

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования

«Крымский федеральный университет имени В.И. Вернадского»

Ордена Трудового Красного Знамени

Медицинский институт имени С.И. Георгиевского

На правах рукописи

ХАБАРОВ ОЛЕГ РОБЕРТОВИЧ

**ПАТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ ВЛИЯНИЯ SARS-COV-2
НА ХИРУРГИЧЕСКУЮ ПАТОЛОГИЮ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ
(КЛИНИКО-ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ)**

3.3.3. Патологическая физиология

3.1.9. Хирургия

Диссертация

на соискание ученой степени кандидата медицинских наук

Научные руководители:

Зяблицкая Евгения Юрьевна

доктор мед. наук, доцент;

Безруков Олег Филиппович

доктор мед. наук, доцент.

Симферополь, 2025

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	17
1.1. Патогенетические механизмы действия вируса SARS-CoV-2 на щитовидную железу	17
1.2. Патофизиология развития хирургической патологии щитовидной железы при инфицировании вирусом SARS-CoV-2	21
1.3. Потенциальные направления опухолевой трансформации тироцитов под действием вируса SARS-CoV-2	26
1.4. Изменение структуры заболеваемости хирургической патологией щитовидной железы в период пандемии COVID-19.....	32
1.5. Влияние пандемии COVID-19 на оказание хирургической помощи пациентам с заболеваниями щитовидной железы и последствия данных изменений.....	36
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	42
2.1. Общий дизайн клинико-экспериментального исследования	42
2.2. Экспериментальная модель новой коронавирусной инфекции на лабораторных грызунах	46
2.3. Морфологические и молекулярные методы изучения патогенетических механизмов повреждения щитовидной железы экспериментальных животных и пациентов, перенесших инфекцию	53
2.4. Методы изучения структуры заболеваемости хирургической патологией щитовидной железы в период пандемии	59
2.5. Математико-статистические методы анализа цифровых данных	62
ГЛАВА 3. СТРУКТУРНЫЕ, ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ И МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ ИНФИЦИРОВАНИЯ ЖИВОТНЫХ ВИРУСОМ SARS-CoV-2	63

3.1. Динамика инфекционного процесса, уровня тиротропина и тиреоидных гормонов, гистологических изменений ткани щитовидной железы у гуманизированных мышей	63
3.2. Динамика инфекционного процесса, гистологических и иммуногистохимических изменений ткани щитовидной железы у сирийских хомяков	67
ГЛАВА 4. ДИНАМИКА ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ ВОСПАЛЕНИЯ И КАНЦЕРОГЕНЕЗА В ТКАНИ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ В НОРМЕ И ПРИ ПАТОЛОГИИ У ЛИЦ, ПЕРЕНЕСШИХ COVID-19.....	82
ГЛАВА 5. АНАЛИЗ СТРУКТУРЫ ЗАБОЛЕВАЕМОСТИ РАЗЛИЧНОЙ ХИРУРГИЧЕСКОЙ ПАТОЛОГИЕЙ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ В РЕСПУБЛИКЕ КРЫМ И ГОРОДЕ СЕВАСТОПОЛЕ В 2019-2024 ГОДАХ С УЧЕТОМ ДИНАМИКИ ВОЛН ПАНДЕМИИ	105
ГЛАВА 6. РЕКОМЕНДАЦИИ ОБСЛЕДОВАНИЯ ПАЦИЕНТОВ, ПЕРЕНЕСШИХ НОВУЮ КОРОНАВИРУСНУЮ ИНФЕКЦИЮ, ПРИ ВЫЯВЛЕНИИ ПАТОЛОГИИ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ	126
6.1. Результаты морфологических, молекулярно-биологических, клинических и статистических данных как основа для разработки рекомендаций ведения пациентов с COVID-19 в анамнезе	126
6.1. Предложения по обследованию пациентов, перенесших COVID-19, для выявления патологии щитовидной железы, опосредованной влиянием SARS-CoV-2.....	131
ГЛАВА 7. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ И ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	137
ВЫВОДЫ	156
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ	158
ПЕРЕЧЕНЬ УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ И СОКРАЩЕНИЙ.....	159
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	161

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования. Болезни щитовидной железы (ЩЖ) чрезвычайно распространены. Каждый четвертый житель планеты имеет тиреоидную патологию на протяжении жизни. Особенности болезней ЩЖ – молодой возраст возникновения заболеваний, влияние на репродуктивную функцию, социальная значимость последствий, существенный рост злокачественных новообразований (ЗНО), в первую очередь папиллярным раком, влияние пандемии COVID-19 на эти процессы – актуализируют тему работы.

Рак ЩЖ – это самое распространенное ЗНО эндокринной системы. У всех россиян, заболевших ЗНО в возрасте до 30 лет, рак ЩЖ по статистике заболеваемости 2023 года занимает второе место, уступая лишь опухолям кроветворной системы, и составляет 12,6 %. У женщин в молодом возрасте он лидирует и составляет 18,2 %. Еще в 2022 году рак ЩЖ занимал 3-е место у молодых лиц и составлял лишь 8,3 % в общей структуре онкопатологии среди лиц возрастом до 30 лет. Это связано с тем, что темп прироста заболеваемости раком ЩЖ превосходит все другие локализации в России и в мире [1-3]. За период 2013-2023 гг. заболеваемость выросла от 6,79 до 11,50 с приростом в год на 3,97 % и за 10 лет на 50,81 %. У мужчин эти показатели еще более высокие: 5,59 % в год и 80,76 % за 10 лет (в 2022 году это было, соответственно, 4,67 % и 61,99 %). То есть при меньшей заболеваемости раком ЩЖ у мужчин (в 3-4 раза ниже, чем у женщин), темпы прироста заболеваемости у мужчин очень высокие. У детей до 15 лет также отмечен прирост заболеваемости ЗНО ЩЖ – на 49,6 % [3, 4]. Заболеваемость ЗНО ЩЖ среди всех возрастов находится на 11-м месте среди других локализаций рака, а вот смертность относительно невысокая и выраженного темпа прироста смертности нет [4, 5]. Рак ЩЖ поддается своевременной диагностике и лечению, что требует активной работы онкологов, специалистов диагностики УЗИ и морфологов: для рака ЩЖ характерны высокие показатели активного выявления (37,6 %), выживаемости более 5 лет,

завершенности радикального лечения; но показатель выявления на поздних стадиях, также высокий (9,2 % и 7,8 % в 2022 и 2023 годах) [2, 6].

Актуальность новых исследований патогенетических механизмов развития хирургических болезней ЩЖ, в том числе под действием вирусных инфекций в современных условиях, обусловлена рядом ключевых позиций. Первостепенным является то, что события 2020-2025 годов изменили жизнь людей. В это время, помимо стабильных базовых обстоятельств развития патологии ЩЖ, таких как эндемичность ряда регионов по йододефициту, наличия других естественных и социальных неблагоприятных факторов во внешней среде, появились и новые риски. Возросла вероятность техногенных катастроф и дестабилизации ядерной отрасли, вырос уровень стресса среди населения в связи с пандемией и различными военными политическими конфликтами по отношению к России и среди других стран мира. Оба фактора – и стресс, и пандемия COVID-19 включены в звенья патогенеза развития хирургических заболеваний ЩЖ. В 2021-2023 годах появились первые сведения о прямом влиянии перенесенной инфекции, вызванной SARS-CoV-2, на развитие тиреоидной патологии. Для пациентов, перенесших тяжелый острый респираторный синдром (ТОРС) во время новой коронавирусной инфекции, или переболевших в форме легкой и средней тяжести, уже в 2020-2022 годах (спустя 0,5-2 года) выявлены статистические изменения структуры заболеваемости хирургической патологией ЩЖ [7-9]. Общая хирургическая патология и онкопатология ЩЖ в крымском регионе в периоды до, во время и после пика пандемии COVID-19 существенно изменила наши представления об ее отдаленных последствиях [9]. Исследования многих авторов позволили предположить патогенез данных изменений (вследствие антигенной мимикрии вируса) через аутоиммунные механизмы, активирующиеся после заболевания, и в редких случаях, после вакцинации [10-14]. Это побудило нас выполнить морфологическое исследование клинического материала и изучить влияние вируса SARS-CoV-2 в модельном эксперименте на чувствительных к нему лабораторных грызунах, подтвердившее данную гипотезу. Очевидна целесообразность разработки персонализированного подхода к

обследованию и лечению пациентов с хирургической тиреопатологией с учетом данного инфекционного анамнеза. Много работ посвящены возникновению терапевтической патологии ЩЖ после COVID-19, они выполняются в крупных медицинских исследовательских центрах РФ, например ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова» (СПб) [15-17]. Исследования в этом направлении проводятся и хирургами эндокринологами, они актуальны в мировом масштабе, однако касаются преимущественно таких эффектов пандемии, как рост числа случаев с несвоевременным оперативным вмешательством по поводу рака ЩЖ в связи с поздним обращением пациентов с цитологическими заключениями III-IV категорий по классификации Bethesda [8]. А патогенетические механизмы и эффекты влияния SARS-CoV-2 на развитие хирургической патологии ЩЖ остаются не изученными. Развитие новых подходов к оценке повреждения тканей ЩЖ при исследовании молекулярных маркеров и возможности выполнения модельного эксперимента, также актуализирует выполнение работы.

Степень разработанности научной темы исследования. Данные литературы показывают, что дисфункция ЩЖ присутствует у значительного процента пациентов с COVID-19. Фундаментальные и клинические научные работы по теме патогенетических механизмов влияния вируса SARS-CoV-2 на патологию ЩЖ сводятся к ряду положений. COVID-19 – это инфекция, вызываемая SARS-CoV-2, коронавирусом, который использует ангиотензин-2-превращающий фермент (АПФ 2), в том числе и для проникновения в клетки ЩЖ и гипофиза, непосредственно повреждая их, и может привести к «цитокиновому шторму», что вызывает опосредованное через цитокины повреждение. То есть COVID-19 оказывает эффект на весь организм, в том числе и на эндокринную систему, нарушение деятельности которой вызвано прямым повреждением вирусом эндокринной железы или опосредованным влиянием на ось гипоталамус-гипофиз, системным воспалением вследствие секреции биологически активных веществ, нарушением кровообращения и аутоиммунными реакциями [12, 18, 19]. На основе патофизиологического поражения оси гипофиз – щитовидная железа, обсуждается диагностика нарушений функции ЩЖ и ведение пациентов с

тиреотоксикозом, тироид-ассоциированной орбитопатией и гипотиреозом на фоне инфекции SARS-CoV-2, обосновывая повреждение прямым токсическим эффектом вируса на клетки [20]. Кроме того, признан негативный эффект лекарств, применяемых при COVID-19, способных вызывать повреждение ЩЖ или влиять на ее метаболизм [12]. Актуальным направлением исследований является изучение аутоиммунных реакций за счет антигенной мимикрии – кросс-реактивности с тиреопероксидазой (ТПО) [21]. Это же является и причиной осложнений вакцинации. Развитие аутоиммунного ASIA-синдрома (autoimmune inflammatory syndrome induced by adjuvants), вызванного адьювантами, синдрома Шонфельда, объясняют сенсбилизацией адьювантами, цитокиновой индукцией, молекулярной мимикрией после вакцины COVID-19, нарушающей иммунологическую толерантность к своим антигенам [22]. Распространенность дисфункции ЩЖ у пациентов с COVID-19 составляет от 13 % до 64 %. При этом большинство пациентов с COVID-19 имеют уровень тиреотропного гормона (ТТГ) в пределах нормы (44-94 %). Есть корреляции между дисфункцией ЩЖ и клинической тяжестью COVID-19 [23]. Многие авторы указывают на потребность персонификации ведения таких пациентов с учетом тиреоидного и инфекционного анамнеза [13, 14]. Практически отсутствуют данные о потенциальных механизмах онкотрансформации тироцитов под действием вируса, несмотря на статистически значимые изменения заболеваемости папиллярным раком в период пандемии [9]. Очевидно, что необходимы комплексные фундаментально-клинические исследования влияния COVID-19 на патологию ЩЖ для оценки его сенсбилизующего и онкогенного действия.

Цель исследования – установить патогенетические механизмы и эффекты влияния вируса SARS-CoV-2 на развитие хирургической патологии ЩЖ.

Для достижения цели поставлены следующие **задачи**:

1. Разработать экспериментальную модель для исследования патогенетических механизмов влияния новой коронавирусной инфекции, вызванной SARS-CoV-2, на развитие патологии ЩЖ у чувствительных к вирусу гуманизированных мышей B6.Cg-Tg (K18-ACE2) и сирийских хомяков.

2. Изучить особенности строения и функции ЩЖ у экспериментальных животных в разные сроки после инфицирования SARS-CoV-2, исследовать в клетках тканей ЩЖ методом иммуногистохимии (ИГХ) экспрессию белков: маркеров воспаления, апоптоза, деструкции межклеточного матрикса, онкогенеза (клеточного цикла и его регуляции), ангиогенеза и аутоантител к белкам и рецепторам тироцитов.

3. Изучить экспрессию маркеров воспаления, апоптоза, деструкции межклеточного матрикса, онкогенеза (клеточного цикла и его регуляции), ангиогенеза и аутоантител к белкам и рецепторам тироцитов в клетках тканей ЩЖ пациентов при ее аутоиммунных и гиперпластических заболеваниях, в сравнении у лиц, переболевших тяжелой формой COVID-19 и не болевших.

4. Выполнить ретроспективный анализ структуры заболеваемости хирургической патологией ЩЖ в Республике Крым и городе Севастополе за период 2019-2024 гг. с учетом динамики волн пандемии COVID-19, ранних и отдаленных последствий у пациентов.

5. Дать характеристику наиболее часто возникающей патологии ЩЖ, развивающейся в связи с инфицированием SARS-CoV-2 в раннем и отдаленном периоде, разработать предложения по внедрению рекомендаций обследования пациентов для выявления патологии ЩЖ, опосредованной COVID-19.

Научная новизна исследования. Впервые создан модельный эксперимент для исследования патогенетических механизмов влияния новой коронавирусной инфекции, вызванной SARS-CoV-2, на развитие патологии ЩЖ у лабораторных грызунов, чувствительных к вирусу. Впервые на тканевом и клеточном уровне изучено строение ЩЖ в разные сроки после инфицирования SARS-CoV-2.

Впервые в методе ИГХ использован комплекс маркеров, нацеленных на выявление экспрессии белков-регуляторов воспаления и клеток воспалительного инфильтрата (CD4, CD5, CD8, CD30, CD48, CD68, CD163, TNF, CD20, CD 138, iNOS), маркеров апоптоза и деструкции межклеточного матрикса (CD-95 (FAS-R) и MMP3), онкогенеза или клеточного цикла и его регуляции (Циклин D1, Bcl-2, P16, P53, c-KIT), ангиогенеза (VEGF, Tie2) и аутоантител к белкам и рецепторам

тироцитов (антитела к ТПО, к молекуле тиреоглобулина Tg, к рецептору ТТГ) в ткани ЩЖ на модели инфекции SARS-CoV-2 у лабораторных грызунов и у человека с хирургической патологией ЩЖ.

Впервые оценены эффекты влияния пандемии COVID-19 на заболеваемость хирургической патологией ЩЖ в Республике Крым и городе Севастополе в 2019-2024 годах, проведен ретроспективный анализ структуры заболеваемости за 5 лет с учетом динамики волн пандемии, ранних и отдаленных последствий у пациентов. В результате чего впервые дана характеристика наиболее часто возникающей патологии ЩЖ, индуцированной вирусом SARS-CoV-2 и выявлены механизмы ее возникновения.

Теоретическая и практическая значимость работы. Сформулированы фундаментальные положения патогенетических механизмов воздействия вируса SARS-CoV-2 на возникновение хирургической тиреоидной патологии. Исследованы потенциально возможные механизмы злокачественной трансформации тироцитов под действием вируса.

На основании полученных данных разработаны предложения по внедрению в практику рекомендаций обследования пациентов, перенесших инфекцию COVID-19, направленных на выявление патологии ЩЖ, опосредованной новой коронавирусной инфекцией. Выявлены общие закономерности, на основании которых сформулированы практические рекомендации для диагностики и персонализированной терапии.

Объект исследования – патогенетические механизмы морфологических и функциональных изменений ЩЖ при инфекционном процессе.

Предмет исследования – структурные и функциональные изменения ЩЖ лабораторных грызунов и человека (при аутоиммунных, доброкачественных и злокачественных неопластических заболеваниях) на фоне перенесенной инфекции, вызванной вирусом SARS-CoV-2.

Материал и методы исследования. Материалом исследования является ткань ЩЖ лабораторных грызунов в модельном эксперименте; клетки ЩЖ, полученные при тонкоигольной аспирационной пункционной биопсии (ТАПБ) и

ткань ЩЖ человека при удалении ее оперативным путем у пациентов Многопрофильной клинической больницы Святителя Луки (структурное подразделение) ФГАОУ ВО «КФУ им. В.И. Вернадского» и ГБУЗС «Городская больница № 1 имени Н.И. Пирогова», давших свое согласие на исследования.

В работе применён комплексный подход, включающий постановку эксперимента, использование как морфологических методов на светооптическом уровне исследования, так и молекулярно-биологических – ИГХ с маркерами белков различных групп и ИФА для определения уровня гормонов; использованы морфометрические методики количественной оценки динамики экспрессии белков, методы биостатистики и математического анализа полученных данных. В клинической части работы выполнен ретроспективный анализ структуры хирургической патологии ЩЖ.

Использованы такие основные группы методов исследования:

1. Модельный эксперимент развития инфекции, вызванной SARS-CoV-2 у лабораторных грызунов; в качестве вспомогательных методов использован ПЦР-тест для верификации инфицирования и иммуноферментный анализ (ИФА) для исследования уровня гормонов в сыворотке крови.

2. Гистологические методы с изготовлением срезов тканей, окрашенных для обзорных исследований и оценки структуры на уровне фолликулов, интерфолликулярной ткани и стромы ЩЖ, метод световой микроскопии, микротомосъемка и сканирование гистопрепаратов для визуализации изменений.

3. На ткани ЩЖ животных и человека выполнена реакция ИГХ с маркерами белков-регуляторов воспаления и клеток воспалительного инфильтрата, маркеров апоптоза и деструкции межклеточного матрикса, клеточного цикла и его регуляции, ангиогенеза и аутоантител к белкам и рецепторам ЩЖ для оценки механизмов воздействия вируса на тироциты и тканевые компоненты стромы.

4. В клинике использованы стандартные инструментальные и лабораторные методы обследования пациентов с тиреоидной патологией, на основании медицинской документации выполнен ретроспективный анализ данных.

5. Методы морфометрии, математического анализа и статистики – для количественной оценки и объективизации полученных данных, математического подтверждения рабочих гипотез, систематизации результатов.

Положения, выносимые на защиту. Модельный эксперимент для исследования патогенетических механизмов влияния новой коронавирусной инфекции, вызванной SARS-CoV-2 на развитие патологии ЩЖ у лабораторных грызунов, чувствительных к вирусу, информативен, имеет ряд преимуществ для динамического морфологического и патофизиологического изучения. Доказано изменение структуры ЩЖ лабораторных грызунов после инфицирования SARS-CoV-2, в зависимости от срока заболевания.

Установлено достоверное изменение экспрессии белковых маркеров регуляторов воспаления и клеток воспалительного инфильтрата (CD4, CD5, CD8, CD30, CD48, CD68, CD163, TNF, CD20, CD 138, iNOS), маркеров апоптоза и деструкции (CD-95 (FAS-R) и MMr3), онкогенеза или клеточного цикла и его регуляции (Циклин D1, Bcl-2, P16, P53, c-KIT), ангиогенеза (VEGF, Tie2 и аутоантител к белкам и рецепторам тироцитов (антитела к ТПО, к молекуле тиреоглобулина, к рецептору ТТГ) в ткани ЩЖ на модели вирусных инфекций у лабораторных грызунов и у человека с хирургической патологией ЩЖ.

Выявлен ряд закономерностей сходства патогенетических механизмов развития патологии ЩЖ у человека и животных. Показана вероятная онкогенная роль вируса в инициации трансформации тироцитов.

Показано, что пандемия COVID-19 повлияла на заболеваемость хирургической патологией ЩЖ в Республике Крым и городе Севастополе в 2019-2024 годах, ретроспективный анализ структуры заболеваемости за 5 лет с учетом динамики волн пандемии, ранних и отдаленных последствий у пациентов показал преобладание аутоиммунных и гиперпластических изменений, онкотрансформации тиреоидного эпителия. Наиболее часто возникающей патологией ЩЖ, индуцированной вирусом SARS-CoV-2, является в остром периоде токсическая аденома, острый тиреоидит, а в отдаленном – папиллярная карцинома. Выявлена динамика морфологических особенностей папиллярных

карцином ЩЖ в связи с пандемией COVID-19. Причины и механизмы их возникновения преимущественно обусловлены антигенной мимикрией и комплексными трансформационными эффектами действия вируса на тироциты и строму ЩЖ.

Специальности, которым соответствует диссертационная работа.

Работа соответствует паспорту научной специальности 3.3.3 Патологическая физиология (медицинские науки), пунктам 1, 2 и 8 паспорта: 1) исследование особенностей этиологических факторов, вызывающих развитие повреждения, и характера их воздействия на уровне клеток, органов и систем организма; 2) изучение механизмов развития заболеваний, типовых патологических процессов и реакций организма на воздействие патогенных факторов, в том числе механизмов формирования патологических систем и нарушений информационного процесса, обуславливающих развитие заболеваний; 8) изучение защитных, компенсаторных и приспособительных реакций организма, развивающихся в ответ на действие повреждающих факторов различной природы и при развитии патологических процессов.

Работа также соответствует паспорту научной специальности 3.1.9. Хирургия, пунктам 1, 2 и 5 паспорта: 1) изучение причин, механизмов развития хирургических заболеваний; 2) разработка и усовершенствование методов диагностики хирургических заболеваний; 5) усовершенствование методов диспансеризации и профилактики хирургических заболеваний.

Степень достоверности полученных результатов. Эксперимент выполнен в виварии на базе Ордена Трудового Красного Знамени Медицинского института им. С.И. Георгиевского ФГАОУ ВО «КФУ им. В.И. Вернадского». Морфологические исследования выполнены в отделе патоморфологии и молекулярной онкологии центральной научно-исследовательской лаборатории (ЦНИЛ), имеющей лицензию на медицинскую деятельность для данного вида работ и при методическом участии специалистов, имеющих большой клинический опыт. ПЦР-диагностика вирусной инфекции и изучение уровня гормонов методом ИФА выполнены в отделе клинической диагностики и

лабораторной генетики ЦНИЛ. Работа с пациентами с патологией ЩЖ является основным профилем хирургической работы диссертанта на протяжении более 20 лет в ГБУЗС «Городская больница № 1 им. Н.И. Пирогова», г. Севастополь.

О достоверности результатов, обоснованности выводов свидетельствуют:

- 1) достаточный объём исследований в модельном эксперименте и в клинике;
- 2) использование комплекса актуальных морфологических и лабораторных методов, позволивших не только верифицировать данные о заболеваниях у обследуемых лабораторных животных и пациентов, но и выявить актуальные молекулярно-биологические маркеры в биоматериале;
- 3) использование математической обработки и статистического анализа для объективной оценки изменений количественных показателей.

О высокой степени достоверности свидетельствует использование метрологически обеспеченных средств измерительной техники и необходимого современного зарегистрированного оборудования, расходных материалов и реагентов с соблюдением требований для преаналитического и аналитического этапов работ.

Апробация результатов. Результаты исследования представлены автором на обсуждение на двенадцати тематических научных форумах: Третья Всероссийская конференция, посвященная 90-летию Ижевской государственной медицинской академии, «Актуальные проблемы современной клинической медицины», 2022, г. Ижевск; Научно-практическая конференция «Актуальные вопросы врачебной практики», 2023, г. Ялта; Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Фундаментальные исследования в онкологии 2023», ФГБУ «НМИЦ онкологии», 2023, г. Ростов-на-Дону; VI Международный форум по онкологии и радиотерапии РАДИ ЖИЗНИ – FOR LIFE, секция «Научные исследования в онкопатологии», 2023, г. Москва; XI Международная научно-практическая конференция «Молекулярная диагностика 2023, MOL Dx», г. Москва; II Конгресс Международного общества клинической физиологии и патологии (The 2nd Congress of the International Society for Clinical Physiology and Pathology, ISCPP2024), 2024, г. Москва; I Евразийский Конгресс по

патофизиологии, 2024, г. Москва; Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Фундаментальные аспекты онкологии 2024», ФГБУ «НМИЦ онкологии», 2024, г. Ростов-на-Дону; XVI конференция патофизиологов Урала, посвященная 85-летию А.П. Ястребова и 60-летию ЦНИЛ УГМУ, 2024, г. Екатеринбург; XI Междисциплинарный медицинский форум «Здравоохранение Севастополя» 2025, г. Севастополь, ГБУЗС «Городская больница № 1 им. Н.И. Пирогова»; III Конгресс Международного общества клинической физиологии и патологии (The 3d Congress of the International Society for Clinical Physiology and Pathology (ISCPP2025), 2025, г. Москва; IX Ежегодный Конгресс Российского общества онкопатологов, 2025 г, Москва.

Из них 5 научных форумов посвящены вопросам клинической медицины (хирургия и онкология), а 7 – фундаментальной медицине (патофизиология и молекулярная медицина).

Внедрение результатов работы в практику. У автора имеются внедрения разработок в образовательную деятельность и медицинскую практику. Отдельные положения, вошедшие в диссертационное исследование, внедрены в образовательные программы и используются в учебном процессе студентов, ординаторов, аспирантов кафедры общей и клинической патофизиологии; патологической анатомии с секционным курсом; общей хирургии Ордена Трудового Красного знамени Медицинского института им. С.И. Георгиевского ФГАОУ ВО «КФУ им. В.И. Вернадского», г. Симферополь. Результаты морфологического анализа материала используются в диагностической работе отдела патоморфологии и молекулярной онкологии Центральной научно-исследовательской лаборатории (ЦНИЛ) Ордена Трудового Красного знамени Медицинского института им. С.И. Георгиевского ФГАОУ ВО «КФУ им. В.И. Вернадского», г. Симферополь. Клинические результаты внедрены в работу хирургического стационара и поликлиники Многопрофильной клинической больницы Святителя Луки (структурное подразделение) ФГАОУ ВО «КФУ им. В.И. Вернадского», а также хирургического стационара и поликлиники ГБУЗС «Городская больница № 1 им. Н.И. Пирогова» г. Севастополя.

Публикации автора по теме диссертации. По материалам диссертации опубликовано 15 научных работ, отражающих основные результаты, положения и выводы. Одна статья опубликована в журнале, индексируемом в наукометрической базе Scopus, входящем в ядро РИНЦ и перечень ВАК Российской Федерации по двум специальностям защищаемой работы. Три статьи опубликованы в научных журналах, входящих в ядро РИНЦ и перечень ВАК по специальностям защищаемой работы. Таким образом, шифру 3.3.3. Патологическая физиология соответствуют 2 статьи, а 3.1.9. Хирургия – 3 статьи в журналах «белого списка». Также дополнительно одна статья опубликована в отечественном журнале ВАК 3-го квартиля по шифру 3.1.9. Хирургия, одна статья – в журнале ВАК не по специальности работы, одна обзорная статья в журнале, рекомендованном ВАК по шифру 3.1.9. Хирургия. 8 публикаций вошли в сборники тематических научных конференций (из которых 4 – международные, 4 – всероссийские).

Личный вклад автора в исследование. Автор инициировал проведение исследования в связи с деятельностью в должности хирурга ГБУЗС «Городская больница № 1 им. Н.И. Пирогова» г. Севастополя, совместно с руководителями сформулировал цель и задачи работы, разработал ее дизайн с привлечением необходимого методического лабораторного обеспечения. В выполнении эксперимента автор принимал непосредственное участие, при консультативной помощи специалистов лаборатории описал результаты исследований, самостоятельно оценил и обобщил их, выполнил анализ данных, биостатистические расчеты и подготовил статьи. Автором сформулированы выводы, разработаны научные и практические рекомендации.

Связь работы с научными программами, планами, темами. Работа поддержана финансируемым государственным заданием по науке 2023-2025 гг. FZEG-2023-0009 «Изучение гетерогенности микроокружения опухоли как фактора ее агрессивности и резистентности к терапии» по соглашению Минобрнауки России и ФГАОУ ВО «КФУ им. В.И. Вернадского» № 075-01400-23-00 от 29.12.22, тема № 123030700011-4 от 07.03.2023. Выполнение проекта и

список исполнителей отражены в приказе ФГАОУ ВО «КФУ им. В.И. Вернадского» о реализации проекта № 190 от 01.03.2023 г. и приказах о внесении изменений № 126 от 12.02.2024 г., № 1060 от 24.09.2024, № 1260 от 01.11.2024, № 238 от 27.03.2025 г. и № 1176 от 08.09.2025 г. Автор является исполнителем в должности ассистента кафедры многопрофильной клинической подготовки, факультета подготовки медицинских кадров высшей квалификации и дополнительного профессионального образования Ордена Трудового Красного Знамени Медицинского института им. С.И. Георгиевского ФГАОУ ВО «КФУ им. В.И. Вернадского».

Работа получила одобрение «Комитета по этике» ФГАОУ ВО «КФУ им. В.И. Вернадского», что отражено в протоколе и предоставленной выписке с положительным решением на проведение научно-исследовательской работы № 7 от 23.06.2023 по теме государственного задания, и № 9 от 12.09.2024 по теме данного диссертационного исследования.

Объём и структура диссертации. Диссертационная работа структурирована классически, содержит введение, обзор литературы, главу, описывающую материалы и методы исследования, четыре главы с результатами собственных исследований, главу анализа и обобщения результатов, выводы, практические рекомендации и список литературы, содержащий 173 наименования. Работа изложена на 181 странице машинописного текста, иллюстрирована 19 таблицами, 49 рисунками (среди них 2 блок-схемы, 8 иллюстраций, 17 диаграмм и графиков и 22 микрофотографии).

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Патогенетические механизмы действия вируса SARS-CoV-2 на щитовидную железу

Пандемия COVID-19, вызванная вирусом SARS-CoV-2, стала глобальной чрезвычайной ситуацией в области здравоохранения, в связи с возникновением миллионов случаев заболевания и значительным числом летальных исходов за короткий срок. Хотя COVID-19 первоначально рассматривали как респираторную инфекцию, многочисленные исследования показали, что SARS-CoV-2 оказывает мультисистемное воздействие, затрагивая не только легкие, но и другие органы. Новая коронавирусная инфекция оказывает влияние на весь организм разными путями, в том числе и опосредованно через эндокринную систему. Ключевые пути воздействия вируса на ЩЖ такие: 1) прямое повреждение вирусом клеток железы; 2) опосредованные эффекты на регуляторную ось гипоталамус-гипофиз-тироциты; 3) эффекты воспаления и иммуногенеза на органном и организменном уровне.

Пути воздействия вируса SARS-CoV-2 на ЩЖ. Вирус проникает в клетки ЩЖ через рецепторы АПФ 2 и трансмембранную протеазу серина 2 (TMPRSS2), экспрессируемые в тканях ЩЖ даже в большей степени, чем в легких, что делает ее уязвимой для прямого вирусного воздействия. Не менее значимы изменения гипофизарно-тиреоидной оси за счет вирусного повреждения и дисфункции передней доли аденогипофиза. Не менее важно также системное воспаление, нарушение кровообращения при COVID-19, важны и механизмы опосредованного повреждения через процессы цитокинового шторма и аутоиммунные реакции на нейро-эндокринные регуляторные органы. Воспаление ЩЖ и ее повреждение являются преимущественно цитокин-опосредованными и сопровождаются либо увеличением продукции тироксина, либо гибелью тироцитов. Также актуальны аутоиммунные реакции за счет антигенной мимикрии с кросс-реактивностью с

ТПО, сенсбилизацией адьювантами при вакцинации [21]. Это же является и причиной осложнений вакцинации у ряда пациентов: аутоиммунный ASIA-синдром, вызванный адьювантами, синдром Шонфельда, цитокиновая индукция, молекулярная мимикрия после вакцины против COVID-19, нарушающих иммунологическую толерантность к своим антигенам [22].

Общая картина поражений ЩЖ при COVID-19 (в разрезе иммунологических изменений) с хронологией событий отражена на рис. 1.

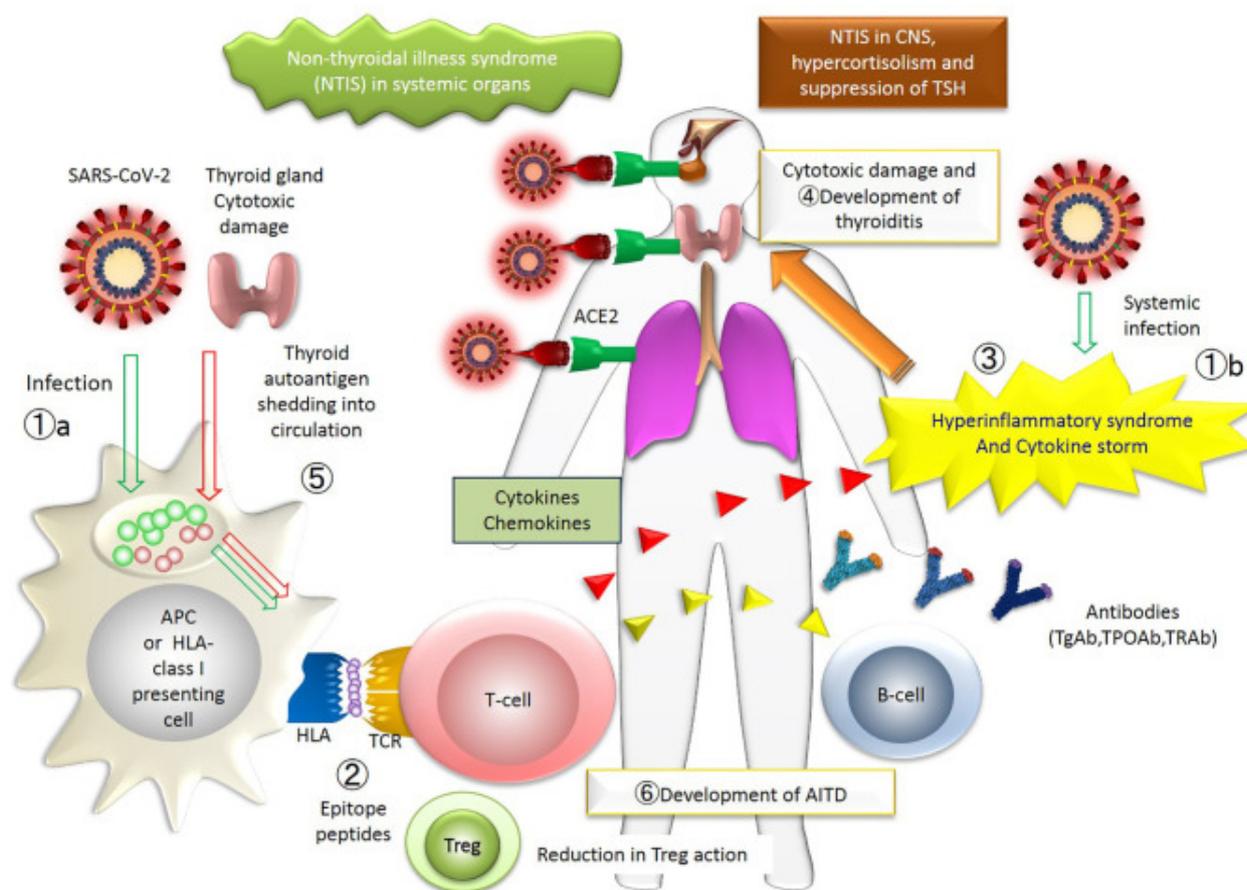


Рисунок 1. Патогенетическая схема поражения ЩЖ при COVID-19 [24].

Обозначения: APC – антигенпрезентирующие клетки; TCR – T-клеточный рецептор; T-cell – T-клетки, которые включают цитотоксические T-клетки и эффекторные T-клетки; B-cell – B-клетки; AITD – аутоиммунное заболевание щитовидной железы; HLA—главный комплекс гистосовместимости у людей (Human Leukocyte Antigens); NTIS– синдром нетиреоидного заболевания; TSH – гормон ТТГ.

На рисунке представлена комплексная многоступенчатая картина повреждения ЩЖ при COVID-19, показывающая преобладание и механизмы цитотоксического иммунологического повреждения. Совокупно показаны события, возникающие у пациентов с заболеваниями ЩЖ, связанными с COVID-19. Цифры в кружках показывают последовательные этапы развития событий. На первом этапе SARS-CoV-2 запускает иммунные реакции первичного и вторичного иммунного ответа. На втором этапе эпитопный пептид вируса SARS-CoV-2, фиксируясь на поверхности системы HLA класса I, антигенпрезентирующих клеток, распознается Т-клеткой. Это вызывает гипервоспалительный синдром, происходящий на третьем этапе и цитокиновый шторм на четвертом. В момент цитокинового шторма возможно повреждение иммунными клетками ЩЖ. Она может быть мишенью антител или Т-клеток. На пятом этапе как следствие нарушения гемато-тканевого барьера этого органа, в кровотоки попадают аутоантигены ЩЖ, которые также представлены на поверхности HLA-клеток. Наконец, вследствие такой провокации развивается аутоиммунный тиреоидит (АИТ) как впервые выявленное заболевание или как вторичный процесс. В редких случаях с осложненной вакцинацией принципиальная схема развития патологии схожа [24].

Дисфункция ЩЖ при инфицировании SARS-CoV-2 и факторы, влияющие на нее. Ученые сообщили о значительной положительной корреляции между сывороточным IL-6 и степенью тиреотоксикоза у пациентов с COVID-19. Это открытие позволило предположить, что повышение уровня IL-6 и/или цитотоксических эффектов Т-клеток во время гипервоспалительного синдрома может быть причиной тиреоидита при COVID-19 [24]. Тиреоидит не может прекратиться, пока сохраняется цитокиновый шторм. У таких пациентов спустя годы может развиваться как стойкий гипотиреоз, так и тиреотоксикоз. Апоптоз тироцитов был продемонстрирован на аутопсийном материале пациентов с атипичной пневмонией во время вспышки 2020 года [25]. В этих образцах SARS-CoV не был обнаружен в тироцитах, а фолликулярная структура в основном сохранилась, что позволяет предположить, что причиной апоптоза не была прямая

инвазия вируса в клетку. Вместо этого причиной повреждения ЩЖ, вероятно была именно аутоиммунная провокация или активация, вызванная цитокиновым штормом во время инфекции SARS-CoV. Другими авторами также выявлен апоптоз фолликулярных клеток при отсутствии самого вируса в тироцитах при инфицировании SARS-CoV, что позволяет предположить действие аналогичного механизма. Исследователи обнаружили, что у большинства пациентов с COVID-19 функция ЩЖ была нормальной, но низкий уровень ТТГ наблюдали либо при поступлении, либо во время госпитализации у 39 % пациентов, что было связано с низким уровнем свободного трийодтиронина (Т₃) в 50 % случаев. Они пришли к выводу, что дисфункция ЩЖ, скорее всего, вызвана цитокиновым штормом, индуцированным SARS-Cov-2, с прямым или опосредованным воздействием на секрецию ТТГ и активность дейодиназы, а не деструктивным тиреоидитом [26]. Схожие механизмы отмечены и обобщены многими авторами в исследованиях последних 5 лет [27-43].

HLA играет важную роль в иммунной системе на границе представления антигена Т-клетками, его распознавания и выработки антител В-клетками [24]. Молекулы HLA класса I обильно экспрессируются в различных клетках и индуцируют CD8⁺ Т-клеточный ответ. С другой стороны, экспрессия молекул HLA класса II ограничена антигенпрезентирующими клетками и отвечает за ответ CD4⁺ Т-клеток. Из-за полиморфизма генов HLA могут возникать различные иммунные реакции на один и тот же антиген и различная восприимчивость к заболеванию. Повышенная распространенность определенных генотипов HLA при COVID-19 зарегистрирована в определенных группах населения, включая пациентов из Китая и Италии [44-46]. В течение более 25 лет описано вовлечение гена HLA и его полиморфизмов в патогенез АИТ и подострого тиреоидита [47-49], а теперь и в развитие COVID-19 [50]. Сообщалось о более высокой частоте АИТ у лиц с определенными антигенами HLA [47] и об увеличении частоты встречаемости их у пациентов с болезнью Грейвса [48]. На сегодняшний день всесторонне изучена связь HLA класса I II с АИТ у самых разных этнических групп [49-51]. Это дополняет прямое повреждающее и иммуно-воспалительное

представление о механизмах повреждения ЩЖ несомненной ролью генетического фактора.

Коллеги из крупных российских центров ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова» и ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» (Санкт-Петербург) исследовали *особенности морфологии ЩЖ у пациентов в период пандемии, перенесших тяжелую форму ТОРС при COVID-19*. При исследовании биоптатов ЩЖ методом ИГХ с маркерами к Spike белкам SARS-CoV-2 и ACE 2 рецептору выявлена экспрессия к белкам вируса в более чем 90 % клеток тиреоидного эпителия, а к ACE 2 рецепторам – на мембранах более 60 % тироцитов. Эти показатели были стабильны и существенно не зависели от волны пандемии, а значит, соответственно, и от штамма вируса, вызвавшего ее. Эти данные, по нашему мнению, и заключению авторов, свидетельствуют о существенной роли прямого поражения ЩЖ SARS-CoV-2 у пациентов с коронавирусной инфекцией. В этой же работе изучена и динамика вирусного повреждения поджелудочной железы, коррелировавшего с патологией ЩЖ [52].

1.2. Патофизиология развития хирургической патологии щитовидной железы при инфицировании вирусом SARS-CoV-2

Развитие терапевтической патологии ЩЖ обусловлено приведенными выше патогенетическими механизмами и инициирует развитие клиники, требующей иногда хирургического лечения в раннем периоде (0,5-8,0 недель) (рис. 2), или усугубляет хронические фоновые патологические процессы, приводя к развитию заболевания спустя 1-2 года после контакта с вирусом. Процесс заболевания ЩЖ, связанный с аутоиммунными реакциями, быстрее развивается у пациентов с ранее существовавшим аутоиммунитетом к молекулярным компонентам ЩЖ [24].

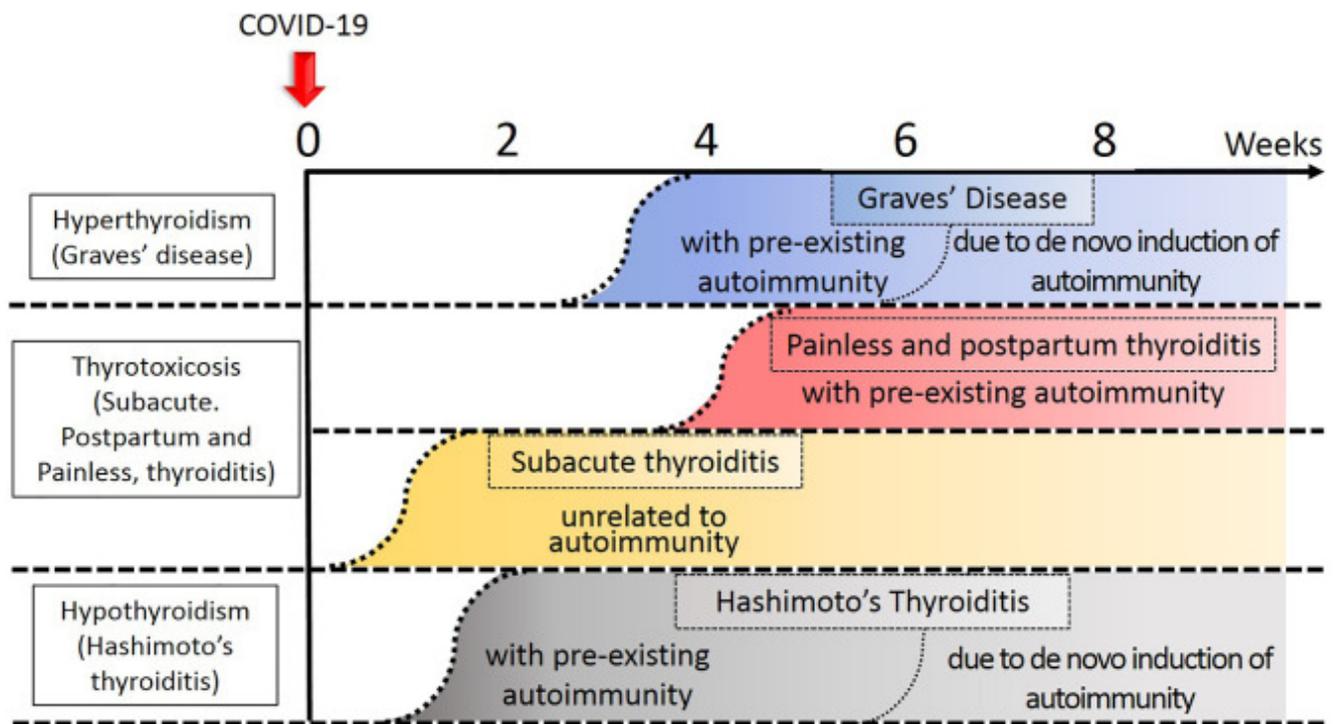


Рисунок 2. Временной профиль развития заболеваний ЩЖ в связи с COVID-19. Вероятное время начала каждого заболевания указано криволинейными пунктирными линиями. Чем интенсивней цвет в градиенте области под линией, тем сильнее степень и вероятность поражения ЩЖ в данном временном периоде [24].

Нарушение функции ЩЖ, обусловленное прямым цитотоксическим действием вируса и иммуноопосредованным повреждением тироцитов, побочными эффектами терапии ТОРС вызывает хирургическую патологию ЩЖ и прямую необратимую деструкцию ткани [27]. Наиболее показательны, конечно, морфологические работы, демонстрирующие гибель тироцитов в остром инфекционном периоде в исследованиях с целью выявления возможного повреждения тканей ЩЖ, вызванного SARS-CoV-2 [28, 29]. Так, изучили образцы, полученные при аутопсии 5 умерших от инфекции SARS-CoV-2 пациентов, и сравнили их с образцами пациентов, скончавшихся от других причин и не имевших патологию ЩЖ. Известно, что сверхэкспрессия некоторых неструктурированных белков SARS-CoV способна индуцировать апоптоз. Для его выявления использовали метод TUNEL (терминальная дезоксирибонуклеотидил-трансфераз-опосредованная реакция dUTP-метки 3'-гидроксильного конца).

Результаты показали, что фолликулярный эпителий ЩЖ подвергается значительному повреждению: клетки отслаивались внутрь фолликулов. Метод TUNEL выявил множество апоптозных клеток, а структура фолликулов была деформирована — они становились либо расширенными, либо сплюснутыми. Также отмечено отсутствие кальцитонин-позитивных клеток, что указывает на повреждение и парафолликулярного аппарата ЩЖ. В этих работах апоптоз определен как основная причина снижения уровня тиреоидных гормонов. Однако одновременное снижение уровня ТТГ позволяет предположить, что повреждение не ограничивается только ЩЖ, а могло затрагивать и другие более высокие звенья эндокринной регуляции [28, 29].

Цитокиновый шторм, который характеризуется повышением провоспалительных цитокинов в сыворотке крови (IL-6, IL-1 β , TNF- α), способствует развитию тяжелых осложнений SARS-CoV-2, в том числе и острых воспалительных процессов в ткани ЩЖ [31]. За счет цитокинового шторма наблюдается увеличение размеров органа, поддерживается активность воспалительного процесса и, при уже имеющемся подостром тиреоидите, развивается острый воспалительный процесс [32]. В острой фазе заболевания повышенные уровни IL-6 тесно коррелируют с развитием тиреоидита и сопутствующего тиреотоксикоза [33]. Показательными стали результаты ретроспективного исследования THYRCOV [34], в рамках которого из 287 госпитализированных пациентов с подтвержденной коронавирусной инфекцией у 5,2 % был диагностирован гипотиреоз, у 20,2 % – тиреотоксикоз, при этом наблюдалось наличие как манифестных, так и субклинических форм выявленной патологии. Механизмы развития этих нарушений связаны с некрозом и апоптозом тироцитов, индуцированным вирусными антигенами, расстройством иммунной толерантности и активацией цитокинов.

Тироциты, как уже упоминалось в данном обзоре, имеют на своей мембране рецепторы и экспрессируют АПФ 2, что подтвердили исследования РНК в биологических образцах желез, удаленных во время операции [35]. Концентрация АПФ в сыворотке крови тесно коррелирует с уровнями общего Т₃ и тироксина

(Т₄) [36]. Снижение показателей тиреоидных гормонов определяется у пациентов еще в период активного течения COVID-19. Причем степень снижения уровня Т₃ положительно коррелирует и с тяжестью течения заболевания.

Показано снижение уровня Т₃ у 60 % пациентов ниже границы нормы в 1,2-3 раза уже спустя месяц после выздоровления. При этом наблюдали и падение уровня ТТГ у многих переболевших SARS-CoV-2 пациентов [36-38]. Такие же результаты наблюдали и в исследовании, где у 10 % пациентов был выявлен изолированный низкий уровень ТТГ, что, вероятно, указывает на субклинический тиреотоксикоз, вызванный тиреоидитом [37].

Спектр патологии ЩЖ, ассоциированной с SARS-CoV-2, включает не только деструктивный тиреоидит, характерный для вирусных инфекций, но и дебют или прогрессирование аутоиммунных заболеваний ЩЖ. Как было сказано выше, важную роль играют предшествующие нарушения функции ЩЖ, а также латентные или недиагностированные аутоиммунные процессы [39, 40]. Вирусная инфекция может спровоцировать патологический иммунный ответ с вовлечением компонентов клеток ЩЖ [41]. Данная реакция индивидуально и генетически обусловлена [41]. Описаны клинические случаи без предшествующей тиреоидной патологии, где коронавирусная инфекция стала триггером для развития у пациентов болезни Грейвса с манифестным тиреотоксикозом тяжелого течения, что требовало активной терапии стероидами и хирургического вмешательства [42].

По причине молекулярной мимикрии между белками SARS-CoV-2 (шиповидным белком, нуклеопротеином) и ТПО — ключевым антигеном ЩЖ [42], активируются патогенетические механизмы аутоагрессии и усугубляется течение хронического процесса АИТ. Содержание антител к ТПО в крови и ткани коррелирует с уровнем провоспалительных цитокинов и активацией Т-клеточного иммунитета, преобладанием лимфоцитов Т-хелперов [43, 44]. Это в свою очередь, замыкает патогенетический круг повреждения ЩЖ при наличии у пациента вируса SARS-CoV-2.

Таким образом, при COVID-19 развивается цепочка иммунопатологических изменений, влияющих на функцию и морфологию железы, что вызывает клинические проявления заболевания, в том числе и требующего хирургического вмешательства. *Нет принципиальной разницы патогенеза между терапевтической и хирургической патологией ЩЖ под действием SARS-CoV-2.* На наш взгляд, это касается скорее степени выраженности проявлений.

Данный универсальный механизм имеет два принципиальных этапа:

1) проникновение вируса SARS-CoV-2 вызывает активацию всех звеньев иммунного ответа; может развиваться гипервоспалительный синдром с выработкой цитокинов, активацией воспаления и иммунным повреждением ЩЖ;

2) это приводит к попаданию белковых антигенов ЩЖ за пределы ее гистогематического барьера; что в дальнейшем инициирует развитие впервые выявленного тиреоидита, либо к обострению существующего процесса.

Исследования демонстрируют, что SARS-CoV-2 может вызывать подострый тиреоидит, гипотиреоз, гипертиреоз и провоцировать развитие или обострение аутоиммунных заболеваний ЩЖ. У пациентов с COVID-19 наблюдаются изменения уровней тиреоидных гормонов (Т₃, Т₄) и их регуляторов (ТТГ), что коррелирует с тяжестью течения заболевания. Важную роль в патогенезе играют провоспалительные цитокины, например IL-6, IL-1β, TNF-α, а также молекулярная мимикрия между вирусными белками и антигенами ЩЖ. Все вышеописанные механизмы находятся в тесной взаимосвязи между собой.

Несмотря на значительный прогресс в изучении влияния SARS-CoV-2 на ЩЖ, многие аспекты остаются не до конца изученными, что требует дальнейших исследований и разработки эффективных стратегий диагностики и лечения тиреоидных нарушений у пациентов с COVID-19. На данный момент в доступной научной печати не представлены отдаленные эффекты пандемии на болезни ЩЖ и нет детальных сведений о хирургической патологии под действием SARS-CoV-2. Среди отечественных эндокринных хирургов, онкологов существует общепризнанная концепция, согласно которой ЗНО ЩЖ образуются на фоне хронического аутоиммунного воспаления, а папиллярный рак ЩЖ чаще

развивается при длительно текущих АИТ, которые провоцируют вирусные заболевания, включая COVID-19. Однако комплексные молекулярно-биологические исследования, лежащие в основе данных закономерностей при COVID-19, не были предметом исследования в тканях ЩЖ и не представлены в доступной литературе.

1.3. Потенциальные направления опухолевой трансформации тироцитов под действием вируса SARS-CoV-2

Респираторные инфекции, вызванные РНК-вирусами, являются не только объектом исследования прямого действия вирусов как факторов развития респираторных заболеваний и развития эпидемий с серьезными последствиями для здравоохранения, но и как *причины трансформации клеток эпителия, с которыми контактируют вирусы* [53-59]. Еще до пандемии было показано, что инфекция вируса гриппа А может влиять на различные сигнальные пути хозяина, которые инициируют регенерацию тканей с гиперпластическими и/или диспластическими изменениями в легких. Хотя эти изменения участвуют в восстановлении легких после инфекции, в некоторых случаях они являются патологическим звеном, могут приводить не только к серьезной дыхательной недостаточности, но при нарушении регуляции долгосрочного восстановления, приводить к диспластической регенерации, посредством перехода воспаления в метаплазию [53-59].

Это же продемонстрировали ученые в период развития пандемии COVID-19 для вируса SARS-CoV-2. Выполнен биоинформационный анализ с дальнейшей верификацией *in vivo* для выяснения динамических молекулярных изменений в легочной ткани мышей, инфицированных РНК-вирусами, с идентификацией основных генов (Birc5, Cdca3, Plk1, Trx2, Prc1, Rrm2, Nusap1, Spag5, Top2a, Mcm5) и факторов транскрипции (E2F1, E2F4, NF-YA, NF-YB, NF-YC), участвующих в стойком повреждении легких и процессах регенерации, которые могут служить генными сигнатурами, отражающими долгосрочные эффекты

пролиферации в эпителии. Дальнейший анализ идентифицированных основных генов выявил их участие в развитии COVID-19 и новообразований легкого, что предполагает их потенциальную роль в качестве биомаркеров тяжелого респираторного заболевания и его осложнений, представленных аномальной пролиферацией эпителия и онкотрансформацией [60-69].

Несмотря на различные источники биоматериала, использованные для транскриптомного анализа в указанных работах (легочная ткань и клетки периферической крови для лабораторных грызунов в модельных экспериментах и людей), все идентифицированные основные гены, с которыми исследователи связывали онкогенез, показали существенный прирост экспрессии в большинстве проанализированных человеческих транскриптомных наборов данных, подтверждая, по крайней мере, частично, возможность экстраполяции и существование «трансляционного моста» между мышами и людьми в контексте восприимчивых к РНК-содержащим вирусам регуляторов перехода от воспаления к метаплазии.

Интересно, что вирус, вызывающий COVID-19, который отличается от гриппозной инфекции более выраженным фибропролиферативным фенотипом с реорганизацией внеклеточного матрикса и гиперкоагуляцией, характеризуется идентичной активирующей регуляцией интересующих генов в клетках периферической крови. Дальнейший подробный анализ экспрессии основных генов у пациентов с различными стадиями COVID-19 выявил тенденцию к последовательному увеличению их уровней экспрессии в зависимости от тяжести COVID-19. Указанные гены с помощью искусственного интеллекта были обозначены как предиктивные маркеры и перспективные кандидаты для лечения пациентов с COVID-19 в критическом состоянии [64], регулирующие дегрануляцию и цитопротекцию, контроль репликации и транскрипции вирусных РНК-геномов [65-67], ряд из них положительно коррелирует с инфильтрацией иммунными клетками неопластической легочной ткани [67], что предполагает его возможное участие в регуляции цитокинового шторма, связанного с COVID-19, и последующего повреждения легких.

Кроме того, используя анализ карты связей, ученые продемонстрировали высокое сходство в транскрипционных сигнатурах ингибиторов TOP2A (ДНК-топоизомеразы 2, являющейся ключевым ферментом, ответственным за контроль топологических состояний ДНК, особенно во время процесса репликации) и гиперцитокинемии, вызванной SARS-CoV-2 [68], что, как и в случае других генов, может предполагать связь между TOP2A и цитокиновым штормом, сопровождающим критический COVID-19.

Таким образом, полученные результаты могут указывать на связь идентифицированной основной сигнатуры гена с переходом воспаления, вызванного РНК-вирусами, к метаплазии, а также с прогрессированием легочных инфекций и эпителиальных деструкций в целом. Принимая во внимание промоцию генов не только в легочной ткани, но и в периферических клетках крови, можно предполагать возможность дальнейшего рассмотрения этих генов в качестве потенциальных диагностических маркеров тяжести инфекции. Эти предположения требуют дальнейших подробных исследований.

Учитывая продемонстрированную восприимчивость основных генов к инфекции SARS-CoV-2, ученые задались вопросом, с какими болезнями человека в целом могут быть связаны эти гены. Анализ отобранных данных из базы DisGeNET выявил связь интересующих генов с 64 различными заболеваниями, большинство из которых (56 из 64) были связаны с неоплазией, как и ожидалось из-за участия основных генов в регуляции клеточного цикла и пролиферации клеток. Интересно, что часть проанализированных генов, были связаны с новообразованиями, специфичными для легких, а часть из них были ассоциированы с некоторыми неопухолевыми заболеваниями и аденокарциномой других локализаций.

Полученные в ходе комплексного исследования данные позволили выявить подмножество генов (*Birc5*, *Cdca3*, *Mcm5*, *Nusap1*, *Plk1*, *Prc1*, *Spag5*, *Top2a* и *Trx2*) и транскрипционных факторов (*E2f1*, *E2f4* и *NfyA*), составляющих основную регуляторную структуру, ответственную за переход от острого воспаления к метапластическим изменениям в легочной ткани во время инфекции

вируса гриппа А [53]. Образую тесно взаимосвязанный кластер генов, выявленные гены демонстрируют удивительно схожий профиль экспрессии на протяжении всего периода развития инфекции и в основном участвуют в регуляции клеточного цикла, пролиферации клеток и ингибировании апоптоза, обеспечивая чрезвычайно быструю регенерацию и выживание вновь образованных клеток. Учитывая связь выявленных основных генов не только с развитием отдаленных последствий инфекции, но и с тяжелой инфекцией COVID-19 и аденокарциномой легких у пациентов, выявленные гены можно рассматривать как новую сигнатуру основного гена, связанную с переходом легочного воспаления в метаплазию и вероятными маркерами неблагоприятных долгосрочных последствий вирусной инфекции в легких.

Таким образом, было доказано потенциально возможное онкотрансформирующее действие при непосредственном контакте вируса и эпителиальной клетки. Этот же механизм (альтерация, воспаление, трансформация, пролиферация) потенциально возможен и в тиреоидном эпителии при наличии прямого доступа вируса в клетку через рецепторы.

Интегративный подход, в цикле статей «Ключевые признаки рака» («Hallmarks of Cancer»), подготовленных Hanahan D. и соавторами его более ранних работ, позволяющих комплексно оценить и предмет нашего исследования, отражен на рисунке 3 [70].

Такая концептуализация отличительных признаков рака, предпринятая авторами — это эвристический инструмент для преобразования огромной сложности фенотипов и генотипов рака в предварительный набор базовых принципов. По мере развития знаний о патогенетических механизмах канцерогенеза появляются другие аспекты в качестве потенциальных уточнений. В 21-м веке рак устрашает ученых-фундаменталистов и клиницистов широтой и масштабом своего разнообразия, охватывающего генетику, клеточную и тканевую биологию, патологию и реакцию на терапию. Все более мощные экспериментальные и вычислительные инструменты и технологии предоставляют

лавину «больших данных» о бесчисленных проявлениях заболеваний, которые охватывает рак.

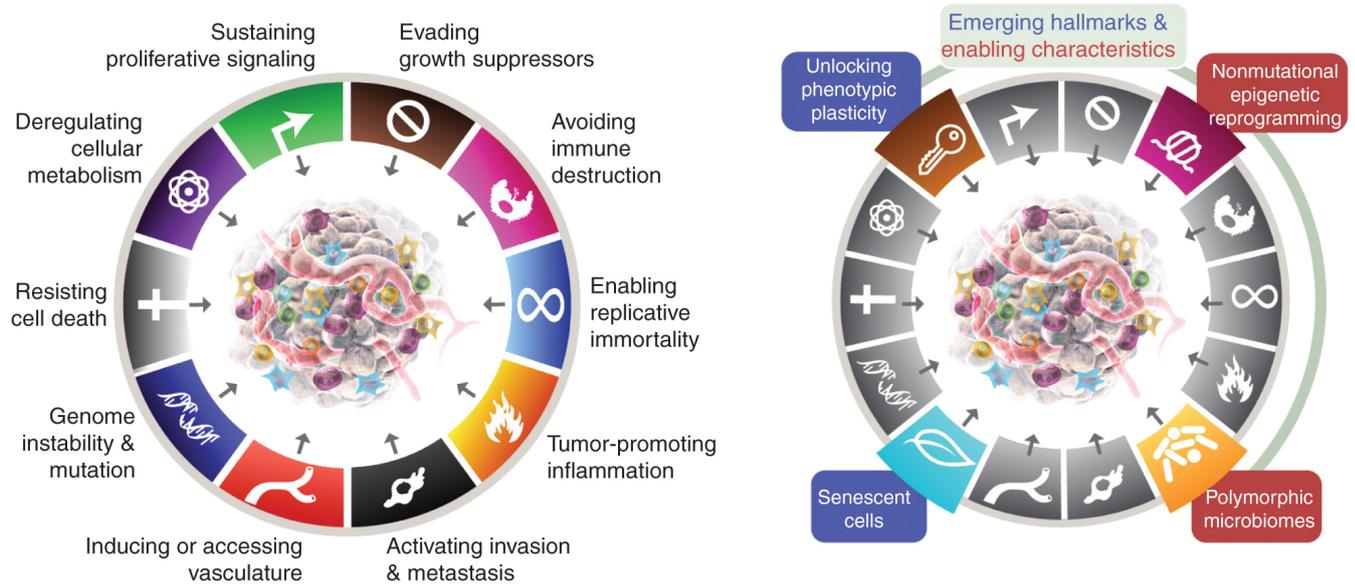


Рисунок 3. Признаки рака с графическим изображением ключевых маркеров, описанных авторами Ханаханом и Вайнбергом в публикациях различных лет [70-72].

На рисунке 3 слева схематически представлены ключевые признаки рака, предложенные авторами в 2000 и 2011 годах – это 10 базовых свойств, включающих «поддержание пролиферативного сигналинга», «уклонение от супрессоров роста», «репликативное бессмертие», «активация инвазии и метастазирования», «васкуляризация и доступ к сосудистой сети», «геномная нестабильность и мутации», «сопротивление апоптозу», «воспаление, способствующее росту опухоли», «перепрограммирование клеточного метаболизма», «избегание иммунно-опосредованной гибели» [71, 72].

На рисунке 3 справа схема из более позднего обзора, которая показывает дополнительные предложенные новые отличительные признаки как благоприятные для канцерогенеза вспомогательные характеристики, включая «разблокирование фенотипической пластичности», «немутационное

эпигенетическое перепрограммирование», «полиморфные микробиомы» и «стареющие (синэсцентные) клетки» [70].

Интегративная концепция, воплощенная в отличительных признаках рака, помогает преобразовать данные в логичную системную науку. В связи с этим, концепция Ханахана и Вайнберга получила широкое признание, показав перспективу исследований, чтобы более полно понять патогенетические механизмы развития рака и прогрессирования опухолей, применить эти знания для систематизации в практической онкологии [70-81]. Поскольку указанные ключевые признаки рака являются и его «слабыми местами», «позициями уязвимости», следовательно, они могут быть рассмотрены как точки приложения терапии или профилактики.

При оценке воздействия вируса SARS-CoV-2 на тироциты не исключены такие факторы, предложенные основателями теории онкогенеза, как поддержка пролиферативного сигналинга, сопротивление апоптозу и цитотоксической иммунной гибели, репликативные изменения и эпигенетическое перепрограммирование, активация воспаления и васкуляризации, перестройка матрикса, геномная и фенотипическая пластичность. Именно этими ключевыми признаками, гениально объединенными авторами обзора [70] мы руководствовались при подборе маркеров (антител для ИГХ метода), позволяющих исследовать экспрессию белков – как молекулярно-биологическое проявление конечной функциональной реализации этих взаимосвязанных молекулярно-генетических изменений с целью проверить гипотезу онкогенного действия вируса SARS-CoV-2 на ЩЖ.

За последние 30 лет достигнут значительный прогресс в области молекулярной биологии, нацеленной на выяснение механизмов, участвующих в процессе трансформации опухолей, прежде всего в исследованиях, направленных на понимание *внутриклеточных систем*, в которых задействованы киназные каскады Ras/Raf/MEK/ERK. Этот сигнальный каскад контролирует клеточную пролиферацию в нормальных и раковых клетках. Более того, они являются

важными путями развития резистентности к препаратам, используемым в химиотерапии.

Текущие исследования доказали, что сигнальный каскад Ras/Raf/MEK/ERK индуцирует пролиферацию злокачественных опухолей, поскольку он стимулирует рост клеток и одновременно ингибирует апоптоз. Кроме того, открытие того, что мутации в гене BRAF сами по себе могут привести к клеточной трансформации и пролиферации при некоторых типах рака, главным образом при раке ЩЖ, подчеркнуло необходимость проведения дальнейших исследований механизмов контроля этого типа генов и их продуктов. Перспективы изучения молекулярной биологии рака ЩЖ включают углубленное исследование генетических изменений для лучшего понимания их роли в онкогенезе. Эти данные являются основой для разработки таргетных препаратов, позволяющих блокировать ключевые сигнальные пути опухолевой трансформации. При этом особое внимание должно быть уделено поиску биомаркеров, способных предсказать ответ на лечение, а также разработке новых стратегий, направленных на преодоление лекарственной резистентности [82-91] и для нашей работы, проверяющей гипотезу возможных стартовых механизмов онкотрансформации под действием внешнего фактора вирусной природы, по-видимому, они имеют лишь вспомогательное второстепенное значение.

1.4. Изменение структуры заболеваемости хирургической патологией щитовидной железы в период пандемии COVID-19

Наша рабочая группа в начале пандемии COVID-19 (осенью 2020 года) отметила *изменение структуры тиреоидной патологии* (выросла частота обращений пациентов с тиреотоксикозом) и половозрастных характеристик обращающихся пациентов (выросла доля обратившихся с жалобами мужчин – почти в 7 раз, а также лиц более молодого возраста, также преимущественно среди мужчин). В связи с этим врачи-хирурги и сотрудники морфологической лаборатории, обслуживающей клинику эндокринной хирургии в МКБ Святителя

Луки, выполнили *статистический анализ морфологических заключений на предоперационном этапе диагностики и послеоперационном этапе*. Это позволило оценить влияние пандемии SARS-CoV-2 на изменение структуры заболеваемости хирургической патологией ЩЖ в Республике Крым в 2020-2022 годах. Как видно из указанного периода, нашими коллегами была изучена заболеваемость патологией ЩЖ в Крыму в раннем периоде, во время разгара заболеваемости и сразу после стихания пандемии COVID-19.

В период пандемии был установлен не только обратимый рост количества операций по поводу токсического зоба, но уже наметилась устойчивая тенденция к росту выявленных злокачественных опухолей ЩЖ. Отмечен парадоксальный рост числа узлов с выявленными достоверными признаками рака (среди пациентов, которым была выполнена ТАПБ на предоперационном этапе и выполнено оперативное вмешательство) в сравнении с периодом до пандемии. Парадоксальным его можно охарактеризовать, поскольку для всех, не угрожающих жизни состояний, в период пандемии была ограничена медицинская помощь, в том числе обследования (включая УЗИ-диагностику узловых образований ЩЖ, консультации хирурга) и оперативные вмешательства, что связано с перераспределением ресурсов медицинских учреждений в пользу лечения инфекционных больных с ТОРС. По нашему мнению, можно объяснить данный факт лишь острой манифестацией тиреоидной дисфункции у пациентов после COVID-19, в том числе и с субфебрильной температурой и сердцебиением, что побуждало их обращаться к терапевтам, перенаправлявшим больных к эндокринологу или хирургу. Выросло количество тиреоидэктомий по поводу рака ЩЖ, что идет вразрез с общемировыми исследованиями, где данный показатель был существенно снижен в период 2020-2022 годов из-за ограничений организационного характера [8]. При этом по данным крымской рабочей группы исследователей [9] в раннем периоде пандемии COVID-19 в Крыму было отмечено увеличение частоты встречаемости В-клеточных аденом (объяснение этому явлению в данный момент не представлено). В раннем периоде после пандемии была установлена более высокая частота встречаемости и

дифференцированных форм рака с невысоким прогнозом риска, уменьшение числа случаев высоко инвазивных форм, в том числе и более агрессивных морфологических подтипов [9]. Это несколько противоречит гипотезе онкогенного действия вируса, однако, с учетом того, что исследования были завершены в раннем периоде после пандемии, данное исследование требует продолжения и дальнейшего изучения. Таким образом, создается впечатление, что на раннем этапе за счет активного самообращения пациентов было выявлено множество случаев латентных форм медленно растущих классических вариантов папиллярных карцином, ткань ЩЖ у данной группы пациентов, по-видимому, чаще реагировала на инфекцию SARS-CoV-2 дисфункцией и гипертиреозом, что побуждало их обращаться к специалистам.

Также были выявлены и изменения морфологии удаленных при оперативном вмешательстве папиллярных карцином ЩЖ: выросла частота встречаемости микрокарцином, после стихания пандемии наметилась тенденция к активации лимфогенного метастазирования, однако отмечено снижение ангиогенного распространения опухолевых клеток. Также претерпел динамику экстратиреоидный рост – отмечено снижение частоты случаев инвазии опухолевых клеток в капсулу ЩЖ, как и прорастания карциномой капсулы ЩЖ. Эти изменения исследователи выявили на основании анализа морфологических заключений за указанный период [9].

Диаграмма, иллюстрирующая изменения морфологии рака ЩЖ, выявленные в крымской популяции в 2020-2022 годах, представлена на рисунке 4.

Такая динамика также может свидетельствовать как в пользу гипотезы о парадоксально более частом обращении пациентов к специалистам с жалобами на тиреоидную дисфункцию в период пандемии, так и в пользу гипотезы онкогенного влияния вируса.

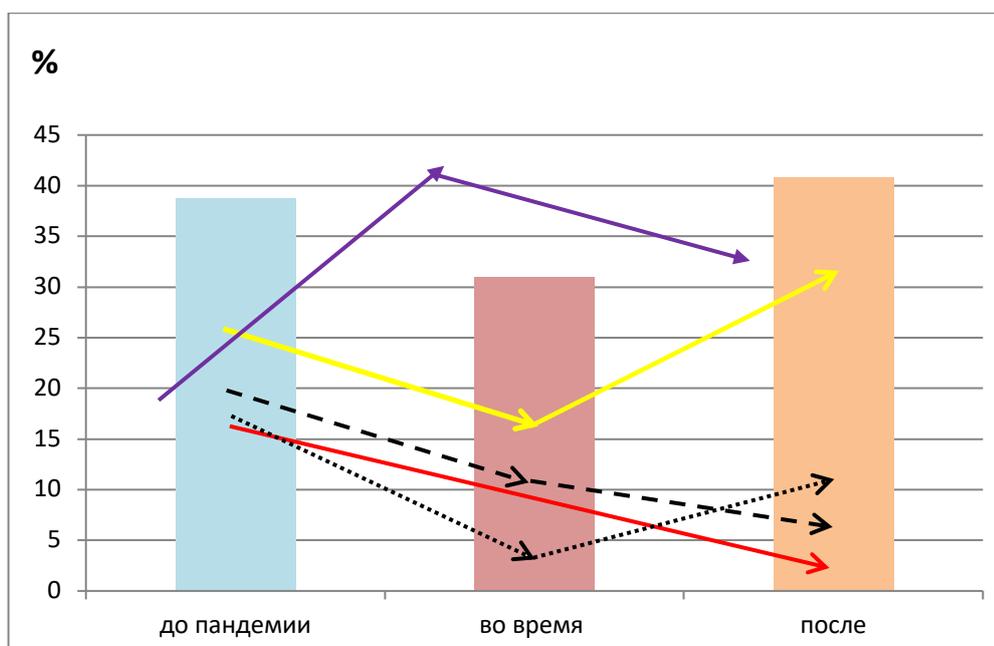


Рисунок 4. Частота выявления папиллярных карцином и других форм рака ЩЖ у жителей Республики Крым среди пациентов, прооперированных в 2020-2022 годах: 1) в период до разгара пандемии (первая половина 2020 года); 2) в период разгара (вторая половина 2020 и весь 2021 год) и 3) после стихания в раннем периоде (2022 год) [9].

Обозначения: столбцы указывают процент рака среди всех операций, а стрелки – частоту микрокарцином (сиреневые стрелки), метастазирования в лимфатические узлы (желтые стрелки), ангиоинвазию (красные стрелки), инвазии (мелкий черный пунктир) и прорастания капсулы (крупный черный пунктир).

Схожие тенденции роста агрессивности рака ЩЖ после пандемии были выявлены в крупных общемировых аналитических отчетах о влиянии пандемии COVID-19 на оказание хирургической помощи эндокринологическим пациентам, что описано ниже. Однако зарубежные коллеги ставили первоочередной задачей оценку качества организации медицинской помощи, а не выявление фундаментальных закономерностей и причин активации канцерогенеза в ткани ЩЖ в связи с влиянием вируса SARS-CoV-2 и вызванной им пандемии. Все это побудило нас расширить период исследования, изучить отдаленные последствия пандемии и применить молекулярно-биологические методики для объяснения выявленных процессов.

1.5. Влияние пандемии COVID-19 на оказание хирургической помощи эндокринологическим пациентам и последствия данных изменений

Повышение качества и продолжительности жизни населения – важнейший приоритет государственной политики, показатель эффективности социально-экономического развития страны и ее национальной безопасности. В настоящее время в мире сформировался устойчивый спрос на новое качество жизни. Следствием этого стал активный рост рынков биотехнологий и услуг высокотехнологичной и персонализированной медицины. Дальнейший прогресс в области биоинформационных, постгеномных и протеомных технологий предоставит медицине возможность персонализации терапевтического воздействия: назначение необходимого лекарства будет все чаще осуществляться на основании анализа индивидуальных особенностей пациента.

На фоне такого тренда активной борьбы с онкологическими заболеваниями, перспективами персонализации и приоритетами качества оказания помощи и качества жизни пациентов, большим испытанием для медицины стала пандемия COVID-19. Пандемия затронула более 667 миллионов человек, в результате чего погибло более 6 миллионов человек [92]. Множественные ее последствия актуальны в клинической практике и организации здравоохранения и в настоящее время.

Мы также приняли участие в мультицентровом исследовании университета Кальяри (Италия), целью этого проекта было количественное определение снижения хирургической активности у пациентов с цитологическими заключениями, соответствующими Bethesda III (атипия неясного значения) [8]. Исследование носило организационный характер, было выполнено в разгар пандемии и ставило задачей оценить, привели ли задержки в хирургическом вмешательстве к увеличению частоты возникновения агрессивных опухолей. Центром было предложено исследователям из разных стран предоставить данные обо всех тиреоидэктомиях, выполненных с 1 января 2019 года по 31 декабря 2021 года. Пациенты с неопределенными узлами (Bethesda III, атипия неясного

значения) были разделены на группы случаев, выявленных в допандемический этап, фазу эскалации пандемии и спада. Учитывали количество операций при Bethesda III, а у пациентов с послеоперационным диагнозом рака ЩЖ дополнительно отмечали еще ключевые морфологические показатели: верификацию опухоли размером более 10 мм, экстратиреоидное распространение, метастазы в лимфатические узлы, сосудистую инвазию, наличие отдаленных метастазов, а также случаи опухоли с высоким риском рецидива.

Данные 157 центров (49 стран), в том числе и Российской Федерации, где один из центров был представлен нашей рабочей группой, сообщили о 87 467 пациентах, перенесших операцию по поводу доброкачественных и злокачественных опухолей ЩЖ в указанный период. Соотношение мужчин и женщин составило 21,4 % и 78,6 %, соответственно. Наблюдали значительное сокращение числа операций во время фазы эскалации пандемии. Это привело к тому, что по сравнению с предпандемической фазой, на этапе снижения активности пандемии наблюдали увеличение возникновения опухолей ЩЖ размером более 10 мм, с метастазами в лимфатические узлы и рост числа опухолей с высоким риском рецидива. Мы, как и все многочисленные авторы данного исследования полагаем, что операцию по поводу узлов ЩЖ с атипией неясного значения не следует откладывать, особенно в будущих случаях эскалации новой волны пандемии COVID-19 или новой пандемии [8].

Исследования показали, что хирургическая активность при заболеваниях ЩЖ, особенно при узлах III-IV категории, в целом в мире снизилась во время пандемии COVID-19 [93-96]. В период с 2019 по 2020 год в Италии было зарегистрировано сокращение количества операций по поводу заболеваний ЩЖ почти на 40 % [94].

Эти исследования также показали, что опухоли в фазе снижения пандемии были более агрессивными, чем опухоли в предпандемической фазе. Обнаружили значительное увеличение частоты метастазирования в лимфатические узлы (увеличилось с 9,3 % до 12,5 %), опухолей с высоким риском рецидива

(увеличилось с 5,7 % до 7,7 %) и опухолей крупных размеров, что для ЩЖ составляет более 10 мм (рост от 69,0 % до 71,5 %).

Коллеги из Китая провели ретроспективное исследование 3 216 пациентов с раком ЩЖ в Уханьском университете с февраля 2017 года по сентябрь 2020 года [96]. Они обнаружили, что у пациентов с аденокарциномами ЩЖ после карантина был повышен риск метастазов в лимфатические узлы в несколько раз (7 % против 45 %) и на 7 % выросло экстрапиреоидное распространение по сравнению с пациентами в предпандемическом периоде.

Когда результаты мультицентрового исследования были опубликованы, мы сравнили влияние пандемии на хирургическую активность при патологии ЩЖ в Республике Крым в 2020-2022 годах, в других странах и общемировые тенденции, при этом выявили существенную региональную разницу. В Крыму не были так выражены ограничения оперативных вмешательств при высоких рисках онкопатологии ЩЖ, что позитивно сказалось на результатах для пациентов.

Как мы уже упоминали, причины описанных статистических различий не были предметом исследования ни в одном из указанных центров, и фундаментальные процессы выявленных изменений остаются открытым вопросом научного мирового сообщества до настоящего времени. Важно учесть, что во время и после пандемии сложившиеся тенденции роста заболеваемости в отношении опухолей ЩЖ, отмеченные нами в описании актуальности работы, вероятно, сохраняются, становясь еще более выраженными и агрессивными.

Мы выдвинули гипотезу об онкогенном действии вируса SARS-CoV-2 на ЩЖ. В мире среди ученых есть сторонники этой гипотезы, однако следует учитывать еще множество фактов.

Например, повышение качества диагностики и точности предоперационных исследований привело к увеличению количества лимфаденэктомий и, как следствие, к увеличению патогистологических заключений, выявивших метастазы в лимфатические узлы. Эта взаимосвязь описана американскими учеными, обнаружившими, что частота метастазов аденокарциномы ЩЖ в шейные лимфатические узлы удвоилась за период, начиная уже с 2010 года [97]. Другая

конкурирующая гипотеза мирового сообщества, касающаяся описываемого нами явления, заключается в том, что во время наиболее острых фаз пандемии, был отдан приоритет оперативных вмешательств у пациентов с более высокими рисками по данным тонкоигольной аспирационной пункционной биопсии (ТАПБ) узлов ЩЖ. Эта гипотеза подтверждается увеличением частоты центральной лимфодиссекции сразу после стихания пандемии. Таким образом, возможно, что после смягчения ограничений первой фазы пандемии первыми пациентами с узлами ЩЖ с атипией неясного значения (Bethesda III), доставленными на операцию, были именно пациенты с агрессивными предоперационными признаками. Эта гипотеза согласуется с тем фактом, что частота исследования узлов ЩЖ с атипией неясного значения (Bethesda III) оставалась одинаковой, в то время как возникновение агрессивных опухолей увеличивалось со временем, что, по-видимому, указывает на более точную индивидуализированную предоперационную оценку риска злокачественности новообразований ЩЖ.

Очевидно, что отсроченные вмешательства во время пандемии привели к увеличению числа агрессивных случаев рака ЩЖ из-за прогрессирования опухоли. Основным аргументом против тезиса о том, что запоздалое лечение узлов ЩЖ с атипией неясного значения (Bethesda III) привело к увеличению частоты агрессивных новообразований ЩЖ, является то, что опухоли ЩЖ в большинстве случаев характеризуются медленным ростом. Таким образом, задержка с хирургическим вмешательством, вызванная пандемией, если бы она достигла 6–12 месяцев, имела бы ограниченное влияние на прогрессирование опухоли, и большинство опухолей оставались бы латентными на протяжении всей пандемии. Ранний агрессивный рак, который не подвергается своевременной резекции, впоследствии может быть обнаружен как распространенная опухоль, в запущенной поздней для выявления стадии.

Тем не менее, большинство исследователей согласны с тем, что небольшая часть опухолей ЩЖ, характеризующихся более быстрым ростом и агрессивными характеристиками, могла прогрессировать во время пандемии, что привело к увеличению встречаемости опухолей с высоким риском рецидива и метастазов в

лимфатические узлы, которые наблюдали многие исследователи. Это наблюдение также свидетельствует в пользу онкогенного действия вируса на ЩЖ.

Большинство хирургов мирового сообщества считают, что инфекция SARS-CoV-2 могла сыграть роль в прогрессировании аденокарцином ЩЖ не только ограничением звеньев организации здравоохранения подавляющего большинства стран [8, 98-112]. Инфекция SARS-CoV-2, изменяя функцию ЩЖ посредством интенсивной воспалительной реакции в форме цитокинового шторма, может повредить ЩЖ, вызывая подострую или острую форму тиреоидита и стимулировать латентную хирургическую аутоиммунную и гиперпластическую патологию.

В связи с этим разработка предложений по внедрению в клиническую практику (диагностику стандарта обследования пациента с SARS-CoV-2, направленного на выявление «активации» ранее существующей патологии ЩЖ или её возникновения, опосредованного новой коронавирусной инфекцией) является чрезвычайно важной. Основываясь на патофизиологии инфекции SARS-CoV-2, важна рутинная оценка функции ЩЖ в острой фазе у пациентов с COVID-19, нуждающихся в высоком уровне интенсивной терапии, поскольку у них часто наблюдается тиреотоксикоз из-за подострого тиреоидита, связанного с SARS-CoV-2, а также во время выздоровления с целью диагностики и адаптации гормональной терапии.

Таким образом, SARS-CoV-2 оказывает значительное влияние на функцию ЩЖ, вызывая достаточно широкий спектр тиреоидной патологии. Нарушение функции ЩЖ при COVID-19 обусловлено как прямым цитотоксическим действием вируса, так и поэтапным иммуноопосредованным повреждением тироцитов. Исследования выявили наличие рецепторов и вирусных антигенов у заболевших лиц непосредственно в тироцитах, апоптоз фолликулярных и парафолликулярных клеток, ряд исследователей показал изменение уровней гормонов Т₃ и Т₄, а также развитие подострого тиреоидита, гипо- и гипертиреоза. Цитокиновый шторм, особенно повышение ИЛ-6, коррелирует с тиреоидитом и тиреотоксикозом. Также отмечено прогрессирование аутоиммунных заболеваний

ЩЖ, в том числе и тиреотоксикоза, имеющего аутоиммунную природу (болезнь Грейвса) у лиц, перенесших COVID-19. Эти процессы приводят к росту частоты патологии, требующей хирургического вмешательства. Исследования развития ЗНО тканей ЩЖ и динамики аденокарцином в период пандемии COVID-19 показало как существенный негативный эффект отложенных операций у пациентов с атипией клеток ЩЖ неясного генеза, выявленной при ТАПБ с заключением Bethesda III, так и вероятное прямое онкогенное действие вируса. Необходимы новые проспективные фундаментальные и прикладные исследования для расширения патофизиологических, эпидемиологических и клинических знаний, для оптимизации лечения заболеваний ЩЖ у пациентов, перенесших COVID-19.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Общий дизайн клинико-экспериментального исследования

Дизайн исследования разработан в соответствии с целью для достижения всех поставленных задач. Работа представлена тремя ключевыми направлениями (рис. 5).

1. Эксперимент на двух видах чувствительных к SARS-CoV-2 грызунов: 1) генномодифицированные мыши линии B6.Cg-Tg (K18-ACE 2) (N=30), имеющие, как и человек в тканях ACE 2 (АПФ 2) рецептор; 2) сирийские хомяки (*Mesocricetus auratus*) (N=40), чувствительность к вирусу SARS-CoV-2 является их видовой особенностью [113].

Поскольку работа подразумевает широкое использование молекулярно-биологических методов, чтоб выявить патогенетические закономерности развития патологии ЩЖ, использованы два вида животных для адаптации методик при возможном ограничении в связи с наличием видовой специфичности для реагентов. Эксперимент позволил реализовать все запланированные виды морфологических и молекулярных исследований, что невозможно на клиническом материале в силу объективных причин.

У грызунов исследованы признаки развития инфекции, уровень гормонов ЩЖ в сыворотке крови методом ИФА; выполнены гистологические исследования с приготовлением пропитанных парафином блоков и депарафинизированных срезов для окраски обзорными методами и постановки ИГХ реакции; микроскопия с морфометрией и микрофотосъёмкой, сканирование гистопрепаратов. Изучены все планируемые ИГХ маркеры воспаления (CD4, CD5, CD8, CD30, CD48, CD68, CD163, TNF, CD20, CD 138, iNOS), апоптоза и деструкции (CD-95 (FAS-R) и MMr3), онкогенеза (Циклин D1, Bcl-2, P16, P53, c-KIT), ангиогенеза (VEGF, Tie2) и аутоантител (к ТПО, Тиреоглобулину и ТТГ),

все количественные показатели прошли математическую обработку методами биостатистики.

2. Исследование клеток и тканей ЩЖ пациентов при ее аутоиммунных и гиперпластических заболеваниях, в сравнении у лиц, переболевших тяжелой формой COVID-19 и не болевших.

В этом разделе были доступны результаты клинических стандартных методик при работе с пациентами, данные инфекционного анамнеза, послеоперационной морфологической верификации диагноза патологии ЩЖ, парафиновые блоки и обзорные препараты, используемые с согласия пациентов для дальнейшей постановки реакции ИГХ и изготовления микрофотографий для описания и морфометрии. Наличие патологии верифицировал врач патоморфолог, он же отбирал оптимальный блок для постановки реакции и контролировал ее качество. Раздел выполнен преимущественно как ретроспективное исследование медицинской документации и морфологического материала выборки пациентов, давших согласие на исследования.

Проведено наблюдательное когортное ретроспективное исследование на базе Многопрофильной клинической больницы имени Святителя Луки и ГБУЗС «Городская больница № 1 имени Н.И. Пирогова» в период с 2019 по 2024 гг. Для ИГХ-исследования выборка сформирована из 80 пациентов женского пола в возрастном диапазоне 33-67 лет. Это связано с тем, что развитие и манифестация папиллярного рака ЩЖ в данной возрастной категории встречается чаще всего, и отмечена более высокая заболеваемость среди женщин. Всем пациенткам была выполнена геми/тиреоидэктомия в связи с хирургической патологией ЩЖ и патогистологически установлены диагнозы: 1) папиллярный рак щитовидной железы (N=40), 2) аутоиммунный тиреоидит (анамнез более 5 лет) (N=40) на фоне доброкачественной опухолевой патологии (фолликулярная аденома). В каждой группе пациенток выделено по две подгруппы (по N=20): 1) перенесшие средней тяжести и тяжелую форму COVID-19 с пневмонией и лечением в условиях стационара, 2) не болевшие COVID-19, возможно перенесшие заболевание субклинически или вакцинированные (составили группы сравнения).

3. Ретроспективный анализ структуры заболеваемости хирургической патологией ЩЖ в Республике Крым и городе Севастополе за период 2019-2024 годов с учетом динамики волн пандемии COVID-19, ранних и отдаленных последствий у пациентов.

Для этого использовали заключения ТАПБ на предоперационном этапе и патогистологическое заключение после операции (N=3353). Анализировали такие данные, как категория по Bethesda для цитологического материала в зависимости от изучаемого периода, процент выявления рака, аутоиммунной и доброкачественной пролиферативной патологии (распределение по нозологиям в соответствии с международной классификацией болезнью МКБ) в зависимости от периода пандемии и демографических данных (пол и возраст). Для выявленных карцином анализировали дополнительно гистологические типы, размеры опухоли, стадию по TNM (аббревиатура от tumor, nodus и metastasis), расчет риска рецидива по АТА (аббревиатура от American Thyroid Association, калькулятор оценки), экстратиреоидный рост, метастазирование.

На основании этого была дана характеристика наиболее часто возникающей патологии ЩЖ, развивающейся в связи с инфицированием SARS-CoV-2 в раннем и отдаленном периоде, разработаны предложения по внедрению рекомендаций обследования пациентов для выявления патологии ЩЖ, опосредованной COVID-19.

Таким образом, методологический подход, сочетающий в себе эксперимент и исследования ЩЖ человека, а также ретроспективный анализ, имеет ряд преимуществ. Он позволил на животных провести исследования в динамике развития инфекции SARS-CoV-2, поэтапно выводя их из эксперимента, при этом на операционном материале пациенток удалось выявить механизмы и направления патогенетических изменений отдаленных последствий у человека, используя сходные наборы маркеров в эксперименте и клинике. Ретроспективный анализ цитологических и патоморфологических заключений исследований ЩЖ пациентов, проживающих на Крымском полуострове, позволил проанализировать изменения на большой выборке и объективизировать динамику заболеваемости.



Рисунок 5. Дизайн исследования.

2.2. Экспериментальная модель новой коронавирусной инфекции на лабораторных грызунах

При проверке рабочей гипотезы на экспериментальной модели заражения новой коронавирусной инфекцией исследования проведены в условиях режимной лаборатории с соблюдением требований безопасности к патогенным биологическим агентам (рис. 6).

В эксперименте на первом этапе были использованы гуманизированные мыши B6.Cg-Tg (K18-ACE2) 2 Prln Ifnar1- (Stock No. 035041, The Jackson Laboratory, США). Они экспрессируют человеческий ACE 2, рецептор, используемый коронавирусом для проникновения в клетки. Промотор кератина 18 человека (KRT18) способствует экспрессии эпителиальными клетками дыхательных путей, где начинается инфекционный процесс. Таким образом, данная линия лабораторных животных является адекватным объектом исследования, а легкое – целевым органом для морфологической верификации наличия инфекции.

Животных в возрасте 7 недель случайно разделили на 2 группы: 1) интактные, 2) с моделью инфицирования без лечения. В каждой группе было по 15 самцов и 15 самок (N=30). Животных содержали в стандартных условиях вивария со свободным доступом к воде и пище. Выведение из эксперимента осуществляли на 5, 10 и 30 сутки.

Инфекцию моделировали путем интраназального введения взвеси частиц вируса SARS-CoV-2, штамм дельта, взяв 30 мкл из пробирки с транспортной средой и биоматериалом мазка глотки больных людей после ПЦР-теста, который впоследствии на третьи сутки после заражения подтверждал и инфицирование мышей.



Рисунок 6. Работа с экспериментальными животными. А, Б – мыши линии B6.Cg-Tg (K18-ACE2) 2 Prl^{mn} Ifnar1⁻ (Stock No. 035041, The Jackson Laboratory, США) после инфицирования находятся в условиях содержания в SPF клетке; все манипуляции выполняются в шкафу биобезопасности с использованием индивидуальной защиты; В – индивидуальная работа с животными в условиях фиксации в рестрейнере, Г – инфицированные сирийские хомяки.

Животные находились в SPF-клетках внутри ламинарных шкафов 2-го класса защиты, в лаборатории, имеющей разрешение на работу с микробами высокого класса опасности. При проведении манипуляций с животными использовали средства индивидуальной защиты (защитные комбинезоны, маски, очки, шапочки, бахилы, перчатки). Материал от животных (подстил, остатки корма) подвергали автоклавированию при температуре 131 С при давлении 3,1

МПа в течение 30 минут, помещения обеззараживали дезсредствами и действием ультрафиолета.

Для контроля состояния животных ежедневно проводили термометрию, взвешивание, внешний осмотр. Перед выведением из эксперимента животных интактной группы и зараженных усыпляли путем внутримышечного введения хлоралгидрата в дозе 200 мг/кг живого веса, после чего извлекали ЩЖ и легкие для верификации наличия изменений, фиксировали их в 10% забуференном формалине и поэтапно готовили для постановки ИГХ-реакции. Однако мы столкнулись со сложностью ее постановки на материале ткани ЩЖ мышей в связи с перекрестной реактивностью к части антител и компонентов системы детекции. Также существенной проблемой стало то, что мыши переносят инфекцию SARS-CoV-2 в виде ТОРС с летальными исходами.

Когда SARS-CoV-2 распространился по миру, для поддержки разработки вакцин и методов лечения исследователи искали подходящую модель мелких животных и выявили трансмиссивность SARS-CoV-2 у золотистых (сирийских) хомяков (*Mesocricetus auratus*) [113]. По данным публикаций, ИГХ анализ показал наличие вирусных антигенов в слизистой оболочке носа, эпителии бронхов и участках консолидации легких на 2-й и 5-й дни после инокуляции SARS-CoV-2 с последующим быстрым клиренсом вируса и гиперплазией пневмоцитов через 7 дней после инокуляции. В публикациях авторы сообщали, что SARS-CoV-2 эффективно передавался от привитых хомяков к интактным при прямом контакте и через аэрозоли. Вирусная РНК выявлялась в смывах из носа инокулированных хомяков в течение 14 дней, инфекционный период был коротким и коррелировал с обнаружением вируса [113]. В связи с этим, модель на хомяках является валидной и информативной.

Наши результаты показывают, что признаки, связанные с инфекцией SARS-CoV-2 у золотистых хомяков, напоминают те, которые обнаруживаются у людей с легкой и средней тяжести инфекцией SARS-CoV-2. Инфицированные хомяки показали потерю веса (до 5-7 %) на 6-7 день после введения вируса; все хомяки вернулись к своему первоначальному весу в течение 14 дней.

Хомяков в возрасте 7 недель (N=40) рандомно разделили на 2 группы: 1) интактные (5 самцов и 5 самок), 2) с моделью инфекции без лечения (15 самцов и 15 самок). Опытную группу разделили на 3 подгруппы в зависимости от срока выведения из эксперимента: ранний срок от заражения – 5 суток, промежуточный – на 10 сутки; отдаленный – 30 сутки. Животных содержали в стандартных условиях вивария со свободным доступом к воде и пище. Выведение из эксперимента осуществляли на 5, 10 и 30 сутки от дня заражения.

Хомяков инфицировали путем интраназального введения 10 мкл раствора носовой слизи пациентов, больных коронавирусом при наличии подтверждения методом ПЦР при пороговом цикле $C_t=16,5$. Через два дня животным выполнили ПЦР-исследование на наличие коронавируса в дыхательных путях, отмечали признаки заболевания, такие как снижение активности, учащенное брюшное дыхание, синюшность кожи. Вирусную нагрузку рассчитывали полуколичественно по значению C_t (пороговый цикл) — количество циклов, которое определяет концентрацию вируса в образцах. Графическое изображение результатов отражено кривыми на мониторе, а значения порогового цикла амплификации (C_t) выделены рамкой темно-красного цвета в нижней правой части изображения экрана монитора, присоединенного к амплификатору (рис. 7-9). По C_t показателю судили о высокой, средней или низкой вирусной нагрузке (чем ниже C_t , тем больше вирусная нагрузка). Считали вирусную нагрузку при $C_t < 20$ — высокой; $C_t 20-30$ — средней; $C_t > 30$ — низкой. Показатели вирусной нагрузки у хомяков на протяжении эксперимента фиксировали (табл. 1).

Для ПЦР-реакции использовали амплификатор (термоциклер) марки Bio-Rad CFX Real-Time PCR Systems. Использовали набор реагентов для выявления РНК коронавируса COVID-19 методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ПЦР) Поливир SARS-CoV-2 Express. Эти реагенты имеют регистрацию для медицинских исследований и чувствительны к циркулировавшему на момент исследования штамму коронавируса. Рисунки 7-9 демонстрируют динамику ПЦР-тестов в эксперименте на хомяках.

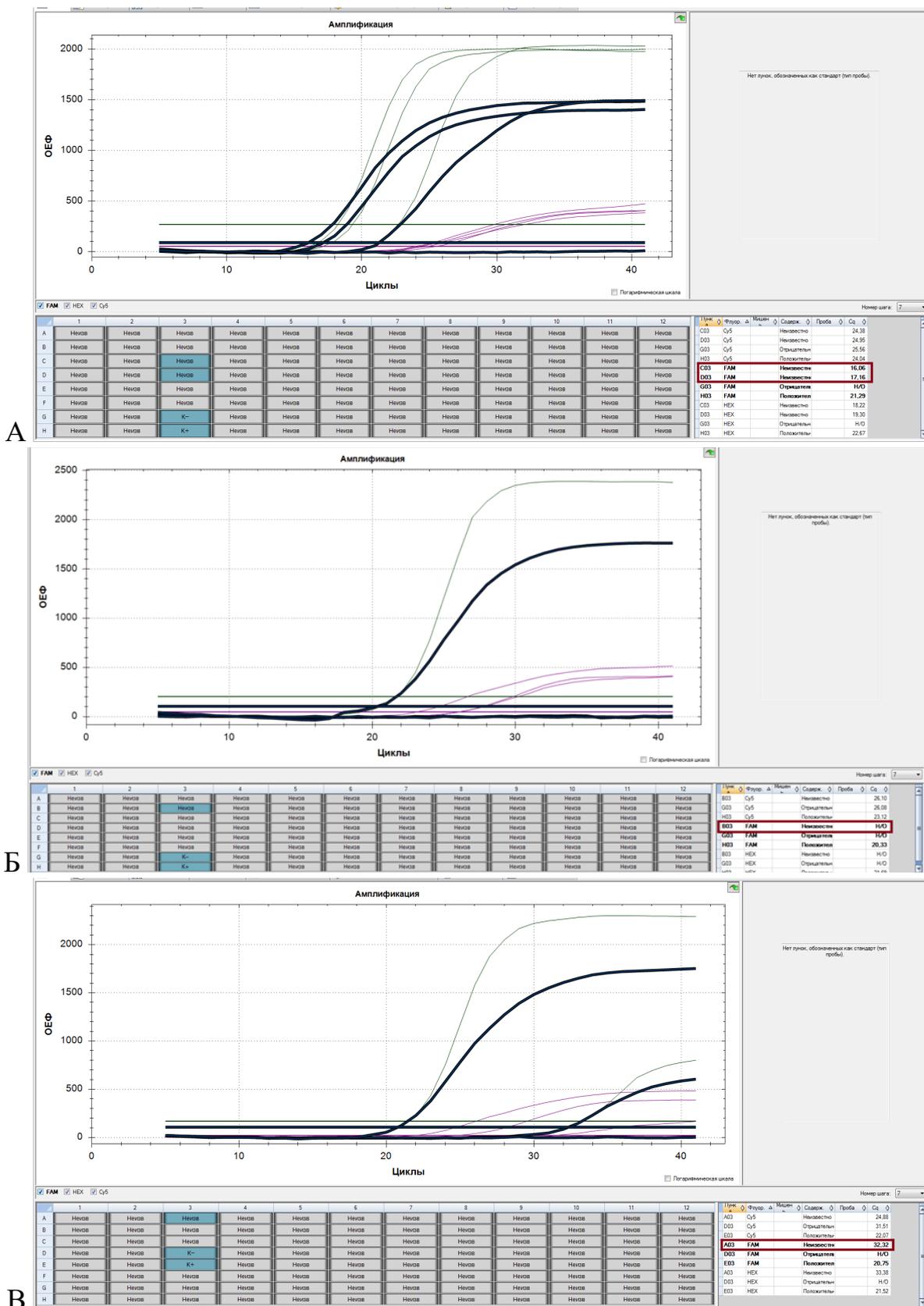


Рисунок 7. Оценка результатов ПЦР-теста на 3 сутки у хомяков.

А. Материал от инфицированного самца, 3 сутки (положительный результат).

Б. Материал контрольной самки, 3 сутки (отрицательный результат).

В. Материал от инфицированной самки, 3 сутки (положительный результат).

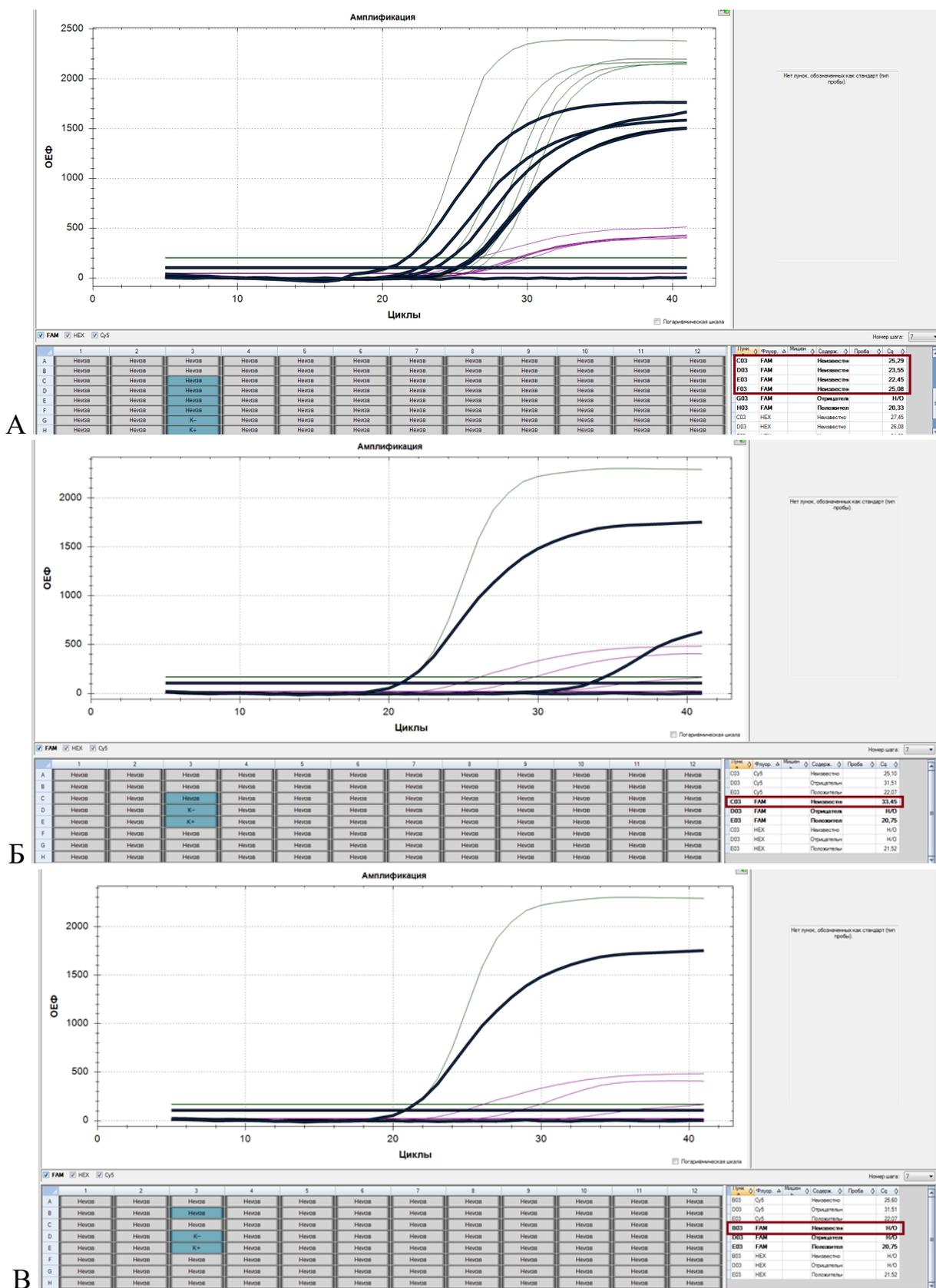


Рисунок 8. Оценка результатов ПЦР-теста на 8 сутки у хомяков.

А. Материал от инфицированного самца, 8 сутки (положительный результат).

Б. Материал от инфицированного самца, 8 сутки (положительный результат).

В. Материал от инфицированной самки, 8 сутки (отрицательный результат).

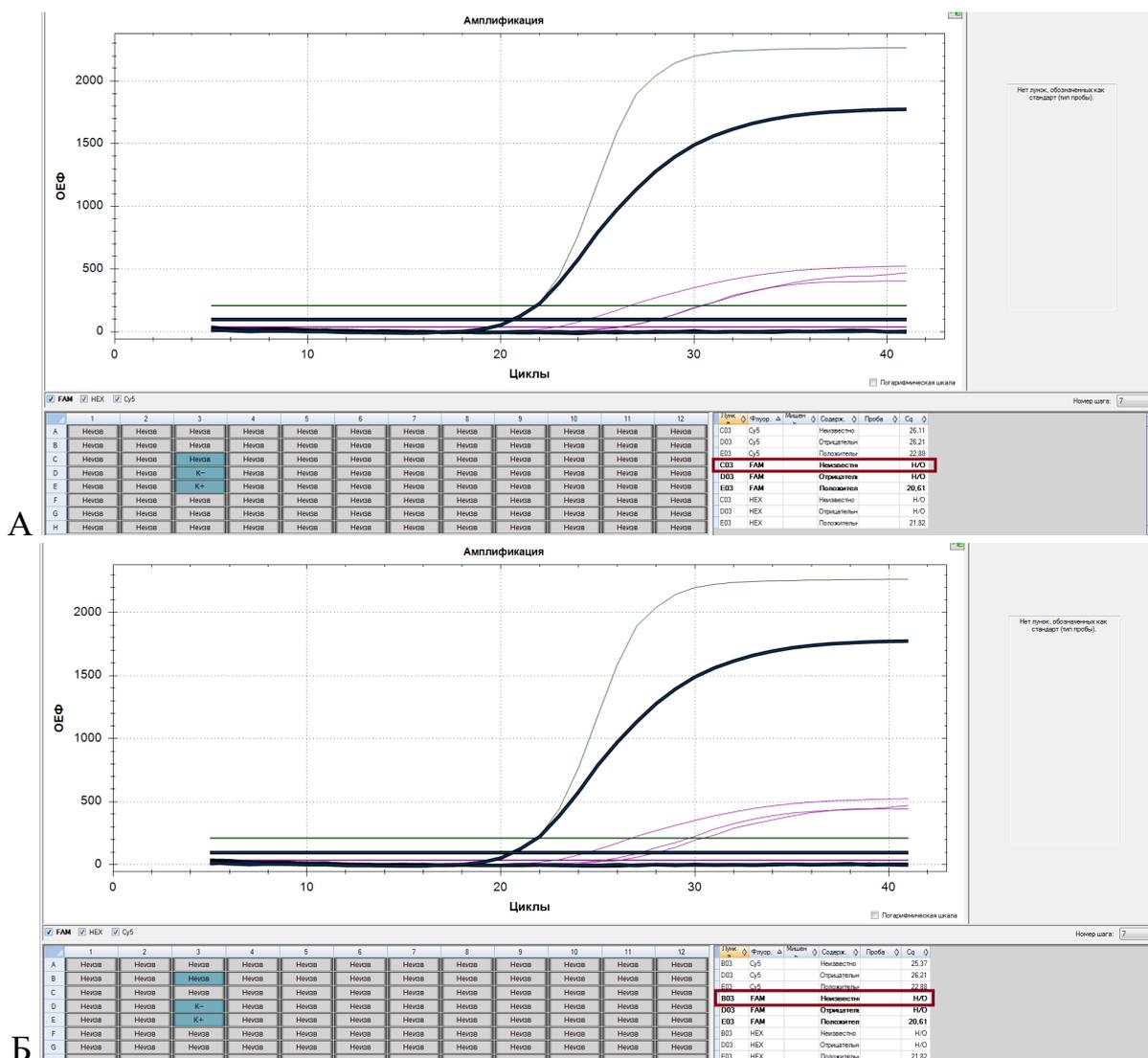


Рисунок 9. Оценка результатов ПЦР-теста на 10 сутки у хомяков.

А. Материал от инфицированного самца, 10 сутки (отрицательный результат).

Б. Материал от инфицированной самки, 10 сутки (отрицательный результат).

Как видно, на третьи сутки кривые демонстрируют репликацию вируса у всех животных подопытной группы и ее отсутствие у контрольной особи (рис. 7).

На восьмые сутки у инфицированных животных возможны различные варианты ПЦР теста – от явно положительных до отрицательных, динамика реконвалесценции у животных была такова, что 7-8 сутки явились периодом выздоровления грызунов в нашем эксперименте (рис. 8).

На десятые сутки все ПЦР-тесты были отрицательны (рис. 9).

Таблица 1. Показатели вирусной нагрузки (Сt) хомяков подопытной группы в течение эксперимента (среднее значение, N=30: 15♂ и 15♀)

Пол	3 сутки	8 сутки	13 сутки	30 сутки
Самцы	22,79±1,56	32,32±1,68	35,47±2,84	-
Самки	25,18±0,25	33,45±2,16	-	-

Животных выводили из эксперимента под изофлурановым наркозом путем диспозиции шейных позвонков с повреждением спинного и продолговатого мозга.

2.3. Морфологические и молекулярные методы изучения патогенетических механизмов повреждения щитовидной железы экспериментальных животных и пациентов, перенесших инфекцию

На протяжении периода выполнения диссертации, ЦНИЛ, где выполнены исследования, как научно-диагностическое подразделение Медицинского института при ФГАОУ ВО «КФУ им. В.И. Вернадского» совмещала выполнение морфологической (цитопатология пунктатов ТАПБ и патогистология операционного материала) и молекулярно-генетической диагностики для специализированного эндокринологического хирургического стационара в МКБ Святителя Луки, а также научных исследований, в том числе с ГБУЗС «Городская больница № 1 имени Н.И. Пирогова». Это создало предпосылки для сбора и формирования биокolleкции, что позволило нам провести исследование на большой выборке цитологического и операционного материала ЩЖ.

Все ткани лабораторных животных и удаленных во время операции ЩЖ человека после фиксации в 10% забуференном нейтральном формалине, обезвоживания и стандартной проводки, заливали в парафиновые блоки согласно инструкциям производителей рекомендованного гистологического оборудования [114, 115]. Использован морфологический комплекс приборов преимущественно фирмы Leica (Германия), включающий вырезную станцию LEEC ltd, гистопроцессор LOGOS (Mielstone, Италия), заливочный комплекс Leica EG

1150, микротом Leica RM 2255, микроскоп Leica DM2000 и сканер гистопрепаратов Aperio CS2.

Блоки пациентов каталогизировали, собирая максимально возможные аннотированные клинические данные, и отбирали оптимальные для постановки ИГХ случаи. После деперсонализации составляли обобщенные каталоги с использованием разработанных Excel форм таблиц. Обновление каталога проводили ежегодно в декабре или по требованию с внесением новых данных, пересмотром номенклатуры и классификации. Для этого при деперсонализации создавали таблицу соответствия номера в каталоге номеру истории болезни, доступную одному ответственному исполнителю, гарантирующему неразглашение. Это позволило создать актуальные коллекции с большим перечнем клинических и анкетных данных.

При заключении договоров с юридическими и физическими лицами и при обслуживании пациентов внутри учреждения, лаборатория инициировала подписание информированного согласия пациентов о возможности проведения дополнительных иммуноморфологических и молекулярно-генетических исследований с исследовательской целью и публикации их результатов в деперсонафицированном виде для развития научных разработок.

При работе с биоматериалом пациентов и в работе с животными соблюдены принципы, предъявляемые Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации (World Medical Association Declaration of Helsinki, 1964, ред. 2013). Информированное согласие получено от всех участников исследования. Манипуляции с животными соответствовали Закону «О ветеринарии», Правилам проведения работ с использованием экспериментальных животных, Конвенции Совета Европы о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (Страсбург, 1986г), Руководству по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских технологиях (2010 г.) национальным законам, рекомендациям совета по исследованиям и правилам,

принятым в учреждении. Исследование одобрено Комитетом по этике при ФГАОУ ВО «КФУ им. В.И. Вернадского» (протокол № 9 от 12 сентября 2024 г.).

В эксперименте из всех удаленных у лабораторных животных ЩЖ формировали мультиблоки (по группам животных) и использовали для морфологических и ИГХ-исследований. Ткань легкого изучали только обзорными методами окраски для предметной идентификации признаков респираторного заболевания, соответствующих сроку эксперимента.

Парафиновые срезы толщиной 3-5 мкм помещали на высокоадгезивные стекла X-TRA M/Slides (Leica). Постановку ИГХ-реакции производили по протоколу, предустановленному в иммуногистостейнере Bond-Max и в соответствии с рекомендациями производителей антител.

Депарафинизацию срезов осуществляли в растворе на основе цитратного буфера Bond Dewax Solution (Leica, Великобритания) 10 мин при температуре 70°C. Высокотемпературную демаскировку антигенов выполнили с помощью раствора для высокотемпературной демаскировки на основе EDTA буфера с pH 8,9 BondEpitopeRetrieval 2 (Leica, Великобритания) либо цитратного буфера с pH 5,9-6,1 BondEpitopeRetrieval 1 (Leica, Великобритания) в течение 20 минут при температуре 96°C. Использовали антитела-маркеры патофизиологических процессов, предназначенные для решения поставленных в работе задач (табл. 2).

Изучены фрагменты ЩЖ пациентов при пролиферативных и аутоиммунных болезнях морфологическими и молекулярно-биологическими методами. Собран морфологический материал на предоперационном этапе диагностики (материал пунктатов ТАПБ) и операционный материал удаленных ЩЖ или их долей. Ключевой особенностью используемого нами подхода является сопоставление морфологии одного и того же участка ткани железы при установленной нозологии на разных этапах работы с пациентом и разных биологических уровнях: тканевом, клеточном, молекулярном. Так, при выполнении ТАПБ хирург под УЗИ контролем получает клетки узлового образования. Этот узел после удаления исследует морфолог на светооптическом уровне, при этом данный материал может быть изучен молекулярными методами. Такой подход дает комплексные

сведения о патогенезе и морфогенезе заболеваний ЩЖ, а ИГХ выступает в качестве вспомогательного метода для морфологической оценки ткани.

Таблица 2. Перечень маркеров, использованных для изучения дисфункции ткани щитовидной железы при инфицировании SARS-CoV-2

ИГХ маркер	Назначение и цель исследования для изучения патогенеза повреждения щитовидной железы при инфекции SARS-CoV-2
CD4	Т-хелперы и антиген-презентирующие клетки, несбалансированная иммунная провокация
CD5	модулирование сигнального пути антигенного рецептора, ингибирует активность Fas L, ингибирует активность Каспазы 8
CD8	Т-киллеры, под действия патогена становятся эффекторными
CD30	регулятор апоптоза, в том числе дендритных клеток, ограничивает пролиферативный потенциал аутореактивных эффекторных Т-клеток CD8 и защищает организм от аутоиммунной агрессии
CD48	биомаркер аллергических или инфекционных заболеваний
CD68	маркер моноцитов крови и тканевых макрофагов
CD163	белок-регулятор острой фазы воспаления, тканевые макрофаги
TNF	воспалительный цитокин, коррелирует с тяжестью COVID-19
CD20	В-лимфоциты
CD138	синдекан 1, демонстрирует воспаление и онкогенез
iNOS	синтезируется в ответ на цитокины, инфекцию, рост опухоли, инициирует септический шок и аутоиммунные процессы
CD95	маркер апоптоза FAS-R, снижается при резистентности опухоли
ММр 3	показывает проницаемость гистогематических барьеров - участвуют в расщеплении белков внеклеточного матрикса и во время ремоделирования тканей в норме и деструкции в патологии
Cyclin D1	коррелирует с ранним онкогенезом и прогрессированием опухоли, связан с VEGF, сверхэкспрессия подавляет экспрессию Fas
Bcl-2	коррелирует с проонкогенезом, подавляет апоптоз
p16	замедляет клеточный цикл, антионкоген
p53	играет роль в регуляции клеточного цикла, стабильности генома
c-KIT	в тучных клетках, в микроокружении опухоли способствуют ангиогенезу, что приводит к усилению роста и метастазированию
VEGF	сосудистый эндотелиальный фактор роста, васкулогенез
Tie 2	тирозинкиназа, рецептор ангиопоэтина в субпопуляции эндотелиоцитов и моноцитов, образование кровеносных сосудов
ауто-антитела	к тиреопероксидазе, к тиреоглобулину и к рецептору тиреотропного гормона – маркеры аутоиммунных процессов

Клоны антител подбирали таким образом, чтоб они были специфичны для человека и грызунов. Протоколы работы адаптировали при использовании рекомендаций производителя и постановки контрольных реакций в лаборатории. ИГХ в эксперименте выполнили на материале сирийских хомяков (табл. 3).

Таблица 3. Протоколы постановки ИГХ реакции с различными антителами и типичная локализация экспрессии в структурах клеток

Название	Клон	Производитель	Разведение	Локализация
CD4	SP35	Cell Marque	1:100	мембрана
CD5	SP19	Cell Marque	1:250	мембрана
CD8	4B11	Leica	RTU	мембрана
CD30	Ber-H2	Cell Marque	1:100	мембрана
CD48	EPR4108	Abcam	1:100	мембрана
CD68	514H12	Leica	1:200	цитоплазма
CD163	EPR19518	Abcam	1:200	цитоплазма
TNF	TNFA/1172	Abcam	1:100	мембрана, цитоплазма
CD20	L26	Leica	1:100	мембрана
CD138	MI15	Leica	RTU	цитоплазма
iNOS	polyclonal	Abcam	1:100	ядро
CD95	polyclonal	BD	1:100	цитоплазма
MMp 3	polyclonal	Abcam	1:50	цитоплазма
Cyclin D1	YN00565r	Elabscience	1:100	цитоплазма
Bcl-2	BCL-2/100/D5	Leica	1:100	цитоплазма
p16	polyclonal	BD	1:20	ядро
p53	DO7	Leica	1:200	ядро
c-KIT	CD117	Leica	1:50	цитоплазма
VEGF	RB-9031-P1	Thermo Scientific	1:100	цитоплазма
Tie 2	polyclonal	Sigma	1:50	цитоплазма
антитело к ТПО	YN01595r	Elabscience	1:100	цитоплазма
антитело к тиреоглобулину Tg	MRQ-41	CellMarque	1:150	цитоплазма
антитело к рецептору TTR	polyclonal	CellMarque	1:150	цитоплазма

Инкубацию с первичными антителами в рекомендованном производителем разведении проводили в течение 15 минут при комнатной температуре.

Разведение осуществляли с помощью раствора для разведения антител на основе трис-буфера Bond Primary Antibody Diluent (Leica, Великобритания).

Блокировку эндогенной пероксидазы (5 минут при комнатной температуре) и окрашивание (инкубация с вторичными антителами 8 минут при комнатной температуре, инкубация с полимером в течение 8 минут и инкубация с хромогеном 10 минут, контрастирование ядер гематоксилином 5 минут) осуществляли с помощью набора реагентов для детекции на основе полимера Bond Polymer Refine Detection (DS9800) (в состав набора входят пероксидазный блок, вторичные кроличьи антимышинные антитела (класс IgG), антикроличьи антитела (класс IgG) меченые полимером, ДАБ, раствор гематоксилина). После каждого этапа производили промывку препарата с помощью отмывочного раствора на основе Трис-буфера, pH 7,7, Bond Wash Solution 10X Concentrate (Leica, Великобритания) в разведении 1:10.

Оценку проводили при увеличении 40x в 5 полях зрения по каждому препарату, что ввиду малого размера органа включало оценку всей его площади. Маркеры дифференцировки лимфоцитов, а также c-Kit, iNOS, Cyclin D1, p16, p63, Bcl-2, Mmp3 в строме железы оценивали количеством позитивно окрашенных клеток в одном поле зрения, маркер Tie 2 – количеством и интенсивностью окрашивания в эндотелии сосудов. Маркеры CD95, VEGF, TNF, Mmp3, Tg, TSH, TPO в тироцитах оценивали полуколичественно, отдельно число окрашенных клеток и интенсивность, по шкале: 0- отсутствие окрашивания; 1 – до 30% окрашенных клеток / слабое; 2 – 30-60% окрашенных клеток / средней интенсивности; 3 – более 60% окрашенных клеток / яркое.

Для изучения функции ЩЖ определяли T_3 , T_4 и ТТГ методом ИФА у лабораторных грызунов. Кровь брали у всех животных прижизненно под эфирным наркозом, получали ее сублингвально, проколом подъязычного венозного сплетения в пробирки с 100 мкл раствора ЭДТА. Готовили сыворотку для определения уровня гормонов методом ИФА. Использовали анализатор Multiskan FC (Thermo Fisher Scientific, США), pH-метр стационарный 2211, промыватель для микропланшетов W600 (Sinnova), термошейкер для

микропланшетов PST-60HL (Biosan, Венгрия) и наборы для определения тиреотропного гормона (TRAb), свободного и общего тироксина T4 (fT4) и трийодтиронина T3 (fT3) у мышей производства «FineTest».

2.4. Методы изучения структуры заболеваемости хирургической патологией щитовидной железы в период пандемии

Для периодизации пандемии и выявления объективных критериев разделения этапов исследования: до вспышки пандемии, во время разгара и после стихания в раннем и отдаленном периоде, мы использовали результаты скрининга населения Республики Крым и города Севастополя доступными методами диагностики (рис. 10). На основании этого выделили ключевые периоды исследования заболеваемости хирургической патологией ЩЖ, определив даты преимущественно на основании динамики ПЦР-тестов (рис. 11). В эти ключевые периоды мы проводили стандартную рутинную диагностику хирургических заболеваний ЩЖ по разработанному ранее алгоритму (рис. 12).

Основные диагностические методы. Периоды применения

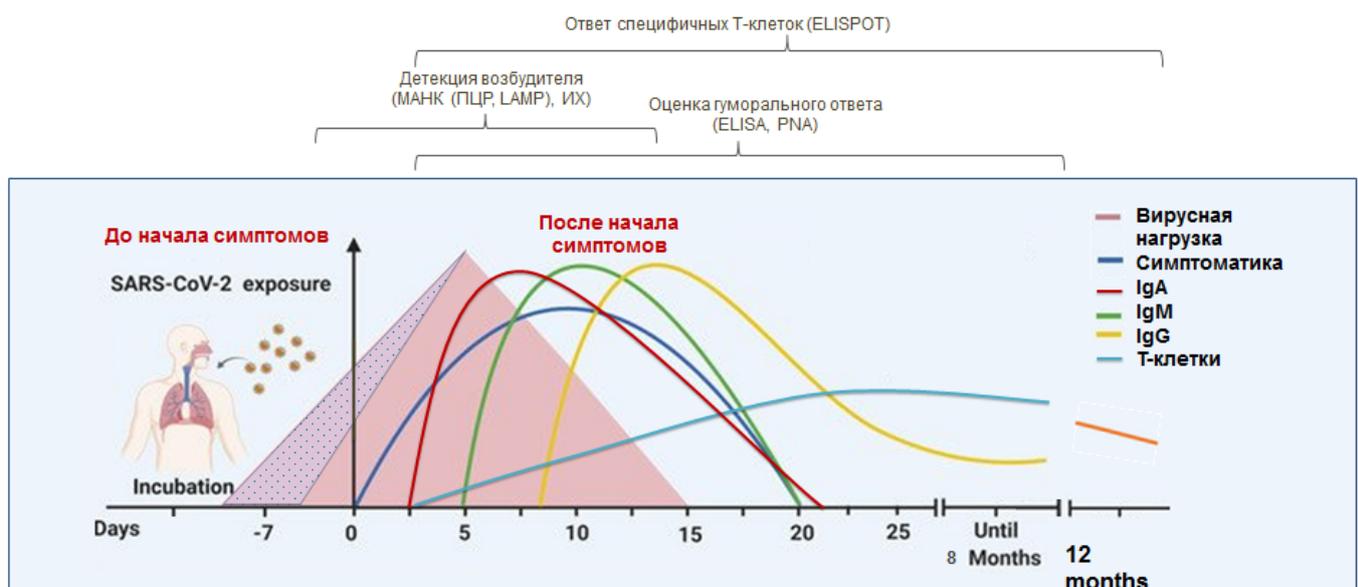


Рисунок 10. Основные диагностические методы во время пандемии COVID-19. Адаптировано из [116-118].

Динамика заболеваемости (% положительных ПЦР-тестов)

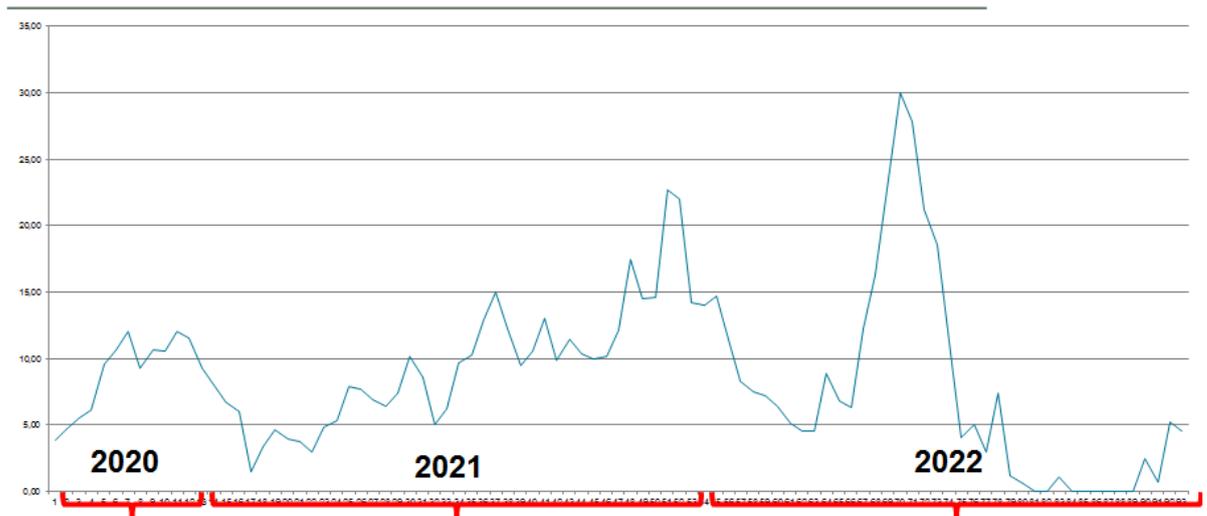


Рисунок 11. Динамика пиков инфицирования населения Крымского полуострова во время пандемии COVID-19 (по данным региональной ПЦР-лаборатории).

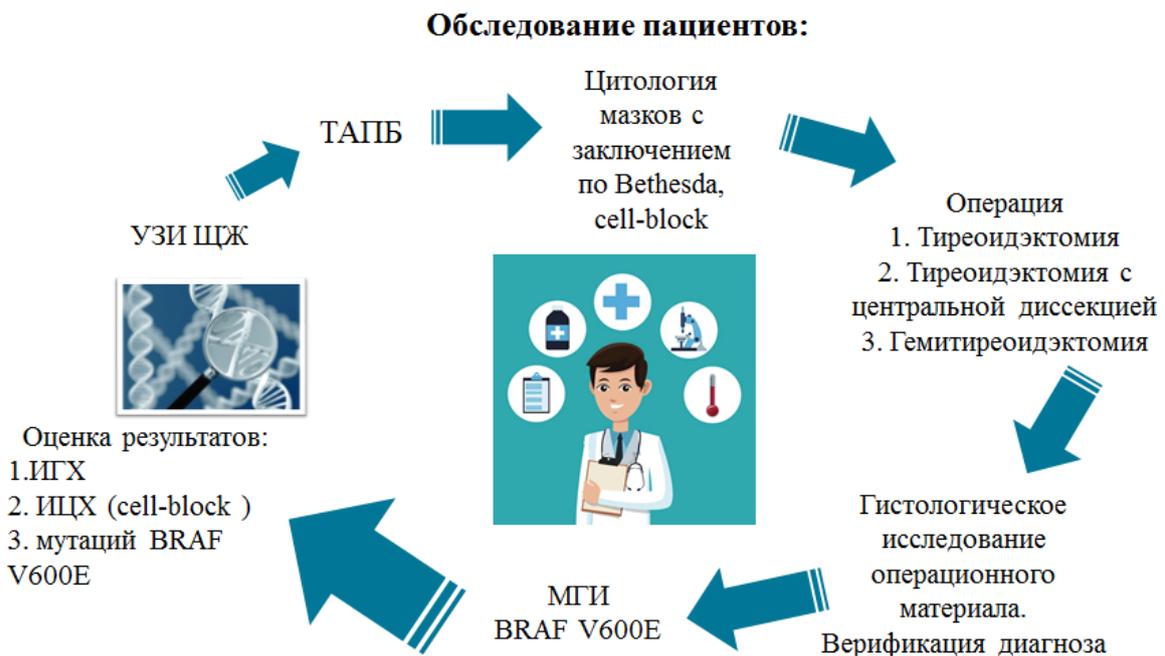


Рисунок 12. Алгоритм обследования пациентов с узловыми образованиями щитовидной железы.

Примечание: ИЦХ – иммуноцитохимическое исследование на клеточном блоке (cell-block), МГИ – молекулярно-генетическое исследование мутации BRAF V 600 E (вспомогательные методы).

Ретроспективное исследование структуры хирургических заболеваний ЩЖ проводили среди населения Республики Крым и г. Севастополя за пятилетний период (2019-2024 гг.), сгруппировав обследуемые случаи в зависимости от периода пандемии:

1 группа – 2019 г и первое полугодие 2020 г., соответствует периоду до пандемии COVID-19 в Республике Крым и г. Севастополе.

2 группа – вторая половина 2020 г., весь 2021 г., соответствует периоду пандемии COVID-19 в Республике Крым и г. Севастополе.

3 группа – 2022 г., соответствует раннему периоду после окончания пандемии COVID-19 в Республике Крым и г. Севастополе.

4 группа – 2023-2024 гг., соответствует отдаленному периоду после окончания пандемии COVID-19 в Республике Крым и г. Севастополе.

Общая выборка составила 2523 случая по Республике Крым (1831 цитологическое исследование материала ТАПБ и 692 гистологических исследования операционного материала больных хирургической патологией ЩЖ), а по г. Севастополю 830 исследований (476 цитологических и 354 гистологических исследования).

Пунктаты ТАПБ и гистологические препараты, а также их описания, были взяты из архива морфологических отделов лабораторий, обслуживающих МКБ Святителя Луки ФГАОУ ВО «КФУ им. В.И. Вернадского», г. Симферополь (лаборатория ЦНИЛ) и ГБУЗ С «Городская больница №1 им. Н.И. Пирогова», г. Севастополь (патологоанатомические отделение). Основанием для работ был заключенный договор между ФГАОУ ВО «КФУ им. В.И. Вернадского» и ГБУЗ С «Городская больница №1 им. Н.И. Пирогова» о проведении совместных исследовательских работ № 11/6-15/5-115 от 09.07.2024.

Архивный биоматериал пунктатов ТАПБ был окрашен по методу Май-Грюнвальда и оценен по классификации Bethesda с учетом современных рекомендаций цитопатологов, операционный материал был обработан для гистологии и окрашен обзорными методами, оценен в соответствии с актуальной классификацией заболеваний ЩЖ.

2.5. Математико-статистические методы анализа цифровых данных

Статистическую обработку результатов молекулярно-биологических исследований проводили с использованием программного продукта STATISTICA 10. Методами описательной статистики определяли нормальность распределения. Ввиду небольшого числа животных в группе ($n=5$) распределение по большинству признаков отличалось от нормального, поэтому вычисляли медиану, определяли значения нижнего и верхнего квартилей. В таблицах данные представлены в виде $Me [Q1;Q3]$. Отличия между группами определяли методом Манна-Уитни попарным сравнением групп с интактной группой, также выявляли отличия значений признака между животными разного пола в одинаковый срок эксперимента, а также между животными одного пола в разные сроки эксперимента. У человека – между группами пациенток с хирургической патологией разного типа. Достоверными считали отличия при $p \leq 0,05$.

Для ретроспективных исследований статистический анализ проводили с использованием программы StatTech v. 4.7.1 (разработчик - ООО "Статтех", Россия). Категориальные данные описывали с указанием абсолютных значений и процентных долей. Сравнение процентных долей при анализе многопольных таблиц сопряженности выполняли с помощью критерия хи-квадрат Пирсона. Апостериорные сравнения выполняли с помощью критерия хи-квадрат Пирсона с поправкой Холма. Оценку силы связи между категориальными показателями выполняли с помощью V Крамера, значения которого интерпретировали согласно рекомендациям Rea & Parker (2014). Различия считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

ГЛАВА 3. СТРУКТУРНЫЕ, ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ И МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ ИНФИЦИРОВАНИЯ ЖИВОТНЫХ ВИРУСОМ SARS-CoV-2

3.1. Динамика инфекционного процесса, уровня тиротропина и тиреоидных гормонов, гистологических изменений ткани щитовидной железы у гуманизированных мышей

На третьи сутки после заражения вирусом SARS-CoV-2 мышей линии B6.Cg-Tg (K18-ACE2) температура тела всех животных в группе с моделью инфицирования поднялась в среднем на 4 С°, снизилась двигательная активность, прекратился набор веса. На десятые сутки наблюдали нормализацию температуры, учащенное брюшное дыхание, цианоз кожи на ушах и хвосте. В период с 12-х по 15-е сутки животные либо выздоравливали, либо погибали. При вскрытии погибших животных и выведенных из эксперимента в сроки, соответствующие разработанному дизайну исследования, при гистологическом исследовании ткани легкого установлены морфологические признаки пневмонии.

При исследовании ЩЖ в этой серии работ изучали ее структуру и функцию. О функции ЩЖ можно судить напрямую по динамике уровня тиреоидных гормонов, аденогипофизарного ТТГ и косвенно – по структуре фолликулов. Т₄ является основным гормоном, продуцируемым ЩЖ, из которого посредством каталитических процессов дейодирования образуется Т₃. При этом Т₄ связан в сыворотке крови с транспортными белками, ограничивающими его контакт с рецепторами, поэтому общий и свободный Т₄ имеют разный функциональный потенциал и разную информативность. Более активным гормоном в ткани и клетке является Т₃. Однако о функции ЩЖ, на наш взгляд, более точно судить по уровню общего Т₄.

В результате экспериментальных исследований уровня гормонов у гуманизированных мышей B6.Cg-Tg (K18-ACE2) мы не обнаружили

статистически значимой динамики. Уровень Т3, Т4 и ТТГ был стабилен в исследуемых группах, отличия количественных показателей не имели математико-статистической значимости в зависимости от пола, срока эксперимента, наличия или отсутствия инфицирования. У всех особей уровень Т3 варьировал в пределах 47-42 пг/мл, уровень ТТГ – аналогично в пределах 1-2 нг/мл без значимых отличий и тенденций к динамике. Уровень Т4 свободного имел тенденцию к росту от $0,05 \pm 0,015$ нМоль/мл в группе самцов контрольной группы до $0,098 \pm 0,03$ нМоль/мл у самцов-реконвалесцентов, а в группе контрольных самок он был в среднем выше, чем у самцов, но мало варьировал внутри экспериментальных групп и сроков (от $1,01 \pm 0,3$ нМоль/мл в контроле до $0,96 \pm 0,24$ нМоль/мл у самок-реконвалесцентов). При этом Т4 общий имел более высокие показатели, не имел отличий между самцами и самками и мы наблюдали тенденцию к снижению в течение эксперимента: максимальные показатели отмечены у самцов группы контроля ($1,24 \pm 0,28$ нМоль/мл), в течение эксперимента его уровень уменьшается (у самок-реконвалесцентов $0,98 \pm 0,07$ нМоль/мл, у самцов-реконвалесцентов $1,012 \pm 0,01$ нМоль/мл). Эти параметры также не имеют статистической значимости. Поскольку прижизненное взятие крови у мелких лабораторных грызунов довольно затруднительно и динамика не показательная (также они видоспецифичны, особенно для ТТГ), в последующем эксперименте на сирийских хомяках данные исследования мы не повторяли.

На гистологических срезах ЩЖ мышей контрольной группы в возрасте ранней половой зрелости (2,5 месяца) железа имеет типичное строение (рис. 13 А). Фолликулы преимущественно овальной или округлой формы. Строма представлена тончайшими прослойками соединительной ткани с единичными микрососудами, имеющими небольшой диаметр с едва заметными форменными элементами крови в просвете. Между фолликулами расположены островки интерфолликулярного эпителия, представленные группами тироцитов. Тироциты, выстилающие фолликулы имеют кубическую форму, в интерфолликулярных островках – округлые.

На гистологических срезах ЩЖ в остром и, особенно, в подостром периоде эксперимента (на 15 сутки) инфицирования животных вирусом SARS-CoV-2 продемонстрированы признаки дисфункции и воспаления (рис. 13 Б). Обнаружена гиперемия с резким расширением сосудов, переполненных форменными элементами крови, с участками локализации эритроцитов вне сосудистого русла. Характерен отек стромы ЩЖ, проявляющийся появлением «пустот» между фолликулами на препарате гистологического среза. В строме расположены очаги лимфоидной (круглоклеточной) инфильтрации. В паренхиме ЩЖ обращает на себя внимание то, что ряд фолликулов деформированы, часть из них имеет признаки усиленной резорбции коллоида, содержит пенистый коллоид; призматический эпителий, выстилающий фолликулы сохраняет преимущественно кубическую форму, но в некоторых участках имеет морфологические признаки гиперфункции.

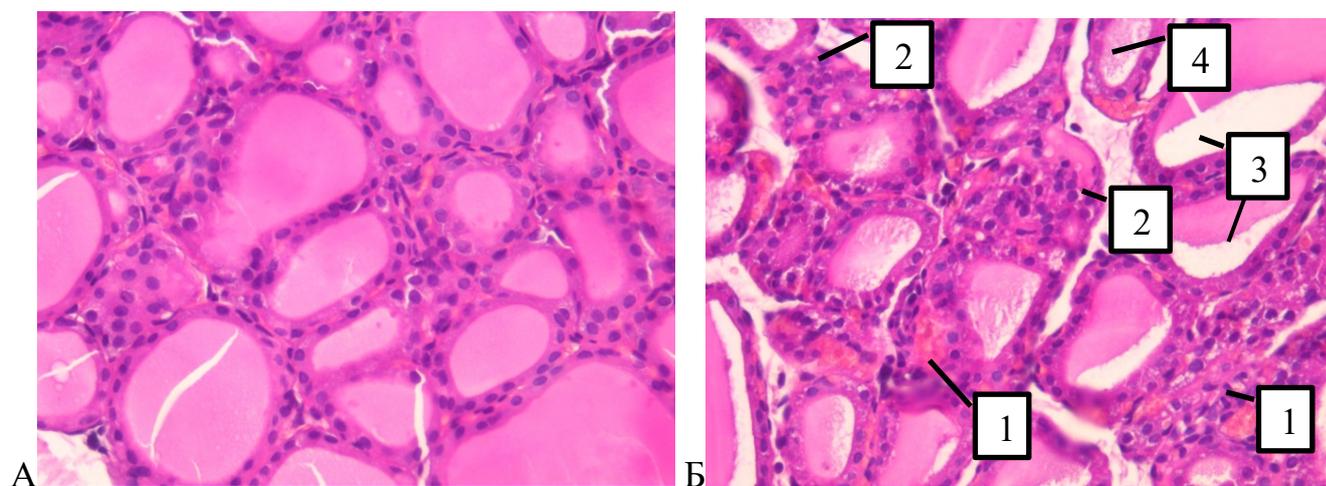


Рисунок 13. Фрагменты щитовидных желез экспериментальных мышей В6.Сg-Tg (K18-ACE2), возраст 10 недель. А, Б – парафиновые срезы, окраска гематоксилином и эозином, ув. 400х, А – интактная группа, Б – группа с моделью инфекции в подостром периоде (15 сутки).

Обозначения: 1 – гиперемия сосудов микроциркуляторного русла в интерфолликулярном эпителии и в строме вокруг фолликулов с очагами кровоизлияний; 2 – участки стромы и интерфолликулярные островки с круглоклеточной инфильтрацией, 3 – участки резорбции коллоида в

деформированных фолликулах, 4 – пенистый коллоид в фолликуле с признаками гиперфункции.

Во все сроки эксперимента у самцов и самок инфицированных мышей В6.Cg-Tg (K18-ACE2) отмечается лимфоидная инфильтрация, артериальная гиперемия, признаки усиленной резорбции коллоида. Интерфолликулярная ткань, расположенная в виде островков между фолликулами, в экспериментальной группе занимает площадь на срезе в среднем в 1,31 раза больше по сравнению с контролем. Это обусловлено как мезенхимально-сосудистыми реакциями на системный и местный воспалительный процесс (гиперемией, отеком, инфильтрацией лимфоцитами), так и увеличением числа тироцитов. Этот пул тироцитов является резервным для новообразования фолликулов ЩЖ в онтогенезе при ее дифференцировке у неполовозрелых особей в период активного роста и при изменении функции у взрослых особей.

Таким образом, коронавирус SARS-CoV-2 вызывая ТОРС, провоцирует, по-видимому, воспаление и аутоиммунную кросс-реактивность в тканях ЩЖ мышей В6.Cg-Tg (K18-ACE2), что проявляется изменением структуры паренхиматозных и стромальных компонентов на светооптическом уровне исследования.

Поскольку при описанной модели заражения генномодифицированных мышей В6.Cg-Tg (K18-ACE2) заболевание протекало чаще в тяжелой форме с летальными исходами, это не позволило нам получить репрезентативный материал для молекулярно-биологического исследования ЩЖ в полном объеме. Также, при попытке поставить реакции ИГХ с мышинными моноклональными антителами из-за кросс-реактивности системы детекции мы получили достаточно высокий уровень фонового окрашивания. В связи с этим, мы поставили вторую серию эксперимента, и в качестве экспериментальных животных выбрали вид золотистых (сирийских) хомяков (*Mesocricetus auratus*) с естественной чувствительностью вируса, без генной модификации рецепторного аппарата, а значит с естественно развивающимся и более сильным иммунным ответом. Мы выполнили исследование на сирийских хомяках в тех же сроках эксперимента, но уменьшив объем вводимой интраназально среды с вирусом (для получения

формы болезни легкой и средней степени тяжести), несколько увеличив выборку для более точного анализа результатов молекулярно-биологических методик. Также в пользу этой серии эксперимента свидетельствует отсутствие кросс-реактивности с антителами и системами детекции, имеющимися в доступе научной лаборатории, а также появившиеся публикации зарубежных коллег по репрезентативности данного вида, в том числе и при постановке ИГХ-реакций [113].

3.2. Динамика инфекционного процесса, гистологических и иммуногистохимических изменений ткани щитовидной железы у сирийских хомяков

У сирийских хомяков в описанной нами модели преобладает легкая и средней тяжести форма заболевания, не наблюдается гибель животных от ТОРС или других осложнений инфекции, вызванной инокулированным SARS-CoV-2. Инфицированные хомяки на 3 сутки все имели положительный ПЦР-тест на SARS-CoV-2 из отделяемого носа и глотки, со вторых суток отмечались признаки заболевания (повышение температуры тела на 2-3 С°, вялость, отказ от корма), на 6-7 день после введения вируса животные теряли вес до 5-7 %; отмечали цианоз кожи на видимых участках носа, ушей, конечностей и хвоста. У большинства животных с 8-10 суток были клинические признаки выздоровления при отрицательном ПЦР-тесте, все животные вернулись к своему первоначальному весу в течение 14 дней. В результате морфологических и ИГХ исследований ЩЖ, а также математико-статистического анализа полученных данных, в эксперименте заражения сирийских хомяков SARS-CoV-2 нами изучены последствия легкой и средней формы тяжести болезни в сроках 5-30 суток. Мы изучили и представили в описании отдельно изменение морфологии ЩЖ, а также группами: 1) маркеры, продуцируемые тироцитами, как показатели изменения их функциональной активности; 2) маркеры дифференцировки лимфоцитов как показатели воспаления, 3) маркеры аутоиммунных процессов в ЩЖ.

Изменение структуры ЩЖ хомяков, инфицированных вирусом SARS-CoV-2 на светооптическом уровне схоже с признаками, выявленными у линейных гуманизированных мышей.

Рисунки 14-15 иллюстрируют следующие изменения: в ранних сроках заболевания отмечена выраженная инфильтрация крупными клетками (макрофагами) и лимфоцитами, резорбция коллоида и преобладание интерфолликулярного эпителия на срезе ткани железы над площадью тироцитов фолликулов, в последующие сроки отмечено сохранение активной инфильтрации, вплоть до периода выздоровления, обилие резорбционных вакуолей в коллоиде (ЩЖ в активно функционирующем состоянии), гиперхромия ядер тироцитов, обильная васкуляризация.

Рисунок 14 демонстрирует последовательную динамику изменений и их визуализацию на большом увеличении микроскопа, а рисунок 15 представляет те же группы животных, в той же последовательности, только на малом увеличении микроскопа для оценки изменений на большей площади препарата.

В интактной группе в ткани ЩЖ хомяков обращает на себя внимание обильная сосудистая сеть и резорбционные вакуоли в коллоиде (рис. 14 А, 15 А), в отличие от гистопрепаратов мышей, где описаны микрососуды гораздо меньшего диаметра (рис. 13 А), встречаются единичные макрофаги.

На пятые сутки резко увеличивается число мигрировавших из сосудистого русла клеток моноцитарного ряда, представленных на препаратах макрофагами типичного строения; тироциты имеют гиперхромные ядра, нагромождающиеся друг на друга в межфолликулярных участках ткани ЩЖ, создается впечатление более толстого темного среза при его стандартной толщине (рис. 14 Б, 15 Б).

На десятые сутки отмечено выраженное увеличение числа клеток в интерфолликулярных островках (рис. 14 В), а на меньшем увеличении – деформация фолликулов, содержащих резорбированный коллоид (рис. 15 В)

На тридцатые сутки наблюдаются выраженные мезенхимально-сосудистые реакции с явлениями вторичного повреждения ткани железы, ее отеком; фолликулы сохранены, содержат пенистый коллоид (рис. 14 Г, 15 Г).

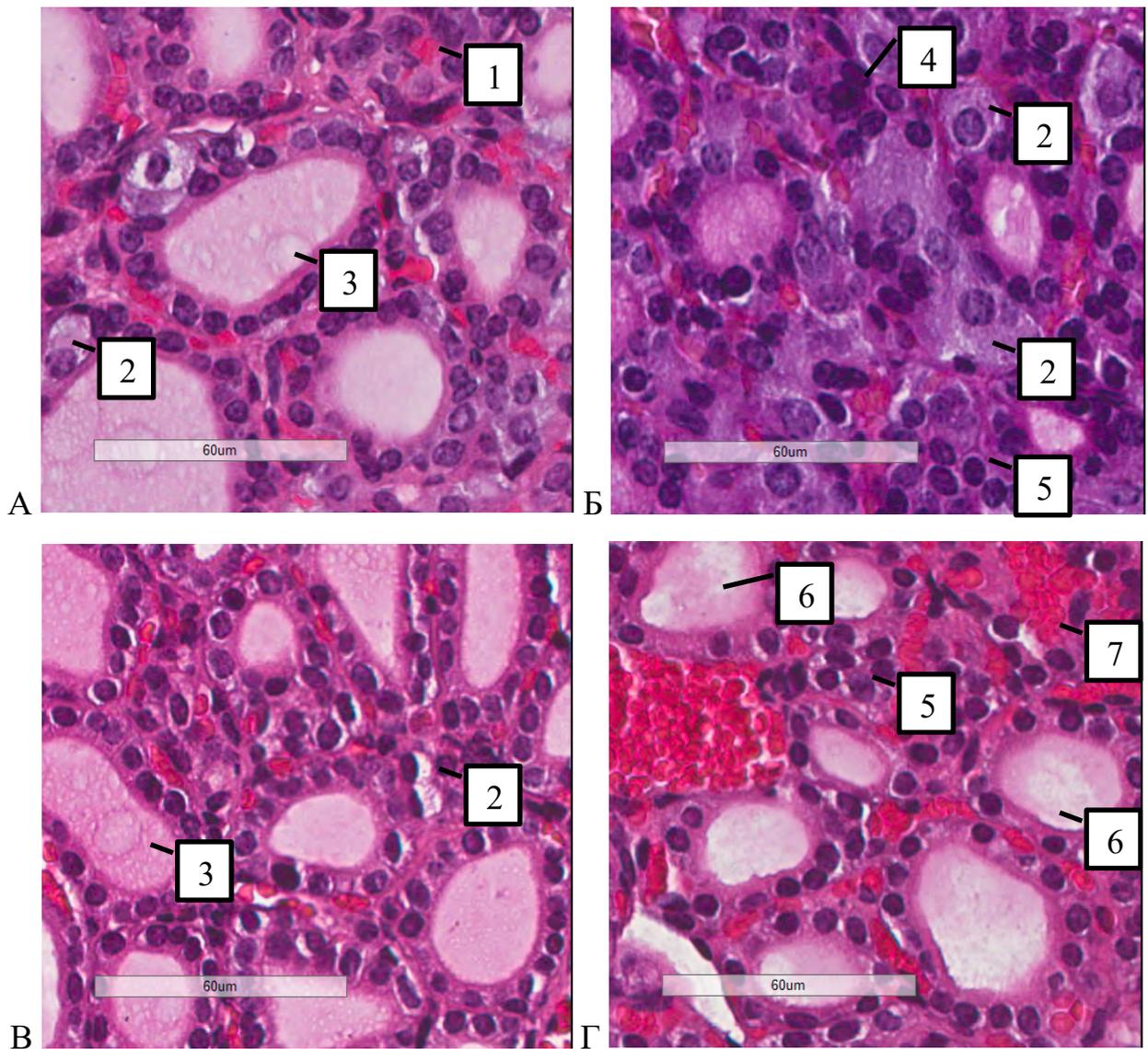


Рисунок 14. Фрагменты щитовидных желез экспериментальных сирийских хомяков, парафиновые срезы, окраска гематоксилином и эозином, ув. 400х.

А. Самка, возраст 60 сут., контроль.

Б. Самец, возраст 65 сут., опыт, 5-е сутки.

В. Самка, возраст 70 сут., опыт, 10-е сутки.

Г. Самец, возраст 90 сут, опыт, 30-е сутки.

Обозначения: 1 – сосуды микроциркуляторного русла в интерфолликулярном эпителии и в строме вокруг фолликулов; 2 – макрофаги; 3 – резорбционные вакуоли в коллоиде; 4 – гиперхромные «нагроможденные» ядра тироцитов; 5 – интерфолликулярные островки с круглоклеточной инфильтрацией; 6 – участки резорбции коллоида в деформированных фолликулах; 7 – очаги кровоизлияний.

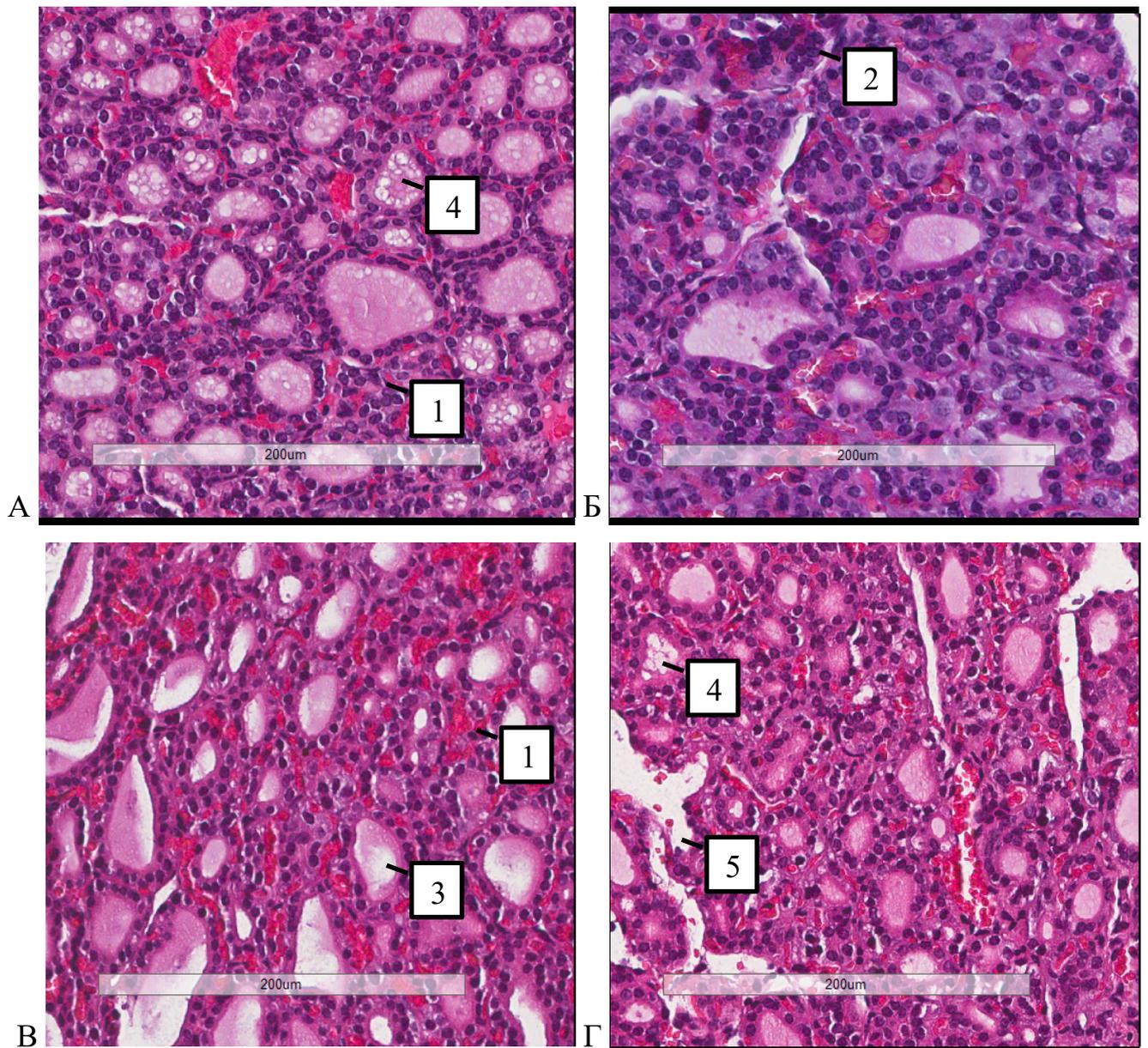


Рисунок 15. Фрагменты щитовидных желез экспериментальных сирийских хомяков, парафиновые срезы, окраска гематоксилином и эозином, ув. 100х.

А. Самка, возраст 60 сут., контроль.

Б. Самец, возраст 65 сут., опыт, 5-е сутки.

В. Самка, возраст 70 сут., опыт, 10-е сутки.

Г. Самец, возраст 90 сут., опыт, 30-е сутки.

Обозначения: 1 – обильная сосудистая сеть; 2 – гиперхромные «нагроможденные» ядра тироцитов; 3 – участки резорбции коллоида в деформированных фолликулах; 4 – пенистый коллоид в фолликулах; 5 – очаги кровоизлияний и отека.

Маркеры, продуцируемые тироцитами, как показатели изменения их функциональной активности. Наибольшие статистически значимые отличия по исследуемым показателям наблюдаются в группе самок на 10 сутки болезни (табл. 4). Преимущественно они касаются маркеров клеточного цикла, ангиогенеза и перестроек внеклеточного матрикса (рис. 16). У контрольных животных и в группе на 30 сутки нет различий между самцами и самками, поэтому данные в таблице для этих сроков представлены без разделения на самцов и самок.

Эпителиальный фактор роста сосудов VEGF, являющийся маркером неоангиогенеза, в контроле экспрессируется в большом количестве клеток, но слабо интенсивно. Интенсивность его экспрессии возрастает пропорционально продолжительности болезни и к 10 суткам становится статистически достоверной как в группе самцов, так и в группе самок. Количество экспрессирующих его клеток также увеличивается. Отличной от общей тенденции является лишь экспрессия VEGF у самцов на 5 сутки заболевания, когда данное значение статистически ниже, чем в любой другой группе. Характерно, что в этой же группе падает и экспрессия рецепторов к Tie 2, подтверждая снижение активности неоангиогенеза у самцов в ранние сроки заболевания. Это сопоставимо и с эффектами данных регуляторных молекул – при обзорной микроскопии в сроки заболевания 10 и 30 сутки отмечено обилие сосудов и гиперемия ткани ЩЖ.

Имеются отличия в экспрессии матричных металлопротеиназ MMP 3. У самок их активность достоверно снижается с течением болезни, и к 10 суткам тироциты перестают их экспрессировать вовсе, при этом в строме экспрессия хоть и ниже контрольных значений, но все еще сохраняется. У самцов тироциты показывают сниженную относительно контроля экспрессию данного маркера на 5 и 30 сутки болезни, тогда как на 10 сутки экспрессия MMP 3 как в тироцитах, так и в клетках стромы существенно возрастает, превышая контрольные значения на 45 %. Этот фермент способствует увеличению проницаемости гистогематических барьеров за счет расщепления белков внеклеточного матрикса, при ремоделировании тканей в норме и при патологической деструкции.

Таблица 4. Уровень экспрессии различных маркеров метаболизма тироцитов у контрольных и экспериментальных хомяков (Me [Q1;Q3])

Маркер, способ оценки	Интактные самки и самцы	Группа с инфицированием, сутки болезни				
		самки 5 сут	самцы 5 сут	самки 10 сут	самцы 10 сут	самки и самцы 30 сут
c-KIT, количество клеток	1 [0;1]	1 [0;1]	1 [1;1]	3 [3;2]	1 [1;2]	1 [0;1]
p16, количество клеток	0	0	0	0	0	0
TNF, количество клеток	0	0	0	0	0	0
p53 количество клеток	4 [4;11]	6 [6;8]#	2 [2;3]^	0*^	3 [1;5]	3 [2;6]
Cyclin D1 количество клеток	45 [37;62]	105 [86;143]	44 [41;46]	116 [109;158]*	91 [39;102]	48 [47;50]
iNOS количество клеток	2 [1;3]	2 [1;2]	2 [2;3]	4 [4;5]	2 [1;2]	3 [1;3]
MMp3, количество клеток	2 [2;3]	2 [2;2]#	2 [1;2]	0*^	3 [3;3]#	1 [1;2]
MMp3 интенсивность	1 [1;1]	1 [1;1]#	1 [1;1]	0*^	1 [1;2]	1 [1;1]
Tie2, количество клеток	1 [0;2]	1 [0;1]	0	1 [0;2]	1 [1;2]	0 [0;2]
Tie2, интенсивность	1 [0;2]	1 [0;1]	0	1 [0;1]	1 [1;2]	0 [0;1]
CD95, интенсивность	2 [2;2]	2 [2;3]	2 [2;3]	3 [3;3]*	3 [3;3]*	2 [2;2]
VEGF, количество клеток	3 [3;3]	3 [3;3]^	2 [2;2]*	3 [3;3]	3 [3;3]#	3 [3;3]#
VEGF, интенсивность	1 [1;1]	2 [1;2]	1 [1;2]	2 [2;3]*	3 [2;3]*#	1 [1;2]

Примечание:

* - отличия от интактных животных;

^ - отличия между самцами и самками в одинаковый срок эксперимента;

- отличия между сроками эксперимента внутри одной группы одного пола.

Cyclin-D1 максимально экспрессируется клетками в фазе G1 митоза, а минимальная экспрессия наблюдается в фазе S клеточного цикла. В контрольной группе число тироцитов с положительным окрашиванием на Cyclin-D1 составляет

50 клеток в поле зрения. У самцов экспериментальных групп на всех сроках заболевания их число отличается от контрольных значений незначительно и недостоверно, тогда как у самок на 5 и 10 сутки заболевания экспрессия данного маркера в тироцитах возрастает в 2 и более раз, прямо пропорционально длительности болезни. Это коррелирует с появлением очагов пролиферации тироцитов интерфолликулярного эпителия, наличие которых описано выше на микрофотографиях гистологических препаратов с обзорной окраской.

Активность индуцированной синтазы оксида азота iNOS отличается стабильностью в клетках стромы и паренхимы ЩЖ во всех группах и на всех сроках эксперимента, не имея статистически достоверных отличий, кроме группы самок на 10 сутки болезни, когда активность данного фермента в клетках стромы почти в два раза превышает контрольные значения. Этот фермент синтезируется в ответ на цитокины, инфекцию и при аутоиммунных процессах

c-KIT, тирозинкиназный рецептор III типа, показал относительно низкую экспрессию во всех группах (порядка 1-2 позитивных клеток в поле зрения), недостоверно увеличившись лишь в группе самок на 10 сутки заболевания. Этот маркер также связан с ангиогенезом и пролиферацией.

Для тироцитов характерна высокая экспрессия маркера CD95, являющегося проапоптотическим белком на поверхности клеток. В контрольной группе интенсивность его экспрессии составляет в среднем 2+, как и на 5 и 30 сутки болезни. При этом на сроке 10 суток, как у самцов, так и у самок наблюдается повышение интенсивности окрашивания до 3+, что статистически достоверно отличается от контроля. Это свидетельствует об активации апоптоза клеток в это период.

Указанные выше наиболее демонстративные изменения иллюстрируют рисунки 16 и 17.

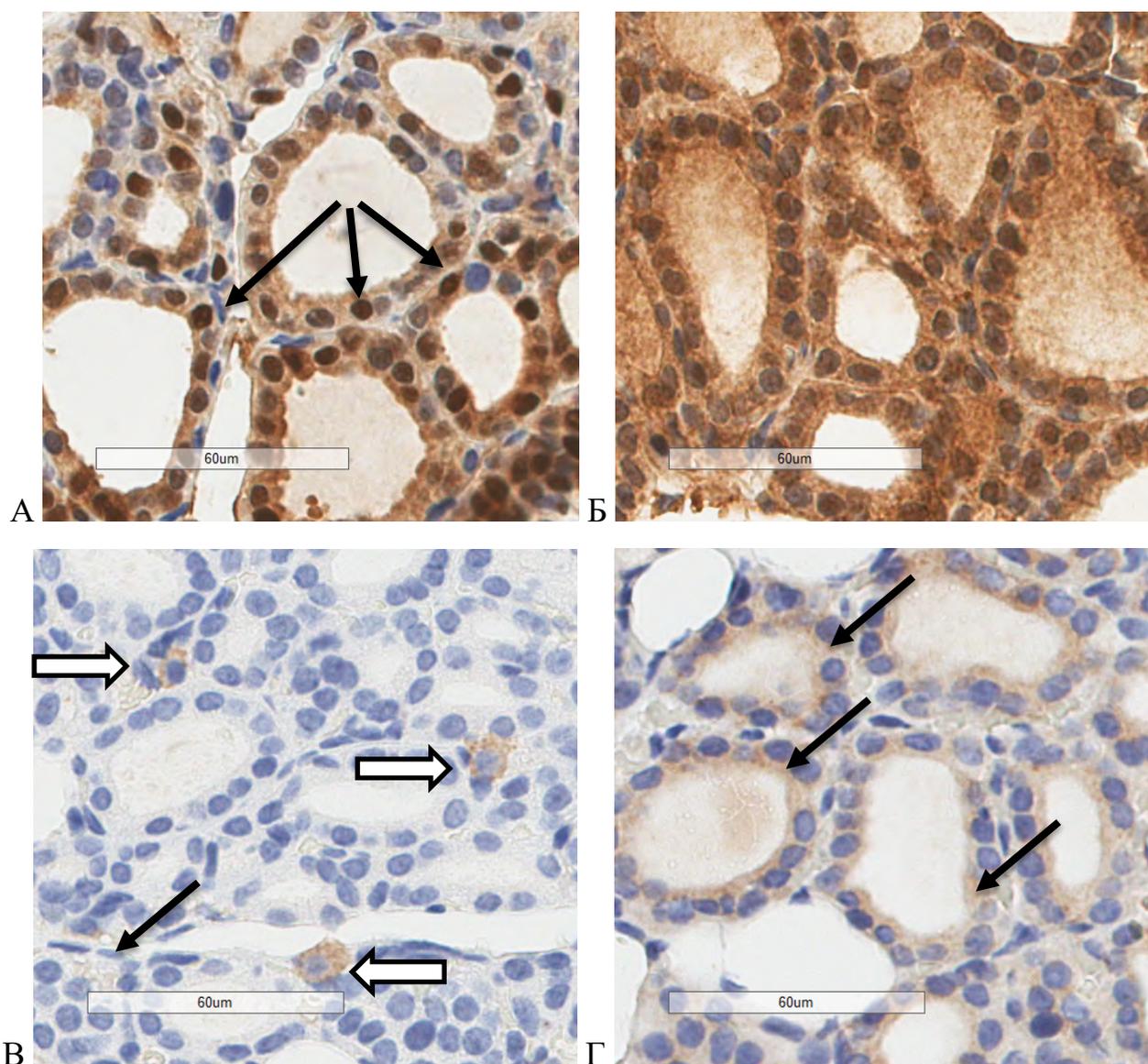


Рисунок 16. Фрагменты щитовидных желез экспериментальных сирийских хомячков, парафиновые срезы, иммуногистохимические реакции, ув. 400х.

А. Самец, возраст 70 суток, опыт, 10-е сутки. ИГХ на Cyclin D1.

Выраженная ядерная экспрессия в 50% тироцитов (стрелка).

Б. Самка, возраст 70 суток, опыт, 10-е сутки. ИГХ на CD 95 (FAS-R).

Интенсивное цитоплазматическое окрашивание абсолютного большинства тироцитов фолликулов и интерфолликулярных участков.

В. Самец, возраст 65 суток, опыт, 5-е сутки. ИГХ на iNOS.

Слабая цитоплазматическая экспрессия макрофагов (белые стрелки) и отдельных клеток эндотелия сосудов (черная стрелка).

Г. Самка, возраст 65 суток, опыт, 5-е сутки. ИГХ на MMP 3

Умеренная цитоплазматическая реакция в тироцитах фолликулов (стрелки).

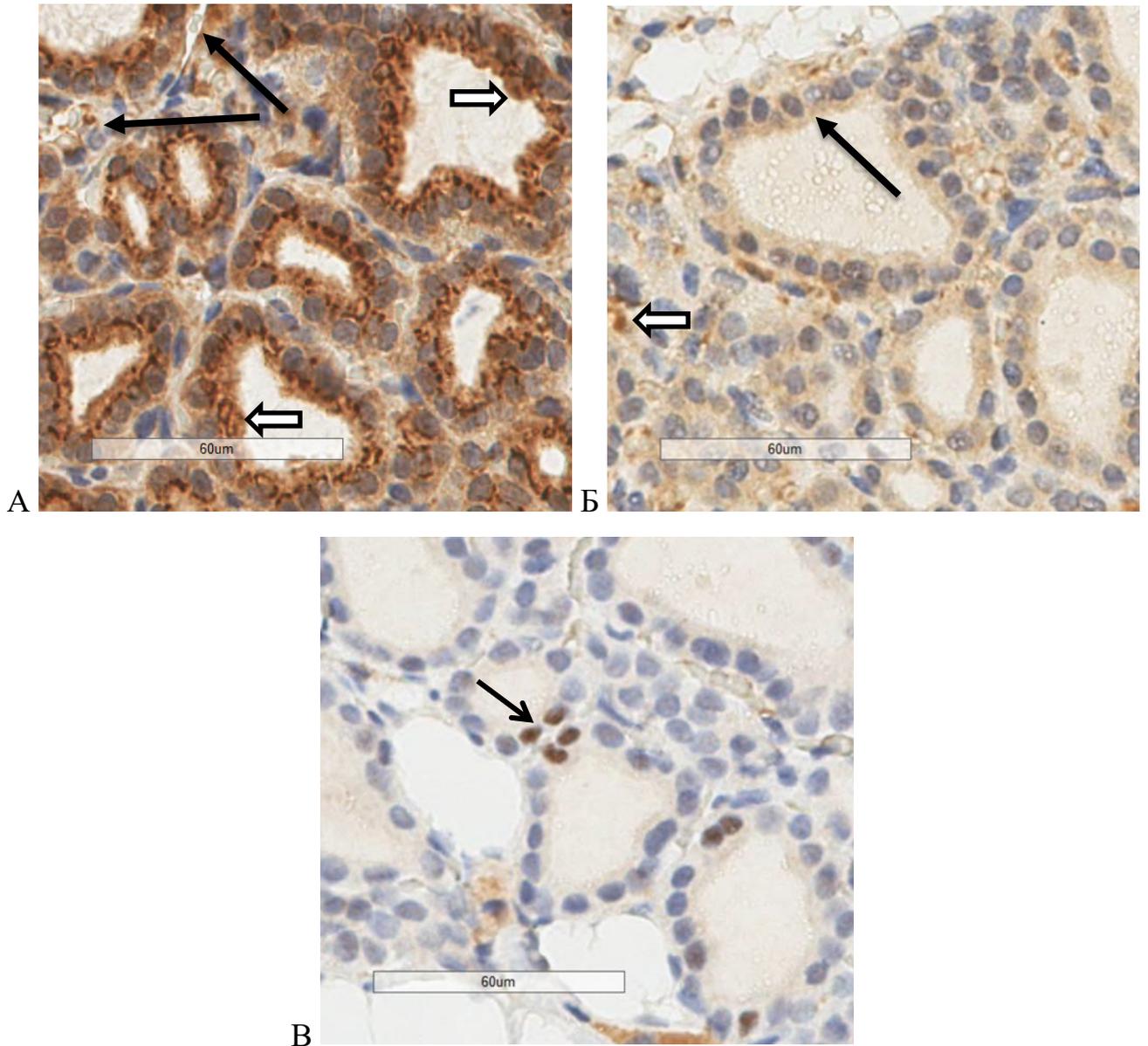


Рисунок 17. Фрагменты щитовидной железы экспериментальных сирийских хомяков, парафиновый срез, иммуногистохимические реакции, ув. 400х.

А. Самец, возраст 70 сут, опыт, 10-е сутки, ИГХ на VEGF.

Выраженная цитоплазматическая экспрессия в тироцитах (белые стрелки). Более умеренно экспрессируется в интерфолликулярных эпителиоцитах и эндотелиальных клетках сосудов (черные стрелки).

Б. Самец, возраст 90 сут, опыт, 30-е сутки, ИГХ на p16.

Слабая реакция в тироцитах (черная стрелка) и клетках стромы (белая стрелка).

В. Самка, возраст 65 сут, опыт, 5-е сутки, ИГХ на p53.

Единичные позитивно окрашенные тироциты (стрелка)

Экспрессия маркера p16 отрицательная во всех группах и на всех сроках. Только у реконвалесцентов единичные клетки показали положительную реакцию, что не имеет статистической достоверности. Окрашивание с TNF во всех группах дало негативную реакцию, однако в литературе этот белок описан как воспалительный цитокин, коррелирующий с тяжестью COVID-19.

Проонкогенный белок p 53 в норме экспрессируется в части эпителиальных клеток. Для контрольной группы данный показатель составил порядка 6 клеток в поле зрения. В экспериментальных группах динамика его разнонаправленная. У самок к 10-м суткам болезни позитивно окрашенных клеток нет. У самцов на пятые сутки болезни число p53+ клеток снижается в три раза относительно нормы, а в более поздние сроки снова возрастает, не достигнув, однако, контрольных показателей.

Изучение экспрессии маркеров дифференцировки лимфоцитов как показателей воспаления в ИГХ-методе показало ряд изменений (табл. 5, рис. 18).

Лейкоцитарная инфильтрация ЩЖ не ярко выражена у больных животных. В норме в железе присутствует по 1-5 клеток различных кластеров дифференцировки, таких как Т-хелперы (CD4+), Т-киллеры (CD8+), макрофаги (общий макрофагальный маркер CD68+ и маркер макрофагов II типа CD163+), В-клетки (CD20+), плазмоциты (CD138+), активированные Т- и В-лимфоциты (CD30+).

У самок на 5 сутки снизилось количество всех исследуемых типов клеток, а к 10 суткам возросло число CD20+, CD163+, CD68+ и CD4+ клеток, что говорит о повышении активности макрофагов и В-лимфоцитов.

У самцов на 5 сутки активность иммунокомпетентных клеток в строме ЩЖ существенно не изменилась (несущественно снизилось число CD8+, CD20+, CD30+ клеток и возросло число макрофагов, плазмоцитов и Т-хелперов), а к 10 суткам все эти показатели нормализовались. На 30-е сутки у реконвалесцентов иммунологический профиль оставался низким, лишь число активированных Т- и В- клеток было выше контроля, что может свидетельствовать о сформированном активном иммунитете (табл. 5).

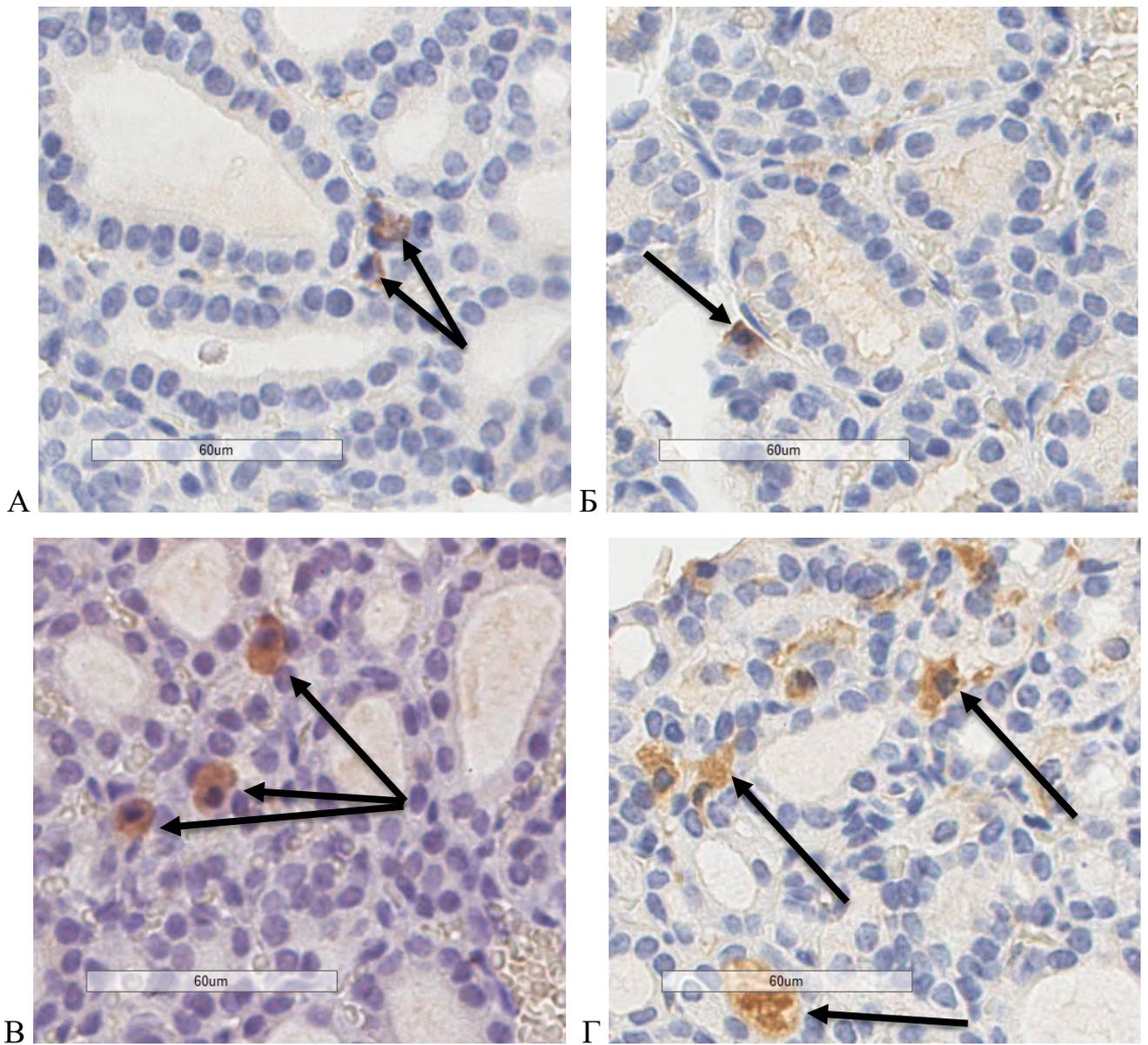


Рисунок 18. Фрагменты щитовидных желез экспериментальных сирийских хомячков, парафиновые срезы, иммуногистохимические реакции, ув. 400х.

А. Самка, возраст 65 суток, опыт, 5-е сутки. ИГХ на CD 4.

CD4+ Т-хелперные лимфоциты возле фолликула ЩЖ (стрелки).

Б. Самка, возраст 65 суток, опыт, 5-е сутки. ИГХ на CD 8.

CD8+ цитотоксический лимфоцит в интерфолликулярных участках ткани ЩЖ (стрелка).

В. Самец, возраст 65 суток, опыт, 5-е сутки. ИГХ на CD 68.

Скопление макрофагов в интерфолликулярных участках ткани ЩЖ (стрелки).

Г. Самка, возраст 70 суток, опыт, 10-е сутки. ИГХ на CD4.

CD4+ Т-хелперные лимфоциты у стенки фолликула ЩЖ (стрелки).

Таблица 5. Уровень экспрессии маркеров дифференцировки лимфоцитов и макрофагов у контрольных и экспериментальных хомяков (число клеток в поле зрения при увеличении 40х, Me[Q1;Q3])

Маркер	Интактные самки и самцы	Группа с инфицированием, сутки болезни				
		самки 5 сут	самцы 5 сут	самки 10 сут	самцы 10 сут	самки и самцы 30 сут
CD4	2 [1;3]	1 [0;2]#	3 [1;4]	5 [4;5]^	2 [2;3]	1 [1;1]
CD8	2 [1;3]	0 [0;1]	2 [0;2]	2 [1;2]	2 [2;3]	1 [0;3]
CD20	3 [2;4]	2 [2;3]	2 [1;3]	3 [3;5]	1 [1;2]	3 [3;6]
CD30	1 [1;1]	1 [0;1]	1 [0;1]	1 [0;1]	0 [0;1]	2 [1;2] *
CD68	2 [1;5]	2 [1;2]	3 [2;3]	5 [4;7]	3 [2;3]	3 [2;3]
CD138	3 [3;4]	1 [1;2]^	4 [3;4]	1 [1;2]	3 [2;3]	3 [2;3]

Примечание:

* - отличия от интактных животных;

^ - отличия между самцами и самками в одинаковый срок эксперимента;

- отличия между сроками эксперимента внутри одной группы одного пола.

При исследовании *факторов аутоиммунного воспаления* выявлен ряд закономерностей (табл. 6).

Число эпителиоцитов с рецепторами к ТТГ низкое в группах самцов и самок на 10 сутки, но резко выше на 5 сутки у самок и в группах животных на 30 сутки (по отношению ко всем срокам с высоким уровнем статистической достоверности). Число позитивных на тиреоглобулин Tg клеток небольшое, при этом в группах самцов и самок на 10 сутки интенсивность экспрессии стала несколько выше, данные изменения незначительны и статистически недостоверны. ИГХ-тест с антителом к тиреопероксидазе ТПО оказался резко положительным для всех групп без исключения, в связи с чем, на наш взгляд, он не подлежит анализу.

Таблица 6. Уровень экспрессии маркеров аутоиммунного воспаления у контрольных и экспериментальных хомяков Me[Q1;Q3]

Маркер, способ оценки	Интак-ные самки и самцы, группа 1	Группа с инфицированием, сутки болезни					p
		самки 5 сут, группа 2	самцы 5 сут, группа 3	самки 10 сут, группа 4	самцы 10 сут, группа 5	самки,и самцы 30 сут, группа 6	
ТТГ количество клеток, баллы	2 [1;2]	3 [2;3]	2 [1;2]	1 [1;2]	1 [1;2]	3 [3;3]	p2-4=0,037
ТТГ интенсивность, баллы	1 [1;1]	2 [1;2]	2 [1;2]	1 [1;2]	1 [1;2]	1 [1;2]	
Tg количество клеток, баллы	1 [1;1]	1 [1;2]	1 [1;1]	1 [1;1]	1 [1;1]	1 [1;1]	
Tg количество клеток, баллы	1 [1;1]	1 [1;1]	1 [1;2]	2 [1;2]	2 [1;2]	1 [1;2]	
CD48, количество клеток	4 [3;7]	2 [2;5]	7 [6;10]	5 [5;7]	3 [2;3]	3 [2;4]	p3-5=0,022
CD138, количество клеток	3 [3;4]	1 [1;2]	4 [3;4]	1 [1;2]	3 [2;3]	3 [2;3]	p2-3=0,037
CD163, количество клеток	4 [4;7]	3 [2;5]	5 [5;6]	7 [6;7]	4 [2;5]	3 [3;3]	p1-6=0,028
CD4, количество клеток	2 [1;3]	1 [0;2]	3 [1;4]	5 [4;5]	2 [2;3]	1 [1;1]	p4-5=0,022 p2-4=0,028

Если еще раз сопоставить эти данные с биомаркерами клеточной инфильтрации и провести корреляционный анализ, мы получим ряд интересных данных. Количество плазмоцитов в строме ЩЖ максимальное у самцов на 5 сутки, наименьшее у самок на 5 и 10 сутки, что носит статистически достоверный характер. Макрофаги составляют наиболее многочисленную популяцию и наиболее многочисленны в группе самок на 10 сутки. Достоверно отличается от большинства групп ткань железы на 30 сутки, где число макрофагов наименьшее.

Большую часть макрофагов представляют макрофаги II типа. CD48⁺ клетки, активирующие гуморальный иммунитет, наиболее многочисленны в группе самцов на 5 сутки, что соответствует наибольшему числу плазмоцитов в этой группе. Достоверно ниже число CD48⁺ клеток в группах самцов на 10 и на 30 сутки. CD4⁺ Т-хелперные клетки наиболее многочисленны в группе самок на 10 сутки, а в группах самых ранних и поздней стадий заболевания их число достоверно уменьшалось.

Корреляционный анализ Пирсона выявил ряд интересных зависимостей.

Выявлена положительная связь средней силы ($r=0,4-0,6$) между числом макрофагов, Т-хелперов и активирующих CD48⁺ лимфоцитов. Вероятно, это связано с активным синтезом провоспалительных цитокинов указанными типами клеток, необходимых для развития адаптивного иммунитета.

Количество макрофагов имеет слабую отрицательную корреляцию с экспрессией Bcl-2 и активностью матриксных металлопротеиназ. В свою очередь Bcl-2 имеет слабую отрицательную связь с экспрессией CD95, что вполне закономерно. Количество клеток, экспрессирующих рецепторы к ТТГ, слабоотрицательно коррелирует с экспрессией c-KIT и iNOS.

Таким образом, исследование выявило изменения в ЩЖ сирийских хомяков при инфицировании SARS-CoV-2. У самцов пик воспаления (CD48⁺ клетки, макрофаги) регистрируется на пятые сутки, у самок — на десятые сутки. Экспрессия онкомаркеров Cyclin D1 и p53 максимальна у самок к десятым суткам, превышая контрольные значения. К тридцатым суткам у самцов снижается активность проапоптотического CD5, тогда как у самок сохраняется высокая экспрессия iNOS. Плазмоциты преобладают у самцов на пятые сутки, тогда как у самок их число минимально. Макрофаги II типа активно инфильтрируют ткань у самок на десятые суткам. CD4⁺ Т-клетки демонстрируют наибольшую активность у самок на десятые сутки, в то время как CD8⁺ лимфоциты остаются малочисленными. Выявлена обратная связь между числом макрофагов и уровнем Bcl-2.

Таким образом, проведённое исследование позволило впервые выявить гендерно-зависимые иммуногистохимические паттерны ЩЖ при SARS-CoV-2 у сирийских хомяков, акцентируя внимание на рисках пролиферации и малигнизации у самок. Полученные данные расширяют представления о патогенезе вирус-индуцированного тиреоидита и подчеркивают необходимость персонализированного подхода к наблюдению и лечению пациентов, перенесших SARS-CoV-2.

ГЛАВА 4. ДИНАМИКА ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ ВОСПАЛЕНИЯ И КАНЦЕРОГЕНЕЗА В ТКАНИ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ В НОРМЕ И ПРИ ПАТОЛОГИИ У ЛИЦ, ПЕРЕНЕСШИХ COVID-19

В данную работу включено 80 пациенток с верифицированными диагнозами: 1) папиллярный рак щитовидной железы, 2) аутоиммунный тиреоидит (анамнез более 5 лет). Среди каждой группы пациентов выделены поровну по две подгруппы: 1) перенесшие средней тяжести и тяжелую форму COVID-19 с пневмонией и лечением в условиях стационара, 2) не болевшие COVID-19, возможно перенесшие заболевание субклинически или вакцинированные (составили группы сравнения). С целью изучения особенностей и механизмов патогенного действия вируса SARS-CoV-2 у пациенток с указанными диагнозами была проведена оценка экспрессии маркеров CD4, CD8, CD20, CD68, CD138, маркера ангиогенеза VEGF, маркеров регуляции клеточного цикла Cyclin D1, p53, TG, TPO, рецептора CD95 в ткани щитовидной железы методом иммуногистохимии.

Гистологически ткань ЩЖ при АИТ (N=40) характеризуется преимущественно макро-нормофолликулярным строением с паренхиматозными участками, а также очаговой пролиферацией тиреоидного эпителия с образованием «подушечек Сандерсона». В строме отмечаются участки разрастания соединительной ткани, рассеянная лимфоплазмочитарная инфильтрация и формирование лимфоидных фолликулов с расширенными герминативными центрами. Определяются участки разрастания фиброзной ткани с очаговыми кровоизлияниями.

Папиллярный рак ЩЖ в нашей выборке представлен преимущественно классическим подтипом (N=32), а также фолликулярным подтипом (N=8). Гистологически ткань характеризуется формированием истинных папиллярных структур и микрофолликулов (фолликулярный подтип) с ядерными признаками папиллярной карциномы: укрупненные ядра и просветление хроматина, наличие

ядерных борозд и псевдovключений. Очагово отмечено наличие псаммомных телец и участков фиброза в большинстве образцов.

При иммуногистохимическом исследовании образцов получены существенные значимые результаты при окрашивании ткани метками с ключевыми маркерами (рис. 19-22, табл. 7).

Маркер CD4⁺ (клетки Т-хелперы) в группе АИТ среди пациентов, не болевших COVID-19, в ИГХ-реакции окрашивает многочисленные клетки в лимфоидных узелках, скопления в интерфолликулярной ткани до 10 клеток в поле зрения. В «горячих точках» численности Т-хелперов достигает 75 клеток в поле зрения, что статистически значимо больше, чем в остальной ткани железы. В группе пациентов с папиллярным раком ЩЖ данный тип лимфоцитов немногочислен, встречается преимущественно в просвете сосудов, в количестве 2-5 клеток в поле зрения. В группе с АИТ среди пациентов, перенесших COVID-19, Т-хелперы крайне многочисленны, как в ткани с сохранными фолликулами, так и в областях, густо окруженных лимфоидными узелками, что имеет статистическую достоверность при сравнении с аналогичными областями в группе АИТ без инфекционного анамнеза. В самих лимфоидных узелках также большое число CD4⁺ клеток. В группе пациентов с папиллярным раком ЩЖ после перенесенного COVID-19, CD4⁺ клетки крайне многочисленны в лимфоидных скоплениях. Но и опухолевая ткань также инфильтрирована Т-хелперами очень обильно, что более выражено, чем в группе пациентов с папиллярным раком ЩЖ без инфекционного анамнеза COVID-19 (рис. 19).

CD8⁺ лимфоциты (клетки Т-супрессоры) в больших количествах встречаются в интерфолликулярной ткани в группе АИТ среди пациентов, не болевших COVID-19, с трехкратным увеличением числа в горячих точках (рис. 20). В группе с папиллярным раком ЩЖ без анамнеза COVID-19 они многочисленны в крупных кровеносных сосудах, однако инфильтрация ткани опухоли статистически меньше, чем ткани при АИТ – до 7 клеток в поле зрения (рис. 21).

Таблица 7. Результаты иммуногистохимического окрашивания препаратов щитовидной железы пациентов различных групп (Me(Q1;Q3))

Маркер	Пациенты, не болевшие COVID-19		Пациенты, перенесшие COVID-19		p
	(1) АИТ, n=20	(2) ПРЦЖ, n=20	(3) АИТ, n=20	(4) ПРЦЖ, n=20	
CD4	7 (6;7)	5 (2;6)	53 (52;62)	8 (7;9)	p1-3=0.012 p3-4=0.012 p2-4=0.037
CD8	40 (36;43)	7 (6;7)	169 (145;173)	15 (14;16)	p1-2=0.012 p1-3=0.012 p3-4=0.012 p2-4=0.012
CD68	5 (5;6)	5 (5;6)	16 (13;19)	16 (15;16)	p1-3=0.012 p2-4=0.012
CD20	4 (3;4)	0 (0;1)	22 (22;29)	8 (7;9)	p1-2=0.012 p1-3=0.012 p3-4=0.012 p2-4=0.012
CD138	10 (9;13)	0 (0;1)	22 (21;29)	2 (1;2)	p1-2=0.012 p1-3=0.012 p3-4=0.012 p2-4=0.037
VEGF	2 (2;2)	1 (1;2)	3 (3;3)	3 (3;3)	p1-3=0.012 p2-4=0.012
CD95	3 (3;3)	1 (1;1)	2 (2;3)	3 (2;3)	p1-2=0.012 p2-4=0.021
Cyclin D1	1 (0;2)	26 (16;31)	50 (48;51)	195 (192;198)	p1-2=0.012 p1-3=0.012 p3-4=0.012 p2-4=0.012
p53	23 (21;28)	45 (37;47)	46 (41;51)	129 (128;134)	p1-3=0.012 p3-4=0.012 p2-4=0.012
TГ	0 (0;1)	1 (1;1)	2 (2;2)	0 (0;0)	p1-3=0.012 p3-4=0.012 p2-4=0.047
TPO	3 (3;3)	2 (2;2)	3 (3;3)	1 (1;1)	p1-2=0.012 p3-4=0.012 p2-4=0.047

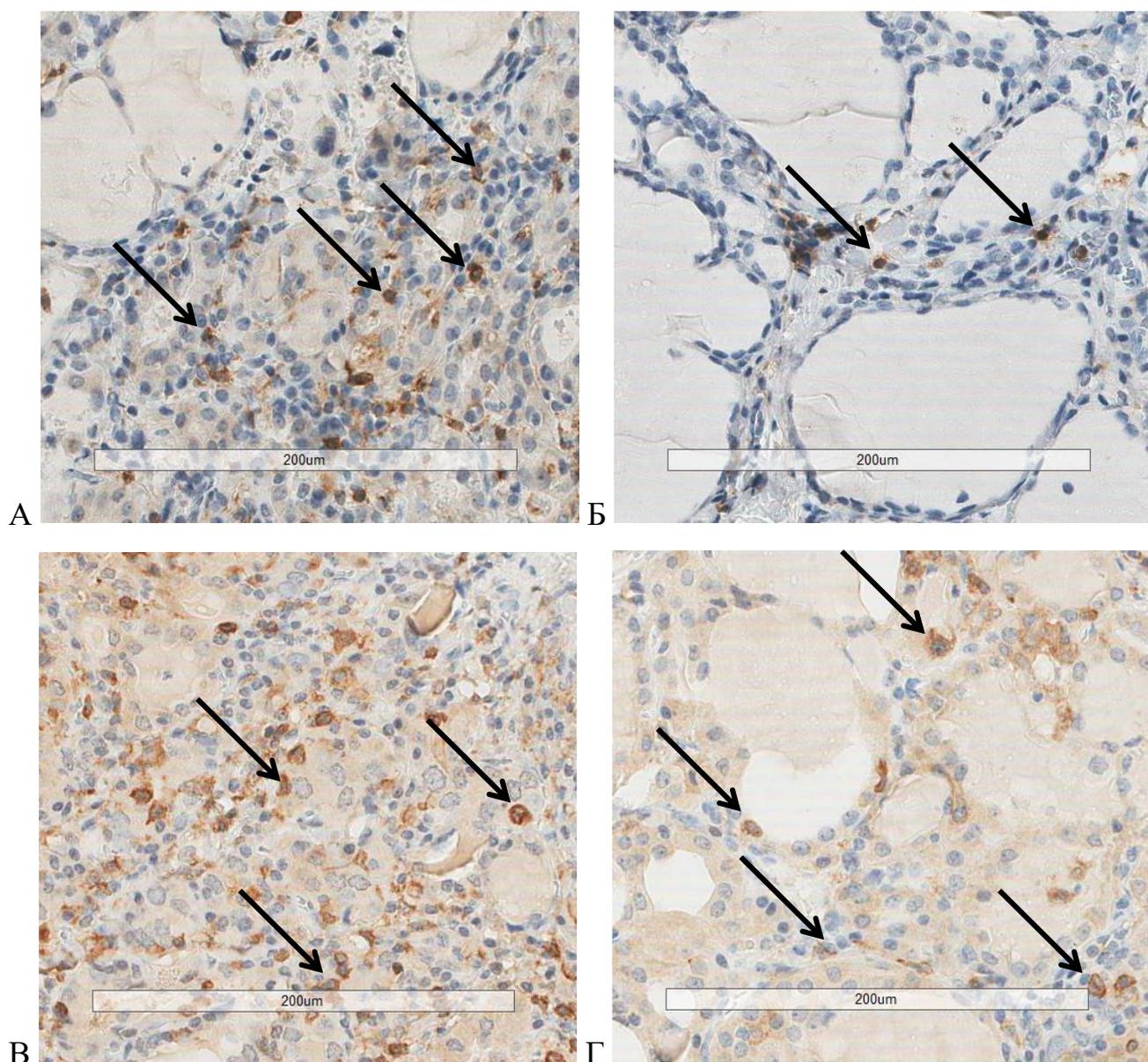


Рисунок 19. Фрагменты щитовидных желез пациенток с АИТ, парафиновые срезы, ИГХ реакции на CD4, Т-хелперные лимфоциты, ув. 400х.

А. АИТ без анамнеза COVID-19, горячая точка.

CD4+ Т-хелперные лимфоциты в строме ЩЖ в большом количестве (стрелки).

Б. АИТ без анамнеза COVID-19, ткань ЩЖ вне горячей точки.

Единичные CD4+ Т-хелперные лимфоциты в строме ЩЖ (стрелки).

В. АИТ после перенесенного COVID-19, горячая точка.

CD4+ Т-хелперные лимфоциты в строме ЩЖ покрывают поле зрения (стрелки).

Г. АИТ после перенесенного COVID-19, ткань ЩЖ вне горячей точки.

Умеренное количество CD4+ Т-хелперных лимфоцитов в строме ЩЖ (стрелки).

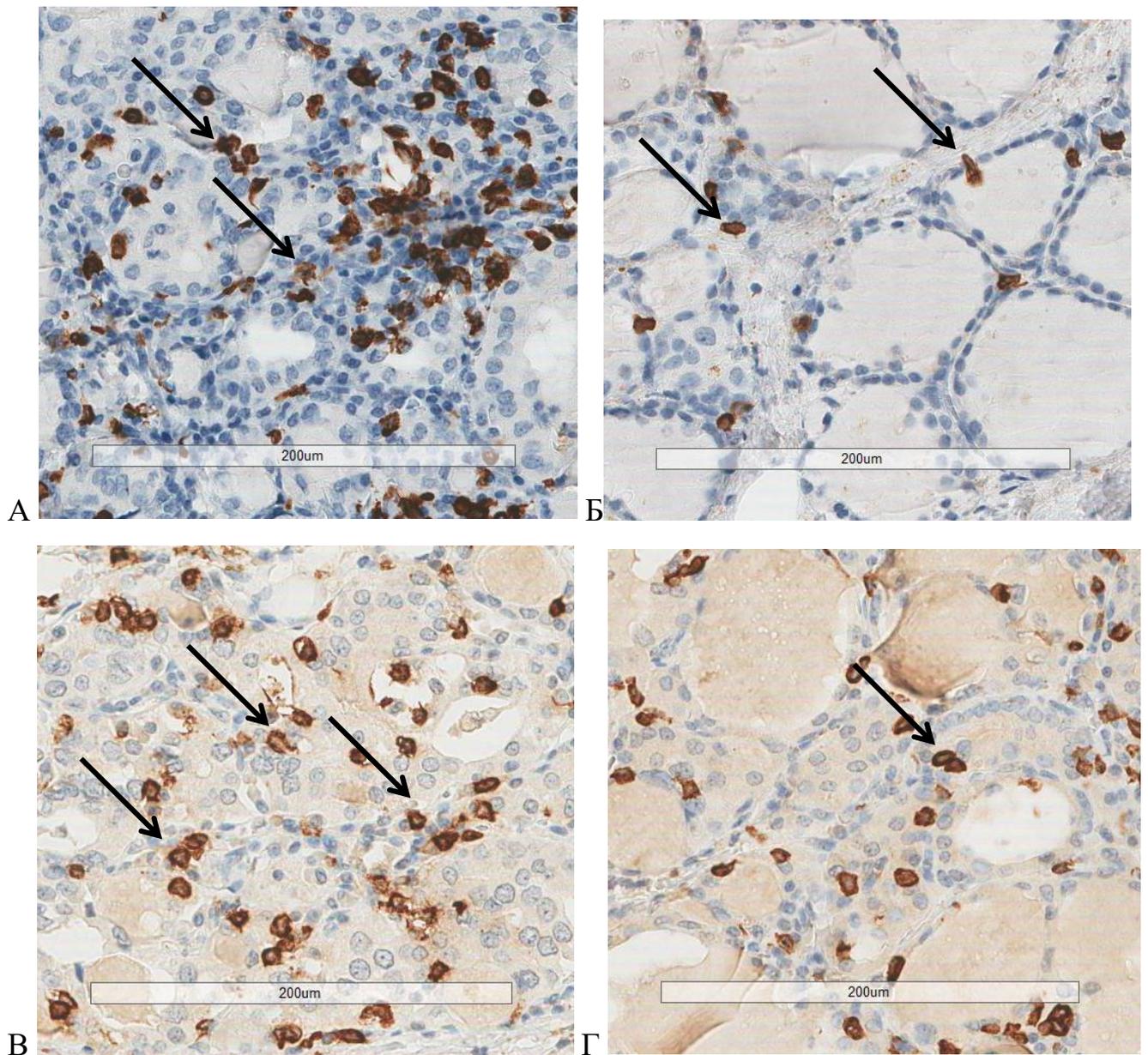


Рисунок 20. Фрагменты щитовидных желез пациенток с АИТ, парафиновые срезы, ИГХ реакции на CD8, лимфоциты Т-супрессоры, ув. 400х.

А. АИТ без анамнеза COVID-19, горячая точка.

CD8+ Т-супрессорные лимфоциты в строме ЩЖ в большом количестве (стрелки).

Б. АИТ без анамнеза COVID-19, ткань ЩЖ вне горячей точки.

Многочисленные CD8+ Т-супрессорные лимфоциты в строме ЩЖ (стрелки).

В. АИТ после перенесенного COVID-19, горячая точка.

CD8+ Т-супрессорные лимфоциты в ЩЖ покрывают поле зрения (стрелки).

Г. АИТ после перенесенного COVID-19, ткань ЩЖ вне горячей точки.

Большое количество CD8+ Т-супрессоров в строме ЩЖ (стрелки).

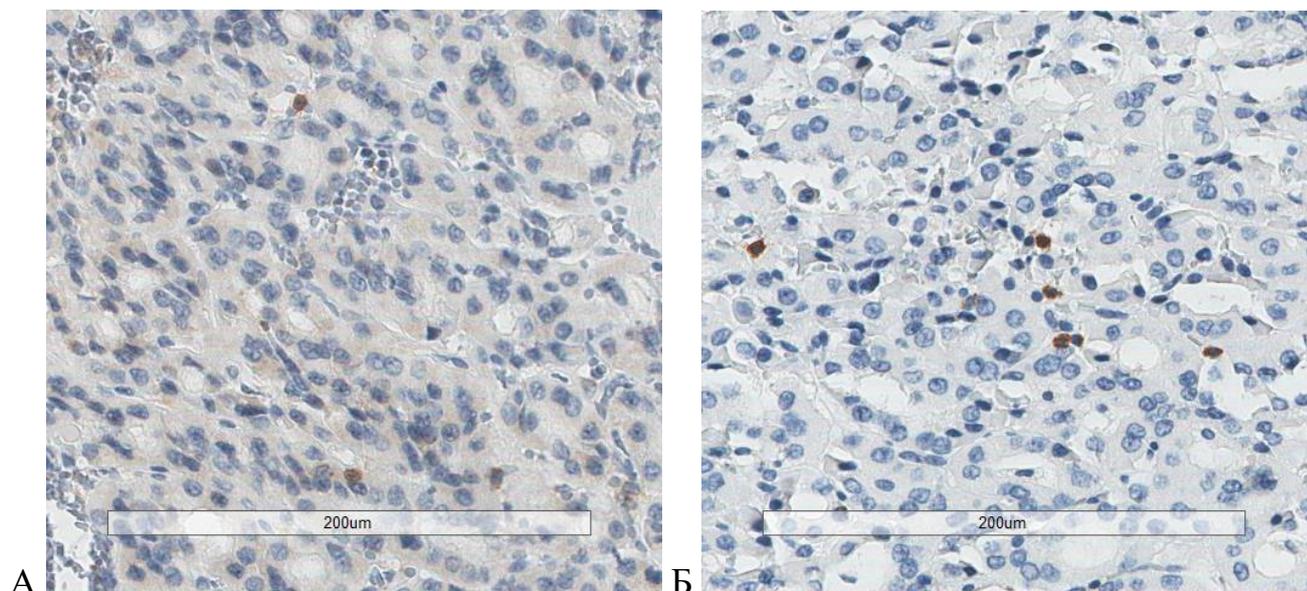


Рисунок 21. Фрагменты щитовидных желез пациенток с папиллярным раком, не болевших COVID-19, парафиновые срезы, ИГХ реакции, ув. 400х.

А. ИГХ реакция на CD4, Т-хелперные лимфоциты.

Слабая инфильтрация ткани опухоли CD4, Т-хелперными клетками.

Б. ИГХ реакция CD8, лимфоциты Т-супрессоры.

Умеренная инфильтрация ткани опухоли CD7, Т-супрессорными клетками.

При АИТ среди пациентов, болевших COVID-19 численность CD8+ клеток, инфильтрирующих ткань ЩЖ, достоверно больше по сравнению с группой АИТ без такого анамнеза. Горячих точек для этого маркера выявить не удалось, так как клетки распространены повсеместно равномерно, с особенно плотными скоплениями в лимфоидных узелках. В ЩЖ пациентов с папиллярным раком после перенесенного COVID-19 цитотоксические клетки представлены главным образом в демаркационном вале, однако также инфильтрируют и ткань опухоли в количестве 14-16 клеток в поле зрения, что достоверно выше, чем при раке, без перенесенного COVID-19 (рис. 21).

CD68+ макрофаги встречаются в центре фолликула в количестве 1-3 клетки в каждой группе, эти клетки не брали в расчет. В межфолликулярной ткани при АИТ располагается по 5-8 клеток в поле зрения. В горячих точках, окруженных лимфоидными узелками, количество макрофагов в 10 раз превышает фон. В

препаратах с раком ЩЖ макрофаги также расположены главным образом в центре фолликула. Между фолликулами встречаются единично, до 5 клеток в поле зрения, при этом в демаркационной зоне по периферии опухоли их число превышает 200 клеток в поле зрения. В группе АИТ при анамнезе перенесенного COVID-19 макрофаги многочисленны по всей ткани железы, в том числе в лимфоидных узелках, а также в межфолликулярной ткани, что носит достоверный характер при сравнении с группой АИТ без COVID-19. Также имеются области с большей плотностью клеток (рис. 22). В группе пациентов с папиллярным раком после COVID-19 макрофаги инфильтрируют опухоль в числе порядка 15 клеток в поле зрения, также многочисленны в демаркационной зоне, что достоверно превышает данный показатель в группе с раком без COVID-19 почти в три раза (рис. 23).

CD20+ В-лимфоциты в группе с АИТ располагаются преимущественно в лимфоидных узелках, которые окрасились тотально, и в междольковых перегородках. В эпителии железы встречаются единичные клетки, более многочисленные в горячих точках вблизи узелков. В группе с папиллярным раком немногочисленные скопления CD20+ клеток встречаются лишь в строме по периферии опухоли, и их число достоверно ниже, чем в группе с АИТ. В группе АИТ после COVID-19 выявлено большое число лимфоидных фолликулов с герминативными центрами. Большая часть лимфоцитов представлена CD20+ клетками. Также большое число В-лимфоцитов распространено в интерфолликулярном пространстве и достоверно выше, чем в группе с АИТ без анамнеза COVID-19. Имеются участки с большей численностью CD20+ клеток. В группе с папиллярным раком после COVID-19 наибольшее число CD20+ клеток встречается в скоплении лимфоцитов, демаркирующих опухолевую ткань, однако и среди эпителиоцитов опухоли встречается от 5 до 12 клеток в поле зрения, что достоверно больше, чем при раке без инфекционного анамнеза (рис. 24).

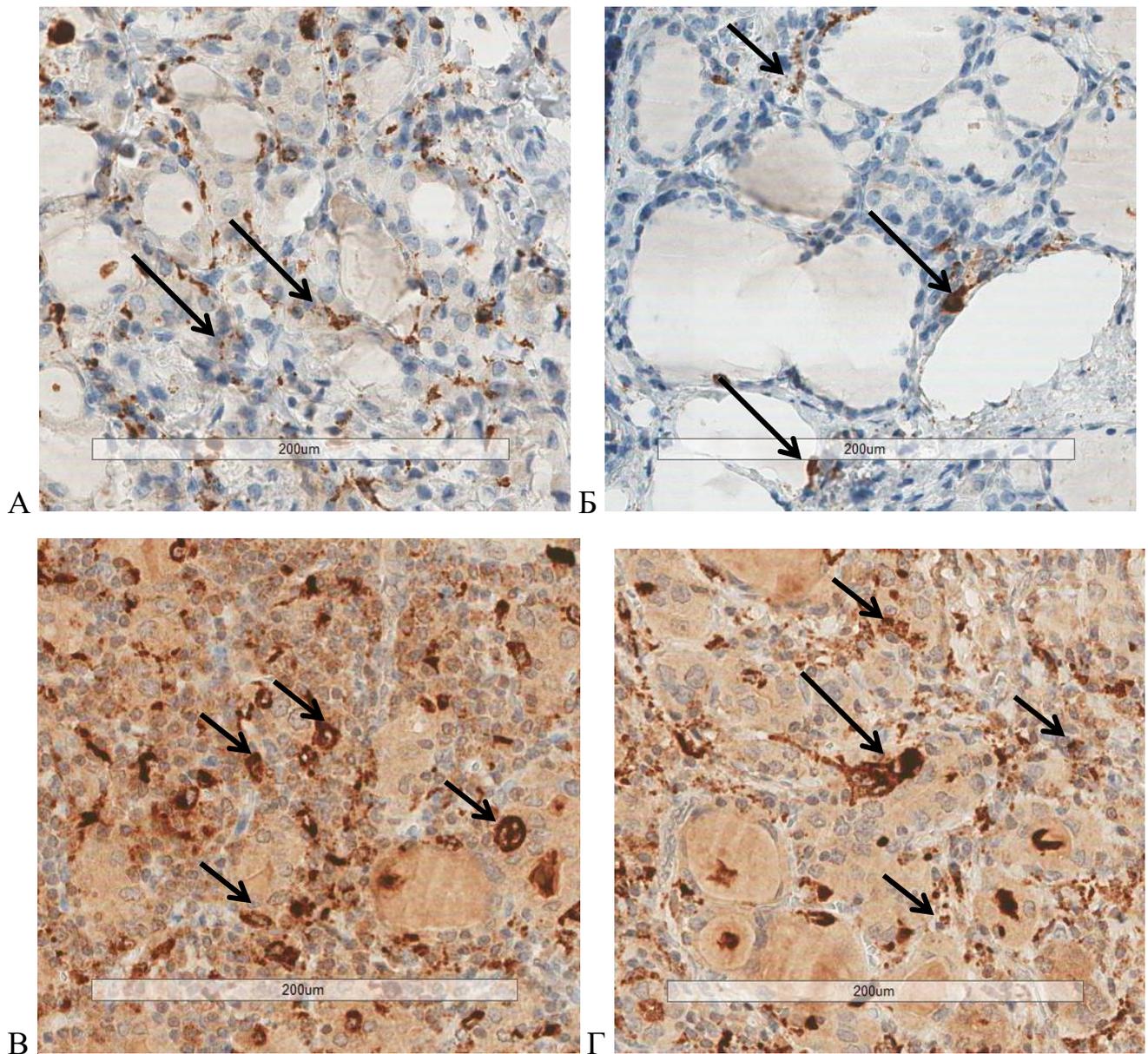


Рисунок 22. Фрагменты щитовидных желез пациенток с АИТ, парафиновые срезы, ИГХ реакции на CD68, макрофаги, ув. 400х.

А. АИТ без анамнеза COVID-19, горячая точка.

CD68+ макрофаги обильно покрывают поле зрения (стрелки).

Б. АИТ без анамнеза COVID-19, ткань вне горячей точки.

Умеренная реакция на CD68+ макрофаги, единичные клетки (стрелки).

В. АИТ после перенесенного COVID-19, горячая точка.

CD68+ макрофаги многочисленны по всей ткани железы (стрелки).

Г. АИТ после перенесенного COVID-19, ткань вне горячей точки.

Многочисленные CD68+, макрофаги (стрелки).

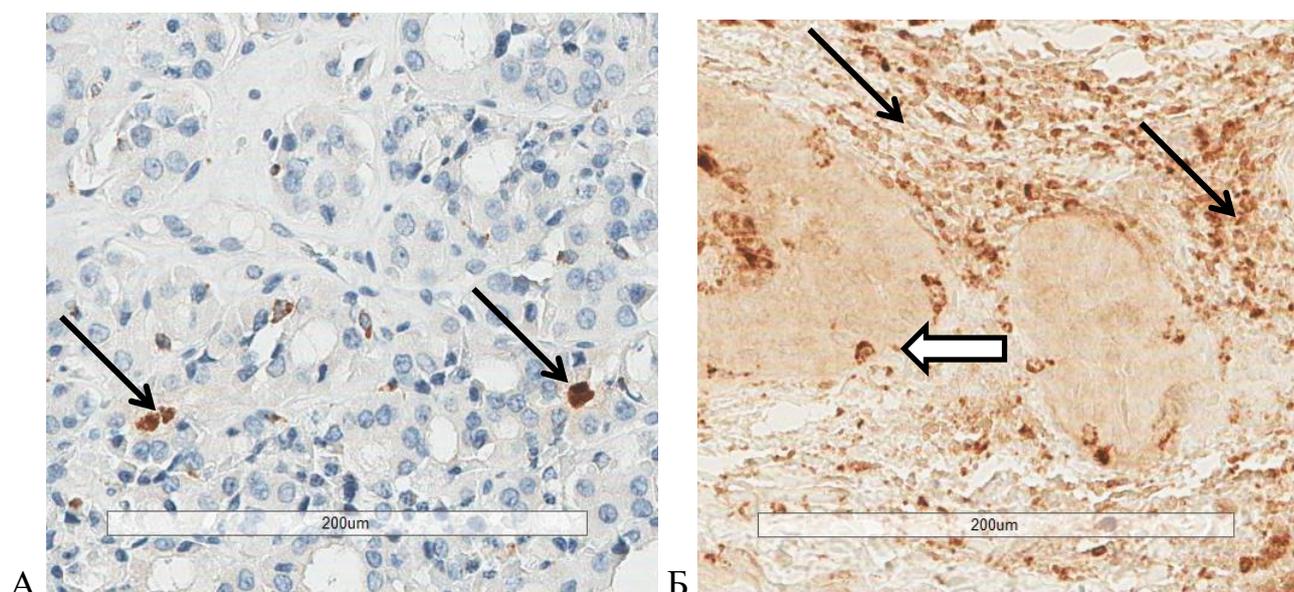


Рисунок 23. Фрагменты щитовидных желез пациенток с папиллярным раком, с различным анамнезом COVID-19, парафиновые срезы, ИГХ реакция на CD68+ макрофаги, ув. 400х.

А. Пациентка без анамнеза COVID-19.

Умеренная инфильтрация ткани опухоли, единичные CD68+ макрофаги (стрелки).

Б. Пациентка после перенесенного COVID-19.

Обильная инфильтрация опухоли, многочисленные CD68+ макрофаги в виде скоплений в зоне демаркации (черные стрелки) и строме опухоли (белые стрелки).

CD138+ клетки (плазмоциты) в группе АИТ без COVID-19 умеренно инфильтрируют интерфолликулярный эпителий. Присутствуют горячие точки с большим скоплением плазмоцитов. Также скопления CD138+ клеток наблюдаются на периферии лимфоидных фолликулов. В группе с раком CD138+ клетки не встречаются в ткани опухоли, однако присутствуют за пределами опухоли, в частности в капсуле железы. В группе АИТ после COVID-19 наблюдается скопление CD138+ клеток по периферии многочисленных лимфоидных узелков, а также существенная инфильтрация интерфолликулярной ткани, особенно в области горячих точек, что достоверно выше, чем в группе с АИТ без COVID-19 (рис. 25).

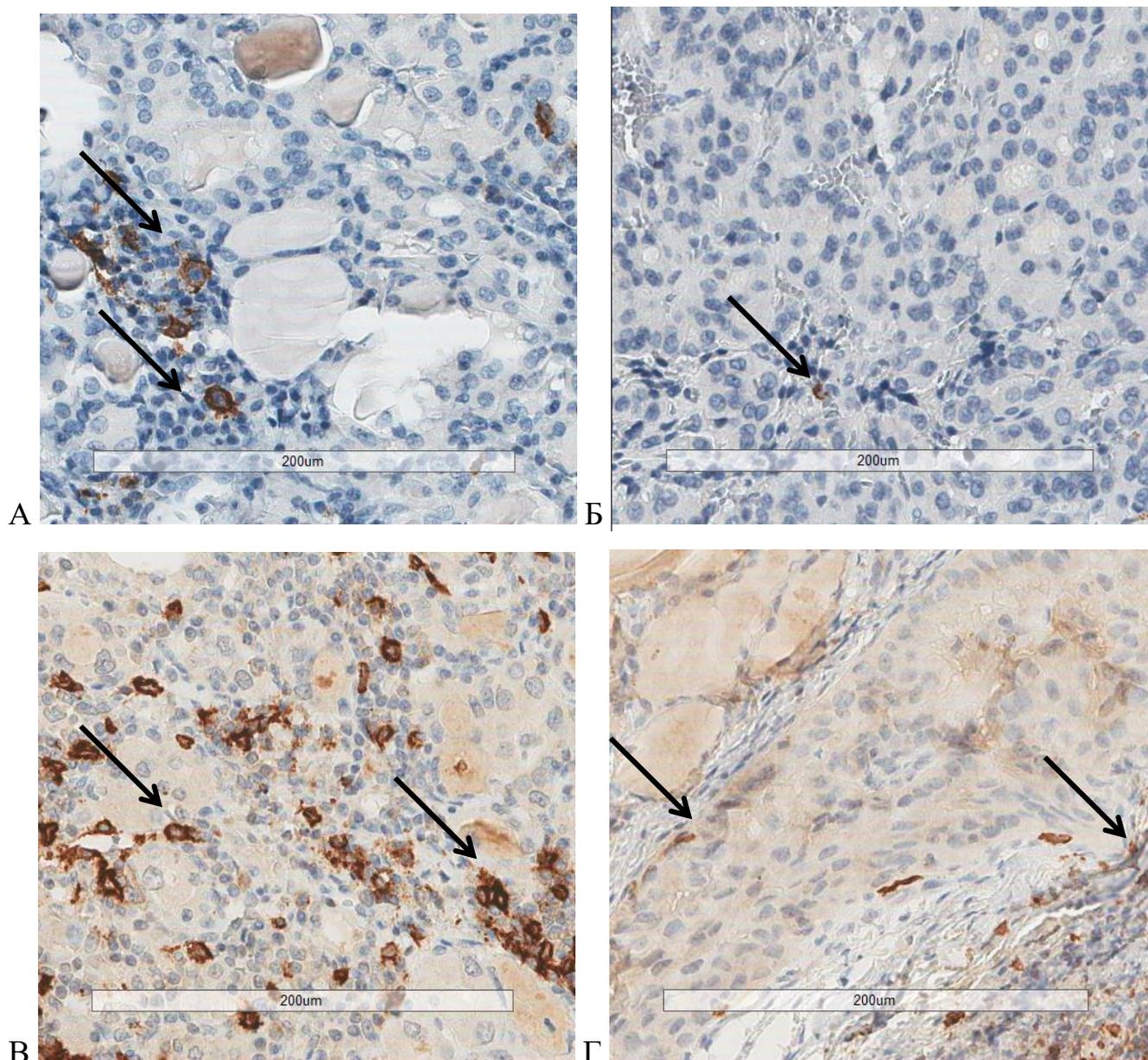


Рисунок 24. Фрагменты щитовидных желез пациенток с папиллярным раком и АИТ, парафиновые срезы, ИГХ реакции на CD20, В-лимфоциты, ув.400.

А. АИТ без анамнеза COVID-19, горячая точка.

CD20+ В лимфоциты в лимфоидных узелках ЩЖ (стрелки).

Б. Папиллярный рак без анамнеза COVID-19.

Слабая реакция на CD20+ В лимфоциты, единичные клетки (стрелка).

В. АИТ после перенесенного COVID-19, горячая точка.

CD20+ В лимфоциты в лимфоидных узелках и строме ЩЖ (стрелки).

Г. Папиллярный рак после перенесенного COVID-19.

Многочисленные CD20+ В лимфоциты локализованы преимущественно в строме, окружающей опухоль (стрелки).

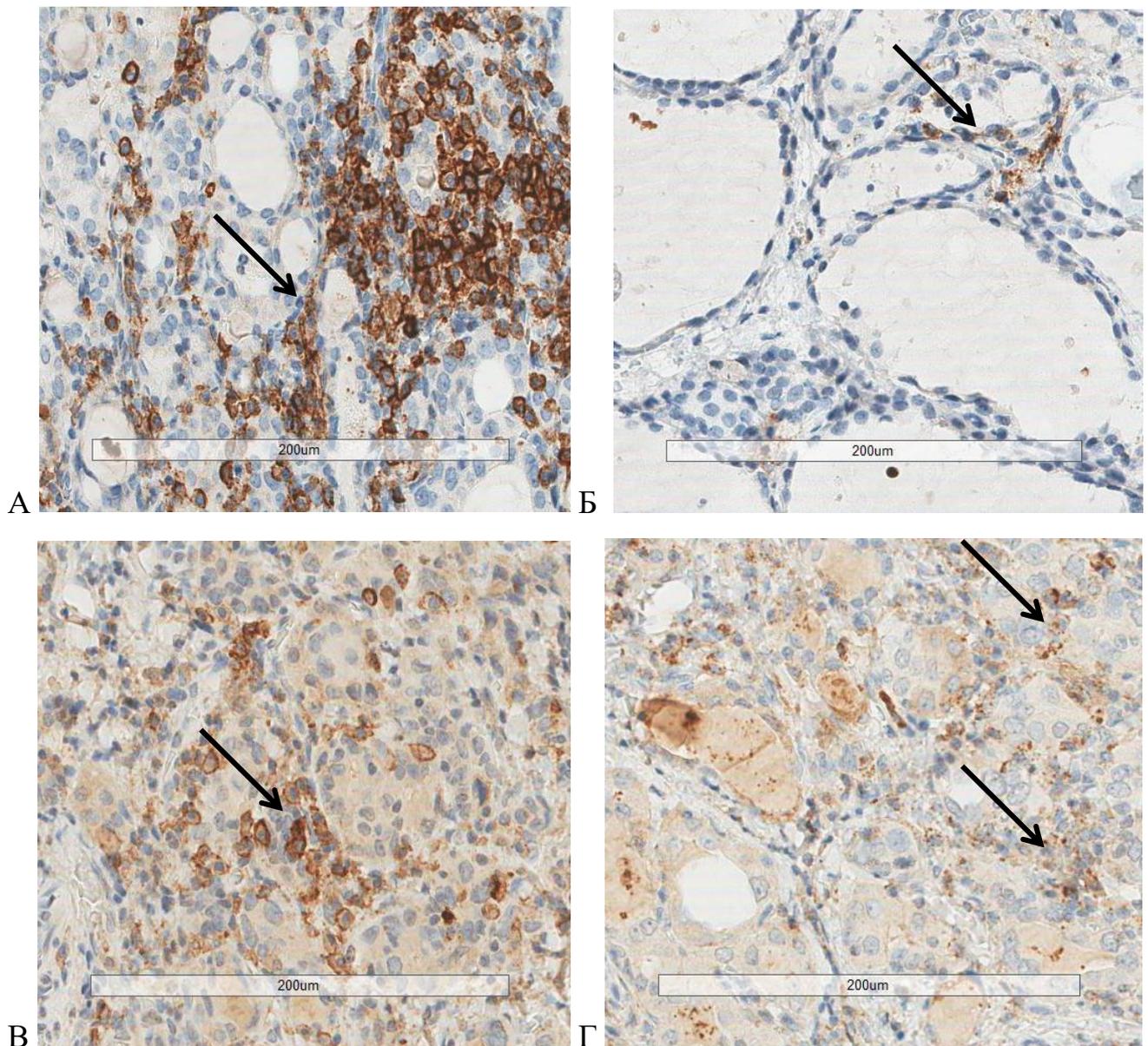


Рисунок 25. Фрагменты щитовидных желез пациенток с АИТ, парафиновые срезы, ИГХ реакции на CD138, плазмоциты, ув. 400х.

А. АИТ без анамнеза COVID-19, горячая точка.

CD138+, плазмоциты в лимфоидных узелках ЩЖ и на периферии лимфоидных фолликулов (стрелка).

Б. АИТ без анамнеза COVID-19, ткань железы вне горячей точки.

CD138+, плазмоциты располагаются в интерфолликулярной строме (стрелка).

В. АИТ после перенесенного COVID-19, горячая точка.

CD138+, плазмоциты обильно инфильтрируют ткань ЩЖ (стрелка).

Г. АИТ после перенесенного COVID-19, ткань железы вне горячей точки.

CD138+, плазмоциты инфильтрируют ткань ЩЖ (стрелки).

В группе с раком после COVID-19 данный тип клеток (CD138+ клетки (плазмоциты) практически не представлен (1-3 клетки в поле зрения), что, однако, достоверно превышает данный показатель в группе пациентов с папиллярным раком без COVID-19.

VEGF умеренно экспрессируется всеми эпителиоцитами ЩЖ в группе с АИТ, при этом в горячих точках экспрессия выражена сильнее (3+). В группе с раком экспрессия фактора сосудистого роста умеренная, однако данные различия с группой АИТ не имеют статистической достоверности. В обеих группах после COVID-19 экспрессия VEGF сильно положительная: 100% клеток имеют яркое окрашивание и статистически отличаются от соответствующих групп без COVID-19 инфекционного анамнеза (рис. 26).

CD95 (маркер апоптоза) экспрессируется выражено и преимущественно с цитоплазматической локализацией во всех эпителиоцитах ЩЖ при АИТ. В горячих точках отмечается яркая мембранная реакция на подавляющем большинстве клеток, сохраняя при этом цитоплазматическое окрашивание. В группе с раком присутствует слабая цитоплазматическая реакция эпителиоцитов, и лишь у 10% клеток наблюдается мембранная реакция. Таким образом мы наблюдаем статистически достоверную потерю экспрессии в группе с раком ЩЖ. Имеются участки, сохранившие лишь слабое фоновое цитоплазматическое окрашивание. В группе АИТ после COVID-19 в основной части ткани железы наблюдается интенсивная цитоплазматическая экспрессия во всех эпителиоцитах и лимфоцитах. При этом имеются области, в которых выраженная мембранная экспрессия характерна практически для 50% эпителиоцитов. В группе с папиллярным раком от 50 до 80% клеток имеют яркое мембранное окрашивание, что достоверно отличается от группы с раком без COVID-19 (рис. 27).

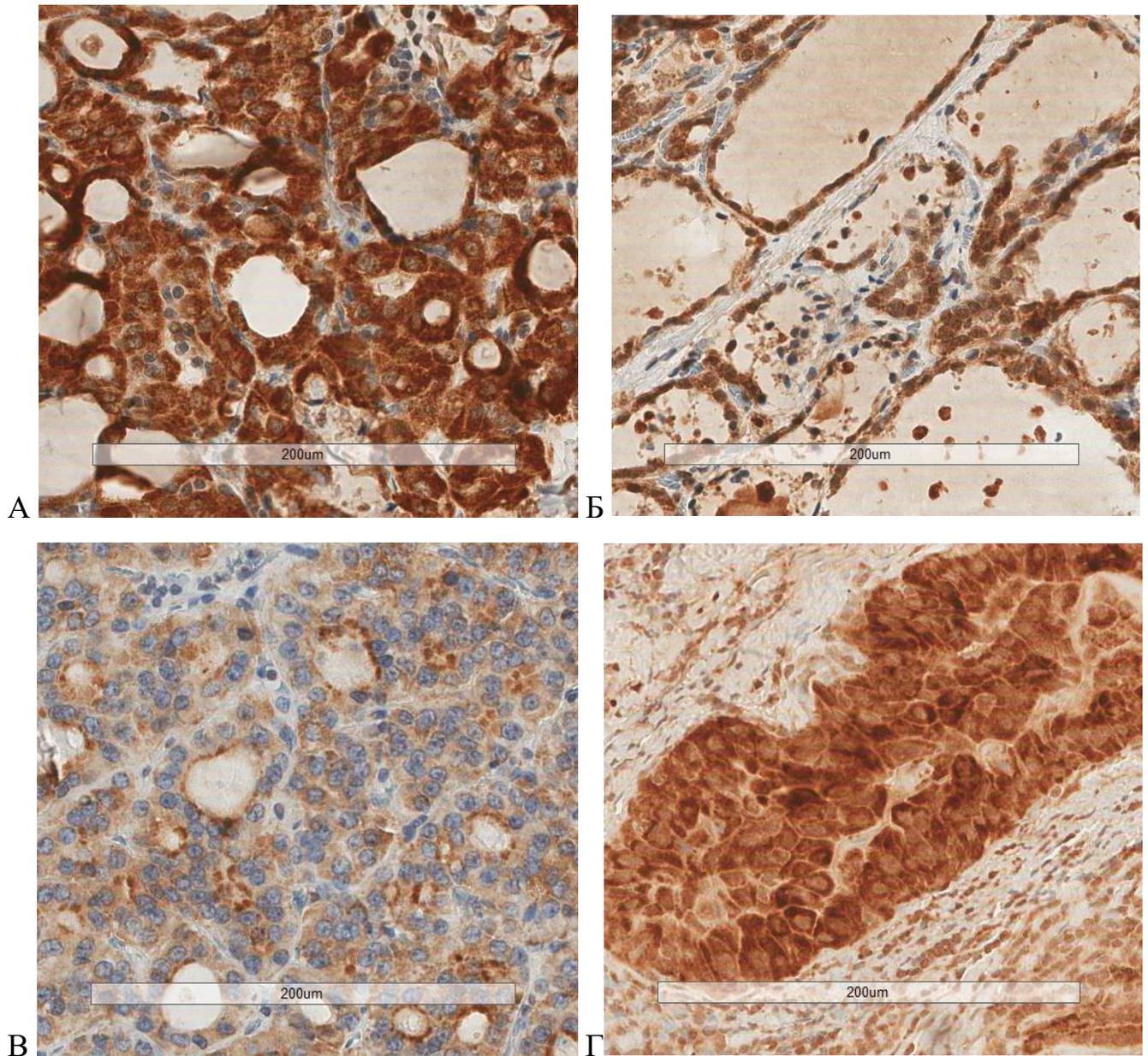


Рисунок 26. Фрагменты щитовидных желез пациенток с папиллярным раком и АИТ, парафиновые срезы, ИГХ на фактор роста сосудов VEGF, ув. 400х.

А. АИТ без анамнеза COVID-19, горячая точка.

100% клеток имеют яркое окрашивание и экспрессируют VEGF

Б. АИТ без анамнеза COVID-19, ткань железы вне горячей точки.

Выраженная экспрессия фактора сосудистого роста.

В. Папиллярный рак без анамнеза COVID-19.

Экспрессия фактора сосудистого роста умеренная (2+).

Г. Папиллярный рак после перенесенного COVID-19.

100% клеток имеют яркое окрашивание и экспрессируют VEGF.

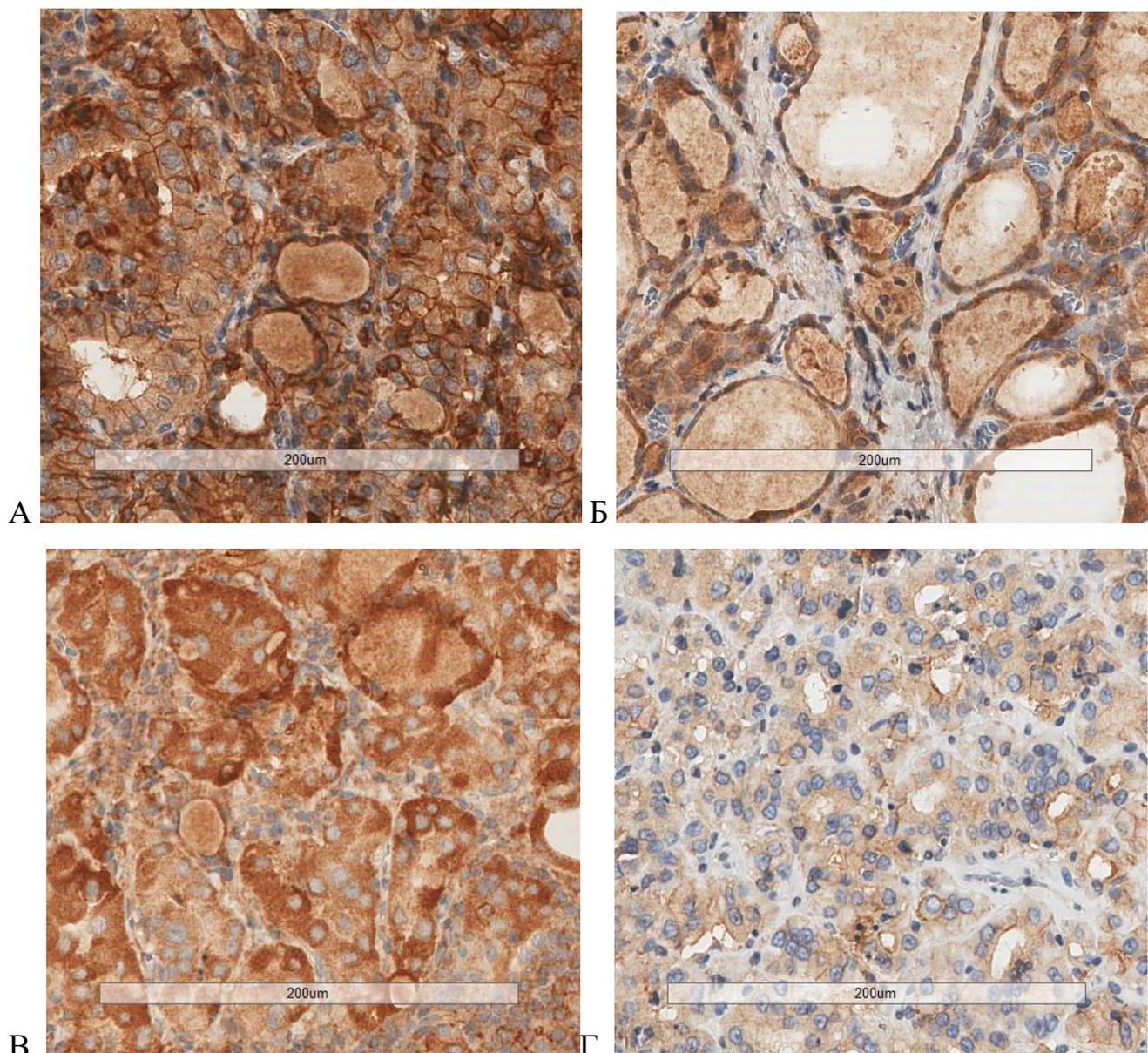


Рисунок 27. Фрагменты щитовидных желез пациенток с АИТ и папиллярным раком, парафиновые срезы, ИГХ реакции на CD95, маркер апоптоза, ув. 400х.

А. АИТ без анамнеза COVID-19, горячая точка.

Б. АИТ без анамнеза COVID-19, ткань железы вне горячей точки.

В. АИТ после перенесенного COVID-19, ткань железы вне горячей точки.

Описание для А, Б, В: маркер апоптоза CD95 экспрессируется выраженно и преимущественно с цитоплазматической локализацией во всех эпителиоцитах ЩЖ при АИТ, с более выраженной экспрессией после COVID-19.

Г. Папиллярный рак без анамнеза COVID-19.

Слабая цитоплазматическая и частично мембранная реакция эпителиоцитов.

Cyclin D1 экспрессируется в ядрах опухолевых клеток при раке ЩЖ в количестве порядка 25 клеток в поле зрения. При АИТ эпителиоциты по большей части не экспрессируют этот маркер, однако встречаются участки (аналогичные с горячими точками при использовании маркеров лейкоцитов) в которых часть ядер оказались положительно окрашены. В группе с АИТ после COVID-19 экспрессия в сохранной ткани слабая, но большая часть клеток окрашены, что достоверно отличается от группы с АИТ без COVID-19. В горячих точках численность сильноокрашенных ядер существенно выше (рис. 28). В группе с раком после COVID-19 CyclinD1 ярко экспрессируется в 100% опухолевых клеток, что статистически достоверно отличается от группы с раком без COVID-19 (рис. 29).

Проонкогенный белок p53 умеренно экспрессируется в ядрах эпителиоцитов при АИТ, большее количество клеток у пациентов с раком положительно на этот маркер. Наибольшая экспрессия отмечена в горячих точках при АИТ. При АИТ после COVID-19 около трети эпителиоцитов экспрессируют p53 крайне слабо, однако по численности достоверно превышает число положительно окрашенных клеток в группе АИТ без COVID-19 (рис. 30). Имеются области с повышенной экспрессией данного белка в ядрах. В группе с раком после COVID-19 90% опухолевых клеток ярко экспрессируют p53, что в три раза больше, чем при раке без анамнеза COVID-19 (рис. 31).

С антителом к Tg окрашивание прошло главным образом в коллоиде фолликулов. В группе с АИТ без COVID-19 эпителиоциты не имеют окрашивания, либо единичные клетки имеют неполную окраску клеточной мембраны, чаще с апикальной части клетки, обращенной в фолликул. В горячих точках число таких клеток несколько больше, однако это статистически незначимо. В группе с папиллярным раком фолликулы практически не имеют коллоида, а окрашивание клеток имеет умеренный характер: около трети препарата экспрессируют среднюю интенсивность окрашивания цитоплазмы эпителиоцитов.

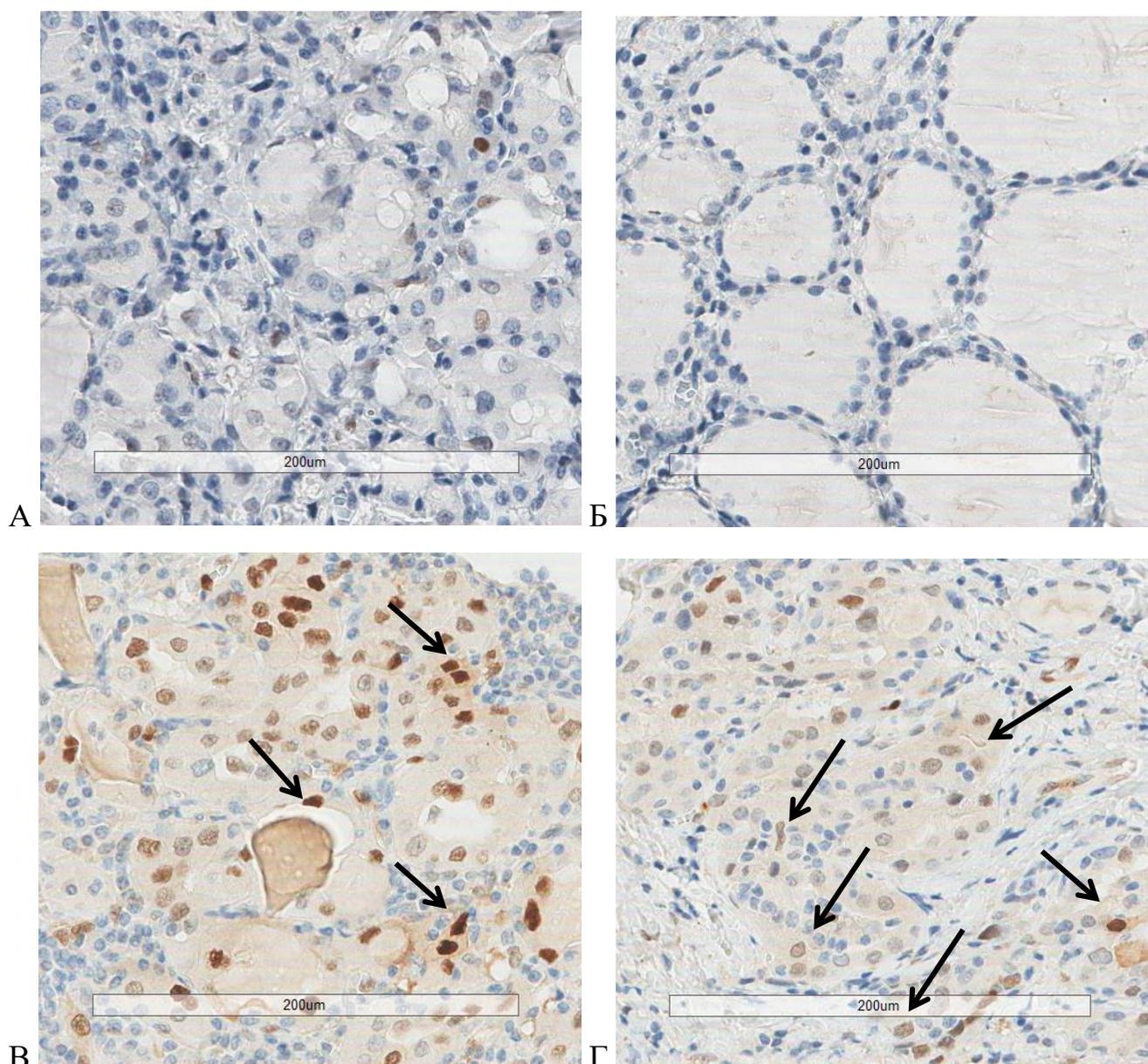


Рисунок 28. Фрагменты щитовидных желез пациенток с АИТ, парафиновые срезы, ИГХ реакции на Cyclin D1, маркер онкогенеза, ув. 400х.

А. АИТ без анамнеза COVID-19, горячая точка.

Эпителиоциты не экспрессируют Cyclin D1, маркер онкогенеза.

Б. АИТ без анамнеза COVID-19, ткань железы вне горячей точки.

Эпителиоциты не экспрессируют Cyclin D1, маркер онкогенеза.

В. АИТ после перенесенного COVID-19, горячая точка.

Численность сильноокрашенных ядер очень высокая (стрелки).

Г. АИТ после перенесенного COVID-19, ткань железы вне горячей точки.

Экспрессия в сохранной ткани слабая, но большая часть эпителиальных клеток окрашены (стрелки).

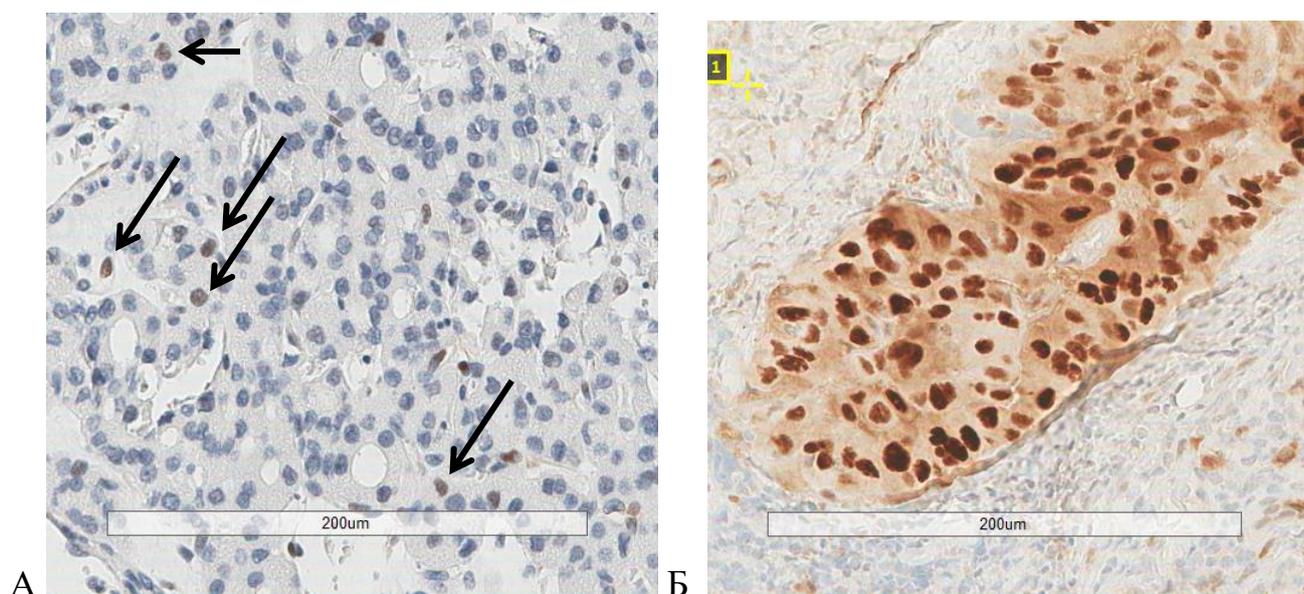


Рисунок 29. Фрагменты щитовидных желез с папиллярным раком, парафиновые срезы, ИГХ реакции на Cyclin D1, маркер онкогенеза, ув. 400х.

А. Папиллярный рак без анамнеза COVID-19.

Cyclin D1 экспрессируется в ядрах опухолевых клеток при раке ЩЖ в количестве порядка 25 клеток в поле зрения (стрелки).

Б. Папиллярный рак после перенесенного COVID-19.

CyclinD1 ярко экспрессируется в 100% опухолевых клеток.

После перенесенного COVID-19 эпителиоциты ЩЖ при АИТ экспрессируют Tg более интенсивно, выявлено до 50% клеток с яркой мембранной окраской в горячих точках и до трети клеток в остальной ткани железы, что статистически отличается от группы АИТ без COVID-19. В опухолевых клетках экспрессия данного маркера отсутствует (рис. 32, 33 А).

Антитело к ТПО ярко экспрессируется эпителиоцитами всех клеток без исключения при АИТ. При раке экспрессия данного маркера снижается как по яркости окрашивания, так и по числу окрашенных клеток, что носит статистически достоверный характер (рис. 33 Б). Аналогичная картина и в группах с перенесенным COVID-19. При этом в группе с АИТ встречаются участки со сниженной экспрессией (рис. 34).

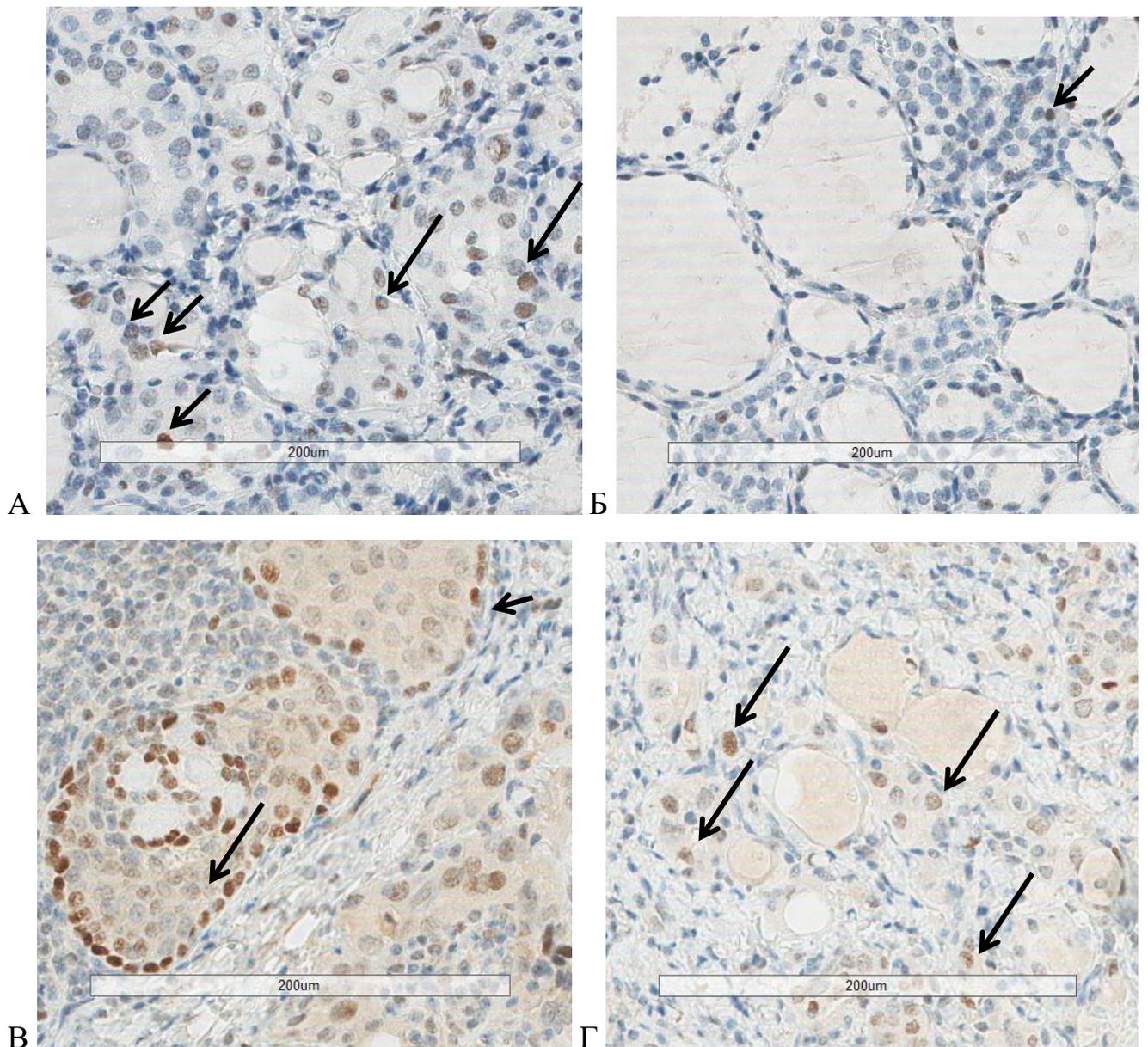


Рисунок 30. Фрагменты щитовидных желез пациенток с АИТ, парафиновые срезы, ИГХ реакции на p53, проонкогенный белок, ув. 400х.

А. АИТ без анамнеза COVID-19, горячая точка.

Умеренная экспрессия в ядрах эпителиоцитов (стрелки).

Б. АИТ без анамнеза COVID-19, ткань железы вне горячей точки.

Слабая экспрессия в ядрах эпителиоцитов (стрелка).

В. АИТ после перенесенного COVID-19, горячая точка.

Порядка 30% эпителиоцитов экспрессируют p53 (стрелки).

Г. АИТ после перенесенного COVID-19, ткань железы вне горячей точки.

Области с повышенной экспрессией маркера (стрелки).

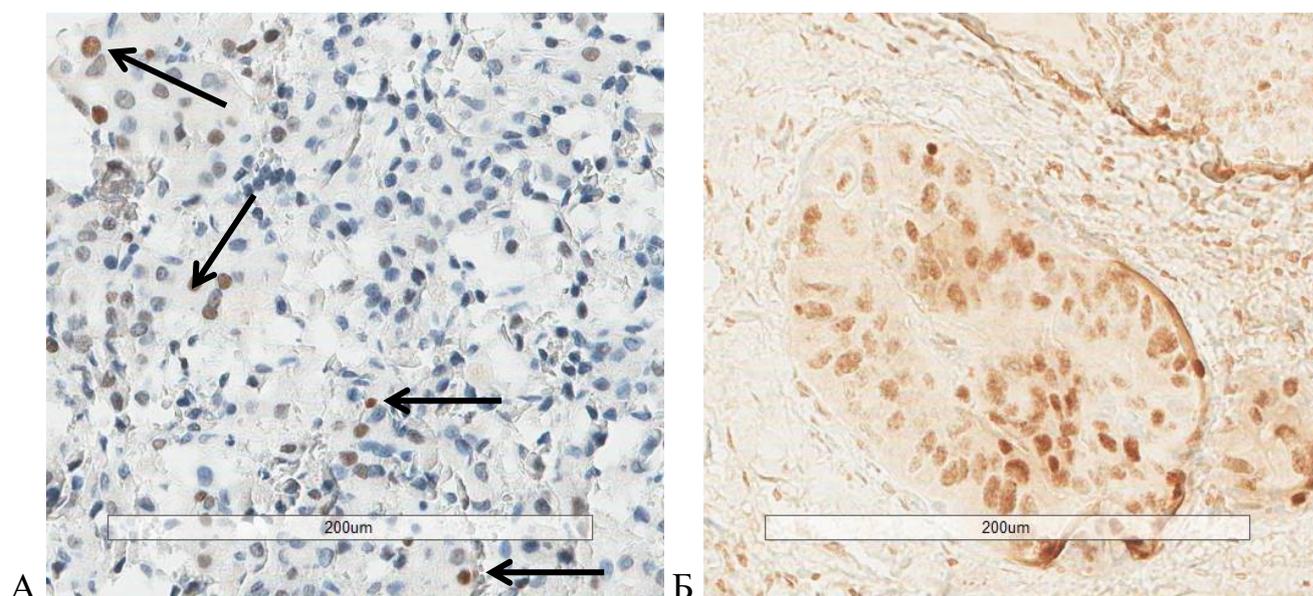


Рисунок 31. Фрагменты щитовидных желез с папиллярным раком, парафиновые срезы, ИГХ реакции на p53, проонкогенный белок, ув. 400х.

А. Папиллярный рак без анамнеза COVID-19.

Умеренная экспрессия в ядрах эпителиоцитов (стрелки).

Б. Папиллярный рак после перенесенного COVID-19.

90% опухолевых клеток ярко экспрессируют p53.

Таким образом, в группе с АИТ в тиреоидной ткани, густо инфильтрированной лейкоцитами, наиболее многочисленной популяцией оказались CD8⁺ цитотоксические лимфоциты (Таблица 7). Вторыми по численности являются плазматические CD138⁺ клетки. В областях с повышенным скоплением лимфоцитов соотношение различных типов лейкоцитов сохраняется. Лишь незначительное количество клеток экспрессируют Cyclin D1, в то время как экспрессия протоонкогенного белка p53 в отдельных участках оказалась довольно высокой (155 клеток в поле зрения). Также для данной группы характерна низкая экспрессия рецепторов к тиреоглобулину (Tg) и высокая – к тиреопероксидазе (ТПО). Такая картина свидетельствует о высокой аутоиммунной активности, которая несет потенциальный риск малигнизации тиреоидного эпителия ввиду нарушения внутриклеточных процессов, о чем свидетельствует повышение экспрессии Cyclin D1 и p53.

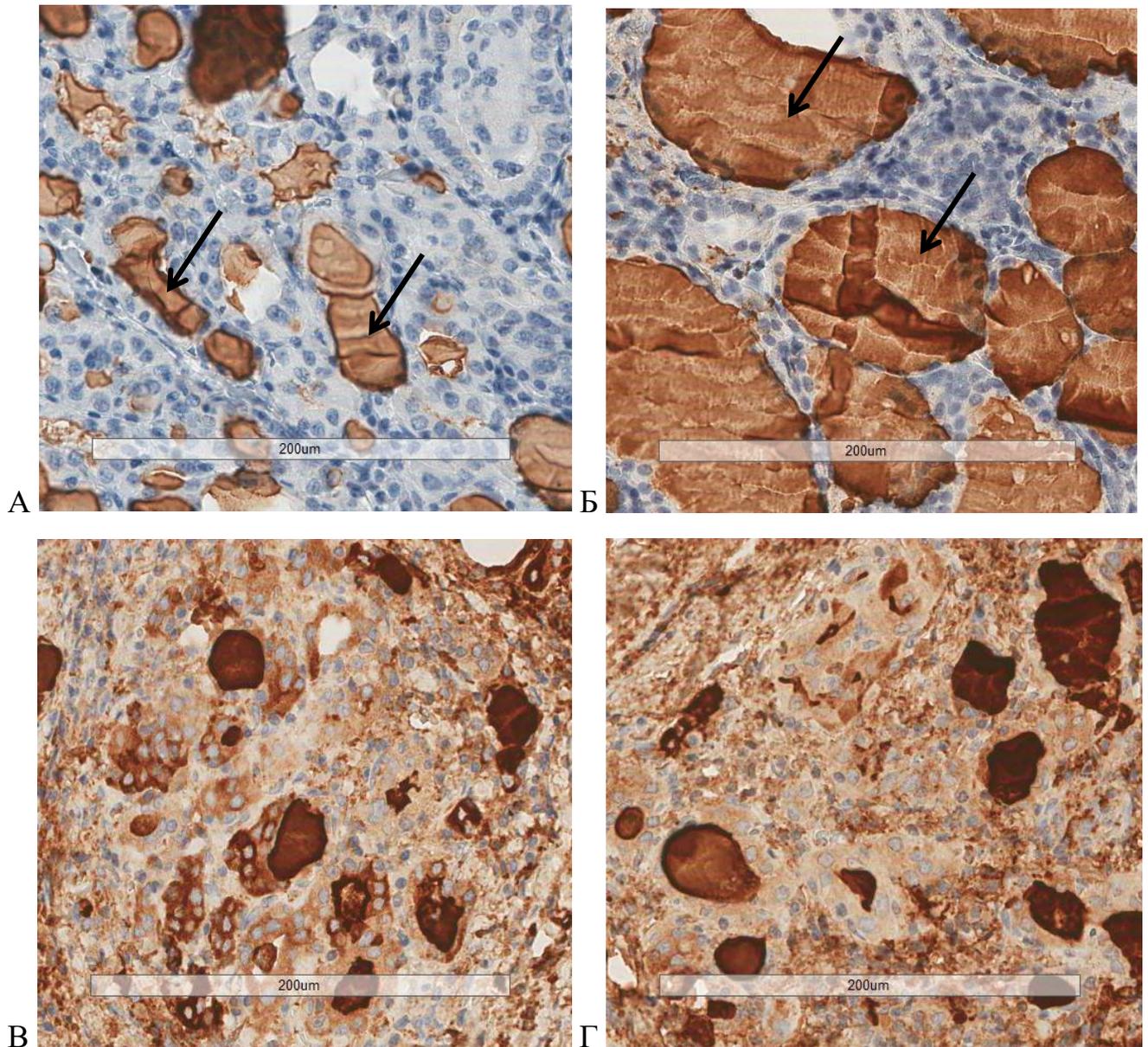


Рисунок 32. Фрагменты щитовидных желез пациенток с АИТ, парафиновые срезы, ИГХ реакции на антитело к Тиреоглобулину, ув. 400х.

А. АИТ без анамнеза COVID-19, горячая точка.

Окрашивание прошло главным образом в коллоиде фолликулов (стрелки), эпителиоциты не имеют окрашивания.

Б. АИТ без анамнеза COVID-19, ткань железы вне горячей точки.

Окрашивание прошло главным образом в коллоиде фолликулов (стрелки).

В. АИТ после перенесенного COVID-19, горячая точка.

До 50% клеток с яркой мембранной окраской в горячих точках.

Г. АИТ после перенесенного COVID-19, ткань железы вне горячей точки.

30-50 % клеток с яркой мембранной окраской в ткани железы.

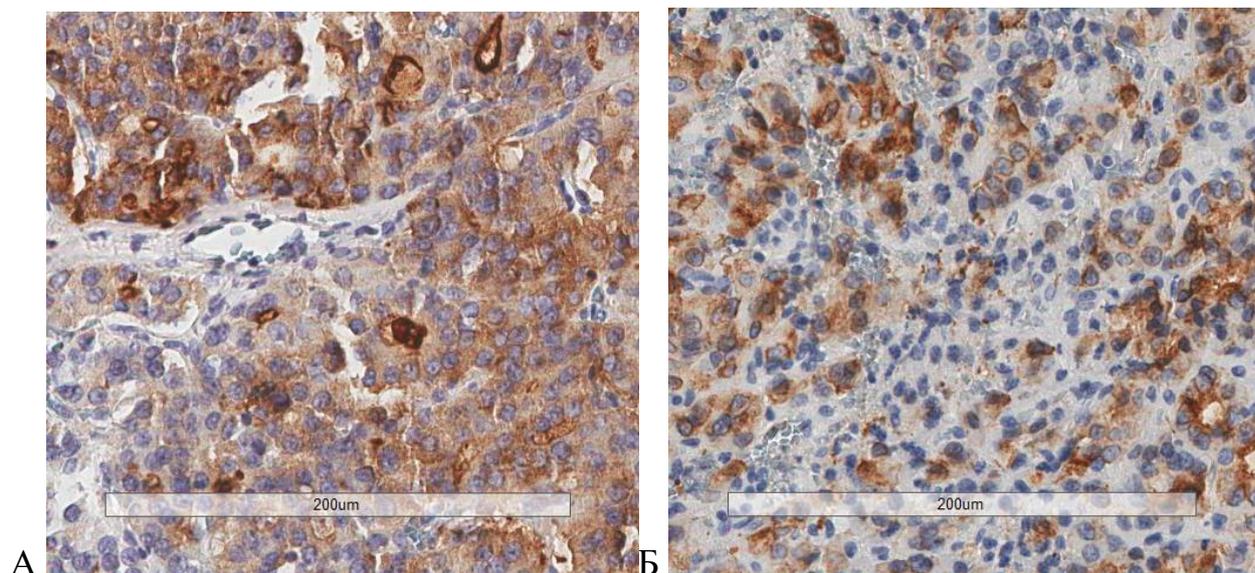


Рисунок 33. Фрагменты щитовидных желез пациенток с папиллярным раком, парафиновые срезы, ИГХ реакции на антитела к Тиреоглобулину (А) и ТПО Б) у пациенток, не болевших COVID-19, ув. 400х.

А. Ткань не содержит коллоид, окрашивание клеток умеренно выражено: около трети эпителиоцитов экспрессируют среднюю интенсивность окрашивания цитоплазмы.

Б. В опухолевых клетках экспрессия данного маркера практически отсутствует.

В группе с папиллярным раком ЩЖ отмечается низкая лимфоидная инфильтрация, а также уход опухолевых клеток от иммунологического контроля, что выражается в снижении экспрессии CD95 на поверхности клетки и снижении синтеза данного белка в целом. Также характерным для папиллярного рака ЩЖ является повышение экспрессии Cyclin D1 и p53. Изменяется и синтетическая активность клеток: незначительно повышается экспрессия Tg и снижается ТПО. Отметим, что достоверных отличий в экспрессии исследованных маркеров в классическом и фолликулярном подтипах папиллярного рака ЩЖ не обнаружено.

В группах пациентов, перенесших COVID-19, выявлено достоверное количественное увеличение всех исследуемых показателей в сравнении с аналогичными группами пациентов, не имевших COVID-19 в анамнезе.

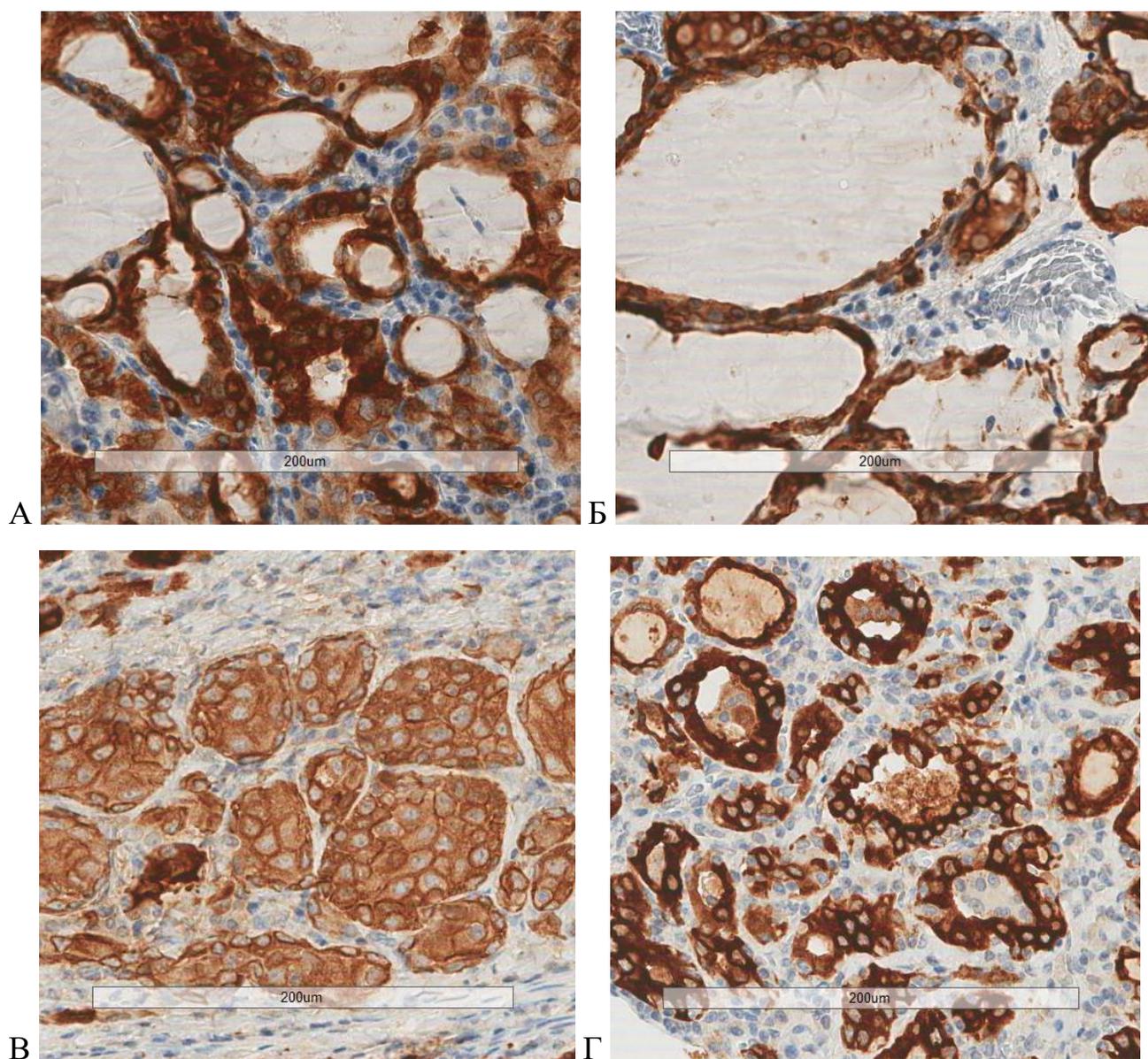


Рисунок 34. Фрагменты щитовидных желез пациенток с АИТ, парафиновые срезы, ИГХ реакции на антитело к тиреопероксидазе, ТПО, ув. 400х.

А. АИТ без анамнеза COVID-19, горячая точка.

Умеренная экспрессия в ядрах эпителиоцитов (стрелки).

Б. АИТ без анамнеза COVID-19, ткань железы вне горячей точки.

Слабая экспрессия в ядрах эпителиоцитов (стрелка).

В. АИТ после перенесенного COVID-19, горячая точка.

Порядка 30% эпителиоцитов экспрессируют p53 (стрелки).

Г. АИТ после перенесенного COVID-19, ткань железы вне горячей точки.

Области с повышенной экспрессией баркера (стрелки).

При этом несколько изменяется соотношение различных групп лимфоцитов в группе с АИТ после перенесенного COVID-19. Наиболее многочисленной популяцией по-прежнему остаются CD8⁺ цитотоксические клетки, однако на второе место по численности выходят Т-хелперы. Также уравниваются в числе В-лимфоциты и плазмоциты. Таким образом, наблюдается явный сдвиг в сторону клеточного иммунитета и замедление развития специфического гуморального ответа. Также существенно возрастает экспрессия Cyclin D1 и p53 в эпителиоцитах ЩЖ, что многократно увеличивает риск развития злокачественной опухоли. Возрастает также активность синтеза тиреоглобулина.

В группе пациентов с раком ЩЖ после COVID-19 наблюдается умеренная инфильтрация лимфоцитами (больше, чем у пациентов без COVID-19 в анамнезе), а также высокая экспрессия CD95 в эпителиоцитах, что говорит об их большей продуктивности и видимости для иммунокомпетентных клеток. Однако экспрессия Cyclin D1 и p53 в данной группе максимальна, практически 100% опухолевых клеток экспрессируют маркеры с большой интенсивностью.

Итак, выявлены статистически значимые отличия в экспрессии изучаемых маркеров. В частности, в группе с АИТ наблюдается высокое содержание Т-регуляторных клеток и В-лимфоцитов, инфильтрирующих ткань железы, в то время как в группе с раком численность лимфоцитов крайне мала, но отмечено нарушение клеточного цикла с накоплением белков CyclinD1 и p53. У пациентов, перенесших COVID-19, наблюдается существенное увеличение численности инфильтрирующих ткань железы лимфоцитов, смещение иммунного ответа в сторону клеточного звена иммунитета, выраженное нарушение клеточного цикла и ферментативной системы тироцитов. Схожие процессы наблюдаются и в ткани опухоли ЩЖ, это признаки потери клетками дифференцировки и способности синтезировать характерные для тироцитов белки, что носит неблагоприятный прогноз для пациента. Можно заключить, что инфицирование организма вирусом SARS-CoV-2 приводит к усилению иммунных процессов и нарушению дифференцировки и функционирования клеток, провоцируя развитие аутоиммунных и опухолевых заболеваний ЩЖ.

**ГЛАВА 5. АНАЛИЗ СТРУКТУРЫ ЗАБОЛЕВАЕМОСТИ РАЗЛИЧНОЙ
ХИРУРГИЧЕСКОЙ ПАТОЛОГИЕЙ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ В
РЕСПУБЛИКЕ КРЫМ И ГОРОДЕ СЕВАСТОПОЛЕ В 2019-2024 ГОДАХ С
УЧЕТОМ ДИНАМИКИ ВОЛН ПАНДЕМИИ**

Данные по пациентам, жителям Республики Крым.

В соответствии с представленной таблицей 8, при анализе распределения *исследованных узловых образований* по категориям Bethesda Thyroid Classification в разные периоды, были установлены статистически значимые различия.

Таблица 8. Результаты цитологического исследования материала ТАПБ узловых образований щитовидной железы за период 2019-2024 гг. по Республике Крым

Показатели	Категории цитологических заключений	Группа в зависимости от исследуемого периода пандемии				p
		1 (до)	2 (во время)	3 (после-ранний период)	4 (после-отдаленный)	
категория по системе Bethesda, абс. (%)	Bethesda I	15 (18,8)	25 (12,9)	11 (5,9)	49 (4,9)	$p_{\text{до-после-ранний}} = 0,015$ $p_{\text{до-после-отдаленный}} < 0,001$ $p_{\text{во время-после-отдаленный}} < 0,001$ $p_{\text{после-ранний-после-отдаленный}} = 0,034$
	Bethesda II	58 (72,5)	149 (76,8)	145 (77,5)	759 (75,7)	
	Bethesda III	0 (0,0)	6 (3,1)	12 (6,4)	29 (2,9)	
	Bethesda IV	3 (3,8)	4 (2,1)	8 (4,3)	104 (10,4)	
	Bethesda V	0 (0,0)	3 (1,5)	5 (2,7)	14 (1,4)	
	Bethesda VI	4 (5,0)	7 (3,6)	6 (3,2)	48 (4,8)	

* – различия показателей статистически значимы ($p < 0,05$)

После окончания пандемии наблюдается рост доли узловых образований, требующих оперативного вмешательства (IV-VI категории по классификации Bethesda), как в раннем (до 10,2 %), так и в отдаленном (до 16,6 %) периодах

(рис. 35). При сравнении этих цифр по критерию χ^2 значимость изменений высокая, а вероятность ошибки не более 0,001.

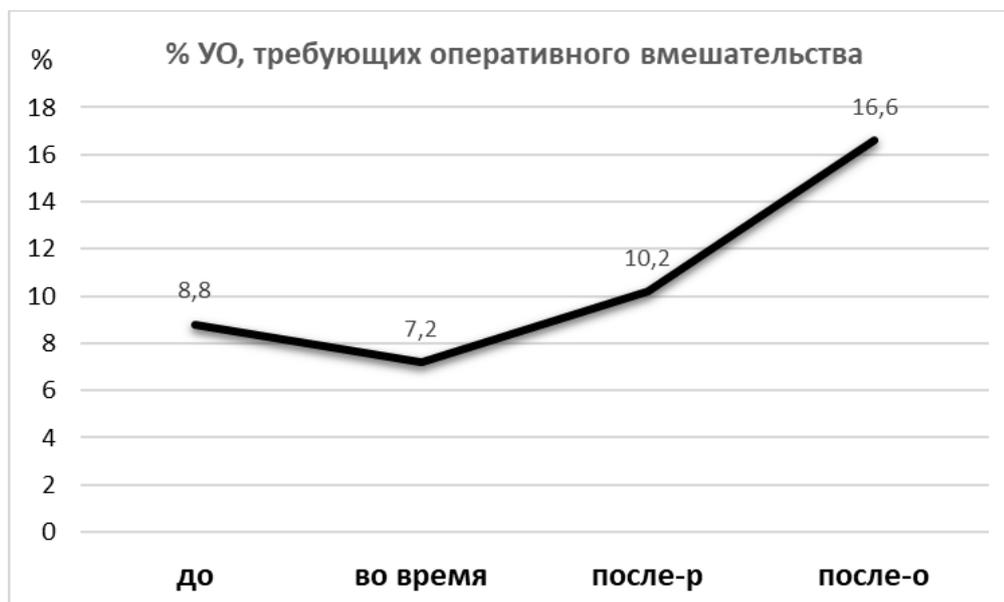


Рисунок 35. Доля узловых образований (в %), требующих оперативного вмешательства согласно результатам цитологических исследований, выполненных в периоды до, во время и после пандемии COVID-19 у населения Республики Крым.

Обозначения: по вертикальной оси – процент узловых образований (УО), требующих операции, от общего количества исследуемых, по горизонтальной оси – периоды пандемии (до, во время разгара, после стихания ранний и после стихания отдаленный периоды).

Стоит отметить и тенденцию к уменьшению доли неинформативного материала (I категория по системе Bethesda) за исследуемый промежуток времени, что, прежде всего, указывает на повышение качества диагностики (усовершенствование техники ТАПБ пунктирующего врача, оптимизация методов окраски препаратов, повышение уровня компетентности цитолога).

В период с 2019 г. по 2024 г. в Многопрофильной клинической больнице Святителя Луки было прооперировано 684 человека с хирургической тиреоидной патологией. Подавляющее большинство пациентов клиники эндокринной

хирургии приходится на пациенток женского пола. Так, число прооперированных женщин в 8-13 раз больше, чем мужчин в разные периоды времени (рис. 36).

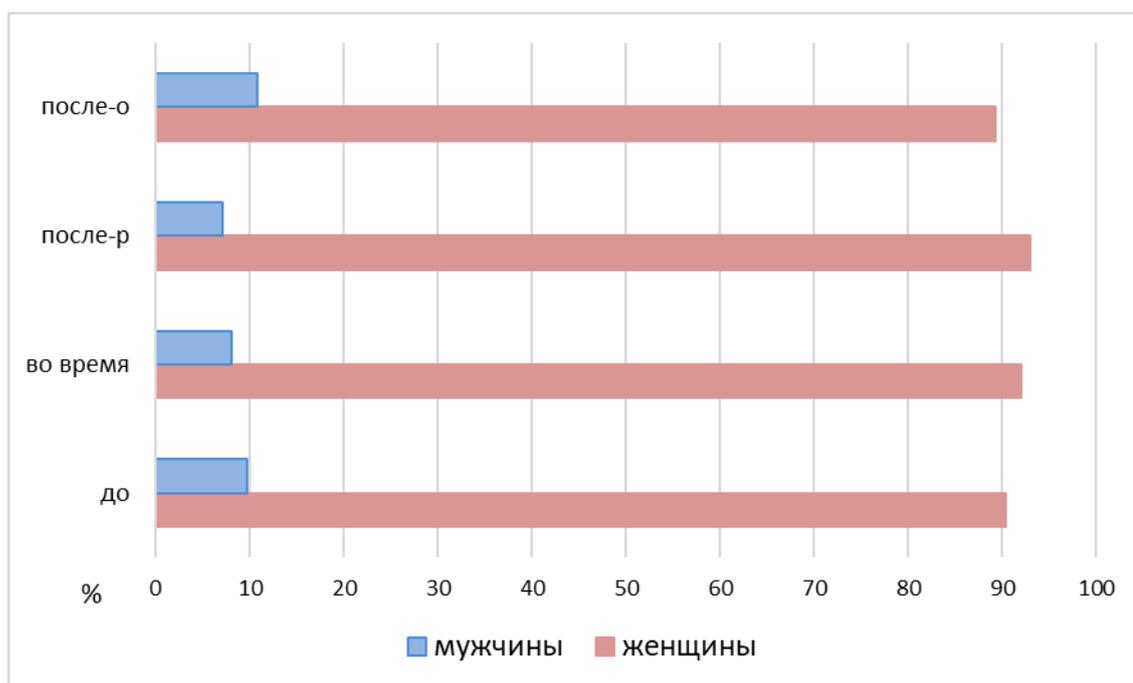


Рисунок 36. Процентная доля пациентов женского и мужского пола среди жителей Республики Крым, подвергшихся хирургическому лечению по поводу заболеваний щитовидной железы за период до, во время и после пандемии COVID-19.

Обозначения: по вертикальной оси – периоды пандемии (до, во время разгара, после стихания ранней и после стихания отдаленный периоды), по горизонтальной оси – процент прооперированных мужчин и женщин от общего количества прооперированных пациентов.

Средний возраст пациенток-женщин составляет 50 лет, пациентов-мужчин – 46 лет. Такие данные свидетельствуют о влиянии гендерных факторов на развитие хирургической тиреоидной патологии, среди которых основное значение, по-видимому, имеют женские репродуктивные циклы. По нашим данным, основная масса заболеваний ЩЖ у женщин приходится именно на возраст, когда наблюдается резкий гормональный дисбаланс с последующим угасанием репродуктивной функции (климакс).

В результате сопоставления соотношения злокачественной и доброкачественной патологии ЩЖ в зависимости от исследуемого периода, были выявлены статистически значимые различия. Обращает на себя внимание рост доли рака в структуре тиреоидной патологии в ранний и отдаленный периоды после окончания пандемии на 9,8 % ($p=0,028$) и 11,5 % ($p=0,017$), соответственно, по сравнению с группой 2 (во время пандемии) (табл. 9). Также, после окончания пандемии процентная доля злокачественных поражений ЩЖ среди всех пациентов, хоть и незначительно, но выросла на 2,1 % в раннем периоде и на 3,8 % в отдаленном, по сравнению с периодом до начала пандемии.

Таблица 9. Данные о пациентах, которым было проведено хирургическое вмешательство в объеме геми-/тиреоидэктомий за период 2019-2024 гг. по Республике Крым

Группа	Число операций (n)	Средний возраст \pm sd			% рака среди всех нозологий		
		все пациенты	мужчины	женщины	все пациенты	мужчины	женщины
1 (до)	93	51,9 \pm 14,4	48,6 \pm 17,1	52,2 \pm 13,9	38,7	55,6	36,9
2 (во время)	252	51,8 \pm 14,0	52,4 \pm 11,8	51,6 \pm 14,1	31,0	25,0*	30,6
3 (после-ранний)	71	51,2 \pm 10,6	41,4 \pm 5,4	51,8 \pm 10,7	40,8**	20,0*	42,4**
4 (после-отдаленный)	268	51,8 \pm 13,9	44,4 \pm 14,5	45,6 \pm 13,5	42,5**	42,8** #	42,2**

Примечание: * - значимо по отношению к группе 1, ** - к группе 2, # - к группе 3; $p < 0,05$.

Таким образом, наблюдается медленный, но необратимый рост доли злокачественных узловых образований в постпандемический период, что вполне может быть связано с негативным влиянием перенесенной вирусной инфекции на ЩЖ. Что касается гендерных особенностей, то описанная динамика отражает изменения, характерные больше для женского пола, у мужчин же в период пандемии и в ранний период после ее окончания доля рака ниже, чем до пандемии

и в отдаленном периоде после. Это позволяет сделать вывод о том, что в период с 2020 г. по 2022 г. у представителей мужского пола возросло число конкурирующих заболеваний щитовидной железы, что снизило удельный вес злокачественных поражений.

Мы также провели анализ распределения хирургических заболеваний ЩЖ по основным нозологиям за анализируемый период времени и установили статистически значимые различия ($p=0,017$) (используемый метод: Хи-квадрат Пирсона; V Крамера = 0,15), результаты представлены в таблице 10.

Наибольшие различия отмечены для папиллярного рака, токсического зоба и В-клеточной аденомы (рис. 37).

Основной тенденцией в распределении нозологических форм тиреоидной патологии в анализируемом периоде является рост доли папиллярного рака (классический подтип) к 2023-2024 гг. Так, после пандемии процент папиллярного рака среди всей хирургической патологии ЩЖ составляет 34,2 % в раннем, и 31,0 % - в позднем периоде, что, соответственно, на 9,5 % ($p=0,01$) и 6,7 % выше, чем до ее начала, и на 10,6 % ($p=0,005$) и 9,6 % ($p=0,01$) выше, чем во время пандемии. Интересным фактом является увеличение оперативных вмешательств по поводу токсического зоба в разгар пандемии более, чем в 2 раза ($p\leq 0,001$), однако после ее окончания доля токсического зоба в структуре хирургической тиреоидной патологии вернулась практически к исходным значениям (как до пандемии). Также отмечен рост частоты встречаемости В-клеточных (онкоцитарных) аденом в раннем периоде после пандемии COVID-19 ($p\leq 0,001$), однако в отдаленном периоде наблюдается снижение этого показателя на 3,0 %. Проанализировав эти данные с учетом гендерного фактора, мы отметили, что они отражают картину, наиболее характерную для женского пола, у мужчин же, помимо описанной общей тенденции, наблюдается рост частоты встречаемости фолликулярных аденом.

Важно отметить, что на столбчатых диаграммах данного подраздела при анализе характеристик карцином из статистической обработки исключены (и не отражены на диаграммах) редкие подтипы по причине слишком малой выборки

(1-4 случая) и отсутствия наглядности их отображения. А в таблицах приведён полный перечень подтипов, в связи с этим процентные данные несколько отличаются.

Таблица 10. Частота основных нозологических форм заболеваний щитовидной железы в период 2019-2024 гг. по Республике Крым

Показатель	Диагноз	Группа				p
		1 (до)	2 (во время)	3 (после-ранний)	4(после-отдаленный)	
Распределение по нозологическим формам, абс. (%)	НЗ	19 (20,4)	36 (14,3)	11 (15,1)	34 (12,7)	0,017* p ₁₋₄ = 0,010
	АИТ	5 (5,4)	18 (7,1)	4 (5,5)	9 (3,4)	
	ТЗ	10 (10,8)	67 (26,6)*	9 (12,3)**	37 (13,8)**	
	ТА	2 (2,2)	7 (2,8)	0 (0,0)	3 (1,1)	
	ФА	16 (17,2)	40 (15,9)	14 (19,2)	57 (21,3)	
	В-кл А	5 (5,4)	6 (2,4)	6 (8,2)**	14 (5,2)	
	ПР	23 (24,7)	54 (21,4)	25 (34,2)* **	83 (31,0) **	
	ПРФ	8 (8,6)	15 (6,0)	3 (4,1)	17 (6,3)	
	ПРВ-кл	2 (2,2)	3 (1,2)	0 (0,0)	4 (1,5)	
	МР	3 (3,2)	6 (2,4)	1 (1,4)	10 (3,7)	

Примечания: НЗ – нетоксический зоб (коллоидный, аденоматозный, многоузловой), АИТ – аутоиммунный тиреоидит, ТЗ – токсический зоб, ТА – токсическая аденома, ФА – фолликулярная аденома, В-кл А – В-клеточная аденома (онкоцитарная), ПР – папиллярный рак классический подтип, ПРФ – папиллярный рак, фолликулярный подтип, ПРВ - В-клеточный (онкоцитарный) подтип папиллярного рака, ПРt – tall cell подтип папиллярного рака, ПРМ – метастаз папиллярного рака, МР - медулярный рак.

* – различия показателей статистически значимы по сравнению с 1 группой;

** - со второй группой ($p < 0,05$)

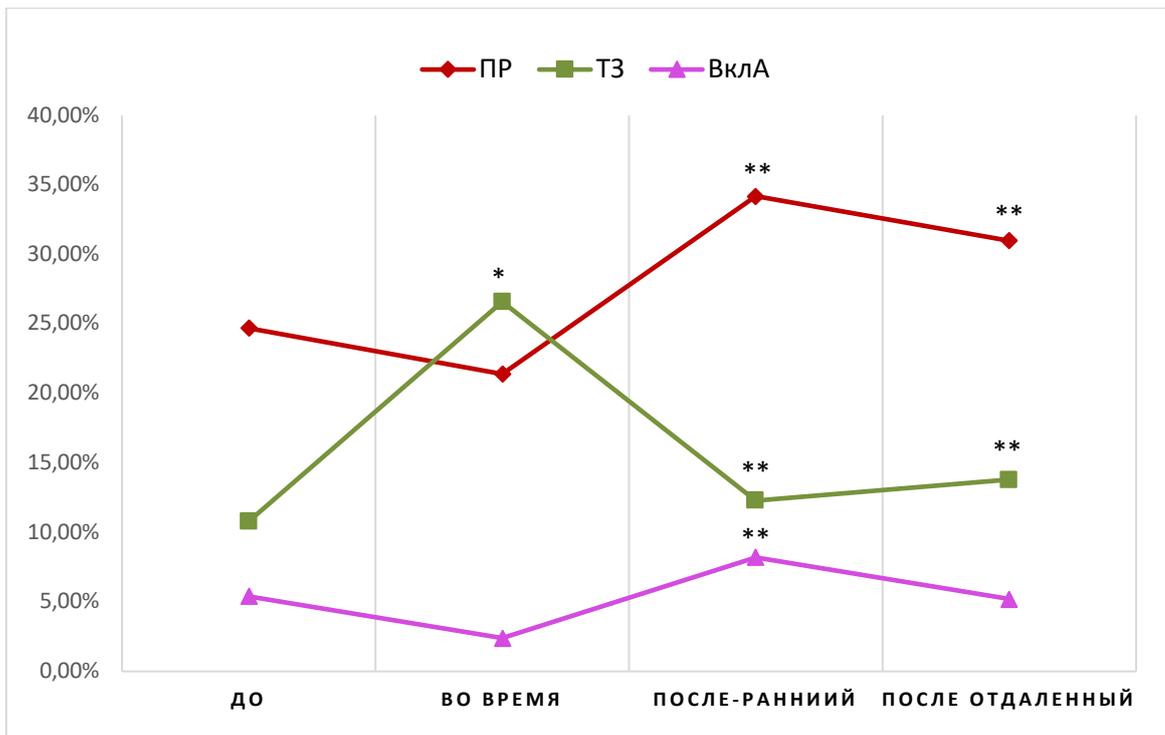


Рисунок 37. Колебания частоты встречаемости некоторых нозологий в структуре хирургической патологии щитовидной железы в периоды до, во время и после пандемии Covid-19. ПР-папиллярный рак; ТЗ- токсический зоб; ВкЛА – В-клеточная (онкоцитарная) аденома.

* - значимо по отношению к группе 1, ** - к группе 2, $p < 0,05$.

На наш взгляд, немаловажными показателями, требующими оценки, являются характеристики самих злокачественных новообразований ЩЖ, которые отражены в таблице 11.

Такие характеристики злокачественных опухолей, как метастазирование, наличие капсулярной и ангиовенозной инвазии, микрокарцинома, показали статистически значимые различия в разные периоды.

Так, по сравнению с периодом до начала пандемии, где микрокарциномы составляли 13,9 % среди злокачественных узлов, их частота возросла на 24,6 % ($p=0,034$) в разгар пандемии и на 13,9 % ($p=0,027$) в отдаленном периоде после окончания пандемии (рис. 38).

Таблица 11. Результаты гистологических заключений злокачественных новообразований щитовидной железы в 2023-2024 гг. по Республике Крым

Группа	Средний размер узла (см) ± sd	Данные микроскопического исследования среди всех форм рака, %						
		микро-карцинома	tall-cell высокие клетки	капсулярная инвазия	прорастание капсулы	мультицентрический рост	метастазы в лимфатически узлы	ангиоинвазия
1 (до)	1,2 ± 0,6	13,9	8,3	16,7	19,4	25,0	25,0	16,7
2 (во время)	1,0 ± 0,8	38,5*	5,3	3,9*	11,8	11,8	15,8*	10,5*
3 (после-ранний)	1,4 ± 0,8	31,0	0,0	10,3**	6,9*	13,8	31,0**	3,4*
4 (после-отдаленный)	1,09 ± 0,8	39,5*	5,3	26,3**#	9,6	25,4	32,4**	2,6**

Примечание: * - значимо по отношению к группе 1, ** - к группе 2, # - к группе 3 при $p < 0,05$.

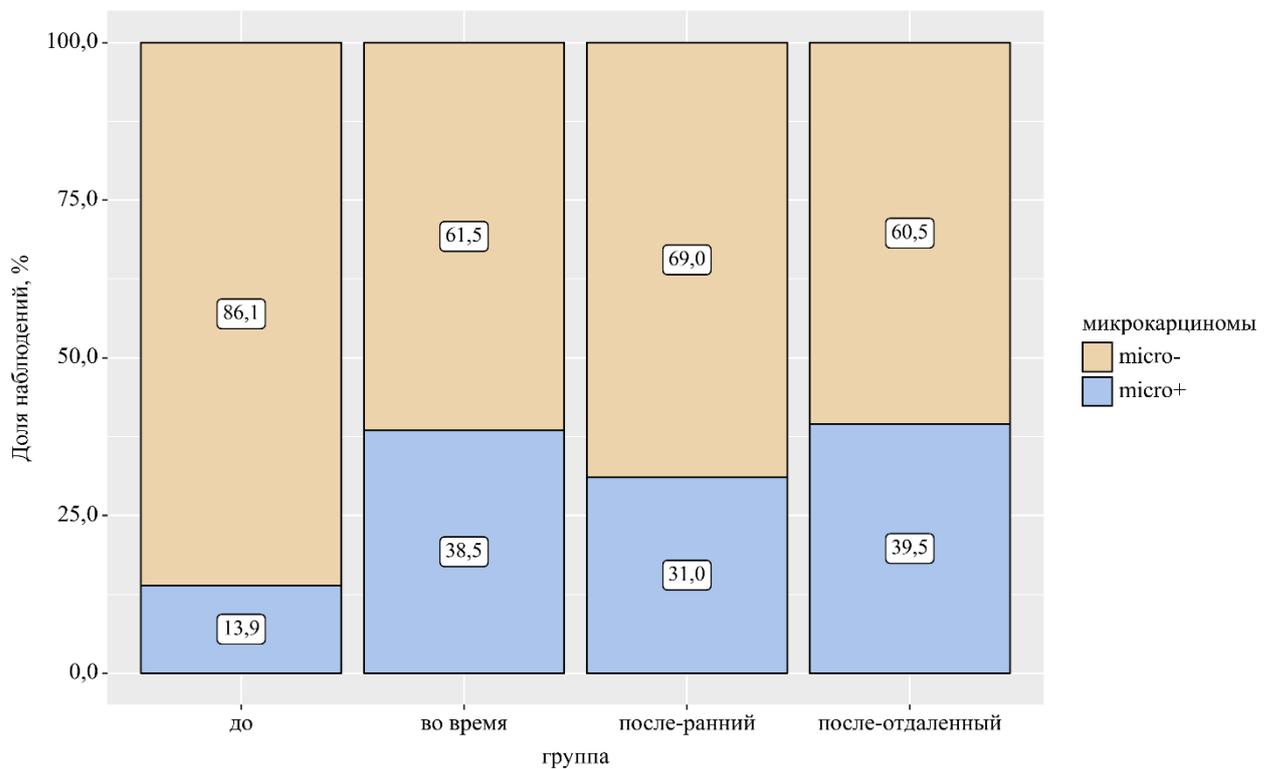


Рисунок 38. Доля микрокарцином в структуре рака щитовидной железы в период до, во время и после пандемии COVID-19.

Периоды роста доли микрокарцином сопровождаются одновременным уменьшением среднего размера узловых образований у пациентов, однако в ранний постпандемический период отмечена противоположная тенденция – некоторое снижение доли микрокарцином с сопутствующим увеличением среднего размера узла (рис. 27). Мы полагаем, что это связано с двумя факторами: 1) откладыванием визита к эндокринологу во время пандемии пациентами; 2) актуализацией скрининговых мероприятий по оценке постковидных осложнений сразу после завершения разгара пандемии.

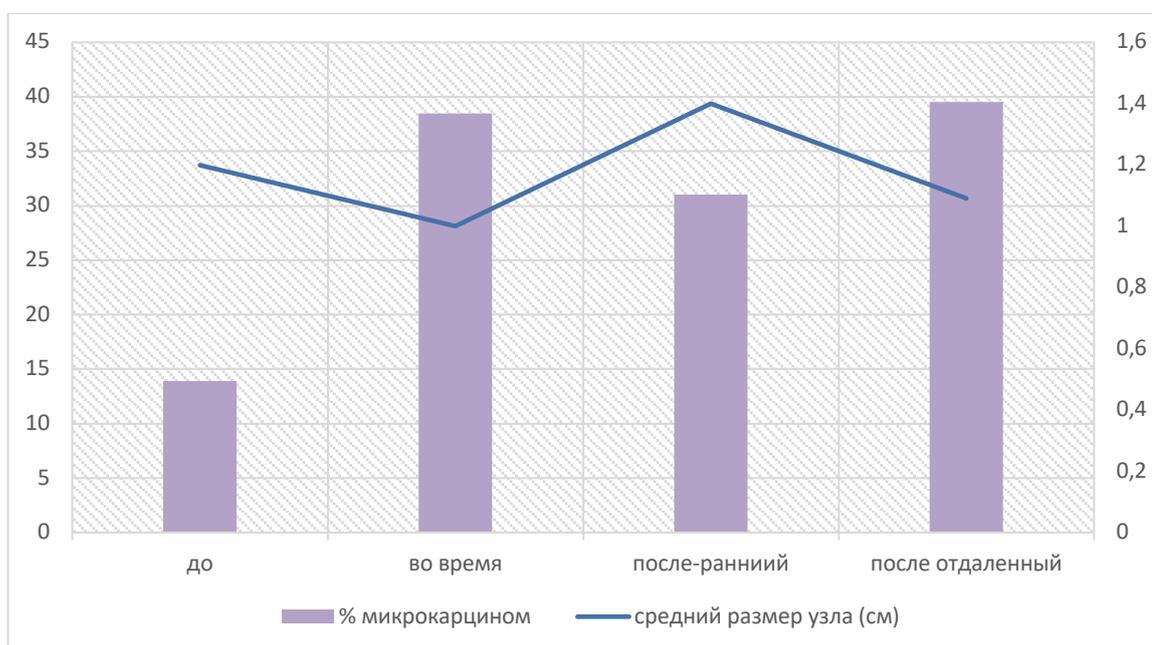


Рисунок 39. Динамика доли микрокарцином и среднего размера узловых образований щитовидной железы в период до, во время и после пандемии COVID-19.

Частота метастазирования рака ЩЖ в регионарные лимфатические узлы спустя некоторое время после окончания COVID-19 заметно возросла с 15,4 % во время пандемии до 31,0 % в раннем ($p=0,006$) и до 38,6 % ($p=0,003$) в отдаленном периоде после пандемии (рис. 40).

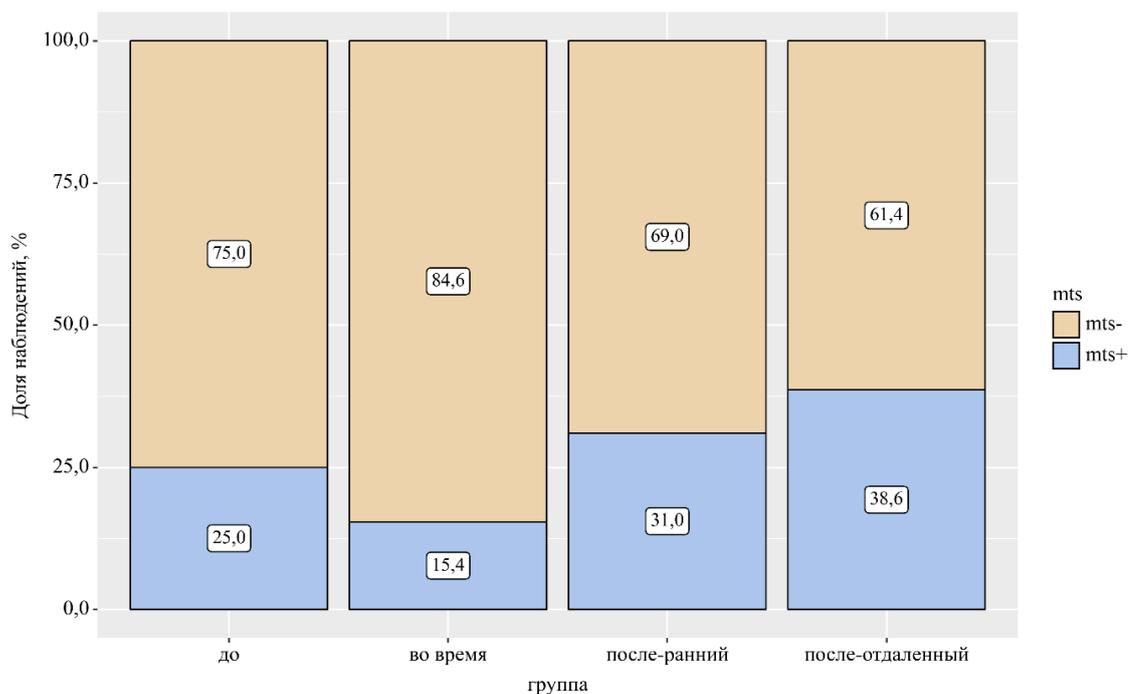


Рисунок 40. Частота метастазирования рака щитовидной железы в лимфатические узлы в период до, во время и после пандемии COVID-19 по Республике Крым. Наличие метастазов (mts+); отсутствие метастазов (mts-).

Аналогичные изменения коснулись и такой характеристики злокачественного поражения, как инвазия в капсулу железы: после окончания пандемии доля инвазивного рака постепенно растет и демонстрирует достоверные различия в отдаленном периоде ($p < 0,001$) (рис. 41).

Таким образом, как капсулярная инвазия, так и метастазирование рака ЩЖ, являясь признаками более запущенных случаев, также могут быть связаны с поздним обращением пациентов и отложенным плановым хирургическим вмешательством в связи с периодом «коронавирусной настороженности».

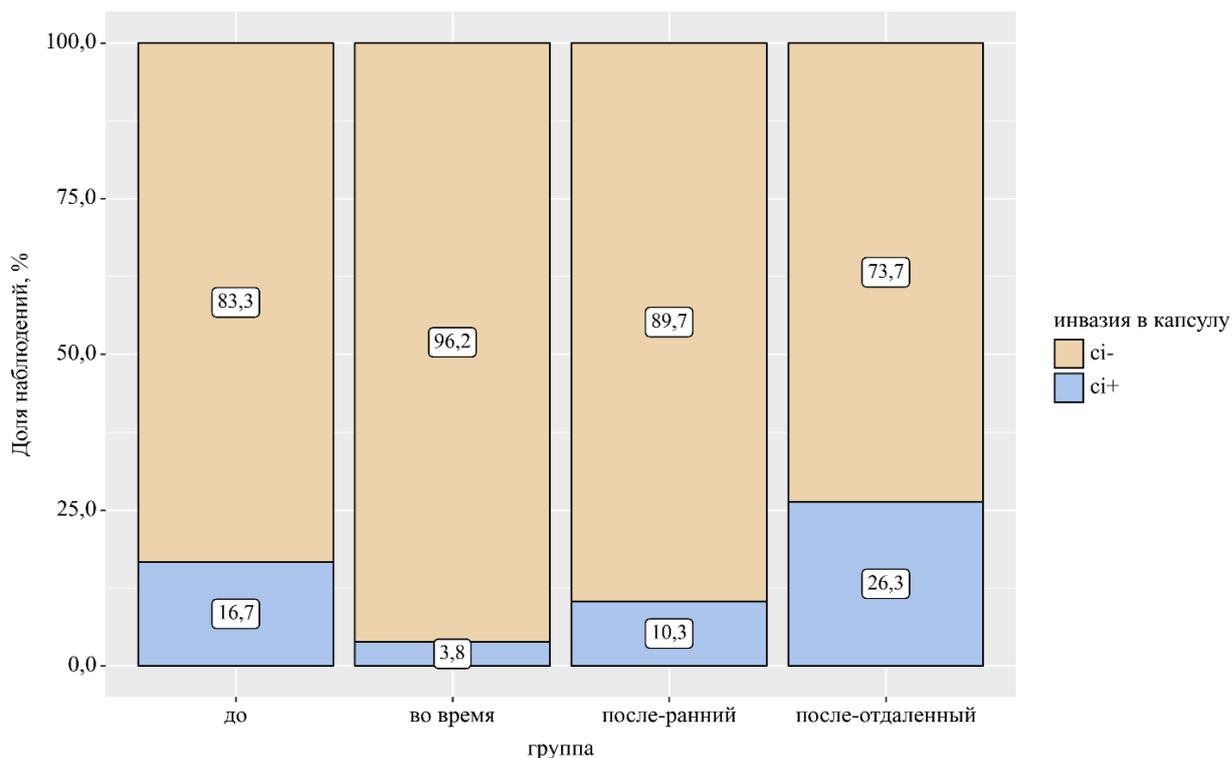


Рисунок 41. Динамика показателей капсулярной инвазии рака щитовидной железы в период до, во время и после пандемии COVID-19 по Республике Крым. Наличие капсулярной инвазии (сi+); отсутствие капсулярной инвазии (сi-).

Что касается ангиоинвазии, этот показатель, напротив, имеет тенденцию постепенного снижения по направлению «до – во время – после» пандемии ($p = 0,016$) (рис. 42). С одной стороны, для папиллярного рака ЩЖ ангиоинвазия менее характерна, чем лимфогенное метастазирование, с другой – связана с более агрессивным течением и худшим прогнозом [118]. Снижение доли ангиоинвазии, наряду с низкими значениями ещё одного критерия агрессивности папиллярного рака – доли высококлеточного (tall-cell) компонента свидетельствует о том, что в период после пандемии не наблюдается повышение агрессивных форм папиллярной карциномы.

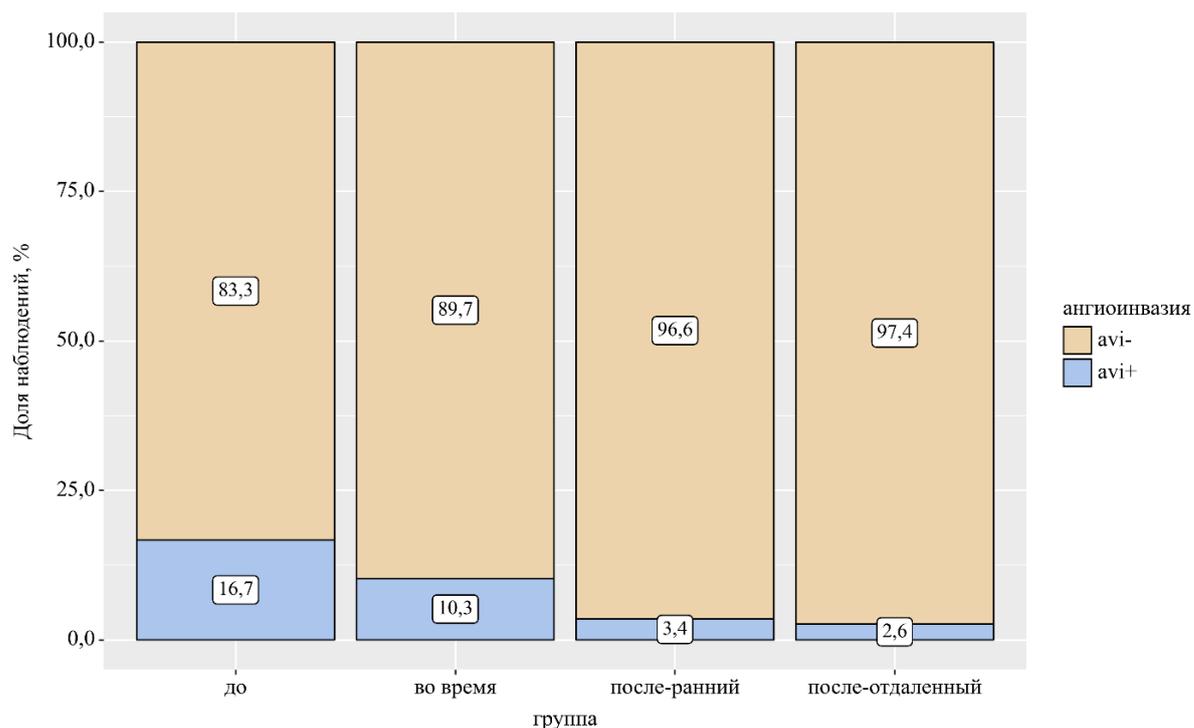


Рисунок 42. Динамика показателя ангиовенозной инвазии (avi) РЩЖ в период до, во время и после пандемии COVID-19 по Республике Крым. Наличие ангиовенозной инвазии (avi+); отсутствие ангиовенозной инвазии (avi-).

Данные по пациентам, жителям города Севастополя.

По г. Севастополю анализ структуры хирургической патологии ЩЖ проводился отдельно, в связи с несколько иными подходами, как в цитологической оценке узловых образований, так и в гистопатологическом описании операционного материала.

Поскольку по г. Севастополю для статистической обработки были доступны цитологические заключения узловых образований ЩЖ только прооперированных пациентов, здесь мы приводим данные по заключениям (Bethesda) лишь для указанной выборки (табл. 12).

Согласно полученным результатам, в структуре цитопатологии за анализируемые периоды времени обнаружены статистически значимые различия ($p = 0,008$) (используемый метод: Хи-квадрат Пирсона). Обращает на себя внимание перераспределение процентного соотношения группы фолликулярных

неоплазий (ФН/подозрение на ФН) – Bethesda IV, а также группы папиллярного рака (ПР/подозрение на ПР) – Bethesda V-VI (рис. 31).

Таблица 12. Результаты цитологического исследования материала ТАПБ узловых образований щитовидной железы пациентов, прооперированных в период 2019-2024 гг. в г. Севастополю

Показатель	Категории	Группа				p
		до	во время	после-ранний	после-отдаленный	
категория по системе Bethesda, абс.(%)	Bethesda I	0 (0,0)	1 (0,5)	1 (1,7)	0 (0,0)	0,008*
	Bethesda II	18 (23,1)	77 (36,5)	18 (31,0)	44 (34,1)	
	Bethesda III	3 (3,8)	20 (9,5)	3 (5,2)	16 (12,4)	
	Bethesda IV	22 (28,2)	44 (20,9)	20 (34,5)	22 (17,1)	
	Bethesda V	14 (17,9)	20 (9,5)	3 (5,2)	6 (4,7)	
	Bethesda VI	21 (26,9)	49 (23,2)	13 (22,4)	41 (31,8)	

* – различия показателей статистически значимы ($p < 0,05$)

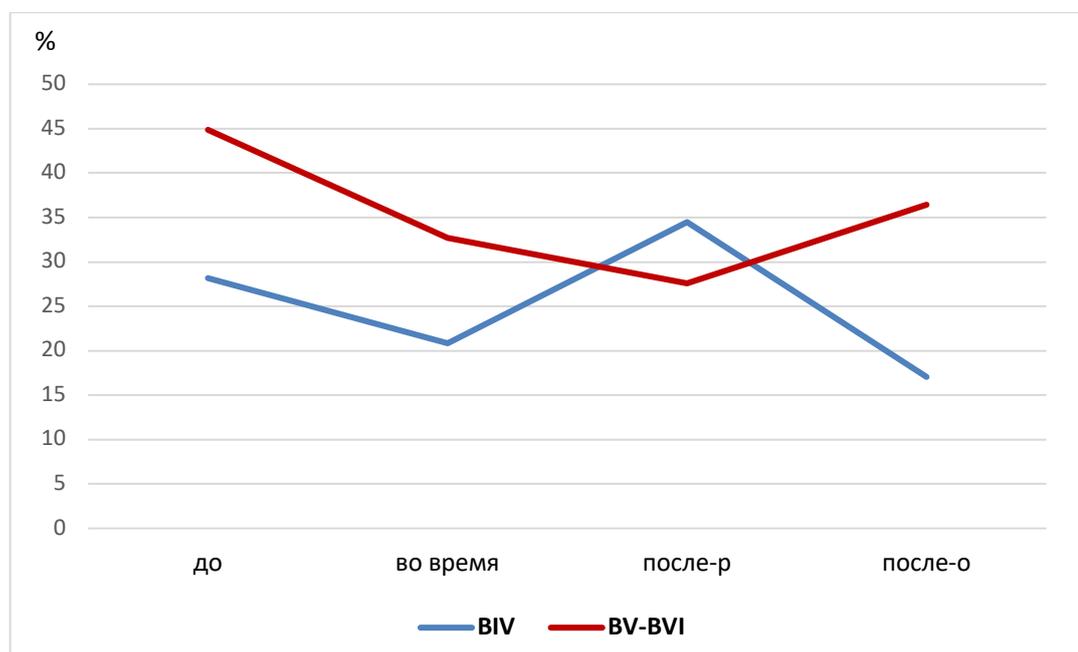


Рисунок 43. Доли узловых образований, оцененных как Bethesda IV (B IV) (подозрение на фолликулярную неоплазию/фолликулярная неоплазия) и Bethesda V-VI (BV-VI) (подозрение на папиллярный рак/ папиллярный рак) в периоды до, во время и после пандемии COVID-19 по г. Севастополю. После-р – ранний; после-о – отдаленный.

По графику на рисунке 9 видно, что во время пандемии доля фолликулярных неоплазий снизилась более чем на 7 %, обратимо возросла на 13,6 % в раннем периоде после пандемии и далее произошел резкий спад уже в отдаленном периоде, где фолликулярная неоплазия составила всего 17 % по сравнению с 28 % до пандемии. В основном такая тенденция связана с колебаниями доли цитологически выявленных карцином (прежде всего папиллярного рака): в разные периоды отмечается перераспределение соотношения фолликулярных неоплазий и папиллярного рака с «перекрестом» в раннем периоде после пандемии. Снижение процента неопластической патологии (как доброкачественной, так и злокачественной) по результатам исследований ТАПБ в разгар пандемии, наиболее вероятно связан с существовавшими на то время ограничениями и «ослаблением» диагностики, однако рост доли фолликулярных неоплазий в раннем периоде после пандемии может означать, что коронавирусная инфекция могла оказать влияние на развитие и рост фолликулярных опухолей в довольно короткий срок.

В период с 2019 г. по 2024 г. в ГБУЗС «Городская больница №1 им. Н.И. Пирогова», было прооперировано 354 пациента с хирургической тиреоидной патологией, 309 из них – пациентки женского пола. Средний возраст мужчин составляет 55 лет, женщин – 53 года. Процент рака в проанализированных группах имеет статистически значимые различия, данные приведены в таблице 13.

В разгар пандемии процент злокачественной патологии ЩЖ снизился с 48,4 % до 28,8 % ($p=0,029$), а в ранний и отдаленный периоды после ее окончания доля рака среди прооперированных случаев заметно возросла на 9,8 % и 33,5 % ($<0,001$), соответственно. Также, отдаленный период характеризуется большей частотой злокачественных новообразований по сравнению с ранним ($p=0,041$). В целом, данные общей выборки справедливы как для женского, так мужского пола, однако среди пациентов-мужчин наблюдается некоторый подъем доли рака в раннем периоде. Таким образом, гендерный фактор (преимущественно пациентки-женщины) и рост доли рака в хирургической патологии ЩЖ после

пандемии у населения г. Севастополя сопоставимы с аналогичной тенденцией по Республике Крым.

Таблица 13. Данные о пациентах, которым было проведено хирургическое вмешательство в объеме геми-/тиреоидэктомий за период 2019-2024 гг. по г. Севастополю

Группа	Число операций (n)	Средний возраст \pm sd			% рака среди всех нозологий		
		все пациенты	мужчины	женщины	все пациенты	мужчины	женщины
1 (до)	62	48,3 \pm 14,5	48,6 \pm 15,7	52,2 \pm 14,6	48,4	42,8	49,0
2 (во время)	163	56,5 \pm 12,5	57,7 \pm 13,8	56,4 \pm 12,4	28,8*	29,4*	28,7*
3 (после-ранний)	44	53,2 \pm 14,6	58,5 \pm 11,8	52,7 \pm 14,9	38,6	57,1	35,1
4 (после-отдаленный)	85	54,2 \pm 15,8	57,2 \pm 13,1	53,6 \pm 16,3	62,3**#	71,4**#	60,5**#

Примечание: * - значимо по отношению к группе 1, ** - к группе 2, #- к группе 3; $p < 0,05$.

Что касается более подробной структуры хирургической тиреоидной патологии, то перераспределение по нозологиям у населения г. Севастополя (табл. 14) имеет, в основном, общие тенденции с проанализированными данными по Республике Крым.

Как и по Республике Крым, отмечен рост случаев токсического зоба ($p=0,001$) в период пандемии и последующий спад после ее окончания, что является интересной находкой. Мы полагаем, что вирусная нагрузка и применяемая терапия могли оказать дестабилизирующий эффект на гормональный статус ЩЖ, особенно у пациентов с уже имеющейся гиперфункцией. Частота папиллярного рака среди прооперированных пациентов также имеет аналогичные колебания в пределах исследуемых групп: наблюдается рост доли классического подтипа папиллярного рака в постпандемический

период, как в ранний – на 10,6 %, так и в отдаленный – на 31,8 % ($p < 0,001$). Если сравнивать долю классической формы папиллярного рака до и после, то в отдаленном периоде после пандемии она выросла до 57,6 % ($p = 0,030$), при этом частота до составляла 29,0 %. Фолликулярный подтип папиллярного рака, напротив, в период пандемии характеризуется более редкой частотой встречаемости – на 14,6 % меньше, чем до ее начала ($p < 0,001$). Основные изменения в структуре нозологий в исследуемом периоде показаны на рисунке 44.

Таблица 14. Частота основных нозологических форм заболеваний щитовидной железы в период 2019-2024 гг. по г. Севастополю

Показатель	Диагноз	группа				p
		1 (до)	2 (во время)	3 (после-ранний)	4 (после-отдаленный)	
Распределение по нозологическим формам, абс.(%)	НЗ	24 (38,7)	68 (41,7)	19(43,2)	24 (28,2)	$< 0,001^*$ $p_{\text{до-во время}} = 0,001$ $p_{\text{до-после-отдаленный}} = 0,030$
	АИТ	1 (1,6)	2 (1,2)	0 (0,0)	0 (0,0)	
	ТА	2 (3,2)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	
	ТЗ	1 (1,6)	19 (11,7)*	2 (4,5)	4 (4,7)	
	ФА	3 (4,8)	22 (13,5)	5 (11,4)	4 (4,7)	
	ВкЛА	1 (1,6)	5 (3,1)	1 (2,3)	0 (0,0)	
	ПР	18 (29,0)	42 (25,8)	16 (36,4)	49 (57,6)***#	
	ПРФ	11 (17,7)	5 (3,1)*	1 (2,3)	4 (4,7)	
	ПРВкл	1 (1,6)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	

Примечания: НЗ – нетоксический зоб (коллоидный, аденоматозный, многоузловой), АИТ – аутоиммунный тиреоидит, ТЗ – токсический зоб, ТА – токсическая аденома, ФА – фолликулярная аденома, В-кл А – В-клеточная аденома (онкоцитарная), ПР – папиллярный рак классический подтип, ПРФ – папиллярный рак, фолликулярный подтип, ПРВ – В-клеточный (онкоцитарный) подтип папиллярного рака, ПРt – tall cell подтип папиллярного рака, ПРМ – метастаз папиллярного рака, МР – медуллярный рак.

.* – различия показателей статистически значимы по сравнению с первой группой; ** - со второй группой, # - с третьей группой ($p < 0,05$)

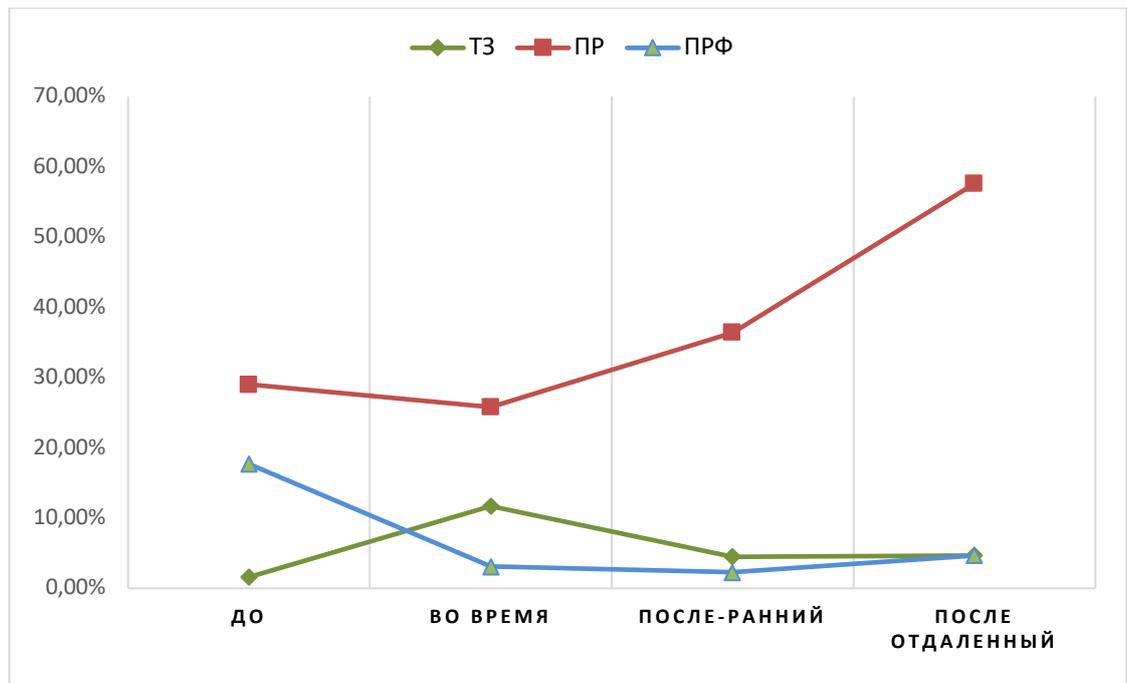


Рисунок 44. Колебания частоты встречаемости некоторых нозологий в структуре хирургической патологии щитовидной железы в периоды до, во время и после пандемии COVID-19 по г. Севастополю. ПР-папиллярный рак; ТЗ-токсический зоб; ПРФ – фолликулярный подтип папиллярного рака.

* - значимо по отношению к группе 1 (до), ** - к группе 2 (во время), # - к группе 3 (после-ранний) ($p < 0,05$).

При анализе характеристик карцином, были выявлены статистически значимые различия, результаты приведены в таблице 15.

В отличие от данных, полученных по Республике Крым, для г. Севастополя достоверные изменения за анализируемый период наблюдаются только по двум характеристикам злокачественных новообразований ЩЖ – микрокарциномам и мультицентрическому типу роста.

Отмечен обратимый рост доли микрокарцином среди злокачественных опухолей ЩЖ во время пандемии на 35,0% ($p=0,011$), после завершения этого периода частота микрокарцином снизилась на 44,1% ($p=0,009$) и на 40,5% ($p<0,001$) в раннем и позднем периодах, соответственно (рис. 45).

Таблица 15. Результаты гистологии злокачественных новообразований щитовидной железы в период 2023-2024 гг. по г. Севастополю

Группа	Средний размер узла (см) $\pm sd$	Данные микроскопического исследования среди всех форм рака, %						
		микрокарцинома	tall-cell высокие клетки	капсулярная инвазия	прорастание капсулы	мультицентрический рост	метастазы в лимфатические узлы	ангиоинвазия
1 (до)	1,8 \pm 0,9	26,7	0	10,0	10,0	0	20,0	0
2 (во время)	1,5 \pm 1,2	61,7*	4,3	8,5	2,1	31,9*	40,4	0
3 (после-ранний)	2,1 \pm 1,2	17,6**	0	0	0	0**	23,5	0
4 (после-отдаленный)	1,5 \pm 0,8	21,2**	0	1,2	1,2	1,2**	20,0	0

Примечание: * - значимо по отношению к группе 1, ** - к группе 2, # - к группе 3 при $p < 0,05$.

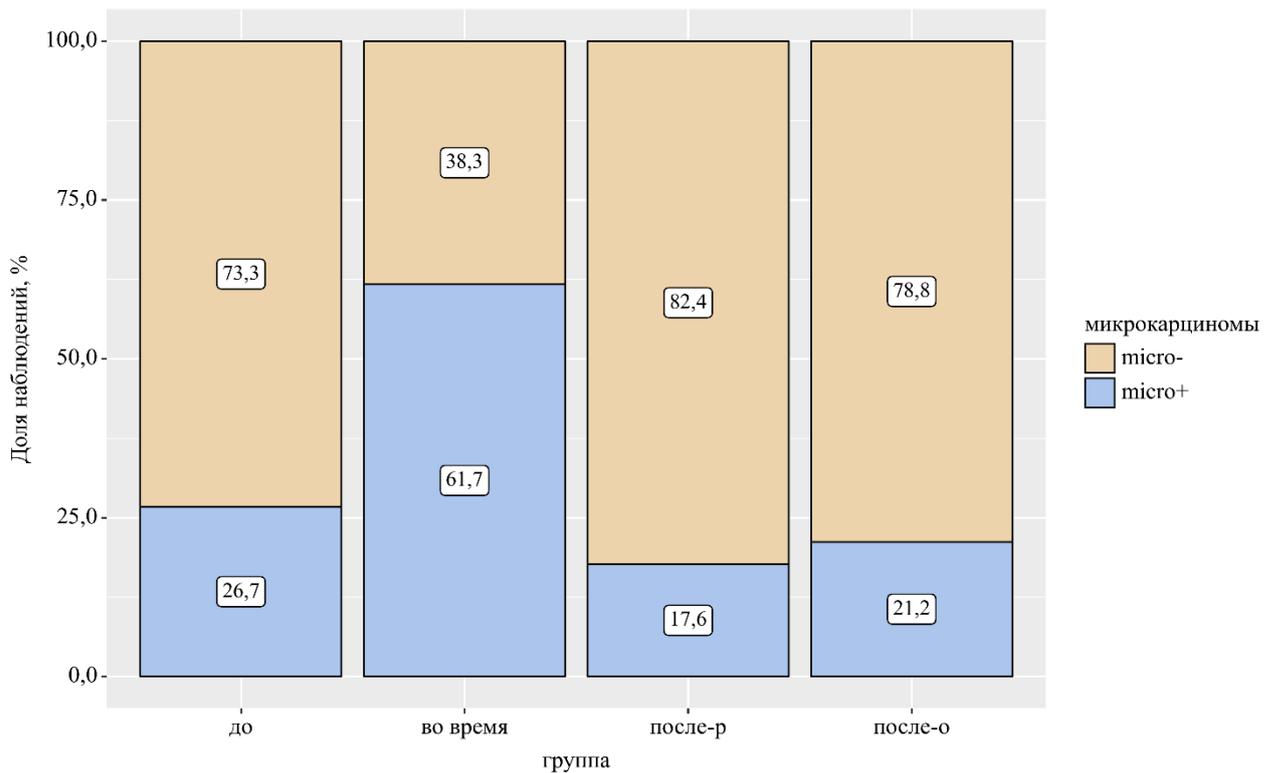


Рисунок 45. Доля микрокарцином в структуре рака щитовидной железы в период до, во время и после пандемии COVID-19 по г. Севастополю.

До пандемии и после ее окончания среди прооперированных пациентов г. Севастополя случаи мультицентрического роста опухолей не отмечались, однако во время пандемии этот показатель достиг отметки 31,9% ($p=0,003$) (рис. 46).

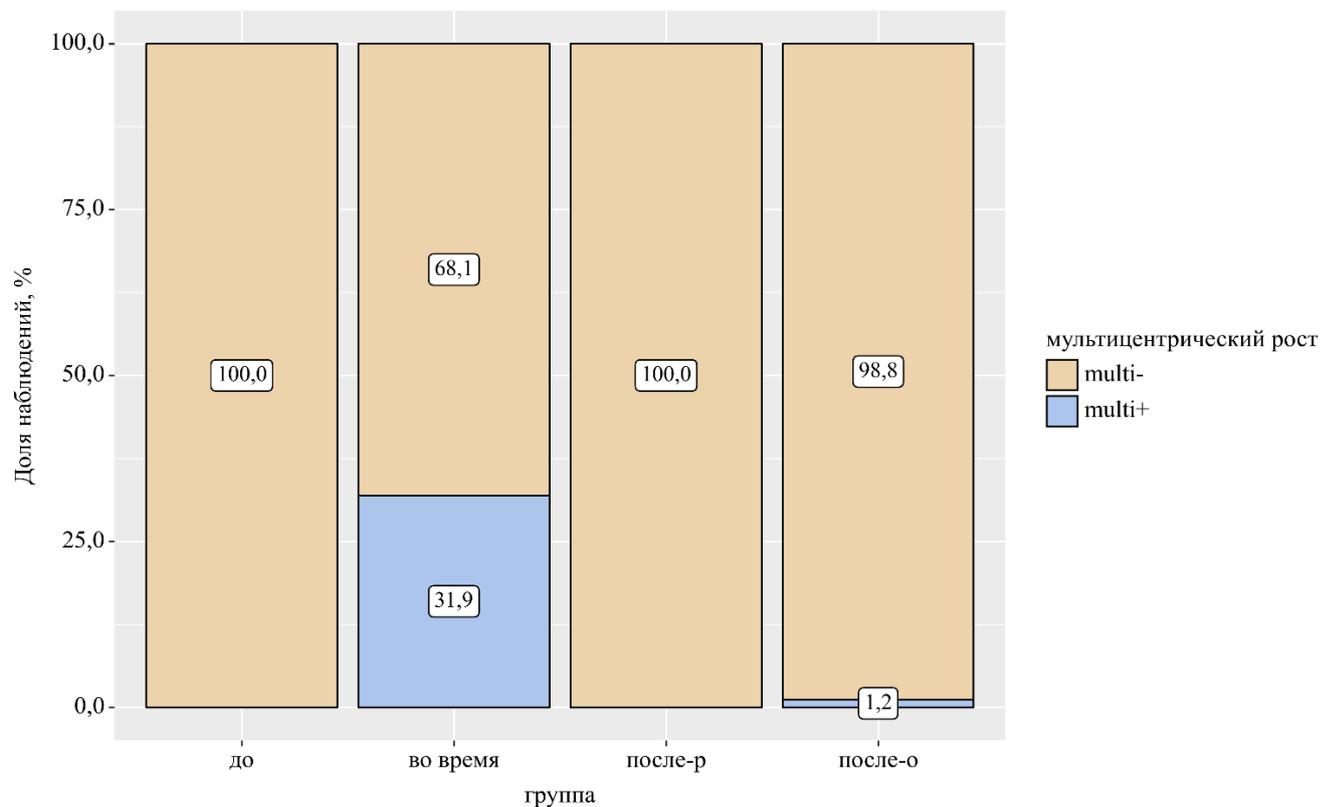


Рисунок 46. Мультицентрический рост в структуре рака щитовидной железы в период до, во время и после пандемии COVID-19 по г. Севастополю.

В целом, отмечено несколько ключевых тенденций, связанных с перераспределением хирургической патологии ЩЖ за исследованный период времени:

1. Процент злокачественных новообразований в структуре тиреоидной патологии заметно вырос после завершения периода пандемии, независимо от исследуемых территориальных групп (Республика Крым и г. Севастополь).

2. Среди всех нозологий папиллярный рак характеризуется наибольшими колебаниями в разных группах, отмечен рост процента классического подтипа

папиллярного рака, как в раннем, так и в отдаленном (более выражено) периодах после пандемии.

3. Период пандемии характеризуется увеличением числа оперативных вмешательств по поводу ТЗ, что справедливо и для Республики Крым, и для г. Севастополя.

4. По Республике Крым отмечен рост частоты метастазирования папиллярного рака в лимфатические узлы (во время пандемии COVID-19 и после), а также капсулярной инвазии (после пандемии, особенно в отдаленном периоде), по г. Севастополю такая тенденция не наблюдается.

5. Во время пандемии у населения г. Севастополя выявлено почти 32 % папиллярного рака с мультицентрическим ростом, при том, что до и после такие случаи зафиксированы не были.

Исходя из проанализированных данных, мы полагаем, что новая коронавирусная инфекция оказала влияние на структуру и характеристику хирургической патологии ЩЖ. Поскольку период пандемии характеризовался не только влиянием вируса на различные органы-мишени, но также агрессивной гормональной терапией, вполне возможно их комплексное влияние на организм. Это может происходить путем запуска различных иммунных и воспалительных процессов, для развития которых требуется некоторый промежуток времени. Поэтому целесообразно анализировать структуру тиреоидной патологии в динамике, для оценки ранних и отдаленных последствий, что и было сделано в данной работе.

Таким образом, проведенный анализ данных за 2019–2024 годы выявил значительные изменения в структуре хирургической патологии щитовидной железы в Республике Крым и городе Севастополе. В постпандемический период отмечен рост доли злокачественных новообразований: в Крыму частота рака ЩЖ увеличилась на 9,8–11,5 % ($p < 0,05$), а в Севастополе — на 9,8–33,5 % ($p < 0,001$). Доминировал папиллярный рак, доля которого в Крыму выросла с 24,7% до 31,0 %, а в Севастополе достигла 57,6 % среди всей патологии ЩЖ, требующей хирургического лечения. В Крыму зафиксировано увеличение метастазирования в

лимфатические узлы (до 38,6 %, $p < 0,05$) и капсулярной инвазии (26,3 %, $p < 0,001$), тогда как в Севастополе во время пандемии участились случаи мультицентрического роста (31,9 %, $p < 0,05$). Рост встречаемости токсического зоба в общей структуре патологии отмечен в пик пандемии (Крым: с 10,8 % до 26,6 %; Севастополь: с 1,6 % до 11,7 %) с последующей нормализацией к 2024 г. Гендерный анализ подтвердил преобладание женщин среди пациентов (85–92 %), особенно в менопаузальном периоде.

Пандемия COVID-19 в исследуемых регионах привела к отсроченной диагностике и росту агрессивных форм рака ЩЖ, что связано с ограничением плановой помощи (однако эта тенденция в Крыму и Севастополе менее выражена, чем в мире) и прямым воздействием вируса на ткань. Рост доли агрессивных форм рака ЩЖ, включая метастазирование и инвазивные подтипы, связан с отсрочкой плановых операций и скрининга в период ограничений, что в свою очередь требует усиления скрининговых программ. Полученные данные указывают на важность адаптации систем здравоохранения к глобальным кризисам, включая ресурсы онкологической помощи, а также алгоритмы ранней диагностики.

ГЛАВА 6. РЕКОМЕНДАЦИИ ОБСЛЕДОВАНИЯ ПАЦИЕНТОВ, ПЕРЕНЕСШИХ НОВУЮ КОРОНАВИРУСНУЮ ИНФЕКЦИЮ, ПРИ ВЫЯВЛЕНИИ ПАТОЛОГИИ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

6.1. Результаты морфологических, молекулярно-биологических, клинических и статистических данных как основа для разработки рекомендаций ведения пациентов с COVID-19 в анамнезе

Как видно, SARS-CoV-2, попадая в организм человека, провоцирует развитие аутоиммунного воспаления ЩЖ, которое обусловлено множеством механизмов, приводящих к гибели тироцитов и нарушению гормонообразования, также он способствует пролиферации и вызывает изменение молекулярно-биологического профиля или иммунофенотипа клеток, что потенциально может привести к развитию онкологической патологии. Клинически аутоиммунные реакции проявляются АИТ, диффузным токсическим зобом (ДТЗ). При других заболеваниях (подострый тиреоидит, аденокарциномы, аденоматозный зоб) воспаление становится вторичным. Это связано с цитокиновым штормом, реакциями в ткани при фиксации антител на рецепторах, продуктах синтеза и ферментах тироцитов вследствие антигенной мимикрии SARS-CoV-2.

В клинической части работы мы исследовали цитологический материал и ЩЖ человека, удаленные во время операции у пациентов с верифицированным АИТ и морфологически подтвержденным тиреоидитом при ДТЗ, токсической аденоме, папиллярном раке, имеющих в анамнезе коронавирусную инфекцию, часто являющуюся причиной дисфункции ЩЖ.

В клинике, как и в эксперименте, использовали набор маркеров для ИГХ с целью выявления воспалительных и онкогенных пролиферативных процессов. Результаты морфологических исследований ЩЖ человека показали выраженную динамику: наличие лимфоидной инфильтрации в ткани, преимущественно за счет Т-хелперов и В-лимфоцитов, обилие макрофагов на фоне усиления митоза и

апоптоза, ангиогенеза и перестройками внеклеточного матрикса. Такие изменения сохраняются на протяжении более 12-18 недель от момента заболевания. Эксперимент позволил систематизировать результаты в динамике реконвалесценции, поскольку в клинике не удается добиться однородности выборки по срокам и преморбидному состоянию ткани железы.

Таким образом, инфицирование SARS-CoV-2 вызывает в ЩЖ продолжительную аутоиммунную воспалительную реакцию, нарушающую ее структуру и функцию. Предыдущие исследования нашей рабочей группы и других авторов, показывающие изменение структуры заболеваемости хирургической патологией ЩЖ до, во время и после пандемии COVID-19, в данном цикле работ подтверждены возможным механизмом онкотрансформации тироцитов и соответствующим изменением их микроокружения.

Развитие терапевтической патологии ЩЖ обусловлено приведенным патогенетическим механизмом и инициирует развитие клиники, требующей иногда хирургического лечения в раннем периоде (0,5-8,0 недель), или усугубляет хронические фоновые процессы, приводя к развитию заболевания спустя 1-2 года после контакта с вирусом.

По нашим наблюдениям (это совпадает и с литературными данными), временной профиль развития заболеваний ЩЖ в связи с COVID-19 следующий:

- 1) гиперфункция ЩЖ чаще возникает в период 3-4 недель после инфицирования и длится 8-10 недель,
- 2) подострый тиреоидит развивается поэтапно: первичная и вторичная аутоиммунизация, возникающая в 1 неделю после инфицирования и на 4 неделе; длится 8-10 недель.

При этом признаки морфологической перестройки ткани и иммунобиологические изменения клеток, выявленные при световой микроскопии и ИГХ методом, сохраняются длительное время.

Процесс заболевания ЩЖ, связанный с аутоиммунитетом, имеет тенденцию возникать раньше у субъектов с ранее существовавшим АИТ.

У хирургов и ранее существовала общая концепция, согласно которой ЗНО развивается на фоне хронического воспаления ЩЖ. Естественно, рак ЩЖ чаще развивается при аутоиммунных заболеваниях, провокатором для которых, прежде всего, выступают вирусные инфекции. Наше исследование показывает, что хирургическая патология ЩЖ изменилась в период пандемии и демонстрируют ее молекулярные и клеточные механизмы.

При анализе риска рецидива на основании калькулятора АТА (American Thyroid Association, калькулятор оценки риска злокачественности узлов щитовидной железы), количество пациентов с низким и средним риском до пандемии соотносится как 3:1, а в период пандемии это соотношение меняется до 6:5 и снижается после завершения пандемии до первоначальных цифр. До и после пандемии преобладают более стабильные формы опухолей, более дифференцированные с низким прогнозом риска.

Если оценить данные удаленных опухолей по классификатору TNM, обращает на себя внимание, что в период пандемии резко сократилось число операций на стадии 3 и 4.

Можно предположить, что это связано с актуализацией вопросов здоровья в пандемию, появлением соматической симптоматики болезни ЩЖ, ее метаболическими и кардиологическими проявлениями, манифестировавшими на фоне заболевания новой коронавирусной инфекцией или стресса, побудившими пациентов обратиться к врачу, где дополнительной своевременной находкой стала опухоль.

Мы полагаем, что ключевое изменение количественных данных заболеваемости разными формами тиреоидной патологии связано с новой коронавирусной инфекцией, ее лечением и осложнениями болезни, а также побочными эффектами терапии; снижением активности клеточного иммунитета, стрессом и затруднением быстрой своевременной госпитализации в эндокринологический хирургический стационар у той категорий пациентов (небольшая группа), где были выявлены опухоли на поздних стадиях.

Таким образом, полученные нами данные (в эксперименте, в клинике и в ретроспективном анализе структуры тиреоидной патологии), легли в основу создания алгоритма профилактики развития тиреоидитов и онконастороженности на фоне перенесенных вирусных инфекций для коррекции терапевтических и хирургических заболеваний ЩЖ.

Суть заключается в следующем: у пациентов с тяжелой формой новой коронавирусной инфекции в анамнезе часто наблюдаются явления дисфункции ЩЖ, тиреоидита, связанного с аутосенсбилизацией, приводящие к повреждению тироцитов. Учитывая данный факт на фоне иммунодепрессивной терапии и общего негативного влияния на организм перенесенного ТОРС, вызванного коронавирусом данного типа, для таких пациентов рекомендована оценка антител к тиреопероксидазе (ТПО), молекуле тиреоглобулина (Тg) и рецептору тиреотропного гормона (ТТГ), оценка субфебрилитета и кардиоваскулярных расстройств с точки зрения вероятной дисфункции ЩЖ, онконастороженность в диагностике узловых образований с предпочтительным оперативным лечением пациентов III категории по Bethesda и динамическим наблюдением 1 раз в 6 месяцев пациентов II категории по Bethesda (рис. 47). Рисунок 47 иллюстрирует алгоритм динамического наблюдения и лабораторных исследований у пациентов, перенесших респираторные вирусные инфекции, для выявления признаков аутоиммунного воспаления и трансформации клеток.

Даже на предоперационном этапе можно предложить пациентам, у которых развивается патология ЩЖ на фоне COVID-19, при проведении обследования для установления рисков малигнизации, исследование методом ИГХ с иммунофенотипированием клеток биоптата ЩЖ (клеточных блоков), полученных при пропитке парафином материала ТАПБ. Эта методика как вспомогательная позволяет получить аналог тканевого образца до операции и очень оправдана при работе с пунктатом ЩЖ.

Таким образом, алгоритм профилактики заключается в своевременном выявлении пациентов из группы риска развития аутоиммунного тиреоидита,

регулярном их наблюдении по расширенному протоколу с предлагаемыми нами методиками, ранним началом терапии АИТ, онконастороженности.

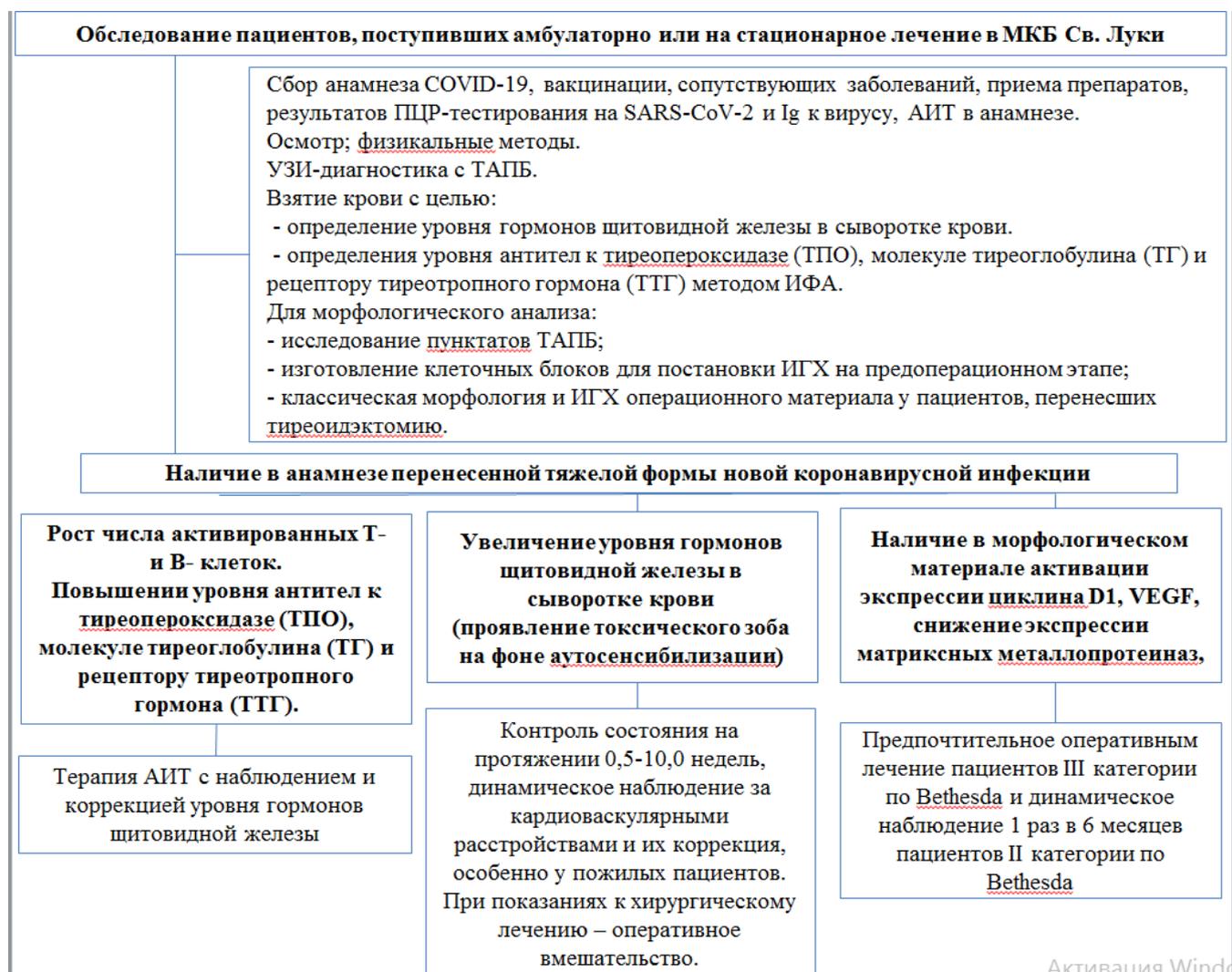


Рисунок 47. Алгоритм динамического наблюдения и лабораторных исследований у пациентов, перенесших респираторные вирусные инфекции, для выявления признаков аутоиммунного воспаления и трансформации клеток

На основании этой концепции мы разработали технологию пробоподготовки образцов и исследования изменений в тканях, которые заключается в выполнении ИГХ исследования на материале ТАПБ или операционном материале, его последующей оценке, а также алгоритм с инструкцией для врача.

6.2. Предложения по обследованию пациентов, перенесших COVID-19, для выявления патологии щитовидной железы, опосредованной влиянием SARS-CoV-2

Алгоритм профилактики развития тиреоидитов и раннего выявления риска развития ЗНО ЩЖ на фоне вирусных инфекционных заболеваний. Данный алгоритм предназначен для врачей эндокринологов, оказывающих помощь пациентам с заболеваниями ЩЖ, для выявления пациентов зоны риска развития аутоиммунного тиреоидита и раннего выявления рака ЩЖ.

Перечень необходимого оборудования, реактивов, препаратов, изделий медицинской техники:

а) аппарат ультразвуковой диагностики (Ультразвуковой диагностический аппарат, работающий в В-режиме, цветовом, импульсно-волновом доплеровском режимах, оснащенный линейным датчиком с частотой сканирования 7,5–10,0 МГц и секторным (векторным) датчиком с частотой сканирования 1,5–2,5 МГц (2 МГц), аппарат для ультразвуковой доплерографии с датчиками 2 и 4 МГц);

б) оборудование для проведения тонкоигольной аспирационной биопсии щитовидной железы;

в) лаборатория, оборудованная для выполнения анализов методами иммуноферментного анализа (Спектрофотометр для определения оптической плотности (ридер), автоматическое устройство для промывания планшетов (вошер), термостат, регулируемый до $(37 \pm 1) \text{ }^\circ\text{C}$);

г) коммерческие тест-системы для определения уровней гормонов щитовидной железы и антител к ТПО, ТГ, ТТГ, иммуноглобулинов класса G и M к SARS-CoV-2;

д) патоморфологическая лаборатория с иммуногистохимическим оборудованием (водяная баня с регулировкой температуры от 37 до 70 °С, гистологический процессор, станция заливки парафиновых блоков, ротационный микротом, аппарат для покраски стекол, иммуногистостейнер, термостат,

регулируемый до (37 ± 1) °C), наличие реактивов для определения Cyclin D1, CD95, VEGF, CD4, CD8, CD68 в ткани.

При поступлении пациентов на амбулаторное или стационарное лечение по поводу заболевания ЩЖ рекомендовано придерживаться следующего алгоритма.

При сборе анамнеза определить наличие следующих факторов:

- перенесенный COVID-19 (давность заболевания, тяжесть течения) либо других тяжелых вирусных инфекций,
- наличие вакцинации,
- результатов ПЦР-тестирования на SARS-CoV-2 и Ig к вирусу,
- наличие АИТ в анамнезе,
- наличие сопутствующих заболеваний,
- приема препаратов.

В случае отсутствия контакта с возбудителем, отсутствием данных об АИТ ведение пациента не отличается от стандартного.

При наличии данных о перенесенном SARS-CoV-2 и/или АИТ, недавней вакцинации, пациент переходит в группу динамического наблюдения.

Таким пациентам рекомендовано взятие крови с целью:

- определения уровня гормонов ЩЖ в сыворотке крови,
- определения уровня антител к тиреопероксидазе (ТПО), молекуле тиреоглобулина (ТГ) и рецептору тиреотропного гормона (ТТГ) методом ИФА,
- определения уровня IgG и IgM к вирусу SARS-CoV-2.

При обнаружении повышенных антител к ТПО, ТТГ, ТГ и SARS-CoV-2, а также с повышенным уровнем гормонов, что может быть проявлением аутоиммунизации и повышенной стимуляции железы, пациент остается в группе динамического наблюдения и пациенту необходима терапия АИТ с наблюдением и коррекцией уровня гормонов ЩЖ.

Всем пациентам с узловыми образованиями рекомендована УЗИ-диагностика с ТАПБ с последующим морфологическим исследованием пунктатов. Рекомендовано одновременное изготовление клеточных блоков из

материала ТАПБ для возможности более детальной предоперационной диагностики.

При результатах ТАПБ категория Bethesda II пациент остается в группе динамического наблюдения, при результатах ТАПБ категория Bethesda III рекомендована постановка ИГХ на клеточных блоках с антителами Cyclin D1, CD95, VEGF, CD4, CD8, CD68.

При повышении интенсивности экспрессии CD95, VEGF, CD4, CD8, CD68, Cyclin D1 рекомендовано оперативное вмешательство с последующим динамическим наблюдением.

Методика оценки ИГХ реакции. При оценке реакции ИГХ каждый препарат необходимо оценить не менее чем в 10 полях зрения. Оценку следует проводить в соответствии с таблицами 16-18.

Задача аналитического этапа – перевести качественную реакцию антиген-антитело с хромогеном в количественную реакцию для ее оценки и клинически значимых выводов и рекомендаций. Так, большинство клеток, как с ядерной, так и с цитоплазматической и мембранной локализацией экспрессируемого маркера, оценивают подсчетом количества позитивно окрашенных клеток в поле зрения при использовании объектива 40х (окуляр 10х) (табл. 16). Однако часть маркеров с цитоплазматической локализацией оценивают по шкале Allred Score (табл. 17 и табл. 18). Эта методика присваивает образцу баллы от 0 до 5 по проценту позитивных клеток PS (proportion score) с цитоплазматическим окрашиванием, а также от 0 до 3 по интенсивности цветовой реакции в цитоплазме клеток данного образца IS (intensive score). В последующем баллы суммируют по формуле (1)

$$TS (Total Score) = PS+IS \quad (1)$$

Оценку результатов ИГХ должен проводить врач-патоморфолог.

Таблица 16. Методика оценки ИГХ реакции

№	Наименование антитела	Локализация метки	Способ подсчета
1.	Cyclin D1	цитоплазма клетки	количество позитивно окрашенных клеток в поле зрения на 40х
2.	CD95	цитоплазма клетки	при увеличении 40х оценивали интенсивность и процент окрашенных клеток по шкале Allred Score
3.	VEGF		
4.	CD4	мембрана лимфоцитов	количество позитивно окрашенных клеток в поле зрения на 40х
5.	CD8	мембрана лимфоцитов	
6.	CD68	мембрана макрофагов	

Примечание. Шкала Allred Score для оценки интенсивности окрашивания и процента окрашенных клеток.

Таблица 17. Методика оценки окрашивания – PS (proportion score)

балл	0	1	2	3	4	5
% ПОЗИТИВНЫХ КЛЕТОК	0	1	10	11-30	31-60	более 60%

Таблица 18. Методика оценки интенсивности окрашивания – IS (intensive score)

балл	0	1	2	3
Интенсивность окрашивания	отсутствует	слабое (бежевый)	среднее (кофейный)	интенсивное (коричневый)

Интерпретация уровней показателей. Интерпретация результатов исследования уровня гормонов ЩЖ проводится любыми реагентами в любой лаборатории и оценивается согласно референсным значениям, указанным в инструкции.

Интерпретацию результатов исследования количества антител к ТПО, ТТГ, ТГ, Ig к возбудителям тяжелых инфекционных заболеваний методом ИФА также необходимо проводить в соответствии с инструкцией к соответствующим наборам,

поскольку фактические значения показателей могут существенно варьировать в зависимости от производителя такого набора.

При интерпретации результатов ИГХ исследования необходимо придерживаться пороговых значений, указанных в таблице 19.

Таблица 19. Уровни пороговых значений результатов ИГХ анализа

№	Наименование антитела	Нормальное значение	Критическое значение
1.	Cyclin D1	менее 80 клеток в поле зрения	свыше 80 клеток в поле зрения
2.	CD95	менее 5 баллов по Allred Score	более 5 баллов по Allred Score
3.	VEGF	менее 5 баллов по Allred Score	более 5 баллов по Allred Score
4.	CD4	менее 5 клеток в поле зрения	более 5 клеток в поле зрения
5.	CD8	менее 5 клеток в поле зрения	более 5 клеток в поле зрения
6.	CD68	менее 5 клеток в поле зрения	более 5 клеток в поле зрения

Методика изготовления клеточных блоков. Для изготовления клеточного блока (cell-block) используют два способа: агаровый и тромбиновый. Оба показали хороший результат. Агаровый способ изготовления включает такие этапы: подогрев агара (HistoGel technique) на водяной бане при температуре 60 °С в течение 10 минут, центрифугирование пунктата при 3000 об/мин в течение 5 минут, - удаление надосадочной жидкости, добавление 5-8 капель агара на дно центрифужной пробирки с полученным центрифугатом, осторожное перемешивание пунктата с агаром носиком дозатора, охлаждение в морозильной камере в течение не более 5 минут, перенос образовавшегося сгустка в кассету с прокладками для фиксации и гистологической проводки.

Тромбиновый способ предполагает следующие этапы: фиксация пунктата в смеси формалина со спиртом в соотношении 4:1, промывка физиологическим раствором, взвесь клеток помещают в стеклянную пробирку, добавляют 500 мкл цитратной плазмы и 5 мкл хлорида кальция, инкубация в термостате 15-20 минут при 37 °С, формируя тромбиновый сверток как связующую основу, перенос

образовавшегося сгустка в кассету с прокладками для фиксации и гистологической проводки.

Из готовых блоков изготавливают срезы по стандартной методике и инструкциям гистологических реагентов и приборов.

Рисунок 48 иллюстрирует алгоритм динамического наблюдения и лабораторных исследований у пациентов, перенесших респираторные вирусные инфекции, для выявления признаков аутоиммунного воспаления и трансформации клеток.

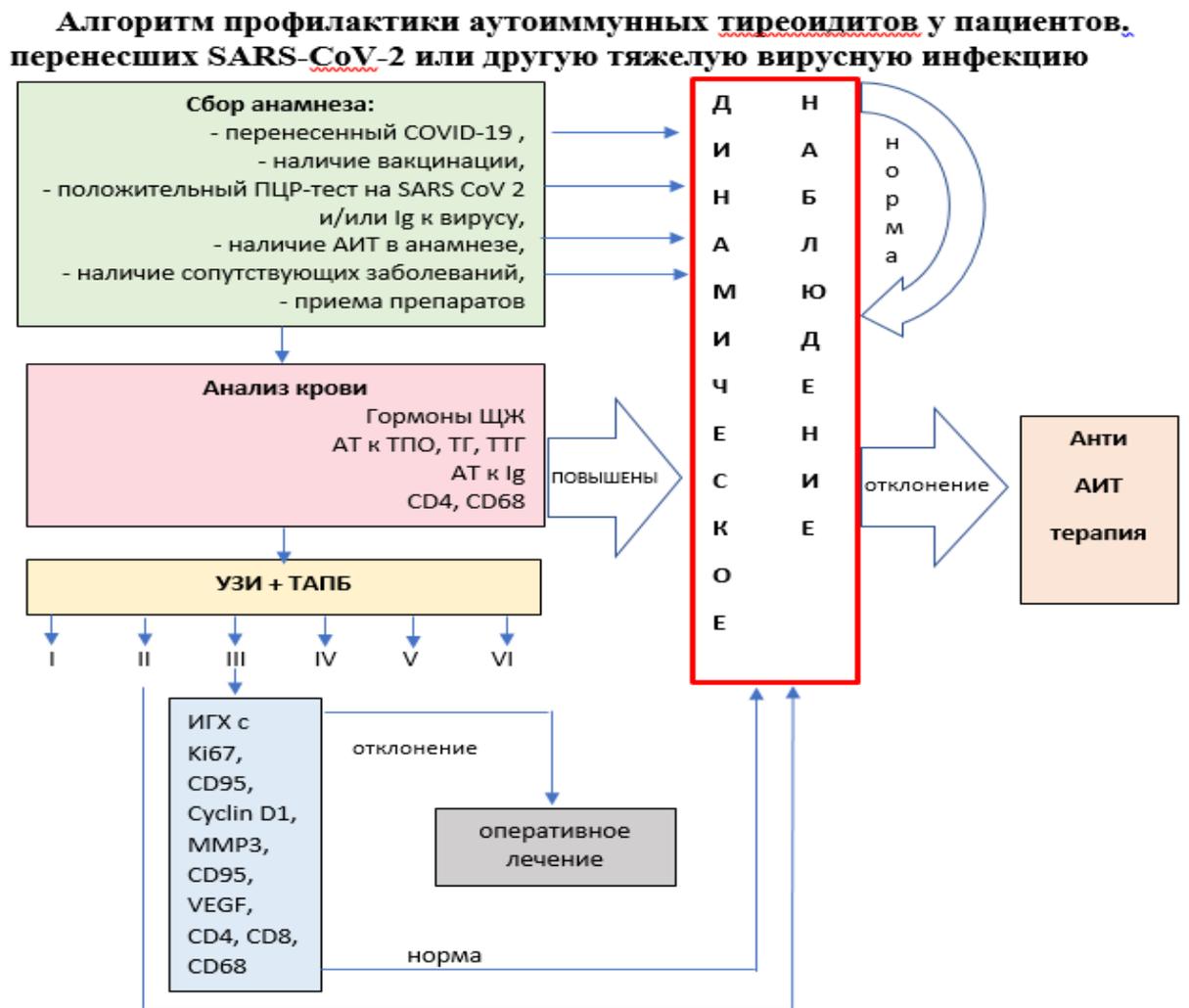


Рисунок 48. Алгоритм динамического наблюдения за пациентами, перенесшими респираторные вирусные инфекции, для выявления признаков аутоиммунного воспаления и трансформации клеток

ГЛАВА 7. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ И ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Актуальность темы связана с возросшим интересом к влиянию COVID-19 на функцию ЩЖ. Согласно данным, ежедневно публикуемым Ресурсным центром COVID-19 пандемия затронула более 667 млн человек, в результате чего погибло более 6 млн человек [92]. Множественные ее последствия заняли центральное место в клинической практике и общественном здравоохранении и после стихания пандемии. Поскольку врачи терапевтического и хирургического эндокринологического профилей отмечали увеличение числа случаев дисфункции ЩЖ у пациентов с диагнозом COVID-19, стали актуальны исследования взаимосвязи между новой коронавирусной инфекцией и патологией ЩЖ. Фундаментальная наука нацелилась на выявление и понимание основных патофизиологических процессов, возникающих при взаимодействии вируса и ЩЖ, что является клинически значимой информацией для диагностики, профилактики и лечения пациентов.

Наша рабочая группа в работе университетской клиники и диагностической морфологической лаборатория при ФГАОУ ВО «КФУ им. В.И. Вернадского» в научном сотрудничестве с ГБУЗС «Городская больница № 1 имени Н.И. Пирогова» также отметила влияние пандемии в изменении структуры хирургической заболеваемости эндокринологических пациентов. В связи с чем, мы: 1) приняли участие в мультицентровом исследовании университета Кальяри (Италия), оценившим общемировую специфику организации лечения больных с тиреоидной патологией; 2) провели ретроспективное изучение региональных особенностей заболеваемости хирургической патологией ЩЖ; 3) инициировали фундаментальное исследование патогенеза повреждения ткани ЩЖ в модельном эксперименте на лабораторных грызунах.

На фоне общемировой тенденции, что с момента вспышки в начале 2020 года пандемия COVID-19 отвлекла ресурсы от несрочных и плановых процедур, которые привели к задержкам в диагностике и лечении, а также к увеличению

числа новообразований ЩЖ на поздних стадиях во всем мире, мы получили иные данные по региону Республики Крым и г. Севастополю. Нами выявлено снижение доли выявления рака в женской популяции во время пандемии (30%) по сравнению с допандемическим периодом (39%, при $P \leq 0,05\%$). Мы объясняем это более частым обращением к врачу в связи с явлениями дисфункции ЩЖ, характерными для COVID-19 и увеличением доли аутоиммунной патологии железы и тиреоидитов, вызванных непосредственно вирусом SARS-COV-2, снижающим удельный вес рака среди проведенных ТАПБ и биоматериала от операций. Среди мужчин процент ЗНО также выше до пандемии (56%), но за счет активного вовлечения ЩЖ в инфекционный процесс COVID-19 резко возросла частота гиперфункциональной патологии (преобладали токсические аденомы, зобы, АИТ) и доля рака в общей структуре болезней ЩЖ, требующей оперативной помощи снизилась до 25,0% ($P \leq 0,005$). Однако, выявленные в этот период опухоли (преимущественно папиллярные карциномы) относятся к низкой категории риска, являются микрокарциномами и крайне редко имеют экстратиреоидное распространение.

Нами выполнено также фундаментальное исследование молекулярно-биологических маркеров в ткани ЩЖ. Это стало возможным благодаря наличию аннотированной биокolleкции большого количества материала. Современные фундаментальные и клинические направления науки, способствующие развитию успехов практической онкологии, это: морфология, молекулярная биология, лабораторная онкогенетика, экспериментальная медицина, а также достижения медицинской техники и персонализированных медицинских технологий. Эти отрасли требуют использования биобанков тканевых и клеточных коллекций биоматериалов опухолей [119-124]. Биобанки — это биохранилища, которые собирают, обрабатывают, хранят, каталогизируют и обеспечивают регламентированный доступ к биологическим образцам, а также к соответствующим аннотированным клиническим данным, которые могут быть использованы в прикладных или клинических исследованиях. Роль и поле

деятельности этих стратегических инфраструктур для развития персонализированной медицины постоянно расширяются.

В России наибольшими возможностями для их создания и использования являются региональные, республиканские или федерального уровня медицинские лаборатории, совмещающие морфологические и молекулярно-генетические исследования тканей пациентов онкологического профиля, организованные при образовательных учреждениях (университетские клиники) или научно-медицинских исследовательских центрах федерального уровня [126-132]. Если диагностическую работу определяет, как правило, императивная потребность и нехватка специалистов-морфологов и молекулярных биологов онкологического профиля, очень актуальная в регионах России, то выполнение научных работ является дополнительным, носит рекомендательный характер.

Сбор коллекции целесообразно проводить в патоморфологической лаборатории по профилю обслуживаемых медицинских учреждений, имеющих достаточный объем поступающего целевого материала и узких специалистов верификации опухолей данной локализации. Не секрет, что в патоморфологическом заключении может присутствовать элемент субъективизма и индивидуального «почерка» в вырезке, оценке и способа описания материала патологом, а также специфика формулирования диагноза согласно действующим классификациям и клиническим рекомендациям. При достаточном объеме материала определенного типа, как правило, его иссекает и оценивает врач, который для качественной работы проходит профильную стажировку у признанных специалистов в данной области и обучает этому своих дублеров и коллег. Так, работа с материалом отделения эндокринной хирургии республиканского уровня инициировала стажировку в Национальном центре клинической морфологической диагностики (СПб). Подробное описание макроскопической и микроскопической картины опухолей ЩЖ дало возможность оценить не только динамику изменения структуры заболеваемости и качества хирургической помощи в сравнении за 5 лет, но и характер опухолевого роста, экстратиреоидного распространения и разных путей

метастазирования, оценить уровень злокачественности и риск рецидива. Подробная каталогизация и аннотирование образцов позволили связать эти изменения с предикторами и прошедшей пандемией (в ключе изменения подхода к плановым оперативным вмешательствам и специфического воздействия вируса SARS-CoV-2 на ЦЖ).

Схематически процесс биобанкинга отражен на авторской иллюстрации (рис. 49), выполненной нами в приложении Biorender (<https://app.biorender.com>).

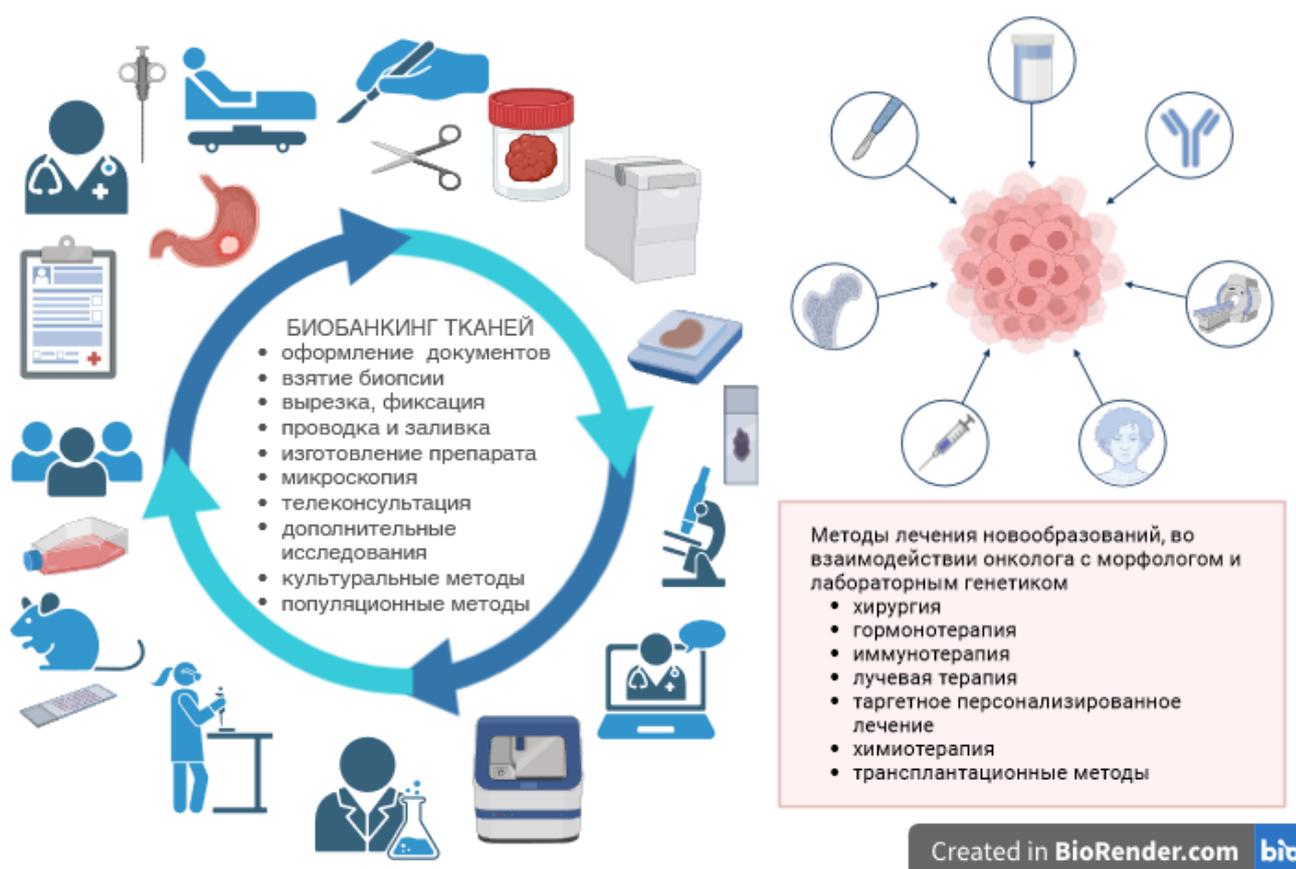


Рисунок 49. Роль биобанка в персонализированной онкологической помощи.

Он демонстрирует пример потенциала биобанкинга для прецизионной медицины в онкологии. Проиллюстрирован путь процессинга материала опухоли, показан возможный вклад биобанкинга в алгоритм ведения пациента,

как на ранней, так и на поздней стадии заболевания. При условии подписания пациентом информированного согласия, можно брать различные биологические образцы. Срезы тканей можно систематически сканировать и сохранять в цифровом виде, что способствует созданию цифрового архива патологии и при условии широкого аннотирования коллекций сопоставлять морфологические критерии с клиническими данными [133-140].

В настоящее время, складывается впечатление, что широкое применение методов молекулярной генетики обошло онкологию ЩЖ в связи с доступностью заместительной гормонотерапии и достаточно редким использованием таргетной терапии у таких пациентов. Однако, на наш взгляд, в ближайшее время, тренд будет меняться. Катализатором внедрения генетического анализа в рутинной хирургической эндокринологии будет именно возможность верного выбора хирургической тактики с оценкой риска рецидива на основании заключения лабораторного генетика. Резолюция XV Съезда общероссийской общественной организации «Российское общество хирургов им. академика В.С. Савельева», прошедшего в октябре 2023 года в разделе, посвященном эндокринной хирургии, также постановила при определении показаний к хирургическому лечению пациентов с узловыми новообразованиями ЩЖ с цитологическими заключениями, относящихся к категориям Bethesda III и IV, прибегать к молекулярно-генетическому исследованию цитологического материала. При отсутствии молекулярно-генетических признаков злокачественной опухоли целесообразно воздержаться от оперативного вмешательства, а при их наличии – выполнить гемитиреоидэктомию.

Методически подходят все современные направления исследования выделенной ДНК и FISH-метод (плюс его хромогенные варианты) для выявления транслокаций. Пандемия COVID-19 легла огромным бременем на здравоохранение РФ, но внедрила как рутину ПЦР-метод в большинство рядовых лабораторий, реагенты для гибридизации стали более доступны в связи с широким внедрением этих методик в молекулярно-генетическую диагностику а наличие секвенаторов отечественного производства сделало доступным метод

фрагментного анализа по Сэнгеру, что дает возможность применять их в каждодневной диагностической практике, выбирая оптимальный по чувствительности и специфичности метод.

Большинство авторов обращают внимание на мутации в гене BRAF V600E, промоторном регионе гена TERT. Они чаще всего фигурируют как маркеры риска высокой злокачественности и рецидива папиллярного рака в оценке его стратификации по мнению специалистов Американской ассоциации тиреоидологии (ATA). Также значимы мутации в семействе генов RAS (HRAS, KRAS, NRAS), ассоциированные уже с фолликулярными вариантами, неинвазивными опухолями NIFTPs. Транслокации RET / PTC, PAX8 / PPARG также имеют диагностическое значение, но меньшее, чем указанные выше мутации в генах. Эти первичные генетические события влекут за собой вторичные мутации трансформированных клеток, активирующие другие сигнальные пути, например p53. Большой интерес представляет связь наиболее распространенной мутации с апоптозом и изменением пролиферации и дифференцировки клеток тиреоидного эпителия, появлением автономности каскадов деления от влияния ростовых факторов. И данный факт позволил нам предположить возможность изучения методом ИГХ (а точнее иммуноцитохимии на клеточном блоке как адаптированного для материала ТАПБ метода) экспрессию белков рецепторов клеточной смерти и ядерных маркеров активной пролиферации [119, 140-144]. Прошедшая пандемия COVID-19 показала вовлеченность ЩЖ в воспалительный процесс при цитокиновом шторме вследствие аутоиммунизации. Связь трансформации клеток с длительно протекающим тиреоидитом также известна, что делает перспективным изучение методом ИГХ маркеров клеточного микроокружения (воспалительного инфильтрата) и клеточного цикла тироцитов в исследовании последствий новой коронавирусной инфекции.

Морфологическое исследование материала ТАПБ на предоперационном этапе имеет объективные трудности в связи с невозможностью получить плотный трепанбиоптат. Ответственность цитопатолога на этапе

предоперационной диагностики заключается в принципиальном определении направления дальнейшей работы с пациентом (наблюдение, терапевтическое лечение, хирургия и ее объем). При этом преаналитический этап обработки материала ТАПБ ЩЖ дает возможность сделать ее очень ценным диагностическим инструментом: получить материал как для первичного морфологического исследования (цитопатология), так и для применения дополнительных молекулярных и генетических методик. Один из алгоритмов предложен в работе и включает комплексную диагностику с использованием ИГХ метода. Исследование белков методом постановки реакции ИГХ перспективно не только для диагностики, но и для фундаментальной медицины в исследовании патогенетических механизмов трансформации клеток.

Концепция применения молекулярно-генетических исследований в диагностике опухолей ЩЖ в соответствии с рекомендациями Американской Ассоциации Щитовидной Железы (ATA) 2015 г такова: все опухоли из тиреоидного эпителия генетически детерминированы; молекулярно-генетические исследования применимы при неопределённых цитологических заключениях, выявление мутаций свидетельствует об опухолевой природе узла, отрицательный результат позволяет перевести узел из неопределённой группы в группу доброкачественных узлов с последующим динамическим наблюдением [145, 146]. Однако по опыту Российских специалистов надежды на молекулярную генетику в тиреопатологии не всегда оправданы.

На конгрессе Российского общества онкопатологов (РООП) в 2023 году, г. Москва активно обсуждалась опухолевая патология ЩЖ. В докладе проф. Завьяловой М. В., ведущего научного сотрудника Научно-исследовательского института онкологии ФГБНУ «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук» на тему «Анализ структуры летальных исходов от злокачественных новообразований с учетом перенесенной новой коронавирусной инфекции COVID-19» также говорилось о взаимосвязи влияния пандемии и статистики ЗНО. Опухолевые процессы у пациентов, перенесших COVID-19, имеют более неблагоприятное течение в пандемии (были

исследованы 2020-2021 годы). При исследовании клинико-морфологических особенностей сравнивали такие параметры, как локализация, гистологический тип, наличие и вариант первично-множественных опухолей, ангиогенное и лимфогенное метастазирование, поражение серозных оболочек. В ранний период пандемии (2020-21 годы) коллегами отмечен рост встречаемости лимфогенного метастазирования, именно варианты, соответствующие критерию N3, существенный рост частоты случаев канцероматоза (иногда с одновременным поражением плевры, брюшины и перикарда с большим числом опухолевых эмболов в лимфатических сосудах серозных оболочек и внутренних органов) и первично-множественных ЗНО. Среди пациентов с первично-множественными ЗНО встречались случаи рака ЩЖ в 4% (это выше, чем в общей структуре) в сочетании с раком легкого и желудка в случаях с синхронным развитием заболевания, такие сочетания преобладали у мужчин и отсутствовали при метасинхронном развитии рака. В группе больных, перенесших COVID-19, чаще выявлялись случаи с выраженной воспалительной инфильтрацией стромы новообразования. Данное исследование выполнено на материале летальных исходов, то есть по срокам отражает самые ранние осложнения. Подобные исследования выполнены и зарубежными коллегами [147-151].

Выполнение биостатистических ретроспективных исследований является важным. С.Л. Воробьев, к. мед. н., ведущий специалист, фактически сделавший реформу в отечественной морфологии, показав, что цитопатология щитовидной железы должна быть предметом изучения профильных цитопатологов с базовой специализацией по патологической анатомии [152], также акцентирует внимание на том, что статистика имеет большое значение для контроля качества и выявления трендов заболеваемости в связи с ведущими глобальными изменениями экологии и другими факторами жизни человечества. Одним из вызовов цитопатологам является невозможность анализировать и сравнивать данные по заболеваемости в разных регионах и медицинских учреждениях, что было также озвучено на конгрессе Российского общества онкопатологов (РООП) в 2023 году, г. Москва.

В докладе «Онкология в период пандемии новой коронавирусной инфекции», представленном на научной сессии РАН «Роль науки в преодолении пандемий и посткризисном развитии общества» главный внештатный специалист-онколог Российской Федерации академик А.Д. Каприн обобщил международные многоцентровые исследования и показал, что пандемия повлияла на онкологию не только за счет осложнения работы системы здравоохранения в связи с ограничительными мероприятиями, но и в связи с онкогенным влиянием вируса и системного воспалительного синдрома. Приостановка скрининговых программ привела к снижению количества выявленных случаев ЗНО на 13-20% в различных странах, вследствие чего выросла доля первично выявленных распространенных и резистентных к терапии форм без возможности радикального лечения. Мировое сообщество едино в мнении, что скрининговые программы в связи с пандемией приостанавливать нельзя [10].

Однако в указанных докладах чаще звучат взаимосвязи инфекции и уже возникшей опухоли, а отдаленных исследований мало. Так у онкологических пациентов, как и при новой коронавирусной инфекции, наблюдается системный воспалительный ответ, связанный с выбросом цитокинов и белков острой фазы воспаления. Степень выраженности системного воспалительного ответа прямо коррелирует с неблагоприятным прогнозом ЗНО. У таких пациентов вследствие применения терапии происходит массивный выброс провоспалительных цитокинов, стимулирующих Т-клетки, макрофаги и эндотелиоциты, дополнительно выбрасывающие факторы ангиогенеза и инвазии, способствующие подготовке премеапластических ниш, облегчению эпителиально-мезенхимального перехода, формированию премеапластического микроокружения опухоли. Такие парадоксальные эффекты любого вида терапии, в том числе таргетной и иммунотерапии, в настоящее время изучаются с целью разработки эффективных алгоритмов оценки и способов купирования синдрома воспаления, ассоциированного с лечением рака. Биологическими маркерами системного воспалительного ответа у онкологических больных чаще всего служат: уровень С-реактивного белка (СРБ) и его производное - индекс Glasgow Prognostic Score

(GPS), учитывающий соотношение уровня СРБ и содержание альбумина в плазме крови; отношение нейтрофилов или тромбоцитов к лимфоцитам (NLR и PLR соответственно), что косвенно отражает соотношение воспалительных реакций и реакций специфического иммунитета; уровни в периферической крови (ИЛ)-6, ИЛ-8, ИЛ-1 β , ИЛ-12, ИЛ-17, фактора некроза опухолей (TNF) [10, 153].

Пандемия инициировала более тесное международное и междисциплинарное сотрудничество в мировом медицинском сообществе. Наша рабочая группа также принимала участие в таких исследованиях по заболеваемости онкологической патологией с локализацией в ЩЖ.

Хирургическая активность при заболеваниях ЩЖ, особенно при узлах III-IV категории по Bethesda (с неоднозначным риском рака), в целом снизилась во время пандемии, а затем, напротив, выросла и изменения в структуре заболеваемости манифестировали и подвергались различной трактовке.

Современная литература по представленным данным раскрывает многогранное влияние пандемии COVID-19 на динамику заболеваний ЩЖ, затрагивая социальные, биологические и клинические аспекты. Мы полагаем, что не только воздействие вируса на ткань железы, но и ограничения плановой медицинской помощи, наложенные в условиях пандемии, а также стресс и иммуносупрессия стали предиктором к росту доли злокачественных новообразований и выявляемости более агрессивных случаев с метастазами, капсулярной инвазией, мультицентрическим ростом, что отражает реальность не только отложенной диагностики. Эти наблюдения перекликаются с выводами коллег [154], продемонстрировавшими, что отсроченная плановая операция из-за пандемии COVID-19 у пациентов по поводу злокачественных новообразований области головы и шеи привела к более высоким показателям прогрессирования заболевания и неоперабельности, что подчеркивает хрупкость баланса между своевременным вмешательством и необратимыми последствиями. Значительная частота несвоевременных операций и сбоев в оказании онкологической помощи связанная с бременем COVID-19 привела к тяжелым последствиям, отраженным статистическими показателями [155]. Стоит отметить, что в период пандемии

COVID-19 наблюдалось временное снижение процента злокачественных опухолей, обусловленное не истинным улучшением эпидемиологической картины, а кризисом систем здравоохранения. Как отмечают другие исследования [155-157] перераспределение ресурсов в пользу борьбы с COVID-19 привело к феномену, когда сокращение плановых операций и скринингов искусственно снизило выявляемость рака, создав иллюзию благополучия. Этот временный спад сменился постпандемическим всплеском, где накопленные недиагностированные случаи проявились в более агрессивных формах [158-162].

Помимо данного аспекта, стоит учитывать непосредственное биологическое влияние SARS-CoV-2 на ткань ЩЖ. Взаимодействие вируса с ACE2-рецепторами, экспрессируемыми в ткани ЩЖ, не только открывает путь прямому повреждению, но и запускает каскад аутоиммунных реакций, что объясняет зафиксированный рост случаев аутоиммунного тиреоидита и всплеск выработки тиреоидных гормонов. Кроме того, применение глюкокортикоидов, таких как дексаметазон, в терапии COVID-19 может подавлять синтез тиреотропного гормона, усугубляя гипотиреоз у предрасположенных пациентов. Это коррелирует с увеличением числа микрокарцином в Севастополе, часто ассоциированных с субклиническим гипотиреозом [158]. Данные согласуются с работами [159], обнаружившими связь между COVID-19 и развитием тиреоидной дисфункции через механизмы молекулярной мимикрии.

В нашем исследовании показан гендерный аспект заболевания о преобладании женщин среди пациентов. Пик заболеваемости у женщин в менопаузальном периоде, вероятно, связан с гормональной перестройкой, усиливающей пролиферативную активность тиреоидной ткани, что сходно с данными в литературе о роли эстрогенов в патогенезе рака щитовидной железы [160]. В целом, пандемия COVID-19 существенно повлияла на структуру и динамику заболеваний щитовидной железы, подчеркнув необходимость адаптации медицинской системы к подобным глобальным вызовам для обеспечения своевременной диагностики и лечения пациентов.

Вероятность (%) развития инвазивного рака в разных возрастных интервалах по полу в США составляет для рака ЩЖ от 0,1% до 0,7% у мужчин и 0,4-1,9 % у женщин разных возрастных групп. Абсолютным лидером является возраст до 30 и 50-59 лет [159], что совпадает с отечественными данными.

Причины существенных половых различий заболеваемости раком ЩЖ до конца не изучены, но, вероятно, в значительной степени отражают различия в воздействии факторов риска из внешней среды, образа жизни и эндогенных гормонов, а также сложные взаимодействия между этими составляющими. Половые различия в иммунной функции также могут играть важную роль. Мужчины и женщины демонстрируют различия во врожденных и адаптивных иммунных реакциях. Некоторые иммунологические половые различия присутствуют на протяжении всей жизни, тогда как другие проявляются только после полового созревания и до репродуктивного старения, что предполагает участие, как генов, так и гормонов. Описано и опосредованное воздействие окружающей среды на иммунную функцию через микробиом, имеющие зависящие от пола эффекты. Важно, что эти основанные на поле иммунологические различия способствуют различиям в частоте аутоиммунных заболеваний и злокачественных новообразований, восприимчивости к инфекционным заболеваниям и реакциям на вакцины у мужчин и женщин. Многие авторы, обсуждая эти различия, подчеркивают, что пол является биологической переменной, которую следует учитывать в иммунологических исследованиях. Эти ключевые положения, имеют значения к изучаемой нами теме, где существенная роль пола в возникновении риска рака ЩЖ, аутоиммунных и гиперпластических заболеваний, а также чувствительности к инфекционным агентам, которую демонстрируют наши эксперименты и статистика, а также другие авторы схожих исследований и разработок.

Интересны были бы результаты дальнейших экспериментальных исследований для изучения влияния терапии глюкокортикостероидами, нестероидными противовоспалительными средствами и противовирусными препаратами, а также детальное исследование популяций иммунных клеток. На

наш взгляд, перспективы дальнейших фундаментальных исследований состоят в поэтапном (согласно стадиям инфекционного процесса) исследовании в ткани железы регуляторных белков, Т, В-клеток, маркеры разрушения, онкогенеза (клеточного цикла и его регуляции), ангиогенеза, аутоантитела методом ИГХ с изучением локализации маркера в ткани.

В работе в эксперименте на животных нами получен ряд данных, представляющих научный интерес.

В группе интактных животных в строме железы присутствует порядка 20 лимфоцитов в поле зрения, представленные главным образом макрофагами, CD48⁺ активирующими лимфоцитами. Чуть меньше В-лимфоцитов и плазмоцитов. Единичны CD4⁺, CD8⁺ и CD30⁺ Т-лимфоциты. Экспрессия белков клеточного цикла и дифференцировки была низкой. Экспрессия маркера bcl-2 наблюдалась главным образом в клетках стромы органа и носила умеренную выраженность. Проапоптотический белок CD95 экспрессировался повсеместно также с умеренной силой. Белок p53 обнаружен в ядрах отдельных эпителиоцитов. Экспрессия факторов сосудистого роста, iNOS и металлопротеиназ была невысокой. Рецепторы к ТТГ слабо экспрессировало порядка 40% клеток.

На 5 сутки инфекции локальный иммунитет у самцов и самок отреагировал по-разному. У самок наблюдалось снижение числа лейкоцитов вообще с равномерным уменьшением всех исследуемых подтипов клеток. В то же время у самцов наблюдалось наибольшее число иммунных клеток в строме опухоли со значительным преобладанием макрофагов, CD48⁺ активирующих клеток, CD4⁺ Т-хелперов и плазмоцитов. У самок также отмечен рост числа клеток с экспрессией p53 и существенно (в 2,5 раза) возрастает экспрессия Cyclin D1. Экспрессия белков дифференцировки не изменяется ни у самцов, ни у самок. Одинаково усиливается экспрессия bcl-2 в клетках стромы, при этом CD95 остается на уровне контроля. Также практически не изменяется активность матриксной металлопротеиназы 3. При этом у самок активируется ангиогенез, о чем можно судить по усилению экспрессии VEGF, а у самцов наоборот, активность этого

фактора достоверно снижается, как и рецептора Tie2. И у самцов, и у самок, повышается экспрессия рецепторов к ТТГ, причем у самок сильнее.

На 10-е сутки число лейкоцитов у самок существенно возрастает с преобладанием по численности макрофагов и регуляторных CD4⁺, CD48⁺ клеток. У самцов же иммунологический профиль стромы нормализуется. Экспрессия bcl-2 снижается и у самцов, и у самок, в то время как экспрессия CD95 достоверно усиливается относительно контроля. Еще сильнее экспрессируется Cyclin D1, а также наблюдается усиление экспрессии факторов дифференцировки, таких как c-KIT и тиреоглобулин, особенно у самок. В целом у самок на 10 сутки заболевания наблюдались наибольшие отличия от контрольной группы. Достоверно снизилась экспрессия p53 и MMP3. Также усилилась экспрессия фактора сосудистого роста и iNOS.

На 30-е сутки практически по всем исследуемым маркерам картина возвращается к норме, лишь экспрессия iNOS и рецепторов к ТТГ остается несколько повышенной, что, впрочем, не носит статистической достоверности.

При развитии заболевания реактивные изменения скорее происходят у самцов и приходятся на пик расцвета заболевания. У самок данные изменения несколько запаздывают, при этом проявляются существенно ярче. Повышение экспрессии Cyclin D1 и c-KIT характерно для опухолей, и в сочетании с высокой экспрессией p53 дает плохой прогноз для выживаемости в связи с низкой дифференцировкой опухоли и повышенной вероятностью метастазирования. Усиление экспрессии данных маркеров в ранний период выздоровления после ковида может спровоцировать малигнизацию. При этом к 30 суткам эксперимента большая часть показателей нормализовалась.

Для папиллярного рака ЩЖ также характерна сверхэкспрессия Cyclin D1, вызванная нарушением процессов его деградации в S-фазе клеточного цикла и связана с тяжелыми формами рака, большим размером опухоли и появлением метастазов [163].

Повышение экспрессии рецепторов к ТТГ в группах больных хомяков может быть связано не только с нарушением синтеза гормонов тироцитами, но и

общим снижением уровня ТТГ в крови, что характерно для острого периода COVID [164].

Повышенная экспрессия p53 является показателем низкой дифференциации клеток. Учеными описаны исследования ИГХ, где окрашивание p53 и Ki-67 при 30% поддерживает пролиферацию опухоли, а не только процессы хемотаксиса плоскоклеточного эпителия. Реакция p53 и Ki-67 связана с низко дифференцированным раком ЩЖ и риском послеоперационного местного рецидива, может быть предиктором плохого прогноза при раке ЩЖ [165].

Результаты исследования демонстрируют, что реактивные изменения в ЩЖ при ТОРС у хомяков носят гендерно-зависимый характер. У самцов пик воспалительной активности (макрофаги, CD48+ клетки) приходился на 5-е сутки, тогда как у самок аналогичные изменения достигали максимума к 10-м суткам, но при этом проявляются существенно ярче. Подобная динамика согласуется с клиническими наблюдениями, где у мужчин чаще отмечается ранняя цитокиновая буря, а у женщин — пролонгированное воспаление [166].

Повышение экспрессии Cyclin D1 и c-KIT в сочетании с высокой активностью p53, выявленное в группах с моделью ТОРС, коррелирует с схожими данными исследований папиллярного рака ЩЖ. Например, зарубежные ученые [163] показали, что сверхэкспрессия Cyclin D1 связана с нарушением деградации белка в S-фазе клеточного цикла, что способствует прогрессии опухоли и метастазированию. Усиление экспрессии данных маркеров в ранний период выздоровления после SARS-COV-2 может спровоцировать малигнизацию. При этом к 30 суткам эксперимента большая часть показателей нормализовалась.

Интересным аспектом является повышение экспрессии рецепторов к ТТГ у инфицированных животных. Это может быть связано не только с нарушением синтеза гормонов тироцитами, но и общим снижением уровня ТТГ в крови, что характерно для острого периода COVID [167-170]. Однако в нашем случае у самок данная реакция была выражена сильнее, что может объяснять их повышенную склонность к тиреоидным дисфункциям. Мы считаем, что выявление гендерных различий: у самок пик воспалительных изменений

приходился на 10-е сутки, тогда как у самцов — на 5-е сутки, является ценностью выполненной нами работы.

Для данной работы важно то, что ЩЖ относится к «забарьерным» органам со сложной гистологической организацией, направленной на изолирование коллоида от интерстиция и микрососудов. Это обеспечивает комплекс тканевых и клеточных образований, формирующих гистогематический барьер. Первоочередную роль играют тироциты, плотные контакты между боковыми поверхностями которых, не допускают «утечки» коллоида и его компонентов, не прошедших химические преобразования в тироците, в интерстиций и в кровь. Межклеточные контакты тироцитов в фолликуле в норме не образуют щелей и пространств, и лишь в базальной части формируются клиновидные расширения, по-видимому, для роста площади контакта с периваскулярным пространством и усиления обменных процессов. При аутоиммунизации в клинике и в эксперименте отмечены дефекты плотных контактов с разрушением клеток и существенным изменением гистоархитектоники железы. Ряд авторов рассматривает это как причину, а ряд — как следствие аутоиммунного повреждения [21]. По нашему мнению, оба варианта правомочны в разных случаях. При Т-клеточной или опосредованной иммунными комплексами или прямой вирус-индуцированной гибели тироцита нарушается структура фолликула с аутоиммунной агрессией против тиреоглобулина и тиреопероксидазы, к рецепторам тиротропина (ТГ, ТПО, ТТГ), к другим компонентам коллоида и клетки. При неадекватном Т-супрессорном эффекте воспаление не прекращается, а прогрессирует, нарушая функцию и вызывая клинические симптомы. Это сопровождается активацией Т- и В-клеточного звена, что установлено методом ИГХ по позитивной реакции с маркерами CD4+, CD20+, CD30+, с антителами к ТГ, ТПО, ТТГ. Выявлена диффузно-очаговая инфильтрация соответствующими иммунными клетками. Числовые показатели демонстрируют достоверное увеличение на 10 и 30 сутки числа макрофагов, Т-хелперов и В-лимфоцитов.

Таким образом, исследование дополняет существующие данные, акцентируя внимание на гендерно-временной динамике и онкогенном потенциале

COVID-19, и обосновывает необходимость дальнейших работ в этом направлении.

Клиническая значимость результатов. Выявленная динамика маркеров (Cyclin D1, p53, VEGF) указывает на риск малигнизации у пациентов, перенесших COVID-19, особенно при наличии сопутствующих факторов риска. Снижение экспрессии CD95 и рост Bcl-2 в строме могут служить мишенями для терапии, направленной на подавление апоптоза и фиброза. Результаты актуальны для разработки алгоритмов наблюдения за пациентами с тиреоидной патологией после вирусных инфекций.

В нашей работе у больных раком, перенесших COVID-19, также существенно повышается экспрессия белка p53 и Cyclin D1. Это характерно для рака ЩЖ и связано с плохим прогнозом [171]. Накопление Cyclin D1 связано с нарушением клеточного цикла, а также со степенью дифференцировки папиллярной карциномы ЩЖ, ее инвазивным биологическим поведением и наличием метастазов в лимфатических узлах [172]. Экспрессия белка p53 в небольших количествах присутствует в нормальной ткани, однако характерно ее существенное увеличение в опухолевых клетках. Увеличение синтеза данного белка связывают с активацией подавления опухолевого роста, воздействуя на различные функциональные пути: останавливает прогрессирование клеточного цикла, программирует гибель клеток, включая апоптоз и аутофагию; вызывают старение; изменение метаболизма, фертильности, а также развития и регуляции стволовых клеток [173]. Отмечается также иммунорегуляторная роль белка p53, что некоторым образом подтверждается в нашем исследовании усилением инфильтрации опухолевой ткани лимфоцитами. Нарушение клеточного цикла и дифференцировки клеток приводит к потере морфофункциональной полярности тироцитов и дисфункции их ферментной системы. Снижение ТГ и ТПО в группе пациентов с раком ЩЖ, развившемся на фоне перенесенного COVID-19, может свидетельствовать о потере клетками дифференцировки и снижении способности продуцировать коллоид. Данные изменения менее выражены у пациентов с раком ЩЖ, не имевших COVID-19 в анамнезе.

Таким образом, установлены существенные отличия в иммунологическом профиле ЩЖ при АИТ и папиллярной карциноме. Малигнизация тироцитов связана с развитием спорадических мутаций в ряде генов и сопровождается серьезными нарушениями клеточного цикла. Инфицирование COVID-19 существенно повышает риски развития АИТ, утяжеляя его течение, а также способствует повышению риска повреждения клеток и развития рака. При этом могут развиваться менее дифференцированные формы рака, имеющие худший прогноз.

Пандемия COVID-19 оказала значимое влияние на структуру хирургической патологии ЩЖ. Восстановление плановой хирургической помощи в постпандемический период выявило противоречивый эффект: рост диагностики ЗНО сопровождался увеличением доли запущенных случаев, что свидетельствует о негативных последствиях отсроченной диагностики в период ограничений. Статистически значимые изменения проявились в росте частоты папиллярного рака, включая увеличение доли его классического подтипа, а также в региональных различиях: в Республике Крым зафиксирован рост метастазирования в лимфатические узлы и капсулярной инвазии, тогда как в г. Севастополе отмечены спорадические случаи мультицентрического роста ПР (32% во время пандемии), не наблюдавшиеся в другие периоды. Динамика токсического зоба демонстрирует временную корреляцию с пандемией — рост оперативных вмешательств в её пиковую фазу с последующей нормализацией, что позволяет предположить связь с психоэндокринными реакциями на стресс и применение иммуносупрессивной терапии, а также непосредственным влиянием вируса SARS-COV-2 на ткань щитовидной железы. Гендерный дисбаланс, выражающийся в преобладании женщин среди пациентов с тиреоидной патологией (особенно в менопаузальном периоде), подтверждает необходимость адресных скрининговых программ для данной группы. Полученные данные указывают на мультифакторность влияния COVID-19, включая прямое вирусное воздействие, опосредованные иммуновоспалительные реакции и ятрогенные эффекты лечения, что требует долгосрочного мониторинга для оценки

отдаленных последствий. Поэтому целесообразно анализировать структуру тиреоидной патологии в динамике, для оценки ранних и отдаленных последствий, что и было сделано в данной работе. Также приоритетным направлением является разработка стратегий минимизации рисков при будущих эпидемиологических кризисах.

ВЫВОДЫ

1. В модели интраназального инфицирования генномодифицированных мышей B6.Cg-Tg (K18-ACE2) коронавирус SARS-CoV-2 вызывает тяжелую форму заболевания с признаками ТОРС, а в тканях ЩЖ в остром, подостром и отдаленном периоде инициирует структурные изменения паренхиматозных и стромальных компонентов на светооптическом уровне исследования с морфологическими признаками воспаления, гиперфункции и гиперплазии интерфолликулярного эпителия.

2. На модели инфицирования золотистых хомяков *Mesocricetus auratus* с естественной восприимчивостью к SARS-CoV-2, вирус вызывает более легкие формы заболевания в сроках 5-10 суток, морфологические изменения ткани ЩЖ имеют схожую динамику. Наиболее значимые изменения в ткани ЩЖ отмечены на 10 сутки и представлены активацией клеточного цикла (усилением митоза и апоптоза, ангиогенеза и перестройками внеклеточного матрикса). Параллельно с этим происходит повышение активности макрофагов, Т-хелперов и В-лимфоцитов.

3. Иммуногистохимические паттерны ЩЖ у лабораторных грызунов при инфицировании SARS-CoV-2 связаны с полом и акцентируют внимание на высокой скорости воспаления у самцов и рисках пролиферации и малигнизации у самок. У самцов пик воспаления регистрируется на пятые сутки, у самок — на десятые сутки. Экспрессия онкомаркеров *Cyclin D1* и *p53* более выражена у самок и максимальна к десятым суткам. Эта динамика демонстрирует патогенез вирус-индуцированного тиреоидита и необходимость персонализированного подхода к наблюдению и лечению пациентов, перенесших SARS-COV-2.

4. Инфицирование человека вирусом Sars-CoV-2 приводит к усилению иммунных процессов и нарушению дифференцировки и функционирования клеток, провоцируя развитие аутоиммунных и опухолевых заболеваний ЩЖ. У пациентов с АИТ и папиллярным раком ЩЖ в зависимости от инфекционного

анамнеза COVID-19 выявлены значимые отличия в экспрессии маркеров воспаления и онкогенеза. У пациентов, перенесших COVID-19, при АИТ выявлено увеличение численности инфильтрирующих лимфоцитов, смещение иммунного ответа в сторону клеточного звена, нарушение клеточного цикла и ферментативной системы тироцитов. Схожие процессы наблюдаются и в ткани папиллярной карциномы ЩЖ после перенесенного COVID-19, с усугублением потери клетками признаков дифференцировки и способности синтезировать характерные для тироцитов белки.

5. В период 2019- 2024 гг. выявлены изменения структуры хирургической патологии ЩЖ в Республике Крым и городе Севастополе. После пандемии отмечен рост доли ЗНО: в Крыму частота рака ЩЖ увеличилась на 9,8–11,5 %, а в Севастополе — на 9,8–33,5 %. Доминировал папиллярный рак, доля которого в Крыму выросла с 24,7% до 31,0 %, а в Севастополе достигла 57,6 % среди патологии ЩЖ, требующей хирургического лечения. В связи с пандемией в Крыму зафиксирован рост числа случаев метастазирования в лимфатические узлы (до 38,6 %), капсульной инвазии (26,3 %), а в Севастополе - мультицентрического роста (31,9 %) папиллярных карцином. В разгар пандемии выявлен рост встречаемости токсического зоба (Крым: с 10,8 % до 26,6 %; Севастополь: с 1,6 % до 11,7 %) с нормализацией к 2024 г.

7. Пандемия COVID-19 в исследуемых регионах привела к росту агрессивных форм рака ЩЖ, что связано не столько с ограничением плановой помощи (эта тенденция в Крыму и Севастополе менее выражена, чем в мире), но и прямым воздействием вируса на ткань ЩЖ, что требует усиления скрининговых программ, применения персонализированного подхода к пациентам с тяжелой формой COVID-19 в анамнезе.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. У пациентов с тяжелой формой COVID-19 в анамнезе часто встречаются явления дисфункции ЩЖ, тиреоидита, связанного с аутосенсбилизацией, приводящие к повреждению тироцитов. Учитывая данный факт на фоне иммунодепрессивной терапии и общего негативного влияния на организм перенесенного ТОРС, вызванного SARS-CoV-2, для таких пациентов рекомендована оценка антител к тиреопероксидазе (ТПО), молекуле тиреоглобулина (Тг) и рецептору тиреотропного гормона (ТТГ), оценка субфебрилитета и сердечнососудистых расстройств с точки зрения вероятной дисфункции ЩЖ, повышенная онконастороженность в диагностике узловых образований с предпочтительным оперативным лечением пациентов III категории по Bethesda и динамическим наблюдением 1 раз в 6 месяцев пациентов II категории по Bethesda.

2. На предоперационном этапе можно предложить пациентам, у которых развивается патология ЩЖ на фоне COVID-19, при проведении обследования для установления рисков малигнизации, исследование методом ИГХ с иммунофенотипированием клеток биоптата ЩЖ (клеточных блоков), полученных при пропитке парафином материала ТАПБ. Это методика как вспомогательная позволяет получить аналог тканевого образца до операции и очень удобна при работе с пунктатом ЩЖ.

3. Разработан алгоритм для своевременного выявления пациентов из группы риска развития АИТ, регулярного их наблюдения по расширенному протоколу с предлагаемыми описанными лабораторными и морфологическими методиками, включая преаналитический и аналитический этап оценки результата.

ПЕРЕЧЕНЬ УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ И СОКРАЩЕНИЙ

АИТ – аутоиммунный тиреоидит

АПФ, АПФ 2 – ангиотензин-2-превращающий фермент

ДИ – доверительный интервал

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ЗНО – злокачественное новообразование

ИГХ – иммуногистохимия

ИФА – иммуноферментный анализ

МКБ – международная классификация болезней

ОШ – отношение шансов

ПЦР – полимеразная цепная реакция

РНК – рибонуклеиновая кислота

T₃ – трийодтиронин

T₄ – тетраiodтиронин, тироксин

ТАПБ – тонкоигольная аспирационная пункционная биопсия

ТГ (Tg) – тиреоглобулин

ТОРС – тяжелый острый респираторный синдром

ТПО – тиреопероксидаза

ТТГ – тиреотропный гормон

УЗИ – ультразвуковое исследование

УО – узловое образование

ЦНИЛ – Центральная научно-исследовательская лаборатория

ЩЖ – щитовидная железа

ACE2 – рецептор ангиотензин-превращающего фермента 2

ASIA – аббревиатура от Autoimmune Syndrome Induced by Adjuvants, аутоиммунный воспалительный синдром, обусловленный адъювантами

АТА – аббревиатура от American Thyroid Association, калькулятор оценки риска злокачественности узлов щитовидной железы

CD4+ - Т-лимфоциты хелперы

CD8+ - Т-лимфоциты супрессоры

COVID-19 - Corona Virus Disease 2019, коронавирусная инфекция 2019 года

ELISPOT – Enzyme-Linked immunoSpot –метод иммуноферментных пятен

исследования клеточного иммунного ответа

HLA – человеческий лейкоцитарный антиген

IL – интерлейкин

M – средняя величина значений

m – ошибка средней величины

Me – медиана

p – достоверность статистического показателя

Q – квартиль

SARS-CoV-2 – Коронавирус 2, связанный с тяжелым острым респираторным синдромом

Sd – стандартное отклонение

S-белок – белок шипа вируса SARS-Cov-2

TMPRSS2 – трансмембранная протеаза серина 2

TNF – фактор некроза опухоли

TNM – аббревиатура от tumor, nodus и metastasis, международная классификация стадий злокачественных новообразований

TUNEL – терминальная дезоксирибонуклеотидилтрансфераз-опосредованная реакция dUTP-метки 3'-гидроксильного конца

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Злокачественные новообразования в России в 2023 году (заболеваемость и смертность) / под ред. А. Д. Каприна. – Москва: МНИОИ им. П. А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2024. – С. 276. – Текст: непосредственный.
2. Каприн, А. Д. Состояние онкологической помощи населению России в 2023 году / А. Д. Каприн, В. В. Старинский, А. О. Шахзадова. – Москва: МНИОИ им. П. А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2024. – С. 262. – Текст : непосредственный.
3. The GLOBOCAN 2022 cancer estimates: Data sources, methods, and a snapshot of the cancer burden worldwide / A. M. Filho, M. Laversanne, J. Ferlay [et al.]. – Текст: непосредственный // *Int J Cancer*. – 2025. – Vol. 156(7). – P. 1336–1346.
4. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries / Hyuna Sung, Rebecca L Siegel, Isabelle Soerjomataram [et al.]. – Текст: непосредственный // *CA Pак J Clin*. – 2021. – Vol.71(3). – P. 209–249.
5. Cancer Statistics, 2021 / R. L. Siegel, K. D. Miller, H. E. Fuchs, A. Jemal. – Текст: непосредственный // *CA Cancer J Clin*. – 2021. – Vol. 71(1). – P. 7–33.
6. Мерабишвили, В. М. Состояние онкологической помощи в россии: эпидемиология и выживаемость больных злокачественными новообразованиями (однолетняя и пятилетняя) по всем локализациям опухолей. Влияние пандемии коронавируса (популяционное исследование) / В. М. Мерабишвили. – Текст: непосредственный // *Злокачественные опухоли*. – 2023. – Т. 13, No 3s1. – С. 85–96.
7. GBD 2021 Lower Respiratory Infections and Antimicrobial Resistance Collaborators. Global, regional, and national incidence and mortality burden of non-COVID-19 lower respiratory infections and aetiologies, 1990–2021: a systematic

analysis from the Global Burden of Disease Study 2021. – Текст: непосредственный // *Lancet Infect Dis.* – 2024. – Vol. 24(9). – P. 974–1002.

8. Effect of the COVID-19 pandemic on surgery for indeterminate thyroid nodules (THYCOVID): a retrospective, international, multicentre, cross-sectional study / F. Medas, Ch. Dobrinja, E. A. Al-Suhaimi [et al.]. – Текст: непосредственный // *The Lancet Diabetes and Endocrinology.* – 2023. – Vol. 11, No. 6. – P. 402–413.

9. Влияние пандемии COVID-19 на хирургию щитовидной железы: ретроспективное исследование / Д. В. Зима, Е. Ю. Зяблицкая, Е. П. Голубинская [и др.]. – Текст: непосредственный // *Вестник современной клинической медицины.* – 2023. – Т. 16, No 1. – С. 28–33.

10. Онкология в период пандемии новой коронавирусной инфекции / А. Д. Каприн, Н. С. Сергеева, П. В. Шегай, Б. Я. Алексеев. – Текст: непосредственный // *Вестник Российской академии наук.* – 2022. – Т. 92, No 8. – С. 722–730.

11. Philippe Caron. Thyroid disorders and SARS-CoV-2 infection: From pathophysiological mechanism to patient management / Philippe Caron. – Текст: непосредственный // *Annales d'Endocrinologie.* – 2020. – Vol. 81, No 5. – P. 507–510.

12. Potential Interaction Between SARS-CoV-2 and Thyroid: A Review / W. Chen, Y. Tian, Z. Li [et al.]. – Текст: непосредственный // *Endocrinology.* – 2021. – Vol. 162(3). – P. bqab004.

13. Gorini, F. COVID-19 and Thyroid: Progress and Prospects / F. Gorini, F. Bianchi, G. Iervasi. – Текст: непосредственный // *Int J Environ Res Public Health.* – 2020. – Vol. 17(18). – P. 6630.

14. Prevalence of thyroid dysfunction in patients with COVID-19: a systematic review / L. Giovanella, R. M. Ruggeri, P. P. Ovčariček [et al.]. – Текст: непосредственный // *Clin Transl Imaging.* – 2021. – Vol. 9. – P. 233–240.

15. Рекомендации по ведению больных COVID-19 и эндокринными заболеваниями в период пандемии / Е. Н. Гринева, Ю. Ш. Халимов, А. Ю.

Бабенко [и др.]. – Текст: электронный <https://www.almazovcentre.ru/?p=62944>
электронный ресурс

16. Уровень ТТГ у больных COVID-19 средней и тяжёлой степени тяжести в остром периоде заболевания / А. А. Михайлова, Д. И. Лагутина, К. А. Головатюк [и др.]. – Текст: непосредственный // Медицинский вестник Юга России. – 2022. – Т. 13(1). – С. 72–79.

17. Морфологическое исследование поджелудочной и щитовидной желез у пациентов II и III волн Covid-19 и молекулярно-биологический анализ щитовидной железы в постковидный период / О. М. Воробьева, Д. О. Григорьева, К. А. Стерхова [и др.]. – Текст: электронный <https://www.medline.ru/public/art/tom24/art66.html>

18. Coronaviruses and endocrine system: a systematic review on evidences and shadows / M. Parolin, M. Parisotto, F. Zanchetta [et al.] – Текст: электронный // Endocr Metab Immune Disord Drug Targets. – 2020. <https://doi.org/10.2174/1871530320666200905123332>;

19. Marazuela, M. Endocrine and metabolic aspects of the COVID-19 pandemic / M. Marazuela, A. Giustina, M. Puig-Domingo. – Текст: непосредственный // Rev Endocr Metab Disord. – 2020. – Vol. 21(4). – P. 495–507.

20. Caron, P. Thyroid disorders and SARS-CoV-2 infection: From pathophysiological mechanism to patient management / P. Caron. – Текст : непосредственный // Ann Endocrinol (Paris). – 2020. – Vol. 81(5). – P. 507–510.

21. COVID-19 endocrinopathy with hindsight from SARS / N. Kothandaraman, A. Rengaraj, B. Xue [et al.]. – Текст: непосредственный // Am J Physiol Endocrinol Metab. – 2021. – Vol. 320(1). – P. E139–E150.

22. Lanzolla, G. Graves' disease and Graves' orbitopathy following COVID-19 / G. Lanzolla, C. Marcocci, M. Marinò. – Текст: непосредственный // J Endocrinol Invest. – 2021. – Vol. 44(9). – P. 2011–2012.

23. Prevalence of thyroid dysfunction in patients with COVID-19: a systematic review / Luca Giovanella, Rosaria M Ruggeri, Petra Petranović Ovcariček

[et al.]. – Текст: непосредственный // Clin Transl Imaging. – 2021. – Vol. 9. – P. 233–240.

24. Inaba, H. Coronavirus Disease 2019 and the Thyroid - Progress and Perspectives / H. Inaba, T. Aizawa. – Текст: электронный // Front Endocrinol (Lausanne). – 2021. – Vol. 12:708333. doi: 10.3389/fendo.2021.708333

25. Pathology of the Thyroid in Severe Acute Respiratory Syndrome / L. Wei, S. Sun, C. H. Xu [et al.]. – Текст: непосредственный // Hum Pathol. – 2007. – Vol. 38. – P. 95–102.

26. The Spectrum of Thyroid Function Tests During Hospitalization for SARS COV-2 Infection / I. Campi, I. Bulgarelli, A. Dubini [et al.]. – Текст: непосредственный // Eur J Endocrinol. – 2021. – Vol. 184(5). – P. 699–709.

27. Impact of COVID-19 on the thyroid gland: an update / L. Scappaticcio, F. Pitoia, K. Esposito [et al.]. – Текст: непосредственный // Rev Endocr Metab Disord. – 2020. – Vol. 22, No 1. – P. 1–13.

28. Влияние SARS-CoV-2 на эндокринную систему / А. Н. Петунина, А. С. Шкода, М. Э. Тельнова [и др.]. – Текст: непосредственный // Медицинское обозрение. – 2021. – Т. 9, No 5. – С. 575–578.

29. Pathology of the thyroid in severe acute respiratory syndrome / L. Wei, S. Sun, C. H. Xu [et al.]. – Текст: непосредственный // Hum Pathol. – 2007. – Vol. 38, No 1. – P. 95–102.

30. Адаптация гипоталамо-гипофизарно-тиреоидной и гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой систем к новому инфекционному заболеванию — COVID-19 в условиях развития COVID-19-пневмонии и/или цитокинового шторма / Е. А. Трошина, Г. А. Мельниченко, Е. С. Сенюшкина, Н. Г. Мокрышева. – Текст: непосредственный // Клиническая и экспериментальная тиреоидология. – 2020. – Т. 16, No 1. – С. 21–27.

31. Lazartigues, E. Endocrine Significance of SARS-CoV-2's Reliance on ACE2 / E. Lazartigues, M. M. F. Qadir, F. Mauvais-Jarvis. – Текст: непосредственный // Endocrinology. – 2020. – Vol. 161, No 9. – P. A2576.

32. Halpert, G. Sars-CoV-2, the Autoimmune Virus / G. Halpert, Y. Shoenfeld. – Текст : непосредственный // *Autoimmun Rev.* – 2020. – Vol. 19, No 12. – P. 102695.
33. Pal, R. COVID-19 and the endocrine system: exploring the unexplored / R. Pal, M. Banerjee. – Текст: непосредственный // *J Endocrinol Invest.* – 2020. – Vol. 43, No 7. – P. 1027–1031.
34. Thyrotoxicosis in patients with COVID-19: the THYRCOV study / A. Lania, M. T. Sandri, M. Cellini [et al.]. – Текст: непосредственный // *European journal of endocrinology.* – 2020. – Vol. 183, No 4. – P. 381–387.
35. Detection of SARS-COV-2 receptor ACE-2 mRNA in thyroid cells: a clue for COVID-19-related subacute thyroiditis. – Текст: непосредственный / M. Rotondi, F. Coperchini, G. Ricci [et al.] // *J Endocrinol Invest.* – 2020. – Vol. 6, No 1. – P. 1–6.
36. Чащина, В. И. Состояние функций щитовидной железы у пациентов после перенесенного заболевания COVID-19 / В. И. Чащина. – Текст: непосредственный // *Международный научный журнал «Инновационная наука».* – 2022. – No 5–1. – С. 107–109.
37. Уровень ТТГ у больных COVID-19 средней и тяжёлой степени тяжести в остром периоде заболевания / А. А. Михайлова, Д. И. Лагутина, К. А. Головатюк [и др.]. – Текст: непосредственный // *Медицинский вестник Юга России.* – 2022. – Т. 13, No 1. – С. 72–79.
38. Thyroid Dysfunction in Relation to Immune Profile Disease Status, and Outcome in 191 Patients with COVID-19 / David Tak Wai Lui, Chi Ho Lee, Wing Sun Chow [et al.]. – Текст: непосредственный // *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism.* – 2021. – Vol. 106, No 2. – P. e926–e935.
39. Naguib, R. Potential relationships between COVID-19 and the thyroid gland: an update / R. Naguib. – Текст: непосредственный // *J Internat Med Res.* – 2022. – Vol. 50, No 2. – P. 1–16.
40. Thyroid and COVID 19: a review on pathophysiological, clinical and organizational aspects / G. Lisco, A. De Tullio, E. Jirillo [et al.]. – Текст: непосредственный // *J Endocrinol Invest.* – 2021. – Vol. 44. – P. 1801–1814.

41. Tee, L. Y. COVID-19 complicated by Hashimoto's thyroiditis. Singapore / L. Y. Tee, S. Harjanto, B. H. Rosario. – Текст: непосредственный // Med J. – 2021. – Vol. 62, No 5. – P. 265–270.
42. COVID-19: new etiological factor Graves' disease? / A. M. Urbanovich, F. V. Lanyush, O. Z. Lischuk, Kh. Yu. Kozlovskaya. – Текст: непосредственный // The international Endocrinology journal. – 2020. – Vol. 16, No 7. – P. 593–597.
43. Nielsen, C. H. Immunoregulation by naturally occurring and disease-associated autoantibodies: binding to cytokines and their role in regulation of T-cell responses / C. H. Nielsen, K. Bendtzen. – Текст: непосредственный // Adv Exp Med Biol. – 2012. – Vol. 750. – P.116–132.
44. Distribution of HLA Allele Frequencies in 82 Chinese Individuals With Coronavirus Disease-2019 (Covid-19) / W. Wang, W. Zhang, J. Zhang [et al.]. – Текст: непосредственный // HLA. – 2020. – Vol. 96(2). – P. 194–6.
45. HLA Allele Frequencies and Susceptibility to COVID-19 in a Group of 99 Italian Patients / A. Novelli, M. Andreani, M. Biancolella [et al.]. – Текст: непосредственный // HLA. – 2020. – Vol. 96(5). – P.610–4.
46. Association of HLA-B22 Serotype With SARS-CoV-2 Susceptibility in Hong Kong Chinese Patients / Y. L. Yung, C. K. Cheng, H. Y. Chan [et al.]. – Текст: непосредственный // HLA. – 2021. – Vol. 97(2). – P. 127–32.
47. Clinical Characteristics of Subacute Thyroiditis Classified According to Human Leukocyte Antigen Typing / N. Ohsako, H. Tamai, T. Sudo [et al.]. – Текст: непосредственный // J Clin Endocrinol Metab. – 1995. – Vol. 80(12). – P. 3653–6.
48. HL-a Antigens as Markers for Disease Susceptibility and Autoimmunity in Graves' Disease / F. C. Grumet, R. O. Payne, J. Konishi, J. P. Kriss. – Текст: непосредственный // J Clin Endocrinol Metab. – 1974. – Vol. 39(6). – P. 1115–9.
49. Tomer, Y. Searching for the Autoimmune Thyroid Disease Susceptibility Genes: From Gene Mapping to Gene Function / Y. Tomer, T. F. Davies. – Текст: непосредственный // Endocr Rev. – 2003. – Vol. 24. – P. 694–717.

50. A Case of Postpartum Thyroiditis Following SARS-CoV-2 Infection / S. Mizuno, H. Inaba, K. I. Kobayashi [et al.]. – Текст: непосредственный // *Endocr J.* – 2021. – Vol. 68(3). – P. 371–4.
51. Association of HLA Antigen and Restriction Fragment Length Polymorphism of T Cell Receptor Beta-Chain Gene With Graves' Disease and Hashimoto's Thyroiditis / M. Ito, M. Tanimoto, H. Kamura [et al.]. – Текст: непосредственный // *J Clin Endocrinol Metab.* – 1989. – Vol. 69. – P. 100–4.
52. Морфологическое исследование поджелудочной и щитовидной желез у пациентов II и III волн COVID-19 и молекулярно-биологический анализ щитовидной железы в постковидный период / О. М. Воробьева, Д. О. Григорьева, К. А. Стерхова [и др.]. – Текст: электронный <https://www.medline.ru/public/art/tom24/art66.html>
53. Novel Core Gene Signature Associated with Inflammation-to-Metaplasia Transition in Influenza A Virus-Infected Lungs / I. A. Savin, A. V. Sen'kova E. P. Goncharova [et al.]. – Текст: непосредственный // *Int J Mol Sci.* – 2024. – Vol. 25(22). – P. 11958.
54. Influenza, SARS-CoV-2, and Their Impact on Chronic Lung Diseases and Fibrosis / S. Soni, L. Antonescu, K. Ro [et al.]. – Текст: непосредственный // *Am. J. Pathol.* – 2024. – Vol. 194. – P. 1807–1822.
55. Epigenetic and Transcriptomic Regulation of Lung Repair during Recovery from Influenza Infection / D. A. Pociask, K. M. Robinson, K. Chen [et al.]. – Текст: непосредственный // *Am. J. Pathol.* – 2017. – Vol. 187. – P. 851–863.
56. Transcriptomic Signature Differences Between SARS-CoV-2 and Influenza Virus Infected Patients / S. Bibert, N. Guex, J. Lourenco [et al.]. – Текст: непосредственный // *Front. Immunol.* – 2021. – Vol. 12. – P. 666163.
57. Profiling of lung SARS-CoV-2 and influenza virus infection dissects virus-specific host responses and gene signatures / A. Kulasinghe, C. W. Tan, A. F. R. D. S. Migliolaro [et al.]. – Текст: непосредственный // *Eur. Respir. J.* – 2021. – Vol. 59. – P. 2101881.

58. Intraepithelial T-Cell Cytotoxicity, Induced Bronchus-Associated Lymphoid Tissue, and Proliferation of Pneumocytes in Experimental Mouse Models of Influenza / S. Sell, I. Guest, K. K. McKinstry [et al.]. – Текст: непосредственный // *Viral Immunol.* – 2014. – Vol. 27. – P. 484–496.

59. A single-cell transcriptomic landscape of the lungs of patients with COVID-19 / S. Wang, X. Yao, S. Ma [et al.]. – Текст: непосредственный // *Nat. Cell Biol.* – 2021. – Vol. 23. – P. 1314–1328.

60. Identification of key genes in SARS-CoV-2 patients on bioinformatics analysis / Ji-Chun Chen, Tian-Ao Xie, Zhen-Zong Lin [et al.]. – Текст: непосредственный // *Biochem Genet.* – 2022. – Vol. 60(3). – P. 1076–1094.

61. SPAG5 promotes proliferation and suppresses apoptosis in bladder urothelial carcinoma by upregulating Wnt3 via activating the AKT/mTOR pathway and predicts poorer survival / J. Y. Liu, Q. H. Zeng, Cao [et al.]. – Текст: непосредственный // *Oncogene.* – 2018. – Vol. 37. – P. 3937–3952.

62. Spatial mapping of SARS-CoV-2 and H1N1 lung injury identifies differential transcriptional signatures / C. Margaroli, P. Benson, N. S. Sharma [et al.]. – Текст: непосредственный // *Cell Rep. Med.* – 2021. – Vol. 2. – P. 100242.

63. Bioinformatics analysis based on high-throughput sequencing data to identify hub genes related to different clinical types of COVID-19 / S. Liu, J. Long, T. Liang [et al.]. – Текст: непосредственный // *Funct. Integr. Genom.* – 2023. – Vol. 23. – P. 71.

64. Lovetruе, B. The AI-discovered aetiology of COVID-19 and rationale of the irinotecan+ etoposide combination therapy for critically ill COVID-19 patients / B. Lovetruе. – Текст: непосредственный // *Med. Hypotheses.* – 2020. – Vol. 144. – P.110180.

65. SPAG5: An Emerging Oncogene / J. He, A. R. Green, Y. Li [et al.]. – Текст: непосредственный // *Trends Cancer.* – 2020. – Vol. 6. – P. 543–547.

66. The PI3K/Akt/mTOR pathway: A potential pharmacological target in COVID-19 / M. S. Basile, E. Cavalli, J. McCubrey [et al.]. – Текст: непосредственный // *Drug Discov. Today.* – 2022. – Vol. 27. – P. 848–856.

67. SPAG5 Expression Predicts Poor Prognosis and is Associated With Adverse Immune Infiltration in Lung Adenocarcinomas / G. Xiao, X. Xu, Z. Chen [et al.]. – Текст: электронный // Clin. Med. Insights. Oncol. – 2023. – Vol. 17. <https://doi.org/10.3892/etm.2020.9205>.

68. An in silico analysis identifies drugs potentially modulating the cytokine storm triggered by SARS-CoV-2 infection / L. Sanchez-Burgos, G. Gómez-López, F. Al-Shahrour, O. Fernandez-Capetillo. – Текст: непосредственный // Sci. Rep. – 2022. – Vol. 12. – P. 1626.

69. COMBATdb: A database for the COVID-19 Multi-Omics Blood Atlas / D. Wang, V. Kumar, K. L. Burnham [et al.]. – Текст: непосредственный // Nucleic Acids Res. – 2022. – Vol. 51. – P. D896–D905.

70. Hanahan, D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions / D. Hanahan. – Текст: непосредственный // Cancer Discov. – 2022. – Vol. 12(1). – P. 31–46.

71. Hanahan, D. The hallmarks of cancer / D. Hanahan, R. A. Weinberg. – Текст: непосредственный // Cell. – 2000. – Vol. 100. – P. 57–70.

72. Hanahan, D. Hallmarks of cancer: the next generation / D. Hanahan, R. A. Weinberg. – Текст: непосредственный // Cell. – 2011. – Vol. 144. – P. 646–74 .

73. Yuan, S. Cellular plasticity in cancer / S. Yuan, R. J. Norgard, B. Z. Stanger. – Текст : непосредственный // Cancer Discov. – 2019. – Vol. 9. – P. 837–51.

74. Epigenomic state transitions characterize tumor progression in mouse lung adenocarcinoma / L. M. LaFave, V. K. Kartha, S. Ma [et al.]. – Текст: непосредственный // Cancer Cell. – 2020. – Vol. 38. – P. 212–28.

75. Emergence of a high-plasticity cell state during lung cancer evolution / N. D. Marjanovic, M. Hofree, J. E. Chan [et al.]. – Текст: непосредственный // Cancer Cell. – 2020. – Vol. 38. – P. 229–46.

76. Extracellular signal-regulated kinase mediates chromatin rewiring and lineage transformation in lung cancer [Internet] / Y. Inoue, A. Nikolic, D. Farnsworth [et al.] // Cancer Biology. – 2020. – Nov. – Текст: электронный Available from: <http://biorxiv.org/lookup/doi/10.1101/2020.11.12.368522>.

77. Hanahan, D. Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment / D. Hanahan, L. M. Coussens. – Текст: непосредственный // *Cancer Cell*. – 2012. – Vol. 21. – P. 309–22.

78. Lee, S. The dynamic nature of senescence in cancer / S. Lee, C. A. Schmitt. – Текст: непосредственный // *Nat Cell Biol*. – 2019. – Vol. 21. – P. 94–101.

79. Wang, B. Senescent cells in cancer therapy: friends or foes? / B. Wang, J. Kohli, M. Demaria. – Текст: непосредственный // *Trends Cancer*. – 2020. – Vol. 6. – P. 838–57.

80. Aster, J. C. The varied roles of notch in cancer / J. C. Aster, W. S. Pear, S. C. Blacklow. – Текст: непосредственный // *Annu Rev Pathol*. – 2017. – Vol. 12. – P. 245–75.

81. Vessel co-option in cancer / E. A. Kuczynski, P. B. Vermeulen, F. Pezzella [et al.]. – Текст: непосредственный // *Nat Rev Clin Oncol*. – 2019. – Vol. 16. – P. 469–93.

82. Boucai, L. Thyroid Cancer: A Review / L. Boucai, M. Zafereo, M. E. Cabanillas. – Текст: непосредственный // *JAMA*. – 2024. – Vol. 331(5). – P. 425–435.

83. Квиткова, Л. В. Факторы риска онкогенеза щитовидной железы. Вклад генетических мутаций, онкогенов, дисэлементозов и ростовых факторов в формирование фолликулярных новообразований щитовидной железы у лиц с висцеральным ожирением / Л. В. Квиткова, А. С. Халимова. – Текст: непосредственный // *Эндокринология: новости, мнения, обучение*. – 2021. – Т. 10, No 1. – С. 41–51.

84. Некоторые генетические маркеры рака щитовидной железы и их прогностическая значимость: обзор литературы / А. К. Муканова, М. Р. Мадиева, М. Ж. Еспенбетова [и др.]. – Текст: непосредственный // *West Kazakhstan Medical Journal*. – 2020. – Т. 62(3). – С. 112–121.

85. Nikiforov, Y. E. Thyroid carcinoma: molecular pathways and therapeutic targets / Y. E. Nikiforov. – Текст: непосредственный // *Mod Pathol*. – 2008. – Vol. 21 Suppl 2 (Suppl 2). – P. S37–43.

86. Mecanismos de señalización intracelular en cáncer de tiroides [Intracellular signaling mechanisms in thyroid cancer] / P. Mondragón-Terán, L. B. López-Hernández, J. Gutiérrez-Salinas [et al.]. – Текст: непосредственный // *Cir Cir.* – 2016. – Vol. 84(5). – P. 434–43.

87. PI3K/Akt/mTOR signaling in medullary thyroid cancer: a promising molecular target for cancer therapy / G. I. Manfredi, A. Dicitore, G. Gaudenzi [et al.]. – Текст: непосредственный // *Endocrine.* – 2015. – Vol. 48(2). – P. 363–370.

88. Blagosklonny, M. V. Cancer prevention with rapamycin / M. V. Blagosklonny. – Текст: непосредственный // *Oncotarget.* – 2023. – Vol. 14. – P. 342–350.

89. The Significance of PAX8-PPAR γ Expression in Thyroid Cancer and the Application of a PAX8-PPAR γ -Targeted Ultrasound Contrast Agent in the Early Diagnosis of Thyroid Cancer / T. Fan, W. Zhu, M. Kong [et al.] // *Contrast Media Mol Imaging.* – 2022;2022:3265342. – Текст: электронный DOI: 10.1155/2022/3265342.

90. Comprehensive analysis of aberrant alternative splicing related to carcinogenesis and prognosis of papillary thyroid cancer / X. Zheng, L. Feng, Y. Yin [et al.]. – Текст: непосредственный // *Aging (Albany NY).* – 2021. – Vol. 13(19). – P. 23149–23168.

91. Stark, R. RNA sequencing: the teenage years / R. Stark, M. Grzelak, J. Hadfield. – Текст: непосредственный // *Nat Rev Genet.* – 2019. – Vol. 20. – P. 631–56.

92. John Hopkins Coronavirus Research Center, 2023. – Текст : электронный <https://coronavirus.jhu.edu/>

93. The COVID-19 outbreak and de-escalation of thyroid cancer diagnosis and treatment / G. Grani, L. Ciotti, V. Del Gatto [et al.]. – Текст: непосредственный // *Endocrine.* – 2022. – Vol. 78. – P. 387–391.

94. The THYCOVIT (thyroid surgery during COVID-19 pandemic in Italy) study: results from a nationwide, multicentric, case-controlled study / F. Medas, G. L. Ansaldo, N. Avenia [et al.]. – Текст: непосредственный // *Updates Surg.* – 2021. – Vol. 73. – P. 1467–1475.

95. The impact of COVID-19 on surgical procedures in Japan: analysis of data from the National Clinical Database / N. Ikeda, H. Yamamoto, A. Taketomi [et al.]. – Текст: непосредственный // *Surg Today*. – 2022. – Vol. 52. – P. 22–35.
96. More aggressive cancer behaviour in thyroid cancer patients in the post-COVID-19 pandemic era: a retrospective study / H. Liu, L. Zhan, L. Guo [et al.]. – Текст: непосредственный // *Int J Gen Med*. – 2021. – Vol. 14. – P. 7197–7206.
97. Morris, L. G. Improved detection does not fully explain the rising incidence of well-differentiated thyroid cancer: a population-based analysis / L. G. Morris, D. Myssiorek. – Текст: непосредственный // *Am J Surg*. – 2010. – Vol. 200. – P. 454–461.
98. A systematic review and meta-analysis of surgery delays and survival in breast, lung and colon cancers: implication for surgical triage during the COVID-19 pandemic / B. A. Johnson, A. C. Waddimba, G. O. Ogola [et al.]. – Текст: непосредственный // *Am J Surg*. – 2021. – Vol.222. – P. 311–318.
99. A delay in the diagnosis of colorectal cancer screened by fecal immunochemical tests during the COVID-19 pandemic: a longitudinal cohort study / F. Ishibashi, D. Shida, S. Suzuki [et al.]. – Текст: непосредственный // *Int J Colorectal Dis*. – 2022. – Vol. 37. – P. 2543–2546.
100. Impact of surgical delay on tumor upstaging and outcomes in estrogen receptor-negative ductal carcinoma in situ patients / A. E. Deliere, K. M. Kuchta, C. E. Pesce [et al.]. – Текст: непосредственный // *J Am Coll Surg*. – 2022. – Vol. 235. – P. 788–798.
101. Impact of COVID-19 restrictions on stage of breast cancer at presentation and time to treatment at an urban safety-net hospital / K. A. Kapp, A-L. Cheng, C. M. Bruton, N. Ahmadiyah. – Текст: непосредственный // *Ann Surg Oncol*. – 2022. – Vol. 29. – P. 6189–6196.
102. The association between COVID-19 lockdowns and melanoma diagnosis and thickness: a multicenter retrospective study from Europe / C. Scharf, G. Brancaccio, A. Di Stefani [et al.]. – Текст: непосредственный // *J Am Acad Dermatol*. – 2022. – Vol. 87. – P. 648–649.

103. Evaluation of COVID-19 impact on delaying diagnostic-therapeutic pathways of lung cancer patients in Italy (COVID-DELAY study): fewer cases and higher stages from a real-world scenario / L. Cantini, G. Mentrasti, G. L. Russo [et al.]. – Текст: электронный // *ESMO Open*. – 2022. 7 doi: 10.1016/j.esmoop.2022.100406.

104. Impact of the first era of the coronavirus disease 2019 pandemic on gastric cancer patients: a single-institutional analysis in Japan / S. Fujita, S. Sakuramoto, Y. Miyawaki [et al.]. – Текст: непосредственный // *Int J Clin Oncol*. – 2022. – Vol. 27. – P. 930–939.

105. Prevalence of thyroid dysfunction in patients with COVID-19: a systematic review / L. Giovanella, R. M. Ruggeri, P. P. Ovčariček [et al.]. – Текст: непосредственный // *Clin Transl Imaging*. – 2021. – Vol. 9. – P. 233–240.

106. SARS-CoV-2-related atypical thyroiditis / I. Muller, D. Cannavaro, D. Dazzi [et al.]. – Текст : непосредственный // *Lancet Diabetes Endocrinol*. – 2020. – Vol. 8. – P. 739–741.

107. COVID-19-associated subacute thyroiditis: evidence-based data from a systematic review / P. Trimboli, C. Cappelli, L. Croce [et al.]. – Текст: электронный // *Front Endocrinol (Lausanne)*. – 2021. – Vol. 12. doi: 10.3389/fendo.2021.707726.

108. Delayed follow-up visits and thyrotropin among patients with levothyroxine during the COVID-19 pandemic / K. Inoue, J. Y. Noh, A. Yoshihara [et al.]. – Текст: электронный // *J Endocr Soc*. – 2021. – Vol. 6 doi: 10.1210/jendso/bvab181

109. Rianto, B. U. D. The difference in thyroid stimulating hormone levels between differentiated carcinoma and benign enlargement / B. U. D. Rianto, A. S. Wibowo, C. Herdini. – Текст: непосредственный // *Int Arch Otorhinolaryngol*. – 2020. – Vol. 24. – P. e73–e79.

110. TSH-TSHR axis promotes tumor immune evasion / Z. Wu, Z. Xi, Y. Xiao [et al.]. – Текст: электронный // *J Immunother Cancer*. – 2022. – Vol. 10 doi: 10.1136/jitc-2021-004049.

111. Increased incidental thyroid cancer in patients with subclinical chronic lymphocytic thyroiditis / D. Jackson, R. S. Handelsman, J. C. Farrá, J. I. Lew. – Текст: непосредственный // *J Surg Res.* – 2020. – Vol. 245. – P. 115–118.

112. Thyroid nodules with indeterminate FNAC according to the Italian classification system: prevalence, rate of operation, and impact on risk of malignancy. An updated systematic review and meta-analysis / P. Trimboli, G. Ferrarazzo, C. Cappelli [et al.]. – Текст: непосредственный // *Endocr Pathol.* – 2022. – Vol. 33. – P. 457–471.

113. Pathogenesis and transmission of SARS-CoV-2 in golden hamsters / S. F. Sia, L. M. Yan, A. W. H. Chin [et al.]. – Текст: непосредственный // *Nature.* – 2020. – Vol. 583(7818). – P. 834–838.

114. Мавликеев, М. О. Гистологическая техника в патоморфологической лаборатории : учебно-методическое пособие / М. О. Мавликеев, А. П. Киясов, Р. В. Деев. – Москва: Практическая медицина, 2023. – 112 с. – Текст: непосредственный.

115. Иммуногистохимические методы: руководство / Ed. by George L. Kumar, Lars Rudbeck.: ДАКО / Пер. с англ. под ред. Г. А. Франка и П. Г. Малькова. – Москва, 2011. – 224 с. – Текст: непосредственный.

116. Current and innovative methods for the diagnosis of COVID 19 infection (Review) / Luca Falzone, Giuseppe Gattuso, Aristidis Tsatsakis [et al.]. – Текст: непосредственный // *International Journal of Molecular Medicine.* – 2021. – Vol. 47. – P. 100.

117. Cox, R. Not just antibodies: B cells and T cells mediate immunity to COVID-19 / R. Cox, Karl A Brokstad. – Текст: непосредственный // *Nat Rev Immunol.* – 2020. – Vol. 20. – P. 581–582.

118. Distinct features of SARSCoV-2-specific IgA response in COVID-19 patients / Yu H-qiong, Sun B-qing, Fang Z-fu, [et al.]. – Текст : электронный // *Eur Respir J.* – 2020. in press (<https://doi.org/10.1183/13993003.01526-2020>).

119. Standard operating procedures for biobank in oncology / G. Bonizzi, L. Zattoni, M. Capra [et al.]. – Текст : электронный // Front Mol Biosci. – 2022. – Vol.26, N 9. – Режим доступа <https://doi.org/10.3389/fmolb.2022.967310>.

120. Current aspects in biobanking for personalized oncology investigations and treatments / L. Policiuc, A. Nutu, O. Zanoaga [et al.]. – Текст: непосредственный // Med Pharm Rep. – 2023. – Vol. 96(3). – P.235–245.

121. Биоресурсные коллекции: алгоритмы формирования и функционирования, фундаментальная и прикладная значимость / Е. Н. Кособокова, Н. А. Калинина, М. А. Барышникова [и др.]. – Текст: непосредственный // Кардиоваскулярная терапия и профилактика. – 2023. – Т. 22, N 10. – С. 26–36.

122. Биобанкирование в стационаре многопрофильного научного медицинского центра как потенциал для широкого спектра научных исследований. Часть I. Организационно-методические аспекты / А. Л. Борисова, О. В. Копылова, М. С. Покровская [и др.]. – Текст: непосредственный // Кардиоваскулярная терапия и профилактика. – 2023. – Т. 22, N 11. – С. 57–63.

123. Особенности формирования клинической аннотации биообразцов / О. В. Копылова, А. И. Ершова, А. Л. Борисова [и др.]. – Текст: непосредственный // Кардиоваскулярная терапия и профилактика. – 2023. – Т. 22, N 11. – С. 89–98.

124. Биобанкинг как отрасль биотехнологий / С. В. Анисимов, О. К. Гранстрем, А. А. Сазанов, В. Ю. Пруцкий. – Текст: непосредственный // Исследования и практика в медицине. – 2015. – N 2(S1). – С. 43.

125. Биобанки в онкологии: мировой опыт и российская действительность / А. Д. Каприн, С. А. Иванов, В. А. Петров [и др.]. – Текст: непосредственный // Современная онкология. – 2020. – Т. 22, N 2. – С. 82–88.

126. Онкологический биобанк НМИЦ радиологии / Н. Н. Духова, С. М. Самборский, Л. Ю. Гривцова [и др.]. – Текст: непосредственный // Евразийское Научное Объединение. – 2020. – N 8-3(66). – С. 143–144.

127. Стандарт по биобанкированию ISO 20387. Анализ требований и опыт внедрения / А. Л. Борисова, М. С. Покровская, А. Н. Мешков [и др.]. – Текст:

непосредственный // Клиническая лабораторная диагностика. – 2020. – Т. 65, N 9. – С. 587–592.

128. Формирование биобанка в структуре научных и лечебно-диагностических учреждений и перспективы межрегиональной интеграции / Р. С. Калинин, О. В. Голева, Р. А. Илларионов [и др.]. – Текст: непосредственный // Кардиоваскулярная терапия и профилактика. – 2022. – Т. 21, N 11. – С. 13–24.

129. Биобанкирование : национальное руководство / С. В. Анисимов, Т. М. Ахмеров, О. П. Балановский [и др.]. – Москва : ООО «Издательство ТРИУМФ», 2022. – 308 с. – Текст: непосредственный.

130. Тирас, Х. П. Биобанки в контексте науки, технологии и образования / Х. П. Тирас. – Текст: непосредственный // Генетические технологии и медицина: доктрина, законодательство, практика. Министерство науки и высшего образования Российской Федерации; Московский государственный юридический университет имени О. Е. Кутафина (МГЮА). – Москва, 2021. – С. 122.

131. Биоресурсная коллекция клеточных линий и первичных опухолей ФГБУ НМИЦ онкологии Минздрава России / С. В. Тимофеева, С. Ю. Филиппова, А. О. Ситковская [и др.]. – Текст: непосредственный // Кардиоваскулярная терапия и профилактика. – 2022. – Т. 21, N 11. – С. 44–50.

132. Мальков, П. Г. Рациональный выбор технологий и оборудования при материально-техническом оснащении патоморфологической лаборатории / П. Г. Мальков, Г. А. Франк, В. П. Сидорова. – Текст: непосредственный // Архив патологии. – 2010. – Т. 72, N 1. – С. 45–50.

133. Перспективы биобанкирования для биомедицинских исследований в области эндокринологии / К. А. Чубакова, Е. М. Каменских, Ю. О. Бахарева, Т. В. Саприна. – Текст: непосредственный // Кардиоваскулярная терапия и профилактика. – 2022. – Т. 21, N 11. – С. 88–96.

134. Биобанк ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России как ресурс для проведения исследований в области персонифицированной медицины / О. И. Кит, С. В. Тимофеева, А. О. Ситковская [и др.]. – Текст: непосредственный // Современная онкология. – 2022. – Т. 24, N 1. – С. 6–11.

135. Colorectal Cancer Organoid-Stroma Biobank Allows Subtype-Specific Assessment of Individualized Therapy Responses / H. F. Farin, M. H. Mosa, B. Ndreshkjana [et al.]. – Текст: непосредственный // *Cancer Discov.* – 2023. – Vol.13(10). – P. 2192–2211.

136. Alleanza Contro il Cancro (ACC) Pathology and Biobanking Working Group. Basic principles of biobanking: from biological samples to precision medicine for patients / L. Annaratone, G. De Palma, G. Bonizzi [et al.]. – Текст: непосредственный // *Virchows Arch.* – 2021. – Vol.479(2). – P. 233–246.

137. UK Biobank: a globally important resource for cancer research / M. C. Conroy, B. Lacey, J. Bešević [et al.]. – Текст: непосредственный // *Br J Cancer.* – 2023. – Vol.128(4). – P. 519–527.

138. Is early-onset cancer an emerging global epidemic? Current evidence and future implications / T. Ugai, N. Sasamoto, H. Y. Lee [et al.]. – Текст: непосредственный // *Nat Rev Clin Oncol.* – 2022. – Vol.19(10). – P. 656–673.

139. The OncoLifeS data-biobank for oncology: a comprehensive repository of clinical data, biological samples, and the patient's perspective / G. Sidorenkov, J. Nagel, C. Meijer [et al.]. – Текст : электронный // *J Transl Med.* – 2019. – Vol.17(1). – Режим доступа <https://doi.org/10.1186/s12967-019-2122-x>.

140. Патент № 2805941С1. Российская Федерация, МПК G01N 33/574, G01N 33/68, A61B 5/026, A61B 5/00. Способ комплексной дифференциальной диагностики доброкачественных и злокачественных узловых образований щитовидной железы : № 2022120414: заявл. 25.07.2022 : опубл. 24.10.2023 /Зима Д. В., Безруков О. Ф., Зяблицкая Е. Ю.,Голубинская Е. П., Макалиш Т. П., Максимова П. Е., Непритимова Е. А., Кубышкин А. В. – 13 с. – Текст: непосредственный.

141. Green tea extract modulates lithium-induced thyroid follicular cell damage in rats / S. M. Zaki, G. H. A. Hussein, G. M. Helal [et al.]. – Текст: непосредственный // *Folia Morphol (Warsz).* – 2022. – Vol.81(3). – P.594–605.

142. Resistance to Fas-Mediated Apoptosis Does Not Correlate to Structural Alterations or Expression Changes of the Death Receptor in Papillary Thyroid

Carcinomas / Fanourakis, A. A. Saetta, A. C. Lazaris [et al.]. – Текст: непосредственный // *Pathobiology*. – 2018. – Vol.85(5-6). – P. 304–310.

143. Инновационные технологии в диагностике и безопасном хирургическом лечении заболеваний щитовидной железы / П. Н. Ромащенко, Н. А. Майстренко, Д. С. Криволапов, М. С. Симонова. – Текст: непосредственный // *Вестник Российской военно-медицинской академии*. – 2022. – Т. 24, N 1. – С. 9–15.

144. The ever-increasing importance of cancer as a leading cause of premature death worldwide / F. Bray, M. Laversanne, E. Weiderpass, I. Soerjomataram. – Текст: непосредственный // *Cancer*. – 2021. – Vol. 127(16). – P. 3029–3030.

145. Rosai and Ackerman's. *Surgical Pathology*. – eleventh edition / Rosai and Ackerman's. – Elsevier Science, 2018. – 2800 p. – Текст: непосредственный.

146. Syed, Z. Ali. *The Bethesda System for Reporting Thyroid Cytopathology. Definitions, Criteria, and Explanatory Notes Third Edition* / Syed Z. Ali, Zubair Baloch // *J Am Soc Cytopathol*. – 2023. – Vol. 12(5). – P. 319–325.

147. Liang, W. Cancer patients in SARS-CoV-2 infection: a nationwide analysis in China / W. Liang. – Текст: непосредственный // *Lancet Oncol*. – 2020. – Vol. 21(3). – P. 335–7.

148. Karakaya, G. Course and Consequences of COVID-19 Infection in Cancer Patients: Single-Center Experience / G. Karakaya, S. Peduk, G. Tazegul. – Текст: непосредственный // *EJMI*. – 2021. – Vol. 5(3). – P. 398–403.

149. Case fatality rate of cancer patients with COVID-19 in a New York hospital system / V. Mehta, S. Goel, R. Kabarriti [et al.]. – Текст: непосредственный // *Cancer Discov*. – 2020. – Vol. 10(7). – P. 935–41.

150. Patients with cancer appear more vulnerable to SARS-COV-2: a multi-center study during the COVID-19 outbreak / M. Dai, D. Liu, M. Liu [et al.]. – Текст: непосредственный // *Cancer Discov*. – 2020. – Vol.10(6). – P. 783–91.

151. Onder, G. Case-fatality rate and characteristics of patients dying in relation to COVID-19 in Italy/ G. Onder, G. Rezza, S. Brusaferro. – Текст: непосредственный // *JAMA*. – 2020. – Vol. 323(18). – P. 1775–6.

152. Воробьев, С. Л. Морфологическая диагностика заболеваний щитовидной железы (цитология для патологов, патология для цитологов): атлас / С. Л. Воробьев. – Санкт-Петербург : «Издательско-полиграфическая компания «КОСТА», 2014. – 104 с. – Текст: непосредственный.

153. Guner, A. Biomarkers for evaluating the inflammation status in patients with cancer / A. Guner, H. I. Kim. – Текст: непосредственный // J. Gastric Cancer. – 2019. – Vol. 19(3). – P. 254–277.

154. Impact of COVID-19 on Disease Progression and Postoperative Complications in Patients with Head and Neck Cancer / A. R. Nadarajan, N. A. George, S. Thomas [et al.]. – Текст: непосредственный // Indian J Surg Oncol. – 2023. – Vol.8. – P.1–5.

155. Delays and Disruptions in Cancer Health Care Due to COVID-19 Pandemic: Systematic Review / R. Riera, Â. M. Bagattini, R. L. Pacheco [et al.]. – Текст: непосредственный // JCO Glob Oncol. – 2021. – Vol.7. – P. 311–323.

156. Impact of the COVID-19 pandemic on cancer care / J. Huang, H. H. X. Wang, Z. J. Zheng, M. C. S. Wong. – Текст: непосредственный // Hong Kong Med J. – 2022. – Vol.28(6). – P. 427–429.

157. Rea, L. M. Designing and conducting survey research / L. M. Rea, R. A. Parker. – San Francisco: Jossey-Bass, Inc.; 2014. – 304 p. – Текст: непосредственный.

158. The impact of the COVID-19 pandemic on cancer care / M. Richards, M. Anderson, P. Carter [et al.]. – Текст: непосредственный // Nat Cancer. – 2020. – Vol.1(6). – P. 565–567.

159. The impact of the COVID-19 pandemic on cancer deaths due to delays in diagnosis in England, UK: a national, population-based, modelling study / C. Maringe, J. Spicer, M. Morris [et al.]. – Текст: непосредственный // Lancet Oncol. – 2020. – Vol. 21(8). – P. 1023–1034.

160. Incidental versus clinical diagnosis of papillary thyroid microcarcinoma. Long-term prognosis / J. Ruiz, A. Ríos, J. M. Rodríguez [et al.]. – Текст:

непосредственный // *Endocrinol Diabetes Nutr (Engl Ed)*. – 2020. – Vol. 67(5). – P. 317–325.

161. Tatal, E. Systematic review of COVID-19 and autoimmune thyroiditis / E. Tatal, R. Ozaras, H. Leblebicioglu. – Текст : электронный // *Travel Med Infect Dis*. – 2022. – Vol.47. – Режим доступа <https://doi.org/10.1016/j.tmaid.2022.102314>

162. Sex disparities in thyroid cancer: a SEER population study / P. Li, Y. Ding, M. Liu [et al.]. – Текст: непосредственный // *Gland Surg*. – 2021. – Vol. 10(12). – P. 3200–3210.

163. Targeting cyclin D1 as a therapeutic approach for papillary thyroid carcinoma / P. Li, Y. Ding, M. Liu [et al.]. – Текст : электронный // *Front. Oncol*. – 2023. – Vol.13. – Режим доступа doi: 10.3389/fonc.2023.1145082

164. COVID-19 associated thyroid dysfunction and other comorbidities and its management using phytochemical-based therapeutics: a natural way / Arpana Parihar, Shivani Malviya, Raju Khan [et al.]. – Текст : электронный // *Biosci Rep*. – 2023. – Vol.43 (7). – Режим доступа <https://doi.org/10.1042/BSR20230293>

165. Ding, W. Progress in diagnosing and treating thyroid squamous cell carcinoma under the 5th edition of WHO classification / W. Ding, X. Gao, X. Ran. – Текст : электронный // *Front Endocrinol (Lausanne)*. – 2024. – Vol.18.14. – Режим доступа doi: 10.3389/fendo.2023.1273472. PMID: 38303977; PMCID: PMC10833225.

166. Sex differences in immune responses that underlie COVID-19 disease outcomes / T. Takahashi, M. K. Ellingson, P. Wong [et al.]. – Текст: непосредственный // *Nature*. – 2020. – Vol. 588(7837). – P. 315–320.

167. COVID-19 associated thyroid dysfunction and other comorbidities and its management using phytochemical-based therapeutics: a natural way / A. Parihar, S. Malviya, R. Khan [et al.]. – Текст : электронный // *Biosci Rep*. – 2023. – Vol. 43(7). – Режим доступа BSR20230293. doi:10.1042/BSR20230293

168. Thyroid function analysis in COVID-19: A retrospective study from a single center / J. Malik, A. Malik, M. Javaid [et al.]. – Текст : электронный // *PLoS One*. – 2021. – Vol.16(3). – Режим доступа doi:10.1371/journal.pone.0249421.

169. The clinicopathological significance of Ki67 in papillary thyroid carcinoma: a suitable indicator? / J. Tang, C. Gui, S. Qiu [et al.]. – Текст: непосредственный // World J Surg Oncol. – 2018. – Vol.16(1). – P. 100.

170. Ding,W. Progress in diagnosing and treating thyroid squamous cell carcinoma under the 5th edition of WHO classification / W. Ding, X. Gao, X. Ran. – Текст : электронный // Front Endocrinol (Lausanne). – 2024. –Vol.14. – Режим доступа doi:10.3389/fendo.2023.1273472

171. Downregulation of miR 193a 3p via targeting cyclin D1 in thyroid cancer / X. J. Li, R. Wen , D. Y. Wen [et al.]. – Текст: непосредственный // Mol Med Rep. – 2020. – Vol.22(3). – P. 2199–2218.

172. Clinical value of Cyclin D1 and P21 in the differential diagnosis of papillary thyroid carcinoma / C. C. Wang, D. D. Lu, M. H. Shen [et al.]. – Текст : непосредственный // Diagn Pathol. – 2023. – Vol.18(1). – P. 123.

173. P53 Activation Effect in the Balance of T Regulatory and Effector Cell Subsets in Patients With Thyroid Cancer and Autoimmunity / A. Arena, A. Stiglian, E. Belcastro [et al.]. – Текст : электронный // Front Immunol. –2021. – Vol.12. – Режим доступа doi: 10.3389/fimmu.2021.728381.