

*В.А. Солодкий¹, А.Д. Каприн², С.А. Иванов², Д.К. Фомин¹, В.К. Боженко¹,
Ф.Е. Севрюков², В.В. Крылов², Е.Л. Джукция¹, Ю.А. Блантер¹, Т.Р. Измайлов¹, О.Н. Авиллов¹*

Возможности дооперационной диагностики йодрезистентности регионарных метастазов дифференцированного рака щитовидной железы

¹ФГБУ «Российский научный центр рентгенорадиологии» Министерства здравоохранения РФ, Москва,

²ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения РФ, Обнинск

В последнее время отмечается рост заболеваемости и выявляемости больных дифференцированным раком щитовидной железы. При этом у ряда пациентов в процессе комбинированного лечения выявляется изначально низкая восприимчивость регионарных метастазов к радиоiodтерапии, либо развивается йодрезистентность в процессе лечения, что значительно ухудшает прогноз. Необходимость выявления на предоперационном этапе больных с радиоiodрезистентностью для обоснования объема хирургического лечения является крайне важной задачей.

Цель исследования. Изучение возможности дооперационной диагностики радиоiodрезистентности регионарных метастазов дифференцированного рака щитовидной железы для определения показаний к профилактической лимфодиссекции на хирургическом этапе лечения.

Материалы и методы. Проанализированы результаты лечения 67 больных дифференцированным раком щитовидной железы, у которых после проведения радиоiodтерапии были выявлены метастазы в шейные лимфатические узлы. В зависимости от результатов посттерапевтической сцинтиграфии пациенты были разделены на две группы: с йод-позитивными (n=32) (первая группа) и йод-негативными (n=35) метастазами (вторая группа). Все больные были оперированы повторно, наличие метастазов было подтверждено морфологически, а также был выполнен анализ экспрессии генов TERT, TG, SLC5, KRT19, KRT5, ERBB2, 2-х референсных генов GUSB и B2M и анализ статуса гена BRAF (поиск мутации V600E).

Результаты. При сравнении результатов молекулярно-генетического исследования в обеих группах обнаружены различия средних значений экспрессии гена SLC5 (NIS), часто-

ты встречаемости гена BRAF дикого типа и, кроме того, отношения частот мутантного (V600E) и немутантного аллелей гена BRAF (p=0,05; p=0,013 и p=0,034). Сочетание 5 показателей: уровня экспрессии генов SLC5, KRT5, ERBB2, немутантного статуса гена BRAF, пропорции числа мутантных (V600E) / немутантных аллелей гена BRAF позволяют предсказать вероятность резистентности регионарных метастазов к радиоiodу — в 90,9% случаев, а — в 75,0% случаев — сохранение их способности к фиксации радиоiodнуклида.

Заключение. Показатели уровня экспрессии генов SLC5, KRT5, ERBB2, немутантный статус гена BRAF, отношение числа мутантных (V600E) / немутантных аллелей гена BRAF в биопсийном (пункционном) материале позволяют до операции предположить, каким может быть прогноз эффективности предстоящей радиоiodтерапии и, при предполагаемой радиоiodрезистентности сформировать показания к профилактической центральной лимфодиссекции. Возможность такого прогноза по результатам исследования первичной опухоли требует дальнейшего уточнения.

Ключевые слова: рак щитовидной железы, йод-позитивные, йод-негативные лимфоузлы, экспрессия генов SLC5, KRT5, ERBB2, мутации V600E гена BRAF, прогностическая модель

Введение

За последнее десятилетие в Российской Федерации количество больных с впервые установленным диагнозом рака щитовидной железы (РЩЖ) выросло с 1168 до 1750 в год [2]. Высокодифференцированный РЩЖ (ВДРЩЖ) составляет до 90-95% от всех типов злокачественных опухолей щитовидной железы (ЩЖ)

[3, 8]. Хирургическое лечение и радиойодтерапия (РЙТ) играют основную роль, особенно при распространенном дифференцированном РЩЖ (ДРЩЖ) и при высоком риске рецидива [6]. Наиболее эффективно воздействие радиойодом у больных молодого возраста с небольшими размерами метастазов [5]. Первичная или приобретенная радиойодрезистентность существенно ухудшает прогноз — 5-летняя болезнь-специфическая выживаемость этих пациентов составляет 66% [3, 7], а 10-летняя выживаемость не превышает 10% [3, 5, 7, 9]. В связи с тем, что в настоящее время судить об отсутствии чувствительности опухоли к радиойоду можно лишь после РЙТ, то есть ретроспективно, а систематическое выполнение профилактических шейных лимфодиссекций практикуется единичными лечебными учреждениями, поиск путей дооперационной диагностики радиорезистентности представляется весьма перспективным.

Материалы и методы

Анализируются результаты лечения 67 больных ДРЩЖ, у которых после проведения РЙТ были выявлены метастазы в шейные лимфатические узлы (ЛУ). В зависимости от результатов посттерапевтической сцинтиграфии пациенты были разделены на две группы: с йод-позитивными (n=32) (первая группа) и йод-негативными (n=35) метастазами (вторая группа). Все больные были оперированы повторно, наличие опухолевого поражения было подтверждено морфологически и при помощи анализа экспрессии генов *TERT*, *TG*, *SLC5*, *KRT19*, *KRT5*, *ERBB2*, 2-х референсных генов *GUSB* и *B2M* и статуса гена *BRAF* (поиск мутации V600E).

Среди пациентов, включенных в исследование, преобладали женщины (n=42; 63%), мужчины составили 37% (n=25). Средний возраст больных составил 51,9±14,06 лет. Распределение обследованных пациентов в зависимости от объема хирургического лечения представлено в табл. 1.

Таблица 1. Виды хирургического вмешательства у больных ДРЩЖ

Объем оперативного вмешательства	Частота	Валидный процент	Накопленный процент
Тиреоидэктомия	5	7,5	7,5
Тиреоидэктомия с лимфаденэктомией	30	44,8	52,3
Повторные операции (боковые лимфодиссекции)	32	47,7	100,0
Итого	67	100,0	-

Как следует из представленных данных, метастатическое поражение шейных ЛУ имело место во всех проанализированных наблюдениях, несмотря на то, что первичное оперативное лечение было формально радикальным. Это обусловлено как вариабельностью расположения ЛУ, так и дефектами хирургической техники.

По данным планового гистологического исследования папиллярный РЩЖ был выявлен у 61 пациента (91,0%), в 9,0% случаев обнаружен фолликулярный вариант РЩЖ.

РЙТ была выполнена 61 пациенту (91,0%), 6 больным (9,0%) осуществлялась диагностическая сцинтиграфия всего тела (СВТ). В 32 случаях (47,8%) по данным постте-

рапевтической сцинтиграфии и СВТ было выявлено накопление радиофармпрепарата (РФП) вне ложа ЩЖ, чему по данным однофотонной эмиссионной компьютерной томографии, совмещенной с рентгеновской компьютерной томографией (ОФЭКТ-КТ), соответствовало накопление в регионарных ЛУ. У 35 (52,2%) больных обнаружены признаки метастатического поражения ЛУ без накопления ¹³¹I, что свидетельствовало об их радиойодрезистентности. Наличие метастазов было подтверждено результатами пункционной биопсии и явилось показанием к лимфаденэктомии.

Интервал от первого до второго хирургического лечения варьировал в пределах от 1 до 60 мес., в среднем составив 9,36±15,11 мес. У 47 пациентов (70,1%) повторное оперативное лечение осуществлялось в срок до 12 мес. У 20 больных (29,9%) повторное хирургическое лечение было выполнено более чем через год.

Количество удаленных при повторном хирургическом лечении ЛУ составило от 4-х до 63-х (в среднем 30,59). У 26 пациентов (38,8%) выявлено прорастание капсулы или тотальное замещение ЛУ опухолевыми массами. У 41 больного (61,2%) капсула ЛУ осталась интактной.

Далее в полученных образцах проводилось определение уровня экспрессии генов и статуса гена *BRAF* (дикий тип/мутация V600E). Процедура от момента получения образца ткани до получения результатов полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией состояла из выделения мРНК из ткани, обратной транскрипции и РВ-ПЦР (ПЦР в «реальном времени» или количественная ПЦР). Определение мутации V600E в гене *BRAF* проводилось методом цифровой капельной ПЦР (ddPCR). Анализ и учет результатов выполнялся в программе «Quanta Self 16» и MS Excel 2010.

Результаты и обсуждение

Исследовалась экспрессия 8 генов: ингибитора апоптоза *TERT*, тиреоглобулина *TG*, натрий-йодного симпортера *NIS SLC5*, кератина 19 *KRT19*, кератина 5 *KRT5*, онкогена *ERBB2* и 2-х референсных генов *GUSB* и *B2M*. Распределение средних значений экспрессии генов и частоты встречаемости мутации гена *BRAF* V600E в метастатических лимфоузлах показано в табл. 2.

Таблица 2. Средние значения экспрессии генов и частоты встречаемости мутации *BRAF* V600E

Гены	Среднее	Среднее кв. отклонение	N
TG	7,6500	2,66716	67
SLC5 (NIS)	4,1936	5,69500	67
KRT19	7,3784	3,22851	67
KRT5	7,6623	9,72643	67
ERBB2	3,3917	1,10207	67
TERT	7,3765	11,55798	67
BRAF V600E	25,5529	62,34900	67
BRAF дикого типа	404,0647	495,93174	67
BRAF V600E / BRAF дикого типа	0,0809	0,14216	67

Как видно из данных, приведенных в табл. 2, распределение среднеквадратичного отклонения оказалось неравнозначным. При наличии в метастатических ЛУ аллелей гена *BRAF* дикого

Таблица 3. Экспрессия генов, мутантный статус гена *BRAF* (V600E) и морфологические характеристики удаленных метастазов

	TG	<i>SLC5</i> (NIS)	<i>KRT19</i>	<i>KRT5</i>	<i>ERBB2</i>	<i>TERT</i>	<i>BRAF</i> V600E	<i>BRAF</i> (дикого типа)	<i>BRAF</i> V600E/ <i>BRAF</i> (дикого типа)	Всего метастатических ЛУ	Размер ЛУ	Прорастание капсулы	
P (Значимость)	0,044	0,038	0,183	0,146	0,161	0,180	0,000	0,014	0,000	0,233	0,102	0,181	
99% ДИ	Нижняя граница	0,039	0,033	0,173	0,137	0,152	0,170	0,000	0,011	0,000	0,222	0,094	0,171
	Верхняя граница	0,050	0,043	0,193	0,155	0,171	0,190	0,001	0,017	0,000	0,244	0,109	0,191

Таблица 4. Сравнительная оценка средних величин экспрессии генов и частоты встречаемости мутации гена *BRAF* V600E в первой и второй группах

Гены	Йоднегативные пациенты	Йодпозитивные пациенты	t-value	p
TG	7,1801	8,4109	-1,57928	0,120840
<i>SLC5</i> (NIS)	3,4566	6,6875	-1,95433	0,056501
<i>KRT19</i>	7,5610	8,4797	-0,98742	0,328389
<i>KRT5</i>	7,6912	11,0078	-0,98526	0,558728
<i>ERBB2</i>	3,2110	3,4469	-0,58884	0,558728
<i>TERT</i>	7,7544	6,5453	0,33726	0,737390
<i>BRAF</i> V600E/ <i>BRAF</i> дикого типа	0,1002	0,0182	2,17674	0,034558
<i>BRAF</i> дикого типа	300,8206	843,7667	-2,57955	0,013081
<i>BRAF</i> V600E	27,5588	3,6467	1,62490	0,110872

Таблица 5. Тест двух независимых выборок (F-критерий Фишера)

	F	p	p (двухсторонняя)	95% ДИ	
				Нижняя	Верхняя
TG	0,327	0,570	0,108	-2,75480	0,28274
					0,101
<i>SLC5</i> (NIS)	5,380	0,025	0,058	-6,33713	0,11508
					0,171
<i>KRT19</i>	0,037	0,848	0,369	-2,63824	0,99854
					0,393
<i>KRT5</i>	1,276	0,264	0,422	-9,29210	3,95387
					0,462
<i>ERBB2</i>	0,559	0,458	0,510	-1,03925	0,52307
					0,540
<i>TERT</i>	0,374	0,543	0,650	-5,41329	8,60152
					0,623
<i>BRAF</i> V600E	2,573	0,115	0,141	-7,39440	50,27455
					0,045
<i>BRAF</i> дикого типа	9,744	0,003	0,009	-963,16852	-143,50280
					0,073
<i>BRAF</i> V600E/ <i>BRAF</i> дикого типа	4,395	0,041	0,032	0,00714	0,15382
					0,005
Количество метастатических ЛУ	0,883	0,352	0,384	-9,762	3,821
					0,450
Размер ЛУ	9,434	0,003	0,046	-11,027	-0,091
					0,104
Прорастание капсулы	1,395	0,243	0,236	-0,472	0,119
					0,248

типа и гена *BRAF* с мутацией V600E среднее квадратичное отклонение было более выраженным (495,93 и 62,34).

Оценка статистической значимости методом Монте-Карло экспрессии генов, мутантного статуса гена *BRAF* V600E, а также макро- и микроскопических параметров, удаленных ЛУ (количество, размер, прорастание капсулы) представлена в табл. 3.

Уровень экспрессии генов *TG*, *SLC5* (NIS), количество мутантных аллелей гена *BRAF* (V600E), количество аллелей гена *BRAF* дикого типа и отношение количества мутантных аллелей *BRAF* V600E к количеству аллелей гена *BRAF* дикого типа характеризовались статистической значимостью ($p=0,044$; $p=0,038$; $p=0,000$; $p=0,014$ и $p=0,000$, соответственно). Напротив, в отношении экспрессии генов *TERT*, *KRT19*, *KRT5*, *ERBB2*, такой зависимости выявлено не было.

Далее мы провели сравнительный анализ экспрессии генов и частоты встречаемости мутации гена *BRAF* V600E в зависимости от способности опухолевой ткани к захвату радиоiodа (табл. 4).

Как следует из представленных данных, частота встречаемости мутаций гена *BRAF* V600E у больных второй группы оказалась выше почти в 8 раз по сравнению с пациентами с йод-позитивными метастазами ($p=0,11$). Частота встречаемости аллелей *BRAF* дикого типа также существенно отличалась (300,8 и 843,7 при резистентности и чувствительности к радиоiodу соответственно, $p=0,013$). Различия средних величин экспрессии генов (*TG*, *TERT*, *KRT19*, *KRT5*, *ERBB2*) оказались незначимыми.

При детальном анализе двух независимых выборок (первая и вторая группы) нами использовался F-критерий Фишера (табл. 5).

Согласно представленным данным, различия выявлены в отношении экспрессии гена *SLC5* (NIS) ($p=0,025$), по частоте встречаемости гена *BRAF* дикого типа ($p=0,003$), по отношению частоты мутантных (V600E) и немутантных аллелей гена *BRAF* ($p=0,041$), максимальному размеру ЛУ ($p=0,003$).

Показатели средних величин экспрессии генов *TG*, *KRT19*, *KRT5*, *ERBB2*, *TERT*, числа мутаций *BRAF* V600E, пораженных лимфоузлов и прорастания капсулы значимо не различались.

На основании проведенного исследования экспрессии генов *SLC5* (NIS), *KRT5*, *ERBB2*, наличия/ отсутствия мутаций гена *BRAF* V600E, отношения частоты мутантных (V600E) / немутантных аллелей гена *BRAF* в метастатических ЛУ предложена следующая прогностическая модель (табл. 6).

Определение экспрессии генов *SLC5*, *KRT5*, *ERBB2*, статуса гена *BRAF* (дикий тип), отношения числа мутантных (V600E) и немутантных аллелей гена *BRAF* в метастатических ЛУ позволяет предсказать вероятность накопления или ненакопления ими РФП в 85,7% случаев. При этом разработанная модель может предсказать нечувствительность лимфоузлов к ^{131}I в 90,9% случаев, а накопление РФП — в 75,0% наблюдений. Стоит отметить, что в данной прогностической модели основной вклад вносит определение статуса гена *BRAF* (немутантный статус гена *BRAF* и отношение количества мутантных аллелей V600E к количеству немутантных аллелей гена *BRAF*, $p=0,005$ и $p=0,003$).

Заключение

Предложенная модель прогнозирования радиорезистентности метастазов в шейных ЛУ по-

Таблица 6. Прогностическая модель выделенных подгрупп (логистическая регрессия)

N=67	Число вариантов в модели: 5; кодировка для 2-х групп сравнения: 0 — йоднегативные, 1 — йодпозитивные Wilks Lambda: 66100 approx. F (5,43)=4,4106 p< 0,0025					
	Wilks Lambda	Partial Lambda	F-remove (1,43)	p-value	Toler.	1-Toler. (R-Sqr.)
<i>SLC5</i> (NIS)	0,661397	0,999401	0,025768	0,873219	0,732956	0,267044
<i>KRT5</i>	0,682341	0,968726	1,388218	0,245186	0,708233	0,291767
<i>ERBB2</i>	0,745834	0,886258	5,518625	0,023479	0,555589	0,444412
<i>BRAF</i> дикого типа	0,794582	0,831886	8,689774	0,005154	0,792465	0,207535
<i>BRAF</i> V600E/ <i>BRAF</i> дикого типа	0,809710	0,816343	9,673914	0,003313	0,611502	0,388498
Группа	Классификационная матрица Ряды: наблюдаемые классификации Столбцы: предсказанные классификации					
	Percent Correct		G_1:0 p=0,50000		G_2:1 p=0,50000	
G_1:0	90,90909		31		7	
G_2:1	75,00000		4		25	
Всего	85,71429		35		32	

зволяет предсказать вероятность отсутствия или наличия события в 85,7% случаев, при этом йодрезистентность — в 90,9% случаев, а фиксацию ¹³¹I в ЛУ — в 75,0% случаев. Немутантный статус гена BRAF и отношение числа мутантных/немутантных аллелей гена BRAF являются в этом отношении наиболее значимыми показателями ($p=0,005$ и $p=0,003$). Возможность такого прогноза по результатам исследования первичной опухоли требует дальнейшего уточнения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Авилов О.Н., Солодкий В.А., Фомин Д.К., Измайлов Т.Р. Йодрезистентный рак щитовидной железы: патогенез и подходы к лечению. // Вестник «Российского научного центра рентгенодиагностики». 2017. — №3. [<http://vestnik.rncrr.ru/vestnik/v17/docs/avilov.pdf>].
2. Злокачественные новообразования в России в 2015 году (заболеваемость и смертность) / Под ред. А.Д. Каприна, В.В. Старинского, Г.В. Петровой — М.: МНИ-ОИ им. П.А. Герцена — филиал ФГБУ «НМИРЦ» Минздрава России, 2017. — 250 с.
3. Румянцев П.О. Рефрактерность высококодифференцированного рака щитовидной железы к лечению радиоактивным йодом // Опухоли головы и шеи. — 2013. — Т. 3. — С. 11-15.
4. Румянцев П.О., Фомин Д.К., Румянцева У.В. Критерии резистентности высококодифференцированного рака щитовидной железы к терапии радиоактивным йодом // Опухоли головы и шеи. — 2014. — Т. 3. — С. 4-9.
5. Durante C., Haddy N., Baudin E. et al. Long-term outcome of 444 patients with distant metastases from papillary and follicular thyroid carcinoma: benefits and limits of radioiodine therapy // J. Clin. Endocrinol. Metab. — 2006. — Vol. 91. — P. 2892-2899.
6. Haugen B.R., Alexander E.K., Bible K.C. et al. 2015 American Thyroid Association Management Guidelines for Adult Patients with Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer: The American Thyroid Association Guidelines Task Force on Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer // Thyroid. — 2016. — Vol. 26. — № 1. — P. 1-133.
7. Nixon I., Whitcher M., Palmer F. et al. The impact of distant metastases at presentation on prognosis in patients with differentiated carcinoma of the thyroid gland // Thyroid. — 2012. — Vol. 22. — P. 884-889.
8. Pellegriti G., Frasca F., Regalbuto C. et al. Worldwide increasing incidence of thyroid cancer: update on epidemiology and risk factors // J. Cancer Epidemiol. — 2013. — Vol. 2013. — Article ID: 965212.
9. Robbins R., Wan Q., Grewal R. et al. Real-time prognosis for metastatic thyroid carcinoma based on 2-[18f] fluoro-2-deoxy-d-glucose-positron emission tomography scanning // J. Clin. Endocrinol. Metab. — 2006. — Vol. 91. — P. 498-505.

Поступила в редакцию 10.09.2018 г.

V.A. Solodkij¹, A.D. Kaprin², S.A. Ivanov²,
D.K. Fomin¹, V.K. Bozhenko¹, F.E. Sevryukov²,
V.V. Krylov², E.L. Dzhikiya¹, Y.A. Blanter¹,
T.R. Izmajlov¹, O.N. Avilov¹

Possibilities of preoperative diagnosis of iodine resistance regional lymph nodes metastases of differentiated thyroid cancer

¹Federal State Budgetary Institution Russian Scientific Center of Roentgenradiology (RSCRR) of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation (Russian Scientific Center of Roentgenradiology),

²The Federal State Budgetary Institution National Medical Research Radiological Center of the Ministry of Health of the Russian Federation (The FSBI NMRRC of the Ministry of Health of Russia)

Summary. Recently, there has been an increase in the incidence and detectability of patients with differentiated thyroid cancer. At the same time in a number of patients in the combined treatment, initially low susceptibility of regional metastases to radioiodine therapy is revealed, or iodine resistance develops during treatment, which significantly worsens the prognosis. The need to identify patients with radioiodine resistance at the preoperative stage to justify the scope of surgical treatment is an extremely important task.

Objective of research. The research was developed to examine the possibility of preoperation diagnostics of iodine-refractory regional metastases for in patients with differentiated thyroid cancer. A number of patients with differentiated thyroid cancer develop iodine-refractory regional metastases, which significantly worsens the prognosis. Given contradictory attitude towards prophylactic lymph node dissection in the central neck area and an increase in the number of organ-preserving operations, we have searched for a method of preoperative diagnosis of radioiodine-resistance.

Materials and methods. The results of treatment of 67 patients with differentiated thyroid cancer were analyzed, which after radioiodine therapy metastases in cervical lymph nodes were revealed. Depending on the results of post-therapy scintigraphy, patients were divided into two groups: with iodine-positive ($n = 32$) (first group) and iodine-negative ($n = 35$) metastases (second group). All patients were operated on again, the presence of metastases was confirmed morphologically, and the expression of the TERT, TG, SLC5, KRT19, KRT5, ERBB2, 2 reference genes GUSB and B2M was analyzed and the status of the BRAF gene (mutation search V600E).

Results. When comparing the results of molecular genetic studies in both groups, differences in the average expression of the SLC5 gene (NIS), the frequency of the wild-type BRAF gene, and, in addition, the ratios of the mutant (V600E) and non-mutated alleles of the BRAF gene ($p = 0,05$; $p = 0,013$ and $p = 0,034$). The combination of 5 indicators: the expression level of SLC5, KRT5, ERBB2, the non-mutated status of the BRAF gene, the proportion of the mutant (V600E) / non-mutant alleles of the BRAF gene, predict the probability of resistance of regional metastases to radioiodine — in 90,9% of cases, and in 75,0% of cases — preservation of their ability to fix the radionuclide.

The conclusion. The level of SLC5, KRT5, ERBB2 gene expression, the non-mutated status of the BRAF gene, the ratio of the number of mutant (V600E) / non-mutant alleles of the BRAF gene in the biopsy material allow before the operation to predict the effectiveness of the forthcoming radioiodine therapy and, at supposed resistance radioiodine therapy to form indications to prophylactic lymph node dissection in the central neck area. The possibility of such a prognosis based on the results of a primary tumor study requires further clarification.

Key words: differentiated thyroid cancer, iodine-positive and iodine-negative lymph nodes, expression of the SLC5, KRT5, ERBB2 genes, mutations of the BRAF gene V600E, prediction model