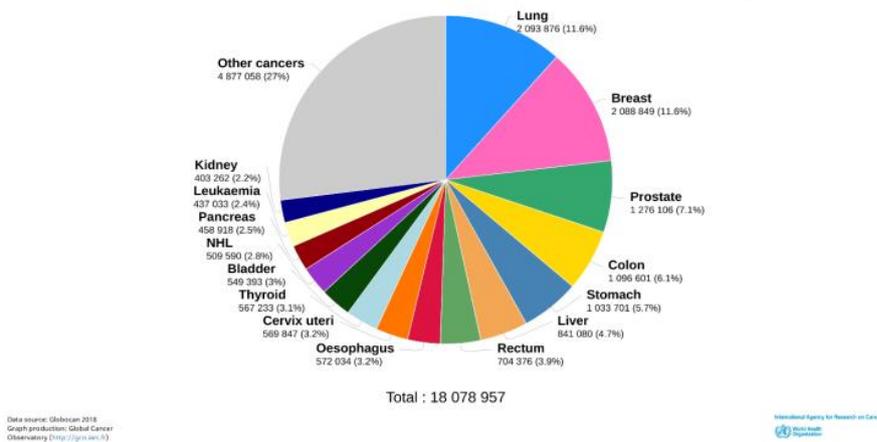


Рисунок 2 - Общая структура онкозаболеваемости в мире по данным МАИР на 2018 г.

Как показано в таблице 1, в Казахстане доля РЦЖ несколько ниже мировой, 1,4%. Рак ЦЖ находится на 18 месте в структуре онкозаболеваемости в стране [8].

Рак ЦЖ диагностируется приблизительно в 3 раза чаще у женщин, чем у мужчин. Общемировое соотношение стандартизированных показателей заболеваемости составляет 3,3:1 (Ж:М). Это соотношение – с небольшими колебаниями – сохраняется практически во всех регионах мира. В Казахстане соотношение стандартизированных показателей составляет 4,4:1 (Ж:М). В силу более высокой заболеваемости у женщин, доля РЦЖ в общей структуре онкопатологии у женщин во всем мире составляет 5,0% и 1,4% у мужчин. В Казахстане эти показатели соответственно 2,3% и 0,5%. [9].

Заболеваемость РЦЖ связана с возрастом. На рисунке 3 представлен показатель стандартизированной заболеваемости во всем мире в различных возрастных группах. Рост заболеваемости РЦЖ с возрастом характерен для всех стран во всех регионах и наблюдается как у женщин, так и мужчин.

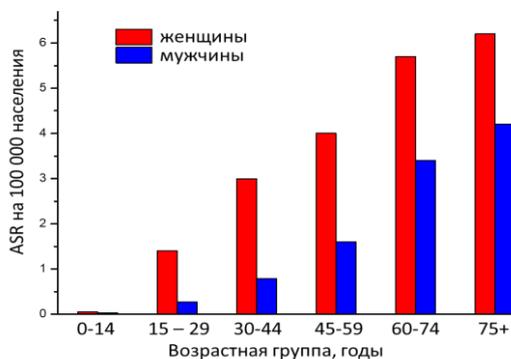


Рисунок 3 - Стандартизированный показатель заболеваемости РЦЖ в различных возрастных группах у женщин и мужчин в 2018 году по данным МАИР

В большинстве стран мира в течение двух последних десятилетий отмечается рост заболеваемостью РЦЖ как у женщин, так и мужчин. В Таблице 2 приведены стандартизованные показатели заболеваемости РЦЖ в разных странах. Отметим, что отличающиеся показатели прироста между странами помимо объективно существующих различий в заболеваемости между различными регионами мира могут быть связаны также с различной степенью доступности средств диагностики, наличием или отсутствием программ скрининга и соответствующими регламентирующими документами, рекомендациями или руководствами по диагностике и лечению РЦЖ. В некоторых случаях обновления регламентирующих документов и изменения в организации и практике здравоохранения могут приводить к стабилизации или даже небольшому снижению заболеваемости на национальном или регионарном уровне при общем сохранении тенденции к росту во всем мире.

Таблица 2 - Стандартизованные показатели заболеваемости РЦЖ в разных странах в течение двух последних десятилетий

Страна	Пол	1995 г.	2000 г.	2005 г.	2010 г.	2018 г.
Китай	Ж		5,4	7,8	14,1	15,8
	М		1,7	2,3	4,7	4,8
Ю.Корея	Ж		15,4	37,8	89,5	100,5
	М		2,8	6,8	19,5	21,8
США	Ж	7,5	9,6	13,3	17,4	22,3
	М	2,7	3,3	4,3	5,5	6,6
Россия	Ж			7,4	6,9	9,2
	М			1,6	1,7	2,3
Япония	Ж	5,8	6,1	6,7	9,1	11,2
	М	1,6	1,6	2,0	3,5	4,4
Индия	Ж	1,6	1,95	2,8	2,7	2,0
	М	1,0	0,8	1,3	1,1	0,8
Бразилия	Ж	4,3	9,5	13,0	13,2	13,1
	М	1,6	2,0	2,7	3,0	3,8
Весь мир	Ж					10,2
	М					3,1
Примечание – Составлено по данным источника [8]						

Причины роста заболеваемости РЦЖ, в основном – ПРЦЖ, остаются предметом научных дебатов. Наиболее вероятно, значительная часть прироста вызвана улучшением методов диагностики РЦЖ [10]. Отметим, что по данным патологоанатомических исследований распространённость РЦЖ может составлять от 0,01% до 35,6% [11] при аутопсии, не связанной со злокачественным процессом в ЦЖ. Это указывает на существование в

популяции довольно большого пула нераспознанных и, видимо, клинически незначимых опухолей ЩЖ. В пользу прироста заболеваемости за счет случайно или побочно выявляемых случаев свидетельствует и очень невысокий прирост смертности от РЩЖ [12].

Также возможным считается реальный прирост заболеваемости, обусловленный изменяющимся состоянием окружающей среды и контакта с факторами риска. К примеру, возрастает количество опухолей не только малого, но и большого размера [13]. Можно было бы также ожидать, что если улучшение методов диагностики была единственной причиной роста заболеваемости РЩЖ, то произошло бы заметное снижение показателей смертности от РЩЖ, что в исследованиях не отмечается [14].

Потенциальными факторами риска РЩЖ являются ионизирующая радиация, повышенный индекс массы тела, пищевой фактор и другие различные факторы окружающей среды, гормональный фон, состояние репродуктивной системы [15]. Отметим, однако, что за исключением ионизирующей радиации данные, однозначно идентифицирующие тот или иной фактор риска для РЩЖ, пока недоступны. Повышенный риск развития РЩЖ после внешнего облучения у переживших атомные бомбардировки в Японии и пациентов, получавших радиологическое лечение [16] и внутреннего облучения после аварии на Чернобыльской АЭС [17] описаны достаточно хорошо. В этой связи выдвигались предположения о возрастающей роли облучения по медицинским показаниям, такое как диагностическая радиография, ядерная медицина и радиотерапия [18].

Возрастающая заболеваемость РЩЖ является актуальной проблемой современной медицины и указывает на необходимость совершенствования существующих диагностических мероприятий и разработку с внедрением в практическую тиреоидологию новых высокотехнологичных методов исследования, которые будут соответствовать современным тенденциям мировой науки в медицине.

Дифференциальная диагностика новообразований ЩЖ в настоящее время проводится путем проведения тонкоигольной аспирационной биопсии (ТАПБ) узлов ЩЖ под ультразвуковым контролем. ТАПБ с последующим цитологическим исследованием являются основными диагностическими процедурами на предоперационном этапе. Однако, несмотря на высокую диагностическую точность данного метода, в ряде случаев возникают погрешности и сложности, связанные с интерпретацией полученного материала [19].

Сложности связаны в первую очередь с неоднородностью строения, а также с цитологическим и морфологическим многообразием гиперпластических процессов и опухолей щитовидной железы [20].

Например, одних только гистологических вариантов ПРЩЖ, помимо классического, в 4-м издании Классификации ВОЗ опухолей эндокринного происхождения насчитывается в районе 14 [21].

Ввиду наличия – в силу ряда объективных и субъективных причин – актуальных нерешенных проблем диагностики узловых образований ЩЖ, поиском новых методов диагностики онкологических заболеваний активно занимаются ученые во многих странах мира. Одним из передовых и перспективных подходов к решению такого рода задач являются высокопродуктивные молекулярно-генетические методы. В процессе своего развития молекулярно-генетические методы постоянно дополнялись разнообразными технологиями, становившимися доступными в ходе научно-технического прогресса. Примером таких весьма значительных достижений стали ОМИКС-технологии, представляющие собой целый комплекс самых современных методов исследования и идентификации молекулярно-генетических маркеров онкологических заболеваний [22].

ОМИКС - технологии, в первую очередь, это сама «геномика», а также весьма развитые к настоящему времени «транскриптомика» и «протеомика». Относительно новым направлением в научных исследованиях представляет собой «метаболомика», активно развивающаяся наука в течение последнего десятилетия. В настоящее время трудно представить современные исследования, не включающие в себя высокотехнологичные молекулярно – генетические методы, описывающих свойства биологического объекта на постгеномных уровнях. Комплексные исследования состояния сразу нескольких систем позволяют всесторонне подходить к изучению процессов, протекающих в живых клетках, последовательно отражая весь поток информации от генов к фенотипу биологического объекта. Геномика при этом может быть началом подобных исследований, а метаболомика – источником необходимой дополнительной информации, своего рода «научным посредником», поскольку профиль метаболитов является важной информативной характеристикой фенотипа.

Можно ожидать, что полученный опыт и результаты молекулярно-генетических ОМИКС-исследований, позволят улучшить диагностику РЩЖ. Использование высокоэффективных методов на основе ОМИКС-технологий с последующим определением и внедрением новых диагностических биомаркеров имеет огромный потенциал для совершенствования алгоритма диагностики РЩЖ, в особенности на раннем дооперационном этапе.

**Цель исследования.** Совершенствование диагностики РЩЖ путем определения на дооперационном этапе спектра метаболитов и мутации гена BRAF

#### **Задачи исследования**

1. Определить масс-спектры метаболитов из образцов плазмы крови пациентов с доброкачественными и злокачественными новообразованиями ЩЖ и контрольных субъектов с последующей идентификацией метаболитов;
2. Провести анализ частоты встречаемости мутации гена BRAF у пациентов с ПРЩЖ;

3. Определить возможность использования выявления мутации гена BRAF как молекулярно - генетического маркера РЩЖ.

4. Совершенствовать алгоритм диагностики РЩЖ путем определения на дооперационном этапе спектра метаболитов и мутации гена BRAF

#### **Дизайн исследования**

В рамках I этапа исследования проведено проспективное исследование спектра метаболитов у 132 пациентов с доброкачественными образованиями ЩЖ в условиях отделения эндокринологии объединенной университетской клиники Казахского Национального Медицинского Университета имени С.Д. Асфендиярова и злокачественными новообразованиями щитовидной железы, получивших лечение в условиях отделения опухолей головы и шеи при Казахском Научно-Исследовательском Институте Онкологии и Радиологии МЗ РК, в том числе контрольная группа безузловых вclusions с применением инструментальных и статистических методов.

На II этапе проведено ретроспективное молекулярное исследование операционного материала (парафиновые блоки) у 92 пациентов с ПРЩЖ, получивших лечение, включая хирургическое вмешательство, в условиях Казахского Научно-исследовательского института онкологии и радиологии МЗ РК в период с января 2016 по июль 2017года. На основании этих данных был проведен анализ частоты встречаемости мутации BRAF в условиях Казахстана.

На III этапе проведено проспективное исследование мутации гена BRAF в материале ТАПБ у 122 пациентов, самостоятельно обратившихся в отделение эндокринологии объединенной университетской клиники Казахского Национального Медицинского Университета имени С.Д. Асфендиярова города Алматы по поводу наличия у них узлового зоба. На данном этапе было проведено цитологическое и молекулярно-генетическое исследование.

#### **Научная новизна работы**

На собственном клиничко-диагностическом материале:

Впервые в рамках отечественной тиреоидологии на современном доказательном уровне, с целью улучшения дооперационной диагностики РЩЖ, установлены и проанализированы метаболомные и молекулярно-генетические показатели.

1. На научно-методическом уровне продемонстрирована возможность применения высокотехнологичного ОМИКС - исследования спектра метаболитов в плазме крови для диагностики злокачественных новообразований ЩЖ.

2. Показана возможность применения нового высокотехнологичного молекулярно - генетического метода анализа мутации гена BRAF в материале ТАПБ для диагностики злокачественных новообразований ЩЖ.

3. Продемонстрирована эффективность использования современных высокоэффективных ОМИКС технологий, что доказывает экспериментальную гипотезу и показывает необходимость внедрения принципиально новых подходов в диагностике РЩЖ, особенно на раннем дооперационном этапе.

## **Практическая значимость**

Первый этап работы по исследованию спектра метаболитов выполнен в рамках научно-исследовательской работы (№ госрегистрации 0116РК00041) в Казахском Национальном Медицинском Университете им. С.Д. Асфендиярова в 2016 году.

1. Практическая значимость проведенной работы заключается в возможности внедрения ОМИКС технологии в практическую тиреоидологию.

2. Идентифицированы специфические метаболиты в качестве биомаркеров для диагностики злокачественных новообразований щитовидной железы

3. Апробированный метод определения BRAF мутации у пациентов со злокачественными новообразованиями щитовидной железы в условиях Казахстана, показал его высокую эффективность и возможность применения для диагностики на раннем дооперационном этапе.

4. Усовершенствован подход к диагностике злокачественных новообразований щитовидной железы на основе использования высокотехнологичных ОМИКС исследований.

## **Основные положения, выносимые на защиту**

1. Нарушение спектра метаболитов при РЩЖ может эффективно использоваться для диагностики. При этом более специфичными являются следующие метаболиты: M129T312, M206T234, M87T21, M72T15.

2. Появление мутации гена BRAF свидетельствует о возможном развитии РЩЖ и может эффективно использоваться для диагностики. Мутация гена BRAF в смывах пункционных игл при РЩЖ является более специфичной и чувствительной.

3. Анализ результатов спектра метаболитов и генетической мутации гена BRAF у пациентов с РЩЖ позволил совершенствовать алгоритм диагностики

## **Личный вклад автора**

Автор в течение 3 лет проводил диагностику, непосредственно участвовал в определении тактики ведения и диагностики пациентов с заболеваниями ЩЖ. В рамках диссертационной работы все амбулаторные, стационарные, интраоперационные и послеоперационные исследования с интерпретацией данных и наблюдением в динамике были проведены непосредственно автором. Помимо этого, автор в условиях Нагасакского университета проводил исследования генетического материала (имуногистохимия, ПЦР) Были проведены литературный поиск по заданной проблеме, первичная обработка материала, статистический анализ, интерпретация полученных результатов с разработкой алгоритма диагностики и ведения пациентов с новообразованиями ЩЖ.

## **Внедрение результатов исследования в практику**

Внедрен модернизированный алгоритм диагностики пациентов с доброкачественными и злокачественными образованиями ЩЖ в клиническую деятельность Эндокринологического отделения УК №2 Национального Медицинского Университета, г. Алматы.

Материалы диссертации используются в учебном процессе на Кафедре эндокринологии и Факультете после дипломного образования и непрерывного профессионального усовершенствования Национального Медицинского Университета, г. Алматы и НИИОиР.

### **Публикации по теме диссертации**

Результаты исследования внедрены в практику Эндокринологического отделения УК № 2 Национального Медицинского Университета и оформлены в виде патентов на изобретение РК:

1. Способ диагностики и прогнозирования рака щитовидной железы № 2019/0193/1.

По теме исследования опубликовано 12 научных работ. Подробная информация согласно публикациям по теме диссертации представлена в Приложении А.

- В журналах, рекомендованных Комитетом по обеспечению качества в сфере образования и науки МОН РК – 3 статьи.

- В республиканском журнале - 1 статья.

- В зарубежном журнале, входящим в базу данных SCOPUS – 1 статья.

- В журнале с импакт-фактором, индексируемом РИНЦ – 1 статья.

- Научно-практическая конференция (Астана, Казахстан) – 2 статьи.

- Научно-практическая конференция (Алматы, Казахстан) – 1 тезис.

- Научно-практическая конференция (Семей, Казахстан) – 1 тезис.

- Научно-практическая конференция (Саппоро, Япония) – 2 доклада.

### **Объем и структура диссертации**

Диссертация изложена на 98 страницах машинописного текста и состоит из списка сокращений и обозначений, введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов собственных исследований, заключения, включающего выводы, практические рекомендации и список использованных источников из 180 наименований. Работа иллюстрирована 16 рисунками, 29 таблицами.

## **1 ОМІС-ИССЛЕДОВАНИЯ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ И УЗЛОВЫХ НОВООБРАЗОВАНИЙ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ В КАЗАХСТАНЕ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)**

### **1.1 Рак щитовидной железы**

Онкологические заболевания в настоящее время представляют огромный интерес для всех ученых всего мира. Такая особенность обусловлена, в первую очередь, быстрым ростом числа встречаемости среди всех остальных заболеваний, во-вторых, своим происхождением и многообразием своего строения.

Согласно мировой статистике, численность населения Земли на июль месяц 2016 года приравнена к цифре около 7,3 миллиарда человек [23].

Каждый год, по данным ВОЗ, более 7,5 миллионов человек в мире умирают от онкологических заболеваний [24].

Из общего числа всех онкологических заболеваний на долю РЩЖ железы согласно литературным данным приходится около 3%, а в группе эндокринных опухолей данный показатель составляет до 90% и на него приходится до 60% смертности в данной группе опухолей [25, 26].

Среди всех злокачественных опухолей с тиреоидной локализацией, преобладает РЩЖ, тогда как другие виды опухолей, такие как лимфосаркома или метастазы в ЩЖ опухолей других органов встречаются крайне редко. На долю РЩЖ приходится более 90–95%, который представлен в основном опухолями, происходящими из клеток фолликулярного эпителия, а в остальных случаях – из парафолликулярных клеток [27].

Согласно данным Международного агентства по исследованию рака (МАИР), в 2018 году в мире диагностировано 567 233 новых случаев злокачественных заболеваний ЩЖ, тогда как по данным Национального института здоровья, в США на 2018 год зарегистрировано 60 845 случаев данной патологии и 2090 летальных исходов вследствие РЩЖ [28].

Первые сообщения о РЩЖ датируются XVIII столетием. Первое сохранившееся в литературе описание клинических проявлений РЩЖ относится к 1811г., и принадлежит Allan Burns из Glasgow. Гистологические изменения при злокачественном зобе впервые описал Леберт в 1862 г. В России первое описание клинической картины рака ЩЖ дали в 1893году Вернер Германович Цеге-фон-Мантейфель, в том же году М.С. Субботиным было впервые применено оперативное лечение.

Согласно данным длительного многоцентрового исследования, которое включало 13 центров или регистров рака и 39 002 участников, страдающих первичным РЩЖ, имеется высокий риск развития первично – множественного рака и при этом на 30% увеличивается риск развития рака ЩЖ после различных других первичных злокачественных опухолей [29].

Литературные данные по возрастным и гендерным аспектам показывают, что рак ЩЖ обычно возникает в возрасте до 50 лет, однако до 15% случаев диагностируют и в раннем юношеском периоде. По данным исследователей проведенных в Америке средний возраст на 2013 год постановки диагноза «рак ЩЖ», пришелся на 45-47 лет. Частота встречаемости диагноза «рак ЩЖ» в зависимости от возраста была распределена следующим образом. Около 2% случаев до 18-20 лет, около 19% случаев до 35 лет, более 24% случаев до 45 лет, максимально 30% случаев до 55 лет, до 65 лет частота встречаемости составила 15% случаев, до 75 лет до 10% случаев, между 75 до 85 лет до 6,0% случаев и для тех, кто старше 85 лет данный показатель составил 1,3% случаев. Таким образом, данные показатели свидетельствует о том, что до 65% случаев новообразований ЩЖ выявляются в период с 35 лет до 55 лет, за исключением, возможно, АРЩЖ [30].

Средний возраст диагностики ФРЩЖ и МРЩЖ приходится в возрасте на 50 лет, НДРЩЖ и АРЩЖ на 60 лет. Заболеваемость РЩЖ среди женщин особенно часто проявляется в возрасте 50 лет [31].

Средний возраст заболевших женщин на 2,5 года меньше, чем у мужчин, но встречается РЩЖ у женщин в среднем в 3 раза чаще. По мнению некоторых авторов, одним из гипотетических механизмов более частой заболеваемости РЩЖ среди женского населения является репродуктивная система. Транзиторная гиперсекреция тиреотропного гормона (ТТГ), происходящая во время беременности, может приводить к нарушению структурной качества самой железы и выступать в роли потенциального пускового фактора РЩЖ [32-35].

По данным экспериментальных работ, кратковременное и, тем более, продолжительное воздействие ТТГ на клетки ЩЖ могут приводить к ее увеличению в размерах вследствие клеточной пролиферации, а также в конечном итоге к зарождению или появлению неоплазии [36].

По данным немногочисленных исследований, доля рака ЩЖ среди всех узловых образований у мужчин выше в 2-3 раза, чем у женщин, и для него характерно более агрессивное и неблагоприятное течение [37].

Также показано, что риск возникновения семейной формы РЩЖ выше у мужчин, чем у женщин, несмотря на то, что частота встречаемости больше у женщин [38, 39].

Частота возникновения рака ЩЖ у детей существенно ниже, чем у взрослых, однако у детей отмечен более высокий риск малигнизации узлов ЩЖ, достигающий 6-10%, причем риск злокачественного процесса особенно повышен у мальчиков [40].

Среди детей заболеваемость раком ЩЖ расценивается как низкая, составляя около 0,5 случаев на 100 тысяч населения [41].

Из общего количества опухолей у детей рак ЩЖ составляет до 3% случаев, а среди злокачественных опухолей головы и шеи на его долю приходится до 15%. У взрослых, как отмечалось ранее, встречаемость рака ЩЖ в 3 раза больше у женщин, чем у мужчин, но в детском возрасте эти половые различия практически не выражены [42].

В течение нескольких десятилетий во всем мире проблема РЩЖ остается актуальной в связи с тем, что узловой зоб встречается у более 4% населения, и более чем в 90% случаев рак ЩЖ при первичном обследовании определяется как аденома [43].

Настораживающей тенденцией является также среднегодовой темп прироста заболеваемости РЩЖ в мире, оцениваемой около 10%, при уровне смертности от РЩЖ до 0,5%. [44].

Проблема РЩЖ, как одного из опасных и потенциально летальных заболеваний, является крайне актуальной, в том числе и для тиреологической службы Казахстана. В РК около 60% территории находится в условиях йодной недостаточности, и большинство населения

проживает в эндемических условиях. Имеются данные о том, что дефицит йода может повышать частоту РЩЖ. Согласно одному исследованию по заболеваемости раком ЩЖ, в двух областях Италии с разным йодным обеспечением частота новых случаев рака оказалась в 2 раза выше в области с йодным дефицитом, чем в йод-достаточном регионе [45].

По оценке МАИР, стандартизованный показатель заболеваемости РЩЖ в РК составил на 2018 год 2,4 на 100 тысяч населения при общей численности населения 18,6 млн. человек. Было зарегистрировано 486 новых случаев (396 женщин и 90 мужчин) [46].

Анализ динамики заболеваемости РЩЖ за период с 2005 до 2014 год показывает увеличение от 2,5 до 3,1 случаев на 100 тысяч населения, а показатель смертности составил 0,5 на 100 тысяч населения [47].

Заболеваемость РЩЖ по регионам РК в течение 2005 – 2014 гг. в Алматы и Алматинской области установлена в пределах 5,4 на 100 тысяч населения. Самый высокий показатель зарегистрирован в Северо-Казахстанской области, 7,0, самый низкий – в Южно-Казахстанской области, 0,6 на 100 тысяч населения [48].

Согласно классификации Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) [49], в настоящее время выделяют следующие основные гистологические типы РЩЖ, происходящие из фолликулярных клеток (в порядке убывания встречаемости в клинической практике): - папиллярный рак ЩЖ (ПРЩЖ) – 80-85%, - фолликулярный рак ЩЖ (ФРЩЖ) – 7-15%, - низкодифференцированный рак ЩЖ (НДРЩЖ) – 2-4%, - анапластический рак ЩЖ (АРЩЖ) – 1-2%. ПРЩЖ и ФРЩЖ, которые суммарно диагностируются в 90-95% случаев, относят к группе дифференцированного РЩЖ. Медуллярный рак ЩЖ (МРЩЖ) развивается из парафолликулярных клеток (С-клеток) и встречается в 3-5% случаев злокачественного поражения ЩЖ.

В клинике Мейо (США), например, за 61 год в период с 1940 по 2001 год, зарегистрированы 3048 пациентов с РЩЖ (исключая низко - или недифференцированные типы). Из них 2802 (92%) были представлены опухолями, происходящими из фолликулярного эпителия, среди которых в 90% случаев диагностирован ПРЩЖ (83% от общего числа случаев); в 246 (8%) случаев диагностировали МРЩЖ [49].

Папиллярный рак ЩЖ может развиваться в любой доле или перешейке ЩЖ, а в случаях эктопированной ткани – проявляться в виде тиреоглоссальной кисты или струмы яичника. Пик частоты выявления приходится на пациентов в возрасте 35-45 лет. Клинически классический ПРЩЖ обычно представляет собой объемное образование ЩЖ, сопровождающееся или не сопровождающееся увеличением шейных лимфоузлов. Частота регионарного метастазирования составляет около 30% у взрослых, и достигает 60-80% у детей. Метастазы, как правило, не имеют гормональной активности. Вероятность поражения различных групп лимфатических узлов связана с локализацией первичного очага в ЩЖ. Основной путь метастазирования –

лимфогенный. Осиплость голоса в силу повреждения опухолью возвратного нерва, а также дисфагия и нарушение дыхания при прорастании опухоли в трахею встречаются редко и более характерны для агрессивных опухолей. ПРЦЖ в целом хорошо поддается лечению и имеет благоприятный прогноз: 5-летняя выживаемость составляет 98% [50].

Основными онкогенными драйверами ПРЦЖ являются мутация гена BRAF, точковые мутации генов семейства RAS и генные перестройки, такие как RET/PTC, ETV6-NTRK и ряд перестроек с участием гена BRAF. Точковые мутации характерны для ПРЦЖ у взрослых пациентов, генные перестройки преобладают в ПРЦЖ у детей и подростков [51].

Из 14 гистопатологических вариантов ПРЦЖ, определенных ВОЗ, фолликулярный вариант ПРЦЖ является одним из достаточно частых; он встречается в 10-30%. В большинстве случаев на морфологическом исследовании отмечается формирование собственной капсулы опухоли. Этот подтип отличается медленным ростом, может оставаться на одной и той же стадии до 10 лет и более. Распространение в лимфатические узлы шейной области обнаруживается у 10-20% пациентов, что несколько ниже, чем у классического ПРЦЖ, у 95% пациентов поражение не выходит за пределы шеи [52].

С 2004 года в классификации ВОЗ опухолей эндокринного происхождения папиллярная микрокарцинома была выделена в самостоятельный вариант ПРЦЖ. По определению, микрокарцинома включает в себя опухоли до 10 мм в максимальном измерении. В клинической практике при послеоперационном гистопатологическом исследовании ткани ЩЖ, удаленной по причине доброкачественных заболеваний, папиллярная микрокарцинома может обнаруживаться в 2–24% случаев. Высокая частота случайного обнаружения папиллярной микрокарциномы нашло свое отражение в таких ранее использовавшихся названиях данной опухоли, как инциденталомы, скрытый РЦЖ. Регионарные метастазы могут выявляться в 10–20% случаев, а отдаленные метастазы крайне редко. Папиллярная микрокарцинома имеет очень хороший прогноз и может не увеличиваться в размерах на протяжении десятилетий. В настоящее время интенсивно дискутируется вопрос о необходимости лечения микрокарциномы у взрослых пациентов при отсутствии признаков местного распространенного процесса, в качестве альтернативы предлагается ее активное наблюдение. Многие авторы высказываются против тиреоидэктомии при микрокарциноме, связывая это с низким процентом рецидивов после оперативного лечения [53-55].

Фолликулярный рак ЩЖ (ФРЦЖ) – высокодифференцированная злокачественная опухоль, развивающаяся из фолликулярного эпителия ЩЖ, с выраженной в той или иной степени собственной капсулой. После ПРЦЖ ФРЦЖ является вторым по частоте встречаемости гистологическим типом РЦЖ, диагностируемым в 7–15% случаев. ФРЦЖ чаще выявляется у пациентов в возрасте 50 лет, что приблизительно на 10 лет позднее, чем при

ПРЦЖ. ФРЦЖ обычно протекает бессимптомно и проявляется в виде узла в ЩЖ. Дисфагия и нарушение дыхания не характерны. Метастазы в регионарные лимфатические узлы довольно редки и выявляются в 5% случаев. Отдаленные метастазы, однако, диагностируются у 10–20% пациентов, поскольку основной путь метастазирования ФРЦЖ – гематогенный. Наиболее часто поражаются кости, реже – легкие. В еще более редких случаях отдаленные метастазы могут обнаруживаться в головном мозге и печени. ФРЦЖ неплохо поддается лечению с показателем 5-летней выживаемости 85-95%. В ФРЦЖ часто выявляются точковые мутации генов семейства RAS и генная перестройка PAX8/PPARG. Мутация гена BRAF выявляется редко. Отметим, что эти же генетические изменения характерны и для наиболее распространенной доброкачественной опухоли ЩЖ, фолликулярной аденомы. Это указывает на общие молекулярные патогенетические механизмы, лежащие в основе развития ФРЦЖ и аденомы [56]

Следующей формой злокачественного поражения ЩЖ, развивающейся из фолликулярных клеток, является низкодифференцированный рак ЩЖ (НДРЦЖ). НДРЦЖ по клиническим и морфологическим особенностям занимает промежуточное место между дифференцированным ПРЦЖ и ФРЦЖ и недифференцированным анапластическим РЦЖ (АРЦЖ). В литературе прежних лет НДРЦЖ также назывался инсулярным или трабекулярным РЦЖ, а также РЦЖ солидного типа или РЦЖ повышенного риска. Впервые низкодифференцированный рак ЩЖ был описан в 1983 г. после проведенного гистологического исследования злокачественных новообразований ЩЖ у 258 пациентов из Японии [57], однако классифицирован ВОЗ как отдельная нозологическая единица в 1994 г. НДРЦЖ достаточно редок в клинической практике и встречается в разных странах в 0,3–7% всех случаев злокачественных новообразований ЩЖ. Возраст пациентов с НДРЦЖ обычно составляет 55-63 года. НДРЦЖ представляет собой агрессивные опухоли, в 60–70% случаев распространяющиеся в мягкие ткани, окружающие ЩЖ. Регионарные лимфоузлы поражаются в 15-65% случаев, а отдаленные метастазы выявляются у 40-70% пациентов. Основные локализации отдаленных метастазов – легкие, кости, головной мозг, печень, кожа, селезенка, почка. НДРЦЖ характеризуется агрессивным течением с неблагоприятным прогнозом. Прогрессирование и рецидивы заболевания в течение полутора лет отмечаются у более 70% больных [58].

В основном летальные исходы наблюдаются в течение 3-5 лет после установления диагноза, причиной смерти обычно является прогрессирование регионарных или отдаленных метастазов. Пятилетняя выживаемость составляет в среднем 60-70%. Наиболее частыми генетическими нарушениями, выявляемыми в НДРЦЖ, являются точковые мутации генов семейства RAS, активирующие мутации промотора гена TERT, мутации гена TP53, мутация BRAF выявляется в относительно небольшом числе случаев.

Наиболее редким, но самым агрессивным типом злокачественной опухоли ЩЖ, происходящей из клеток фолликулярного эпителия, является анапластический рак ЩЖ (АРЩЖ; синоним – недифференцированный РЩЖ). На АРЩЖ приходится 1-2% всех случаев РЩЖ. Обычно диагностируется у людей старше 60-65 лет [59].

Этиология АРЩЖ остается не установленной в полной мере, но одним из вероятных сценариев является перерождение ПРЩЖ, ФРЩЖ или НДРЩЖ, поскольку присутствие соответствующих гистологических структур не редко выявляются при патоморфологическом анализе опухолей, а многие пациенты имели в анамнезе эти заболевания [60].

Анапластический РЩЖ проявляется в виде плотного быстрорастущего объемного образования на шее и часто сопровождается болями, хрипотой, параличом голосовых связок, затрудненным дыханием и дисфагией. Практически во всех случаях наблюдается поражение регионарных лимфоузлов, а у 30-40% пациентов при диагнозе выявляются метастазы в легкие, кости и головной мозг. Прогноз АРЩЖ крайне неблагоприятный с медианной годичной выживаемости, не превышающей 10-20%. При анализе базы данных SEER с 1983 по 2002 год, в которую входили пациенты с АРЩЖ, которые прожили более месяца после лечения, средняя выживаемость составила не более четырех месяцев [61].

Для АРЩЖ характерными молекулярными изменениями являются мутации гена TP53, промотора гена TERT, мутации генов семейства RAS и мутация BRAF.

Медуллярный РЩЖ (МРЩЖ) является нечастым типом опухоли, развивающейся из парафолликулярных С-клеток, его частота доходит до 5% от всех опухолей [62].

Медуллярный РЩЖ обычно выявляют у людей старше 50 лет. Около 20% МРЩЖ в клинической практике – это семейные случаи, как правило, обусловленные наследуемыми точковыми мутациями в гене RET [63].

Соотношение мужчин и женщин при спорадической форме – один к одному. Впервые, происхождение данной опухоли из «С» клеток было уточнено в 1966 году [64].

Для МРЩЖ характерно быстрое распространение. Частым проявлением в период метастазирования является послабление стула, встречающегося в 30% случаев. В большей степени данный тип РЩЖ характеризуется гиперпродукцией кальцитонина, однако в 2-7% встречаются случаи с продукцией АКТГ и развитием эктопированного гиперкортизолемиического синдрома [65].

Согласно проведенному обзору литературных данных, существующие методы диагностики для выбора тактики лечения по-прежнему требуют совершенствования, в особенности это справедливо для ранней дооперационной дифференциальной диагностики. Одним из перспективных подходов служит выявление генетических изменений, обуславливающих

развитие разных типов РЩЖ. Молекулярная диагностика является клинически востребованным научным направлением в медицине, в том числе и в условиях Казахстана.

## **1.2 Современные подходы к диагностике рака щитовидной железы**

Проблемам современного подхода к диагностике РЩЖ в настоящее время уделяется огромное внимание. На ранних этапах предоперационного выявления рака ЩЖ необходимо провести дифференциальную диагностику между выявленными узловыми новообразованиями ЩЖ, которые требуют оперативного вмешательства с определением необходимого объема и узлы, не требующие такового [66].

Актуальность вопросов диагностики рака на ранних этапах, обусловлена в первую очередь увеличением частоты встречаемости РЩЖ и риска смертности. Риск смертности обусловлен тем, что в более 60% случаев рак диагностируется на поздних, как правило, на терминальных стадиях, когда опухоль распространилась по всему организму и поразила ряд систем [67].

Рак ЩЖ является частой диагностической проблемой в клинической медицине. При случайном проведении ультразвукового исследования (УЗИ), узлы ЩЖ обнаруживаются до 68% случаев, с более частой встречаемостью у женщин и пожилых людей [68].

Главным дифференциальным диагностическим требованием ко всем узловым образованиям ЩЖ более 1,0 см на раннем дооперационном этапе является необходимость исключения или подтверждения РЩЖ, который встречается в 15% случаев в зависимости от возраста, пола и других факторов, таких как, облучение и семейная предрасположенность [69].

Проводимые научные исследования в течение нескольких десятилетий демонстрируют большие достижения в области диагностики узловых новообразований ЩЖ, но единого алгоритма с оптимальными методами, позволяющего с полной достоверностью и высокой специфичностью проводить дифференциальную диагностику, в особенности на раннем дооперационном этапе, до сих пор не существует.

На начальных этапах дифференциальной диагностики доброкачественных и злокачественных узловых образований ЩЖ знание одних лишь данных физикального и объективного статуса не представляется достаточным и полным. В большинстве случаев общее состояние пациентов и клиническая картина на данном этапе не претерпевает значительных изменений [70].

Дальнейшее обследование посредством проведения пальпации не обеспечивает достаточной и точной информации и не имеет достоверных разграничительных критериев в силу того, что злокачественные образования пальпаторно практически идентичны доброкачественным. Злокачественные и доброкачественные новообразования ЩЖ могут иметь характерные общие признаки, такие как, плотность, подвижность, вызывать компрессионный синдром, осиплость голоса и, конечно же, болезненность [71].

Чувствительность дифференциальной диагностики посредством проведения или использования метода пальпации по сравнению с другими методами составляет 63%, тогда как 67% достигает специфичность и 65% точность [72].

Дальнейшая оптимизация диагностических методов в области узловых новообразований ЩЖ, особенно в плане диагностики РЩЖ, является очень важной. Обусловлено это тем, что любое образование неясной этиологии может иметь злокачественную природу и нести угрозу для жизни. Своевременная и ранняя диагностика с подбором и проведением оптимального лечения в дальнейшем обеспечивает 96% 10-летнюю выживаемость пациентов с РЩЖ [73].

Частое сочетание рака ЩЖ с иной сопутствующей тиреоидной патологией и отсутствие четких и явных клинических изменений усложняют проведение достаточно достоверной дифференциальной диагностики [74].

Согласно последним и современным литературным источникам имеется множество рекомендаций по основным диагностическим критериям и методам. Но, несмотря на их огромное количество, идентификация злокачественных новообразований ЩЖ продолжает оставаться одной из самых важных проблем для медицины, в особенности на раннем дооперационном этапе [75].

При планировании алгоритма дифференциальной диагностики на раннем дооперационном этапе, первостепенное место занимает комплексное обследование пациентов, которое включает в себя как субъективные, так и объективные методы исследований. Диагностическими методами для проведения комплексного обследования и оценки распространенности опухолевого процесса при РЩЖ железы являются методы лабораторной и лучевой диагностики.

К методам лабораторной диагностики относят исследование уровня гормонов ЩЖ (свободный Т4, кальцитонин) а также тиреотропного гормона (ТТГ) и тиреоглобулина (ТГ) и тонкоигольную аспирационную пункционную биопсию (ТАПБ). Именно ТАПБ из всех имеющихся методов лабораторной диагностики является наиболее достоверным способом оценки патологических изменений в ЩЖ [76].

Согласно рекомендациям Американской Тиреологической Ассоциации (АТА), при обнаружении узловых образований в щитовидной железе более одного сантиметра, уже на самом начальном этапе в сыворотке крови должен быть определен уровень ТТГ. Если его уровень будет изменен по типу субклинического гипотиреоза (СКГ) или является подавленным, следует провести радиоизотопное исследование ЩЖ, с целью исследования функционального состояния самого узла. Очаги или участки с избыточным накоплением изотопа встречаются при тиреотоксикозе или злокачественных новообразованиях из гормонпродуцирующих клеток. Очаги, имеющие меньшее поглощение, чем окружающая их ткань ЩЖ, такие участки отражают скопление гипофункциональной ткани, встречаются при кисте или раке [77].

Гиперфункционирующие узлы на фоне явного или СКГ редко являются показателем злокачественности и требуют цитологического анализа. Высокий уровень ТТГ в сыворотке крови, даже на верхней границе нормального диапазона, может быть связан с повышенным риском злокачественных новообразований ЩЖ, а также более высокой стадией РЩЖ [78].

Согласно показаниям тиреоидологической ассоциации в Америке, измерение ТГ в плазме крови с целью дифференциальной диагностики узловых образований ЩЖ проводить не рекомендуется. Так как, концентрация ТГ в плазме крови может быть повышена при других тиреоидных патологиях. Вследствие чего данный показатель имеет низкую чувствительность и расценивается на сегодняшний день, как неспецифический онкомаркер РЩЖ [79].

Достоверных литературных данных за облигатную или факультативную необходимость измерения кальцитонина в сыворотке крови у больных с узловыми образованиями ЩЖ в настоящее время нет. Однако согласно некоторым литературным источникам было показано, что скрининговое измерение сывороточного кальцитонина может обнаружить С-клеточную гиперплазию и МРЩЖ на более ранних стадиях и, следовательно, может улучшить диагностику, также в выводах данной работы предполагается возможное скрининговое использование кальцитонина [80].

По данным Российских ученых определение кальцитонина в сыворотке крови для диагностики МРЩЖ не применяется, оно скорее актуально для динамического наблюдения после тиреоидэктомии. Согласно другим источникам, при превышении уровня кальцитонина в 50-100 Пг/мл диагноз МРЩЖ является достоверным [81].

По данным последних исследований, измерение кальцитонина в смывах ТАПБ может быть полезным в предоперационной диагностике МРЩЖ сопровождающегося незначительным повышением базального уровня кальцитонина [82].

Измерение уровня кальцитонина для предоперационной диагностики МРЩЖ до сих пор продолжает быть дискуссионным и спорным вопросом. Однако согласно некоторым исследованиям, определение кальцитонина играет немаловажную роль в дифференциальной диагностике узловых новообразований и может быть использовано для диагностической оценки [83].

К методам лучевой диагностики относят ультразвуковое исследование (УЗИ), магнитно-резонансную томографию (МРТ), позитронно-эмиссионную томографию (ПЭТ) и сцинтиграфию. Из всех методов лучевой диагностики наибольшее применение в выявлении РЩЖ получило ультразвуковое исследование в силу своей доступности и безопасности. Современные аппараты ультразвуковой диагностики способны выявлять узловые образования ЩЖ размером до 1-2мм [84].

Компьютерная или магнитно-резонансная томография согласно многочисленным исследованиям не получила широкого применения в

диагностике РЩЖ в силу своей дороговизны и сложности технического обслуживания оборудования, а также отсутствия абсолютного превосходства над более доступным и легким в использовании УЗИ. Эти методы используются лишь в случаях эктопического расположения ЩЖ и при необходимости оценки метастазов и степени поражения соседних органов и систем [85].

Радиоизотопное сканирование ЩЖ, также не является специфическим методом диагностики РЩЖ. По данным некоторых исследований, специфичность данного метода составляет около 43%. Узловые образования, сильно накапливающие радиоизотоп и не накапливающие его, в одинаковой степени могут быть злокачественными [86].

Позитронно-эмиссионная томография в настоящее время является одним из методов радионуклидного исследования и широко используется для топической диагностики метастазов и локального рецидива. По данным литературных источников, чувствительность данного метода составляет 85%, а специфичность 95% [87].

Таким образом, по-прежнему, самым доступным и надежным методом лучевой диагностики новообразований ЩЖ является УЗИ.

### **1.3 Тонкоигольная аспирационная пункционная биопсия щитовидной железы**

Тонкоигольная аспирационная пункционная биопсия ЩЖ является наиболее точным и экономически выгодным методом для диагностики узловых новообразований ЩЖ. В настоящее время ВОЗ для единого описания результатов ТАПБ рекомендует использовать единую терминологическую классификацию, разработанную в клинике Бетезда США в 2007 году [88] и доработанную в 2017 году [89]

Система распознает шесть диагностических категорий и обеспечивает оценку риска РЩЖ в каждой из них. Это позволяет врачу-эндокринологу определить порядок дальнейших действий. В каждой категории отражены предполагаемые от 0-3% либо очевидные, до 100%, риски малигнизации.

**Б I. UNS (Non-diagnostic or Unsatisfactory)** – Недиагностический или неадекватный материал, полученный в результате биопсии, материал не позволяет дать четкое заключение и установить диагноз (например, в пунктате присутствует только межклеточная жидкость, имеются элементы крови, практически отсутствуют клетки). Вероятность злокачественного процесса –5-10%, необходима повторная биопсия. Доля недиагностического или неадекватного материала в клинической практике составляет 2-20%, но может достигать и до 30%.

**Б II. Benign** – Доброкачественный (коллоидный) узел. Не является опухолью. Представлен участком разрастания клеток ЩЖ, формирующих округлое образование, напоминающее при УЗИ опухоль. Коллоидные узлы не

требуют лечения и не перерождаются в РЩЖ. Вероятность злокачественного процесса 0-3%,

- Аутоиммунный (лимфоцитарный), хронический тиреоидит в соответствующем клиническом контексте.

**Б III. AUS (Atypia of Undetermined Significance)** – Атипия неясного генеза или изменения клеток фолликулярного эпителия неясной этиологии. Морфологические изменения, трудно дифференцируемые между доброкачественными и подозрительными в отношении малигнизации. Вероятность злокачественного процесса 6-30%,

**Б IV. FN/SFN (Follicular Neoplasm or Suspicious for Follicular Neoplasm)** – Фолликулярная опухоль или подозрение на фолликулярную опухоль. Совокупность морфологических и гистологических критериев новообразования, диагностируемого как ФРЩЖ и требующего хирургического вмешательства. Данные критерии не позволяют дифференцировать фолликулярную аденому и ФРЩЖ, однако предполагают тактику оперативного вмешательства (чаще удаления доли ЩЖ). Вероятность злокачественного процесса 10-40%,

**Б V. Suspicious for Malignancy** – Подозрение на малигнизацию. Вероятность злокачественного процесса 45-75%,

- Наличие 1-2 цитоморфологических признаков рака, не характерных для всей представленной популяции клеток.

- Образец малоклеточный, диагноз рака не может быть поставлен с уверенностью.

- Узел, подозрительный в отношении: папиллярного рака; медуллярного рака; метастатического рака; лимфомы.

**Б VI. Malignancy** – Малигнизация. Вероятность злокачественного процесса 94-99%

Данная система оценки цитологии ЩЖ была разработана для упрощения терминологии ТАПБ и улучшения клинического ведения пациента. Все исследования, в которых применялась данная система, показали достаточно хорошее совпадение в отчетности ТАПБ [90].

Результат ТАПБ зависит от ряда факторов, в том числе и от мастерства медицинских работников, методики проведения, подготовки образцов и цитологического заключения. Подготовленное и более квалифицированное проведение ТАПБ под контролем УЗИ позволяет добиться цитологической верификации диагноза с высокой точностью даже у пациентов с узлами менее 5 мм [91].

ТАПБ по-прежнему остается процедурой выбора для предоперационной диагностики РЩЖ, но во многих случаях не позволяет добиться дифференциального диагноза [92].

Одной из известных проблем является невозможность отличить ФРЩЖ от фолликулярной аденомы, даже морфологически, что в 80% случаев приводит к проведению неадекватной тиреоидэктомии [93].

В результате определенного несовершенства диагностических методов некоторым пациентам проводится оперативное лечение не по поводу РЦЖ. И, напротив, пациенты со злокачественными новообразованиями ЩЖ после прохождения ТАПБ с заключением «без атипии» получают амбулаторное лечение по месту жительства.

Результаты многочисленных, а если быть точным, 12 исследований показали, что среди 4055 прооперированных пациентов с доброкачественным цитологическим заключением уровень злокачественности согласно гистологическому заключению составил 3,2% [94].

Согласно одному литературному источнику, где на предоперационном этапе выполнялась ТАПБ, среди 125 образцов с цитологическим заключением о доброкачественной природе узлов, 10,4% оказались злокачественными по результатам послеоперационной гистопатологии. В других работах в течение 3 лет были исследованы более 1400 пациентов с узлами размером более 3см, и в 66% случаев был найден рак, несмотря на первоначальные доброкачественные заключения цитологии. Именно поэтому ряд ученых считают ТАПБ методом скрининга [95].

Однозначно, одним из немаловажных показателей, который снижает диагностическую точность ТАПБ, является интерпретация полученного материала [96].

К факторам, которые усложняют проведение интерпретации, относятся в первую очередь неоднородность строения и цитологическое многообразие РЦЖ [97].

Метод аспирационной биопсии, как один из методов дооперационной диагностики рака ЩЖ – очень хороший и экономически доступный. Но данный метод показывает лишь состояние клеток только из той небольшой области, из которой был взят пунктат, и совсем не показывает состояние соседней области узла или других образований, которые могут быть в ЩЖ, в том числе и таковые размером до 1мм и практически не диагностируемые при жизни.

Преодоперационная постановка диагноза РЦЖ по-прежнему продолжает оставаться неоптимальной и не окончательной.

#### **1.4 Ультразвуковое исследование щитовидной железы**

В настоящее время одним из чувствительных методом в диагностике узловых образований ЩЖ является УЗИ высокой разрешающей способности. Чувствительность УЗИ в диагностике РЦЖ составляет 46-93%, специфичность 50-92%, точность 74-87% [98].

УЗИ ЩЖ и других органов используется повсеместно и повсюду. Данный метод исследования проводится почти у каждого второго человека в течение жизни, в том числе у всех пациентов с подозрением на узловых образований ЩЖ. Первоочередной задачей при УЗИ является проведение оценки однородности паренхимы ЩЖ на предмет наличия качественных изменений по типу узловых образований, далее оценивается размер железы и расположение.

Однако многообразие особенностей ультразвуковой картины опухолей ЩЖ создают некоторые затруднения в интерпретации такого рода информации [99].

При наличии неопределенных включений, проводится полное описание визуализированной картины с расшифровкой узловых образований, куда обязательно входит описание консистенции: твердый узел или мягкий, размер и форма, однородность, наличие кальцинатов и кровоснабжение. В особенности такую расшифровку УЗИ необходимо проводить у всех пациентов со сниженным уровнем ТТГ в крови, а также после проведения сцинтиграфии, чтобы оценить локальную необходимость проведения ТАПБ [100].

Впервые об успешном применении ультразвуковых волн для исследования ЩЖ было сообщено в 1966 году, а дальнейшее применение УЗИ привело к значительному росту частоты встречаемости и выявляемости узловых образований [101].

Многочисленные исследования, проводимые во всем мире, подтверждают, что это связано не только с ростом самой патологии, но и с улучшением качества диагностики, а именно применении УЗИ. Такая ситуация привела к тому, что по статистике у каждого второго жителя нашей планеты диагностируются признаки узлового зоба или что более 50% населения имеют узловые образования ЩЖ различных размеров [102].

По данным проведенных исследований около 80-90% людей к возрасту старше 70-80 лет имеют в ЩЖ одно или несколько узловых образований, и подавляющее большинство этих узлов являются доброкачественными. Риск наличия рака ЩЖ среди всех выявленных узловых образований ЩЖ составляют 1-10% [103].

На сегодняшний день согласно зарубежным и отечественным литературным данным, узловые образования ЩЖ являются достаточно распространенной эндокринной патологией во всем мире [104].

Согласно имеющимся данным по регионам России, ежегодный прирост заболеваемости узловым зобом составляет в молодом возрасте около 0,1%, а в пожилом достигает 2%, преимущественно у женщин с соотношением с мужчинами 4:1 [105].

По данным американских исследователей, ежегодно в США выявляются более 300 000 новых случаев наличия узлов в ЩЖ [106].

Частота встречаемости узлового зоба напрямую зависит от йодной обеспеченности. Согласно статистике, заболеваниями ЩЖ страдает до трети всего населения, узловые образования при этом выявляются примерно у 4-7% взрослого населения, проживающих в регионах с нормальной йодной обеспеченностью и у более 30% у взрослого населения, проживающего в эндемических регионах [107].

По рекомендациям АТА, всем пациентам с узловыми образованиями ЩЖ необходимо проводить УЗИ, которое входит в план обследования всех пациентов с узловым или многоузловым зобом [108].

Дооперационное УЗИ ЩЖ позволяет идентифицировать узловые образования различных форм и размеров, что помогает в дальнейшем определиться в отношении злокачественности и необходимости проведения ТАПБ, а также, самое главное, о необходимости обоснованного хирургического вмешательства [109].

Согласно многочисленным литературным источникам, в случае наличия нескольких узловых образований при проведении УЗИ ЩЖ, необходимо вначале пунктировать узлы, которые имеют подозрительные ультразвуковые признаки. Плохими признаками узлового образования являются: гипоехогенность, микрокальцинаты, неровные контуры узла, губчатое строение узла, усиленная интранодулярная васкуляризация, высокое соотношение высоты узла к ширине. Однако следует принимать во внимание, что наличие только одного из признаков не позволяет отличить доброкачественные узловые образования от злокачественных, и что именно совокупность ультразвуковых признаков позволяет оценить риск злокачественности [110-112]

В настоящее время для классификации узлов ЩЖ и оценки риска злокачественности используется система TI-RADS, которая по совокупности УЗ-признаков показывает в процентах вероятность злокачественности [113].

Согласно данной системе, для дифференциальной диагностики между злокачественными и доброкачественными опухолями ЩЖ в первую очередь имеет значение форма самого узлового образования. В большинстве случаев, а именно в 97%, при РЩЖ узловые образования носят измененный и неправильный контур [114].

Во вторую очередь имеют значение дополнительные или различного рода включения в виде гиперэхогенных участков с акустической тенью, так называемые кальцинаты. При УЗИ кальцинаты могут выявляться как при РЩЖ, так и при узловых образованиях без атипии. Согласно имеющимся данным все же, до 95% кальцинатов определяются при ПРЩЖ [115].

Следующим признаком дифференциальной диагностики злокачественных образований на УЗИ является наличие своего рода гипоехогенного ободка, который возникает вследствие компрессии сосудов по периферии узла. Однако данный характерный признак говорит в большей степени за доброкачественность, так как злокачественные узлы растут быстро и кровеносные сосуды не успевают оттесниться к периферии. Для злокачественных узловых новообразований ЩЖ характерен нечеткий ободок или в некоторых случаях полное его отсутствие [116].

Нечеткость контура визуализированных новообразований ЩЖ несет немаловажную дифференциальную информацию. Для злокачественных узлов с прорастанием в паренхиму щитовидной железы характерен более прерывистый и нечеткий контур [117].

Васкуляризация узловых образований ЩЖ также является ценным прогностическим признаком. В зависимости от вида распространения, выделяют несколько типов: интранодулярный, нодулярный, и смешанный. В

зависимости от интенсивности выделяют повышенный и пониженный тип кровоснабжения [118].

Для злокачественных узловых новообразований характерно усиленное кровоснабжение как внутри узла, так и за его пределами [119].

Для доброкачественных образований более характерно пониженное кровоснабжение или даже его отсутствие. Так, для кистозных образований пониженное кровоснабжение отмечается в 85,3% случаев, а для коллоидных узлов в 60,5% случаев. И, напротив, в случаях аденом характерен усиленный смешанного вида кровоток [120].

Однако следует отметить, что в настоящее время ни один из УЗ-признаков и методов УЗ-диагностики, включая и соноэластографию, не могут с высокой степенью достоверности и высоким положительным прогностическим значением считаться средством дифференциальной диагностики рака ЩЖ [121].

### **1.5 Молекулярно – генетические OMICS исследования**

Одним из особенных достижений современной медицины является внедрение и применение молекулярно-генетических методов исследования (МГМИ). Имеющиеся в настоящее время методы являются передовыми, и используются для дифференциальной диагностики в таких областях как онкология и генетика. МГМИ позволяют быстрее, с высокой достоверностью и на самых ранних этапах проводить дифференциальную диагностику онкологических заболеваний. Это в свою очередь помогает с решением вопросов предоперационной подготовки и оперативного лечения. К МГМИ относятся высокопроизводительные OMICS-технологии, где используются постгеномные подходы [122, 123].

В современной медицине для постановки дифференциального диагноза, особенно в онкологии, требуются диагностические методы с достаточным и достоверным потенциалом в плане определения в первую очередь специфических или кандидатных биомаркеров.

Онкомаркеры, определяемые посредством биохимического исследования, не требуют больших затрат и являются по сути малоинвазивными. К ним можно отнести такие онкомаркеры как, РЭА, СА199, СА724. Однако сывороточные уровни онкомаркеров могут не в полной мере отражать ситуацию с очагом поражения, что отрицательно сказывается на показателях тестов. Также на достоверность результатов определения онкомаркеров могут влиять общераспространенные воспалительные процессы и доброкачественные новообразования [124].

Онкомаркеры, определяемые посредством иммуногистохимического исследования требуют больших затрат и вмешательств. Иммуногистохимия (ИГХ) – это высокотехнологичный метод, используемый для выявления точной локализации антигенов, синтезирующихся в процессе физиологических или патофизиологических процессов на клеточном или тканевом уровне. В

настоящее время ИГХ является одним из методов, которые используются в оценке патологоанатомических, морфофизиологических и онкоморфологических заключений [125].

Современная дифференциальная гистогенетическая и онкоморфологическая диагностика требует использование ИГХ - исследования с целью полной верификации диагноза, определения метастазов, и важна для выбора дальнейшего лечения и определения прогноза [126].

На данный момент имеются различные методы и виды ИГХ - исследования. Наиболее часто используется метод непрямого окрашивания, который заключается в последовательном использовании первичных антител, специфичных к определенному антигену, и, затем, конъюгированных с ферментом – меткой вторичных антител, которые связываются с первичными антителами [127].

Для повышения чувствительности непрямого метода применяют полимерные конъюгаты, способные обеспечивать большее отношение молекул метки к антителу, чем достигается усиление сигнала [128].

Отметим, что достоверность ИГХ - исследования в большинстве случаев зависит от множества факторов, в числе которых в первую очередь, такие как, используемые реагенты, методика проведения и проведение самой реакции [129].

Также, очень весомым недостатком данного метода является его инвазивность. Для данного исследования необходим биопсийный материал, который может быть недоступен на ранних преоперационных этапах [130].

Еще одним методом, используемым для определения онкомаркеров злокачественных заболеваний, является метод полимеразной цепной реакции (ПЦР). Данный метод не является инвазивным и требует лишь минимального количества генетического материала опухоли. Использование данного метода в дооперационной дифференциальной диагностике злокачественных новообразований позволяет достичь высокой чувствительности благодаря повторяющимся циклам синтеза ДНК [131].

Согласно, научным исследованиям, направленных на поиск и выявление новых онкомаркеров методами, основанными на ПЦР, наиболее чувствительным подходом является ПЦР в реальном времени (Real-TimePCR). Его основным достоинством является возможность количественно определить генетический онкомаркер [132].

Согласно исследованию, проведенному с целью сравнения ИГХ и ПЦР, было показано, что совпадение результатов можно ожидать в более чем 80% анализов [133].

## **1.6 Метаболомика: определение, особенности, подходы и применение в мировой практике**

В современном мире молекулярно-биологические исследования характеризуются применением различных технологий, позволяющих получить

комплексное описание свойств биологического объекта на различных имеющихся уровнях. Наиболее часто исследования ведутся на геномном уровне, далее на транскриптомном, протеомном и, в конечном счете, на завершающем данную исследовательскую последовательность, но на не менее важном, метаболомном уровне.

Совместное применение данных технологий позволяет систематически исследовать процессы, которые протекают во всех живых организмах и системах, поочередно проследив весь поток информации, начиная от генов и заканчивая фенотипом, фокусируя исследовательский интерес на любом уровне, в том числе и на метаболомном. Все эти методы исследования объединяют в понятие OMICS-технологии.

"OMICS" в переводе с греческого означает «полный, целый, весь», а OMICS-технологии являются одним из главных методов поиска биомаркеров, подходящих для дифференциальной диагностики. Это основа распределения всех компонентов живого организма в целом; данный вид исследований является наиболее близким к решению самых сложных вопросов дифференциальной диагностики онкологических заболеваний.

Метаболомика (от англ. *metabolomics*, греч. *Metabolism* + суффикс – *omics*) – область современной науки, изучающая совокупность и количественное содержание в организме всех начальных, промежуточных и конечных продуктов клеточного метаболизма. Объектом исследования являются низкомолекулярные метаболиты, отражающие биологические процессы в клетке, ткани или организме, и представляющие собой важный составной элемент фенотипа.

Пионером такого рода исследований является L. Pauling, который в 1971 году предложил использовать метаболомные исследования для диагностики различных заболеваний посредством проведения анализа выдыхаемого воздуха, при дыхании пациентов используя при этом метод газовой хроматографии. Посредством такого рода исследований, на тот момент, уже было обнаружено более двухсот летучих органических соединений, различного характера.

В начале 2007 года, а именно в январе месяце ученые из Альбертовского университета и университета Калгари закончили свои проводимые исследования по расшифровке метаболомического профиля человека. В целом было идентифицировано более 2500 метаболитов из 1200 лекарств и 3500 компонентов пищи, которые могут быть найдены во всех биологических частях человеческого организма [134].

Метаболомические исследования (МИ) – относительно новое и быстро развивающееся научное направление. Метаболиты – это молекулы массой менее 3000 Да, которые участвуют во всех начальных, промежуточных и конечных метаболомических реакциях; они являются естественной составляющей гомеостаза и функционирования клеток.

Совокупность всех метаболитов называется метаболомом, так как, метаболиты характеризуются различными физико-химическими свойствами.

Метаболом – это полный набор всех метаболитов биологического объекта. Метаболом традиционно изучается методами аналитической химии, ориентированными на определенные группы химических веществ.

От момента зарождения OMICS-технологий до настоящего времени метаболомика, также как и остальные направления, претерпела некоторые изменения в подходах. Сейчас метаболомика основывается на применении масс-спектрометрических методов. Такими методами являются метаболический фингерпринтинг и метаболическое профилирование.

Метаболический фингерпринтинг позволяет получать самую различную информацию через анализ спектра всего метаболома. Метаболическое профилирование позволяет получать информацию за счет детального исследования отдельных групп метаболитов с возможностью их дальнейшей идентификации, что позволяет вести поиск биомаркеров различных заболеваний, включая онкологические.

Последние исследования в данной области показали, что метаболомика может успешно применяться в диагностике и прогнозе онкологических заболеваний посредством определения биомаркеров со специфическими признаками болезни в биологических жидкостях [135].

В настоящее время описаны многочисленные метаболиты биологических жидкостей таких как, моча, спинномозговая жидкость и плазма крови. Исследования образцов биологических жидкостей на предмет спектра метаболитов выполняются с использованием различных методов хроматографии, куда входят газовая хроматография (ГХ) и жидкостная хроматография (ЖХ), а также метод масс-спектрометрии (МС) и метод спектроскопии ядерного магнитного резонанса (ЯМР - спектроскопия). Газовая хроматография является универсальным методом для разделения смеси веществ, испаряющихся без разложения [136]. Масс-спектрометрия и ЯМР спектроскопия являются универсальными и основными двумя методами, которые используются для сбора метаболомических данных. Данные два метода в настоящее время, достигли высокого уровня по сбору метаболомных данных [137].

Масс-спектрометрия имеет высокую чувствительность и позволяет обнаружить метаболиты в различных органах и тканях на любом уровне. Сочетание нескольких методов, а именно сочетание МС с ЖХ или ГХ позволяет проводить анализ до нескольких сотен отдельно взятых метаболитов из одного или нескольких образцов, что вместе с постоянно обновляемыми базами метаболомных данных делает идентификацию любых ранее не известных метаболитов довольно таки простой и очень доступной для любого исследователя [138].

Однако метаболомные исследования имеют особенности, отличающие их от других, так называемых, “пост - геномных” технологий. Первое – это изменчивость концентраций метаболитов в организме в зависимости от его состояния и времени суток. Это в свою очередь требует проведения

определенной и дополнительной стандартизации протоколов метаболомного анализа. Второе – это отсутствие строгой видовой специфичности, когда поступающие с пищей вещества оказывают влияние на результаты исследований. Третье – это различия свойств и концентраций метаболитов, обусловленные тем, что метаболиты относятся к разным типам и выполняют разные функции.

Метаболомные исследования показали свою потенциальную перспективу и по данным проведенных научно-исследовательских работ были получены многочисленные положительные результаты.

И так, что касается онкоурологии, то в работе А. Sreekumar совместно с несколькими исследователями был проведен анализ метаболомического профиля у пациентов с диагнозом «рак предстательной железы». Метаболомический профиль был проведен с целью выявления особенностей данной патологии среди 42 образцов ткани, 110 образцов мочи и 110 образцов плазмы крови. На основе результатов ГХ и ЯМР-спектроскопии в общей сложности были идентифицированы 1126 метаболитов, которые принадлежали разным органическим подгруппам. Специфическими и чувствительными для рака предстательной железы были идентифицированы из всего большого списка около 87 метаболитов, которые были значительно отличающимися от образцов других исследуемых групп. Концентрация таких метаболитов, как «саркозин», «урацил», «кинуренин», «глицерин-3-фосфат», «лейцин» и «пролин» значительно была высокой во всех образцах больных с раком предстательной железы и прогрессирования злокачественности самого заболевания. В конечном итоге было установлено, то, что высокие концентрации метаболита «саркозина» были в значительной степени увеличены у пациентов с метастатическими поражениями и именно на поздних терминальных стадиях. Таким образом, авторами был сделан вывод о том, что метаболит «саркозин» может быть не только биомаркером рака предстательной железы, но и показателем метастазирования данного заболевания [139].

В работе С. Silva с соавтором было проведено исследование спектра метаболитов в моче для использования в дальнейшем, как потенциальных биомаркеров онкологических заболеваний. Было проведено исследование, где были проанализированы 33 образца мочи у 14 больных с лейкемией, у 12 больных с колоректальным раком, и у 7 больных с лимфомой, а также среди 21 пациентов входящих в контрольную группу без данных патологий. В ходе исследования во всех группах (онкологической, контрольной) был идентифицирован спектр метаболитов в общей сложности, состоящий из 82 метаболитов, которые также принадлежали к различным химическим группам. В онкологической группе были идентифицированы метаболиты, принадлежащие к группе производных бензола и терпеноиды, но наиболее распространенными представителями были соединения относящиеся к группе фенолы. Для контрольной группы выделенными из мочи здоровых людей, был

обнаружен спектр метаболитов, относящийся к таким соединениям как, кетоны и серосодержащие вещества [140].

В такой отрасли как онкогинекология, было проведено исследование по поводу рака яичников. А именно был проведен анализ спектра метаболитов в 66 образцах тканей взятых у больных с инвазивной формой рака яичников и в 9 образцах другой группы исследуемых, а именно у больных с доброкачественными опухолями яичников. В ходе исследования были получены результаты показывающие, что существуют более чем 50 определенных метаболитов различающихся между данными группами. Многие из этих метаболитов играют важную роль в пуриновом и пиридиновом обмене, а также в самом энергетическом обмене для постройки организма.

На более поздних этапах метаболомных исследований была продемонстрирована возможность определения спектра метаболитов в образцах ткани опухоли для гистопатологической диагностики при помощи метаболомических исследований. В работе M. Brown совместно с соавт., была показана возможность применения разработанной методики для совместной идентификации спектра метаболитов и гистологического анализа полученных образцов ткани опухоли. Важной особенностью проведения такого рода исследований, является возможность идентификации спектра метаболитов в неповрежденных биоптатах. Даная особенность позволяет проводить два данных метода диагностики в одном и том же биологическом образце. Такого рода исследования позволили идентифицировать спектр метаболитов у больных с раком кишечника, раком надпочечника и раком селезенки. В ходе таких исследований был идентифицирован спектр метаболитов, принадлежащий к аминокислотным, углеводным и липидным групповым соединениям, а также были обнаружены ксенобиотики. Также были идентифицированы около 70 метаболитов, которые в значительной степени отличались по концентрации у больных со злокачественной опухолью в почках и от образцов плазмы крови у больных с доброкачественными опухолями в почках [141].

По литературным данным имеются лишь единичные работы в онкоэндокринологии, а именно работы связанные с исследованиями рака ЩЖ. В работе Yuan Tianc соавт., было проведено исследование спектра метаболитов в 53 образцах плазмы крови у больных с раком ЩЖ. В ходе исследования при помощи данных полученных при проведении ГХ и ЯМР-спектроскопии был идентифицирован спектр метаболитов, которые относились к различным химическим группам. Был идентифицирован спектр метаболитов с повышенной концентрацией таких метаболитов как, «сукцинат», «фумарат», «пальмитиновая и стеариновая кислота», и «глутатион». Авторами сделан вывод, что данные метаболиты могут стать специфическими и чувствительными биомаркерами рака ЩЖ [142].

За последние несколько лет значительно выросло количество метаболомных исследований с целью поиска в крови новых биомаркеров

онкологических, сердечно - сосудистых, эндокринных и генетических заболеваний [143-145].

Метаболический анализ образцов крови женщин с ранней стадией рака яичника, пациенток с кистой яичника и здоровых женщин позволил дифференцировать все три группы друг от друга [146].

Метаболическое исследование образцов крови больных мужчин с раком простаты выявило 6 метаболитов, позволяющих диагностировать рак с более высоким уровнем точности, чем тест на простатический специфический антиген [147].

Таким образом, наблюдаемое в последнее время стремительное развитие OMICS-технологий и их использование в научных работах, позволило эффективнее изучать изменения на уровне генома и метаболома при различных заболеваниях, в том числе и онкологических. На сегодняшний день метаболомика, как одно из новых направлений OMICS-технологий, продолжает интенсивно развиваться и внедряться в научных исследованиях.

Метаболомика среди OMICS-технологий имеет ряд преимуществ. Первое – это непосредственное и прямое исследование фенотипа, в результате которого имеется возможность получения более достоверной информации по изменениям на клеточном уровне. Второе – это высокая пропускная способность, позволяющая проводить большое количество исследований в реальном времени. Метаболомные исследования вносят большой вклад в процессы дифференциальной диагностики раковых заболеваний и для оценки риска развития болезни.

Однако все процессы в организме связаны между собой, и каждый метаболомный анализ выявляет определенный набор ассоциированных с болезнью метаболитов. Для повышения точности диагностики необходимо использовать исследование всей совокупности или спектра метаболитов, что в свою очередь позволит повысить потенциал данной группы OMICS-технологий.

В большинстве случаев, на сегодняшний день задачи OMICS - технологий, в особенности, метаболомики, связаны с решением вопросов ранней дооперационной дифференциальной диагностики пациентов с онкологическими заболеваниями, с целью более корректного управления заболеванием, оценки рисков и назначения эффективных консервативных или радикальных методов терапии.

Таким образом, перечисленные исследования и имеющиеся данные, являются показателем необходимости внедрения метаболомного анализа в качестве дооперационного лабораторного теста для онкологических заболеваний, в том числе и РЦЖ.

## **1.7 Диагностическая значимость BRAF мутации в диагностике рака щитовидной железы**

Использование лабораторной диагностики, основанной на измерении концентрации молекулярных маркеров заболеваний (биомаркеров), которая статистически достоверно меняется в организме пациента при возникновении болезни, может оказать дополнительную помощь в диагностике РЩЖ. Развитие молекулярных аналитических методов, таких как ИГХ, способствовали открытию биомаркеров. Сравнительно недавно были предложены специализированные молекулярные аналитические методы определения особенностей опухолевых ДНК, РНК и белка.

Наиболее изученными генетическими мутациями при РЩЖ являются таковые, запускающие механизмы активации внутриклеточных протеинкиназных каскадов. При возникновении мутации происходит активирование MAPK-цепочки в функциональном отношении обуславливающую клеточную выживаемость, пролиферацию и регуляцию апоптоза [148].

Также одним из перспективных направлений для диагностики рака ЩЖ является метод молекулярно-генетического анализа, который включает методы иммуноцитологии, иммуногистохимии и иммуноцитохимии, а также генетические исследования. Имеются некоторые работы, где были успешно проанализированы в смывах пункционных игл такие биомаркеры, как FAS, HMGF, FRA-1, NSE, цитокератин, циклооксигеназа, гаплотипы HLA и такие онкогены как PAX8-PPAR1, RET/PTC1, RET/PTC3 [149].

Одним из эффективных направлений дифференциальной диагностики рака щитовидной железы считается анализ цитокератинов (ЦК). На сегодняшний день определено несколько ЦК, которые отличаются по некоторым биопараметрам, которые включают аминокислотный состав и молекулярный вес. Фолликулярный эпителий всегда содержит СК-7, 8, 18 и 19, такие же цитокератины находят в эпителии всех типов доброкачественных и злокачественных новообразований ЩЖ. При папиллярном раке ЩЖ в местах стойкого замещения дифференцированного плоского эпителия находят цитокератины (1, 5, 6, 13), которые характерны для многослойного плоского эпителия. Аналогичные цитокератины по данным некоторых исследований могут также присутствовать в гиалинизированных аденомах трабекулярного типа строения [150].

В некоторых исследованиях рекомендуют использовать характер экспрессии цитокератина-19 для идентификации разного вида эпителиальных образований злокачественного характера [151].

Характер экспрессии имеет большое значение, также как характер и тип распространенности окрашивания полученных препаратов. Так при наличии экспрессии цитокератина-19 в большинстве случаев дает диффузное окрашивание по всем полям и абсолютно говорит о наличии ПРЩЖ. Окрашивание же фокального ограниченного характера говорит о доброкачественности новообразования или отмечается при других злокачественных образованиях щитовидной железы [152].

Существуют некоторые научные исследования, в которых говорится о том, что процент встречаемости цитокератина-19 при ПРЦЖ составляет более 92% и только в 3% встречается при доброкачественных новообразованиях щитовидной железы [153].

По данным других научно-исследовательских работ процент встречаемости цитокератина-19 при ПРЦЖ составляет все 100%, причем как при классической папиллярной форме рака, так и в представлении фолликулярного варианта данной формы рака. При этом указывается на то, что экспрессия цитокератина-19 не бывает диффузного характера ни при фолликулярном типе рака ЩЖ ни при фолликулярной аденоме. Данный факт может быть использован для дифференциальной диагностики между фолликулярным типом ПРЦЖ, ФРЦЖ и фолликулярной аденомы [154].

В других работах была показана возможность использования для дифференциальной диагностики злокачественных и доброкачественных новообразований ЩЖ такого онкомаркера как HBME-1 (hectorbattiforamesothelial cell-1), который является представителем группы полисахаридов и гликопротеинов. Однако согласно все тем же работам, мнения касательно данного онкомаркера весьма противоречивы. Так по данным отдельных исследований экспрессия HBME-1 при папиллярной раке ЩЖ встречается от 78% до 100%, тогда как при фолликулярном раке ЩЖ экспрессия данного онкомаркера встречается от 84,6% до 100% случаев. Другими авторами было показано, что экспрессия данного онкомаркера наблюдается лишь в 50% при фолликулярном раке ЩЖ. В других работах было показано, что присутствие данного онкомаркера может быть обнаружена и при ряде случаев с узловым зобом. Согласно другому исследованию, данный онкомаркер является самым ярким представителем папиллярного рака ЩЖ [155].

Согласно другим аналогичным работам, где дополнительно была проведена оценка диагностических характеристик HBME-1, были получены результаты, которые указывали на высокую специфичность и чувствительность при раке ЩЖ, в некоторых случаях достигающие 100%. Авторами было сделано предположение, что полученные характеристики указывают на то, что применение HBME-1 в качестве онкомаркера при дифференциальной диагностике злокачественных новообразований ЩЖ имеет актуальность и высокую обоснованность [156].

Следующим не безызвестным онкомаркером для дифференциальной диагностики рака ЩЖ является галектин-3. Данный онкомаркер получил большую актуальность, как многофункциональный белок, который участвует в биорегуляции клеточного метаболизма, в том числе и апоптоза. Галектин-3 по данным молекулярной онкобиологии является передаточным веществом при взаимодействии поверхности клеток с внеклеточным жидкостным матриксом [157].

По данным некоторых работ, где было проведено ИГХ исследование онкомаркера галектина-3 при раке ЩЖ, были получены результаты, показывающие, что экспрессия галектина-3 в раковых клетках при папиллярной форме рака ЩЖ определялась с очень высокой частотой, тогда как при доброкачественных новообразованиях данная экспрессия была довольно таки скудной и невесомой, а в некоторых случаях даже отсутствовала [158].

Так при проведении сравнительной оценки экспрессии галектина-3 при различных формах рака ЩЖ, были получены следующие результаты. При классическом варианте ПРЩЖ частота встречаемости составила 100%, при фолликулярном варианте ПРЩЖ данный показатель составил 91,7%, и при фолликулярном раке ЩЖ была получена относительно низкая частота в сравнении, которая составила 58,8% случаев [159].

Имеющиеся литературные данные свидетельствуют, что положительная экспрессия галектина-3 полученная посредством проведения ИГХ указывает на злокачественную природу диагностируемого новообразования ЩЖ с высоким процентом чувствительности и специфичности [160, 161].

На основании ряда работ, где была изучена совместная прогностическая ценность двух вышеупомянутых онкомаркеров, были получены следующие результаты. Одновременная экспрессия галектина-3 и НВМЕ-1 встречалась в 90% случаев с папиллярным раком ЩЖ. Авторы сделали вывод, что сочетание данных двух онкомаркеров может быть использовано для дифференциальной диагностики злокачественных и узловых новообразований ЩЖ. При этом с точки зрения диагностической значимости, могут служить оптимальной диагностической панелью онкомаркеров для рака ЩЖ [162].

Однако существуют и работы, где показан высокий уровень ложноположительных и ложноотрицательных результатов использования галектина-3 в диагностике РЩЖ [163].

Молекулярный патогенез ПРЩЖ изучен достаточно хорошо. Наиболее часто встречающимися онкогенами являются генные перестройки, такие как RET/PTC, ETV6/NTRK3 и разнообразные перестройки с участием гена BRAF, а также точковые мутации в генах семейства RAS и гена BRAF. Общей особенностью белковых продуктов мутированных генов является их способность активировать MAP - киназный (от англ. Mitogen Activated Protein Kinase) сигнальный каскад вне зависимости от внешних и внутренних стимулов. Химерные продукты генов RET/PTC также способны активировать и PI3K (от англ. Phosphatidylinositol 3-Kinase)-Akt/ПКВ (от англ. Protein Kinase B), MAPK p38 и C-JUN (от англ. Janus Kinase) каскады. Нерегулируемая активация этих внутриклеточных сигнальных цепочек способствует активной пролиферации клеток, приобретению устойчивости к проапоптотическим сигналам и снижению дифференцировки. Отметим, что частота генных перестроек и точковых мутаций разно направленно связана с возрастом пациентов: перестройки более характерны для детей и подростков (40-80%), в то время как точковые мутации для взрослых пациентов (30-90%) [164].

Среди точковых мутаций, выявляемых в ПРЩЖ, наиболее частой является трансверсия с.Т1799А в экзоне 15 гена BRAF, приводящая к замене остатка валина на остаток глютаминовой кислоты в 600-ом положении аминокислотной последовательности белка (p.V600E), и обозначаемую BRAF<sup>V600E</sup>. Из всех форм мутантного гена BRAF, BRAF<sup>V600E</sup> выявляется в более чем 80% случаев, в то время как другие (p.V600K, V600M, V600D, V600G, V600delinsYM) весьма редки [165].

Распространённость BRAF варьирует в разных исследованиях ПРЩЖ от 30% до 90% у взрослых пациентов. Различия обусловлены, скорее всего, численной и гистологической неомогенностью исследованных групп, а также их этническим составом. К примеру, было продемонстрировано, что BRAF наиболее характерна для опухолей классического папиллярного строения, а также оксифильноклеточного, уртино-подобного варианта ПРЩЖ и ПРЩЖ с высококлеточными и столбчатыми структурами. В фолликулярном варианте ПРЩЖ мутации выявляются редко. В папиллярной микрокарциноме ЩЖ BRAF<sup>V600E</sup> выявляется в 20–40% случаев, причем наличие мутации маловероятно в опухолях с фолликулярной архитектурой. Наибольшая частота ПРЩЖ приходится на страны Азиатско-тихоокеанского региона: в Японии у взрослых пациентов она может достигать до 80%, а в Корее – до 90% [166].

Последнее обстоятельство может указывать также, что богатая содержанием йода пища может также быть связана с частотой встречаемости BRAF<sup>V600E</sup> в ПРЩЖ. Вероятно, взвешенной оценкой распространенности BRAF<sup>V600E</sup> в ПРЩЖ могут служить результаты, включенные в Атлас Ракового Генома, 61,7% [167].

Данные о прогностической значимости BRAF<sup>V600E</sup> достаточно противоречивы. С одной стороны, в метаанализе, в который вошло 20,764 пациентов из 63 независимых исследований, была продемонстрирована связь BRAF<sup>V600E</sup> с распространением опухоли за пределы капсулы ЩЖ, более высокой стадией, метастазами в регионарные лимфоузлы шеи, большей вероятностью рецидива и пониженной общей выживаемостью [168].

С другой стороны, в ряде работ подобных корреляций выявлено не было [169]. Отметим, что опять же этнический фактор и разница в пищевом рационе, вероятно, могут играть роль. В то время как в европеоидных популяциях прогностическая значимость BRAF<sup>V600E</sup> представляется более вероятной, у пациентов из Азиатско-тихоокеанского региона она может быть незначимой.

Данные о прогностической значимости BRAF<sup>V600E</sup> на раннем дооперационном этапе, были достаточно хорошо продемонстрированы в научно-исследовательской работе по ранней диагностике узловых форм заболеваний щитовидной железы. В данном исследовании проведенного в условиях Казахстана, продемонстрирована связь BRAF<sup>V600E</sup> с раком ЩЖ. По результатам исследования показано, что мутации в гене BRAF<sup>V600E</sup> были выявлены только при раке ЩЖ, а среди всех форм злокачественных новообразований ЩЖ мутации в гене BRAF<sup>V600E</sup> наблюдались только в случаях

связанных с папиллярным раком ЩЖ. Согласно результатам данного цитологического исследования биопсийного материала, где было обследовано 137 больных со злокачественными и доброкачественными новообразованиями ЩЖ на предмет мутации в гене BRAF<sup>V600E</sup>, частота встречаемости случаев мутации в гене BRAF<sup>V600E</sup> была получена в 19 (24,6%) случаев, из общего 77 количества больных с папиллярным раком ЩЖ. При доброкачественных опухолях у 18 больных и 15 больных с фолликулярной неоплазией ни одного случая мутации. В группе подозрение на рак – 15 больных, фолликулярная карцинома – 8 больных, низкодифференцированная карцинома – 2 больных, злокачественная лимфома – 1 больной также не было ни одного положительного случая генетической BRAF<sup>V600E</sup> мутации [170-173].

Важным обстоятельством полученных результатов по данному исследованию является то, что мутация гена BRAF<sup>V600E</sup> является высокоспецифичной для рака ЩЖ. Мутация с наибольшей частотой была выявлена в случаях с папиллярным раком ЩЖ и не определялась в фолликулярном и медулярном раке ЩЖ, фолликулярной аденоме, узловом зобе или аутоиммунном тиреоидите. Также согласно данному исследованию была показана сравнительная связь частоты мутации гена BRAF<sup>V600E</sup> в зависимости от радиационного фактора. Согласно представленным данным были получены выводы, что частота выявления мутаций гена BRAF гораздо больше в зонах с наличием радиационного фактора. Причем на достаточном доказательном уровне показана связь мутации гена BRAF<sup>V600E</sup> с дозами облучения. В зонах с более высокой радиацией частота встречаемости гораздо больше, чем в зонах повышенного и минимального риска. Помимо всего в данном исследовании указана взаимосвязь частоты встречаемости генетической BRAF<sup>V600E</sup> мутации у больных с папиллярным раком ЩЖ в зависимости от возраста. Так, согласно полученным данным по данному исследованию у больных с наличием мутации в гене BRAF<sup>V600E</sup> выявлено значительное превышение частоты в группах от 51 до 60 лет. Авторами данный факт объясняется тем, что больные в данной группе на момент проведения взрывов были раннего или дошкольного возраста и, соответственно, в рационе питания у них было больше молочных продуктов местного происхождения. Авторами было отмечено также, что в группе больных с отсутствием мутации гена BRAF<sup>V600E</sup> никаких возрастных особенностей частоты встречаемости папиллярного рака ЩЖ в группе у лиц старше 40 лет выявлено не было. Однако авторами в данном исследовании была показана связь мутации гена BRAF<sup>V600E</sup> с раком ЩЖ, но не показана связь с морфологическими особенностями.

В другом исследовании, также проведенном, в условиях Казахстана были представлены результаты морфологического состояния щитовидной и паращитовидных желез. Данное исследование проводилось в течение 40 лет, в котором была продемонстрирована значимая связь не только между

радиационным фактором и развитием опухоли ЩЖ, но также патологическое воздействие радиации на паращитовидные железы. [174].

Это делает выявление мутированного BRAF<sup>V600E</sup> гена одним из наиболее информативных и надежных вспомогательных методов дифференциальной диагностики узлов ЩЖ. В связи с этим, одной из задач работы было проведение такого исследования.

## 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 2.1 Дизайн исследования и клиническая характеристика материалов исследования

В настоящей работе проанализированы результаты обследования 350 пациентов с доброкачественными и злокачественными новообразованиями щитовидной железы. Согласно дизайну, исследование состояло из двух этапов. Методы исследования, количество больных и этапы исследования показаны в таблице 3.

Таблица 3 - Методы, количество больных и содержание исследования на разных этапах

Этап	Метод исследования	Кол-во больных	Содержание исследования
1	Молекулярно-генетическое исследование спектра метаболитов в крови пациентов с помощью тандемной Высоко-эффективной Жидкостной Хроматографии/Масс-спектрометрии (ВЭЖХ/МС)	132	Исследование спектра метаболитов у пациентов из Казахстана со злокачественными и доброкачественными узловыми новообразованиями ЩЖ
2-1	Молекулярное исследование частоты встречаемости мутантного BRAF в материале парафиновых блоков иммуногистохимическим методом	92	Ретроспективный анализ встречаемости мутантного белка BRAF в ткани ПРЩЖ и определение клинико-патологических корреляций
2-2	Молекулярно-генетическое исследование частоты встречаемости мутации гена BRAF в материале ТАПБ высокотехнологичным методом капельной цифровой ПЦР	122	Проспективное исследование частоты встречаемости мутации BRAF в узловых новообразованиях ЩЖ в материале ТАПБ

Клинический материал первого этапа молекулярно-генетических OMICS-исследований, а именно изучение спектра метаболитов, представлен тремя

исследуемыми группами. Первая группа 40 больных раком ЩЖ, получавших лечение и наблюдавшихся в НИИОиР на период 2016 год. Вторая группа 31 больных ДУОЩЖ, самостоятельно обратившихся в университетскую клинику №2 при КазНМУ им С.Д. Асфендиярова на период 2016 год. Третья группа 61 человек, отобранные в условиях университетской клиники №2 при КазНМУ им С.Д. Асфендиярова на период 2016 год, как контрольная группа без УОЩЖ. Возраст больных в первой группе составил  $48,1 \pm 15,8$  лет среди 8 мужчин и  $48,4 \pm 9,2$  среди 32 женщин. Во второй группе средний возраст составил  $45,1 \pm 35,20$  лет среди 2 мужчин и  $49,8 \pm 9,3$  среди 29 женщин. Половозрастные характеристики больных с узловыми и злокачественными новообразованиями щитовидной железы представлены в таблице 4.

Таблица 4 - Распределение больных по полу и возрасту.

Группа	Узловые новообразования	N	Рак щитовидной железы	N
Мужчины (лет)	$45,1 \pm 35,2$	2	$48,1 \pm 15,8$	8
Женщины (лет)	$49,8 \pm 9,3$	29	$48,4 \pm 9,2$	32

В исследовании проанализированы лабораторные и половозрастные показатели 71 больного с узлами ЩЖ, из которых 40 пациентов имели РЩЖ. После утверждения плана исследования этическим комитетом и получения письменного информированного согласия каждого пациента, у всех участников был произведен забор крови для последующего анализа спектра метаболитов (образцы крови собирались согласно стандартной процедуре венепункции в специальный контейнер с ЭДТА). У пациентов, прооперированных по поводу цитологически подтвержденного РЩЖ, гистологические исследования были выполнены на базе Научно-Исследовательского Института Онкологии и Радиологии в отделении опухоли головы и шеи и их результаты были сопоставлены с заключением цитологии. У пациентов с узловыми образованиями ЩЖ было проведено цитологическое исследование материала ТАПБ, проведенной под контролем УЗИ. Для ТАПБ отбирались только те пациенты, размер узлов ЩЖ у которых был более 1,0 см в диаметре по результатам УЗИ ЩЖ. Оценка функционального состояния ЩЖ была определена по уровню тиреоидных гормонов: FT4 и FT3, а также уровня ТТГ и антител к тиреопероксидазе (а/тТПО) и тиреоглобулину (а/тТГ). Лабораторные показатели пациентов, включенных в исследование, приведены в таблице 5.

Таблица 5 - Уровни гормонов и аутоантител у пациентов с УОЩЖ

Показатель	Кол-во обследуемых		Узловые образования	N	Рак ЩЖ
	N				
ТТГ, мкМе/мл	муж	2	$1,66 \pm 1,1$	10	$4,16 \pm 3,4$
	жен	29	$3,05 \pm 2,4$	30	$2,6 \pm 2,4$

Продолжение таблицы 5

Показатель	Кол-во обследуемых		Узловые образования	N	Рак ЩЖ
	муж	жен			
свFT4, ng/dl	муж	2	21,7±9,8	10	10,2±8,8
	жен	29	21,9±8,9	30	12,5±8,8
FT3, pg/ml	муж	2	13,4±6,8	10	2,6±1,8
	жен	29	5,4±3,8	30	4,2±3,8
а/тТПО,МЕ/ml	муж	2	0	10	59,1±18,5
	жен	29	574,7±114,4	30	37,4±13,4
а/тТГ,МЕ/ml	муж	2	0	10	141,1±38,1
	жен	29	414,3±160,1	30	98,2±4,6

Согласно дизайну работы, молекулярно-генетические исследования мутации гена BRAF в биологическом материале проводились в две стадии в условиях Отдела радиационных медицинских наук Университета Нагасаки (Япония).

Первая стадия заключалась в молекулярно-генетическом исследовании послеоперационного материала, а именно парафиновых блоков тканей 98 пациентов, прооперированных по поводу цитологически диагностированного РЩЖ. В послеоперационном исследовании у всех пациентов гистологический подтвержден диагноз ПРЩЖ. На основании полученных результатов проведен ретроспективный анализ частоты встречаемости мутантного белка BRAF у пациентов с различными гистологическими вариантами ПРЩЖ.

Возраст больных составил 48,1±15,8 лет среди 8 мужчин и 48,4±9,2 среди 32 женщин. Половозрастные характеристики пациентов с ПРЩЖ представлены в таблице 6.

Таблица 6 - Распределение больных по полу и возрасту

Группа	Рак щитовидной железы	N
Мужчины (лет)	48,1±15,8	8
Женщины (лет)	48,4±9,2	32

Вторая стадия исследования заключалась в выявлении мутации BRAF в материале ТАПБ узловых образований ЩЖ. Проведено исследование 122 пациентов, самостоятельно обратившихся в отделение эндокринологии объединенной университетской клиники Казахского Национального Медицинского Университета имени С.Д. Асфендиярова города Алматы, по поводу узлового зоба. Средний возраст пациентов составил 49,5 лет; соотношение мужчин и женщин 1,2:10. Всем пациентам под контролем УЗИ производилась аспирационная биопсия узлов ЩЖ. На основании цитологического заключения пациенты были разделены на 3 группы согласно классификации Бетезда:

- первая группа Б VI (малигнизация, опухолевое новообразование ЩЖ имеет злокачественный характер);
- вторая группа Б V (подозрение на малигнизацию);
- третья группа Б II (коллоидный зоб, узловые образования носят доброкачественный характер).

Распределение пациентов по группам в зависимости от цитологического заключения представлено в таблице 7.

Таблица 7 - Распределение пациентов по группам в зависимости от результатов цитологического заключения

Результат ТАПБ	Количество пациентов	
	Абс.	%
Категория Б VI	2	1,7
Категория Б V	4	3,3
Категория Б II	116	95

Возрастные градации были применены согласно существующей классификации возраста по рекомендации ВОЗ от 2015 года. Согласно данной классификации различают пять возрастных групп:

- первая, от 25 до 44 лет, молодой возраст;
- вторая, от 44 до 60 лет, средний возраст;
- третья, от 60 до 75, пожилой возраст;
- четвертая, от 75 до 90 лет, старческий возраст;
- пятая, старше 90 лет.

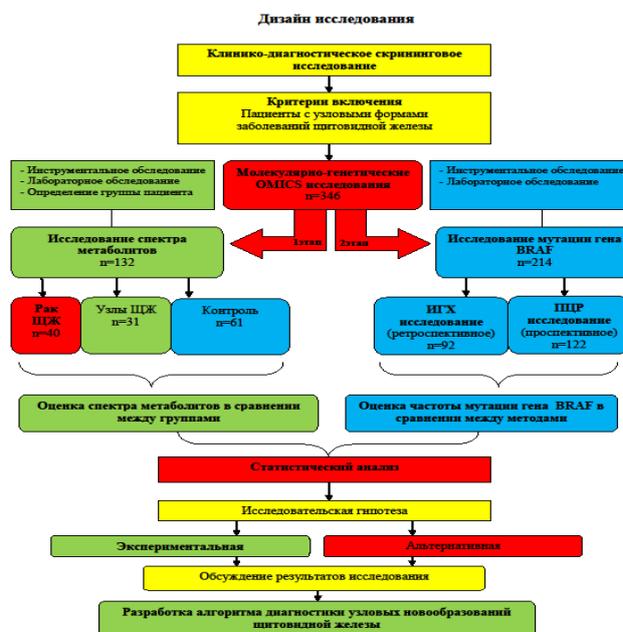


Рисунок 4 - Дизайн исследования

В нашем исследовании пациентов старше 90 лет не было. Участниками, входящими в старческую группу, были две только женщины в возрасте 77 и 82 лет. Ввиду этого, для статистического анализа они были объединены с пациентами пожилого возраста.

## 2.2 Методы исследования

Алгоритм обследования, включавший клинико-лабораторное и ультразвуковое исследования и ТАПБ узлов ЩЖ, проводили пациентам, включенных в группы метаболомного анализа и исследования мутации гена BRAF методом ПЦР. У пациентов данных групп также определялся уровень ТТГ, тиреоидных гормонов и аутоантител. Забор материала проводился на дооперационном этапе, ТАПБ узловых образований ЩЖ проводилась под строгим контролем УЗИ. При исследовании спектра метаболитов в плазме крови у пациентов с РЩЖ полученный пункционный материал полностью подвергался цитологическому исследованию. Для выполнения молекулярно-генетического исследования на наличие в материале ТАПБ мутации BRAF одна треть хранилась в специальных условиях для выделения ДНК и последующего генетического исследования, а две трети полученного материала подвергали цитологическому исследованию.

Диагностику узловых образований ЩЖ производили на аппарате Panasonic Voluson E8 Expert с использованием стандартных линейных датчиков 7,5МГц в кабинете ультразвуковой диагностики отделения эндокринологии при университетской клинике (зав. отделением д.м.н., профессор Ж. Абылайулы)

Цитологическое исследование было проведено согласно протоколам диагностики после окраски материала методом Романовского и Папаникалау в условиях патоморфологической лаборатории при НИИОиР г. Алматы.

Исследование спектра метаболитов производили на аппарате Agilent 6224 TOF LC/MS (Agilent, USA) в условиях лаборатории НИИ ФПМ им. Б.А. Атчабарова при КазНМУ им. С.Д. Асфендиярова.

Гистологическое исследование было проведено согласно стандартным протоколам диагностики с окраской гематоксилином и эозином в условиях патоморфологической лаборатории Института радиоиндуцированных заболеваний Университета Нагасаки, Япония (заведующий лабораторией профессор Masahiro Nakashima). Окончательный диагноз был основан на данных гистологического заключения. Определение мутантного белка BRAF в срезах парафиновых блоках выполнялась у пациентов с ПРЩЖ. Диагноз ПРЩЖ был независимо подтвержден двумя патологоанатомами: Сатбаева Э.Б. (Казахстан) и профессор Абросимов А.Ю. (ЭНЦ, Россия).

Молекулярно-генетический анализ мутации гена BRAF в материале пункционных игл посредством ПЦР метода с последующей статистической обработкой был проведен согласно стандартным протоколам в условиях Отдела радиационных медицинских наук Университета Нагасаки (Япония, г. Нагасаки,

заведующий – профессор Shunichi Yamashita). Исследование производили на аппарате QX200 Droplet Digital PCR System (фирма Bio-Rad Laboratories, США).

### **2.3 Методика исследования спектра метаболитов в крови больных с узловыми новообразованиями щитовидной железы, основы эксперимента**

Метаболомика является одним из методов OMICS-технологий, которая наряду с другими методами, такими как геномика, транскриптомика и протеомика используется для оценки основных функций в организме. Метаболомика, кроме связанных изменений транскриптома и протеома, также отражает изменения фенотипа и представляет собой наиболее близкую и тончайшую картину обмена веществ. Таким образом, метаболомика непосредственно отражает фенотип, физиологию и молекулярное состояние организма.

Получено разрешение локальной этической комиссии (ЛЭК) университета о соответствии проводимых исследований с участием больных с узловыми заболеваниями ЩЖ международным правилам проведения научных работ. В сравнительную группу здоровых людей отобраны добровольцы в количестве, необходимом для получения репрезентативных данных. Участники проекта строго придерживались принципов научной этики, данные получены из первоисточника при непосредственном участии самих сотрудников. Все полученные результаты подтверждены соответствующими периоду исследований протоколам и отчетами. У пациентов получено «Информированное согласие» на участие и возможность использования полученных индивидуальных данных в научно-исследовательском проекте.

#### **2.3.1 Лабораторные методы**

В лаборатории НИИ ФПМ им. Б.А. Атчабарова проведена оценка состояния метаболомного профиля по результатам масс-спектрометрии (МС).

Дизайн исследования:

- Проспективно:

1. Осмотр больных
2. Ультразвуковое исследование щитовидной железы
3. Забор крови у больных.

- Цитоморфология:

1. Тонкоигольная аспирационно-пункционная биопсия узловых образований щитовидной железы под контролем УЗ-датчика.
2. Микроскопия нативных препаратов.

- Лабораторные исследования:

1. Гематологическое – общий анализ крови
2. Иммуноферментный анализ – определение ТТГ, свТ4, Т3 и кальцитонина.

- Масс-спектрометрическое исследование: определение спектра метаболитов в плазме крови больных с помощью тандемной Высокоэффективной Жидкостной Хроматографии/Масс-спектрометрии (ВЭЖХ/МС).

### 2.3.2 Протокол экстракции метаболитов из сыворотки

Экстракция метаболитов из плазмы крови осуществлялась по следующей методике: к 100 микролитрам плазмы добавлялось 300 микролитров экстрагирующего буфера (метанол:ацетонитрил:вода 45:45:10) соответственно. Вortexирование 15 секунд. К получившейся смеси добавлялось 200 микролитров хлороформа. Инкубация образцов 30 минут при комнатной температуре с перемешиванием каждые 5 минут. Инкубация образцов при температуре -20°C в течение 2-8 часов. Центрифугирование образцов при 12000g 2 минуты. Полученные верхняя и нижняя фракции отбирались в новые 1,5 мл пробирки. Сушка образцов в вакуумном концентрате 4-6 часов. Высушенные образцы растворяли в 100 микролитрах мобильной фазы для хроматографии (вода: ацетонитрил:муравьиная кислота 97.9:2:0,1). Растворенные образцы фильтровались через 0,2 мкм фильтры с помещением образцов в автоматическое устройство ввода пробы. Хромато-масс-спектрометрия экстрагированных метаболитов для каждого отдельного образца проводилась на времяпролетном хромато-масс-спектрометре Agilent 6224 TOF LC/MS (Agilent, USA) при следующих условиях:

- условия хроматографии: колонка Zorbax SB-Aq, 2,1 x 150мм, 3,5 мкм. Скорость потока 0,4 мл/мин. Температура колонки 20°C. Объем инъекции 2,0 мкл. Мобильная фаза А: 0,1% муравьиная кислота в воде; В: 0,1% муравьиная кислота в ацетонитриле. Градиент 2% В на 0,0 минут до 100% В на 28,0 минуте. Стоп: 35 минута.

- условия масс-спектропии: тип ионизации позитивный. Поток сухого газа 10 л/мин. Температура сухого газа 250°C. Небулайзер 40 psig. Vcap 4000V. Максимальная масса 1700. Диапазон сканирования m/z 50–1000.

### 2.3.3 Условия и характер исследования

В работе проанализирован собственный опыт исследования спектра метаболитов в диагностике злокачественных и доброкачественных узловых образований ЩЖ у 71 пациента, а также контрольная группа из 61 человека. Для достижения поставленной цели нами были выделены три исследуемые группы.

1) Злокачественные новообразования ЩЖ 40 пациентов: 30 женщин и 10 мужчин в возрасте от 24 до 72 лет.

2) Доброкачественные узлы ЩЖ 31 пациент: 29 женщин, 2 мужчин в возрасте от 21 до 78 лет.

3) Контрольная группа 61 человек: 52 женщины, 9 мужчин в возрасте от 22 до 60 лет.

Набор первой группы пациентов проводился на базе НИИОиР в условиях Отделения опухоли головы и шеи г. Алматы. Выполнен анализ 40 историй болезни пациентов, получивших лечение в плановом порядке по поводу РЩЖ. Диагноз был установлен на основании планового морфологического исследования щитовидной железы, проведенного в Патоморфологическом отделении института. На дооперационном этапе проводили определение уровней FT4, FT3, ТТГ и а/т ТПО и а/т ТГ, проводили УЗИ ЩЖ и выполняли ТАПБ под контролем УЗИ и соноэластографии.

Вторая группа была составлена путем проведения обследования в условиях университетской клиники КазНМУ им. С.Д.Асфендиярова. Диагноз узловой зоб выставлялся согласно показаниям УЗИ щитовидной железы, а именно эхопризнаки образования, размером более 1,0 см в диаметре. Определяли уровни FT4, FT3, ТТГ и а/т ТПО и а/т ТГ, проводили УЗИ ЩЖ и выполняли ТАПБ под контролем УЗИ. Критерием включения в группу было цитологическое заключение категории Б II.

Группу контроля составили 61 человек, критерием включения было отсутствие узловых образований ЩЖ по данным УЗИ.

После утверждения этического комитета и получения письменного согласия каждого пациента, образцы венозной крови из локтевой вены всех трех групп исследуемых были собраны для последующего исследования спектра метаболитов.

Образцы собирались согласно стандартной процедуре венепункции в объеме 5,0 мл в специальный контейнер с ЭДТА.

## **2.4 Методика выявления мутантного белка BRAF или мутации гена BRAF**

### **2.4.1 Выявление мутантного белка BRAF в гистологических препаратах фиксированной ткани опухоли щитовидной железы**

Использовали серийные срезы тканей толщиной 4 мкм, которые окрашивали гематоксилином и эозином, а также иммуногистохимически. После стандартных процедур депарафинирования, регидратации и промывки, проводили антиген-демаскирующую обработку путем автоклавирования срезов при 120°C в течение 20 мин в буфере CC1 (Ventana Medical Systems) с последующей промывкой дистиллированной водой. Блокирование эндогенной пероксидазной активности, а также все последующие этапы окрашивания (за исключением обработки первичными антителами) выполняли с использованием компонентов набора Novolink Polymer Detection System (Leica Biosystems Newcastle Ltd., RE7140-K). После блокирования неспецифической окраски срезы инкубировали во влажной камере с мышинными моноклональными антителами anti-BRAF V600E (VE1), разведенными 1:100 в растворе Antibody Diluent V (каталожные номера E19290 и ADV-060 соответственно; оба реактива производства Spring Bioscience). Дальнейшие

шаги выполняли в соответствии с рекомендациями производителя набора Novolink Polymer Detection System, включая проявление с помощью DAB и докрашивание ядер гематоксилином в конце методики. После обезвоживания и просветления ксилолом, срезы заключали в синтетическую полимерную среду.

#### 2.4.2 Выделение ДНК из материала тонкоигольной аспирационной биопсии узла щитовидной железы и проведение ПЦР анализа

После биопсии полученный материал использовали для последующего цитологического исследования, а остаточное содержимое пункционной иглы осторожно промывали раствором RNeasy в объеме 0,7 мл в стерильной эппендорфовой пробирке объемом 1,5 мл. Оставляли пробирку на полчаса при комнатной температуре. Для долгосрочного хранения пробирки помещали в морозильник при  $-20^{\circ}\text{C}$ .

ДНК выделяли согласно протоколу, используя набор “QIAampDNA Mini” (QIAGEN, Германия). В результате для каждого образца были получены 50 мкл водного раствора, содержащего ДНК. После выделения образцы ДНК до исследования хранились при температуре  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Определение концентрации ДНК на УФ-спектрофотометре NANO Drop.

После стандартной процедуры подготовки спектрофотометра согласно прилагаемой инструкции, по 2 мкл каждого образца наносили на предметный пьедестал и определяли концентрацию ДНК по оптической плотности раствора при 260 нм.

Проведение ПЦР анализа.

Капельная цифровая ПЦР проводилась на приборе QX200 Droplet Digital PCR System (Bio-Rad Laboratories, США) и осуществлялась в четыре этапа согласно протоколу. Первым этапом во все образцы добавляли приготовленный раствор, содержащий необходимые праймеры и молекулярные зонды, и помещали в пластиковый картридж генератора капель. Вторым этапом или генерация капель, проводили путем добавления в соответствующие каналы картриджа специального минерального масла. Наполненный картридж устанавливался в генератор капель, где образцы и масло соединяются между собой по микроканалам внутри картриджа для получения эмульсии около 20 000 монодисперсных капель объемом 1 нл. Третьим этапом проводилась ПЦР. Все эмульгированные образцы в объеме 40 мкл переносились в стандартный 96-луночный планшет для ПЦР и амплифицировались с помощью стандартного термоциклера C1000 Touch (Bio-Rad Laboratories) в течение 3 часов. Условия проведения амплификации были стандартными и заключались в начальной денатурации ( $95^{\circ}\text{C}$ , 10 мин) и 40 циклов, включавших денатурацию ( $94^{\circ}\text{C}$ , 30 с), отжиг праймеров ( $55^{\circ}\text{C}$ , 2,5 мин), с последующей заключительной элонгацией ( $98^{\circ}\text{C}$ , 10 мин). Завершающим этапом было считывание полученных результатов, для чего планшет загружался в ридер для анализа флуоресцентного сигнала капель.

## 2.5 Статистическая обработка результатов

Статистическая обработка результатов проведена в условиях Нагасакского медицинского университета (Япония).

Статистическая обработка результатов исследования спектра метаболитов в крови у больных со злокачественными и узловыми новообразованиями щитовидной железы проводилась с использованием таких методов как, Agilent's METLIN Personal metabolite database, ППП СТАТИСТИКА 7.0, SPSS версия 16 с использованием параметрических и непараметрических методов. Количественные показатели представлены в виде  $M (CO)$ ,  $Me (25\%-75\%)$ , где  $M$  – среднее значение, а  $Me$  – медиана, 95% ДИ,  $CO$  – стандартное отклонение. Для показателей, характеризующих качественные признаки, указаны абсолютное число и относительная величина в процентах (%). Для проверки нормальности распределения исследуемых количественных показателей в группах использовали критерий согласия Колмогорова-Смирнова. Если распределение исследуемых числовых показателей отличалось от нормального, то значимость различий проверялась при помощи критерия Манна-Уитни, а для связанных выборок –  $W$ -критерий Уилкоксона. Качественные частотные признаки сравнивали при помощи критерия  $\chi^2$  Пирсона. Различия считали значимыми при  $p < 0,05$ . Для определения существования связей между параметрами вычисляли коэффициент корреляции  $R$  Спирмана, который также считали значимым при  $p < 0,05$ .

Сравнительный анализ спектра метаболитов в трех исследуемых группах проводился с помощью on-line программы Metabo Analyst (отбор предикторов, пермутационные тесты, кросс-валидации, ROC-анализ) и пакета SPSS (корреляционный анализ, логистическая регрессия, ROC-анализ).

Статистический анализ результатов выявления мутантного белка BRAF после иммуногистохимического исследования выполняли с помощью пакета SPSS. Однофакторный анализ включал точный тест Фишера (или его расширение), или тренд-тест Кохрана-Армитажа для частотных показателей и непараметрический тест Манна-Уитни для количественных признаков. Многофакторный логистический регрессионный анализ был проведен для определения клинко-морфологических параметров, независимо связанных со статусом BRAF. Значение  $p < 0,05$  полагали указывающим на возможную статистическую значимость.

### 3 СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

#### 3.1 Оценка исследования спектра метаболитов в плазме крови у больных со злокачественными и узловыми новообразованиями щитовидной железы

Данные по группам пациентов при проведении анализа спектра метаболитов показаны в таблице 8.

Таблица 8 – Данные анализа спектра метаболитов

Номер группы	Наименование группы
0	Пациенты без узловых новообразований щитовидной железы (контрольная группа)
1	Пациенты с узловыми образованиями щитовидной железы (доброкачественные узлы)
2	Пациенты со злокачественными новообразованиями щитовидной железы (рак щитовидной железы)

Примечание - Кодировки групп: 0 – контроль, 1 – доброкачественные узлы ЩЖ, 2 – РЩЖ.

При трансформации данных, как показано на рисунке 5, из значения концентраций всех метаболитов извлекался кубический корень. Шкалирование и нормализация данных (по выборкам или метаболитам) не проводилась. Нулевые уровни концентраций не видоизменялись. Такой подход позволяет строить предикативные индексы риска для проспективных исследований.

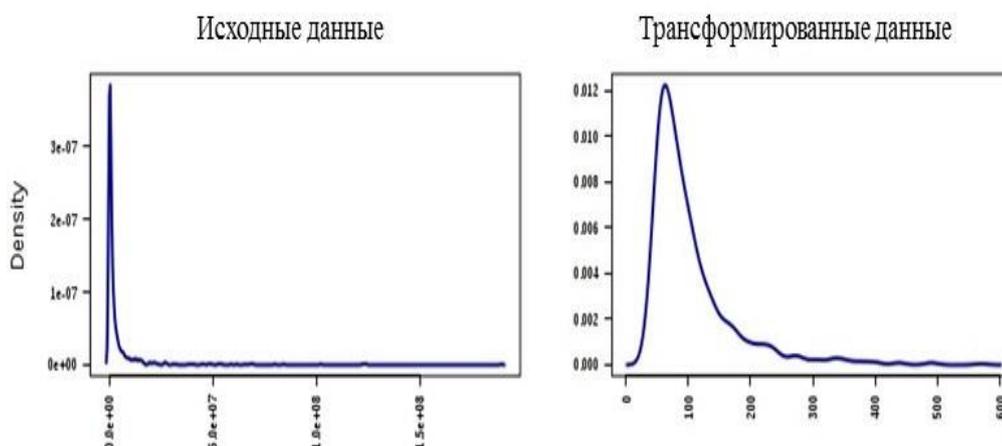


Рисунок 5 - Трансформация данных

Анализ спектра метаболитов в сравнении между тремя исследуемыми группами проводился с помощью on-line программы Metabo Analyst (отбор предикторов, пермутационные тесты, кросс-валидации, ROC-анализ) и пакета программ SPSS (корреляционный анализ, логистическая регрессия, ROC-анализ).

### 3.1.1 Сравнение между группами 0-2 (контроль-рак ЩЖ)

При одномерном сравнении групп 0-2 обнаружено 98 предикторов-метаболитов, для которых различия между группами оказались значимыми по *t*-тесту Стьюдента с учетом множественности сравнений (FDR, False Discovery Rate). FDR контроль – поправка на множественность сравнений методом Бенджамини-Хохберга, является более корректной оценкой статистической значимости, чем собственное *p*-value. При использовании непараметрического теста Манна-Уитни таковых оказалось еще больше (117 метаболитов). Большинство из этих предикторов не являются независимыми. Имелись большие группы метаболитов, корреляции между которыми доходили до 0.80 – 0.95. В таблице 9 приведены самые значимые предикторы, упорядоченные по величине AUC (AUC – Area Under Curve, площадь под ROC-кривой) в одномерном ROC-анализе. Статистическая значимость оценок AUC соответствует значимости теста Манна-Уитни. Приведены все метаболиты с AUC > 0.7 (общепринятый уровень минимальной предикативности). Кроме того, указаны логарифмы отношений концентраций метаболитов в контрольной группе и группе пациентов с РЩЖ ( $FC = C_0/C_2$ ).

Таблица 9 Предикторы, упорядоченные по величине AUC в одномерном ROC-анализе, сравнение групп 0-2 (Контроль – Рак ЩЖ).

Метаболит	log <sub>2</sub> FC	AUC	<i>t</i> -тест		Тест Манна-Уитни	
			<i>p</i> -value	FDR	<i>p</i> -value	FDR
1	2	3	4	5	6	7
M129T312	5,8	0,766	2,2E-08	1,1E-05	6,4E-06	3,9E-03
M764T313	6,2	0,752	3,1E-06	2,1E-04	1,8E-05	3,9E-03
M411T31	6,1	0,752	7,5E-06	3,3E-04	1,8E-05	3,9E-03
M113T2	1,3	0,750	2,2E-04	4,3E-03	2,3E-05	3,9E-03
M410T312	6,7	0,748	3,4E-05	9,5E-04	2,6E-05	3,9E-03
M410T311	6,0	0,746	1,8E-06	1,3E-04	2,9E-05	3,9E-03
M764T312	7,6	0,745	1,1E-05	4,2E-04	3,3E-05	3,9E-03
M394T313	6,6	0,742	1,3E-04	2,7E-03	4,0E-05	3,9E-03
M206T234	0,8	0,742	5,8E-05	1,4E-03	4,3E-05	3,9E-03
M87T21	0,5	0,737	5,9E-05	1,4E-03	6,1E-05	5,1E-03
M204T24	1,5	0,732	1,0E-04	2,3E-03	8,4E-05	5,5E-03
M91T16	1,3	0,732	1,8E-04	3,5E-03	8,6E-05	5,5E-03
M101T31	6,9	0,731	3,0E-05	9,2E-04	9,1E-05	5,5E-03
M409T31	7,5	0,730	9,1E-05	2,1E-03	9,6E-05	5,5E-03
M129T311	7,3	0,730	7,2E-06	3,3E-04	9,9E-05	5,5E-03
M764T311	7,6	0,727	5,5E-06	3,0E-04	1,8E-05	3,9E-03
M65T233	-1,6	0,727	8,4E-06	3,5E-04	1,2E-04	5,5E-03
M204T22	1,5	0,725	9,2E-05	2,1E-03	1,4E-04	5,7E-03

Продолжение таблицы 9

Метаболит	log <sub>2</sub> FC	AUC	t-тест		Тест Манна-Уитни	
			p-value	FDR	p-value	FDR
M150T2312	2,1	0,724	1,2E-07	1,7E-05	1,5E-04	5,7E-03
M259T31	6,9	0,723	3,3E-05	9,4E-04	1,6E-04	5,7E-03
M699T30	-0,9	0,723	5,3E-05	1,4E-03	1,7E-04	5,7E-03
M393T311	8,6	0,721	4,8E-08	1,1E-05	1,7E-04	5,8E-03
M395T311	6,6	0,718	2,9E-08	1,1E-05	2,2E-04	6,0E-03
M394T314	7,9	0,718	1,3E-07	1,7E-05	2,2E-04	6,0E-03
M331T19	-0,9	0,718	6,0E-05	1,4E-03	2,3E-04	6,0E-03
M394T312	7,1	0,717	1,6E-07	1,7E-05	2,4E-04	6,0E-03
M393T313	7,2	0,715	5,1E-08	1,1E-05	2,6E-04	6,1E-03
M477T32	7,2	0,714	1,2E-05	4,4E-04	2,93E-4	6,3E-03
M765T31	7,1	0,713	2,9E-05	9,2E-04	3,1E-04	6,3E-03
M111T31	6,7	0,708	2,7E-05	8,9E-04	4,1E-04	8,0E-03
M110T11	1,3	0,706	2,5E-04	4,8E-03	5,0E-04	9,0E-03
M499T32	7,2	0,705	3,7E-06	2,2E-04	5,0E-04	9,0E-03
M394T315	7,9	0,700	5,0E-07	4,2E-05	6,9E-04	1,2E-02

Далее для оценки совместных эффектов метаболитов использовалась множественная логистическая регрессия с пошаговым включением предикторов (многомерный анализ). Модель строилась из 45 наиболее значимых метаболитов с использованием пошаговой процедуры включения и удаления коррелированных и незначимых предикторов (реализовано в SPSS). Результаты моделирования приведены в таблице 10.

Таблица 10 - Множественная логистическая регрессия с пошаговым включением предикторов

	B	SE(B)	Wald	df	p	exp(B)	95%CI exp(B)	
M129T312	-0,071	0,025	8,161	1	0,004	0,931	0,887	0,978
M206T234	-0,049	0,022	4,894	1	0,027	0,952	0,911	0,994
M87T21	-0,088	0,031	8,122	1	0,004	0,916	0,862	0,973
M72T15	0,083	0,033	6,209	1	0,013	1,086	1,018	1,159
Константа	8,49	3,198	7,047	1	0,008	4864,7		

Примечание - Общая значимость модели  $p = 1,5E-11$ ;  $R^2$  Нэйджелкерка = 0,580

Показатели метаболитов в зависимости от пола, как показано в таблице 11, особо значимо не изменялись.

Таблица 11 - Влияние пола на параметры модели

	<i>B</i>	SE( <i>B</i> )	Wald	df	<i>p</i>	exp( <i>B</i> )	95%CI exp( <i>B</i> )	
M129T312	-0,073	0,025	8,650	1	0,003	0,930	0,886	0,976
M206T234	-0,055	0,023	5,512	1	0,019	0,947	0,904	0,991
M87T21	-0,090	0,031	8,208	1	0,004	0,914	0,860	0,972
M72T15	0,085	0,034	6,088	1	0,014	1,088	1,018	1,164
Пол	0,826	0,807	1,049	1	0,306	2,285	0,470	11,109
Константа	7,450	3,377	4,866	1	0,027	1719,842		
Примечание - Общая значимость модели $p = 3,8E-11$ ; $R^2$ Нэйджелкерка = 0,589								

Показатель «Возраст», как показано в таблице 12, оказывал существенное влияние на выявленные ассоциации.

Таблица 12 - Влияние возраста на параметры модели

	<i>B</i>	SE( <i>B</i> )	Wald	df	<i>p</i>	exp( <i>B</i> )	95%CI exp( <i>B</i> )	
M129T312	-0,054	0,024	5,171	1	0,023	0,948	0,90	0,993
M206T234	-0,050	0,032	2,490	1	0,115	0,951	0,894	1,012
M87T21	-0,090	0,034	6,806	1	0,009	0,914	0,855	0,978
M72T15	0,106	0,048	4,886	1	0,027	1,111	1,012	1,220
Возраст	0,110	0,028	15,312	1	9,1E-5	1,116	1,056	1,179
Константа	1,773	3,793	0,218	1	0,640	5,886		
Примечание - Общая значимость модели $p = 2,2E-15$ ; $R^2$ Нэйджелкерка = 0,728								

В таблице 13 представлены результаты логистической регрессии с пошаговым исключением предикторов из 4 отобранных метаболитов, пола и возраста, с выделением оптимальной модели (Шаг 2).

Таблица 13 - Оптимизация модели для сравнения групп 0-2 (Контроль – Рак ЦЖ)

		<i>B</i>	SE( <i>B</i> )	Wald	df	<i>p</i>	exp( <i>B</i> )	95%CI exp( <i>B</i> )	
Шаг 1 <sup>a</sup>	M129T312	-0,053	0,024	5,065	1	0,024	0,948	0,905	0,993
	M206T234	-0,053	0,033	2,562	1	0,109	0,948	0,889	1,012
	M87T21	-0,089	0,034	6,716	1	0,010	0,915	0,855	0,979
	M72T15	0,109	0,050	4,752	1	0,029	1,115	1,011	1,229
	Sex	0,353	0,881	0,161	1	0,688	1,423	0,253	7,996
	Age Yrs	0,109	0,028	14,805	1	0,000	1,115	1,055	1,178
	Константа	1,169	4,163	0,079	1	0,779	3,220		

Продолжение таблицы 13

		B	SE(B)	Wald	df	p	exp(B)	95%CI exp(B)	
Шаг 2	M129T312	-0,054	0,024	5,171	1	0,023	0,948	0,905	0,993
	M206T234	-0,050	0,032	2,490	1	0,115	0,951	0,894	1,012
	M87T21	-0,090	0,034	6,806	1	0,009	0,914	0,855	0,978
	M72T15	0,106	0,048	4,886	1	0,027	1,111	1,012	1,220
	Age_Yrs	0,110	0,028	15,312	1	9,1E-5	1,116	1,056	1,179
	Константа	1,773	3,793	0,218	1	0,640	5,886		

Примечание -<sup>a</sup> Переменные, включенные на шаге 1: M129T312, M206T234, M87T21, M72T15, Sex (пол), Age\_Yrs (возраст)

Далее проводился ROC-анализ для вычисления вероятности заболевания (т.е. РЦЖ), использовался результат оптимальной логистической регрессионной модели. Проведенный ROC-анализ логита вероятности заболевания с учетом возраста равно:  $\log(P / (1 - P)) = 1,773 + (0,11 \text{ Возраст}) + (0,106 \text{ M72T15}) - (0,09 \text{ M87T21}) - (0,05 \text{ M206T234}) - (0,054 \text{ M129T312})$  показал следующие результаты:  $AUC = 0,942$ ,  $DI_{95\%} = 0,894 - 0,989$ ;  $p = 7,1E-14$ . Оптимальный порог дискриминации равен  $P = 0,49$  (т.е. если значение  $P$  превышает 0,49, то это указывает на РЦЖ). Данный порог обеспечивает чувствительность теста  $Se = 85\%$  и специфичность  $Sr = 92\%$ . На рисунке 6 приведена соответствующая эмпирическая ROC-кривая

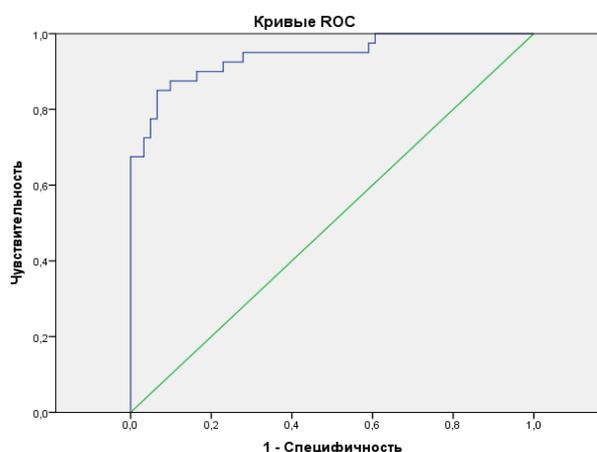


Рисунок 6 - Эмпирическая ROC-кривая

Далее была проведена оценка эффективности ROC-анализа с помощью методов численного ресамплинга: кросс-валидации (перекрестной проверки) и пермутационного теста. Основной задачей кросс-валидации является оценка доверительного интервала полученной модели. Полученные показатели 10-кратной кросс-валидации показаны в таблице 14.

Таблица 14 - Результаты 10-кратной кросс-валидации (10-CV)

	AUC	Чувствительность	Специфичность
Обучение	0,945 (0,930 - 0,960)	0,850 (0,813 - 0,887)	0,914 (0,891 - 0,938)
10-CV	0,907 (0,840 - 0,974)	0,850 (0,850 - 0,961)	0,885 (0,805 - 0,965)

На рисунке 7 представлена соответствующая ROC-кривая с 95%-ым доверительным интервалом. Показано, что границы доверительной области не пересекают диагональную «безразличную» линию. Представлены «ступенчатая» ROC-кривая – эмпирическая, и плавная голубая – аналитическая, получаемая с помощью математического расчета-сглаживания.

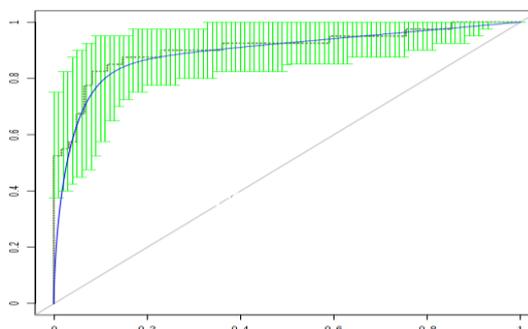


Рисунок 7 -ROC-кривая

Был использован также еще один метод оценки статистической значимости полученной ROC-кривой, пермутационный тест. В нем 1000 раз случайным образом переставляются метки «контроль» и «РЦЖ», и для каждой перестановки рассчитывается ROC-кривая, которая сравнивается с полученной. Как показано на рисунке 8, ни одна производная ROC-кривая (серый цвет) не обеспечивает AUC большую, чем у полученной ROC-кривой (голубой цвет), указывая на лучшую предикативность последней. Значимость полученной кривой по результатам 1000 пермутаций соответствует  $p\text{-value} < 0,001$ .

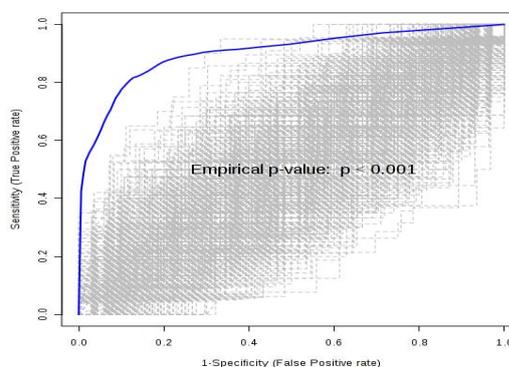


Рисунок 8 -ROC-кривые, генерируемые при 1000 случайных перестановках меток «Контроль» и «РЦЖ»

### 3.1.2 Сравнение между группами 0-1 (контроль-доброкачественный узел)

При сравнении между группами 0-1 (Контроль - Доброкачественный узел ЩЖ) с помощью одномерных тестов, как показано в таблице 15, не обнаружено метаболитов, для которых различия между группами оказались бы значимыми по параметрическому тесту с учетом множественности сравнений (FDR).

Таблица 15 - Предикторы, упорядоченные по величине в одномерном ROC-анализе, сравнение групп 0-1 (Контроль - Доброкачественный узел ЩЖ)

Метаболит	$\log_2$ FC	AUC	<i>t</i> -тест	FDR
M168T12	-1,09	0,752	2,4E-04	ns
M331T23	1,11	0,742	2,6E-03	ns
M104T12	-0,99	0,726	5,1E-04	ns
M206T2312	-1,08	0,724	6,2E-03	ns
M206T2311	-0,75	0,723	4,7E-03	ns
M199T13	-0,69	0,723	1,4E-02	ns
M113T11	-1,16	0,721	9,1E-04	ns
M321T1	-1,16	0,719	1,7E-03	ns
M200T12	-1,06	0,716	1,1E-03	ns
M259T13	-0,81	0,715	2,6E-03	ns
M305T11	-0,94	0,711	4,6E-04	ns
M129T312	0,52	0,710	1,3E-03	ns
M99T12	-1,08	0,706	1,3E-03	ns
M118T22	-1,15	0,706	2,2E-03	ns
M205T237	-0,24	0,703	5,3E-02	ns
M115T11	-1,10	0,702	2,4E-03	ns
M81T14	-1,35	0,701	1,4E-03	ns
M205T30	-0,78	0,700	1,7E-03	ns

Приведенные в таблице 16 данные представляют результаты логистического регрессионного анализа с пошаговым включением предикторов по 18 лучшим метаболитам, которые были отобраны по критерию AUC > 0.7 (таблица 15). Показана оптимальная комбинация, которая значимо сопряжена с наличием узлов.

Таблица 16 - Множественная логистическая регрессия с пошаговым включением предикторов (оптимальная модель)

	<i>B</i>	SE( <i>B</i> )	Wald	df	<i>p</i>	exp( <i>B</i> )	95%CI exp( <i>B</i> )	
M104T12	0,050	0,026	3,756	1	0,053	1,052	0,999	1,106
M168T12	0,034	0,016	4,417	1	0,036	1,035	1,002	1,068
M305T11	0,056	0,028	4,024	1	0,045	1,058	1,001	1,118

Продолжение таблицы 16

	<i>B</i>	SE( <i>B</i> )	Wald	df	<i>p</i>	exp( <i>B</i> )	95%CI exp( <i>B</i> )	
Константа	-9,854	2,853	11,929	1	0,001	-		
Примечание - Общая значимость модели $p = 1,6E-5$ ; $R^2$ Нэйджелкерка = 0,348								

Показатели метаболитов в зависимости от пола, как показано в таблице 17, особо значимо не изменялись

Таблица 17 -Влияние пола на параметры модели

	<i>B</i>	SE( <i>B</i> )	Wald	df	<i>p</i>	exp( <i>B</i> )
M104T12	0,053	0,026	4,163	1	0,041	1,054
M168T12	0,035	0,017	4,466	1	0,035	1,036
M305T11	0,055	0,028	3,754	1	0,053	1,057
Пол	1,096	0,987	1,231	1	0,267	2,991
Константа	-12,051	3,645	10,933	1	0,001	-
Примечание - Общая значимость модели $p = 2,7E-5$ ; $R^2$ Нэйджелкерка = 0,365						

Показатель «Возраст», как показано в таблице 18, оставляет значимым только один предиктор (M104T12).

Таблица 18 - Влияние возраста на параметры модели

	<i>B</i>	SE( <i>B</i> )	Wald	df	<i>p</i>	exp( <i>B</i> )	95%CI exp( <i>B</i> )	
M104T12	0,082	0,034	5,728	1	0,017	1,086	1,015	1,162
M168T12	0,021	0,018	1,354	1	0,245	1,021	0,986	1,058
M305T11	0,015	0,035	0,189	1	0,664	1,015	0,949	1,087
Возраст	0,085	0,027	9,855	1	0,002	1,089	1,032	1,148
Константа	-11,637	3,667	10,071	1	0,002	-		
Примечание - Общая значимость модели $p = 9,2E-8$ ; $R^2$ Нэйджелкерка = 0,499								

В таблице 19 показана многомерная логистическая регрессия с пошаговым исключением предикторов из 3 отобранных метаболитов, пола и возраста, что подтверждает результат отдельной проверки показателя «Возраст» (таблица 18).

Таблица 19 - Оптимизация модели для сравнения групп 0-1 (Контроль-Доброкачественный узел ЦЖ)

		<i>B</i>	SE( <i>B</i> )	Wald	df	<i>p</i>	exp( <i>B</i> )	95%CI exp( <i>B</i> )	
Шаг 1	M104T12	0,081	0,034	5,581	1	0,018	1,084	1,014	1,160
	M168T12	0,022	0,018	1,460	1	0,227	1,022	0,986	1,060

Продолжение таблицы 19

Шаг 1		B	SE(B)	Wald	df	p	exp(B)	95%CI exp(B)	
	M305T11	0,016	0,034	0,205	1	0,651	1,016	0,950	1,086
	Age_Yrs	0,082	0,027	9,410	1	0,002	1,086	1,030	1,144
	Sex	0,986	1,157	0,726	1	0,394	2,680	0,277	25,888
	Константа	-13,421	4,298	9,750	1	0,002	0,000		
Шаг 2	M104T12	0,082	0,033	6,006	1	0,014	1,085	1,017	1,159
	M168T12	0,022	0,018	1,432	1	0,231	1,022	0,986	1,060
	Age_Yrs	0,088	0,025	12,517	1	0,000	1,092	1,040	1,146
	Sex	0,975	1,157	0,710	1	0,400	2,651	0,274	25,625
	Константа	-12,538	3,623	11,974	1	0,001	0,000		
Шаг 3	M104T12	0,084	0,034	6,164	1	0,013	1,087	1,018	1,161
	M168T12	0,021	0,018	1,325	1	0,250	1,021	0,986	1,057
	Age_Yrs	0,090	0,025	13,124	1	0,000	1,094	1,042	1,149
	Константа	-10,804	2,889	13,989	1	0,000	0,000		
Шаг 4	M104T12	0,089	0,033	7,420	1	0,006	1,093	1,025	1,165
	Age_Yrs	0,095	0,024	15,476	1	8.36E-02	1,099	1,049	1,152
	Константа	-10,140	2,718	13,916	1	1.91E-01	0,000		
Примечание - Переменные, включенные на шаге 1: M104T12, M168T12, M305T11, Age_Yrs, Sex									

Проведенный ROC-анализ индекса логита вероятности узла, равного  $\log(P/(1 - P)) = -10.14 + (0.095 \text{ Возраст}) + (0.089 \text{ M104T12})$  показывает AUC = 0.866, ДИ<sub>95%</sub> = 0,786 - 0,945;  $p = 5,0E-8$ . Оптимальный порог дискриминации равен  $P = 0,42$  (т.е., если  $P > 0,42$ , то это указывает на узел ЦЖ). Данный порог обеспечивает чувствительность теста  $Se = 74\%$  и специфичность  $Sp = 85\%$ . На рисунке 9 приведена соответствующая эмпирическая ROC-кривая:

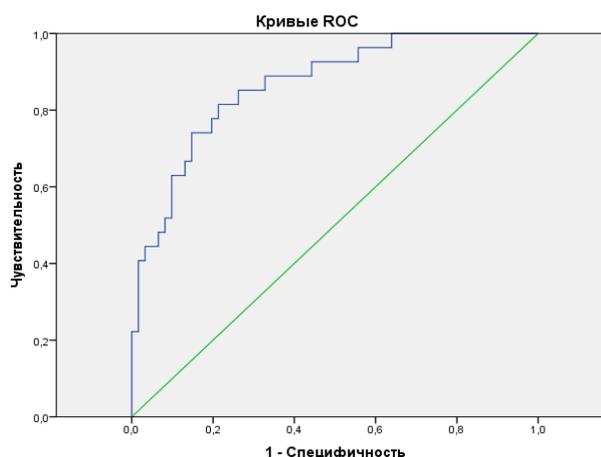


Рисунок 9 - Эмпирическая ROC-кривая

Результаты кросс-валидации данного ROC-анализа, в котором был использован возраст и только один метаболит (M104T12), представлены в таблице 20.

Таблица 20 - ROC-анализ: 10-кратная кросс-валидация (10-CV)

	AUC	Чувствительность	Специфичность
Обучение	0.870 (0.845 - 0.896)	0.757 (0.703 - 0.811)	0.831 (0.799 - 0.862)
10-CV	0.831 (0.734 - 0.927)	0.741 (0.741- 0.906)	0.787 (0.684 - 0.890)

На рисунке 10 показана соответствующая ROC-кривая, полученная в 10-кратной кросс-валидации с 95%-м ДИ.

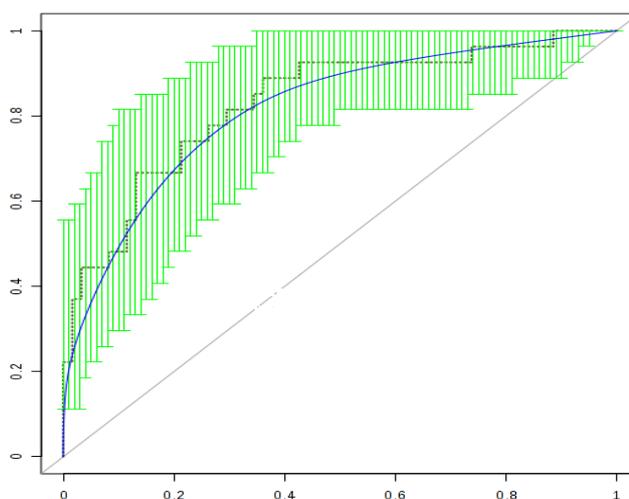


Рисунок 10 - ROC-кривая

Как показано на рисунке 11, значимость кривой по результатам 1000 пермутаций соответствует  $p$ -value  $< 0,001$  (изображены 1000 ROC-кривых, возникающих при случайных перестановках меток «контроль – доброкачественный узел ЩЖ»).

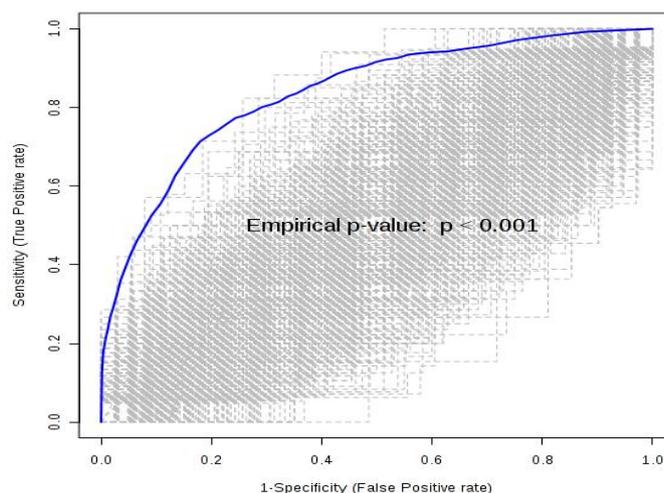


Рисунок 11 -ROC-кривые, генерируемые при случайных перестановках меток «Контроль» и «Доброкачественный узел ЩЖ»

### 3.1.3 Сравнение между группами 1-2 (доброкачественный узел – рак ЩЖ)

При сравнении данных групп с помощью одномерных тестов обнаружено большое количество метаболитов, для которых концентрации в группах больных РЩЖ и пациентов с доброкачественными узлами значительно различались (297 по *t*-тесту Стьюдента и 323 по непараметрическому тесту). В таблице 21 приведены метаболиты, для которых эти различия достигают значимости  $p_{FDR} < 0,005$  по непараметрическому тесту с учетом множественности сравнений. Как и ранее, данные упорядочены по величине AUC.

Таблица 21 - Предикторы, упорядоченные по величине AUC (AUC – Area Under Curve, площадь под ROC-кривой) в одномерном ROC-анализе групп 1-2 (Доброкачественный узел – Рак ЩЖ)

Метаболит	$\log_2$ FC	AUC	<i>t</i> -тест	Тест Манна-Уитни	
			p-value	p-value	FDR
1	2	3	4	5	6
M168T12	1,75	0,827	2,6E-06	2,2E-06	1,6E-03
M169T1	0,67	0,819	1,2E-04	4,0E-06	1,6E-03
M305T11	0,99	0,813	1,4E-05	6,5E-06	1,6E-03
M203T2	1,64	0,810	5,2E-05	8,1E-06	1,6E-03
M261T2	1,07	0,804	9,0E-06	1,3E-05	1,6E-03

Продолжение таблицы 21

1	2	3	4	5	6
M162T24	1,20	0,801	1,2E-05	1,6E-05	1,6E-03
M81T14	2,11	0,801	2,9E-05	1,6E-05	1,6E-03
M561T1	0,85	0,800	9,5E-06	1,7E-05	1,6E-03
M162T26	1,13	0,799	3,2E-05	1,8E-05	1,6E-03
M159T11	1,42	0,798	2,4E-05	2,0E-05	1,6E-03
M217T11	1,18	0,795	1,8E-05	2,4E-05	1,8E-03
M184T13	1,64	0,791	2,8E-04	3,3E-05	2,1E-03
M81T12	1,27	0,791	1,6E-04	3,3E-05	2,1E-03
M227T14	0,54	0,786	8,6E-05	4,5E-05	2,6E-03
M764T312	7,65	0,786	6,7E-04	7,2E-05	3,1E-03
M764T313	6,18	0,785	4,1E-04	7,6E-05	3,2E-03
M227T12	1,12	0,784	2,8E-04	5,1E-05	2,6E-03
M83T21	1,48	0,784	1,0E-04	5,1E-05	2,6E-03
M293T29	1,97	0,781	1,2E-04	6,5E-05	3,0E-03
M87T13	0,59	0,781	7,7E-05	6,5E-05	3,0E-03
M227T11	1,54	0,774	2,0E-04	9,9E-05	3,7E-03
M91T16	1,16	0,774	1,8E-03	9,9E-05	3,7E-03
M289T11	1,48	0,771	1,8E-04	1,2E-04	4,2E-03
M203T14	1,04	0,770	1,6E-04	1,2E-04	4,2E-03
M764T311	7,52	0,770	9,6E-04	1,8E-04	4,7E-03
M70T12	1,05	0,770	2,4E-03	1,2E-04	4,2E-03
M162T25	0,65	0,769	1,2E-03	1,3E-04	4,2E-03
M294T21	3,83	0,768	2,5E-04	2,1E-04	5,4E-03
M201T14	0,78	0,767	2,8E-04	1,6E-04	4,7E-03
M91T12	1,69	0,766	2,1E-04	1,7E-04	4,7E-03
M493T1	0,99	0,765	2,8E-04	1,8E-04	4,7E-03
M315T191	1,82	0,765	1,5E-03	1,8E-04	4,7E-03
M294T24	2,01	0,764	1,2E-04	1,9E-04	4,8E-03

Для оценки совместных эффектов метаболитов использовалась логистическая регрессия с пошаговым включением предикторов. Модель строилась для 84 лучших метаболитов с использованием пошаговой процедуры удаления коррелированных и незначимых предикторов. Результаты моделирования приведены в таблице 22.

Таблица 22 - Логистическая регрессия с пошаговым включением предикторов 1-2 (Доброкачественный узел – Рак ЩЖ).

	<i>B</i>	SE( <i>B</i> )	Wald	df	<i>p</i>	exp( <i>B</i> )	95%CI exp( <i>B</i> )	
M168T12	-0,116	0,054	4,662	1	0,031	0,891	0,802	0,989
M411T31	-0,077	0,031	6,233	1	0,013	0,926	0,872	0,984
M561T1	-0,292	0,103	8,053	1	0,005	0,746	0,610	0,913
M90T11	-0,226	0,109	4,289	1	0,038	0,798	0,644	0,988
Константа	43,297	13,769	9,887	1	0,002	-		
Примечание - Общая значимость модели $p = 1,0E-11$ ; $R^2$ Нэйджелкерка = 0,777								

Показатели метаболитов в зависимости от возраста и пола, как показано в таблице 23, особо значимо не изменялись.

Таблица 23 - Влияние возраста и пола на параметры модели в группах 1-2 (Доброкачественный узел – Рак ЩЖ)

	<i>B</i>	SE( <i>B</i> )	Wald	df	<i>p</i>	exp( <i>B</i> )	95%CI exp( <i>B</i> )	
M168T12	-0,119	0,055	4,602	1	0,032	0,888	0,796	0,990
M411T31	-0,080	0,031	6,484	1	0,011	0,923	0,868	0,982
M561T1	-0,307	0,111	7,574	1	0,006	0,736	0,592	0,916
M90T11	-0,277	0,128	4,665	1	0,031	0,758	0,589	0,975
Возраст	0,046	0,040	1,363	1	0,243	1,047	0,969	1,132
Пол	-0,596	1,374	0,188	1	0,665	0,551	0,037	8,152
Константа	46,742	15,174	9,488	1	0,002	-		
Примечание - Общая значимость модели $p = 7,8E-11$ ; $R^2$ Нэйджелкерка = 0,789								

Согласно возрастному показателю, группы 1 и 2 (Доброкачественный узел и Рак ЩЖ) не отличались:  $48.78 \pm 3.16$  против  $49.78 \pm 2.05$  лет, соответственно,  $p = 0,783$ .

В таблице 24 показана оптимальная модель, полученная с помощью многомерного логистического регрессионного анализа с пошаговым исключением предикторов из 4 отобранных метаболитов, пола и возраста.

Таблица 24 - Оптимизация модели для сравнения групп 1-2 (Доброкачественный узел – РЦЖ)

		B	SE(B)	Wald	df	p	exp(B)	95%CI exp(B)	
Шаг 1 <sup>a</sup>	M168T12	-0,119	0,055	4,602	1	0,032	0,888	0,796	0,990
	M411T31	-0,080	0,031	6,484	1	0,011	0,923	0,868	0,982
	M561T1	-0,307	0,111	7,574	1	0,006	0,736	0,592	0,916
	M90T11	-0,277	0,128	4,665	1	0,031	0,758	0,589	0,975
	Age_Yrs	0,046	0,040	1,363	1	0,243	1,047	0,969	1,132
	Sex	-0,596	1,374	0,188	1	0,665	0,551	0,037	8,152
	Константа	46,742	15,174	9,488	1	0,002	-		
Шаг 2	M168T12	-0,120	0,055	4,681	1	0,030	0,887	0,796	0,989
	M411T31	-0,079	0,031	6,436	1	0,011	0,924	0,870	0,982
	M561T1	-0,312	0,110	8,027	1	0,005	0,732	0,590	0,908
	M90T11	-0,266	0,122	4,710	1	0,030	0,767	0,603	0,975
	Age_Yrs	0,043	0,039	1,207	1	0,272	1,044	0,967	1,126
	Константа	45,300	14,438	9,845	1	0,002	-		
Шаг 3	M168T12	-0,116	0,054	4,662	1	0,031	0,891	0,802	0,989
	M411T31	-0,077	0,031	6,233	1	0,013	0,926	0,872	0,984
	M561T1	-0,292	0,103	8,053	1	0,005	0,746	0,610	0,913
	M90T11	-0,226	0,109	4,289	1	0,038	0,798	0,644	0,988
	Константа	43,297	13,769	9,887	1	0,002	-		
Примечание – <sup>a</sup> Переменные, включенные на шаге 1: M168T12, M411T31, M561T1, M90T11, Age_Yrs, Sex									

В таблице 25 показаны результаты ROC-анализа логита вероятности РЦЖ, равного  $\log(P / (1 - P)) = 43,297 - (0,116 \text{ M168T1}_2) - (0,077 \text{ M411T31}) - (0,292 \text{ M561T1}) - (0,226 \text{ M90T1}_1)$  и результаты 10-кратной кросс-валидации ROC-анализа. Площадь под ROC-кривой:  $AUC = 0,961$ ,  $ДИ_{95\%} = 0,948-0,974$ ;  $p = 1,9E-10$ . Оптимальный порог дискриминации равен  $P = 0,63$  (т.е. если  $P > 0,63$ , то это говорит в пользу РЦЖ, но не доброкачественного узла). Данный порог обеспечивает чувствительность теста  $Se = 82\%$  и специфичность  $Sp = 96\%$ .

Таблица 25 - ROC-анализ логита вероятности РЦЖ с 10 кратной кросс-валидацией (10-CV) между группами 1-2 (Доброкачественный узел – РЦЖ)

	AUC	Чувствительность	Специфичность
Обучение	0.961 (0.948 - 0.974)	0.822 (0.783 - 0.862)	0.959 (0.934 - 0.984)
10-CV	0.935 (0.881 - 0.990)	0.800 (0.800 - 0.924)	0.926 (0.827 - 1.000)

На рисунке 12 показана соответствующая эмпирическая ROC-кривая для анализа между 1-2 группами (Доброкачественный узел – Рак ЩЖ).

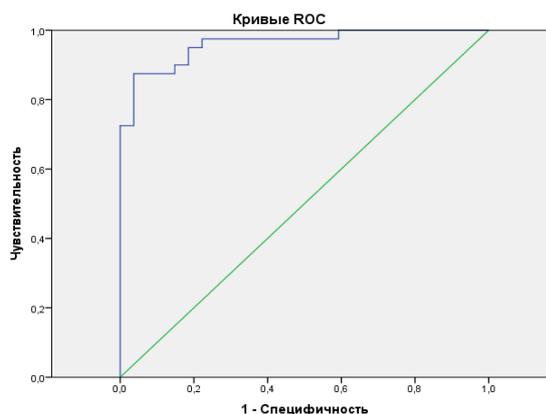


Рисунок 12 - Эмпирическая ROC-кривая

На рисунке 13 приведена соответствующая ROC-кривая, полученная в 10 кросс-валидациях с 95%-ми ДИ между группами 1-2 (Доброкачественный узел – РЦЖ).

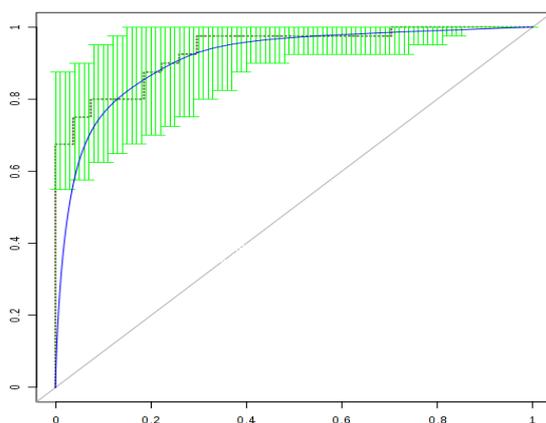


Рисунок 13 - ROC-кривая, полученная в 10-кратной кросс-валидации

На рисунке 14 серым цветом показаны 1000 ROC-кривых, получаемых при случайных перестановках меток «Рак ЩЖ» и «Доброкачественный узел»

щитовидной железы» в пермутационном тесте. Значимость полученной кривой по результатам 1000 пермутаций соответствует  $p$ -value  $< 0,001$ .

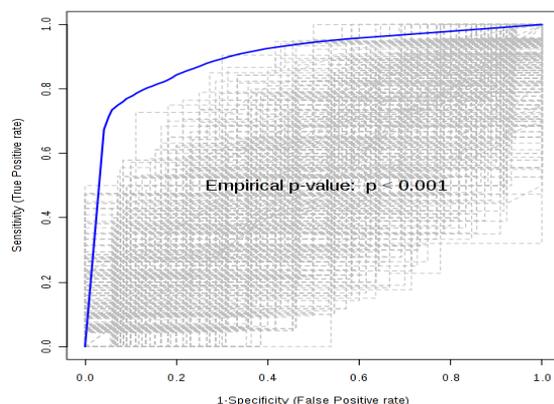
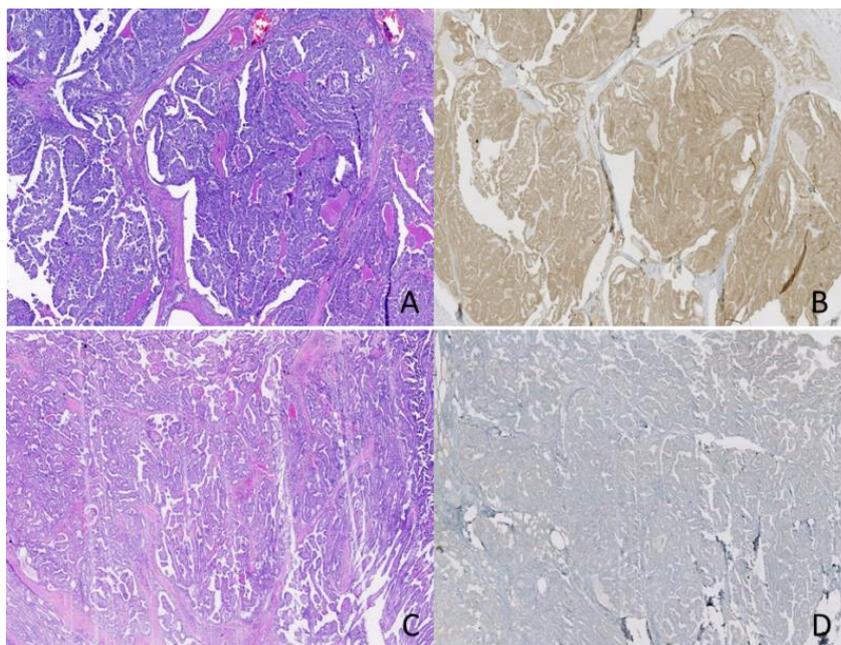


Рисунок 14 - ROC-кривые, генерируемые при случайных перестановках меток «РЦЖ» и «Доброкачественный узел щитовидной железы»

Показанные на рисунках колебания эмпирической кривой, полученные при помощи проведенного ROC-анализа, свидетельствуют о высокой степени чувствительности и достоверности полученных результатов.

### **3.2 Исследование частоты случаев встречаемости мутантного белка BRAF (гистологические препараты), и его связь с клинико-морфологическими характеристиками опухоли**

Демографические данные пациентов и патоморфологические характеристики исследованных опухолей, а также однофакторный статистический анализ связи с мутантным BRAF приведены в таблице 26. Присутствие мутантного BRAF (BRAF+) было обнаружено в 62 (67,4%) случаев. Как показали наши исследования по сравнению процент частоты встречаемости положительной BRAF мутации среди обследованных закономерно достоверно был выше, чем в группе с отрицательной мутацией гена BRAF [175]. Частота встречаемости мутации гена BRAF в казахской популяции в нашем исследовании хорошо соответствует аналогичным показателям у взрослых пациентов с ПРЦЖ из стран восточной Азии и Европы и является близкой к 62% в группе, представленной в Атласе Ракового Генома [176]. На рисунке 15 приведены примеры положительного и отрицательного иммуногистохимического окрашивания опухолей.



А – ПРЦЖ сосочкового строения, окраска гематоксилин-эозином; В- положительное иммуногистохимическое окрашивание опухолевых эпителиальных клеток на мутантный BRAF; А и В – серийные срезы. С – ПРЦЖ сосочкового строения, окраска гематоксилин-эозином; D– отрицательное иммуногистохимическое окрашивание; Си D – серийные срезы. Увеличение: А-D– x100.

Рисунок 15 - Иммуногистохимическое выявление мутантного BRAF в ткани ПРЦЖ

Анализ взаимосвязи мутации гена BRAF с полом пациентов не выявил статистически значимой связи ( $p=0,330$ ), что в целом подтверждается и другими исследованиями последовательных серий ПРЦЖ. Высокая статистическая значимость была обнаружена для разницы в возрасте на момент операции: пациенты с BRAF+ опухолями ( $50.2 \pm 14.2$  года) были существенно старше таковых, в опухолях которых был BRAF дикого типа (BRAF-,  $36.7 \pm 12.9$  лет),  $p=7,352 \times 10^{-5}$ . Подобная взаимосвязь выявлена во многих работах и соответствует представлениям о том, что BRAF+ ПРЦЖ обычно выявляются у пациентов старшего возраста и являются сравнительно редкими у детей и подростков с ПРЦЖ.

Таблица 26 - Клинико-морфологические характеристики ПРЦЖ в зависимости от статуса BRAF

Параметры	BRAF- N = 30 (32,6%)	BRAF+ N = 62 (67,4%)	<i>p</i> <0,01
1	2	3	4
Пол, Ж/М (%)	5/25 (16,7%)	6/56 (9,7%)	0,330
Средний возраст ± СКО, годы (интервал, полных лет)	36.7±12.9 (14-59)	50.2±14.2 (21-80)	7,352E-05
Размер опухоли, средний ± СКО, см (интервал)	1,8±0,8 (0,25-3,5)	1,8±0,9 (0,5-4,0)	0,758
Подгруппы размера опухоли			0,065
≤1 см, микрокарцинома, (%)	7 (23,3%)	26 (41,9%)	0,106
1,1-2,0 см (%)	15 (50,0%)	16 (25,8%)	0,033
>2,1 см (%)	8 (26,7%)	20 (32,3%)	0,637
рТ категория			0,544
1	16 (53,3%)	33 (53,2%)	1,000
2	12 (40,0%)	26 (41,9%)	1,000
3	0 (0%)	2 (3,2%)	1,000
4	2 (6,7%)	1 (1,6%)	0,247
рТ(3+4) vs рТ(1+2)	2 (6,7%)	3 (4,8%)	0,660
Регионарный метастаз, N1	8 (26,6%)	14 (22,6%)	0,795
Отдаленный метастаз, M1	0 (0,0%)	0 (0,0%)	1,000
Интрапиреодное распространение	17 (73,9%)	45 (84,9)	0,335
Экстратиреодная инвазия	7 (23,3%)	20 (32,3%)	0,468
Опухолевая капсула	10 (40,0%)	11 (19,6%)	0,062
Многофокусный рост	2 (8,3%)	0 (0%)	0,094
Сосудистая инвазия	6 (21,4%)	1 (1,7%)	0,004
Преобладающий структурный компонент			9,200E-06
папиллярный	13 (43,3%)	55 (88,7%)	7,990E-06
фолликулярный	11 (36,7%)	6 (9,7%)	0,003
солидный	6 (20,0%)	1 (1,6%)	0,004
Присутствующие морфологические структуры			
папиллярные	19 (63,3%)	60 (97,8%)	4,872E-05
фолликулярные	19 (63,3%)	32 (51,6%)	0,372
солидные	10 (33,3%)	7 (11,3%)	0,020
трабекулярные	2 (6,7%)	14 (22,6%)	0,079

Продолжение таблицы 26

1	2	3	4
столбчатые и высококлеточные	0 (0%)	3 (4,8%)	0,548
вартиноподобные	0 (0%)	4 (6,5%)	0,300
hobnail («сапожные гвозди»)	0 (0%)	2 (3,2%)	1,000
Фокальная оксифильноклеточная метаплазия	2 (6,7%)	19 (30,6%)	0,015
Сопутствующая тиреоидная патология			
узловая	0 (0%)	9 (17,6%)	0,050
тиреоидит	18 (75,0%)	35 (68,6%)	0,768

Более углубленное исследование связи присутствия в опухоли мутантного BRAF с возрастом пациентов с помощью логистической регрессии и ROC-анализа подтвердило статистическую значимость выявленной корреляции. Площадь под характеристической кривой (AUC)оказалось равной 0,756, что превышает общепринятый уровень минимальной предикативности (0,700) и соответствует “хорошей” степени сопряженности частоты выявления мутантного BRAF и возраста. Оптимальный порог отсечения составил 46,6 лет.

Дополнительные доказательства связи частоты мутантного BRAF в ПРЦЖ с возрастом были получены с помощью анализа линейного тренда. Возрастные подгруппы были сформированы согласно рекомендации ВОЗ от 2015 года для взрослых людей, которая классифицирует возраст 25-44 года как молодой, 44-60 – средний, 60-75 лет - пожилой, 75-90 - старческий возраст, и 90+ лет. В нашем исследовании пациентов старше 90 лет не было, а в подгруппе 75-90 лет были только две женщины в возрасте 77 и 82 лет; они были отнесены к группе старше 60лет. Шесть пациентов моложе 25 лет (возраст на момент операции 14-23 года) отнесли к подгруппе <44 года. Показатели частоты выявляемости мутантного BRAF в возрастных подгруппах, сформированных вышеозначенным способом представлены в таблице 27.

Таблица 27 - Половозрастная частота встречаемости мутантного BRAF

Возраст, годы	Пол	BRAF-, n=30	BRAF+, n=62	Частота мутантного BRAF%	
				полоспецифичная	общая
<44	М	2 (18,2%)	2 (18,2%)	50,0	55,6
	Ж	18 (22,2%)	23 (28,4%)	56,1	
45-59	М	3 (27,3%)	1 (11,0%)	25,0	65,5
	Ж	7 (8,6%)	18 (22,2%)	72,0	
60+	М	0 (0,0%)	3 (27,3%)	100,0	100,0
	Ж	0 (0,0%)	15 (18,5%)	100,0	

Для мужчин статистическая значимость возрастного тренда оказалась невысокой, ( $p=0,260$ , очевидно, в силу малого числа лиц этого пола в возрастных подгруппах), а для женщин тренд оказался значимым,  $p=0,002$ , как и для объединенных подгрупп мужчин и женщин ( $p=0,001$ ). При одномерном анализе с помощью логистической регрессии отношение шансов повышения частоты BRAF+ опухолей с возрастом для мужчин составило 2,663 (95% ДИ 0,490-14,462),  $p=0,257$ , а для женщин 3,467 (1,500-8,016),  $p=0,004$ . Показатели для мужчин и женщин статистически значимо не различались, оценка гетерогенности  $p=0,764$  (тест Бреслоу-Дэя).

Размеры BRAF+ и BRAF- опухолей статистически значимо не различались ни в случае анализа размера на непрерывной шкале ( $p=0,758$ ), ни по подгруппам ( $p=0,065$ ). Единственным отличием была меньшая частота мутантного BRAF среди опухолей размером от 1 до 2 см (25,8% против 50,0%,  $p=0,033$ ). В целом данные демонстрируют, что связь мутантного BRAF с размером опухоли в казахской популяции не выражена, как и в подавляющем большинстве опубликованных работ.

В целом ряде исследований была показана взаимосвязь мутантного BRAF с более высокой pT категорией, клинической стадией и агрессивными свойствами ПРЦЖ, такими как наличие регионарного метастаза и инвазии за пределы щитовидной железы [177].

Вместе с тем, немалое количество работ не обнаруживало подобной связи. Наши результаты скорее совпадают с последними данными. В серии ПРЦЖ из Казахстана корреляции присутствия мутантного BRAF с клинико-патологическими характеристиками выявлено не было. Не установлена связь с pT категорией ( $p=0,544$ ), регионарным метастатическим процессом ( $p=0,795$ ), интратиреоидным распространением ( $p=0,335$ ), экстратиреоидной инвазией ( $p=0,468$ ), присутствием опухолевой капсулы ( $p=0,062$ ) и многофокусностью ( $p=0,094$ ). Единственным показателем, значимо отличавшимся между BRAF+ и BRAF- опухолями, была меньшая частота сосудистой инвазии в случае наличия мутантного BRAF (1,7% против 21,4%,  $p=0,004$ ), что не предполагает более высокую агрессивность BRAF+ ПРЦЖ.

Анализ связи мутантного BRAF с морфологическим строением опухоли выявил значительное количество значимо сопряженных показателей. Наиболее очевидной оказалась взаимосвязь с папиллярным структурным компонентом. Около 90% опухолей с преобладающей папиллярной архитектоникой были BRAF+. В фолликулярном варианте ПРЦЖ частота мутантного BRAF была ниже, а в солидном варианте мутация практически не встречалась. Отметим также, что среди 3 опухолей, в которых присутствовали столбчатые и высококлеточные структуры, мутантный BRAF был выявлен во всех 3 (100%) случаях. Эти результаты хорошо согласуются с данными, представленными во многих работах

Статистически значимая связь мутантного BRAF была также выявлена с присутствием оксифильноклеточных изменений (30,6% против 6,7%,  $p=0,015$ ) и

более высокой частотой сопутствующей узловой патологии ЩЖ (17,6% против 0%,  $p=0,05$ ). Клиническую значимость этих корреляций еще предстоит исследовать.

Выявленная взаимосвязь ряда клинико-морфологических характеристик ПРЦЖ с присутствием мутантного BRAF была дополнительно подтверждена с помощью многомерного логистического регрессионного анализа. Результаты представлены в таблице 28.

Таблица 28 - Многомерная модель связи мутантного BRAF с клинико-морфологическими параметрами ПРЦЖ

Параметры	OR (95% ДИ)	p
Возраст на момент операции	1.087 (1.008-1.174)	0.031
Преобладающий папиллярный структурный компонент	66.719 (7.437-598.570)	1.752E-04
Опухолевая капсула	0,015 (0,001-0,261)	0.004
Сопутствующий тиреоидит	0.115 (0.016- 0.848)	0.034
Интратиреоидноераспространение	0.074 (0,005-1.162)	0.064
Сосудистая инвазия	0.039 (0.001-1.076)	0.055
Фокальная оксифильноклеточная метаплазия	8.273 (0.586-116.795)	0.118

В полную модель включали следующие параметры: пол, возраст на момент операции, максимальный размер опухоли, опухолевая капсула, преобладающий структурный компонент (папиллярный или другой), pT категория, pN категория, интратиреоидное распространение, экстратиреоидная инвазия, сосудистая инвазия, фокальная оксифильноклеточная метаплазия, сопутствующая узловая патология и сопутствующий тиреоидит. Оптимизация модели производилась путем обратного пошагового отбора.

При общей высокой статистической значимости оптимальной модели ( $p=8,173E-8$ ), более старший возраст (OR=1,087 (1,008-1,174),  $p=0,031$ ) и присутствие преобладающего папиллярного структурного компонента (OR=66,719 (7,437-598,570),  $p=1,752E-04$ ) независимо коррелировали с BRAF+ статусом опухоли. Также независимой, но отрицательной оказалась связь мутантного BRAF с наличием опухолевой капсулы (OR=0,015 (0,001-0,261),  $p=0,004$ ) и сопутствующим тиреоидитом (OR=0,115 (0,016-0,848),  $p=0,034$ ). Аналогичные данные были получены в работе, в которой было показано, что при наличии тиреоидита мутация BRAF встречается относительно реже [178].

### 3.3 Оценка частоты случаев встречаемости мутантного гена BRAF (пункционный материал тонкоигольной аспирационной биопсии)

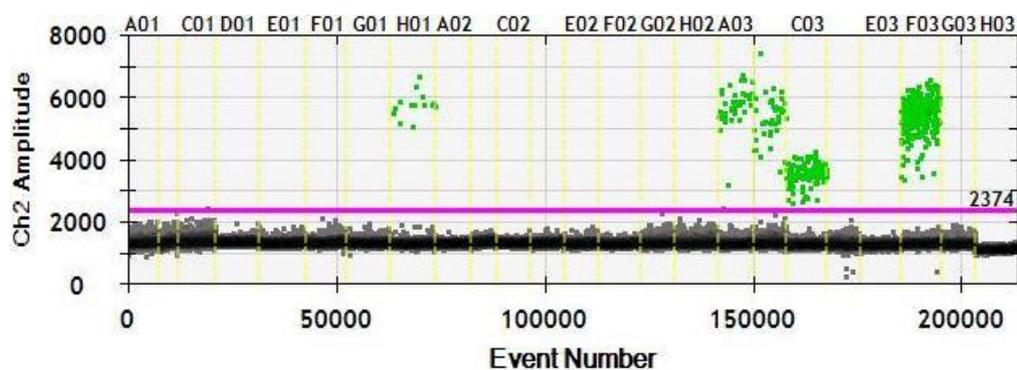
Вторая стадия молекулярно - генетических исследований заключалась в определении мутации гена BRAF в пункционном материале ТАПБ из узловых образований ЩЖ.

Результаты многих существующих исследований, связанных с данной проблематикой, показывают, что наличие BRAF-мутации может определять тактику ведения больных с опухолями ЩЖ. Стандартное цитологическое исследование материала, полученного при аспирационной биопсии, в некоторых случаях не может предоставить однозначного ответа о характере опухоли. В таких случаях выявление мутации гена BRAF определенно свидетельствует о злокачественности новообразования. Это в свою очередь требует более тщательного наблюдения в динамике и при необходимости требует принятия более радикальных мер.

Ввиду достаточно высокой частоты случаев встречаемости мутантного BRAF по результатам ретроспективного иммуногистохимического исследования среди пациентов из Казахстана, была проведена проспективная оценка возможности использования для практического выявления мутации гена BRAF в исследуемых образцах. Для этой цели использовали ДНК из материала ТАПБ, которую анализировали с помощью капельной цифровой ПЦР.

В ходе исследования были собраны образцы с цитологическими заключениями, соответствующими категориям Б VI (рак ЩЖ2 случая), Б V (подозрение на рак1 случай), Б IV (фолликулярная неоплазия или подозрение на фолликулярную неоплазию1 случай) и Б II (доброкачественный – 2 образца, но сстораживающими признаками на УЗИ).

1 Результаты анализа показаны на рисунке 16. Оба образца категории Б VI и 1 образец категории Б V оказались положительными на мутацию BRAF. Образцы категории Б IV, также оказался положительным. Среди образцов категории Б II все оказались отрицательными. Один из пациентов с цитологическим заключением «рак» (категория Б VI) был прооперирован к моменту написания данной работы, и диагноз ПРЩЖ подтвержден патоморфологическим исследованием [179].



Дорожки H01, A03, B03, C03 – образцы биоптатов, содержащие мутантный ген BRAF; дорожка F03- положительный контроль, дорожки G03иH03 – отрицательные контроли. Остальные дорожки отрицательные по мутации в гене BRAF пункционные образцы.

Рисунок 16 - Анализ флуоресцентного сигнала капельных продуктов амплификации

Таким образом, как видно из таблицы 29, проведенный анализ с помощью капельного цифрового ПЦР метода отличался высокой чувствительностью и специфичностью.

Таблица 29 - Критерии достоверности метода выявления мутации гена BRAF

Параметры	BRAF мутация	Доверительный интервал
Чувствительность	95%	95-97%
Специфичность	100%	91-100%

Характеристики метода выявления мутации гена BRAF в пункционном материале тонкоигольной аспирационной биопсии узловых образований щитовидной железы для диагностики рака щитовидной железы на раннем дооперационном этапе были оценены с помощью общепринятых статистических методов и показаны в таблице 29.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Согласно данным Международного агентства по исследованию рака (МАИР), в 2018 году в мире диагностировано 567 233 новых случаев злокачественных заболеваний щитовидной железы [28].

Заболеваемость раком щитовидной железы возрастает по всему миру. В настоящее время заболеваемость раком щитовидной железы входит в десятку первичных злокачественных новообразований в общей структуре онкологической заболеваемости по всему миру. В Республике Казахстан рак щитовидной железы в структуре онкологических заболеваний занимает 18 место и является самой частой онкологической патологией среди эндокринных органов.

По оценке Международного агентства по исследованию рака (МАИР), стандартизованный показатель заболеваемости раком щитовидной железы в Республике Казахстан составил на 2018 год 2,4 на 100 тысяч населения при общей численности населения 18,6 млн. человек. Было зарегистрировано 486 новых случаев [46].

На сегодняшний день существуют и проводятся многочисленные научные работы, направленные на изучение данной проблемы, однако до сих пор остаются открытыми и не ясными вопросы этиологии, патогенеза и объективной диагностики, не разработан единый алгоритм дифференциальной диагностики на раннем дооперационном этапе.

В связи с чем, большинство исследователей высказывают мнение, о том, что необходимо проведение исследований именно направленных на получение информации о понимании механизмов и этиопатогенеза злокачественности на самом начальном молекулярном уровне.

Вышеперечисленные моменты послужили основанием к проведению данного исследования, посвященного изучению молекулярно-генетических высокотехнологичных OMICS методов дифференциальной диагностики злокачественных и узловых новообразований щитовидной железы.

Исследовательская работа направлена на решение такой актуальной проблемы как рак щитовидной железы, а именно посвящена совершенствованию методов дифференциальной диагностики в особенности на раннем дооперационном этапе с целью оптимизации тактики дальнейшего лечения.

Целью исследования явилось усовершенствование диагностики рака щитовидной железы путем определения на дооперационном этапе спектра метаболитов и мутации гена BRAF.

При выполнении работы следовали следующим поставленным задачам:

1. Определить масс-спектры метаболитов из образцов плазмы крови пациентов с доброкачественными и злокачественными новообразованиями щитовидной железы и контрольных субъектов с последующей идентификацией метаболитов;

2. Провести анализ частоты встречаемости мутации гена BRAF у пациентов с папиллярным раком щитовидной железы;

3. Определить возможность использования выявления мутации гена BRAF как молекулярно - генетического маркера рака щитовидной железы.

4. Совершенствовать алгоритм диагностики рака щитовидной железы путем определения на дооперационном этапе спектра метаболитов и мутации гена BRAF.

Для решения такой актуальной проблемы в данной работе были использованы высокотехнологичные методы молекулярно – генетических ОМИКС исследований.

На первом этапе нашего исследования мы провели проспективную оценку спектра метаболитов у 132 пациентов с использованием одного из методов ОМИКС технологий считающийся относительно новым направлением высокотехнологичного OMICS направления молекулярно – генетической диагностики, а именно применение метаболомики на основе анализа спектра метаболома плазмы крови.

С целью определения диагностического потенциала анализа спектра метаболома плазмы крови для рака щитовидной железы, в работе использовали образцы крови, собранные от пациентов с раком щитовидной железы, с узловыми доброкачественными образованиями щитовидной железы, и от пациентов контрольной группы, без узловых образований щитовидной железы.

Эффективность спектра метаболитов была определена в репрезентативных группах сравнения. Первая группа у пациентов без узловых образований щитовидной железы и у пациентов с раком щитовидной железы. Вторая группа у пациентов без узловых новообразований щитовидной железы и у пациентов с доброкачественными образованиями щитовидной железы. Третья группа у пациентов с доброкачественными образованиями щитовидной железы и у пациентов с раком щитовидной железы.

Анализ спектра метаболитов в сравнении между тремя исследуемыми группами проводился с помощью on-line программы Metabo Analyst (отбор предикторов, пермутационные тесты, кросс-валидации, ROC-анализ) и пакета программ SPSS (корреляционный анализ, логистическая регрессия, ROC-анализ).

Полученные результаты были подтверждены расчетом статистических критериев достоверности (чувствительность, специфичность).

Таким образом, в работе показана эффективность моделей, основанных на масс-спектрометрическом анализе метаболома плазмы крови при раке щитовидной железы и доброкачественных узлах щитовидной железы.

Масс-спектрометрия метаболома плазмы крови является мультивариационной характеристикой, позволяющей достоверно диагностировать наличие онкологического заболевания.

Метаболиты, вносящие вклад в диагностику, отражают изменения в организме пациента, имеющие непосредственное отношение к этиологии или развитию этих заболеваний.

В работе установлено, что метаболомические исследования плазмы крови могут эффективно использоваться для диагностики рака щитовидной железы.

Для подтверждения соответствия раку щитовидной железы была проведена идентификация метаболитов по величине: область под ROC-кривой (AUC), которая отражает диагностическую силу исследуемого параметра, должна быть больше 0,8. Полученный спектр метаболитов удовлетворяющий данную величину был идентифицирован как кандидатные биомаркеры рака щитовидной железы.

На этапе раннего дооперационного периода исследование спектра метаболитов обладает максимальной чувствительностью, составляющей 85% и максимальной специфичностью, составляющей 92%.

На втором этапе нашего исследования, мы провели исследование частоты случаев встречаемости генетической мутации BRAF. Проведена ретроспективная оценка в материале парафиновых блоков у 92 пациентов оперированных с диагнозом высокодифференцированный папиллярный рак щитовидной железы посредством иммуногистохимического метода.

Исследование группы пациентов с папиллярным раком щитовидной железы показало высокую степень встречаемости мутантного BRAF (67,4%), что в целом соответствует частоте выявляемости мутации BRAF в папиллярном раке щитовидной железы в других странах мира, включая азиатские.

Полученные результаты подтверждают то, что мутация гена BRAF характерна для папиллярной формы рака щитовидной железы и имеет высокую частоту встречаемости.

Данный факт согласно литературным источникам указывает на высокую частоту встречаемости данной мутации в исследуемых образцах.

Помимо возможного диагностического потенциала генетической мутации BRAF, мы оценили прогностические характеристики мутации гена BRAF. Для выявления прогностической значимости мы исследовали связь мутации гена BRAF с клинико-морфологическими особенностями опухоли.

Выявлена взаимосвязь ряда клинико-морфологических характеристик папиллярного рака щитовидной железы с присутствием мутантного BRAF. Проведена оценка согласно следующим параметрам: пол, возраст на момент операции, максимальный размер опухоли, опухолевая капсула, преобладающий структурный компонент (папиллярный или другой), pT категория, pN категория, интратиреоидное распространение, экстратиреоидная инвазия, сосудистая инвазия, фокальная оксифильноклеточная метаплазия, сопутствующая узловатая патология и сопутствующий тиреоидит.

По результатам исследования получены доказательства связи частоты мутантного BRAF с более старшим возрастом пациентов, с сосочковым

(классическим папиллярным) строением опухоли, меньшей вероятностью присутствия опухолевой капсулы и сопутствующим тиреоидитом.

Также не подтверждена взаимосвязь мутантного BRAF с клинико-морфологическими показателями агрессивности опухоли.

Завершающий этап работы был отработан исследованием на предмет выявления мутации гена BRAF в материале тонкоигольной аспирационной биопсии у 122 пациентов с узловыми образованиями щитовидной железы.

В исследуемой группе с цитологическим заключением категория 2 (доброкачественный узел) согласно международной классификационной системе Бетезда, генетической мутации BRAF не выявлено ни в одном из 116 (95%) образцов.

В группе с цитологическим заключением категория 6 (рак щитовидной железы) мутация гена BRAF выявлена во всех 2 (1,7%) образцах, данный факт свидетельствует о высокой корреляционной связи между генетической мутацией и раком щитовидной железы.

У 4 пациентов с цитологическим заключением категория 5 (подозрение на малигнизацию) мутация гена BRAF выявлена во всех 4 (3,3%) образцах, что свидетельствует о наличии злокачественности процесса и требует радикальных методов лечения.

Один из пациентов с цитологическим заключением категория 6 (рак щитовидной железы) был прооперирован, папиллярный рак щитовидной железы подтвержден гистологическим исследованием.

Показана эффективность диагностической модели основанной на выявление мутации гена BRAF в материале тонкоигольной аспирационной биопсии. Выявление мутации гена BRAF в пункционном материале ТАПБ из узловых образований щитовидной железы может эффективно использоваться в качестве дополнительного метода дооперационной диагностики рака щитовидной железы.

Полученные результаты показывают высокую потенциальную информативность выявления мутации BRAF в материале тонкоигольной аспирационной биопсии узловых образований щитовидной железы, которая, основываясь на связи частоты мутации с возрастом, может быть особенно рекомендована для пациентов старше 46 лет в случае необходимости уточнения предоперационного диагноза [180].

Выявление мутации гена BRAF в узловых новообразованиях щитовидной железы значительно повышает вероятность диагностики рака щитовидной железы. Отрицательный результат исследования снижает вероятность этого диагноза.

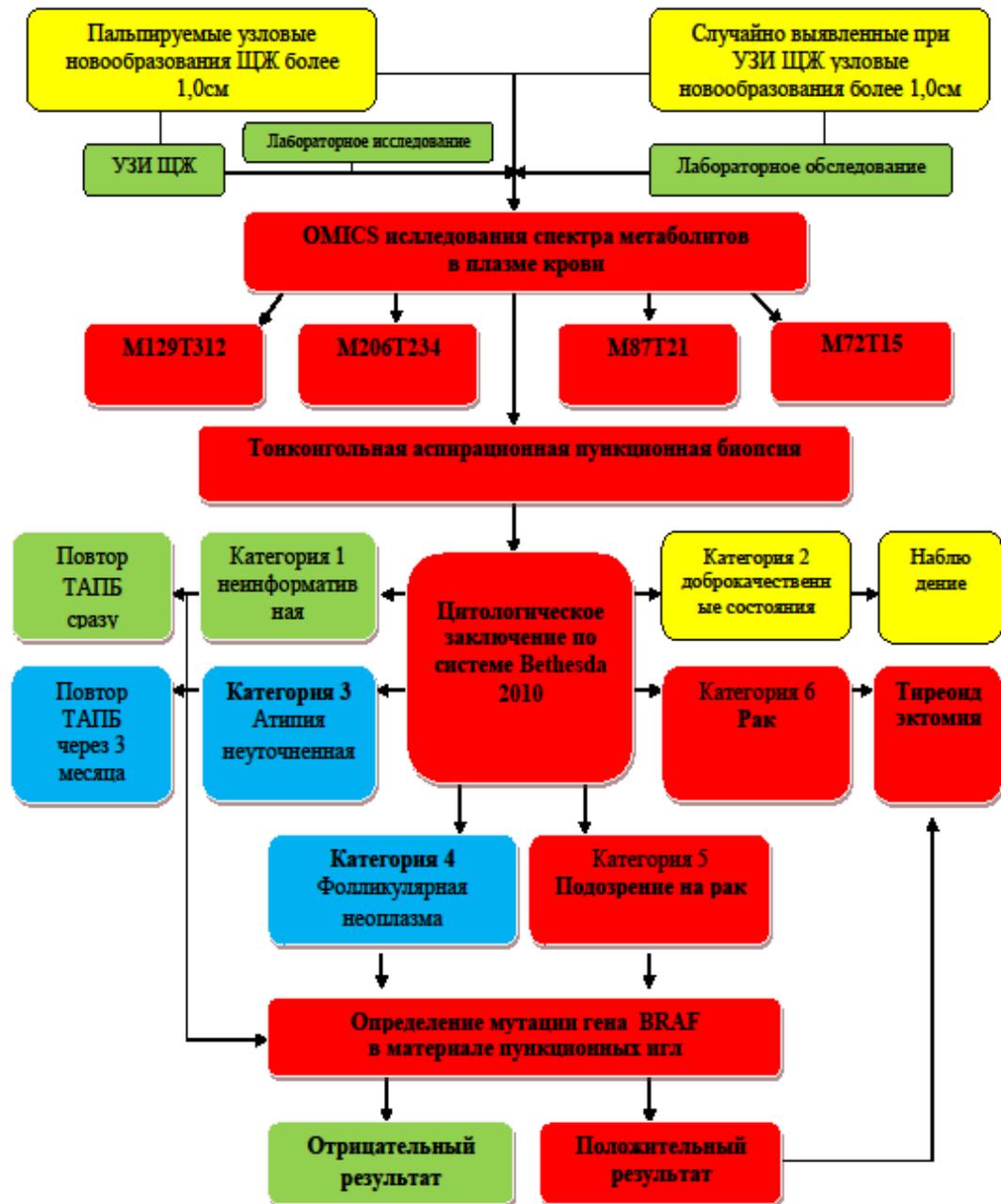
Исследование генетической мутации BRAF на раннем дооперационном этапе также обладает максимальной чувствительностью, составляющей 95% и максимальной специфичностью, составляющей 100%.

Анализ результатов определения генетической мутации BRAF в смывах пункционных игл на этапе раннего дооперационного периода целесообразно

проводить совместно с оценкой спектра в плазме крови следующих метаболитов: M129T312, M206T234, M87T21, M72T15.

Полученный анализ результатов исследования послужил основанием для усовершенствования алгоритма диагностики рака щитовидной железы, в особенности на раннем дооперационном этапе.

## АЛГОРИТМ ДИАГНОСТИКИ УЗЛОВЫХ НОВООБРАЗОВАНИЙ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ



Таким образом, внедрение высокотехнологичных методов молекулярно-генетических ОМКС-исследований на дооперационном этапе позволит улучшить дифференциальную диагностику рака щитовидной железы и в последующем выполнить оперативное лечение в оптимальном и необходимом объеме.

Полученные результаты молекулярно – генетических исследований при комплексном использовании ОМКС технологий свидетельствуют о том, что необходимо провести в дальнейшем новое и перспективное исследование по изучению спектра метаболитов и других генетических факторов при злокачественных новообразованиях щитовидной железы.

## **Выводы**

1. Исследование спектра метаболитов в образцах плазмы крови выявило 833 метаболита. Среди них после проведения ранжирования, частотные распределения у пациентов, не имеющих узловые образования щитовидной железы и у пациентов с раком щитовидной железы составили (0,5%), у пациентов с доброкачественными образованиями щитовидной железы и у пациентов с раком щитовидной железы также (0,5%) соответственно, и у пациентов не имеющих узловые образования щитовидной железы и у пациентов с доброкачественными образованиями щитовидной железы частотные распределения составили (0,12%), соответственно ниже, чем у предыдущих двух групп.

2. Спектр метаболитов M129T312, M206T234, M87T21 и M72T15 является высокоэффективным классификатором, позволяющим создать модель для идентификации рака щитовидной железы на предоперационном этапе со специфичностью 92% и чувствительностью 85%. Данный классификатор особенно полезен в случае солитарного узла щитовидной железы, когда задачей является определение его злокачественной природы.

3. Спектр метаболитов M168T12, M411T31, M561T1 и M90T11 может быть использован для дифференциальной диагностики злокачественного и доброкачественного новообразования щитовидной железы на предоперационном этапе с чувствительностью 85% и специфичностью 96%.

4. Определение концентрации метаболита M104T12 является информативным для диагностики доброкачественного процесса. Полученная статистическая модель, в которую M104T12 входит наряду с возрастом пациента, позволяет идентифицировать доброкачественные узлы щитовидной железы с чувствительностью 74% и специфичностью 85%.

5. Встречаемость мутантного BRAF у пациентов с папиллярным раком щитовидной железы составляет 67,4%, указывая на обоснованность выявления данной мутации на предоперационном этапе. Наличие BRAF мутации в опухоли связано с возрастом и может быть особенно рекомендована для пациентов старше 46 лет.

6. Выявление мутации BRAF в материале смыва иглы, использованной для тонкоигольной аспирационной биопсии узла щитовидной железы, может с успехом выполняться на раннем предоперационном этапе. Высокая частота встречаемости мутантного BRAF у пациентов из Казахстана и сильная корреляция с результатами цитологического анализа (чувствительность 95% и специфичность 100%) предполагают целесообразность использования молекулярного анализа в качестве дополнительного диагностического теста в случаях сомнительных результатов УЗИ и цитологического исследования.

### **Практические рекомендации для внедрения**

1. Для дооперационной дифференциальной диагностики узлов щитовидной железы у пациентов с предварительным диагнозом или подозрением на рак щитовидной железы рекомендуется проводить анализ спектра метаболитов M129T312, M206T234, M87T21, M72T15, M168T12, M411T31, M561T1 и M90T11 в плазме крови.

2. Для дооперационной дифференциальной диагностики у пациентов с предварительным диагнозом или подозрением на рак щитовидной железы рекомендуется проводить молекулярно-генетический анализ мутации гена BRAF в материале смыва пункционных игл.

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. La Vecchia C, Malvezzi M, Bosetti C, et al. Thyroid cancer mortality and incidence: a global overview //Int J Cancer. - 2015. –Vol. 136. – P.2187–2195.
2. Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. Cancer Statistics, 2010 //CA Cancer J Clin. -2010. – Vol. 60. – P.277-300.
3. Международное агентство по исследованию рака, [https://gco.iarc.fr/today/onlineanalysisstreeam?v=2018&mode=cancer&mode\\_population=continents&population=900&populations=900&key=asr&sex=0&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population\\_group=0&ages\\_group%5B%5D=0&ages\\_group%5B%5D=17&nb\\_items=5&group\\_cancer=1&include\\_nmsc=1&include\\_nmsc\\_other=1&reloaded.](https://gco.iarc.fr/today/onlineanalysisstreeam?v=2018&mode=cancer&mode_population=continents&population=900&populations=900&key=asr&sex=0&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&nb_items=5&group_cancer=1&include_nmsc=1&include_nmsc_other=1&reloaded.) -20.08.2019г.
4. Международное агентство по исследованию рака, [https://gco.iarc.fr/today/onlineanalysisstreeam?v=2018&mode=cancer&mode\\_population=continents&population=900&populations=900&key=asr&sex=0&cancer=39&type=0&statist=5&prevalence=0&population\\_group=0&ages\\_group%5B%5D=0&ages\\_group%5B%5D=17&nb\\_items=5&group\\_cancer=1&include\\_nmsc=1&includenmsc\\_other=1&reloaded.](https://gco.iarc.fr/today/onlineanalysisstreeam?v=2018&mode=cancer&mode_population=continents&population=900&populations=900&key=asr&sex=0&cancer=39&type=0&statist=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&nb_items=5&group_cancer=1&include_nmsc=1&includenmsc_other=1&reloaded.) -20.08.2019г.
5. Park S, Oh CM, Cho H, et al. Association between screening and the thyroid cancer "epidemic" in South Korea: evidence from a nationwide study. BMJ. 2016 Nov 30;355:i5745.
6. Международное агентство по исследованию рака, [https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-dual-bars-2?v=2018&mode=cancer&mode\\_population=regions&population=900&populations=900&key=asr&sex=0&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population\\_group=0&ages\\_group%5B%5D=0&ages\\_group%5B%5D=17&nb\\_items=10&group\\_cancer=0&include\\_nmsc=1&include\\_nmsc\\_other=1&dual\\_distribution=1&population1=900&population2=410&show\\_values=false&type\\_multiple=%257B%2522inc%2522%253Atrue%252C%2522mort%2522%253Atrue%252C%2522prev%2522%253Afalse%257D&population\\_group\\_globocan\\_id=&type\\_sort=0#collapse-bycountry](https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-dual-bars-2?v=2018&mode=cancer&mode_population=regions&population=900&populations=900&key=asr&sex=0&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&nb_items=10&group_cancer=0&include_nmsc=1&include_nmsc_other=1&dual_distribution=1&population1=900&population2=410&show_values=false&type_multiple=%257B%2522inc%2522%253Atrue%252C%2522mort%2522%253Atrue%252C%2522prev%2522%253Afalse%257D&population_group_globocan_id=&type_sort=0#collapse-bycountry) -20.08.2019г.
7. Международное агентство по исследованию рака, <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/32-Thyroid-fact-sheet.pdf>.
8. Международное агентство по исследованию рака, <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/398-kazakhstan-factsheets.pdf>.
9. Международное агентство по исследованию рака, [https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-dual-bars-2?v=2018&mode=cancer&mode\\_population=regions&population=250&populations=250&key=asr&sex=0&cancer=32&type=0&statistic=5&prevalence=0&population\\_group=0&ages\\_group%5B%5D=0&ages\\_group%5B%5D=17&nb\\_items=20&group\\_cancer=1&include\\_nmsc=1&include\\_nmsc\\_other=1&dual\\_distribution=2&population1=250&population2=554&show\\_values=false&type\\_multiple=%257B%2522inc%2522%253Atrue%252C%2522mort%2522%253Afalse%252C%2522prev%2522%253Afalse%257D&population\\_group\\_globocan\\_id=&type\\_sort=0.](https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-dual-bars-2?v=2018&mode=cancer&mode_population=regions&population=250&populations=250&key=asr&sex=0&cancer=32&type=0&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&nb_items=20&group_cancer=1&include_nmsc=1&include_nmsc_other=1&dual_distribution=2&population1=250&population2=554&show_values=false&type_multiple=%257B%2522inc%2522%253Atrue%252C%2522mort%2522%253Afalse%252C%2522prev%2522%253Afalse%257D&population_group_globocan_id=&type_sort=0.) -20.08.2019г.

- 10 Davies L. How understanding thyroid cancer in Belgium can help us mitigate the problem of increasing incidence // *J Clin Endocrinol Metab.* -2013. – Vol. 98(10). – P.3977.
- 11 Boucek J, Kastner J, Skrivan J, et al. Occult thyroid carcinoma // *Acta Otorhinolaryngol Ital.* - 2009 Dec. – Vol. 29(6). – P.296-304.
- 12 Davies L, Welch HG. Current thyroid cancer trends in the United States. *JAMA Otolaryngol Head Neck Surg.* 2014 Apr;140(4):317-22.
- 13 Pathak KA, Leslie WD, Klonisch TC, Nason RW. The changing face of thyroid cancer in a population-based cohort. *Cancer Med.* 2013 Aug;2(4):537-44.
- 14 Burgess JR. Temporal trends for thyroid carcinoma in Australia: an increasing incidence of papillary thyroid carcinoma (1982-1997). *Thyroid.* 2002 Feb;12(2):141-9.
- 15 Peterson E, De P, Nuttall R. BMI, diet and female reproductive factors as risks for thyroid cancer: a systematic review. *PLoS One.* 2012;7(1):e29177.
- 16 Veiga LH, Holmberg E, Anderson H, et al. Thyroid Cancer after Childhood Exposure to External Radiation: An Updated Pooled Analysis of 12 Studies. *Radiat Res.* 2016 May;185(5):473-84.
- 17 Cardis E, Kesminiene A, Ivanov V, et al. Risk of thyroid cancer after exposure to <sup>131</sup>I in childhood. *J Natl Cancer Inst.* 2005 May 18;97(10):724-32.
- 18 [https://www.unscear.org/docs/publications/2008/UNSCEAR\\_2008\\_Report\\_Vol.I.pdf](https://www.unscear.org/docs/publications/2008/UNSCEAR_2008_Report_Vol.I.pdf)
- 19 Кондратьева Т.Т., Павловская А.И., Врублевская Е.А. Морфологическая диагностика узловых образований щитовидной железы // *Практ. онкол.*—2007.—№ 1.— С. 9–16.
- 20 De Lellis R.A., Williams E.D. Thyroid and parathyroid tumours: Introduction // *Pathology and Genetics of Tumours of Endocrine Organs.*—2004.— P.51–56.
- 21 Lloyd RV, Osamura RY, Kloppel G, Rosai J, Eds. WHO classification of tumours of endocrine organs. 4 ed. Lyon: IARC Press; 2017
- 22 Agretti P., et al. MicroRNA expression profile helps to distinguish benign nodules from papillary thyroid carcinomas starting from cells of fine-needle aspiration // *Eur. J. Endocrinol.* – 2012. – Vol. 167, №3. – P. 393-400.
- 23 The World Factbook // ЦПУ: «Population: 7,323,187,457 (July 2016 est)
- 24 Фурина Р.Р. Метаболомические исследования в онкологии // *Российский онкологический журнал* №4. 2014. С.12
- 25 Барчук А.С. Рецидивы дифференцированного рака щитовидной железы / А.С. Барчук // *Практическая онкология.* – 2007. – Т. 8, № 1. – С. 35–41.
- 26 Voijunga J., Zeuzem S. Molecular detection of thyroid cancer: an update // *Clin. Endocrinol. (Oxf.)*. – 2004. – Vol. 61. P. 523–530.
- 27 Nikiforov Y.E. Molecular diagnostics of thyroid tumors // *Arch. Pathol. Lab. Med.* – 2011. – Vol. 135. – № 5. – P. 569-577.
- 28 Международное агентство по исследованию рака,

[https://gco.iarc.fr/today/onlineanalysisstreemap?v=2018&mode=cancer&mode\\_population=continents&population=900&populations=900&key=asr&sex=0&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population\\_group=0&ages\\_group%5B%5D=0&ages\\_group%5B%5D=17&nb\\_items=5&group\\_cancer=1&include\\_nmssc=1&include\\_nmssc\\_other=1&reloaded](https://gco.iarc.fr/today/onlineanalysisstreemap?v=2018&mode=cancer&mode_population=continents&population=900&populations=900&key=asr&sex=0&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&nb_items=5&group_cancer=1&include_nmssc=1&include_nmssc_other=1&reloaded).

29 Sandeep T.C., Strachan M.W.J., Reynolds R.M. et al. Second primary cancers in thyroid cancer patients: a multinational record linkage study // J. Clin. Endocrinol. Metab. – 2006. – Vol. 91 – P. 1819 – 1825.

30 Ries L.A.G., Harkins D., Krapcho M. et al. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2003. National Cancer Institute, Bethesda, MD. [http://seer.cancer.gov/csr/1975\\_2003/](http://seer.cancer.gov/csr/1975_2003/), posted to the SEER web site 2006.

31 Давыдов М.И. Статистика злокачественных новообразований в России и странах СНГ в 2005 году // Вестник РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН. – 2007. – Т. 18. №2 (приложение 1). – С. 156.

32 Memon A, Darif M, Al-Saleh K, Suresh A. Epidemiology of reproductive and hormonal factors in thyroid cancer: evidence from a case control study in the Middle East. Int J Cancer 2002;97:82–9.

33 Negri E, Dal Maso L, Ron E, et al. A pooled analysis of case-control studies of thyroid cancer. II. Menstrual and reproductive factors. Cancer Causes Control 1999;10:143–55.

34 Zivaljevic V, Vlajinac H, Jankovic R, et al. Case-control study of female thyroid cancer--menstrual, reproductive and hormonal factors. Eur J Cancer Prev 2003;12:63–6.

35 Goodman MT, Kolonel LN, Wilkens LR. The association of body size, reproductive factors and thyroid cancer. Br J Cancer 1992;66:1180–4.

36 Smith P, Williams ED, Wynford-Thomas D. In vitro demonstration of a TSH-specific growth desensitising mechanism in rat thyroid epithelium. Mol Cell Endocrinol 1987;51:51–8.

37 Потапов 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.

38 Чиссов В.И., Старинский В.В. Злокачественные новообразования в России в 2000 году. М: МНИОИ им. П.А.Герцена. 2002, 264.

39 Hemminki K., Li. X. Gender effects in familial cancer // Int. J. Cancer. – 2002. – Vol. 102. – P. 184-187.

40 Niedzila M. Pathogenesis, diagnosis and management of thyroid nodules in children // Endocrine Related Cancer –2006. – Vol. 13. – P. 427-453.

41 J. Figge et al. Thyroid Cancer. A comprehensive Guide to Clinical Management // Humana Press. – 2006. – Vol. 122. – P. 63-84.

42 Дедов И.И. Руководство по детской эндокринологии / И. И. Дедов, В. А. Петеркова. -М.: Универсум Паблишинг, 2006. С. – 194.

- 43 De Groot L. J. Radio iodine and the immune system // *Thyroid*. – 1997. – Vol. 7. – P. 259 – 264.
- 44 C. Romei et al. Modifications in the papillary thyroid cancer gene profile over the last 15 years // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 2012. – Vol. 97, №9. – P. 1758-1765.
- 45 Ингбар С. Болезни щитовидной железы. В кн.: Браунвальд Е. и др., ред. Внутренние болезни: Пер. с англ. М.: Медицина; 1997; т. 9: 94 – 133.
- 46 Международное агентство по исследованию рака,  
[https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-dual-bars?v=2018&mode=cancer&mode\\_population=regions&population=840&populations=860&key=total&sex=0&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population\\_group=0&ages\\_group%5B%5D=0&ages\\_group%5B%5D=17&nb\\_items=all&group\\_cancer=1&include\\_nmsc=1&include\\_nmsc\\_other=1&dual\\_distribution=1&population1=860&population2=398&show\\_values=false&type\\_multiple=%257B%2522inc%2522%253Atrue%252C%2522mort%2522%253Atrue%252C%2522prev%2522%253Afalse%257D&population\\_group\\_globocan\\_id=&type\\_sort=0#collapse-group-0-3](https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-dual-bars?v=2018&mode=cancer&mode_population=regions&population=840&populations=860&key=total&sex=0&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&nb_items=all&group_cancer=1&include_nmsc=1&include_nmsc_other=1&dual_distribution=1&population1=860&population2=398&show_values=false&type_multiple=%257B%2522inc%2522%253Atrue%252C%2522mort%2522%253Atrue%252C%2522prev%2522%253Afalse%257D&population_group_globocan_id=&type_sort=0#collapse-group-0-3).
- 47 Показатели онкологической службы РК за 2014год. - Алматы, 2015. - 127 с.
- 48 Показатели онкологической службы РК за 2014год. - Алматы, 2015. - 131 с.
- 49 Lloyd RV, Osamura RY, Kloppel G, Rosai J, Eds. WHO classification of tumours of endocrine organs. 4 ed. Lyon: IARC Press; 2017.
- 50 [https://seer.cancer.gov/archive/csr/1975\\_2012/results\\_merged/sect\\_26\\_thyroid.pdf](https://seer.cancer.gov/archive/csr/1975_2012/results_merged/sect_26_thyroid.pdf).
- 51 Ciampi R, Nikiforov YE. Minireview: RET/PTC rearrangements and BRAF mutations in thyroid tumorigenesis. *Endocrinology*. 2007;148(3):936-941
- 52 Дедов И.И., Мельниченко Г.А., Фадеев В.В. Эндокринология. – Издание второе. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2008. – 432с.: С. 173.
- 53 Caliskan M, Park JH, Jeong JS, et al. Role of prophylactic ipsilateral central compartment lymph node dissection in papillary thyroid microcarcinoma. *Endocrin J*. 2012;59(4):305-311. doi: 10.1507/endocrj.EJ11-036644
- 54 Lee J, Park JH, Lee C-R, et al. Long-term outcomes of total thyroidectomy versus thyroid lobectomy for papillary thyroid microcarcinoma: Comparative analysis after propensity score matching. *Thyroid*. 2013;23(11):1408-1415.
- 55 Pacini F. Management of papillary thyroid microcarcinoma: Primum non nocere! *J Clin Endocrinol Metab*. 2013;98(4):1391-1393
- 56 Haugen B.R., Alexander E.K., Bible K.C., Doherty G.M., et al. American Thyroid Association Management Guidelines for Adult Patients with Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer: The American Thyroid Association Guidelines Task Force on Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer. *Thyroid*. 2016; 26 (1):1–133

- 57 Sakamoto A., Kasai N., Sugano H. Poorly differentiated carcinoma of the thyroid. A clinicopathologic entity for a high-risk group of papillary and follicular carcinomas. *Cancer*. 1983; 52 (10): 1849—55.
- 58 Hiltzik D, Carlson DL, Tuttle RM, et al. Poorly differentiated thyroid carcinomas defined on the basis of mitosis and necrosis: a clinicopathologic study of 58 patients. *Cancer*. 2006 Mar 15;106(6):1286-95.
- 59 Neff R.L., Farrar W.B., Kloos R.T., Burman K.D., Anaplastic thyroid cancer // *Endocrinol. Metab. Clinic. NorthAm.* – 2008. – Vol. 37. – N 2. – P. 525-538
- 60 Agarwal A., Mishra S.K. Completion total thyroidectomy in the management of differentiated thyroid carcinoma // *Aust.N.Z.J.Surg.* – 1996. – Vol. 66, № 6\_8. – P.358-360
- 61 Akm Hossain et al., Anaplastic Thyroid Cancer // *Journal of Oncology*. 2011
- 62 Kondo T., Ezzat S., Asa S.L. Pathogenetic mechanisms in thyroid follicular cell neoplasia. *Nature Reviews //Cancer.* – 2006.– Vol.6. – P.292–306
- 63 Пальцев М.А., Кветной И.М., Полякова В.О., Гурко Г.И., Мурсалов С.У. Нейроиммуноэндокринные механизмы старения и возрастной патологии. – СПб.: Наука, 2012. – 248
- 64 Казубская Т.П. Рак щитовидной железы: генетическая обусловленность, гетерогенность, молекулярные маркеры диагностики // *Практическая онкология*. Т. 15, №13 – 2014. С. 138
- 65 Кузнецов Н.С., Латкина Н.В., Добрева Е.А. АКТГ-эктопированный синдром: клиника, диагностика, лечение (обзор литературы) // *Эндокринная хирургия*. №1. - 2012. С. 26
- 66 Валдина Е.А, Объем оперативного вмешательства при высокодифференцированном раке щитовидной железы // *Вопросы онкологии*. 2006. – Т. 52, №1. – С. 119-121
- 67 Чиссов В.И., Старинский В.В., Петрова Г.В. Злокачественные новообразования в России в 2008 году. –М., 2010. С 256
- 68 Guth S, Theune U, Aberle J, et al. Very high prevalence of thyroid nodules detected by high frequency (13 MHz) ultrasound examination. *EurJClinInvest* 2009. 39:699–706
- 69 Hegedus L 2004 Clinical practice. The thyroid nodule. *N Engl J Med* 351:1764–1771
- 70 Васьков В.М., Микрокарциномы щитовидной железы / В.М. Васьков, П.В. Панов, Т.А. Масальская // *Современные аспекты хирургической эндокринологии: материалы 11 (13) Российского симпозиума по хирургической эндокринологии.* – СПб., 2003. – С. 54-55
- 71 Валдина, Е.А. Заболевания щитовидной железы: руководство / Е.А. Валдина. – 3-е изд. – СПб. Питер. 2006. – С. 368
- 72 Пинский, С.Б. Диагностика заболеваний щитовидной железы / С.Б. Пинский, А.П. Калинин, В.А. Белобородов. – М.: Медицина, 2005. – С. 192

- 73 Демидов, В.П. Ошибки в диагностике и лечении рака щитовидной железы / В.П. Демидов, С. А. Сергеев, Е.Д. Панов // Вопросы онкологии. – 1990. – Т. 36, № 5. – С. 568-571
- 74 De Lellis, R.A. Pathology and genetics of thyroid carcinoma / R.A. De Lellis // J. Surg. Oncol. – 2006. – Vol. 94, №8. – P. 662-669
- 75 Piscaglia F., et al. Guidelines and recommendations on the clinical practice of contrast enhanced ultrasound (CEUS): update 2011 on non-hepatic applications // *Ultraschall in der Medizin*. - 2012. Vol. 33, Iss. 1. P. 33–59
- 76 Воробьев С.Л., Сравнительная оценка результатов цитологического исследования материала, полученного при дооперационной тонкоигольной аспирационной биопсии и интраоперационных мазков-отпечатков при одиночных узлах щитовидной железы / С.Л. Воробьев // Сборник научных трудов 2 научной конференции «Клиническая морфология новообразований эндокринных желез». – 2001. - №2. – С. 30-33
- 77 Gharib H, Papini E 2007 Thyroid nodules: clinical importance, assessment, and treatment. *Endocrinol Metab Clin North Am* 36:707–35
- 78 Haymart MR, Repplinger DJ, Leverson GE, et al. Higher serum thyroid stimulating hormone level in thyroid nodule patients is associated with great errisks of differentiated thyroid cancer and advanced tumorstage. *JClin Endocrinol Metab* 2008. 93:809–814
- 79 Lee EK, Chung KW, Min HS, et al. Preoperative serum thyroglobulinas au seful predictive marker to differentiate follicular thyroid cancer from benign nodules in indeterminate nodules. *JKorean Med Sci* 2012. 27:1014–1018
- 80 Chambon G, Aloviseti C, Idoux-Louche C, et al. The use of preoperative routine measure ment of basal serum thyrocalcitonin in candidates for thyroidectomydue to nodular thyroid disorders: results from 2733consecutive patients. *JClin Endocrinol Metab* 2011. 96:75–81
- 81 Gagel RF, Hoff AO, Cote GE. Medullary thyroid carcinoma. In: raverman L, Utiger R (eds) *Werner and Ingbar’s The Thyroid*. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, PA. 2005. pp 967–988
- 82 Diazzi C, Madeo B, Taliani E, et al. The diagnostic value of calcitonin measure mentin wash – out fluid from fine – needle aspiration of thyroid nodules in the diagnosis of medullary thyroid cancer. *EndocrPract* 2013.19:769–779
- 83 Зубов А.Д., Чирков Ю.Э., Чередниченко С.И., Губанов Д.М. THIRADS: ультразвуковая классификация узлов щитовидной железы // *Лучевая диагностика, лучевая терапия*. — 2010. - С. 33-40
- 84 Михнин А.Е., Рак щитовидной железы: диагностика, классификация, стадирование / А.Е. Михнин // *Практическая онкология*. – 2007. – Т. 8, №1. – С. 17-25
- 85 Шустов С.Б. Функциональная и топическая диагностика в эндокринологии / С.Б. Шустов, Ю.Ш. Халимов. – СПб. ЭЛБИ СПб. 2001. –С. 239

- 86 Трошина Е.А., Юшков П.В., Абесадзе И.А. Клинические, морфологические и иммуногистохимические особенности фолликулярных опухолей щитовидной железы: результаты ретроспективного исследования / Сборник научных трудов 2 научной конференции «Клиническая морфология новообразований эндокринных желез». – М., 2007. – С. 153-158
- 87 Talbot, J.N. PET in thyroid cancer / J.N. Talbot, F. Montravers, N. Younsi // *Presse Med.* – 2006. – Vol. 353, №9. – P. 1377-1385.
- 88 Cibas ES, Ali SZ; NCI Thyroid FNA State of the Science Conference. The Bethesda System For Reporting Thyroid Cytopathology. *Am J Clin Pathol.* 2009 Nov;132(5):658-65.
- 89 Cibas ES, Ali SZ. The 2017 Bethesda System for Reporting Thyroid Cytopathology. *Thyroid.* 2017 Nov;27(11):1341-1346.
- 90 Bongiovanni M, Spitale A, Faquin WC, Mazzucchelli L, Baloch ZW 2012 The Bethesda System for Reporting Thyroid Cytopathology: a meta-analysis. *Acta Cytol* 56: 333–339.
- 91 Пачес А.И., Любаев В.Л., Шенталь В.В., Пустынский И.Н. Современное состояние проблем лечения рака щитовидной железы // *Вопросы онкологии.* - 1997. - Т. 44, № 5. С. 562-566
- 92 Pauzar B, Staklenac B, Loncar B. Fine Needle Aspiration Biopsy of Follicular Thyroid Tumors. *Coll Antropol* 2010; 34: 87-91
- 93 Shibru D., Hwang J., Khanafshar E., Duh Q.Y., Clark O.H., Kebebew E. Does the 3 gene diagnostic assay accurately distinguish benign from malignant thyroid neoplasms? // *Cancer.* 2008. – Vol. 113. – No 5. – P. 930–935
- 94 Tee YY, Lowe AJ, Brand CA, Judson RT 2007 Fine needle aspiration may miss a third of all malignancy in palpable thyroid nodules: a comprehensive literature review. *Ann Surg* 246:714–720
- 95 Герасимов Г.А. Влияние ионизирующей радиации на щитовидную железу // *Проблемы эндокринологии.* – 1991. – Т. 37, № 4. С. 64-67
- 96 Кондратьева Т.Т., Павловская А.И., Врублевская Е.А. Морфологическая диагностика узловых образований щитовидной железы // *Практ. онкол.*—2007.—№ 1.— С. 9–16
- 97 De Lellis R.A., Williams E.D. Thyroid and parathyroid tumours: Introduction // *Pathology and Genetics of Tumours of Endocrine Organs.*—2004.— P.51–56
- 98 Malterling R.R., Andersson R.E., Falkmer S., Falkmer U., Niléhn E., Järhult J. Differentiated thyroid cancer in a Swedish county--long-term results and quality of life. *Acta Oncol.* - 2010; 49: 454
- 99 Reading C.C., Charboneau J.W., Hay I.D., Sebo T.J. Sonography of thyroid nodules: a “classic pattern” diagnostic approach. *Ultrasound Q* 2005; 21: 157-165
- 100 Langer JE, Agarwal R, Zhuang H, Huang SS, Mandel SJ 2011 Correlation of findings from iodine 123 scan and ultrasonography in their commendation for thyroid fine needle aspiration biopsy. *Endocr Pract* 17:699–706

- 101 Mazzaferri EL. Management of a solitary thyroid nodule. *N Engl J Med* 1993;328: 553-559
- 102 Wang, C. The epidemiology of thyroid disease and implications for screening // *Endocrinology and metabolism clinics of North America*. - 1997. - Vol. 26. - P. 189 – 218
- 103 Петров В.Г., Нелаева А.А., Хучашева И.А., Мелехин Е.В. Лазериндуцированная термотерапия кистозно-коллоидных узлов щитовидной железы: эффективность и безопасность // *Вестник хирургии им. И.И. Грекова*. - 2016. - №1. - С. 48-53
- 104 В.Э. Ванушко, В.В. Фадеев. Эндокринная хирургия. Узловой зоб (клиническая лекция). - М.: 2012. - №14. - С. 11-15
- 105 Ванушко В.Э., Кузнецов Н.С., Гарбузов П.И., Фадеев В.В. Рак щитовидной железы // *Пробл. эндокринолог.* - 2005. - Т. 51. - № 4. - С. 43-52
- 106 Петров В. Г., Нелаева А. А., Александрова Е. А., и др. К вопросу об эффективности и безопасности миниинвазивной лазериндуцированной термотерапии кистозно-коллоидных узлов щитовидной железы // *Университетская медицина Урала*. - 2015. - №1. - С. 28-31
- 107 Валдина Е.А. Заболевания щитовидной железы. - СПб.: 2006. - 368 с
- 108 Cooper DS, Doherty GM, Haugen BR, et al. American Thyroid Association (ATA) Guidelines Taskforce on Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer, Revised American Thyroid Association management guidelines for patients with thyroid nodules and differentiated thyroid cancer. *Thyroid* 2009; 19: 1167-1214
- 109 Moon WJ, Baek JH, Jung SL, et al. Korean Society of Thyroid Radiology (KSThR); Korean Society of Radiology. Ultrasonography and the ultrasound-based management of thyroid nodules: consensus statement and recommendations. *Korean J Radiol* 2011; 12: 1-14
- 110 Yuan WH, Chiou HJ, Chou YH, Hsu HC, Tiu CM, Cheng CY, Lee CH. Gray-scale and color Doppler ultrasonographic manifestations of papillary thyroid carcinoma: analysis of 51 cases. *Clin Imaging* 2006; 30: 394-401
- 111 Chan BK, Desser TS, McDougall IR, et al. Common and uncommon sonographic features of papillary thyroid carcinoma. *J Ultrasound Med* 2003; 22: 1083-1090
- 112 Gürsoy A, Anil C, Erişmiş B, Aytürk S. Fine-needle aspiration biopsy of thyroid nodules: comparison of diagnostic performance of experienced and inexperienced physicians. *Endocr Pract* 2010; 16: 986-991
- 113 Маркова Е.Н., Башилов В.П. Современные возможности ультразвукового исследования в предоперационной диагностике фолликулярных опухолей щитовидной железы // *Материалы 5-го Съезда Российской ассоциации специалистов ультразвуковой диагностики в медицине*. - М., 2007. - С. 178
- 114 Ионова Е.А., Тамбовцева Н.М. Диагностическая значимость ультразвукового исследования у больных раком щитовидной железы //

Материалы 5-го Съезда Российской ассоциации специалистов ультразвуковой диагностики в медицине. - М., 2007. - С. 173

115 Тимофеева Л.А., Диомидова В.Н., Воропаева Л.А., Быкова А.В., Алешина Т.Н. Сравнение диагностической ценности лучевых методов визуализации при узловых образованиях щитовидной железы // Медицинский альманах. – 2012. - № 4. - С. 120-123

116 Brill L., Pacini F. Targeted therapy in refractory thyroid cancer: current achievements and limitations. *Future Oncol.* - 2011; 7: 657–668

117 Alptekin Gürsoy, Murat Faik Erdoğan. Ultrasonographic Approach to Thyroid Nodules: State of Art // *Thyroid International.* - 2012. № 3. P. 3-14

118 Kwak J.Y., Han K.H., Yoon J.H., et al. Thyroid imaging reporting and data system for US features of nodules: a step in establishing better stratification of cancer risk // *Radiology.* - 2011; 260: 892-899

119 Eng C.Y., Quraishi M.S., Bradley P.J. Management of Thyroid nodules in adult patients. *Head&NeckOncology.* - 2010; 2(11):1-5

120 Kim E.K., Park C.S., Chung W.Y., et al. New sonographic criteria for recommending fine-needle aspiration biopsy of nonpalpable solid nodules of the thyroid. *AJR&M&JRoentgenol.* - 2002; 178: 687-691

121 Park CS, Kim SH, Jung SL, et al. Observer variability in the sonographic evaluation of thyroid nodules. *J Clin Ultrasound* 2010; 38: 287-293

122 Иванцов, А. О. Возможности иммуногистохимического исследования в диагностике опухолей // *Практ. онкология.* – 2011. – Т. 12. № 4. – С. 185–193

123 Кривола Ю. А., и др. Первый опыт проведения внешнего контроля качества иммуногистохимических исследований в диагностике лимфопролиферативных заболеваний // *Арх. патологии.* – 2011. – Т. 73, № 2. – С.23–32.

124 Криволапов, Ю. А. Применение тканевых матриц в иммуногистохимии // *Арх. патологии.* – 2005. – Т. 67. № 2. – С. 48–49.

125 Al-Nafussi, A. Tumor diagnosis: practical approach and pattern analysis / A. Al-Nafussi. – London : CRC Press. 2005. – 1344.

126 Kumar G.L., Rudbeck L. Иммуногистохимические методы: руководство / пер. с англ. под ред. Г. А. Франка, П. Г. Малькова. – М., 2011. – 224

127 Стаффорд, В. В. Применение иммуногистохимического метода в диагностике // *RJOAS.* – 2016 Aug. – Vol. 8. N 56. – P. 18–21

128 Збруева Ю. В., и др. Иммуногистохимическое исследование ушиба сердца // *Судебно-мед. экспертиза.* – 2013. – Т. 56. № 1. – С. 54–55

129 Fisher, C. Immunohistochemistry in diagnosis of soft tissue tumours / C. Fisher // *Histopathology.* – 2011 Jun. – Vol. 58. N 7. – P. 1001–1012

130 Baehner F. L., et al. Genomic signatures of cancer: basis for individualized risk assessment, selective staging and therapy. *J. Surg. Oncol.* – 2011. – Vol. 103, N 6. – P. 563–573

- 131 Langley R. R., Fidler I. J. Role of tumorstroma interactions in metastasis to different organs // *Int. J. Cancer.* – 2011. – Vol. 128. 11. – P. 2527–2535
- 132 Имянитов, Е. Н. Высокопроизводительные молекулярно-генетические методы нового поколения в диагностике и лечении новообразований // *Практ. онкология.* – 2011. – Т. 12, № 4. – С. 194–202
- 133 Иммуногистохимические и молекулярно-генетические методы диагностики онкологических заболеваний. Вестник ВГМУ. – 2017. – Том 16, №2. – С. 15-25
- 134 Wishart D.S., Tzur D., Knox C. HMDB: the Human Metabolome Database. *Nucleic Acids Res.* 2007; 35: 521–6
- 135 Catchpole G., Platzer A., Weikert C. et al. Metabolic profiling reveals key metabolic features of renal cell carcinoma // *J. Cell. Mol. Med.* — 2011. — Vol. 15. — P. 109–118
- 136 Silva C.L., Passos M., Camara J.S. Investigation of urinary volatile organic metabolites as potential cancer biomarkers by solidphase microextraction in combination with gas chromatography-mass spectrometry. *Br. J. Cancer.* 2011; 105: 1894–904
- 137 Patti G.J., Yanes O., Siuzdak G. Innovation: Metabolomics: the apogee of the omics trilogy. *Nature Rev. Mol. Cell. Biol.* 2012; 13: 263–9
- 138 Veenstra T.D. Metabolomics: the final frontier. *Genome Medicine.* 2012; 4: 40
- 139 Sreekumar A., Poisson L.M., Rajendiran T.M. et al. Metabolomic profiles delineate potential role for sarcosine in prostate cancer progression // *Nature.* — 2009. — Vol. 457. — P. 910–914
- 140 Silva C.L., Passos M., Camara J.S. Investigation of urinary volatile organic metabolites as potential cancer biomarkers by solid-phase microextraction in combination with gas chromatography-mass spectrometry // *Brit. J. Cancer.* — 2011. — Vol. 105. — P. 1894–1904
- 141 Brown M.V., Mc Dunn J.E., Gunst P.R. et al. Cancer detection and biopsy classification using concurrent histopathological and metabolomic analysis of core biopsies // *Gen. Med.* — 2012. — Vol. 4. — P. 33
- 142 Tian Y. et al., Integrative metabolomics as potential method for diagnosis of thyroid malignancy. *SciRep.* -2015.Oct21;5:148-169.
- 143 Kaddurah-Daouk R., Krishnan K.R. Metabolomics: a global biochemical approach to the study of central nervous system diseases. *Neuropsychopharmacology* – 2009. 34(1).173-186.
- 144 Lokhov P.G., Kharybin O.N., Archakov A.I. *Int. J. Mass Spectrom.*, 2012, vol. 309, pp. 200–205.
- 145 Sabatine M.S., Liu E., Morrow D.A., et al. Metabolomic identification of novel biomarkers of myocardial ischemia. *Circulation.* 2005. 112;3868-3875
- 146 Odunsi K., Wollman R.M., Ambrosone C.B., et al. Detection of epithelial ovarian cancer using IH-HMR-based metabolomics. *Int. J. Cancer.* 2005;113;782-788

- 147 Lokhov P.G., Dashtiev M.I., Moshkovskii S.A., Archakov A.I. *Metabolomics*. 2010. 6. –P. 156-163
- 148 Bommarito A., et all. BRAFV600E mutation, TIMP – 1 upregulation, and NF – kB activation; closing the loop on the papillary thyroid cancer trilogy / *Endocr. Relat. Cancer*. – 2011. – Vol 18. № 6. – P. 669-685
- 149 Петров С.В. Иммуногистохимическая диагностика опухолей щитовидной и паращитовидных желез, вилочковой железы. Руководство по иммуногистохимической диагностике опухолей человека. - Казань: Татул; 2004; 150-9
- 150 Хазиев В.В. Экспрессия цитокератинов в опухолях щитовидной железы. 2014. <http://mfvt.ru/ekspressiya-citokeratinov-v-opuxolyax-shhitovidnoj-zhelezy>
- 151 Yoshiyuki Ban, Gou Yamamoto, Michiya Takada et al. Proteomic Profiling of Thyroid Papillary Carcinoma // *J. Thyroid Research*. – 2012. – Vol. 2012
- 152 Zhu X., Sun T., Lu H. Et al. Diagnostic significance of CK19, Ret, galectin-3 and HBME-1 expression for papillary thyroid carcinoma // *J. Clin. Pathol*. – 2010. – Vol. 63 (9). – P. 786–789
- 153 Чернухина Д.Ю., Прилуцкий А.С. Роль галектина-3, HBME-1 и цитокератина-19 в иммуногистохимической диагностике папиллярного рака щитовидной железы // *Международный эндокринологический журнал*. – 2012. – № 5 (45). – С. 121–125
- 154 Adela Nechifor-Boilă, Ramona Cătană, Andrada Loghinetal. Diagnostic value of HBME-1, CD56, Galectin-3 and Cytokeratin-19 in papillary thyroid carcinomas and thyroid tumors of uncertain malignant potential // *Rom. J. Morphol. Embryol*. – 2014. – Vol. 55 (1). – P. 49–56
- 155 de Matos P.S., Ferreira A.P., de Oliveira Facuri F. et al. Usefulness of HBME-1, cytokeratin 19 and galectin-3 immunostaining in the diagnosis of thyroid malignancy // *Histopathology*. – 2005. – Vol. 47. – P. 391–401
- 156 Nga M.E., Lim G.S., Soh C.H., Kumarasinghe M.P. HBME-1 and CK19 are highly discriminatory in the cytological diagnosis of papillary thyroid carcinoma // *Diagn. Cytopathol*. – 2008. – Vol. 36. – P. 550–556
- 157 Almkvist J., Karlsson A. Galectins as inflammatory mediators // *Glycoconj. J*. – 2004. – Vol. 19. – P. 575–581
- 158 Qingbin Song, Deguang Wang, Yi Lou et al. Diagnostic significance of CK19, TG, Ki67 and galectin-3 expression for papillary thyroid carcinoma in the northeastern region of China // *Diagnostic Pathology*. – 2011. – Vol. 6. – P. 126–132
- 159 Двинских Н.Ю. Морфологическая и иммуногистохимическая оценка злокачественности опухолей щитовидной железы. Автореферат. – М.: 2010. – С. 26.
- 160 Вильгельм А.Э., Заика А.И., Прасолов В.С. Координированное взаимодействие мультифункциональных членов семейства p53 влияет на важнейшие процессы в многоклеточных организмах // *Молекулярная биология*. – 2011. – Т. 45, № 1. – С. 180–197

161 Недосекова Ю.В. Роль апоптоза в развитии аутоиммунных заболеваний щитовидной железы. // Бюллетень сибирской медицины. – 2009. – № 1. – С. 64–71

162 Абросимов А.Ю. Диагностическое значение иммуноэкспрессии галектина-3, HBME-1 и цитокератина-19 в опухолях щитовидной железы различного потенциала злокачественности / А.Ю. Абросимов, Н.Ю. Двинских // Российский онкологический журнал. – 2010. – № 1. – С. 26–31

163 M. Papotti, J. Rodriguez, R. de Pompa, A. Bartolazzi, and J. Rosai, “Galectin-3 and HBME-1 expression in well-differentiated thyroid tumors with follicular architecture of uncertain malignant potential,” *Modern Pathology*. -Vol. 18. no.4, pp. 541–546, 2005

164 Yamashita S, Saenko V. Mechanisms of Disease: molecular genetics of childhood thyroid cancers. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab*. 2007. 3 (5). 422-429.

165 Matsuse M, Yabuta T, Saenko V, Hirokawa M, Nishihara E, Suzuki K, Yamashita S, Miyauchi A, Mitsutake N. TERT promoter mutations and Ki-67 labeling index as a prognostic marker of papillary thyroid carcinomas: combination of two independent factors. *Sci Rep*. 2017 Feb 2;7:41752.

166 Jeong D, Jeong Y, Park JH, et al. BRAF (V600E) mutation analysis in papillary thyroid carcinomas by peptide nucleic acid clamp real-time PCR. *Ann Surg Oncol*. 2013 Mar;20(3):759-66.

167 The Cancer Genome Atlas Research Network. Integrated Genomic Characterization of Papillary Thyroid Carcinoma. -Vol.159. -ISSUE 3. -P 676-690, OCTOBER 23, 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2014.09.050>

168 Liu C, Chen T, Liu Z. Associations between BRAF (V600E) and prognostic factors and poor outcomes in papillary thyroid carcinoma: a meta-analysis. *World J Surg Oncol*. 2016 Sep 6;14(1):241.

169 Nair CG, Babu M, Biswas L, Jacob P, Menon R, Revathy AK, Nair K. Lack of Association of B-type Raf Kinase V600E Mutation with High-risk Tumor Features and Adverse Outcome in Conventional and Follicular Variants of Papillary Thyroid Carcinoma. *Indian J Endocrinol Metab*. 2017 Mar-Apr;21(2):329-333.

170 Еспенбетова М.Ж., Заманбекова Ж.К., Юрковская О.А., Атантаева Б.Ж., Болеубаева М.Т. Частота опухолей щитовидной железы в Семипалатинском регионе // Материалы II Санкт-Петербургского международного экологического форума в 2-х частях, 1-4 июля 2008 // Вестник Российской Военно-медицинской академии. – 2008, № 3 (23). – С. 197-198.

171 Атантаева Б.Ж. Еспенбетова М.Ж. Сандыбаев М.Н. Адылханов Т.А. Масадыков А.С. Танатова З.А. Роль мутации гена BRAF в качестве дополнительного диагностического критерия в диагностике рака щитовидной железы // Материалы международного научного форума «Рак щитовидной железы: современные принципы диагностики и лечения», 12-13 июня 2009 г. – Санкт-Петербург, 2009. – С. 16-18.

172 Атантаева Б.Ж. Воздействие радиации на развитие опухолей щитовидной железы в Семипалатинском регионе. // Материалы

Международной научно-практической конференции «Эхо полигона и мир без ядерного оружия». – 22-24 сентября 2009.- Семей.- С.160-161.

173 Kumagai A, Namba H, Akanov Zh, Saenko V.A, et al. Clinical implications of pre-operative rapid BRAF analysis for papillary thyroid cancer. *Endocrine Journal*, 2007, 54(3), стр. 399–405.

174 Alipov G.K, Pruglo Y.V, Sekine I, Pruglo M. Morphological investigation of thyroid and parathyroid glands of the population living around the Semipalatinsk Nuclear Test Site. *International Congress Series*. –V.1258. – 2003. - P 129-134

175 Tlegenov A, Abylaiuly Zh, Adilbay D, Yeleubaeva Sh, Adilbayev G, Satbaeva E, Bolshakova S. Prevalence of mutant BRAFV600E in the papillary thyroid carcinoma in patients from Kazakhstan and its correlation with clinical-morphological tumor characteristic. *Medical news of North Caucasus*. -2018. -Vol. 13. -Issue 3. - P 468-473.

176 Cancer Genome Atlas Research Network. Integrated genomic characterization of papillary thyroid carcinoma. *Cell*. 2014 Oct 23;159(3):676-90.

177 M. Xing. BRAF mutation in papillary thyroid cancer: pathogenic role, molecular bases, and clinical implications. *Endocrine Reviews*.- 2007. - Vol. 28. - Issue 7. - P 742–762.

178 Sargent R, Li Volsi V, Murphy J, Mantha G, Hunt JL. BRAF mutation is unusual in chronic lymphocytic thyroiditis-associated papillary thyroid carcinomas and absent in non-neoplastic nuclear atypia of thyroiditis. *Endocr. Pathol*. - 2006 Fall;17(3):235-41.

179 Тлегенов А.Ш., Абылайулы Ж., Адилбай Д.Г. Использование молекулярно-генетического тестирования BRAF V600E мутации для тонкоигольной аспирационной цитологии щитовидной железы // *Онкология и радиология Казахстана*.—2018.—№ 3 (49).— С. 4–7.

180 Атантаева Б.Ж. Ранняя диагностика узловых форм заболеваний щитовидной железы (клинико-эпидемиологическое и генетическое исследование: автореф. ... дис. к-та мед. наук. – Алматы., 2010. – 13 с.

## ПРИЛОЖЕНИЕ А

### СПИСОК РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

#### **В журналах, рекомендованных Комитетом по обеспечению качества в сфере образования и науки МОН РК**

1. Тлегенов А.Ш., Абылайулы Ж., Богенбай Г.А. Метаболомические исследования: взгляды клинициста //Вестник КазНМУ. – 2017. - № 1. – С. 158 - 159

2. Тлегенов А.Ш., Богенбай Г.А. Перспективы внедрения ОМИКС – технологий персонализированной медицины //Вестник КазНМУ. – 2017. - № 1. – С. 160–161

3. Тлегенов А.Ш., Молдабек Г.К., Алипова А.Т., Ильмалиева А.Ж. особенности встречаемости узловых образований щитовидной железы в зависимости от пола и возраста //Вестник КазНМУ. – 2017. - № 2. – С. 172 - 174

#### **В республиканском журнале**

1. Тлегенов А.Ш., Сафиоллаева А.К. Жидкостная цитология и ультразвуковая диагностика щитовидной железы //Денсаулык. – 2018. - № 5. – С. 13 - 15

#### **В зарубежном журнале, входящим в базу данных SCOPUS**

1. Тлегенов А.Ш., Абылайулы Ж., Адильбай Д.Г., Елубаева Ж.Б., Адильбаев Г.Б., Сатбаева Е.Б., Большакова С.В. PREVALENCE OF MUTANT BRAFV600E IN THE PAPILLARY THYROID CARCINOMA IN PATIENTS FROM KAZAKHSTAN AND ITS CORRELATION WITH CLINICAL-MORPHOLOGICAL TUMOR CHARACTERISTIC // Medical news of North Caucasus. Scientific Practical Journal. – 2018. - Т. 13. – № 3. – С. 463 - 473

#### **В журнале с импакт-фактором, индексируемом в базе данных РИНЦ**

1. Тлегенов А.Ш., Абылайулы Ж., Адильбай Д.Г., Елубаева Ж.Б., Адильбаев Г.Б., Кусаинова Б.Т., Кусаинова Н.Ж. Использование молекулярно-генетического тестирования BRAFV600E мутации для тонкоигольной аспирационной цитологии щитовидной железы //Онкология и Радиология Казахстана. Научно – практический журнал Казахского НИИ онкологии и радиологии. – 2018. – Т. 49. - № 3. – С. 158 - 159

#### **Прочие публикации**

**Международная научно-практическая конференция, Астана, Казахстан**

1. Тлегенов А.Ш. ОМИКС - исследования злокачественных и доброкачественных новообразований щитовидной железы в Казахстане/Сборник трудов I международной научно-практической конференции «Молодежь и инновации в 21 веке». – СПб. – 2018. – С. 4 - 6

2. Тлегенов А.Ш. Биомаркеры злокачественных новообразований щитовидной железы /Сборник трудов I научно-практической конференции «Молодежь и инновации в 21 веке». – СПб. – 2018. – С. 83– 88

**Международная научно-практическая конференция, Алматы, Казахстан**

1. Тлегенов А.Ш. ИЗУЧЕНИЕ МУТАЦИИ ГЕНА BRAF V600E У ПАЦИЕНТОВ С ПАПИЛЛЯРНЫМ РАКОМ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ: КЛИНИКО-МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ /Сборник трудов IX международной научно-практической конференции «АКАНОВСКИЕ ЧТЕНИЯ: АКТУАЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ ОБЩЕСТВЕННОГО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ» – СПб. – 2018. – С. 40

**Международная XIV научно-практическая конференция Экология. Радиация. Здоровье., Семей, Казахстан**

1. OMICS – ИССЛЕДОВАНИЯ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ И УЗЛОВЫХ НОВООБРАЗОВАНИЙ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ В КАЗАХСТАНЕ / Материалы XIV Международной научно-практической конференции «Экология. Радиация. Здоровье» - СПб. – 2019. С. 163

**Международная научно – практическая конференция по интегративной медицине, Саппоро, Япония**

1. Molecular and genetics studies of thyroid gland cancer and clinical experience of using АНСС / Сборник трудов 26 ежегодной международной научно-практической конференции «Интегративная медицина» – СПб. – 2018. – С. 38

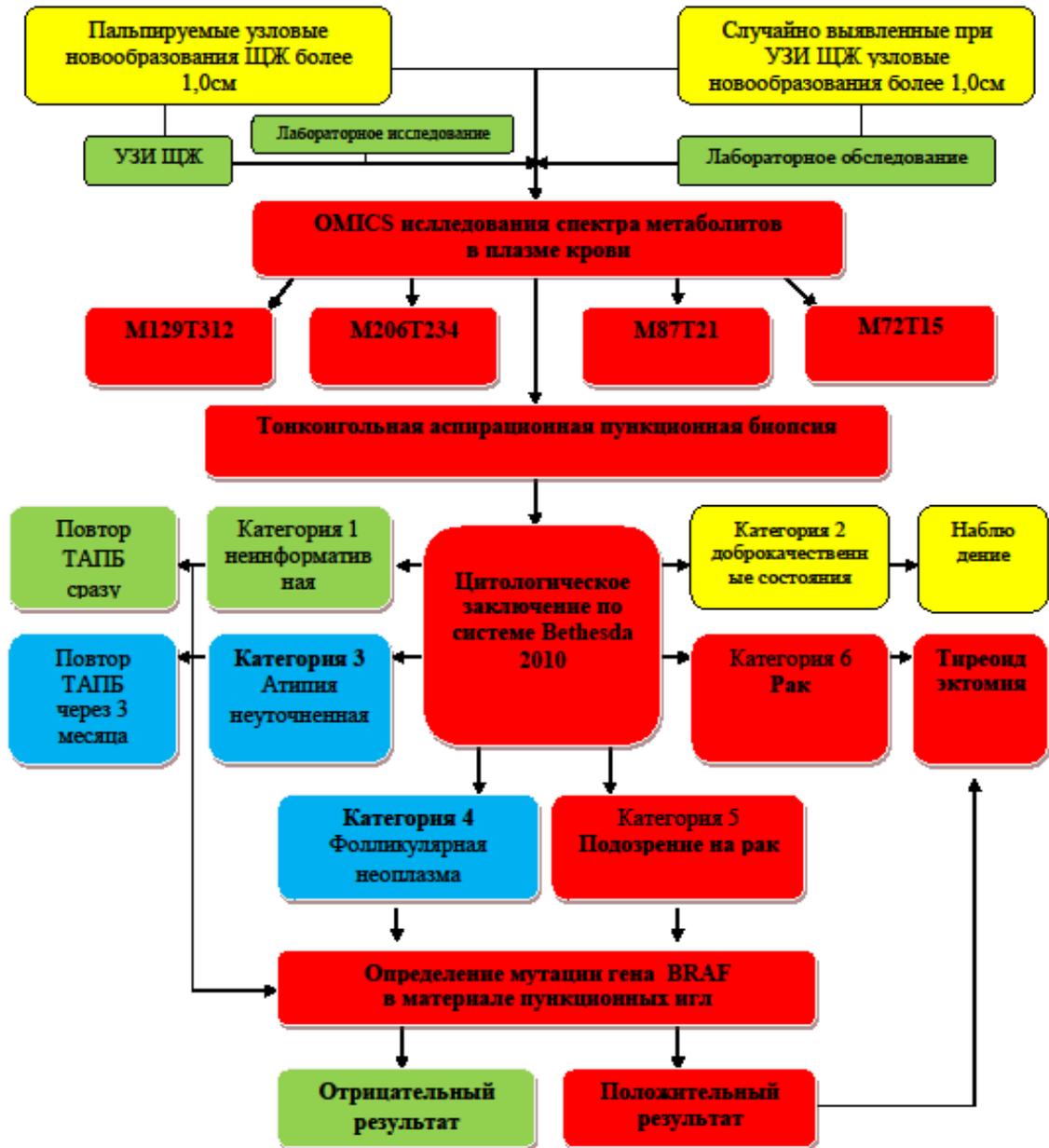
2. Study of the metabolism spectrum of malignant thyroid formations and prospects of using АНСС in the treatment / Сборник трудов 26 ежегодной международной научно-практической конференции «Интегративная медицина» – СПб. – 2018. – С. 39

**Патент РК на изобретение**

1. Способ диагностики доброкачественных и злокачественных новообразований щитовидной железы №34387

## ПРИЛОЖЕНИЕ Б

### АЛГОРИТМ ДИАГНОСТИКИ УЗЛОВЫХ НОВООБРАЗОВАНИЙ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ



# ПРИЛОЖЕНИЕ В

**ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫ**  **РЕСПУБЛИКА КАЗАХСТАН**

**REPUBLIC OF KAZAKHSTAN**

**ПАТЕНТ**  
**PATENT**

№ 34387

**ӨНЕРТАБЫСҚА / НА ИЗОБРЕТЕНИЕ / FOR INVENTION**



(21) 2019/0193.1



(22) 11.03.2019



(45) 12.06.2020

(54) Қалқанша бездің жаңа қатерсіз және қатерлі ісігінің барысын диагностикалау тәсілі  
Способ диагностики доброкачественных и злокачественных новообразований щитовидной железы  
Method of diagnostics of benign and thyroid neoplasm malignant

(73) «С.Ж. Асфендияров атындағы Қазақ ұлттық медицина университеті» коммерциялық емес акционерлік қоғамы (KZ)  
Некоммерческое акционерное общество «Казахский национальный медицинский университет имени С. Д. Асфендиярова» (KZ)  
«S.D. Asfendiyarov Kazakh National Medical University» Non-Commercial Joint-Stock Company (KZ)

(72) Абылайұлы Жангентхан (KZ)	Abylaiuly Zhangentkhan (KZ)
Тлегенов Аскар Шыңдалыевич (KZ)	Tlegenov Askar Shyndalyevich (KZ)



ЭЦҚ қол қойылды  
Подписано ЭЦП  
Signed with EDS

«Ұлттық зияткерлік меншік институты» РМК директоры  
Директор РГП «Национальный институт интеллектуальной собственности»  
Director of the «National Institute of Intellectual Property» RSE

Е. Куантыров  
Е. Куантыров  
Y. Kuantyrov

## ПРИЛОЖЕНИЕ Г

### АКТ

внедрения нового метода с использованием молекулярно-генетических исследований для дифференциальной диагностики злокачественных и доброкачественных новообразований щитовидной железы  
в Казахском НИИ онкологии и радиологии

**Наименование предложения:** Применение молекулярно – генетических методов для диагностики злокачественных и доброкачественных новообразований щитовидной железы – определение мутации гена BRAF, применялись в работе докторанта Тлегенова А.Ш. на тему: «OMICS – исследования злокачественных и узловых новообразований щитовидной железы в Казахстане». Метод определения мутации гена BRAF в смывах пункционных игл (Приложение №1).

**Форма внедрения:** Презентация с практическим занятием с использованием цитологического материала, взятой в клинике внутренних болезней КазНМУ имени С.Д. Асфендиярова, где Тлегенов А.Ш. представил метод определения генетической мутации гена BRAF для обучения молодых сотрудников и резидентов КазНИИ онкологии и радиологии.

**Ответственные за внедрение:** PhD докторант КазНМУ имени С.Д. Асфендиярова – Тлегенов А.Ш.; д.м.н., профессор кафедры эндокринологии КазНМУ имени С.Д. Асфендиярова – Абылайулы Ж.; зав. кафедрой эндокринологии КазНМУ имени С.Д. Асфендиярова, к.м.н – Большакова С.В.; врач цитопатолог КазНИИ онкологии и радиологии – Елеубаева Ж.Б.; зав. центром молекулярно-генетических исследований КазНИИ онкологии и радиологии, к.б.н – Оразгалиева М.Г.; ученый секретарь КазНИИ онкологии и радиологии, д.б.н – Гончарова Т.Г.

**Эффективность внедрения:** Использование молекулярно – генетических методов для исследования пунктатов узловых образований щитовидной железы позволяет провести полимеразную цепную реакцию на выявление BRAF мутации. Использование нового высокотехнологичного метода исследования - детекция мутации гена BRAF методом ПЦР узловых образований щитовидной железы, даст возможность на раннем дооперационном этапе провести дифференциальную диагностику рака щитовидной железы. Выявление наличия мутации BRAF при раке ЩЖ на предоперационном этапе имеет очень важное прогностическое значение. Мутация гена BRAF является показателем неблагоприятного прогноза, сопровождается более тяжелой клинической картиной заболевания, а именно разнообразным характером роста, распространением опухоли за пределы щитовидной железы, в том числе регионарным и отдаленным метастазированием. Мутация гена BRAF является показателем для использования более радикальных методов лечения и более тщательного наблюдения в динамике у данной категории пациентов.

**Срок внедрения:** 2019г.

**Ответственные за внедрение:**

*Тлегенов А.Ш.*  
*Абылайулы Ж.*  
*Большакова С.В.*  
*Елеубаева Ж.Б.*  
*Оразгалиева М.Г.*  
*Гончарова Т.Г.*

Тлегенов А.Ш.  
Абылайулы Ж.  
Большакова С.В.  
Елеубаева Ж.Б.  
Оразгалиева М.Г.  
Гончарова Т.Г.



ҚАЗАҚ ОНКОЛОГИЯ  
ЖӘНЕ РАДИОЛОГИЯ  
ҒЫЛЫМИ-ЗЕРТТЕУ ИНСТИТУТЫ  
АҚЦИОНЕРЛІК ҚОҒАМЫ

№59 - 2019

*Тлегенов*

**Метод определения мутации гена BRAF в смывах пункционных игл**

**1. Подготовительный этап**

Полученный пункционный материал используется для последующего цитологического исследования, а содержимое пункционной иглы осторожно промывается раствором RNeasy в объеме 0,7 мл и помещается в стерильную эппендорфовскую пробирку объемом 1,5мл. Полученный материал в пробирках хранится при комнатной температуре в течение 30 минут. Для долгосрочного хранения, в полном герметичном состоянии, помещаются в морозильник при -20 градусах.

**2. Выделение ДНК**

Генетический материал выделяется согласно протоколу исследования, с использованием набора “QIAamp DNA Mini Kit only” (QIAGEN, Германия). После выделения образцы ДНК до исследования хранятся при температуре -20 °С.

**3. Определение концентрации ДНК на УВ спектрофотометре NANO – Drop**

После стандартной процедуры подготовки спектрофотометра согласно прилагаемой инструкции, по 2 мкм из каждого образца переносится в специальный считываемый прибор и определяется концентрация ДНК.

**4. Проведение ПЦР анализа**

Капельная цифровая ПЦР проводится на приборе “QX200 Droplet Digital PCR System” (фирма “Bio-Rad”, США) и осуществляется в четыре этапа согласно инструкции. Первым этапом во все образцы добавляется приготовленный раствор, содержащий необходимые праймеры и помещается в пластиковый картридж QX200 droplet генератора. Второй этап или генерация капель, проводится с добавлением в соответствующие каналы картриджа специального минерального масла. Наполненный картридж устанавливается в QX200 droplet генератор, где образцы и масло соединяются между собой по микро каналам внутри картриджа для получения эмульсии — около 20 000 монодисперсных капель для каждого из 8 подготовленных образцов. Объем каждой капли 1 нл. Третьим этапом проводится основная полимеразная цепная реакция. Все эмульсионные образцы в объеме 40 мкл переносятся в стандартную 96-луночную плашку для ПЦР и амплифицируются с помощью стандартного термоциклера C1000 Touch в течение 3х часов. Условия проведения амплификации считаются стандартными и заключаются в начальной денатурации (95 °С, 10 мин) и 40 циклов, включающая денатурацию (94 °С, 30 с), отжиг праймеров (55°С, 2 мин 30 с), и заключительную элонгацию (98 °С, 10 мин). Завершающим этапом проводится считывание и анализ полученных результатов. После завершения ПЦР плашка загружается в QX200 droplet ридер, который проводит анализ флуоресцентного сигнала капель, детектируя каждую каплю по очереди и определяя, какие капли содержат мишень, а какие нет. Анализ результатов осуществляется автоматический с помощью программного обеспечения ddPCR.

КАЗАК ОНКОЛОГИЯ  
ЖЕНЕ РАДИОЛОГИЯ  
ҒЫЛЫМИ-ЗЕРТТЕУ ИНСТИТУТЫ  
ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫ АСШ БҒАЛМАҚ  
САНАУ МІНІСТРЛІГІ

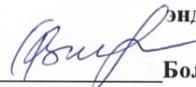
№59-2019

*Handwritten signature*

# ПРИЛОЖЕНИЕ Д

	<b>«ҰЛТТЫҚ МЕДИЦИНА УНИВЕРСИТЕТІ» АКЦИОНЕРЛІК ҚОҒАМЫ</b> <b>АКЦИОНЕРНОЕ ОБЩЕСТВО «НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»</b>	
	Кафедра эндокринологии	Акт внедрения

**УТВЕРЖДЕН**  
Заведующая кафедрой  
эндокринологии

  
**Большакова С.В.**

## АКТ

**Внедрения научно-исследовательской работы**  
**Кафедра эндокринологии Национальный Медицинский Университет**

**НАИМЕНОВАНИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ: ПРИМЕНЕНИЕ СОВРЕМЕННЫХ**  
**МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ В РАННЕЙ ДИАГНОСТИКЕ РАКА**  
**ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ**

**ФОРМА ВКЛЮЧЕНА ИЗ** диссертации

**ФОРМА ВНЕДРЕНИЯ** – НЕПОСРЕДСТВЕННОЕ ВНЕДРЕНИЕ

**ОТВЕТСТВЕННЫЙ ЗА ВНЕДРЕНИЕ И ИСПОЛНИТЕЛЬ** – Абылайулы Ж  
Тлегенов А.Ш.

**ЭФФЕКТИВНОСТЬ ВНЕДРЕНИЯ** – лечебно-диагностическая – улучшает своевременную диагностику злокачественных и доброкачественных узловых образований щитовидной железы.

**Предложения, замечания учреждения, осуществляющего внедрение** – продолжить внедрение

**Срок внедрения** – 2018-2019

**Председатель комиссии:**

к.м.н. профессор  **Молдабек Г.К.**

**Члены (ответственные за внедрение)**

д.м.н. профессор  **Абылайулы Ж**

**Исполнитель:**

докторант PhD  **Тлегенов А.Ш**

