

## ОПТИМИЗАЦИЯ ПРОГНОЗА РАЗВИТИЯ РАННИХ РЕЦИДИВОВ ЛОКАЛИЗОВАННОГО РАКА ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Альникин А.Б.

*ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Минздрава России, Ростов-на-Дону,  
e-mail: alnikin\_ab@rostgmu.ru*

**Цель исследования:** определить прогностическую информативность содержания и экспрессии фибронектина 1 в опухоли для формирования прогноза в отношении развития рецидивов рака щитовидной железы. Обследованы 63 пациента с впервые выявленным раком щитовидной железы 1-й (n=49) и 2-й стадий (n=14). Концентрацию фибронектина 1 в гомогенате ткани определяли с помощью иммуноферментного анализа. Оценку экспрессии фибронектина в опухолевых клетках и перифокальной зоне осуществляли иммуногистохимическим методом. За 2 года наблюдения в клинической группе у 7 (11,1%) пациентов был выявлен рецидив заболевания. Результаты лабораторного и иммуногистохимического исследования ретроспективно сопоставляли с фактом рецидива заболевания. У пациентов с развитием рецидива заболевания уровень фибронектина 1 был выше на 17,5% ( $p<0,001$ ) по сравнению с безрецидивным течением болезни. Исходное повышение фибронектина 1 в гомогенате опухоли у больных с развитием рецидивов было обусловлено гиперэкспрессией протеина раковыми клетками. При превышении концентрации фибронектина 1 в гомогенате опухолевого образца более 136,4 нг/мл с диагностической чувствительностью 99,87% и специфичностью 76,79% можно заключить о высоком риске рецидива заболевания у больных раком щитовидной железы. Прогностическая информативность определения фибронектина 1 в гомогенате опухоли высокая и может быть использована для выявления больных с высоким риском рецидива заболевания после операции.

Ключевые слова: рак щитовидной железы, рецидив, биологические маркеры, прогностическая информативность, фибронектин 1.

## OPTIMIZATION OF PROGNOSIS OF EARLY RECURRENCES OF LOCALIZED THYROID CANCER

Alnikin A.B.

*«Rostov state medical university» of Ministry of Health of the Russian Federation, Rostov-on-Don, e-mail:  
alnikin\_ab@rostgmu.ru*

**Aim:** to determine the prognostic information value of the content and expression of fibronectin 1 in the tumor to form a prognosis regarding the development of relapses of thyroid cancer. 63 patients with newly diagnosed thyroid cancer of stages 1 (n=49) and 2 (n=14) were examined. The concentration of fibronectin 1 in the tissue homogenate was determined using an enzyme-linked immunosorbent assay. The expression of fibronectin in tumor cells and the perifocal zone was assessed by immunohistochemical method. During 2 years of observation in the clinical group, 7 (11,1%) patients had a relapse of the disease. The results of laboratory and immunohistochemical studies were retrospectively compared with the fact of disease relapse. In patients with relapse of the disease, the level of fibronectin 1 was higher by 17,5% ( $p<0,001$ ) compared with the non-relapse course of the disease. The initial increase in fibronectin 1 in tumor homogenate from patients with relapses was due to overexpression of the protein by cancer cells. If the concentration of fibronectin 1 in the homogenate of the tumor sample exceeds more than 136,4 ng/ml with a diagnostic sensitivity of 99,87% and specificity of 76,79%, we can conclude that there is a high risk of disease relapse in patients with thyroid cancer. The prognostic information value of fibronectin 1 determination in tumor homogenate is high and can be used to identify patients at high risk of disease relapse after surgery.

Keywords: thyroid cancer, relapse, biological markers, prognostic information, fibronectin 1.

Рак щитовидной железы (РЩЖ) является наиболее распространенным эндокринным злокачественным новообразованием. Среди всех онкологических заболеваний РЩЖ встречается от 1 до 4% случаев [1]. При правильном лечении дифференцированный РЩЖ имеет благоприятный прогноз по сравнению с другими злокачественными новообразованиями. 20-летняя выживаемость больных дифференцированным РЩЖ

приближается к 90% [2]. Для медуллярного РЩЖ характерны агрессивное течение, раннее и обширное метастазирование, худший прогноз в отношении выживаемости по сравнению с дифференцированными гистотипами опухоли [3]. Учитывая высокую выживаемость большинства больных РЩЖ, важное значение приобретает частота рецидивов злокачественного заболевания. Выявление опухолевого поражения в лимфоузлах и отдаленных органах после 6 месяцев от начала специализированного лечения приравнивается к рецидиву болезни [3]. Авторами исследования на большой выборке пациентов установлено, что из 784 больных дифференцированным РЩЖ после хирургического лечения рецидивы заболевания встречались в 32,5% случаев. В преобладающем большинстве (84,3%) рецидивы наблюдались у пациентов с папиллярным РЩЖ и в 15,7% – при фолликулярной карциноме щитовидной железы. В 46,7% случаев рецидивы были диагностированы в первые 12 месяцев после операции. В 68,3% случаев рецидивы были выявлены в области оперативного вмешательства и в 20,7% – в отдаленных органах [2].

К настоящему моменту обозначен узкий круг биомаркеров, используемых для диагностики злокачественных заболеваний щитовидной железы, послеоперационной оценки эффективности хирургических и радиоабляционных воздействий или химиотерапевтического лечения [4]. К ним можно отнести кальцитонин, тиреоглобулин, антитела к тиреоглобулину. При этом отмечается недостаточное количество биомаркеров, разделяющих на хирургическом этапе лечения злокачественные поражения низкого и высокого риска прогрессирования. Сложилась практическая потребность в выявлении молекулярных биомаркеров, которые могут дополнить традиционные методы послеоперационного наблюдения и помочь своевременно выделить группу высокого риска больных с неблагоприятным течением болезни.

Цель исследования – определить прогностическую информативность содержания и экспрессии фибронектина 1 в опухоли для формирования прогноза в отношении развития рецидивов РЩЖ.

### **Материал и методы исследования**

Исследование проведено на 63 больных с впервые выявленным РЩЖ 1-й (n=49) и 2-й стадий (n=14). Число женщин в группе составило 51 (81%), а мужчин – 12 (19%). Средний возраст больных соответствовал  $47,9 \pm 1,8$  года и колебался от 22 до 64 лет. Критерием включения пациентов в исследование явилось отсутствие экстращитовидной инвазии опухоли, а также локорегиональных и отдаленных метастазов. Критерии исключения – противоопухолевое лечение до операции, наличие онкологических заболеваний иной локализации. По итогам гистологического исследования операционных образцов опухолевых образований папиллярная карцинома встречалась в 69,8% случаев (n=44), фолликулярная

карцинома – в 20,6% случаев (n=13), медуллярный рак щитовидной железы – в 9,5% случаев (n=6). Распределение больных в зависимости от стадии pTNM по итогам послеоперационного обследования было следующим: T1aN0M0 – 7 (11,1%), T1bN0M0 – 13 (20,6%), T2N0M0 – 24 (38,1%), T3aN0M0 – 19 (30,2%). Всем пациентам клинической группы проводили радикальное хирургическое лечение.

Все больные подписывали добровольное информированное согласие на участие в исследовании. Исследование одобрено Локальным этическим комитетом ФГБОУ «Ростовский государственный медицинский университет» Минздрава России.

Для приготовления гомогената опухоли образцы тканей помещали на лед и доставляли в лабораторию. Образцы опухоли и нормальной ткани гомогенизировали в фосфатно-солевом буфере PBS (EURx, Польша) в соотношении 9:1 (объем PBS / вес ткани). Гомогенизацию проводили с помощью гомогенизатора Bio-Gen PRO200 (PRO Scientific Inc., США) при скорости 10000 об/мин. После центрифугирования отбирали супернатант.

Для определения концентрации фибронектина 1 в гомогенате ткани применяли иммуноферментный анализ. При этом использовали набор Fibronectin ELISA Kit (Technoclone, США).

Оценку экспрессии фибронектина в опухолевых клетках и перифокальной зоне осуществляли иммуногистохимическим методом. Операционные образцы опухолевой ткани фиксировали в 10%-ном забуференном формалине в течение 24 часов, а затем заливали в парафин. Гистологические срезы толщиной 4 мкм обрабатывали с помощью набора Histostain-Plus (Invitrogen, США). При оценке экспрессии фибронектина использовали кроличьи моноклональные антитела на фибронектин человека (DakoCytomation, Дания) в разведении 1:1000. В случаях положительного окрашивания фибронектина 1 гранулы локализовались в цитоплазме. Образцы исследовали под микроскопом с увеличением x400. Оценку экспрессии осуществляли путем подсчета числа окрашенных клеток: 0 баллов – менее 25% окрашенных клеток, 1 балл – 25–50%, 2 балла – 51–75%, 3 балла – более 75%.

За 2 года наблюдения в клинической группе у 7 (11,1%) пациентов был выявлен рецидив заболевания. Результаты лабораторного и иммуногистохимического исследования ретроспективно сопоставляли с фактом рецидива заболевания.

Статистическую обработку результатов осуществляли с помощью программ Statistica 12.0 (StatSoft, США) и MedCalc (Software Ltd, США).

### **Результаты исследования и их обсуждение**

Клеточная нерастворимая форма фибронектина 1 является основным компонентом внеклеточного матрикса. Доказано, что фибронектин 1 участвует в развитии карцином желудка [5], молочной железы [6], толстой кишки [7], щитовидной железы [8],

светлоклеточного рака почки [9]. При этом экспрессия фибронектина 1 в раковых клетках повышена [10]. Адгезия клеток карциномы к фибронектину 1 усиливает туморогенность и придает устойчивость к химиотерапевтическим агентам, индуцирующим апоптоз [10]. Фибронектин 1 рассматривают как потенциальный биомаркер радиорезистентности, его экспрессию анализируют при формировании прогноза течения злокачественного заболевания [11].

В гомогенате опухоли у больных РЦЖ всей группы медиана концентрации фибронектина 1 составила 128,9 нг/мл с межквартильным диапазоном 110,3–156,5 нг/мл. В подгруппе пациентов с развитием рецидива заболевания уровень фибронектина 1 соответствовал 149,3 [139,4–158,2] нг/мл и был выше на 17,5% ( $p < 0,001$ ) по сравнению с безрецидивным течением болезни (127,1 [109,4–148,1] нг/мл (рис. 1).

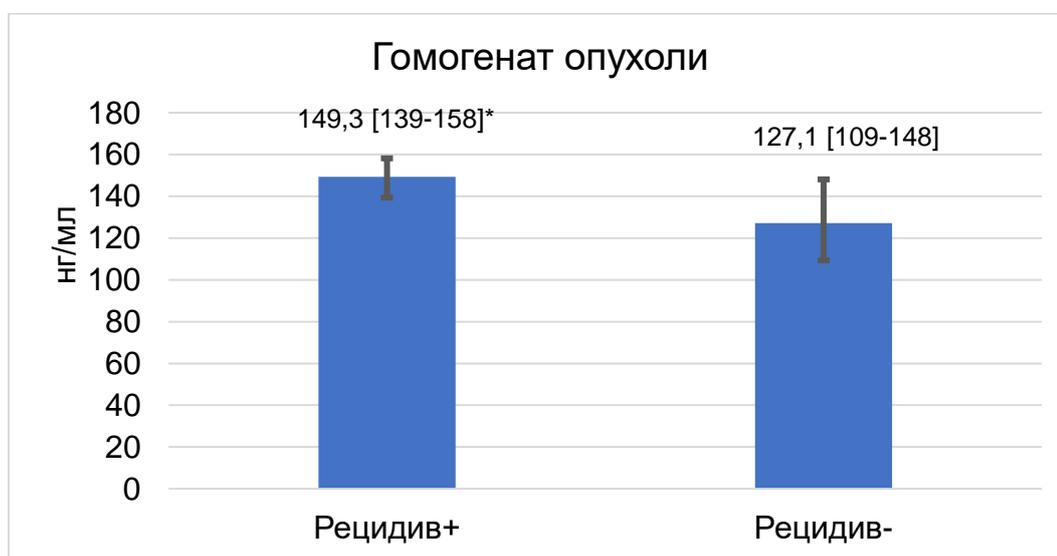


Рис. 1. Концентрация фибронектина 1 (медиана и межквартильный диапазон) в гомогенате опухоли операционных образцов у больных РЦЖ в зависимости от последующего развития рецидива заболевания. \* – статистически значимые различия по критерию Манна–Уитни

В гомогенате опухолевой ткани уровень фибронектина 1 возрастал от Т1 до Т3 соответственно от 114,5 [111,2–118,9] нг/мл до 135,7 [131,3–139,7] нг/мл ( $p = 0,002$ ) (табл. 1).

Таблица 1

Концентрация фибронектина 1 в гомогенате опухоли у больных РЦЖ в зависимости от клинических характеристик заболевания

Признак	Ранг признака	Фибронектин 1 в гомогенате опухоли, нг/мл		p
		Медиана	[25–75]	
Стадия Т	Т1а (n=7)	114,5	[111,2–118,9]	0,002
	Т1б (n=13)	117,4	[113,7–124,8]	

	T2 (n=24)	129,1	[126,5–134,1]	
	T3a (n=19)	135,7	[131,3–139,7]	
Диаметр опухоли	До 2 см (n=20)	115,4	[111,6–118,2]	0,001
	Более 2 см (n=43)	132,6	[127,3–138,1]	
Гистотип опухоли	ПК (n=32)	128,2	[123,6–133,4]	0,218
	ФК (n=13)	124,3	[121,8–129,6]	
	ФВ ПК (n=12)	127,9	[123,5–134,5]	
	МК (n=6)	134,7	[130,2–138,7]	
Онкогенные мутации	Есть (n=32)	136,9	[133,5–140,2]	<0,001
	Нет (n=31)	118,0	[111,5–124,7]	

Примечание: [25-75] – межквартильный диапазон, p – уровень значимости определен по критерию Краскела–Уоллиса при сравнении показателей четырех рангов и Манна–Уитни при попарном сравнении.

При диаметре опухоли более 2 см концентрация биомаркера в изучаемой среде была на 15% выше ( $p=0,001$ ) по сравнению с пациентами, у которых размер опухоли в диаметре составлял менее 2 см (табл. 1). Концентрация фибронектина 1 в опухоли у больных РЦЖ статистически значимо не зависела от гистологического типа опухоли (табл. 1). При наличии онкогенных генетических мутаций в генах *BRAF*, *KRAS*, *NRAS*, *HRAS*, *TERT*, *RET*, *PTC*, *PAX8*, *PPARG* уровень фибронектина 1 в опухолевом гомогенате был выше на 16% ( $p<0,001$ ), в отличие от пациентов с отсутствием мутаций (табл. 1).

Таким образом, концентрация фибронектина 1 в опухолевом гомогенате зависела от размера опухоли, наличия онкогенных мутаций и развития рецидива заболевания в последующем.

Поскольку фибронектин 1 является компонентом внеклеточного матрикса, на следующем этапе проводили оценку экспрессии белка в опухолевой ткани и в перифокальной зоне. При иммуногистохимическом исследовании экспрессии фибронектина 1 в опухолевой ткани установлено, что гиперэкспрессия изучаемого белка опухолевыми клетками наблюдалась в половине случаев (49,2%). Умеренная экспрессия белка раковыми клетками имела место в 44,4% случаев, а низкая экспрессия – в 6,3%. В перифокальной зоне в большинстве случаев (74,6%) экспрессия фибронектина 1 клетками была низкой (табл. 2).

Таблица 2

Распределение больных РЦЖ в зависимости от выраженности экспрессии фибронектина 1 в опухолевой ткани и перифокальной зоне

Экспрессия, баллы	Опухолевая ткань, абсолютное число (%)	Перифокальная зона, абсолютное число (%)	p
0	–	6 (9,5)	
1	4 (6,3)	47 (74,6)	

2	28 (44,4)	10 (15,9)	p<0,001 ( $\chi^2=81,78$ )
3	31 (49,3)	–	
Всего	63 (100,0)	63 (100,0)	

Примечание: доверительную вероятность p определяли путем сравнения трех долей по критерию Пирсона с поправкой Йетса на непрерывность.

У всех больных с рецидивами злокачественного заболевания в ближайшие 2 года после операции наблюдалась исходная гиперэкспрессия фибронектина 1 раковыми клетками (табл. 3).

Таблица 3

Распределение больных РЦЖ в зависимости от выраженности экспрессии фибронектина 1 в опухолевой ткани

Опухолевая экспрессия, баллы	Рецидив есть, абсолютное число (%)	Рецидива нет, абсолютное число (%)	p
0	0	0	p=0,017 ( $\chi^2=8,13$ )
1	0	4 (7,1)	
2	0	28 (50,0)	
3	7 (100,0)	24 (42,9)	
Всего	7 (100,0)	56 (100,0)	

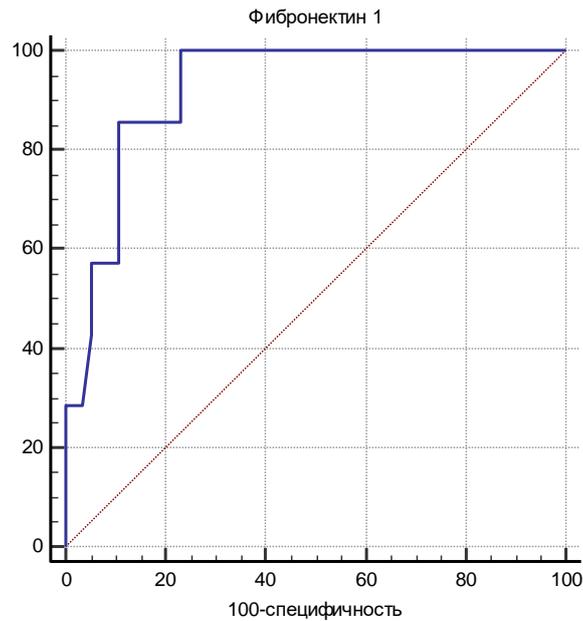
Примечание: доверительную вероятность p определяли путем сравнения трех долей по критерию Пирсона с поправкой Йетса на непрерывность.

Следовательно, исходное повышение фибронектина 1 в гомогенате опухоли у больных с последующим развитием рецидивов было обусловлено гиперэкспрессией протеина раковыми клетками.

Поскольку содержание фибронектина 1 в опухолевом гомогенате у пациентов с рецидивами заболевания отличалось от аналогичного показателя у пациентов при безрецидивном течении, на следующем этапе оценивали прогностическую информативность маркера с помощью ROC анализа.

Больным с рецидивами заболевания присваивали ранг 1, а без рецидивов – ранг 0. Далее сопоставляли чувствительность и специфичность разделения пациентов на два ранга при различных концентрациях фибронектина 1 в гомогенате опухоли.

Разделительный уровень фибронектина 1 в супернатанте опухоли составил 136,4 нг/мл. При превышении концентрации фибронектина 1 в гомогенате опухолевого образца более 136,4 нг/мл с диагностической чувствительностью 99,87% и специфичностью 76,79% можно говорить о высоком риске рецидива заболевания у больных РЦЖ (рис. 2).



*Рис. 2. Сопоставление чувствительности и специфичности оценки риска рецидива РЩЖ по содержанию фибронектина 1 в гомогенате опухоли*

Площадь под ROC кривой до опорной линии имела величину  $0,922 \pm 0,039$  (доверительный интервал  $0,826-0,975$ ) и значимо отличалась от диагонали ( $z=10,839$  при  $p<0,001$ ).

При превышении в гомогенате опухоли уровня  $136,4$  мкг/мл риск рецидива РЩЖ повышался в  $4,31$  раза ( $p<0,001$ ).

Таким образом, прогностическая информативность определения фибронектина 1 в гомогенате опухоли высокая и может быть использована для выявления больных с выраженным риском рецидива заболевания после операции.

### **Выводы**

1. Повышение концентрации фибронектина 1 в гомогенате опухоли операционных образцов ткани вследствие усиления экспрессии белка раковыми клетками ассоциировано с последующим развитием рецидива локализованного рака щитовидной железы.

2. При превышении концентрации фибронектина 1 в гомогенате опухолевого образца более  $136,4$  нг/мл риск развития рецидива заболевания в ближайшие два года после операции у больных локализованным раком щитовидной железы возрастает в  $4,31$  раза ( $p<0,001$ ).

## Список литературы

1. Качко В.А., Семкина Г.В., Платонова Н.М., Ванушко В.Э., Абросимов А.Ю. Диагностика новообразований щитовидной желез // Эндокринная хирургия. 2018. Т. 12. № 3. С. 109-127.
2. Барчук А.С. Рецидивы дифференцированного рака щитовидной железы // Практическая онкология. 2007. Т. 8. № 1. С. 35-41.
3. Бельцевич Д.Г., Мудунов А.М., Ванушко В.Э., Румянцев П.О., Мельниченко Г.А., Кузнецов Н.С. и др. Дифференцированный рак щитовидной железы // Современная онкология. 2020. Т. 22. № 4. С. 30-44.
4. Macvanin M.T., Gluvic Z.M., Zaric B.L., Essack M., Gao X., Isenovic E.R. New biomarkers: prospect for diagnosis and monitoring of thyroid disease // Front Endocrinol (Lausanne). 2023. Vol. 14. P. 1218320. DOI: 10.3389/fendo.2023.1218320.
5. Wang H., Zhang J., Li H., Yu H., Chen S., Liu S. et al. FN1 is a prognostic biomarker and correlated with immune infiltrates in gastric cancers // Front. Oncol. 2022. Vol. 12. P. 918719. DOI: 10.3389/fonc.2022.918719.
6. Bae Y.K., Kim A., Kim M.K., Choi J.E., Kang S.H., Lee S.J. Fibronectin expression in carcinoma cells correlates with tumor aggressiveness and poor clinical outcome in patients with invasive breast cancer // Hum Pathol. 2013. Vol. 44. P. 2028-2037.
7. Xie Y., Liu C., Qin Y., Chen J., Fang J. Knockdown of IRE1 $\alpha$  suppresses metastatic potential of colon cancer cells through inhibiting FN1-Src/FAK/GTPases signaling // Int. J. Biochem Cell Biol. 2019. Vol. 114. P. 105572. DOI: 10.1016/j.biocel.2019.105572.
8. Xia S., Wang C., Postma E.L., Yang Y., Ni X., Zhan W. Fibronectin 1 promotes migration and invasion of papillary thyroid cancer and predicts papillary thyroid cancer lymph node metastasis // Oncol Targets Ther. 2017. Vol. 10. P. 1743-1755. DOI: 10.2147/OTT.S122009 10.
9. Steffens S., Schrader A.J., Vetter G., Eggers H., Blasig H., Becker J. et al. Fibronectin 1 protein expression in clear cell renal cell carcinoma // Oncol Lett. 2012. Vol. 3. № 4. P. 787-790. DOI: 10.3892/ol.2012.566.
10. Efthymiou G., Saint A., Ruff M., Rekad Z., Ciais D., Van Obberghen-Schilling E. Shaping up the tumor microenvironment with cellular fibronectin // Front Oncol. 2020. Vol. 10. P. 641. DOI: 10.3389/fonc.2020.00641.
11. Lin T-C., Yang C.H., Cheng L.H., Chang W.T., Lin Y.R., Cheng H.C. Fibronectin in cancer: Friend or foe // Cells. 2019. Vol. 9. № 1. P. 27. DOI: 10.3390/cells9010027.