

На правах рукописи

Газизова Дарья Олеговна

**ПРОГНОСТИЧЕСКИЕ КРИТЕРИИ КЛИНИЧЕСКОГО ТЕЧЕНИЯ  
И ЛЕЧЕБНАЯ ТАКТИКА ПРИ МЕДУЛЛЯРНОМ РАКЕ  
ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ**

14.01.02 – эндокринология

Автореферат диссертации на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук

Москва - 2013

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Эндокринологический научный центр» Министерства Здравоохранения Российской Федерации (директор – академик РАН и РАМН, профессор, доктор медицинских наук, Дедов Иван Иванович)

#### Научные руководители:

доктор медицинских наук

**Бельцевич Дмитрий Германович**

доктор медицинских наук

**Тюльпаков Анатолий Николаевич**

#### Официальные оппоненты:

**Романцова Татьяна Ивановна** - доктор медицинских наук, профессор кафедры эндокринологии ГБОУ ВПО «Первый Московский Государственный Университет им И.М. Сеченова» МЗ РФ

**Бржезовский Виталий Жанович** - доктор медицинских наук, главный научный сотрудник отделения опухолей головы и шеи ФГБУ "Российский онкологический научный центр» им. Н.Н. Блохина РАМН

#### Ведущая организация:

Государственное бюджетное общеобразовательное учреждение Высшего профессионального образования «Ростовский государственный медицинский университет» Министерства Здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится «\_\_» \_\_\_\_\_ 2014 году в \_\_\_\_\_ часов на заседании Диссертационного Совета Д 208.126.01 в ФГБУ «Эндокринологический научный центр» МЗ РФ по адресу: 117036, Москва, ул. Дмитрия Ульянова, д. 11.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения «Эндокринологический научный центр» Министерства Здравоохранения Российской Федерации.

Автореферат разослан «28» декабря 2013 года

Ученый секретарь Диссертационного Совета  
доктор медицинских наук

**Е.В. Суркова**

## **ВВЕДЕНИЕ. Актуальность**

Медуллярный рак щитовидной железы (МРЦЖ) – наиболее агрессивное злокачественное новообразование среди дифференцированных карцином щитовидной железы.

Несмотря на широкое внедрение в клиническую практику высокоинформативных лабораторных и инструментальных методов обследования, МРЦЖ, как и десять лет назад, диагностируется на 3 и 4 стадиях заболевания более чем в 50% случаев [Cohen M.S. et al., 2003]. В то время как именно распространенность опухолевого процесса на момент диагностики является главным прогностическим фактором (при наличии регионарных и отдаленных метастазов - 10-летний уровень выживаемости составляет 70% и 40%, соответственно) [Modigliani E. et al., 1998]. С целью более ранней диагностики МРЦЖ активно обсуждается необходимость внедрения в алгоритм обследования пациентов с узловым зобом гормонального анализа крови на кальцитонин [Наhm J.R. et al., 2001]. По результатам ряда работ исследование кальцитонина при выявлении узлового зоба позволяет диагностировать МРЦЖ на ранней стадии, что существенно улучшает результаты оперативного лечения и общую выживаемость [Elisei R. et al., 2004]. Однако большинством эндокринологических сообществ данная тактика пока обсуждается, и общепринятым стандартом является исследование кальцитонина у всех пациентов с узловым зобом, направляемых на оперативное лечение [Cooper D.S et al., 2009].

Выраженная гетерогенность клинического течения – от бессимптомных форм, не приводящих к ограничению продолжительности жизни, до крайне агрессивных, приводящих к инвалидизации, с низкой 5-летней выживаемостью, требует анализа различных факторов при выборе тактики ведения пациентов с МРЦЖ. Проведение обширных вмешательств далеко не всегда оправдано - зачастую снижая качество, редко удается увеличить продолжительность жизни [Kebebew E., 2000].

В основе наследуемой формы МРЦЖ, наблюдаемой в 20-25%-случаев, лежит мутация гена *RET*, вид которой во многом определяет агрессивность течения заболевания. Разработанная в 2009 году Американской тиреоидологической ассоциацией (ATA) классификация мутаций гена *RET*, требует постоянного обновления по мере выявления новых мутаций и уточнения особенностей течения ассоциированных заболеваний при известных мутациях [Cooper D.S., 2009].

Поиск эффективной системной терапии МРЦЖ у неоперабельных больных дал существенный толчок в исследовании соматических мутаций при спорадическом МРЦЖ. Если пять лет назад общепринятым стандартом генетического обследова-

ния пациентов с МРЦЖ являлось исключение только наследственной природы заболевания, то в настоящее время при спорадическом МРЦЖ данное обследование дополняется поиском соматических мутаций гена *RET*. Частота обнаружения последних варьирует от 25% до 71%-случаев [Agrawal N., 2013]. Активно изучается роль мутаций суперсемейства гена *RAS* [Ciampi R. et al., 2013].

Дополнительным прогностическим параметром при отсутствии ремиссии заболевания служит скорость нарастания опухолевых маркеров [Stepanas A.V. et al., 1979]. Miyauchi и соавт. предложили стандартизированный способ оценки динамики роста, а именно времени удвоения кальцитонина и РЭА [Miyauchi A. et al., 1984]. Вычисление этого параметра делает более информативной оценку величины опухолевых маркеров, которая может изменяться как в сторону увеличения, так и незначительно уменьшаться при сравнении только двух точек.

Согласно рекомендациям Американской тиреодологической ассоциации, впервые исследование кальцитонина и РЭА проводится через три месяца после оперативного лечения, так как к этому времени их уровни достигают своего минимума [Stepanas A.V. et al., 1979]. Однако по данным ряда работ, исследование вышеописанных онкомаркеров, в особенности кальцитонина, информативно уже через 72-часа после операции [Fugazzola L. et al., 1994].

Существуют отдельные сообщения о случаях агрессивного течения МРЦЖ, с повышением другого неспецифического для МРЦЖ онкомаркера - Ca19-9 [Elisei R. et al., 2013]. Роль последнего в оценке агрессивности МРЦЖ требует уточнения.

Необходимость индивидуализированного подхода, все возрастающая роль генетических мутаций в разработке новых методов лечения рака щитовидной железы определяют актуальность представленного исследования.

**Цель работы:** оптимизировать тактику ведения пациентов с МРЦЖ.

**Задачи исследования:**

1. Изучить диагностическую ценность онкомаркеров МРЦЖ.
2. Изучить диагностическую ценность ТАБ в диагностике МРЦЖ.
3. Изучить спектр герминальных и соматических мутаций при МРЦЖ, их влияние на агрессивность течения заболевания.
4. Оценить влияние различных факторов на результаты хирургического лечения МРЦЖ.

**Научная новизна:**

1. Впервые в России показаны преимущества рутинного определения кальцитонина у больных с узловым зобом, позволяющего выявлять МРЦЖ на более ранней стадии
2. Оптимизирован протокол проведения пробы с глюконатом кальция, доказана информативность оценки результатов оперативного лечения на основании исследования кальцитонина через 3 суток после оперативного лечения;
3. Изучен спектр герминальных и соматических мутаций при МРЦЖ на российской популяции, их влияние на агрессивность течения МРЦЖ. Впервые в мире выявлены три, ранее не описанные герминальные мутации гена *RET*;
4. Проведена оценка уровня Ca19-9 в качестве опухолевого маркера МРЦЖ.

#### **Практическая значимость:**

1. Рекомендовано исследование базального кальцитонина у всех пациентов с узловым зобом вне зависимости от результатов цитологического исследования.
2. Рекомендован оптимизированный протокол проведения стимуляционной пробы с глюконатом кальция.
3. С целью оценки результатов хирургического лечения рекомендовано исследование кальцитонина через 3 суток после оперативного лечения.
4. Рекомендовано использование модифицированной классификации агрессивности герминальных мутаций при МРЦЖ.
5. С целью уточнения агрессивности течения МРЦЖ, рекомендовано исследование соматических мутаций всем пациентам со спорадической формой заболевания.
6. Рекомендовано определение Ca19-9 в качестве дополнительного маркера высокой агрессивности МРЦЖ.

#### **Положения, выносимые на защиту:**

1. Уровень кальцитонина имеет определяющую роль в диагностике МРЦЖ
2. Рутинное определение кальцитонина у пациентов с узловым зобом позволяет осуществить диагностику МРЦЖ на более ранней стадии и, таким образом, улучшить прогноз заболевания.
3. Стимулированный уровень кальцитонина имеет значение для дифференциального диагноза первичной и вторичной гиперкальцитонинемии.
4. Результаты молекулярно-генетического исследования позволяют:
  - определить семейный характер заболевания;
  - прогнозировать время манифестации МРЦЖ;

- прогнозировать вероятность развития феохромоцитомы и первичного гиперпаратиреоза;
- прогнозировать агрессивность заболевания;
- определять время профилактической тиреоидэктомии;
- определять ранжированность наблюдения.

**Апробация работы и публикации.** Апробация работы состоялась на межотделенческой конференции ФГБУ ЭНЦ 10 декабря 2013 г. По теме диссертации опубликовано 6 печатных работ.

**Структура и объем диссертации.** Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, описания результатов исследования и их обсуждения, выводов, практических рекомендаций и списка литературы. Работа изложена на 97 страницах, содержит 8 таблиц, 30 рисунков. Список литературы содержит 163 источника.

**Конкурсная поддержка исследования.** Диссертация выполнена при поддержке ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009-2013 годы (мероприятие 1.2.1 – I очередь), тема ПНИР: «Оптимизация методов диагностики и лечения нейроэндокринных опухолей».

#### **Общая структура исследования, характеристика обследованных больных.**

В ФГБУ ЭНЦ проведено ретроспективно-проспективное аналитическое клиническое исследование 137 пациентов с МРЦЖ. Пациенты обследованы и оперированы в период с 1982 по 2013гг. Из них 73 пациентам первичное либо повторное оперативное вмешательство было проведено в хирургическом отделении ФГБУ ЭНЦ (руководитель – проф., д.м.н. Кузнецов Н.С.) с 1990 по 2013гг, 61-пациенту - в других лечебных учреждениях РФ. 3 пациентам оперативное лечение не проведено (2 – инкурабельны, 1 – отказался) (**рис.1**). У всех пациентов диагноз подтвержден морфологически.

Среднее время наблюдения составило  $7,6 \pm 7,4$  лет, от 4 месяцев до 32 лет (Me 5 лет). Недоступными для наблюдения оказались 23 пациента. Умерло на момент окончания исследования всего 5 пациентов, двое из них - от распространенного МРЦЖ, один - от осложнений, возникших после оперативного лечения по поводу феохромоцитомы, один - от рака другой этиологии, один - по неизвестной причине.

## Характеристика групп больных

Пациенты были разделены на две группы: спорадический (n=83) и генетически-детерминированный МРЦЖ (n=54).

В группу генетически-детерминированного МРЦЖ были отнесены пациенты:

- с генетически подтвержденным синдромом МЭН 2 типа;
- обследованные до 2000 года без генетической верификации диагноза при наличии других компонентов синдромов МЭН 2 типа (феохромоцитома/гиперпаратиреоз) или при наличии в семейном анамнезе родственников с МРЦЖ или с генетически подтвержденным МРЦЖ.

В группу спорадического МРЦЖ были отнесены пациенты:

- с отсутствием мутаций гена *RET*, ассоциированных с МРЦЖ в рамках синдромов МЭН 2 типа, по результатам молекулярно-генетического исследования;
- без отягощенного семейного анамнеза и заболеваний, ассоциированных с МРЦЖ в рамках генетических синдромов;
- при отсутствии С-клеточной гиперплазии и мультифокального роста по результатам гистологического исследования.

В зависимости от поставленных в работе задач оценивались разные по составу выборки больных.

**Методы исследования.** Биохимические и гормональные исследования выполнялись в лаборатории гормонального анализа (рук. – профессор Н.П.Гончаров) и клинической биохимии (рук. - А.В. Ильин) ФГБУ ЭНЦ. Исследование уровня кальцитонина и РЭА проводилось методом иммунохемилюминисценции. Верхний норматив для уровня кальцитонина, предложенный фирмой-производителем, составил 18,9 нг/л для мужчин и 5,5 нг/л для женщин. Верхний норматив РЭА, предложенный фирмой производителем для общей популяции, - 5 нг/мл. Исследование уровня Са19-9 в сыворотке крови выполнялось методом ИФА на диагностическом наборе CanAg Са19-9. Референсные значения, предложенные фирмой-производителем, - 0-29 Ед/мл, медиана 4,5 Ед/мл.

Молекулярно-генетическое исследование проводилось в лаборатории отделения наследственных эндокринопатий ФГБУ ЭНЦ (руководитель – д.м.н. Тюльпаков А.Н.). На первом этапе исключалось наличие герминальных мутаций гена *RET*. При наличии фенотипических признаков синдрома МЭН 2В типа, в первую очередь проводилось исключение мутаций в 16 экзоне, при отсутствии последних, последовательно в 15, 13-14, 10-11 экзонах гена *RET*. У пациентов без фенотипических при-

знаков синдрома МЭН 2В, исключалось наличие мутаций последовательно в 10-11, 13-15, 16 экзонах гена *RET*. После исключения наследственного генеза заболевания, вторым этапом проводилось исследование спорадических мутаций из образцов тканей МРЦЖ в виде парафиновых блоков. Идентификацию выявленных изменений нуклеотидной последовательности проводили с помощью базы данных dbSNP и генетического браузера Ensembl ([www.ensembl.org](http://www.ensembl.org)), патогенетически значимых мутаций – с помощью базы данных HGMD (<http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>).

УЗИ проводилось в отделении функциональной диагностики ФГБУ ЭНЦ (руководитель – к.м.н. Солдатов Т.В.). УЗИ щитовидной железы на аппаратах экспертного класса Aloka альфа 10, Toshiba Aplio XG 790 с использованием линейного датчика с частотой 6,5 -10,0 мГц.

Всем оперированным в ФГБУ ЭНЦ больным выполнено плановое гистологическое исследование в лаборатории патоморфологического анализа ЭНЦ (зав. лабораторией – проф., д.м.н. Абросимов А.Ю., позднее - Молчков Р.В.). Диагноз формулировался в соответствии с классификацией TNM UICC в 7ой редакции.

**Статистический анализ данных** выполнялся с использованием пакета программ Statistica 9.1 (StatSoft, Inc., США) в соответствии с рекомендациями [Реброва О.Ю., 2002]. Описательная статистика количественных признаков представлена средними и средне-квадратическими отклонениями (в формате  $M \pm s$ ; в случае нормальных распределений) либо медианами и квартилями (в формате  $Me [Q_1; Q_3]$ ). Описательная статистика качественных признаков представлена абсолютными и относительными частотами. Информативность диагностических тестов оценивалась по формулам: чувствительность = истинно положительный результат / истинно положительный + ложноотрицательный; специфичность = истинно отрицательный результат / истинно отрицательный результат + ложноположительный. При анализе соответствия распределений количественных признаков нормальному закону применялся критерий Шапиро-Уилка. Для сравнения несвязанных групп по количественным и порядковым признакам применялся непараметрический дисперсионный анализ по Краскел-Уоллису, множественные *post hoc* сравнения групп по Сигэл и Кастеллан, тест Манна-Уитни. Сравнение несвязанных групп по качественным признакам проводилось с использованием теста Хи-квадрат и точного критерия Фишера. При проверке гипотез нулевая гипотеза отклонялась при достигнутом уровне значимости  $P < 0,05$ .

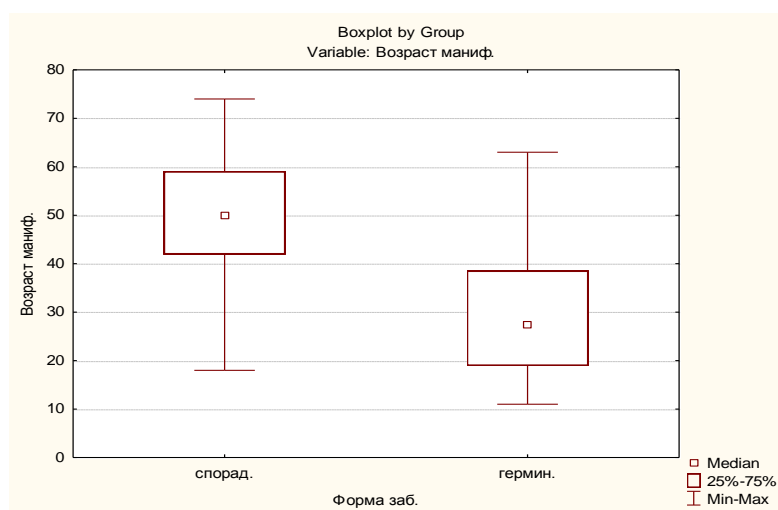
**РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ.** Результаты работы основаны на данных анамнеза и обследования 137 пациентов с МРЦЖ, из них 38 мужчин (28%) и 101-



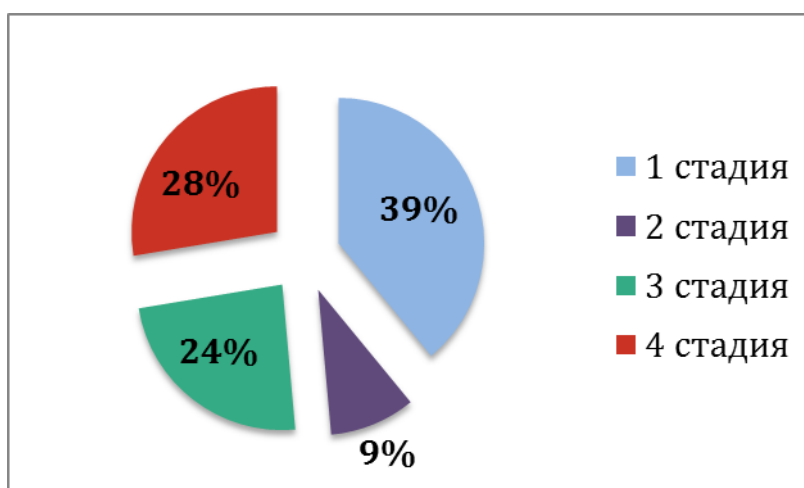
женщина (72%). В группе генетически-детерминированного МРЦЖ (n=54): 19 мужчин (35%) и 35 женщин (65%). В группе спорадического МРЦЖ (n=83): 19 мужчин (23%) и 64 женщины (77%).

Средний возраст диагностики МРЦЖ в группе спорадического МРЦЖ составил  $49,1 \pm 12,7$  лет [Me 50], (n=75); в группе генетически-детерминированного МРЦЖ –  $30,3 \pm 13,6$  лет [Me 27,5], (n=48). Определены статистически достоверные различия по возрасту между группами ( $p < 0,001$ ) (рис.1). Выявленные различия по возрасту между группами подтверждают более раннюю манифестацию генетически-детерминированных форм МРЦЖ.

**Рисунок 1.** Медиана возраста диагностики в группе генетически-детерминированного и спорадического МРЦЖ



**Рисунок 2.** Распределение пациентов по стадиям заболевания на момент диагностики МРЦЖ



Согласно классификации UICC в 7ой редакции, МРЦЖ был диагностирован у 41/105 (39%) на 1 стадии, у 10/105 (9%) на 2 стадии, у 25/105 (24%) и 29/105 (28%) на 3 и 4 стадиях, соответственно (рис.2). Таким образом, в 52%-случаев, МРЦЖ был

диагностирован при наличии регионарных или отдаленных метастазов, что практически исключает возможность достижения полной ремиссии заболевания.

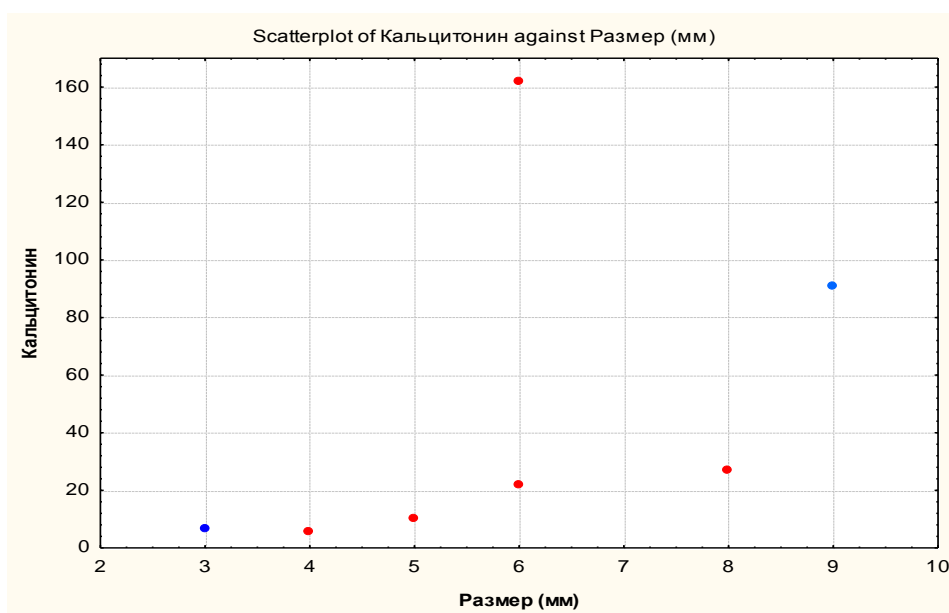
**Роль онкомаркеров в диагностике МРЩЖ.** Из 137 пациентов исследование уровня кальцитонина до проведения оперативного лечения проведено в 44%-случаев (n=60), РЭА – в 18% (n=24). Уровень кальцитонина превышал нормативные значения с учетом пола у 58/60-пациентов, за исключением двух пациентов с микрокарциномой МРЩЖ размером менее 5 мм. РЭА был повышен только у 15/24(63%)-пациентов на момент диагностики МРЩЖ.

Проведен анализ уровня онкомаркеров в зависимости от стадии заболевания по классификации TNM. Выявлены четкие тенденции зависимости уровня кальцитонина и РЭА от стадии опухоли. За период с августа 2010 по октябрь 2013 года проведено исследование базального кальцитонина 372-пациентам, поступившим с целью проведения оперативного лечения. В эту группу вошли пациенты со следующими предварительными диагнозами по результатам цитологического исследования: фолликулярная опухоль (n=191), папиллярный рак (n=139), узловой коллоидный зоб с компрессионным синдромом (n=42). Повышенный уровень базального кальцитонина был выявлен у 3/372 пациентов. Повышение кальцитонина более 100 нг/л в ходе пробы с глюконатом кальция было выявлено у двоих из них, при этом оба пациента имели цитологическое заключение фолликулярная аденома. Всем троим пациентам была выполнена ТЭ, МРЩЖ по результатам гистологического исследования подтвержден у 2/3 пациентов, оба из которых имели положительный стимуляционный тест. Специфичность исследования уровня базального кальцитонина в данной выборке составила 99,7%.

Таким образом, кальцитонин является наиболее чувствительным и специфичным маркером МРЩЖ. Уровень онкомаркеров в большинстве случаев отражает распространенность опухолевого процесса и может быть использован для определения объема визуализирующих методов обследования.

**МРЩЖ менее 1 см.** Проведен анализ данных группы пациентов с размером МРЩЖ менее 1 см по результатам гистологического исследования (n=16). Молекулярно-генетическое обследование проведено всем пациентам, синдром МЭН 2А типа диагностирован в 5-случаях. Повышение кальцитонина выше нормативных значений было выявлено у 14/16-пациентов, за исключением двух случаев - пациентки со спорадическим МРЩЖ размером 4 мм, уровень кальцитонина у которой составил 5,4 нг/л, и пациента с синдромом МЭН 2А, у которого уровень кальцитонина до операции составил 6 нг/л, а при гистологическом исследовании помимо СКГ, был выявлен очаг МРЩЖ размером 3 мм (рис. 3).

**Рисунок 3.** Распределение уровня кальцитонина при МРЦЖ менее 1 см



Регионарные метастазы в лимфоузлы VI уровня были выявлены у двоих пациентов с генетически детерминированным МРЦЖ при наличии СКГ и двух очагов размером 5 мм в первом случае, и множественных очагов размером 2-3 мм во втором. Регионарные метастазы в лимфоузлы II-V уровней были выявлены в одном случае спорадического МРЦЖ размером 6 мм. У двоих из трех пациентов с регионарными метастазами не удалось добиться ремиссии заболевания. (табл.1)

**Таблица 1.** Данные по пациентам с первичным очагом МРЦЖ менее 1 см

П о л	Вариант заболевания	Размер МРЦЖ (мм), С-клеточная гиперплазия (+/-)	Наличие регионарных мтс в центральной зоне (+/-)	Кальцитонин базальный – мах (нг/л)*	Достижение ремиссии
1, м	МЭН 2А	3+СКГ	-	6,5-274	да
2, м	МЭН 2А	2+СКГ	-	-	да
3, ж	МЭН 2А	5+5+СКГ	+	22,7	да
4, ж	МЭН 2А	5	-	162	да**
5, м	МЭН 2А	9+СКГ	-	91,2-3920	да
6, ж	МЭН 2А	м2-3+СКГ	+	143	нет
7, ж	Спорадический	6	-	-	да
8, ж	Спорадический	6	-	22	да
9, ж	Спорадический	7	-	-	да*
10, ж	Спорадический	6	-	-	да
11, ж	Спорадический	6	в боковой зоне	-	нет
12, ж	Спорадический	5	-	-	да
13, ж	Спорадический	5	-	10-148	да
14, ж	Спорадический	8	-	27,2	да
15, ж	Спорадический	4	-	5,4	да
16, ж	Спорадический	9	-	-	да

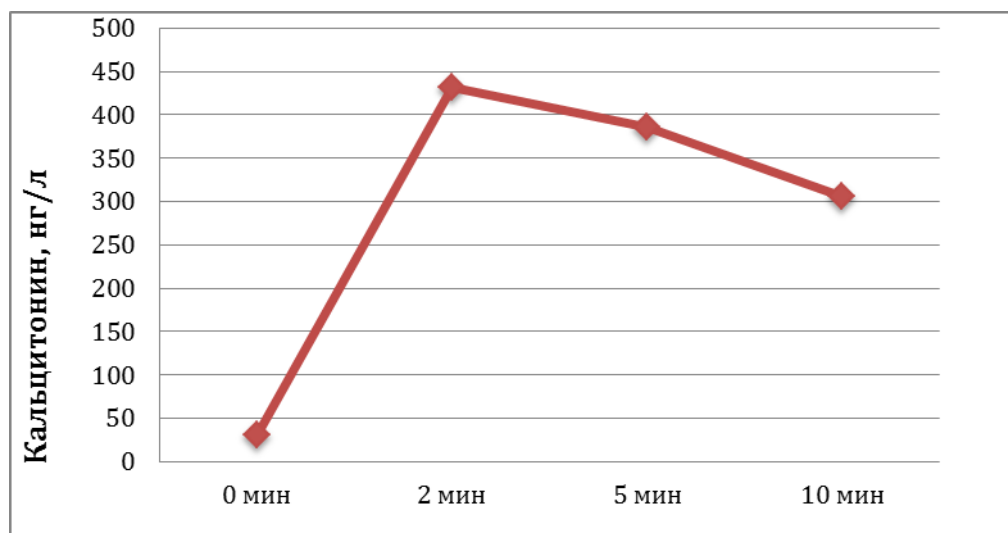
Примечания: \* - кальцитонин мах – пиковый уровень кальцитонина в ходе стимуляционной пробы с глюконатом кальция

\*\* - рост кальцитонина в ходе стимуляционного теста

Таким образом, микрокарциномы МРЦЖ характеризуются высоким уровнем регионарного метастазирования (19%). Проведение ЦЛАЭ показано всем пациентам с МРЦЖ, вне зависимости от размеров первичной опухоли.

**Стимуляционный тест с глюконатом кальция.** Проведен анализ результатов стимуляционного теста с глюконатом кальция у 37-пациентов с первично выявленным либо рецидивом МРЦЖ и у 2-пациентов с нейроэндокринными опухолями другой локализации, секретирующими кальцитонин. У пациентов с МРЦЖ в ходе пробы наблюдался рост кальцитонина в 2,7-33 раза по сравнению с базальным. Пик кальцитонина в 76%-случаев (n=28) приходился на 2-минуту теста, в 24% (n=9) – на 5-минуту (рис.4).

**Рисунок 4.** Динамика уровня кальцитонина в ходе стимуляционного теста у пациента с рецидивом МРЦЖ

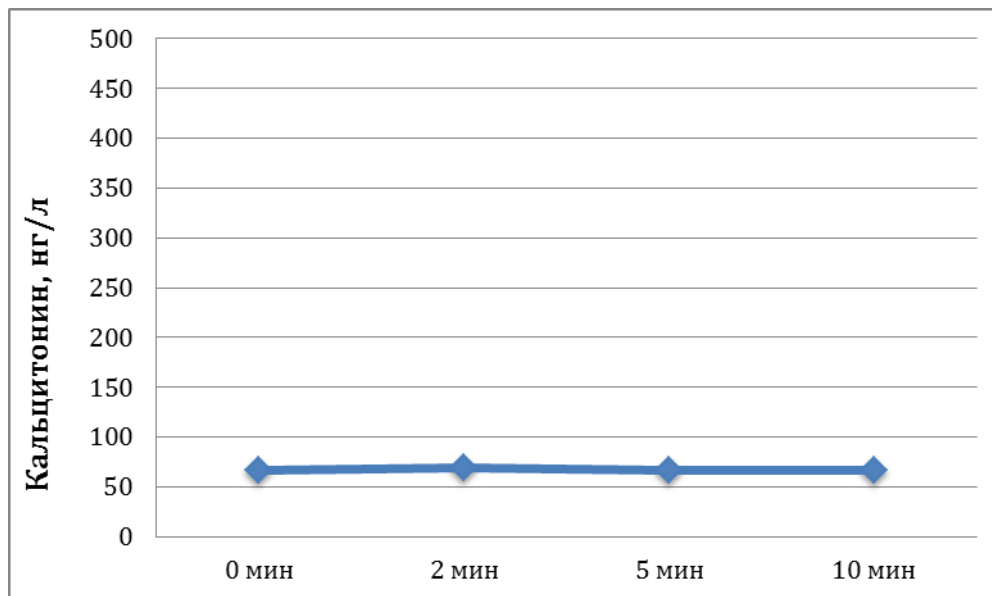


У пациентов с НЭО вне щитовидной железы при введении глюконата кальция не наблюдалось значимого роста кальцитонина. Так, у пациентки с инсулиномой динамика уровня кальцитонина в ходе пробы выглядела следующим образом: 0 мин - 65,6 нг/л, 2 мин - 68,6 нг/л, 5 мин – 66 нг/л, 10 мин - 67,1 нг/л, при уровне РЭА 0,8 нг/мл (рис.5). После оперативного лечения в объеме энуклеации опухоли уровень кальцитонина нормализовался: 0 мин - 3,1 нг/л, 2 мин - 3,9 нг/л, 5 мин - 3,5 нг/л, 10 мин - 3,5 нг/л. У пациента с НЭО неясной локализации были получены следующие результаты пробы: 0 мин – 7870 нг/л, 2 мин - 8620 нг/л, 5 мин - 8164 нг/л, 10 мин – 7900 нг/л. Пациент признан инкурабельным, поэтому оценить результаты теста после лечения не представляется возможным.

Учитывая то, что у 100%-пациентов с МРЦЖ пик кальцитонина в ходе стимуляционной пробы пришелся на 2- и 5-ю минуты теста, исследование уровня кальцитонина на 10-ой минуте проводить нецелесообразно. Модификация пробы позволит снизить как временные, так и экономические затраты. Наличие  $\geq 3$ -кратного повы-

шения кальцитонина в ходе стимуляционного теста позволяет провести дифференциальную диагностику МРЦЖ и других НЭО, сопровождающихся секрецией кальцитонина.

**Рисунок 5.** Динамика уровня кальцитонина в ходе стимуляционного теста у пациентки с инсулиномой



**Информативность ТАБ в диагностике МРЦЖ.** С целью установления чувствительности ТАБ в диагностике МРЦЖ проанализированы результаты цитологических заключений ТАБ (n=141), выполненных 107 пациентам в различных лечебных учреждениях РФ с 1983 по 2013 гг. Всем исследуемым пациентам диагноз МРЦЖ был в дальнейшем подтвержден либо установлен по результатам гистологического исследования. Полученные результаты были адаптированы в соответствии с цитологической классификацией Бетесда от 2009 г. Диагноз МРЦЖ на основании цитологического исследования был заподозрен/установлен у 35% пациентов (n=49). В остальных случаях результаты ТАБ распределились следующим образом:

- злокачественный, либо подозрительный в отношении других видов рака материал - 15% (n=21)
- фолликулярная опухоль - 15% (n=21)
- неинформативный материал - 8% (n=12)
- доброкачественный материал - 27% (n=38).

При цитологическом заключении «злокачественный либо подозрительный в отношении других видов рака материал» (n=21) пациентам в большинстве случаев был проведен адекватный объем оперативного лечения. Следует отметить, что в эту группу вошли 3 случая с первичным диагнозом «папиллярный рак», что противоречит мнению о том, что исключение МРЦЖ целесообразно только при результатах,

свидетельствующих о наличии фолликулярной опухоли. В одном из этих случаев гистологически подтверждена редко встречающаяся папиллярная форма МРЦЖ.

При предварительном диагнозе «фолликулярная опухоль» более чем в половине случаев был выполнен неадекватный объем оперативного вмешательства.

Наиболее всегостораживают результаты ТАБ, свидетельствующие о доброкачественном процессе, полученные в 25% случаев (n=37 «коллоидный зоб», n=1 «ХАИТ»). В нашей выборке это привело к несвоевременному оперативному лечению у 12 пациентов, что значительно ухудшило их прогноз (табл.2).

**Таблица 2.** Результаты цитологического исследования и объем операции

Цитологическое заключение	Число пациентов n,%	Неадекватный объем оперативного лечения (число пациентов - вид оперативного лечения)
МРЦЖ	49(35)	11 – ТЭ
Злокачественный либо подозрительный на наличие других видов рака материал	21(15)	4 – ТЭ
Фолликулярная опухоль	21(15)	5 – ГТЭ 6 – резекция ЩЖ 3 – ТЭ
Доброкачественный материал	38(27)	3 - ГТЭ 4 - резекция ЩЖ 4 - ТЭ
Неинформативный материал	12(8)	2 – резекция ЩЖ 3 – ТЭ

С целью установления специфичности ТАБ в диагностике МРЦЖ, были проанализированы результаты цитологических исследований 530-пациентов, обратившихся в ФГБУ ЭНЦ с января по декабрь 2012 года с предварительным диагнозом узловой нетоксической зоб. Заключение МРЦЖ либо подозрение на С-клеточную опухоль было высказано у 17/530 (3,2%)-пациентов. С целью подтверждения диагноза до оперативного лечения в этой группе всем пациентам было проведено исследование базального и стимулированного кальцитонина. Уровень кальцитонина превышающий нормативные значения и положительный стимуляционный тест были выявлены у 14/17-пациентов. У всех пациентов с уровнем кальцитонина превышающим нормативные значения (n=14) по результатам гистологического исследования был подтвержден МРЦЖ. В остальных случаях (n=3) диагностировано наличие фолликулярной аденомы. Таким образом специфичность ТАБ в диагностике МРЦЖ составила 99,4%.

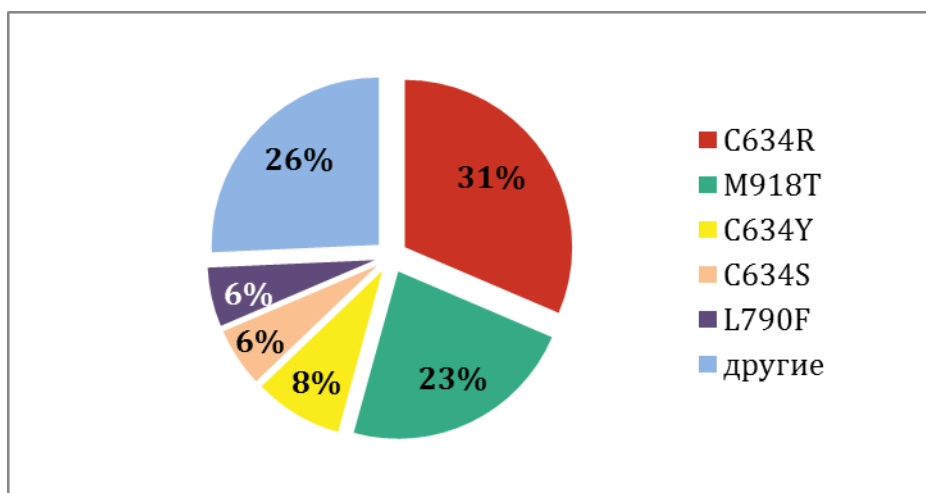
Выявленная крайне низкая чувствительность ТАБ, безусловно, является основной причиной несвоевременной диагностики МРЦЖ. Низкая чувствительность

метода может быть связана с отсутствием внедрения иммуноцитохимического исследования на кальцитонин, ошибками в диагностике нетипичных форм МРЦЖ и сложностью выбора узлов для ТАБ при многоузловом зобе.

**МРЦЖ в рамках синдромов МЭН 2 типа.** Генетический анализ гена *RET* был проведен 102 из 137-пациентов с МРЦЖ. Синдром МЭН 2 типа был выявлен на основании генетического исследования у 48 пациентов, у 6 диагноз установлен на основании клинической картины. Таким образом, наследственный вариант МРЦЖ был выявлен в 39% случаев (n=54).

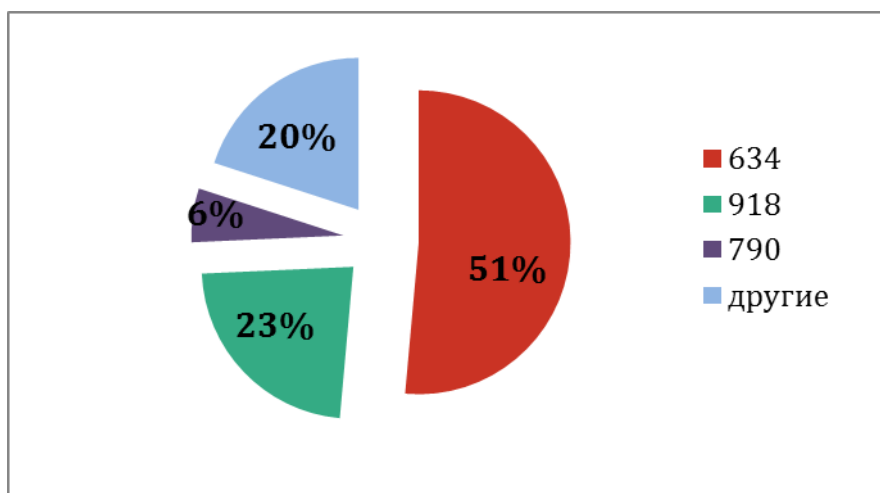
Анализ частоты тех или иных мутаций был проведен по количеству семей с одноименной мутацией. Всего в исследование вошли 35 семей, при этом было выявлено 14 видов различных мутаций. Наиболее частой мутацией в исследуемой популяции являлась замена С634R (11/35, 31%), второй по частоте встречаемости – М918Т (8/35, 23%) (рис.6).

**Рисунок 6.** Распределение выявленных мутаций при синдромах МЭН 2 типа



При этом наиболее часто мутации были обнаружены в 634 кодоне 11 экзона гена *RET* (18/35) (рис.7).

**Рисунок 7.** Распределение мутаций по кодонам при МЭН 2 типа



Выявленные мутации были разделены по агрессивности согласно классификации Американской тиреоидологической ассоциации на четыре группы (A-D). В ходе исследования впервые в мире были диагностированы: одна не классифицированная по агрессивности мутация K603Q и три ранее неописанные - Y826S, del632-636 ins6, Y791F+I852M. Данные мутации были отнесены в ту или иную группу на основании анализа кодируемого данной мутацией домена молекулы *RET* белка и агрессивности МРЦЖ у носителей, Y826S - в группу агрессивности "А", K603Q - в группу "В", del632-636 ins6 и Y791F+I852M – в группу "С".

Мутации по группам распределились следующим образом (от наименее к наиболее агрессивным):

- группа низкой агрессивности «А» (5/35, 14%): E768D, L790F, Y791F, Y826S
- группа умеренной агрессивности «В» (4/35, 11%): K603Q, C609F, C611W, C620R
- группа высокой агрессивности «С» (18/35, 52%): C634R, C634W, C634Y, C634S, del632-636 ins6
- группа мутаций крайне высокой агрессивности «D» (8/35, 23%): M918T

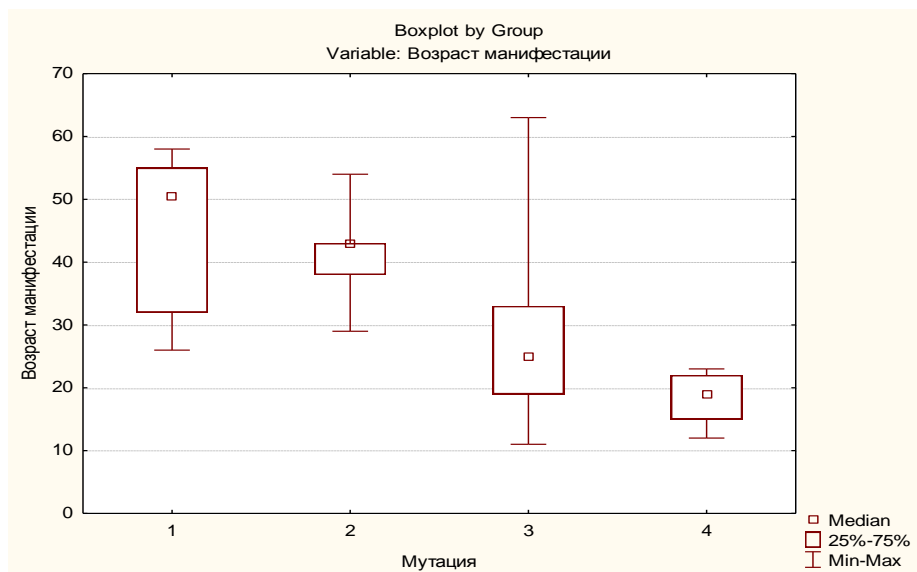
Согласно существующей классификации, в исследуемой выборке 23% пациентов (n=8) имели МРЦЖ в рамках синдрома МЭН 2В (группа мутаций с крайне высокой агрессивностью), 77% (n=27) - в рамках синдрома МЭН 2А (группы мутаций от низкой агрессивности до высокой). Выделить группу с семейным МРЦЖ оказалось невозможно по причине недостаточного количества наблюдений в рамках одной семьи.

Средний возраст манифестации МРЦЖ в группе пациентов с наименьшей агрессивностью мутаций составил  $45 \pm 13,1$  лет (n=6), умеренной агрессивностью -  $41 \pm 9,1$  лет (n=5), высокой агрессивностью –  $25 \pm 11,2$  лет (n=25), с крайне агрессивными мутациями -  $18 \pm 4,1$  лет (n=7). При анализе по Краскел-Уоллису существенные различия по возрасту доказаны между группами "А" и "С" ( $p=0,049$ ), "А" и "D" ( $p=0,002$ ), "В" и "D" ( $p=0,007$ ) (**рис.8**).

Проведен анализ стадии заболевания в зависимости от вида мутации. В группе агрессивности мутаций типа «А» 67% пациентов имели 1 стадию МРЦЖ на момент диагностики, 33% - 3-стадию. В группе агрессивности мутаций типа «В» 25% пациентов имели 2-стадию МРЦЖ на момент диагностики, 75% - 3-стадию. В группе «С» - 27% пациентов имели 1 стадию МРЦЖ, 6% - 2-стадию, 40% - 3-стадию, 27% - 4-стадию. В группе «D» - 17% пациентов имели 1 стадию МРЦЖ, 50% - 3-стадию, 33% - 4-стадию заболевания (**табл.3**). Все пациенты с временем удвоения онкомаркеров менее 6 месяцев (n=4) имели мутации высокой и крайне высокой агрессивности.



**Рисунок 8.** Медианы возраста диагностики МРЦЖ в зависимости от агрессивности мутации



**Таблица 3.** Распространенность МРЦЖ в зависимости от агрессивности мутации

Вид мутации	Стадия 1	Стадия 2	Стадия 3	Стадия 4
низкая агрессивность	67%	0%	33%	0%
умеренная агрессивность	25%	0%	75%	0%
высокая агрессивность	27%	6%	40%	27%
крайне высокая агрессивность	17%	0%	50%	33%

Выявленная частота генетически-детерминированной формы МРЦЖ превышает общепринятые значения 20-25% [Pelizzo M.R. et al., 2007]. Выявленные различия, наиболее вероятно, обусловлены тем, что часть пациентов с генетически-детерминированным МРЦЖ первоначально были направлены в ЭНЦ по поводу феохромоцитомы.

Полученные данные спектра герминальных мутаций на российской популяции совпадают с результатами общеевропейского исследования EUROMEN. Наиболее частой мутацией в итальянской популяции по результатам работы Romei и соавторов является замена V804M.

Доказана ассоциация агрессивности мутации и возраста диагностики МРЦЖ. Продемонстрирована зависимость распространенности заболевания от статуса мутации, что подтверждает актуальность существующей классификации агрессивности мутаций.

**Спорадический МРЦЖ.** Диагноз спорадического МРЦЖ был установлен в 61%-случаев (n=83). Молекулярно-генетическое обследование с целью исключения герминальных мутаций было проведено у 67%-пациентов данной группы (n=56), остальным диагноз установлен клинически (пациенты прооперированные в ЭНЦ до 2000г).

Исследование соматических мутаций генов *RET*, *H*-, *N*-, *K-RAS* после исключения наследуемой формы МРЦЖ было проведено 35-пациентам. Мутации гена *RET* выявлены у 46%(n=16)-пациентов, из них в 75%-случаев (n=12) обнаружена миссенс-мутация M918T, в остальных случаях изменения локализовались в 634 (n=3) и 620 (n=1) кодонах. Мутации генов *H*-, *N*-, *K-RAS* выявлены в 9%-случаев (n=3), а именно в гене *K-RAS* - G12R, в гене *H-RAS* – Q61R, Q61K (табл.4).

**Таблица 4.** Выявленные соматические мутации генов *RET*, *H*-, *N*-, *K-RAS*

Мутации гена <i>RET</i>	
локализация мутации	частота выявления (n/%)
918	12/75%
634	2/20%
620	1/5%
Мутации генов <i>H</i> -, <i>N</i> -, <i>K-RAS</i>	
<i>K-RAS</i> (G12R)	9%
<i>H-RAS</i> (Q62R, Q61K)	

В зависимости от наличия и вида соматической мутации, пациенты (n=35) были разделены на 4 группы:

- 1-группа: пациенты с соматической мутацией M918T (12/35, 34%)
- 2-группа: пациенты с другими соматическими мутациями гена *RET* (4/35, 11%)
- 3-группа: пациенты с соматическими мутациями гена *RAS* (3/35, 9%)
- 4-группа: пациенты с отсутствием соматических мутаций (ни *RET*, ни *RAS*) (16/35, 46%)

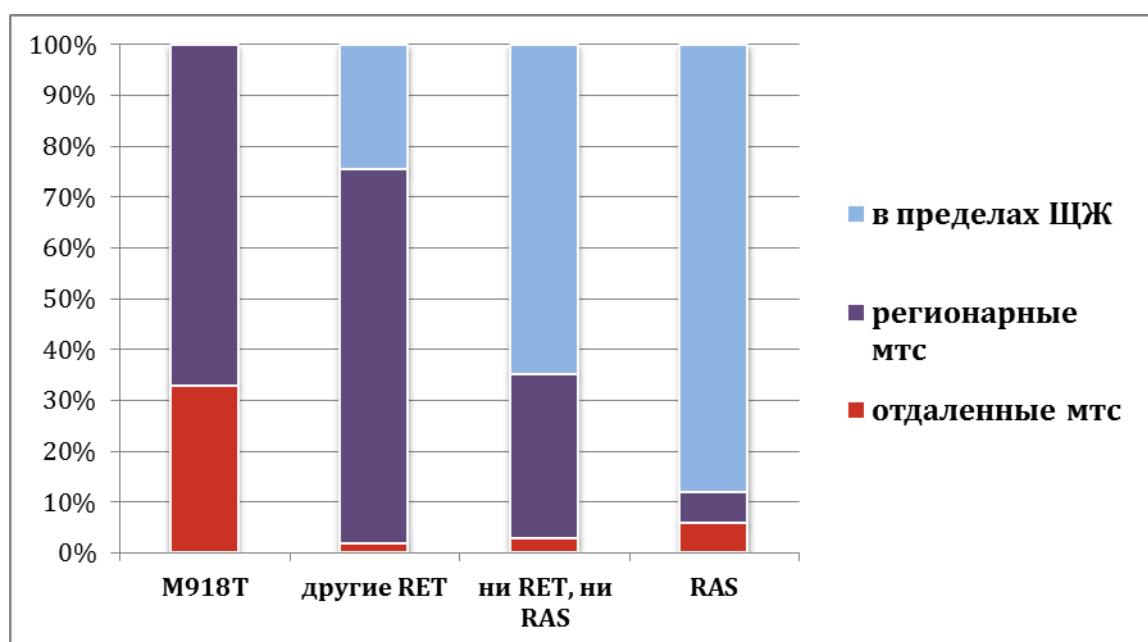
Проведен анализ зависимости наличия тех или иных соматических мутаций и распространенности опухоли. Последняя оценивалась в зависимости от наличия регионарных и отдаленных метастазов. В группе 1 у 67%-пациентов (n=8) на момент первичной диагностики имелись регионарные метастазы, у 33% (n=4) – отдаленные. Из пациентов 2-группы (n=4), у одного пациента МРЦЖ был в пределах ЩЖ, у троих по результатам гистологического исследования доказано наличие метастазов в регионарные лимфоузлы. В 3-группе (n=3) у двоих пациентов МРЦЖ не выходил за пределы щитовидной железы. Из пациентов 4-группы у 88% (n=14) заболевание ог-

раничивалось щитовидной железой, и по одному пациенту имело регионарные и отдаленные метастазы. Из пациентов 1-группы ремиссия заболевания была достигнута у 8%, из 2-группы у 50%, и в 67% и 75%-случаев у пациентов 3 и 4-групп, соответственно (табл.5, рис.9).

**Таблица 5.** Распространенность МРЦЖ и частота достижения ремиссии в зависимости от наличия и вида соматических мутаций

Вид мутации	Ограничено ЩЖ %	Регионарные мтс %	Отдаленные мтс %	Достижение ремиссии n/%
группа «M918T» (n=12)	0	67	33	1/8
группа «другие RET» (n=4)	25	75	0	2/50
группа «ни RET, ни RAS» (n=3)	67	33	0	2/67
группа «RAS» (n=16)	88	6	6	12/75

**Рисунок 9.** Распространенность МРЦЖ в зависимости от агрессивности мутации

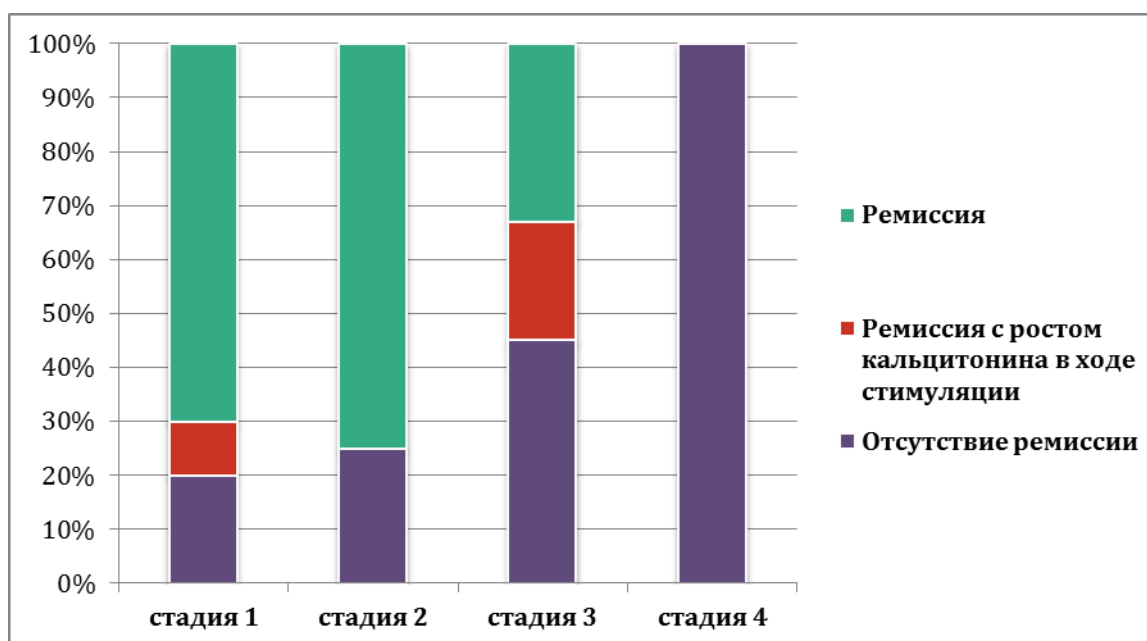


**Результаты хирургического лечения.** Для проведения оценки результатов хирургического лечения были доступны данные 111-пациентов. Ремиссия заболевания в результате оперативного вмешательства была достигнута в 46%-случаев (n=51). Хирургическое вмешательство при 1-стадии МРЦЖ привело к достижению биохимической ремиссии у 14(70%)-пациентов, в 2(10%)-случаях к нормализации

уровня базального кальцитонина с ростом в ходе стимуляционного теста, и у 4/20% наблюдалась персистенция заболевания. При 2-стадии ремиссия не была достигнута только в одном случае – 25% (n=1). При 3-стадии в 22%-случаев (n=2) уровень базального кальцитонина нормализовался, однако повышался в ходе стимуляции кальцием, полная ремиссия достигнута только у 33%-пациентов (n=3) и в 44%-случаев (n=4) ремиссии достичь не удалось. Ни у одного пациента с 4-стадией МРЦЖ не была достигнута биохимическая ремиссия (рис.10).

Полученные результаты подчеркивают необходимость оптимизации диагностики МРЦЖ, так как именно распространенность заболевания определяет вероятность достижения ремиссии.

**Рисунок 10.** Частота достижения ремиссии в зависимости от стадии заболевания на момент оперативного лечения

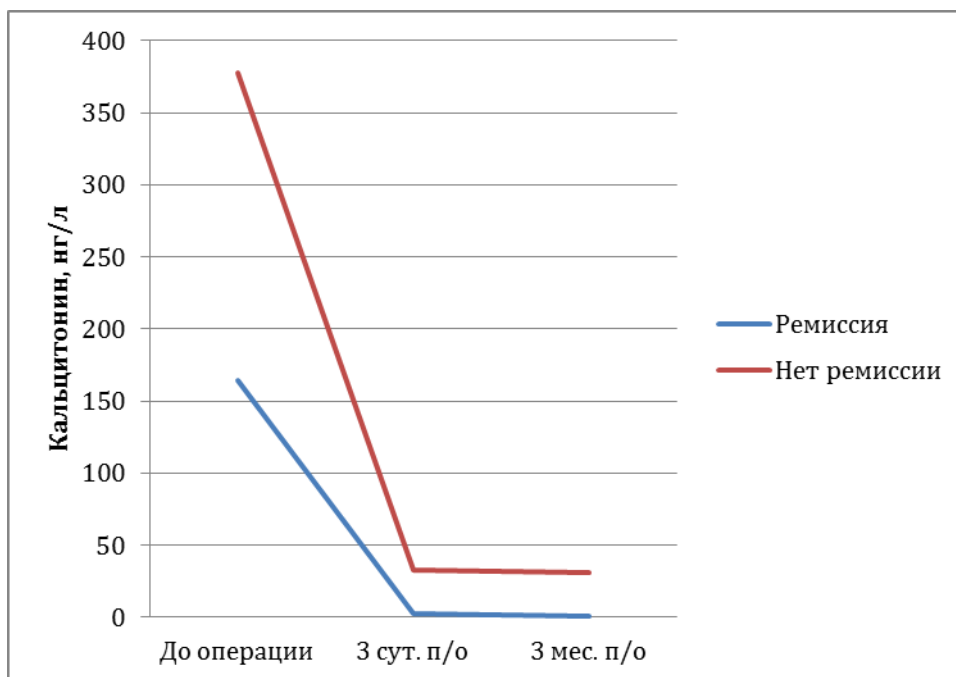


При наличии метастазов в VI-ом клетчаточном пространстве шеи достичь ремиссии заболевания удалось в 37%-случаев, при метастазах в боковую зону шеи – ни у одного пациента. Также ни одно повторное оперативное вмешательство в области регионарных зон лимфооттока не позволило достичь ремиссии заболевания.

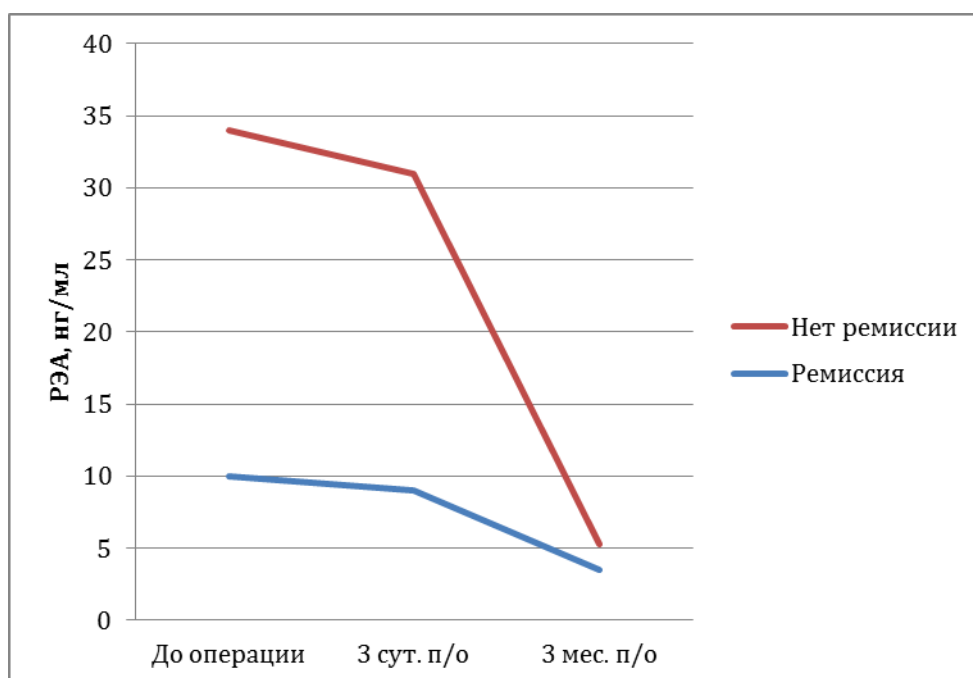
**Информативность оценки уровня онкомаркеров через 72 часа после оперативного лечения.** С целью изучения информативности исследования уровня онкомаркеров в первые дни после оперативного лечения, было проведено изучение динамики уровня кальцитонина и РЭА на 3-сутки и через 3 месяца после оперативного лечения у 22-пациентов. В зависимости от достижения ремиссии заболевания пациенты были разделены на 2 группы. В группе пациентов, у которых в дальнейшем была подтверждена ремиссия заболевания, снижение кальцитонина до норма-

тивных значений наблюдалось уже через 72 часа после оперативного лечения (рис.11). В группе без достижения ремиссии уровень кальцитонина оставался выше нормативных значений. Значимого снижения РЭА на 3-сутки не наблюдалось ни в одной из групп (рис.12). При помощи точного критерия Фишера подтверждена ассоциация нормализации уровня кальцитонина на 3-сутки после оперативного лечения и достижения ремиссии МРЩЖ ( $p < 0,001$ ).

**Рисунок 11.** Сравнительная динамика уровня кальцитонина до операции, через 72 часа и 3 месяца после оперативного лечения в группах с/без достижения ремиссии



**Рисунок 12.** Сравнительная динамика уровня РЭА до операции, через 72 часа и 3 месяца после оперативного лечения в группах с/без достижения ремиссии



На практике нередко возникают ситуации, требующие оценки адекватности выбранного объема и эффективности хирургического вмешательства в ранние сроки после операции. Таким образом, нормализация уровня кальцитонина на 3-сутки может быть использована в качестве прогностического критерия достижения ремиссии МРЦЖ.

**Роль СА19-9 в оценке агрессивности МРЦЖ.** Исследование онкомаркера Са19-9 было проведено у 25-пациентов с первично выявленным МРЦЖ, либо при персистенции/рецидиве заболевания. В том числе в эту группу вошли 7 пациентов с агрессивным течением МРЦЖ (время удвоения кальцитонина <6 месяцев и/или наличие отдаленных метастазов). Превышение референсного диапазона Са19-9 выявлено в одном случае.

Таким образом, при дискордантных данных о распространенности МРЦЖ, уровне кальцитонина и РЭА, для оценки динамики опухолевого роста возможно использование онкомаркера Са19-9.

## ВЫВОДЫ

1. Диагностическая ценность онкомаркеров МРЦЖ:
  - а) кальцитонин является наиболее чувствительным маркером МРЦЖ. При размерах образования более 5 мм его чувствительность составила 100%, в то время как повышение РЭА отмечено только в 67%-случаев МРЦЖ
  - б) пик секреции кальцитонина в ходе стимуляционного теста с глюконатом кальция на 2 и 5-минуты пробы у 100% пациентов
  - в) прогностическая ценность исследований базального кальцитонина на 3-сутки и через 3 месяца после оперативного лечения не отличаются
  - д) у части пациентов с высокой агрессивностью МРЦЖ и парадоксально невысоким уровнем кальцитонина отмечаются высококонормальные и высокие значения Са 19-9, при низкой агрессивности МРЦЖ экспрессии Са19-9 клетками опухоли не выявлено.
2. Чувствительность ТАБ в отношении злокачественности процесса составила 65%, в отношении МРЦЖ – 35%. Специфичность ТАБ в отношении МРЦЖ составила 99,7%.
3. По результатам молекулярно-генетического исследования можно заключить:
  - а) агрессивные варианты герминальных мутаций (M918E, мутации 634 кодона гена *RET*) проявляются ранней манифестацией МРЦЖ, большей распростра-

ненностью на момент диагностики и коротким временем удвоения уровня онкомаркеров

b) частота выявления соматических мутаций гена *RET* составила 46%, из них в 75%-случаев выявлена миссенс-мутация M918T. Мутации *RAS*-гена при спорадическом МРЦЖ выявлены в 8,6%-случаев

с) при наличии соматической мутации гена *RET* M918T чаще наблюдаются регионарные и отдаленные метастазы, короткое время удвоения уровня онкомаркеров. Наименьшая распространенность процесса наблюдается при мутациях гена *RAS*, и в группе больных без выявленных мутаций

4. Анализ результатов хирургического лечения показал:

a) при МРЦЖ размером менее 1 см регионарные метастазы выявляются с частотой 19%

b) при распространенных формах МРЦЖ 3-стадии частота достижения ремиссии составляет 30%. При 4 стадии – биохимическая ремиссия не достигнута ни у одного пациента.

#### **ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ**

1. Исследование уровня базального кальцитонина показано всем пациентам с узловым зобом, вне зависимости от результатов ТАБ
2. При проведении стимуляционной пробы с глюконатом кальция исследование уровня кальцитонина целесообразно ограничить 0, 2 и 5-ой минутами
3. При дискордантности уровня кальцитонина и результатов цитологического исследования показано проведение стимулирующей пробы с глюконатом кальция
4. Уровень кальцитонина на 3-сутки после оперативного лечения может быть рекомендован в качестве прогностического критерия достижения ремиссии
5. Время удвоения кальцитонина и РЭА должно учитываться при определении периодичности проведения визуализирующих методов обследования
6. При несоответствии распространенности заболевания и амплитуды повышения кальцитонина целесообразно исследование уровня Ca19-9
7. Исследование соматических мутации показано всем пациентам со спорадической формой МРЦЖ
8. Вне зависимости от размеров первичного очага, всем пациентам с МРЦЖ показано проведение тиреоидэктомии с удалением клетчатки VI зоны, с обязательной предоперационной оценкой распространенности процесса в II-V клетчаточных пространствах шеи

#### СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Диагностика медуллярного рака щитовидной железы и тактика ведения пациентов при отсутствии биохимической ремиссии. Обзоры // «Проблемы эндокринологии», 2011. -№6.-С.45-51 /соавт. Бельцевич Д.Г., Тюльпаков А.Н., Симакина О.В., Солдатова Т.В.;
2. Факторы клинического прогноза медуллярного рака щитовидной железы. Лекция // «Опухоли головы и шеи», 2011. -№4.-С.48-54 /соавт. Румянцев П.О., Ильин А.А., Румянцева У.В.;
3. Диагностика медуллярного рака щитовидной железы. Обзоры // “Врач”, 2013. - №11.-С.8-9 /соавт. Бельцевич Д.Г.;
4. Современный взгляд на проблему диагностики и лечения медуллярного рака щитовидной железы. Обзоры // «Эндокринная хирургия», 2013. - № 3.-С.4-21 /соавт. Бельцевич Д.Г.;
5. Схема предоперационной подготовки больных феохромоцитомой. «Проблемы эндокринологии» 2013, №3, стр. 3-7 /соавт. Бельцевич Д.Г, Лысенко М.А, Кузнецов Н.С, Кац Л.Е., Ванушко В.Э., Солдатова Т.В, Юкина М.Ю., Мельниченко Г.А.;
6. Влияние характера герминальной мутации на агрессивность течения медуллярного рака щитовидной железы. // Доклад. Научно-образовательная конференция Европейской Ассоциации Тиреоидологов “Рак щитовидной железы. Современный взгляд на проблему”. Москва, 16-17 мая, 2013;
7. «Heterogeneity of medullary thyroid cancer aggressiveness among family members with the same RET gene mutation»// Gazizova D., Beltceovich D., Tiulpakov A., Kuznetsov N., Soldatova T., Vladimirova V., Remizov O.// The Endocrine Society's 95th Annual Meeting & Expo, - 2013 – S 221.

#### СПИСОК ПРИНЯТЫХ СОКРАЩЕНИЙ

UICC	Международное объединение против рака
Ca 19-9	Углеводный антиген 19-9
H	Критерий Крускала-Уоллиса
U	Критерий Манна-Уитни
ГТЭ	Гемитиреоидэктомия
ИФА	Иммуноферментный анализ
ЛАЭ	Лимфаденэктомия
МРЩЖ	Медуллярный рак щитовидной железы
НЭО	Нейроэндокринная опухоль
ПНИР	Поисковая научно-исследовательская работа
РЭА	Раково-эмбриональный антиген
Синдром МЭН	Синдром множественных эндокринных неоплазий
СКГ	С-клеточная гиперплазия
ТАБ	Тонкоигольная аспирационная биопсия
ТЭ	Тиреоидэктомия
ФЦП	Федеральная целевая программа
ХАИТ	Хронический аутоиммунный тиреоидит
ЦЛАЭ	Центральная лимфаденэктомия
ЩЖ	Щитовидная железа
ЭДТА	Этилендиаминтетрауксусная кислота