

*На правах рукописи*

КРУПИНОВА Юлия Александровна

**ПРЕДОПЕРАЦИОННАЯ ДИАГНОСТИКА РАКА ОКОЛОЩИТОВИДНЫХ  
ЖЕЛЕЗ И ПРОГНОЗИРОВАНИЕ ЕГО РЕЦИДИВА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ  
МАТЕМАТИЧЕСКОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ И МОЛЕКУЛЯРНО-  
ГЕНЕТИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ**

3.1.19 – эндокринология

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Москва – 2022

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении  
«Национальный медицинский исследовательский центр эндокринологии»  
Министерства здравоохранения Российской Федерации

**Научный руководитель:**

**Мокрышева Наталья Георгиевна**

член-корреспондент РАН, доктор медицинских наук, профессор

**Официальные оппоненты:**

- Ветшев Петр Сергеевич — доктор медицинских наук, профессор кафедры хирургии с курсом хирургической эндокринологии Института усовершенствования врачей федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медико-хирургический Центр имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации
- Демидова Татьяна Юльевна — доктор медицинских наук, профессор, заведующая кафедрой эндокринологии лечебного факультета Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования "Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова" Министерства здравоохранения Российской Федерации

**Ведущая организация:**

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И. Евдокимова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится «\_\_» \_\_\_\_ 2022 года, в \_\_\_\_ часов на заседании диссертационного совета 21.1.045.01 в ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр эндокринологии» Минздрава России по адресу: 117292, г. Москва, ул. Дмитрия Ульянова, д.11.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр эндокринологии» Минздрава России или на сайте [www.endocrincentr.ru](http://www.endocrincentr.ru).

Автореферат разослан «\_\_» \_\_\_\_ 2022 г.

Ученый секретарь диссертационного

совета, доктор медицинских наук **Мазурина Наталия Валентиновна**

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность работы

Первичный гиперпаратиреоз (ПГПТ) – эндокринное заболевание, характеризующееся избыточной секрецией паратиреоидного гормона (ПТГ) при верхнормальном или повышенном уровне кальция крови вследствие первичной патологии околощитовидных желез (ОЩЖ). Классификация опухолей эндокринных органов Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) (4-е издание, 2017 г.) выделяет две категории новообразований ОЩЖ: аденому и рак. ПГПТ в 85-90% случаев обусловлен солитарной аденомой ОЩЖ, в 5-10% случаев – множественными аденомами или гиперплазией нескольких/всех ОЩЖ; раком - в среднем в 1%.

Согласно критериям экспертов ВОЗ, к карциномам ОЩЖ следует относить новообразования с достоверными признаками инвазивного роста в прилежащие структуры и/или с наличием документированных метастазов [DeLellis R.A. и соавт., 2017]. Атипические аденомы (АА) ОЩЖ – опухоли, в которых отсутствуют достоверные признаки инвазивного роста, но есть морфологические изменения, подозрительные в отношении злокачественности. Классификация опухолей эндокринных органов ВОЗ не выделяет АА в отдельную группу новообразований ОЩЖ и относит их к вариантам аденом [DeLellis R.A. и соавт., 2017]. По данным большинства исследований частота атипических аденом (АА) у прооперированных пациентов с ПГПТ колеблется от 0,5 до 4,4% [Schneider R. и соавт., 2015; McCoу K.L. и соавт., 2015].

Рак ОЩЖ чаще носит спорадический характер и значительно реже встречается в рамках наследственных синдромов, а в частности при синдроме гиперпаратиреоза с опухолью челюсти (hyperparathyroidism-jaw tumour syndrome, НРТ-ЈТ) [Mamedova E.O. и соавт., 2016; Starker L.F. и соавт. 2012]. НРТ-ЈТ (ОМІМ#145001) является редким синдромом, характеризующимся ПГПТ, фиброзно-костными поражениями (оссифицирующая фиброма) нижней или верхней челюсти, опухолями почки и матки. Опухоли ОЩЖ, из которых 15-20% составляют карциномы, обычно становятся первым проявлением и встречаются в более чем 90% случаев НРТ-ЈТ. Герминальные мутации в гене *CDC73* присутствуют примерно у 90% пациентов с НРТ-ЈТ и у трети пациентов со спорадическими карциномами ОЩЖ с отсутствием отягощенного семейного анамнеза [Cetani F. и соавт., 2019]. В настоящее время принято считать анализ герминальной мутации в гене *CDC73* у пациентов с предположительно спорадической карциномой ОЩЖ оправданным, поскольку необходимо исключить риск наличия наследственного синдрома

и, соответственно, развития НРТ-ЖТ-ассоциированных опухолей у пробанда и его родственников ближайшей линии.

Минимальный объем операции при подозрении на рак ОЩЖ должен включать, помимо резекции самой железы, удаление прилежащей доли щитовидной железы (ЩЖ) и окружающей клетчатки, а также любой спаянной с опухолью ткани. Основная цель расширенного объема хирургического вмешательства – избежать разрыва капсулы карциномы во время операции, что является неблагоприятным прогностическим фактором последующего рецидива заболевания. По результатам последних ретроспективных исследований профилактическая лимфодиссекция не влияет на выживаемость, при этом сопряжена с риском развития послеоперационных осложнений [Hsu K.-T. и соавт., 2014].

Прогноз пациентов с раком ОЩЖ считается относительно благоприятным ввиду медленного опухолевого роста. Рецидивы развиваются в среднем в 50% случаев, треть метастазов поражают региональные лимфатические узлы, в 25% случаев развиваются отдаленные метастазы в легкие (40%), печень (10%), кости, реже – плевру, перикард, поджелудочную железу и головной мозг [Obregón L.M. и соавт., 2005]. Пятилетняя выживаемость составляет 76-85%, десятилетняя – от 49 до 77% [Brown S. и соавт., 2011; Kebebew E., 2001]. В случае уже развившихся метастазов карциномы ОЩЖ пятилетняя выживаемость снижается до 50% [Shane E., 2001; Asare E.A. и соавт., 2015; Lo W.M. и соавт., 2018]. Основная причина смерти связана не с опухолевой нагрузкой, а с эндокринными осложнениями – гиперкальциемией вследствие гиперпродукции ПТГ метастазами, нечувствительным к химио- и лучевой терапии [Schulte K. M. и соавт., 2012; Ryhanen E.M. и соавт., 2017; Rodrigo J.P. и соавт., 2020].

Несмотря на то, что для пациентов с карциномой характерно более агрессивное течение ПГПТ с выраженным повышением уровня интактного паратгормона (иПТГ) и кальция в крови по сравнению с доброкачественными новообразованиями, в настоящее время маркеров предоперационной диагностики рака нет. Ввиду сложности дооперационной диагностики злокачественного новообразования ОЩЖ большое значение имеет опыт хирурга, который может заподозрить карциному во время операции и провести необходимый объем первичного хирургического вмешательства.

Появляется все больше данных о роли микроРНК (миРНК) в качестве новой группы биомаркеров различных видов рака. Важной особенностью миРНК является их способность мигрировать в кровь, что позволяет рассматривать их в качестве высококачественных биомаркеров различных патологий, включая злокачественные новообразования [Anfossi S. и соавт., 2018; Cheng G. и соавт., 2015; Mitchell P.S. и соавт., 2008]. В отличие от длинных молекул РНК (например, мРНК) циркулирующие миРНК очень стабильны в биологических

жидкостях [Mitchell P.S. и соавт., 2008; Xi X. и соавт. 2017]. При этом, согласно проведенному нами анализу научной литературы, исследования, посвященные изучению циркулирующих в крови миРНК у пациентов со злокачественными новообразованиями ОЩЖ, до настоящего времени не проводились.

В связи с вышеизложенным актуальным представляется разработка эффективных способов предоперационной дифференциальной диагностики злокачественных и доброкачественных новообразований ОЩЖ и определение неблагоприятных прогностических факторов течения.

**Цель работы** – определить молекулярно-генетические и клинические особенности пациентов с карциномой и АА ОЩЖ, разработать метод предоперационной диагностики рака ОЩЖ, выделить факторы неблагоприятного течения заболевания.

**Задачи исследования:**

1. Охарактеризовать клинические особенности пациентов с карциномой и АА ОЩЖ.
2. Разработать неинвазивный способ предоперационной дифференциальной диагностики рака и АА с доброкачественными новообразованиями ОЩЖ.
3. Определить диагностическую ценность циркулирующих миРНК в дифференциальной диагностике рака и аденомы ОЩЖ.
4. Оценить диагностическую ценность утраты экспрессии парафибромина для выявления у пациента герминальной мутации в гене *CDC73*.
5. Определить неблагоприятные факторы развития рецидива рака ОЩЖ.

**Научная новизна**

Впервые в России проведена сравнительная характеристика пациентов с карциномой и АА, оценка прогноза течения рака ОЩЖ.

Впервые в мире разработан неинвазивный способ предоперационной дифференциальной диагностики злокачественных новообразований и АА с доброкачественными новообразованиями ОЩЖ с помощью логит-регрессионного анализа.

Впервые в мире проведен анализ циркулирующих миРНК в сыворотке у пациентов с раком ОЩЖ.

**Теоретическая и практическая значимость работы**

На основании результатов исследования разработан способ дифференциальной диагностики, позволяющий выделить группу пациентов с повышенным риском наличия рака ОЩЖ и планировать расширенный объем хирургического вмешательства (*en bloc*).

По результатам иммуногистохимического (ИГХ) исследования установлено, что пациентам с наличием экспрессии парафибромина как в первичной опухоли, так и в

метастазах рака ОЩЖ можно исключить наличие герминальной мутации в гене *CDC73* с вероятностью от 91% до 100%.

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

1. Для пациентов с карциномами и АА характерно более агрессивное течение ПППТ, чем для пациентов с аденомой ОЩЖ.
2. Разработанный неинвазивный способ предоперационной дифференциальной диагностики карцином, АА и аденом ОЩЖ позволяет с высокой вероятностью исключать диагноз карциномы (от 99% до 100%) и АА (в 100%) и планировать необходимый объем хирургического вмешательства.
3. Точка отсечения CRT (cycle relative threshold) циркулирующей миРНК-342-3р в сыворотке крови более 27,5 может служить способом исключения аденомы ОЩЖ.
4. Чувствительность потери экспрессии парафибромина при ИГХ-исследовании для оценки наличия у пациента герминальной мутации в *CDC73* составляет 100%, специфичность 90%.
5. У пациентов с раком ОЩЖ и герминальной мутацией в гене *CDC73* повышается частота развития рецидива.

### **Апробация работы**

Официальная апробация диссертационной работы состоялась 26 октября 2021 года на расширенной межотделенческой научной конференции ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» Минздрава России.

Результаты работы представлены в виде устных докладов на международных конгрессах: 20th European Congress of Endocrinology (Barcelona, Spain, 2018); 21th European Congress of Endocrinology (Lyon, France, 2019); 23th European Congress of Endocrinology (online), 2021 (удостоена премии «Young Investigator Award»). На всероссийских конгрессах: III Всероссийский эндокринологический конгресс с международным участием (Москва, 2017 г.); VIII (XXVI) Национальный конгресс эндокринологов «Персонализированная медицина и практическое здравоохранение» (Москва, 2019 г.); I Всероссийская конференция с международным участием «Патология околощитовидных желез: современные алгоритмы диагностики и лечения» (Москва, 2019 г.); XXIX Российский симпозиум по эндокринной хирургии с участием эндокринологов «Калининские чтения» (Казань, 2019 г.); VI симпозиум «Нестандартные ситуации в диагностике и лечении нейроэндокринных опухолей» (Москва, 2020 г.); IV (XXVII) Национальный конгресс эндокринологов с международным участием «Инновационные технологии в эндокринологии» (Москва, 2021 г.).

По теме диссертационной работы опубликовано 18 печатных работ, из них статей в иностранных журналах – 3; в отечественной литературе – 7; включенных в перечень российских рецензируемых научных журналов и изданий для публикации основных научных результатов диссертаций – 5.

На разработанный «Способ неинвазивной дифференциальной диагностики новообразований околощитовидных желез» получен патент (RU2755931C1, дата публикации 2021-09-23).

### **Объем и структура диссертации**

Диссертация изложена на русском языке в объеме 245 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, главы с описанием материалов и методов исследования, результатов собственных исследований, главы с обсуждением результатов, заключения, выводов и практических рекомендаций. Работа иллюстрирована 46 таблицами и 53 рисунками. Список использованной литературы включает 349 источников: 8 отечественных и 341 зарубежных.

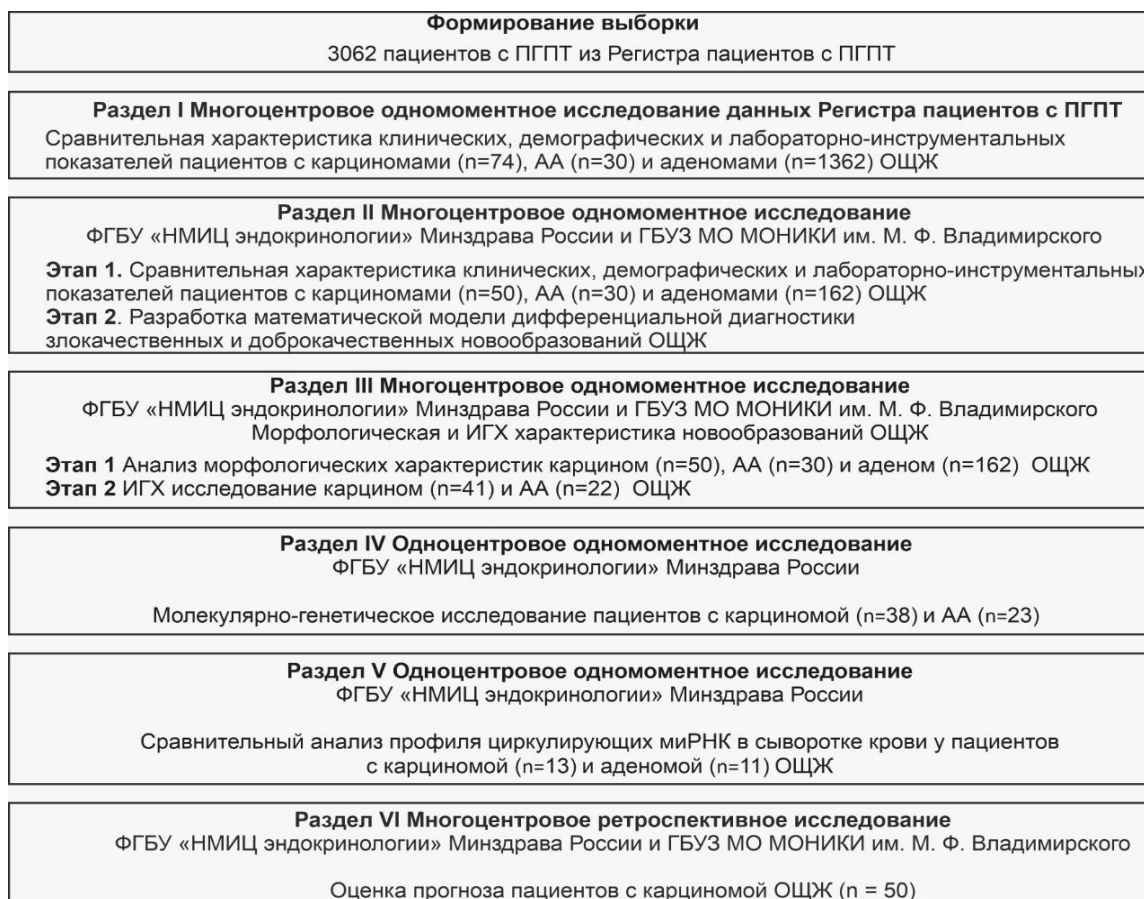
## **СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

### **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

Исследование выполнено на базе отделения патологии ОЩЖ и нарушений минерального обмена ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» Минздрава России, г. Москва (1989–2018 гг. – директор – академик РАН Дедов И.И.; 2019 г. – настоящее время – директор – член-корреспондент РАН Мокрышева Н.Г.). Согласно поставленной цели и задачам были сформированы соответствующие разделы и этапы с использованием разных популяций. Дизайн исследования представлены на рисунке 1.

**Раздел I.** Проведен анализ эпидемиологических, клинических и лабораторно-инструментальных показателей пациентов регистра больных с ПГПТ, которым проведено хирургического лечение ПГПТ с гистологически верифицированным диагнозом «аденома», «АА», «карцинома» ОЩЖ.

Критерии включения: пациенты с гистологически верифицированным диагнозом «аденома», «АА», «карцинома» ОЩЖ после хирургического лечения ПГПТ; пациенты без проведенного хирургического лечения ПГПТ; пациенты с гистологическим диагнозом «гиперплазия» ОЩЖ; пациенты с неудовлетворительно заполненной медицинской документацией.



**Рисунок 1 - Дизайн исследования**

**Раздел II. На этапе 1** после отбора из регистра потенциально подходящих больных с ПГПТ с морфологическими диагнозами «рак» и «АА» ОЩЖ, повторно проведен пересмотр гистологических препаратов двумя независимыми патологами, специализирующимися на патологии эндокринных органов. При расхождении диагнозов случаи были исключены из дальнейшего исследования (n=11). Шестьдесят шесть пациентов с диагнозом «аденома» были исключены из контрольной группы ввиду отсутствия согласия информированного согласия. Далее произвольно была сформирована контрольная группа (каждый восьмой случай из 1296 пациентов) из упорядоченного по алфавиту деперсонализированного списка пациентов ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» Минздрава России.

Контрольная группа пациентов с диагнозом «аденома» была выбрана

На **этапе 2** разработана математическая модель дифференциальной диагностики злокачественных опухолей ОЩЖ. Ретроспективный анализ клинических, демографических и лабораторно-инструментальных показателей пациентов с карциномами, АА и аденомами ОЩЖ с включением двух центров, равнозначных по уровню квалификации специалистов и лабораторно-инструментального, хирургического, морфологического оснащения.



**Раздел III. Этап 1.** Проведен анализ морфологических характеристик карцином, АА и аденом ОЩЖ. Анализируемые показатели представлены в разделе «Результаты».

**Этап 2.** ИГХ-исследование карцином и АА. Анализируемые показатели представлены в разделе «Результаты».

**Раздел IV.** Высокопроизводительное параллельное секвенирование панели генов пациентов с карциномой и АА.

Анализируемые показатели: Герминальные мутации в генах: *CDC73*, *MEN1*, *CASR*, *GCM2*, *RET*, *CDKN1A*, *CDKN1B*, *CDKN1C*, *CDKN2A*, *CDKN2C*, *CDKN2D*. Проведен сравнительный анализ клинических, лабораторных и ИГХ-параметров у пациентов с мутацией в гене *CDC73* и без: возраст на момент постановки диагноза; пол; ПТГ, альбумин-скорректированный кальций,  $\text{Ca}^{2+}$ , фосфор, ЩФ до хирургического лечения ПГПТ; частота костно-висцеральных осложнений; частота развития рецидивов; индекс пролиферации Ki-67%; потеря экспрессии парафибромина.

**Раздел V.** Анализ профиля циркулирующих миРНК.

Критерии включения: пациенты с морфологически установленным диагнозом «карцинома» и «аденома» ОЩЖ, у которых забор крови осуществлялся до хирургического лечения ПГПТ и до приема препаратов, влияющих на кальций-фосфорный обмен.

Критерии исключения: иные (помимо рака ОЩЖ) верифицированные злокачественные новообразования; узловые образования ЩЖ; тяжелые сопутствующие заболевания (стадия сердечной недостаточности III и IV по данным Нью-Йоркской ассоциации сердца (NYHA), терминальная болезнь почек и проч.); сахарный диабет 1-го или 2-го типов; психические заболевания; обострение хронических заболеваний в течение последнего месяца и острые респираторные вирусные инфекции; беременность и лактация.

Анализируемые показатели: экспрессия миРНК (уровень delta cycle relative threshold (CRT)) в сыворотке крови; корреляция между уровнем миРНК (CRT) и лабораторными данными пациентов (уровень ПТГ и кальция в крови); корреляция между экспрессией миРНК (CRT) и наличием или отсутствием мутации в гене *CDC73*.

**Раздел VI.** Проводился анализ частоты развития рецидивов, локализации метастазов, времени до первого рецидива (месяцев), количество операций по поводу основного заболевания, времени до смерти с момента постановки диагноза, 5- и 10-летняя безрецидивная выживаемость. Нами был проведен анализ ассоциаций клиничко-лабораторных, морфологических, иммуногистохимических, генетических и других параметров с развитием рецидива у пациентов с карциномой для определения прогностически неблагоприятных факторов развития рецидивов.

### Лабораторные методы исследования

Биохимические параметры крови натошак (общий кальций в сыворотке крови (референсный интервал (РИ) 2,15-2,55 ммоль/л), альбумин (РИ 34-48 г/л), ЩФ (РИ 40-150 ед/л),  $\text{Ca}^{2+}$  (РИ 1,03-1,29 ммоль/л), креатинин (РИ 63-110 мкмоль/л)) определяли на автоматическом биохимическом анализаторе ARCHITECT c8000. Расчет показателя СКФ проводился с учетом возраста и показателя креатинина сыворотки по формуле СКД-EPI. Гормональный анализ крови с определением иПТГ (РИ 15-65 пг/мл) выполнен на электрохемилюминесцентном анализаторе Cobas 6000.

### Инструментальные методы исследования

УЗИ ОЩЖ проводилось на аппарате Valuson E8 фирмы General Electric или аналогичных по уровню. Объем ОЩЖ рассчитывался по формуле эллипса:  $V(\text{см}^3) = (A \times B \times C) \times 0,49$ . Количественная оценка состояния костной ткани оценивалось в поясничных позвонках (L1–L4), проксимальном отделе бедра (шейке бедра (Neck), во всем бедре (Total)) и лучевой кости (ультрадистальном отделе (RUD), средней трети (R33%), во всей лучевой кости (RT) с использованием двухэнергетической рентгеновской абсорбциометрии (DEXA) на аппаратах Prodigy Lunar и Hologic. МПК оценивалась по T-score (у женщин в постменопаузе и мужчин старше 50 лет) или Z-score (у женщин в пременопаузе и у мужчин моложе 50 лет). Оценка состояния почек проводилась с использованием УЗИ на аппарате Valuson E8 фирмы General Electric. Дополнительные инструментальные методы обследования проводились в зависимости от конкретной клинической ситуации.

### Хирургическое лечение

Лечение проводилось в соответствии с клиническими рекомендациями по ПГПТ.

### Морфологическое и иммуногистохимическое исследование

Гистопатологический диагноз опухолей ОЩЖ установлен в соответствии с критериями классификации ВОЗ (2017 г.). Карциномы ОЩЖ классифицированы в соответствии с системой TNM от 2017 г. (AJCC), а также на Low grade (LG) и High grade (HG) по степени выраженности ядерной атипии. Метастазы верифицировались с помощью характерной рентгенологической картины, а также при возможности результатами морфологического, ИГХ-анализа или высокого уровня ПТГ в смыве с пункционной иглы (более 5000 пг/мл) при ТАБ очага. ИГХ-исследование проводилось с помощью иммуноштейнера Leica Bond-Max. Использованы первичные антитела к ПТГ, Ki-67. С целью определения риска наличия у пациента мутации в гене *CDC73* проведена оценка экспрессии парафибромина. Стартовый протокол: разведение первичного антитела 1:50, демаскирующая обработка проводилась в щелочном растворе в течение 40 минут при температуре 97 °C.

### Методы оценки иммуногистохимической реакции

Для подтверждения тканеспецифичности определяли экспрессию ПТГ в ткани опухолей. Уровень экспрессии оценивали полуколичественным методом по уровню интенсивности: 0 – отсутствие экспрессии, 1 – слабая, 2 – умеренная, 3 – интенсивная; и по количеству иммунопозитивных клеток: очаговая и диффузная. Ранжирование экспрессии ПТГ проводилось с целью дальнейшего сравнительного анализа между группами карцином и АА, а также для оценки уровня экспрессии ПТГ в качестве прогностического маркера развития рецидива рака ОЩЖ. Оценка экспрессии и определение индекса Ki-67 проводились в наиболее пролиферирующих очагах «горячие точки» по стандартной методике (вычисляли среднее количество меченых этим маркером ядер из 100 ядер опухолевых клеток при учете 1000 клеток в репрезентативных полях зрения при увеличении 400). Отрицательное (патологическое) окрашивание для парафибромина определялось как потеря ядерной экспрессии во всех опухолевых клетках при наличии положительного внутреннего контроля (эндотелий сосудов и клетки стромы). Цитоплазматическое окрашивание считалось неспецифичным и игнорировалось. Анализ результатов ИГХ-исследований проводился вслепую (без знания клинических и генетических данных пациентов).

### Высокопроизводительное параллельное секвенирование

В работе была использована специально разработанная панель SeqCap EZ Prime Choice (Roche Sequencing Solutions, США), нацеленная на исследование 11 генов, ассоциированных с развитием ПГПТ (*CDC73*, *MEN1*, *CASR*, *GCM2*, *RET*, *CDKN1A*, *CDKN1B*, *CDKN1C*, *CDKN2A*, *CDKN2C*, *CDKN2D*). Секвенирование проводили на секвенаторе Illumina MiSeq (Illumina, США). С помощью программы Hyper Design Tool (<https://www.sequencing.roche.com>) создана панель зондов для таргетного обогащения вышеперечисленных генов. С помощью программы Hyper Design Tool (<https://www.sequencing.roche.com>) создана панель зондов для таргетного обогащения вышеперечисленных генов. Аннотирование выявленных вариантов проводилось с помощью программы ANNOVAR (версии 2015–2016 гг.) (<http://annovar.openbioinformatics.org>). Для оценки клинической значимости выявленных вариантов были использованы база данных OMIM (<http://www.omim.org/>), база данных Human Gene Mutation Database (<http://www.hgmd.cf.ac.uk/index.php>), специализированная база данных мутаций, описанная для кальций-чувствительного рецептора (<http://www.casrdb.mcgill.ca/>) и данные литературы. С учетом известных ограничений метода NGS (метод не позволяет выявить инсерции и делеции длиной более 10 п.о.), для выявления косвенных признаков крупных делеций генов (снижение глубины прочтения

при проведении NGS по сравнению с остальными образцами) проводился анализ BAM-файлов с помощью программы ExomeDepth.

### **Анализ профиля циркулирующих миРНК в сыворотке крови у пациентов с карциномой и аденомой ОЩЖ**

МиРНК были выделены из образцов сыворотки с использованием набора mirVana PARIS™ (Life Technologies) по протоколу выделения тотальной РНК из жидких образцов в соответствии с рекомендациями производителя. Использованы праймеры «Megaplex™ RT» и пулы проб «А» и «В» v3.0 (PN 4444282), поскольку они соответствовали панели «TagMan Open Array Human miRNA Panel Quant Studio™ 12K Flex». Каждый пул содержал праймеры для обратной транскрипции (ОТ) и для 377 уникальных миРНК и миРНК мишени. Каждый образец РНК подвергался ОТ отдельно с пулами «А» и «В» в соответствии с протоколом microRNA Starter Kit (Life Technologies) на приборе QuantStudio™ 12K Flex OpenArray microRNA Starter Kit (Life Technologies). Другие, предварительно амплифицированные продукты, хранили при температуре -20 °С до 1 недели. Для приготовления реакционных смесей «А» и «В» для ПЦР в реальном времени 22,5 мкл каждого разбавленного продукта предварительной амплификации соединяли с 22,5 мкл смеси «2xTaqMan OpenArray Real-Time Master Mix». 5 мкл каждой реакционной смеси ПЦР наносили на 384-луночный планшет для образцов OpenArray в комбинации согласно протоколу «microRNA Starter Kit».

### **Методы статистического анализа результатов исследования**

Статистический анализ проводили с использованием пакетов программ STATISTICA 13 (StatSoft, США, 2017) и SPSS 26 (IBM, США, 2019) и языка программирования python 3.9 (Python Software Foundation). Количественные данные представлены в виде медианы (*Me*), а также 1-м и 3-м квартилями [Q1; Q3], качественные – в виде абсолютных и относительных частот. Различия между двумя независимыми группами по количественным признакам оценивали с использованием критерия Манна-Уитни (*U*-тест). Сравнение трех независимых групп для количественных данных выполнялось с помощью критерия Краскела-Уоллиса ANOVA с дальнейшим post-hoc анализом. Для выявления критических значений отдельных параметров, показавших статистически значимые различия при сравнении групп пациентов с карциномами и аденомами, использовали ROC-анализ. Анализировали следующие параметры: AUC (площадь под ROC-кривой), диагностическая чувствительность (ДЧ), диагностическая специфичность (ДС), прогностическая ценность положительного результата (ПЦПР) и прогностическая ценность отрицательного результата (ПЦОР). Отрезная точка выбиралась

с помощью критерия Юдена (разность суммы ДЧ и ДС и единицы должна была быть максимальной для данной точки). Частоты признаков сравнивались между собой с помощью критерия Хи-квадрат ( $\chi^2$ ). При необходимости применялась поправка Йетса. При наличии нулевых частот применялся тест Фримена-Халтона. Корреляционный анализ выполнялся с помощью метода Спирмена. Доверительные интервалы частот рассчитывались методом Клоппера-Пирсона. Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез принимался равным 0,05. Для множественных сравнений применялась поправка Бонферрони за исключением анализа циклов уровней миРНК, для которого применялся метод Бенджамини-Хохберга, встроенный в программное обеспечение (Life Technologies). Безрецидивную выживаемость анализировали с помощью метода Каплана-Майера. Выявление статистически значимых независимых переменных для прогнозирования рецидива рака ОЩЖ использовали лог-ранг тест и критерий  $\chi^2$ .

При поиске совокупности независимых переменных для диагностики злокачественных опухолей и построении моделей дифференциальной диагностики типов опухолей ОЩЖ выполняли логистический регрессионный анализ и метод градиентного бустинга (CatBoost). Вычислялись операционные характеристики моделей: ДЧ, ДС, ПЦПР, ПЦОР. Логистическая регрессия – это один из методов множественной регрессии, общее назначение которой состоит в определении стохастической связи между зависимым бинарным признаком (откликом) и несколькими количественными и/или качественными независимыми признаками (независимые переменные). Расчет вероятности события в логит-регрессионной модели осуществляется следующим образом:

$$p = 1 / (1 + e^{-z}), \quad (1)$$

где  $e$  – математическая константа, приближенно равная 2,718,

$$Z = \beta_0 + \beta_1 * X_1 + \beta_2 * X_2 + \dots + \beta_i * X_i, \quad (2)$$

где  $X_1, \dots, X_i$  – независимые признаки,  $\beta_0, \dots, \beta_i$  – коэффициенты.

CatBoost – это библиотека градиентного бустинга, созданная Яндексом и реализующая уникальный патентованный алгоритм построения моделей машинного обучения, использующий одну из оригинальных схем градиентного после бустинга – ансамбль забывчивых деревьев решений (oblivious decision tree).

Количественная оценка миРНК проводилась по алгоритму, описанному ниже. Файлы необработанных данных (eds) проанализированы с использованием программного обеспечения для анализа данных ExpressionSuite v1.1 (Life Technologies). Значения Ct нормализованы с использованием алгоритма «global normalization», встроенного в программу ExpressionSuite v1.1. Алгоритм использует среднее значение экспрессии всех миРНК в каждом образце для нормализации количественных данных ПЦР. МиРНК с

«amplification score» <1 и «Cq confidence» <0,8 были исключены из анализа. Для сравнения относительного порога дельта-циклов уровней миРНК ( $\Delta\text{C}_\text{RT}$ ) между образцами карцином и аденом различия считались значимыми, когда значение  $p$  было менее 0,05 после корректировки по методу Бенджамини-Хохберга; различия в кратном изменении  $\log_2$  <-1 или > 1 считались актуальными. Ранговый тест Спирмена проведен для оценки корреляции между миРНК и лабораторными показателями.

**Источник финансирования.** Грант Президента РФ – МК-8689.2016.7 «Изучение молекулярно-генетических особенностей патогенеза опухолей околощитовидных желез» (2016–2017 гг.), государственное задание «Оценка эпидемиологических особенностей и контроль оказания медицинской помощи пациентам с первичным гиперпаратиреозом на основании данных регистра Российской Федерации» (2018–2020 гг.), государственное задание «Наследственные опухолевые синдромы и множественные эндокринные неоплазии: персонализация диагностики и лечения, прогнозирование рисков, идентификация ядерных семей» (2018–2020 гг.).

**Этическая экспертиза.** Протокол исследования одобрен локальным этическим комитетом ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» Минздрава России, выписка из протокола № 1 от 25.01.2017 г.

## РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

В период с 1990 по 2019 гг. по данным регистра пациентов с ПГПТ выявлено 74 больных с карциномой ОЩЖ. При этом 22 случая зафиксировано в первые 19 лет исследования, большинство пациентов ( $n=52$ ) с раком зарегистрировано в последние 9 лет.

**Раздел I Сравнительная характеристика клинических, демографических и лабораторно-инструментальных показателей пациентов с карциномами, АА и аденомами ОЩЖ по данным регистра пациентов с ПГПТ (таблица 1).**

В данный раздел исследования включено 1466 пациентов с ПГПТ: 74 пациентов с карциномой ОЩЖ (группа 1); 30 пациентов с АА ОЩЖ (группа 2); 1362 пациентов с аденомой ОЩЖ (группа 3). При анализе множества клинических, демографических и лабораторно-инструментальных показателей с учетом поправки на множественные сравнения статистически значимые различия выявлены по концентрации  $\text{Ca}^{2+}$ , ПТГ, общего кальция, ЩФ, СКФ, объему образования и полу. Также установлено, что среди пациентов с карциномами преобладали мужчины по сравнению с группой аденом. Статистически значимо женщины были старше мужчин на 5 лет на момент постановки диагноза в группе аденом ОЩЖ.

**Таблица 1** – Сравнительная характеристика пациентов между группами карцином, АА и аденом ОЦЖ по данным регистра пациентов ПГПТ

Показатель*	Карцинома (группа 1)		АА (группа 2)		Аденома (группа 3)		p	p, post-hoc анализ
	N	Медиана [Q1; Q3], n (%)	N	Медиана [Q1; Q3], n (%)	N	Медиана [Q1; Q3], n (%)		
Возраст на момент постановки диагноза	74	53 [39; 62]	30	56 [46; 63]	1362	55 [48; 62]	0,184 <sup>1</sup>	p <sub>1-2</sub> = 0,172 p <sub>1-3</sub> < <b>0,001</b> p <sub>2-3</sub> < <b>0,001</b>
Мужской пол	74	16 (22%)	30	5 (17%)	1362	124 (9%)	< <b>0,001</b> <sup>2</sup>	p <sub>1-2</sub> = 0,568 p <sub>1-3</sub> < <b>0,001</b> p <sub>2-3</sub> = 0,274*
Соотношение м:ж	74	1:4	30	1:5	1362	1:10		
Ca <sup>2+</sup> , ммоль/л	41	1,48 [1,32; 1,66]	24	1,70 [1,46; 1,87]	1019	1,38 [1,29; 1,51]	< <b>0,001</b> <sup>1</sup>	p <sub>1-2</sub> = <b>0,040</b> p <sub>1-3</sub> = <b>0,042</b> p <sub>2-3</sub> < <b>0,001</b>
ПТГ, пг/мл	66	578 [174; 1484]	29	755 [342; 1450]	1330	174 [115; 308]	< <b>0,001</b> <sup>1</sup>	p <sub>1-2</sub> = 0,172 p <sub>1-3</sub> < <b>0,001</b> p <sub>2-3</sub> < <b>0,001</b>
Кальций общий, ммоль/л	66	2,95 [2,60; 3,36]	28	3,26 [2,99; 3,57]	1236	2,79 [2,64; 2,98]	< <b>0,001</b> <sup>1</sup>	p <sub>1-2</sub> < <b>0,001</b> p <sub>1-3</sub> = <b>0,019</b> p <sub>2-3</sub> < <b>0,001</b>
ЩФ, ед/л	28	404 [113; 832]	18	364 [220; 428]	700	164 [104; 290]	< <b>0,001</b> <sup>1</sup>	p <sub>1-2</sub> = 1,000 p <sub>1-3</sub> = <b>0,003</b> p <sub>2-3</sub> = <b>0,032</b>
Объем образования ОЦЖ, см <sup>3</sup>	12	6,97 [1,87 12,01]	28	3,93 [1,83 11,10]	79	0,91 [0,31; 2,30]	< <b>0,001</b> <sup>1</sup>	p <sub>1-2</sub> = 1,000 p <sub>1-3</sub> = <b>0,003</b> p <sub>2-3</sub> = 0,111
СКФ	34	65,4 [31,2; 90,7]	28	70,3 [47,5; 88,7]	907	80,9 [64,6; 96,5]	<b>0,004</b> <sup>1</sup>	p <sub>1-2</sub> = 0,302 p <sub>1-3</sub> = <b>0,004</b> p <sub>2-3</sub> = 0,089
СКФ менее 60, мл/мин/1,73 м <sup>2</sup>	33	16 (48%)	26	11 (39%)	393	126 (32%)	0,103 <sup>2</sup>	
Нефролитиаз	33	23 (70%)	29	19 (66%)	392	247 (63%)	0,742 <sup>2</sup>	
Низкоэнергетические переломы	73	21 (29%)	28	6 (21%)	1351	251 (19%)	0,093 <sup>2</sup>	
Остеопороз (по данным остеоденситометрии)	73	35 (48%)	30	20 (67%)	1351	615 (46%)	0,041 <sup>2</sup>	

<sup>1</sup> – критерий Краскела — Уоллиса ANOVA, <sup>2</sup> - критерий  $\chi^2$ . Поправка Бонферрони  $P_0 = 0,004$

\*среднее время с момента сбора предоперационных данных до проведения хирургического лечения – 1 месяц (мин 15 дней, макс 2 месяца)

**Раздел II Сравнительная характеристика клинических, демографических и лабораторно-инструментальных показателей пациентов с карциномами, АА и аденомами ОЩЖ и разработка математической модели дифференциальной диагностики злокачественных и доброкачественных новообразований ОЩЖ.**

**Этап 1.** В многоцентровое одномоментное исследование включено 242 пациента с ПГПТ, которые были разделены на три группы в зависимости от результатов морфологического исследования ОЩЖ: 50 пациентов с карциномой (группа 1); 30 пациентов с АА (группа 2); 162 пациента с аденомой (группа 3). Ввиду отсутствия статистически значимых различий в клинико-лабораторных и инструментальных показателях между группами карцином (1) и АА (2), они были объединены в одну общую группу (1+2) для выявления различий с доброкачественными аденомами (таблица 2).

**Таблица 2** – Сравнение объединенной группы карцином и АА с группой аденом ОЩЖ

Показатель	Карцинома +АА (N = 80)	Аденом (N = 162)	P
Возраст на момент постановки диагноза	53 [39,5; 62]	57 [50; 64]	0,029 <sup>1</sup>
Ca <sup>2+</sup> , ммоль/л	1,65 [1,48; 1,8]	1,31 [1,26; 1,42]	< 0,001 <sup>1</sup>
ПТГ, пг/мл	816,4 [450; 1640]	169,7 [117,2; 290,9]	< 0,001 <sup>1</sup>
Альбумин-скорректированный кальций, ммоль/л	3,3 [2,98; 3,62]	2,75 [2,63; 2,94]	< 0,001 <sup>1</sup>
Фосфор, ммоль/л	0,76 [0,68; 0,91]	0,83 [0,74; 0,92]	0,025 <sup>1</sup>
ЩФ, ед/л	285 [124; 525]	97 [80; 129]	< 0,001 <sup>1</sup>
Наибольший диаметр образования ОЩЖ, мм	30 [24; 38]	17 [13; 25]	< 0,001 <sup>1</sup>
Объем образования ОЩЖ, см <sup>3</sup>	4,98 [2,61; 11,48]	0,7 [0,32; 1,74]	< 0,001 <sup>1</sup>
Пол	М – 16/80 (20%), Ж – 64/80 (80%)	М – 13/162 (8%), Ж – 149/162 (92%)	0,007 <sup>2</sup>
СКФ менее 90, мл/мин/1,73 м <sup>2</sup>	52/69 (75%)	86/149 (58%)	0,012 <sup>2</sup>
СКФ менее 60, мл/мин/1,73 м <sup>2</sup>	28/69 (41%)	17/149 (11%)	< 0,001 <sup>2</sup>
Нефролитиаз	49/79 (62%)	87/162 (54%)	0,221 <sup>2</sup>
Переломы	22/78 (28%)	12/145 (8%)	< 0,001 <sup>2</sup>
Остеопороз	53/79 (67%)	89/162 (55%)	< 0,001 <sup>2</sup>
Остеопороз, переломы	54/79 (68%)	90/162 (56%)	0,057 <sup>2</sup>
Костно-висцеральные поражения	72/80 (90%)	139/162 (86%)	0,358 <sup>2</sup>



Гиперкальциемический криз	4/73 (5%)	-	-
Сочетание с папиллярным раком ЦЖ	7/80 (9%)	3/162 (2%)	0,028 <sup>3</sup>
<sup>1</sup> - критерий Манна-Уитни, <sup>2</sup> - критерий $\chi^2$ , <sup>3</sup> - критерий $\chi^2$ с поправкой Йетса. Поправка Бонферрони $P_0 = 0,003$			

**Этап 2.** Математические модели дифференциальной диагностики типов опухолей ОЩЖ при ПГПТ:

**А. Использование отрезных точек лабораторных и инструментальных показателей для предоперационной дифференциальной диагностики различных типов опухолей ОЩЖ.**

Для предоперационной дифференциальной диагностики образований ОЩЖ был проведен сравнительный анализ показателей, представленных в таблице 2. Поиск отрезных точек лабораторных и инструментальных показателей для предоперационной дифференциальной диагностики был проведен между группами: карцином и аденом; объединенной группы карцином и АА с группой аденом; АА и аденом (таблица 3). Проведен ROC-анализ, ПЦПР и ПЦОР скорректированы в соответствии с частотой рака (1%) и АА ОЩЖ (0,5%) в общей популяции.

**Б. Многомерная модель дифференциальной диагностики карцином, атипических аденом и аденом ОЩЖ при ПГПТ**

Для разработки многомерной модели экспертным способом изначально были выбраны 13 предикторов: пол, возраст установления диагноза ПГПТ, сывороточная концентрация ПТГ,  $\text{Ca}^{2+}$ , альбумин-скорректированного кальция, ЩФ, фосфора, гиперкальциемический криз в анамнезе, объем новообразования, наибольший размер новообразования, СКФ менее 60 мл/мин/1,73м<sup>2</sup>, почечные осложнения (нефролитиаз и/или ХБП) и костные осложнения ПГПТ (остеопороз и/или низкотравматичные переломы).

**Таблица 3** – Отрезные точки лабораторных и инструментальных показателей для предоперационной дифференциальной диагностики различных типов опухолей ОЩЖ

Показатель	Карциномы и аденомы	Карциномы+АА и аденомы	АА и аденомы
Возраст	AUC составила менее 0,5, что свидетельствует о непригодности для дифференциальной диагностики новообразований ОЩЖ		
ПТГ	443,55 пг/мл (ДЧ = 77% (95% ДИ: 65%-86%))	438,85 пг/мл (ДЧ = 75% (95% ДИ: 67%-82%))	209,05 пг/мл (ДЧ = 93% (95% ДИ: 78%-99%))
Ca <sup>2+</sup>	1,495 ммоль/л (ДЧ = 76% (95% ДИ: 62%-86%))	1,445 ммоль/л (ДЧ = 82% (95% ДИ: 72%-89%))	1,565 ммоль/л (ДЧ = 68% (95% ДИ: 50%-82%))
Альбумин-скорр. Са	3,235 ммоль/л (ДЧ = 61% (95% ДИ: 49%-71%))	3,015 ммоль/л (ДЧ = 71% (95% ДИ: 61%-79%))	2,835 ммоль/л (ДЧ = 97% (95% ДИ: 81%-100%))
ЩФ	176 ед/л (ДЧ = 68% (95% ДИ: 50%-82%))	190 ед/л (ДЧ = 70% (95% ДИ: 58%-80%))	218 ед/л (ДЧ = 79% (95% ДИ: 57%-93%))
Наиб. размер опухоли по УЗИ	22,5 мм (ДЧ = 85% (95% ДИ: 71%-93%))	22,5 мм (ДЧ = 82% (95% ДИ: 73%-89%))	22,5 мм (ДЧ = 75% (95% ДИ: 57%-88%))
Объем опухоли по УЗИ	2,594 см <sup>3</sup> (ДЧ = 83% (95% ДИ: 71%-91%))	1,947 см <sup>3</sup> (ДЧ = 83% (95% ДИ: 74%-90%))	1,947 см <sup>3</sup> (ДЧ = 75% (95% ДИ: 57%-88%))

Дифференциальная диагностика различных новообразований ОЩЖ проводилась в 2 этапа: между аденомами и объединенной группой АА и карцином, а также между карциномами и АА.

*Модель 1.* В модель CatBoost для дифференциальной диагностики аденом вошли 10 предикторов: пол, возраст установления диагноза ПГПТ, сывороточная концентрация ПТГ, Са<sup>2+</sup>, альбумин-скорректированного кальция, фосфора, объем новообразования, наибольший размер новообразования, СКФ менее 60 мл/мин/1,73м<sup>2</sup> и костные осложнения ПГПТ (остеопороз и/или низкотравматичные переломы).

*Модель 2.* Для дифференциальной диагностики АА и карцином ОЩЖ была также построена модель CatBoost, в которую вошли 11 предикторов: пол, возраст установления диагноза ПГПТ, сывороточная концентрация ПТГ, Са<sup>2+</sup>, альбумин-скорректированного кальция, ЩФ, фосфора, объем новообразования, наибольший размер новообразования, СКФ менее 60 мл/мин/1,73м<sup>2</sup>, почечные осложнения (нефролитиаз и/или ХБП) и костные осложнения ПГПТ (остеопороз и/или низкотравматичные переломы).

Матрица классификации в результате последовательного применения указанных моделей и операционные характеристики представлены в таблице 4.

Таким образом, разработанную модель можно использовать для диагностики аденомы ОЩЖ и исключения карцином и АА.

**Таблица 4 – Матрица классификации и операционные характеристики (n=242)**

		Гистологическое заключение				
		Карцинома	АА	Аденома		
Результат предсказания моделью	Карцинома	49	4	7	ПЦПР*=3% (95% ДИ: 0,1%; 3%)	ПЦОР*=10 0% (95% ДИ: 99%; 100%)
	АА	0	26	1	ПЦПР*=15% (95% ДИ: 0%; 21%)	ПЦОР*=10 0% (95% ДИ: 100%; 100%)
	Аденома	1	0	154	ПЦПР*=100% (95% ДИ: 99%; 100%)	ПЦОР*=23 % (95% ДИ: 9%; 23%)
		ДЧ=98% (95% ДИ: 90%; 100%)	ДЧ=70% (95% ДИ: 60%; 73%)	ДЧ=95% (95% ДИ: 93%; 96%)		
		ДС=70% (95% ДИ: 60%; 73%)	ДС=98% (95% ДИ: 90%; 100%)	ДС=99% (95% ДИ: 94%; 100%)		

\*ПЦПР и ПЦОР были рассчитаны с учетом поправки на распространенность типов опухолей ОЩЖ в общей популяции: карцинома – 1%, АА – 0,5%, аденома – 98,5%

### Раздел III Морфологическая и ИГХ-характеристика новообразований ОЩЖ

**Этап 1.** Морфологические характеристики новообразований ОЩЖ представлены в таблице 5.

**Таблица 5 – Морфологические характеристики новообразований ОЩЖ**

Морфологические характеристики образований ОЩЖ		Карциномы (N = 50)	АА (N = 30)	Аденомы (N = 162)	P
Преимущественный клеточный тип	Главные	40/45 (89%)	27/30 (90%)	130/151 (86%)	0,736 <sup>2</sup>
	Онкоцитраные (оксифильные)	3/45 (7%)	3/30 (10%)	10/151 (7%)	
	Транзиторные	0 (0%)	0 (0%)	3/151 (2%)	
	Водянисто-светлые	2/45 (4%)	0 (0%)	8/151 (5%)	
	Вакуолизированные	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
Митотическая активность	Количество митозов на 50 РПЗ	2 [0; 6]	2 [0; 3,5]	-	0,708 <sup>1</sup>
	Качественная	Повышена† 14/41 (34%)	Повышена† 3/23 (13%)	-	0,067 <sup>2</sup>
Патологические митозы		7/50 (14%)	4/30 (13%)	-	0,801 <sup>3</sup>
Широкие фиброзные тяжи		36/44 (82%)	22/29 (78%)	-	0,538 <sup>2</sup>
Кисты		4/44 (9%)	1/27 (4%)	13/162 (8%)	0,688 <sup>2</sup>
Некрозы		10/43 (23%)	4/28 (14%)	0	0,353 <sup>2</sup>
Ядерная атипия		19/44 (43%)	8/25 (32%)	1/161 (0,6%)	<0,001 <sup>2</sup>
Grade по AJCC	LG	35/44 (80%)	-	-	-
	HG	9/44 (20%)	-	-	
Края резекции	R1	3/44 (7%)	0	-	0,149 <sup>2</sup>
	R0	31/44 (70%)	24/27 (89%)	-	
	Rx	10/44 (23%)	3/27 (11%)	-	

<sup>1</sup> У-тест, <sup>2</sup>  $\chi^2$ , <sup>3</sup>  $\chi^2$  с поправкой Йетса; † более 5 митозов на 50 РПЗ; - нет данных  
Поправка Бонферрони  $P_0 = 0,0056$

Из всех анализируемых морфологических характеристик только частота ядерной атипии значимо различалась в группах. Отсутствие специфического клеточного состава для рака ОЩЖ объясняет невозможность дифференциальной диагностики доброкачественных и злокачественных опухолей с помощью цитологического исследования с помощью тонкоигольной аспирационной биопсии.

**Этап 2.** Результаты ИГХ-исследования карцином и АА ОЩЖ (таблица 6).

**Таблица 6** – Характеристика уровня экспрессии ПТГ, индекса пролиферации Ki-67 и парафибромина, а также сопоставление статуса экспрессии парафибромина с герминальной мутацией в гене *CDC73*

ИГХ-характеристики		Карциномы (n=50)	АА (n=30)
Экспрессия ПТГ	0	0	0
	1	1/41 (2%), из них 1 очагово	0
	2	12/41 (30%), из них 3 очагово	11/22 (50%)
	3	27/41(68%), из них 2 очагово	11/22 (50%)
Ki-67 %		8 [4; 13]	6 [2; 10]
Экспрессия парафибромина	Положительная	63,4% (26/41)	82% (18/22)
	Утрата	29,3% (12/41)	9% (2/22)
	Сомнительные результаты	7,3% (3/41)	9% (2/22)

Генетическое тестирование *CDC73* было доступно у 61 больных: из них 38/50 (76%) пациентов с карциномой и 23/30 (77%) с АА ОЩЖ. В 100% случаев (7/7) у больных с герминальной мутацией в гене *CDC73* наблюдалась отсутствие экспрессии парафибромина. У 44 пациентов не было выявлено герминальной мутации в гене *CDC73*, при этом в 38 случаях зафиксирована положительная экспрессия парафибромина, а в 6 случаях экспрессия отсутствовала. Матрица классификации представлена в таблице 7.

**Таблица 7** – Матрица классификации наличия мутации в *CDC73* в зависимости от статуса экспрессии парафибромина

		Мутация в <i>CDC73</i>	
		Есть	Нет
Экспрессия парафибромина	Утрата	7	6
	Положительная	0	38

Таким образом, ДЧ ИГХ-исследования экспрессии парафибромина для оценки наличия у пациента герминальной мутации в *CDC73* составила 100% (ДИ: 59%-100%), ДС = 86% (ДИ: 73%-95%), ПЦПР = 54% (ДИ: 25%-81%), ПЦОР = 100% (ДИ: 91%-100%).

#### **Раздел IV Результаты высокопроизводительного параллельного секвенирования (next-generation sequencing, NGS).**

Результаты генетического исследования были доступны у 38/50 (76%) больных раком и 23/30 (77%) АА ОЩЖ. Всего в группе карцином зафиксировано 7 герминальных мутаций в гене *CDC73* (таблица 8).

**Таблица 8 – Характеристика пациентов с выеденными мутациями в гене *CDC73***

[illegible]

Мы проанализировали особенности клинического течения заболевания у больных с мутациями и без них (таблица 9).

**Таблица 9** – Особенности клинического течения рака ОЩЖ у пациентов с мутацией в гене *CDC73* и без мутации

Признак	Есть мутация (n=7)	Нет мутации (n=31)	p
Возраст, года	24 [13; 28]	51 [44; 63]	<0,001 <sup>1</sup>
ПТГ, пг/мл	1550 [569; 2440]	1065 [409; 1778]	0,230 <sup>1</sup>
Альб.скор. Са, ммоль/л	3,57 [3,24; 3,96]	3,26 [2,91; 3,45]	0,199 <sup>1</sup>
Са <sup>2+</sup> , ммоль/л	1,76 [1,58; 1,8]	1,54 [1,35; 1,62]	0,077 <sup>1</sup>
Р, ммоль/л	0,74 [0,62; 0,78]	0,80 [0,68; 0,99]	0,348 <sup>1</sup>
ЩФ, ед/л	848 [663; 1053]	194 [110; 261]	0,011 <sup>1</sup>
ИГХ - Ki-67 %	9 [6; 15]	7 [3; 12]	0,241 <sup>1</sup>
Пол	М – 1 Ж – 6	М – 8 Ж – 23	0,877 <sup>2</sup>
Костно-висцеральная форма	6/7	25/31	0,755 <sup>2</sup>
Потеря экспрессии парафибромина	7/7	4/27	–
Рецидивы	5/7	8/31	0,063 <sup>2</sup>
<sup>1</sup> U-тест; <sup>2</sup> критерий $\chi^2$ с поправкой Йетса; Поправка Бонферрони $P_0 = 0,005$ .			

Манифестация ПГПТ у пациентов с герминальной мутацией в гене *CDC73* наблюдалась статистически значимо раньше, чем в группе без мутации ( $p < 0,0011$ ).

## **Раздел V Сравнительный анализ профиля циркулирующих миРНК в сыворотке крови у пациентов со злокачественными и доброкачественными новообразованиями ОЩЖ.**

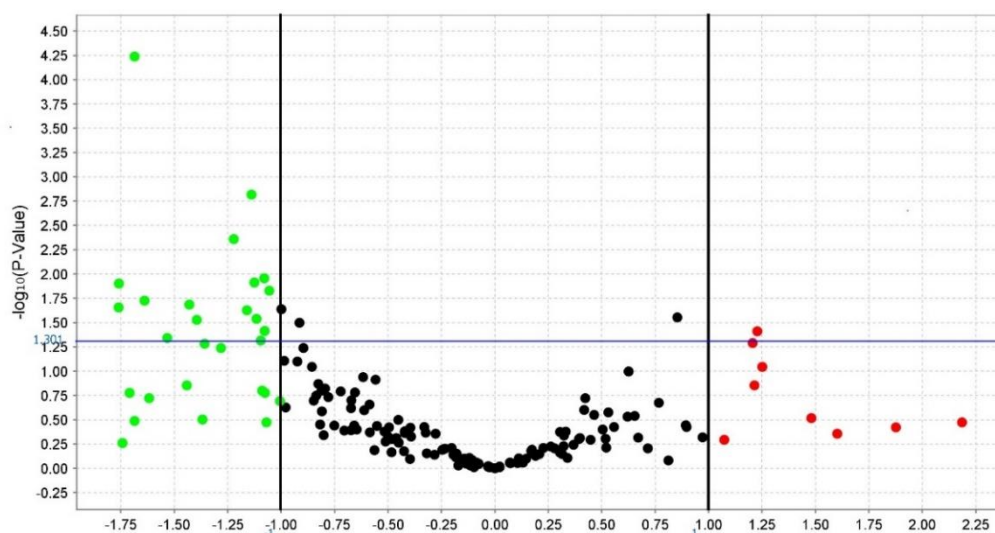
### **Клинико-лабораторная характеристика исследуемых групп**

В соответствии с критериями включения и исключения в исследование для анализа миРНК включено 24 пациента с ПГПТ (8 мужчин и 16 женщин). Медиана возраста манифестации ПГПТ в группе карцином ( $n=13$ ) составила 58 лет [28; 63] и 55 лет [32; 68] в группе аденомы ОЩЖ (группа контроля,  $n=11$ ). Группы были сопоставимы по полу ( $p = 0,999$ ,  $\chi^2$  с поправкой Йетса) и возрасту ( $p = 0,999$ , U-тест). Медиана уровня иПТГ была в 4,7 раз выше, чем в контрольной группе (аденомы ОЩЖ): 988 пг/мл [543; 1289] vs 211 пг/мл [80; 520] соответственно. Медиана уровня сывороточного кальция для группы карцином составила 3,5 ммоль/л [3,17; 4,19] и 2,82 ммоль/л [2,68; 3,05] в группе аденом. У восьми пациентов зафиксированы метастазы на момент постановки диагноза или за время наблюдения. Герминальные мутации в гене *CDC73* были выявлены у трех больных раком (~20%).

**Различия в экспрессии миРНК в сыворотке между группами карцином и аденом ОЩЖ.** В результате одномоментного сравнительного анализа 754 типов миРНК в сыворотке между группой карцином и контрольной группой аденом ( $p < 0,05$ ) статистически значимые различия выявлены у 17 типов миРНК (таблица 10). После применения поправки множественных сравнений (корректировка Бенджамини-Хохберга, которая была автоматически интегрирована в программу) свою статистическую значимость ( $p = 0,02$ ) сохранил сниженный уровень миРНК-342-3p.  $\Delta$ CRT для миРНК-342-3p в группе карцином составила 28,297 [27,943; 29,386] и 27,012 [26,199; 27,309] в контрольной группе аденом (рисунок 2). Отрезная точка CRT для карцином составила 27,527.

**Таблица 10** – Экспрессия миРНК (кратное изменение  $< 0,5$  или  $> 2,0$ ) в группе карцином по сравнению с группой аденом (контроль). (Б–Х)-корректировка p-значений по Бенджамини-Хохбергу

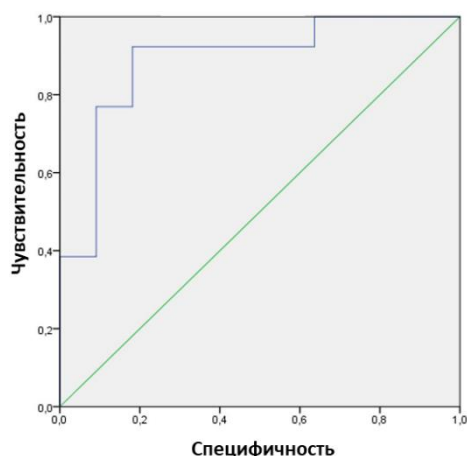
миРНК	Fold Change	P-value	P-value (Б–Х)	Экспрессия
миРНК-342-3p	0,311	$< 0,001$	<b>0,020</b>	Снижена
миРНК-19b	0,454	0,002	0,267	Снижена
миРНК-150	0,429	0,004	0,511	Снижена
миРНК-17	0,473	0,011	0,689	Снижена
миРНК-106a	0,458	0,012	0,689	Снижена
миРНК-186	0,296	0,013	0,689	Снижена
миРНК-19a	0,481	0,015	0,689	Снижена
миРНК-194	0,321	0,019	0,689	Снижена
миРНК-let-7e	0,371	0,021	0,689	Снижена
миРНК-195	0,295	0,022	0,689	Снижена
миРНК-486	0,500	0,023	0,689	Снижена
миРНК-744	0,462	0,029	0,692	Снижена
миРНК-191	0,380	0,030	0,692	Снижена
миРНК-126	0,474	0,039	0,757	Снижена
миРНК-361	2,341	0,039	0,757	Повышена
миРНК-215	0,345	0,045	0,832	Снижена
миРНК-320	0,468	0,048	0,832	Снижена



**Рисунок 2** – Разница в экспрессии сывороточных миРНК (график вулкана) у пациентов в группе карцином и аденом (контроль)

Примечания: Граница кратной разницы, которую мы использовали в этом исследовании, составляет 2,0; зеленые точки – это миРНК с кратностью изменения  $<0,5$ , а красные точки – миРНК с кратностью изменения  $>2,0$ . Черные точки – миРНК без статистически значимых различий между группами. Уровень  $p$  после корректировки Бенджамини-Хохберга: 0,05. Синяя линия (ось Y) соответствует пороговому значению  $P = 0,05$  ( $-\lg(0,05) = 1,301$ ).

**Диагностическая ценность миРНК-342-3р.** В результате ROC-анализа площадь под кривой (AUC) циркулирующего миРНК-342-3р, выраженной в CRT, составляла 0,888 (95% ДИ, 0,749–1;  $p = 0,001$ ,  $\chi^2$ ), что указывает на средний уровень диагностической точности. Отрезная точка для миРНК-342-3р составила 27,5 (чувствительность = 92% (95% ДИ: 64%-100%), специфичность = 82% (95% ДИ: 48%-98%), ПЦПР = 5% (95% ДИ: 0%-5%), ПЦОР = 100% (95% ДИ: 99%-100%)) (рисунок 3).



**Рисунок 3** – А. ROC-анализ CRT миРНК-342. AUC = 0,888 (95% ДИ, 0,749–1;  $p=0,001$ ,  $\chi^2$ )



Установлена умеренная положительная корреляция между предоперационным уровнем кальция в крови и миРНК -342-3p ( $r = 0,52$ ,  $p=0,01$ ) и умеренная положительная корреляция между предоперационным уровнем ПТГ и миРНК -342-3p ( $r = 0,68$ ,  $p < 0,01$ ).

#### **Раздел VI Лечение и оценка прогноза пациентов с карциномой ОЩЖ.**

Селективная ПТЭ среди карцином проведена в 26/50 (52%), расширенный объем хирургического лечения *en bloc* – 24/50 (48%), селективная ПТЭ среди АА – 24/30 (80%), в объеме *en bloc* – 6/30 (20%), селективная ПТЭ среди аденом – 160/162 (99%), *en bloc* – 2/162 (1%), лимфодиссекция в группе карцином – 8/50 (16%).

Первый метастаз рака ОЩЖ чаще поражает регионарные лимфатические узлы – 75% (12/16), реже кости – 12,5% (2/16) и легкие – 6,3% (1/16). Частота локализаций метастазов рака ОЩЖ за все время наблюдения: регионарные лимфатические узлы – 46% (13/28), легкие – 21% (6/28), кости – 14% (4/28), печень – 7% (2/28), головной мозг – 4% (1/28), средостение – 4% (1/28), другие органы и ткани – 4% (1/28) (рисунок 50). Количество проведенных операций у пациентов с карциномой ОЩЖ: 1 операция – 38/50 (76%), 2 операции – 6/50 (12%), 3 операции – 3/50 (6%), 4 операции – 3/50 (6%) по поводу рецидивов.

Помимо хирургического лечения, 6 пациентов получили альтернативную терапию по поводу метастазов рака ОЩЖ: лучевая терапия – 1/6 (17%), таргетная терапия – 3/6 (50%), комбинированное лечение в виде химио-, лучевой и таргетной терапии – 1/6 (17%), комбинация таргетного лечения и радиочастотной абляции – 1/6 (17%). Пятилетняя безрецидивная выживаемость составила 56%, десятилетняя – 50%.

Установлена статистически значимая ассоциация наличия у пациента герминальной мутации в *CDC73* с развитием рецидива ( $p=0,002$ ,  $p$ -value, лог-ранг-тест и  $\chi^2$ ).

## ВЫВОДЫ

1. Пациенты с карциномами и АА не отличаются по лабораторным и инструментальным характеристикам. Для дифференциальной диагностики карцином и АА от аденом определены следующие критерии: ПТГ более 439 пг/мл,  $\text{Ca}^{2+}$  более 1,45 ммоль/л, альбумин-скорректированный Са более 3,02 ммоль/л, ЩФ более 190 ед/л, размер опухоли по УЗИ более 22,5 мм, объем опухоли по УЗИ более 1,947 см<sup>3</sup>.
2. Разработанный неинвазивный математический способ может быть использован для исключения карциномы ОЩЖ с вероятностью ПЦОР=100% (95% ДИ: 99%; 100%); исключить АА с вероятностью ПЦОР=100% (95% ДИ: 100%; 100%); диагностировать аденому с вероятностью ПЦПР=100% (95% ДИ: 99%; 100%).
3. В группе пациентов с карциномой ОЩЖ наблюдается значительное подавление экспрессии циркулирующей миРНК-342-3р ( $p=0,02$ ) в сыворотке крови по сравнению с группой аденом. Критерием диагностики рака ОЩЖ может выступать CRT миРНК-342-3р более 27,5.
4. ИГХ-исследование экспрессии парафибромина может быть рекомендовано для исключения герминальной мутации в *CDC73* с вероятностью ПЦОР = 100% (ДИ: 91%-100%).
5. У пациентов с рецидивом рака ОЩЖ частота герминальной мутации в гене *CDC73* выше (38%) по сравнению с группой пациентов без рецидива (8%).

## ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Для определения объема хирургического вмешательства ПППТ (селективная паратиреоидэктомия vs *en bloc*) рекомендуется внедрение в клиническую практику (или применение) разработанного неинвазивного математического способа дифференциальной диагностики.
2. При наличии экспрессии парафибромина как в первичной опухоли, так и в метастазах рака ОЩЖ по результатам ИГХ-исследования проведение генетического исследования *CDC73* нецелесообразно, за исключением случаев высокой вероятности наследственной формы заболевания (наличие других компонентов синдрома или мутации у родственника первой линии).

### Список научных работ, опубликованных по теме диссертации

1. **Крупина Ю.А.**, Воронкова И.А., Айнетдинова А.Р. и соавт. Многоцентровое ретроспективное исследование клинико-лабораторных предикторов и морфологических характеристик рака околощитовидной железы // Вестник Российской академии медицинских наук. – 2021. – Т. 76. – № 1. – С. 111-124. – DOI: 10.26442/00403660.2021.10.201109.
2. **Krupinova J.**, Mokrysheva N., Petrov V. и соавт. Serum circulating miRNA-342-3p as a potential diagnostic biomarker in parathyroid carcinomas: A pilot study // Endocrinology, Diabetes and Metabolism. – 2021. – DOI: 10.1002/edm2.284.
3. Мокрышева Н.Г., Еремкина А.К., Мирная С.С., **Крупина Ю.А.** и соавт. Клинические рекомендации по первичному гиперпаратиреозу, краткая версия // Проблемы эндокринологии. – 2021. – Т. 67. – № 4. – С. 94-124. – DOI: 10.14341/probl12801.
4. Eremkina A, **Krupinova J**, Dobрева E, и соавт. Denosumab for management of severe hypercalcemia in primary hyperparathyroidism // Endocrine Connections. – 2020. – Т. 9. – №10 – С. 1019-1027. DOI: 10.1530/EC-20-0380.
5. Мокрышева Н.Г., Мирная С.С., Добрева Е.А., Маганева И.С., Ковалева Е.В., **Крупина Ю.А.** и соавт. Первичный гиперпаратиреоз в России по данным регистра. // Проблемы Эндокринологии. – 2019. – Т 65. – № 5. – С. 300-310. – DOI: 10.14341/probl10126
6. Мокрышева Н.Г., **Крупина Ю.А.**, Мирная С.С. Клинические и лабораторно-инструментальные возможности предоперационной диагностики рака околощитовидных желез. // Эндокринная хирургия. – 2017. –Т. 11. – № 3. – С.136-145. – DOI: 10.14341/serg20173136-145.
7. Rozhinskaya L, Pigarova E, Sabanova E, Mamedova E, Voronkova I, **Krupinova J.** и соавт. Diagnostic and treatment challenges of a parathyroid carcinoma: a 27-year old woman with multiple lung metastases // Diabetes & Metabolism Case Reports. – 2017. – 16-0113. DOI: 10.1530/EDM-16-0113.
8. Дедов И.И., Мельниченко Г.А., Мокрышева Н.Г., Рожинская Л.Я., Кузнецов Н.С., Пигарова Е.А., Еремкина А.К., Егшатын Л.В., Мамедова Е.О., **Крупина Ю.А.** Первичный гиперпаратиреоз: клиника, диагностика, дифференциальная диагностика, методы лечения // Проблемы Эндокринологии. – 2016. – Т. 62. – №6. – С. 40-77.
9. Горбунова В.А., Пигарова Е.А., Рожинская Л.Я., Воронкова И.А., **Крупина Ю.А.** и соавт. Применение сорафениба (нексавара) в лечении больной диссеминированным раком паращитовидных желез (клинический случай) // Опухоли головы и шеи. 2016. – Т. №6. – С. 67-72. DOI: 10.17650/2222-1468-2016-6-4-67-72

10. Мокрышева Н.Г., Еремкина А.К., Ковалева Е.В., **Крупина Ю.А.**, Викулова О.К. Современные проблемы гипер- и гипопаратиреоза // Терапевтический архив. – 2021. – Т.93. – №10. – С. 1149-115. – DOI: 10.26442/00403660.2021.10.201109.
11. Айнетдинова А. Р., **Крупина Ю. А.**, Ковалева Е. В., Реброва О. Ю. Поиск предикторов злокачественности опухолей околощитовидных желез у пациентов с первичным гиперпаратиреозом // Инновационные технологии в эндокринологии: Сборник тезисов IV (XXVII) Национального конгресса эндокринологов с международным участием (Москва, 22–25 сентября 2021 года).
12. **Julia Krupinova**, Iya Voronkova, Alina Aynetdinova и соавт. Preoperative predictors and prognostic factors of recurrence of the parathyroid carcinoma – Data of a multi-center study // Endocrine Abstracts. – 2021. – 73. – YI12 | DOI: 10.1530/endoabs.73.YI12 (Young Investigator Awards)
13. Eremkina A, **Krupinova J**, Bibik E и соавт. Denosumab for preoperative management of severe hypercalcemia due to primary hyperparathyroidism // Journal of Bone and Mineral Research. - 2020. - Vol. 35, No S1 (2020 Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research Virtual Event). - P. 636. DOI 10.1002/jbmr.4206
14. **Julia Krupinova**, Julia Veretennikova, Irina Maganeva и соавт. Increasing incidence of parathyroid carcinoma according to Russian registry of the primary hyperparathyroidism // Endocrine Abstracts – 2020 – 70 AEP164 | DOI: 10.1530/endoabs.70.AEP164
15. **Julia Krupinova**, Natalia Mokrysheva. Remission of disseminated parathyroid cancer after multiple surgical interventions because of recurrences in the neck lymph nodes, left lung and liver in a young patient with hyperparathyroidism-jaw tumor syndrome // Endocrine Abstracts. – 2020. – 70 AEP191 | DOI: 10.1530/endoabs.70.AEP191
16. **Julia Krupinova**, Natalia Mokrysheva, Vasiliy Petrov, и соавт. MiRNA-342-3p as a potential diagnostic biomarker in parathyroid carcinomas // Endocrine Abstracts. – 2019. – 63 P661 | DOI: 10.1530/endoabs.63.P661
17. **Julia Krupinova**, Natalia Mokrysheva, Ekaterina Pigarova и соавт. Multikinase inhibitors for the treatment of progressive, metastatic parathyroid cancer // Endocrine Abstracts. – 2019 – 63 GP227 | DOI: 10.1530/endoabs.63.GP227
18. **Julia Krupinova**, Natalia Mokrysheva, Vasiliy Petrov и соавт. A pilot study of the differences in miRNA expression profile in the blood serum between patients with malignant and benign parathyroid tumors // Endocrine Abstracts. – 2018. – 56 GP172 | DOI: 10.1530/endoabs.56.GP172

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ**

CRT – cycle relative threshold

АА – атипические аденомы

ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения

ДС – диагностическая специфичность

ДЧ – диагностическая чувствительность

ИГХ – иммуногистохимическое

иПТГ – интактный паратиреоидный гормон

миРНК – малые некодирующие РНК

ОЩЖ – околощитовидная железа

ПГПТ – первичный гиперпаратиреоз

ПТГ – паратиреоидный гормон

ПТЭ – паратиреоидэктомия

ПЦОР – прогностическая ценность отрицательного результата

ПЦПР – прогностическая ценность положительного результата

УЗИ – ультразвуковое исследование

ХБП – хроническая болезнь почек

ЩЖ – щитовидная железа

ROC-анализ – анализ характеристических кривых