

На правах рукописи

Иванов Анатолий Акимович

**ПАТОМОРФОЛОГИЯ
И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ
ПАПИЛЛЯРНОГО РАКА ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ**

14.03.02 – патологическая анатомия

**АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук**

Новосибирск – 2021

Работа выполнена в лаборатории клинической морфологии важнейших заболеваний Института молекулярной патологии и патоморфологии ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины» (Новосибирск)

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, профессор

Бакарев Максим Александрович

Научный консультант:

доктор медицинских наук

Авдалян Ашот Меружанович

Официальные оппоненты:

Войцицкий Владимир Евгеньевич, доктор медицинских наук, профессор, ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, заведующий кафедрой онкологии.

Жукова Наталья Анатольевна, доктор медицинских наук, ФГБУН Новосибирский институт органической химии имени Н.Н.Ворожцова СО РАН, ведущий научный сотрудник лаборатории фармакологических исследований.

Ведущая организация:

НИИ клинической и экспериментальной лимфологии – филиал ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН» (Новосибирск).

Защита диссертации состоится «___» _____ 2021 г. в ___ час. на заседании совета Д 001.048.05 в ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины» по адресу 630117, Новосибирск, ул. Тимакова, 2.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины» <http://frcftm.ru>

Автореферат разослан «___» _____ 2021 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
доктор биологических наук

Клиникова Марина Геннадьевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Рак щитовидной железы (РЩЖ) является одним из самых распространенных злокачественных новообразований эндокринной системы. В мире ежегодно регистрируется около 150 тыс. новых случаев РЩЖ (Шкилёва И.Ю. и др., 2017). По данным ВОЗ, заболеваемость РЩЖ за последние 20 лет увеличилась вдвое (Кашигина О.Ю., Оди-нец А.М., 2017). Встречаемость данной нозологии у женщин в 3–5 раз выше, чем у мужчин (Кондратьева Т.Т. и др., 2007; Павлова Е.П., 2016).

В Российской Федерации стандартизованные показатели женской заболеваемости РЩЖ выросли с 7,7 (1997–2001 гг.) до 11,2 случая на 100 тыс. населения в период 2012–2016 гг. (Каприн А.Д. и др., 2016). В Алтайском крае эти показатели за те же периоды времени достоверно выше – 24,4 и 29,3 случая на 100 тыс. населения соответственно (Лазарев А.Ф. и др., 2017). По данным канцер-регистра Алтайского краевого онкологического диспансера за 2016 г., в структуре заболеваемости женского населения Алтайского края злокачественными новообразованиями РЩЖ занимает 4-е место (6,1%) после рака молочной железы, кожи и тела матки. Рост показателей заболеваемости связывают не только с ухудшающейся экологической обстановкой, но и с усовершенствованием техники проведения и доступности УЗИ при диагностике заболеваний щитовидной железы (Румянцев П.О. и др., 2009).

Общепринято, что ведущими параметрами прогноза, оказывающими влияние на время жизни оперированных пациентов с РЩЖ, являются клиничко-морфологические характеристики опухоли. На наш взгляд, международная классификация по системе TNM имеет с этой точки зрения ряд недостатков, так как в одну и ту же категорию попадают пациенты, неоднородные по другим прогностическим параметрам. Таким образом, актуальным является анализ гистологических и молекулярно-биологических факторов, влияющих как на прогноз, так и на показания для последующей радиойодтерапии и персонализированного таргетного лечения.

РЩЖ характеризуется разнообразием гистологических типов и вариантов, которые отличаются по клиническому течению (Куклева А.Д., 2017). Папиллярный РЩЖ (ПРЩЖ) является самым частым вариантом и составляет 71% от числа всех случаев РЩЖ в Алтайском крае (Гервальд В.Я. и др., 2014). Как правило, ПРЩЖ отличается благоприятным прогнозом для жизни, однако папиллярные карциномы характеризуются выраженной этиологической и клиничко-морфологической неоднородностью, встречаются случаи с агрессивным течением опухолевого процесса (от 10 до 15%), появлением метастатических очагов и развитием резистентности к радиойодтерапии (Шкурко О.А., 2008).

В оценке злокачественного потенциала ряда новообразований в клинической практике широко используется иммуногистохимический анализ пролиферативной активности и апоптоза клеток. В то же время попытки изучения экспрессии маркеров пролиферации (Ki-67) и регуляторов апоптоза (p53, bcl-2) при ПРЩЖ привели к неоднозначным выводам об их взаимосвязи с клиничко-морфологическими параметрами и влиянии на прогноз заболевания (Свиридова Т.Е. и др., 2002; Афанасьева З.А. и др., 2005; Коган Е.А. и др., 2006; Ланцов Д.С., 2006; Ito Y. et al., 2005; Marcello M.A. et al., 2013; Lee Y.M., Lee J.B., 2013).

Важную роль в контроле клеточной пролиферации и апоптоза играют белки теплового шока (в частности, HSP70), участвующие в регуляции белкового синтеза, сборке, доставке, стабилизации или гидролизе ядерных белков, связанных с управлением клеточного цикла, таких как p53 (Mizoguchi M. et al., 1998; Loo G. et al., 2002). В данный момент исследование экспрессии HSP70 служит неплохим тестом для определения чувствительности к комплексному лечению неоплазий многих локализаций (Workman P., 2003), однако работы в этом направлении по ПРЩЖ практически отсутствуют.

Преобразование нормальных клеток в злокачественные является следствием накопления мутаций генов, участвующих в процессах пролиферации, дифференцировки и программируемой клеточной гибели. Выявление мутаций таких генов может иметь не только прогностическое, но и предиктивное значение в связи с тем, что они являются

потенциальными мишенями для таргетной терапии. Например, Her2-ассоциированные карциномы молочной железы характеризуются неблагоприятным прогнозом, плохим ответом на гормонотерапию, но хорошим клиническим эффектом на терапию моноклональными антителами. Увеличение содержания белка Her2 и амплификация гена *HER2/Neu* найдены при раке толстой кишки, желудка и других локализаций, что побуждает к изучению данного маркера и в аспекте персонализированной терапии ПРЦЖ (Завалишина Л.Э. и др., 2012; Кобяков Д.С., 2015).

По данным различных авторов, при ПРЦЖ наиболее часто встречается мутация гена *BRAF*, реже – повреждения генов *KRAS*, *HRAS*, *NRAS*, а также *RET/PTC* и *TRK* перестройки (Trovisco V. et al., 2007; Abubaker J. et al., 2008; Costa A.M. et al., 2008). Мутации в генах семейства *RAS* наблюдаются в 15% случаев ПРЦЖ (Xu B., Ghossein R., 2016), мутация V600E в гене *BRAF* – от 29 до 83% случаев (Trovisco V. et al., 2006; Choi S. et al., 2013). В-Raf – серин/треониновая киназа, участвующая в MAPK-сигнальном пути, регулирующем пролиферацию и выживание клеток в ответ на внешние митогенные сигналы.

Принято считать, что наличие *BRAF* V600E является неблагоприятным прогностическим критерием, однако данное мнение разделяют не все ученые (Kebebew E. et al., 2007; Lupi C. et al., 2007; Basolo F. et al., 2010; Ahn D. et al., 2012; Barbaro D. et al., 2014). К важным вопросам относится связь мутации *BRAF* V600E с другими прогностически неблагоприятными критериями, такими как инвазия опухолевого процесса в капсулу щитовидной железы и наличие метастазов в регионарных лимфоузлах, а также ее влияние на снижение чувствительности ПРЦЖ к радиоiodтерапии (Xing M. et al., 2013). Остается нераскрытой роль, которую играют в развитии данной опухоли другие гены сигнального каскада RAS-RAF-МЕК-ERK, такие как *KRAS* и *PI3K*.

Таким образом, на сегодняшний день актуальным является исследование молекулярно-биологических маркеров пролиферативной активности, апоптоза, экспрессии HSP70, наличия мутаций в генах *BRAF*, *KRAS*, *PI3K* и статуса гена *HER2/Neu* во взаимосвязи с клинико-морфологическими параметрами, выживаемостью и прогнозом при ПРЦЖ. Анализ литературных данных показал высокую актуальность молекулярного типирования ПРЦЖ с целью создания модели индивидуального прогноза, которая способна существенно дополнить широко применяемые системы (AGES, AMES, MACIS), основанные на учете известных прогностических факторов (Сдвижков А.М. и др., 2004; Akslen L.A., Li Volsi V.A., 2000; Zuo H. et al., 2006).

Степень разработанности темы исследования. Несмотря на увеличение массива клинических данных, разработку на их основе новых критериев и шкал для оценки прогноза течения ПРЦЖ, в настоящее время отсутствует эффективный персонализированный подход, учитывающий патологоанатомические и молекулярные свойства опухоли. Так, при ПРЦЖ практически нет данных о прогностическом значении целого ряда параметров, или они носят противоречивый характер (гистологический вариант ПРЦЖ, экспрессия Ki-67, p53, bcl-2, HSP70, наличие мутаций в генах *KRAS*, *BRAF*, *PI3K*), не изучена взаимосвязь между вышеперечисленными молекулярно-биологическими маркерами и клинико-морфологическими параметрами ПРЦЖ.

Цель исследования – изучить клинико-морфологические, иммуногистохимические и молекулярно-генетические особенности папиллярного рака щитовидной железы для определения прогностически значимых критериев и разработки модели индивидуального прогнозирования послеоперационной выживаемости больных.

Задачи исследования:

1. Изучить взаимосвязь различных гистологических вариантов ПРЦЖ с клинико-морфологическими параметрами у пациентов, проживающих в Алтайском крае.
2. Изучить молекулярно-биологические характеристики ПРЦЖ (уровень экспрессии Ki-67, p53, bcl-2, тип реакции HSP70, статус генов *BRAF*, *KRAS*, *PI3K*, *HER2/Neu*) во взаимосвязи с патологоанатомическими и клинико-морфологическими параметрами.
3. Определить клинико-морфологические и молекулярно-биологические параметры, неблагоприятно влияющие на специфическую выживаемость пациентов с ПРЦЖ.

4. Выделить молекулярные подтипы ПРЦЖ на основании наиболее значимых молекулярно-биологических параметров.

5. По результатам многофакторного анализа выделить наиболее значимые клинко-морфологические и молекулярно-биологические предикторы неблагоприятного исхода и разработать комбинированную модель прогноза специфической выживаемости при ПРЦЖ.

Научная новизна. Впервые при патологоанатомическом исследовании у пациентов, проживающих в Алтайском крае, изучены особенности гистологических вариантов ПРЦЖ во взаимосвязи с другими клинко-морфологическими параметрами. Показано, что, по сравнению с классическим, солидный вариант чаще ассоциирован с мужским полом и крупными размерами опухоли, фолликулярный и высококлеточный – с более частым метастазированием в регионарные лимфоузлы, фолликулярный и солидный – с увеличением доли случаев с III–IV стадиями заболевания.

Впервые по данным иммуногистохимического исследования показано, что ПРЦЖ характеризуется низкими уровнями экспрессии Ki-67 и p53, высоким уровнем экспрессии bcl-2, преобладанием цитоплазматического и смешанного типов реакции HSP70. Повышение индекса Ki-67 и экспрессии p53, отсутствие экспрессии bcl-2 и ядерный тип реакции HSP70 ассоциированы (в различных сочетаниях) с увеличением доли случаев мужского пола и старшего возраста, III–IV стадиями заболевания, более крупными размерами опухоли, выявлением солидного варианта ПРЦЖ.

Впервые при ПРЦЖ на объемном клиническом материале изучены статус гена *HER2/Neu* и частота встречаемости мутаций в генах *BRAF*, *KRAS*, *PI3K*. Показано, что мутации генов *KRAS*, *PI3K*, а также амплификация гена *HER2/Neu* не характерны для ПРЦЖ, в то время как мутация *BRAF V600E* встречается в большинстве наблюдений (75% случаев настоящего исследования), при этом статус мутации *BRAF V600E* не ассоциирован с основными клинко-морфологическими характеристиками и специфической выживаемостью при ПРЦЖ.

Впервые на основании комплексного анализа наиболее значимых молекулярно-биологических параметров (типа реакции HSP70 и экспрессии Ki-67) выделены два молекулярных подтипа ПРЦЖ, тесно ассоциированных с исходом заболевания. К 1-му подтипу относятся цитоплазматический тип реакции HSP70 (при любом уровне пролиферативной активности) или смешанный тип реакции при Ki-67 < 7%. Ко 2-му подтипу – ядерный тип реакции HSP70, а также смешанный тип реакции при Ki-67 ≥ 7%.

Впервые по результатам многофакторного анализа разработана комбинированная модель прогноза выживаемости, учитывающая наиболее значимые клинко-морфологические и молекулярно-биологические параметры (возраст, инвазия опухолевого процесса в капсулу щитовидной железы, экспрессия Ki-67, тип реакции молекулярного шаперона HSP70), способствующая повышению эффективности прогнозирования на моделирующей выборке.

Теоретическая и практическая значимость работы. На большом клиническом материале изучена встречаемость различных гистологических вариантов ПРЦЖ, комплексно исследован широкий спектр иммуногистохимических (Ki-67, p53, bcl-2, HSP70) и молекулярно-генетических маркеров (статус гена *HER2/Neu*, наличие мутаций в генах *KRAS*, *BRAF*, *PI3K*). Изучена взаимосвязь вышеперечисленных параметров с клинко-морфологическими характеристиками ПРЦЖ.

Результаты исследования указывают на возможность оценки прогноза специфической выживаемости больных ПРЦЖ на основании определения его молекулярного подтипа путем комплексного анализа уровня экспрессии Ki-67 и локализации в опухолевых клетках белка HSP70.

Разработанная на основании многофакторного анализа комбинированная модель прогноза выживаемости, включающая четыре наиболее значимых параметра (возраст, инвазия опухолевого процесса в капсулу щитовидной железы, экспрессия Ki-67, тип реакции HSP70), может способствовать повышению эффективности клинического прогнозирования при ПРЦЖ.

Методология и методы исследования. Принципы и задачи настоящего исследования основаны на изучении научной литературы по теме выполненной работы, применении современных методов патологоанатомического, иммуногистохимического, молекулярно-

генетического и статистического анализов. Объект исследования – опухолевая ткань, полученная при хирургическом лечении пациентов с ПРЦЖ. Предмет исследования – патологоанатомические, иммуногистохимические, молекулярно-генетические изменения при ПРЦЖ, от которых зависит прогноз заболевания.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Мутации генов *KRAS*, *PI3K*, а также амплификация гена *HER2/Neu* не характерны для ПРЦЖ; мутация *BRAF V600E* встречается в большинстве наблюдений (75% исследуемой выборки). Статус мутации *BRAF V600E* не взаимосвязан с основными клинико-морфологическими характеристиками и специфической выживаемостью при ПРЦЖ.

2. Статистически значимыми факторами, ассоциированными со специфической выживаемостью при ПРЦЖ, являются: ядерный тип реакции HSP70; III–IV стадии процесса; размер опухоли более 2 см; возраст старше 45 лет для мужчин и 50 лет для женщин; индекс Ki-67 $\geq 7\%$; отсутствие экспрессии bcl-2; наличие инвазии в капсулу щитовидной железы; копияность гена *HER2/Neu* $< 1,2$; солидный гистологический вариант ПРЦЖ; уровень экспрессии p53 $\geq 10\%$; мужской пол.

3. В зависимости от характера коэкспрессии HSP70 и Ki-67 выделяются два молекулярных подтипа ПРЦЖ, тесно ассоциированных с исходом заболевания. К 1-му подтипу относятся цитоплазматический тип реакции HSP70 (при любом уровне пролиферативной активности) или смешанный тип реакции при Ki-67 $< 7\%$. Ко 2-му подтипу – ядерный тип реакции HSP70, а также смешанный тип реакции при Ki-67 $\geq 7\%$.

4. Независимыми предикторами специфической выживаемости при ПРЦЖ по данным многофакторного анализа являются возраст, инвазия опухолевого процесса в капсулу щитовидной железы, экспрессия Ki-67, тип реакции HSP70. Построенная на их основе прогностическая модель способствует повышению эффективности прогнозирования на моделирующей выборке.

Степень достоверности результатов. Использованы современные методы патоморфологического (световая микроскопия, метод тканевых матриц, иммуногистохимия) и молекулярно-генетического исследования (полимеразная цепная реакция, секвенирование по Сэнгеру), проведена статистическая обработка количественных данных. Использованные методические подходы отвечают цели и задачам исследования и гарантируют статистически значимые результаты. Диссертация выполнена на оборудовании, имеющем регистрационные удостоверения в Российской Федерации, в исследовании использован достаточный объем анализируемого материала (89 пациентов с ПРЦЖ). Представленные научные положения, выводы и практические рекомендации базируются на результатах собственных исследований, не носят умозрительный характер и вытекают из результатов работы.

Апробация работы. Основные положения работы доложены и обсуждены на Российской научно-практической конференции с международным участием «Инновационные подходы в онкологии» (Барнаул, 2015); Международном биотехнологическом симпозиуме «Биотехнология: молекулярные аспекты ранней диагностики и терапии онкологических заболеваний» (Барнаул, 2015); XIX Российском онкологическом конгрессе (Москва, 2015); XVI научно-практической конференции Алтайского государственного медицинского университета, посвященной Дню российской науки (Барнаул, 2016); IX съезде онкологов и радиологов стран СНГ и Евразии (Минск, 2016); XXI Российском онкологическом конгрессе (Москва, 2017); III Петербургском международном онкологическом форуме «Белые ночи 2017» (Санкт-Петербург, 2017); XII Всероссийской конференции молодых ученых – онкологов «Актуальные вопросы фундаментальной и клинической онкологии» (Томск, 2017); X съезде онкологов и радиологов стран СНГ и Евразии (Сочи, 2018); Всероссийской научно-практической конференции «Персонализированные подходы к профилактике, лечению и диагностике злокачественных новообразований» (Барнаул, 2018); конференции «Опухолевые маркеры: фундаментальные и клинические аспекты» (Горно-Алтайск, 2018); конференции «Современные достижения и инновационные технологии в лечении больных со злокачественными опухолями головы и шеи» в рамках IV Петербургского международного онкологического форума (Санкт-Петербург, 2018);

XXII Российском онкологическом конгрессе (Москва, 2018); XXIII Российском онкологическом конгрессе (Москва, 2019); заседании Ученого совета в Институте молекулярной патологии и патоморфологии ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины» (Новосибирск, 2019).

Внедрение в практику результатов исследования. Основные результаты исследования используются в научной работе Алтайского филиала ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (г. Барнаул) и в практической работе КГБУЗ «Алтайский краевой онкологический диспансер» (г. Барнаул).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 12 работ, из них 6 – в рецензируемых научных журналах, рекомендуемых ВАК Минобрнауки России для публикаций основных результатов исследований.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, главы «Материалы и методы исследования», 3 глав с результатами собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций и списка цитируемой литературы. Общий объем диссертации – 136 страниц компьютерного текста. Указатель литературы содержит 188 источников (87 отечественных и 101 зарубежных авторов). Диссертация иллюстрирована 50 таблицами и 27 рисунками.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Общая характеристика клинических наблюдений. В основу работы положены результаты клиничко-морфологического обследования и лечения 89 пациентов с ПРЦЖ. С января 2003 по декабрь 2015 г. в КГБУЗ «Алтайский краевой онкологический диспансер» был обследован и прооперирован 3101 пациент с ПРЦЖ, клинические данные по которым вносились в общую базу и дополнялись информацией об исходах из канцер-регистра Алтайского края. К моменту завершения набора и ретроспективного анализа материала 35 (1,1%) пациентов из этого массива наблюдений умерли по причине прогрессирования ПРЦЖ через различные промежутки времени после операции (от 19 дней до 9,8 лет). Для каждого из них в качестве контроля случайным образом выбрано по три пациента общей когорты, живых на момент завершения 10-летнего срока послеоперационного наблюдения. После оценки качества морфологического материала и отсеивания сформирована окончательная выборка для исследования, которая включала в себя 25 случаев с летальным исходом по основному заболеванию и 64 контрольных наблюдения.

Все этапы работы проведены с разрешения Комитета по биомедицинской этике ФИЦ ФТМ, обследуемые пациенты были ознакомлены с каждым шагом исследования и подписали информированное добровольное согласие на медицинское вмешательство.

Средний возраст больных ПРЦЖ составил $50,4 \pm 13,9$ лет (от 17 до 78 лет), из них 66% – в возрасте от 30 до 60 лет. Среди пациентов преобладали женщины – 77 (87%) случаев, мужчины – 12 (13%) случаев. Объем операции в 64% случаев соответствовал тиреоидэктомии, в остальных случаях – гемитиреоидэктомии с перешейком. Расширение объема операции за счет иссечения паратрахеальной клетчатки, фасциально-футлярного иссечения клетчатки шеи или операции Крайля зависело от распространенности процесса. Предоперационная и постоперационная химиолучевая терапия не проводилась. Случаи, в которых лечение ПРЦЖ осуществлялось с помощью использования радиоактивного йода, а также случаи с первично-множественными опухолями были исключены из исследования.

Клиничко-морфологические параметры и стадия заболевания определены согласно классификации TNM (7-е издание, 2010) (Собин Л.Х. и др., 2011). Показатель Т в 67% случаев соответствовал Т1 (1 и 1m), в 10% – Т2 (2 и 2m), в 14% – Т3 (3 и 3m) и в 9% – Т4 (4 и 4m). В 44% отмечалось метастатическое поражение лимфатических узлов, в 2% случаях – отдаленные метастазы. Инвазию в капсулу или за ее пределы отмечали в 47% наблюдений.

Методы патоморфологического анализа. Операционный материал фиксировали в 10% нейтральном забуференном растворе формалина HistoSafe® в течение 18–24 ч.

Спиртовую проводку материала выполняли по стандартному протоколу в гистологическом аппарате Sakura Tissue-Tek VIP 6, заливку материала в парафин – в аппарате Sakura Tissue-Tek TEC 5. Срезы толщиной 4 мкм получали на ротационном микротоме Accu-Cut® SRM™ 200, помещали на предметное стекло, затем окрашивали гематоксилином и эозином и покрывали пленкой в аппаратном комплексе Tissue-Tek Prisma&Film. Под световым микроскопом срезы исследовали для выявления общей морфологической картины, определения гистологического типа и степени дифференцировки опухоли.

Изготовление тканевых матриц. Из блока донора получали столбик ткани иглой-панчером с внутренним диаметром 1,5 мм, используя максимально богатые опухолевой тканью участки препарата. Полученные столбики ткани помещали в два шаблона блоков-реципиентов Sakura Quick-Ray™ Tissue-Tek® с формированием тканевых матриц размером 15x20 мм, состоящих из 60 столбиков. С полученных парафиновых блоков-реципиентов проводили серийные гистологические срезы толщиной 4 мкм и переносили их на предметные стекла для последующего окрашивания.

Иммуногистохимические методы. Иммуногистохимическое исследование проводили в автостейнере BenchMark XT (Ventana) и аппаратном комплексе Tissue-Tek Prisma&Film. Использовали первичные антитела (маркеры), отражающие характеристики пролиферации, апоптоза: Ki-67 (MIB-1, «Dako», разведение 1:25); p53 (DO7, «Dako», разведение 1:25); Vcl-2, (MKA124, «Dako», разведение 1:10); HSP70 (W27, «Diagnostic BioSystems», разведение 1:25). В работе применяли систему визуализации UltraView Universal DAB Detection Kit (Ventana). Анализировали не менее 1000 клеток в 4–7 полях зрения при $\times 400$, результат оценивали согласно общепринятым методикам и рекомендациям производителя. При изучении экспрессии Ki-67 и p53 вычисляли процент позитивно окрашенных клеток. При анализе HSP70 оценивали локализацию белка в клетке (типы реакции): цитоплазматическую, ядерную (в том числе нуклеолярную, ядерно-нуклеолярную).

SISH-метод. Подготовку срезов с тканевых матриц и сам этап гибридизации *in situ* осуществляли в автостейнере BenchMark XT (Ventana). Использовали набор зондов INFORM HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail, меченных динитрофенилом и дигоксигенином, для анализа гена *HER2/Neu* (черная метка) и центрального участка 17-й хромосомы (CEP17, красная метка). При увеличении микроскопа в 1000 раз суммировали соответствующие метки в 20 ядрах опухолевых клеток, затем определяли усредненный коэффициент HER2/CEP17. Согласно инструкции производителя набора, при $HER2/CEP17 < 1,8$ фиксировали отсутствие амплификации гена *HER2/Neu* и отмечали снижение его копийности, а при $HER2/CEP17 > 2,0$ – наличие амплификации. При коэффициенте HER2/CEP17 от 1,8 до 2,0 в просчет включали добавочный объем клеток до получения уровня менее 1,8 или более 2,0 (Кобяков Д.С., 2015; Wang S. et al., 2002).

Молекулярно-генетические методы. Выделение ДНК из ткани производили с помощью набора FFPE QIAGEN по протоколу производителя на автоматической станции QIAcube (QIAGEN). Мутацию V600E 15-го экзона гена *BRAF*, 7 мутаций в 12–13-м кодоне 2-го экзона гена *KRAS* и 4 соматические мутации в 9-м и 20-м экзоне гена *PI3K* выявляли с помощью аллель-специфичной полимеразной цепной реакции в реальном времени наборами Real-time – PCR *BRAF* V600E и *KRAS* 7M («Биолинк», Россия), а также *PI3K* Mutation Test Kit (QIAGEN, Германия). Амплификацию и анализ результатов проводили на аппарате SFX 96 (BIORAD, США) по протоколам производителей реактивов.

Секвенирование по Сэнгеру 15-го экзона гена *BRAF* осуществляли на генетическом анализаторе Applied Biosystems 3500 (США) с помощью набора Seqfinder *BRAF* Sequencing Kit (GML, США), который позволяет обнаружить все мутации в 600-м и 601-м кодонах 15-го экзона гена *BRAF*. С целью повышения чувствительности в некоторых случаях была проведена макродиссекция опухолевой ткани (для обогащения злокачественными клетками исследуемого материала).

Статистические методы. Статистическую обработку и графическое представление полученных данных проводили с использованием программ STATISTICA 12.0 (StatSoft

Inc., США), SPSS Statistics 26.0 (IBM, США), Microsoft Excel 2016. Проверку гипотезы о нормальности распределения количественных данных и равенстве выборочных дисперсий осуществляли с использованием критериев Шапиро – Уилка и Левена. При нормальном распределении непрерывных величин описательные статистики представлены в виде среднего арифметического и стандартного отклонения ($M \pm \sigma$), при отсутствии нормального распределения – в виде медианы (Me) и межквартильного интервала (25–75%). С целью сравнения двух независимых групп по количественному признаку использовали t-критерий Стьюдента или непараметрический U-критерий Манна – Уитни. Сравнение средних в трех и более группах проводили с помощью дисперсионного анализа, сравнение медиан – с помощью критерия Краскела – Уоллиса.

Для трансформации количественных величин в бинарные проводили их дихотомизацию с подбором точек отсечения по результатам анализа ROC-кривых. Для анализа таблиц сопряженности применяли точный критерий Фишера или критерий χ^2 Пирсона. Для оценки силы связи между признаками определяли критерий V Крамера и показатель отношения шансов (ОШ). Коррелятивные взаимоотношения оценивали с помощью критерия Спирмена.

Для оценки комплексного влияния изучаемых факторов на исход заболевания использовали метод логистической регрессии с пошаговым включением и ранжированием предикторов по величине статистики Вальда (W). С целью проверки результата дополнительно применяли метод пошагового исключения. С использованием полученных коэффициентов регрессии в каждом случае оценивали вероятность наступления летального исхода по формуле: $p = 1 / (1 + e^{-z})$, где $z = \beta_0 + \beta_1 \times X_1 + \dots + \beta_n \times X_n$; здесь $\beta_1 - \beta_n$ – регрессионные коэффициенты для каждого предиктора ($X_1 - X_n$); β_0 – константа, определяющая вероятность наступления события при отсутствии влияния изучаемых факторов. Кроме того, протестированы две балльные системы оценки, в которых положительному значению предиктора присваивалось от 1 до 3 баллов. Подбор пороговых значений для выделения групп риска проводили по результатам ROC-анализа.

Для сравнительной оценки качества регрессионных моделей использовали коэффициент детерминации R^2 Нагелькерке, информационный критерий Акаике (AIC). Соответствие предсказанных событий реальным данным характеризовали на основании процента правильной переклассификации, а также теста согласия Хосмера – Лемешова. Для определения дискриминирующей способности модели применяли ROC-анализ, определяли показатели чувствительности (Se), специфичности (Sp), точности и показатель площади под кривой (AUC).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Как правило, ПРЦЖ характеризуется относительно благоприятным прогнозом. Причины появления случаев с агрессивным течением (от 10 до 15%) мало изучены, для их понимания требуется комплексный анализ клинико-морфологических и молекулярно-биологических параметров с оценкой их влияния на исход заболевания.

Клинико-морфологические факторы прогноза. Возраст пациента. ROC-кривая параметра «возраст» указывала на высокую прогностическую ценность данного признака (AUC = 0,871), однако имела сложную форму, поэтому в качестве точки отсечения для разделения пациентов на группы риска выбраны пограничные значения, принятые в классификациях UICC, TNM и CИH – 45 лет для мужчин и 50 лет для женщин (Sobin L.H. et al., 2002; Sugitani I. et al., 2004). По нашим данным, среди летальных случаев абсолютное большинство составляли наблюдения старше 45/50 лет (92%), в то время как в контрольной группе преобладали пациенты более молодого возраста (66%) (табл. 1). На относительно сильную взаимосвязь между возрастом и исходом заболевания указывали значение критерия V Крамера (0,518), показатель ОШ (22,0), а также величина статистики Вальда (15,6).

Пол. Среди пациентов обеих групп предсказуемо преобладали женщины, однако в группе летальных случаев доля мужчин (28%) была статистически значимо выше, чем в контрольных наблюдениях (8%, $p = 0,033$). Таким образом, показатель пола взаимосвязан с

прогнозом выживаемости при ПРЦЖ, хотя сила ассоциации существенно слабее, чем в случае с возрастом ($V = 0,266$; ОШ = 4,6; $W = 5,6$).

Таблица 1. Ассоциации клиничко-морфологических параметров со специфической выживаемостью при ПРЦЖ (однофакторный анализ)

Параметры		n	Контроли ($n = 64$)	Случаи ($n = 25$)	p	V	W	ОШ (95% ДИ)
Возраст, лет	$< 45_{м}/50_{ж}$	44	42 (66%)	2 (8%)	$<0,001$	0,518	15,6	22,0
	$\geq 45_{м}/50_{ж}$	45	22 (34%)	23 (92%)				(4,7–101,8)
Пол	женщины	77	59 (92%)	18 (72%)	0,033	0,266	5,6	4,6
	мужчины	12	5 (8%)	7 (28%)				(1,3–16,2)
Размер опухолевого узла, см	< 2	67	56 (88%)	11 (44%)	$<0,001$	0,453	15,7	8,9
	≥ 2	22	8 (12%)	14 (56%)				(3,0–26,3)
Инвазия в капсулу	нет	47	41 (64%)	6 (24%)	0,001	0,361	10,4	5,6
	есть	42	23 (36%)	19 (76%)				(2,0–16,1)
Метастазы в регионарных лимфоузлах	нет	50	38 (59%)	12 (48%)	0,352	0,103	0,9	1,6
	есть	39	26 (41%)	13 (52%)				(0,6–4,0)
Стадия	I–II	57	50 (78%)	7 (28%)	$<0,001$	0,469	17,0	9,2
	III–IV	32	14 (22%)	18 (72%)				(3,2–26,4)
Гистологический вариант ($n = 85$)	другие*	79	60 (98%)	19 (79%)	0,006	0,337	6,0	15,8
	солидный	6	1 (2%)	5 (21%)				(1,7–142,9)

Примечание. Здесь и в других таблицах: $45_{м}/50_{ж}$ – пороговые значения возраста мужчин/женщин; * – классический, фолликулярный, высококлеточный варианты; p – значимость различий (точный тест Фишера); V – критерий Крамера; W – статистика χ^2 Вальда (однофакторный регрессионный анализ).

Размер опухолевого узла. По данным ROC-анализа, в качестве пороговой величины для разделения пациентов на прогностические группы принят размер опухоли 2 см. Зарегистрирована относительно сильная ассоциация полученного признака со специфической выживаемостью при ПРЦЖ (см. табл. 1): в 56% наблюдений с летальным исходом выявлялась опухоль ≥ 2 см в диаметре, в то время как в абсолютном большинстве контрольных случаев (88%) опухоль имела меньшие размеры ($V = 0,453$; ОШ = 8,9; $W = 15,7$).

Инвазия в капсулу щитовидной железы. При оценке влияния данного фактора установлена взаимосвязь средней силы с исходом заболевания ($V = 0,361$): инвазия опухоли в капсулу щитовидной железы выявлялась в 76% наблюдений с летальным исходом и в 36% контрольных случаев ($p = 0,001$). Показатели ОШ (5,6) и χ^2 Вальда (10,4) были ниже, чем в случае размера опухолевого узла (см. табл. 1).

Метастазы в регионарных лимфоузлах. По нашим данным, частота выявления регионарных метастазов в наблюдениях с летальным исходом (52%) и контрольных случаях (41%) значимо не отличалась, доверительный интервал ОШ включал единицу (см. табл. 1). Таким образом, фактор наличия метастазов в регионарных лимфоузлах не является прогностически значимым критерием специфической выживаемости при ПРЦЖ.

Стадия заболевания является интегральным дескриптором и определяется по совокупности показателей TNM. При оценке влияния фактора «стадия» на исход заболевания в 52% наблюдений с летальным исходом показатели TNM соответствовали IV стадии, в 20% – III стадии, в 28% – I–II стадиям ПРЦЖ, в то время как в большинстве контрольных случаев (78%) определялись I–II стадии процесса ($p < 0,001$). Поскольку частота выявления III и IV стадий в группах случаев и контролей значимо отличалась только в сравнении с распределением I–II стадий заболевания, мы объединили III и IV стадии в одну категорию для последующего анализа (см. табл. 1). Полученный бинарный показатель продемонстрировал относительно сильную связь с исходом заболевания ($V = 0,469$; ОШ = 9,2; $W = 17,0$).

Гистологический вариант ПРЦЖ. По данным патологоанатомического исследования, установлена значительная вариабельность гистологических вариантов ПРЦЖ с преобладанием классического (62%), реже – фолликулярного (19%), высококлеточного (8%) и

солидного (7%). Склерозирующий, светлоклеточный и низкодифференцированный варианты встречались в единичных случаях.

Зарегистрированы ассоциации между наиболее распространенными гистологическими вариантами и некоторыми другими параметрами, имеющими неблагоприятное прогностическое значение. Опухоли солидного строения, как правило, отличались более крупным размером (≥ 2 см) – частота таких случаев (83%), а также медианный размер узла в данной подгруппе (5 см) значительно превышали соответствующие показатели в наблюдениях с классическим и фолликулярным вариантами (22 и 12%, $p = 0,005$ и $0,003$; 1,2 и 1,0 см, $p = 0,003$ и $0,005$ соответственно). По сравнению с классическим, солидный вариант был чаще ассоциирован с мужским полом, фолликулярный и высококлеточный варианты – с более частым метастазированием в регионарные лимфоузлы, фолликулярный и особенно солидный – с увеличением доли случаев с III–IV стадиями заболевания (табл. 2).

Таблица 2. Ассоциации между клинико-морфологическими параметрами и наиболее распространенными гистологическими вариантами ПРЦЖ

Параметры		n	Гистологический вариант (n = 85)				$p_{\text{сумм}}$	$p_{\text{пар}}$	V
			классический	фолликулярный	высококлеточный	солидный			
			1	2	3	4			
Пол	жен.	73	51 (70%)	13 (18%)	6 (8%)	3 (4%)	0,018	1-4: 0,017	0,338
	муж.	12	4 (33%)	4 (33%)	1 (8%)	3 (25%)			
Размер опухолевого узла	< 2 см	64	43 (78%)	15 (88%)	5 (71%)	1 (17%)	0,007	1-4: 0,005 2-4: 0,003	0,390
	≥ 2 см	21	12 (22%)	2 (12%)	2 (29%)	5 (83%)			
Регионарные метастазы	нет	47	38 (69%)	5 (29%)	2 (29%)	2 (33%)	0,005	1-2: 0,004 1-3: 0,048	0,376
	есть	38	17 (31%)	12 (71%)	5 (71%)	4 (67%)			
Стадия	I–II	54	42 (76%)	8 (47%)	3 (43%)	1 (17%)	0,003	1-2: 0,025 1-4: 0,007	0,389
	III–IV	31	13 (24%)	9 (53%)	4 (57%)	5 (83%)			

Примечание. $p_{\text{сумм}}$, $p_{\text{пар}}$ – значимость различий при суммарном и попарных сравнениях.

При оценке влияния гистологического варианта ПРЦЖ на исход заболевания основные различия были связаны с солидным вариантом, который был выявлен в 21% летальных случаев и только в 2% контрольных наблюдений (см. табл. 1). Поскольку показатели распределения других вариантов существенно не отличались, мы объединили их в одну подгруппу. Полученный признак («солидный/другие») продемонстрировал взаимосвязь средней силы с исходом заболевания ($V = 0,337$) при относительно небольшой величине статистики Вальда (6,0) и высоком показателе ОШ (15,8).

Молекулярно-генетические факторы прогноза. По данным исследования уровня экспрессии *Ki-67*, пролиферативная активность опухоли при ПРЦЖ характеризуется высокой вариабельностью при достаточно низком медианном значении доли экспрессирующих клеток – 3,3% (1,9–6,1%). По результатам ROC-анализа определена высокая прогностическая значимость индекса *Ki-67* ($AUC = 0,745$), установлена оптимальная пороговая величина для разделения пациентов на группы риска (7% меченых клеток).

При анализе ассоциаций с клинико-морфологическими параметрами выявлено статистически значимое повышение медианного индекса *Ki-67* у мужчин (13,7% против 3,1% у женщин, $p = 0,001$), а также в наблюдениях с размерами опухолевого узла ≥ 2 см и III–IV стадиями заболевания (6,1% и 5,7% против 2,8% при меньших размерах опухоли и I–II стадиях, $p < 0,001$ и $p = 0,006$ соответственно). Установлены взаимосвязи между превышением порогового уровня экспрессии и мужским полом ($p < 0,001$, $V = 0,515$), возрастом $\geq 45/50$ лет ($p < 0,039$, $V = 0,232$), размером опухоли ≥ 2 см ($p = 0,005$, $V = 0,333$), выявлением III–IV стадий заболевания ($p = 0,002$, $V = 0,347$), а также солидного варианта ПРЦЖ ($p = 0,018$, $V = 0,305$).

Зарегистрирована относительно сильная ассоциация индекса *Ki-67* со специфической выживаемостью при ПРЦЖ (табл. 3): доля наблюдений, в которых индекс *Ki-67* превышал пороговое значение, среди летальных случаев была существенно больше, чем в контрольной группе (48% против 11%, $p < 0,001$; $V = 0,402$; ОШ = 7,3; $W = 12,2$).

Таблица 3. Ассоциации молекулярно-биологических параметров со специфической выживаемостью при ПРЦЖ (однофакторный анализ)

Параметры	<i>n</i>	Контроли	Случаи	<i>p</i>	<i>V</i>	<i>W</i>	ОШ (95% ДИ)	
Индекс Ki-67, %	< 7	68	55 (89%)	13 (52%)	<0,001	0,402	12,2	7,3 (2,4–22,0)
	≥ 7	19	7 (11%)	12 (48%)				
Экспрессия p53, %	< 10	81	61 (98%)	20 (80%)	0,007	0,328	5,9	15,3 (1,7–138,4)
	≥ 10	6	1 (2%)	5 (20%)				
Экспрессия bcl-2	позитивная	72	57 (93%)	15 (60%)	<0,001	0,411	11,7	9,5 (2,6–34,6)
	негативная	14	4 (7%)	10 (40%)				
Тип реакции HSP70	цит./смеш.	70	59 (95%)	11 (44%)	<0,001	0,584	20,2	25,0 (6,2–101,8)
	ядерная	17	3 (5%)	14 (56%)				
Копийность гена <i>HER2/Neu</i>	< 1,2	37	20 (32%)	17 (68%)	0,004	0,327	8,7	4,5 (1,7–12,1)
	≥ 1,2	50	42 (68%)	8 (32%)				
Мутация <i>BRAF</i> V600E	V600E-	21	16 (25%)	5 (20%)	0,783	0,053	0,25	1,3 (0,4–4,1)
	V600E+	68	48 (75%)	20 (80%)				

Экспрессия p53. Роль положительной экспрессии белка p53 при ПРЦЖ в прогнозе выживаемости остается предметом дискуссии. Полученное нами по данным ROC-анализа значение AUC (0,623) указывает на умеренную прогностическую значимость данного показателя. Оптимальная точка отсечения оказалась близка к принятому в литературе порогу в 10% меченых клеток, который и был использован в качестве критерия позитивной экспрессии, отражающей накопление мутантной формы белка (Yemelyanova A. et al., 2011; Kluth M. et al., 2014, Guedes L.B. et al., 2017).

По результатам анализа, положительная экспрессия p53 различной интенсивности наблюдалась в 64% образцов ПРЦЖ, при этом доля экспрессирующих клеток была, как правило, очень низкой (медианное значение 0,5%). Повышение медианного уровня экспрессии наблюдалось у мужчин (3,5% против 0,4% у женщин, $p = 0,002$) и в наблюдениях с солидным вариантом опухоли (3,6% против 0,4% в других вариантах, $p = 0,036$).

Несмотря на то, что превышение порога в 10% меченых клеток отмечено лишь в 6 случаях настоящего исследования, данный признак оказался значимо ассоциирован с некоторыми клинико-морфологическими факторами неблагоприятного прогноза – мужским полом ($p = 0,003$, $V = 0,417$), возрастом $\geq 45/50$ лет ($p = 0,027$, $V = 0,263$), III–IV стадией заболевания ($p = 0,024$, $V = 0,263$), а также, в виде тенденции, с выявлением солидного варианта ПРЦЖ ($p = 0,058$, $V = 0,281$).

Хотя доля наблюдений с позитивной экспрессией p53 среди летальных случаев составляла только 20%, в контрольной группе такие наблюдения практически отсутствовали (см. табл. 3), за счет чего данный признак демонстрировал статистически значимую ассоциацию средней силы с исходом заболевания ($V = 0,328$, $p = 0,007$) при относительно небольшой величине статистики Вальда (5,9) и высоком показателе ОШ (15,3).

Экспрессия bcl-2. Неблагоприятным прогностическим фактором может являться отсутствие или снижение экспрессии bcl-2 (супрессора апоптоза) в опухолевых клетках. По результатам иммуногистохимического анализа в 16% наблюдений ПРЦЖ зафиксировано отсутствие экспрессии bcl-2 в опухолевой ткани. Установлены статистически значимые ассоциации этого показателя с клинико-морфологическими факторами неблагоприятного прогноза – возрастом $\geq 45/50$ лет ($p = 0,006$, $V = 0,295$), размером опухоли ≥ 2 см ($p = 0,001$, $V = 0,391$), наличием III–IV стадии заболевания ($p = 0,033$, $V = 0,247$), выявлением солидного гистологического варианта ПРЦЖ ($p = 0,048$, $V = 0,263$).

Зарегистрирована относительно сильная ассоциация между статусом экспрессии bcl-2 и специфической выживаемостью при ПРЦЖ (см. табл. 3): экспрессия bcl-2 отсутствовала в 40% наблюдений с летальным исходом и только в 7% контрольных случаев ($p < 0,001$; $V = 0,411$; ОШ = 9,5; $W = 11,7$).

Молекулярный шаперон HSP70. В результате иммуногистохимического исследования экспрессии молекулярного шаперона HSP70 в образцах ПРЦЖ выявлены различные

типы реакции: цитоплазматическая (41% случаев), смешанная (39%), ядерная (9%), ядрышковая (4%) и ядерно-ядрышковая (7%). Последние три паттерна были в дальнейшем объединены в одну группу («ядерный тип реакции»). Поскольку основные тенденции и отличия были связаны именно с этим типом, последующие сопоставления проводили с разделением характера экспрессии HSP70 на две категории – «цитоплазматический/смешанный» и «ядерный».

Для наблюдений с ядерным типом реакции характерны более высокие показатели медианного размера опухоли (1,8 см против 1,1 см, $p = 0,023$), а также среднего возраста пациентов ($63,2 \pm 10,6$ против $47,1 \pm 12,7$ лет, $p < 0,001$). Ядерная экспрессия HSP70 значительно чаще наблюдалась в возрастной группе старше 45/50 лет (36%) и у пациентов с III–IV стадией ПРЦЖ (34%) – в сравнении с наблюдениями более молодого возраста и I–II стадий (2 и 11% случаев, $p < 0,001$ и $p = 0,011$ соответственно).

Установлена довольно сильная взаимосвязь между типом реакции HSP70 и исходом заболевания при ПРЦЖ: ядерный тип реакции был зафиксирован в 56% наблюдений с летальным исходом и только в 5% контрольных случаев ($p < 0,001$). Значения критерия V Крамера (0,584), показателя ОШ (25,0), а также статистики Вальда ($W = 20,2$) для данного фактора были максимальными среди всех параметров, подвергавшихся анализу (см. табл. 3). Таким образом, при ядерной транслокации HSP70 прогноз статистически значимо хуже, чем при смешанном и цитоплазматическом типах реакции.

Статус гена *HER2/Neu*. В настоящем исследовании амплификации гена *HER2/Neu* не выявлено ни в одном случае, что позволяет сделать вывод о том, что данная хромосомная перестройка не характерна для ПРЦЖ. В то же время в процессе дополнительного изучения показателя относительной копииности данного гена обнаружено уменьшение медианных значений коэффициента *HER2/CEP17* у пациентов старше 45/50 лет (1,19) и в наблюдениях с наличием инвазии в капсулу щитовидной железы (1,15) – в сравнении с пациентами более молодого возраста и случаями без инвазии (1,30 и 1,33, $p = 0,034$ и $0,002$ соответственно). Отмечалась некоторая тенденция к уменьшению копииности гена *HER2/Neu* в группе опухолей с размером узла более 2 см (1,14 против 1,29, $p = 0,135$).

По данным ROC-анализа определена умеренная прогностическая значимость копииности гена *HER2/Neu* ($AUC = 0,695$), установлено оптимальное пороговое значение коэффициента *HER2/CEP17*, равное 1,20. При оценке ассоциации полученного бинарного показателя с исходом заболевания выявлены статистически значимые различия (см. табл. 3): наблюдения, в которых копииность *HER2/Neu* была ниже порогового значения, среди летальных случаев встречались существенно чаще, чем в контрольной группе (68% против 32%, $p = 0,004$). Взаимосвязь имела среднюю силу ($V = 0,327$) при сравнительно невысоких показателях ОШ (4,5) и статистики Вальда (8,7).

Мутации в генах *KRAS*, *PI3K*, *BRAF*. По результатам молекулярно-генетического анализа, мутации генов *KRAS* (G12A, G12C, G12D, G12R, G12S, G12V, G13D) и *PI3K* (H1047R, E545K, E545D, E542K) не выявлены ни в одном случае настоящего исследования, в то время как мутация *BRAF* V600E зафиксирована в 75% наблюдений ПРЦЖ.

За исключением небольшого повышения среднего возраста в V600E-позитивных случаях ($51,8 \pm 13,0$ лет против $44,3 \pm 14,9$ лет, $p = 0,028$), статус мутации *BRAF* V600E не был значимо ассоциирован с *клинико-морфологическими характеристиками* при ПРЦЖ, при этом многие из имевшихся тенденций отличались обратной направленностью. В частности, частота обнаружения мутации *BRAF* V600E имела тенденцию к относительному снижению у мужчин (58% против 79% у женщин, $p = 0,145$), а также в случаях с размерами опухоли более 2 см (64% против 81% при меньшем размере узла, $p = 0,147$), наличием регионарных метастазов (67% против 84% при их отсутствии, $p = 0,078$), выявлением солидного гистологического варианта ПРЦЖ (50% против 77% в группе с другими вариантами, $p = 0,157$).

При анализе взаимосвязей с *молекулярно-генетическими параметрами* установлена отрицательная ассоциация между наличием мутации *BRAF* V600E и индексом Ki-67 – в группе случаев с повышенной экспрессией этого белка ($\geq 7\%$) частота выявления мутации была

ниже, чем в наблюдениях с низким уровнем пролиферативной активности (58% против 82%, $p = 0,034$, $V = 0,240$). Отмечена тенденция к снижению частоты выявления мутации в группе bcl-2-отрицательных случаев (57% против 81% при позитивной экспрессии, $p = 0,082$).

Анализ взаимосвязи между специфической выживаемостью больных ПРЦЖ и статусом гена *BRAF* не зафиксировал значимых различий: мутация V600E выявлялась в большинстве летальных и контрольных наблюдений практически с одинаковой частотой (80 и 75%, $p = 0,783$). Таким образом, наличие данного генетического повреждения при ПРЦЖ не является прогностически значимым критерием.

Индекс Ki-67 и тип экспрессии HSP70 в формировании прогностических групп пациентов с ПРЦЖ. Усиление пролиферации опухолевых клеток связано с про- и антиапоптотической активностью, а также накоплением канцерогенного стресса (Pechan P.M., 1991). HSP70 и Ki-67 – молекулярно-биологические критерии с самыми высокими значениями статистики Вальда при однофакторном анализе (см. табл. 3). В зависимости от особенностей их экспрессии все пациенты были разделены на шесть групп (табл. 4).

Таблица 4. Распределение наблюдений ПРЦЖ (контроли и случаи) в зависимости от индекса Ki-67 и типа экспрессии HSP70

Группа	Подтип	Тип реакции HSP70	Индекс Ki-67	<i>n</i>	Контроли (<i>n</i> = 62)	Случаи (<i>n</i> = 25)	<i>p</i>		<i>V</i>
I	1	цитоплазм.	< 7%	32	29 (91%)	3 (9%)	1-4: 0,007	1-2: 0,390	0,674
II		цитоплазм.	≥ 7%	4	3 (75%)	1 (25%)	1-5: < 0,001	1-3: 0,618	
III		смешанный	< 7%	25	23 (92%)	2 (8%)	1-6: < 0,001	2-3: 0,143	
IV	2	смешанный	≥ 7%	9	4 (44%)	5 (56%)	2-6: 0,033	2-4: 0,343	
V		ядерный	< 7%	11	3 (27%)	8 (73%)	3-4: 0,007	2-5: 0,143	
VI		ядерный	≥ 7%	6	0 (0%)	6 (100%)	3-5: < 0,001	4-5: 0,370	
							3-6: < 0,001	4-6: 0,092	
								5-6: 0,243	

Анализ показал, что наибольшая доля благоприятных исходов (75–92%) была ассоциирована с цитоплазматической экспрессией HSP70, а также со смешанным типом реакции при Ki-67 < 7% (см. табл. 4). Доля летальных исходов резко возрастала при сочетании смешанной реакции HSP70 с повышением пролиферативной активности (56% в IV группе) и еще больше увеличивалась в наблюдениях с ядерным типом реакции – как при низких значениях индекса Ki-67 (73% случаев в V группе), так и при его повышении в VI группе, где до 10 лет после операции не доживал ни один пациент.

Поскольку при попарном анализе полученных групп статистически значимые различия имели место только между I, II, III группами (с одной стороны) и IV, V, VI группами (с другой), были сформированы два молекулярных подтипа ПРЦЖ (см. табл. 4):

1-й подтип: а) цитоплазматическая реакция HSP70 при любом индексе Ki-67; б) смешанная реакция HSP70 при Ki-67 < 7%;

2-й подтип: а) ядерная реакция HSP70 при любом индексе Ki-67; б) смешанная реакция HSP70 при Ki-67 ≥ 7%.

При оценке влияния подтипа ПРЦЖ на исход заболевания получены статистически значимые различия: 2-й подтип зафиксирован в 76% наблюдений с летальным исходом и только в 11% контрольных случаев ($p < 0,001$). Значения критерия *V* Крамера (0,640) и статистики Вальда (27,2) для комбинированного признака были максимальными среди всех изученных факторов (см. табл. 1, 3) и свидетельствовали о наличии сильной взаимосвязи между молекулярным подтипом и исходом заболевания.

Комбинированная модель индивидуального прогноза выживаемости при ПРЦЖ. Отбор переменных для введения в уравнение логистической регрессии проводили на основании результатов анализа таблиц сопряженности, а также данных однофакторного регрессионного анализа, в результате которого выявлены 11 признаков, имеющих значимую связь с прогнозируемым исходом (в порядке убывания χ^2 Вальда): тип реакции HSP70 (цитоплазматическая или смешанная / ядерная), стадия заболевания (I–II / III–IV), размер опухолевого узла (< 2 см / ≥ 2 см), возраст (< 45_м/50_ж / ≥ 45_м/50_ж лет), индекс Ki-67 (< 7% / ≥ 7%),

статус экспрессии *bcl-2* (позитивная / негативная), инвазия в капсулу щитовидной железы, копияность гена *HER2/Neu* ($< 1,2$ / $\geq 1,2$), солидный гистологический вариант ПРЩЖ, уровень экспрессии *p53* ($< 10\%$ / $\geq 10\%$), пол.

При построении модели применяли метод пошагового включения с ранжированием предикторов по величине статистики Вальда, на заключительном этапе в списке переменных осталось 4 признака. На основании полученных значений коэффициентов регрессии и скорректированных ОШ можно сделать вывод, что тип реакции HSP70, инвазия опухоли в капсулу щитовидной железы, индекс Ki-67 и возраст пациента являются независимыми предикторами специфической выживаемости при ПРЩЖ (табл. 5).

Таблица 5. Независимые переменные, включенные в модель прогноза специфической выживаемости при ПРЩЖ

Переменные		X_{1-4}	β	W	p	Exp(β) (95% ДИ)
1. Тип реакции HSP70	цит./смеш.	0	4,257	8,499	0,004	70,6 (4,0–1235,3)
	ядерная	1				
2. Инвазия в капсулу	нет	0	3,865	8,767	0,003	47,7 (2,2–266,6)
	есть	1				
3. Индекс Ki-67	< 7	0	3,436	8,034	0,005	31,1 (3,7–615,8)
	≥ 7	1				
4. Возраст	$< 45_{м}/50_{ж}$	0	3,196	6,873	0,009	24,4 (2,9–334,3)
	$\geq 45_{м}/50_{ж}$	1				
Константа			-7,424	10,111	0,001	0,001

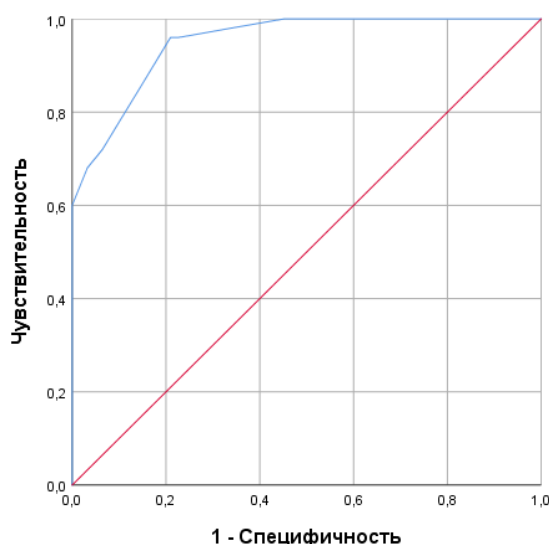
Примечание: X_{1-4} – значения переменных в уравнении; β – коэффициенты регрессии; W – χ^2 Вальда; Exp(β) – отношение шансов.

По результатам регрессионного анализа построена математическая модель прогноза специфической выживаемости больных ПРЩЖ, в которой вероятность наступления события (летального исхода в течение 10 лет после оперативного вмешательства) определяется по формуле: $p = 1 / (1 + e^{-z})$, где $z = -7,424 + 3,196 \times X_1 + 3,865 \times X_2 + 3,436 \times X_3 + 4,257 \times X_4$; здесь $X_1 - X_4$ – значения переменных (см. табл. 5). По умолчанию в качестве порогового уровня для принятия решения о прогнозе летального исхода принималось значение $p = 0,5$.

Оценка общих показателей качества модели позволяет определить ее как статистически значимую при $\chi^2 = 64,73$ ($p < 0,001$). Коэффициент детерминации R^2 Нагелькерке составил 0,755, т. е. изменение зависимой переменной на 75,5% объясняется включенными в модель предикторами. Уровень значимости критерия согласия Хосмера – Лемешова ($p = 0,922$) свидетельствует об адекватной калибровке модели. Точность прогноза на моделирующей выборке составила 88,5%, что указывает на хорошую согласованность с эмпирическими данными.

По данным ROC-анализа, показатель AUC составил 0,950, что подтверждает отличную дискриминирующую способность модели. По результатам анализа (см. рисунок) подобраны пороговые значения, соответствующие различным требованиям: 1) $p = 0,3$ – максимальная чувствительность (96%) при достаточно высокой специфичности (79%) и точности (83,9%); 2) $p = 0,4$ – минимальная разница между чувствительностью (88%) и специфичностью (83,9%); 3) $p = 0,5$ (по умолчанию в модели) – максимальная специфичность (96,8%) при умеренной чувствительности (68%) и максимальной точности (88,5%).

После разделения наблюдений в соответствии с порогами отсека на группы высокого и низкого риска проведен анализ таблиц сопряженности. Полученные значения χ^2 Пирсона, V Крамера и ОШ указывают на высокую статистическую значимость различий ($p < 0,001$) и сильные связи между группами риска и исходом заболевания: 1) $\chi^2 = 41,0$, $V = 0,687$, ОШ = 90,5 (при пороге $p = 0,3$); 2) $\chi^2 = 39,6$, $V = 0,674$, ОШ = 38,1 (при пороге $p = 0,4$); 3) $\chi^2 = 43,8$, $V = 0,709$, ОШ = 63,8 (при пороге $p = 0,5$).



p	Se	Sp	Se + Sp
0,000	1,000	0,000	1,000
0,007	1,000	0,339	1,339
0,016	1,000	0,516	1,516
0,023	1,000	0,548	1,548
0,034	0,960	0,774	1,734
0,176	0,960	0,790	1,750
0,361	0,880	0,839	1,719
0,440	0,720	0,935	1,655
0,488	0,680	0,968	1,648
0,732	0,600	1,000	1,600
0,963	0,480	1,000	1,480
0,975	0,400	1,000	1,400
0,990	0,160	1,000	1,160
1,000	0,000	1,000	1,000

ROC-кривая прогностической эффективности модели прогноза специфической выживаемости при ПРЦЖ. AUC = 0,950 (95% ДИ 0,908–0,992).

Для того чтобы убедиться в оптимальном составе предикторов, дополнительно проанализированы более 10 моделей с использованием метода пошагового исключения при ограничении количества одновременно вводимых переменных до 5–7 в разнообразных сочетаниях. В случаях, когда отобранные признаки включали четыре переменные из первого уравнения, результат работы алгоритма оказывался таким же, как и при пошаговом включении, в остальных вариантах – итоговые модели имели более низкие показатели качества и более высокие значения информационного критерия AIC.

С целью облегчения практического применения алгоритма прогноза протестированы две балльные системы оценки, основанные на присвоении каждому предиктору определенного веса, отражающего его вклад в общую предсказательную способность. В первой системе (МОД₁), с учетом небольших отличий регрессионных коэффициентов (см. табл. 5), вес каждого предиктора был принят за единицу (табл. 6). Во второй системе (МОД₂), построенной на основе скорректированных значений ОШ, положительному значению предиктора присваивалось от 1 до 3 баллов (минимальное значение ОШ принималось за единицу). В обеих системах итоговая сумма баллов для каждого случая служила косвенной оценкой вероятности летального исхода.

Таблица 6. Балльная оценка предикторов специфической выживаемости при ПРЦЖ

Признак		Балльная система	
		МОД ₁ (баллы)	МОД ₂ (баллы)
Тип реакции HSP70	цитоплазматическая, смешанная	0	0
	ядерная	1	3
Инвазия в капсулу	без инвазии	0	0
	инвазия	1	2
Экспрессия Ki-67	< 7%	0	0
	≥ 7%	1	1
Возраст	< 45 лет (м) / 50 лет (ж)	0	0
	≥ 45 лет (м) / 50 лет (ж)	1	1
Максимальное количество баллов		4	7

Сравнение прогностической эффективности и подбор порогов отсечения для выделения групп риска проводили по результатам ROC-анализа. Система МОД₁ имела высокий показатель AUC (0,945); порог 2 балла (0–1/2–4) соответствовал максимальной чувствительности (96,0%) при достаточно высокой специфичности и точности (79 и 83,9% соответственно). Система МОД₂ при чуть меньшем AUC (0,938) была более сбалансированной: порог отсечения 3 балла (0–2/3–7) отличался балансом чувствительности, специфичности

и точности (88, 82,3 и 83,9%); порог отсечения 4 балла (0–3/4–7) характеризовался максимальной специфичностью и точностью прогноза (96,8 и 88,5%) при его умеренной чувствительности (68%).

После разделения наблюдений в соответствии с порогами отсечения на группы высокого и низкого риска проведен анализ таблиц сопряженности. Полученные значения χ^2 Пирсона, V Крамера и ОШ указывают на высокую значимость различий ($p < 0,001$) и сильные связи между группами риска и исходом заболевания: МОД₁ (порог 2 балла) – $\chi^2 = 41,0$, $V = 0,687$, ОШ = 90,5; МОД₂ (порог 3 балла) – $\chi^2 = 37,4$, $V = 0,655$, ОШ = 34,0; МОД₂ (порог 4 балла) – $\chi^2 = 43,8$, $V = 0,709$, ОШ = 63,8.

Таким образом, по данным многофакторного регрессионного анализа, независимыми предикторами неблагоприятного исхода при ПРЦЖ являются (в порядке убывания χ^2 Вальда и ОШ): ядерный тип реакции молекулярного шаперона HSP70, инвазия опухоли в капсулу щитовидной железы, уровень экспрессии Ki-67 выше 7% и возраст пациента более 45 лет для мужчин и 50 лет для женщин. С учетом полученных данных мы предлагаем комбинированную модель расчета вероятности неблагоприятного исхода при ПРЦЖ, включающую эти клинико-морфологические и молекулярно-биологические параметры. Использование данной модели, в том числе с применением упрощенных балльных систем оценки, позволяет более точно определять индивидуальный прогноз при ПРЦЖ в сравнении с отдельными клинико-лабораторными, патоморфологическими и/или биомолекулярными факторами.

ВЫВОДЫ

1. По данным патологоанатомического исследования у пациентов, проживающих в Алтайском крае, установлена значительная вариабельность гистологических вариантов ПРЦЖ с преобладанием классического (62%), реже – фолликулярного (19%), высококлеточного (8%) и солидного (7%). По сравнению с классическим, солидный вариант чаще ассоциирован с мужским полом и крупными размерами опухоли, фолликулярный и высококлеточный – с более частым метастазированием в регионарные лимфоузлы, фолликулярный и солидный – с увеличением доли случаев с III–IV стадиями заболевания.

2. По данным иммуногистохимического исследования, ПРЦЖ характеризуется низкими медианными уровнями экспрессии Ki-67 и p53 (3,3 и 0,5% клеток соответственно), высоким уровнем экспрессии bcl-2 (84% позитивных случаев), преобладанием цитоплазматического (41%) и смешанного (39%) типов реакции HSP70. Повышенные индексы Ki-67 и p53, негативная экспрессия bcl-2 и ядерная реакция HSP70 ассоциированы с увеличением доли случаев старшего возраста, III–IV стадиями заболевания, мужским полом (Ki-67, p53), выявлением солидного варианта ПРЦЖ (Ki-67, p53, bcl-2), более крупными размерами опухоли (Ki-67, bcl-2).

3. Мутации генов *KRAS* (G12A, G12C, G12D, G12R, G12S, G12V, G13D), *PI3K* (H1047R, E545K, E545D, E542K), а также амплификация гена *HER2/Neu* не характерны для ПРЦЖ, в то время как мутация *BRAF* V600E встречается в большинстве наблюдений (75% исследуемой выборки). Статус мутации *BRAF* V600E значимо не ассоциирован с основными клинико-морфологическими характеристиками и специфической выживаемостью при ПРЦЖ.

4. По данным однофакторного регрессионного анализа, статистически значимыми факторами, ассоциированными с неблагоприятным прогнозом специфической выживаемости при ПРЦЖ, являются следующие (в порядке убывания χ^2 Вальда): ядерный тип реакции HSP70, III–IV стадия процесса, размер опухоли более 2 см, возраст старше 45 лет для мужчин и 50 лет для женщин, индекс Ki-67 $\geq 7\%$, отсутствие экспрессии bcl-2, инвазия в капсулу щитовидной железы, копияность гена *HER2/Neu* $< 1,2$, солидный гистологический вариант ПРЦЖ, уровень экспрессии p53 $\geq 10\%$, мужской пол.

5. В зависимости от характера коэкспрессии HSP70 и Ki-67 выделены два молекулярных подтипа ПРЦЖ, тесно ассоциированных с исходом заболевания (V Крамера = 0,64; ОШ = 24,9; χ^2 Вальда = 27,2). К 1-му подтипу относятся цитоплазматический тип реакции

HSP70 (при любом индексе Ki-67) или смешанный тип реакции при Ki-67 < 7%. Ко 2-му подтипу – ядерный тип реакции HSP70 вне зависимости от уровня пролиферативной активности, а также смешанный тип реакции при Ki-67 ≥ 7%.

6. Независимыми предикторами неблагоприятного исхода при ПРЦЖ по данным многофакторного регрессионного анализа являются: ядерный тип реакции молекулярного шаперона HSP70, инвазия опухоли в капсулу щитовидной железы, уровень экспрессии Ki-67 выше 7% и возраст пациента более 45 лет для мужчин и 50 лет для женщин. Построенная на их основе комбинированная прогностическая модель способствует повышению эффективности индивидуального прогнозирования при ПРЦЖ на моделирующей выборке. Модель имеет высокую статистическую значимость ($\chi^2 = 64,73$; $p < 0,001$) и хорошую дискриминирующую способность (AUC = 0,950, точность прогноза 88,5%).

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. С целью более точного индивидуального прогнозирования течения ПРЦЖ рекомендуется в качестве обязательного этапа патоморфологического исследования проводить иммуногистохимический анализ с определением уровня экспрессии Ki-67 и типа реакции HSP70 в клетках опухоли (цитоплазматическая, ядерная, смешанная).

2. После определения индекса Ki-67 относительно пороговой величины 7% и типа реакции HSP70 необходимо определить молекулярный подтип ПРЦЖ, на основании чего можно отнести пациента к группе благоприятного или неблагоприятного прогноза.

3. Для более точного определения индивидуального прогноза рекомендуется применять математическую модель прогноза специфической выживаемости при ПРЦЖ с расчетом вероятности наступления неблагоприятного исхода по формуле в зависимости от значений четырех предикторов и их коэффициентов регрессии. Предикторы модели: ядерный тип реакции молекулярного шаперона HSP70, инвазия опухоли в капсулу щитовидной железы, уровень экспрессии Ki-67 выше 7% и возраст пациента более 45 лет для мужчин и 50 лет для женщин. Положительному значению предиктора присваивается значение 1, отрицательному – 0. В зависимости от требований к чувствительности и специфичности теста можно выбрать один из трех вариантов порога отсечения ($p = 0,3$; $0,4$; $0,5$). После сравнения полученного значения p с порогом отсечения пациента следует отнести к группе благоприятного или неблагоприятного прогноза.

4. Для того чтобы облегчить применение алгоритма прогноза, рекомендуется использовать одну из двух балльных систем оценки вероятности неблагоприятного исхода, в которых положительному значению предиктора присваивается 1 балл (МОД₁) или от 1 до 3 баллов (МОД₂). Затем производится подсчет баллов, итоговая сумма сравнивается с порогом отсечения, который выбирается в зависимости от требований к чувствительности и специфичности теста (0–1 / 2–4 для МОД₁; 0–2 / 3–4 или 0–3 / 4–7 для МОД₂).

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Гервальд В.Я., Климачев В.В., Иванов А.А., Рагулина В.Д., Авдалян А.М., Бобров И.П., Лазарев А.Ф. Рак щитовидной железы // Международный научно-исследовательский журнал. – 2014. – Т. 27, № 8–3. – С. 17–18.

2. Гервальд В.Я., Климачев В.В., Авдалян А.М., Иванов А.А., Бобров И.П., Лепилов А.В., Черданцева Т.М., Мяделец М.Н., Лазарев А.Ф., Таранина Т.С., Самуйленкова О.В., Рагулина В.Д. Рак щитовидной железы и методы его иммуногистохимической диагностики // Фундаментальные исследования. – 2014. – № 10–10. – С. 1911–1917.

3. Иванов А.А., Авдалян А.М., Гервальд В.Я., Лушникова Е.Л., Зоркина Ю.Н., Круглова Н.М., Лазарев А.Ф. Мутация *BRAF* V600E при папиллярном раке щитовидной железы, клинико-морфологические параллели и прогноз // **Российский онкологический журнал**. – 2017. – Т. 22, № 1. – С. 15–20.

4. Панасьян А.У., Кобяков Д.С., Авдалян А.М., Иванов А.А., Лушникова Е.Л., Бакарев М.А., Лазарев А.Ф. Экспрессия маркеров апоптоза (p53, bcl-2, BAX) и пролиферации (Ki-67, топоизомеразы $\text{II}\alpha$, аргирофильных белков ядрышкообразующих районов) в норме и при немелкоклеточном раке легкого и их взаимосвязь с некоторыми клинико-морфологическими параметрами // **Российский онкологический журнал.** – 2017. – Т. 22, № 3. – С. 153–157.

5. Иванов А.А., Авдалян А.М., Бахарев С.Ю., Ракуть Д.В., Лазарев А.Ф. Некоторые биомолекулярные критерии в прогнозе папиллярного рака щитовидной железы // Сборник научных работ III Петербургского международного онкологического форума «Белые ночи 2017» ФГБУ «НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России. – СПб.: Изд-во АННМО «Вопросы онкологии», 2017. – С. 159.

6. Иванов А.А., Авдалян А.М., Гервальд В.Я., Лушникова Е.Л., Зоркина Ю.Н., Круглова Н.М., Лазарев А.Ф. Молекулярные типы в прогнозе папиллярного рака щитовидной железы на основе анализа статуса *BRAF* V600E и индекса экспрессии Ki-67 // **Российский онкологический журнал.** – 2017. – Т. 22, № 4. – С. 188–193.

7. Панасьян А.У., Кобяков Д.С., Авдалян А.М., Иванов А.А., Лушникова Е.Л., Бакарев М.А., Лазарев А.Ф. Взаимосвязь экспрессии белков ALK, HER2 и амплификации гена *HER2* с пролиферативной активностью и выживаемостью при аденокарциноме легкого I–II стадии // **Российский онкологический журнал.** – 2017. – Т. 22, № 4. – С. 209–213.

8. Иванов А.А., Авдалян А.М., Бахарев С.Ю., Ракуть Д.В., Лазарев А.Ф. Некоторые биомолекулярные критерии в прогнозе папиллярного рака щитовидной железы // Злокачественные опухоли. – 2017. – Т. 7, № 3s1. – С. 191.

9. Иванов А.А. Возможность стратификации пациентов с папиллярным раком щитовидной железы на группы прогноза в зависимости от статуса мутации *BRAF* V600E и индекса экспрессии Ki-67 // Сборник материалов XII Всероссийской конференции молодых ученых-онкологов «Актуальные вопросы фундаментальной и клинической онкологии», посвященной памяти академика РАМН Н.В. Васильева. – Томск: Изд-во Томского университета, 2017. – С. 58–60.

10. Иванов А.А., Авдалян А.М., Лушникова Е.Л., Молодых О.П., Зоркина Ю.Н., Круглова Н.М., Лазарев А.Ф. Индекс Ki-67 и тип экспрессии HSP70 в формировании прогностических групп пациентов с папиллярным раком щитовидной железы // **Российский онкологический журнал.** – 2018. – Т. 23, № 2. – С. 90–95.

11. Авдалян А.М., Иванов А.А., Круглова Н.М., Вихлянов И.В. Индекс Ki-67 и тип экспрессии HSP70 при папиллярном раке щитовидной железы, клинико-морфологические особенности // Сборник материалов конференции, посвященной памяти советского и российского ученого Гарри Израйлевича Абелева «Опухолевые маркеры: фундаментальные и клинические аспекты». – Новосибирск: ИПЦ НГУ, 2018. – С. 7–8.

12. Avdalyan A.M., Ivanov A.A., Lushnikova E.L., Molodykh O.P., Vikhlyanov I.V. The relationship of immunoeexpression of KI-67 and HSP70 with clinical and morphological parameters and prognosis of papillary thyroid cancer // **Bulletin of Experimental Biology and Medicine.** – 2020. – Vol. 168, № 5. – P. 688–693. doi: 10.1007/s10517-020-04781-1.