

**МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
УКРАЇНСЬКИЙ НАУКОВО-ПРАКТИЧНИЙ ЦЕНТР ЕНДОКРИННОЇ
ХІРУРГІЇ, ТРАНСПЛАНТАЦІЇ ЕНДОКРИННИХ ОРГАНІВ І ТКАНИН**

На правах рукопису

Хоперія Вікторія Геннадіївна

УДК: 616.441-006-07

ЧИННИКИ ПРОГНОЗУ ПУХЛИН ЩИТОПОДІБНОЇ ЗАЛОЗИ

14.01.14 – ендокринологія

Дисертація
на здобуття наукового ступеня
доктора медичних наук

Науковий консультант:
Ларін Олександр Сергійович
доктор медичних наук, професор,
Заслужений лікар України

Київ – 2012

ЗМІСТ

стор.

ВСТУП	6
РОЗДІЛ 1. ЕПІДЕМІОЛОГІЯ ТА ПАТОГЕНЕЗ ПУХЛИН ЩИТОПОДІБНОЇ ЗАЛОЗИ (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ)	24
1.1. Клініко-морфологічні особливості фолікулярних пухлин щитоподібної залози	24
1.2. Діагностика вузлів щитоподібної залози	25
1.3. Патогістологічні особливості пухлин щитоподібної залози фолікулярного походження	33
1.3.1. Фолікулярна аденома	33
1.3.2. Диференційований рак щитоподібної залози фолікулярного походження	34
1.4. Сучасні уявлення про канцерогенез пухлин щитоподібної залози	41
1.4.1. Структурна активація каскаду цАМФ як генетична основа розвитку гіперфункції щитоподібної залози	42
1.4.2. Активуючі мутації каскаду RAS-BRAF-MAPK у патогенезі папілярного раку щитоподібної залози	43
1.5. Генетичні основи патогенезу фолікулярних пухлин	46
1.5.1. Значення молекулярних змін для туморогенезу щитоподібної залози	47
1.5.2. Молекулярні механізми інвазії раку щитоподібної залози	48
1.5.3. Клінічні перспективи вивчення генетики пухлин щитоподібної залози	53
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ	55
2.1. Клінічна характеристика пацієнтів	55
2.2. Методи дослідження	61
РОЗДІЛ 3. КЛІНІКО-МОРФОЛОГІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ ПУХЛИН ЩИТОПОДІБНОЇ ЗАЛОЗИ ФОЛІКУЛЯРНОГО ПОХОДЖЕННЯ	69
3.1. Порівняльна характеристика фолікулярної аденоми та раку	

щитоподібної залози фолікулярного походження	69
3.2. Прогностичне значення гістологічних варіантів папілярного раку щитоподібної залози	74
3.3. Клініко-морфологічні особливості кістозно-дегенеруючого варіанту папілярного раку щитоподібної залози	79
3.4. Клініко-морфологічні особливості папілярної мікрокарциноми щитоподібної залози	84
3.5. Клініко-морфологічні особливості інвазії папілярного раку щитоподібної залози у прищитоподібну залозу	91
3.6. Особливості хірургічного втручання за інвазії папілярного раку щитоподібної залози у прищитоподібні залози	96
3.7. Аналіз частоти та структури метастазів за папілярного раку щитоподібної залози	101
3.8. Аналіз рецидивів за папілярного раку щитоподібної залози	106
Резюме до розділу 3	108
РОЗДІЛ 4. МАРКЕРИ ЗЛОЯКІСНОСТІ У ДІАГНОСТИЦІ ПУХЛИН ЩИТОПОДІБНОЇ ЗАЛОЗИ	112
4.1. Діагностична ефективність дослідження НВМЕ-1, ТПО та цитохімічне дослідження ДАП IV під час тонкоголкової аспіраційної пункційної біопсії вузлів щитоподібної залози	112
4.2. Кореляція цитологічних і гістологічних діагнозів у діагностиці вузлового зоба у дітей	117
4.3. Діагностична ефективність застосування імуноцитохімічного дослідження тиреоїдної пероксидази в аспіратах вузлів щитоподібної залози у дітей	126
4.4. Роль виявлення мутацій <i>BRAF</i> на аспіратах вузлів щитоподібної залози	134
Резюме до розділу 4	138
РОЗДІЛ 5. ОЦІНКА ВПЛИВУ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНИХ ЧИННИКІВ НА ПРОГНОЗ ПУХЛИН ЩИТОПОДІБНОЇ ЗАЛОЗИ	142

5.1. Значення активації протеїнкінази В у канцерогенезі пухлин щитоподібної залози	142
5.2. Роль транслокацій <i>RET/PTC</i> у пухлинах щитоподібної залози після аварії на ЧАЕС	148
5.3. Прогностичне значення виявлення мутацій <i>BRAF</i> за папілярного раку щитоподібної залози	153
Резюме до розділу 5	161
РОЗДІЛ 6. МОЛЕКУЛЯРНІ МЕХАНІЗМИ ІНВАЗІЇ ТА МЕТАСТАЗУВАННЯ РАКУ ЩИТОПОДІБНОЇ ЗАЛОЗИ	164
6.1. Роль епітеліально-мезенхімальної трансформації у процесі інвазії раку щитоподібної залози	164
6.2. Роль експресії Е-кадгерину у процесі інвазії папілярного раку щитоподібної залози	168
6.3. Вірус простого герпесу в доброякісних і злоякісних пухлинах щитоподібної залози	174
Резюме до розділу 6	183
РОЗДІЛ 7. АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ	186
ВИСНОВКИ	229
ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ	232
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	233

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

Akt – протеїнкаіаза В

АРЩЗ – анапластичний рак щитоподібної залози

БВЗ – багатовузловий зоб

ДАП IV – дипептидиламінопептидаза IV

ДРЩЗ – диференційований рак щитоподібної залози

ДТЗ – дифузний токсичний зоб

ЕМТ – епітеліально-мезенхімальна трансформація

МоАт47 – моноклональні антитіла 47 до тиреоїдної пероксидази

МРЩЗ – медулярний рак щитоподібної залози

НРЩЗ – низькодиференційований рак щитоподібної залози

ПМЩЗ – папілярна мікрокарцинома щитоподібної залози

ПРЩЗ – папілярний рак щитоподібної залози

ПКС – протеїнкаіаза С

РЩЗ – рак щитоподібної залози

ТАПБ – тонкоголкова аспіраційна пункційна біопсія

ТПО – тиреоїдна пероксидаза

ТТГ – тиреотропний гормон

УНПЦЕХТЕОТ – Український науково-практичний центр ендокринної хірургії, трансплантації ендокринних органів і тканин МОЗ України

УЗД – ультразвукове дослідження

ФА – фолікулярна аденома щитоподібної залози

ФВПРЩЗ – фолікулярний варіант папілярного раку щитоподібної залози

ФПНПМ – фолікулярна пухлина із невизначеним потенціалом малігнізації

ФРЩЗ – фолікулярний рак щитоподібної залози

ЩЗ – щитоподібна залоза

ВСТУП

Актуальність теми. Доброякісні вузлові утворення у структурі захворювань щитоподібної залози (ЩЗ), за даними різних авторів, складають 12-30 % [19]. За результатами гістологічного дослідження видаленої тканини ЩЗ у більшості пацієнтів виявляли мікро- та макрофолікулярний колоїдний зоб (70 %), у 14-25 % випадків – аденоми (на тлі колоїдного зоба вони траплялись у 24 % випадків), у 10,4 % – вузлової форми аутоімунного тиреоїдиту (АІТ) [48, 18]. Звертає на себе увагу висока частота карцином у структурі осередкових уражень ЩЗ, яка коливається від 2 % до 30 % (у середньому 5-7 %) [2]. Такий значний діапазон обумовлено різними чинниками: профілем лікувального закладу, рівнем кваліфікації хірургів, безпосередньо якістю морфологічних досліджень, рівнем діагностики та системи реєстрації [249]. Цікавим є факт, що приріст раку ЩЗ (РЩЗ) частіше спостерігається в країнах із розвинутою промисловістю: частота прихованого РЩЗ в Японії складає 28,4 %, у США щорічно реєструється 12 000 нових випадків, в Україні – близько 2 тисяч, а середньорічний темп приросту складає 5,6 % [13]. Вважають, що вказані відмінності у частоті прихованого раку обумовлено впливом екологічних чинників: іонізуючої радіації, мешканням на території, забрудненій радіонуклідами, та дефіцитом деяких елементів у довкіллі (йоду, міді, кобальту) [242].

До чинників ризику розвитку РЩЗ також відносять: вік до 25 і понад 55 років, чоловічу стать, наявність в анамнезі тиреоїдної патології у родині та хірургічного втручання на ЩЗ, шийну лімфаденопатію, дисгормональні захворювання, а також проведення променевої терапії на ділянку шиї та радіоізотопного дослідження ЩЗ із використанням І-131 [10]. Досить докладно описано спостереження, що простежують зв'язок РЩЗ зі статтю, віком хворих і його переважною локалізацією [27]. Виявлено, що у чоловіків, незважаючи на меншу частоту виявлення у них РЩЗ порівняно з жінками, його перебіг є агресивнішим, із більшою ймовірністю метастазування в лімфатичні вузли

(показник захворюваності на РЩЗ у жінок склав 2 на 1 тис. населення та 0,5 на 1 тис. серед чоловіків [272]. Одні автори вважають, що середній вік розвитку РЩЗ становить 43 роки (від 18 до 75 років) [167], інші зазначають, що високодиференційований рак, зокрема, папілярна мікрокарцинома, трапляється частіше у молодих [10]. За даними Захарової С.М. і співавт. [11], в осіб віком понад 60 років, надто у чоловіків, РЩЗ виявляється набагато частіше порівняно з особами молодого віку. Деякі автори не знаходять залежності частоти виявлення РЩЗ від статі та віку, натомість переконані, що ймовірність злоякісного характеру пухлини значно зростає зі збільшенням розміру вузла до 3 см і вище [4]. Rodier J.F. і співавт. [244] до особливостей первинної пухлини відносять її малі розміри, схильність до інвазійного росту, багатофокусність. Щодо локалізації злоякісного вузла у ЩЗ єдиної думки не існує. Є праці, в яких зазначено переважне його розташування як у верхніх і нижніх полюсах, так і в середній третині [7]. Існує багато досліджень, в яких активно обговорюється питання виникнення РЩЗ як самостійно, так і на тлі супутньої доброякісної патології [10]. Дані захворювання прийнято називати «фоновими», адже етіологічний зв'язок між ними і РЩЗ не доведено, але частота їх спільного виявлення говорить про схожість етіологічних причин. Низка авторів розглядають практично всі гіперпластичні процеси як передпухлинні захворювання [1], які, на думку Подвизнікова С.О. і співавт. [10] можуть бути фоновими для розвитку РЩЗ у 23,6 % випадків. Суперечить вищевикладеним висловлюванням думка, що далеко не будь-яка гіперплазія є обов'язковим етапом розвитку пухлини і, швидше за все, РЩЗ розвивається з однієї клітини у незмінній паренхімі ЩЗ. Деякі дослідники простежують чіткий зв'язок між РЩЗ і вузовим зобом [1]. Дане поєднання у їхніх спостереженнях виявлялося у третини хворих, а збільшення кількості випадків вузового зоба, відповідно, супроводжувалося збільшенням виявлених випадків РЩЗ. Інші автори вважають солітарні вузові утворення найбільш небезпечними в плані малігнізації [2]. На їхню думку, наявність будь-якого осередкового утворення у ЩЗ має розцінюватися перш за все з точки зору онкологічної настороженості,

що пояснює необхідність хірургічного лікування за онкологічними показаннями. Вважають, що у 40 % випадків рак виникає на тлі солітарного вузла, і лише у 18 % випадків – на тлі багатовузлового зоба.

Деякі дослідники відводять роль облігатного «передраку» аденомі, відзначаючи найбільш високий відсоток виявлення мікрокарціном на її тлі [252]. Існує припущення, що практично в кожній аденомі спочатку присутній мікрофокус карциноми, і залежно від індивідуальних особливостей людини, від активності його імунно-генетичних механізмів даний мікрофокус може протягом всього життя перебувати у «сплячому» стані або ж, навпаки, переродитися у ракову пухлину. Автори підкреслюють, що генні мутації у ЩЗ потенційно можливі, але відбуваються вкрай рідкісно, і ймовірність такого переродження дуже мала [217]. Ними ж зазначено, що для колоїдних вузлів злоякісна трансформація взагалі є не характерною та малоімовірною, що у більшості випадків і пояснює відмову від хірургічного лікування цих хворих. Окремі дослідники вказують на приблизно однакову частоту розвитку раку як за солітарних, так і за множинних вузлових утворень [270]. За зведеними даними, у хворих, які перенесли операцію на ЩЗ, злоякісну трансформацію вузла виявляють у середньому у 8-10 % випадків.

У літературі немає однозначної точки зору щодо зв'язку між раком і зобом Хашімото. Таке поєднання, за даними різних авторів, трапляється з частотою 0,5-31 % [262]. Існує думка, що за наявності у ЩЗ вузла з ознаками зоба Хашімото, ймовірність його малігнізації вища, ніж за наявності дифузних або багатовузлових змін. Гульчій Н.В і співавт. [5] відзначають, що серед хворих з АІТ частота випадків РЩЗ істотно збільшилася. Є повідомлення про сприятливий прогноз РЩЗ на тлі автоімунного тиреоїдиту, відзначено абсолютну перевагу виникнення папілярних форм РЩЗ із відносно сприятливим його перебігом у цієї категорії хворих [160]. Існує припущення про можливу залежність виникнення раку на тлі доброякісних вузлових утворень від швидкості їх збільшення. За даними літератури, найшвидше ростуть колоїдні вузли (68 %), значно повільніше збільшуються вузли за АІТ

(6,5 %) та аденоми (24 %). Незважаючи на це, Старинський В.В. і співавт. [8] відзначають, що ризик малігнізації за вузлового колоїдного зоба становить 2,5-8,4 %, за АІТ він дорівнює 1,2-8,2 %, за вузлової форми АІТ – 4,7-29,5 %, а за аденоми – 5,0-24,4 %.

Існують припущення, що ймовірність виникнення раку може залежати від тривалості існування вузлів. Цю точку зору спростовують дослідження фахівців, які наочно продемонстрували незмінність доброякісного характеру вузлових утворень у динамічному спостереженні пацієнтів впродовж 1-13 років після первинного виявлення вузлів у ЩЗ, а в деяких випадках навіть описують спонтанну їх регресію аж до повного зникнення [236]. Проведено чимало морфологічних досліджень конкретних видів карцином. За їх результатами, диференційований рак може характеризуватися багатофокусним ростом (8,7-80 %), що вражає обидві частки ЩЗ, раннім метастазуванням у регіонарні лімфатичні вузли, рецидивами та віддаленими метастазами. Солідно-трабекулярний варіант папілярного раку ЩЗ (ПРЩЗ) в основному трапляється у дітей, відрізняється агресивнішим перебігом, частим регіонарним метастазуванням і рецидивами [191]. Дифузно-склерозуючий варіант ПРЩЗ переважно вражає чоловіків молодого віку. У таких випадках пухлина часто поширюється за межі капсули залози, виявляються регіонарні метастази на шії та віддалені – у легенях [289]. Плоскоклітинний РЩЗ трапляється зрідка, частіше внаслідок проростання до ЩЗ пухлин з органів верхніх дихальних і травних шляхів, і у таких випадках дуже важливою є диференційна діагностика між первинною пухлиною ЩЗ і злоякісним новоутворенням іншого органа, що проростає в її тканину. Також описано випадки лімфосарком ЩЗ, що розвиваються на тлі тиреоїдиту Хашімото та лімфогрануломатозу, фібросарком, лейоміосарком і пухлин судинного генезу [10].

Для різних карцином 10-річне виживання хворих із ПРЩЗ складає 90 %, із фолікулярним раком ЩЗ (ФРЩЗ) – 70 %. Медулярний рак ЩЗ (МРЩР) і низько диференційований (НРЩЗ), на думку більшості авторів, відрізняються злоякісним перебігом і вкрай несприятливим прогнозом: 5-річне виживання

хворих не перевищує 37 %. За даними літератури, частота метастазування РЩЗ становить від 17 % до 80 % [13], з переважним однобічним ураженням лімфатичних вузлів (36-85 %), двобічне спостерігали лише у 12-15 % випадків. Щодо частоти метастазування окремих форм РЩЗ існує така статистика: для ПРЩЗ – 40-81,3 %, для ФРЩЗ – 2-10 %, для МРЩЗ – 40-55 % і для НРЩЗ – 70 % випадків. Віддалені метастази за ПРЩЗ виявляються у 4,0-4,4 % випадків [12].

ФРЩЗ представлено мінімально інвазійною та ангіоінвазійною формами. Прогноз за мінімально інвазійного ФРЩЗ близький до такого за ПРЩЗ, у разі ангіоінвазійного ФРЩЗ частота віддалених метастазів у легенях і кістках значно вища [289]. МРЩЗ має спорадичну та спадкову форми. Остання зазвичай двобічна, часто не надто агресивна, з відносно сприятливим прогнозом [176]. Відзначено, що метастази за папілярного та медулярного РЩЗ у різних групах лімфатичних вузлів трапляються з різною частотою: центральна група уражається у 45 % і 83 % випадків, латеральна – у 15 % і 22 %, медіастинальна – у 4 % і 19 % відповідно. У середньому ПРЩЗ складає близько 76 %, ФРЩЗ – 14 %, а МРЩЗ і НРЩЗ разом не перевищують 10 % від усіх карцином ЩЗ (МРЩЗ – 5-6 %, низько диференційований та анапластичний – 3-4 %) [48].

Важко переоцінити роль морфологічних досліджень на всіх етапах діагностики та лікування вузлового зоба. Клінічне поняття «вузловий зоб» включає як доброякісні, так і злоякісні захворювання ЩЗ [248]. Доброякісні захворювання підрозділяють на аденоматозний (багатовузловий) зоб, коли визначаються декілька утворень, і солітарний зоб, якщо вузол ЩЗ є поодиноким. Багатовузловий зоб (БВЗ) представлено декількома вузлами, що не розглядаються як пухлини, аденоми є солітарним розростанням фолікулярних клітин і визначаються як пухлини. Морфологічно фолікулярні аденоми (ФА) ЩЗ є гетерогенними і підрозділяються на різні підтипи залежно від гістологічної будови: макрофолікулярні, мікрофолікулярні та трабекулярні [199]. У деяких аденомах ЩЗ визначаються ознаки клітинної атипії, що

нагадують рак ЩЗ, проте гістологічні ознаки злоякісності відсутні. Такі пухлини вперше назвали «атиповою аденомою» 50 років тому, а в подальшому вони отримали різні назви [81]. Остання запропонована назва таких пухлин – «високо диференційована пухлина із невизначеним потенціалом злоякісності» (ФПНПМ) – викликає багато питань, пов'язаних із тактикою лікування [246], адже ці пухлини можуть бути попередниками РЩЗ. РЩЗ, що розвиваються з фолікулярних клітин, належать до трьох основних категорій: папілярний, фолікулярний та анапластичний РЩЗ. Для ПРЩЗ характерними є певні ядерні ознаки фолікулярних клітин, виявлення яких і є підставою для встановлення діагнозу. Серед різних підтипів ПРЩЗ фолікулярний варіант (ФВПР) гістологічно цілком представлено диференційованими фолікулами [33]. Пухлини ФРЩЗ також мають фолікулярну будову без характерних для ПРЩЗ ядерних ознак, проте з ознаками інвазії у судини пухлини або капсули [49]. Отже, для пухлин ЩЗ фолікулярної будови (або фолікулярної пухлини), гістологічний діагноз буде встановлюватися таким чином:

- ПРЩЗ – за наявності характерних ядерних ознак;
 - ФРЩЗ – якщо в ядрах фолікулярних клітин відсутні характерні для ПРЩЗ ознаки та виявляються ознаки інвазії;
 - ФА – без характерних ядерних ознак ПРЩЗ і без ознак інвазії пухлини.
- Діапазон «злоякісності» РЩЗ простягається від високо диференційованого ПРЩЗ до однієї з найнебезпечніших форм раку, відомих людині – анапластичного [101].

Визначення лікування та прогнозу пухлин ЩЗ ґрунтується на результатах гістологічного дослідження, яке є «золотим стандартом» діагностики, але його здійснення вимагає хірургічного втручання. Проте з огляду на невисоку частоту РЩЗ серед вузлового зоба систематичне видалення ЩЗ не є виправданим [19]. Існує низка методів, розроблених для оцінки потенціалу злоякісності вузлів ЩЗ на передопераційному етапі. Тонкогольова аспіраційна пункційна біопсія (ТАПБ) із подальшим цитологічним аналізом аспіратів вузлів ЩЗ отримала широке визнання серед ендокринологів та ендокринних морфологів як

діагностична процедура вибору. Основним завданням ТАПБ є диференційна діагностика вузлів ЩЗ, які можуть бути злоякісними та, відповідно, вимагають хірургічного втручання, і доброякісних, для яких можливо застосовувати терапевтичну тактику спостереження [19].

Зазвичай цитологічні висновки ТАПБ поділяють на доброякісні, злоякісні або сумнівні. Ефективність ТАПБ для діагностики доброякісних і злоякісних пухлин ЩЗ є досить високою, проте їй бракує ефективності у випадках сумнівних вузлів. До цієї групи належать випадки з атиповою цитологічною картиною та випадки з ознаками «фолікулярної неоплазії» [81]. Загальновизнано, що цитолог не може вірогідно розмежувати ФА і ФРЩЗ, тому такі пухлини об'єднано у групу фолікулярних неоплазій, які складають «сіру зону» у цитологічній діагностиці вузлів ЩЗ [81, 108]. Саме через те, що у цих випадках неможливо виключити РЩЗ за допомогою ТАПБ, пацієнти піддаються хірургічному втручання. Отже, великій кількості хворих виконуються неадекватні операції з приводу доброякісних захворювань ЩЗ. Під час післяопераційного гістологічного дослідження встановлюється остаточний діагноз і визначається справжня природа фолікулярних пухлин ЩЗ. Тим не менше, диференційна діагностика «атипової» аденоми ЩЗ і РЩЗ ускладнюється, оскільки ФПНПМ і ФРЩЗ можуть мати схожі морфологічні ознаки (ознаки цитологічної та структурної атипії, виражена клітинна проліферація) [32, 81]. Тобто цілком можливо, що класифікація цих пухлин часто залежить від суб'єктивного рішення патологоанатома. Наведені вище міркування привели до висновку, що на всіх етапах морфологічної діагностики вузлів ЩЗ (ТАПБ, гістологічне дослідження) ми маємо вирішити одну задачу – здійснення диференційної діагностики фолікулярних пухлин ЩЗ.

Останнім часом впроваджено велику кількість нових методик із метою підвищення ефективності діагностики. Так, використовують деякі «маркери», що, як вважається, присутні у злоякісних, але не визначаються у доброякісних пухлинах. Для виявлення цих «маркерів» використовують такі методи, як зворотно-транскриптазна полімеразна ланцюгова реакція (ЗТ-ПЛР) або

імуноцітохімічне дослідження з використанням специфічних антитіл. Але серед безлічі доступних маркерів лише деякі наразі використовуються у повсякденній практиці цитологічного аналізу: використання моноклональних антитіл 47 (МоАт 47) до тиреоїдної пероксидази (ТПО), дипептидиламінопептидази IV (ДАП IV), галектину 3 [72, 109, 117]. Дослідження показали, що поєднання застосування зазначених маркерів зі стандартними цитологічним дослідженням значно підвищує чутливість і ефективність ТАПБ. Тим не менше, **навіть найкращим із молекулярних маркерів бракує ефективності для диференційної діагностики ФПНПМ і ФРЩЗ.**

Отже, фолікулярні пухлини ЩЗ є групою, що включає морфологічно подібні фолікулярні доброякісні та злоякісні пухлини. Відсутність надійних методів, які дозволяли б чітко диференціювати фолікулярні пухлини, є однією з основних причин існуючої дилеми у виборі лікувальної тактики. Рішення про хірургічне втручання у таких випадках ґрунтується на більшій або меншій мірою суб'єктивних критеріях.

Незважаючи на розмаїття сучасних методів променевої діагностики, проблему ранньої та якісної верифікації осередкових уражень ЩЗ дотепер не вирішено. **За зведеними даними, до 40 % хворих на РЩЗ госпіталізуються на пізніх стадіях захворювання [14].** Оцінюючи діагностичні можливості інструментальних методів, одні дослідники **вважають ультразвукове дослідження (УЗД) ЩЗ основним за будь-якої її патології [3], інші вважають, що як самостійний ультразвуковий метод не має вирішального значення і може використовуватися лише як додатковий, на пізніх етапах діагностики.** Автори переконані в тому, що для первинного обстеження хворих із патологією ЩЗ основним орієнтиром є результати сцинтиграфії [9]. **Виправданим є широке використання ТАПБ, тоді як комп'ютерна томографія (КТ) і магнітно-резонансна томографія (МРТ) не відіграють значної ролі у діагностиці РЩЗ, але водночас успішно застосовуються за необхідності визначення поширеності процесу та виявлення метастазів.** Чимало дослідників віддають перевагу радіоізотопному дослідженню, що дозволяє уточнити стадію РЩЗ, виявити

метастази та показано з метою виключення раку хворим із низьким рівнем тиреотропного гормону (ТТГ), багатовузловим зобом і у випадках сумнівних висновків ТАПБ [9].

Фахівці Всесвітньої асоціації ендокринологів [19] вважають проведення УЗД пацієнтам із вузловим зобом обґрунтованим у випадках контролю виконання ТАПБ та у ході тривалого динамічного спостереження хворих, коли метод дозволяє точно і об'єктивно оцінювати зміни розмірів вузла. Ними зазначено, що іноді УЗД може допомогти у виявленні дрібних вузлів, недоступних для візуалізації іншими методами дослідження, зокрема сцинтиграфією. Деякі автори вважають, що лише сумісне застосування УЗД і сцинтиграфії дозволяє виявити у післяопераційний період тиреоїдні залишки, динаміку їх росту, оцінити обсяг проведеної операції й тактику подальшої корекції. Інші схилиються до висновку, що на сьогоднішній день взагалі не існує вірогідних методів променевої діагностики: сцинтиграфія не розрізняє характер процесу; біопсія у більшості випадків буває просто неінформативною; УЗД не можна використовувати за наявності пухлини, що виходить за межі середостіння та зміщує трахею; КТ і МРТ мають слабку роздільчу здатність для виявлення патологічних осередків у тканині ЩЗ. Одні фахівці вважають, що будь-який вузол у ЩЗ слід розглядати як потенційно злоякісний і пунктувати всі вузли, виявлені за допомогою УЗД [16]. На думку інших, якщо вузол ЩЗ не перевищує 1,5 см у діаметрі, або ж він більшого розміру, але за даними УЗД має ознаки доброякісного процесу, рекомендовано спостереження без ТАПБ. Лише у випадку збільшення розміру вузла або зміни його ехоструктури слід проводити біопсію, а ультразвукове та радіонуклідне дослідження – в окремих випадках [6]. Інші автори стверджують, що вузлові утворення розміром до 1 см не мають самостійного клінічного значення та не вимагають подальшого діагностичного пошуку [15]. У результаті відкидається необхідність виконання УЗД ЩЗ із профілактичною метою для раннього виявлення вузлових уражень, із чим не згодні дослідники, які визнають високу ефективність профілактичних оглядів у ранньому виявленні онкологічної патології.

За період з 1980 по 2000 рік частота застосування УЗД зросла з 3 % до 84,4 %, цитологічного аналізу – з 4,5 % до 23 %, а радіоізотопного сканування – зменшилася з 89,4 % до 49 % [19]. Водночас поширеність раку ШЦЗ серед оперованих хворих зросла з 12,5 % до 37 %. У результаті багатофакторного аналізу встановлено, що цитологічне дослідження, поряд з іншими методами діагностики, є значущим чинником об'єктивності показника захворюваності на РЩЗ. Більшість авторів сходяться на думці, що наразі оптимальним варіантом залишається проведення УЗД із подальшою ТАПБ. Утім відомо, що ефективність даної методики значно знижується за наявності у ШЦЗ множинних вузлових утворень. До того ж, клінічний досвід показує, що ранні діагностичні ознаки РЩЗ далеко не завжди виявляються сучасними інструментальними методами. Зокрема, ТАПБ із цитологічним дослідженням отриманого матеріалу до цих пір не може остаточно вирішити проблему ранньої діагностики карциноми ШЦЗ, оскільки навіть сприятливий результат цитологічного дослідження пунктату ШЦЗ, що містить лише окремі клітини або їх скупчення, не завжди може бути вирішальним критерієм для відмови від хірургічного втручання. Цитологічна верифікація РЩЗ на сьогоднішній день залишається однією з найскладніших і вимагає високої кваліфікації як лікаря, який виконує ТАПБ, так і лікаря-цитолога. Проте деякі автори вважають, що незалежно від результатів цитологічного дослідження за наявності клінічних ознак злоякісної трансформації слід домагатися гістологічного уточнення діагнозу шляхом хірургічного видалення вузлового утворення. Цю діагностичну та одночасно профілактичну операцію, показано пацієнтам із групи ризику розвитку РЩЗ. Радикально налаштовані хірурги стверджують, що єдино виправданим заходом профілактики раку є активне хірургічне втручання, яке показано за наявності як поодиноких, так і множинних вузлових утворень ШЦЗ [236].

На думку більшості фахівців, найбільш ефективна та прийнятна тактика включає з'ясування анамнезу, клінічне обстеження хворого, вивчення функції ШЦЗ, проведення УЗД і ТАПБ, діагностична цінність якої підвищується у поєднанні з імуноцитохімічним і молекулярно-генетичним методами

досліджень [115]. Багато фахівців відводять вирішальну роль результатам гормональних досліджень. За спостереженнями одних [60], рівень тиреоглобуліну у крові є високоінформативним показником післяопераційного стану хворих із диференційованими формами раку. Авторами відзначено: показники тиреоглобуліну рівною мірою можуть підвищуватися за будь-якої патології ЩЗ, але цього ніколи не спостерігається за МРЩЗ. На думку інших дослідників, підвищений вміст у сироватці кальцитоніну дозволяє діагностувати дану морфологічну форму на ранніх стадіях захворювання та з більшою точністю, ніж ТАПБ [300].

Розвиток пухлин ЩЗ тісно пов'язано з багатьма генами та різними фенотипами пухлин. Наприклад, мутації генів рецептора ТТГ або гуанін-нуклеотид стимулюючого чинника ($G\alpha$) сприяють проліферації клітин ЩЗ. У трансгенних мишей зі специфічною до ЩЗ експресією мутованого $G\alpha$ розвивається гіперплазія ЩЗ і гіпертиреоз, але не рак [216]. Онкогенні зміни тирозинкіназ (*RET/PTC*, *TPK*) є характерною рисою ПРЩЗ [302]. Останнім часом систематичний скринінг генів, що кодують шлях RAS-RAF-MEK-ERK-MAP-кіназ, продемонстрував значущість *BRAF*-мутацій у канцерогенезі. Серед злоякісних пухлин ЩЗ *BRAF*-мутації було виявлено у ПРЩЗ [133]. Мутації онкогенів *RAS* і *PPAR-PAX8* є типовими для ФРЩЗ [26, 97]. Зв'язок між *PTEN*-мутаціями та ФРЩЗ було виявлено у хворих із синдромом Коудена. Також доведено роль *PI3k* сигнального шляху та, надто, РКВ у канцерогенезі фолікулярних пухлин. У хворих із комплексом Карні (аутосомно-домінантне захворювання, пов'язане з розвитком доброякісних вузлів ЩЗ і ФРЩЗ) виявлено інактивацію мутації регуляторного відділу 1A в РКА. Для НР та АР ЩЗ характерними є генетичні аномалії *p53* [66].

В основних видах РЩЗ аномалії генів детально розглянуто, натомість значно менше відомо про генетичні зміни у групі фолікулярних пухлин і, надто, у фолікулярних пухлинах із невизначеним потенціалом злоякісності (ФПНПМ). До цих пір невідомо біологічне значення клітинної атипії та солідного характеру росту у ФПНПМ. Також невизначеним залишається співвідношення

між ФПНПМ і мінімально інвазійним ФРЩЗ і фолікулярним варіантом ПРЩЗ [302].

Очевидно, слід погодитися з думкою, що жоден із застосовуваних наразі діагностичних методів не дозволяє отримати повну інформацію про характер змін у ЩЗ. Про злоякісність природи цих утворень можна судити лише з більшою або меншою мірою вірогідності [6]. Все це свідчить про необхідність подальшого вдосконалення існуючих і розробки нових інформативних методів діагностики вузлових уражень ЩЗ із наступним визначенням їх місця в діагностичному алгоритмі.

Отже, ці проблеми відображають наші обмежені знання про природу та еволюцію вузлів ЩЗ. Механізми росту нормальних клітин ЩЗ, що призводять до гіперплазії, а потім, ймовірно, аденоми ЩЗ, вивчено недостатньо.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Роботу виконано в рамках планових наукових досліджень Українського науково-практичного центру ендокринної хірургії, трансплантації ендокринних органів і тканин МОЗ України (УНПЦЕХТЕОТ), вона є частиною науково-дослідної роботи «Оптимізація хірургічного лікування та післяопераційного моніторингу хворих на пухлини щитоподібної залози в залежності від їх морфологічних та патогенетичних форм, в тому числі впливу радіоактивного опромінення» (ДР № 0103U000589, 2003-2007 рр.), де автор був виконавцем фрагмента, та науково-дослідної роботи «Молекулярні механізми інвазії раку щитоподібної залози» (ДР № 0107U002116, 2007-2010 рр.), де автор був керівником НДР.

Мета роботи - розробка нових підходів у діагностиці та лікуванні пухлин щитоподібної залози на підставі вивчення сучасних уявлень про механізми канцерогенезу та визначення основних прогностичних чинників.

Задачі дослідження:

1. Проаналізувати клініко-морфологічні дані, результати лікування та прогностичні чинники відповідно до класифікацій BOOЗ і TNM у пацієнтів із пухлинами ЩЗ фолікулярного походження.
2. Визначити прогностичні чинники доброякісних і злоякісних пухлин ЩЗ на підставі кореляції гістологічної будови, цитологічних ознак, експресії маркерів малігнізації та клінічних результатів.
3. Провести дослідження ранніх етапів канцерогенезу пухлин щитоподібної залози фолікулярного походження.
4. Дослідити біологічне значення атипії клітин і молекулярних змін у фолікулярних пухлинах із невизначеним потенціалом малігнізації.
5. Визначити взаємозв'язок між фолікулярними пухлинами з невизначеним потенціалом малігнізації та мінімально інвазійним фолікулярним раком щитоподібної залози, а також між фолікулярними пухлинами з невизначеним потенціалом малігнізації і фолікулярним варіантом папілярного раку щитоподібної залози.
6. Визначити роль мутацій і транслокацій генів у канцерогенезі щитоподібної залози.
7. Оцінити роль епітеліально-мезенхімальної трансформації у міграції клітин раку щитоподібної залози. Дослідити рівень експресії мезенхімальних білків у ділянках інвазії та метастазах раку щитоподібної залози, ступінь експресії онкогенів.
8. Дослідити фенотипові зміни клітин раку щитоподібної залози у зонах інвазії, а також встановити роль колективної міграції клітин у процесі інвазії раку щитоподібної залози.

Об'єкт дослідження – пухлини щитоподібної залози на різних етапах діагностики, лікування та моніторингу.

Предмет дослідження – клінічні, морфологічні, інструментально-діагностичні та молекулярно-біологічні особливості доброякісних і злоякісних

пухлин ЩЗ у різних контингентів хворих. ЩЗ і регіонарні лімфатичні вузли пацієнтів, які зазнали хірургічного лікування з приводу захворювань ЩЗ.

Методи дослідження. У роботі виконано комплексне морфологічне дослідження ЩЗ пацієнтів із вузловими новоутвореннями. Крім цього, проведено загальні клінічні обстеження, моніторинг хворих на рак ЩЗ, вивчення впливу фармакологічних препаратів на клітини раку ЩЗ. Для досягнення поставлених задач застосовано: цитологічні, гістологічні, макроскопічні, імуноцито- та гістохімічні методи, конфокальну мікроскопію, вестерн-блот аналіз, кількісну ПЦР, екстракцію ДНК, РНК, білків, моделювання інвазії клітин, імунофлюоресценцію, статистичні дослідження.

Для вирішення поставлених задач проаналізовано різні типи фолікулярних пухлин ЩЗ: ФА, ФПНПМ, мінімально та широко інвазійні ФРЩЗ, варіанти ПРЩЗ. З метою визначення ролі різних епідеміологічних чинників досліджено пухлини ЩЗ пацієнтів, які мешкають у районах, забруднених після аварії на ЧАЕС, і французьких пацієнтів. За допомогою імуногістохімічного дослідження оцінювали ступінь проліферативної активності та диференціації клітин. Отримані результати щодо рівнів експресії онкогенів порівнювали з клініко-морфологічними даними. За допомогою комп'ютерного аналізу зображень порівнювали характеристики клітин ФПНПМ і типових ФА, ФРЩЗ і ПРЩЗ. Також проаналізовано молекулярні зміни, характерні для кожного класу пухлин, залежно від морфометричних даних.

Наукова новизна отриманих результатів. Визначено основні прогностичні чинники розвитку пухлин ЩЗ. Виявлено основні тенденції захворюваності та перебігу окремих клініко-морфологічних форм РЩЗ, їх зв'язок із патогенетичними чинниками і впливом скринінгових заходів.

Шляхом комп'ютерного морфометричного аналізу зображень розрізнили клітини фолікулярної аденоми від клітин фолікулярного та папілярного РЩЗ. За результатами молекулярних і морфометричних досліджень встановлено, що ФПНПМ можуть бути початковим етапом у розвитку фолікулярного та папілярного РЩЗ.

Вперше на найсучаснішому рівні визначено молекулярно-біологічні та клініко-морфологічні прогностичні критерії високого ризику рецидиву, метастазування РЩЗ, інвазії в оточуючі тканини та судини.

Доведено суттєвий вплив радіаційного опромінення внаслідок аварії на ЧАЕС на розвиток ПР ЩЗ не лише серед постраждалих дітей, але й серед опромінених дорослих.

Доведено високу ефективність у діагностиці пухлин ЩЗ і доцільність застосування як скринінгових таких досліджень: ТАПБ із застосуванням маркерів малігнізації, надто у дітей пубертатного віку.

Встановлено роль ЕМТ у процесі інвазії та метастазування РЩЗ шляхом дослідження рівня експресії мезенхімальних білків у ділянках інвазії і метастазах, а також визначення ступеня експресії генів, залучених до сигнальних шляхів РЩЗ. Доведено, що наявність *BRAF*-мутацій у ПР ЩЗ є маркером несприятливого прогнозу, а їх визначення на передопераційному етапі є показанням до застосування більш агресивної тактики хірургічного лікування.

Доведено, що забарвлені цитологічні препарати ТАПБ вузлів ЩЗ можна використовувати для виділення ДНК і подальшої оцінки наявності *BRAF*-мутацій методом ПЦР. Визначено, що виявлення даних мутацій має обмежене значення для діагностики злоякісного процесу у випадках із сумнівними цитологічними висновками ТАПБ.

Доведено роль Akt у процесах інвазії та метастазування РЩЗ. Активована Akt є перспективною мішенню для хіміотерапії тиреоїдних карцином.

Доведено, що механізми регуляції метилювання Е-кадгерину відіграють важливу роль в індукції ЕМТ у первинній пухлині, а також у зміні мезенхімального фенотипу.

Доведено роль вірусу простого герпесу (ВПГ) у туморогенезі ЩЗ. Показано, що чутливість клітин пухлин ЩЗ до ВПГ збільшується через підвищення експресії вірусного рецептора Nectin-1, активації мітогенних сигналів та індукції ЕМТ у метастатичних РЩЗ.

Практична значущість отриманих результатів. Визначення основних прогностичних чинників пухлин ЩЗ дозволяє застосовувати у клінічній практиці диференційований підхід до діагностики та лікування вузлових новоутворень ЩЗ. Врахування встановлених клініко-морфологічних особливостей форм РЩЗ, їх зв'язок із патогенетичними чинниками дозволить підвищити ефективність діагностики та лікування пацієнтів із РЩЗ. Встановлення того факту, що ФПНПМ є початковим етапом у розвитку фолікулярного та папілярного РЩЗ, є підґрунтям для впровадження у клінічну практику морфологічних критеріїв діагностики таких пухлин, що дозволить уникати неадекватних хірургічних втручань з приводу доброякісних утворень залози. Застосування маркерів малігнізації під час цитологічного аналізу аспіратів ТАПБ вузлів ЩЗ підвищує ефективність методу та дозволяє уникати хибно-позитивних і хибно-негативних результатів. Доведено, що виявлення *BRAF*-мутацій можливо на стандартно забарвлених цитологічних препаратах ТАПБ вузлів ЩЗ і має обмежене значення для діагностики злоякісного процесу у випадках сумнівних висновків, проте може бути корисним для передопераційного визначення пухлин із високим ризиком наявності екстраорганної інвазії та метастазів у лімфовузлах (МЛВ). Впровадження результатів дослідження матиме не лише медичне, але й економічне значення, оскільки дозволить підвищити працездатність пацієнтів і знизити інвалідизацію та смертність внаслідок РЩЗ. Результати дослідження впроваджено у клінічну практику лікарів-ендокринологів, радіологів, терапевтів, хірургів, цитологів, патологоанатомів ендокринологічних та онкологічних стаціонарів, диспансерів.

Особистий внесок здобувача. Дисертантові належить ідея дослідження, формулювання мети та задач роботи, складання протоколу дослідження. Дисертант брала безпосередню участь у виконанні майже всіх діагностичних процедур і морфологічних досліджень. Аналітична робота у повному обсязі, обробка архівного матеріалу, результатів дослідження та лікування, систематизація та узагальнення отриманих даних, їх статистичне обчислення

виконано дисертантом особисто. Всі розділи дисертації, висновки та практичні рекомендації сформульовано та написано автором самостійно.

У публікаціях, що їх видано у співавторстві, дисертантові належить основна роль, а саме – ідея роботи, отримання та аналітична обробка результатів, підготовка до друку. Співавтори публікацій і винаходів надавали консультативну, методологічну та аналітичну допомогу, брали участь у патентних дослідженнях та аналізі літератури, в оформленні документів – загалом не більше за 50 % роботи.

Апробація результатів дисертації. Основні положення дисертаційної роботи доповідались і обговорювались на науково-практичних конференціях республіканського та міжнародного рівня: XXI з'їзді хірургів України (Київ, 2005 р.), республіканських конференціях із міжнародною участю «Актуальні проблеми клінічної ендокринології та ендокринної хірургії» (Київ, 2005-2011 рр.); науково-практичній конференції з міжнародною участю та III конференції українського дивізіону Інтернаціональної академії патології «Актуальні проблеми онкоморфології» (Харків, 2011 р.); II Українсько-Російському симпозиумі «Современные аспекты хирургической эндокринологии» (Харків, 2011 р.); «Тиреошколі» (Дніпропетровськ, Львів, Одеса 2011 р.), конгресах Американської тиреоїдної асоціації (Нью-Йорк, 2007 р., Палм Біч, 2009 р.); конгресі Європейської спілки хірургів (Барселона, 2008 р.), конгресах Міжнародного ендокринологічного товариства (Сан-Дієго, 2005 р., Торонто, 2007 р., Вашингтон, 2009 р., Бостон, 2011 р.), багатьох республіканських фахових симпозиумах.

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 46 наукових праць. Із них 17 – у періодичних виданнях, рекомендованих ВАК України для публікації матеріалів дисертації, 10 – в авторитетних іноземних періодичних виданнях, які визнаються ВАК України, 19 тез і матеріалів доповідей на наукових з'їздах, конгресах і конференціях (зокрема 11 – в іноземних збірках). Прийнято заявку на патент на корисну модель, видано 4 методичні рекомендації МОЗ України.

Обсяг і структура дисертації. Дисертація складається зі вступу, огляду літератури, матеріалів і методів дослідження, 4 розділів власних результатів, їх аналізу та узагальнення, висновків, практичних рекомендацій, списку використаних літературних джерел (нараховує 306 посилань, у тому числі 18 вітчизняних і 288 іноземних першоджерел). Роботу викладено на 265 сторінках друкованого тексту, вона містить 35 таблиць і 70 ілюстрацій.

РОЗДІЛ 1

ЕПІДЕМІОЛОГІЯ ТА ПАТОГЕНЕЗ ПУХЛИН ЩИТОПОДІБНОЇ ЗАЛОЗИ (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ)

1.1. Клініко-морфологічні особливості фолікулярних пухлин щитоподібної залози

Вузловий зоб є найбільш поширеною формою захворювання ЩЗ. Частота його виявлення, за результатами широких популяційних досліджень, коливається від 3,2 % до 4,2 % (6,4 % серед жінок і 1,5 % серед чоловіків) [297]. За результатами автопсійних досліджень вузли ЩЗ виявляли у 50,5 % випадків клінічно незмінених залоз. УЗД ЩЗ із високою роздільною здатністю продемонструвало найбільшу ефективність у діагностиці вузлового зоба. Під час демографічних досліджень із використанням датчика частотою 7,5 МГц вузли ЩЗ було виявлено у 27 % жінок і 15 % чоловіків, тоді як із застосуванням датчика з частотою 10 МГц – у 40-46 % хворих [137], а у 48 % пацієнтів із вузлом ЩЗ виявлено додатковий вузол [248]. Лікарі-ендокринологи найчастіше порівняно з лікарями інших фахів застосовують УЗД, адже цей метод значно розширює можливості обстеження ЩЗ. Крім того, вузли ЩЗ можуть бути виявленими під час проведення комп'ютерної або магнітно-резонансної томографії грудної клітки з причин, не пов'язаних із патологією залози. За допомогою доплерівського дослідження сонної артерії та позитронно-емісійної томографії також можна виявити вузловий зоб, так само, як і під час УЗД ший отримати зображення прищитоподібних залоз (ПЩЗ), лімфатичних вузлів або слинних залоз [137].

РЩЗ є досить рідкісною патологією порівняно зі злоякісними пухлинами іншої локалізації, проте найбільш поширеною серед пухлин органів ендокринної системи. За даними Американської асоціації раку, 2003 року зареєстровано 22 000 нових випадків РЩЗ, що становить 1,5 % усіх вперше виявлених випадків раку; смертність внаслідок РЩЗ склала 2300 випадків. За

результатами програми спостереження, епідеміології та кінцевих результатів Національного інституту раку США, серед пацієнтів із РЩЗ смертність внаслідок даного захворювання склала менше від 0,1 %. В Україні приблизно 2000 нових випадків захворювання було діагностовано 2001 року та майже 4000 нових випадків РЩЗ – 2002 року. У період 1990-1997 рр. в Україні відзначено 10-кратне збільшення кількості випадків РЩЗ серед дітей і підлітків [135].

Клінічно РЩЗ проявляється досить рідко, у більшості випадків, коли окультна пухлина має діаметр до 1-2 мм, її виявляють випадково під час операції або автопсії. Частота окультного РЩЗ, виявленого під час автопсій, у США коливалася від 0,45 % до 13 % і склала у середньому 3,6 % [299]. У деяких країнах частота окультного РЩЗ сягає 36 % випадків. Частота виявлення окультного РЩЗ залежить від застосовуваних методів і значно зростає, коли проводиться гістологічне дослідження всієї ЩЗ. Вважається, що більшість випадків окультного РЩЗ мають сприятливий прогноз, але описано і випадки з віддаленими метастазами [260].

За результатами аналізу ТАПБ під контролем УЗД в одній клініці, частота РЩЗ серед вузлів, що не пальпуються, склала 6,4 %, що відповідало кількості РЩЗ серед вузлів ЩЗ, які пальпуються. Припускаючи, що 40 % випадків вузлів ЩЗ не пальпуються, а 28-30 % із них – це вузли розмірами 10 мм і більше, можна дійти висновку, що 11-12 % населення потребують ТАПБ ЩЗ. Отже, показник захворюваності на РЩЗ у США може зрости у 6-7 разів [137].

1.2. Діагностика вузлів щитоподібної залози

Важливе значення для оцінки вузла ЩЗ відіграють клінічні дані та дані фізикального обстеження, оскільки деякі ознаки можуть вказувати на ймовірність захворювання на РЩЗ. У пацієнтів із вузловим зобом необхідно провести дослідження рівня ТТГ для визначення наявності гіпер- або гіпотиреозу. Для підтвердження діагнозу тиреоїдиту необхідним є вимірювання рівнів сироваткового тироксину, трийодтироніну, антитіл до тиреоїдної

пероксидази та тиреоглобуліну. Історично склалося, що сканування ЩЗ було основним методом дослідження ЩЗ. За результатами сканування ЩЗ встановлюють ступінь поглинання ізотопу регіонарними лімфатичними вузлами за РЩЗ або визначають функціональний стан залози. Магнітно-резонансна і комп'ютерна томографія є досить вартісними та малоефективними методами в діагностиці захворювань ЩЗ. Ехографія ЩЗ дозволяє визначити обсяг часток, виявити відмінності в ехогенності різних ділянок залози, оцінити стан капсули, виявити деформацію контуру залози, додаткові утворення, але не їх природу [19].

Наразі ТАПБ розглядається як найбільш ефективний метод для морфологічної діагностики вузлів ЩЗ, а також метод скринінгу у виборі тактики лікування. Із застосуванням ТАПБ кількість хірургічних втручань із приводу доброякісних захворювань ЩЗ зменшилася вдвічі, а кількість операцій із приводу РЩЗ зросла [19]. Зазвичай цитологічні висновки ТАПБ розділяють на три групи: доброякісні, злоякісні та сумнівні [108]. Чутливість даного методу для діагностики ПРЩЗ, АРЩЗ і МРЩЗ складає понад 90 %. Також високою є діагностична ефективність даного методу для діагностики доброякісних захворювань органа [122, 199]. Водночас сумнівні висновки ТАПБ, як і раніше, є основною проблемою цитологічного аналізу. До цієї групи належать випадки з цитологічними ознаками атипії, а також випадки «фолікулярних неоплазій» [200, 81]. За результатами цитологічного аналізу пунктатів вузлів ЩЗ до групи фолікулярних пухлин відносять випадки з цитологічними ознаками мікрофолікулярної будови та/або з ознаками ядерної атипії та мітотичної активності. Цитологічні особливості в таких випадках однакові для аденом і карцином. Основними критеріями морфологічної діагностики ФРЩЗ є наявність інвазії капсули пухлини або її судин, а не цитологічні особливості. Отже, висновок цитологічного аналізу аспірату вузла ФРЩЗ може бути сумнівними, проте діагноз ФРЩЗ під час цитологічної діагностики встановити неможливо. Кількість сумнівних цитологічних висновків коливається від 13 % до 30 % усіх висновків ТАПБ, із них під час

гістологічного дослідження виявляється РЩЗ у 10-60 % випадків [81, 122, 201]. Дійсно, діагноз фолікулярної неоплазії вважається «сірою зоною» у цитологічній діагностиці вузлів ЩЗ. Загальновизнаним є факт, що цитолог не може вірогідно розмежувати ФА та ФРЩЗ, тому такі пухлини було об'єднано у групу «фолікулярні неоплазії». До діагностичної «сірої зони» також входять вузли ЩЗ солідної будови та ФВПРЩЗ. Оскільки у таких випадках неможливо виключити РЩЗ, пацієнти із сумнівними висновками ТАПБ підлягають хірургічному втручанню.

Патологоанатом відіграє визначну роль на всіх етапах лікування РЩЗ: у передопераційний період для виявлення РЩЗ під час цитологічного аналізу аспіратів ТАПБ; під час експрес-гістологічного дослідження для підтвердження/виключення злоякісності процесу, уточнення гістологічного типу та встановлення рівня розповсюдженості пухлини; у післяопераційний період для встановлення остаточного патогістологічного діагнозу та уточнення розповсюдженості пухлинного процесу.

Цитологічний аналіз аспіратів ТАПБ дозволяє правильно діагностувати 60-70 % вузлів ЩЗ і виявляти понад 90 % випадків РЩЗ, а тому є найбільш ефективним методом у селекції вузлів ЩЗ для хірургічного лікування [122]. Проведення експрес-гістологічного дослідження під час операції з приводу РЩЗ дозволяє визначити адекватний обсяг втручання. Проте обидва методи мають певні обмеження. Чутливість цитологічного методу значно вища за таку експрес-гістологічного, надто з використанням маркерів злоякісності (тиреоїдна пероксидаза, дипептидиламінопептидаза IV) [30, 34, 72]. Чутливість експрес-гістологічного дослідження для діагностики класичного варіанту ПРЩЗ складає 100 %, тоді як для ФРЩЗ та інкапсульованого фолікулярного варіанту ПРЩЗ – зрідка перевищує 50 %. Проведення макроскопічного та остаточного патогістологічного дослідження дозволяє встановити точний розмір пухлини, підтвердити її гістологічний тип, виявити екстраорганну інвазію, інвазію судин і метастази у ЛВ.

Отже, різниця у біологічній поведінці різних типів РЩЗ пояснює необхідність застосування різних підходів у їх лікуванні, а також складності в оцінці якості лікування. Наразі виділено чотири найбільш значущих клініко-морфологічних параметри (вік хворого, розмір пухлини, її розповсюдженість, гістологічний тип), які дозволяють класифікувати пухлини за ступенем ризику з метою вибору адекватної тактики лікування [201].

Патогістологічне дослідження є «золотим стандартом» для діагностики пухлин ЩЗ. Проте питання диференційної діагностики фолікулярної аденоми та мінімально інвазійного або інкапсульованого ангіоінвазійного раку, як і раніше, залишаються не до кінця вирішеними [49]. Залишається нез'ясованим сьогодні і біологічне значення клітинної атипії та солідного характеру будови ФПНПМ. Також погано визначено взаємозв'язки між ФПНПМ та мінімально інвазійним варіантом ФРЩЗ і між ФПНПМ і ФВПРЩЗ. Необхідно враховувати, що інколи зони капсулярної або судинної інвазії є ледве помітними, тому встановити діагноз у цих випадках майже неможливо, надто за умов недбалої підготовки матеріалу для дослідження.

Останні дослідження демонструють, що генетичний аналіз може прояснити молекулярні механізми розвитку злоякісних пухлин людини [302].

Останнім часом з метою підвищення ефективності діагностики злоякісних пухлин, включаючи РЩЗ, розроблено велику кількість нових технологій. Такі методи ґрунтуються на існуванні біохімічних відмінностей у тканинах доброякісних і злоякісних пухлин. Деякі з «маркерів злоякісності» (тиреоїдна пероксидаза, ДАП IV і галектин-3) значно корелюють зі злоякісною прогресією і сьогодні використовуються у повсякденній практиці під час цитологічного аналізу аспіратів ЩЗ. Також описано багато інших маркерів, проте ефективність їх застосування не доведено.

ТПО – це мембранний фермент, що каталізує йодування тирозинових залишків і зв'язування йодтирозинів у процесі синтезу тиреоїдних гормонів. Ген ТПО складається з 17 екзонів і розташований у короткому плечі 2-ї хромосоми. Тиреоїдна пероксидаза забезпечує нормальну функцію ЩЗ, її

недостатність призводить до зменшеного поглинання йоду та порушення гормонального синтезу [145].

За даними останніх імуногістохімічних досліджень, проведених на аспіратах ТАПБ, виявлено позитивну реакцію ТПО з клітинами більшості доброякісних пухлин ЩЗ, а у випадках злоякісних пухлин позитивними були менше від 80 % клітин. Важливо підкреслити, що чутливість цього дослідження для діагностики раку складає 100 %, а специфічність – 90 % [284].

У проспективному дослідженні цитологічних препаратів ЩЗ 1576 прооперованих пацієнтів, серед яких було 227 ПРЩЗ, аналізували діагностичну ефективність стандартної цитології та імуногістохімічного дослідження ТПО. Виявилося, що за допомогою стандартних цитологічних методів вірно встановити діагноз раку вдалося у 32 із 42 випадків ФВПРЩЗ і у 170 зі 185 випадків класичних ПРЩЗ. Водночас із використанням імуногістохімічного методу виявлення ТПО було верифіковано всі 42 випадки ФВПРЩЗ і 182 зі 185 випадків типових ПРЩЗ [72]. В іншому дослідженні також оцінювали ефективність застосування МоАт 47 для діагностики пухлин ЩЗ (109 фолікулярних пухлин). Чутливість методу у виявленні раку склала 100 %, специфічність – 68 % [109].

Отже, можна констатувати, що застосування МоАт 47 до ТПО під час ТАПБ є досить ефективним сучасним методом діагностики РЩЗ і дозволяє значно підвищити діагностичну цінність цитологічного дослідження вузлів ЩЗ.

Інший маркер, галектин-3, входить до групи лектинів – білків, що беруть участь у регуляції функцій інших протеїнів, розпізнаючи їх специфічні карбогідратні радикали. Цей білок також задіяно у рості та диференціюванні клітин, міжклітинному розпізнаванні, адгезії клітин та їх злоякісній трансформації. Результати імуноблот-аналізу демонструють високий рівень експресії галектину-1 і галектину-3 у препаратах РЩЗ і досить низький – у нормальних клітинах ЩЗ, що і використовується для діагностики фолікулярних аденом [109].

Експресію галектину-3 вивчали імуногістохімічно на 1009 гістологічних препаратах пухлин ЩЗ і на 226 цитологічних препаратах, одержаних під час ТАПБ, – чутливість і специфічність методу для верифікації добро- та злоякісних захворювань ЩЗ склали 99 % і 98 % відповідно [34]. Проте до цього дослідження не було включено МРЩЗ, НРЩЗ і ФПНПМ. Тому отримані результати можуть бути завищеними. Крім того, отримані авторами дані не підтверджено іншими імуногістохімічними дослідженнями з МоАт до галектину-3 на фолікулярних пухлинах, де було встановлено їх низьку ефективність у діагностиці ФРЩЗ [144].

Результати дослідження ДАП IV показали, що цей фермент бере участь в онкогенезі ЩЗ, а цитохімічне визначення його можна розглядати як маркер злоякісності клітин [30]. Ця точка зору знайшла підтвердження у роботі з вибіркоvim застосуванням моноклональних антитіл до ДАП IV на парафінових зрізах РЩЗ [82]. Чутливість ДАП IV для діагностики РЩЗ під час ТАПБ була нижчою від отриманої для імуноцитохімічного дослідження із МоАт 47, але специфічність склала понад 90 % [84, 293].

Комбіноване застосування ТПО і ДАП IV зі стандартним цитологічним дослідженням під час ТАПБ дозволяє підвищити чутливість і діагностичну цінність даного методу [245].

Існують також інші маркери злоякісності (група ядерних білків HMGI, що беруть участь у процесах регуляції структури та функції хроматину), але їх потенційна роль у діагностиці новоутворень ЩЗ залишається невизначеною [77]. Заслуговує на увагу фібронектин-адгезійний глікопротеїн, що локалізується у міжклітинному середовищі. Онкофетальний фібронектин містить домен (HCS-домен), відсутній у нормальному фібронектині. Можливість його застосування як маркера злоякісності досліджували у раках різної локалізації, в тому числі і РЩЗ. У цьому випадку рівень онкофетального фібронектину був значно вищим у ПРЩЗ і АРЩЗ порівняно з доброякісними пухлинами. Водночас у деяких ФРЩЗ визначався низький рівень цього

маркера, в інших – високий, що заважало верифікувати їх як злоякісну пухлину [174].

Nm23 ген і його білкові продукти описано як «супресори метастазування». Дослідження *in vitro* показали, що на тлі їх експресії відбувається зменшення метастатичного потенціалу злоякісних пухлин. Але виявлення *Nm23* не дозволяє відрізнити доброякісні пухлини від злоякісних [35].

Іншим маркером злоякісності може стати церулопламін – сироватковий глікопротеїн, головною функцією якого є транспорт міді. За результатами імуногістохімічних досліджень пухлин ЩЗ його виявлено у ракових клітинах і не знайдено у клітинах фолікулярних аденом. Функціональна роль церулоплазміну та можливість застосування як маркера злоякісності перебувають на стадії вивчення [291].

Можливу роль кератинів як молекулярних маркерів вивчали на різних раках, у тому числі і РЩЗ. Позитивну реакцію на антитіла до кератину 19 виявлено переважно у ПРЩЗ. Разом із тим, використання цих антитіл не дає можливості визначити добро- або злоякісний характер фолікулярних пухлин ЩЗ [69].

У раках різної локалізації виявлено високу експресію одного з транспортерів глюкози – GLUT-1. Роль даного маркера у діагностиці пухлин ЩЗ досліджено на препаратах 38 доброякісних і 28 злоякісних пухлин залози [124]. У доброякісних пухлинах експресії GLUT-1 автори не виявили, а у 9 із 17 випадків ПРЩЗ, у 2 із 6 випадків ФРЩЗ та у 2 із 2 випадків АРЩЗ із даним маркером реакція була позитивною. Отже, ймовірно, GLUT-1 буде застосовуватися як маркер злоякісності.

CA 19-9 і CD 15 (або Leu-M1) є антигенами, що були визначені як маркери злоякісності пухлин підшлункової залози та шлунково-кишкового тракту. На аспіратах ТАПБ ЩЗ ці антигени досліджували разом із HBME-1 [296]. Авторами виявлено низьку чутливість CA 19-9 і CD-15, за використання з

HBME-1 вона була набагато більшою. Усі ПРЦЗ виявилися позитивними, але даний метод, як вважають автори, має низьку специфічність.

CD 30 (антиген Ki-1) є цитокіновим рецептором, що визначається у деяких типах раку, включаючи лімфому Ходжкіна, меланому та саркоми різного генезу. Результати дослідження нормальної тканини та пухлин ЩЗ показали, що у першому випадку не визначалось експресії ані CD 30, ані її ліганду, а у групі доброякісних і злоякісних пухлин мала місце експресія даних молекул [95].

CD 97 – глікопротеїн, що належить до підтипу поверхневих молекул лейкоцита. У препаратах нормальної тканини ЩЗ і диференційованих РЦЗ реакція на нього була відсутньою або мінімальною, а більшість АРЦЗ мали виражену експресію даного антигену. Авторами виявлено залежність між рівнем експресії CD 97 і стадією пухлинного росту: вона була відсутньою або слабкою у пухлинах стадії T1 і значно вираженою у пухлинах стадії T4 [51].

Циклооксигеназа 2 (ЦОГ-2) є ферментом, який, як вважається, відіграє важливу роль у канцерогенезі. Його експресію досліджували на добро- та злоякісних пухлинах ЩЗ за допомогою ПЛР [68]. Встановлено більший рівень мРНК ЦОГ-2 у препаратах злоякісних пухлин залози порівняно з таким в оточуючій нормальній тканині та доброякісних вузлах ЩЗ. Автори роблять висновок, що ЦОГ-2 можна використовувати як потенційний маркер у диференційній діагностиці добро- та злоякісних пухлин у передопераційний період.

Отже, аналіз літератури з питань онкопатології ЩЗ і проблем діагностики пухлинних захворювань показує, що отримані дані є неоднозначними, методичний рівень морфологічних досліджень – незадовільним, а інтенсивність використання сучасних імуноцитохімічних методів – недостатньою.

1.3. Патогістологічні особливості пухлин щитоподібної залози фолікулярного походження

Термін «фолікулярна неоплазія» застосовується як цитологічний висновок, який робиться на підставі виявлення чітких морфологічних критеріїв [20, 81, 201]. За гістологічною класифікацією ВООЗ пухлин ЩЗ [129], фолікулярні пухлини ЩЗ залежно від біологічної поведінки розділяють на три групи: фолікулярні аденоми, фолікулярний рак і фолікулярний варіант папілярного раку ЩЗ.

В останній редакції гістологічної класифікації ВООЗ (2004) пухлин ЩЗ було вдосконалено загальні класифікації пухлин ЩЗ з урахуванням накопичених даних про патологічні та біологічні особливості пухлин залози [89]. Деякі гістологічні підтипи пухлин було додано, а деякі – виключено з головних категорій класифікації. Виділено дві групи ДРЩЗ фолікулярного походження: ПРЩЗ і ФРЩЗ. Кожна група РЩЗ налічує як класичні (загально визнані) форми, так і гістологічні варіанти, що трапляються зрідка. Існує декілька проміжних форм клініко-морфологічних варіантів пухлин ЩЗ невизначеного гістогенезу, які важко класифікувати (ФПНПМ, а також низькодиференційований РЩЗ) [282]. Наразі біологічні параметри, такі як плоідність ДНК, клітинна проліферація та експресія онкогенів, не визнаються провідними чинниками, що впливають на вибір тактики лікування.

ПРЩЗ і ФРЩЗ відрізняються за своєю біологічною поведінкою та епідеміологією, тобто гістологічний тип пухлини є основним прогностичним чинником перебігу захворювання [27, 85, 184, 223].

1.3.1. Фолікулярна аденома. Зазвичай фолікулярна аденома ЩЗ виявляється під час макроскопічного дослідження у вигляді солітарного вузла, відокремленого від оточуючої тканини ЩЗ фіброзною капсулою, побудованого з різних за розмірами фолікулів. Залежності від гістологічної будови ФА ЩЗ розрізняють макрофолікулярну, мікрофолікулярну (фетальну) та трабекулярну аденоми [129]. Фолікулярні клітини мають невеликі розміри, ядра – округлої

форми. Оточуюча тканина – не змінена або атрофічна внаслідок компресії з боку пухлини. Інколи трапляються ФА ЩЗ із зонами, гістологічна будова яких нагадує гемангіому, або вони мають онкоцитарні цитологічні ознаки, а також аденоми у вигляді парагангліоми з ознаками гіалінозу стромы.

Раніше у літературі для фолікулярних аденом із солідним типом будови за відсутності ознак інвазії капсули або судин, характерних для ФРЩЗ, використовувався також термін «атипова аденома» [49, 269]. В епітеліальних клітинах таких пухлин виявляються ознаки клітинної атипії: збільшення розмірів ядер, гіпертрофія ядерця, деформація контурів ядра, можуть з'являтися також деякі ознаки ПРЩЗ. Крім того, трапляються веретеноподібні клітини, клітини з різними фігурами мітозів. Прогноз для цих пухлин залишається невизначеним.

1.3.2. Диференційований рак щитоподібної залози фолікулярного походження. Більшість випадків ДРЩЗ фолікулярного походження є безсимптомними, і лише 8-10 % із них мають агресивний перебіг, що пояснює труднощі у виборі адекватної тактики лікування, а також необхідність визначення основних прогностичних чинників [208, 218].

Незважаючи на існуючі розбіжності у методичних підходах і тактиці лікування, виділено основні чинники розвитку ДРЩЗ фолікулярного походження: вік хворого, розповсюдженість процесу на момент діагностики, гістологічний тип і ступінь диференціювання пухлини, але залишається невизначеною індивідуальна ймовірність рецидиву пухлини. Зазвичай провести адекватну оцінку ризику, що ґрунтується на сучасних патологічних критеріях, неможливо на передопераційному етапі, коли не відомі усі характеристики пухлини. Отже, дуже часто складно визначити оптимальний обсяг первинного хірургічного втручання. Крім того, потреба в радіойодтерапії, інтенсивність супресивної терапії, особливості спостереження пацієнта мають визначатися на підставі клініко-патологічної оцінки ризику. Отже, визначення нових інформативних прогностичних критеріїв може допомогти у стратифікації

ризик, визначенні прогнозу рецидиву пухлини у пацієнтів із ПРЩЗ, а також підвищити ефективність первинної та тривалої терапії [27, 127, 208, 251].

Папілярний рак щитоподібної залози. ПРЩЗ – це злоякісна епітеліальна пухлина ЩЗ фолікулярного походження з характерними ядерними змінами. В умовах йододефіциту ПРЩЗ складає близько 80 % усіх РЩЗ, пік захворюваності припадає на період від 30 до 50 років [27]. Зазвичай ПРЩЗ має вигляд щільної пухлини білуватого кольору з макроскопічними ознаками інвазії. Лише у 10 % випадків пухлина ПРЩЗ інкапсульована та має ознаки кістоподібної дегенерації. Багатофокусний ріст виявляється у 21-46 % випадків, переважно білатерально. Метастазування ПРЩЗ відбувається лімфатичними судинами, і на момент операції у 25-50 % хворих виявляються метастази у регіонарних лімфатичних вузлах. Віддалені метастази виявляються у 2-17 % випадків, переважно у легенях і, зрідка, у кістках і головному мозку [208].

У цілому ПРЩЗ характеризується сприятливим прогнозом, а загальна смертність за даної патології складає 5-10 % [127]. Проте розвиток місцевої інвазії за межі капсули залози і віддалених метастазів обумовлюють слабку відповідь на радіойодтерапію із подальшою прогресією та підвищенням рівня смертності. Серед основних чинників несприятливого прогнозу виділяють розмір пухлини, розповсюдженість і наявність віддалених метастазів. Існує пряма залежність між розміром пухлини та смертністю, яка практично дорівнює нулю у випадках ПРЩЗ розміром до 1 см, перевищує 15 % для пухлин >4 см і складає понад 50 % для пухлин >7 см. Наявність макроскопічних ознак екстраорганної інвазії є чинником гіршого прогнозу та асоціюється з високим рівнем локальних рецидивів, віддалених метастазів, за яких смертність протягом 15 років сягає 50 % [27]. На відміну від цього, наявність мікроскопічної інвазії капсули ЩЗ не впливає на прогноз [218]. Присутність віддалених метастазів є безперечним чинником несприятливого прогнозу, у 75 % випадків вони виявляються у легенях і найбільш характерні для дітей (50 % випадків у віці від 10 до 20 років) або дорослих, старших за 70 років. У понад 90 % випадків віддалені метастази поєднуються з метастазами у

регіонарних лімфовузлах. Дистантні метастази великих розмірів, на відміну від мікроскопічних, йод не накопичують, а тому асоціюються з агресивним перебігом та високим рівнем смертності. Смертність протягом 15 років за наявності віддалених метастазів в осіб віком до 40 років складає 40 %, старших за 40 років – 92 % [27, 218].

Цитологічні ознаки атипії клітин розглядають як важливий прогностичний чинник. На практиці справжня атипія клітин РЩЗ виявляється досить рідка, на відміну від недиференційованого РЩЗ. За результатами морфометричних досліджень ядер і плоїдності визначено взаємозв'язок ознак атипії з поведінкою РЩЗ, проте ці дані не мають практичної значущості [223]. На жаль, бракує багатофакторних досліджень, де б оцінювали прогностичне значення гістологічного типу РЩЗ [218]. Проте відзначено, що наявність зон зниженого диференціювання у ПРЩЗ супроводжується високою частотою віддалених метастазів і збільшенням рівня смертності.

Наявність багатофокусного росту пухлини та метастазів у лімфовузлах (МЛВ) пов'язують із високим ризиком розвитку локальних рецидивів [251]. Не було виявлено впливу багатофокусності на рівень смертності. МЛВ виявляються у 37-65 % випадків РЩЗ і не впливають на рівень смертності, якщо цей показник оцінювати без урахування інших прогностичних чинників. А наявність значної кількості МЛВ, старший вік хворого, білатеральність і медіастинальне ураження значно підвищують рівень смертності.

Іншим важливим прогностичним чинником є характер інкапсуляції пухлини. Найліпшим є прогноз для пухлин, цілком оточених капсулою (10-15 % ПРЩЗ). Не описано жодного випадку смерті або віддалених метастазів за такої форми ПРЩЗ, незважаючи на можливу наявність МЛВ (від 30 % до 40 %) [85].

Наявність ознак інвазії судин пов'язують із більшим ризиком регіонарного метастазування пухлини, але не з підвищенням рівня смертності [218].

Папілярна мікрокарцинома – пухлина розміром до 1 см. Розрізняють клінічно значущу мікрокарциному, яка проявляється у вигляді вузла ЩЗ, що пальпується, або наявністю МЛВ, і «окулярну мікрокарциному», яку виявляють на тлі інших захворювань під час автопсій або під час операцій з приводу доброякісної вузлової патології. Залежно від типу росту та інкапсуляції визначено декілька підтипів папілярних мікрокарцином ЩЗ (ПМЩЗ) [195]: окультна склерозована з рясною фіброзною стромою зі сприятливим прогнозом; неінкапсульована і неінвазійна «обмежена»; інкапсульована і неінвазійна; інкапсульована з інвазією у капсулу; інвазійна без капсули. Інкапсульований тип із капсулярною інвазією виявляється у 36-44 % випадків, цілком інкапсульовані складають менше від ніж 5 % ПМЩЗ [57].

Визначення оптимальної тактики лікування хворих із ПМЩЗ залишається дискусійним. Є дані, що випадки диференційованого раку ЩЗ із розміром пухлини менше від 1,5 см не впливають на зростання рівня смертності [127]. Інші дослідники випадки розповсюджених форм ПМЩЗ розглядають як потенційно агресивні, що несуть загрозу життю пацієнта. Хірургічне лікування ПМЩЗ як метод вибору було запропоновано після появи даних про високу частоту МЛВ за даної патології [208]. Локальні та регіонарні рецидиви визначено у понад 20 % ПМЩЗ, у деяких дослідженнях описано випадки віддалених метастазів за ПМЩЗ із смертельними наслідками [85].

Несприятливими прогностичними анатомо-клінічними чинниками за ПМЩЗ є багатофокусність, білатеральність, екстраорганна та інтраорганна інвазія (неінкапсульовані пухлини або інкапсульовані з ознаками інвазії капсули), наявність МЛВ – пальпаторних і/або множинних і/або вісцеральних. Ймовірність МЛВ більша за умов інвазійності, багатофокусності, у чоловіків і залежить від розміру пухлини: від 13 % для пухлин, менших від 5 мм до 59 % для пухлин понад 5 мм [208]. Наразі визнано, що для мікрокарцином розміром до 5 мм критерій інвазійності є прогностично більш значущим порівняно з розміром.

Дифузно-склерозуючий варіант ПРЩЗ трапляється зрідка – у 0,8-4 % випадків ПРЩЗ [242]. Найчастіше виявляється в осіб молодого віку та дітей і проявляється дифузним ураженням однієї або обох часток ЩЗ. Клінічно може нагадувати картину тиреоїдиту, надто у випадках підвищення титру антимікросомальних антитіл та антитіл до тиреоглобуліну. Під час гістологічного дослідження виявляються дифузна пухлинна інфільтрація всієї тканини ЩЗ і виражені ознаки інвазії лімфатичних судин, що пояснює дифузне розповсюдження пухлини. Щодо прогнозу за даної патології за результатами більшості досліджень виявлено асоціацію з більшим ризиком регіонарного та віддаленого метастазування і смертельних наслідків, тоді як інші дослідники вважають, що прогноз за даного типу раку не відрізняється від такого для класичного варіанту ПРЩЗ [83].

Фолікулярний варіант ПРЩЗ як окремий вперше було описано 1960 року [56]. За допомогою експрес-гістологічного дослідження, коли характерні цитологічні ядерні ознаки не видимі, у випадках цілковитого оточення капсулою таку пухлину неможливо відрізнити від аденоми. Існують також інфільтративні форми фолікулярного варіанту ПРЩЗ, які характеризуються агресивнішим перебігом [282]. Також окремо виділено макрофолікулярний варіант ПРЩЗ, для якого характерний більш сприятливий прогноз [271], а також дифузну форму фолікулярного варіанту ПРЩЗ, коли виявляється ураження всієї залози зі значною кількістю віддалених метастазів і збільшенням смертельних наслідків [85].

Висококлітинний варіант ПРЩЗ складає 5-10 % усіх ПРЩЗ. Найчастіше виявляється в осіб віком понад 50 років, із розміром пухлини ≥ 3 см. У більше, ніж третині клітин такої пухлини висота вдвічі більша за ширину, вони мають рясну еозинофільну цитоплазму, що нагадує онкоцитарний варіант ПРЩЗ [242]. Екстраорганна інвазія виявляється у 42 % випадків, МЛВ – у 75 %, рецидиви – у 58,2 %, віддалені метастази – у 16,7 %, смертність складає 25 % (для порівняння: за класичного варіанту ПР – 0 %, 42 %, 8,3 %, 0 %, 0 % відповідно) [33, 34, 168].

Колоноклітинний варіант ПРЩЗ є досить рідкісним (до 0,2 %) [208]. Вік хворих коливається від 21 до 63 років. Найчастіше даний тип пухлини виявляють серед чоловіків, і у більшості випадків він представлений пухлиною розміром понад 5 см із вираженими ознаками екстраорганної інвазії та інвазією до оточуючих органів. Прогноз для такого типу РЩЗ вкрай несприятливий: 6 із 8 описаних хворих померли у період від 7 місяців до 6 років. У 7 випадках віддалені метастази було виявлено у передопераційний період. Саме через агресивну поведінку такий варіант ПРЩЗ наближено до низькодиференційованих РЩЗ [85].

Онкоцитарний варіант ПРЩЗ складає від 1,5 % до 3 % усіх випадків РЩЗ. Розмір пухлини коливається від 0,5 см до 6 см і у середньому складає 2,3 см. Папілярний тип будови превалює у 70 % випадків, також виявляються зони фолікулярної, трабекулярної та солідної будови. Пухлини даного підтипу з превалюванням трабекулярної будови схильні до рецидивів. Загалом прогноз для онкоцитарного варіанту ПРЩЗ схожий на такий для класичного варіанту [55].

Фолікулярний рак щитоподібної залози. ФРЩЗ – злоякісна епітеліальна пухлина з ознаками фолікулярно-клітинного диференціювання, позбавлена характерних ядерних ознак ПРЩЗ [251].

Макроскопічно виділяють два типи ФРЩЗ: інвазійну форму, що найчастіше виявляється під час хірургічних втручань, та інкапсульовану (або слабо інвазійну) [71]. Мікроскопічно інкапсульований фолікулярний рак нагадує за своєю будовою ембріональні (фетальні) аденоми або ФПНПМ. У таких випадках діагноз злоякісності процесу встановлюється за наявності інвазії капсули або її судин.

На відміну від аденом, для ФРЩЗ характерною є товста фіброзна капсула, також трапляються ділянки некрозу, крововиливів і набряку у центральних відділах пухлини. За інвазійної форми ФРЩЗ пухлину лише частково оточено капсулою, спостерігається значне проростання її клітин у навколишню тканину та за її межі [71]. Мікроскопічно пухлину ФРЩЗ представлено мікро- та

макрофолікулами або трабекулами, інколи вона має солідний тип росту. Такі пухлини схильні до уніцентричного росту і дають в основному гематогенні метастази.

У випадках слабо інвазійного ФРЦЗ часто виникають труднощі під час патоморфологічної діагностики онкопроцесу. За відсутності характерної інвазії пухлини наявність ознак ядерної атипії, мітозів і некрозів не дозволяють припустити РЦЗ. Діагноз встановлюють лише за наявності інвазії в капсулу пухлини або її судини. За цих умов несправжня судинна інвазія або виявлений у капсулі окремих фолікул не розглядаються як ознаки інвазії [49]. Ознаки інвазії судин мають бути безсумнівними. До того ж, необхідно враховувати судини значних розмірів (вени середніх розмірів), розташовані в межах капсули пухлини, в їх просвіті має бути пухлинний тромб, а наявність інвазії дрібних судин не вважається діагностичним критерієм ФРЦЗ. Крім того, наявність у просвіті судин поодиноких епітеліальних клітин, прикріплених до судинної стінки або непов'язаних із пухлинним тромбом, також не є діагностичним критерієм ФРЦЗ.

В останній редакції гістологічної класифікації ВООЗ пухлин ЦЗ із метою відмежування пухлин із мінімальною інвазією капсули від інкапсульованих із васкулярною інвазією у групі ФРЦЗ відокремлено «інкапсульований ангіоінвазійний» підтип. У випадках ФРЦЗ з ознаками інвазії судин ризик місцевого розповсюдження або віддалених метастазів значно вищий.

МЛВ за ФРЦЗ виявляються у 12 % випадків, віддалені метастази – у 10 % випадків і є більш характерними для широко інвазійних його форм. Кістки та легені – найчастіша локалізація віддалених метастазів ФРЦЗ. Смертність протягом 10 років складає 15 %. Такі відмінності у наслідках ФРЦЗ і ПРЦЗ доводять їх різну біологічну поведінку. Основними чинниками прогнозу для ФРЦЗ є вік хворого та наявність віддалених метастазів, коли виживання протягом 10 років складає лише 18 %. Інкапсуляція та ангіоінвазія є більш значущими прогностичними чинниками, ніж для ПРЦЗ. Так, смертність протягом 10 років у випадках інкапсульованих ФРЦЗ складає 3 %, а для

інвазійних форм сягає 32 %. Ознаки інвазії капсули є менш значущим чинником прогнозу порівняно з ознаками інвазії судин. У випадках ангіоінвазійних ФРЦЗ смертність і рецидиви протягом 10 років складає 16 % і 28 % відповідно. Наявність МЛВ асоціюється з вищим рівнем смертності [154, 222, 282].

Онкоцитарний і світлоклітинний залишаються двома основними варіантами ФРЦЗ. Онкоцитарний варіант складає 3-4 % злоякісних пухлин ЩЗ. Деякі дослідники припускають, що значну роль у розвитку таких пухлин відіграють мітохондріальні аномалії.

Транслокації пероскисоми проліфератора активованого рецептора гамма (PPAR γ) виявлено у 25-50 % ФРЦЗ, найбільш поширеною серед них є PAX8-PPAR γ . Транслокації PPAR γ визначаються також на ранніх стадіях ангіоінвазійного підтипу ФРЦЗ. Мутації генів *RAS* виявляються у 20-50 % ФРЦЗ. Найчастіше активовано мутації у кодоні 61 *H*- і *N*-*RAS*. Мутації *RAS* і транслокації PPAR γ визначають різні шляхи канцерогенезу ФРЦЗ.

Пошкодження генів *p53*, *PTEN*, гена β -катехіну сприяють прогресуванню диференційованого ФРЦЗ у низькодиференційованих.

НРЦЗ – злоякісні пухлини з обмеженими ознаками фолікулярно-клітинної диференціації, посідають проміжне місце між диференційованими та анапластичними раками ЩЗ. За гістологічною будовою такі пухлини підрозділяють на солідний, інсулярний і трабекулярний варіанти. Вважають, що НРЦЗ походить з існуючих диференційованих ФРЦЗ і ПРЦЗ, але можуть розвиватися *de novo*. П'ятирічне виживання (50 %) є значно нижчим для НРЦЗ, ніж для диференційованих ПРЦЗ і ФРЦЗ [222].

1.4. Сучасні уявлення про канцерогенез пухлин щитоподібної залози

Вузловий зоб є найчастішою патологією залоз внутрішньої секреції – його поширеність серед дорослих у регіонах йодного дефіциту досягає 30 % [273]. Вузлові утворення ЩЗ класифікують за морфологічними та

функціональними критеріями [71, 182]. Обидві ці ознаки можуть бути незалежними характеристиками утворень ЩЗ. Так, «холодним» вузлом можуть бути колоїдний зоб, ФА або (менше, ніж у 10 % випадків) РЩЗ. З іншого боку, ФА за даними сцинтиграфії може виявитися як «гарячим», так і «холодним» і навіть «теплим» (нормально функціонуючим) вузлом. Така розбіжність функціональних і морфологічних характеристик вузових утворень, що походять з одних і тих самих епітеліальних клітин, є важливою особливістю. У патогенезі вузового зоба давно відома роль чинників довкілля (йодний дефіцит, куріння тютюну, радіація) і генетичних (жіноча стать, родинна схильність), тим не менше, вузовий зоб часто розвивається і за відсутності цих чинників ризику. Добре відомо, що важливою вихідною умовою розвитку клінічно значущого вузла є тривала фокальна проліферація клітин. Вона може відбуватися під впливом як ендогенних чинників, що сприяють формуванню вузлів, так і екзогенних [130]. Важливі дані про патогенез вузових утворень ЩЗ отримано у дослідженні їх клональних властивостей (клональності) за допомогою оцінки патерну інактивації Х-хромосоми у пухлинах. Показано, що до 60 % доброякісних вузлів ЩЗ мають моноклональне походження, тобто з єдиної клітини-попередниці, яка «модифікувалася генетично» внаслідок соматичної мутації [101]. Така мутація має давати клітині якусь біологічну перевагу, наприклад, прискорення клітинного циклу. Зараз з'являється все більше даних про те, що фенотип пухлин ЩЗ насамперед детерміновано тим геном, в якому сталася соматична мутація.

1.4.1. Структурна активація каскаду цАМФ як генетична основа розвитку гіперфункції щитоподібної залози. Функціональна автономія ЩЗ є основною причиною тиреотоксикозу у регіонах йодного дефіциту та клінічно може проявлятися солітарним токсичним зобом («токсичною аденомою») або, значно частіше, множинними автономними ділянками, що прийнято позначати терміном «багатовузовий токсичний зоб» [101]. Мутація гена рецептора ТТГ (рТТГ), що призводила до стійкої активації рецептора незалежно від ТТГ, вперше описано за токсичного зоба 1993 року. Сигнал від зміненого рецептора

спричинює стійку активацію продукції цАМФ усередині клітини, внаслідок чого стимулюється продукція тиреоїдних гормонів і ріст клітини. Хронічна активація каскаду цАМФ детермінує клінічний фенотип: тиреотоксикоз і розростання змінених клітин (вузловий, багатовузловий токсичний зоб).

Поширеність мутацій рТТГ на тлі функціональної автономії ЩЗ, за даними різних авторів, складає близько 55-80 %; причиною такого діапазону, ймовірно, є використання різних методів дослідження [115]. Наразі ідентифіковано понад 50 мутацій рТТГ, які активують каскад цАМФ. Крім того, ці праці зробили неоціненний внесок у вивчення самого рецептора ТТГ. Активні дискусії викликають дані про те, що активуючі мутації рТТГ виявляються як на тлі йодного дефіциту, так і за його відсутності [296].

У незначній частині (2-10 %) «гарячих» вузлів, в яких не визначалися мутації рТТГ, виявлено активуючі мутації α -субодиниці білка Gs (Gsp). Слід зазначити, що активація аденілатциклази відбувається внаслідок взаємодії Gsp із рТТГ. У зв'язку з цим за автономії ЩЗ соматичні мутації рТТГ і Gsp є комплементарними генетичними подіями, в результаті яких відбувається стійка активація одного і того ж сигнального шляху.

Описані молекулярні основи патогенезу автономії ЩЗ було підтверджено у серії експериментальних і клінічних досліджень. По-перше, соматичні мутації рТТГ виявлено за допомогою авторадіографії в автономних ділянках на тлі еутиреоїдного зоба, і це свідчить, що такі мутації виникають на ранніх етапах еволюції автономії ЩЗ. По-друге, «гарячі» вузли, в яких виявлено мутації рТТГ (або Gsp), є моноклональною патологією [140]. По-третє, існують вроджені мутації гена рТТГ, які успадковуються за аутосомно-домінантним типом. Крім того, за наявності мутації Gsp у пацієнтів із синдромом МакБюна-Олбрайта також розвивається автономія ЩЗ. По-четверте, у трансгенних мишей, у яких моделюється хронічна активація каскаду цАМФ (наприклад, за допомогою гіперекспресії рецептора аденозину-A2), розвивається токсичний зоб. Нарешті, експресія активуючої мутації рТТГ у тиреоцитах *in vitro* призводить до стимуляції продукції цАМФ, а також функції та росту клітин [115].

1.4.2. Активуючі мутації каскаду RAS-BRAF-MAPK у патогенезі папілярного раку щитоподібної залози. ПРЩЗ є найповніше охарактеризованою неоплазією ЩЗ щодо взаємозв'язку епідеміологічних чинників (радіаційно індукований або спорадичний) з наявними на молекулярному рівні дефектами. Перший генетичний дефект, що його було виявлено за ПРЩЗ – транслокація *RET/PTC* – відомий з 1990 року [31]. Ген *RET* кодує рецептор тирозинкінази для чинника росту, що експресується нейроендокринними клітинами [241]. Надекспресія зміненого *RET* відбувається за ПРЩЗ внаслідок злиття промотору та N-термінальної ділянки неспоріднених генів (*PTC-1*, *PTC-2* тощо) і функціональної, що містить тирозинкіназний домен, С-термінальної ділянки гена *RET*. Це приводить до конструктивної активації каскаду RAS-BRAF-MAPK. До теперішнього часу у пухлинах ПРЩЗ ідентифіковано декілька химерних *RET/PTC* генів, у 80 % випадків – це *RET/PTC-1* і *RET/PTC-3*. Транслокація *RET/PTC* є специфічною для ПРЩЗ і виявляється з досить високою частотою (30-65 %) у випадках радіаційно індукowanego раку та зрідка (5-15 %) – за спорадичних його форм [102].

У дослідженні причин злиття *RET-PTC* у ЩЗ за допомогою флуоресцентної гібридизації *in situ* було продемонстровано, що фрагменти генів *RET* і *PTC*, локалізовані у 10-й хромосомі, попри відстань між ними приблизно у 20 мегабаз, приблизно на 35 % зливаються з нормальними генами тиреоцитів в інтерфазі. В інших клітинах такого злиття не відбувається. Радіоактивне опромінення призводить до порушення структури ДНК і може обумовити утворення патологічної рекомбінації *RET/PTC*. В експерименті було показано, що іонізуюче опромінення тиреоцитів може індукувати розвиток *RET/PTC1* і *RET/PTC3* (найчастіші транслокації, виявлені у дитячих чорнобильських раках) [193]. Крім того, про значення химерних генів *RET/PTC* у патогенезі ПРЩЗ свідчить їх виявлення у папілярних мікрокарциномах, а також, що більш важливо, розвиток ПРЩЗ у трансгенних тварин після моделювання транслокації *RET/PTC* [87].

Описані раніше точкові мутації гена *RAS* виявляються лише у 15 % пухлин ПРЩЗ [133]. 2002 року було описано мутацію *BRAF*, яка з високою частотою виявлялася в меланомі, після чого з'ясувалося, що дана мутація є ключовим онкогеном у пухлинах ЩЗ. Цікаво відзначити, що мутація у гені *BRAF* відбувається майже виключно у кодоні 600: як правило, відбувається заміна валіну на глутамат (*V600E*). Мутація *V600E* у гені *BRAF*, ймовірно, призводить до структурної активації RAF-кінази. In vitro було показано, що за таких умов клітинна трансформація відбувається більш ефективно, аніж за дії незміненого (дикого) типу *BRAF* [235]. Мутація *V600E* у гені *BRAF* сьогодні розцінюється як найбільш поширений молекулярний дефект (39-69 %) у спорадичних ПРЩЗ і, навпаки, рідкісний за радіаційно індукованого ПРЩЗ [164]. Крім того, фенотип ПРЩЗ вдалося змодельовати у трансгенних мишей із мутацією *V600E* у гені *BRAF*.

Отже, в основі патогенезу ПРЩЗ лежить структурна активація каскаду RAS-BRAF-MAPK. Останній може розвиватися за двома різними сценаріями: точкова мутація (у генах *BRAF* і *RAS* – 70 %) переважно у спорадичному ПРЩЗ і генні транслокації (близько 70 %) у радіаційно індукованому ПРЩЗ. Дану закономірність підтверджують нещодавні дослідження, які виявили інші транслокації генів у пухлинах, де не було транслокації *RET/PTC*, а саме транслокацію *TRK* і химерний ген *AKAP9-BRAF* [39]. Обидва дефекти переважно виявляються у радіаційно індукованому варіанті ПРЩЗ і аналогічним чином активують каскад MAPK. Важливо відзначити, що перехрест між молекулярними дефектами за ПРЩЗ відсутній. Певним виключенням з цього правила є ПРЩЗ, що розвивається у дитячому віці, коли мутації *BRAF* виявляються виключно зрідка, але у випадках як радіаційно індукованого, так і спорадичного ПРЩЗ виявляються транслокації *RET/PTC* [163]. Це свідчить, що вік пацієнта є ще однією важливою детермінантою онкогенного процесу в тиреоцитах.

Слід зазначити, що незалежно від того, який сигнальний шлях стимулюється в тиреоциті, відбувається формування одних і тих самих

фенотипових варіантів ПРЩЗ. Можна припустити, що окремі мутації призводять до різного ступеня структурної активації різних каскадів та їх окремих компонентів. Фенотипові відмінності пухлин (метастазування, дедиференціювання тощо) можуть бути обумовленими як різним онкогенним потенціалом генетичних дефектів всередині одного сигнального каскаду, так і активацією інших [104].

1.5. Генетичні основи патогенезу фолікулярних пухлин

Фолікулярні неоплазії залишаються однією з найбільших проблем як з точки зору диференційної діагностики на тлі вузлового зоба, так і з точки зору нез'ясованих молекулярних основ їх розвитку. Фолікулярні пухлини характеризуються підвищеною анеуплоїдією; крім того, до теперішнього часу в них виявлено два генетичних дефекти [183]. По-перше, це мутації генів *RAS* (*H*-, *N*- і *K-RAS*), які виявляють як у ФА, так і у ФРЩЗ, причому в останньому дещо частіше. Фолікулярні пухлини змодельовано у трансгенних тварин із мутацією *RAS*; крім того, виявлено взаємозв'язок між активацією онкогена *RAS* та анеуплоїдією [101]. Роль мутацій *RAS* у розвитку фолікулярних пухлин багатьма приймається, хоча це конкурує з наведеними вище даними про мутації *RAS* за ПРЩЗ. У цьому контексті Zhu Z. і співавт. [184] припустили, що мутації *RAS* за ПРЩЗ переважно трапляються у випадках ФВПРЩЗ.

Другим генетичним дефектом, ідентифікованим у фолікулярних пухлинах, є транслокація *PAX8-PPAR γ 1* [214]. Химерний ген *PAX8-PPAR γ 1* утворюється шляхом злиття гена чинника транскрипції *PAX8* (на хромосомі 2) і гена рецептора γ , активованого проліфератором пероксисом (*PPAR γ*), (на хромосомі 3). У цьому ж дослідженні вперше було отримано дані (не на моделі клітин ЩЗ), що транслокація *PAX8-PPAR γ 1* призводить до пригнічення *PPAR γ* . Значення для ЩЗ *PPAR γ* залишається не цілком зрозумілим. Тим не менше, два останніх дослідження, проведені на клітинних лініях тиреоцитів, показали, що *PPAR γ* відіграє певну роль у контролі апоптозу та диференціювання, а за

умов транслокації *PAX8-PPAR γ 1* відбувається пригнічення функції як *PPAR γ* , так і *PAX8*. Після першого описання цього химерного гена низка дослідників підтвердили, що транслокація *PAX8-PPAR γ 1* присутня у клітинах ФРЩЗ (26-56 %), а також у клітинах ФА (13-25 %) [102, 103]. На цій підставі висловлено припущення, що наявність транслокації *PAX8-PPAR γ 1* в імовірно доброякісній фолікулярній неоплазії може бути ознакою преінвазійного ФРЩЗ [232].

1.5.1. Значення молекулярних змін для туморогенезу щитоподібної залози. Наявність однакових генетичних дефектів у ФА та у карциномах ЩЗ за умов однакової їх морфології дозволяє припустити (але ніяк не доводить) можливість переходу аденоми в карциному. Крім того, Vasko V. і співавт. у своєму мета-аналізі з вивчення мутації *RAS* у пухлинах ЩЗ показали, що *N-RAS* генотип переважно асоційовано з ФА, тоді як *H-RAS* частіше виявлявся за ФРЩЗ [258]. Більше того, якщо був би реальним перехід фолікулярної аденоми в карциному, а транслокація *PAX8-PPAR γ* була би тригером у механізмі цієї трансформації, тоді в одній і тій же пухлині мали б виявлятися обидва химерних гени: як *RAS*, так і *PAX8-PPAR γ* (якщо, звичайно, *RAS* не втрачається у процесі пухлинної трансформації). У цих дослідженнях частота мутації *RAS* і транслокації *PAX8-PPAR γ* у пухлинах ФРЩЗ склали відповідно 49 % і 36 %, а у ФА – 48 % і 4 %. Одночасно обидва гени виявлено лише в 1 з 33 випадків ФРЩЗ. В іншому дослідженні обидва гени виявлено у 14 % випадків ФРЩЗ. Отже, можна прийняти концепцію, відповідно до якої мутації *RAS* і транслокації *PAX8-PPAR γ* за ФРЩЗ є самостійними і незалежними феноменами [232]. Можливості участі таких різних дефектів в якомусь одному сигнальному каскаді, за аналогією із ПРЩЗ, не визначено. У зв'язку з цим найбільш ймовірно, що найголовніші деталі молекулярних механізмів туморогенезу фолікулярних клітин ще не відомі.

Одним із шляхів, що може пролити світло на цю проблему, є технології генних мікрочипів, які дозволяють ідентифікувати гени, що специфічно регулюються у різних пухлинах. Можна припустити, що ідентифікація специфічного транскриптому дозволить простежити порушений сигнальний

шлях і виявити причинний молекулярний дефект [100]. Наступним кроком могло б бути використання тієї ж методики для повної розшифровки молекулярних механізмів, які лежать в основі процесу переходу локалізованої пухлини в метастатичну. Безпосереднім результатом досліджень із використанням генних мікрочипів з'явилася ідентифікація «маркерних генів» для деяких пухлин ЩЗ [120]. З огляду на відносно невелику кількість і значну гетерогенність пухлин ЩЗ для вивчення транскриптомів слід застосовувати різні методи, а результати цих праць перед впровадженням у рутинну клінічну практику мають пройти випробування у незалежних багатоцентрових дослідженнях.

Анапластичний рак ЩЗ (АРЩЗ) є найагресивнішою пухлиною ЩЗ, що спричинює дуже високу смертність через неоперабельність і резистентність до променевої та хіміотерапії [38]. Мутації *BRAF* і *RAS* виявляються у 73 % випадків АРЩЗ. Інактивація *p53* – «захисника геному» – внаслідок соматичної мутації багатьма фахівцями розглядається як критична подія патогенезу АРЩЗ, оскільки мутації *p53* виявляються у 22-82 % випадків цієї пухлини [103].

1.5.2. Молекулярні механізми інвазії раку щитоподібної залози. Процес метастазування вимагає, аби ракові клітини успішно пройшли певні послідовні етапи. Вони мають: 1) відокремитися від первинної пухлини та вторгнутися у навколишню тканину; 2) проникнути до лімфатичних або кровоносних судин і потрапити у кровобіг; 3) потрапити з кровоносної системи в паренхіму рецептивного органа-господаря; 4) розмножитися на вторинному місці; 5) створити новий пухлинний осередок шляхом утворення нових судин [303]. Набуття міграційного фенотипу – найважливіша умова інвазійності та метастазування ракових клітин. Клітинна міграція зазвичай сприймається як рух окремої клітини, яка зазнає поляризаційних циклів витягування-скорочення разом з адгезією до субстрату. Описано інший тип клітинного пересування – колективна міграція клітин або рух тяжів, що складаються з численних клітин [112].

Рух окремої клітини описано у міграції мезенхімальних клітин під час ембріогенезу і у злоякісних пухлинах, що походять із мезенхіми [141]. Цей тип клітинної міграції включає амебоїдний і мезенхімальний типи міграції, які зазвичай спостерігаються на тлі злоякісних пухлин кровотворної системи / дрібноклітинного раку легенів (МКРЛ) і фібросаркоми / гліоми / анапластичної пухлини [114]. Епітеліальні ракові клітини можуть зазнавати морфологічних змін, подібні клітинам мезенхімальних, втрачати контакт клітина-клітина, піддаватися перебудові цитоскелету, набувати здатність до експресії мезенхімальних компонентів і проявляти міграційний фенотип. Цей процес відомий під назвою «епітеліально-мезенхімальний перехід» (ЕМП). Ознаки ЕМП включають експресію віментину, фібронектину, остеопонтину, *Runx2* і знижену регуляцію E-кадгеріну. Експресія цих генів і білків запускається різними чинниками росту з тірозинкіназною активністю [292, 304].

Очевидно, що ЕМП бере участь у прогресії РЩЗ. Пухлинам ЩЗ зі зменшеної експресією E-кадгеріну властивий більш несприятливий прогноз і більш висока частота метастазування в лімфатичні вузли [119]. Відомо, що фібронектин надмірно експресується в РЩЗ, і його експресія більша у зонах інвазії порівняно з центральними ділянками пухлини. Надмірна експресія остеопонтину в РЩЗ поєднується з експресією *RET/PTC* [207]. Дослідження *in vitro* показали, що експресія остеопонтину призводить до інвазії, а дія антиостеопонтинових антитіл пригнічує інвазію. На цих підставах припускають, що остеопонтин відіграє важливу роль у процесі інвазії клітин РЩЗ подібно до того, як це відбувається за раку молочної залози [305]. Є повідомлення про експресію мезенхімального маркера віментину у метастазуючих ПРЩЗ та АРЩЗ. У клітинних лініях НРЩЗ виявлено віментин-залежну міграцію та мезенхімальні ознаки [28]. Особливу роль відводять поєднанню експресії віментину та інших регуляторів клітинної міграції, адже його експресію виявлено у доброякісних пухлинах ЩЗ без ознак інвазії та метастазів.

Отже, маркери ЕМТ (Е-кадгерин, остеопонтин і віментин) є функціонально значущими у процесі інвазії клітин РЩЗ. Також доведено роль у розвитку РЩЗ рецепторів чинника росту, які активують гени та білки, залучені до ЕМТ. Так, специфічними для РЩЗ є надмірна експресія рецепторів до EGF, HGF і його рецепторів, c-met, IGF і рецепторів IGF [58]. EGF у поєднанні з TGF- β спричинює інвазію клітин раку. Здатність клітин РЩЗ до міграції збільшується під дією HGF. Нарешті, продемонстровано стимулюючу дію IGF-1 у клітинній міграції [58]. Усе це свідчить, що ЕМТ відіграє важливу роль у міграції клітин РЩЗ, але точний механізм, що регулює цей процес, вимагає подальшого вивчення.

На підставі виявлення мутації *RAS* у ФА висунуто припущення, що вона є ранньою ознакою канцерогенезу пухлин ЩЗ [232]. Також експресія *RAS* асоціюється з агресивною поведінкою та несприятливим прогнозом РЩЗ [186]. Показано, що у трансгенних мишей – носіїв специфічного для ЩЗ активованого гена *N-RAS* – розвивається НРЩЗ. Передача сигналів від *RAS* через зворотній зв'язок на ERK та Akt сигнальні шляхи, ймовірно, може стимулювати ЕМТ у різних клітинах. Ці дані дозволяють припустити, що *RAS* бере участь не лише у розвитку пухлини, але й у прогресії РЩЗ. Транслокації *RET/PTC* найчастіше є характерними для ПРЩЗ і МРЩЗ, надто для радіоіндукованих ПРЩЗ [193]. Подібно до мутації *RAS*, транслокації *RET/PTC* вважають ранньою ознакою у канцерогенезі РЩЗ, адже їх виявлено в окультному РЩЗ і ПМЩЗ [102]. Значення транслокацій *RET/PTC* у пухлинній прогресії підтверджується їх виявленням у ПРЩЗ із високим метастатичним потенціалом. У трансгенних мишей – носіїв специфічної для РЩЗ транслокації *RET/PTC3* – розвивається агресивний РЩЗ. У клітинах ЩЗ із транслокацією *RET/PTC3* визначено підвищення рівня клітинної проліферації, здатність до міграції *in vitro* та підвищений рівень експресії генів, пов'язаних з ЕМТ [274]. Точкова мутація *BRAF* і злиття *AKAP9-BRAF* часто виявляються у ПРЩЗ і радіоіндукованих ПРЩЗ відповідно [203].

BRAF-мутація асоціюється з гіршим прогнозом, і цільова експресія мутованого *BRAF* у ЩЗ мишей призводить до розвитку інвазійного ПРЩЗ [266]. Визначення нуклеотидної послідовності у нормальних клітинах залози та клітинах *BRAF*-позитивних ПРЩЗ показало підвищення рівня експресії генів, пов'язаних з ЕМТ, що включають, віментин та остеопонтин. Усі *BRAF*-індуковані молекулярні зміни ймовірно, обумовлюють агресивну поведінку ПРЩЗ.

Генні перебудови, що включають *PPARg-PAX8*, часто виявляються у високоінвазійних формах ФРЩЗ. Так, у мишей із прихованим домінантно негативним мутантним рецептором β гормону ЩЗ ($TRb^{pv/pv}$) із недостатністю *PPARg* виявлено спонтанний розвиток ФРЩЗ із метастазами. Дослідження експресії генів у пухлинах ЩЗ у мишей $TRb^{pv/pv}$ дозволило довести важливу роль пригнічення *PPARg* сигнального шляху, що призводить до зменшення рівня *PTEN* і розширення *P13K/AKT* сигнального шляху [36].

Отже, процес інвазії та метастазування РЩЗ тісно пов'язано з експресією різних онкогенів. Натомість точні механізми, залучені до міграції та інвазії клітин ЩЗ, вимагають подальшого детального вивчення.

Akt (протеїнкіназа В) є центральною сигнальною молекулою фосфатидил-інозитол-3-кіназного (*P13K*) шляху, який активується різними чинниками росту [36]. Активація *RAS* та інактивація *PTEN* стимулюють *P13K/Akt* сигнальний шлях, який відіграє ключову роль у прогресії РЩЗ [36]. Показано, що Akt бере участь у регуляції клітинної міграції в РЩЗ, а також залучений до процесу метастазування. Доведено прямий зв'язок між ядерним накопиченням Akt і здатністю клітин РЩЗ до інвазії [28]. Перебуваючи у ядрі клітини, Akt фосфорилує численні субстрати-мішені, включаючи інгібітор циклін-залежної кінази *p27*, що призводить до її переходу у цитоплазму [235]. Цей процес асоціюється з набуттям клітинами РЩЗ мезенхімального фенотипу та міграційної здатності. Отже, *p27* є інгібітором клітинного циклу за умов ядерної локалізації та регулятором ЕМТ – за цитоплазматичної.

Ці дані свідчать про взаємозв'язок сигнальних шляхів, активованих онкогенами РЩЗ, із сигнальними шляхами ЕМТ. Колективний тип міграції клітин, описаний в ембріогенезі серця, морфогенезі зябрових дуг і міграції зачатка РЩЗ, може бути механізмом інвазії та метастазування диференційованого епітеліального раку [112]. На відміну від міграції окремої клітини, клітини раку зберігають міжклітинні контакти та мігрують групами, формуючи пласт. Під час пухлинної прогресії групи клітин проникають у лімфатичні судини і можуть виявлятися у периферичній крові [112]. У колективній міграції клітин задіяно багато чинників, що регулюють міграцію окремої клітини та ЕМТ. Наприклад, інтегрин-опосередкована адгезія асоціюється з поляризацією цитоскелету й активністю протеаз. Інтегринову кластеризацію пов'язано з активацією трьох сигнальних шляхів: FAK/RAS/RAF-1/MAPK-кіназа, який спричинює проліферацію, P13K-шлях, який бере участь у виживанні клітин, і кальцій/кальцій кальмодулін-залежна кіназа II (Ca^{2+} /CaMKII), яка бере участь у міграції клітин [149]. HGF спричинює міграцію клітин раку товстої кишки, регулюючи матриксну металопротеїназу мембранного типу 1 і желатиназу А, які експресуються лише поверхневими клітинами мігруючого клітинного шару. Показано, що в клітинах раку молочної залози за відсутності ЕМТ колективну міграцію викликає подопланін. Утім, точний молекулярний механізм, що контролює колективну клітинну міграцію, залишається невідомим. У літературі відсутні повідомлення щодо механізму колективної клітинної міграції за РЩЗ.

Знижена регуляція генів-супресорів метастазів також відіграє важливу роль у процесі інвазії та метастазування РЩЗ. Гени-супресори метастазування кодують білки, що пригнічують цей процес, але не впливають на злоякісну трансформацію [259]. У цій групі описано такі гени, як *NM23*, *CAD1*, *MKK4*, *KAI-1* (*CD82*), *TXNP*, *CRSP3*, *BRMS1*, *KiSS-1* тощо. Деякі з цих генів досліджено в РЩЗ.

Отже, регуляція процесів інвазії та міграції клітин РЩЗ – складний процес, що включає численні сигнальні шляхи. Молекулярні механізми, які

контролюють міграцію клітин під час ембріонального розвитку, такі як ЕМТ, ймовірно, знову активуються під час інвазії РЩЗ. Для розуміння функціонального значення та ролі у процесі інвазії РЩЗ сигнальних шляхів, пов'язаних з ЕМТ, необхідно їх вивчення на клітинних і тваринних моделях. Порівняльний аналіз ембріональних і ракових клітин дозволяє припустити, що в ембріона міграція – це тимчасовий і просторово організований процес, який може контролюється «програмами сприяння та обмеження» міграції. Механізми інвазії раку подібні до тих, які спостерігаються в ембріоні, але «програми обмеження інвазії», скоріше за все, порушуються під час пухлинної прогресії. Якщо процес інвазії досліджується досить інтенсивно, то механізми, що обмежують інвазію, вивчено набагато менше. Розуміння молекулярних механізмів, залучених до процесу обмеження інвазії, допоможе проникнути у суть пухлинної прогресії та метастазування, що, у свою чергу, стане підґрунтям для створення нових технологій або препаратів, здатних регулювати специфічні молекулярні механізми канцерогенезу.

1.5.3. Клінічні перспективи вивчення генетики пухлин щитоподібної залози. Розширення наших уявлень про генетику пухлин ЩЗ можуть істотно поліпшити результати їх лікування. По-перше, виявлення специфічних молекулярних дефектів може вирішити проблему диференційної діагностики та лікування фолікулярних неоплазій, включаючи пухлини з клітин Гюртля та ФВПРЩЗ. На ухваленні рішення про лікування можуть позначитися дані про те, чи є ці пухлини стадіями одного захворювання, чи самостійною окремою патологією.

По-друге, цілком можливо, що створення молекулярної класифікації злоякісних пухлин ЩЗ приведе до визначення нових, точніших прогностичних критеріїв. Фактично низкою недавніх досліджень показано, що ПРЩЗ, в якому визначається мутація *BRAF*, характеризується агресивнішим перебігом порівняно з ПРЩЗ із транслокацією *RET/PTC*. Крім того, продемонстровано, що фолікулярний рак, в якому визначається *PAX8/PPAR γ* , характеризується більшою інвазійністю [232]. Ці дані вимагають підтвердження. Сьогодні

подібні кореляції генотипу та фенотипу вже використовуються у клінічній медицині, наприклад за МРЩЗ, коли виявлення певних мутацій *RET*-протоонкогена за синдрому МЕН-2 є показанням для проведення профілактичної тиреоїдектомії.

По-третє, виявлення специфічних для окремих пухлин, змінених внаслідок мутацій сигнальних шляхів відкриває перспективи для фармакологічних впливів. У цьому напрямку зараз ведуться інтенсивні дослідження, спрямовані насамперед на лікування злоякісних пухлин ЩЗ пізніх стадій, нездатних захоплювати радіоактивний йод. Отримано багатообіцяючі результати. Зокрема, мова йде про специфічні інгібітори тирозинкінази для сигнальних шляхів *RET/PTC* або *RET* [301] і тіазолідиндіон для стимуляції *PPAR γ* [290]. Ймовірно, нові специфічні інгібітори, що пригнічуватимуть активацію сигнальних шляхів *BRAF* за ПРЩЗ і *P13K* за АРЩЗ буде розроблено у найближчому майбутньому [231].

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Клінічна характеристика пацієнтів

Матеріалом для дисертаційної роботи послужили пухлини щитоподібної залози та регіонарні лімфатичні вузли на різних етапах діагностики, лікування та моніторингу пацієнтів із вузловим зобом, які лікувалися на базі Українського науково-практичного центру ендокринної хірургії, трансплантації ендокринних органів і тканин МОЗ України 2004-2011 роками.

В окремих розділах роботи для вирішення певних задач із загальної групи хворих виділяли вибірки відповідно до конкретних наукових завдань.

Ретроспективно проведено аналіз результатів цитологічного дослідження аспіратів ЩЗ 15 225 пацієнтів, із них 611 (0,4 %) дітей віком від 6 до 17 років, яким було проведено ТАПБ вузлів ЩЗ на базі відділення патоморфології і цитології УНПЦЕХТЕОТ протягом 1999-2007 років.

157 дітей (131 дівчинка – 83,4 % і 26 хлопчиків – 16,6 %) прооперовано з приводу захворювань ЩЗ, і результати цитологічних досліджень порівняно з остаточними гістологічними діагнозами. Сорок шість пацієнтів (41 дівчинка і 5 хлопчиків) народилися до 1986 року.

Патогістологічні діагнози встановлювали згідно з класифікацією ВООЗ пухлин ЩЗ (2004). Всього у дітей діагностовано 47 (29,9 %) злоякісних і 110 (74,3 %) доброякісних пухлин ЩЗ. Серед злоякісних пухлин визначено 42 ПРЩЗ, із них 9 – фолікулярні варіанти і 1 дифузно-склерозуючий варіант; 2 ФРЩЗ; 1 МРЩЗ; 2 неходжкінські лімфоми. Серед доброякісних утворень ЩЗ багатовузловий зоб (БВЗ) діагностовано у 25 випадках, ФА – у 76 випадках, 7 випадків мали обмежені ознаки ПРЩЗ, у 2 випадках визначено фолікулярну аденому з клітин Гюртля.

З метою вивчення прогнозу для ФПНПМ із застосуванням автоматизованої системи аналізу зображень досліджено структуру хроматину

ядер пухлин ЩЗ на парафінових зрізах пухлин 39 пацієнтів, прооперованих з приводу захворювань ЩЗ на базі УНПЦЕХТЕОТ. За результатами гістологічного дослідження виявлено 10 ФА, 9 ФПНПМ, 10 ФРЩЗ і 10 ПРЩЗ. у жодному з 9 випадків ФПНПМ не виявлено клінічних ознак РЩЗ. Протягом 5-річного післяопераційного спостереження 4 випадків ФПНПМ місцевих рецидивів або метастазів виявлено не було.

З метою оцінки ефективності застосування НВМЕ-1 порівняно з комбінованим застосуванням МоАт 47 до ТПО та визначення активності ДАП IV у цитологічній діагностиці вузлів ЩЗ проведено імуноцитохімічне дослідження на препаратах ЩЗ 111 пацієнтів із РЩЗ, прооперованих в УНПЦЕХТЕОТ протягом 2008-2009 років. Серед них 28 ПРЩЗ, 24 ФРЩЗ, 32 макрофолікулярні аденоми (МА) та 27 фолікулярних аденом (ФА) іншої гістологічної будови. Усі діагнози було встановлено згідно з гістологічною класифікацією ВООЗ пухлин ЩЗ.

У межах міжнародного українсько-французького проекту «Дніпро» для оцінки впливу радіаційного опромінення та визначення генетичних чинників РЩЗ досліджено злоякісні пухлини дорослих пацієнтів, постраждалих внаслідок аварії на ЧАЕС, а також пацієнтів, які мешкали у незабруднених районах України, та пацієнтів із півдня Франції. Група хворих, які отримали певні дози радіоактивного опромінення, складалася з осіб, прооперованих в УНПЦЕХТЕОТ із приводу пухлинних утворень ЩЗ. Їх розподілили на підгрупи відповідно до офіційних (підтверджених свідоцтвами) категорій постраждалих від аварії на ЧАЕС: ліквідатори аварії, евакуйовані з 30-кілометрової зони, мешканці забруднених територій. Додатково аналізували групу пацієнтів, які були дітьми та підлітками на момент аварії на ЧАЕС (1969-1986 рр. народження).

Для дослідження використано гістологічні препарати ЩЗ пацієнтів, прооперованих із приводу РЩЗ у період 1994-2003 рр. на базі УНПЦЕХТЕОТ, а також на базі відділення ендокринної хірургії Університетського шпитального центру м. Марсель (Франція). Усього досліджено 50 випадків ПРЩЗ, у т.ч. 12 –

серед ліквідаторів, 17 – серед українських пацієнтів контрольної групи і 21 – серед французьких пацієнтів.

Для дослідження мутацій *BRAF* вибірку клініко-морфологічних даних проводили на базі УНПЦЕХТЕОТ разом із дослідниками медичних факультетів Університету Джона Хопкінса та Йельського університету, шпиталю Болонського університету: 32, 147, 17 і 29 випадків відповідно. Всього увійшли до дослідження 219 випадків ПРЩЗ. Гістологічно було виділено такі варіанти ПРЩЗ: класичний – 125 випадків, фолікулярний – 77, висококлітинний – 16 і колоноклітинний – 1.

Ретроспективно вивчали історії хвороб усіх прооперованих з приводу ПРЩЗ пацієнтів, яких спостерігали протягом 14-річного періоду (1990-2004 роки). Також досліджували **тканину ЩЗ (пухлинну)**, що була доступною для аналізу мутації *BRAF*. З метою визначення патогістологічного типу пухлини, демографічних характеристик і клінічного перебігу (рецидиви, результати радіойодтерапії) інформацію з клінічних даних узагальнювали з використанням стандартного протоколу. Патогістологічний діагноз встановлював досвідчений патологоанатом на препаратах, забарвлених гематоксиліном та еозином. Випадки недиференційованого/анапластичного раку до дослідження не включали. Рецидиви РЩЗ підтверджували скануванням із радіоактивним йодом, визначенням сироваткового тиреоглобуліну після первинного лікування та/або цитологічним або гістологічним дослідженням препаратів пухлини. Не розглядали випадки ПРЩЗ у дітей, які не досягли 18 років. З метою уникнення ефекту змішування з індукованою формою РЩЗ, українських пацієнтів, які не досягли 20 років на момент аварії на ЧАЕС, було також виключено з досліджуваної групи. У частині випадків мутації *BRAF* визначали у попередніх дослідженнях. Також використовували дані попереднього дослідження мутації *BRAF*, в яких цитологічні висновки ТАПБ не відрізнялися від остаточного патогістологічного діагнозу.

З метою оцінки можливості застосування рутинно забарвлених цитологічних препаратів ТАПБ для виділення ДНК та аналізу BRAFV600

мутації ретроспективно досліджено 134 цитологічні препарати пацієнтів, яким на базі УНПЦЕХТЕОТ проведено ТАПБ вузлів ЩЗ. Також оцінено ефективність даного методу у цитологічній діагностиці сумнівних ТАПБ і можливості ідентифікації пацієнтів із високим ризиком розвитку метастазів у групі з цитологічно діагностованим ПРЩЗ. Цитологічні висновки розподілено на дві категорії: сумнівні (30 випадків) і злоякісні (104 випадки). Усім пацієнтам виконано тиреоїдектомію та, за необхідності, центральну та/або латеральну дисекцію лімфатичних вузлів шиї. Гістологічний діагноз встановлено подвійним сліпим методом двома патологоанатомами згідно з критеріями ВООЗ. Серед випадків із сумнівними цитологічними висновками ТАПБ після остаточного патогістологічного дослідження виявлено 5 ФА, 5 аденом із клітин Гюртля, 10 ФРЩЗ і 10 фолікулярних варіантів ПРЩЗ. В усіх випадках зі злоякісними висновками ТАПБ після остаточного гістологічного дослідження встановлено діагноз РЩЗ: 11 випадків ФВПРЩЗ і 93 випадки класичного ПРЩЗ.

Для вивчення активації Akt проект досліджень схвалено вченими радами усіх закладів – учасників дослідження. Зразки тканини ЩЗ отримано з відома 66 пацієнтів (50 пацієнтів були прооперовані на базі УНПЦЕХТЕОТ, 16 – в Ітонському шпиталі та у Токійському медичному університеті). За результатами патогістологічного дослідження ФА склали 10 випадків, ФПНПМ – 10, ФРЩЗ – 10, ПРЩЗ – 26, ФВПРЩЗ – 10 випадків. Із 50 пацієнтів з України 19 безпосередньо зазнали впливу радіації внаслідок аварії на ЧАЕС. Після фіксації 10 % формаліном і заливки у парафін для кожного випадку було підготовлено серійні зрізи товщиною 5 мкм, забарвлено гематоксиліном та еозином. Усі гістологічні препарати було досліджено 2 патологоанатомами, патогістологічні діагнози встановлювали згідно з критеріями ВООЗ (2004).

В окрему групу було виділено 253 випадки папілярних мікрокарцином через суттєве розповсюдження цієї підгрупи папілярного РЩЗ останніми роками (до 20-30 %) і поширену думку щодо безпечності та незагрозливого характеру перебігу цієї форми пухлини.

У розробці питання можливості інвазії РЩЗ до прищитоподібних залоз та адекватної хірургічної тактики за таких умов проаналізовано випадки ураження прищитоподібних залоз ПРЩЗ і наслідки видалення 1-2 прищитоподібних залоз.

Для визначення клініко-морфологічних особливостей кістозно-дегенеруючого варіанту ПРЩЗ ретроспективно проаналізовано дані 68 хворих на ПРЩЗ, прооперованих на базі УНПЦХТЕОТ у період 2006-2008 роки. Усім пацієнтам проведено клінічне обстеження, УЗД ший, ТАПБ із наступним цитологічним аналізом, а також тотальну тиреоїдектомію з дисекцією лімфатичних вузлів із приводу ПРЩЗ. В усіх випадках, крім одного (підозра на папілярний рак), цитологічний діагноз встановлено у передопераційний період. В усіх випадках діагноз ПРЩЗ підтверджено під час остаточного патогістологічного дослідження. До I групи (основна група) увійшли 34 хворих із кістозними ПРЩЗ віком від 20 до 74 років (у середньому $46,15 \pm 2,76$ року) з розміром пухлини від 0,5 до 6 см (у середньому $2,09 \pm 0,22$ см). Серед них було 29 (85,3 %) жінок і 5 (14,7 %) чоловіків. Кістозними вважали ті пухлини, в яких вміст кістозного компонента складав ≥ 50 %. До II групи (група порівняння) увійшли 34 пацієнти приблизно такого ж віку (від 20 до 74 років, у середньому $46,18 \pm 2,75$ року), статевого складу: жінок – 26 (76,5 %) і чоловіків – 8 (13,5 %), з практично такими ж розмірами пухлин (від 0,5 см до 5,7 см, у середньому $2,04 \pm 0,23$ см). Для встановлення клініко-морфологічних особливостей кістозного ПРЩЗ досліджували загальновизнані прогностичні критерії пухлин (розмір, гістологічний варіант, наявність капсули, екстраорганної інвазії, багатофокусного росту, інвазії судин, метастазування у регіонарні лімфовузли), а також кількість і розмір метастатичних лімфовузлів. Для характеристики метастазування у регіонарні лімфатичні вузли використовували класифікацію TNM.

З метою вивчення можливості індивідуального прогнозування рецидиву захворювання та визначення оптимальної тактики післяопераційного моніторингу хворих, прооперованих із приводу ПРЩЗ, досліджено їх клініко-

морфологічні особливості. Ретроспективно проаналізовано дані 21 хворого з рецидивами ПРЩЗ, обстежених і прооперованих з приводу первинної та рецидивної пухлини на базі УНПЦЕХТЕОТ з 2000 по 2008 рік. Серед них було 18 (85,69 %) жінок і 3 (14,31 %) чоловіки. В усіх випадках проведено клінічні обстеження, УЗД ший, ТАПБ та остаточне патогістологічне дослідження. Хворих із віддаленими метастазами ПРЩЗ на момент первинної операції з приводу ПРЩЗ до дослідження не включено. Рецидивом захворювання вважали клінічно або ехографічно виявлені та морфологічно підтверджені пухлини у регіонарних лімфатичних колекторах ший у хворих на ПРЩЗ, які вважалися вилікуваними впродовж 6 місяців після тотальної тиреоїдектомії з дисекцією лімфатичних вузлів і радіойод-абляцією. Термін від видалення первинної пухлини до виявлення першого випадку рецидиву склав від 6 до 64 місяців (у середньому 22,24 місяця). Усі випадки розділено на дві групи ризику на підставі критеріїв AMES (Age – вік, Metastases – метастази, Extrathyroid invasion – екстратиреоїдна інвазія, Size – розмір пухлини) [46].

Для вивчення шляхів прогресії раку ЩЗ з окремим визначенням експресії генів у центральних ділянках пухлин і зонах інвазії ПРЩЗ матеріалом для дослідження послужили гістологічні препарати ПРЩЗ пацієнтів, прооперованих на базі УНПЦЕХТЕОТ. Зразки тканин для дослідження взято з огляду на необхідність порівняння центральних та інвазійних зон ПРЩЗ. До дослідження включали лише зразки пухлин ПР, які цілком складалися з клітин раку. Аби переконатися у цьому в усіх випадках попередньо проводили гістологічне дослідження заморожених зрізів. Випадки ПРЩЗ з ознаками лімфоцитарного тиреоїдиту або такі, в яких виявлено менше від 90 % клітин ПРЩЗ, виключали з дослідження. Зразки тканини залози взято з центральних ділянок пухлини, із зони інвазії та з протилежної, гістологічно нормальної частки. Інформативними вважали препарати пухлин, в яких визначали 90 % і більше епітеліальних клітин.

Всього до дослідження включено 34 випадки ПРЩЗ у пацієнтів, серед яких було 3 чоловіки та 31 жінка, середній вік хворих склав $39,2 \pm 4,6$ року (від 9 до 68 років), а середній розмір пухлини – $22,2 \pm 4,3$ мм (від 9 мм до 45 мм).

З метою вивчення мезенхімальних властивостей клітин інвазійного РЩЗ досліджено метилювання та експресію Е-кадгерину на гістологічних препаратах 66 випадків ПРЩЗ і 34 відповідних лімфатичних вузлах із метастазами.

Матеріалом для дослідження чутливості до ВПГ доброякісних і злоякісних пухлин ЩЗ, а також клітинних ліній раку *in vitro* послужили гістологічні препарати 70 пацієнтів, прооперованих на базі УНПЦЕХТЕОТ із приводу доброякісних і злоякісних пухлин ЩЗ. За результатами патогістологічного дослідження, проведеного відповідно до критеріїв ВООЗ, виявлено 14 випадків АІТ, 30 ФА, 16 ФРЩЗ, 43 ПРЩЗ і 6 випадків АРЩЗ.

2.2. Методи дослідження

У роботі використано методи клінічного обстеження, статистичної обробки масивів інформації, інструментальні та лабораторні методи діагностики. До їх числа входили такі:

Вивчення клінічних даних історій хвороб.

Ультразвукове дослідження ЩЗ і лімфатичних вузлів шиї на апараті «ЕCHO CAMERA SSD-1200 ALOCKA» (Японія) з електронним датчиком 7,5 МГц, з 2003 року – на апараті «PHILIPS En Visor» (Нідерланди) з доплерівським картуванням, а з 2006 р. – «Toshiba» (Японія).

Для дослідження функціонального значення гіпопаратиреозу усім пацієнтам, використовуючи нативну сироватку крові, у перед- і післяопераційний періоди визначали вміст кальцію на аналізаторі іонізованого кальцію CIBA CORNING 634 (Велика Британія) на іоноселективних електродах (норма – 1,01-1,31 ммоль/л).

Тонкоголкова аспіраційна пункційна біопсія під контролем і без контролю УЗД із терміною оцінкою якості отриманого матеріалу шляхом мікроскопічного дослідження цитологічних препаратів, забарвлених толуїдиновим синім.

Аспірати ТАПБ вузлів ЩЗ наносили на предметні скельця, висушували за кімнатної температури та забарвлювали за методом Май-Грюнвальда-Гімза. Цитологічне дослідження аспіратів вузлів ЩЗ проведено за допомогою світлової мікроскопії на мікроскопі «Leica» (Німеччина). Результати цитологічного дослідження розподілено та чотири групи: неінформативні (менше від 100 клітин у препараті), доброякісні (відсутні цитологічні ознаки злоякісності), сумнівні (випадки з цитологічними ознаками атипії та «фолікулярної неоплазії») та злоякісні.

У роботі застосовано два основних різновиди ТАПБ вузлів ЩЗ: під контролем УЗД і без ультразвукового контролю. Для вузлів ЩЗ понад 1,0 см у діаметрі в наших дослідженнях проводили пункцію без ультразвукового контролю за умови, якщо попереднє УЗД дозволяло точно визначити розміри вузла, його ехоструктуру та розташування відносно магістральних судин ший. Цю інформацію використовували у виборі способу пункції та оптимального доступу до вузла. Додаткові утворення з підвищеною ехогенністю пунктували аспіраційною голкою 25G, кістоподібно дегенеруючі вузли та кісти пунктували голкою більшого калібру – 23G або 21G, що забезпечувало забирання значної кількості рідини. Після максимально можливого її видалення проводили повторну пункцію голкою меншого калібру для отримання клітинного матеріалу.

Результати стандартного цитологічного дослідження ґрунтувалися на аналізі аспіратів вузлів ЩЗ з урахуванням певних морфологічних критеріїв: характер колоїду, локалізація та щільність скупчень клітин, їх розміри та форма, наявність елементів запалення, багатоядерних клітин і макрофагів. На підставі цих даних визначали гістологічний тип новоутворень та оцінювали рівень ризику їх злоякісності.

Для морфометричного аналізу цифрових зображень структури хроматину ядер пухлин ЩЗ поля зору відібрано випадково (близько 100 ядер фолікулярних клітин у кожному полі зору за X100 збільшення). Кожне ядро оцінювали за шістнадцятьма критеріями. Досліджувані показники розділили на три групи: (I) ознаки розміру та форми, (II) денситометричні властивості і (III) текстурні особливості. Для калібрування статистичної моделі аналізу спочатку аналізували ядра у типових пухлинах (ФА, ФРЩЗ, ПРЩЗ), а потім у ФПНПМ.

Імуноцитохімічне дослідження на аспіратах вузлів ЩЗ із використанням моноклональних антитіл до тиреоглобуліну, тиреокальцитоніну («Vector», Велика Британія) та МоАт 47 проти ТПО («Coger», Франція) у розведенні 1:50 із застосуванням стрептавідин-біотин-пероксидазного універсального набору («DAKO» «Glostrup», Нідерланди) за рекомендованою методикою.

Для цитохімічного визначення активності ДАП IV аспіраційний матеріал фіксували та забарвлювали відповідно до методичних рекомендацій.

Імуногістохімічне дослідження з використанням набору Vectastain Universal Quick згідно з інструкцією виробника. Результати дослідження інтерпретували 3 незалежні патологоанатоми за наявністю або відсутністю забарвлення.

Експрес-гістологічне дослідження вузлів ЩЗ і регіонарних лімфатичних вузлів під час операції з метою підтвердження діагнозу злоякісності та виявлення метастазів. Дослідження проводили на заморожених зрізах, які отримували на кріостаті «Leica» (Німеччина), забарвлювали толуїдиновим синім та оцінювали за допомогою світлового мікроскопу «Leica» (Німеччина).

Гістологічне дослідження операційного матеріалу після стандартної обробки та забарвлення парафінових зрізів гематоксилін-еозином і світлової мікроскопії за допомогою мікроскопа «Leica» (Німеччина). Верифікацію гістологічних діагнозів проводили за допомогою патогістологічних методів, заснованих на критеріях загальноприйнятої класифікації ВООЗ пухлин ЩЗ.

Виділення ДНК зі свіжозаморожених або парафінових зрізів пухлинної тканини ЩЗ пацієнтів із ПРЩЗ проводили шляхом стандартної фенол-хлороформної екстракції з етанолом із використанням QI-Amp DNA mini kit.

Мутацію *BRAF*^{T1799A} аналізували з використанням геномної ДНК прямим секвестуванням і колориметричним методом за допомогою набору Mutector. Для прямого секвестування екзону 15 ген *BRAF* було помножено полімеразно-ланцюговою реакцією, після чого виконували реакцію прямого секвестування Big Dye terminator. Послідовність ДНК аналізували на генетичному аналізаторі ABI PRISM 3730.

Виділення ДНК із рутинно забарвлених цитологічних препаратів ТАПБ за допомогою комплекту для екстракції ДНК (Zymo Research, Ірвін, Каліфорнія, США) відповідно до процедури виробника. Виявлення мутації *BRAF* V600E проведено за допомогою прямого секвестування геномної ДНК і колориметричного методу з використанням набору PCR Master Mix (SABiosciences, Фредерік, Меріленд, США).

Ампліфікацію екзонів *N2-RAS* проведено за допомогою ПЛР із використанням відповідних праймерів і набору HotStar Taq DNA Polymerase (Qiagen). Продукти ПЛР оцінено за допомогою електрофорезу на 3 % агарозному гелі.

Транслокації *RET/PTC1* і *RET/PTC3* визначали у злоякісних пухлинах ліквідаторів аварії на ЧАЕС шляхом зворотної транскриптаз-полімеразної ланцюгової реакції (ЗТ-ПЛР) і гібридизації з радіоміченим зондом.

Імуногістохімічне дослідження *RET*-білка проведено після пригнічення ендогенної пероксидази з використанням поліклональних антитіл C19 (Vector Lab, Burlingame, Каліфорнія, США) у розведенні 1:100 і набору для візуалізації імунної реакції Vectastain Universal Quick kit (Vector Lab).

Імуногістохімічне дослідження Runx2, фібронектину, остеопоетину, віментину проведено із застосуванням специфічних антитіл (Cemines, Golden, CO, AB/RN20, Santa Cruz, sc-6952, Assay Designs, Ann Arbor, MI, 915-034 та Sigma, B-6634) за стандартними методиками. Для кожного дослідження

включено негативні контролі без додавання первинних антитіл. Для виявлення функціональних груп генів, залучених до процесів інвазії ПРЩЗ, у кожному випадку порівнювали ступінь експресії генів у центральних зонах пухлин і у нормальній тканині залози, а також у зонах інвазії та центральних ділянках пухлини.

Імуноцитохімічне визначення HBME-1 проводили на додаткових аспіратах ЩЗ, отриманих під час операції та заморожених за температури -20°C . Первинні антитіла HBME-1 використовували у розведенні 1:100. Результати імуноцитохімічного дослідження HBME-1 оцінено двома незалежними морфологами без знання остаточного гістологічного діагнозу та результатів визначення ТПО і ДАП IV і за допомогою напівкількісного аналізу: «-» – негативна реакція, «+»/«-» – слабка реакція ($<10\%$ позитивно реагуючих клітин), «+» – помірна реакція ($10\text{--}50\%$ клітин), «++» – позитивна реакція ($>50\%$ клітин).

Для оцінки результатів цитологічного дослідження аспіратів ЩЗ використано критерії діагностичної інформативності, що застосовуються у лабораторній діагностиці [199]. Згідно з цими рекомендаціями, діагностична чутливість (ДЧ) – це відсоток вірно діагностованих злоякісних новоутворень, діагностична специфічність (ДС) – відсоток вірно діагностованих доброякісних новоутворень, діагностична ефективність (ДЕ) – відсоток сукупності усіх вірно діагностованих випадків. Зазначені поняття розраховували за стандартними формулами.

Для імуофлюоресцентного аналізу клітини вирощували з використанням вторинних кон'югованих антитіл Alexa Four 488 (США).

Конфокальні зображення тканин ПРЩЗ і ФРЩЗ отримували за допомогою мікроскопу Zeiss LSM 510, обладнаного спектральним детектором (Carl Zeiss ікс., Німеччина) у режимі лямбда з лінзами об'єктиву а663 Plan-Apochromat (NA 1.4).

Імуногістохімічні дослідження Е-кадгерину проведено із застосуванням специфічних антитіл до Е-кадгерину (sc-21791) та універсального набору

Vectastain Universal Quick kit (США). Для кожного дослідження включено негативні контролю без додавання первинних антитіл. Імунофлюоресцентне дослідження проведено з використанням відповідних вторинних антитіл і набору Prolong anti-fade kit (США).

Онкогенний статус (*RET/PTC1*, *RET/PTC3*, *BRAF* і *N2-RAS*) визначено у 73 пухлинах ЩЗ. Клітинні лінії ФРЩЗ (FTC133, FTC236 і FTC238), ПРЩЗ (TPC1, KTC і BCRAP)) і WRO клітини людини вирощували у середовищі RPMI-1640 medium (Invitrogen) та обробляли фармакологічним інгібітором P13K/Akt сигнального шляху, TNF- α та інгібітором MEK1/2 (Cell Signaling Technology, США).

Експериментальну модель міграції клітин ПРЩЗ досліджено в камері Боуена з мембраною, вкритою матригелем. Ефективність міграції оцінювали за допомогою мембранного забарвлення за методом Diff-Quick kit. Ступінь росту клітин досліджували з використанням набору для оцінки життєздатності клітин Vi-CELL™ Cell Viability Analyzer (США) відповідно до інструкцій виробника.

Штами вірусу простого герпесу КОС і вірус простого герпесу II типу виділено з інфікованих клітин. Для експериментальних заражень клітини ЩЗ посіяно у 12-лункові планшети (3×10^4 клітин в 1 мл середовища). Ефективність інфекції перевірено виявленням вірусної ДНК і білка у клітинах ЩЗ.

Виділення вірусної ДНК і РНК проведено з парафінових препаратів пухлин і клітинних культур ПРЩЗ із застосуванням TRIzol реагенту. Ампліфіковані продукти візуалізували після електрофорезу на 2 % розчині поліакриламідного гелю.

Імуногістохімічне виявлення вірусного білка проведено із використанням антитіл HSV-1/2 gG (SC-57861, Santa Cruz Biotechnology, США) та універсального набору anti-HSV capsid protein Light Diagnostics HSV DFA kit (США). Також на гістологічних препаратах ЩЗ досліджено експресію з такими антитілами: anti-interferon beta (IFN- β) (ab25470, Велика Британія), anti-NF κ B p65 (MAB3026, США), p-AKT1/2/3 (SC-7985), anti-Nectin-1 (H-62) (Santa Cruz

Biotechnology, США) та універсального набору Vectastain Universal Quick kit (США).

Виявлення Nectin-1 за допомогою вестерн-блот-аналізу проведено з використанням специфічних первинних, вторинних антитіл і системи імунологічної та кількісної візуалізації Li-Cor Odyssey (США).

Статистичний аналіз отриманих результатів проведено за допомогою програми SPSS software (version 13.0, SPSS Inc., США), де вірогідними вважали результати із $p < 0,05$. Також визначено чутливість (Ч), специфічність (С), співвідношення кількості хибно-позитивних і хибно-негативних результатів. Визначено середнє арифметичне та середньоквадратичне відхилення. Порівняння середніх групових значень та оцінку вірогідності відмінностей виконували за параметричними і непараметричними методами варіаційної та рангової статистики із застосуванням t-критерію Стьюдента-Фішера, U-критерію Вілкоксона-Манна-Уїтні. Критерій Стьюдента застосовували за рівномірного розподілу варіаційного ряду, Фішера – за нерівномірного. Методи непараметричної рангової статистики застосовували для обчислення невеликої кількості спостережень (до 30), які не відповідали закону нормального розподілу. U-критерій Вілкоксона-Манна-Уїтні застосовували через те, що він найсуворіший з усіх непараметричних критеріїв і є аналогом t-критерію для перевірки середніх значень. Два порівнювані показники вважали клінічно еквівалентними, якщо 95 % довірчий інтервал був у межах ± 5 % різниці. Значення кількісних змінних проаналізовано за допомогою непараметричного тесту Колмогорова-Смірнова. З метою визначення змінних, за допомогою яких можливо відрізнити ядра клітин ФА, ФРЦЗ, ФВПРЦЗ, проведено дискримінантний аналіз із попереднім ступінчастим відбором змінних на підставі мінімізації лямбди Wilk із розрахунком 3 формул, що визначали три типи клітин ЦЗ. У сумісних багатоцентрих міжнародних дослідженнях категорійні дані підсумовували, використовуючи частоти та відсотки. Одержані дані підсумовували з медіанами та міжквартильними розмахами за допомогою chi-square тесту та точного тесту Фішера. Непараметричні статистичні

величини порівнювали з неперервними змінними. Порівняння 2 груп проводили за допомогою критерію рангової суми Вілкоксона, а порівняння 3 груп – із використанням критерію рангової суми Крускала-Уолліса. Довірчий інтервал підраховали за допомогою стандартних методів. Усі значення «р» були двобічними.

РОЗДІЛ 3

КЛІНІКО-МОРФОЛОГІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ ПУХЛИН ЩИТОПОДІБНОЇ ЗАЛОЗИ ФОЛІКУЛЯРНОГО ПОХОДЖЕННЯ

3.1. Порівняльна характеристика фолікулярної аденоми та раку щитоподібної залози фолікулярного походження

Фолікулярна аденома ЩЗ – це цілком інкапсульована пухлина без ознак інвазії, характерних для ФРЩЗ, і без типових для ПРЩЗ ознак атипії ядер [71, 246]. Термін «фолікулярна пухлина з невизначеним потенціалом малігнізації» запропоновано для характеристики ФА, які за своїми морфологічними ознаками солідного росту відрізняються від звичайної аденоми, а після дослідження серійних зрізів капсули пухлини не виявляються ознаки інвазії капсули або судин [33]. Відповідно до критеріїв ВООЗ 2004 р., ФПНПМ входить до класу ФА та характеризується значною щільністю клітин, наявністю мітозів і цитологічних ознак атипії. На практиці такі пухлини важко диференціювати з ФВПРЩЗ, для якого характерна фолікулярна будова, ядерні ознаки ПРЩЗ, наявність або відсутність ознак інвазії. З метою вирішення цієї діагностичної проблеми до ФПНПМ включено пухлини з «обмеженими ядерними ознаками ПР» (ОЯОПР) [72]. Нарешті, як зазначено в останньому виданні класифікації пухлин ЩЗ [71], термін «атипова аденома» став «сміттєвою корзиною, до якої неадекватно відносять будь-які випадки пухлин із невизначеними ознаками ядерної атипії». Для уникнення неточностей діагностики та лікувальної тактики, запропоновано замінити термін «атипова аденома» на «фолікулярну пухлину з невизначеним потенціалом малігнізації», що дозволяє патологам відносити такі пухлини до класу доброякісних. Проте у деяких випадках пухлин із ОЯОПР описано віддалені метастази, що стало причиною наполягання багатьма патологами на віднесенні таких пухлин до класу злоякісних [32]. Ця проблема пояснює тенденцію до гіпердіагностики ФВПРЩЗ, а також наявність значних розбіжностей в інтерпретаціях ядерних

ознак ПРЦЗ патологами [32]. З метою відокремити подібні пухлини для подальшого вирішення даної проблеми групою експертів-патологів міжнародного проекту «Чорнобильський банк тканин» запропоновано віднести ФПНПМ до групи «диференційованих пухлин із невизначеним потенціалом злоякісності» [www.Chornobyltissuebank.com]. Це підтверджує існуючу концепцію, відповідно до якої такі пухлини мають низку ознак РЦЗ і можуть мати передраковий характер [64].

Порушення у гені *RET* відіграють важливу роль у розвитку ПРЦЗ через транслокації *RET/PTC* [133], у той час як мутації онкогена *RAS* у кодоні 61 *N-RAS* (*N2-RAS*) є характерними для ФРЦЗ [258]. Показано кореляцію активації *RET* із ядерними ознаками ПРЦЗ [31]. Проте інтерпретація структури хроматину під час гістологічного дослідження є дуже суб'єктивною [197]. Для розробки об'єктивних критеріїв діагностики пухлин ЦЗ проаналізовано ядерні ознаки різних типів фолікулярних пухлин із застосуванням комп'ютерної морфометрії [79]. З метою оцінки біологічного значення ядерних змін у ФПНПМ за допомогою комп'ютерної морфометрії проаналізовано цифрові зображення ядер клітин типових й атипових фолікулярних пухлин ЦЗ. Отримані дані порівняно з результатами визначення мутації *N2-RAS* та активації *RET*.

За результатами комп'ютерного аналізу зображень відібрано 12/16 найбільш дискримінативних змінних: 4 змінні розміру та форми, 2 денситометричні змінні та 6 текстурних змінних. 3000 моделей клітин розподілено на три групи: характерні для ФА (кФА), типові для ФРЦЗ (кФР) і типові для ПРЦЗ (кПР) клітини. Застосуванням комп'ютерної формули, яка визначала тип клітин, серед 3000 клітин рекласифіковано 73,6 % (рис. 3.1). За результатами аналізу зображень 1000 клітин ФА склалися з 75,5 % кФА, 15,6 % кФР і 8,9 % кПР, у 1000 клітин, отриманих із ФРЦЗ, 56,8 % відповідали кФР, 27,0 % – кФА і 16,2 % – кПР, серед 1000 клітин, отриманих із ФВПРЦЗ, 87,7 % відповідали кПР, 11,3 % – кФР і 1,0 % – кФА. Морфологічні особливості ядер, характерні для ФРЦЗ і ПРЦЗ, наведено на рис. 3.2.

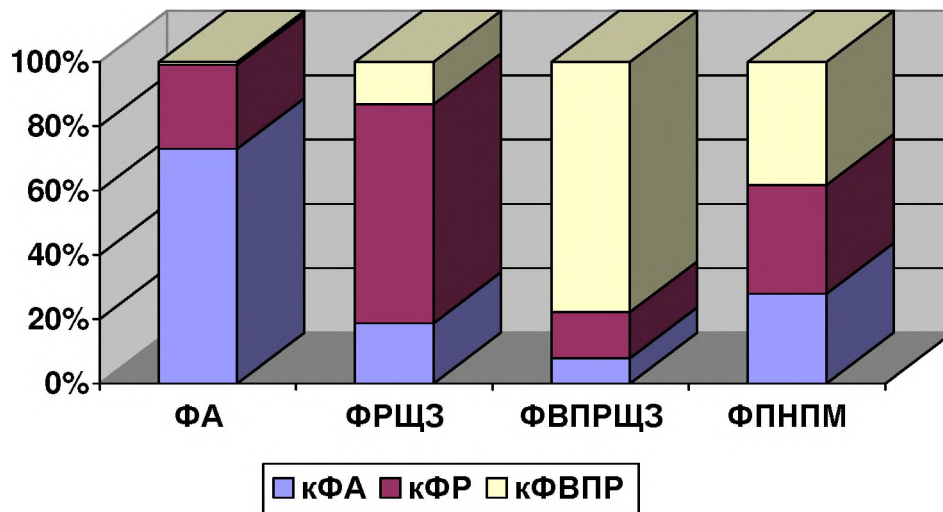


Рис. 3.1. Результати морфометричної рекласифікації клітин фолікулярної аденоми (ФА) фолікулярного раку (ФРЦЗ), фолікулярного варіанту ПРЦЗ (ФВПРЦЗ) та фолікулярної пухлини з невизначеним потенціалом малігнізації (ФПНПМ): кПР – клітини, характерні для ФВПРЦЗ; кФР – для ФРЦЗ; кФА – для ФА.

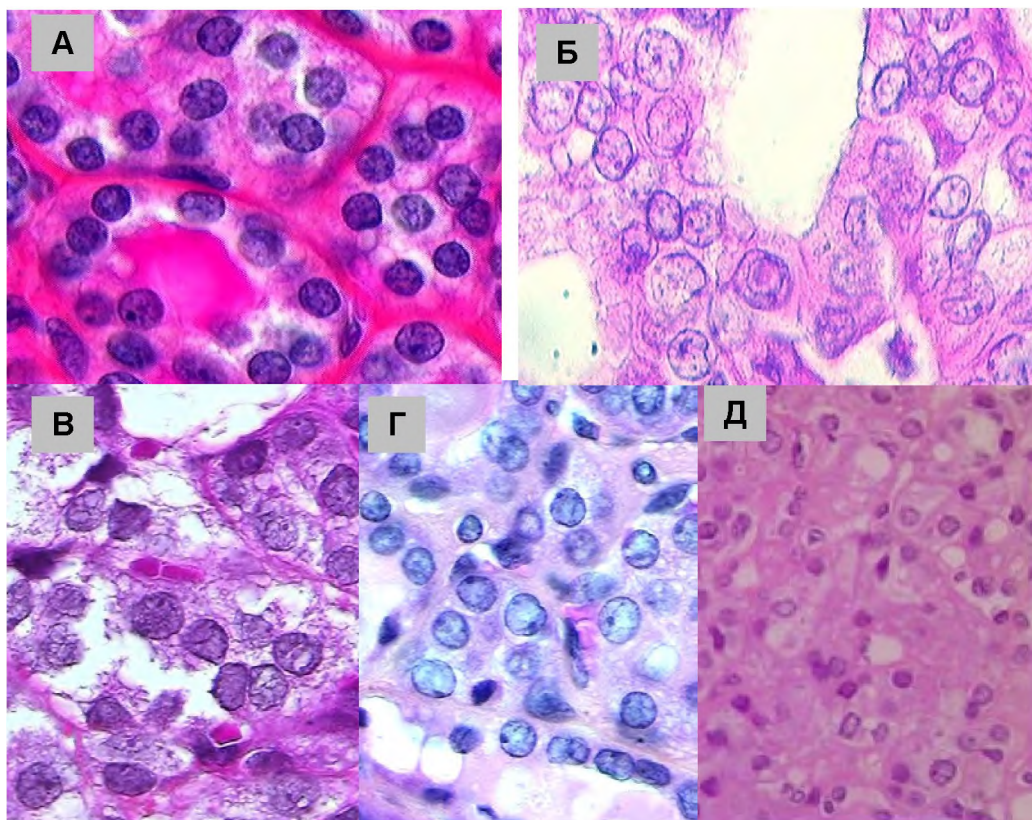


Рис. 3.2. Морфологічні ознаки клітин фолікулярної аденоми (А), фолікулярного варіанту ПРЦЗ (Б), ФПНПМ із обмеженими ядерними ознаками ПР (В, Г, Д). Гематоксилін-еозин, $\times 200$, $\times 400$.

Індивідуальне морфометричне дослідження окремих пухлин показало, що у 9/10 випадків ФА представлено кФА. В одному випадку ФА виявлено 5,1 % кФА, 35,2 % кФР і 55,4 % кПР. У 7/10 випадків ФРЦЗ визначено переважання кФР. У 2 випадках ФРЦЗ кількість кФР і кПР була однаковою, а в одному випадку ФРЦЗ із мінімальною інвазією переважали кФА (89,6 %). У 10/10 ФВПРЦЗ переважали кПР.

У цілому по групі із дев'яти ФПНПМ пропорція кФА, кФР і кПР була майже однаковою (27,9 %, 33,8 % і 38,3 % відповідно). У 2/9 випадків ФПНПМ переважали кФА, у 2/9 – кФР і у 3/9 – кПР. В одному із цих випадків визначено майже однакову кількість кФР і кПР (46,8 % і 49,2 % відповідно), у другому – 24,5 % кФА, 30,8 % кФР і 46,1 % кПР. Типові морфологічні ознаки ФПНПМ наведено на рис. 3.3, 3.4.

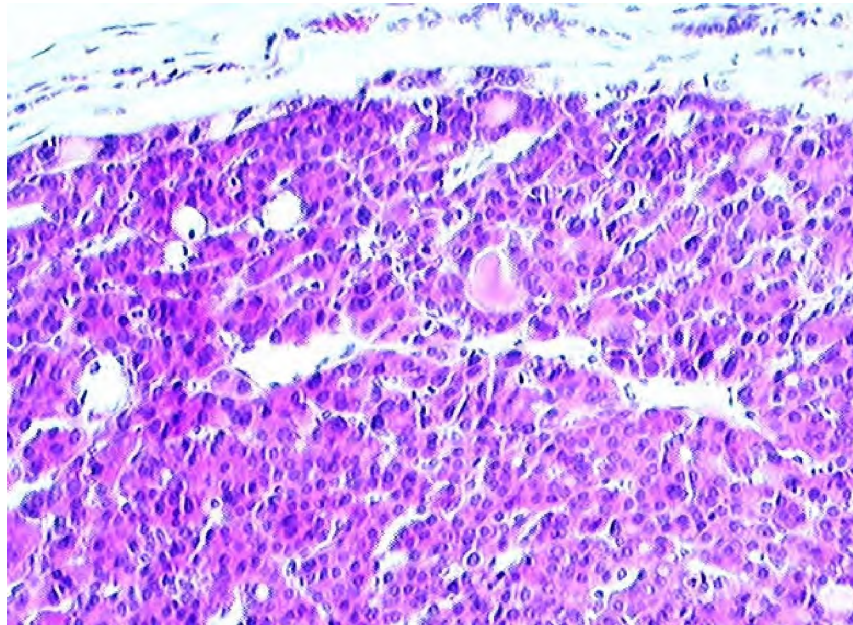


Рис. 3.3. Морфологічні ознаки клітин фолікулярної пухлини із невизначеним потенціалом малігнізації (ФПНПМ). Гематоксилін-еозин, $\times 200$.

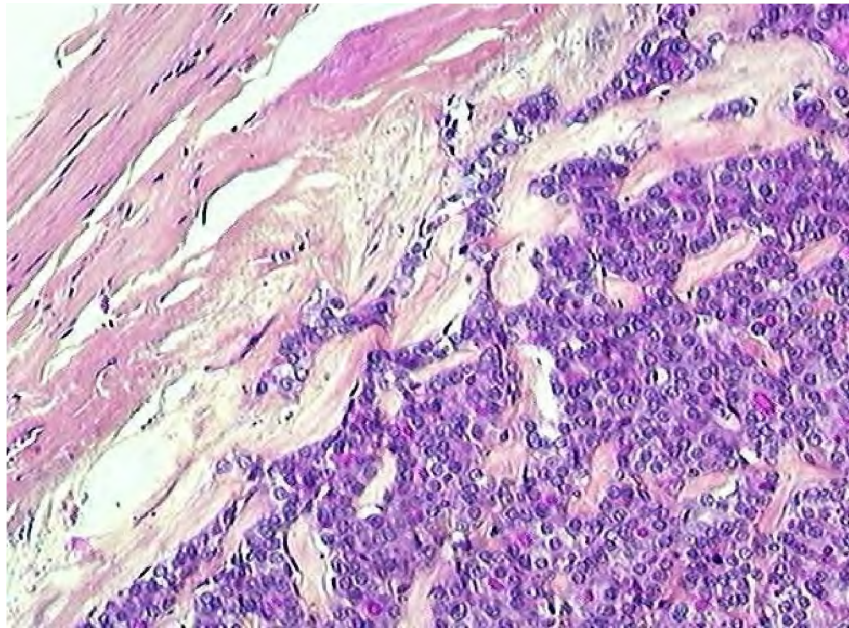


Рис. 3.4. Відсутність ознак інвазії капсули, типових для ФРЩЗ за фолікулярної пухлини із невизначеним потенціалом малігнізації (ФПНПМ). Гематоксилін-еозин, $\times 200$.

Мутації *N2-RAS* у кодоні 61 виявлено в 0/10 випадків ФА (0 %), у 2/10 ФРЩЗ (20,0 %), у 2/10 ФВПРЩЗ (20,0 %) і у 3/9 ФПНПМ (33,3 %). Навіть після повторного гістологічного дослідження пухлин із мутаціями *N2-RAS* морфологічних ознак злоякісності виявлено не було. Не визначено кореляції між частотою мутації *N2-RAS* і вмістом у пухлині кФА, кФР і кПР.

Позитивну імуногістохімічну реакцію з антитілами до RET-білка виявлено в 0/10 випадків ФА (0 %), у 2/10 ФРЩЗ (20,0 %), у 5/10 ФВПРЩЗ (50,0 %). Реакція була помірною або слабкою та локалізувалася у цитоплазмі. Визначено істотну кореляцію між експресією *RET* і кількістю кПР у досліджуваних пухлинах ($p=0,001$). З іншого боку, визначено обернено пропорційний зв'язок між кількістю кФА та експресією *RET* ($p=0,007$). У трьох пухлинах (1 ФПНПМ, 1 ФРЩЗ і 1 ФВПРЩЗ) визначено імунологічну реактивність *N2-RAS* і *RET*. У цих випадках позитивну імуногістохімічну реакцію виявлена лише у клітинах зі світлими ядрами.

3.2. Прогностичне значення гістологічних варіантів папілярного раку щитоподібної залози

Визначено низку чинників, які мають прогностичне значення для ПРЩЗ. До них належать: вік і стать пацієнта, розмір пухлини, багатофокусність її росту, екстраорганна інвазія, метастазування [48]. За результатами окремих досліджень вважається, що одним із чинників, який впливає на результати лікування пацієнтів із ПРЩЗ, є його гістологічний варіант [162]. Наприклад, для висококлітинного та колоноклітинного варіантів ПРЩЗ характерний агресивніший порівняно з класичним варіантом перебіг [116]. Метою даного розділу роботи було встановлення асоціації між різними гістологічними варіантами ПРЩЗ і групами ризику відповідно до AMES системи ризику [46].

Ретроспективно проведено дослідження 114 гістологічних препаратів та історій хвороб пацієнтів, прооперованих із приводу ПРЩЗ на базі хірургічного відділення УНПЦЕХТЕОТ протягом 2003-2006 рр. За результатами патогістологічного дослідження виділено гістологічні варіанти ПРЩЗ і розділено їх на дві групи ризику відповідно до класифікації AMES.

Визначення груп ризику відповідно до класифікації AMES [46]

Група низького ризику:

А. Пацієнти без віддалених метастазів

(чоловіки до 41 року, жінки до 51 року).

Б. 1) пухлина без ознак екстраорганної інвазії;

2) пухлина < 5 см;

3) без віддалених метастазів.

Група високого ризику:

всі пацієнти з віддаленими метастазами

1) пухлина з ознаками екстраорганної інвазії;

2) пухлина ≥ 5 см.

Статистичний аналіз клініко-морфологічних даних виконано з використанням описового та параметричного методів. Статистично значущим вважалось значення $p < 0,05$.

Серед 114 пацієнтів були 101 (88,6 %) жінка і 13 (12,4 %) чоловіків. Вік пацієнтів коливався від 19 до 72 років (середній вік – $45,5 \pm 4,3$ року). Класичний варіант ПРЩЗ виявлено у 58 випадках (50,9 %), інкапсульований – у 4 (3,5 %). Під час гістологічного дослідження таких випадків ПРЩЗ виявлялися різні за формою та розмірами сосочки. Як правило, вони розташовувались у порожнинах кіст і складали основну масу пухлини (рис. 3.5).

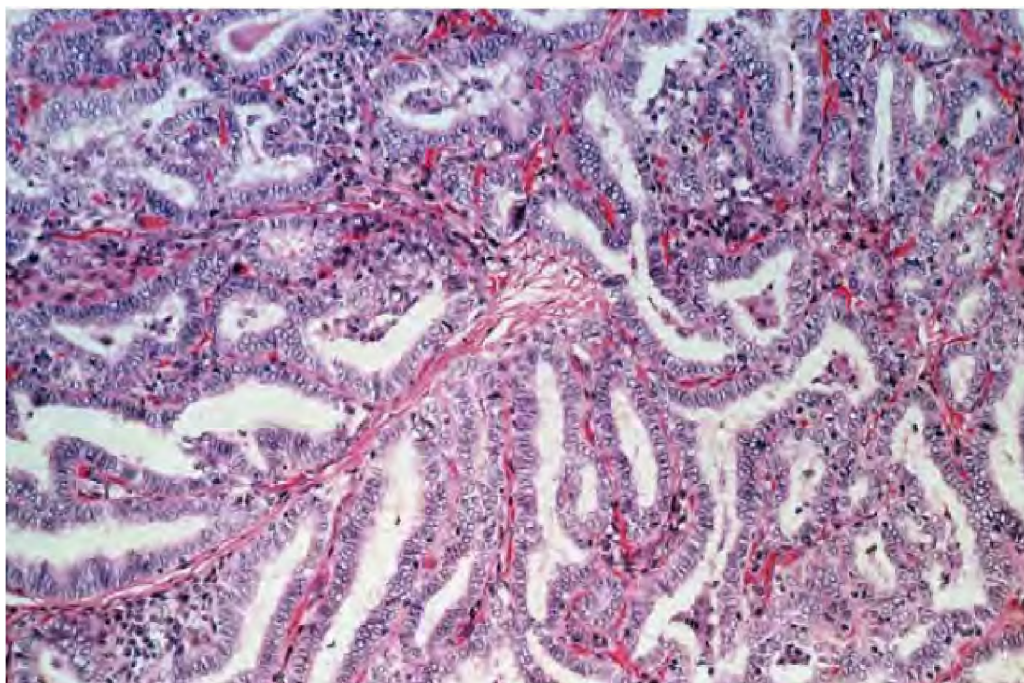


Рис. 3.5. Класичний варіант папілярного раку щитоподібної залози. Пухлину представлено гіллястими папілами, вкритими одношаровим епітелієм з ядрами типу «матових скелець». Гематоксилін-еозин, $\times 200$.

Серед 114 випадків ПРЩЗ висококлітинний варіант виявлено у 20 (17,5 %) випадках. Ці пухлини характеризувалися переважанням комбінації папілярної та трабекулярної будови, тоді як фолікулярний тип будови виявлявся зрідка. Фолікулярному епітелію цього варіанту властива рясна

цитоплазма та ядра, схожі на такі для класичного варіанту, проте борозни та внутрішньоядерні включення виявлялися зрідка (рис. 3.6).

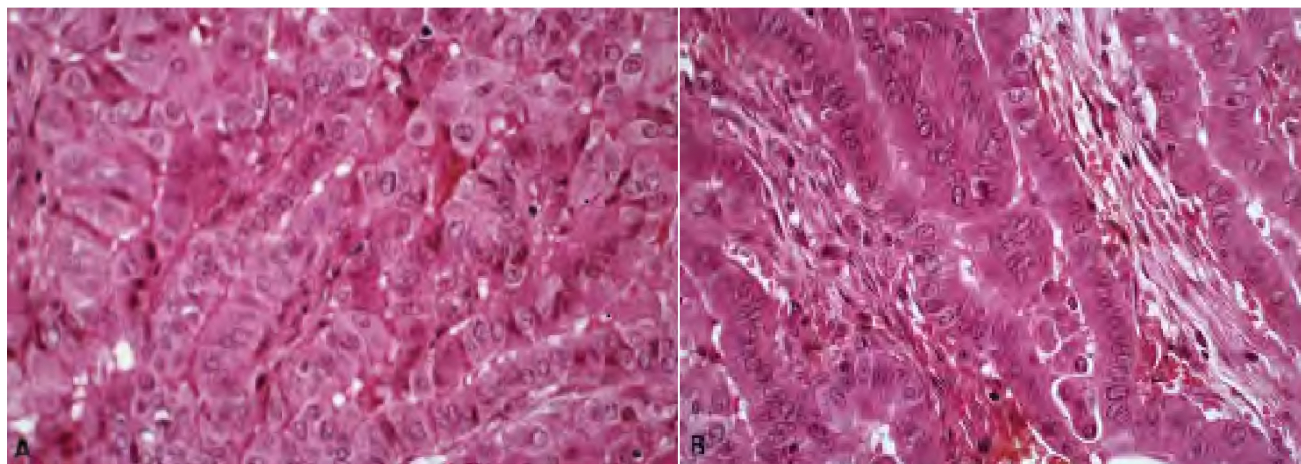


Рис. 3.6. Висококлітинний варіант папілярного раку щитоподібної залози. Гематоксилін-еозин, $\times 200$.

У 15 зі 114 досліджуваних випадків пухлин (13,2 %) виявлено ФВПРЩЗ. Такі пухлини представлено фолікулами маленьких і середніх розмірів, неправильної форми, папілярні структури відсутні. У просвітку фолікулів виявлявся еозинофільний або фестончатий колоїд. Більшість клітин, що вистилали фолікули, мали великі світлі ядра з борознами та внутрішньоядерними включеннями (рис. 3.7).

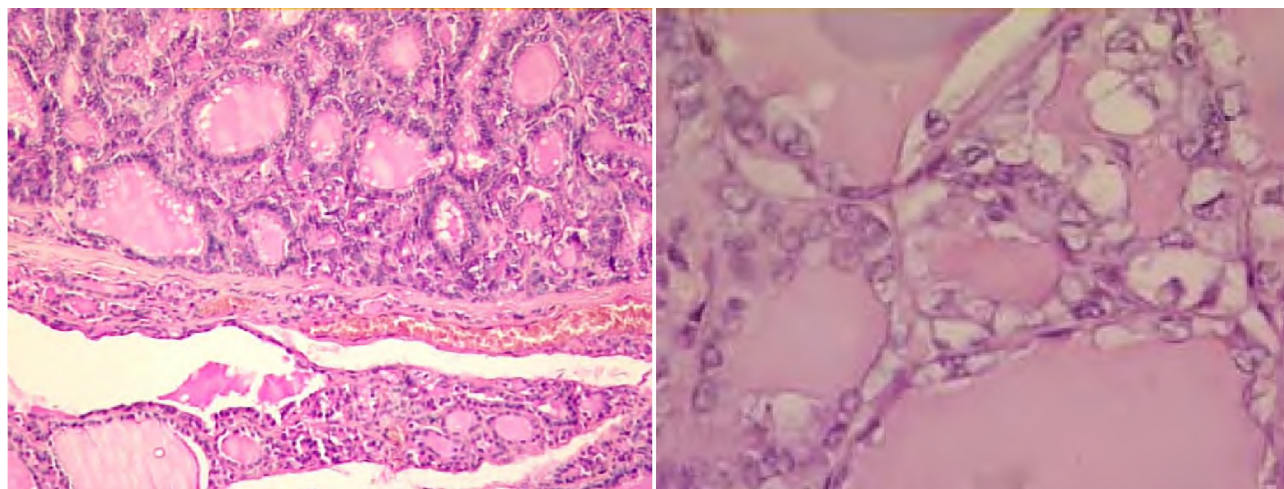


Рис. 3.7. Фолікулярний варіант папілярного раку щитоподібної залози. Гематоксилін-еозин, $\times 200$.

У 14/114 спостереженнях (12,3 %) виявлено папілярну мікрокарциному. У переважній більшості випадків ПМЩЗ не були інкапсульованими та мали склерозовану строму. У ПМЩЗ маленьких розмірів (менше від 5 мм) визначався фолікулярний тип будови (рис. 3.8), а папілярну будову мали пухлини більших розмірів.

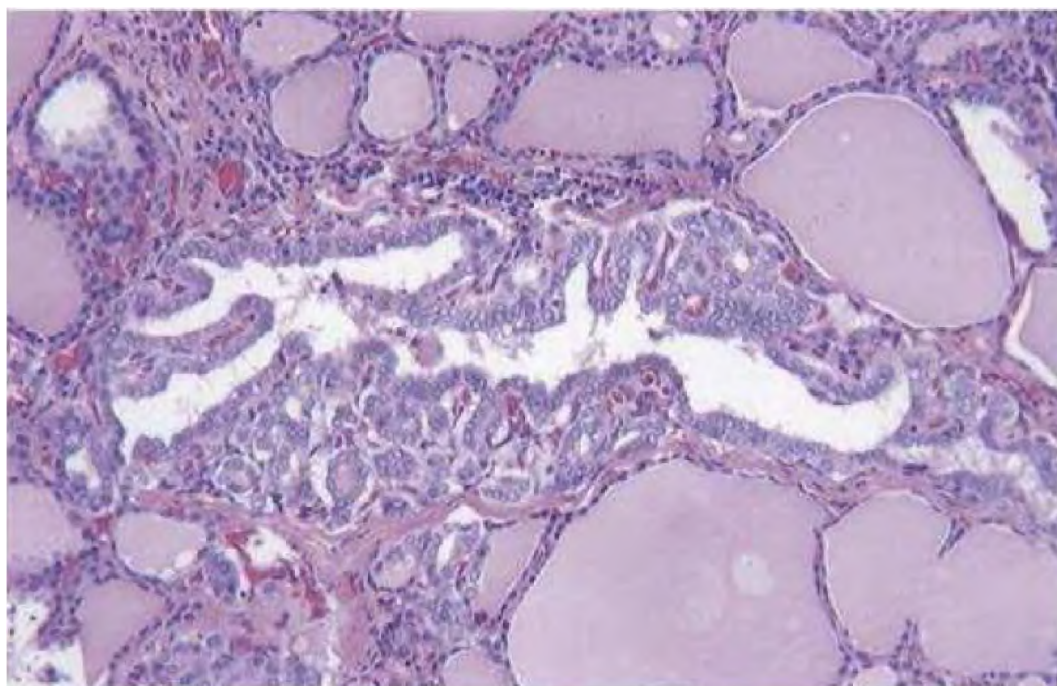


Рис. 3.8. Папілярна мікрокарцинома щитоподібної залози. Гематоксилін-еозин, $\times 100$.

У трьох випадках виявлено солідний варіант ПРЩЗ (2,6 %). У цих пухлинах переважав солідний тип будови, фолікулярний епітелій із типовими для ПРЩЗ ядерними ознаками. У двох із цих пухлин виявлено ознаки інвазії судин та екстраорганної інвазії (рис. 3.9).

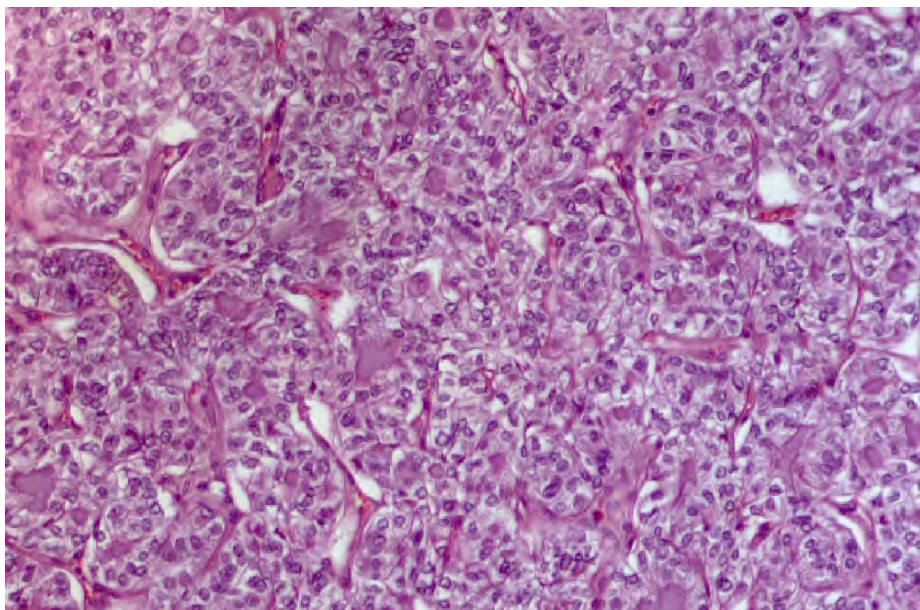


Рис. 3.9. Солідний варіант папілярного раку щитоподібної залози. Гематоксилін-еозин, $\times 400$.

Відповідно до критеріїв AMES до групи низького ризику увійшли 86 пацієнтів (75,4 %), до групи високого ризику – 28 пацієнтів (24,6 %). Співвідношення груп ризику та різних гістологічних варіантів ПРЩЗ наведено на рис. 3.10. Серед випадків солідного та висококлітинного варіантів ПРЩЗ найбільшу частку віднесено до групи високого ризику – 72,0 % і 29,5 % відповідно. Серед випадків класичного варіанту ПРЩЗ, фолікулярного його варіанту та мікрокарциноми до групи високого ризику потрапили 12,0 %, 3,3 % і 0,8 % відповідно (рис. 3.10).

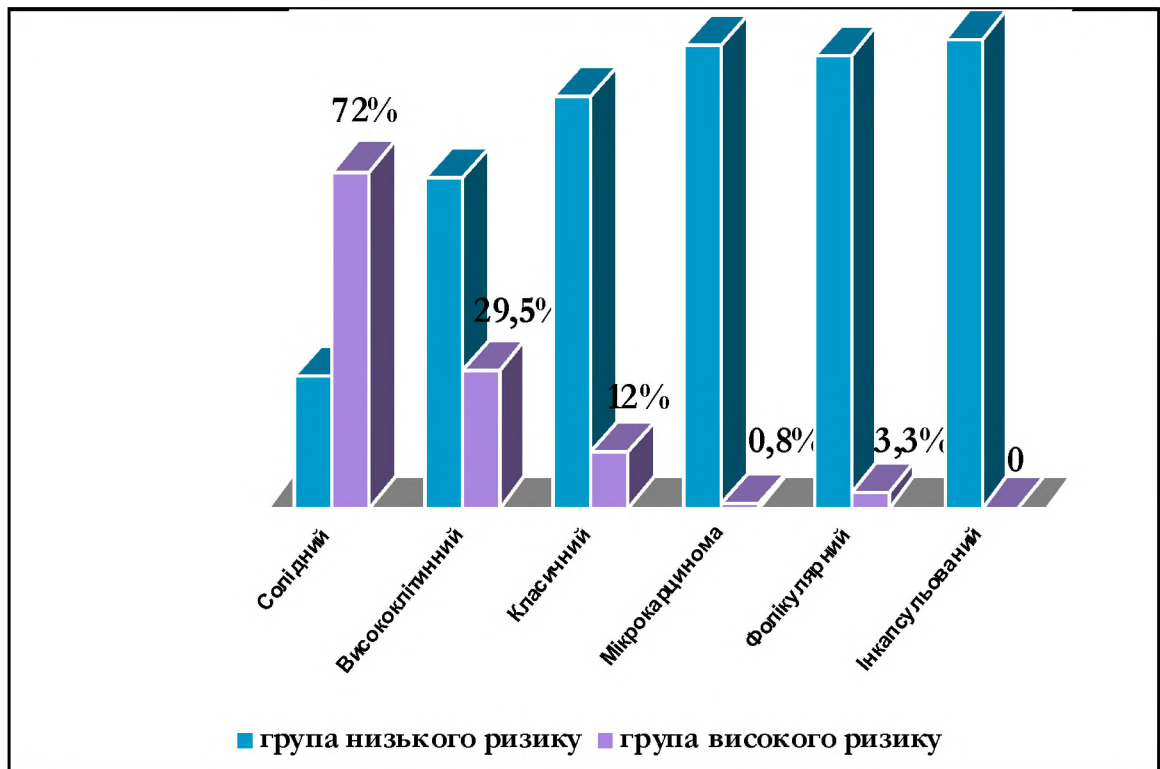


Рис. 3.10. Співвідношення гістологічних варіантів папілярного раку щитоподібної залози та груп ризику за системою AMES.

Як свідчать отримані результати, існує асоціація між гістологічними варіантами ПРЦЗ і прогнозом хвороби. Крім того, результати нашого дослідження, як і дані інших авторів, демонструють, що ПРЦЗ у цілому має сприятливий прогноз, 75,4 % випадків було як віднесено до групи низького ризику. Отже, результати наших досліджень підтверджують існуючі дані про велике значення оцінки гістологічних варіантів ПРЦЗ для прогнозування захворювання.

3.3. Клініко-морфологічні особливості кістозно-дегенеруючого варіанту папілярного раку щитоподібної залози

ПРЦЗ є однією з найпоширеніших форм диференційованого раку щитоподібної залози [254]. У літературі щодо кістозних вузлів ЩЗ існують досить суперечливі дані, адже деякі дослідники відносять до них лише прості кісти, а інші – змішані вузли з кістозним і солідним компонентом. У деяких

дослідженнях вузол називають «кістозним» за даними УЗД, інші вживають цей термін для описання солідних вузлів з ознаками кістозної дегенерації [168, 212].

Саме характер солідного компоненту у кістах має первинне клінічне значення. Більшість кістозних вузлів відповідають доброякісним утворенням ЩЗ. За деякими даними, лише у 3 % кіст за результатами ТАПБ виявляються злоякісні клітини [126]. Це пов'язано з методом проведення ТАПБ та інформативністю цитологічних препаратів. Натомість ПРЩЗ можуть бути кістозними, і за даними серійних досліджень кістозні вузли мають ознаки злоякісності не набагато рідше, ніж солідні вузли [247].

Невеликі фокуси кістозної дегенерації трапляються досить часто за ПРЩЗ, але раки, представлені лише кістами, що займають майже всю пухлину, – рідкісне явище. Виникнення кістозних порожнин у злоякісних пухлинах пов'язують із дегенеративними змінами та некрозом. Кістозні ПРЩЗ в основному бувають інкапсульованими, тому їх клінічний перебіг вважався традиційно більш сприятливим через зменшений ризик метастазування.

Метою даного фрагменту роботи було вивчення клініко-морфологічних особливостей кістозного папілярного раку ЩЗ для визначення оптимальної тактики лікування хворих на ПРЩЗ.

За результатами патогістологічного дослідження пацієнтів було розподілено рівномірно на 2 групи. До I групи (основної) увійшли 34 хворих віком від 20 до 74 років (у середньому $46,15 \pm 2,76$ року) із кістозними ПРЩЗ розміром від 0,5 см до 6 см (у середньому $2,09 \pm 0,22$ см). Серед них жінок було 29 (85,3 %), чоловіків – 5 (14,7 %). Кістозними вважали ті пухлини, в яких вміст кістозного компоненту складав ≥ 50 %. До II групи (група порівняння) увійшли 34 пацієнти приблизно такого ж віку (від 20 до 74 років, у середньому $46,18 \pm 2,75$ року), статевого складу (жінок – 26 (76,5 %), чоловіків – 8 (13,5 %)) і з такими ж розмірами пухлин (від 0,5 см до 5,7 см, у середньому $2,04 \pm 0,23$ см), але без кістозних змін.

Для встановлення клініко-морфологічних особливостей кістозного ПРЩЗ досліджували загальновизнані прогностичні критерії пухлин (розмір пухлини,

гістологічний варіант, наявність капсули, екстраорганної інвазії, багатофокусного росту, інвазії судин, метастазування у регіонарні лімфовузли), а також кількість та розмір метастатичних лімфовузлів.

Порівняльну характеристику клініко-патологічних чинників у пацієнтів обох груп наведено у таблиці 3.1. Більшість злоякісних кістозних папілярних пухлин мали розмір від 2 см до 4 см, що узгоджується з даними літератури. Серед гістологічних варіантів ПРЩЗ в обох групах найчастіше визначався класичний варіант (91,18 % і 82,35 %) відповідно. Інкапсульовані форми траплялись у 21 (61,76 %) випадку в основній групі та у 26 (76,5 %) у групі II. Ознаки екстраорганної інвазії виявлено у I групі у 21 (61,76 %) випадку, у II групі – у 23 (67,64 %).

Розмір метастазів ПРЩЗ із кістозними змінами коливався у межах від 0,1 см до 5 см (у середньому $1,43 \pm 0,25$ см). Метастази морфологічно також мали ознаки кістозної дегенерації, як і первинна пухлина (рис. 3.11 і 3.12).

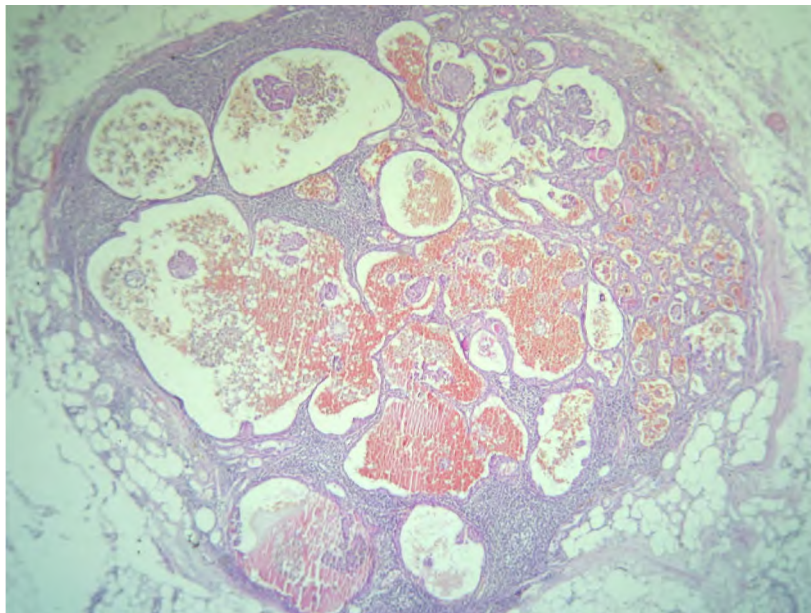


Рис. 3.11. Метастаз кістозно-дегенеруючого варіанту папілярного раку щитоподібної залози у регіонарному лімфовузлі. Гематоксилін-еозин $\times 100$.

Таблиця 3.1

Характеристика клініко-патологічних критеріїв у пацієнтів із кістозним і некістозним папілярним раком щитоподібної залози

Клініко-морфологічний критерій	Група I, n=34	Група II, n=34
Стать, ч/ж	5/29	8/26
Середній вік хворих, роки	46,147±2,762	46,176±2,749
Середній розмір пухлини, см	2,091±0,227	2,038±0,225
Наявність капсули пухлини	21 (61,76 %)	26 (76,5 %)
Гістологічний варіант папілярного раку		
класичний	31 (91,18 %)*	28 (82,35 %)*
колоноклітинний	2	-
фолікулярний	1	4
солідний	-	1
висококлітинний	-	1
Екстраорганна інвазія	21 (61,76 %)*	23 (67,64 %)*
Багатофокусність	12 (35,29 %)	9 (26,47 %)
Метастази у регіонарних лімфатичних вузлах	26 (76,47 %)*	10 (29,41 %)*
N _x	1	0
N ₀	7	24
N _{Ia}	10	3
N _{Ib}	16	7

Примітка: * – зв'язок між ознаками вірогідний ($p < 0,05$).

Пацієнти з кістозними раками мали більшу частоту метастазування порівняно з хворими з некістозними раками (76,47 % і 29,41 % відповідно, $p=0,041$). Це може свідчити про агресивнішу поведінку кістозних раків ЩЗ, що суперечить традиційній думці про низький ризик їх метастазування.

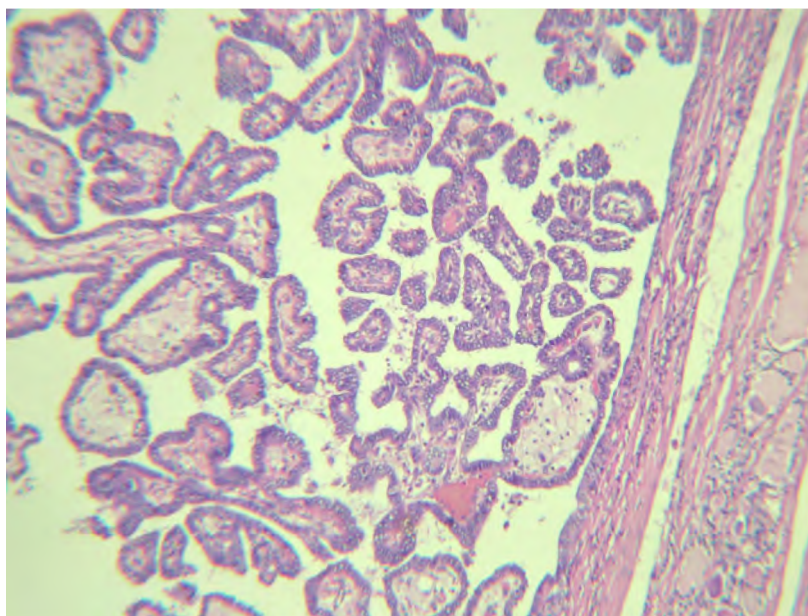


Рис. 3.12. Папілярний рак щитоподібної залози, кістозний варіант. Гематоксилін-еозин. $\times 100$.

У I групі виявлено кореляційний зв'язок між метастазуванням і розміром пухлини та наявністю екстраорганної інвазії. У II групі знайдено кореляційний зв'язок між метастазуванням і розміром пухлини, наявністю багатофокусного росту та інвазії судин (табл. 3.2).

Таблиця 3.2

Коефіцієнт кореляції r за Спірменом між морфологічними ознаками пухлини та метастазуванням ПРЩЗ

Ознака	(I група, n=34)	(II група, n=34)
Розмір пухлини	-0,39*	0,51*
Екстраорганна інвазія	0,41*	0,03
Багатофокусність	0,15	0,34*
Інвазія судин	0,24	0,48*
Інвазія в тканину ЩЗ	0,09	0,00

Примітка: * – зв'язок між ознаками вірогідний ($p < 0,05$).

Хоча ПРЩЗ із кістозними змінами за основними клініко-морфологічними чинникам не відрізняється від звичайного, і тактика ведення хворих є однаковою, за нашими результатами частота метастазування за кістозного папілярного раку виявилася у 2,6 разу більшою, ніж за ПРЩЗ без кістозної дегенерації. Отже, частота метастазування папілярного раку щитоподібної залози з кістозними змінами є вищою, ніж ПРЩЖ без кістозних змін. Отримані дані можуть бути використаними для більш ефективного диференційованого підходу у хірургічному лікуванні пацієнтів зі злоякісними вузлами щитоподібної залози з наявністю кістозної дегенерації.

3.4. Клініко-морфологічні особливості папілярної мікрокарциноми щитоподібної залози

Згідно з гістологічною класифікацією ВООЗ пухлин ЩЗ, ПМЩЗ – пухлина, менша від 1 см [71]. Більшість із них не пальпуються і не мають клінічних проявів. Найчастіше ПМЩЗ виявляється під час гістологічного дослідження за доброякісних захворювань ЩЗ, таких як багатовузловий зоб, фолікулярна аденома та хвороба Грейвса. Висока частота виявлення мікрокарцином під час аутопсійного дослідження пацієнтів, померлих не з приводу захворювань ЩЗ (понад 35 %) також свідчить про сприятливий прогноз за даної патології [198]. Проте кількість МЛВ за ПМЩЗ залежно від розміру пухлини сягає 71 % [180]. Дані про кількість смертельних випадків за ПМЩЗ є досить обмеженими і не дозволяють провести статистичне дослідження [171]. Кількість рецидивів за ПМЩЗ, згідно з даними літератури, становить від 1,3 % до 20 % випадків: після двобічного хірургічного втручання кількість регіонарних або локальних рецидивів сягає 5 %, після однобічного – 20 %, а тип резекції (тотальна, субтотальна або часткова) не впливає на кількість рецидивів [210].

Активне впровадження останніми роками ультразвукового дослідження ЩЗ і ТАПБ значно збільшило частку мікрокарцином у структурі ПРЩЗ [285].

Існують суперечливі погляди на обсяг хірургічного втручання та необхідність проведення дисекції лімфатичних вузлів шиї за ПМЩЗ. Метою даного фрагменту дослідження було визначення частоти та структури МЛВ за ПМЩЗ і прогностичних чинників у розмежуванні безсимптомних і потенційно агресивних мікрокарцином.

Ретроспективно проаналізовано результати клінічних і патогістологічних досліджень у 253 пацієнтів, прооперованих з приводу ПМЩЗ на базі УНПЦЕХТЕОТ протягом 2001-2006 рр. Досліджувану групу склали 233 жінки (92,1 %) і 20 чоловіків (7,9 %). Вік пацієнтів на момент встановлення діагнозу ПМЩЗ складав від 17 до 80 років (середній вік $49,6 \pm 4,3$ років). ПМЩЗ діагностовано як пухлину розміром 10 мм і менше згідно з гістологічною класифікацією ВООЗ пухлин ЩЗ. Досліджувана група ПМЩЗ у структурі ПРЩЗ склала 22,3 % (253/1133).

Із 253 випадків ПМЩЗ дисекцію ЛВ шиї проведено у 107 (42,3 %). У 186 (73,5 %) пацієнтів діагноз ПМЩЗ встановлено під час гістологічного дослідження (впродовж або після хірургічного втручання) на тлі доброякісних захворювань ЩЗ, з приводу яких проведено лікування. Так, на тлі багатовузлового зоба ПМЩЗ виявлено у 42,0 % випадків, макрофолікулярної аденоми – у 8,3 %, мікрофолікулярної аденоми – у 7,0 %, дифузного гіперпластичного зоба – у 4,7 %, вузлового гіперпластичного зоба – у 5,0 %, на тлі тиреоїдиту – у 5,5 %. У 67 (26,5 %) пацієнтів ПМЩЗ було виявлено як солітарний вузол ЩЗ розміром до 1 см. Діагноз ПМЩЗ у таких випадках було встановлено після проведення ТАПБ або експрес-гістологічного дослідження під час операції. Зі 186 «випадкових» ПМЩЗ дисекцію ЛВ шиї було проведено у 62 випадках (33,3 %), а із 67 «не випадкових» ПМЩЗ – у 45 випадках (67,1 %).

Після дисекції шиї МЛВ ПМЩЗ виявлено у 14,9 % (16/107) випадків, із них 43,7 % (7/16) випадків – в іпсілатеральній групі, 56,2 % (9/16) – у центральній. У групі випадково виявлених ПМЩЗ частота МЛВ склала 16,1 % (10/62), а у групі ПМЩЗ, які було діагностовано як солітарні вузли ЩЗ, МЛВ

визначалися у 13,3 % (6/45) випадків. Ознаки інвазії до оточуючої тканини залози у цих групах ПМЩЗ виявлено у 90,1 % і 97,3 % відповідно. Ознаки екстраорганної інвазії визначались у 12,4 % випадково виявлених ПМЩЗ та у 25,6 % ПМЩЗ, які було діагностовано як солітарні вузли ЩЗ. Частота багатофокусного росту пухлини у контрлатеральній частці ЩЗ серед ПМЩЗ, виявлених випадково, склала 48,0 %, а за ПМЩЗ, виявлених як солітарні вузли – 87,5 %. У 35,7 % випадково виявлених ПМЩЗ розмір пухлини не перевищував 5 мм, а у групі солітарних ПМЩЗ таких пухлин було лише 9,4 % ($p < 0,0001$ за тестом chi-square). Результати аналізу дисекції ЛВ ший у пацієнтів із випадково виявленими ПМЩЗ і ПМЩЗ, що їх було діагностовано як солітарні вузли ЩЗ, наведено на рис. 3.13.

Отже, частота МЛВ за випадково виявлених ПМЩЗ на тлі багатовузлового зоба, як і у випадках солітарних ПМЩЗ, є досить високою та складає 16,1 % і 13,3 % відповідно.

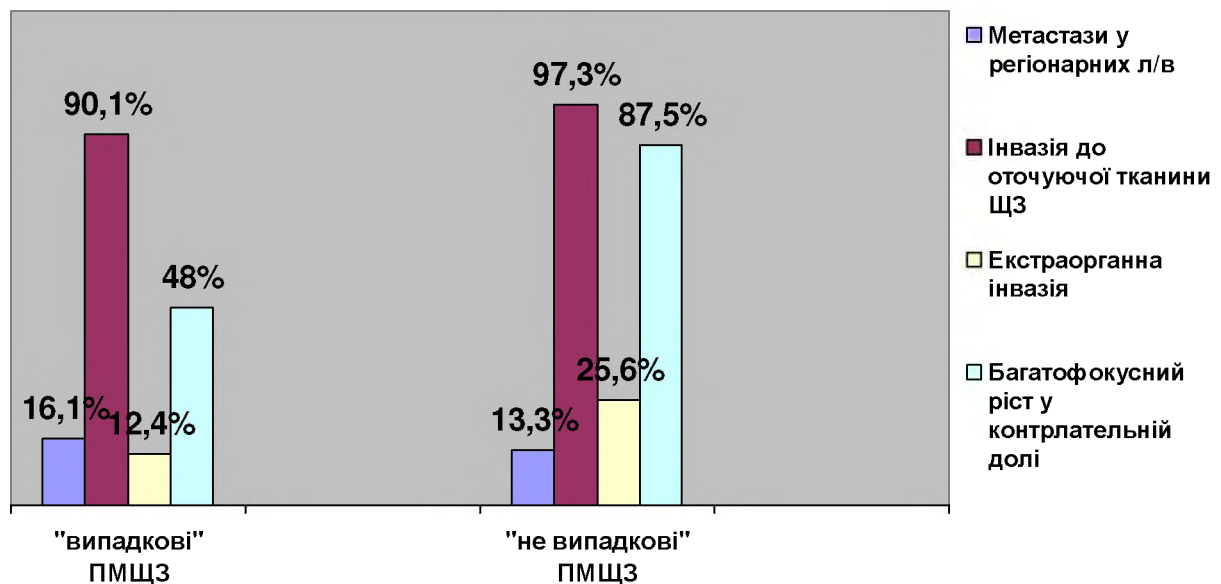


Рис. 3.13. Клініко-морфологічні ознаки «випадкових» і «не випадкових» папілярних мікрокарцином щитоподібної залози.

Залежно від розміру пухлини всі досліджені випадки ПМЩЗ розподілено на мікрокарциноми <5 мм у діаметрі, що склали 28,5 % усіх випадків ПМЩЗ

(72/253) і ПМЩЗ розміром 5 мм і більше – 71,5 % усіх ПМЩЗ (181/253). Середній розмір пухлин складав $0,5 \pm 0,02$ см, максимальний – 0,9 см, мінімальний – 0,1 см. Серед 72 випадків ПМЩЗ розміром до 5 мм дисекцію ЛВ шії проведено у 15 (20,8 %), у 3 із них виявлено МЛВ (20,0 %). Серед 50,8 % (92/181) випадків дисекції ЛВ за ПМЩЗ діаметром 5 мм і більше МЛВ виявлено у 14,1 % (13/92). Частота екстраорганої інвазії була більшою у випадках ПМЩЗ розміром 5 мм і більше та становила 19,2 % проти 8,3 % за ПМЩЗ, менших від 5 мм. Для ПМЩЗ діаметром 5 мм і більше багатофокусний ріст у контрлатеральній частці ЩЗ виявлено у 66,4 % випадків, тоді як за ПМЩЗ, менших від 5 мм, кількість таких випадків склала 45,2 %. Навпаки, частота багатофокусного росту в іпсилатеральній частці була вищою у випадках ПМЩЗ розміром до 5 мм (55,3 %), для пухлин діаметром 5 мм і більше цей показник склав 34,3 %. Ознаки інвазії в оточуючу тканину залози виявлялися у переважній більшості випадків ПМЩЗ розміром до 5 мм (93,6 %), як і для ПМЩЗ діаметром 5 мм і більше (91,0 %). Порівняльну характеристику клініко-морфологічних критеріїв ПМЩЗ різних розмірів наведено на рис. 3.14.

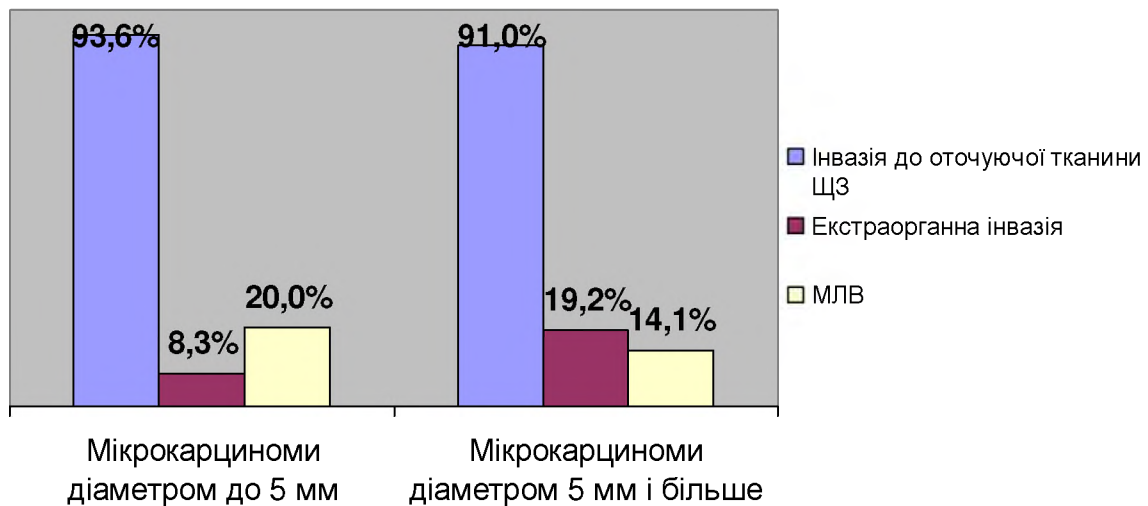


Рис. 3.14. Клініко-морфологічні ознаки папілярних мікрокарцином щитоподібної залози залежно від їх розмірів.

Отже, за результатами порівняльного аналізу ПМЩЗ різного розміру виявлено, що ця ознака не впливає на частоту метастазування, різниця між групами була невірною ($p>0,05$).

Також досліджували клініко-морфологічні особливості ПМЩЗ залежно від статі пацієнта. У досліджуваній групі ПМЩЗ 20 із них діагностовано у чоловіків (7,9 %), а 233 – у жінок (92,1 %). У чоловічій групі дисекцію ЛВ ший проведено у 65,0 % випадків (13/20), а серед жінок – у 40,3 % (94/233). Ознаки екстраорганної інвазії ПМЩЗ значно частіше виявлялися серед чоловіків (35,2 % проти 14,1 % у жінок). Частота МЛВ за ПМЩЗ у чоловіків склала 23,2 %, у жінок – (14,3 %). Результати порівняльного аналізу клініко-морфологічних ознак ПМЩЗ залежно від статі пацієнта наведено на рис. 3.15.

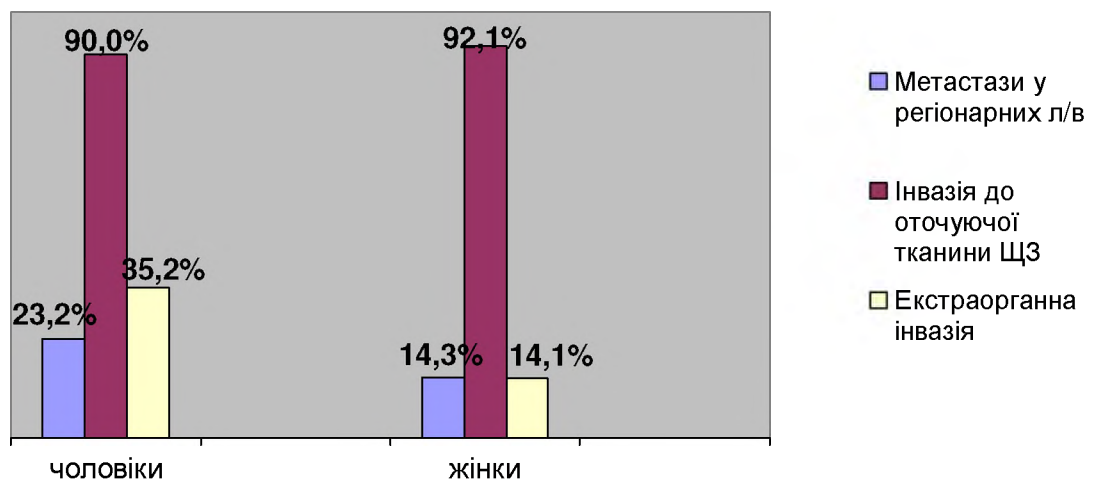


Рис. 3.15. Клініко-морфологічні ознаки папілярних мікрокарцином щитоподібної залози залежно від статі пацієнта.

Результати дисекції ЛВ ший у пацієнтів із ПМЩЗ (107 випадків), проаналізовано залежно від різних клініко-морфологічних ознак (вік, стать, наявність багатофокусного росту та локалізація іншого фокусу у частках і полюсах залози, гістологічний тип будови пухлини, розмір, наявність капсули, наявності ознак інтра- та екстраорганної інвазії, тиреоїдиту в пухлині та в оточуючій тканині ЩЗ (табл. 3.3).

Таблиця 3.3

**Результати аналізу дисекції лімфатичних вузлів ший залежності від
клініко-морфологічних критеріїв ПМЩЗ, n (%)**

Клініко-морфологічна ознака	ПМЩЗ без МЛВ (107 випадків)	ПМЩЗ із МЛВ (16 випадків)
Вік до 40 років / понад 40 років	24 (22,3) / 83 (77,6)	4 (25,0) / 12 (75,0)
Стать чоловіча / жіноча	13 (12,1) / 94 (87,9)	3 (18,8) / 13 (81,3)
Багатофокусний ріст	13 (12,1%)	3 (18,8)
контрлатеральний / іпсілатеральний	10 (9,3) / 3 (2,8)	3 (18,8) / 0 (0)
Гістологічний тип будови		
Папілярний	20 (18,7)	4 (25,0)
Фолікулярний	19 (17,8)	2 (12,5)
Трабекулярний	0 (0)	2 (12,5)
змішаний папілярно-фолікулярний	68 (63,6)	8 (50,0)
змішаний із трабекулярним компонентом	0 (0)	2 (12,5)
Наявність капсули	85 (79,4)	13 (81,3)
Інвазія до оточуючої тканини залози	98 (91,3)	14 (87,5)
Екстраорганна інвазія	25 (23,4)	9 (56,3)
Наявність ознак тиреоїдиту	16 (14,9)	2 (12,5)
Локалізація у правій / лівій частці	42 (39,3) / 58 (54,2)	7 (43,7) / 9 (56,3)
у перешийку	7 (6,5)	0 (0)
Локалізація у верхньому / нижньому полюсі	38 (35,5) / 35 (32,7)	6 (37,5) / 7 (44,8)
у середній третині	28 (26)	3 (18,6)
Діаметр пухлини до 5 мм / 5 мм і більше	15 (14,0) / 92 (85,9)	3 (18,8) / 13 (81,3)

В усіх випадках ПМЩЗ із МЛВ виявлено ознаки інвазії до оточуючої тканини, ознаки екстраорганної інвазії визначалися у 56,1 % випадків ПМЩЗ із МЛВ проти 22,9 % для ПМЩЗ без МЛВ. Серед ПМЩЗ із МЛВ 19,2 % відповідали ПМЩЗ до 5 мм у діаметрі (рис. 3.16).

МЛВ у пацієнтів віком до 40 років виявляли у 25,1 % випадків, віком 40 років і більше – у 75,3 %, середній вік пацієнтів складав $49,2 \pm 6,4$ року, мінімальний – 36 років, максимальний – 68 років. У ПМЩЗ із МЛВ пухлина була частково оточена капсулою у 81,3 % випадків (13/16), ознаки інвазії до оточуючої тканини визначали в усіх хворих, а ознаки екстраорганної інвазії – у 56,3 % випадків (9/16). Розмір метастатичного депозиту у ЛВ становив від 1 мм до 10 мм. Кількість випадків ПМЩЗ із метастатичними депозитами розміром 1 мм склала 62,1 % від загальної кількості випадків із МЛВ.

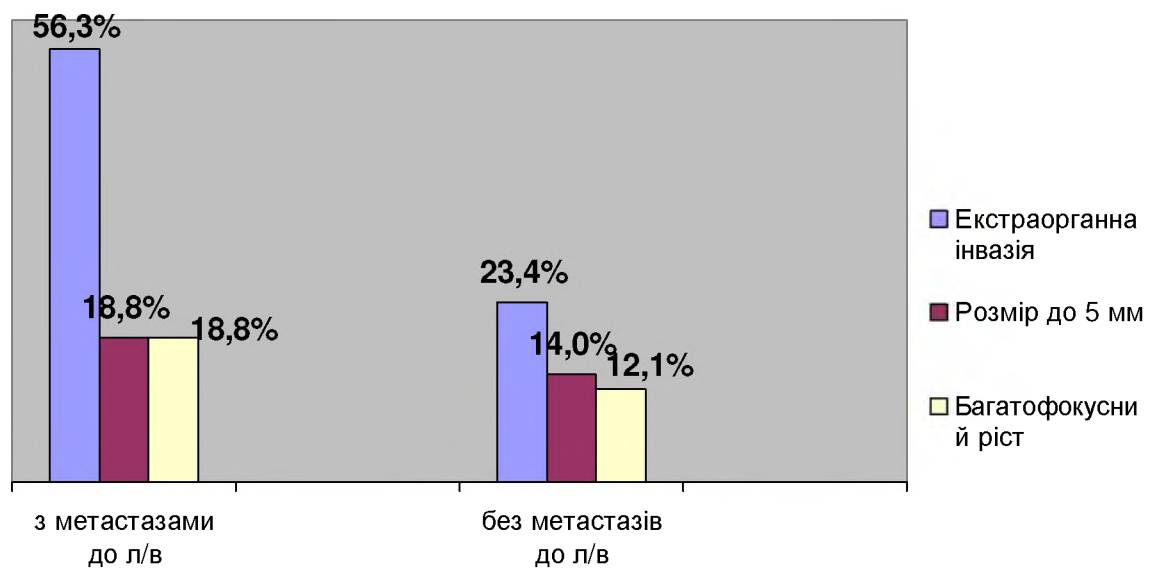


Рис. 3.16. Клініко-морфологічні ознаки папілярних мікрокарцином щитоподібної залози залежно від наявності метастазів у лімфовузлах.

Наразі визнано, що для мікрокарцином, менших від 5 мм, критерій інвазійності є прогностично більш значущим порівняно з розміром [62]. За результатами наших досліджень, кількість випадків ПМЩЗ із метастатичними депозитами розміром 1 мм виявилася досить високою, а існуюча практика

візуальної оцінки ЛВ під час операції хірургом не гарантує їх виявлення, тобто не дозволяє вірогідно визначити адекватний обсяг хірургічного втручання.

Отже, ми вважаємо за доцільне проведення радикального хірургічного втручання у хворих на ПМЩЗ в обсязі екстрафасціальної тиреоїдектомії з іпсілатеральною та центральною модифікованою дисекцією ший та визнання хірургічної операції як можливої підготовки до радіологічного етапу лікування ДРЩЗ.

У нашому дослідженні були певні обмеження, пов'язані з відсутністю даних про рецидиви ПМЩЗ і результати радіоізотопної терапії. Тому остаточний висновок щодо тактики ведення пацієнтів із ПМЩЗ вимагає проведення тривалих проспективних досліджень.

3.5. Клініко-морфологічні особливості інвазії папілярного раку щитоподібної залози у прищитоподібну залозу

Екстраорганна інвазія (пухлинна інфільтрація оточуючої тканини за межами капсули ЩЗ) є одним із встановлених клініко-патологічних чинників, що обумовлює несприятливий прогноз у хворих на диференційований РЩЗ [194]. До прилеглих структур, що потенційно можуть уражатися раком ЩЗ, відносять жирову клітковину, м'язи, стравохід, трахею, блукаючі нерви, тимус, сонні артерії та яремні вени. У науковій літературі є лише поодинокі описання інвазії ПРЩЗ у прищитоподібну залозу (ПЩЗ) як місцевого поширення пухлини [211].

Ми проаналізували 230 випадків ПРЩЗ, серед яких у 5 (2,2 %) виявлено інвазію у ПЩЗ (табл. 3.4). Середній вік пацієнтів складав $45,3 \pm 5,4$ року (від 36 до 67 років). Усі 5 пацієнтів були жінками. У 3 із 5 випадків розмір пухлини складав 2 см і менше, у двох інших – понад 2 см. В усіх 5 випадках, крім інвазії у ПЩЗ, виявлено інші ознаки екстраорганної інвазії у такі структури, як жирова клітковина, м'язи, гортанний нерв. В усіх хворих виявлено багатофокусний ріст

пухлини, причому у 2 випадках другий фокус росту злоякісної пухлини виявлено у контрлатеральній частці ЩЗ. МЛВ виявлено у 3 із 5 випадків.

Таблиця 3.4

**Характеристика випадків папілярного раку щитоподібної залози
з інвазією у при щитоподібну залозу**

Клініко-морфологічна ознака	Кількість (%) випадків
Вік <40 / ≥40 років	3 (60) / 2 (40)
Розмір пухлини ≤2 / >2 см	3 (60) / 2 (40)
Метастази у лімфовузлах є / немає	3 (60) / 2 (40)
Екстраорганна інвазія є / немає	5 (100) / 0 (0)
Багатофокусний ріст є / немає	5 (100) / 0 (0)

Виявлена інвазія у ПЩЗ була 3 типів (табл. 3.5): (1) безпосередня інвазія у ПЩЗ шляхом інфільтративного росту злоякісної пухлини ЩЗ (тип А) (рис. 3.17); (2) розповсюдження злоякісної пухлини у ПЩЗ із формуванням псевдокапсули між зонами ПРЩЗ і ПЩЗ (тип Б) (рис. 3.18); (3) наявність груп злоякісних клітин як метастатичних депозитів у ПЩЗ без видимого зв'язку зі злоякісною пухлиною (тип В) (рис. 3.19).

Під час імуногістохімічного дослідження виявлено позитивну реакцію до тиреоглобуліну в клітинах ПРЩЗ в зоні інвазії у прищитоподібну залозу (рис. 3.20).

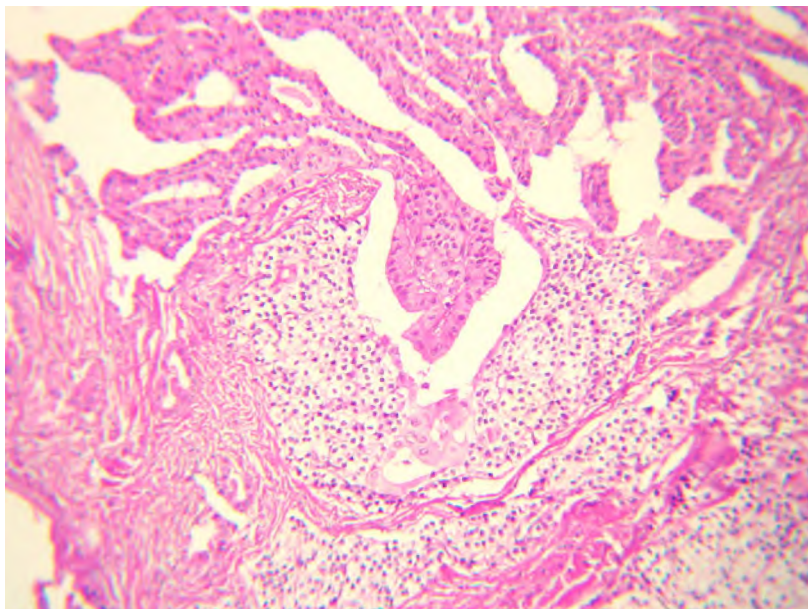


Рис. 3.17. Тип інвазії А. Безпосередня інвазія у ПЩЗ шляхом інфільтративного росту злоякісної пухлини ПЩЗ. Гематоксилін-еозин, $\times 200$.

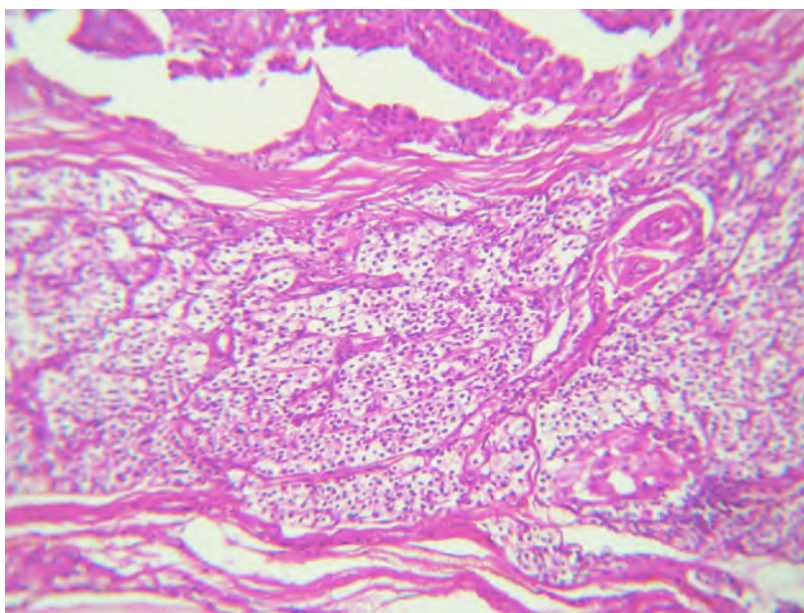


Рис. 3.18. Тип інвазії Б. Розповсюдження злоякісної пухлини в ПЩЗ із формуванням псевдокапсули між зонами ПРЩЗ та ПЩЗ. Гематоксилін-еозин, $\times 200$.

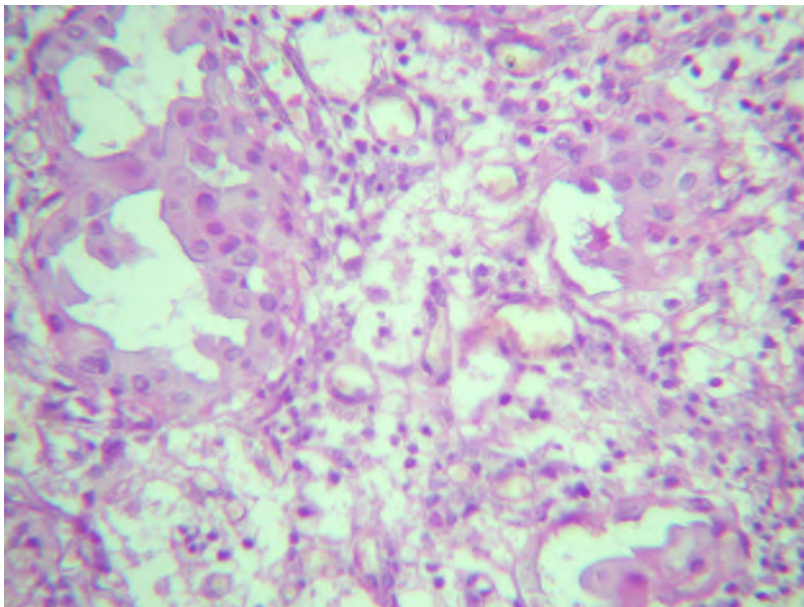


Рис. 3.19. Тип інвазії В. Групи злоякісних клітин (метастатичні депозити) у прищитоподібній залозі без видимого зв'язку з первинною пухлиною щитоподібної залози. Гематоксилін-еозин, $\times 400$.

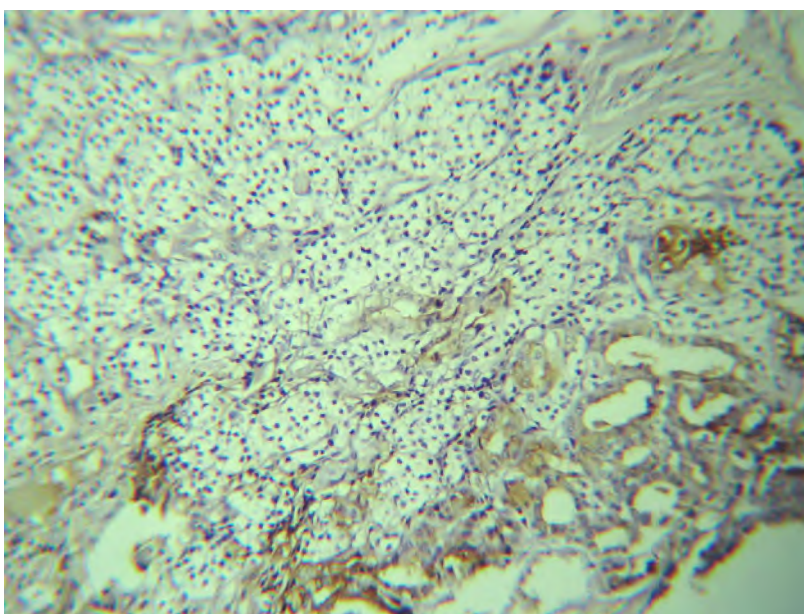


Рис. 3.20. Позитивна імунологічна реакція із антитілами до тиреоглобуліну в зоні інвазії папілярного раку ЩЗ у ПЩЗ, $\times 200$.

Під час гістологічного дослідження визначено анатомічну локалізацію ПЩЗ з інвазією ПРЩЗ: у 3 із 5 випадків ПЩЗ були розташовані в межах

капсули ЩЗ, у безпосередній близькості від пухлини; у 2 інших випадках ПЩЗ була розташована поза межами капсули ЩЗ у жировій клітковині. В одному випадку (цей випадок не увійшов у досліджувану групу) ПЩЗ розташовувалась поза межами капсули ЩЗ, у зоні екстраорганної інвазії у жирову клітковину та лімфатичні судини, але у самій ПЩЗ ознак інвазії не виявлено. Середній розмір досліджуваних ПЩЗ складав 3,7×2,3 мм (від 2,7×1,6 мм до 5,4×3,5 мм). В 1 із 5 випадків ПЩЗ була збільшеною (5,4×3,5 мм), і кількість жирової тканини у ній була меншою від такої у нормальній ПЩЗ. В одному випадку понад 50 % ПЩЗ було інфільтровано клітинами злоякісної пухлини, тому розміри виміряти не вдалося.

Таблиця 3.5

**Частота виявлення патоморфологічних ознак папілярного раку
щитоподібної залози за різних типів його інвазії
у прищитоподібну залозу, n (%)**

Тип інвазії	Розмір ПЩЗ, мм	Екстраорганна інвазія	метастази в л/в	розмір ПРЩЗ >2 см	багато- фокусний ріст
А, 2 (40)	5,4×3,5	2/2(100)	1/2 (50)	-	2/2 (100)
В, 1 (20)	2,6×1,6	1/1 (100)	-	-	1/1 (100)
С, 2 (40)	3,4×2	2/2 (100)	2/2 (100)	2/2 (50)	2/2 (100)

В усіх 5 досліджуваних випадках не було виявлено патогістологічних особливостей у нормальній тканині ЩЗ. У 3 із 5 випадків розмір злоякісної пухлини не перебільшував 2 см (1,8 см, 1,5 см, 1,3 см, 2 см), у 2 хворих розмір ПРЩЗ був більшим – 2,5 см.

Після патогістологічного дослідження в усіх випадках, крім одного, виявлено змішаний тип будови пухлин ПРЩЗ, тобто визначались зони класичної папілярної будови з фокусами солідного або трабекулярного росту, а також зони, утворені фолікулами середніх і малих розмірів. В одному випадку

виявлено фолікулярний варіант ПРЩЗ. У стромі пухлин визначались зони склерозу. У 2 із 5 випадків пухлини були неповністю оточені капсулою, визначались гістологічні ознаки інвазії у навколишню тканину ЩЗ. Не було визначено кореляції між гістологічними ознаками пухлин ПРЩЗ та ознаками інвазії у ПЩЗ.

Отже, описано морфологічні варіанти інвазії у ПЩЗ у серії ПРЩЗ. Незважаючи на малу кількість випадків, ми вважаємо правомірним висновок, що інвазія ПРЩЗ у ПЩЗ і екстраорганна інвазія мають схоже клініко-патологічне значення. Так, за результатами нашого дослідження, інвазія у ПЩЗ у вигляді метастатичних депозитів без видимого зв'язку зі злоякісною пухлиною асоціювалася із наявністю метастазів у регіонарних лімфатичних вузлах.

3.6. Особливості хірургічного втручання за інвазії папілярного раку щитоподібної залози у прищитоподібні залози

Проаналізовано результати лікування хворих із ПРЩЗ, оперованих в УНПЦХТЕОТ протягом 2005 року. Оцінено можливість радикальних операцій у випадках локального розповсюдження ПРЩЗ у прищитоподібну залозу. На підставі літературних даних і результатів власних досліджень запропоновано алгоритм оперативного втручання, який дозволяє мінімізувати ризик розвитку післяопераційного гіпопаратиреозу.

Досліджувану групу склали 197 пацієнтів із первинним ПРЩЗ, серед яких 95 (48,2 %) осіб – з ознаками екстраорганної інвазії та 73 (37,1 %) – із метастазами у регіонарних лімфатичних вузлах. Усім пацієнтам впродовж 2005 року проведено екстрафасціальну тиреоїдектомію, у 125 випадках (63,5 %) – із різними видами дисекції шиї, лімфаденектомією.

Ідентифікацію ПЩЗ проводили суб'єктивним методом за візуальними ознаками або з використанням інтраопераційного забарвлення метиленовим синім на 15 % димексиді.

Патогістологічне дослідження проводили в усіх випадках на гістологічних препаратах ПРЩЗ, забарвлених гематоксилін-еозином. Визначали патогістологічні ознаки пухлини ЩЗ (тип, розмір, ступінь і спрямованість екстраорганної інвазії), МЛВ, метастази у ПЩЗ, кількість і розміри ПЩЗ.

Серед 197 пацієнтів було 178 жінок (90,4 %) і 19 чоловіків (9,6 %). Середній вік хворих склав $43,6 \pm 5,7$ року (від 18 до 69 років). Проаналізовано стан кальцієвого обміну у 197 хворих на ПРЩЗ у перед- і післяопераційний періоди (табл. 3.6, 3.7).

Таблиця 3.6

**Структура гіпокальціємії залежно від розповсюдженості процесу
та обсягу хірургічного втручання, n (%)**

Показник	Кількість лабораторних гіпокальціємій
T1-3, 102 (51,8)	18 (17,6)
T4, 95 (48,2)	59 (62,1)
ЕФТЕ, 72 (36,5)	10 (13,8)
ЕФТЕ + ДШ, 125 (63,5)	67 (53,6)
Всього, 197	77 (39,1)

Примітки: T1-3, T4 – стадії процесу за TNM; ЕФТЕ – екстрафасціальна тиреоїдектомія; ЕФТЕ + ДШ – екстрафасціальна тиреоїдектомія з дисекцією шиї.

Аналіз протоколів операцій показав, що у 13 (86,7 %) випадках із 15, де за даними гістологічного дослідження було констатовано видалення ПЩЗ, ампутацію ПЩЗ (в 1 випадку – двох ПЩЗ) було проведено ненавмисно. Лише в одному випадку було виявлено інвазійний ріст диференційованого РЩЗ у ПЩЗ, внаслідок чого хворому виконано паратиреоїдектомію.

**Структура гіпокальціємії залежно від виду інтраопераційної травми
прищитоподібних залоз**

Показник	Ішемія ПЩЗ	Ампутація 1 ПЩЗ	Ампутація 2 ПЩЗ
Кількість лабораторних гіпокальціємії	62	14	1
Концентрація Ca^{++} у сироватці, ммоль/л	0,91±0,07 (0,89-0,99)	0,87±0,04 (0,82-0,94)	0,78
Клінічні прояви гіпокальціємії у ранній п/о період, n	14	12	1
Клінічні прояви гіпокальціємії у пізній п/о період, n	0	1	1

Гістологічне дослідження 15 видалених ПЩЗ визначило, що 5 із них були задіяні у пухлинному процесі. У трьох виявлено ділянки безпосереднього розповсюдження ПРЩЗ (пухлина з ознаками екстраорганної інвазії без МЛВ шії – рис. 3.21), у двох інших – метастатичні депозити ПРЩЗ без видимого зв'язку з пухлиною. В усіх випадках уражена ПЩЗ була розташована на боці первинної пухлини ЩЗ. Ураження ПЩЗ виявлено у 2,5 % усіх випадків ПРЩЗ і у 5,2 % інвазійних його форм.

Отже, видалення однієї ПЩЗ не супроводжується стійкими порушеннями кальцієвого обміну. Рівень та інтенсивність гіпокальціємії після ампутації 1 ПЩЗ є порівнянними з ішемічним післяопераційним гіпокальціємічним синдромом, і ця гіпокальціємія мала доброякісний перебіг.

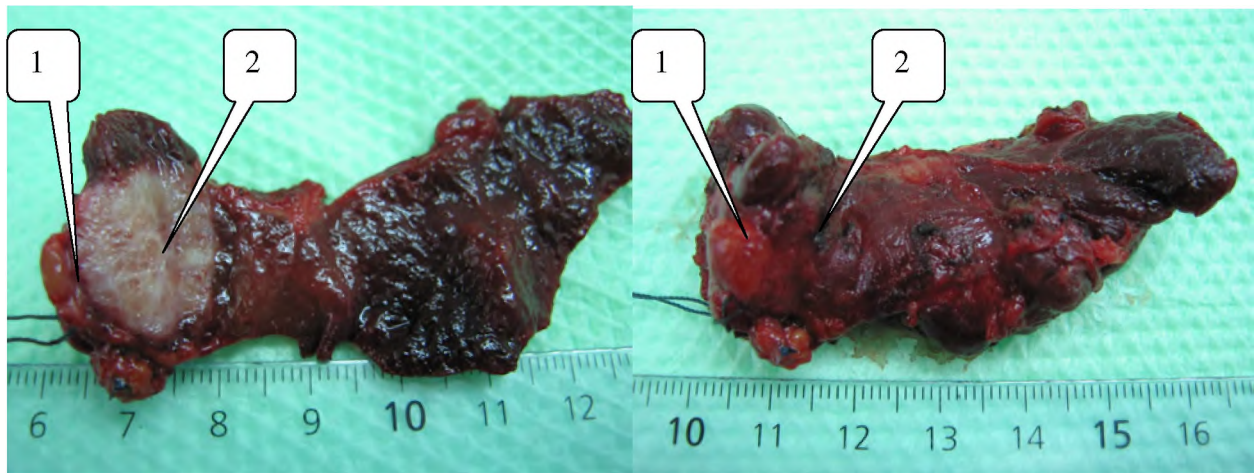


Рис. 3.21. Макропрепарат видаленої щитоподібної залози з папілярним раком (2) та інвазією до прищитоподібної залози (1) і претиреоїдних м'язів.

З огляду на те, що у 5,2 % випадків локально інвазійного раку ЩЗ, надто за наявності регіонарного метастазування (а за даними літератури — у 7,9 %), спостерігається ураження папілярною карциномою прищитоподібних залоз, для забезпечення радикальності операції доцільно видаляти прилеглу до пухлини ПЩЗ, забезпечивши перед цим збереженість і життєздатність інших трьох. Втім, має сенс вивчити віддалені результати (якість і тривалість життя) для визначення впливу як інвазії до ПЩЗ, так і метастазування до них.

Для уникнення розвитку стійких порушень кальцієвого обміну пропонуємо алгоритм оперативного втручання, наведений на рис. 3.22.

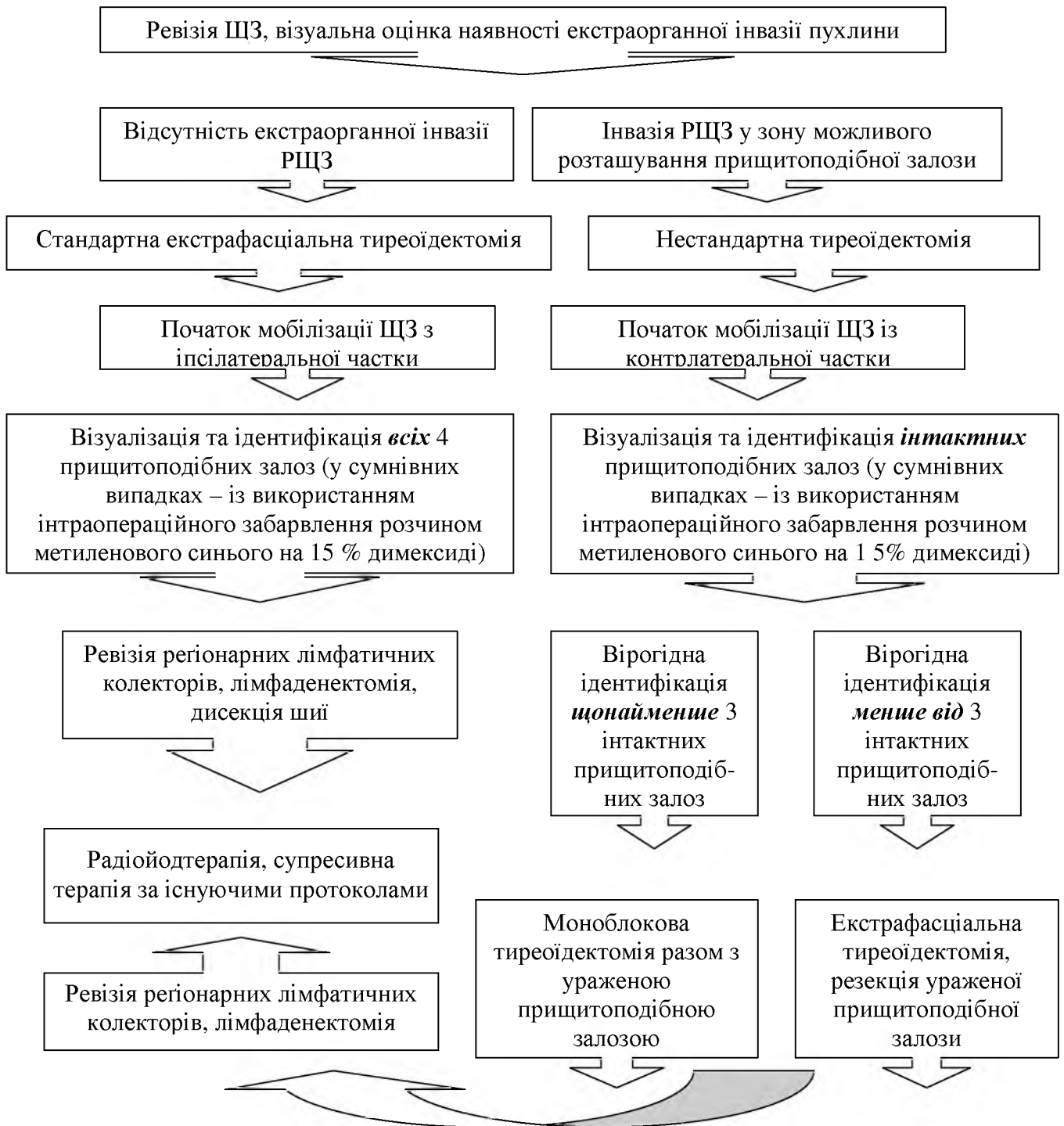


Рис. 3.22. Алгоритм хірургічного втручання з приводу диференційованого раку щитоподібної залози з інвазією до прищитоподібної залози.

Підсумовуючи результати даного фрагменту дослідження, можна констатувати, що за ПРЩЗ може відбуватися інвазія або метастазування до ПЩЗ, надто на боці ураження. Видалення однієї ПЩЗ не призводить до стійких

порушень кальцієвого обміну. Свідоме видалення ПЩЗ у ділянці інвазії ПРЩЗ є можливим за впевненості у життєздатності щонайменше 3 інтактних ПЩЗ.

3.7. Аналіз частоти та структури метастазів за папілярного раку щитоподібної залози

З огляду на недостатнє усвідомлення багатьма хірургами актуальності регіонарного метастазування РЩЗ і суперечностей щодо необхідності застосування профілактичних дисекцій ми вирішили провести ретельний аналіз частоти виявлення метастазів у лімфатичних вузлах ший за найбільш поширеної форми тиреоїдної карциноми – ПРЩЗ, а також клініко-морфологічних аспектів цього процесу.

Дослідження ґрунтується на ретроспективному аналізі лікування 369 пацієнтів із ПРЩЗ, прооперованих в УНПЦЕХТЕОТ за період 2006-2007 рр. До групи обстежених увійшли 30 чоловіків (8,1 %) і 339 жінок (91,9 %), середній вік складав $47,9 \pm 6,3$ року. В усіх випадках проведено екстрафасціальну тиреоїдектомію з центральною та радикальною модифікованою або селективною дисекцією лімфатичних вузлів ший. Під час макроскопічного дослідження післяопераційний матеріал оцінювали за такими параметрами: локалізація пухлини (верхній полюс, середня третина, нижній полюс, перешийок); наявність багатофокусного росту (іпсілатеральний, контрлатеральний); локалізація метастазів (латеральний колектор, центральний колектор). Під час патогістологічного дослідження препаратів підраховували кількість лімфатичних вузлів у кожному колекторі ший, кількість лімфатичних вузлів із метастазами, а також вимірювали розмір метастатичного депозиту в них.

Із 369 досліджених випадків ПРЩЗ у 109 виявлено МЛВ ший, що склало 29,5 %, у решті 260 випадках метастазів не знайдено. Багатофокусний ріст пухлини визначено у 33,9 % випадків ПРЩЗ із МЛВ та у 32,3 % випадків ПРЩЗ без метастазів ($p > 0,05$). Ознаки екстраорганної інвазії виявлено у 64,2 %

випадків у групі ПРЦЗ із метастазами та у 32,5 % випадків у групі без метастазів ($p < 0,001$, табл. 3.8).

Таблиця 3.8

**Морфологічні ознаки метастатичного папілярного раку
щитоподібної залози, n (%)**

Морфологічна ознака	Папілярний РЩЗ із регіонарними метастазами
Багатофокусний ріст	37 (33,9)
контрлатеральний	26 (23,8)
іпсілатеральний	11 (10,1)
Екстраоргана інвазія	70 (64,2)
Розмір пухлини <1 см	12 (11,0)
≥1 см	98 (89,9)

Найчастіше ПРЩЗ виявлявся у віковій групі від 50 до 59 років, тоді як найбільшу частоту МЛВ визначено у хворих віком від 40 до 49 років (рис. 3.23).

За результатами порівняльної оцінки особливостей метастатичного ураження регіонарних лімфатичних вузлів залежно від статі та віку хворого частота МЛВ у групі пацієнтів віком 10-19 років виявилася значно вищою серед хлопчиків, а також відзначено поступове збільшення частоти МЛВ у групі чоловіків віком понад 60 років і її зниження серед жінок цієї групи (рис. 3.24).

Визначено пряму залежність частоти МЛВ від розміру пухлини ПРЩЗ, частота метастазів у групі пухлин, близьких до 1 см, була досить високою і не відрізнялася від такої для пухлин розміром до 4-6 см (рис. 3.25).

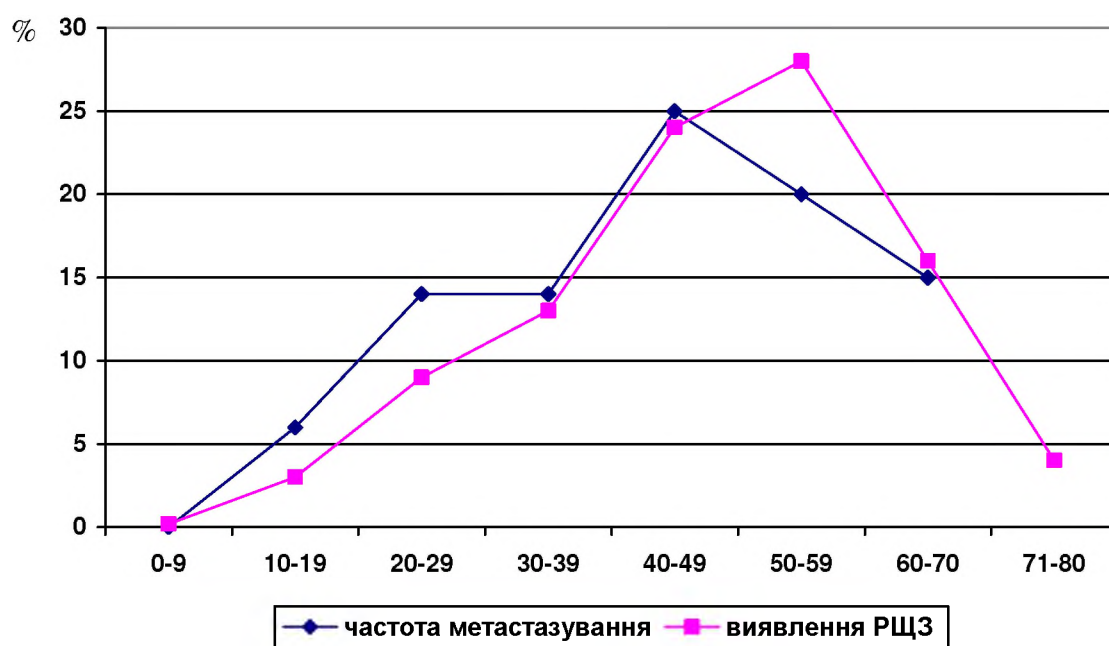


Рис. 3.23. Залежність частоти виявлення папілярного раку щитоподібної залози та частоти його метастазування у регіонарні лімфатичні вузли від віку пацієнта.

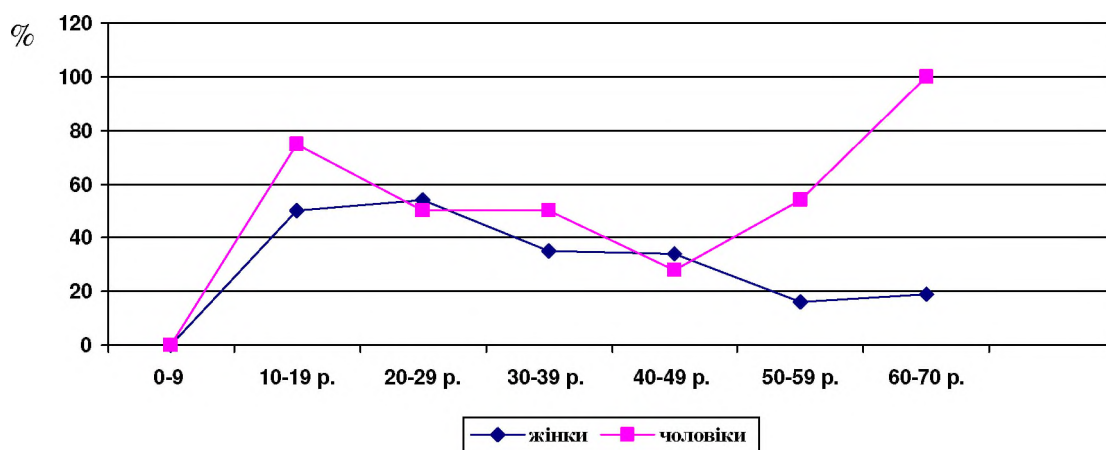


Рис. 3.24. Залежність частоти метастазування папілярного раку щитоподібної залози у регіонарні лімфатичні вузли від віку та статі пацієнта.

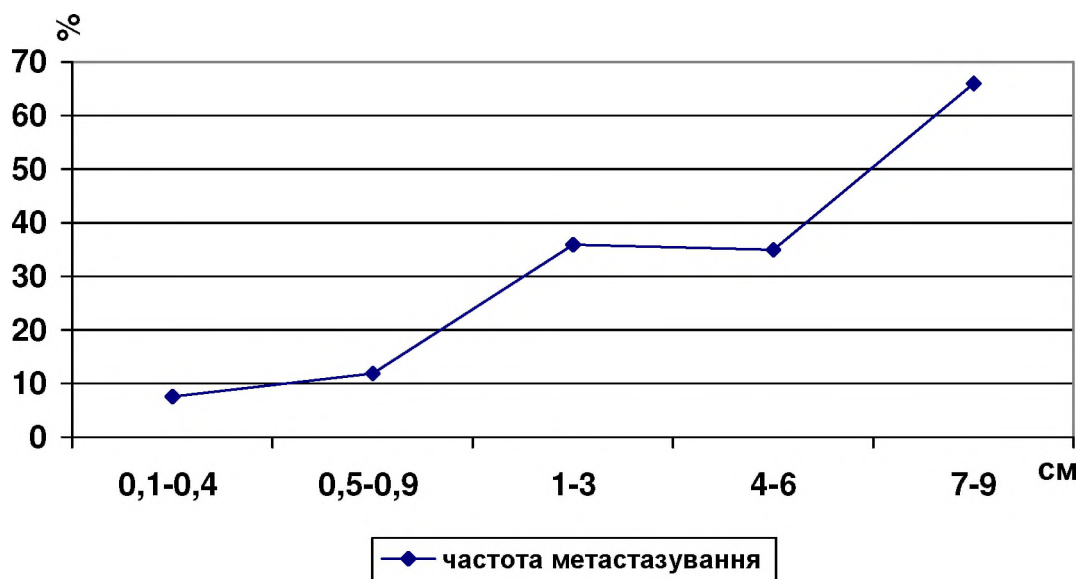


Рис. 3.25. Залежність частоти метастазування папілярного раку щитоподібної залози у регіонарні лімфатичні вузли залежно від розміру пухлини.

Серед 109 випадків ПРЩЗ метастази лише у лімфатичних вузлах центрального колектора (VI рівень) виявлено у 75,3 % випадків, латерального колектора (II, III і IV рівні) – у 25,2 %, верхнього середостіння (VII рівень) – у 3,1 % спостережень, причому у більшості хворих із метастазами у латеральних колекторах і середостінні були також і метастази VI рівня (рис. 3.26).

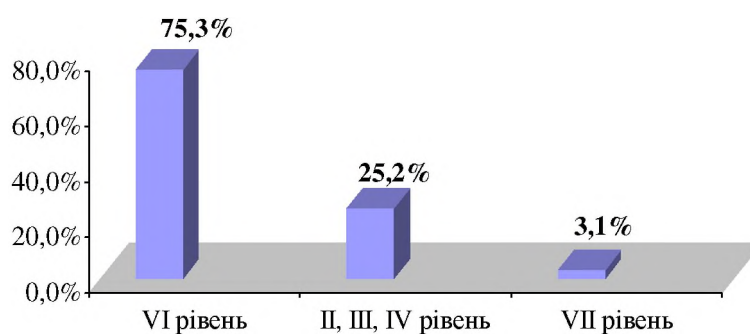


Рис. 3.26. Розподіл метастазів папілярного раку щитоподібної залози по лімфатичних колекторах ший.

Не виявлено залежності між локалізацією пухлини ПРЦЗ у межах частки та частотою метастазування у колектори ший (рис. 3.27). Натомість за розташування пухлини у перешийку метастази у центральному колекторі виявлено у 97,1 % випадків (різниця з пухлинами іншої локалізації вірогідна – $p < 0,05$), а у латеральному колекторі – у 40,2 % випадків.

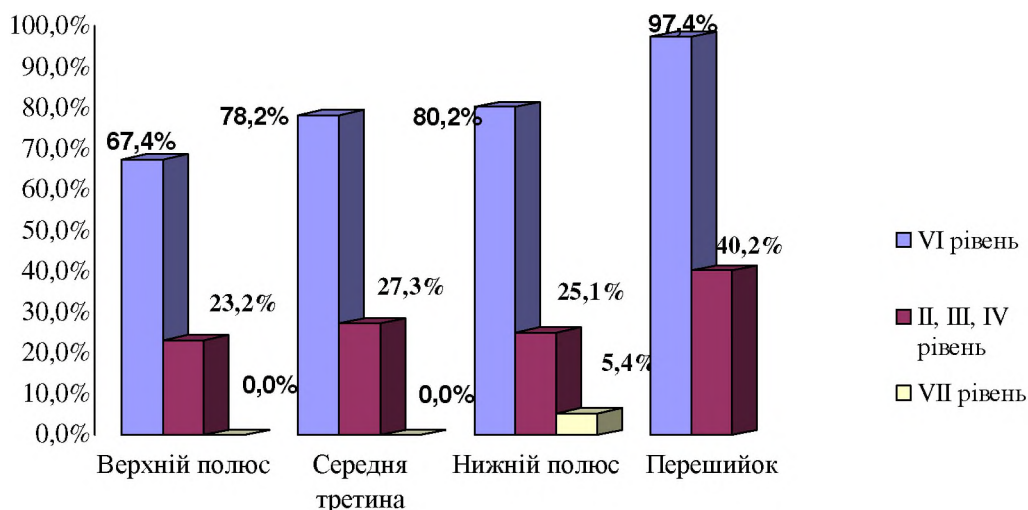


Рис. 3.27. Розподіл метастазів папілярного раку щитоподібної залози у колекторах ший залежно від локалізації пухлини.

За результатами оцінки розмірів лімфовузлів із метастазами ПРЦЗ у 59,2 % усіх метастазів максимальний діаметр був ≤ 3 мм (рис. 3.28).

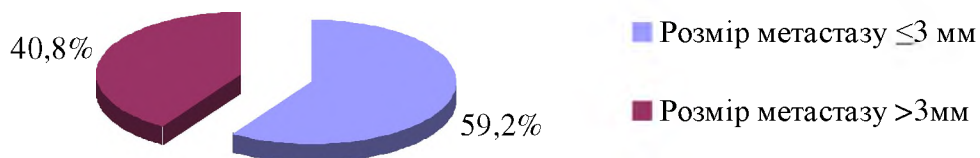


Рис. 3.28. Розподіл метастазів залежно від їх розмірів.

Отже, підтверджено, що характерною особливістю ПРЦЗ є його схильність метастазувати до регіонарних лімфатичних вузлів ший. МЛВ виявлено у 29,5 % випадків ПР.

Впровадження стандартизованого підходу до виконання дисекції лімфатичних колекторів ший, який ґрунтується на передопераційному (сонографія, ТАПБ) та інтраопераційному (експрес-гістологія) підтвердженні наявності МЛВ, привело до 2-кратного збільшення частоти виявлення метастазів у лімфатичних вузлах ший (рис. 3.29), що дозволило змінити тактику лікування з підвищенням його ефективності.

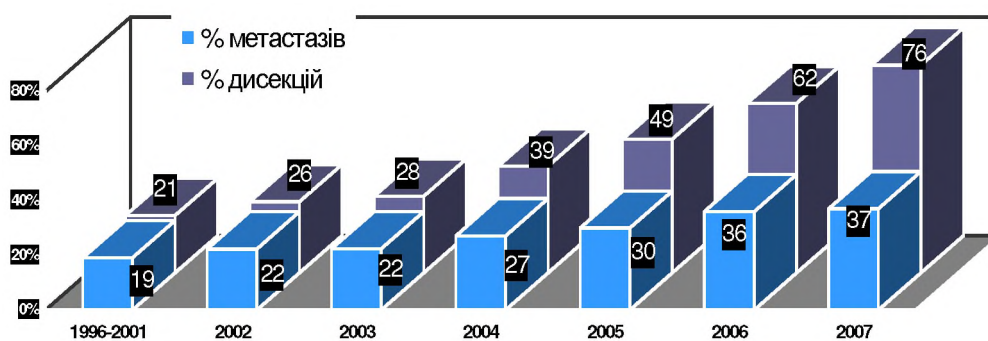


Рис. 3.29. Частота дисекцій лімфатичних вузлів ший та відносна кількість випадків регіонарного метастазування папілярного раку щитоподібної залози.

Незалежно від морфологічної форми раку будь-який випадок макроскопічної екстраорганної інвазії слід розцінювати як чинник високого ризику регіонарного метастазування та показання для розширення обсягу дисекції ший.

3.8. Аналіз рецидивів за папілярного раку щитоподібної залози

Метою даного фрагменту дослідження було вивчення можливості індивідуального прогнозу рецидиву ПРЦЗ на підставі клініко-морфологічних

даних і визначення оптимальної тактики післяопераційного моніторингу хворих.

Згідно з класифікацією AMES, до групи низького ризику увійшли 11 хворих (52,4 %), до групи високого ризику – 10 (47,6 %). Клініко-патологічну характеристику пацієнтів наведено у таблиці 3.9.

Таблиця 3.9

Характеристика клініко-патологічних чинників у пацієнтів із рецидивами папілярного раку щитоподібної залози (n=21)

Клініко-патологічний чинник	n (%)
Стать ч / ж	3 (14,3) / 18 (85,7)
Група ризику за класифікацією AMES низький / високий	11 (52,4) / 10 (47,6)
Вік <45 / >45 років	8 (38,1) / 13 (61,9)
Гістологічний варіант папілярного раку	
класичний	18 (85,7)
фолікулярний	1 (4,8)
онкоцитарний	1 (4,8)
дифузно-склерозуючий	1 (4,8)
Розмір пухлини ≤2 см	5 (23,8)
2-4 см	14 (66,7)
>4 см	2 (9,5)
МЛВ є / немає	16 (76,2) / 5 (23,8)
Екстраоргана інвазія є / немає	16 (76,2) / 5 (23,8)
Багатофокусний ріст є / немає	5 (23,8) / 16 (76,2)
Інвазія лімфатичних судин є / немає	6 (28,6) / 15 (71,4)

Серед гістологічних варіантів ПРЩЗ найчастіше виявлявся класичний (85,69 %). Розмір первинної пухлини склав від 0,7 см до 6 см (у середньому

2,43±4,6 см). МЛВ, ознаки екстраорганної інвазії були наявними у 16 (76,2 %) пацієнтів, багатофокусність, ознаки інвазії лімфатичних судин – у 5 (23,8 %) і 6 (28,6 %) хворих відповідно.

Так як ПРЩЗ асоціюється з дуже сприятливим прогнозом після хірургічного видалення первинної пухлини, існує необхідність у тривалому (понад 20 років) спостереженні великої кількості пацієнтів для визначення клінічно відповідних чинників, які є прогностичними для рецидиву. На жаль, до цього дослідження було залучено невелику кількість пацієнтів із нетривалим періодом спостереження, що створило певні обмеження для визначення вірогідних незалежних чинників клінічного рецидиву.

Резюме до розділу 3

Для розробки об'єктивних критеріїв діагностики пухлин ЩЗ проаналізовано ядерні ознаки різних підтипів фолікулярних пухлин із застосуванням комп'ютерної морфометрії. З метою оцінки біологічного значення ядерних змін у ФПНПМ проаналізовано цифрові зображення ядер клітин типових і атипових фолікулярних пухлин ЩЗ. Отримані дані порівняли з результатами визначення мутацій *N2-RAS* і *RET*.

За допомогою даного методу успішно діагностовано РЩЗ у 19/20 випадків, а також типові фолікулярні пухлини у 26/30 випадків. Чутливість методу для діагностики злоякісного процесу склала 95,3 %, що відповідає попереднім результатам. Точність для діагностики типу пухлини склала 86,6 %.

У випадках ФА не виявлено жодної мутації *RAS* або *RET*. Мутації *N2-RAS* у кодоні 61 виявлено у 2/10 ФРЩЗ (20,0 %), у 2/10 ФВПРЩЗ (20,0 %) і у 3/9 ФПНПМ (33,3 %) без кореляції зі структурою хроматину. Експресія *RET*-білка, виявлена у 45,2 % ФПНПМ, 20,0 % ФРЩЗ і 50,0 % ФВПРЩЗ, корелювала з

ядерними ознаками, характерними для ПРЩЗ. Отже, група ФПНПМ – гетерогенна група пухлин, до якої входять доброякісні пухлини та пухлини з морфологічними і молекулярними особливостями ФРЩЗ і ПРЩЗ, – можуть бути попередниками обох типів РЩЗ.

Для визначення прогностичної ролі гістологічних варіантів ПРЩЗ ретроспективно проведено дослідження гістологічних препаратів та історій хвороб пацієнтів, прооперованих з приводу ПРЩЗ. Гістологічні варіанти ПРЩЗ розділено на дві групи ризику відповідно до класифікації AMES. Серед випадків солідного та висококлітинного варіантів ПРЩЗ найбільшу частку віднесено до групи високого ризику – 72,0 % і 29,5 % відповідно. Серед випадків класичного варіанту ПРЩЗ, фолікулярного його варіанту та мікрокарциноми до групи високого ризику потрапили 12,0 %, 3,3 % і 0,8 % відповідно.

Для визначення оптимальної тактики лікування хворих на ПРЩЗ досліджено загальновизнані прогностичні критерії його кістозного варіанту (розмір пухлини, гістологічний варіант, наявність капсули, екстраорганної інвазії, багатофокусного росту, інвазії судин, метастазування у регіонарні лімфовузли), а також кількість і розмір метастатичних лімфовузлів. Виявлено більшу частоту метастазування кістозного варіанту ПРЩЗ порівняно з некістозними раками (76,47 % і 29,41 % відповідно, $p=0,041$). Це може свідчити про більш агресивну поведінку кістозного варіанту ПРЩЗ, що суперечить традиційній думці про низький ризик його метастазування. Отримані дані можуть бути використані для вибору ефективного диференційованого підходу у хірургічному лікуванні з розширенням обсягу дисекції.

Для визначення прогностичних чинників папілярної мікрокарциноми ЩЗ ретроспективно проаналізовано частоту та структуру МЛВ. В усіх випадках ПМЩЗ із МЛВ виявлено ознаки інвазії до оточуючої тканини, ознаки екстраорганної інвазії визначалися вірогідно частіше, ніж у ПМЩЗ без МЛВ (56,3 % проти 23,4 %). У 19 % ПМЩЗ із МЛВ розмір пухлини складав до 5 мм. Кількість випадків ПМЩЗ із метастатичними депозитами діаметром 1 мм

склала 62,3 % від загальної кількості випадків МЛВ. Запропоновано проведення радикального хірургічного втручання у хворих на ПМЩЗ в обсязі екстрафасціальної тиреоїдектомії з іпсилатеральною та центральною модифікованою дисекцією ший.

Для оптимізації хірургічного лікування, забезпечення онкологічної радикалізації та підготовки до радіологічного етапу лікування ДРЩЗ проаналізовано випадки інвазії ПРЩЗ у ПЩЗ. Отримані результати не можуть свідчити про стадію злоякісного процесу, адже в усіх випадках виявлено ознаки екстраорганної інвазії, а ПЩЗ розташована у безпосередній близькості до злоякісної пухлини. З іншого боку, метастазування у ПЩЗ може здійснюватися лімфатичними капілярами, які поєднують ЩЗ і ПЩЗ анатомічно. Розроблено та впроваджено алгоритм хірургічного лікування ПРЩЗ із клінічними ознаками екстраорганної інвазії, що включає видалення прилеглої до пухлини ПЩЗ за умови візуалізації трьох інших ПЩЗ.

Для оцінки ефективності та необхідності профілактичних дисекцій проведено аналіз лікування пацієнтів із ПРЩЗ. У 29,5 % випадків виявлено МЛВ. Не знайдено залежності між локалізацією пухлини ПРЩЗ у межах частки та частотою метастазування у колектори ший. Натомість за розташування пухлини у перешийку метастази у центральному колекторі виявлено у 97,4 % випадків, тобто вірогідно частіше, ніж для пухлин іншої локалізації, а у латеральному колекторі – у 40,2 % випадків. З огляду на високу частоту метастатичного ураження лімфатичних вузлів центрального колектора (75,2 %), переважно невеликий діаметр метастазів (59,2 % випадків ≤ 3 мм) вважаємо за доцільне виконання рутинної центральної дисекції ший за ПРЩЗ.

Для вивчення можливості індивідуального прогнозу рецидиву захворювання та визначення оптимальної тактики післяопераційного моніторингу хворих із ПРЩЗ ретроспективно проаналізовано результати спостереження пацієнтів із рецидивами ПРЩЗ. Розмір первинної пухлини складав від 0,7 до 6,0 см. МЛВ та ознаки екстраорганної інвазії виявлено у 76,19 % випадків, багаточисельність та ознаки інвазії лімфатичних судин – у

23,81 % і 28,57 % відповідно. Констатовано, що для остаточного вірогідного визначення незалежних чинників клінічного рецидиву за ПРЩЗ необхідно проведення досліджень із тривалим (понад 20 років) періодом спостереження.

Результати, викладені у даному розділі, опубліковано у працях:

1. Хоперія В.Г. Порівняльна характеристика доброякісних та злоякісних пухлин щитоподібної залози фолікулярного походження [Текст] / В.Г. Хоперія // Ендокринологія. – 2012. – Т.17, №1. – С.74-79.
2. Хоперія В.Г. Морфологические особенности фолликулярных опухолей щитовидной железы с неопределенным потенциалом злокачественности [Текст] / В.Г. Хоперія, Н.И. Белемец, О.А. Гузь // Современные аспекты хирургической эндокринологии (с участием терапевтов-эндокринологов): материалы II Украинско-Российского симпозиума. – Харьков, 2011. – С. 436-438.

РОЗДІЛ 4

МАРКЕРИ ЗЛОЯКІСНОСТІ У ДІАГНОСТИЦІ ПУХЛИН ЩИТОПОДІБНОЇ ЗАЛОЗИ

4.1. Діагностична ефективність дослідження НВМЕ-1, ТПО та цитохімічне дослідження ДАП IV під час тонкоголкової аспіраційної пункційної біопсії вузлів щитоподібної залози

Метою даного фрагменту дослідження була оцінка ефективності застосування НВМЕ-1 у цитологічній діагностиці аспіратів пункцій вузлів ЩЗ і його комбінованого застосування із МоАт 47 і ДАП IV.

За результатами імуноцитохімічного визначення активності МоАт 47 до ТПО понад 80 % позитивно маркованих клітин виявлено у 30 з 32 випадків колоїдних вузлів (рис. 4.1). У двох випадках (6,3 %) імунологічну реакцію з ТПО виявлено менше, ніж у половині клітин. В усіх 32 випадках ФА цитохімічна активність ДАП IV мала слабку поширеність (<10 % клітин) (рис. 4.2). Помірну позитивну реакцію з НВМЕ-1 (>10 % маркованих клітин) виявлено у 14 з 32 випадків. У семи випадках (21,8 %) визначалась позитивна реакція з НВМЕ-1 (>50 % клітин). Результати імуноцитохімічних досліджень МоАт 47 до ТПО, НВМЕ-1 і цитохімічного визначення активності ДАП IV наведено у табл. 4.1.

Таблиця 4.1

Результати імуноцитохімічного дослідження МоАт 47, НВМЕ-1 і цитохімічного визначення активності ДАП IV у пухлинах щитоподібної залози, n

Тип пухлини	НВМЕ-1	МоАт 47	ДАП IV
ФА	14/32	30/32	0/32
ФПНПМ	19/27	25/27	5/27
ПРЩЗ	28/28	0/28	28/28
ФРЩЗ	23/24	0/24	16/24

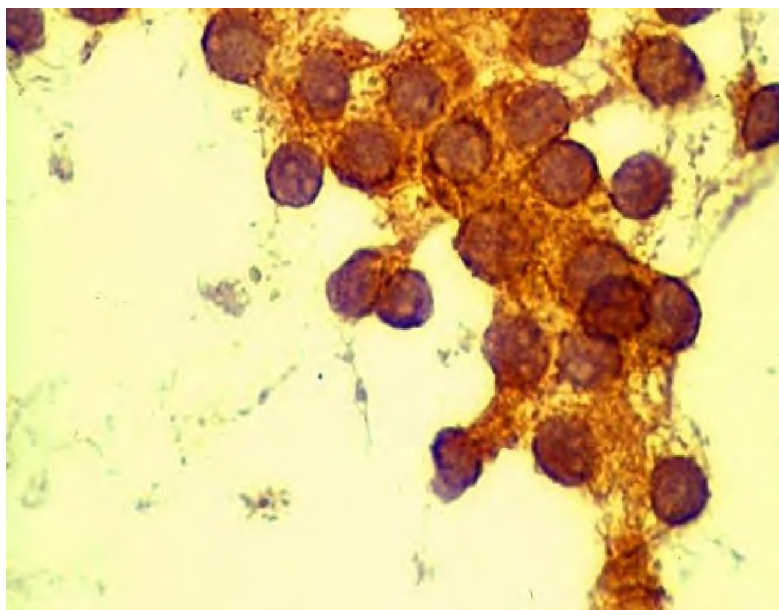


Рис. 4.1. Позитивна імуноцитохімічна реакція із МоАт 47 в аспіраті макрофолікулярної аденоми щитоподібної залози, $\times 400$.

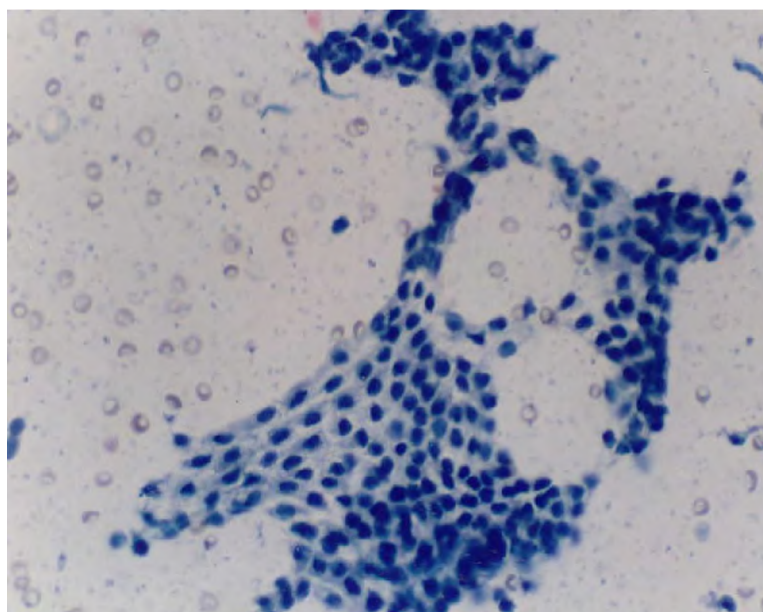


Рис. 4.2. Негативна цитохімічна активність ДАП IV в аспіраті макрофолікулярної аденоми щитоподібної залози, $\times 200$.

У 25 з 27 випадків ФПНПМ виявлено позитивну реакцію ТПО із МоАт 47 (понад 80 % клітин). У двох випадках (7,4 %) імунореактивність ТПО визначено у 60 % клітин. У 6 і цих випадків (18,5 %) виявлено позитивну

цитохімічну реакцію ДАП IV (>10 % клітин). Імуноцитохімічна реакція з HBME-1 була позитивною у 19 (70,4 %) випадках (понад 10 % клітин, табл. 4.1).

За результатами імуноцитохімічного дослідження активності ТПО з МоАт 47, в усіх випадках ПРЦЗ клітин із позитивною реакцією було менше від 20 % (рис. 4.3). Цитохімічна активність ДАП IV була позитивною для всіх 28 випадків ПРЦЗ (>10 % маркованих клітин з індексом реакції 6-12) (рис. 4.4). Активність HBME-1 визначено в усіх випадках ПРЦЗ (>50 % клітин, рис. 4.5).

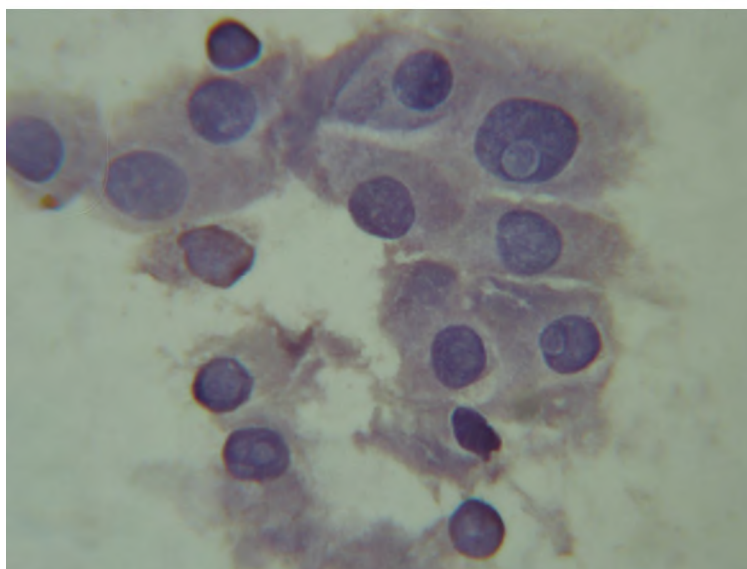


Рис. 4.3. Негативна імуноцитохімічна реакція із МоАт 47 в аспіраті папілярного раку щитоподібної залози, $\times 400$.

Для всіх 24 випадків ФРЦЗ імуноцитохімічна реакція з ТПО була негативною або виявлялась менше, ніж у 20 % клітин. Активність ДАП IV була високою або помірною в 11 з 24 випадків ФРЦЗ (>40 % позитивних клітин, індекс реакції 4-9). У випадку онкоцитарного варіанту ФРЦЗ цитохімічну реакцію ДАП IV виявлено у невеликій кількості клітин, індекс реакції складав 4. В усіх випадках ФРЦЗ, крім його онкоцитарного варіанту, виявлено виражену експресію HBME-1 у понад 40 % клітин.

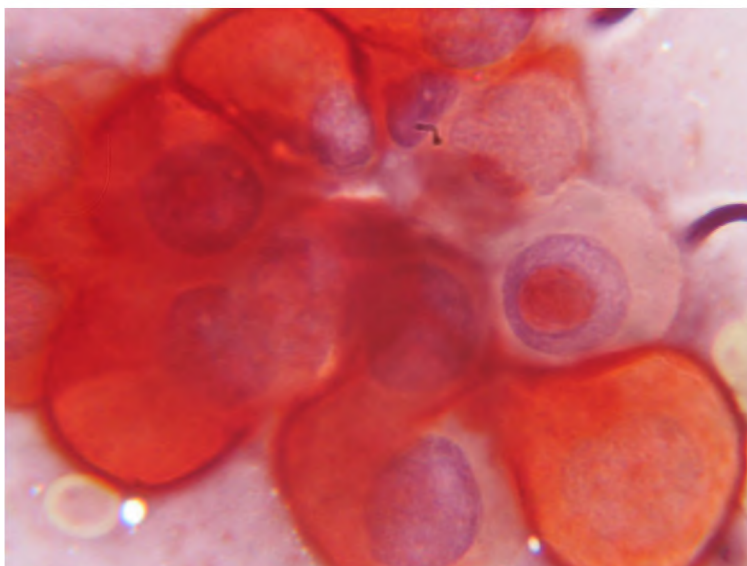


Рис. 4.4. Позитивна цитохімічна активність ДАП IV в аспіраті папілярного раку щитоподібної, $\times 1000$.



Рис. 4.5. Позитивна імуноцитохімічна реакція з HBME-1 в аспіраті ПРЦЗ, $\times 400$.

Чутливість, специфічність і діагностична цінність імуноцитохімічного дослідження ТПО із МоАт 47 склали 100 %, 93,2 % і 96,4 % відповідно; позитивна та негативна прогностична цінність – 92,8 % і 100 % відповідно. Для

цитохімічного визначення активності ДАП IV чутливість, специфічність і діагностична ефективність склали 78,8 %, 89,8 % і 84,68 % відповідно; позитивна та негативна прогностична цінність – 87,2 % і 82,8 % відповідно. Чутливість імуноцитохімічного дослідження HBME-1 склала 98 %, його специфічність – 44 %, позитивна прогностична цінність – 60,7 %, негативна – 96,3 %, а діагностична ефективність – 69,4 % (табл. 4.2).

Таблиця 4.2

**Результати порівняння ефективності імуноцитохімічного дослідження
МоАт 47, HBME-1 і цитохімічного визначення активності ДАП IV у
пухлинах щитоподібної залози, %**

Маркер	Ч	С	ПЗ+	ПЗ-	ДЕ	ХП	ХН
МоАт 47	100	93,2	92,8	100	96,4	3,6	0
HBME-1	98,0	44,0	60,7	96,3	69,4	29,7	0,9
ДАП IV	69,2	91,5	87,0	77,0	81,0	4,5	14,4
ТПО + ДАП IV	100	98,3	98,0	100	99,0	0,9	0

Примітка: Ч – чутливість, С – специфічність, ПЗ+ – позитивне прогностичне значення, ПЗ- – негативне прогностичне значення, ДЕ – діагностична ефективність, ХП – хибно-позитивні результати, ХН – хибно-негативні результати.

З метою підвищення специфічності цитологічного аналізу було об'єднано результати цитохімічного визначення активності ДАП IV та імуноцитохімічного дослідження ТПО із МоАт 47. У результаті 58 випадків із 59 було діагностовано як доброякісні. Серед них у 2 випадках ФА було менше від 80 % позитивно маркованих МоАт 47 клітин, а цитохімічна активність ДАП IV у цих випадках була негативною; в одному випадку фолікулярної пухлини виявлено лише 60 % позитивно маркованих МоАт47 клітин, а цитохімічна активність ДАП IV була негативною (загальний індекс 1); п'ять випадків

ФПНПМ були позитивними з ДАП IV (загальний індекс реакції 4-9), але у цих випадках понад 80 % клітин позитивно прореагували із МоАт 47; лише в одному випадку ФПНПМ імуноцитохімічну реакцію з МоАт 47 виявлено у 60 % клітин, і також виявлено позитивну цитохімічну реакцію ДАП IV (загальний індекс реакції 6). Усі випадки із цитологічним висновком про злоякісність, для яких загальний індекс ДАП IV складав 4-12, а імуноцитохімічну активність МоАт 47 було виявлено менше, ніж у 20 % клітин, було визнано злоякісними за результатами гістологічного дослідження.

За умови комбінації імуноцитохімічного дослідження ТПО із МоАт 47 і цитохімічного визначення активності ДАП IV чутливість, специфічність і позитивна прогностична цінність методу склали 100 %, 98,3 % і 98 % відповідно. За результатами імуноцитохімічного дослідження ТПО із МоАт 47, цитохімічного визначення активності ДАП IV та імуноцитохімічного дослідження з НВМЕ-1 частота хибно-позитивних результатів склала 3,6 %, 4,5 % і 29,7 % відповідно. За умови комбінованого застосування імуноцитохімічного визначення ТПО із МоАт 47 і цитохімічного визначення активності ДАП IV хибно-позитивні результати отримано у лише у 0,9 % випадків.

Отже, за результатами оцінки можливості застосування імуноцитохімічного дослідження НВМЕ-1, МоАт 47 до ТПО та цитохімічного дослідження ДАП IV для диференціювання злоякісних і доброякісних пухлин ЩЗ доведено високу чутливість методу (92 %) для виявлення ПРЩЗ.

4.2. Кореляція цитологічних і гістологічних діагнозів у діагностиці вузлового зоба у дітей

Метою цього розділу дослідження була оцінка клінічного значення ТАПБ у діагностиці вузлів ЩЗ у дітей віком від 6 до 17 років із порівнянням ефективності застосування ТАПБ без контролю та під контролем УЗД.

У 157 випадках серед 609 пацієнтів (25,7 %) після проведення ТАПБ було виконано гемі- або тотальну тиреоїдектомію. Розподіл цитологічних висновків наведено у таблиці 4.3.

Таблиця 4.3

**Розподіл цитологічних висновків тонкоголкової аспіраційної
пункційної біопсії вузлів щитоподібної залози у дітей**

Стать	Кількість	Цитологічні висновки			
		неінформативні	доброякісні	Сумнівні	злаякісні
Дівчинки	481	39	354	59	30
Хлопчики	128	16	89	15	7
Всього	609	55	443	74	37

Із 55 пацієнтів із неінформативними цитологічними висновками ТАПБ 12 (21,8 %) хворих було прооперовано за клінічними показаннями. Усі ці пацієнти мали солітарні вузли ЩЗ розмірами від 25 мм до 56 мм (у середньому $34,3 \pm 2,3$ мм). За результатами гістологічного дослідження 8 випадків відповідали кістам ЩЗ, 3 випадки – колоїдним вузлам і 1 випадок – фолікулярній аденомі ЩЗ.

Зі 443 пацієнтів із доброякісними цитологічними висновками 64 (14,4 %) було прооперовано. За результатами остаточного гістологічного дослідження доброякісну патологію діагностовано у 63 (98,4 %) із них: БВЗ – у 18, фолікулярну аденому з макро-мікрофолікулярною будовою – у 35, фолікулярну аденому з нормо-фолікулярною будовою – у 8, тиреоїдит Хашімото – в 1, хворобу Грейвса – в 1. В одному випадку виявлено розходження між цитологічним і гістологічним діагнозом, коли фолікулярний варіант ПРЩЗ було невірно діагностовано під час цитологічного аналізу як доброякісне захворювання.

Із 74 пацієнтів із сумнівними цитологічними висновками ТАПБ («фолікулярна пухлина» або «підозра на рак») прооперовано 44 (59,4 %). За результатами гістологічного дослідження доброякісну патологію виявлено у 35 (79,5 %) із них: БВЗ – у 5; фолікулярну аденому – у 27 (5 із макрофолікулярною будовою, 13 із мікрофолікулярною будовою, 2 аденоми з клітин Гюртля та 7 фолікулярних аденом з обмеженими ознаками ПРЩЗ), тиреоїдит Хашімото – у 3 (рис. 4.6, 4.7, 4.8, 4.9).

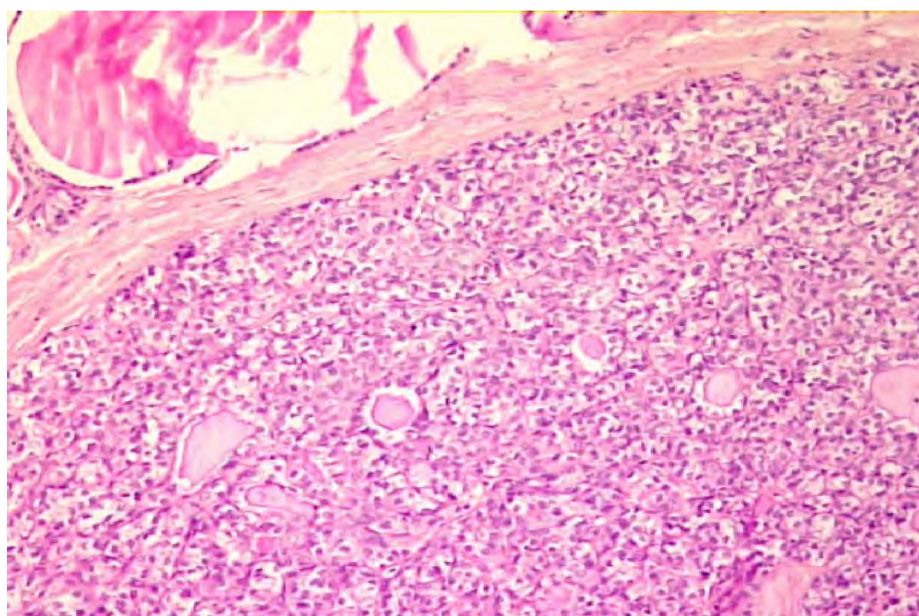


Рис. 4.6. Мікрофолікулярна аденома щитоподібної залози. Гематоксилін-еозин, $\times 200$.

Злоякісні пухлини за результатами гістологічного дослідження діагностовано у 9/44 (20,5 %) випадках із сумнівними цитологічними висновками ТАПБ, серед них 4 класичних ПРЩЗ і 5 ФВПРЩЗ (рис. 4.10, 4.11, 4.12, 4.13).

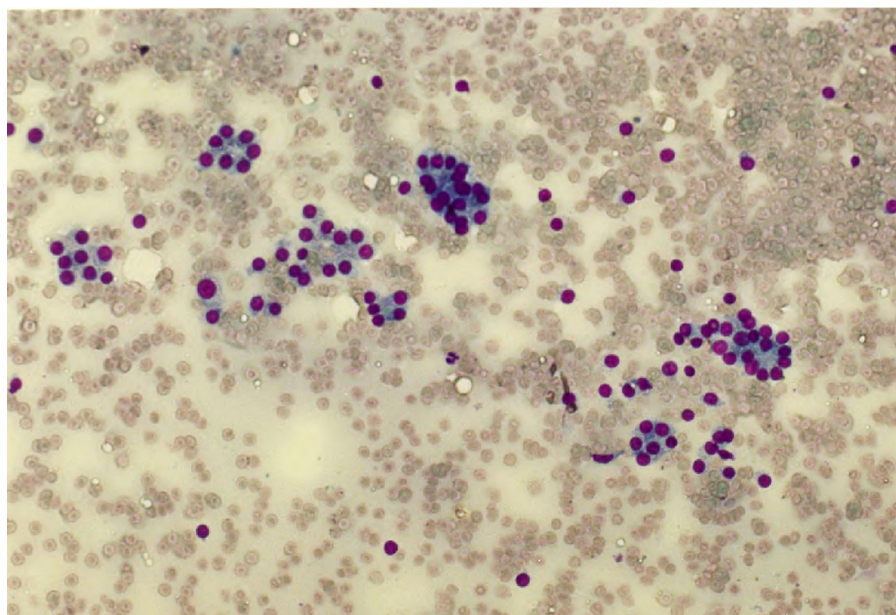


Рис. 4.7. Аспірат мікрофолікулярної аденоми щитоподібної залози. Май-Грюнвальд-Гімза, $\times 200$.

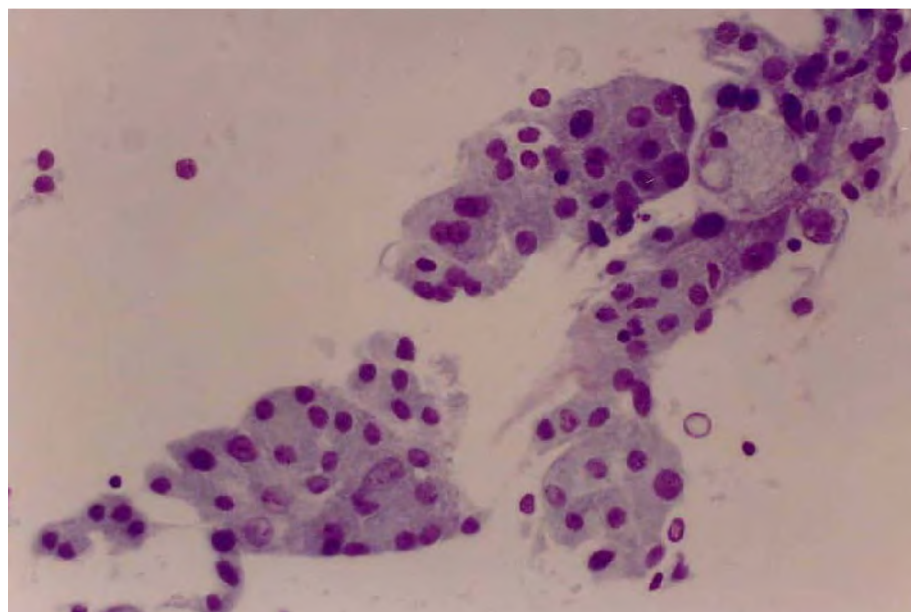


Рис. 4.8. Аспірат аденоми з клітин Гюртля щитоподібної залози. Май-Грюнвальд-Гімза, $\times 200$.

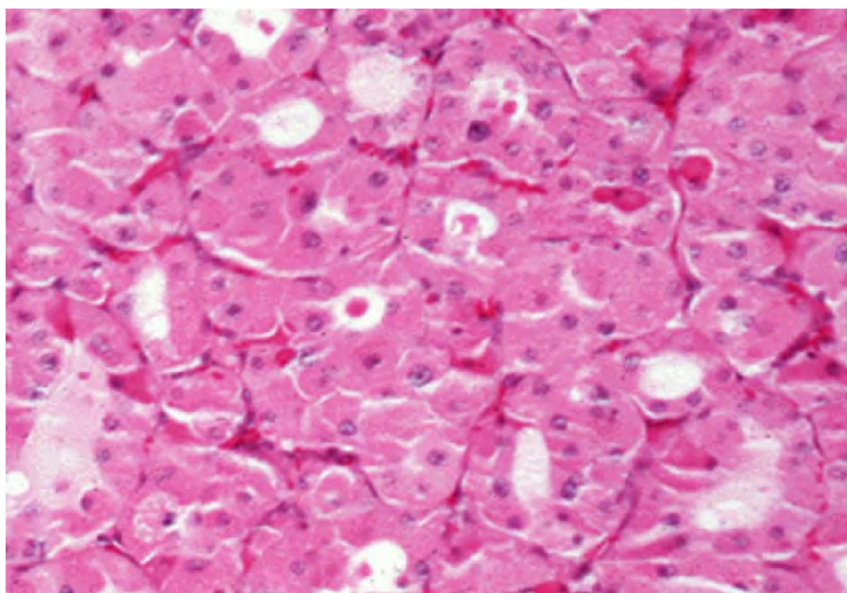


Рис. 4.9. Аденома з клітин Гюртля щитоподібної залози. Гематоксилін-еозин, $\times 200$.

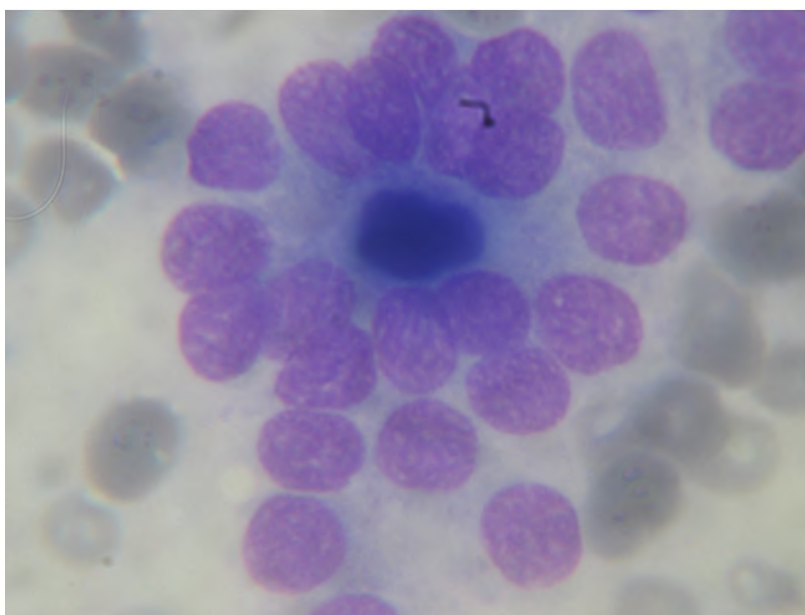


Рис. 4.10 Аспірат фолікулярного варіанту папілярного раку щитоподібної залози. Май-Грюнвальд-Гімза, $\times 400$.

Злоякісні пухлини у цій групі мали менші розміри (у середньому $18,2 \pm 3,3$ мм) порівняно з доброякісними (у середньому $25,5 \pm 2,6$ мм).

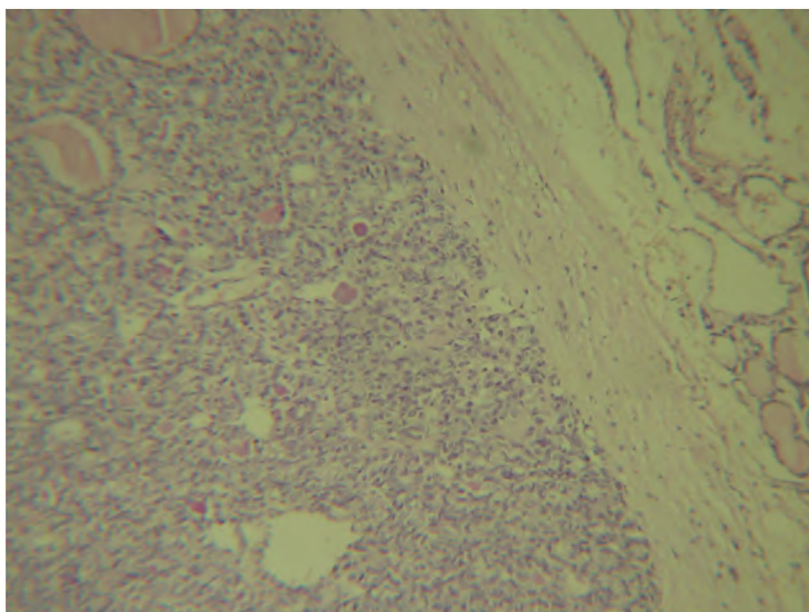


Рис. 4.11. Фолікулярний варіант папілярного раку щитоподібної залози.
Гематоксилін-еозин, $\times 100$.

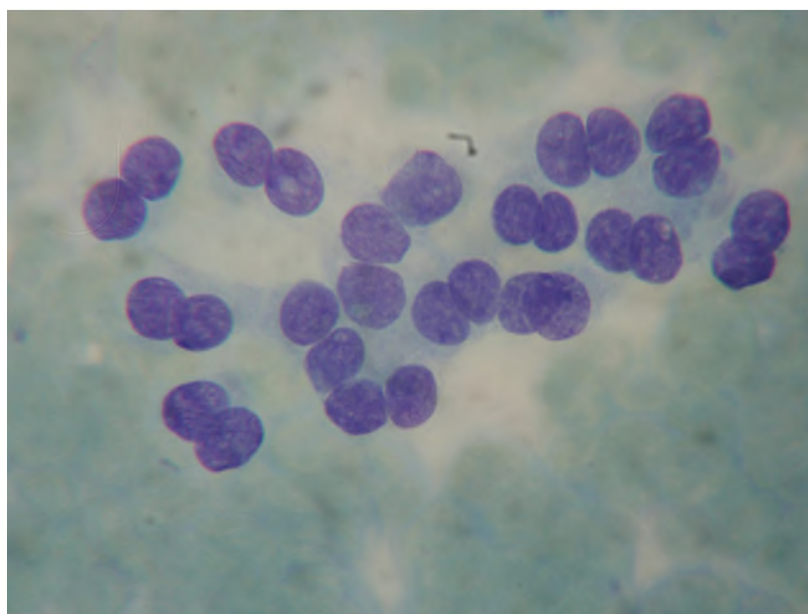


Рис. 4.12. Аспірат папілярного раку щитоподібної залози. Толуїдиновий
синій, $\times 200$.

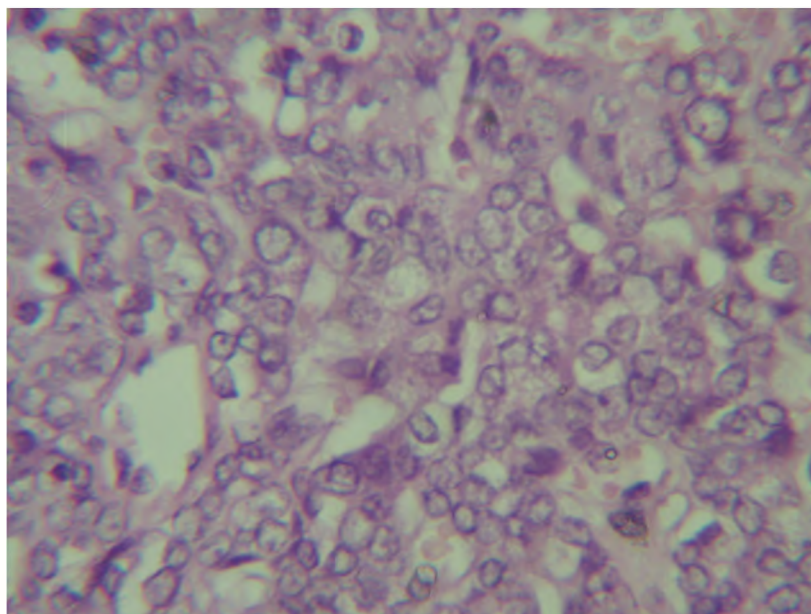


Рис. 4.13. Фолікулярний варіант папілярного раку щитоподібної залози, інкапсульований варіант. Гематоксилін-еозин, $\times 200$.

Тридцять сім пацієнтів зі злоякісними цитологічними висновками ТАПБ було прооперовано. В усіх випадках за результатами гістологічного дослідження підтверджено діагноз злоякісної пухлини: 27 ПРЩЗ, 4 ФВПРЩЗ, 1 дифузно-склерозуючий варіант ПРЩЗ, 2 ФРЩЗ, 1 МРЩЗ, 2 лімфоми (рис. 4.14, 4.15, 4.16).

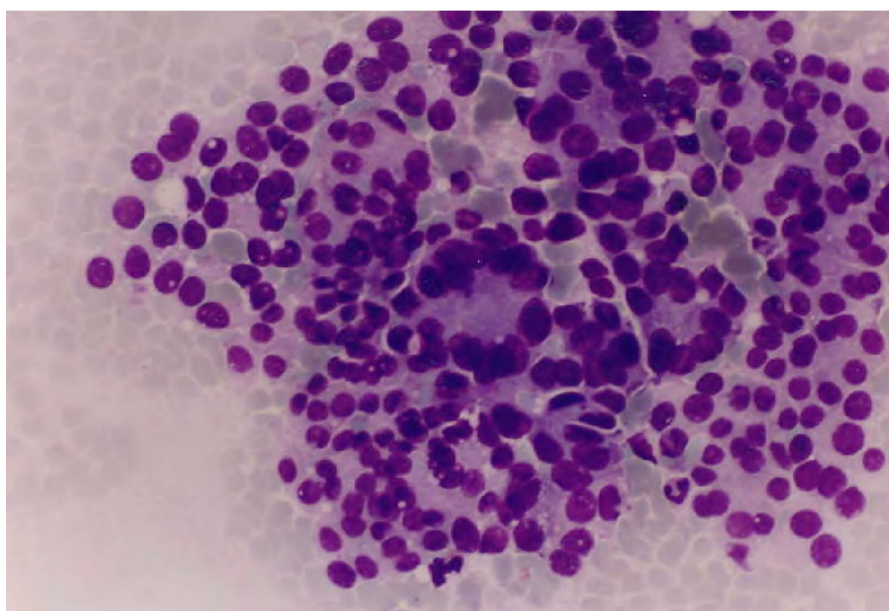


Рис. 4.14. Аспірат «фолікулярної пухлини» з атипією. Згідно гістологічного дослідження - ФРЩЗ. Май-Грюнвальд-Гімза, $\times 200$.

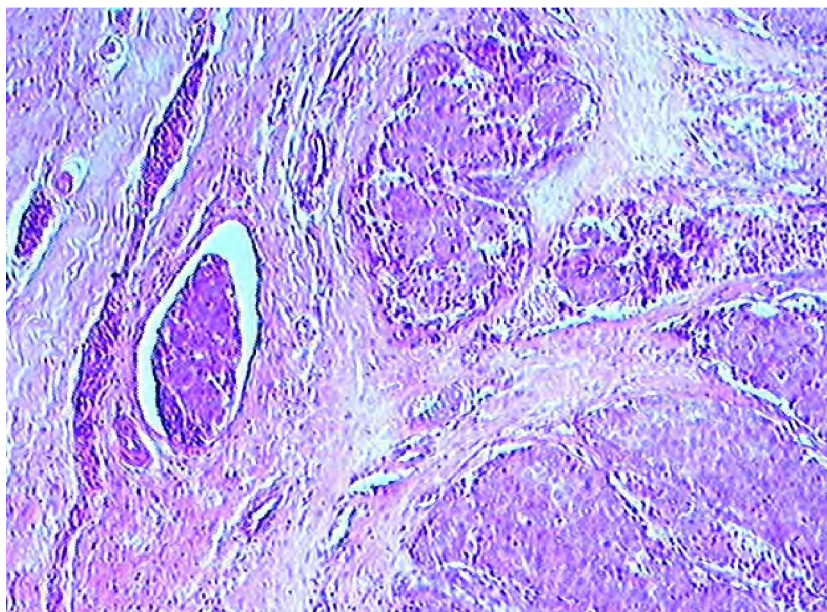


Рис. 4.15. Фолікулярний рак щитоподібної залози, широка інвазія. Гематоксилін-еозин, $\times 100$.

Проведено імуноцитохімічне дослідження кальцитоніну на аспіраті МРЩЗ. Результат стандартного цитологічного аналізу та імуноцитохімічної реакції на аспіраті МРЩЗ наведено на рис. 4.16 і 4.17.

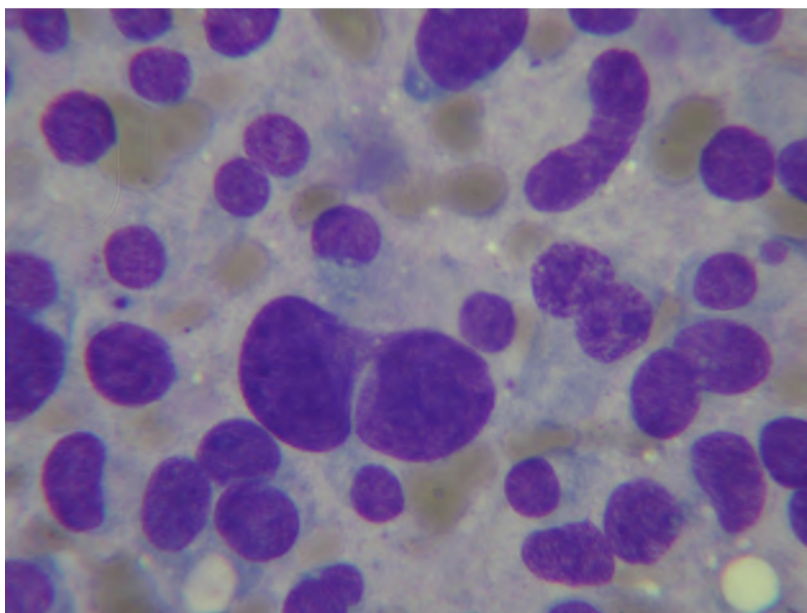


Рис. 4.16. Аспірат медулярного раку щитоподібної залози. Май-Грюнвальд-Гімза, $\times 400$.

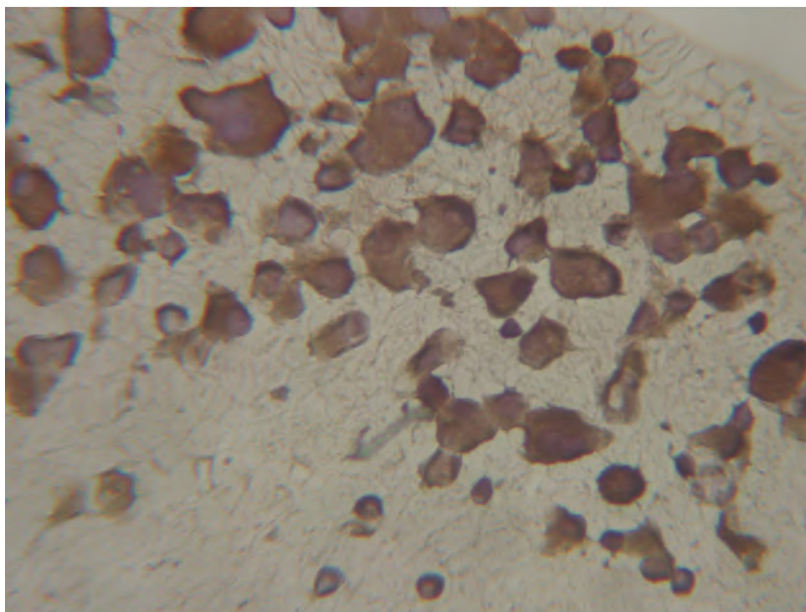


Рис. 4.17. Позитивна імуноцитохімічна реакція кальцитоніну на аспіраті медулярного раку щитоподібної залози, $\times 200$.

За результатами гістологічного дослідження було виявлено 47/157 (30,3 %) випадків злоякісних пухлин і 110/157 (69,7 %) – доброякісних (табл. 4.4). Чутливість і специфічність ТАПБ вузлів ЩЗ для діагностики РЩЗ (з розглядом як позитивні лише злоякісних цитологічних висновків) склали 78,7 % і 98 % відповідно. З урахуванням сумнівних і злоякісних цитологічних висновків ТАПБ як позитивних чутливість специфічність методу склали 97,8 % і 67,5 % відповідно. Усі хибно-позитивні та хибно-негативні результати були з групи сумнівних цитологічних висновків.

Загалом було виявлено 47/157 випадків злоякісних пухлин ЩЗ, частота РЩЗ серед оперованих дитячих випадків склала 29,9 %. З метою визначення ефективності ТАПБ проаналізовано лише інформативні випадки.

Чутливість і специфічність методу визначали, розглядаючи сумнівні цитологічні висновки ТАПБ або як «негативні», або як «позитивні» результати щодо злоякісності.

Порівняльний аналіз гістологічних і цитологічних діагнозів, n

Гістологічні висновки	Цитологічні висновки			
	неінформативні	доброякісні	сумнівні	злаякісні
Доброякісні (110)	12	63	35	0
Злаякісні (47)	0	1	9	37
Всього (157)	12	70	50	33

Коли за «позитивні» результати враховували лише злаякісні цитологічні висновки, а сумнівні відносили до «негативних», отримали 37 істинно-позитивних результатів, 10 хибно-негативних, 110 істинно-негативних і 0 хибно-позитивних. Чутливість і специфічність методу склали 78,7 % і 100 % відповідно.

Коли злаякісні та сумнівні цитологічні висновки ТАПБ відносили до «позитивних», визначили 46 істинно-позитивних результатів, 1 хибно-негативний, 75 істинно-негативних і 35 хибно-позитивних результатів. Чутливість і специфічність за таких умов склали 97,8 % і 68,1 % відповідно. За обох підходів більшість хибно-позитивних і хибно-негативних результатів виходили з групи сумнівних цитологічних висновків.

4.3. Діагностична ефективність застосування імуноцитохімічного дослідження тиреоїдної пероксидази в аспіратах вузлів щитоподібної залози у дітей

З огляду на те, що РЦЗ у дітей схильний до швидкої прогресії, наслідки можливих хибно-негативних результатів ТАПБ викликають серйозну стурбованість. З іншого боку, агресивний лікувальний підхід, обраний на підставі хибно-позитивного результату ТАПБ, обумовлює неадекватність

хірургічного втручання. Метою даного фрагменту дослідження був аналіз діагностичної ефективності стандартного цитологічного дослідження у великій когорті педіатричних пацієнтів і визначення доцільності застосування імуноцитохімічного дослідження з МоАт 47 у діагностиці вузлів ЩЗ у дітей.

Серед 707 дітей із вузловим зобом, яким проведено ТАПБ, було 559 дівчинок і 148 хлопчиків (співвідношення 3,7:1). Вік хворих коливався від 5 до 17 років. У досліджуваній групі було 52 пацієнти препубертатного віку (вік 5-10 років) у тому числі 33 дівчинки та 19 хлопчиків (співвідношення 1,7:1) і 655 – пубертатного віку (11-17 років), у тому числі 526 дівчинок і 129 хлопчиків (співвідношення 4,0:1).

За даними, наведеними у таблиці 4.5, виявлено значну частоту вузлового зоба серед дітей пубертатного віку, а також більшу частку дівчинок порівняно з пацієнтами молодшого віку. Усі первинні цитологічні діагнози розподілено на чотири діагностичні категорії: 66 неінформативних (9,3 %), 510 доброякісних (72,1 %), 86 сумнівних (12,2 %), 45 злоякісних (6,4 %).

Результати цитологічних досліджень залежно від віку та статі пацієнтів наведено у таблиці 4.6.

На підставі клінічних даних і результатів ТАПБ 165 хворим було проведено гемі- або тиреоїдектомію. Для більшості пацієнтів із доброякісними висновками ТАПБ показанням до операції були великі розміри вузла (у середньому $34,4 \pm 4,3$ мм). Середній розмір вузлів у хворих із доброякісними висновками ТАПБ був значно більшим, ніж у пацієнтів із сумнівними висновками ТАПБ ($23,0 \pm 1,3$ мм) або злоякісними ($27,2 \pm 1,8$ мм).

Під час гістологічного дослідження діагностовано 121 випадок доброякісної патології і 44 – злоякісних пухлин ЩЗ. Розподіл первинних цитологічних висновків та остаточних гістологічних діагнозів наведено у таблиці 4.7.

У хворих із неінформативними висновками ТАПБ за результатами гістологічного дослідження виявлено кісти ЩЗ.

Таблиця 4.5

**Розподіл дітей, яким проведено тонкоголкову аспіраційну пункційну
біопсію вузлів щитоподібної залози, за віком і статтю, n**

Вік, роки	Дівчинки	Хлопчики	Всього
4	2	1	3
5	0	1	1
6	0	4	4
7	3	3	6
8	4	0	4
9	7	4	11
10	17	6	23
11	16	7	23
12	20	11	31
13	42	9	51
14	74	20	94
15	126	27	153
16	139	24	163
17	109	31	140
Всього	559	148	707

Шістдесяти дев'ятьом із сімдесятьох (98,5 %) пацієнтам із доброякісними висновками ТАПБ під час гістологічного дослідження встановлено діагноз доброякісного процесу. Найчастіше такий діагноз відповідав багатовузловому зобу і фолікулярній аденомі. В одному випадку з доброякісним цитологічним висновком виявлено ФВПРЩЗ. У пацієнтів із сумнівними висновками ТАПБ РЩЗ було підтверджено у 10 випадках із 50 (20,0 %). Пухлини з невизначеним потенціалом малігнізації (аденоми з обмеженими ядерними ознаками ПРЩЗ) діагностовано у 8 випадках із 50 (16,0 %). У 32 із 50 (64,0 %) випадках із сумнівними цитологічними висновками за результатами гістологічного дослідження встановлено діагноз доброякісного процесу (БВЗ, ФА, АІТ).

Таблиця 4.6

Розподіл цитологічних висновків тонкоголкової аспіраційної пункційної біопсії залежно від віку та статі дітей (n)

Стать	Цитологічні висновки			
	неінформативні (66)	доброякісні (510)	сумнівні (86)	злаякісні (45)
Препубертатний вік				
Дівчинки (33)	4	22	2	5
Хлопчики (19)	3	8	6	2
Пубертатний вік				
Дівчинки (526)	43	385	67	31
Хлопчики (129)	16	95	11	7

Для оцінки ефективності ТАПБ ми аналізували лише інформативні цитологічні препарати (153 випадки). Чутливість, специфічність і прогностичну цінність визначали з використанням двох підходів: розгляд сумнівних висновків ТАПБ або як «негативних», або як «позитивних» щодо злаякісності.

Коли як «позитивні» розглядали лише злаякісні висновки ТАПБ, а сумнівні розцінювали як «негативні», 33 випадки виявилися істинно-позитивними, 11 – хибно-негативними, 109 – істинно-негативними, хибно-позитивних випадків не було. Чутливість і специфічність склали 75,0 % і 100 % відповідно. Коли за «позитивні» вважали злаякісні та сумнівні висновки ТАПБ, 43 випадки виявилися істинно-позитивними, 1 – хибно-негативним, 69 – істинно-негативними та 40 – хибно-позитивними. Чутливість і специфічність склали 97,7 % і 63,3 % відповідно.

Таблиця 4.7

Кореляція цитологічних висновків і гістологічних діагнозів у дітей (n)

Гістологічний діагноз	Цитологічні висновки			
	неінформативні (12)	доброякісні (70)	сумнівні (50)	злаякісні (33)
Доброякісні (121):				
кіста	8	0	0	0
багатовузловий зоб	0	23	8	0
фолікулярна аденома	4	42	21	0
атипова аденома	0	1	8	0
автоімунний тиреоїдит	0	3	3	0
Злаякісні (44):				
папілярний рак	0	0	4	25
фолікулярний варіант папілярного раку	0	1	5	4
фолікулярний рак	0	0	1	2
медулярний рак	0	0	0	2

У даному дослідженні ми оцінили ефективність імуноцитохімічного дослідження ТПО із МоАт 47 у цитологічній діагностиці вузлів ЩЗ у дітей. Дане дослідження проведено на цитологічних препаратах 54 прооперованих хворих. За результатами гістологічного дослідження виявлено 32 доброякісних і 22 злаякісних захворювання. У 24 із 33 випадків із доброякісними висновками ТАПБ виявлено високий рівень реакції з МоАт 47 (понад 80 % позитивно забарвлених клітин), але в усіх випадках зі злаякісними висновками ТАПБ реакція із МоАт 47 була негативною. Результати стандартного цитологічного дослідження та імуноцитохімічного дослідження з МоАт 47 наведено на рисунку 4.18.

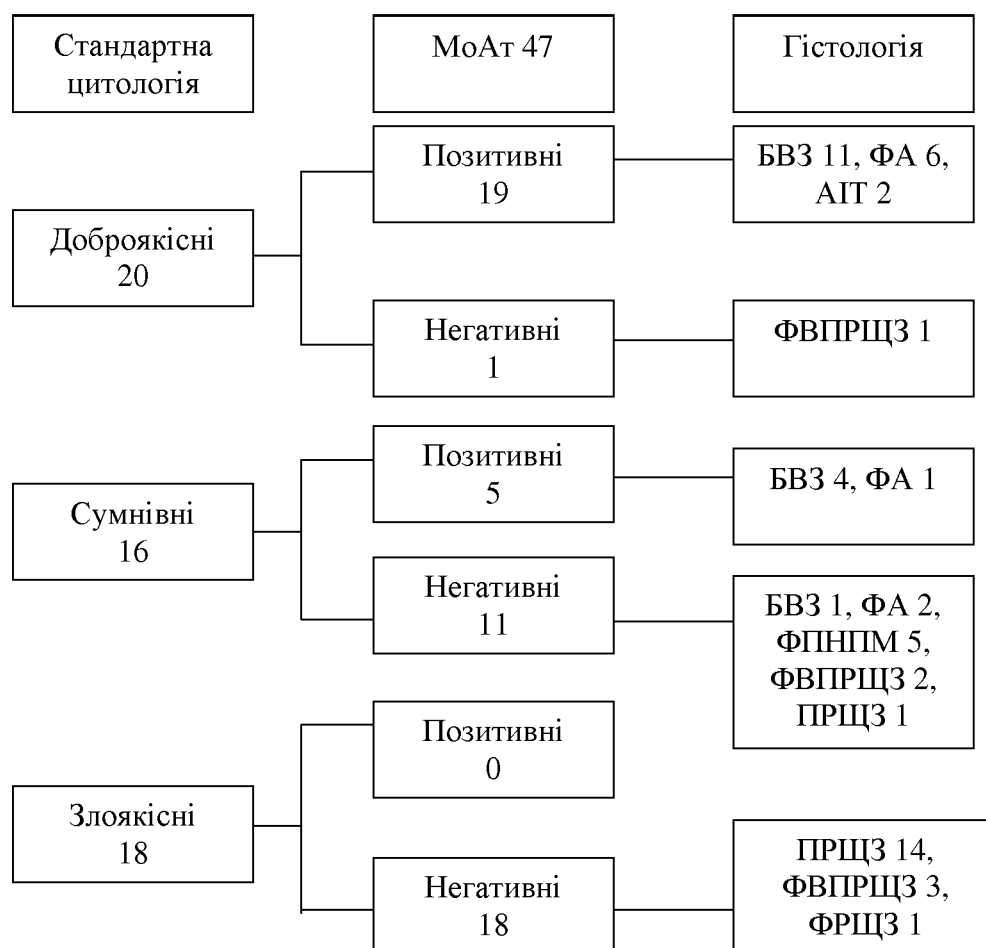


Рис. 4.18. Порівняльний аналіз результатів стандартного цитологічного дослідження, імуноцитохімічного дослідження із МоАт 47 та остаточних гістологічних діагнозів у дітей.

У випадках доброякісних висновків ТАПБ реакція з МоАт 47 була позитивною у 19 з 20 випадків, а в одному випадку, який за результатами гістологічного дослідження відповідав ФВПРЦЗ, реакція була відсутньою. У пацієнтів із сумнівними висновками ТАПБ виявлено позитивну імуноцитохімічну реакцію з МоАт 47 у 7 випадках (рис. 4.19, 4.21), які за результатами гістологічного дослідження відповідали доброякісному процесу (БВЗ, ФА), проте у випадках раку та пухлин з обмеженими ядерними ознаками ПРЦЗ реакція була слабкою. В усіх випадках злоякісних пухлин виявлено слабку реакцію з МоАт 47 (рис. 4.20, 4.22).

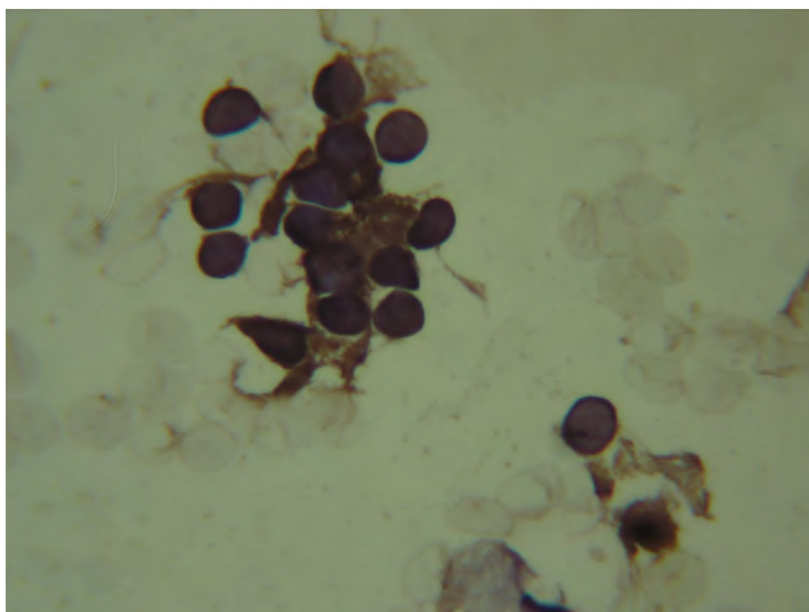


Рис. 4.19. Позитивна імуноцитохімічна реакція в аспіраті макро-
мікрофолікулярної аденоми щитоподібної залози, $\times 200$.

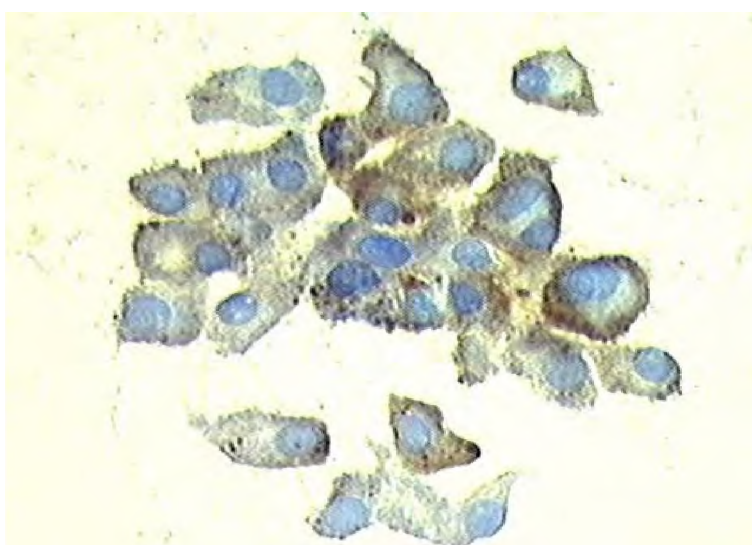


Рис. 4.20. Слабка імуноцитохімічна реакція із МоАт 47 в аспіраті
фолікулярної пухлини з невизначеним потенціалом малігнізації, $\times 400$.

За результатами імуногістохімічного дослідження із МоАт виявлено позитивну реакцію у ФА та негативну – у ПРЩЗ (рис. 4.21, 4.22).

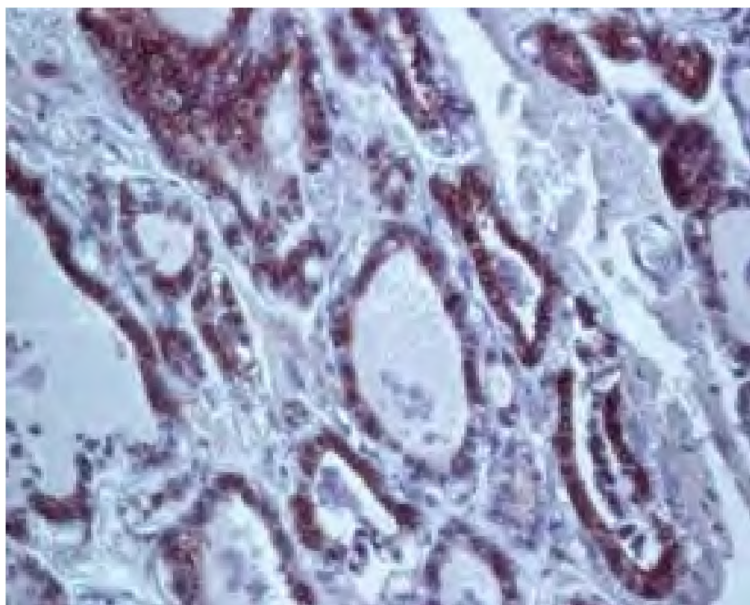


Рис. 4.21. Позитивна імуногістохімічна реакція з МоАт 47 у макрофолікулярній аденомі щитоподібної залози, $\times 200$.

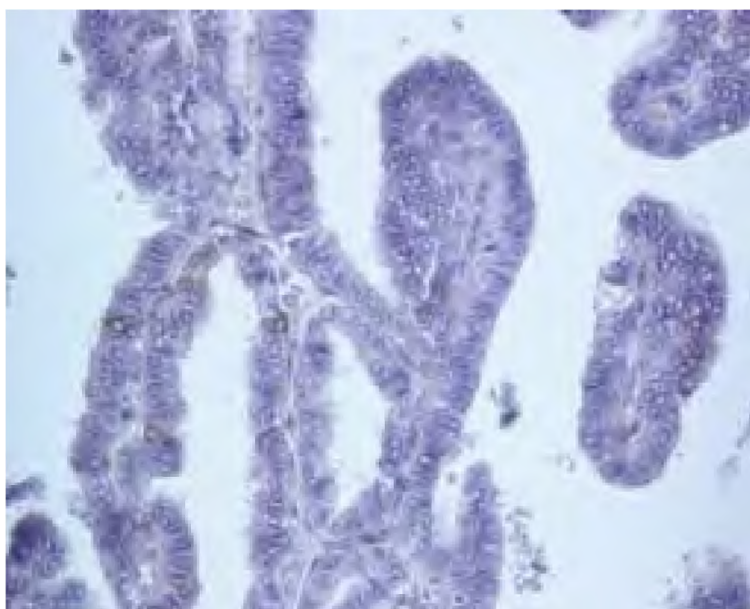


Рис. 4.22. Негативна імуногістохімічна реакція із МоАт 47 у препараті папілярного раку щитоподібної залози, $\times 200$.

Статистичний аналіз результатів стандартного цитологічного дослідження та імуноцитохімічного визначення активності ТПО з МоАт 47 наведено у таблиці 4.8.

Таблиця 4.8

Діагностична ефективність стандартного цитологічного дослідження та імуноцитохімічного визначення ТПО з МоАт 47 (%)

Показник ефективності	Стандартна цитологія	МоАт 47
Чутливість	95,4	100
Специфічність	55,8	75,0
Позитивний прогностичний індекс	61,7	73,3
Негативний прогностичний індекс	95,0	100

Отже, розглянуто доцільність імуноцитохімічного дослідження з МоАт 47 на аспіратах вузлів ЩЗ у 54 пацієнтів дитячого віку. Зменшення імунореактивності з МоАт 47 відзначено в усіх випадках злоякісних пухлин ЩЗ, а також у пухлинах із невизначеним потенціалом малігнізації. З іншого боку, виявлено високий рівень імунореактивності з МоАт 47 в усіх випадках доброякісних пухлин. Застосування даного методу у групі сумнівних висновків ТАПБ допомагає виявляти доброякісні пухлини, що дозволяє уникати неадекватних хірургічних втручань і значно підвищити чутливість і специфічність стандартного цитологічного дослідження.

4.4. Роль виявлення мутацій *BRAF* на аспіратах вузлів щитоподібної залози

Нещодавно запропоновано виявлення мутації *BRAF* у передопераційний період на цитологічних препаратах ТАПБ як новий метод для визначення груп високого ризику ПРЩЗ. Метою даного фрагменту дослідження було встановлення можливості застосування рутинно забарвлених цитологічних

препаратів ТАПБ для виділення ДНК та оцінки мутації *BRAF*^{V600E}. Також у даній роботі оцінено ефективність даного методу у цитологічній діагностиці сумнівних ТАПБ і можливість ідентифікації пацієнтів із високим ризиком розвитку метастазів у групі з цитологічно діагностованим ПРЩЗ.

З метою оцінки можливого застосування виявлення мутацій *BRAF* як доповнення до стандартного цитологічного аналізу досліджено ДНК, яку виділяли з рутинно забарвлених цитологічних препаратів ТАПБ. Попередньо на цитологічних препаратах виявляли ділянки з високою щільністю клітин, що становлять інтерес для виділення ДНК. Кількість ДНК, що її оцінювали перед молекулярним тестуванням, коливалась від 1 мкг до 5 мкг. Якість ДНК оцінювали під час ПЛР-ампліфікації гена *BRAF*. З усіх цитологічних препаратів виділено достатню кількість ДНК адекватної якості, що дозволило застосувати менше від 35 циклів ампліфікації.

Для оцінки ефективності застосування виявлення мутації *BRAF* у цитологічній діагностиці сумнівних випадків ТАПБ вивчено цитологічні препарати ЩЗ 30 хворих із сумнівними висновками. За цитологічними критеріями сумнівні результати ТАПБ було розподілено на дві підгрупи: фолікулярна пухлина (20 випадків) і підозра на рак (10 випадків). Частоту мутації *BRAF* залежно від патогістологічного діагнозу наведено у табл. 4.9.

У групі сумнівних ТАПБ *BRAF*-мутацію виявлено у 2/30 (6,0 %) випадках (1 фолікулярний і 1 класичний варіант ПРЩЗ). Обидва *BRAF*-позитивні випадки було діагностовано як сумнівні за даними стандартного цитологічного аналізу. У жодному з цитологічних препаратів фолікулярної аденоми мутації *BRAF* не виявлено.

На цитологічних препаратах ТАПБ 104 пацієнтів із ПРЩЗ виявляли мутацію *BRAF* та аналізували її зв'язок із клініко-морфологічними характеристиками пухлин. Мутацію *BRAF* виявлено у 43 (46,2 %) із 93 випадків із класичним ПРЩЗ і у чотирьох (36,3 %) з 11 випадків ФВПРЩЗ, що загалом склало 45,2 %. Результати аналізу зв'язку між наявністю мутації *BRAF*, віком і статтю пацієнтів наведено у табл. 4.10.

Таблиця 4.9

Результати виявлення мутації *BRAF* у сумнівних випадках ТАПБ

Гістологічний висновок	Фолікулярна неоплазія (n=20)		Підозра на рак (n=10)	
	<i>BRAF</i> (+)	<i>BRAF</i> (-)	<i>BRAF</i> (+)	<i>BRAF</i> (-)
ФА (10)	0	9	0	1
ФРЩЗ (5)	0	4	0	1
ФВПРЩЗ (10)	0	7	1	2
ПРЩЗ (5)	0	0	1	4

Таблиця 4.10

Частота мутації *BRAF* залежно від віку та статі пацієнтів із папілярним раком щитоподібної залози

Показник	<i>BRAF</i> (+), n=47	<i>BRAF</i> (-), n=57	p
Вік на момент встановлення діагнозу, роки	42,4±13,3	40,3±17,3	0,49
Стать (ч / ж)	8/39	13/44	0,62

За результатами однофакторного аналізу не було виявлено вірогідної кореляції між наявністю мутації *BRAF*^{V600E} і віком або статтю пацієнта. Частота мутації *BRAF* істотно не різнилася серед пацієнтів віком на момент операції до 45 років і хворих віком 45 років і більше. Наявність мутації *BRAF*^{V600E} було пов'язано з такими клініко-морфологічними параметрами, як розмір пухлини, багатофокусний ріст, екстраорганна інвазія та наявність МЛВ. Частоту мутації *BRAF*^{V600E} залежно від розміру пухлини наведено у табл. 4.11. Виявлено більшу частоту мутації *BRAF*^{V600E} у пухлинах розміром 3 см і більше порівняно з пухлинами невеликих розмірів, але різниця не була статистично значущою.

Таблиця 4.11

Зв'язок між наявністю мутації *BRAF* і розміром пухлини

Розмір пухлини	<i>BRAF</i> -позитивні випадки		Всього, n
	n	%	
1 см і менше	4	36,6	11
2-2,9 см	15	38,4	39
3-3,9 см	15	53,5	28
4 см і більше	13	54,1	24

Результати, що демонструють зв'язок між мутацією *BRAF*^{V600E} і чинниками несприятливого прогнозу пухлин ЩЗ, наведено у табл. 4.12. Багатофокусний ріст частіше виявлявся у *BRAF*-позитивних, ніж у *BRAF*-негативних ПРЩЗ, проте ця різниця не була вірогідною. Встановлено зв'язок між наявністю *BRAF*-мутації на цитологічних препаратах ТАПБ і чинниками негативного прогнозу (ознаки екстраорганної інвазії та МЛВ), виявленими після патогістологічного дослідження операційного матеріалу тканини залози.

Наші результати показали, що виділення ДНК зі стандартно забарвлених цитологічних препаратів ТАПБ є можливим. Якість ДНК, виділеної із забарвлених препаратів, була належною для генетичного аналізу. Кількість виділеної ДНК була більшою порівняно із зазначеною у результатах тих досліджень, де нуклеїнові кислоти виділяли з матеріалу, що залишився у голці після ТАПБ.

Наші результати дозволяють припустити, що цитологічне дослідження забарвлених препаратів може бути корисним для вибору ділянки з достатньою клітинністю для подальшого виділення ДНК. Ми розглянули статус мутації *BRAF* у серії цитологічних препаратів, які після стандартного цитологічного дослідження класифіковано як сумнівні. Наші результати показали, що виявлення мутації *BRAF* мало обмежену діагностичну цінність у випадках із сумнівними цитологічними висновками ТАПБ. У пацієнтів зі злоякісними цитологічними висновками мутацію *BRAF* було виявлено у 45,2 % випадків.

Таблиця 4.12

Зв'язок між наявністю мутації *BRAF* і чинниками несприятливого прогнозу папілярного раку щитоподібної залози, n (%)

Чинник	<i>BRAF</i> (+), n=47	<i>BRAF</i> (-), n=57	p
Багатофокусний ріст	21 (44,6)	16 (28,1)	0,1
Екстраоргана інвазія	35 (74,4)	24 (42,1)	0,001
Метастази у лімфатичних вузлах	37 (78,7)	28 (49,1)	0,002

Отже, доведено, що забарвлені цитологічні препарати ТАПБ вузлів ЩЗ можна використовувати для виділення ДНК та оцінки наявності мутації *BRAF*^{V600E}. Визначено, що виявлення даної мутації має обмежене значення для діагностики злоякісного процесу у випадках із сумнівними цитологічними висновками ТАПБ. Виявлення мутації *BRAF*^{V600E} у випадках злоякісних висновків ТАПБ може бути корисним для передопераційного визначення пухлин із високим ризиком екстраорганої інвазії та метастазів у лімфовузлах.

Резюме до розділу 4

Для оцінки ефективності застосування НВМЕ-1 у цитологічній діагностиці аспіратів вузлів ЩЗ, а також визначення ефективності його комбінованого застосування із МоАт 47 і ДАП IV проведено імуноцитохімічне дослідження на препаратах 111 випадків РЩЗ.

Встановлено, що за умови комбінованого імуноцитохімічного дослідження ТПО із МоАт 47 і цитохімічного визначення активності ДАП IV чутливість, специфічність і позитивна прогностична цінність методу склали 100 %, 98,3 % і 98 % відповідно. Хибно-позитивні результати за імуноцитохімічного дослідження ТПО із МоАт 47, цитохімічного визначення активності ДАП IV та імуноцитохімічного дослідження з НВМЕ-1 склали 3,6 %, 4,5 % і 29,7 % відповідно. За комбінованого застосування

імуноцитохімічного визначення ТПО із МоАт 47 і цитохімічного визначення активності ДАП IV хибно-позитивні результати визначено у лише у 0,9 % випадків.

Для оцінки клінічного значення ТАПБ у діагностиці вузлів ЩЗ у дітей визначення доцільності застосування імуноцитохімічного дослідження із МоАт 47 проведено порівняльний аналіз цитологічних і гістологічних діагнозів, а також проаналізовано ефективність стандартного цитологічного дослідження аспіратів і використання МоАт 47. У 64,3 % випадках із сумнівними цитологічними висновками за результатами остаточного гістологічного дослідження встановлено діагноз доброякісного процесу (БВЗ, ФА, АІТ). Застосуванням імуноцитохімічного дослідження із МоАт 47 під час цитологічного аналізу аспіратів вузлів ЩЗ у дітей дозволило значно підвищити основні показники ефективності: специфічність – на 19,2 %, позитивний прогностичний індекс – на 11,6 %. Так, чутливість і специфічність стандартного цитологічного аналізу та імуноцитохімічного дослідження ТПО із МоАт 47 склали 95,4 % і 100 % та 55,8 % і 75 % відповідно. Застосування цього методу дозволило зменшити кількість сумнівних цитологічних висновків та уникнути неадекватних оперативних втручань з приводу доброякісних утворень ЩЗ у дітей.

Для оцінки можливого застосування виявлення мутації *BRAF*^{V600E} як доповнення до стандартного цитологічного аналізу аспіратів ЩЗ досліджено ДНК, яку виділяли з рутинно забарвлених цитологічних препаратів вузлів ЩЗ. Також оцінено ефективність даного методу у цитологічній діагностиці сумнівних ТАПБ і можливість ідентифікації пацієнтів із високим ризиком розвитку метастазів у групі з цитологічно діагностованим ПРЩЗ.

У групі сумнівних ТАПБ мутацію *BRAF*^{V600E} виявлено у 6,0 % випадків (1 ФВПРЩЗ і 1 класичний варіант ПРЩЗ). У жодному випадку доброякісних утворень дану мутацію не виявлено. Загалом у 45,2 % випадків ПРЩЗ визначено мутацію *BRAF*^{V600E}, що корелює з даними літератури [41]. Доведено, що забарвлені цитологічні препарати вузлів ЩЗ можна використовувати для

виділення ДНК і виявлення мутації *BRAF*^{V600E}. Виявлення мутації *BRAF*^{V600E} у випадках ПРЩЗ у передопераційний період дозволяє визначити пухлини з високим ризиком розвитку екстраорганної інвазії та метастазів.

Результати, викладені у даному розділі, опубліковано у працях:

1. Хоперія В.Г. Імуноцитохімічне (НВМЕ-1, ТПО) та цитохімічне дослідження після ТАПБ вузлів щитоподібної залози [Текст] / В.Г. Хоперія // Клінічна ендокринологія та ендокринна хірургія. – 2010. – № 3 (32) – С. 9-14.
2. Utility of malignancy markers in fine-needle aspiration cytology of thyroid nodules: comparison of Hector Battifora mesothelial antigen-1, thyroid peroxidase and dipeptidyl aminopeptidase IV [Text] / C. de Micco, V. Savchenko, R. Giorgi, F. Sebag, J.F. Henry // Br. J. Cancer. – 2008. – V. 98, № 4. – P. 818-823.
3. Thyroid fine needle aspiration biopsies in children: study of cytological-histological correlation and malignancy markers [Text] / V. Hoperia, K. Jensen, O. Larin, A. Bauer, V. Vasko // Int. J. Pediatr. Endocrinol. – 2010. – V. 2010, No. 690108. - 5 p.
4. Хоперія В.Г. Тонкоголкова аспіраційна пункційна біопсія у дітей: кореляція цитологічних і гістологічних діагнозів [Текст] / В.Г. Хоперія // Клінічна ендокринологія та ендокринна хірургія. – 2010. – № 2 (31) – С. 8-10.
5. Detection of BRAFV600E mutation in May-Grunwald stained thyroid FNA samples can help in identification of cancers with a high risk of extra-thyroidal extension and metastases [Text] / V. Hoperia, J. Klubo-Gwiedzinska, K. Jensen, A. Patel, A. Bauer, V. Vasko // Annual meeting of Endocrine society. – Boston, USA, 2011 – P. 665.

6. BRAF(V600E) mutation analysis from May-Grünwald Giemsa-stained cytological samples as an adjunct in identification of high-risk papillary thyroid carcinoma [Text] / V. Hoperia, J. Klubo-Gwiedzinska, K. Jensen, A. Patel, O. Larin, A. Bauer, V. Vasko // Endocr. Pathol. – 2011. – V. 22, № 4. – P. 195-199.

РОЗДІЛ 5

ОЦІНКА ВПЛИВУ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНИХ ЧИННИКІВ НА ПРОГНОЗ ПУХЛИН ЩИТОПОДІБНОЇ ЗАЛОЗИ

5.1. Значення активації протеїнкінази В у канцерогенезі пухлин щитоподібної залози

Активацію протеїнкінази В (Akt) оцінювали на 66 зрізах нормальної тканини ЩЗ за допомогою імуногістохімічного дослідження на загальний активований Akt із неізоформспецифічними антитілами до Akt. Активації Akt не виявлено у більшості (62 із 66) зразків нормальної тканини ЩЗ.

Також активацію Akt досліджували у 20 доброякісних фолікулярних аденомах, включаючи 10 випадків із зонами клітинної атипії, підозрілими на злоякісні зміни. У 6 з 10 пухлин із зонами атипії визначено активацію Akt, тоді як серед типових фолікулярних аденом активацію виявлено лише у 2 випадках із 10.

Слід відзначити, що активація Akt визначалася лише у клітинах ФПНПМ і поряд із судинами у типових фолікулярних аденомах. Тобто за нашими результатами активація Akt у доброякісних пухлинах визначалася рідко, на відміну від ФПНПМ.

Активацію Akt виявлено у зонах інвазії судин та інвазії капсули в усіх первинних випадках ФРЩЗ, а також у метастазах. На відміну від цього, у центральних ділянках пухлин, що не були інвазійними, імунореактивність до фосфорильованої Akt (pAkt) була значно меншою (рис. 5.1). Точкову мутацію (A-G) у кодоні 61 гена *N-RAS* виявлено у 3 із 10 ФРЩЗ. Не виявлено значної різниці в імунореактивності pAkt або pERK у пухлинах із або без активації мутації *RAS*.

Серед 36 випадків ПРЩЗ імуногістохімічно активацію Akt виявлено у 10 випадках ФВПРЩЗ, у 21 класичному ПРЩЗ і у 5 низькодиференційованих РЩЗ, що характеризувалися наявністю високих клітин і солідним типом росту.

Вестерн-блот-аналіз проведено у 14 з 36 випадків. Активацію Akt виявлено у 21 випадку класичного ПРЦЗ і в усіх 5 випадках низькодиференційованого раку. Водночас активацію Akt виявлено лише у 2 із 10 випадків фолікулярного варіанту ПРЦЗ. Інтенсивність активації pAkt була найбільшою у зонах інвазії та метастазах у лімфатичних вузлах, подібно до ФРЦЗ (рис. 5.1).

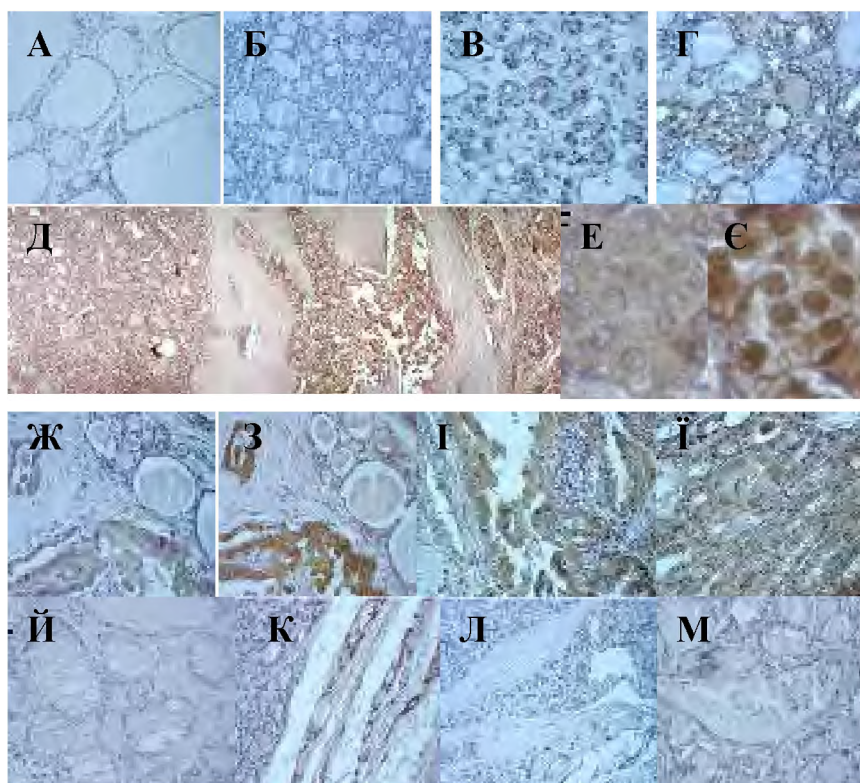


Рис. 5.1. Імуногістохімічна реакція pAkt, pERK і *RET* у тканині ЩЗ. Нормальна тканина залози (А); центральна ділянка ФА (Б) – відсутня імунореактивність pAkt; позитивна реакція у перикапсулярній зоні деяких ФА (В), у ФА з ознаками атипії клітин (Г); виражена реакція pAkt у ядрах клітин зон інвазії ФРЦЗ (Д), відсутня реакція pAkt у центральних ділянках ФРЦЗ (Е) позитивна ядерна реакція в зоні інвазії ФРЦЗ (Є). Позитивна реакція з pAkt у цитоплазмі клітин неінвазійних зон *RET*-позитивного ПРЦЗ (Ж, З). Ядерна та цитоплазматична активація pAkt у зонах інвазії та у метастазах ПРЦЗ (І, Ї). Відсутня активація pAkt у випадках *RET*-негативного ФВПРЦЗ (Й). Експресія pERK у ПРЦЗ (К), відсутня експресія pERK у ФА (Л) і ФРЦЗ (М). Експресія pERK в ендотеліальних клітинах ПРЦЗ (К, М).

Імуногістохімічне дослідження та імуноблотинг проведено на парафінових і свіжозаморожених препаратах інвазійних ПРЩЗ. В усіх випадках імуногістохімічно виявлено активацію Akt у зонах інвазії ПРЩЗ, але не в оточуючій тканині. Подібні результати отримано з використанням імуноблотингу: у 12 із 14 випадків виявлено надмірну активацію Akt (рис. 5.2).

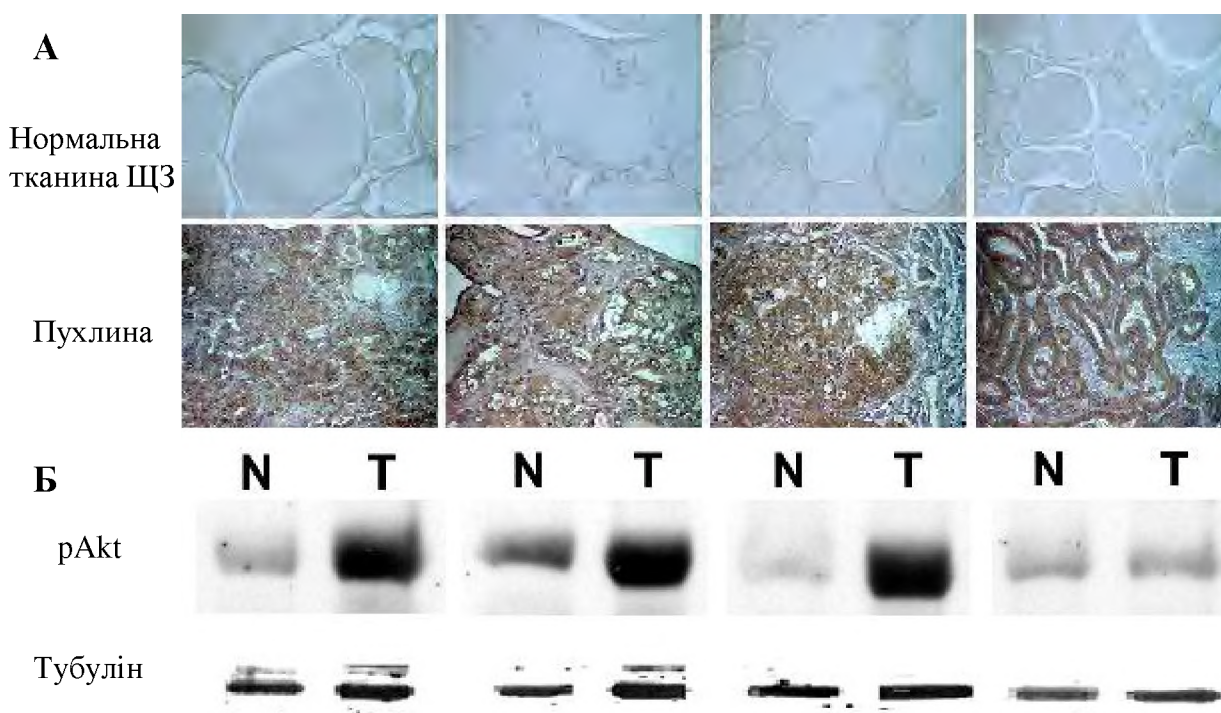


Рис. 5.2. Активація Akt у випадках інвазійного папілярного раку щитоподібної залози.

За допомогою імуногістохімічного методу досліджували експресію *RET*-білка у 10 випадках класичного ПРЩЗ і НРЩЗ у пацієнтів, які зазнали опромінення внаслідок аварії на ЧАЕС (ліквідатори, евакуйовані, мешканці забруднених регіонів). Період між опроміненням та операцією на ЩЗ складав $13,2 \pm 4,3$ року. У 8 із 10 випадків виявлено надмірну експресію гена *RET/PTC1*. В усіх 8 випадках шляхом ПЛР ізольованої загальної РНК було підтверджено наявність *RET/PTC1*. Із 2 випадків фолікулярного варіанту ПРЩЗ із підвищеною активністю pAkt в одному випадку виявлено надмірну експресію

RET і мутацію *N-RAS* у другому. Активації ERK у випадках фолікулярного варіанту ПРЩЗ не виявлено.

Із використанням імуногістохімічного дослідження та імуноблотингу встановлено рівень загального Akt і pAkt у 14 випадках ПРЩЗ (рис. 5.2). Виявлено підвищений рівень активованого pAkt у зонах інвазії та регіонарних метастазах в усіх 14 випадках ПРЩЗ. Шляхом вестерн-блот-аналізу виявлено високі рівні pAkt у 12 із 14 випадків (рис. 5.2. Б). За сумарними результатами обох досліджень виявлено надмірну активацію Akt у РЩЗ, а імуногістохімічна картина вказує на її зв'язок з інвазією пухлини.

За допомогою імуногістохімічного дослідження знайдено різницю у локалізації активованої Akt (ядро/цитоплазма) у ФРЩЗ і ПРЩЗ (рис. 5.3, 5.4).

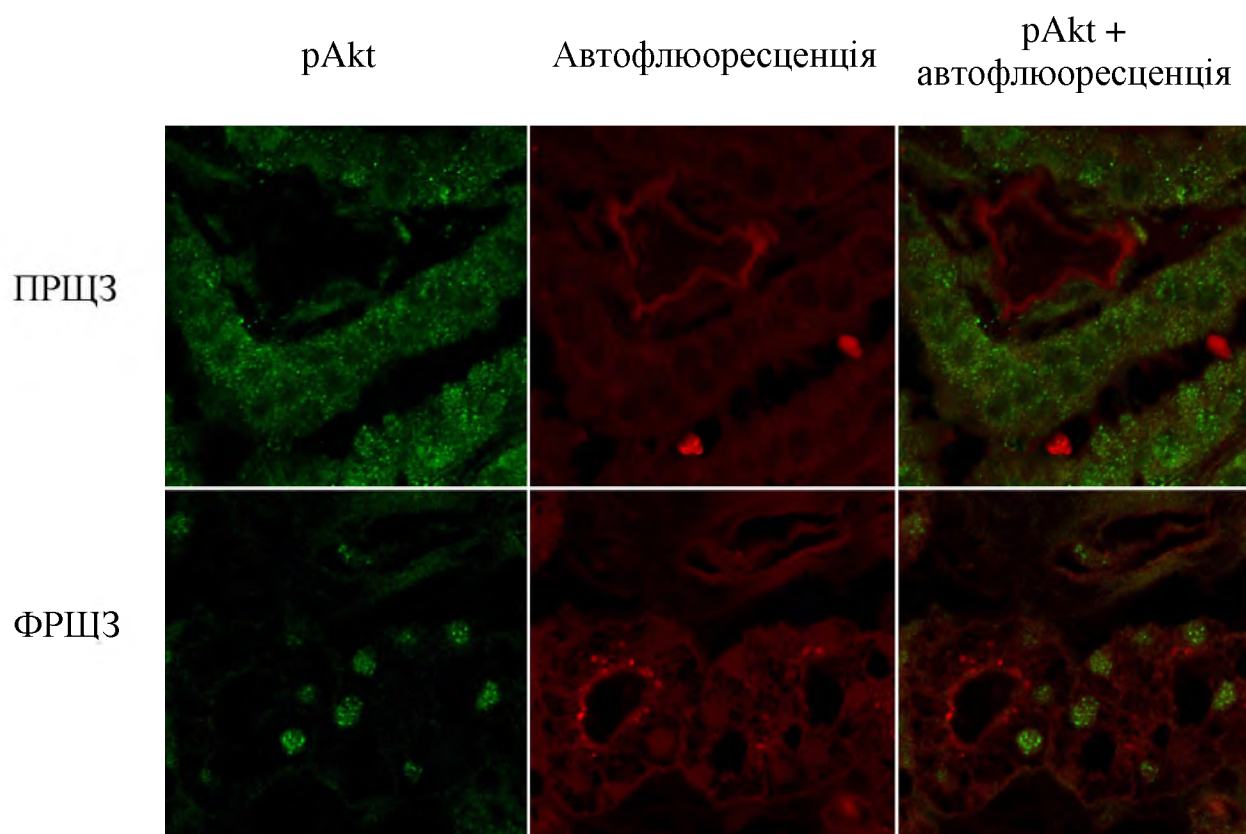


Рис. 5.3. Конфокальна мікроскопія активованої Akt у препаратах папілярного та фолікулярного раку щитоподібної залози.

Спочатку ядерну локалізацію активованої pAkt було виявлено у клітинах інвазійного ФРЦЗ та «атипових» клітинах фолікулярних аденом (ФПНПМ). На відміну від цього, для ПРЦЗ була характерною цитоплазматична локалізація. Для підтвердження отриманих результатів проведено конфокальну мікроскопію у 3 випадках: ПРЦЗ, ФРЦЗ і фолікулярна аденома (рис. 5.5).

За результатами конфокальної мікроскопії виявлено зв'язок між локалізацією активованої Akt (ядро/цитоплазма) і гістологічним підтипом РЦЗ, а саме: цитоплазматичну локалізацію pAkt виявлено у ПРЦЗ, а ядерну – у ФРЦЗ.

Нами виявлено асоціацію цитоплазматичної експресії *p27* з інвазією пухлини та/або активацією Akt і її локалізацією у пухлині РЦЗ. В усіх досліджуваних випадках (10 ФРЦЗ і 10 ПРЦЗ) виявлено цитоплазматичне накопичення *p27* у зонах інвазії (рис. 5.4), якого не спостерігали у зонах із відсутньою активацією Akt, а також в оточуючій тканині залози. Отже, в усіх досліджуваних випадках зони інвазії РЦЗ характеризувалися наявністю ядерної (ФРЦЗ) чи ядерної й цитоплазматичної (ПРЦЗ) pAkt і цитоплазматичної – *p27*.

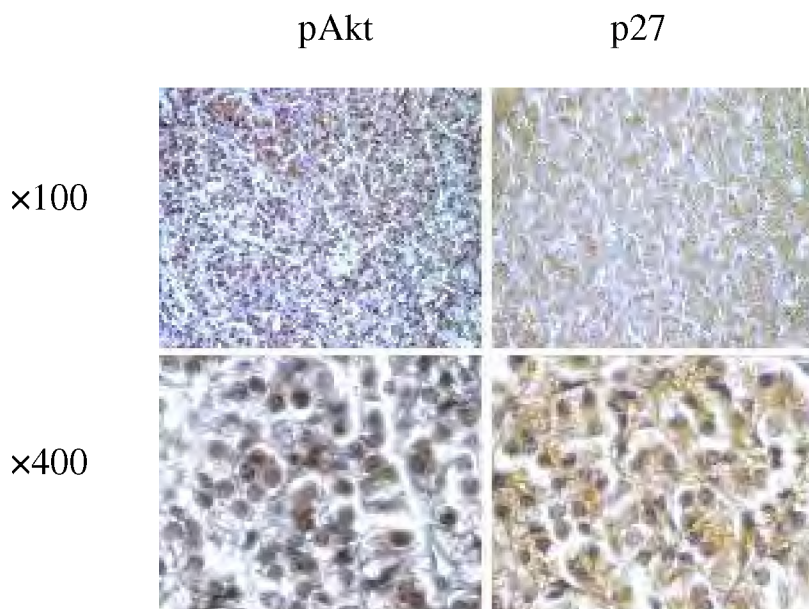


Рис. 5.4. Імуногістохімічне визначення *p27* у зонах інвазії раку щитоподібної залози.

Шляхом імуноблотингу показано надмірну експресію Akt1 і Akt2 у ФРЦЗ порівняно з нормальною тканиною залози, але без розподілу по ізоформах. З метою визначення експресії Akt1, 2 і 3 та загальної фосфорильованої Akt у 38 випадках проведено імуногістохімічний аналіз із використанням найбільш специфічних антитіл (>90 % визначення ізоформспецифічних імунопреципітатів). Репрезентативні результати для фолікулярних аденом, ПРЦЗ і ФРЦЗ наведено на рис. 5.5.

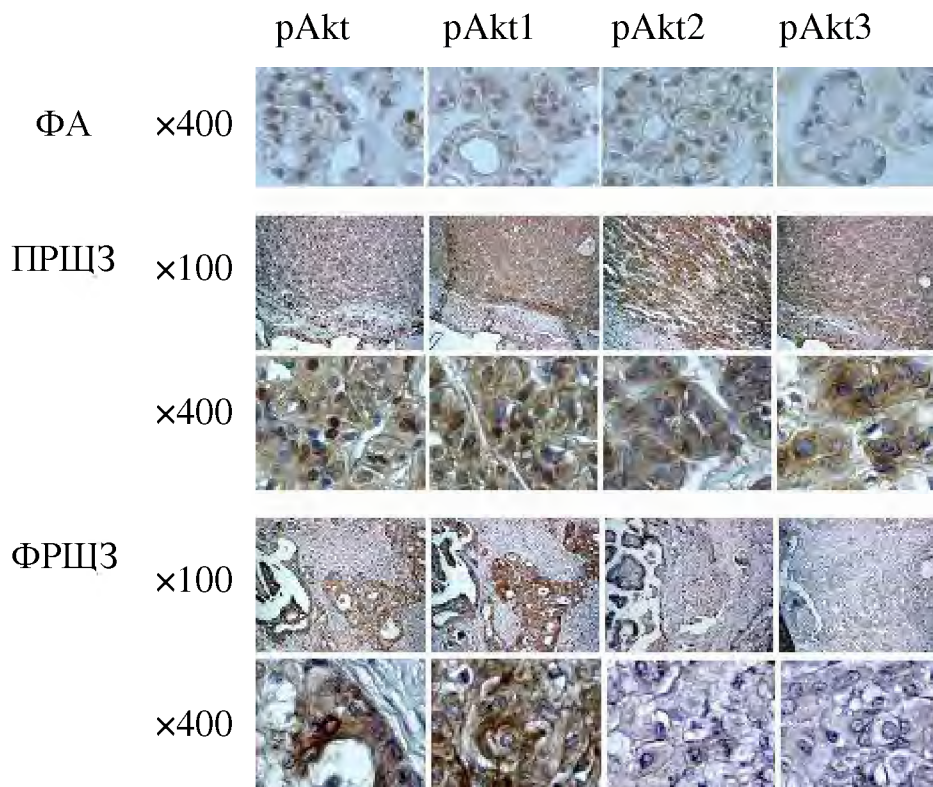


Рис. 5.5. Активація ізоформ Akt у пухлинах щитоподібної залози.

У фолікулярних аденомах pAkt було виявлено в атипових фолікулярних клітинах, а Akt1 і 2, розташованих у ядрі, та Akt3 не було визначено. У випадках ФРЦЗ експресію усіх 3 ізоформ Akt було представлено послідовно (див. рис. 5.5).

Для ПРЦЗ характерною є цитоплазматична локалізація pAkt, за виключенням зон інвазії, де була присутня і цитоплазматична, і ядерна Akt. У ПРЦЗ послідовно виявляли експресію лише Akt1. Для попереднього описання, з використанням загальної РНК, ізольованої з декількох ПРЦЗ, було проведено

специфічний кількісний ПЛР-аналіз. В усіх випадках виявлено більшу кількість мРНК Akt1, ніж Akt2 або Akt3, що відповідає результатам імуногістохімічних досліджень. Отже, у досліджуваних тканинах раку Akt1 є основною ізоформою активованої Akt. На відміну від ФРЦЗ, в атипових фолікулярних аденомах виявлено ядерну експресію як Akt1, так і Akt2 (див. рис. 5.5).

Для декількох клітинних ліній РЦЗ було оцінено їх здатність до міграції у камері Бойдена. Для однієї з цих ліній (NPA-87 – лінія клітин НРЦЗ людини) визначено швидкий рух клітин крізь мембрану та наступну міграцію на дно камери (рис. 5.6). Тому ця клітинна лінія була обрана для наступних експериментів із міграцією. На моделі інвазії клітин визначено високий рівень pAkt, Akt1 та ядерну локалізацію pAkt у мігруючих клітинах.

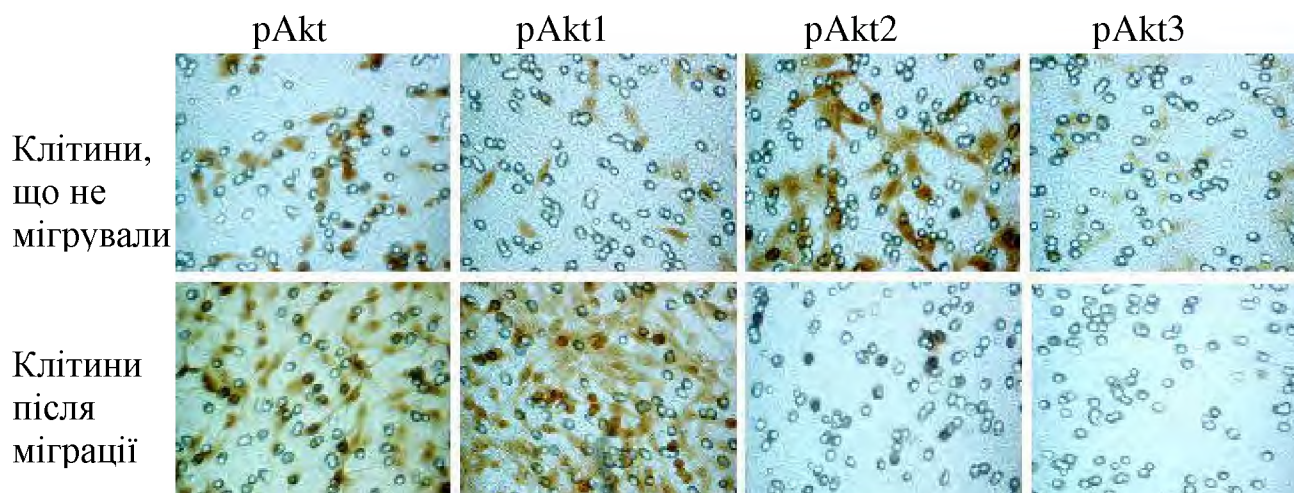


Рис. 5.6. Активація Akt та експресія ізоформ Akt у мігруючих клітинах.

Враховуючи центральну роль Akt у передачі тиреоїдних онкогенних сигналів, а також дані про потенційну роль Akt у рухливості та інвазії клітин раку, ми висунули гіпотезу, що активація Akt буде найбільш значущою у зонах інвазії РЦЗ. Результати дослідження підтвердили цю гіпотезу: активацію Akt найбільшою мірою було виражено у зонах інвазії РЦЗ, визначено її різну локалізацію у ПРЦЗ (ядро і цитоплазма) і ФРЦЗ (ядро), а також асоціацію активації ядерної Akt з інвазією клітин РЦЗ *in vitro*.

5.2. Роль транслокацій *RET/PTC* у пухлинах щитоподібної залози після аварії на ЧАЕС

Метою цього фрагменту дослідження було визначення наявності або відсутності високої частоти транслокації *RET/PTC3* серед ПРЩЗ ліквідаторів аварії на ЧАЕС, характерної для ПРЩЗ дітей, постраждалих внаслідок аварії. Транслокації *RET/PTC1* і *RET/PTC3* визначали у злоякісних пухлинах ліквідаторів аварії на ЧАЕС за допомогою ПЛР і гібридизації з радіоміченим зондом (рис. 5.7).

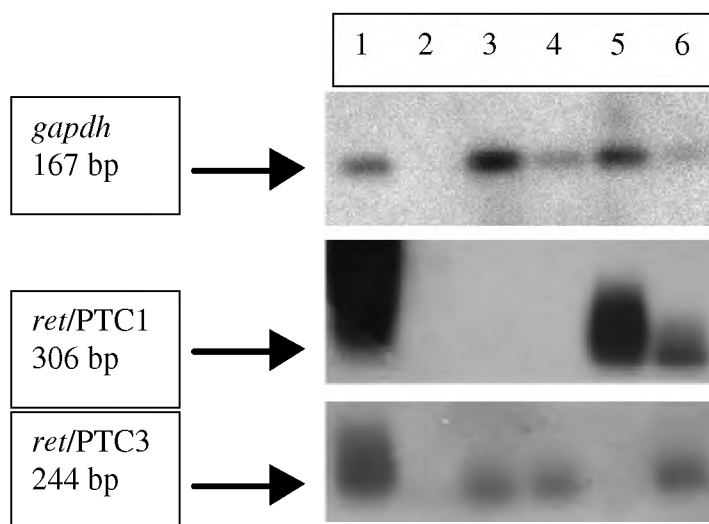


Рис. 5.7. Типові випадки транслокацій *RET*: лінії 1 і 2 – позитивний і негативний контроль; лінії 3 і 4 – зразок прояву лише *RET/PTC3*; лінія 5 – зразок прояву лише *RET/PTC1*; лінія 6 – зразок прояву *RET/PTC3* і *RET/PTC1*.

До досліджуваних груп увійшли гістологічні препарати ЩЗ пацієнтів, прооперованих із приводу РЩЗ у період з 1994 по 2003 рр. на базі хірургічного відділу УНПЦЕХТЕОТ і відділення ендокринної хірургії Університетського шпитального центру м. Марсель (Франція).

Усі пацієнти групи ліквідаторів наслідків аварії на ЧАЕС мали відповідний офіційний документ, але нам не вдалося отримати інформацію про індивідуальні дози. До складу контрольної групи увійшли українські пацієнти,

які мешкали на офіційно незабруднених територіях, проте не виключалася ймовірність їх можливого опромінення, а також французькі пацієнти, у яких в історії хвороби даних про опромінення не було.

Гістологічний діагноз встановлено згідно з класифікацією ВООЗ пухлин ЩЗ [54]. Усього виявлено 50 випадків папілярного раку ЩЗ, у т. ч. 12 серед ліквідаторів, 17 – серед українських пацієнтів контрольної групи і 21 – серед французьких пацієнтів (табл. 5.1).

Гістологічні підтипи ПРЩЗ визначали за загальноприйнятими діагностичними критеріями [54]. Не виявлено жодного випадку солідного або висококлітинного варіанту ПРЩЗ. Зони солідної будови спостерігали у 3 випадках ПРЩЗ у контрольній групі українських пацієнтів, у 2 – у контрольній групі французьких пацієнтів та у 2 випадках серед ліквідаторів. Зони висококлітинної будови виявлялись із різною інтенсивністю (від 20 % до 40 %) у 7 випадках серед французьких пацієнтів контрольної групи, у 3 випадках у контрольній групі українських пацієнтів та у 2 випадках серед ліквідаторів.

Таблиця 5.1

**Вікові характеристики пацієнтів
із папілярним раком щитоподібної залози (n=50)**

Групи обстежених	ж/ч	Вік на момент діагнозу		Вік на момент аварії 1986 р.	
		медіана	діапазон	медіана	діапазон
Ліквідатори (12)	4/8	46,8	35-67	33,3	18-50
Неопромінені українські пацієнти (17)	7/10	46,8	34-63	33,1	21-47
Неопромінені французькі пацієнти (21)	15/6	41,7	24-77	30,8	10-67

Транслокації онкогенів *RET/PTC1* і *RET/PTC3* було виявлено у 83,3 % випадків серед ліквідаторів, у 64,7 % – серед українських пацієнтів контрольної групи та у 42,9 % – у французьких пацієнтів контрольної групи (табл. 5.2).

Частота транслокацій *RET/PTC* у ПРЩЗ серед ліквідаторів була значно вищою порівняно з такою у французьких пацієнтів контрольної групи ($p=0,05$), проте не перевищувала показник для українських пацієнтів контрольної групи. Частота транслокацій *RET* серед українських пацієнтів контрольної групи була вищою порівняно з показником у французьких пацієнтів контрольної групи, але не вірогідно.

Таблиця 5.2

Транслокації *RET* у пухлинах ЩЗ ліквідаторів і неопромінених українських і французьких пацієнтів

Групи обстежених	Кількість випадків	<i>RET/PTC</i> n (%)	<i>RET/PTC1</i> n (%)	<i>RET/PTC3</i> n (%)	<i>RET/PTC1</i> і <i>RET/PTC3</i> n (%)
Ліквідатори					
Папілярний рак	12	10 (83,3)	5 (41,7)	3 (25,0)	2 (16,7)
Класичний	8	6	3	2	1
фолікулярний варіант	4	4	2	1	1
Неопромінені українські пацієнти					
Папілярний рак	17	11 (64,7)	7 (41,2)	3 (17,6)	1 (5,8)
Класичний	10	8	5	2	1
фолікулярний варіант	7	3	2	1	0
Неопромінені французькі пацієнти					
Папілярний рак	21	9 (42,9)	8 (38,1)	1 (4,8)	0 (0)
класичний	9	4	3	1	0
фолікулярний варіант	12	5	5	0	0

Частота транслокацій *RET/PTC1* у випадках раку ліквідаторів склала 41,7 %, серед українських пацієнтів контрольної групи – 41,2 %, серед французьких пацієнтів контрольної групи – 38,1 %. Вірогідної різниці за цим показником між трьома групами не виявлено. Транслокації *RET/PTC3* виявлено у 25,0 % випадків серед ліквідаторів, у 17,6 % – серед українських пацієнтів контрольної групи та у 4,8 % – серед французьких пацієнтів.

Не було значної різниці у досліджуваних показниках між раками ліквідаторів та українських пацієнтів контрольної групи, але таку різницю визначено між РЩЗ ліквідаторів і французьких пацієнтів контрольної групи ($p=0,03$; табл. 5.3).

Таблиця 5.3

Частота *RET/PTC*-транслокацій у пухлинах ЩЗ ліквідаторів і неопромінених українських і французьких пацієнтів, %

Групи пацієнтів	<i>RET/PTC</i>	<i>RET/PTC1</i>	<i>RET/PTC3</i>
Ліквідатори (n=12)	83,3	41,7	25,0
Неопромінені українські пацієнти (n=17)	64,7	41,2	17,6
Неопромінені французькі пацієнти (n=21)	42,9	38,1	4,8

Отримані результати свідчать про те, що частота транслокацій *RET/PTC3* була вищою у групі українських пацієнтів порівняно з французькими..

Частота транслокацій *RET/PTC1* і *RET/PTC3* у пухлинах ліквідаторів та українських пацієнтів контрольної групи не різнилася, тоді як у раках французьких пацієнтів контрольної групи частота *RET/PTC1* була значно вищою, ніж *RET/PTC3* ($p=0,02$).

У 2 випадках РЩЗ ліквідаторів, 1 випадку раку українського пацієнта контрольної групи виявлено транслокації *RET/PTC1* і *RET/PTC3*. У процесі

порівняння класичного ПРЩЗ і фолікулярного варіанту ПРЩЗ не було визначено значної різниці у частоті транслокацій *RET/PTC1* або *RET/PTC3*. Випадки раку, в яких виявлялися зони, утворені високими клітинами фолікулярного епітелію, частіше траплялися серед ліквідаторів, ніж в українських пацієнтів контрольної групи ($p < 0,01$), але статистично вірогідної різниці між транслокаціями *RET* у цих пухлинах виявлено не було.

Не було визначено кореляції між транслокаціями *RET* і статтю пацієнта, стадією процесу за класифікацією TNM, віку та терміну опромінення пацієнта.

Результати нашого дослідження підтверджують роль транслокацій *RET*, а саме *RET/PTC3*, у розвитку пухлин ЩЗ після аварії на ЧАЕС. Високий рівень *RET/PTC3*, визначений у ліквідаторів, вказує на те, що ця ознака притаманна не лише дитячим випадкам і ракам, що швидко розвиваються. Натомість рівень транслокацій *RET* був вищий у пухлинах українських пацієнтів контрольної групи порівняно з пухлинами французьких пацієнтів.

5.3. Прогностичне значення виявлення мутацій *BRAF* за папілярного раку щитоподібної залози

Для встановлення зв'язку *BRAF*-мутації з клініко-морфологічними характеристиками, рецидивами ПРЩЗ і визначення прогностичної ролі цього генетичного чинника ми провели багатоцентрове дослідження із залученням великих груп пацієнтів із ПРЩЗ, використовуючи множинний аналіз.

Дослідження проводили на базі УНПЦХТЕОТ і медичних факультетів Університету Джона Хопкінса, Йельського університету, шпиталю Болонського університету: 32, 141, 17 і 29 випадків відповідно. Всього увійшло до дослідження 219 випадків ПРЩЗ, серед яких гістологічно було виділено такі варіанти: класичний (125), фолікулярний (77), висококлітинний (16) і колоноклітинний (1).

Для аналізу впливу мутації *BRAF* на рецидив пухлини проаналізовано результати лікування I-131. Для визначення впливу мутації *BRAF* на рецидиви

раку використано граничний результативний аналіз виживання та рангово-логарифмічний критерій. Для оцінки ризику рецидиву пухлини, пов'язаного з мутацією *BRAF*, проведено пропорційний випадково-регресійний аналіз рецидиву пухлини. Ми також порівняли вихідні демографічні дані з клінічними характеристиками залучених до дослідження медичних закладів. Стать, вік на момент встановлення діагнозу, наявність мутації *BRAF*, багатофокусність росту пухлини, стадія, розмір і follow-up не різнилися. Різницю виявлено для гістологічного типу пухлини, МЛВ, екстраорганної інвазії, рецидиву пухлини та дози I-131. Після того, як дані усіх закладів увійшли до множинного аналізу, було виявлено мінімальні зміни у вірогідності успішного виходу мутації *BRAF*, тому результати описано без коректування по медичних закладах. Довірчий інтервал підраховали за допомогою стандартних методів. Усі значення «р» були двобічними.

У хворих на ПРЦЗ *BRAF*-мутації визначались зі значною частотою, яка не різнилася вірогідно серед пацієнтів 4 різних медичних закладів (табл. 5.4, точний критерій Фішера, $p=0,47$).

Таблиця 5.4

Кількість випадків і розповсюдженість *BRAF*-мутації

Медичний науковий заклад	Випадки ПРЦЗ (n)	<i>BRAF</i> -позитивні випадки (n)	Розповсюдженість <i>BRAF</i> -мутації (%)
Університет Джона Хопкінса	141	64	45,4
Йельський університет	17	8	47,1
Шпиталь Болонського університету	32	19	59,4
УНПЦХТЕОТ	29	16	55,2
Всього	219	107	48,9

Але у даному дослідженні загальна розповсюдженість *BRAF*-мутації виявилася дещо нижчою, що пояснюється значною кількістю випадків фолікулярного варіанту ПРЩЗ, що увійшли до дослідження.

За результатами аналізу встановлено зв'язок між *BRAF*-мутацією та екстраорганною інвазією, метастазуванням до лімфатичних вузлів, стадією пухлинного процесу (табл. 5.5).

Загальновизнано, що ці ознаки пов'язано з високим ризиком рецидиву РЩЗ. Не було визначено кореляції між *BRAF*-мутацією та віком і статтю пацієнта або багатофокусністю росту пухлини.

Рецидив пухлини значно частіше виникав у пацієнтів із *BRAF*-позитивними ПРЩЗ: 25 % проти 9 % ($p=0,004$). Більшість рецидивів виявлено у колекторі по стороні ураження, паратрахеальній ділянці, ложі залози; 5 пацієнтів мали метастази у медіастинальних лімфовузлах, легенях і кістках. Не було також значної різниці у співвідношенні *BRAF*-позитивних і *BRAF*-негативних осіб серед пацієнтів, які отримали післяопераційний курс лікування радіоактивним йодом. Заслуговує на увагу той факт, що розміри пухлин у *BRAF*-позитивних пацієнтів були меншими, ніж у негативній групі, що свідчить про можливий зв'язок *BRAF*-мутації з проявом агресивності пухлини на відносно ранніх стадіях канцерогенезу.

За результатами порівняння, частота *BRAF*-мутації, екстраорганної інвазії, метастазів у лімфатичних вузлах, стадій пухлинного процесу та рецидивів відрізнялася для різних підтипів ПРЩЗ. Усі ці особливості були найбільше характерними для висококлітинного варіанту, менше – для класичного і найменше – для фолікулярного варіанту ПРЩЗ (табл. 5.6).

Встановлено значний зв'язок між *BRAF*-мутацією та чинниками негативного прогнозу (екстраорганна інвазія, метастази у лімфатичних вузлах, рецидив), помітніший для висококлітинного та класичного варіантів порівняно з нечастим фолікулярним варіантом ПРЩЗ (табл. 5.7).

Таблиця 5.5

Порівняльна характеристика клініко-морфологічних ознак залежно від наявності *BRAF*-мутації у пацієнтів із ПРЩЗ, медіана (%)

Показник	BRAF +	BRAF -	p
Загальна кількість	107	112	
Вік на момент встановлення діагнозу, р.	43 (35-56)	45 (38-55)	0,41
Стать, чол.	29 (27,1)	29 (25,9)	0,84
Розмір пухлини, см	2,0 (1,4-3,0)	2,4 (1,5-3,5)	0,009
Багатофокусність	45 (42)	42 (38)	0,49
Екстраорганна інвазія	44 (41)	18 (16)	<0,001
Метастази у л/в	58 (54)	24 (21)	<0,001
Стадія пухлини			0,002
I	44 (42)	39 (35)	
II	30 (29)	57 (51)	
III	29 (28)	15 (13)	
IV	2 (2)	1 (1)	
Стадія пухлини III/IV	31 (30)	16 (14)	0,007
Рецидиви	23 (25)	9 (9)	0,004
Кількість курсів I-131			
0	19 (22)	26 (28)	
1	68 (77)	67 (71)	
2	1 (1)	1 (1)	
Загальна доза I-131, мСі	100 (32-100)	100 (0-101)	0,96
Період спостереження, міс.	16,5 (5-30)	14,0 (2-28)	0,40

Таблиця 5.6

Порівняння клініко-патологічних характеристик і статусу *BRAF*-мутації у різних гістологічних підтипах папілярного раку ЩЗ, медіана (%)

Характеристика	Класичний варіант	Фолікулярний варіант	Високо- клітинний варіант	p
Загальна кількість	125	77	16	
Мутації <i>BRAF</i>	81 (64,8)	11 (14,3)	14 (87,5)	<0,001
Вік на момент встановлення діагнозу, р.	44 (38-56)	44 (35-52)	64 (39-73)	0,06
Стать, чол.	35 (28,0)	17 (22,1)	5 (31,3)	
Розмір пухлини, см	2,0 (1,5-2,7)	2,8 (1,5-3,5)	2,3 (1,9-3,5)	0,004
Багатофокусність	55 (44,0)	25 (32,5)	7 (43,8)	0,25
Екстраорганна інвазія	47 (37,6)	5 (6,5)	9 (56,3)	<0,001
Метастази у л/в	65 (52,0)	7 (9,1)	9 (56,3)	<0,001
Стадія пухлини				0,003
I	48 (38,4)	31 (40,3)	4 (25,0)	
II	43 (34,4)	39 (50,7)	4 (25,0)	
III	30 (24,0)	6 (7,8)	8 (50,0)	
IV	2 (1,6)	1 (1,0)	0 (0)	
Стадія пухлини III/IV	32 (25,6)	7 (9,1)	8 (50,0)	<0,001
Рецидиви	21 (16,8)	5 (6,5)	5 (31,3)	0,02
Кількість курсів I-131				0,83
0	25 (25,5)	16 (23,5)	3 (20,0)	
1	71 (72,5)	52 (76,5)	12 (80,0)	
2	2 (2,0)	0 (0)	0 (0)	
Загальна доза I-131, мСі	100 (0-103)	100 (0-103)	100 (50-100)	0,42
Період спостереження, міс.	16,5 (5-30)	13,0 (2-27)	20,5 (8-34)	0,55

Відомо, що вік пацієнта на момент встановлення діагнозу, стать, розмір пухлини, багатофокусність росту та гістологічний підтип ПРЦЗ асоціюються з клінічними наслідками для пацієнтів із ПРЦЗ. З метою визначення незалежної кореляції між наявністю мутації *BRAF* і кожної з трьох патологічних особливостей високого ризику (екстраорганою інвазією, МЛВ, прогресивною стадією хвороби) та рецидивом пухлини, було застосовано множинний аналіз із коректуванням на ці чинники (див. табл. 5.6).

Множинний аналіз показав значне збільшення різниці цих трьох патологічних особливостей високого ризику рецидиву пухлини для *BRAF*-позитивних випадків із коректуванням на вік пацієнта, стать, розмір пухлини та багатофокусність росту (табл. 5.7).

Таблиця 5.7

**Аналіз зв'язку *BRAF*-мутації та клініко-патологічних характеристик
серед трьох підтипів ПРЦЗ (p)**

Ознака	Висококлітинний проти фолікулярного	Класичний проти висококлітинного	Класичний проти фолікулярного
Мутація <i>BRAF</i>	<0,001	0,09	<0,001
Екстраорганна інвазія	<0,001	0,06	<0,001
Метастази у л/в	<0,001	0,80	<0,001
Стадія пухлини III/IV	<0,001	0,07	0,003
Рецидив пухлини	0,02	0,34	0,02

Навіть за додаткового коректування на екстраорганну інвазію та стадію пухлини III/IV зв'язок мутації *BRAF* із МЛВ залишався значним, що дає можливість припустити, що мутація *BRAF* є незалежним чинником, який визначає прогноз, і, можливо, впливає на процес метастазування до лімфатичних вузлів.

За результатами аналізу виживання Каплана-Масра виявлено значно більшу ймовірність рецидиву пухлини серед пацієнтів із *BRAF*-позитивними ПРЦЗ, ніж у пацієнтів без цієї мутації. За результатами пропорційного випадково-регресійного аналізу з урахуванням віку на момент встановлення діагнозу, статі, розміру пухлини, багатофокусності росту та загальної дози I-131, коефіцієнт ризику для рецидивів пухлини, пов'язаних із *BRAF*-мутацією, склав 3,2. З урахуванням екстраорганної інвазії, метастазів у лімфатичних вузлах і стадії раку даний коефіцієнт становив 2,4, що мало більшу статистичну значущість (табл. 5.8). Дані результати свідчать про прогностичне значення *BRAF*-мутації у визначенні несприятливого перебігу ПРЦЗ.

Таблиця 5.8

Багатофакторний аналіз зв'язку *BRAF*-мутації з клініко-патологічними ознаками папілярного раку щитоподібної залози

Клініко-патологічна ознака	Коефіцієнт вірогідності	95 % довірчий інтервал	p
Екстраорганна інвазія	4,0	2,0-7,9	<0,001
Метастази у л/в	5,0	2,6-9,5	<0,001
Стадія пухлини III/IV	2,9	0,87-9,5	0,09
Рецидиви пухлини	4,8	1,7-14	0,003
Екстраорганна інвазія	1,9	89-4,2	0,10
Метастази у л/в	3,1	1,5-6,5	0,002
Стадія пухлини III/IV	2,9	0,87-9,5	0,09
Рецидиви пухлини	4,4	1,3-14	0,02
Екстраорганна інвазія	1,2	0,5-2,8	0,68
Метастази у л/в	1,9	0,8-4,3	0,13
Стадія пухлини III/IV	3,0	0,8-11,0	0,10
Рецидиви пухлини	4,0	1,1-14,1	0,03

Рецидиви РЩЗ були більш агресивними у випадках *BRAF*-позитивних пухлин. Ми оцінили частоту рецидивів РЩЗ у підгрупі пацієнтів із I та II клініко-патологічною стадією. Рецидиви РЩЗ вірогідно частіше ($p=0,002$) виявлялися серед *BRAF*-позитивних пацієнтів із стадією I/II порівняно з *BRAF*-негативними: 14/64 (21,9 %) проти 4/83 (4,8 %). За результатами аналізу ймовірності рецидиву для цих пацієнтів із урахуванням віку, статі, багатофокусності росту, розміру пухлини, накопичення I-131, метастазів у лімфатичних вузлах, екстраорганної інвазії та підтипу ПРЩЗ виявлено її значну залежність від наявності *BRAF*-мутації (коефіцієнт імовірності = 11,6; 95 % контурний інтервал = 2,2-62,6; $p=0,004$).

Подальший розширений аналіз частоти рецидиву РЩЗ проведено у підгрупах пацієнтів з Університету Джона Хопкінса, де було доступно більше інформації. Було всебічно оцінено дані 20 пацієнтів із рецидивами ПРЩЗ. У *BRAF*-позитивних пацієнтів порівняно з негативними випадками рецидиви були більш численними та вимагали застосування агресивнішої тактики лікування (хірургічного та променевого).

На додаток до радіойодтерапії 9 із 13 (69,2 %) пацієнтів із *BRAF*-позитивними ПРЩЗ потребували щонайменше одного додаткового хірургічного втручання та/або зовнішньої променевої терапії, тоді як лише 1 із 7 (14,3 %) хворих із рецидивами без мутації потребували додаткового хірургічного втручання без променевої терапії ($p=0,057$). Крім цього, у 7 із 13 (53,8 %) випадків рецидивів *BRAF*-позитивної групи проти жодного з 7 (0 %) *BRAF*-негативної групи виявлено зменшення накопичення I-131 у ділянках рецидиву пухлини ($p=0,057$). Пацієнти з йод-негативними ПРЩЗ потребували застосування повторних хірургічних втручань і зовнішнього опромінення. Серед осіб із рецидивами *BRAF*-негативних ПРЩЗ 6 лікували лише повторною терапією радіойодом, і для одного пацієнта провели додаткове хірургічне втручання з наступним сеансом радіойодтерапії.

Відомо, що трансверсія *BRAF*^{T1799A} виявляється за анапластичного РЩЗ папілярного походження. Було висловлено гіпотезу про те, що дана мутація

може визначати прогноз ПРЩЗ. За результатами нашого дослідження виявлено залежність мутації *BRAF*^{T1799A} із декількома патологічними особливостями високого ризику та рецидивом пухлини. Найчастіше *BRAF*-мутації виявляються у тих підтипах ПРЩЗ (висококлітинний і класичний), для яких характерні наявність екстраорганної інвазії, МЛВ і розповсюдженість пухлинного процесу. Ці дані підтримують ідею про те, що *BRAF*-мутація може відігравати важливу роль у формуванні, прогресії та агресивності відомих класичних підтипів ПРЩЗ високого ризику. Рецидив захворювання у пацієнтів із *BRAF*-мутаціями асоціювався зі втратою чутливості до йоду, обмежуючи таким чином застосування даного методу лікування. Фактично пацієнти з *BRAF*-позитивним ПР потребували більш агресивного хірургічного лікування та застосування променевої терапії для лікування рецидивів.

Резюме до розділу 5

З огляду на центральну роль Akt у канцерогенезі ЩЗ і процесі інвазії шляхом імуногістохімічного дослідження оцінено активацію Akt (pAkt), її ізоформ Akt1, Akt2, і Akt3 та експресію p27 на гістологічних препаратах доброякісних і злоякісних пухлин ЩЗ. Встановлено надмірну активацію Akt у зонах інвазії РЩЗ і МЛВ, різну її субклітинну локалізацію за ПРЩЗ і ФРЩЗ, а також асоціацію активації ядерної Akt з інвазією клітин РЩЗ *in vitro*. Також виявлено ядерну активацію Akt у клітинах ФА з цитологічними ознаками атиpii. Визначено підвищений рівень активації Akt у клітинах раку порівняно з оточуючою тканиною залози, і він асоціювався з транслокацією *RET/PTC* у випадках ПРЩЗ. Доведено, що здатність клітин до міграції пов'язано з переходом активованої Akt і Akt1 із ядра у цитоплазму. Отже, постійну активацію Akt1 пов'язано з прогресією РЩЗ. Даний розділ роботи доводить виключну перспективність розробок специфічних терапевтичних препаратів, які блокуватимуть активацію Akt у тиреоцитах.

Результати дослідження підтверджують роль транслокацій *RET*, а саме *RET/PTC3*, у розвитку пухлин ЩЗ після аварії на ЧАЕС. Високий рівень *RET/PTC3*, визначений у ліквідаторів, вказує на те, що ця ознака притаманна не лише дитячим випадкам і ракам, що швидко розвиваються. Натомість рівень транслокацій *RET* був вищий у пухлинах українських пацієнтів контрольної групи порівняно з пухлинами французьких пацієнтів.

Для встановлення зв'язку *BRAF*-мутації з клініко-морфологічними характеристиками, рецидивами ПРЩЗ і визначення прогностичної ролі цього генетичного чинника проведено багатоцентрове дослідження великих груп пацієнтів із ПРЩЗ із використанням множинного аналізу. Найчастіше *BRAF*-мутації виявлялися у тих підтипах ПРЩЗ (висококлітинний і класичний), для яких характерні наявність екстраорганної інвазії, метастази у лімфатичних вузлах і розповсюдженість пухлинного процесу. У випадках *BRAF*-позитивних ПРЩЗ порівняно з негативними частота рецидиву була більшою, що вимагало застосування агресивнішої тактики лікування (хірургічного та променевого). Отже, визначення *BRAF*-мутації може сприяти оптимізації лікування пацієнтів із ПРЩЗ.

Результати, викладені у даному розділі, опубліковано у працях:

3. Akt activation and localisation correlate with tumor invasion and oncogene expression in thyroid cancer [Text] / V. Vasko, M. Saji, E. Hardy, M. Kruhlak, O. Larin, V. Savchenko, M. Mijakawa, O. Isoxaki, H. Murakami, T. Tsushima, K. D. Burman, C. De Micco, M. D. Ringel // J. Med. Genet. – 2004. – V. 41, № 3. – P. 161-170.
4. Distinct localization patterns of activated Akt in thyroid cancer correspond to tumor invasion and Ret expression [Text] / V. Vasko, O. S. Larin, V. Savchenko, M. Saji, M. Ringel // Proc. of 74th annual meeting of the American thyroid association. – California (USA), 2002. – P. 198.
5. Nuclear phosphorylated Akt1 is a critical regulator of thyroid cancer cell invasion [Text] / V. Vasko, V. Savchenko, M. Saji, K. D. Burman, M. Ringel //

Proc. of 75th annual meeting of the American thyroid association. – Florida (USA), 2003. – P. 711.

6. Ret/PTC1 and ret/PTC3 in thyroid tumors from Chernobyl liquidators: comparison with sporadic tumors from Ukrainian and French patients [Text] / J. D. Cristofaro, V. Vasko, V. Savchenko, S. Cherenko, A. Larin, M. D. Ringel, M. Saji, M. Marcy, J. F. Henry, P. Carayon, C. De Micco // *Endocr. Relat. Cancer*. – 2005. – № 1. – P. 173-183.
7. High prevalence and possible de novo formation of BRAF mutation in metastasized papillary thyroid cancer in lymph nodes [Text] / V. Vasko, S. Hu, G. Wu, J. C. Xing, A. Larin, V. Savchenko, B. Trink, M. Xing // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 2005. – V. 90, № 9. – P. 5265-5269.
8. Vasily Vasko, Shuiying Hu, Guojun Wu, Alexandr Larin, Victoria Savchenko, and Mingzhao Xing. High prevalence and possible de novo formation of BRAF mutation in metastasized papillary thyroid cancer in lymph nodes [Text] / V. Vasko, S. Hu, G. Wu, A. Larin, V. Savchenko, M. Xing // 87-th Annual meeting of Endocrine Society. – San Diego, CA, 2005. – P. 687.

РОЗДІЛ 6

МОЛЕКУЛЯРНІ МЕХАНІЗМИ ІНВАЗІЇ ТА МЕТАСТАЗУВАННЯ РАКУ ЩИТОПОДІБНОЇ ЗАЛОЗИ

6.1. Роль епітеліально-мезенхімальної трансформації у процесі інвазії раку щитоподібної залози

Для пацієнтів із ПРЩЗ на ранній стадії прогноз є добрим, проте пухлини великих розмірів, інвазійні та/або з віддаленими метастазами слабо реагують на стандартну терапію, а 5-річне виживання хворих із такими пухлинами складає лише ~40 % [156, 226]. Отже, існує необхідність детального дослідження молекулярних причин прогресії РЩЗ для розробки нових методів лікування.

У процесі інвазії бере участь ЕМТ, у ході якої епітеліальні клітини втрачають міжклітинні контакти, зазнають змін цитоскелета, експресують характерні для мезенхімальних клітин білки та проявляють здатність до міграції [141]. Деякі з сигнальних молекул, безпосередньо задіяних у регуляції ЕМТ, причетні до прогресії ПРЩЗ. Характерними ознаками ЕМТ є втрата експресії Е-кадгеріну та збільшення рівня фібронектину та віментину [255].

Аби переконатися, що білки експресуються клітинами ЩЗ, а не стромі, проведено імуногістохімічне дослідження 3 генів: Runx2 (транскрипційний чинник, пов'язаний із диференціацією остеобластів), фібронектину та віментину.

Рівень експресії віментину не відрізнявся у зонах інвазії ПРЩЗ і центральних ділянках пухлини (рис. 6.1). Експресія кожного з білків була більшою у центральних відділах пухлини порівняно з нормальною тканиною залози. Імуногістохімічна реакція з антитілами до Runx2 і фібронектину була інтенсивнішою у зонах інвазії, ніж у центральних ділянках пухлини, а інтенсивність імуногістохімічної реакції з антитілами до віментину була однаковою у зонах інвазії та центральних ділянках.

З огляду на високу експресію генів, залучених до ЕМТ у зонах інвазії ПРЦЗ, проведено дослідження зв'язку між експресією віментину в зонах інвазії та у метастазах ПРЦЗ.

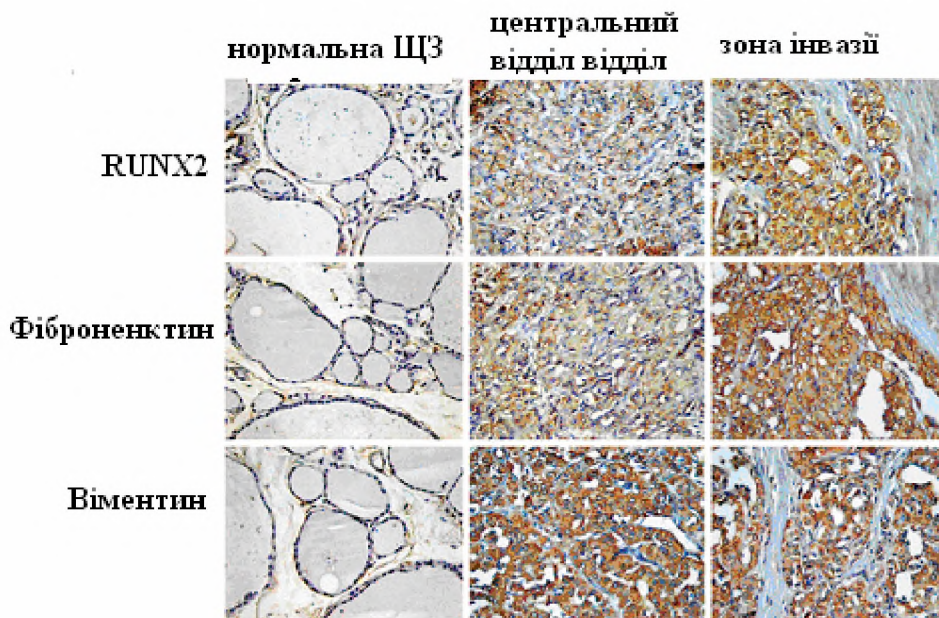


Рис. 6.1. Результати імуногістохімічного дослідження Runx2, фібронектину та віментину у ПРЦЗ: відсутня або низька імунологічна реакція Runx2, фібронектину та віментину в нормальній тканині та значно підвищена у пухлинах для кожного білка.

Дослідження експресії віментину провели на 34 зразках нормальної тканини протилежної ураженій частки залози та 25 зразках метастазів ПРЦЗ у лімфатичних вузлах. У 33 випадках ПРЦЗ виявлено ознаки екстраорганної інвазії: у 19 на етапі мікроскопічного аналізу (T3) та у 4 – макроскопічного (T4).

Як показали результати імуногістохімічних досліджень із використанням антитіл до віментину, реакція була відсутня у клітинах нормальної тканини залози, натомість була вираженою в ендотеліальних клітинах (позитивний контроль). В усіх випадках первинних пухлин і метастазів ПРЦЗ виявлено виражену імуногістохімічну реакцію з віментином (рис. 6.2). Підвищена експресія віментину асоціювалася з ознаками екстраорганної інвазії ($p=0,005$),

наявністю метастазів у лімфовузлах ($p=0,004$) і багатофокусним ростом пухлини ($p=0,013$, табл. 6.1).

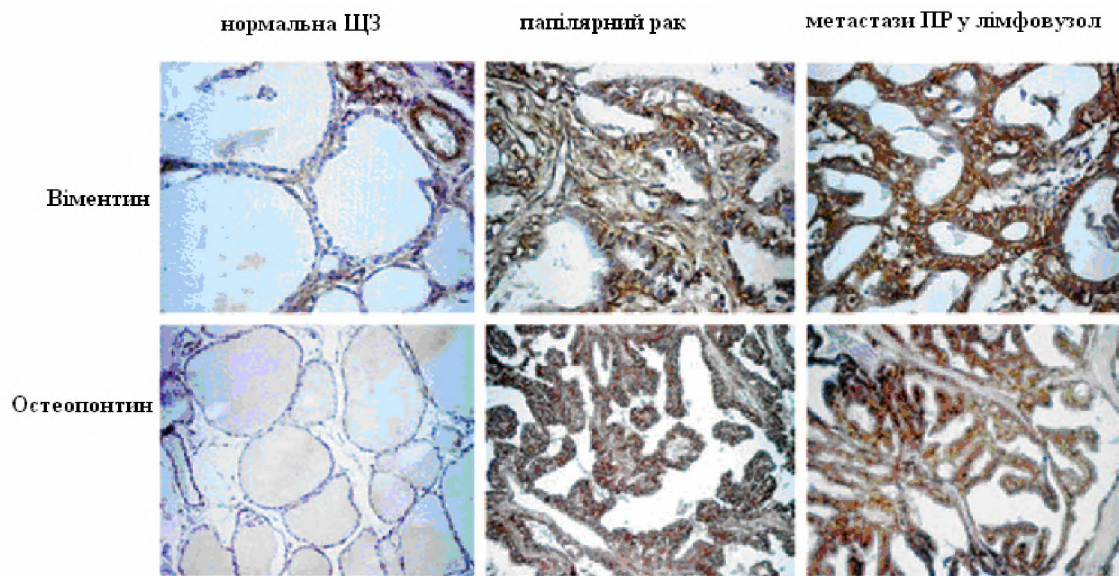


Рис. 6.2. Імуногістохімічне дослідження мезенхімальних білків у ПРЦЗ: експресію віментину та остеопонтину виявлено у первинній пухлині ПР і метастазах у лімфовузлах, у нормальній тканині залози вона відсутня.

Статистично вірогідної різниці між розмірами пухлини, статтю пацієнта та віком визначено не було. Порівняльну характеристику інтенсивності експресії віментину та ознак екстраорганної інвазії або метастазів наведено у таблиці 6.2.

Як і віментин, остеопонтин відіграє важливу функціональну роль у розвитку інвазії клітин раку та частково регулюється *Runx2*. Імуногістохімічну активність остеопонтину досліджували на тих же зразках ПРЦЗ із застосуванням специфічних антитіл. В усіх випадках пухлин і метастазів ПРЦЗ виявлено високу імунологічну реактивність до віментину та остеопонтину (рис. 6.2).

Таблиця 6.1

Кореляція клініко-морфологічних ознак папілярного раку щитоподібної залози з експресією віментину

Клініко-морфологічна ознака	Середнє значення або % позитивних	Асоціація з експресією віментину
Кількість випадків	34	
Стать, ч / ж	3 / 31	
Середній вік*, роки	39,2 (9-68)	-0,10 (p=0,58)
Середній розмір пухлини*, мм	22,2 (9-45)	0,006 (p=0,97)
Кількість метастазів*	4,9 (0-17)	0,63 (p=0,0001)
Експресія Runx2*		0,5 (p=0,0025)
Інвазія**, %	44	p=0,005
Метастази в лімфовузлах**, %	64	p=0,0004
Багатофокусний ріст**, %	70	p=0,013

Примітки: * – статистичний аналіз проведено за методом рангової кореляції Спірмена; ** – статистичний аналіз проведено за тестом Кокрана-Армітаж.

Таблиця 6.2

**Порівняльна характеристика інтенсивності експресії віментину та
екстраорганної інвазії або метастазів папілярного раку
щитоподібної залози**

Інтенсивність експресії віментину	0	1+	2+	3+
Метастази, %	0	24,0	36,0	40,0
Інвазія, %	0	26,1	34,8	39,1

Отже, за результатами окремого визначення експресії генів, залучених до ЕМТ, її виявлено у зонах інвазії агресивних ПРЦЗ, на відміну від центральних ділянок пухлин. Встановлено вірогідний зв'язок між високим рівнем експресії

віментину та ознаками екстраорганної інвазії, багатофокусним ростом, наявністю метастазів у лімфовузлах.

6.2. Роль експресії Е-кадгерину у процесі інвазії папілярного раку щитоподібної залози

ПРЩЗ характеризується лімфогенним метастазуванням, у 50 % випадків метастази у регіонарних лімфовузлах виявляються під час операції [228]. Крім того, лімфатичні вузли є найбільш поширеним місцем рецидиву ПРЩЗ, частота його виявлення у лімфовузлах складає 38,5-58,8 %. Отже, розуміння молекулярних механізмів інвазії клітин РЩЗ, їх виживання у метастазах має вирішальне значення для розробки ефективної терапії.

Але мезенхімальні особливості інвазійних клітин РЩЗ у метастазах не вивчалися. З метою дослідження даного факту ми розглянули статус метилювання промотору гена Е-кадгерину у серії ПРЩЗ і відповідних метастазів у лімфовузлах. Для встановлення взаємозв'язку між експресією гена Е-кадгерину та рухливістю клітин раку використовували клітинні лінії РЩЗ.

Метилювання промотору Е-кадгерину досліджено у пухлинах РЩЗ та оточуючій тканині залози. У 26/66 (39,3 %) випадках ПРЩЗ виявлено гіперметилювання 5'СрG острівців промотору Е-кадгерину (рис. 6.3).

В оточуючій нормальній тканині ЩЗ метилювання Е-кадгерину знайдено в 1 з 22 (4,5 %) випадків. У цьому випадку під час гістологічного дослідження виявлено ознаки хронічного тиреоїдиту. Клініко-морфологічну характеристику випадків ПРЩЗ залежно від статусу метилювання промотору Е-кадгерину наведено у табл. 6.3.

У ході гістологічного дослідження пухлини ЩЗ гіперметилювання промотору гена Е-кадгерину виявлялося частіше у випадках класичного ПРЩЗ, ніж його фолікулярного варіанту. Метилювання промотору Е-кадгерину асоціювалося з ознаками несприятливого прогнозу (екстраорганна інвазія, метастази у лімфовузлах).

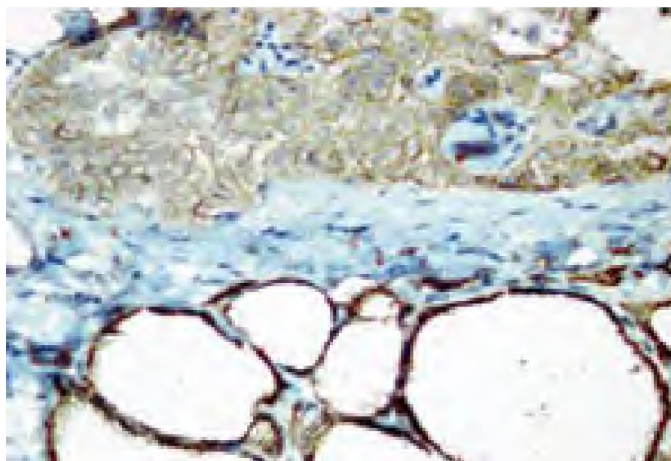


Рис. 6.3. Зменшення імуногістохімічної реакції Е-кадгерину в клітинах папілярного раку (зверху) порівняно з оточуючою тканиною залози (внизу), $\times 200$.

Таблиця 6.3

Клініко-морфологічна характеристика папілярного раку щитоподібної залози залежно від статусу метилювання промотору Е-кадгерину

Клініко-морфологічна ознака	Статус метилювання промотору Е-кадгерину		Р
	гіперметилований (n=26)	неметилований (n=40)	
Вік, роки	43,1 $\pm$ 17,1	35,3 $\pm$ 12,2	0,2949
Розмір пухлини, мм	33,4 $\pm$ 0,6	22,3 $\pm$ 0,8	0,4902
Стать, ч / ж	6 / 20	16 / 24	0,0164
Багатофокусний ріст, є / немає	12 / 14	12 / 14	0,2021
Метастази, є / немає	1 / 25	16 / 24	0,0011

Гіперметилювання промотору Е-кадгерину виявлено у 8/30 (26,6 %), 1/8 (12,5 %) і 0/5 (0 %) пухлин із мутаціями *BRAF*, *RET* і *RAS* відповідно. У випадках ПРЦЗ без мутацій гіперметилювання Е-кадгерину виявлено у 8/28

(28,5 %) випадках. Кореляція між метилюванням промотору Е-кадгерину та мутаціями онкогенів ЦЗ не була статистично значущою.

У нормальній тканині залози інтенсивну експресію Е-кадгерину виявлено в епітеліальних клітинах, а у клітинах строми вона була відсутня. В усіх випадках ПРЦЗ із гіперметилюваним промотором Е-кадгерину і в 16/40 (40,0 %) випадках ПРЦЗ із неметилюваним Е-кадгеріном виявлено зниження інтенсивності його експресії. Втрата експресії Е-кадгерину асоціювалася з лімфоїдною інфільтрацією строми пухлин і наявністю метастазів. Не було встановлено кореляції між мутаціями онкогенів ЦЗ і рівнем експресії Е-кадгерину.

Ми припустили, що клітини РЦЗ у зонах інвазії мають підвищену рухливість внаслідок гіперметилювання промотору Е-кадгерину та зниження його експресії. Отже, у 10 випадках ПРЦЗ досліджено окремо зони інвазії та центральні відділи пухлин. У 7 випадках ознаки метилювання промотору Е-кадгерину та його експресії були схожими у центральних відділах пухлини та зонах інвазії. У 3 випадках відбувся перехід статусу метилювання промотору Е-кадгерину від неметилюваного у центральних відділах до гіперметилюваного у зонах інвазії.

Статус метилювання промотору Е-кадгерину проаналізовано в первинних пухлинах ПР і метастазах у лімфовузлах (34 випадки). У 20/34 (58,8 %) випадках метилювання промотору Е-кадгерину було ідентичним у первинній пухлині та у відповідному метастазі. У 10 випадках не виявлено метилювання промотору Е-кадгерину у первинних пухлинах і метастазах. Гіперметилювання промотору Е-кадгерину у первинній пухлині й у відповідних метастазах встановлено також у 10 випадках. У 14/34 (41,2 %) випадках статус метилювання Е-кадгерину у первинній пухлині та лімфовузлах відрізнявся. У 12 випадках (35,3 %) промотор Е-кадгерину був гіперметилюваним у первинній пухлині, але неметилюваним у метастазах, у яких виявлено підвищений рівень експресії Е-кадгерину. У двох випадках (5,9 %) гіперметилювання промотору Е-кадгерину визначено лише у метастазах.

З метою вивчення ролі Е-кадгерину в регуляції рухливості клітин РЩЗ ми розглянули статус метилювання промотору Е-кадгерину у клітинних лініях РЩЗ із різними фенотипами. У клітинних лініях ПРЩЗ (TPC1), первинної пухлини ФРЩЗ (FTC133), регіонарного та легеневого метастазу ФРЩЗ (FTC236 і FTC238) виявлено морфологічні ознаки, характерні для мезенхімальної тканини (веретеноподібні клітини), тоді як у клітинах культури ФРЩЗ (WRO) епітеліальні клітини були округлими, тобто схожими на епітеліальні. У клітинах РЩЗ із морфологічними мезенхімальними ознаками виявлено гіперметилювання промотору Е-кадгерину, а експресії РНК і білка виявлено не було. Навпаки, у клітинних лініях з епітелієподібними клітинами РЩЗ метилювання Е-кадгерину виявлено не було, тоді як експресія РНК і білка була очевидною. Визначено підвищену експресію Е-кадгерину в епітеліальних клітинах WRO (рис. 6.4).

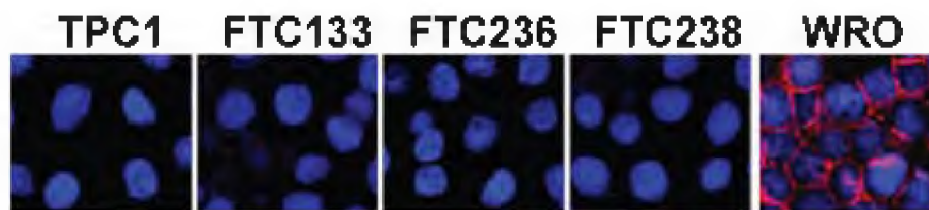


Рис. 6.4. Експресія Е-кадгерину в клітинних лініях раку щитоподібної залози (конфокальна мікроскопія).

У випадках Е-кадгерін-негативного РЩЗ клітини з мезенхімальними ознаками ефективно пенетрували мембрану у камері Бойдена, на відміну від Е-кадгерин-позитивних клітин WRO з епітеліальними ознаками (рис. 6.5).

З метою визначення статусу метилювання Е-кадгерину та міграційної здатності клітин РЩЗ після обробки деметилювальними агентами клітини РЩЗ інкубували з 5-аза-2'-дезокситидином. Така обробка клітин РЩЗ не викликала змін статусу метилювання промотору та експресії Е-кадгерину, не перешкоджала міграції клітин. У клітинах із мезенхімальними морфологічними ознаками після обробки 5-аза-2'-дезокситидином виявлено гальмування

росту. Не визначено істотного впливу на ріст клітин РЩЗ з епітеліальними ознаками.

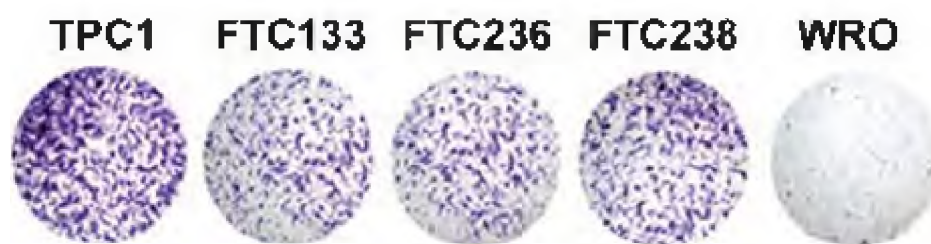


Рис. 6.5. Здатність до міграції клітин РЩЗ. Мікрофото з поверхні мембрани камери Бойдена. Е-каргерин-негативні клітини мігрували, Е-кадгерин-позитивні клітини WRO не мігрували.

Відомо, що P13K/AKT і RAS/ERK сигнальні шляхи відіграють важливу роль у регуляції процесу міграції клітин РЩЗ. Крім того, доведено, що активація сигналу ферменту протеїнкінази С (ПКС) диефірфорболом (РМА) викликає морфологічні зміни у клітинах WRO.

З метою оцінки впливу активації ПКС на рухливість клітин РЩЗ шляхом регуляції Е-кадгерину досліджено статус метилювання промотору Е-кадгерину та експресії його білка під дією інгібітору P13K/AKT (LY-294002), RAS/ERK (U-0126) і після лікування РМА. Під впливом інгібіторів LY-294002 і U-0126 виявлено гальмування міграції клітин РЩЗ із мезенхімальними ознаками. Проте втрату міграційної здатності не було пов'язано зі статусом метилювання промотору Е-кадгерину, експресією його білка та зміною епітеліального фенотипу. Не визначено істотного впливу РМА на рухливість клітин РЩЗ із мезенхімальними ознаками, але знайдено кардинальні морфологічні зміни епітеліальних клітин. Дія РМА проявлялася втратою клітинних контактів і набуттям мезенхімальних ознак у клітинах WRO. Хронічний вплив пухлинного промотору (РМА) спричинював втрату експресії Е-кадгерину у клітинах WRO та індукцію міграції (рис. 6.6).



Рис. 6.6. Локалізація Е-кадгерину в клітинах WRO. Втрата експресії Е-кадгерину та міжклітинних контактів.

Не визначено змін статусу метилювання промотору Е-кадгерину та експресії його білка після PMA-індукованої ре-локалізації Е-кадгерину з клітинної мембрани у цитоплазму.

З огляду на те, що зменшення експресії Е-кадгерину в клітинах ПРЦЗ пов'язано з лімфоїдною інфільтрацією, ми припустили, що воно може ініціюватися ЧНП- α [287]. Тривалий вплив ЧНП- α призводив до втрати експресії Е-кадгерину та індукції міграції клітин раку (рис. 6.7).

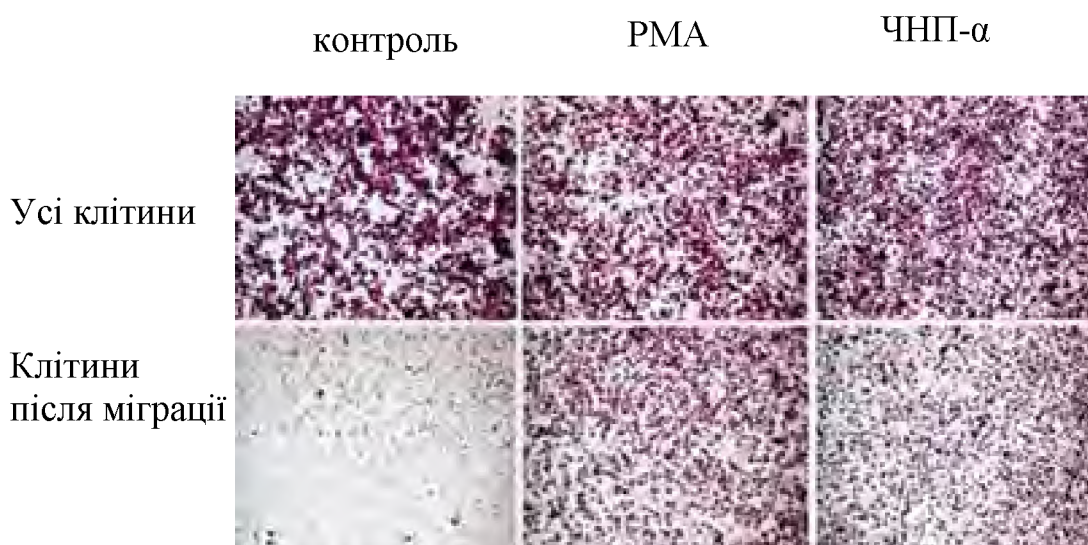


Рис. 6.7. Тривалий вплив PMA та ЧНП- α призводив до індукції міграції в клітинах WRO.

Як і під дією РМА, зміна локалізації експресії Е-кадгерину не супроводжувалася зміною статусу його метилювання та експресії. ЧНП- α -індукована втрата експресії Е-кадгерину виявилася нестійкою. Перехід від середовища, що містить ЧНП- α , до середовища, вільного від нього, призводив до відновлення морфологічних ознак і втрати міграційної здатності клітинами.

Отже, експресія Е-кадгерину у клітинах РЩЗ регулюється епігенетичними механізмами. У процесі метастазування виявлено динамічні зміни статусу метилювання промотору Е-кадгерину. Епігенетичні механізми й активація ЧНП- α -індукованих сигналів є незалежними чинниками інвазії клітин РЩЗ, дія яких реалізується шляхом регуляції експресії та внутрішньоклітинної локалізації Е-кадгерину. Механізми регуляції метилювання Е-кадгерину відіграють важливу роль в індукції ЕМТ у первинній пухлині, а також у зміні мезенхімального фенотипу на епітеліальний у метастазах.

6.3. Вірус простого герпесу в доброякісних і злоякісних пухлинах щитоподібної залози

Дослідження *in vitro* показали, що клітини РЩЗ можуть бути мішенню для ВПГ. Експресію рецептора ВПГ Nectin-1 продемонстровано в клітинних лініях РЩЗ, а рівень експресії корелював із чутливістю клітин до вірусів герпесу [117]. ДНК ВПГ виявлено у гістологічних препаратах пухлин ЩЗ з ознаками автоімунного тиреоїдиту [252]. Показано, що ВПГ бере участь у регуляції RAS/MEK/MAPK мітогенного шляху [234], який зазвичай активується в РЩЗ.

Результати виявлення ДНК ВПГ1 і ВПГ2 в пухлинах ЩЗ наведено у таблиці 6.4. ДНК ВПГ1 виявлено в 11/44 (25,0 %), а ДНК ВПГ2 – в 1/44 (2,3 %) випадку доброякісних пухлин ЩЗ (табл. 6.4).

**Результати виявлення вірусу простого герпесу в доброякісних і
злоякісних пухлинах ЩЗ**

Гістологічний діагноз	Кількість випадків	Виявлення ВПГ			
		ВПГ1	ВПГ2	ВПГ1/2	Всього
АІТ	14	3	0	0	3
ФА	10	1	0	0	1
ФПНПМ	10	2	1	0	3
Аденома з клітин Гюртля	10	5	0	0	5
ФРЩЗ	16	8	0	0	8
ФВПРЩЗ	10	2	2	0	2
ПРЩЗ	33	2	11	3	18
АРЩЗ	6	2	1	0	3

Під час гістологічного дослідження ВПГ-позитивних ФА виявлено ознаки атипії клітин, онкоцитарної метаплазії.

У злоякісних пухлинах ЩЗ ДНК ВПГ1 частіше виявлялась у випадках із фолікулярним типом будови. ВПГ2 значною мірою асоціюється з ПРЩЗ. У трьох випадках ПРЩЗ виявлено ДНК як ВПГ1, так і ВПГ2, гістологічно в цих випадках виявлено змішаний фолікулярно-папілярний тип будови. Як і у випадках ВПГ-позитивних ФА, для ВПГ-позитивних ПРЩЗ характерною є лімфоїдна інфільтрація та онкоцитарна метаплазія (рис. 6.8).

Виявлено значну асоціацію між наявністю ВПГ1 і розміром пухлини ($p=0,020$), ВПГ2 і метастазами у лімфовузах ($p=0,0263$). Статус ВПГ також досліджено у 17 лімфатичних вузлах із метастазами ПРЩЗ, які були доступні для аналізу. У 7/17 (41,1 %) метастазах виявлено ВПГ (1 ВПГ1 і 6 ВПГ2). У відповідних первинних пухлинах ПРЩЗ ВПГ1 виявлено у 2 випадках, ВПГ2 – у 10 випадках, і 5 пухлин були негативними (табл. 6.5).

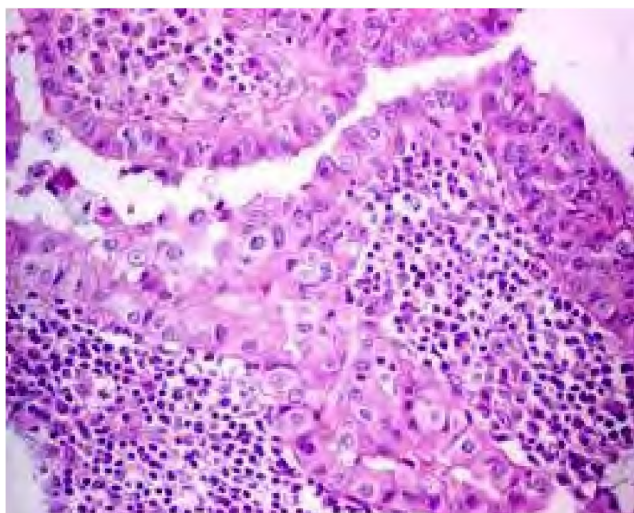


Рис. 6.8. ВПГ1 і ВПГ2 виявлено у ПРЩЗ із зонами лімфоїдної інфільтрації стромы пухлини та ознаками онкоцитарної метаплазії фолікулярного епітелію (Warthin-like варіант ПРЩЗ). Гематоксилин-еозин, $\times 200$.

Таблиця 6.5

Клініко-морфологічна характеристика пацієнтів із раком щитоподібної залози в залежності від статусу вірусу простого герпесу

Клініко-морфологічна ознака	Виявлення ВПГ			
	ВПГ (-)	ВПГ1	ВПГ2	ВПГ1/2
Кількість випадків	34	14	14	3
Вік, роки	45,9 $\pm$ 14,6	47,6 $\pm$ 16,8	45,5 $\pm$ 10,9	43,3 $\pm$ 14,9
Стать, чол.	5	1	2	0
Розмір пухлини, мм	23,6 $\pm$ 13,1	32,1 $\pm$ 14,2	19,5 $\pm$ 13,3	23,1 $\pm$ 3,6
Екстраорганна інвазія	16	4	6	2
Багатофокусний ріст	7	1	4	3
Метастази у лімфовузлах	17	4	12	3

Аби переконатися, що ВПГ асоційовано з метастатичним ураженням лімфовузлів епітеліальними клітинами ЩЗ, досліджено гістологічно нормальні лімфатичні вузли, отримані під час видалення ВПГ-позитивних пухлин ПРЩЗ.

У жодному лімфовузлі без метастазів ВПГ виявлено не було. У 25 випадках досліджено статус ВПГ у нормальній оточуючій тканині залози (10 ФА та 15 РЦЗ). ВПГ виявлено у 3/25 (12,0 %) випадках: ВПГ1 – у 2 випадках і ВПГ2 – в одному. Частота виявлення ВПГ у нормальній тканині залози була значно нижчою, ніж у пухлині ($p=0,0096$). У 70 ВПГ-позитивних пухлинах ЩЗ досліджено мутації *RAS*, *BRAF* і транслокації *RET/PTC* (табл. 6.6).

Мутації онкогенів ЩЗ виявлено у 12/44 (27,2 %) ВПГ-негативних пухлинах і у 21/30 (70,0 %) ВПГ-позитивній пухлині. Після внесення поправок на гістологічний тип РЦЗ частота мутацій онкогенів виявилася подібною у випадках ВПГ-позитивних і ВПГ-негативних пухлин. Проте мутації онкогенів ЩЗ частіше виявлялися у випадках ВПГ2-позитивних, ніж ВПГ1-позитивних РЦЗ.

Таблиця 6.6

Вивлення мутацій онкогенів ЩЗ у ВПГ-позитивних пухлинах

Статус ВПГ у пухлині	Кількість випадків	Генетичні альтерації			
		<i>RAS</i>	<i>RET/PTC</i>	<i>BRAF</i>	Всього
Доброякісні (34 випадки)					
ВПГ (-)	27	2	1	0	3 (11,1 %)
ВПГ1	6	0	1	0	1 (16,6 %)
ВПГ2	1	0	0	0	0 (0 %)
ВПГ1/2	0	0	0	0	1 (0 %)
Злоякісні (36) випадків					
ВПГ (-)	17	2	4	3	9 (52,9 %)
ВПГ1	11	0	1	1	2 (18,1 %)
ВПГ2	10	0	3	4	7 (70 %)
ВПГ1/2	2	0	0	1	1 (50,0 %)

Отже, ДНК ВПГ частіше виявляється у пухлинах ЩЗ порівняно з нормальною тканиною залози. Хоча ДНК ВПГ1 виявлено з однаковою

частотою в доброякісних і злоякісних пухлинах ЩЗ, ВПГ2 частіше виявлявся у пухлинах ПРЩЗ і відповідних метастазах.

У 73/109 пухлинах ЩЗ (34 доброякісних і 39 злоякісних) зі встановленим статусом ВПГ (48 ВПГ-негативних і 25 ВПГ-позитивних) проведено імуногістохімічне дослідження з антитілами проти білків оболонки ВПГ. З використанням авідин-біотин-пероксидазного комплексу експресію білка ВПГ1/2 не виявлено у жодній з 48 ВПГ-негативних пухлин і у 21 з 25 (84,0 %) ВПГ-позитивних випадків. Із використанням антитіл до ВПГ2, мічених флюоресцеїнізотіоціанатом (ФІТЦ), виявлено позитивну реакцію в 0/48 ВПГ-негативних випадків і у 12/25 (48,0 %) ВПГ-позитивних пухлинах (рис. 6.9).

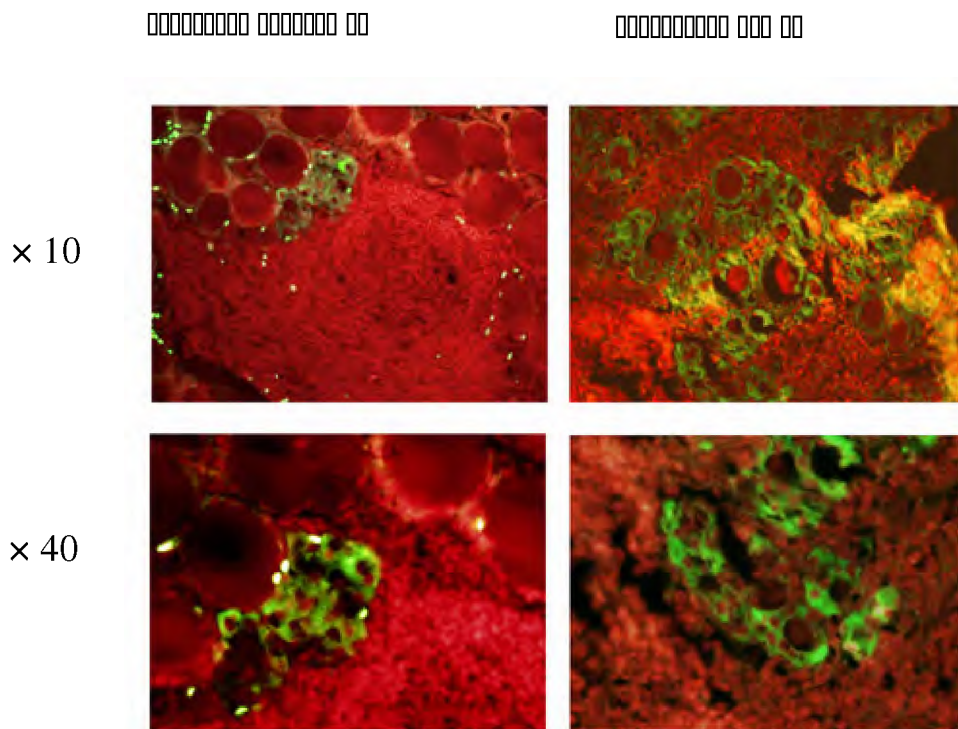


Рис. 6.9. Реакція у ВПГ-позитивних пухлинах щитоподібної залози, пряма імунофлюоресценція з використанням антитіл до ВПГ2, мічених флюоресцеїнізотіоціанатом.

Імунореактивність визначено в епітеліальних клітинах, у той час як стромальні фібробласти, ендотеліальні клітини та лімфоцити були негативними. В епітеліальних клітинах ЩЗ з ознаками активної вірусної

реплікації (позитивні реакція з антитілами) виявлено ознаки еозинофілії та вакуолізації цитоплазми і нерівномірність контуру ядер.

Аналіз вірус-індукованих сигналів проводили за допомогою імуногістохімічного дослідження з антитілами IFN- β , NF κ B і pAKT. Інтенсивність реакції з IFN- β , NF κ B і pAKT була значно вищою у випадках ВПГ-позитивних пухлин порівняно з ВПГ-негативними (рис. 6.10).

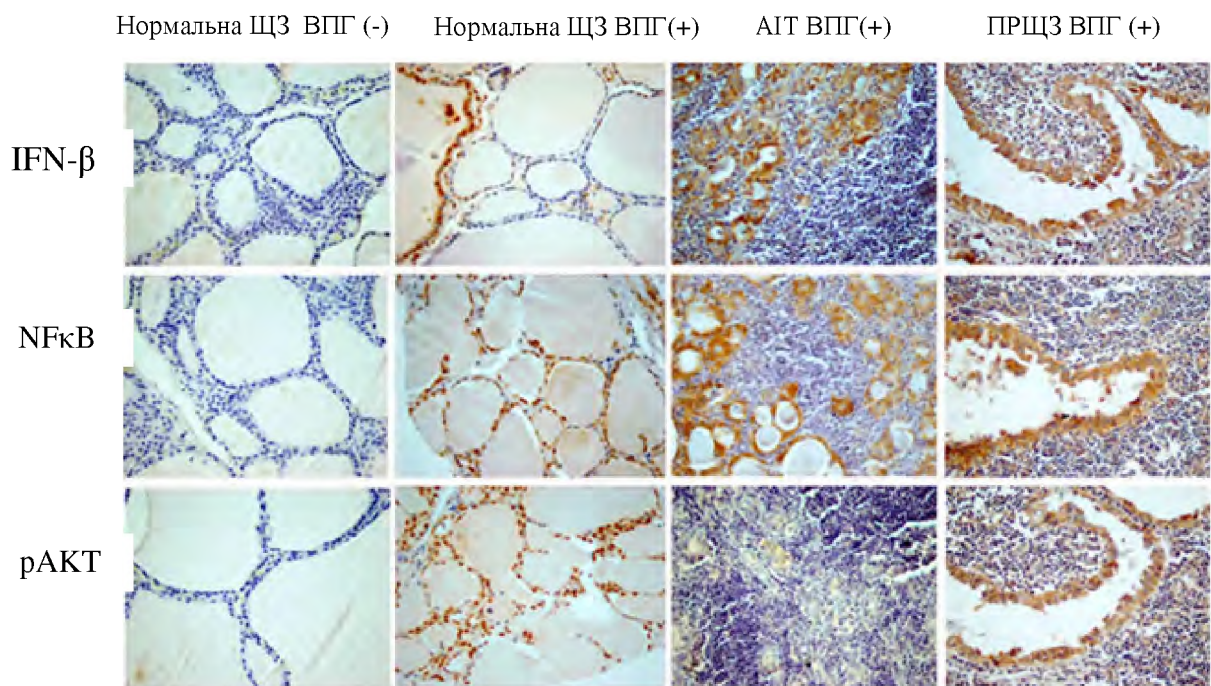


Рис. 6.10. Результат імуногістохімічного дослідження вірус-індукованих сигналів у ВПГ-позитивних і ВПГ-негативних пухлинах щитоподібної залози з антитілами IFN- β , NF κ B і pAKT, $\times 100$.

Багатофакторний аналіз показав, що з урахуванням віку, статі пацієнтів і гістологічного типу пухлини виявлено значну асоціацію ВПГ з інтенсивністю реакції із IFN- β ($p=0,001$) і NF κ B ($p=0,0001$). У ВПГ-негативній нормальній тканині залози імунологічної реакції виявлено не було. Навпаки, у ВПГ-позитивній тканині ЩЗ виявлено підвищену експресію IFN- β , NF κ B і pAKT. Це підтверджує існуючі дані про виявлення ВПГ у тканині ЩЗ і демонструє зв'язок між ВПГ та активацією вірус-індукованих сигнальних шляхів у пухлині ЩЗ.

В епітеліальних клітинах нормальної ЩЗ виявлено експресію Nectin-1, проте інтенсивність її була низькою. У доброякісних і злоякісних пухлинах залози виявлено вищу імунореактивність Nectin-1 порівняно з нормальною тканиною залози. Рівень експресії Nectin-1 був значно вищим у випадках ФА порівняно з нормальною тканиною залози ($p=0,005$), проте не виявлено статистично вірогідної різниці в його експресії між ФРЩЗ і ФА. Знайдено більший рівень експресії Nectin-1 у випадках ПРЩЗ порівняно з ФА ($p=0,004$) і ФРЩЗ ($p=0,005$). У випадках класичного варіанту ПРЩЗ рівень експресії Nectin-1 був вищим, ніж за ФВПРЩЗ.

Не виявлено зв'язку між рівнем експресії Nectin-1 та ознаками екстраорганої інвазії, багатофокусним ростом і МЛВ. Інтенсивність імунологічної реакції Nectin-1 була аналогічною з первинними пухлинами. ВПГ-позитивні пухлини характеризувалися високим рівнем експресії Nectin-1. Утім за результатами багатовимірної аналізу з урахуванням віку, статі пацієнта та гістологічного типу пухлини не виявив значного зв'язку експресії Nectin-1 і ВПГ зі статусом пухлини. За результатами аналізу імунореактивності Nectin-1 та активації вірус-індукованих сигнальних шляхів РЩЗ не визначено кореляції інтенсивності реакції Nectin-1 з IFN- β або NF κ B, проте її знайдено для високого рівня pAKT. Ці дані свідчать, що посилення експресії Nectin-1 відбувається на ранній стадії туморогенезу ЩЗ і призводить до підвищення чутливості клітин пухлини до ВПГ. Для перевірки цієї гіпотези проведено лабораторні дослідження ЩЗ із використанням клітинних ліній раку.

Експресію Nectin-1 і чутливість ВПГ1 і ВПГ2 досліджено у клітинних лініях ФРЩЗ (FTC133, 236 і 238), ПЩЗ із прихованою транслокацією *RET/PTC1* (TPC1) і *BRAF*-позитивного РЩЗ (KTC і VCAP). За допомогою вестерн-блот-аналізу та In-Cells Western аналізу експресію Nectin-1 виявлено в усіх досліджених клітинних лініях ракових клітин, із найбільшим рівнем у клітинах FTC133, TPC1 і KTC1 (рис. 6.11).

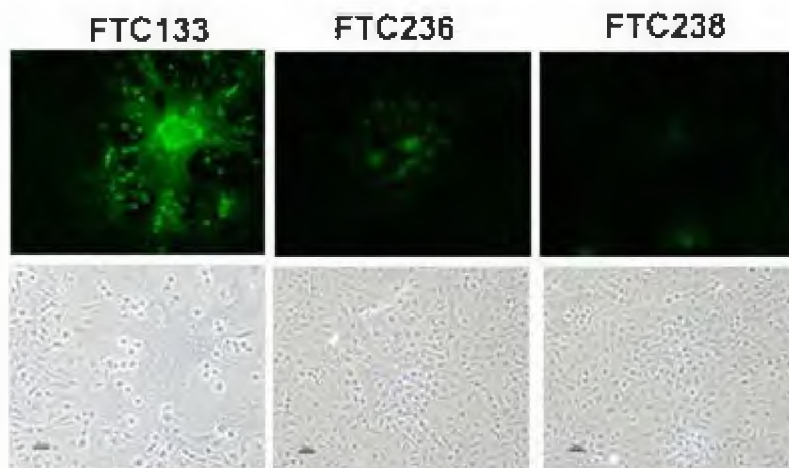


Рис. 6.11. Експресія капсида білка вірусу в інфікованих клітинах ПЦЗ. ВПГ асоціюється з цитологічними ознаками хронічного запалення та здатністю до формування синцитію, конфокальна мікроскопія, $\times 400$.

Чутливість клітин клітинних ліній РЦЗ до ВПГ корелює з рівнем експресії Nectin-1. Так, у понад третині клітин клітинних ліній РЦЗ із високим рівнем експресії Nectin-1 (FTC133, TPC1 і KTC1) виявлено ознаки активної реплікації вірусу через 24 години після інфікування. На відміну від цього, у клітинних лініях із низьким рівнем експресії Nectin-1 (FTC236, FTC238 і *BRAF*-клітин), позитивне забарвлення білка ВПГ виявлено менше, ніж у 5 % клітин через 24 години після зараження. Через 48 годин після зараження у понад 30 % клітин серед усіх досліджених клітинних ліній спостерігалися характерні морфологічні зміни відповідно до цитопатичного ефекту (ВПГ-індукована втрата міжклітинних контактів, округлення клітин і поява цитоплазматичних вакуолей). Найбільш характерною рисою, пов'язаною з ВПГ2-інфекцією, є наявність гігантських багатоядерних клітин і формування синцитієподібних структур. В інфікованих клітинах ВПГ-індукована клітинна загибель відбувалася з інтенсивністю від окремих груп протягом 72 годин після інфікування до масової загибелі клітин протягом 96 годин (рис. 6.12).

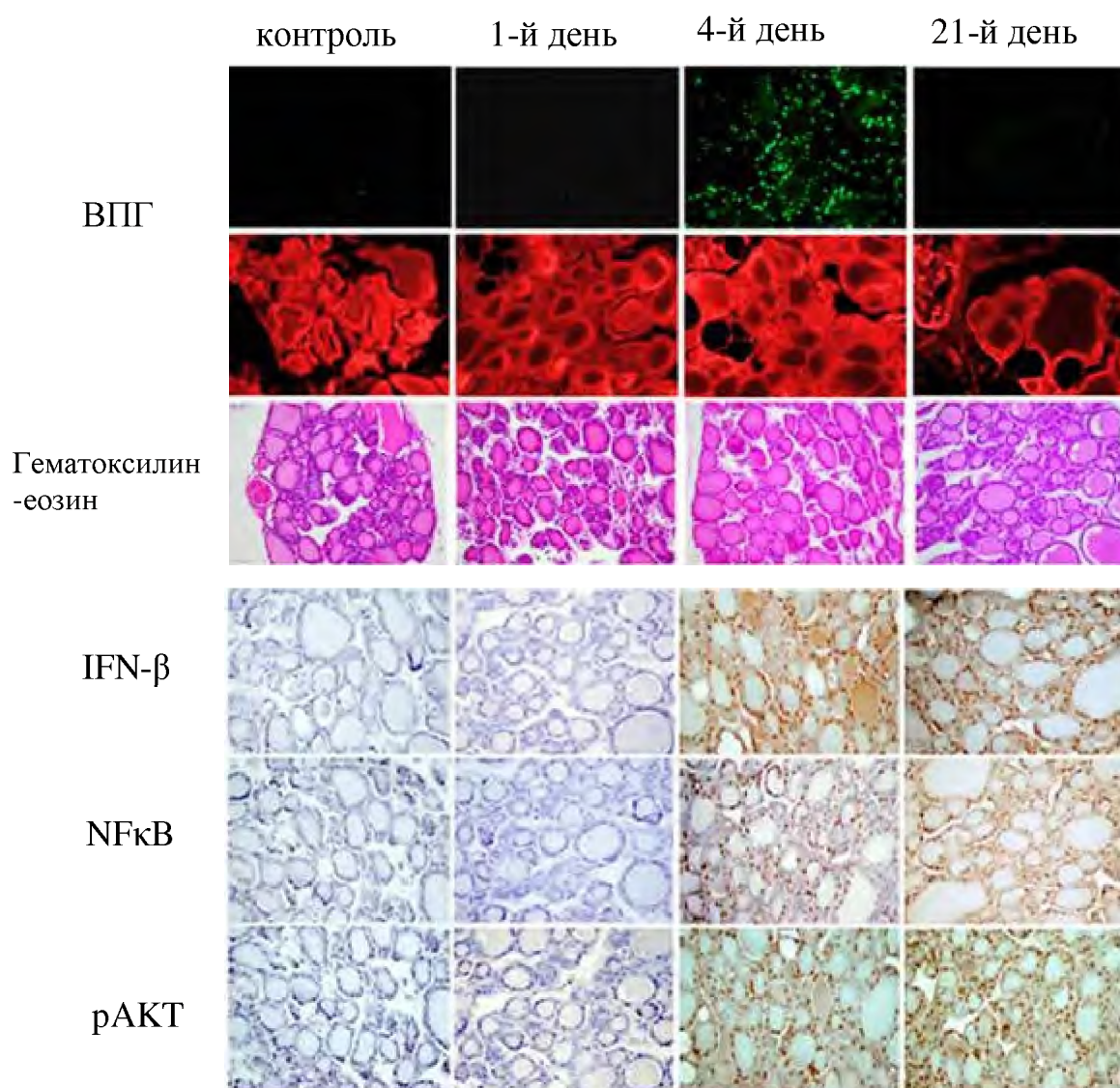


Рис. 6.12. Виявлення білка вірусу простого герпесу та морфологічні особливості щитоподібної залози на моделі ВПГ-інфікованого щура, імунофлюоресценція, конфокальна мікроскопія, гематоксилин-еозин, $\times 100$. Активація вірус-індукованого сигналу у ЩЗ на 4-й день після інфікування, імуногістохімічна реакція, $\times 100$.

Отже, виявлено прямий зв'язок між чутливістю клітин РЩЗ до ВПГ-інфекції, ВПГ1 і рівнем експресії Nectin-1. Показано, що гальмування Akt у клітинних лініях РЩЗ фармакологічним інгібітором не впливало на експресію Nectin-1. Інгібіція MAPK/ERK сигнального шляху в клітинах РЩЗ також не вплинула на рівень Nectin-1. Утім чутливість клітин РЩЗ до ВПГ знизилася

після впливу або P13K/AKT або MAPK/ERK інгібіторів. У пухлинах ШЗ виявлено зв'язок між наявністю ВПГ2 і метастазами ПРЩЗ. Показано, що клітини РЩЗ у зоні інвазії мають подібні до мезенхімальних молекулярні характеристики, а ЕМТ розглядається як чинник, що впливає на чутливість ракових клітин до онколітичних вірусів. Тому ми припустили, що клітини РЩЗ, що піддаються ЕМТ більш сприйнятливі до вірусу простого герпесу. В усіх досліджених клітинних лініях виявлено мезенхімальні властивості та підвищену здатність до міграції. Аби визначити, чи підвищує ЕМТ чутливість клітин раку до ВПГ, використано WRO і ARO клітини з епітелієподібними зонами росту, які неефективно мігрували у камері Бойден. У цих клітинних лініях ЕМТ індуковано шляхом впливу ЧНП- α . Це призвело до втрати міжклітинних контактів, зниження рівня мембранного Е-кадгерину та появи ядерної Akt. Визначено підвищення чутливості клітин РЩЗ, які набули мезенхімо-подібних властивостей, до ВПГ. Експресія вірусних білків і цитопатичні ефекти спостерігалися у клітинах, попередньо оброблених ЧНП- α , але не в контрольних клітинних лініях після дії ВПГ. Ці результати показали, що активації сигнальних шляхів та індукція ЕМТ призводить до підвищення чутливості клітин РЩЗ до ВПГ.

Отже, ВПГ пов'язаний із туморогенезом ШЗ. Чутливість клітин пухлин ШЗ до вірусу простого герпесу збільшується за рахунок: 1) підвищення експресії вірусного рецептора Nectin-1, 2) активації мітогенних сигналів, 3) індукції ЕМТ у метастатичних РЩЗ. Наші результати свідчать про можливу ефективність онколітичного ВПГ2 для лікування метастатичного ПРЩЗ.

Резюме до розділу 6

Для вивчення ролі ЕМТ у процесі інвазії та встановлення зв'язку з клініко-морфологічними чинниками у зонах інвазії та у метастазах ПРЩЗ проведено дослідження експресії генів, залучених до ЕМТ. У зонах інвазії ПРЩЗ виявлено експресію генів, залучених до ЕМТ. Встановлено вірогідний

зв'язок між високим рівнем експресії віментину та ознаками екстраорганної інвазії, багатофокусним ростом, наявністю метастазів у лімфовузлах.

Для вивчення мезенхімальних особливостей інвазійних клітин РЩЗ у метастазах досліджено статус метилювання промотору гена Е-кадгерину у серії ПРЩЗ і відповідних МЛВ. У процесі метастазування виявлено динамічні зміни статусу метилювання промотору Е-кадгерину. Епігенетичні механізми й активація ЧНП- α -індукованих сигналів є незалежними чинниками інвазії клітин РЩЗ, дія яких реалізується шляхом регуляції експресії та внутрішньоклітинної локалізації Е-кадгерину.

Для вивчення ролі ВПГ у канцерогенезі ЩЗ досліджено стан ВПГ у низці доброякісних і злоякісних пухлин ЩЗ, а також чутливість до вірусу клітинних ліній раку *in vitro*. Визначено підвищення чутливості клітин РЩЗ, які набули мезенхімо-подібних властивостей, до ВПГ. Експресія вірусних білків і цитопатичні ефекти спостерігались у клітинах, попередньо оброблених ЧНП- α , але не в контрольних клітинних лініях після дії ВПГ. Отже, активація сигнальних шляхів та індукція EMT призводить до підвищення чутливості клітин РЩЗ до вірусу простого герпесу.

Результати, викладені у даному розділі, опубліковано у працях:

9. Gene expression and functional evidence of epithelial-to-mesenchymal transition in papillary thyroid carcinoma invasion [Text] / V. Vasko, A.V. Espinosa, W. Scouten, H. He, H. Auer, S. Liyanarachchi, A. Larin, V. Savchenko, G. Francis, A. de la Chapelle, M. Saji, M. D. Ringel // Proc. Natl. Acad. Sci USA. – 2007. – V. 104, № 8. – P. 2803–2808.
10. Dynamic changes in E-cadherin gene promoter methylation during metastatic progression in papillary thyroid cancer [Text] / K. Jensen, A. Patel, V. Hoperia, O. Larin, A. Bauer, V. Vasko // Experimental and Therapeutic Medicine. – 2010. – V. 1. – P. 457-462.
11. Epithelial-mesenchymal transition (EMT), vimentin expression and re-localization are important in thyroid cancer progression and invasion [Text] / V.

- Vasko, W.T. Scouten, A. Patel, K. Oakley, M. Saji, M.D. Ringel, A. Larin, V. Savchenko, G. Francis // 87-th Annual meeting of Endocrine Society. – San Diego, CA, 2005. – P. 68.
12. Herpes virus in thyroid cancer [Text] / V. Kinichenko, K. Jensen, A. Patel, A. Bauer, O. Larin, V. Vasko // European Congress of Endocrine Surgeons. – Barcelona (Spain), 2008. – P. 53.
13. TREM signaling is activated in metastatic thyroid cancer cells [Text] / K. Jensen, A. Patel, V. Savchenko, O. Larin, A. Bauer, V. Vasko // American Thyroid Association. – Palm Beach, FL., 2009. – P. 51.
14. Human herpes virus is frequently detected in metastatic thyroid cancer and induces resistance to anoikis in thyroid cancer cells lines [Text] / K. Jensen, A. Patel, V. Savchenko, O. Larin, A. Bauer, K. Yim, V. Vasko // AAP Uniformed Services Pediatric Seminar. – Dayton, OH, 2009. – P. 78.
15. Jensen K, Patel A, Hoperia V, Larin O., Bauer AJ and Vasko V. Human herpes virus (HSV) entry receptor Nectin-1 expression and regulation in thyroid cancer cells [Text] / K. Jensen, A. Patel, V. Hoperia, O. Larin, A. Bauer, V. Vasko // 91st Endocrine Society Meeting. – Washington DC, 2009. – P. 45.
16. Хоперія В.Г. Роль епітеліально-мезенхімальної трансформації у процесі інвазії раку щитоподібної залози. Журн. НАМН України. – 2011. – Т.17, № 4. – С . 402-405.

АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

Роботу присвячено вивченню потенційних чинників прогнозу пухлин щитоподібної залози, а також визначенню їх ролі у виборі діагностичної та лікувальної тактики на підставі сучасних уявлень про механізми канцерогенезу.

Вузли ЩЗ є одним із найчастіших різновидів патології ЩЗ, у клінічній практиці часто виникають проблеми у діагностиці та виборі тактики лікування пацієнтів із цією патологією. Відомо, що частота захворюваності на вузловий зоб коливається у різних вікових категоріях та залежно від географічного регіону мешкання досліджуваної популяції від 2 % до 7 % [276]. У більшості випадків вузли ЩЗ мають доброякісну природу, проте у 5 % випадків морфологічно виявляється рак [209].

На практиці щільний, малорухомий, солітарний вузол ЩЗ, що швидко збільшується, завжди викликає підозру на рак, натомість щільними можуть бути і колоїдні вузли із зонами склерозу, а також вузли на тлі хронічного тиреоїдиту. Водночас, вузол, що діагностується пізніше як папілярний рак, може бути м'яким за умов його кістоподібного перетворення.

Для раку ЩЗ характерним є збільшення регіонарних лімфатичних вузлів, рідше – параліч голосових зв'язок внаслідок пошкодження поворотного гортанного нерва, а також симптоми стиснення органів ший. Збільшені за розмірами лімфатичні вузли ший визначаються і на тлі тиреоїдиту, але за таких умов пальпація залози частіше викликає біль, ніж у випадках раку.

На цих підставах можна вважати, що основну проблему сучасної ендокринології щодо вузлового зоба складає його діагностика, тобто встановлення добро- або злоякісної природи процесу, адже сьогодні загальновизнано, що лише хірургічне лікування хворих є невиправданим із цілої низки об'єктивних причин [19].

Дані лабораторних досліджень дозволяють оцінити лише функціональний стан ЩЗ. Як правило, злоякісні вузли визначаються на тлі еутиреоїдного або гіпотиреоїдного стану залози. Для автоімунного тиреоїдиту характерно

підвищення титру антимікросомальних антитіл та антитіл проти тиреоглобуліну. У діагностиці токсичного зоба користуються визначенням імуноглобулінів, що стимулюють ріст залози, та антитіл, які пригнічують зв'язування тиреотропіну. Визначення циркулюючого тиреоглобуліну широко застосовується у діагностиці метастазів після тотального видалення ЩЗ із приводу диференційованих форм раку ЩЗ. За підозри на медулярний рак ЩЗ показано визначення рівня тиреокальцитоніну. Проте, збільшення рівня цього гормону може визначатися також за раку легенів, молочної, підшлункової залози, феохромоцитом та наявності метастазів у кістках. Отже, аналіз літератури з питань лабораторної діагностики пухлинних захворювань ЩЗ сьогодні показує, що у багатьох випадках можливості визначення добро- або злоякісної природи пухлин ЩЗ на передопераційному етапі є обмеженими.

Що стосується рентгенологічних досліджень, то їх застосування дозволяє визначити лише ознаки компресії органів ший, наявність метастазів у легенях, але у діагностиці раку ЩЗ даний метод не є інформативним [19].

У свою чергу, ультразвукове дослідження дозволяє визначити розміри часток залози, виявити зміни ехогенності різних її зон, оцінити стан судин, а також виявити деформацію контурів ЩЗ і додаткові утворення. Визначення ехографічних особливостей, притаманних раку (зниження ехогенності, неправильні та нечіткі контури вузла) дають можливість лише запідозрити злоякісний характер процесу, але не встановити його природу [248].

Радіоізотопне дослідження ЩЗ ґрунтується на здатності клітин залози накопичувати радіоактивні елементи. Для цього використовують радіоактивний йод 123, технецій 99, селенометіонін 75, цитрат галію 67, цезій 131, талій 201. Цей метод дає можливість класифікувати вузли залози залежно від здатності накопичувати радіоактивний йод як «гарячі» (гіперфіксуючі), «холодні» (гіпофіксуючі) та ізофіксуючі. Найчастіше злоякісні пухлини ЩЗ тотожні «холодним» вузлам, проте трапляються і випадки ізофіксуючих і «гарячих» вузлів. З огляду на це можна вважати, що радіоізотопне дослідження також є малоефективним методом у діагностиці вузлів ЩЗ [19].

Томоденситометрія та ядерно-магнітний резонанс не дозволяють визначити гістологічну структуру пухлини залози та її характер – злоякісний або доброякісний. Використання цих методів дає можливість визначити топографо-анатомічні особливості пухлини (загруднинне або затрахеальне розташування, наявність регіонарних метастазів), що може служити лише додатковою інформацією для хірургічного лікування утворення [19].

Сьогодні загальновизнано, що ТАПБ є найефективнішим методом у діагностиці захворювань ЩЗ і застосовується з метою визначення їх морфологічної природи та як метод скринінгу у визначенні лікувальної тактики [122].

ЩЗ дорослої людини розташована на шії попереду трахеї і на бічних стінках гортані та частково прилягає до щитоподібного хряща. Верхівки часток залози заходять на зовнішню поверхню щитоподібного хряща, прикриваючи нижній ріг і прилеглу частку хряща, знизу частки залози доходять до п'ятого-шостого кільця трахеї. Задньою поверхнею частки стикаються зі стінками глотки та стравоходу. Перешийок задньою поверхнею прилягає до другого-третього кілець трахеї, іноді доходючи своїм верхнім краєм до персноподібного хряща. Передні поверхні часток залози вкрито груднино-щитоподібними та груднино-під'язиковими м'язами. До латеральних відділів часток залози прилягають груднино-ключице-сосцеподібні та лопатково-під'язикові м'язи [169]. ЩЗ вкрито глибоким листком власної фасції шії, тонкі сполучнотканинні перетинки якої розділяють паренхіму органа на часточки. Фіксація внутрішніх поверхонь часток залози до трахеї здійснюється за допомогою внутрішніх латеральних зв'язок Грубера, поворотний нерв або його гілки проходять позаду цих зв'язок, що враховується під час операцій на щитоподібній залозі. Кровопостачання ЩЗ забезпечується гілками верхніх (система зовнішньої сонної артерії) та нижніх щитоподібних артерій (система підключичної артерії), у 10 % випадків виявляється непарна щитоподібна артерія. Гілки цих судин розподіляються таким чином, що передньо-латеральні поверхні часток васкуляризуються переважно гілками верхніх щитоподібних артерій, а задня

поверхня – гілками нижньої щитоподібної артерії. Існуючі анастомози по передній і задній поверхнях часток, над і під перешийком формують так зване перищитоподібне кільце. Верхні та середні щитоподібні вени є притоками внутрішньої яремної вени, нижні щитоподібні вени впадають у плече-головний стовбур. Іннервація ЩЗ здійснюється гілками блукаючого нерва, а також нервами периваскулярних симпатичних сплетінь [169].

Під час УЗД кожна ехограма – це фронтальний зріз передньої ділянки шиї товщиною 3-4 мм. Частки ЩЗ візуалізуються як утворення напівкруглої або трикутної форми, світло-сірого кольору, із нерівно вираженою зернистістю, симетрично розташовані відносно трахеї. Попереду трахеї знаходиться перешийок, латеральніше та позаду від часток ЩЗ визначаються ехонегативні утворення округлої форми – поперечні зрізи загальної сонної артерії та внутрішньої яремної вени. Загальна сонна артерія виявляється у вигляді пульсуючого ехонегативного утворення та розташована медіально, внутрішня яремна вена – латерально. Внутрішні яремні вени не завжди візуалізуються під час дослідження, адже їх просвіт легко передавлюється датчиком.

Під час поздовжнього сканування перешийок ЩЗ виявляється у формі невеликого валу, безпосередньо за ним видно ланцюжок ехопозитивних структур – кільця трахеї. Частки ЩЗ мають овоїдну форму, одразу ж за ними знаходяться трубчасті ехонегативні пульсуючі утворення – загальні сонні артерії. На тлі однорідної ехоструктури ЩЗ можуть виявлятися гідрофільні зони діаметром 3-4 мм, які відповідають фолікулам, заповненим колоїдом, а також тонкі звивисті гідрофільні структури довжиною 5-6 мм – інтраорганні, міжчасткові судини. За поперечного положення датчика на рівні перешийка ЩЗ латерально візуалізується груднино-ключице-сосцеподібний м'яз, а глибше і медіальніше – груднино-під'язиковий і груднино-щитоподібний м'язи. Вони мають темно-сірий колір, а контури м'язів – підвищену ехогенність за рахунок сполучнотканинних футлярів, утворених поверхневим листком власної фасції шиї (для груднино-ключице-сосцеподібного м'яза) та глибоким листком

власної фасції шиї (для груднино-під'язикового та груднино-сосцеподібного м'язів) [295].

Ехографія ЩЗ дозволяє визначити форму, особливості розташування, об'єм часток, виявити різницю в ехогенності різних ділянок залози, оцінити стан капсули, виявити деформацію контуру залози та додаткові утворення, проте низка анатомічних утворень цієї ділянки не візуалізуються навіть із використанням датчика із високою роздільною здатністю.

Під час проведення ТАПБ залежно від локалізації вузла необхідно враховувати ті анатомічні структури, які не візуалізуються під час УЗД, але ушкодження яких значно знижує ймовірність отримання достатньої кількості клітинного матеріалу. Передні яремні вени не візуалізуються на ехограмах, вони розташовані на груднино-щитоподібному та груднино-під'язиковому м'язах, прямують донизу та медіально у проекції часток ЩЗ і анастомозують між собою у надгруднинному міжапоневротичному просторі. Передня яремна вена може бути непарною та прямувати донизу по середній лінії шиї, перетинаючи перешийок ЩЗ. За низького та загруднинного розташування ЩЗ цей венозний анастомоз може проектуватися на рівні перешийка. За такої топографії ЩЗ пунктування вузла, розташованого у ділянці перешийка, може супроводжуватися кровотечею та утворенням гематоми. Ймовірність отримання достатньої кількості клітинного матеріалу у повторній пункції цієї зони значно знижується [295].

Під час топографо-анатомічного дослідження передньої ділянки шиї виявляється низка нервових структур, що не візуалізуються за допомогою ехографічного дослідження. Латеральніше груднино-щитоподібного м'яза визначаються нерви, що йдуть від шийної петлі. Вони розташовуються по передній поверхні внутрішньої яремної вени, перетинають загальну сонну артерію та проектується на рівні середніх відділів часток ЩЗ. Позаду судинного пучка шиї латерально проходить діафрагмальний нерв, медіальніше – блукаючий нерв, гортанно-глоточні гілки симпатичного стовбура. У цій ділянці від блукаючого нерва відходять верхні та середні шийні гілки, а від

симпатичного стовбура – верхні та середні серцеві нерви. Ушкодження цих утворень під час проведення аспіраційної біопсії може викликати різноманітні вегетативні реакції, ймовірність пошкодження таких утворень підвищується під час введення етанолу з метою склерозування кіст. Біопсія вузлів ЩЗ тонкою голкою – майже безболісна маніпуляція, лише у випадках гранульоматозного тиреоїдиту виникає локальний біль, що не іррадіює. Поява болю під час пункції кістоподібно дегенеруючих вузлів свідчить про ушкодження нервових структур, тому ін'єкції етанолу в таких випадках є надто небезпечними [6].

Додаткові утворення, що виявляються біля задніх поверхонь часток ЩЗ, вимагають особливої уваги. Середній шийний симпатичний вузол розташований у місці перехрестя нижньої щитоподібної артерії та загальної сонної артерії. Під час формування парагангліоми у цій ділянці пухлина може зміщуватися до задньої поверхні частки ЩЗ і тісно прилягати до неї. Ехоструктура парагангліоми подібна до такої вузлів ЩЗ, і не завжди можна визначити, чи це дійсно утворення щитоподібної залози. По задній поверхні часток ЩЗ проходять поворотні гортанні нерви, від яких відходять нижні шийні серцеві гілки. Пошкодження цих структур під час ін'єкції етанолу може призвести до парезу голосових зв'язок.

У ділянці переходу верхнього краю перешийка у медіальний край частки щитоподібна залоза у випадку її високого розташування тісно прилягає до хрящів гортані. Між перснеподібним хрящем і нижнім краєм щитоподібного хряща знаходиться щілина, закрита перснеподібною зв'язкою, прямим і косим персне-щитоподібними м'язами, глибше розташовано персне-щитоподібні м'язи, а ще глибше – шлуночок гортані та підголосова порожнина. Відстань від заднього краю ЩЗ до порожнини гортані не перевищує 6 мм. Під час проведення ТАПБ вузла, розташованого у цій ділянці, можливо потрапляння голки у шлуночок гортані. У момент створення від'ємного тиску у шприці вестибулярна складка притискається до латеральної стінки гортані, повітря не потрапляє, але під час цитологічного дослідження аспіратів виявляється мерехтливий епітелій.

У зоні переходу перешийка у праву частку ЩЗ проектується місце ділення плече-головного стовбура на праву загальну сонну артерію та підключичну артерію. У випадках низького положення ЩЗ на ехограмах ця зона може хибно трактуватися як зона кістоподібної дегенерації. Існують варіанти розташування судин ший, за яких загальна сонна артерія проходить крізь товщу ЩЗ. Під час УЗД визначається ехонегативне додаткове утворення біля задньої поверхні частки щитоподібної залози, що може хибно трактуватися як кіста. За умов застосування приладів, що працюють у масштабі реального часу, виявляється пульсація «додаткового» утворення, що дозволяє правильно оцінити стан ЩЗ.

Поряд із варіантами розташування судин і нервів відносно ЩЗ, існують їх аномалії, пов'язані з порушенням внутрішньоутробного розвитку. 1789 року було описано варіант розміщення правої підключичної артерії, яка відходить безпосередньо від аорти, направляється до правої верхньої кінцівки, проходячи позаду стравоходу. Вперше ці відомості були наведені у трактаті «*Lusus naturae*», і наразі ця артерія відома як артерія *lusoria*. Приблизно в 1 % випадків правий поворотний нерв не є поворотним, тобто досягає гортані, не утворюючи петлі навколо підключичної артерії. Це пояснюється тим, що у пренатальному онтогенезі з 6 первинних дуг аорти перша, друга та п'ята цілком регресують, а майбутній правий поворотний нерв (нерв шостої дуги) виявляється під четвертою дугою – майбутньою підключичною артерією. У випадку аномалії четверта дуга аорти також зникає, а поворотний нерв відходить на рівні ший.

Під час УЗД передньої області ший можливо виявлення ектопованої тканини ЩЗ, а також аномалій форми залози, пов'язаних із порушенням внутрішньоутробного розвитку. Згідно з даними літератури, внаслідок порушень внутрішньоутробного розвитку можуть спостерігатися такі варіанти будови органа: гіпотрофія або відсутність частки, відсутність перешийка (за цих умов частки зв'язані міжчастковою зв'язкою), розташування перешийка на рівні середньої або верхньої третини часток, роздвоєння пірамідальної частки, відсутність зв'язку пірамідальної частки зі щитоподібною залозою [169].

Внаслідок порушення міграції серединного зачатка ектопована тканина ЩЗ може визначатися у будь-якій зоні по середній лінії шиї.

Слід відзначити, що можливою є малігнізація ектопованої тканини на тлі незміненої структури ЩЗ. Необхідно проводити ТАПБ у будь-якому випадку, бажано, аби стандартне цитологічне дослідження доповнювалось імуноцитохімічними методами з метою підтвердження доброякісної або злоякісної природи утворення, що пунктується [122].

Зміни ехоструктури ЩЗ, виявлені шляхом УЗД, класифікують як гіпо-, гіпер, анехогенні. Більшість кістозних вузлів за результатами гістологічного аналізу діагностуються як кістозно дегенеруючі аденоми ЩЗ. Деякі автори за допомогою цитологічного дослідження аспіратів виявляють злоякісні клітини лише у 3 % кістозних утворень. Це залежить від методу проведення ТАПБ та інформативності цитологічних препаратів [200].

Досить часто за ПРЩЗ виявляються невеликі фокуси кістозної дегенерації, але наявність кісти, що займає майже всю пухлину – рідкісне явище. Утворення кістозних порожнин у злоякісних вузлах пояснюють дегенеративними змінами та некрозом пухлини. У 70 % випадків вузли ЩЗ виявляються як додаткові утворення, що мають ізоехогенну або гіперехогенну щільність. У 95 % випадків такі додаткові утворення відповідають доброякісним пухлинам ЩЗ [200].

Різним формам раку ЩЗ властиві певні ехографічні особливості. ФРЩЗ ехографічно має вигляд вузла зниженої або звичайної ехогенності з гіпоехогенним обідком по периферії вузла та гідрофільними ділянками неправильної форми у вузлі. ПРЩЗ має вигляд гіпоехогенного вузла округлої або неправильної форми з нечіткими контурами. Ехографічно виявляються ознаки фіброзу, кальцинації та некрозу. Для анапластичного раку характерною є наявність вузла великих розмірів, неправильної форми і без чітких контурів. Ехогенність знижена, ехоструктура є неоднорідною за рахунок зон кістоподібної дегенерації, дрібних безсистемно розташованих кальцифікатів, осередків фіброзу. Відзначається зміщення трахеї та контрлатеральної частки у

бік, протилежний пухлині. Часто визначаються збільшені регіонарні лімфатичні вузли у вигляді гіпоехогенних утворень округлої або овальної форми. Проте слід відзначити, що на даний час не визначено ехогенні ознаки, характерні лише для злоякісних новоутворень ЩЗ [17].

Залежно від ехографічних ознак додаткового утворення ЩЗ визначається спосіб пункції. Під час проведення ТАПБ вузлів ЩЗ використовують голки діаметром від 0,5 мм (25G) до 0,8 мм (21G). Порівняльний аналіз результатів використання голок різного діаметра дозволив визначити, що максимальна кількість матеріалу отримується за умов проведення ТАПБ вузлів голками 21G без аспірації, 23G – з аспірацією та здійсненням 5 поступально-зворотних рухів голкою, 25G – з аспірацією та здійсненням 10 поступально-зворотних рухів голкою. Використання голок 21G дозволяє отримати цілі фрагменти епітеліального пласта, але на мазки потрапляє значна кількість крові, що ускладнює цитологічний аналіз аспірата. Використання таких голок є найзручнішим під час пункції кістоподібно дегенеруючих вузлів, адже це дозволяє видалити вміст кісти, після чого повторна пункція цієї ж зони голкою 25G або 23G дозволяє отримати достатню кількість матеріалу для цитологічного дослідження. Підозру щодо злоякісності викликає кістоподібно дегенеруючий вузол, який швидко відновлює свій об'єм після проведення тонкогोलкової аспіраційної біопсії та евакуації його вмісту [199].

Наразі застосовуються два основних варіанти пункції вузлів ЩЗ: під контролем УЗД і без такого. Вузли ЩЗ, що пальпуються, розміром понад 1 см, можна пунктувати без ультразвукового контролю, але попереднє ультразвукове дослідження дозволяє точніше визначити розміри вузла, його розташування відносно магістральних судин шиї, ехоструктуру. Аспіраційна біопсія з ультразвуковим контролем дозволяє проводити пункцію додаткових утворень діаметром менше від 1 см. Можливо застосування лінійного електронного датчика з робочою частотою 5 МГц або секторного датчика з робочою частотою 7,5 МГц. Деякі ультразвукові апарати оснащено програмами «водія» голки, що дозволяє візуалізувати на екрані апарата голку, утворення, що

пунктується, а також шкалу відстані від датчика до зони ЩЗ, що пунктується. Цей метод розглядається як один із найефективніших. За даними деяких авторів, із використанням ультразвукового контролю можна отримати достатньо клітинного матеріалу у 91 % випадків під час пункції вузлів ЩЗ, що не пальпуються [5].

За результатами аналізу серії з 5 600 випадків ТАПБ було встановлено, що неінформативні цитологічні висновки склали 3,5 %, серед яких випадки, що за даними цитологічного дослідження відповідали вмісту кісти, склали майже 90 %. Не було відзначено вірогідної різниці в інформативності мазків під час пункції вузлів ЩЗ, що пальпуються, з ультразвуковим контролем і без ультразвукового контролю. Слід відзначити, що кількість неінформативних випадків залежала від досвіду лікаря, який проводив маніпуляцію. Під час пункції у перших 100 пацієнтів неінформативні випадки складали 23 %, через півроку, після проведення 500 ТАПБ, кількість неінформативних цитологічних препаратів склала 9,3 %. Одним із методів підвищення ефективності пункційної біопсії є терміновий цитологічний контроль якості мазків. За відсутності достатньої кількості клітин необхідно повторити маніпуляцію. Проте слід враховувати, що за пошкодження судини ймовірність отримання достатньої кількості клітинного матеріалу під час проведення повторної пункції значно знижується. За ехографічними ознаками утворення розміром понад 10 мм, цитологічний аналіз аспірату яких був неінформативним, найчастіше відповідають кістам, кістоподібно дегенеруючим вузлам, вузлам із вираженим фіброзом, а також трапляються у випадках вузлів, оточених капсулою зі значною кількістю кальцифікатів [108].

Наразі питання про доцільність проведення ТАПБ вузлів, діаметр яких не перевищує 10 мм, обговорюється. Одним з аргументів на користь проведення пункції таких вузлів є той факт, що у деяких випадках на підставі цитологічного аналізу аспіратів вузлів діаметром менше від 8 мм було діагностовано рак ЩЗ. Проте слід відзначити, що після пункції додаткових утворень ЩЗ діаметром до 10 мм неінформативні цитологічні висновки склали

24 %, і навіть за умов достатньої кількості клітинного матеріалу не можна бути цілком впевненим у тому, що клітини отримано з вузла, а не з поряд розташованої тканини ЩЗ. На підставі вищенаведених даних здається доцільним диференційовано підходити до пункції вузлів ЩЗ, діаметр яких не перевищує 10 мм. Усі новоутворення ЩЗ, що пальпуються, пунктуються з високим ступенем інформативності, навіть якщо їх діаметр не перевищує 10 мм. У випадках вузлів діаметром менше від 10 мм, що виявляються лише під час УЗД і розташовані біля задньої поверхні часток ЩЗ, ймовірність отримання вірогідної інформації про природу утворення, що пунктується, є невисокою. У таких випадках слід проводити повторне ехографічне дослідження після 3-6 місяців, і виконувати ТАПБ з ультразвуковим контролем у випадках збільшення розмірів вузла [19].

Отже, ймовірність отримання достатньої кількості клітинного матеріалу прямо залежить від діаметра утворення, що пунктується, його ехоструктури, локалізації та досвіду лікаря, який виконує ТАПБ. Диференційований підхід у доборі способу проведення ТАПБ, урахування анатомічних особливостей будови ділянки проекції додаткового утворення ЩЗ і його ехоструктури можуть сприяти підвищенню діагностичної цінності пункційної біопсії та уникненню можливих ускладнень. Враховуючи той факт, що ефективність проведення ТАПБ визначається лікарем-цитологом, одним зі способів зниження кількості неінформативних цитологічних висновків є експрес-оцінка достатності отриманого під час пункції клітинного матеріалу.

В умовах, коли операції на ЩЗ проводяться без експрес-гістологічного контролю, цитологічний висновок щодо злоякісності має бути абсолютно вірогідним, адже значною мірою визначає обсяг хірургічного втручання. У таких випадках виключається можливість хибно-позитивного результату (цитологічний висновок щодо злоякісності для доброякісного захворювання), тому зростає відсоток сумнівних результатів і складається ситуація, коли пацієнт зі злоякісною пухлиною залишається непрооперованим.

Якщо основною задачею цитологічного дослідження розглядати селекцію вузлів для хірургічного лікування, а питання щодо їх злоякісності вирішувати з використанням експрес-гістологічних методик, то чутливість методу стає максимальною, але знижується його специфічність. За таких умов експрес-гістологічний контроль застосовують лише для підтвердження цитологічного висновку щодо злоякісності процесу і на цій підставі визначають обсяг хірургічного втручання.

Основну проблему у цитологічній діагностиці вузлів ЩЗ складає група сумнівних висновків. До неї відносять випадки із цитологічними ознаками атипії, що нагадують «фолікулярні неоплазії». У подібних випадках діагноз ФРЩЗ може бути встановленим лише під час гістологічного дослідження за наявності інвазії капсули або судин, але не на підставі цитологічних ознак ядерної атипії. Сумнівні висновки ТАПБ складають від 13 % до 30 % випадків, із них під час гістологічного дослідження РЩЗ діагностують у 10-60 %, тому сумнівний висновок розглядають як показання для хірургічного лікування [81]. Водночас діагноз «фолікулярна неоплазія» за результатами цитологічного аналізу аспіратів ЩЗ розглядається як діагностична «сіра зона», коли відрізнити ФА і ФРЩЗ неможливо.

За даними літератури, існують типові цитологічні ознаки ядер, характерні для папілярного раку ЩЗ: просвітлений хроматин, нерівні контури ядер, ядерні борозни, нашарування ядер, а також типові ядерні включення, що виникають внаслідок інвагінації цитоплазми в ядро [53]. Такі цитологічні ознаки виявляються майже у 80 % випадків ПРЩЗ, а доброякісні, цілком інкапсульовані пухлини з не досить вираженими ознаками атипії ядер відносять до групи ФПНПМ, які складають гетерогенну групу диференційованих пухлин ЩЗ із невизначеним злоякісним потенціалом і вимагають детального вивчення.

За класифікацією AFIP (1993), серед «атипових аденом» розрізняють три групи: аденоми, що за цитологічними ознаками нагадують папілярний рак; аденоми, що за цитологічними ознаками нагадують фолікулярний рак; аденоми з різними цитологічними ознаками атипії ядер [246].

Фолікулярна аденома (ФА) ЩЗ – пухлина фолікулярного походження, цілком оточена капсулою, позбавлена судинної, лімфатичної або капсулярної інвазії та характерних для ПРЩЗ ядерних ознак атипії. Натомість у деяких ФА виявляються ознаки ядерної атипії, характерні для ФРЩЗ і ФВПРЩЗ, які розглядаються як можливі попередники злоякісної трансформації. Тому для визначення ФПНПМ, які можуть бути передраковими, використовують об'єктивну оцінку ядерного хроматину.

У даному дослідженні із застосуванням автоматизованої системи аналізу зображень вивчено структуру хроматину ядер пухлин ЩЗ. Проаналізовано ядра клітин ФА, ФРЩЗ і ФВПРЩЗ і визначено відмінності між цими класами пухлин. Також проаналізовано випадки ФПНПМ із паралельним визначенням активації мутації *N2-RAS* та експресії *RET*. У випадках ФА не виявлено жодної мутації *RAS* або *RET*. Мутації *N2-RAS* визначено у третині випадків ФПНПМ, 20 % ФРЩЗ і 20 % ФВПРЩЗ без кореляції зі структурою хроматину. Транслокації *RET*, виявлено у 45 % ФПНПМ, 20 % ФРЩЗ і 50 % ФВПРЩЗ, корелювали з ядерними ознаками, характерними для ПРЩЗ. Отже ФПНПМ – гетерогенна група пухлин, до якої входять доброякісні утворення та пухлини з морфологічними та молекулярними особливостями ФРЩЗ і ПРЩЗ, і вони можуть бути попередниками обох типів РЩЗ.

На підтвердження півстолітньої дискусії про класифікацію і термінологію атипових пухлин ЩЗ можна сказати, що фактичне значення ядерної атипії в інкапсульованих утвореннях залишається загадкою. Тим не менше, у цитологічній діагностиці захворювань ЩЗ визначено кореляцію ознак ядерної атипії зі злоякісним процесом [80]. Як наслідок широке застосування ТАПБ у діагностиці вузлів ЩЗ привело до збільшення частки раку та ФПНПМ у структурі операцій з приводу захворювань залози. Дійсно, раніше, перед введенням у рутинну практику ТАПБ, частка виявлення ФПНПМ під час гістологічного дослідження коливалась від 2,7 % до 9,8 % від усіх ФА [148]. З використанням ТАПБ, зокрема в УНПЦХТЕОТ, частка таких пухлин у структурі ФА зросла до 14 %.

Було показано, що мутації *N2-RAS* у кодоні 61, залучені до процесу фолікулярного канцерогенезу, відсутні у випадках ФА, але виявлялися з майже однаковою частотою у ФПНПМ (23 %) і у ФРЦЗ (17,6 %) [258]. Продемонстровано позитивну імунологічну реактивність *RET* у зонах ОЯОПР [151]. Також у деяких клітинах ФПНПМ виявлено мутації *p53*. Тобто ФПНПМ можуть передувати РЦЗ. Оскільки основу морфологічних відмінностей ФРЦЗ і ПРЦЗ складають ядерні ознаки атипії, ми припустили, що ядра клітин ФПНПМ можуть мати «папілярний» (тонкий) або «фолікулярний» (грубий) ядерний фенотип хроматину [142]. Аби дослідити цю гіпотезу, проведено автоматизований аналіз зображень ядерного хроматину у типових і нетипових фолікулярних пухлинах, а також визначено мутації *N2-RAS* у кодоні 61 та активацію онкогенів *RET/PTC*.

З використанням ознак ядер класичної фолікулярної пухлини як контролю калібровано методику аналізу, що дало змогу розрізнити ядра клітин ФА, ФРЦЗ і ПРЦЗ. За допомогою даного методу успішно діагностовано РЦЗ у 19/20 випадках. Чутливість такого методу для діагностики злоякісного процесу склала 95 %, що відповідає результатам інших авторів [185]. Точність для діагностики типу пухлини склала 86,6 %, що підтверджує дані про можливість виділення ядер клітин ФА, ФРЦЗ і ПРЦЗ за допомогою морфометричного аналізу [79]. Цікаво, що усі три виділені типи ядер фолікулярних пухлин (ФА, ФРЦЗ і ПРЦЗ) у різних пропорціях були присутні у кожному з цих трьох класів пухлин, хоча з більшістю відповідних ядер у 26/30 випадках. Цей факт підкреслює неоднорідність фолікулярної пухлини, навіть якщо її визнано «типовою» за результатами гістологічного дослідження. Ми припустили, що ця неоднорідність лежить в основі перекриття ядерних ознак між різними підтипами доброякісних і злоякісних пухлин ЦЗ.

Результати дослідження 9 випадків ФПНПМ підтвердили цю гіпотезу. Ми виявили, що лише у двох випадках ФПНПМ мали фенотип істинної аденоми з переважанням клітин ФА, а у 7 випадках в основному виявлено клітини, характерні для ФРЦЗ та/або ПРЦЗ, тобто переважали ядерні ознаки

злюкисних пухлин. Цікаво, що у двох випадках ФПНПМ виявлено приблизно однаковий відсоток клітин, характерних для ФА, ФРЦЗ і ПРЦЗ. Такі пухлини нагадують «гібридні» фолікулярні пухлини, що мають ознаки як ПРЦЗ, так і ФРЦЗ, що підтверджує потенційне існування змішаних форм пухлин [142].

Визначення у деяких випадках ФПНПМ під час морфометричного аналізу головним чином клітин ФРЦЗ і ПРЦЗ, а також аналогічної кількості мутацій *N2-RAS* у ФПНПМ, ФРЦЗ і ФВПРЦЗ узгоджуються з виявленою в інших дослідженнях кореляцією між фолікулярною будовою ПРЦЗ та активацією мутації *RAS* [184]. Зазвичай мутації *RAS* зрідка виявляються у класичному варіанті ПРЦЗ і пов'язані з кодуючим геном *K-RAS*, а не з *N2-RAS* [258]. Виявлення активації мутацій *N2-RAS* у випадках ФПНПМ та істинно злюкисних пухлин фолікулярної будови свідчить, що діяльність цього гена може підтримувати фолікулярний тип росту незалежно від ядерного фенотипу.

За результатами імуногістохімічного дослідження експресію *RET*-білка виявлено з аналогічною частотою у випадках ФПНПМ і ФВПРЦЗ (приблизно у половині випадків). Експресію онкогенів *RET/PTC* знаходили у 40-86 % випадків ПРЦЗ [238], що було підтверджено ПЛР [181]. Таку експресію пояснюють активацією транслокацій у гені *RET* або діяльністю дикого типу онкогена *RET* [99]. Також у випадках ПРЦЗ було виявлено альтернативний сплайсинг транскрипції *RET*. Відмінності у частоті виявлення *RET* пов'язують із географічними та епідеміологічними особливостями [240]. Найчастіше онкогени *RET/PTC* визначали у пухлинах ЩЗ пацієнтів після зовнішнього або внутрішнього опромінення.

Високу частоту виявлення експресії *RET* у пухлинах ФВПРЦЗ у нашому дослідженні можна пояснити тим, що до нього увійшли пухлини пацієнтів, які мешкають у забруднених після аварії на ЧАЕС районах України. Ми не виявили активації *RET* у випадках ФА без ознак атиpii клітин, тоді як частота даного онкогена у пухлинах ФПНПМ була подібною до такої у ФВПРЦЗ, що відповідає даним літератури про активацію *RET/PTC* у фолікулярних пухлинах з ОЯОПР [31]. Це може пояснити деякі суперечливі результати дослідження

активації *RET* у фолікулярних пухлинах залежно від включення до досліджуваної серії пухлин з ознаками ядерної атипії або ОЯОПР [151]. У випадках ФПНПМ, як і у пухлинах ПРЩЗ, імунореактивність *RET* специфічно корелювала з часткою моделей-клітин ПРЩЗ, що підтверджує дані про те, що саме активація *RET* викликає в клітинах ЩЗ появу морфологічних ядерних ознак ПРЩЗ (просвітлення хроматину, нерегулярність контуру) [111].

Цікаво, що у трьох випадках (1 ФПНПМ, 1 ФРЩЗ і 1 ФВПРЩЗ) альтерації у генах *RAS* і *RET* виявлено у кожній пухлині, що пояснює різні молекулярні порушення в основі «фолікулярного» і «папілярного» шляхів канцерогенезу ЩЗ. Це пояснює також труднощі у диференційній діагностиці фолікулярного або папілярного підтипу пухлини ЩЗ [246].

Отже, група фолікулярних пухлин ЩЗ є гетерогенною та включає істинно доброякісні пухлини, позбавлені ознак ядерної атипії, та атипові пухлини, що мають як морфологічні, так і генетичні особливості, притаманні злоякісним новоутворенням. Ці атипові пухлини мають морфологічні й онкогенні ознаки фолікулярного та папілярного раку, що дозволяє припустити можливість їх передування будь-якому типу раку ЩЗ. Цей факт узгоджується з багаторічною клінічною картиною спостереження ФРЩЗ на тлі вузлового зоба та пояснює вузловий, повільний та інкапсульований характер росту більшості ФВПРЩЗ. Стосовно тривалої дискусії щодо термінології фолікулярних пухлин [52] наші результати підтверджують аргументи на користь існування проміжного етапу між аденомою та раком. Який би термін не буде обрано для найменування атипових фолікулярних пухлин, існує необхідність їх виділення із загальної групи аденом для аналізу прогностичних чинників і тривалого спостереження, що дозволить розробити оптимальну тактику лікування.

Наразі існує декілька класифікаційних систем, розроблених для прогнозування РЩЗ [46]. Для розподілу пацієнтів по групах ризику використовують різні прогностичні чинники (вік, стать, розмір пухлини, ознаки екстраорганної інвазії, повнота первинної резекції пухлини, наявність відділених метастазів). Проте жодна з цих систем не враховує гістологічний

варіант пухлини як прогностичний чинник. Ми поставили за мету визначити зв'язок між гістологічними варіантами ПРЩЗ і прогностичними групами ризику за критеріями класифікації AMES. Для цього ретроспективно проаналізовано ПРЩЗ, прооперованих у період 2003-2006 рр. Серед випадків солідного та висококлітинного варіантів ПРЩЗ найбільшу частку віднесено до групи високого ризику – 72,0 % і 29,5 % відповідно. Серед випадків класичного варіанту ПРЩЗ, фолікулярного його варіанту та мікрокарциноми до групи високого ризику потрапили 12,0 %, 3,3 % і 0,8 % відповідно.

Інкапсульований варіант і мікрокарцинома класифіковано як пухлини групи низького ризику. Отримані дані свідчать, що асоціація між різними гістологічними варіантами ПРЩЗ і групами ризику існує. Для солідного та висококлітинного варіантів ПРЩЗ, найбільша частка яких потрапила у групу високого ризику, характерний агресивніший перебіг [71]. Для фолікулярного, інкапсульованого варіантів і мікрокарциноми характерний більш сприятливий прогноз, тому більшість із них були у групі низького ризику. Ці дані підтверджують наявність асоціації між гістологічним варіантом ПРЩЗ і прогнозом хвороби. Крім того, результати нашого дослідження, як і дані інших авторів, продемонстрували, що ПРЩЗ у цілому має сприятливий прогноз, 75,4 % його випадків було класифіковано як групу низького ризику. Отже, результати наших досліджень узгоджуються з існуючими даними про важливе значення оцінки гістологічних варіантів ПРЩЗ для прогнозування захворювання [127]. Це ще раз підкреслює необхідність приділяти особливу увагу визначенню гістологічного варіанту ПРЩЗ під час гістологічного дослідження. Крім того, урахування гістологічного підтипу дозволяє визначати адекватні тактику лікування, індивідуальне прогнозування, післяопераційний моніторинг.

Окрему дослідну групу склали випадки папілярної мікрокарциноми ЩЗ, адже визначення оптимальної тактики лікування хворих із цією патологією залишається дискусійним.

Залежно від типу росту та інкапсуляції виділяють декілька підтипів ПМЩЗ [43]: окультна склерозована карцинома, оснащена рясною фіброзною стромою, із надто сприятливим прогнозом; неінкапсульована та неінвазійна мікрокарцинома «обмежена»; інкапсульована та неінвазійна мікрокарцинома, інкапсульована мікрокарцинома з інвазією у капсулу; інвазійна мікрокарцинома без капсули. Інкапсульований тип із капсулярною інвазією виявляється у 36-44 % випадків, цілком відмежовані форми, або інкапсульовані складають менше від 5 % ПМЩЗ [50].

Визначення оптимальної тактики лікування хворих із ПМЩЗ залишається суперечливим питанням. За існуючими даними, випадки диференційованого раку ЩЗ із розміром пухлини менше від 1,5 см не впливають на рівень смертності [260]. Проте інші дослідники випадки розповсюджених форм ПМЩЗ розглядають як потенційно агресивні, що несуть загрозу життю пацієнта [123]. Хірургічне лікування ПМЩЗ як метод вибору було запропоновано з появою даних про досить високу частоту МЛВ за даної патології [173]. Наявність локальних і регіонарних рецидивів описано у понад 20 % ПМЩЗ, є свідчення про випадки віддалених метастазів за ПМЩЗ зі смертельними наслідками [75]. Наші результати підтвердили дані про те, що ПМЩЗ може характеризуватися несприятливим прогнозом і відповідати більш агресивній стадії раку.

За результатами дисекції шиї МЛВ ПМЩЗ виявлено у 14,9 % випадків, із них 43,7 % – в іпсілатеральній групі, 56,2 % – у центральній. Ознаки екстраорганної інвазії в оточуючу тканину за ПМЩЗ в усіх випадках асоціювалися з МЛВ, у 20 % випадків МЛВ виявлено за пухлин, менших від 5 мм.

МЛВ виявлено у 14,9 % випадків ПМЩЗ, багатофокусний ріст – в 11 %, серед яких 58,6 % – у контрлатеральній частці ЩЗ, ознаки екстраорганної інвазії виявлено у 15,8 % випадків. Отже, за результатами нашого аналізу можна констатувати, що не розмір ПМЩЗ, а наявність ознак інвазійності є критерієм несприятливого прогнозу.

Несприятливими прогностичними анатомо-клінічними чинниками за ПМЩЗ визнають багатофокусність, білатеральність, екстраорганну та інтраорганну інвазію (неінкапсульовані пухлини або інкапсульовані з ознаками інвазії капсули), наявність МЛВ. Імовірність МЛВ зростає за умов інвазійності, багатофокусності, у чоловіків та залежить від розміру пухлини: від 13 % для пухлин <5 мм до 59 % для пухлин 5 мм і більше [180]. За результатами наших досліджень, кількість випадків ПМЩЗ із метастатичними депозитами розміром 1 мм виявилася досить високою, а існуюча практика візуальної оцінки ЛВ під час операції хірургом не гарантує їх виявлення, тобто не дозволяє вірогідно визначити адекватний обсяг хірургічного втручання.

Отже, ми вважаємо за доцільне проведення радикального хірургічного втручання у хворих на ПМЩЗ в обсязі екстрафасціальної тиреоїдектомії з іпсілатеральною та центральною селективною дисекцією шиї та визнання хірургічної операції як можливої підготовки до радіологічного етапу лікування ДРЩЗ.

Наше дослідження мало певні обмеження, пов'язані з відсутністю даних про рецидиви ПМЩЗ і результати радіоізотопного дослідження. Тому остаточний висновок щодо адекватної тактики ведення пацієнтів із ПМЩЗ можна буде зробити після проведення відповідних тривалих проспективних досліджень.

Для оцінки прогностичного значення варіантів ПР проаналізовано клініко-морфологічні характеристики випадків ПР з ознаками кістозної дегенерації. Відомо, що більшість кістозних вузлів відповідають доброякісним пухлинам ЩЗ, і лише у 3 % випадків за результатами ТАПБ виявляли цитологічні ознаки малігнізації [126]. Але є і дані, що вузли з ознаками кістозної дегенерації мають ознаки злоякісності не набагато рідше, ніж вузли солідної будови [168].

Ми виявили вірогідно більшу (у 2,6 разу) частоту метастазування у групі кістозних ПРЩЗ порівняно з некістозними. Це може свідчити про більш агресивну поведінку кістозних раків ЩЗ, що суперечить традиційній думці про

низький ризик їх метастазування. Також встановлено кореляційний зв'язок між метастазами та розміром пухлини і наявністю екстраорганної інвазії.

Отримані дані можуть стати підставою для розробки більш ефективного диференційованого підходу до хірургічного лікування пацієнтів зі злоякісними вузлами ЩЗ із наявністю кістозної дегенерації.

З метою аналізу прогностичного значення ознак екстраорганної інвазії за ПРЩЗ досліджено 5 випадків інвазії ПРЩЗ у ПЩЗ. Лише в 1 із цих випадків інвазію у ПЩЗ було виявлено клінічно під час хірургічного втручання. Інвазія ПРЩЗ у ПЩЗ виявлялась як безпосереднє розростання пухлинної тканини у ПЩЗ або шляхом метастазування. В 1 із 5 випадків виявлено як безпосереднє розростання пухлинної тканини у ПЩЗ, так і зони злоякісних клітин у ПЩЗ, що потрапили туди, ймовірно, шляхом лімфогенного метастазування. У дослідженнях, які ґрунтувалися на автопсійних дослідженнях, описано наявність метастазів різних злоякісних пухлин у ПЩЗ [190]. Інвазія ПРЩЗ у ПЩЗ виявляється досить зрідка і лише під час гістологічного дослідження. У нашій роботі ПЩЗ виявлено під час макроскопічного дослідження у 2 із 5 випадків, в інших – під час гістологічного дослідження. У 3 із 5 випадків виявлено інвазію у ПЩЗ шляхом безпосереднього розповсюдження ПРЩЗ, у 2 із цих випадків не виявлено МЛВ, а в 1 випадку визначено інвазію у гортанний нерв, тоді як у двох інших випадках інвазія у ПЩЗ мала вигляд метастатичних депозитів без видимого зв'язку зі злоякісною пухлиною та асоціювалася з МЛВ.

Отримані результати не можуть свідчити про стадію злоякісного процесу, адже відомо, що в усіх випадках ПРЩЗ виявляються ознаки екстраорганної інвазії, а ПЩЗ розташована у безпосередній близькості до злоякісної пухлини [169]. З іншого боку, метастазування у ПЩЗ може здійснюватися лімфатичними капілярами, що об'єднують ЩЗ і ПЩЗ анатомічно. За даними літератури, метастатичне ураження ПЩЗ злоякісними пухлинами виявляється у 0,2-19,9 % випадків [190]. Найчастішою локалізацією злоякісної пухлини у таких випадках були молочна залоза, кров (лейкемія), шкіра (меланома), легені

та м'які тканини [190]. Проте наявність лімфатичних судин у ПЩЗ до сьогодні досліджено недостатньо, а у деяких ранніх виданнях цей факт навіть заперечувався [268]. Тому для ліпшого розуміння шляхів метастазування ПРЩЗ у ПЩЗ необхідно продовжити дослідження для виявлення лімфатичних судин, які можуть з'єднувати ці органи.

Для оцінки можливості радикалізації хірургічних втручань та визначення ризику післяопераційного гіпаратиреозу у випадках локального розповсюдження ПРЩЗ у ПЩЗ ми дослідили клініко-морфологічні характеристики пухлин і стан кальцієвого обміну пацієнтів із ПРЩЗ. В усіх випадках уражена ПЩЗ була розташована на боці первинної пухлини. Загалом у 2,5 % випадків ПРЩЗ виявлено ураження ПЩЗ. Видалення однієї ПЩЗ не супроводжувалося стійкими порушеннями кальцієвого обміну.

На підставі літературних даних і результатів власних досліджень запропоновано алгоритм хірургічного втручання, який дозволяє мінімізувати ризик розвитку післяопераційного гіпаратиреозу. З метою забезпечення радикальності операції доцільно видаляти прилеглу до пухлини ПЩЗ, забезпечивши перед цим збереженість і життєздатність інших трьох. Втім, має сенс вивчити віддалені результати (якість і тривалість життя) для визначення впливу як інвазії до прищитоподібних залоз, так і метастазування до них.

З огляду на схильність ПРЩЗ метастазувати до регіонарних лімфатичних вузлів ший проаналізовано частоту метастазів та їх структуру.

За даними аналізу результатів систематичних дисекцій лімфатичних вузлів ший, частота метастатичного ураження коливається від 37 % до 80 % [173]. У нашому дослідженні МЛВ виявлено у 29,5 % лімфовузлів. Метастатичне ураження лімфатичних вузлів центрального колектора (VI рівень), за даними літератури, виявляється у 70-90 % усіх метастазів [218], що підтверджено і результатами нашого дослідження. Метастази ПРЩЗ у лімфатичних вузлах латерального колектора ми виявили у чверті випадків, що також не суперечить даним інших авторів (25-81 %) [253]. Деякі автори вважають, що локалізація метастазу у колекторах ший залежить від

розташування пухлини у частці залози [62], інші такої залежності не відзначають і стверджують, що локалізація папілярної карциноми у ЩЗ не впливає на характер метастазування у лімфатичні вузли [172]. Результатами нашого дослідження не виявлено вірогідної залежності між розташуванням пухлини у ЩЗ і локалізацією МЛВ, за винятком пухлин перешийка, коли ураження центрального колектора визначено майже в усіх випадках.

Наразі не існує єдиної думки щодо доцільності проведення профілактичної центральної дисекції шиї. За рекомендаціями консенсусу Європейської тиреоїдної асоціації з ведення диференційованого РЩЗ [249], виконання профілактичної центральної дисекції будь-якого виду (модифікованої, селективної) виправдано лише у випадках підозри на наявність МЛВ у передопераційний період або виявлення їх під час операції. Американський консенсус з ведення диференційованого РЩЗ [218] наполегливо рекомендує проведення профілактичної центральної дисекції під час хірургічного лікування ПРЩЗ на тій підставі, що метастатичне ураження лімфатичних вузлів асоціюється зі значно більшим ризиком розвитку як локального та регіонарного рецидиву, так і віддалених метастазів. Протягом останніх років показано, що після видалення цілого колектора зменшується частота виникнення рецидивів, тоді як проведення *pick-up* дозволяє видалити лише макроскопічно змінені лімфатичні вузли [218].

З огляду на високу частоту метастатичного ураження лімфатичних вузлів центрального колектора, переважно невеликий діаметр метастазів вважаємо за доцільне виконання рутинної центральної дисекції шиї за ПРЩЗ. У нашій практиці впровадження стандартизованого підходу до виконання дисекції лімфатичних колекторів шиї привело до 2-кратного збільшення частоти виявлення метастазів у лімфатичних вузлах шиї.

Отримані нами дані відносно прогностично несприятливого характеру регіонарного розповсюдження РЩЗ за таких умов, як його радіаційний генез, наявність *BRAF*-мутацій, спадковий характер для медулярного раку та певні гістологічні форми ПРЩЗ (висококлітинний, колоноклітинний, дифузно-

склерозуючий), а також в усіх випадках низькодиференційованого та недиференційованого (анапластичного) РЩЗ дають право наполягати на обов'язковому виконанні не лише центральної, але й унілатеральної радикальної модифікованої дисекції шиї у таких випадках. Питання щодо білатеральної радикальної дисекції шиї слід вирішувати індивідуально, залежно від результатів експрес-гістологічного дослідження селективно видалених лімфатичних вузлів відповідних рівнів метастазування.

Загальновідомо, що ПРЩЗ є однією з найпоширеніших форм диференційованого РЩЗ [254]. У структурі злоякісних новоутворень ЩЗ фолікулярного походження він складає щонайменше 70 %, і ця частка у світі за останні десятиріччя постійно зростає [45]. Хоча прогноз для ПРЩЗ у цілому доволі сприятливий, до 10 % пацієнтів помирають від цього захворювання, а у 5-20 % виникають рецидиви [234]. Загальне виживання для більшості хворих із ДРЩЗ складає 90-100 % і залежить від гістологічних особливостей пухлини, а також загально визначених прогностичних чинників [45]. Рівень 10-річного виживання для хворих із ПРЩЗ складає до 93 % [262]. Лікуванню первинного ПРЩЗ приділяється багато уваги, і ця проблема постійно обговорюється в літературі [172]. Але лікування рецидивів захворювання є не менш актуальним, проте висвітлюється недостатньо. Пацієнти з рецидивами ДРЩЗ мають менш сприятливий прогноз порівняно з первинною хворобою, і ризик летальності, пов'язаної з пухлиною, для них вищий.

Чинники, що впливають на виникнення рецидиву хвороби після повного видалення первинної пухлини є предметом інтенсивного вивчення. Серед несприятливих прогностичних чинників деякі автори виділяють вік понад 40 років, розмір пухлини більше за 1,5 см, екстраорганну інвазію, наявність МЛВ тощо [224]. Проте бракує даних, на підставі яких виявляються прогностичні змінні для виживання після лікування регіонарного рецидиву. Є лише поодинокі повідомлення, що ґрунтуються на великих ретроспективних дослідженнях численних випадків ПРЩЗ [234]. На жаль, причини виникнення

регіонарних рецидивів після повного видалення папілярної карциноми залишаються нез'ясованими.

Ми вивчили можливість індивідуального прогнозування рецидиву захворювання на підставі ретроспективного аналізу клініко-морфологічних даних з метою визначення оптимальної тактики післяопераційного моніторингу хворих, прооперованих з приводу ПРЩЗ.

Рецидивом захворювання вважали клінічно або ехографічно виявлені та морфологічно підтверджені пухлини у лімфатичних колекторах шиї у хворих на ПРЩЗ, які вважалися вилікованими впродовж 6 місяців після тотальної тиреоїдектомії з дисекцією лімфатичних вузлів і радіойодабляції. Термін від видалення первинної пухлини до виявлення першого випадку рецидиву склав від 6 до 64 місяців. Згідно з класифікацією AMES, групу низького ризику склали 11 хворих (52,4 %), а групу високого ризику – 10 (47,6 %). Тобто рецидиви ПР виявлялися частіше серед пацієнтів групи низького ризику. Серед гістологічних варіантів ПРЩЗ найчастіше діагностовано класичний (85,69 %). Розмір первинної пухлини склав від 0,7 см до 6 см. МЛВ та ознаки екстраорганної інвазії були виявлені у 76,19 % випадків, багатофокусність, ознаки інвазії лімфатичних судин – у 23,8 % і 28,6 % відповідно.

Хоча ДРЩЗ добре піддаються лікуванню і прогноз є сприятливим, ризик регіонарного метастазування існує не лише для хворих групи високого ризику (вік понад 45 років, великі розміри пухлини, екстраорганна інвазія, МЛВ), але й для пацієнтів групи низького ризику. Тому важливо проводити довічний моніторинг для виявлення ознак залишкової або рецидивної хвороби на субклінічній, потенційно виліковній стадії захворювання з використанням таких засобів скринінгу, як визначення рівня сироваткового тиреоглобуліну та УЗД шиї з подальшою ТАПБ підозрілих лімфатичних вузлів.

Наразі, на тлі постійно зростаючої кількості візуалізаційних досліджень, що проводяться не з приводу захворювань ЩЗ, діагноз «вузловий зоб» став спільною проблемою для терапевтів та ендокринологів. Серед діагностичних методів оцінки злоякісного потенціалу вузлів ЩЗ значну підтримку серед

фахівців отримала ТАПБ. Цей метод із подальшим цитологічним аналізом аспіратів дослідченим морфологом має дуже високі чутливість і специфічність. Обмеженням для застосування даного методу є ФПНПМ, коли цитологічні ознаки доброякісного та злоякісного процесу дуже схожі [230].

Мета цитологічного дослідження аспіратів пункцій вузлів ЩЗ визначається необхідністю добору адекватної лікувальної тактики та полягає або у виявленні злоякісних новоутворень, або у селекції вузлів залози для хірургічного лікування. Коли операції з приводу захворювань ЩЗ проводять без експрес-гістологічного контролю, цитологічний висновок щодо злоякісності має бути абсолютно вірогідним, адже саме від нього значною мірою залежить обсяг хірургічного втручання. За цих умов виключається можливість хибно-позитивного результату (цитологічний висновок щодо злоякісності для доброякісного захворювання), проте зростають відсоток сумнівних результатів і ймовірність «пропустити» рак.

Якщо основною задачею цитологічного дослідження вважати селекцію вузлів для хірургічного лікування, а питання щодо злоякісності їх вирішувати з використанням експрес-гістологічних методик, то чутливість такого методу стає максимальною, але знижується його специфічність. За таких умов експрес-гістологічний контроль застосовують лише з метою підтвердження цитологічного висновку щодо злоякісності процесу і на цій підставі визначають обсяг хірургічного втручання.

Інцизійна біопсія вузлів ЩЗ товстою голкою сьогодні практично не використовується, на відміну від ТАПБ. Останній метод є менш небезпечним, простим у застосуванні, маловартісним, не вимагає забагато часу, легко переноситься хворими, а діагностична цінність його є більшою порівняно з інцизійною біопсією. Під час проведення ТАПБ, на відміну від інцизійної біопсії, не визначалося жодного випадку дисемінації клітин пухлини по ходу голки [122].

Основною проблемою використання ТАПБ є хибно-негативні та неінформативні результати та вибір лікувальної тактики у випадках сумнівних

ТАПБ. Так, нерідко хибно-негативний результат може бути отриманим у випадках ФВПРЩЗ і ФРЩЗ, а класичні цитологічні ознаки ПРЩЗ не завжди виявляються під час цитологічного аналізу [282].

Іншою діагностичною проблемою є застосування сумнівних результатів ТАПБ у визначенні лікувальної тактики хворих із вузловим зобом. Деякі автори пропонують виконувати тиреоїдектомію лише для хворих зі злоякісними висновками ТАПБ [82]. Проте за таких умов 30-40 % пацієнтів будуть потребувати повторного хірургічного втручання, а 2-5 % хворих не отримають лікування взагалі.

У даному дослідженні оцінено можливість застосування імуноцитохімічного визначення НВМЕ-1, ТПО та цитохімічне дослідження ДАП IV для диференціювання злоякісних і доброякісних пухлин ЩЗ і підтверджено їх високу чутливість (92 %) для виявлення ПРЩЗ.

Визначено високу імуноцитохімічну активність НВМЕ-1 у випадках ПРЩЗ і ФРЩЗ, проте специфічність даного методу була досить низкою (44 %). Комбіноване застосування імуноцитохімічного визначення активності ТПО із МоАт 47 і цитохімічного визначення активності ДАП IV для цитологічного аналізу аспіратів вузлів ЩЗ дозволили досягти найбільшої діагностичної ефективності – 99 %.

ТАПБ є малоінвазійним і високоефективним методом у діагностиці вузлів ЩЗ дорослих і дітей. Фахівці Американської тиреоїдної асоціації та Національної мережі раку рекомендують застосовувати ТАПБ як первинний діагностичний тест [167]. Ефективність даного методу доведена результатами багатотисячних досліджень серед дорослого населення [110]. Проте є обмаль даних про результати ТАПБ вузлів ЩЗ у дітей.

Серед цитологічних висновків ТАПБ у дітей, яких оперували в УНПЦХТЕОТ, понад половину склали сумнівні або злоякісні, що ще раз підтверджує роль ТАПБ як скринінгового методу у відборі пацієнтів для проведення операції. Злоякісні пухлини було виявлено у 26,6 % випадках серед дітей із вузлами ЩЗ, що відповідає даним літератури [70].

Наше дослідження показало, що доброякісні та злоякісні висновки ТАПБ мають високу негативну та позитивну прогностичну цінність відповідно. Це узгоджується з результатами інших досліджень ТАПБ серед дорослих і дітей [70]. Проте, якщо до аналізу ефективності ТАПБ включати сумнівні цитологічні висновки, чутливість і специфічність методу набувають зворотної кореляції і в основному залежать від того, як визначати сумнівність. У нашому дослідженні, коли сумнівні ТАПБ розцінювали як «позитивні», чутливість і специфічність методу склали 97,8 % і 68,1 % відповідно, а коли такі висновки розцінювали як «негативні», чутливість і специфічність склали 78,7 % і 100 % відповідно. Ці результати підтверджують, що сумнівні цитологічні висновки ТАПБ є однією з основних діагностичних пасток у виборі терапевтичної тактики ведення педіатричних хворих із вузловим зобом. У даному дослідженні злоякісні пухлини серед оперованих хворих із сумнівними цитологічними висновками виявлено у 20 % випадків. За результатами інших досліджень, цей показник коливається від 15 % до 38 % у дорослих і від 10 % до 35 % у дітей [153].

Результати остаточного гістологічного аналізу прооперованих випадків із сумнівними цитологічними висновками ТАПБ у нашій серії показали, що до цієї групи входять злоякісні пухлини, ФПНПМ і доброякісні утворення. Ці результати відображають діагностичну дилему навколо фолікулярних аденом ЩЗ. Було доведено, що під час цитологічного аналізу стандартно забарвлених аспіратів ТАПБ неможливо відрізнити доброякісні від злоякісних фолікулярних пухлин, таких як ФРЩЗ і ФВПРЩЗ [21]. Отже, потенційна цінність цитологічного аналізу ТАПБ полягає у можливості відрізнити злоякісні пухлини та пухлини із підвищеним потенціалом злоякісності від доброякісних. У цілому серед дітей і підлітків, яким проведено ТАПБ вузлів ЩЗ, діагностична чутливість та ефективність цитологічного аналізу були подібними до описаних у дорослих. Більшість сумнівних цитологічних випадків ТАПБ у дітей після остаточного гістологічного аналізу відповідали доброякісним пухлинам. Отже,

ТАПБ є високоефективним методом у прогностичній оцінці злоякісності та відборі пацієнтів із вузловим зобом.

Вперше проаналізовано ефективність застосування імуноцитохімічного дослідження із МоАт 47 у цитологічній діагностиці вузлів у дітей. Більшість (92,5 %) пацієнтів нашого дослідження народилися після аварії на ЧАЕС. За демографічними даними виявлено значне збільшення поширеності РЩЗ у дітей пубертатного віку із зростанням серед дівчинок. Ці дані дозволяють припустити, що естрогени можуть сприяти розвитку РЩЗ. Є повідомлення про асоціацію експресії рецепторів естрогену та сироваткового інсуліноподібного чинника росту 1 (ІЧР-1) із розвитком вузлового зоба [167]. Проте для визначення такого причинно-наслідкового зв'язку необхідно проведення спеціальних досліджень.

Застосування маркерів злоякісності є ефективними доповненням у встановленні діагнозу раку під час ТАПБ. Імуноцитохімічне дослідження активності ТПО із МоАт 47 – один із перших ефективних методів у диференційній діагностиці доброякісного та злоякісного процесу на аспіратах вузлів ЩЗ [73]. Чутливість і специфічність застосування даного маркеру у цитологічній діагностиці вузлового зоба у дорослих склали 98,6 % і 80,3 % відповідно. Ми розглянули доцільність імуноцитохімічного дослідження з МоАт 47 на аспіратах вузлів ЩЗ у дітей. Зменшення імунореактивності з МоАт 47 було відзначено в усіх випадках злоякісних пухлин ЩЗ, а також у пухлинах із невизначеним потенціалом злоякісності. З іншого боку, виявлено високий рівень імунореактивності з МоАт 47 в усіх випадках доброякісних пухлин. Застосування даного методу у групі сумнівних висновків ТАПБ допомагає виявляти доброякісні пухлини, що дозволяє уникати неадекватних хірургічних втручань і значно підвищує чутливість і специфічність стандартного цитологічного дослідження.

Отже, чутливість і специфічність стандартного цитологічного аналізу вузлів ЩЗ серед дітей і підлітків аналогічні тим, що описані для дорослого населення. Більшість випадків сумнівних ТАПБ у дітей за даними остаточного

гістологічного дослідження відповідали доброякісним пухлинам. Наші дані довели, що імуноцитохімічне дослідження ТПО з МоАт 47 є ефективним методом у цитологічній діагностиці вузлового зоба, надто у випадках сумнівних висновків ТАПБ.

Патологічні характеристики несприятливого прогнозу ПРЩЗ, що підвищують ризик пролонгації/рецидиву хвороби та смерті (ознаки екстраорганної інвазії, метастази у лімфатичних вузлах, стадія пухлини, агресивний гістологічний підтип), як правило, погано або зовсім не визначаються перед операцією. Численні дослідження ПРЩЗ у пацієнтів різних етнічних і географічних груп продемонстрували асоціацію мутації *BRAF* з агресивним перебігом захворювання. Результати даного дослідження показують, що виявлення мутації *BRAF* на цитологічних препаратах ТАПБ, тобто на передопераційному етапі, дозволяє передбачити наявність чинників несприятливого прогнозу (екстраорганної інвазії, МЛВ).

Загальновизнано, що обсяг первинної операції з приводу ПРЩЗ значною мірою впливає на рецидив захворювання. Оцінка ризику агресивності РЩЗ на підставі клінічних даних і тестування перед операцією може допомогти у виборі відповідної хірургічної тактики. Можливості УЗД у передопераційній оцінці агресивності хвороби за ПРЩЗ часто обмежено, надто щодо виявлення метастазів у лімфатичних вузлах центрального відділу шиї. Отже, новий параметр, а саме мутація *BRAF*, для передопераційної оцінки ризику може виявитися надзвичайно цінним у виборі оптимальної тактики лікування за ПРЩЗ.

Доведено, що рутинно забарвлені цитологічні препарати вузлів ЩЗ можна використовувати для виділення ДНК та оцінки наявності мутації *BRAF*^{V600E}. На цитологічних препаратах цю мутацію виявлено у 45,0 % випадків класичного ПРЩЗ та у 36,3 % – ФВПРЩЗ.

Не було виявлено вірогідної кореляції між наявністю мутації *BRAF*^{V600E} і віком або статтю пацієнта. Частота цієї мутації істотно не різнилася між пацієнтами віком на момент операції до 45 років і хворими віком 45 років і

більше. Наявність мутації *BRAF*^{V600E} було пов'язано з такими клініко-морфологічними параметрами, як розмір пухлини, багатофокусний ріст, екстраорганна інвазія та наявність метастазів у лімфовузлах. Доведено обмежену ефективність виявлення мутації *BRAF*^{V600E} у серії сумнівних цитологічних випадків. Серед пацієнтів зі злоякісними цитологічними висновками цю мутацію виявлено у 45,2 % випадків. Тобто виявлення даної мутації має обмежене значення для діагностики злоякісного процесу у випадках із сумнівними цитологічними висновками ТАПБ, проте може бути корисним для передопераційного визначення пухлин ПРЩЗ із високим ризиком екстраорганної інвазії та МЛВ.

Продемонстровано, що активація Akt є найбільшою у зонах інвазії РЩЗ, визначено різницю у її локалізації у клітинах ПРЩЗ і ФРЩЗ, а також асоціацію активації ядерної Akt з інвазією клітин РЩЗ *in vitro*.

На відміну від нормальної тканини ЩЗ, надмірну активацію Akt виявлено в усіх випадках ФРЩЗ і у більшості випадків ПРЩЗ. Найбільшим рівень активації Akt був у клітинах раку в зонах інвазії у капсулу пухлини, капсулу залози, а також в МЛВ. У фолікулярних аденомах ядерну активацію Akt виявлено у клітинах із цитологічними ознаками атипії. На 12 із 14 свіжозаморожених препаратів РЩЗ рівень активації Akt у клітинах раку був значно вищий порівняно з оточуючою тканиною залози, а у випадках ПРЩЗ асоціювався з транслокаціями у гені *RET*.

Рух клітин РЩЗ через вкриту матригелем мембрану було визначено шляхом забарвлення цитоплазматичного та ядерного Akt. Здатність клітин до пересування пов'язано з переходом активованої Akt та Akt1 з ядра у цитоплазму. Міграція клітин була зупинена застосуванням малої дози інгібітору P13-кінази, а не MEK-інгібітором, що свідчить про роль P13-кінази у рухливості клітин РЩЗ. Отже, можна заключити, що постійна активації Akt1 може бути однією з причин прогресії РЩЗ. Ці дані доводять виключну перспективність розробок специфічних препаратів, здатних блокувати активацію Akt у тиреоцитах.

Генетичні дослідження в клітинах РЩЗ протягом останніх десятиріч демонструють можливості проникнення медичної науки до молекулярних причин виникнення та прогресії раку. Співпраця з відомими науковими медичними центрами Франції та США дала змогу проаналізувати декілька надзвичайно цікавих аспектів патогенезу, клінічного перебігу та можливостей поліпшення результатів лікування окремих форм РЩЗ, пов'язаних із певними змінами генетичного апарату тиреоцитів. Наші дослідження були спрямовані на виявлення частоти транслокацій у гені *RET*, активації інтрацелюлярного білка Akt і *BRAF*-мутації.

Більшість досліджень, проведених на пухлинах ЩЗ після аварії на ЧАЕС, розглядали специфічність взаємодії між *RET/PTC* транслокаціями та ПРЩЗ, що швидко розвивався у дітей – мешканців уражених районів Білорусі та України [121, 135, 205]. Лише окремі дослідження включали випадки ПРЩЗ у ліквідаторів наслідків аварії на ЧАЕС, але порівняння з випадками ПРЩЗ у дорослих, які не зазнали впливу аварії, не проводилося [158, 279].

Існуючі дані дозволяють припустити, що профілі *RET* транслокацій у ПРЩЗ в опромінених дітей відрізняються від таких в опромінених дорослих і дорослих або дітей інших країн. У ПРЩЗ дітей, які мали вік понад 10 років на момент аварії, виявлено високу частоту транслокацій *RET/PTC3* [134]. У ПРЩЗ підлітків і дорослих, постраждалих внаслідок аварії на ЧАЕС, як і пацієнтів, які отримували зовнішнє опромінення з лікувальною метою, виявлялися транслокації *RET/PTC1* [121, 165].

Результати попередніх досліджень показали, що іррадіація прямо індукує *RET* транслокації у клітинах ЩЗ [219]. Такі транслокації виявлено у 84 % пухлин ЩЗ після променевої терапії та у понад 76 % раків дітей після аварії на ЧАЕС [240]. Російські вчені стверджують, що досліджувана ними група ліквідаторів демонструвала надмірний ризик РЩЗ незалежно від національності [158].

За результатами останніх досліджень, РЩЗ у ліквідаторів є більш агресивним порівняно з РЩЗ у дорослих, які не зазнавали опромінення [59].

Проте мало відомо про гістологічні та молекулярні характеристики раку ліквідаторів наслідків аварії на ЧАЕС.

Виявлено високу частоту транслокацій *RET/PTC1* і *RET/PTC3* у раках українських пацієнтів умовно-контрольної групи. Частота транслокацій *RET/PTC1* у раках французьких пацієнтів умовно-контрольної групи була значно вищою, ніж за даними попередніх досліджень, проведених у Франції [239], але транслокації *RET/PTC3* виявлялись зрідка.

Значний відсоток *RET/PTC* транслокацій у раках ліквідаторів у нашому дослідженні співпадає з результатами інших авторів [240]. За нашими даними, у ліквідаторів, як і в українських пацієнтів умовно-контрольної групи, визначено високу частоту онкогена *RET/PTC3*.

Вперше ми порівняли частоту *RET* транслокацій у раках ЩЗ ліквідаторів зі спорадичними раками дорослих пацієнтів умовно-контрольної групи, які мешкали на незабруднених територіях. У раках ліквідаторів відсоток *RET* транслокацій виявився значно вищим. Між тим, ця різниця для *RET/PTC3* не була статистично вірогідною через недостатню кількість випадків.

Результати нашого дослідження підтверджують роль *RET* транслокацій, а саме *RET/PTC3*, у розвитку пухлин ЩЗ після аварії на ЧАЕС. Високий рівень *RET/PTC3*, визначений у ліквідаторів, вказує на те, що ця ознака не обмежується лише дитячими випадками та раками, що швидко розвиваються.

Raf-кіназа є компонентом $RAS \rightarrow RAF \rightarrow MEK \rightarrow ERK/MAP$ -кіназного сигнального шляху, який відіграє ключову роль у регуляції росту клітин, їх поділу та проліферації. Серед інших форм Raf-кіназ В-тип, або BRAF – це найсильніший активатор низхідного сигнального шляху MAP-кінази. Активація цього шляху призводить до утворення пухлини. Мутації *BRAF* виявлено у різних формах раку людини, надто у меланомах. Найтиповішою *BRAF*-мутацією є T1799A трансверсія в екзоні 15 гена, яка призводить до V600E амінокислотної заміни у білку та подальшої активації кінази. Нещодавні дослідження показали, що *BRAF*-мутація виявляється у ПРЩЗ із частотою від 29 % до 83 % [178]. T1799A *BRAF*-мутації визначаються лише у папілярних

карциномах та анапластичних раках, що походять із ПРЩЗ, і не визначаються ані в нормальній тканині залози, ані у доброякісних пухлинах, ані у ФРЩЗ або МРЩЗ.

Так як мутації *BRAF* відіграють важливу роль у канцерогенезі ПРЩЗ, висловлено припущення про можливе прогностичне значення даної мутації. Namba Н. і співавт. [61] повідомляли про зв'язок мутації *BRAF* із віддаленими метастазами ПРЩЗ. За даними Nikiforova M.N. і співавт. [41], *BRAF*-мутації асоційовано з екстраорганою інвазією та стадією раку. Інші автори описали зв'язок мутації *BRAF* з метастазуванням до лімфатичних вузлів. Натомість в інших дослідженнях зв'язку між мутацією *BRAF* і патогістологічними чинниками високого ризику не виявлено [39]. Не проводилися дослідження з використанням багатомірного аналізу, а також не оцінювалась ймовірність зв'язку *BRAF*-мутації з рецидивом ПРЩЗ.

Існує гіпотеза, що присутність мутації *BRAF*^{T1799A} може впливати на поведінку ПРЩЗ і його клінічні наслідки. Ми виявили взаємозв'язок мутації *BRAF*^{T1799A} із декількома патологічними особливостями високого ризику та рецидивом пухлини. Найчастіше ці мутації виявляли у тих підтипах ПРЩЗ (висококлітинний і класичний), для яких часто характерні екстраоргана інвазія, МЛВ і розповсюдженість пухлинного процесу. Ці дані підтримують ідею про те, що *BRAF*-мутація може відігравати важливу роль у формуванні, прогресії та агресивності відомих класичних підтипів ПРЩЗ високого ризику. За допомогою методу логістичної регресії виявлено незалежний зв'язок *BRAF*-мутації із рецидивом пухлини. Рецидив захворювання у пацієнтів із *BRAF*-мутаціями асоціювався зі втратою чутливості до йоду, обмежуючи таким чином застосування даного методу лікування. Фактично пацієнти із *BRAF*-позитивним ПРЩЗ потребували більш агресивного хірургічного лікування та застосування променевої терапії для лікування рецидивів. Отже, *BRAF*-мутація є генетичним індикатором гіршого прогнозу для ПРЩЗ.

Зазвичай ПРЩЗ (складає понад 80 % випадків злоякісних пухлин органа) розглядається як злоякісна пухлина зі сприятливим прогнозом, проте розвиток

місцевої інвазії за межі капсули залози та віддалені метастази обумовлюють слабку відповідь на радіойодтерапію з подальшою прогресією та підвищенням рівня смертності. Отже, прогностична оцінка ПРЩЗ має велике значення для виявлення пацієнтів із високим ризиком рецидиву з метою застосування більш агресивної терапії та моніторингу. Прогнозування традиційно ґрунтувалося на наявності або відсутності певних клінічних і патогістологічних чинників, таких як вік пацієнта, стать, розмір пухлини та її гістологічний підтип, екстраорганне та метастатичне розповсюдження. Проте ці критерії часто не дають впевненості щодо пухлинної прогресії та рецидиву. Крім цього, патогістологічні критерії зазвичай не визначаються перед операцією і, відповідно, не можуть допомогти у визначенні оптимального обсягу первинного хірургічного втручання.

Визначення *BRAF*-мутації в аспіратах ТАПБ новоутворень ЩЗ дозволяє проводити стратифікацію ризику ПРЩЗ на передопераційному етапі. Отже, характеристика *BRAF*-мутації може сприяти оптимізації як первинного лікування, так і довгострокового спостереження рецидиву захворювання у пацієнтів із ПРЩЗ. Нещодавно отримані результати 15-річного післяопераційного спостереження пацієнтів із *BRAF*-позитивними тиреоїдними карциномами [37] цілком співпадають із нашими даними та підтверджують визначальну роль цієї мутації у негативному прогнозі для хворих на ПРЩЗ.

З огляду на вищенаведене стає очевидним важливість застосування дослідження *BRAF*-мутацій під час ТАПБ кожного випадку РЩЗ у передопераційний період.

У світлі вищенаведених результатів генетичних досліджень постає низка питань, пов'язаних із можливими причинами мутацій (інших, крім іонізуючого опромінення) та терапевтичними можливостями певних груп препаратів, які блокують патогенетичні шляхи розвитку ракової клітини.

Незважаючи на те, що більшість випадків РЩЗ мають сприятливий прогноз, пацієнти з вираженою локальною інвазією та віддаленими метастазами часто не відповідають на стандартну терапію, тому для таких випадків прогноз гірший.

За останні 10 років виявлено генетичну та епігенетичну основу ДРЦЗ із визначеними активуючими мутаціями онкогенів та епігенетичним сайленсингом генів-супресорів пухлини. Зазвичай для ПРЦЗ характерними є транслокації *RET/PTC* і мутації *NTRK* і *BRAF*, тоді як *RAS*-мутації та транслокації *PTEN-PPAR γ -PAX8* є типовими для ФРЦЗ [156]. На додаток, мікроРНК та малі РНК, що не кодують білок, а функціонують як негативні регулятори генів, мають підвищену транскрипційну активність у пухлинах ЦЗ, що дозволяє припустити участь цих молекул у канцерогенезі пухлин ЦЗ [229].

Лікування ПРЦЗ включає проведення тотальної тиреоїдектомії з подальшою терапією радіоактивним йодом і довгостроковою супресією ТТГ [173]. Більшість пацієнтів із ПРЦЗ мають сприятливий прогноз, пролонгація хвороби та рецидиви розвиваються у 20-40 % випадків і можуть обумовлювати гірший прогноз, коли присутні віддалені метастази або виражена місцева інвазія. Крім того, рівень 5-річного виживання для пацієнтів, у яких виявлено віддалені метастази на момент встановлення діагнозу, складає лише 50 %. Несприятливий прогноз зазвичай пов'язано зі зменшенням ефективності радіойодтерапії та відсутністю альтернативної терапії. Тому розуміння специфічних механізмів, залучених у процеси інвазії та метастазування РЦЗ, є ключовим для розробки нового підходу у лікуванні саме таких пацієнтів.

Для пухлин РЦЗ *in vivo* та *in vitro* виявлено зв'язок процесів їх інвазії та метастазування з індукцією ЕМТ [255]. Епітеліальні клітини у процесі ЕМТ втрачають клітинні контакти та набувають міграційного фенотипу. Ген *CDH1* (*16q22.1*) кодує трансмембранний глікопротеїн Е-кадгерину, який відіграє важливу роль у міжклітинній адгезії епітеліальних клітин. Зниження експресії Е-кадгерину є характерною ознакою ЕМТ [263]. Активація сигнальних шляхів внаслідок мутації гена індукує ЕМТ. Дослідження інших авторів показали, що сигнальні шляхи HGF/cMET [170], TGF- β /Smurf1 [273] і MAPK/ERK [177] беруть участь у регуляції ЕМТ. Епігенетичні механізми контролюють ЕМТ шляхом регуляції рівня експресії Е-кадгерину. Виявлено зменшення експресії Е-кадгерину внаслідок гіперметилування промотору його гена у різних

злоякісних пухлинах, у тому числі за наявності лейкемії [89], раку молочної залози [150] та колоректального раку [25].

Внутрішньоклітинне розташування Е-кадгерину має вирішальне значення для його функції та регулюється фосфорилуванням [90]. Активація тирозинкіназ призводить до втрати кадгерин-опосередкованої адгезії клітин шляхом активації ендоцитозу Е-кадгерину. Доведено роль протеїнкінази С у регуляції ендоцитозу та фосфорилування Е-кадгерину. Показано, що в клітинах раку, оброблених флорболовим ефіром, підвищується швидкість ендоцитозу Е-кадгерину, що призводить до зниження рівня його мембранної експресії [227]. Чинник некрозу пухлини α (ЧНП- α), який є медіатором запалення, індукує ЕМТ шляхом протеїнкіназа-залежної активації ЧНП- β [287].

За результатами імуногістохімічних досліджень і ДНК мікрочип-аналізу виявлено значне зменшення експресії Е-кадгерину за РПЦЗ [119]. Аберантне метилювання промотору Е-кадгерину продемонстровано у 23-83 % випадків РПЦЗ [229]. Ці дослідження також показують, що втрата експресії Е-кадгерину відіграє роль у розвитку метастазів РПЦЗ. За результатами наших досліджень, профіль експресії генів клітин інвазійного РПЦЗ відповідає ЕМТ.

Нами проведено імуногістохімічне дослідження експресії мезенхімальних білків у центральних відділах, зонах інвазії, нормальній тканині залози і МЛВ 34 випадків пухлин РПЦЗ. У зонах інвазії РПЦЗ виявлено експресію генів, залучених до ЕМТ. Встановлено вірогідний зв'язок між високим рівнем експресії віментину та інвазією пухлини, багатофокусним ростом і МЛВ.

З огляду на значну різницю у виживанні пацієнтів із ранньою стадією РПЦЗ (5-річне виживання >90 %) і хворих із його інвазійними та метастатичними формами (~ 40 -50 %) РПЦЗ є унікальною моделлю для вивчення біології клітин. У зв'язку з прогностичними відмінностями між цими двома групами пацієнтів і відсутністю ефективного лікування для агресивних випадків, визначення шляхів прогресії РПЦЗ може сприяти розробці нових підходів у лікувальній тактиці. Дане дослідження є першим в об'єктивному

вивченні шляхів прогресії раку ЩЗ з окремим визначенням експресії генів у центральних ділянках пухлин і зонах інвазії ПРЩЗ.

У зонах інвазії ПРЩЗ виявлено експресію генів, залучених до ЕМТ. Зокрема, визначено підвищену експресію генів сигнальних шляхів, які безпосередньо регулюють ЕМТ. Цей висновок узгоджується з результатами досліджень, які в клітинах зон інвазії виявили зниження рівня мРНК білків (Е-кадгерину), що беруть участь у клітинній адгезії [141]. З огляду на ймовірність взаємодії між пухлиною, стромою, імунними клітинами ЩЗ і процесом інвазії у даному дослідженні основну увагу приділено змінам у клітинах ПРЩЗ.

Раніше було виявлено високий рівень експресії мезенхімального маркера в агресивних варіантах ПРЩЗ, у тому числі у випадках високіклітинного та колоноклітинного варіантів ПРЩЗ, а також у випадках анапластичного раку ЩЗ, які можуть розвиватися з ПРЩЗ, що підтверджує асоціацію експресії віментину з клінічно агресивною поведінкою ПРЩЗ [215]. Ми провели окреме визначення експресії генів у центральних ділянках пухлин і зонах інвазії агресивних ПРЩЗ. У зонах інвазії ПРЩЗ виявлено експресію генів, залучених до ЕМТ. Встановлено вірогідний зв'язок між високим рівнем експресії віментину та ознаками екстраорганої інвазії, багатофокусним ростом, наявністю метастазів у лімфовузлах.

Набуття міграційного фенотипу відіграє ключову роль у процесах інвазії та метастазування клітин раку. Зниження експресії Е-кадгерину вважається однією з основних молекулярних подій у процесі інвазії клітин.

Метилування промотору Е-кадгерину частіше виявлялося в пухлинах ПРЩЗ із метастазами на момент операції порівняно з пухлинами без метастазів. Ці дані узгоджуються з результатами інших дослідників, які виявили високу частоту метилування промотору Е-кадгерину у випадках низькодиференційованого метастатичного раку [215]. Наші дані дозволяють припустити, що клітини РЩЗ із високою щільністю метилування та зменшеною експресією Е-кадгерину найбільш здатні до інвазії.

За результатами порівняльного аналізу у первинних пухлинах і відповідних лімфовузлах із метастазами виявлено динамічні зміни статусу метилювання Е-кадгерину та його експресії у процесі метастазування. У значній частині випадків збільшення експресії Е-кадгерину у метастазах порівняно з первинними пухлинами було пов'язано з втратою епігенетичного гальмування. Отже, в метастазах РЦЗ можлива втрата мезенхімального фенотипу та мезенхімально-епітеліальний перехід. Ці дані підтверджують результати досліджень про те, що епігенетична інактивація Е-кадгерину є зворотною і може залежати від мікроекологічних чинників [222]. Доведено роль Е-кадгерину у процесі виживання клітин раку у метастазах. Так, виявлено значну експресію Е-кадгерину в емболах лімфатичних судин хворих на часточковий рак молочної залози [125]. Експресію Е-кадгерину виявлено і у метастазах Е-кадгерін-негативного колоректального раку.

У деяких випадках ПРЦЗ виявлено підвищену експресію Е-кадгерину як у первинних пухлинах, так і в метастазах. Це свідчить, що метастази РЦЗ можуть виникати з клітин, що ніколи не втрачали експресії Е-кадгерину. Доведено роль Е-кадгерину у регуляції колективної міграції клітин раку. На відміну від одноклітинної, у ході колективної міграції клітини раку не втрачають міжклітинних контактів і мігрують групами [152]. Цілком можливо, що наведений механізм метастазування стосується і клітин РЦЗ.

У дослідженні *in vitro* виявлено прямий зв'язок між втратою експресії Е-кадгерину внаслідок метилювання та рухливостю клітин РЦЗ. Тобто, РЦЗ із високою щільністю метилювання та втратою експресії Е-кадгерину характеризується здатністю до метастазування.

Також вивчено взаємозв'язок між активацією онкоген-індукованих сигналів та епігенетичних механізмів у регуляції руху клітин ЦЗ. Активація P13K/AKT і RAS/ERK сигнальних шляхів спричинює міграцію клітин раку незалежно від метилювання та експресії Е-кадгерину. З іншого боку, вплив ЧНП- α на міграцію клітин пов'язано зі зміною внутрішньоклітинної локалізації Е-кадгерину.

Досліджено фармакологічний вплив 5-аза-2'-дезоксцитидину на клітини РЦЗ і не визначено підвищення експресії Е-кадгерину, проте виявлено менше мезенхімальних ознак. Також виявлено антипухлинну ефективність 5-аза-2'-дезоксцитидину у пацієнтів із лейкемією і мієлодиспластичним синдромом, а клінічні випробування даного препарату в лікуванні хворих із метастатичним РЦЗ тривають. Наші дані показали, що Е-кадгерин-позитивні та негативні клітини РЦЗ дають різну відповідь на лікування 5-аза-2'-дезоксцитидином. Можливо, цей препарат може справляти різний ефект на клітини раку, розташовані у первинній пухлині та у метастазах. Отже, експресія Е-кадгерину в клітинах РЦЗ регулюється епігенетичними механізмами. У процесі метастазування виявлено динамічні зміни статусу метилювання промотору Е-кадгерину. Епігенетичні механізми й активація ЧНП- α -індукованих сигналів є незалежними чинниками інвазії клітин РЦЗ, дія яких реалізується шляхом регуляції експресії та внутрішньоклітинної локалізації Е-кадгерину. Механізми регуляції метилювання Е-кадгерину відіграють важливу роль в індукції ЕМТ у первинній пухлині, а також у зміні мезенхімального фенотипу на епітеліальний у метастазах.

Доведено також зв'язок між певними генетичними змінами та агресивною поведінкою РЦЗ [136]. Проте, крім мутацій генів, необхідні вторинні зміни для прогресії пухлин РЦЗ із метастатичним фенотипом. Є свідчення, що віруси можуть брати безпосередню участь у регуляції ЕМТ і процесі метастазування. Було показано, що білок вірусу Епштейна-Барра контролює експресію головного регулятора ЕМТ і процес метастазування через вплив на метастаз-супресор ген *NM23* [88]. Крім того, вірусна інфекція істотно впливає на пухлинне мікросередовище, стимулює ангиогенез і сприяє розвитку метастазів [148]. Є декілька показників можливої ролі вірусів у розвитку РЦЗ. Так, у ПРЦЗ показано активацію вірус-індукованих сигнальних шляхів, таких як Toll-подібні рецептори (TLR) [131]. Також у випадках РЦЗ виявлено парвовірус-В19 [78] і експресію білка вірусу Епштейна-Барра у випадках НРЦЗ [96].

Наразі існує обмежена кількість даних щодо ролі ВПГ у розвитку РЩЗ. З метою визначення прогностичної ролі герпетичної інфекції в канцерогенезі ЩЗ проаналізовано ДНК ВПГ1 і ВПГ2 на гістологічних препаратах хворих із доброякісними та злоякісними пухлинами ЩЗ.

ВПГ виявлено у 39,4 % досліджуваних випадків. ВПГ-позитивні пухлини характеризувалися експресією бета-інтерферону, ядерною експресією транскрипційного чинника NF κ B та активацією Акт. у ВПГ-позитивних пухлинах виявлено ознаки лімфоїдної інфільтрації та онкоцитарної метаплазії. Частота виявлення ВПГ1 була однаковою в доброякісних і злоякісних пухлинах ЩЗ. Виявлено прямий зв'язок між наявністю ВПГ2 у пухлинах ПРЩЗ і у МЛВ. Експресія Nectin-1 виявлялася частіше в пухлинах ЩЗ порівняно з нормальною тканиною залози, надто у випадках ПРЩЗ. Рівень експресії Nectin-1 у клітинних лініях РЩЗ корелював з їх сприйнятливістю до ВПГ. Інгібування P13K/АКТ або MAPK/ERK сигнальних шляхів не впливала на рівень експресії Nectin-1, але спричинювали зниження сприйнятливості клітин РЩЗ до ВПГ. Виникнення ЕМТ корелювало з чутливістю клітин раку до вірусу.

Отже, досліджено можливий зв'язок між ВПГ і туморогенезом ЩЗ. У пухлинах ЩЗ може виявлятися ДНК ВПГ і його білок. Наявність ВПГ пов'язано з активацією вірус-індукованих сигнальних шляхів у клітинах ЩЗ. У пухлинах ЩЗ виявлено високу експресію Nectin-1. Нарешті, показано, що активація мітогенних сигналів та індукція ЕМТ збільшує чутливість клітин ЩЗ до ВПГ. Наявність ВПГ у тканині ЩЗ підтверджено виявленням його капсиду. Крім того, у ВПГ-позитивних пухлинах знайдено характерні морфологічні ознаки хронічного запалення, такі як лімфоцитарна інфільтрація та клітинна оксифілія. Ретроспективний характер цього дослідження обмежено використанням лише парафінових препаратів пухлин ЩЗ, на яких неможливо проводити дослідження інфекції *in vivo*. Виявлено активацію ВПГ-індукованих сигнальних шляхів, що є непрямым підтвердженням наявності ВПГ у тканині щитоподібної залози.

Було показано, що індукцію інтерферону через NFκB сигнальний шлях [209] та активацію P13K/Akt сигналізації [256] пов'язано з герпетичною інфекцією. У нашому дослідженні виявлено кореляцію між наявністю ВПГ й активацією цих сигнальних шляхів у клітинах ЩЗ. Поряд із ВПГ, порушення у генах ЩЗ активують NFκB і Akt сигнальні шляхи. Проте у ВПГ-позитивних пухлинах ЩЗ без альтерації генів та у ВПГ-позитивній нормальній тканині залози виявлено активацію NFκB і підвищену експресію бета-інтерферону. Тобто активація сигналу NFκB у тканині ЩЗ може бути обумовленою інфекцією ВПГ.

Було показано, що експресія вірусних рецепторів є критичним чинником, який обумовлює ефективність проникнення ВПГ у клітину [188]. Існує три класи молекул клітинної поверхні, які визначено як рецептори проникнення для ВПГ-1 і ВПГ-2 [257]. Nectin-1 визначено як головний рецептор для проникнення ВПГ у нейрони та інші клітини [63]. Тому ми дослідили експресію Nectin-1 у доброякісних і злоякісних пухлинах ЩЗ. Виявлено підвищену експресію Nectin-1 у пухлинах ЩЗ порівняно з нормальною тканиною, що пояснює більшу частоту ВПГ у пухлинах залози. Отже, отримані результати підтверджують існуючі дані [189], що рівень експресії Nectin-1 у клітинних лініях РЩЗ корелює з чутливістю клітин до ВПГ.

Частота виявлення ВПГ1 у доброякісних і злоякісних пухлинах ЩЗ була схожою, проте ВПГ2 виявляли головним чином у ПРЩЗ. Ці висновки навели на думку, що ознаки сигнальної трансдукції в клітинах РЩЗ можуть лежати в основі їх чутливості до ВПГ2. Є повідомлення, що реплікація ВПГ2 посилюється шляхом активації RAS/MEK/MAPK/ERK сигнального шляху [114]. Мутація *BRAF* і транслокації *RET/PTC* – добре відомі чинники, що активують MEK/MAPK/ERK сигнальний шлях [103]. У нашому дослідженні ці альтерації генів частіше виявлялися у пухлинах із прихованим ВПГ2, ніж у ВПГ1-позитивних. Також визначено, що активація цього шляху може сприяти підвищенню чутливості клітин РЩЗ до ВПГ2. Цікаво, що дія фармакологічних інгібіторів MAPK/ERK або P13K/Akt сигнальних шляхів зменшувала чутливість

клітин раку до ВПГ без помітного впливу на експресію Nectin-1. Схоже, що і експресія Nectin-1, і активація сигнальних шляхів впливають на чутливість клітин пухлин ЦЗ до ВПГ.

Виявлено кореляцію між ВПГ2 і метастазами ПРЦЗ. Відомо, що ЕМТ – молекулярний механізм, який сприяє розвитку метастазів. Недавні дослідження показали, що ЕМТ також є важливим чинником підвищення чутливості клітин раку до вірусів [92]. Ми виявили підвищення сприйнятливості до ВПГ у клітин РЦЗ із мезенхімальними ознаками. Також показано, що індукція ЕМТ в епітеліальних клітинах раку призводить до різкого збільшення їх чутливості до ВПГ. Ці результати узгоджуються з даними інших дослідників, які у клітинах із міграційними та інвазійними властивостями виявили високий рівень експресії Nectin-1 і підвищену чутливість до герпетичної інфекції порівняно з клітинами, що не мігрують [91].

Метастази РЦЗ є основною причиною захворюваності та смертності у хворих на дану патологію. Нові підходи в лікуванні РЦЗ включають розробку цільової та вірус-онколітичної терапії. Нещодавно показано, що метастази РЦЗ характеризуються активацією MAPK/ERK і P13K/Akt сигналів. Клінічні випробування лікування РЦЗ інгібітором тирозинкінази, який гальмує активацію ERK сигналу в метастатичних клітинах, тривають. Залежність реплікації ВПГ2 від активації RAS/ERK стала підґрунтям для розробки ВПГ2-онколітичної терапії, яка продемонструвала високу ефективність проти клітин раку підшлункової залози з активованим RAS/ERK сигнальним шляхом. На моделі тварин дія такої терапії дозволила знищити пухлину моделі раку підшлункової залози людини і цілком запобігти розвитку місцевих метастазів. Показано перспективність застосування онколітичних вірусів у лікуванні анапластичного раку ЦЗ [206]. Наші результати свідчать про можливу ефективність онколітичного ВПГ2 для лікування метастатичного ПРЦЗ.

Чутливість клітин пухлин ЦЗ до ВПГ збільшується шляхом підвищення експресії вірусного рецептора Nectin-1, активації мітогенних сигналів та індукції ЕМТ у метастатичних РЦЗ.

Отже, РЩЗ фолікулярного походження має унікальні властивості, які роблять цей рак прикладом для вивчення розвитку та прогресії злоякісних пухлин. Описано більшість пухлинних ознак для найбільш розповсюдженого папілярного РЩЗ. Наразі стає реальним розуміння основних етапів канцерогенезу ЩЗ, що вимагає подальших досліджень. Наслідком цього, безумовно, стане розробка нових підходів у лікуванні РЩЗ.

ВИСНОВКИ

У дисертації наведено теоретичне та клінічне вирішення проблеми діагностики пухлин щитоподібної залози на підставі вивчення механізмів канцерогенезу та визначення основних прогностичних чинників, що дало можливість оптимізувати тактику лікування пацієнтів із вузловими новоутвореннями.

1. Вперше шляхом комп'ютерного морфометричного аналізу зображень розрізнили клітини фолікулярної аденоми від фолікулярного та папілярного РЩЗ. Чутливість методу для діагностики злоякісного процесу склала 95,3 %, діагностична ефективність для діагностики типу пухлини – 86,6 %. ФПНПМ можуть бути початковим етапом у розвитку злоякісних пухлин ЩЗ, у них виявлено аномалії, характерні як для фолікулярного, так і для папілярного раку (мутації *N2-RAS* визначено у 33,3 % випадків, експресію RET-білка – у 45,2 %).
2. Найбільшу частку у групі високого ризику складає солідний і висококлітинний варіанти ПРЩЗ – 72,0 % і 29,5 % відповідно. Визначення гістологічного варіанту ПРЩЗ має важливе значення для індивідуального прогнозу та вибору тактики моніторингу.
3. Кістозний варіант ПРЩЗ характеризується у 2,6 разу більшою, ніж ПРЩЗ без кістозної дегенерації частотою метастазування, на підставі чого слід розширювати обсяг дисекції під час хірургічного лікування ПРЩЗ з ознаками кістозної дегенерації.
4. Інвазія у ПЩЗ за ПРЩЗ виявляється у 2,2 % випадків та асоціюється з ознаками екстраорганної інвазії та метастазуванням у регіонарні лімфовузли. В усіх випадках виявлення екстраорганної інвазії РЩЗ необхідно видаляти прилеглу до пухлини прищитоподібну залозу, забезпечивши перед цим збереженість і життєздатність решти. Такий підхід відповідає вимогам онкологічної радикальності та не спричинює розвитку післяопераційного гіпопаратиреозу.

5. Частота метастазування ПРЩЗ у лімфовузли ший не залежить від локалізації пухлини у межах частки ЩЗ. Висока частота метастатичного ураження лімфатичних вузлів центрального колектора (28,3 %), переважно невеликий діаметр метастазів (59,2 % випадків ≤ 3 мм), що не дозволяє виявити їх макроскопічно під час операції, обґрунтовують доцільність виконання рутинної центральної дисекції ший за ПРЩЗ.
6. Метод комбінованого застосування імуноцитохімічного дослідження НВМЕ-1, ТПО та цитохімічного дослідження ДАП IV має високу чутливість (92,0 %) для виявлення ПРЩЗ і диференціювання злоякісних і доброякісних пухлин ЩЗ. Застосування МоАт 47 у групі сумнівних висновків ТАПБ вузлів ЩЗ у дітей дозволяє виявити доброякісні пухлини, уникнути неадекватних хірургічних втручань і значно підвищити чутливість і специфічність стандартного цитологічного дослідження.
7. Наявність *BRAF*-мутацій асоційовано з чинниками несприятливого прогнозу за ПРЩЗ. Доведено можливість виділення ДНК та оцінки наявності *BRAF*-мутацій на забарвлених аспіратах ТАПБ вузлів ЩЗ. Виявлення даних мутацій має обмежене значення для діагностики злоякісного процесу у випадках із сумнівними висновками ТАПБ, а у випадках злоякісних висновків ТАПБ може бути корисним для передопераційного визначення пухлин із високим ризиком екстраорганної інвазії та наявності метастазів у лімфовузлах.
8. Встановлено надмірну активацію Akt у зонах інвазії РЩЗ, її різну субклітинну локалізацію за ПРЩЗ і ФРЩЗ, а також асоціацію активації ядерної Akt з інвазією клітин РЩЗ *in vitro*.
9. Доведено суттєвий вплив радіаційного опромінення внаслідок аварії на ЧАЕС на розвиток тиреоїдного раку не лише серед постраждалих дітей, але й серед опромінених дорослих, але кореляції між *RET/PTC*-транслокаціями, статтю пацієнта, стадією процесу та віком у пацієнтів не визначено.

10. Встановлено роль ЕМТ у процесі інвазії та метастазування РЩЗ. У зонах інвазії ПРЩЗ виявлено експресію генів, залучених до ЕМТ. Встановлено вірогідний зв'язок між високим рівнем експресії віментину та ознаками екстраорганної інвазії, багатофокусним ростом, наявністю метастазів у лімфовузлах. Доведено роль метилювання Е-кадгерину в індукції ЕМТ, а також у зміні мезенхімального фенотипу.
11. Доведено, що ЩЗ є органом-мішенню для вірусу простого герпесу. Встановлено зв'язок останнього з туморогенезом ЩЗ. Показано, що збільшення експресії Nectin-1, активація мітогенних сигналів та індукція ЕМТ підвищують чутливість клітин пухлин ЩЗ до вірусу простого герпесу.

ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

1. Визначення основних прогностичних чинників пухлин ЩЗ дозволяє застосовувати у клінічній практиці диференційований підхід до діагностики та лікування вузлових новоутворень ЩЗ.
2. Врахування встановлених клініко-морфологічних особливостей форм РЩЗ, їх зв'язок із патогенетичними чинниками дозволить підвищити ефективність діагностики та лікування пацієнтів із РЩЗ.
3. Той факт, що ФПНПМ є початковим етапом у розвитку фолікулярного та папілярного РЩЗ, є підґрунтям для впровадження у клінічну практику морфологічних критеріїв діагностики таких пухлин, що дозволить уникати неадекватних хірургічних втручань з приводу доброякісних утворень залози.
4. Застосування маркерів малігнізації під час цитологічного аналізу аспіратів ТАПБ вузлів ЩЗ підвищує ефективність методу та дозволяє уникати хибно-позитивних і хибно-негативних результатів.
5. В усіх випадках виявлення екстраорганної інвазії РЩЗ доцільно видаляти прилеглу до пухлини прищитоподібну залозу, забезпечивши перед цим збереженість і життєздатність решти. Такий підхід відповідає вимогам онкологічної радикальності та не спричинює розвитку післяопераційного гіпопаратиреозу.
6. Виявлення *BRAF*-мутацій можливо на стандартно забарвлених цитологічних препаратах ТАПБ вузлів ЩЗ і має обмежене значення для діагностики злоякісного процесу у випадках сумнівних висновків, проте може бути корисним для передопераційного визначення пухлин із високим ризиком наявності екстраорганної інвазії та метастазів у лімфовузлах.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Валдина Е.А. Заболевания щитовидной железы [Текст] / Е.А. Валдина. – СПб.: Питер, 2001. – 416 с.
2. Ванушко В.Э. Клинические рекомендации по хирургическому лечению узлового эутиреоидного зоба [Текст] / В.Э. Ванушко, Н.С. Кузнецов // III Всероссийский тиреологический конгресс: Диагностика и лечение узлового зоба : тезисы докладов. – М., 2004. – С. 43.
3. Ветшев П.С. Аденомы щитовидной железы [Текст] / П.С. Ветшев, К.Е. Чилингари, Д.И. Габаидзе // Хирургия. – 2005. – № 7. – С. 4-8.
4. Гринёва Е.Н. Фолликулярная опухоль щитовидной железы. Возможные критерии злокачественности [Текст] / Е.Н. Гринёва, У.А. Цой, Т.В. Малахова // Амбулаторная хирургия. – 2001. – № 4. – С. 19-21.
5. Гульчий Н.В. Рак щитовидной железы и аутоиммунный тиреоидит. Клинико-морфологические аспекты объединённой патологии [Текст] / Н.В. Гульчий, И.Л. Аветисян, А.П. Степаненко // Одесский Мед. Журнал. – 2001. – № 4. – С. 86-88, 109-110.
6. Диагностика узловых образований щитовидной железы с использованием современных методов исследования [Текст] / М.М. Абдулхалимова, В.В. Митьков, В.О. Бондаренко [и др.] // Ультразвуковая диагностика. – 2002. – № 2. – С. 7-15.
7. Зубарева И.А. Значение тонкоигольной пункционной биопсии под ультразвуковым контролем в диагностике рака щитовидной железы у жителей юго-западных районов брянской области [Текст] / И.А. Зубарева, И.В. Каревская // V съезд Российской ассоциации специалистов ультразвуковой диагностики в медицине: тезисы докладов. – М., 2007. – С. 172.
8. Использование автоматизированного клинико-лабораторного скрининга для выявления группы онкологического риска и ранних стадий

- онкологического процесса: Методические рекомендации [Текст] / В.В. Старинский, Е.П. Сотникова, А.П. Кашулина [и др.]. – М., 1995. – 11 с.
9. Петров В.Г. К вопросу о быстром росте узла щитовидной железы, как признаку его принадлежности к онкопатологии [Текст] / В.Г. Петров, А.А. Нелаева, Е.А. Александрова // III Всероссийский тиреоидологический конгресс: Диагностика и лечение узлового зоба: тезисы докладов. – М., 2004. – С. 234.
 10. Подвязников С.О. Рак щитовидной железы. Клиника, диагностика, лечение [Текст] / С.О. Подвязников // Современная онкология. – 1999. – Т.1, № 2. – С. 50-54.
 11. Распространённость тиреоидной патологии в старшей возрастной группе в регионе лёгкого йодного дефицита [Текст] / С.М. Захарова, В.В. Фадеев, А.М. Артёмов [и др.] // III Всероссийский тиреоидологический конгресс: Диагностика и лечение узлового зоба: тезисы докладов. – М., 2004. – С. 138.
 12. Сенча А.Н. Комплексная ультразвуковая диагностика аденом [Текст] / А.Н. Сенча // V съезд Российской ассоциации специалистов ультразвуковой диагностики в медицине: тезисы докладов. – М., 2007. – С. 185.
 13. Современные подходы к диагностике и хирургическому лечению рака щитовидной железы [Текст] / И.В. Решетов, В.О. Ольшанский, А.К. Голубцов [и др.] // III Всероссийский тиреоидологический конгресс: Диагностика и лечение узлового зоба: тезисы докладов. – М., 2004. – С. 63.
 14. Трудности диагностики рака щитовидной железы [Текст] / Н.П. Володченко, Е.А. Шевченко, Т.И. Коротчик [и др.] // XI Российский симпозиум по хирургической эндокринологии: Современные аспекты хирургической эндокринологии: тезисы докладов. – Санкт-Петербург, 2003. – С. 79-81.
 15. Фадеев В.В. Узловые образования щитовидной железы.

Международные алгоритмы и отечественная клиническая практика
[Текст] / В.В. Фадеев // Лечащий врач. – 2002. – № 7. – С. 12-16.

16. Фолликулярная аденома щитовидной железы [Текст] / В.Г. Петров, А.А. Нелаева, С.А. Якимов [и др.] // III Всероссийский тиреоидологический конгресс: Диагностика и лечение узлового зоба: тезисы докладов. – М., 2004. – С. 232.
17. Харченко В.П. Диагностика рака щитовидной железы по данным ультразвукового исследования [Текст] / В.П. Харченко, П.М. Котляров, А.Р. Зубарев. – М., 2002. – 72 с.
18. Харченко В.П. Ультразвуковая диагностика заболеваний щитовидной железы [Текст] / В.П. Харченко, П.М. Котляров, Л.И. Сметанина. – М.: Стром, 1999. – 115 с.
19. AACE/AAES medical/surgical guidelines for clinical practice: management of thyroid carcinoma [Text] / American Association of Clinical Endocrinologists // Endocr. Pract. – 2001. – V. 7, № 3. – P. 202-220.
20. "Suspicious" thyroid cytologic findings: outcome in patients without immediate surgical treatment [Text] / E. Cersosimo, H. Gharib, V.J. Suman [et al.] // Mayo Clin. Proc. – 1993. – V. 68, № 4. – P. 343-348.
21. A diagnostic predictor model for indeterminate or suspicious thyroid FNA samples [Text] / N.D. Banks, J. Kowalski, H.L. Tsai [et al.] // Thyroid. – 2008. – V. 18. – P. 933-941.
22. A HBME-1 expression in follicular tumor of the thyroid: an investigation of whether it can be used as a marker to diagnose follicular carcinoma [Text] / Y. Ito, H. Yoshida, C. Tomoda [et al.] // Anticancer Res. – 2005. – V. 25. – P. 179-182.
23. A prospective study of thyroid nodular disease in children and adolescents in western Poland from 1996 to 2000 and the incidence of thyroid carcinoma relative to iodine deficiency and the Chernobyl disaster [Text] / M. Niedziela, E. Korman, D. Breborowicz [et al.] // Pediatr. Blood Cancer. – 2004. – V. 42, № 1. – P. 84-92.

24. A time trend analysis of papillary and follicular cancers as a function of tumour size: A study of data from six cancer registries in France (1983– 2000) [Text] / M. Colonna, A.V. Guizard, C. Schwartz [et al.] // Eur. J. Cancer. – 2007. – V. 43. – P. 891–900.
25. ACpG island hyper-methylation profile of primary colorectal carcinomas and colon cancer cell lines [Text] / G.E. Lind, L. Thorstensen, T. Lovig [et al.] // Mol. Cancer. – 2004. – V. 3. – P. 28.
26. Activated ras oncogenes in human thyroid cancers [Text] / N.R. Lemoine, E.S. Mayall, S. Fiona [et al.] // Cancer Res. – 1988. – V. 48, № 16. – P. 4459-4463.
27. Akslen L. A. Prognostic importance of histologic grading in papillary thyroid carcinoma [Text] / L. A. Akslen // Cancer. – 1993. – V. 72, № 9. – P. 2680-2685.
28. Akt activation and localization correlate with tumor invasion and oncogene expression in thyroid cancer [Text] / V. Vasko, M. Saji, E. Hardy [et al.] // J. Mol. Genet. – 2004. – V. 41. – P. 161-170.
29. Akt1 contains a functional leucine-rich nuclear export sequence [Text] / M. Saji, V. Vasko, F. Kada [et al.] // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2005. – V. 332. – P. 167-173.
30. Aratake Y. Dipeptidyl aminopeptidase IV staining of cytologic preparations to distinguish benign from malignant thyroid diseases [Text] / Y. Aratake // Am. J. Clin. Pathol. – 1991. – V. 96, №3. – P. 306-310.
31. Assessment of RET/PTC oncogene activation and clonality in thyroid nodules with incomplete morphological evidence of papillary carcinoma: a search for the early precursors of papillary cancer [Text] / A. Fusco, G. Chiappetta, P. Hui [et al.] // Am. J. Pathol. – 2002. – V. 160. – P. 2157–2167.
32. Baloch Z.W. Encapsulated follicular variant of papillary thyroid carcinoma with bone metastases [Text] / Z. W. Baloch, V. A. LiVolsi // Modern Pathology – 2000. – V. 13 – P. 861–865.
33. Baloch Z.W. Follicular-patterned lesions of the thyroid: the bane of the pathologist [Text] / Z.W. Baloch, Livolsi V.A. // Am. J. Clin. Pathol. – 2002. –

- V. 117, № 1. – P. 143-150.
34. Bartolazzi A. Application of an immunodiagnostic method for improving preoperative diagnosis of nodular thyroid lesions [Text] / A. Bartolazzi, A. Gasbarri, M. Paotti // *Lancet*. – 2001. – V. 357, № 9269 – P. 1644-1650.
 35. Bertheau, P., et al., NM23 protein in neoplastic and nonneoplastic thyroid tissues [Text] // *Am. J. Pathol.* – 1994. – V. 145, № 1. – P. 26-32.
 36. B-Raf acts via the ROCKII/LIMK/cofilin pathway to maintain actin stress fibers in fibroblasts [Text] / C.A. Pritchard, L. Hayes, L. Wojnowski [et al.] // *Mol. Cell. Biol.* – 2004. – V. 24. – P. 5937-5952.
 37. BRAF mutation in papillary thyroid carcinoma [Text] / Y. Cohen, M. Xing, E. Mambo [et al.] // *J. Natl. Cancer. Inst.* – 2003. – V. 95. – P. 625-627.
 38. BRAF mutation predicts a poorer clinical prognosis for papillary thyroid cancer [Text] / M. Xing, W.H. Westra, R.P. Tufano [et al.] // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 2005. – V. 90. – P. 6373-6379.
 39. BRAF mutations and RET/PTC rearrangements are alternative events in the etiopathogenesis of PTC [Text] / P. Soares, V. Trovisco, A.S. Rocha [et al.] // *Oncogene*. – 2003. – V. 22. – P. 4578-4580.
 40. BRAF mutations in anaplastic thyroid carcinoma: implications for tumor origin, diagnosis and treatment [Text] / S. Begum, E. Rosenbaum, R. Henrique [et al.] // *Mod. Pathol.* – 2004. – V. 17. – P. 1359-1363.
 41. BRAF mutations in thyroid tumors are restricted to papillary carcinomas and anaplastic or poorly differentiated carcinomas arising from papillary carcinomas [Text] / M.N. Nikiforova, E.T. Kimura, M. Gandhi [et al.] // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 2003. – V. 88. – P. 5399-5404.
 42. BRAF T1796A transversion mutation in various thyroid neoplasms [Text] / M. Xing, V. Vasko, G. Tallini [et al.] // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 2004. – V. 89. – P. 1365-1368.
 43. Bramley M.D. Papillary microcarcinoma of the thyroid gland [Text] / M. D. Bramley, B.J. Harrison // *Br. J. Surg* – 1996 – V. 83 – P. 1674-1683.
 44. Brazil D. P. Advances in protein kinase B signalling: AKTion on multiple

- fronts [Text] / D. P. Brazil, Z. Z. Yang, B.A. Hemmings // Trends. Biochem. Sci. – 2004 – V. 29 – P. 233-242.
45. Burgess J.R. Incidence trends for papillary thyroid carcinoma and their correlation with thyroid surgery and thyroid fine-needle aspirate cytology [Text] / J.R. Burgess, P. Tucker // Thyroid. – 2006. – V. 16. – P. 47-53.
 46. Cady B. An expanded view of risk-group definition in differentiated thyroid carcinoma [Text] / B. Cady, R. Rossi // Surgery. – 1988. – V. 104. – P. 947-953.
 47. Carcangiu M. L. Diffuse sclerosing variant of papillary thyroid carcinoma. Clinicopathologic study of 15 cases [Text] / M. L. Carcangiu, S. Bianchi // Am. J. Surg. Pathol. – 1989. – V. 13, № 12. – P. 1041-1049.
 48. Carcangiu M.L. Thyroid gland [Text] / M.L. Carcangiu, R.A. DeLellis // Andersons pathology: 10th ed. / Editors: I. Damjanov, J. Linder. – St. Louis: Mosby; 1996. – P. 1955-1973.
 49. Carcangiu M.L. Minimally invasive follicular carcinoma [Text] / M.L. Carcangiu // Endocr. Pathol. – 1997. – V. 8, № 3. – P. 231-234.
 50. Carcangiu M.L. Papillary thyroid carcinoma: a study of its many morphologic expressions and clinical correlates [Text] / M.L. Carcangiu, G. Zampi, J. Rosai // Pathol. Annu. – 1985. – V. 20. – P. 1-44.
 51. CD97: a dedifferentiation marker in human thyroid carcinomas [Text] / G. Aust, W. Eichler, S. Laue [et al.] // Cancer Res. – 1997. – V. 57, № 9 – P. 1798-1806.
 52. Chan J.K.C. Strict criteria should be applied in the diagnosis of encapsulated follicular variant of papillary thyroid carcinoma [Text] / J.K.C. Chan // Am. J. Clin. Pathol. – 2002. – V. 117 – P. 16–18.
 53. Chan J.K.C. The grooved nucleus. A useful criterion of papillary carcinoma of the thyroid [Text] / J.K.C. Chan, D. Saw // Am. J. Surg. Pathol. – 1986. – V. 10. – P. 672-679.
 54. Characterization of thyroid ‘follicular neoplasms’ in fine-needle aspiration cytological specimens using a panel of immunohistochemical markers: a proposal for clinical application [Text] / E. Saggiorato, R. De Pompa, M.

- Volante [et al.] // *Endocr. Relat. Cancer.* – 2005. – V. 12. – P. 305- 317.
55. Chen K.T.K. Fine-needle aspiration cytology of papillary Hurthle-cell tumors of thyroid: a report of three cases [Text] / K.T.K. Chen // *Diagn. Cytopathol.* – 1991. – № 7. – P. 53-56.
 56. Chen K.T.K. Follicular variant of thyroid papillary carcinoma: a clinicopathologic study of six cases [Text] / K.T.K. Chen, J. Rosai // *Am. J. Surg. Pathol.* – 1977. – № 1. – P. 123-130.
 57. Chen K.T.K. Minute [< 1 mm] occult papillary thyroid carcinoma with metastasis [Text] / K.T.K. Chen // *Am. J. Clin. Pathol.* – 1989. – № 91. – P. 746.
 58. Ciampolillo A. The IGF-I/IGF-I receptor pathway: Implications in the Pathophysiology of Thyroid Cancer [Text] / A. Ciampolillo, C. De Tullio, F. Giorgino // *Curr. Med. Chem.* – 2005. – V. 12. – P. 2881-2891.
 59. Clinical analysis of thyroid cancer in adult patients exposed to ionizing radiation due to the chernobyl nuclear accident: 5–year comparative investigations based on the results of surgical treatment [Text] / S. Cherenko, A. Larin, M. Gorobeyko M, R. Sichinava // *World J. Surg.* – 2004. – № 28. – P. 1071-1074.
 60. Clinical comparison of whole-body radioiodine scan and serum thyroglobulin after stimulation with recombinant human thyrotropin [Text] / B.R. Haugen, E.C. Ridgway, B.A. McLaughlin, M.T. McDermott // *Thyroid.* – 2002. – V. 12, № 1. – P. 37-43.
 61. Clinical Implication of hot spot BRAF mutation, V599E, in papillary thyroid cancers [Text] / H. Namba, M. Nakashima, T. Hayashi [et al.] // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 2003. – V. 88. – P. 4393-4397.
 62. Coatesworth A.P. Cervical metastasis in papillary carcinoma of the thyroid: a histopathological study [Text] / A.P. Coatesworth, K. MacLennan // *Int. J. Clin. Pract.* – 2002. – V. 26. – P. 241-242.
 63. Comparative usage of herpesvirus entry mediator A and nectin-1 by laboratory strains and clinical isolates of herpes simplex virus [Text] / C. Krummenacher, F. Baribaud, M. Ponce de Leon [et al.] // *Virology.* – 2004. – V. 322. – P. 286-

- 299.
64. Comparison of benign and malignant follicular thyroid tumours by comparative genomic hybridization [Text] / S. Hemmer, V.W. Wasenius, S. Knuutila // Br. J. Cancer. – 1998. – V. 78. – P. 1012-1017.
 65. Complex regulation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27kip1 in thyroid cancer cells by the PI3K/AKT pathway: regulation of p27kip1 expression and localization [Text] / M.L. Motti, D. Califano, G. Troncone [et al.] // Am. J. Pathol. – 2005. – V. 166. – P. 737-749.
 66. Contribution of p53 gene alterations to development of metastatic forms of follicular thyroid carcinoma [Text] / Z. Sapi, G. Lakacs, M. Sztan [et al.] // Diagn. Mol. Pathol. – 1995. – V. 4. – P. 256-260.
 67. Cyclin D1 protein expression predicts metastatic behavior in thyroid papillary microcarcinomas but is not associated with gene amplification [Text] / M.L.C. Khoo, S. Ezzat, J.L. Freeman, S.L. Asa // J. Clin. Endocrinol. Metab. – 2002. – V. 87. – P. 1810-1813.
 68. Cyclooxygenase-2 expression in thyroid nodules [Text] / M.C. Specht, O.N. Tucker, M. Hovever [et al.] // J. Clin. Endocrinol. Metab. – 2002. – V. 87, № 1. – P. 358-363.
 69. Cytokeratin 19 immunoreactivity in the diagnosis of papillary thyroid carcinoma: a note of caution [Text] / S. Sahoo, S.A. Hoda, J. Rosai [et al.] // Am. J. Clin. Pathol. – 2001. – V. 11, № 5. – P. 696-702.
 70. Cytopathologic analysis of thyroid lesions in the pediatric population [Text] / G.A. Hosler, I. Clark, M.F. Zakowski [et al.] // Diagn. Cytopathol. – 2006. – V. 34. – P. 101-105.
 71. De Lellis R.A. World Health Organization Classification of tumours. Pathology and genetics of tumours of endocrine organs [Text] / Eds.: R.A. De Lellis, R.V. Lloyd, P.U. Heitz. – Lyon : IARC Press, 2004. – 320 p.
 72. De Micco C. Interest of thyroid peroxidase immunocytochemistry in the preoperative fine needle aspiration diagnosis of follicular variant of thyroid papillary cancers [Text] / C. De Micco, V. Vasko, J.F. Henry // Surgery. – 1999.

- V. 126. – P. 1200–1204.
73. De Micco C. Malignancy markers in the cytological diagnosis of thyroid nodules. Thyroid peroxidase [Text] / C. De Micco, P. Zoro, J.-F. Henry // *Annales de Pathologie*. – 1994. – V. 14, № 6. – P. 378-383.
 74. De Micco C. The value of thyroid peroxidase immunohistochemistry for preoperative fine-needle aspiration diagnosis of the follicular variant of papillary thyroid cancer [Text] / C. De Micco, V. Vasko, J.F. Henry // *Surgery*. – 1999. – V. 126, № 6. – P. 1200-1204.
 75. Deaths due to differentiated thyroid cancer: a 46-year perspective [Text] / J.K. Harness, M. McLeod, N.W. Thompson [et al.] // *World J. Surg.* – 1988. – V.12. – P. 623-629.
 76. Detection of herpes virus DNA in post-operative thyroid tissue specimens of patients with autoimmune thyroid disease [Text] / D. Thomas, V. Liakos, V. Michou [et al.] // *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes*. – 2008. – V. 116. – P. 35-39.
 77. Detection of high mobility group I HMGI(Y) protein in the diagnosis of thyroid tumors: HMGI(Y) expression represents a potential diagnostic indicator of carcinoma [Text] / G. Chiappetta, G. Tallini, M.C. De Biasio [et al.] // *Cancer Res.* – 1998. – V. 58, № 18. – P. 4193-4198.
 78. Detection of human parvovirus B19 in papillary thyroid carcinoma [Text] / J.H. Wang, W.P. Zhang, H.X. Liu [et al.] // *Br. J. Cancer*. – 2008. – V. 98. – P. 611-618.
 79. Detection of underlying characteristics of nuclear chromatin patterns of thyroid tumor cells using texture and factor analyses [Text] / S. Murata, K. Mochizuki, T. Nakazawa [et al.] // *Cytometry*. – 2002. – V. 49. – P. 91-95.
 80. Diagnosis accuracy and use of aspiration biopsy in the management of thyroid nodules [Text] / C.E. Ramacciotti, H.T. Pretorius, E.W. Chu [et al.] // *Arch. Intern. Med.* – 1984. – V. 144. – P. 1169-1173.
 81. Diagnosis of ‘follicular neoplasm’: a gray zone in thyroid fine-needle aspiration cytology [Text] / Z. W. Baloch, S. Fleisher, V. A. LiVolsi [et al.] // *Diagn Cytopathol.* – 2002. – V. 26. – P. 41-44.

82. Diagnostic usefulness of dipeptidyl aminopeptidase IV monoclonal antibody in paraffin-embedded thyroid follicular tumours [Text] / T. Kotani, Y. Asada, Y. Aratake [et al.] // J. Pathol. – 1992. – V. 168, № 1. – P. 41-45.
83. Diffuse follicular variant of papillary carcinoma of the thyroid [Text] / Y. Mizukami, A. Nonomura, T. Michigishi [et al.] // Histopathology. – 1995. – V. 27. – P. 575-577.
84. Dipeptidyl aminopeptidase IV in the cytologic diagnosis of thyroid carcinoma [Text] / R. Gonzalez-Campora, D. Galera Ruiz, J.R. Armas Padron [et al.] // Diagn. Cytopathol. – 1998. – V. 19, № 1 – P. 4-8.
85. Distant metastases in differentiated thyroid carcinoma: a multivariate analysis of prognostic variables [Text] / J.J. Ruegemer, I.D. Hay, E.J. Bergstralh [et al.] // J. Clin. Endocrinol. Metab. – 1988. – V. 67, № 3. – P. 501-508.
86. Distant metastases in papillary thyroid cancer. A review of 91 patients [Text] / J. Hoie, A.E. Stenwig, G. Kullmann, M. Lindegaard // Cancer. – 1988. – V. 61, № 1. – P. 1-6.
87. Dose-dependent generation of RET/PTC in human thyroid cells after in vitro exposure to gamma-radiation: a model of carcinogenic chromosomal rearrangement induced by ionizing radiation [Text] / C.M. Caudill, Z. Zhu, R. Ciampi [et al.] // J. Clin. Endocrinol. Metab. – 2005. – V. 90. – P. 2364-2369.
88. EBNA3C can modulate the activities of the transcription factor Necdin in association with metastasis suppressor protein Nm23-H1 [Text] / R. Kaul, M. Murakami, K. Lan [et al.] // J. Virol. – 2009. – V. 83. – P. 4871-4883.
89. E-cadherin expression is silenced by 5' CpG island methylation in acute leukemia [Text] / P.G. Corn, B.D. Smith, E.S. Ruckdeschel [et al.] // Clin. Cancer. Res. – 2000. – V. 6. – P. 4243-4248.
90. E-cadherin phosphorylation by protein kinase D1/protein kinase C{mu} is associated with altered cellular aggregation and motility in prostate cancer [Text] / M. Jaggi, P.S. Rao, D.J. Smith [et al.] // Cancer Res. – 2005. – V. 65. – P. 483-492.
91. Enhanced nectin-1 expression and herpes oncolytic sensitivity in highly

- migratory and invasive carcinoma [Text] / Z. Yu, M.K. Chan, P. Oc [et al.] // Clin. Cancer Res. – 2005. – V. 11. – P. 4889-4897.
92. Epithelial phenotype confers resistance of ovarian cancer cells to oncolytic adenoviruses [Text] / R. Strauss, P. Sova, Y. Liu [et al.] // Cancer Res. – 2009. – V. 69. – P. 5115-5125.
 93. European consensus for the management of patients with differentiated thyroid carcinoma of the follicular epithelium [Text] / F. Pacini, M. Schlumberger, H. Dralle [et al.] // Eur. J. Endocrinol. – 2006. – V. 154, № 6. – P. 787-803.
 94. Evaluation of the monoclonal antibody anti-thyroperoxidase MoAb47 in the diagnostic decision of cold thyroid nodules by fine-needle aspiration [Text] / M.J. Faroux, S. Theobald, M. Pluot [et al.] // Pathol. Res. Pract. – 1997. – V. 1931. – P. 705-712.
 95. Expression of CD30 ligand and CD30 receptor in normal thyroid and benign and malignant thyroid nodules [Text] / M. Trovato, D. Villari, L. Batolone [et al.] // Thyroid. – 2001. – V. 11, № 7. – P. 621-628.
 96. Expression of Epstein-Barr virus in thyroid carcinoma correlates with tumor progression [Text] / M. Shimakage, K. Kawahara, T. Sasagawa [et al.] // Hum. Pathol. – 2003. – V. 34. – P. 1170-1177.
 97. Expression of PAX8-PPAR gamma 1 rearrangements in both follicular thyroid carcinomas and adenomas [Text] / A.R. Marques, C. Espadinha, A.L. Catarino [et al.] // J. Clin. Endocrinol. Metab. – 2002. – V. 87, № 8. – P. 3947-3952.
 98. Expression of proliferating cell nuclear antigen in follicular thyroid tumors: correlation with clinicopathological findings [Text] / V. Vassko, S. Garcia, J.F. Henry, C. De Micco // Oncol. Rep. – 1999. – V. 6. – P. 359-364.
 99. Expression of the RET protooncogene in papillary thyroid carcinoma and its correlation with clinical outcome [Text] / P. Kjellman, D.L. Learoyd, M. Messina [et al.] // Br. J. Surg. – 2001. – V. 88. – P. 557-563.
 100. Expression profiling reveals a distinct transcription signature in follicular thyroid carcinomas with a PAX8-PPAR(gamma) fusion oncogene [Text] / W.O. Lui, T. Foukakis, J. Liden [et al.] // Oncogene. – 2005. – V. 24. – P. 1467-1476.

101. Fagin J.A. Branded from the start-distinct oncogenic initiating events may determine tumor fate in the thyroid: minireview [Text] / J.A. Fagin // *Mol. Endocrinol.* – 2002. – V. 16. – P. 903-911.
102. Fagin J.A. Challenging dogma in thyroid cancer molecular genetics – role of RET/PTC and BRAF in tumor initiation [Text] / J.A. Fagin // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 2004. – V. 89 – P. 4264-4266.
103. Fagin J.A. Genetics of papillary thyroid cancer initiation: implications for therapy [Text] / J.A. Fagin // *Trans. Am. Clin. Climatol. Assoc.* – 2005. – V. 116. – P. 259-269.
104. Fagin J.A. Perspective: lessons learned from molecular genetic studies of thyroid cancer-insights into pathogenesis and tumor-specific therapeutic targets [Text] / J.A. Fagin // *Endocrinology.* – 2002. – V. 143. – P. 2025-2028.
105. Fearon E.R. Human cancer syndromes: clues to the origin and nature of cancer [Text] / E.R. Fearon // *Science.* – 1997. – V. 278, № 5340. – P. 1043-1050.
106. Fine needle aspiration biopsy of thyroid nodules [Text] / I. S. Arda, S. Yildirim, B. Demirhan [et al.] // *Arch. Dis. Child.* – 2001. – V. 85, № 2. – P. 313-317.
107. Fine needle aspiration cytology of the thyroid: a comparison of 5469 cytological and final histological diagnoses [Text] / G. Sangalli, G. Serio, C. Zampatti [et al.] // *Cytopathology.* – 2006. – V. 17. – P. 245-250.
108. Fine-needle aspiration cytology of the thyroid. A 12-year experience with 11,000 biopsies [Text] / H. Gharib, J.R. Goellner, D.A. Johnson // *Clin. Lab. Med.* – 1993. – V. 13, № 3. – P. 699-709.
109. Fine-needle aspiration of thyroid follicular neoplasm: diagnostic use of thyroid peroxidase immunocytochemistry with monoclonal antibody 47 [Text] / C. De Micco, V. Vasko, S. Garcia [et al.] // *Surgery.* – 1994. – V. 116, № 6. – P. 1031-1035.
110. Fine-needle aspiration of thyroid nodules: a study of 4703 patients with histologic and clinical correlations [Text] / J. Yang, V. Schnadig, R. Logrono, P.G. Wasserman // *Cancer.* – 2007. – V. 111, № 5. – P. 306-315.

111. Fischer A.H. Nuclear envelope irregularity is induced by RET/PTC during interphase [Text] / A.H. Fischer, P. Taysavang, S.M. Jhiang // *Am. J. Pathol.* – 2003. – V. 163. – P. 1091–1100.
112. Friedl P. Collective cell migration in morphogenesis and cancer [Text] / P. Friedl, Y. Hegerfeldt, M. Tusch // *Int J Dev Biol.* – 2004. – V. 48. – P. 441–449.
113. Friedl P. Prespecification and plasticity: shifting mechanisms of cell migration [Text] / P. Friedl // *Curr. Opin. Cell. Biol.* – 2004. – V. 16. – P. 14–23.
114. Fu X. An HSV-2-based oncolytic virus deleted in the PK domain of the ICP10 gene is a potent inducer of apoptotic death in tumor cells [et al.] / X. Fu, L. Tao, X. Zhang // *Gene Ther.* – 2007. – V. 14. – P. 1218–1225.
115. Fuhrer D., Krohn K, Paschke R. Toxic adenom and toxic multinodular goiter [Text] / D. Fuhrer, K. Krohn, R. Paschke // *Werner & Ingbar`s The Thyroid: a fundamental and clinical text: Ninth Edition.* – 2005. – P. 456–588.
116. Gaertner E.M. The columnar cell variant of thyroid papillary carcinoma. Case report and discussion of an unusually aggressive thyroid papillary carcinoma [Text] / E.M. Gaertner, M. Davidson, B.M. Wenig // *Am. J. Surg. Pathol.* – 1995. – V. 19. – P. 940–947.
117. Galectin-3 and laminin expression in neoplastic and non-neoplastic thyroid tissue [Text] / P.L. Fernandez, M.J. Merino, M. Gomez [et al.] // *J. Pathol.* – 1997. – V. 181, № 1. – P. 80–86.
118. Gene expression and functional evidence of epithelial-to-mesenchymal transition in papillary thyroid carcinoma invasion [Text] / V. Vasko, A.V. Espinosa, W. Scouten [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2007. – V. 104. – P. 2803–2808.
119. Gene expression in poorly differentiated papillary thyroid carcinomas [Text] / O. Fluge, O. Bruland, L.A. Akslen [et al.] // *Thyroid.* – 2006. – V. 16. – P. 161–175.
120. Gene expression profiling identifies platelet-derived growth factor as a diagnostic molecular marker for papillary thyroid carcinoma [Text] / Y. Yano, N. Uematsu, T. Yashiro [et al.] // *Clin. Cancer Res.* – 2004. – V. 10. – P. 2035–

- 2043.
121. Gene rearrangement and Chernobyl related thyroid cancers [Text] / M. Santoro, G.A. Thomas, G. Vecchio [et al.] // Br. J. Cancer. – 2000. – V. 82. – P. 315-322.
 122. Gharib H. Fine-needle aspiration biopsy of thyroid nodules: advantages, limitations, and effect [Text] / H. Gharib // Mayo Clin. Proc. – 1994. - V. 69, № 1. – P. 44-49.
 123. Gimm O. Pattern of lymph node metastases in papillary thyroid carcinoma [Text] / O. Gimm, F.W. Rath, H. Dralle // Br. J. Surg. – 1998. – V. 85. – P. 252-254.
 124. GLUT1 glucose transporter expression in benign and malignant thyroid modules [Text] / R.S. Haber, K.R. Weiser, A.Pritsker [et al.] // Thyroid. – 1997. – V.7. – P. 363-367.
 125. Gupta A. Role of E-cadherins in development of lymphatic tumor emboli [Text] / A. Gupta, C.G. Deshpande, S. Badve // Cancer. – 2003. – V. 97. – P. 2341-2347.
 126. Hammer M. Cancer in cystic lesions of the thyroid [Text] / M. Hammer, J. Wortsman, R. Folse // Arch. Surg. – 1995. – V. 118, № 6. – P. 996–1003.
 127. Hay I.D. Managing patients with papillary thyroid carcinoma: insights gained from the Mayo Clinic`s experience of trading 2,512 consecutive patients during 1940 through 2000 [Text] / I.D. Hay, W.M. McConahey, J.R. Goellner // Trans. Am. Clin. Climatol. Assoc. – 2002. – V. 113. – P. 241-260.
 128. HBME-1 immunostaining in thyroid fine-needle aspirations: a useful marker in the diagnosis of carcinoma [Text] / M.J. Sack, C. Astengo-Osuna, B.T. Lin [et al.] // Mod. Pathol. – 1997. – V. 10. – P. 668-674.
 129. Hedinger C. Histological typing of thyroid tumours: 2nd edition [Text] / C. Hedinger, E.D. Williams, L.H.Sobin. – Berlin: Springer-Verlag, 1988. – 66 p.
 130. Hegedus L. Management of simple nodular goiter: current status and future perspectives [Text] / L. Hegedus, S.J. Bonnema, F.N. Bennedbaek // Endocr. Rev. – 2003. – V. 24. – P. 102-132.

131. High basal levels of functional toll-like receptor 3 (TLR3) and noncanonical Wnt5a are expressed in papillary thyroid cancer and are coordinately decreased by phenylmethimazole together with cell proliferation and migration [Text] / K.D. McCall, N. Harii, C.J. Lewis [et al.] // *Endocrinology*. – 2007. – V. 148. – P. 4226-4237.
132. High prevalence of activating ret proto-oncogene rearrangements, in thyroid tumors from patients who had received external radiation [Text] / A. Bounacer, R. Wicker, B.Caillou [et al.] // *Oncogene*. – 1997. – V. 15. – P. 1263-1273.
133. High prevalence of BRAF mutations in thyroid cancer: genetic evidence for constitutive activation of the RET/PTC-RAS-BRAF signaling pathway in papillary thyroid carcinoma [Text] / E.T. Kimura, M.N. Nikiforova, Z. Zhu [et al.] // *Cancer Res*. – 2003. – V. 63, № 7. – P. 1454-1457.
134. High prevalence of RET rearrangement in thyroid tumors of children from Belarus after the Chernobyl reactor accident[Text] / S. Klugbauer, E. Lengfelder, E.P. Demidchik, H.M. Rabes // *Oncogene*. – 1995. – V. 11. – P. 2459-2467.
135. High prevalence of RET/PTC rearrangements in Ukrainian and Belarusian post-Chernobyl thyroid papillary carcinomas: A strong correlation between RET/PTC3 and the solid-follicular variant [Text] / G.A. Thomas, H.Benell, H.A. Cook [et al.] // *J. Clin. Endocrinol. Metab*. – 1999. – V. 84, № 11. – P. 4232-4238.
136. Highly prevalent genetic alterations in receptor Tyrosine Kinases and PI3K/Akt and MAP Kinase pathways in anaplastic and follicular thyroid cancers [Text] / Z. Liu, P. Hou, M. Ji [et al.] // *J. Clin. Endocrinol. Metab*. – 2008. – V. 93, № 8. – P. 3106-3116.
137. High-resolution ultrasonography and computed tomography of thyroid lesions in patients with hyperparathyroidism [Text] / D.D.Stark, O.H. Clark, G.A. Gooding [et al.] // *Surgery*. – 1983. – V. 94, № 6. – P. 863-868.
138. Hilger R.A. The Ras-Raf-MEK-ERK pathway in the treatment of cancer [Text] / R.A. Hilger, M.E. Scheulen, D. Strumberg // *Oncology*. – 2002. – V. 25. – P. 511-518.

139. Horwitz C.A. Secondary malignant tumors of the parathyroid glands: report of two cases with associated hypoparathyroidism [Text] / C.A. Horwitz, W.P. Myers, F.W. Jr Foote // *Am. J. Med.* – 1972. – V. 52. – P. 797-808.
140. Hot microscopic areas of iodine-deficient euthyroid goitres contain constitutively activating TSH receptor mutations [Text] / K. Krohn, S. Wohlgemuth, H. Gerber, R. Paschke // *J. Pathol.* – 2000. – V. 192. – P. 37-42.
141. Huber M.A. Molecular requirements for epithelial-mesenchymal transition during tumor progression [Text] / M.A. Huber, N. Kraut, H. Beug // *Curr. Opin. Cell Biol.* – 2005. – V. 17. – P. 548–558.
142. Hybrid thyroid carcinoma with a coarse chromatin pattern and nuclear features of papillary thyroid carcinoma [Text] / K.T. Mai, R. Bokhary, H.M. Yazdi, J. Thomas // *Pathol. Res. Pract.* – 2002. – V. 198. – P. 253-260.
143. Immunohistochemical diagnosis of papillary thyroid carcinoma [Text] / C.C. Cheung, S. Ezzat, J.L. Freeman [et al.] // *Mod. Pathol.* – 2001. – V. 14. – P. 338–342.
144. Immunohistochemical expression of galectin-3 in benign and malignant thyroid lesions [Text] / M.E. Herrmann, V.A. Livolsi, T.L. Pasha [et al.] // *Arch. Pathol. Lab. Med.* – 2002. – V. 126, № 6. – P. 710-713.
145. Immunohistochemical study of thyroid peroxidase in normal, hyperplastic and neoplastic human thyroid tissue [Text] / C. De Micco, J. Ruf, M. Chrestian [et al.] // *Cancer.* – 1991. – V. 67. – P.3036-3041.
146. Increased expression of the vascular endothelial growth factor is a pejorative prognosis marker in papillary thyroid carcinoma [Text] / M. Klein, J.-M. Vignaud, V. Hennequin [et al.] // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 2001. – V. 86. – P. 656-840.
147. Increased expression of vascular endothelial growth factor C in papillary thyroid carcinoma correlates with cervical lymph node metastases [Text] / X.M. Yu, C.Y. Lo, W.F. Chan [et al.] // *Clin. Cancer Res.* – 2005. – V. 11. – P. 8063-8069.
148. Induction of receptor for advanced glycation end products by EBV latent

- membrane protein 1 and its correlation with angiogenesis and cervical lymph node metastasis in nasopharyngeal carcinoma [Text] / A. Tsuji, N. Wakisaka, S. Kondo [et al.] // Clin. Cancer Res. – 2008. – V. 14. – P. 5368-5375.
149. Integrin-dependent cell growth and survival are mediated by different signals in thyroid cells [Text] / M. Illario, V. Amideo, A. Casamassima [et al.] // J. Clin. Endocrinol. Metab. – 2003. – V. 88. – P. 260-269.
150. Interaction of 5-aza-2'-deoxycytidine and depsipeptide on anti-neoplastic activity and activation of 14-3-3sigma, E-cadherin and tissue inhibitor of metalloproteinase 3 expression in human breast carcinoma cells [Text] / J. Gagnon, S. Shaker, M. Primeau [et al.] // Anticancer Drugs. – 2003. – V. 4. – P. 193-202.
151. Interpretation of RET immunostaining in follicular lesions of the thyroid [Text] / L.A. Cerilli, S.E. Mills, C.A. Rumpel [et al.] // Am. J. Clin. Pathol. – 2002. – V. 118. – P. 186–193.
152. Isolation of prostate-derived single cells and cell clusters from human peripheral blood [Text] / B. Brandt, R. Junker, C. Griwatz [et al.] // Cancer Res. – 1996. – V. 56. – P. 4556-4561.
153. Jarzab B. Differentiated thyroid cancer in children and adults: same or distinct disease? [Text] / B. Jarzab, D. Handkiewicz-Junak // Hormones. – 2007. – V. 6, № 3. – P. 200-209.
154. Kahn N.F. Follicular carcinoma of the thyroid: an evaluation of the histology criteria used for diagnosis [Text] / N.F. Kahn, K.H. Persin // Pathol. Annu. – 1983. – V. 18. – P. 221-253.
155. Kato M. A. III Molecular markers in thyroid cancer diagnostics [Text] / M.A. Kato, T. J. Fahey // Surgical Clinics of North America. – 2009. – V. 89, № 5. – P. 1139-1155.
156. Kondo T. Pathogenetic mechanisms in thyroid follicular-cell neoplasia [Text] / T. Kondo, S. Ezzat, S.L. Asa // Nat. Rev. Cancer. – 2006. – V. 6. – P. 292-306.
157. La cytoponction a l'aiguille fine des nodules thyroïdiens. Valeur diagnostique et place dans la strategie therapeutique [Text] / M. Heim, M.Chrestian, J.F.

- Henry [et al.] // *Rev. F. Endocrinol. Clin.* – 1984. – V. 25, № 1. – P. 37-42.
158. Leukaemia and thyroid cancer in emergency workers of the Chernobyl accident: estimation of radiation risks (1986-1995) [Text] / V.K. Ivanov, A.F. Tsyb, A.I. Gorsky [et al.] // *Radiat Environ Biophys.* – 1997. – P. 9-16.
159. Links Do long-standing nodular goitres result in malignancies [Text] / V. Mathai, J. Idikula, A.S. Fenn [et al.] // *Surg.* – 1994. – V. 64, № 3. – P. 180-182.
160. Lisboa S.S. Impact of previous thyroid autoimmune diseases on prognosis of patients with well-differentiated thyroid cancer [Text] / S.S. Lisboa, A.L. Montalli da, W.L. Sterion // *Thyroid.* – 2003. – V. 13, № 5. – P. 491-495.
161. LiVolsi V.A. Prognostic factors in well-differentiated thyroid cancer [Text] / V.A. LiVolsi, G. Fadda, Z.W. Baloch // *Rays.* – 2000. – V. 25. – P. 163-175.
162. Lloyd R.V. Solid variant of papillary thyroid carcinoma: incidence, clinical-pathologic characteristics, molecular analysis, and biologic behavior [Text] / R.V. Lloyd // *Am. J. Surg. Pathol.* – 2001. – V. 25. – P. 1478-1484.
163. Low frequency of BRAF T1796A mutations in childhood thyroid carcinomas [Text] / A. Kumagai, H. Namba, V.A. Saenko [et al.] // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 2004. – V. 89. – P. 4280-4284.
164. Low prevalence of BRAF mutations in radiation-induced thyroid tumors in contrast to sporadic papillary carcinomas [Text] / M.N. Nikiforova, R. Ciampi, G. Salvatore [et al.] // *Cancer Lett.* – 2004. – V. 209. – P. 1-6
165. Low prevalence of the ret/PTC3r1 rearrangement in a series of papillary thyroid carcinomas presenting in Belarus ten years post – Chernobyl [Text] / A.V. Pisarchik, G. Ermak, E.P. Demidchik [et al.] // *Thyroid.* – 1998. – V. 8. – P. 1003-1008.
166. Macrofollicular variant of papillary thyroid carcinoma – Report of a case with fine needle aspiration biopsy findings [Text] / M. Hirokawa, M. Shimizu, K. Terayama [et al.] // *Acta Cytol.* – 1998. – V. 42, № 6. – P. 1441-1443.
167. Management guidelines for patients with thyroid nodules and differentiated thyroid cancer [Text] / D.S. Cooper, G.M. Doherty, B.R. Haugen [et al.] // *Thyroid.* – 2006. – V. 16. – P. 109-142.

168. Management of cystic or predominantly cystic thyroid nodules: the role of ultrasound-guided fine-needle aspiration biopsy [Text] / R. Bellantone, C. P. Lombardi, M. Raffaelli [et al.] // *Thyroid*. – 2009. – V. 14, № 1. – P. 43-47.
169. Mansberger A.R. Surgical embryology and anatomy of the thyroid and parathyroid glands [Text] / A.R. Mansberger, J.P. Wei // *Surg. Clin. North Am.* – 1993. – V. 73. – P. 727-746.
170. Matteucci E. Hepatocyte growth factor differently influences Met-E-cadherin phosphorylation and downstream signaling pathway in two models of breast cells [Text] / E. Matteucci, E. Ridolfi, M.A. Desiderio // *Cell. Mol. Life Sci.* – 2006. – V. 63. – P. 2016-2026.
171. Mazzafarri E.L. An overview of management of papillar and follicular thyroid carcinoma [Text] / E.L. Mazzafarri // *Thyroid*. – 1999. – V. 19. – P. 421-427.
172. Mazzaferri E.L. Current approaches to primary therapy for papillary and follicular thyroid cancer [Text] / E.L. Mazzaferri, R.T. Kloos // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 2001. – V. 86, № 4. – P. 1447-1463.
173. Mazzaferri E.L. Long-term impact of initial surgical and medical therapy on papillary and follicular thyroid cancer [Text] / E.L. Mazzaferri, S.M. Jhiang // *Am. J. Med.* – 1994. – V. 97. – P. 418-428.
174. Measurement of the expression of oncofetal fibronectin mRNA in thyroid carcinomas by competitive reverse transcription-polymerase chain reaction [Text] / T. Higashiyama, T. Takano, F. Matsuzuka [et al.] // *Thyroid*. – 1999. – V. 9, № 3. – P. 235-240.
175. Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF [Text] / P.T. Wan, M.J. Garnett, S.M. Roe [et al.] // *Cell*. – 2004. – V. 116. – P. 855-867.
176. Medullary thyroid carcinoma [Text] / M. Brauckhoff, K. Lorenz, J. Ukkat [et al.] // *Scand. J. Surg.* – 2004. – V. 93, № 4. – P. 249-260.
177. MEK/ERK signaling is a critical mediator for integrin-induced cell scattering in highly metastatic hepatocellular carcinoma cells [Text] / N. Honma, T. Genda,

- Y. Matsuda [et al.] // *Lab. Invest.* – 2006. – V. 86. – P. 687-696.
178. Mercer K.E. Raf proteins and cancer: B-Raf is identified as a mutational target [Text] / K.E. Mercer, C.A. Pritchard // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2003. – V. 1653. – P. 25-40.
179. Methylation patterns of the E-cadherin 5' CpG island are unstable and reflect the dynamic, heterogeneous loss of E-cadherin expression during metastatic progression [Text] / J.R. Graff, E. Gabrielson, H. Fujii [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2000. – V. 275. – P. 2727-2732.
180. Microcarcinoma of the thyroid gland: the Gustave-Roussy Institute experience [Text] / E. Baudin, J. P. Travagli, J. Ropers [et al.] // *Cancer.* – 1998 – V. 83 –P. 553–559.
181. Molecular mechanisms of RET activation in human cancer [Text] / M. Santoro, R.M. Melillo, F. Carlomagno [et al.] // *Annals of the New York Academy of Sciences.* – 2002. – V. 963. – P. 116-121.
182. Molecular pathogenesis of euthyroid and toxic multinodular goiter [Text] / K. Krohn, D. Fuhrer, Y. Bayer [et al.] // *Endocr. Rev.* – 2005. – V. 26. – P. 504-524.
183. Molecular pathology of well-differentiated thyroid carcinomas [Text] / M. Sobrinho-Simoes, A. Preto, A.S. Rocha [et al.] // *Virchows Arch.* – 2005. – V. 447. – P. 787-793.
184. Molecular profile and clinical-pathologic features of the follicular variant of papillary thyroid carcinoma. An unusually high prevalence of ras mutations [Text] / Z. Zhu, M. Gandhi, M.N. Nikiforova [et al.] // *Am. J. Clin. Pathol.* – 2003. – V. 120. – P. 71-77.
185. Multivariate karyometric approach in differential diagnosis of follicular thyroid neoplasms. A study of 31 cases [Text] / O. Tsybrovskyy, I. Vassilenko, S. Mannweiler, M. Klimpfinger // *Virchows Arch.* – 1998. – V. 433. – P. 135-143.
186. Mutation of the PIK3CA gene in anaplastic thyroid cancer [Text] / G. Garcia-Rostan, A.M. Costa, I. Pereira-Castro [et al.] // *Cancer Res.* – 2005. – V. 65. – P. 10199-10207.

187. Natural history, treatment, and course of papillary thyroid carcinoma [Text] / L.J. DeGroot, E.L. Kaplan, M. McCormick [et al.] // J. Clin. Endocrinol. Metab. – 1990. – V. 71. – P. 414-424.
188. Nectin-1 expression by squamous cell carcinoma is a predictor of herpes oncolytic sensitivity [Text] / Z. Yu, P.S. Adusumilli, D.P. Eisenberg [et al.] // Mol. Ther. – 2007. – V. 15. – P. 103-113.
189. Nectin-1 is a marker of thyroid cancer sensitivity to herpes oncolytic therapy [Text] / Y.Y. Huang, Z. Yu, S.F. Lin [et al.] // J. Clin. Endocrinol. Metab. – 2007. – V. 92. – P. 1965-1970.
190. Neoplasms metastatic to parathyroid glands [Text] / P. Gattuso, N.A. Khan, V.R. Jablonsky, S. Kathuria // South. Med. J. – 1988. – V. 81 – P. 1467.
191. Nguyen G. Solid / trabecular variant papillary carcinoma of the thyroid. Report of three cases with fine-needle aspiration [Text] / G. Nguyen, M.W. Lee // Diagn. Cytopathol. – 2006. – V. 34, № 10. – P. 712-714.
192. Niedziela M. Pathogenesis, diagnosis and management of thyroid nodules in children [Text] / M. Niedziela // Endocrine-Related Cancer. – 2006. – V. 13, № 2. – P. 427-453.
193. Nikiforov Y.E. RET/PTC rearrangement in thyroid tumors [Text] / Y.E. Nikiforov // Endocr. Pathol. – 2002. – V. 13. – P. 3-16.
194. Nishida T. Local control in differentiated thyroid carcinoma with extrathyroidal invasion [Text] / T. Nishida, K. Nakao, T. Hashimoto // Am. J. Surg. – 2000. – V. 179. – P. 86-91.
195. Not all 'occult' papillary carcinomas are 'minimal' [Text] / M. D. Allo, W. Christianson, D. Koivunen // Surgery – 1988. – № 104. – P. 971-976.
196. Nuclear phosphorylated Akt1 is a critical regulator of thyroid cancer cell invasion [Text] / V. Vasko, V. Savchenko, M. Saji [et al.] // Program of 75th annual meeting of the American thyroid association. – Florida (USA), 2003. – P. 711.
197. Observer variation of encapsulated follicular lesions of the thyroid gland [Text] / M. Hirokawa, J.A. Carney, J.R. Goellner [et al.] // Am. J. Surg. Pathol. – 2002.

- V. 26. – P. 1508-1514.
198. Occult papillary carcinoma of the thyroid. A study of 408 autopsy cases [Text] / Y. Yamamoto, T. Maeda, K. Izumi [et al.] // Cancer. – 1990. – V. 65. – P. 1173-1179.
 199. Oertel Y.C. Diagnosis of benign thyroid lesions: fine-needle aspiration and histopathologic correlation [Text] / Y.C. Oertel, J.E. Oertel // Ann. Diagn. Pathol. – 1998. – V. 2, № 4. – P. 250-263.
 200. Oertel Y.C. Fine-Needle Aspiration in the Evaluation of Thyroid Neoplasms [Text] / Y.C. Oertel // Endocr. Pathol. – 1997. – V. 8, № 3. – P. 215-224.
 201. Oertel Y.C. Thyroid cytology and histology [Text] / Y.C. Oertel, J.E. Oertel // Baillieres Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab. – 2000. – V. 14, № 4. – P. 541-557.
 202. Okamoto T. Tumors markers for endocrine neoplasms [Text] / T. Okamoto // Gan. To Kagaku Ryoho. – 2001. – V. 28, № 4. – P. 561-565.
 203. Oncogenic AKAP9-BRAF fusion is a novel mechanism of MAPK pathway activation in thyroid cancer [Text] / R. Ciampi, J.A. Knauf, R. Kerler [et al.] // J. Clin. Invest. – 2005. – V. 115. – P. 94-101.
 204. Oncogenic mutations in the thyrotropin receptor of autonomously functioning thyroid nodules in the Japanese population [Text] / V. Vanvooren, S. Uchino, L. Duprez [et al.] // Eur. J. Endocrinol. – 2002. – V. 147. – P. 287-291.
 205. Oncogenic rearrangements of the RET proto-oncogene in papillary thyroid carcinomas from children exposed to the Chernobyl nuclear accident [Text] / L. Fugazzola, S. Pilotti, A. Pinchera [et al.] // Cancer Research – 1995. – V. 55. – P. 5617-5620.
 206. Oncolytic vaccinia virotherapy of anaplastic thyroid cancer in vivo [Text] / S.F. Lin, D.L. Price, C.H. Chen [et al.] // J. Clin. Endocrinol. Metab. – 2008. – V. 93. – P. 4403-4407.
 207. Osteopontin is overexpressed in human papillary thyroid carcinomas and enhances thyroid carcinoma cell invasiveness [Text] / V. Guarino, P. Faviana, G. Salvatore [et al.] // J. Clin. Endocrinol. Metab. – 2005. – V. 90. – P. 5270-5278.

208. Outcome of 309 patients with metastatic differentiated thyroid carcinoma treated with radioiodine [Text] / F. Pacini, F. Cetani, P. Miccoli [et al.] // World J. Surg. – 1994. – V. 18, № 4. – P. 600-604.
209. Paludan S.R. Requirements for the induction of interleukin-6 by herpes simplex virus-infected leukocytes [Text] / S.R. Paludan // J. Virol. – 2001. – V. 75. – P. 8008-8015.
210. Papillary carcinoma of thyroid: a clinicopathologic study of 241 cases treated at the university of Florence, Italy [Text] / M.L. Carcangiu, G. Zampi, A. Pupi [et al.] // Cancer – 1985. – V. 55. – P. 805-828.
211. Parathyroid invasion, nodal recurrence, and lung metastasis by papillary carcinoma of the thyroid [Text] / K. Kakudo, W. Tang, Y. Ito [et al.] // J. Clin. Pathol. – 2004. – V. 57. – P. 245-249.
212. Partially cystic thyroid nodules on ultrasound: probability of malignancy and sonographic differentiation [Text] / M.J. Lee, E.K. Kim, J.Y. Kwak, M.J. Kim // Thyroid. – 2009. – V. 19, № 4. – P. 341-346.
213. Paterson I.C. Thyroid cancer in Wales 1985-1996: a cancer registry-based study [Text] / I.C. Paterson, R. Greenlee, D. Adams Jones // Clin. Oncol. (R. Coll. Radiol). – 1999. – V. 11. – P. 245-251.
214. PAX8-PPARgamma1 fusion oncogene in human thyroid carcinoma [corrected] [Text] / T.G. Kroll, P. Sarraf, L. Pecciarini [et al.] // Science. – 2000. – V. 289. – P. 1357-1360.
215. Peroxisomal proliferator-activated receptor-gamma agonists induce partial reversion of epithelial-mesenchymal transition in anaplastic thyroid cancer cells [Text] / A. Aiello, G. Pandini, F. Frasca [et al.] // Endocrinology. – 2006. – V. 147. – P. 4463-4475.
216. Phe 486 thyrotropin receptor mutation in an autonomously functioning follicular carcinoma that was causing hyperthyroidism [Text] / P. Camacho, D. Gordon, E. Chieffari [et al.] // Thyroid. – 2000. – V. 10, № 11. – P. 1009-1012.
217. Postoperative findings and risk for malignancy in thyroid nodules with cytological diagnosis of the so-called follicular neoplasm [Text] / E.S. Kim, J.S.

- Nam-Goong, G. Gong [et al.] // Korean J. Intern. Med. – 2003. – V. 18, № 2. – P. 94-97.
218. Predicting outcome in papillary thyroid carcinoma. Development of a reliable prognostic scoring system in a cohort of 1779 patients surgically treated at one institution during 1940 through 1989 [Text] / I.D. Hay, E.J. Bergstralh, J.R. Goellner [et al.] // Surgery. – 1993. – V. 114. – P. 1050-1058.
219. Preferential induction of RET/PTC1 rearrangement by X-ray irradiation [Text] / T. Mizuno, K.S. Iwamoto, S. Kyoizumi [et al.] // Oncogene. – 2000. – V. 180. – P. 438-443.
220. Prognostic factors determining survival in differentiated thyroid cancer [Text] / M.A. Gulcelik, N.E. Gulcelik, B. Kuru [et al.] // J. Surg. Oncol. – 2007. – V. 96. – P. 598-604.
221. Prognostic factors for thyroid carcinoma. A population-based study of 15,698 cases from the Surveillance, Epidemiology and End Results (SEER) program 1973-1991 [Text] / F.D. Gilliland, W.C. Hunt, D.M. Morris, C.R. Key // Cancer. – 1997. – V. 79. – P. 564-573.
222. Prognostic factors in differentiated carcinoma of the thyroid gland [Text] / J.P. Shah, T.R. Loree, D. Dharker [et al.] // Am. J. Surg. – 1992. – V. 164, № 6. – P. 658-661.
223. Prognostic implications of the tall cell variant of papillary thyroid carcinoma [Text] / T.L. Johnson, R.V. Lloyd, N.W. Thompson [et al.] // Am. J. Surg. Pathol. – 1988. – № 12. – P. 22-27.
224. Prognostic parameters for recurrence of papillary thyroid microcarcinoma [Text] / T.Y. Kim, S.J. Hong, J.M. Kim [et al.] // BMC Cancer. – 2008. – V. 8. – P. 296-306.
225. Prognostic value of E-cadherin expression in thyroid follicular carcinoma [Text] / E. Brecelj, S. Frkovic Grazio, M. Auersperg, M. Bracko // Eur. J. Surg. Oncol. – 2005. – V. 31. – P. 544-548.
226. Prospective multicenter study of thyroid carcinoma treatment: initial analysis of staging and outcome. National Thyroid Cancer Treatment Cooperative Study

- Registry Group [Text] / S.I. Sherman, J.D. Brierley, M. Sperling [et al.] // Cancer. – 1998. – V. 83. – P. 1012-1021.
227. Protein kinase C regulates endocytosis and recycling of E-cadherin [Text] / T.L. Le, S.R. Joseph, A.S. Yap, J.L. Stow // Am. J. Physiol. Cell. Physiol. – 2002. – V. 283. – P. 489-499.
228. Puxeddu E. The 2009 American thyroid association guidelines for management of thyroid nodules and differentiated thyroid cancer: progress on the road from consensus- to evidence-based practice [Text] / E. Puxeddu, S. Filetti // Thyroid. – 2009. – V. 19. – P. 1145-1147.
229. Quantitative assessment of promoter methylation profiles in thyroid neoplasms [Text] / M.O. Hoque, E. Rosenbaum, W.H. Westra [et al.] // J. Clin. Endocrinol. Metab. – 2005. – V. 90. – P. 4011-4018.
230. Errors in thyroid gland fine-needle aspiration [Text] / S.S. Raab, C.M. Vrbic, D.M. Grzybicki [et al.] // Am. J. Clin. Pathol. – 2006. – V. 125. – P. 873–882
231. Ras mutations are associated with aggressive tumor phenotypes and poor prognosis in thyroid cancer [Text] / G. Garcia-Rostan, H. Zhao, R.L. Camp [et al.] // J. Clin. Oncol. – 2003. – V. 21. – P. 3226–3235.
232. RAS point mutations and PAX8-PPAR gamma rearrangement in thyroid tumors: evidence for distinct molecular pathways in thyroid follicular carcinoma [Text] / M.N. Nikiforova, R.A. Lynch, P.W. Biddinger [et al.] // J. Clin. Endocrinol. Metab. – 2003. – V. 88. – P. 2318-2326.
233. Ras-GAP binding and phosphorylation by herpes simplex virus type 2 RR1 PK (ICP10) and activation of the Ras/MEK/MAPK mitogenic pathway are required for timely onset of virus growth [Text] / C.C. Smith, J. Nelson, L. Aurelian [et al.] // J. Virol. – 2000. – V. 74. – P. 10417-10429.
234. Recurrent differentiated thyroid carcinoma: biological implication of age, method of detection, and site and extent of recurrence [Text] / A. Stojadinovic, M. Shoup, A. Nissan [et al.] // Ann. Surg. Oncol. – 2002. – V. 9, № 8. – P. 789-798.
235. Regulation of p27Kip1 protein levels contributes to mitogenic effects of the

- RET/PTC kinase in thyroid carcinoma cells [Text] / D. Vitagliano, F. Carlomagno, M.L. Motti [et al.] // *Cancer Res.* – 2004. – V. 64. – P. 3823-3829.
236. Related Articles, Links Risk of malignancy in nonpalpable thyroid nodules: predictive value of ultrasound and color-Doppler features [Text] / E. Papini, R. Guglielmi, A. Bianchini [et al.] // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 2002. – V. 87, № 5. – P. 1941-1946.
237. Renshaw A.A. Why there is the tendency to ‘overdiagnose’ the follicular variant of papillary thyroid carcinoma [Text] / A.A. Renshaw, E.W. Gould // *Am. J. Clin. Pathol.* – 2002. – V. 117. – P. 19-21.
238. RET expression in papillary thyroid cancer from patients irradiated in childhood for benign conditions [Text] / B.J. Collins, G. Chiappetta, A.B. Schneider [et al.] // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 2002. – V. 87. – P. 3941-3946.
239. Ret/PTC activation in benign and malignant thyroid tumors arising in a population exposed to low-dose externalbeam irradiation in childhood [Text] / S. Sadetzki, R. Calderon-Margalit, B. Modan [et al.] // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 2004. – V. 89. – P. 2281-2289.
240. RET/PTC rearrangements in thyroid nodules: studies in irradiated and not irradiated, malignant and benign thyroid lesions in children and adults [Text] / R. Elisei, C. Romei, T. Vorontsova [et al.] // *J Clin. Endocrinol. Metab.* – 2001. – V. 86. – P. 3211–3216.
241. RET: normal and abnormal functions: minireview [Text] / M. Santoro, R.M. Melillo, F. Carlomagno [et al.] // *Endocrinology.* – 2004. – V. 145. – P. 5448-5451.
242. Revised American thyroid association management guidelines for patients with thyroid nodules and differentiated thyroid cancer [Text] / D.S. Cooper, G.M. Doherty, B.R. Haugen [et al.] // *Thyroid.* – 2009. – V. 19, № 11. – P. 1167-1214.
243. SEER Cancer Statistics Review, 1975–2003 [Text] / L.A.G. Ries, D. Harkins, M. Krapcho [et al.] – Natl. Cancer Inst.: Bethesda, MD, 2006. – 543 p.
244. Rodier J.F. Cervical lymphadenopathy revealing differentiated thyroid cancer. Review of the literature and therapeutic approach [Text] / J.F. Rodier, J.C.

- Janser // *Ann.Chir.* – 1998. – V. 52, № 9. – P. 922-926.
245. Rosai J. Papillary carcinoma of the thyroid : a discussion of its several morphologic expressions, with particular emphasis on the follicular variant [Text] / J. Rosai, G. Zampi, M. Carcangiu // *Am. J. Surg. Pathol.* – 1983. – V. 8. – P. 809-817.
246. Rosai J. Tumors of the thyroid gland [Atlas] / J.Rosai, M.L. Carcangiu, R.A. De Lellis // *Atlas of Tumor Pathology.* – Fascicle 5. – Series 3 / Armed Force Institute of Pathology. – Washington, DC, 1992. – P. 161–182.
247. Rosen I.B. Pathologic nature of cystic thyroid nodules selected for surgery by needle aspiration biopsy [Text] / I.B. Rosen, J.P. Provias, P.G. Walfish // *Thyroid.* – 1998. – V. 8, № 8. – P. 661-666.
248. Ross D.S. Nonpalpable thyroid nodules – managing an epidemic [Text] / D.S. Ross // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 2002. – V. 87, № 5. – P. 1938-1940.
249. Schlumberger M. Initial treatment [Text] / M. Schlumberger, F. Pacini // *Thyroid tumours: 2nd edn.* – Paris: Editions Nucleon, 2003. – P. 127-146.
250. Schlumberger M. Thyroid tumors [Text] / M. Schlumberger, F. Pacini. – Paris : Editions Nucleon, 1999. – 317 p.
251. Schlumberger M.J. Papillary and follicular thyroid carcinoma [Text] / M.J. Schlumberger // *N. Engl. J. Med.* – 1998. – V. 338. – P. 297-306.
252. Selection of patients with solitary thyroid nodules for operation [Text] / L. Leenhardt, F. Menegaux, B. Franc [et al.] // *Eur. J. Surg.* – 2002. – V. 168, № 4. – P. 236-241.
253. Shaha A.R. Intermediate-risk group for differentiated carcinoma of thyroid [Text] / A.R. Shaha, T.R. Loree, J.P. Shah // *Surgery.* – 1994. – V. 116. – P. 1036-1041.
254. Sherman S. I. Thyroid carcinoma [Text] / S.I. Sherman // *Lancet.* – 2003. – V. 361. – P 501-511.
255. Shook Dand Keller R. Mechanisms, mechanics and function of epithelial-mesenchymal transitions in early development [Text] / R. Shook Dand Keller // *Mech. Dev.* – 2003. – V. 120. – P. 1351-1383.

256. Smith C.C. The herpes simplex virus type 2 protein ICP10PK: a master of versatility [Text] / C.C. Smith // *Front. Biosci.* – 2005. – V. 10. – P. 2820-2831.
257. Spear P.G. Herpes simplex virus: receptors and ligands for cell entry [Text] / P.G. Spear // *Cell. Microbiol.* – 2004. – V. 6. – P. 401-410.
258. Specific pattern of RAS oncogene mutations in follicular thyroid tumors [Text] / V. Vasko, M. Ferrand, J. Di Cristofaro [et al.] // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 2003. – V. 88. – P. 2745-2752.
259. Steeg P.S. Metastasis suppressors alter the signal transduction of cancer cells [Text] / P.S. Steeg // *Nat. Rev. Cancer.* – 2003. – V. 3. – P. 55-63.
260. Strate S.M. Occult papillary carcinoma of the thyroid with distant metastases [Text] / S.M. Strate, E.L. Lee, J.H. Childer // *Cancer.* – 1984. – V. 54. – P. 1093-1100.
261. Stravopodis D .J. Drug-mediated targeted disruption of multiple protein activities through functional inhibition of the Hsp90 chaperone complex [Text] / D.J. Stravopodis, L.H. Margaritis, G.E. Voutsinas // *Curr. Med. Chem.* – 2007. – V. 14, № 29. – P. 3122-3318.
262. Survival and death causes in differentiated thyroid carcinoma [Text] / C.F. Eustatia-Rutten, E.P. Corssmit, N.R. Biermasz [et al.] // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 2006. – V. 91. – P. 313–319.
263. Takeichi M. Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator [Text] / M .Takeichi // *Science.* – 1991. – V. 251. – P. 1451-1455.
264. Tall cell variant: an aggressive form of papillary thyroid carcinoma [Text] / S. Prendiville, K.D. Burman, M.D. Ringel [et al.] // *Otolaryngol. Head Neck Surg.* – 2000. – V. 122, № 3. – P. 352-357.
265. Tallini G. Molecular pathobiology of thyroid neoplasms [Text] / G. Tallini // *Endocr. Pathol.* – 2002. – V. 13. – P.271-288.
266. Targeted expression of BRAFV600E in thyroid cells of transgenic mice results in papillary thyroid cancers that undergo dedifferentiation [Text] / J.A. Knauf, X. Ma, E.P. Smith [et al.] // *Cancer Res.* – 2005. – V. 65. – P. 4238-4245.
267. The contributions of oestrogen receptor isoforms to the development of

- papillary and anaplastic thyroid carcinomas [Text] / Q. Zeng, G. G. Chen, A. C. Vlantis [et al.] // J. Pathol. – 2008. – V. 214, № 4. – P. 425-433.
268. The correlation between papillary thyroid carcinoma and lymphatic infiltration in the thyroid gland [Text] / S. Matsubayashi, K. Kawai, Y. Matsumoto [et al.] // J. Clin. Endocrinol. Metab. – 1995. – V. 80. – P. 3421-3424.
269. The differentiation of atypical adenomas and encapsulated follicular carcinomas in the thyroid gland [Text] / W. Lang, A. Georgii, G. Stauch [et al.] // Virchows Arch. – 1980. – V. 385. – P. 125-141.
270. The incidence of thyroid carcinoma in multinodular goiter. Retrospective analysis [Text] / P. Gandolfi, A. Frisina, M. Raffa [et al.] // Acta biomed. – 2004. – V. 75, № 2. – P. 114-117.
271. The macrofollicular variant of papillary thyroid carcinoma: a study of 17 cases [Text] / J. Albores-Saavedra, E. Gould, C. Vardaman [et al.] // Hum. Pathol. – 1991. – V. 22, № 12. – P. 1195-1205.
272. The occurrence of nodel metastases in differentiated thyroid carcinoma patients and the outcome of multidisciplinary treatment, including radioiodine [Text] / L. Stefanovic, R. Avramovic, M. Malesevic [et al.] // Annual Congress of the European Association of Nuclear Medicina. – Vienna, 2002. – P. 310.
273. The prevalence of undiagnosed thyroid disorders in a previously iodine-deficient area [Text] / H. Volzke, J. Ludemann, D.M. Robinson [et al.] // Thyroid. – 2003. – V. 13. – P. 803-810.
274. The RET/PTC-RAS-BRAF linear signaling cascade mediates the motile and mitogenic phenotype of thyroid cancer cells [Text] / R.M. Melillo, M.D. Castellone, V. Guarino [et al.] // J. Clin. Invest. – 2005. – V. 115. – P. 1068-1081.
275. The significance of the Wnt pathway in the pathology of human cancers [Text] / R. Karim, G. Tse, T. Putti [et al.] // Pathology. – 2004. – V. 36. – P. 120-128.
276. The spectrum of thyroid disease in a community: the Whickham survey [Text] / W.M. Tunbridge, D.C.Evered, R. Hall [et al.] // Clin. Endocrinol. (Oxf). – 1977. – V. 7, № 6. – P. 481-493.

277. Thiery J.P. Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions [Text] / J.P. Thiery, J.P. Sleeman // *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* – 2006. – V. 7. – P. 131-142.
278. Thiery J.P. Epithelial-mesenchymal transitions in development and pathologies [Text] / J.P. Thiery // *Curr. Opin. Cell. Biol.* – 2003. – V. 15. – P. 740-746.
279. Thyroid cancer incidence among liquidators of the Chernobyl accident. Absence of dependence of radiation risks on external radiation dose [Text] / V.K. Ivanov, A.F. Tsyb, A.V. Petrov [et al.] // *Radiation and Environmental Biophysics.* – 2002. – V. 41. – P. 195-198.
280. Thyroid cytology and the risk of malignancy in thyroid nodules: importance of nuclear atypia in indeterminate specimens [Text] / A.S. Kelman, A. Rathan, J. Leibowitz [et al.] // *Thyroid.* – 2001. – V. 11. – P. 271-277.
281. Thyroid fine-needle aspiration biopsy in children and adolescents: experience with 218 aspirates [Text] / M. Amrikachi, T. B. Ponder, T. M. Wheeler [et al.] // *Diagn. Cytopathol.* – 2005. – V. 32. – P. 189-192.
282. Thyroid follicular adenomas may display features of follicular carcinoma and follicular variant of papillary carcinoma [Text] / V.V. Vasko, J. Gaudart, C. Allasia [et al.] // *Eur. J. Endocrinol.* – 2004. – V. 151. – P. 779-786.
283. Thyroid peroxidase (TPO) immunocytochemistry as a screening test for malignancy in thyroid cytology: a prospective evaluation in 1620 resected thyroid nodules [Text] / C. De Micco, P. Carayon, B. Conte Devolx [et al.] // *J Endocrinol Invest.* – 1998. – V. 21, Suppl. 4. – P. 5.
284. Thyroid peroxidase immunodetection as a tool to assist diagnosis of thyroid nodules on fine-needle aspiration biopsy [Text] / C. De Micco, V. Vasko, S. Garcia [et al.] // *Eur. J. Endocrinol.* – 1994. – V. 131, № 5. – P. 474-479.
285. Thyroid ultrasonography with the fine needle aspiration cytology in the diagnosis of thyroid cancer [Text] / J.D. Lin, B.Y. Huang, H.F. Weng [et al.] // *J. Clin. Ultras.* – 1997. – V. 25. – P. 111-118.
286. Thyroperoxidase (TPO) immunostaining of the solitary cold thyroid nodule [Text] / L. Christensen, M. Blichert-Toft, M. Brandt [et al.] // *Clin. Endocrinol.* –

2000. – V. 53. – P. 161-169.
287. TNF- α regulates TGF- β -dependent epithelial-mesenchymal transition by promoting hyaluronan-CD44-Moesin interaction [Text] / E. Takahashi, O. Nagano, T. Ishimoto [et al.] // J. Biol. Chem. – 2010. – V. 285. – P. 4060-4073.
288. Transforming growth factor beta regulates cell-cell adhesion through extracellular matrix remodeling and activation of focal adhesion kinase in human colon carcinoma Moser cells [Text] / H. Wang, V. Radjendirane, K.K. Wary, S. Chakrabarty // Oncogene. – 2004. – V. 23. – P. 5558-5561.
289. Triggiani V. Papillary thyroid carcinoma, diffuse sclerosing variant, with abundant psammoma bodies [Text] / V. Triggiani, A. Ciampolillo, E. Maiorano // Acta. cytol. – 2003. – V. 47, № 6. – P. 1141-1143.
290. Troglitazone, the peroxisome proliferator-activated receptor γ agonist, induces antiproliferation and redifferentiation in human thyroid cancer cell lines [Text] / J.W. Park, R. Zarnegar, H. Kanauchi [et al.] // Thyroid. – 2005. – V. 15. – P. 222-231.
291. Tuccari G. Immunohistochemical demonstration of ceruloplasmin in follicular adenomas and thyroid carcinomas [Text] / G. Tuccari, G. Barresi // Histopathology. – 1987. – V. 11, № 7. – P. 723-731.
292. Tumor invasion in the absence of epithelial-mesenchymal transition: Podoplanin-mediated remodeling of the actin cytoskeleton [Text] / A. Wicki, F. Lehembre, N. Wick [et al.] // Cancer Cell. – 2006. – V. 9. – P. 261-272.
293. Tumor markers in the cytodagnosis of thyroid nodules. Detection of dipeptidyl aminopeptidase IV (DAP IV) activity [Text] / P. Zoro, V. Vassko, S. Garcia [et al.] // Ann. Pathol. – 1996. – V. 16, № 4. – P. 261-265.
294. UICC TNM Classification of malignant tumours [Text] / L.H. Sobin, C. Wittekind, eds. – 5th ed. – New York: Wiley-Liss, 1997.
295. Value of repeated fine needle aspirations of the thyroid: an analysis of over ten thousand FNAs [Text] / Y.C. Oertel, L. Miyahara-Felipe, M.G. Mendoza, K. Yu // Thyroid. – 2007. – V. 17. – P. 1061-1066.

296. van Hoeven K.H. Immunocytochemical evaluation of HBME-1, CA 19-9, and CD-15 (Leu-M1) in fine-needle aspirates of thyroid nodules [Text] / K.H. van Hoeven, A.J. Kovatch, M. Miettinen // *Diagn. Cytopathol.* – 1998. – V. 18, № 2. – P. 93-97.
297. Vander J.B. The significance of nontoxic thyroid nodules. Final report of a 15-year study of the incidence of thyroid malignancy [Text] / J.B. Vander, E.A. Gaston, T.R. Dawber // *Ann. Intern. Med.* – 1968. – V. 69, № 3. – P. 537-540.
298. Vasko V.V. Molecular mechanisms involved in differentiated thyroid cancer invasion and metastasis [Text] / V.V. Vasko, M. Saji // *Curr. Opin. Oncol.* – 2007. – V. 19. – P. 11-17.
299. Wang C. The epidemiology of thyroid disease and implications for screening [Text] / C. Wang, L.M. Crapo // *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* – 1997. – V. 26, № 1. – P. 189-218.
300. Wiersinga W.M. Management of thyroid nodules in children and adolescents [Text] / W.M. Wiersinga // *Hormones (Athens).* – 2007. – V. 6. – P. 194-199.
301. Wnt/{beta}-catenin signalling mediates antineoplastic effects of Imatinib mesylate (Gleevec) in anaplastic thyroid cancer [Text] / A.S. Rao, N. Kremenevskaja, R. von Wasielewski [et al.] // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 2006. – V. 91, № 1. – P. 159-168.
302. Wynford-Thomas D. Origin and progression of thyroid epithelial tumours: cellular and molecular mechanisms [Text] / D. Wynford-Thomas // *Horm. Res.* – 1997. – V. 47, № 4-6. – P. 145-157.
303. Yamaguchi H. Cell migration in tumors [Text] / H. Yamaguchi, J. Wyckoff, J. Condeelis // *Curr. Opin. Cell. Biol.* – 2005. – V. 17. – P. 559-564.
304. Zavadil J. TGF- β and epithelial-to-mesenchymal transitions [Text] / J. Zavadil, E.P. Bottinger // *Oncogene.* – 2005. – V. 24. – P. 5764-5774.
305. Zhang G. Growth factor signaling induces metastasis genes in transformed cells: molecular connection between akt kinase and osteopontin in breast cancer [Text] / G. Zhang, B. He, G.F. Weber // *Mol. Cell. Biol.* – 2003. – V. 23. – P. 6507-6519.

306. Zhao Z.S. PAK and other Rho-associated kinases – effectors with surprisingly diverse mechanisms of regulation [Text] / Z.S. Zhao, E. Manser // *Biochem. J.* – 2005. – V. 386. – P. 201-214.