

OPEN ACCESS

DOI 10.25040/ntsh2021.02.19

Для листування: 79010 Львів, вул.
Пекарська, 69.

е-мейл: slipesky@gmail.com

Надійшла до редакції: 15.08.2021

Прийнята до друку: 03.12.2021

Опублікована онлайн: 29.12.2021



© Олег Дуда,
Ніна Бойко,
Роман Сліпецький
2021

ORCID IDs

Олег Дуда:

<https://orcid.org/0000-0001-8910-7629>

Ніна Бойко:

<https://orcid.org/0000-0002-8308-0071>

Роман Сліпецький:

<https://orcid.org/0000-0002-5385-8014>

Дозвіл комісії з біоетики про проведення досліджень: протокол №10 від 12 грудня 2017 року.

ВНЕСОК АВТОРІВ: Усі автори в однаковій мірі зробили внесок у проведення дослідження, підготовку рукопису, його редагування, а також прочитали та затвердили подану версію.

Конфлікт інтересів: немає.

Фінансування. Автори не отримали жодної фінансової підтримки для свого дослідження.

Роль імуногістохімічних маркерів для прогнозування виникнення рецидиву або смерті у пацієнтів з медулярним раком щитоподібної залози

Олег Дуда, Ніна Бойко, Роман Сліпецький

Львівський національний медичний університет
імені Данила Галицького, м. Львів, Україна

Вступ. Медулярний рак щитоподібної залози (МРЩЗ) належить до класу рідкісних нейроендокринних агресивних пухлин та виникає з парафолікулярних клітин (С-клітин). Важливою сучасною проблемою є розробка способів передбачення появи рецидиву даної хвороби.

Мета роботи. Визначити роль імуногістохімічних онкомаркерів медулярного раку щитоподібної залози у прогнозуванні виникнення рецидиву чи смерті.

Методи дослідження. Аналіз проспективного дослідження включав 22 пацієнти з спорадичним типом МРЩЗ, з яких у 5 хворих розвинувся рецидив захворювання та 4 – померли на кінець 10-тирічного (120 місяців) періоду спостереження. Імуногістохімічні дослідження проводили з використанням моноклональних антитіл онкомаркерів

кальцитоніну, хромограніну А, віментину та Ki-67 на базі "Західноукраїнської гістологічної лабораторії" (м. Львів, Україна).

Результати. Розбіжність поміж даними гістологічних та імуногістохімічних досліджень при МРЩЗ становить 12,0%, що вказує на гіпердіагностику даної нозології та аргументує важливість проведення імуногістохімічних досліджень для верифікації діагнозу. У пацієнтів в яких виник рецидив МРЩЗ був достовірно ($p < 0,05$) менший рівень експресії кальцитоніну (5,00 [5,00; 5,00] балів) порівняно з пацієнтами у яких рецидив не виник, де даний показник становив 6,00 [6,00; 7,00] балів. У пацієнтів з МРЩЗ збільшення рівня експресії кальцитоніну достовірно поєднувалось зі збільшенням рівня експресії хромограніну А ($r = +0,49$, $p = 0,02$); аналогічний зв'язок виявлено щодо часток імунопозитивних клітин даних онкомаркерів: $r = +0,68$, $p = 0,001$. Водночас встановлено, що збільшення рівня експресії кальцитоніну достовірно поєднувалось з зменшенням рівня експресії Ki-67 ($r = -0,52$, $p = 0,02$). Також було встановлено, що збільшення рівня експресії віментину поєднується зі збільшенням експресії ($r = +0,64$, $p = 0,001$) та частки імунопозитивних клітин хромограніну А ($r = +0,45$, $p = 0,038$).

Висновки. Низькі рівні експресії кальцитоніну є прогностично несприятливими маркерами щодо появи рецидиву МРЩЗ. Специфічні онкомаркери є важливими у процесі лікування та для динамічного спостереження за пацієнтами з МРЩЗ.

Ключові слова: медулярний рак, щитоподібна залоза, онкомаркери, кальцитонін, хромогранін А, віментин, Ki-67, рецидив, смерть.

The role of immunohistochemical markers in predicting recurrence or death in patients with medullary thyroid cancer

Oleh Duda, Nina Boyko, Roman Slipetsky

Danylo Halytsky Lviv National Medical University, Lviv, Ukraine

Introduction. Medullary thyroid cancer (MTC) belongs to a class of rare neuroendocrine aggressive tumors and appears from parafollicular cells (C-cells). An important modern problem is the development of ways to predict the recurrence of this disease.

Aim. Determine the role of immunohistochemical tumor markers of medullary thyroid cancer in predicting recurrence or death.

Materials and methods. The analysis of the prospective study included 22 patients with sporadic MTC, 5 of whom have developed a recurrence and 4 have died at the end of the 10-year (120 months) follow-up period. Immunohistochemical examinations were performed using monoclonal antibodies of tumor markers calcitonin, chromogranin A, vimentin and Ki-67 at "Western Ukrainian Histological Laboratory" (Lviv city, Ukraine).

Results. The discrepancy between the data of histological and immunohistochemical examinations in MTC is 12.0%, which indicates the hyperdiagnosis of this nosology and argues the importance of performing immunohistochemical examinations to verify the diagnosis. Patients who had a recurrence of MTC had significantly ($p < 0.05$) lower levels of calcitonin expression (5.00 [5.00; 5.00] points) compared to patients who did not relapse, where this figure was 6.00 [6.00; 7.00] points. In patients with MTC, an increase in calcitonin expression was significantly associated with an increase in chromogranin A expression ($r = + 0.49$, $p = 0.02$); a similar relationship was found for proportions of immunopositive cells of these tumor markers: $r = + 0.68$, $p = 0.001$. At the same time, the increased level of calcitonin expression was found to be combined with the decreased level of Ki-67 expression ($r = -0.52$, $p = 0.02$). The increased level of vimentin expression was found to be combined with an increase in the expression ($r = + 0.64$, $p = 0.001$) and the proportion of immunopositive cells of chromogranin A ($r = + 0.45$, $p = 0.038$).

Conclusions. Low levels of calcitonin expression are prognostically unfavorable markers for the recurrence of MTC. Specific tumor markers are important for the treatment process and the dynamic monitoring of patients with MTC.

Keywords: medullary cancer, thyroid gland, tumor markers, calcitonin, chromogranin A, vimentin, Ki-67, recurrence, death.

OPEN ACCESS

DOI 10.25040/ntsh2021.02.19

For correspondence: 79010 Lviv, Pekarska Str., 69.

E-mail: slipesky@gmail.com

Received: Aug, 15, 2021

Accepted: Dec, 3, 2021

Published online: Dec, 29, 2021



© Олег Дуда,
Ніна Бойко,
Роман Сліпецький
2021

ORCID IDs

Oleh Duda:

<https://orcid.org/0000-0001-8910-7629>

Nina Boyko:

<https://orcid.org/0000-0002-8308-0071>

Roman Slipetsky:

<https://orcid.org/0000-0002-5385-8014>

Author Contributions

All authors contributed equally to the research, first draft of the manuscript, manuscript revision, and read and approved the submitted version.

Resolution of the Bioethics Commission on performing research: Protocol №10 of December 12, 2017.

Conflict of interests: absent.

Funding. The authors did not receive any funding for their study.

Вступ

Медулярний рак щитоподібної залози (МРЩЗ) належить до класу рідкісних нейроендокринних агресивних пухлин, виникає з парафолікулярних клітин (С-клітин), що відповідають за вироблення та секрецію численних пептидів, включаючи кальцитонін. У структурі злоякісних новоутворень щитоподібної залози медулярний рак складає 5-7% та смертність від нього досягає 14% [1, 2]. Безсимптомне протікання МРЩЗ призводить до пізньої діагностики, зокрема у половини хворих діагностуються регіонарні метастази [3, 4]. Запущені форми МРЩЗ вимагають високоспеціалізованого лікування у медичних закладах, що займаються лікуванням пухлин голови та шиї, а хірурги мають навички оперативного лікування на гортані, глотці, стравоході та лімфатичних вузлах шиї і середостіння [5].

За перебігом захворювання МРЩЗ займає проміжне місце між високодиференційованими та недиференційованими формами раку щитоподібної залози. МРЩЗ володіє високим ступенем клінічної агресивності і характеризується схильністю до рецидиву захворювання [6].

Показники кальцитоніну (Кт) та хромограніну А в крові використовуються з метою діагностики рецидиву та моніторингу прогресування хвороби, хоча існують приклади невідповідності даних показників з рецидивом захворювання [7, 8]. Зниження рівня Кт в крові пацієнтів у післяопераційному періоді свідчить про радикальність проведеного лікування, а його підвищення у подальшому (вище 100 пг/мл) – про наявність рецидиву хвороби чи метастазування пухлини [9, 10, 11]. Інші дослідники вважають достовірними стимуляційні тести з Кт [12]. Також зустрічаються випадки біохімічного рецидиву – відсутність клінічного рецидиву при високих рівнях сироваткового Кт [13, 14]. Біохімічна Кт ремісія вважається кращим прогностичним фактором для безрецидивної виживаності [15]. Враховуючи таку велику кількість різнопланових прогностичних чинників важливим залишається питання уніфікованого алгоритму діагностики та спостереження за такими хворими. Мета роботи: визначити роль імуногістохімічних онкомаркерів медулярного раку щитоподібної залози у прогнозуванні виникнення рецидиву чи смерті.

Матеріали і методи досліджень

У дослідження було включено показники 25 пацієнтів, які проходили лікування з приводу медулярного раку щитоподібної залози у Львівському державному онкологічному регіональному лікувально-діагностичному центрі, Львівській обласній клінічній лікарні та у Вінницькому обласному онкологічному диспансері. Нами було проведено проспективне дослідження: забір матеріалу проводився під час оперативного втручання, а класифікація по групах здійснювалась після завершення терміну спостереження. Дослідження відповідає Гельсінській декларації та отримало дозвіл комісії з біоетики про проведення досліджень (протокол №10 від 12 грудня 2017 року).

Первинно гістологічні дослідження підтвердили діагноз МРЩЗ у всіх 25 пацієнтів. У подальшому були проведені імуногістохімічні дослідження, які показали, що МРЩЗ діагностовано тільки у 22 пацієнтів. Тобто, у 12% випадків (у трьох пацієнтів) мала місце гіпердіагностика МРЩЗ, що доводить важливість проведення імуногістохімічної оцінки.

Кінцево у аналіз проспективного дослідження було включено 22 пацієнти з МРЩЗ, з яких у 5 хворих розвинувся рецидив захворювання та 4 – померли на кінець 10-тирічного (120 місяців) періоду спостереження. Причому, у 5 осіб з рецидивом смерть настала у трьох (60,0%) пацієнтів. З числа 4-х померлих лише один пацієнт не мав підтвердженого рецидиву. Враховуючи вищенаведене, було проведено порівняння отриманих імуногістохімічних показників у наступних групах:

- а) пацієнтів з рецидивом (n=5) та пацієнтів, в яких рецидив за період спостереження не виник (n=17);
- б) у пацієнтів, які померли (n=4) та у осіб, які були живими на кінець дослідження (n=18).

Порівняння хворих на МРЩЗ за статтю у групах залежно від кінцевого їх статусу на кінець дослідження не виявило суттєвої різниці: з 5-ти досліджуваних чоловіків помер 1 хворий, що становить 20,0%, а з 17 жінок – померло 3 хворих, що складає 17,7% (p>0,05).

Імуногістохімічні дослідження проводили з використанням моноклональних антитіл онкомаркерів кальцитоніну, хромограніну А, віментину та Ki-67 на базі «Західноукраїнської

Introduction

Medullary thyroid cancer (MTC) belongs to a class of rare neuroendocrine aggressive tumors, arising from parafollicular cells (C-cells), which are responsible for the production and secretion of numerous peptides, including calcitonin. In the structure of malignant neoplasms of the thyroid gland, medullary cancer accounts for 5–7% and mortality from it reaches 14% [1, 2]. Asymptomatic MTC leads to late diagnosis, moreover, half of the patients are diagnosed with regional metastases [3, 4]. Advanced forms of MTC require a highly specialized treatment in medical establishments that provide treatment of tumors in the head and neck, while surgeons have the skills of surgical treatment of the larynx, pharynx, esophagus and lymph nodes of the neck and mediastinum [5].

In the course of the disease, MTC occupies an intermediate position between highly differentiated and undifferentiated forms of thyroid cancer. MTC has a high degree of clinical aggression and is characterized by a tendency to recurrence [6].

Calcitonin (Ct) and chromogranin A levels in the blood are used to diagnose recurrence and monitor disease progression, although there are examples of discrepancies between these indicators and disease recurrence [7, 8]. The decrease in the blood levels of Ct of patients in the postoperative period indicates the radicality of the treatment, and its increase in the future (above 100 pg/ml) indicates the recurrence of the disease or tumor metastasis [9, 10, 11]. Other researchers believe the stimulation tests with Ct to be reliable [12]. There are also cases of biochemical recurrence – the absence of clinical recurrence despite high levels of serum Ct [13, 14]. Biochemical Ct remission is considered the best prognostic factor for survival with no recurrence [15]. Considering such a large number of diverse prognostic factors, the issue of a unified algorithm for the diagnosis and monitoring of such patients remains important. The aim of the study is to determine the role of immunohistochemical tumor markers of medullary thyroid cancer in predicting recurrence or death.

Materials and methods. The study included indicators of 25 patients treated for medullary thyroid cancer at Lviv State Regional Oncolo-

gy Treatment and Diagnostic Center, Lviv Regional Clinical Hospital and Vinnytsia Regional Oncological Center. We conducted a prospective study: the material was collected during surgery, and the classification into groups was carried out after the end of the monitoring period. The study meets the requirements of the Declaration of Helsinki and was approved by the Bioethics Commission on research performance (protocol No. 10 of December 12, 2017).

Initially, histological examination confirmed the diagnosis of MTC in all 25 patients. Subsequently, immunohistochemical examinations were performed, which showed that MTC was diagnosed only in 22 patients. Thus, in 12% of cases (in three patients), there was a hyperdiagnosis of MTC, which proves the importance of immunohistochemical evaluation.

Finally, 22 patients with MTC were included in the analysis of the prospective study, of whom 5 patients have developed a recurrence and 4 have died at the end of the 10-year (120 months) follow-up period. Moreover, among 5 individuals with recurrence, 3 have died (60.0%). Out of 4 deaths, only one patient had no confirmed recurrence. Given the above, we have compared the obtained immunohistochemical indicators in the following groups:

- a) patients with recurrence ($n = 5$) and patients who did not develop recurrence during the observation period ($n=17$);
- b) patients who died ($n = 4$) and those who were alive at the end of the study ($n=18$).

Comparison of patients with MTC by sex in groups depending on their final status at the end of the study did not reveal a significant difference: among 5 men studied, 1 patient died, which accounted for 20.0%; and among 17 women, 3 patients died, which accounted for 17.7% ($p>0.05$).

Immunohistochemical examinations were performed using monoclonal antibodies of tumor markers calcitonin, chromogranin A, vimentin and Ki-67 based on "Western Ukrainian Histological Laboratory" (Lviv city, Ukraine). For the convenience of findings analysis, the number of pluses, determined by the results of immunohistochemical examinations, was translated into a 7-point rank scale, where + corresponded to 1 point, +++ corresponded to 7 points:

гістології лабораторії» (м. Львів, Україна). Для зручності проведення аналізу отриманих результатів кількість плюсів, визначена за результатами імуногістохімічного дослідження, була переведена у 7-мибальну рангову шкалу, де + відповідав 1 балу, +++ відповідали 7 балам:

| Шкала, плюси | Шкала, бали |
|--------------|-------------|
| + | 1 |
| + / ++ | 2 |
| ++ / + | 3 |
| ++ | 4 |
| ++ / +++ | 5 |
| +++ / ++ | 6 |
| +++ | 7 |

Під час роботи використано методи описової та аналітичної статистики. З огляду на дискретний характер даних, малу вибірку та невідповідність нормальному розподілу (встановлено за допомогою критерію Шапіро-Уїлка) центральну тенденцію було представлено у вигляді Ме [25%; 75%], додатково у таблицях вказано мінімальне та максимальне значення. Для перевірки достовірності різниці значення між групами абсолютних показників було використано U-критерій Мана-Уїтні. Результати вважали достовірними при рівні значущості $p < 0,05$ [16, 17].

Результати

Аналіз показників пухлинних маркерів у пацієнтів з МРЦЗ у групах без рецидиву та з рецидивом захворювання показав, що рівень експресії кальцитоніну в групі пацієнтів із рецидивом був нижчим і становив 5,00 [5,00; 5,00] балів (що є в межах ++/+++ за інтенсивністю забарвлення) із коливанням від мінімального показника 3 бали до максимального 6 балів. Тоді як у групі без рецидиву МРЦЗ цей показник був вищим і становив 6,00 [6,00; 7,00] балів (у межах +++/++) із коливаннями від 2 до 7 балів. Різниця між групами за результатами обчислення U-критерію Мана-Уїтні була статистично значущою ($p < 0,05$) (табл. 1).

На противагу доведеної більшій експресії проявів маркера кальцитоніну у взірцях пацієнтів без рецидиву МРЦЗ, частка позитивно забарвлених клітин взірців не мала суттєво більших значень у цій групі ($p > 0,05$): 100,00 [90,00; 100,00] % з коливаннями від 45% до 100% порівняно з групою рецидиву 95,00 [80,00; 100,00] % з коливаннями від 30% до 100%.

Подібно до кальцитоніну інтенсивність забарвлення взірців хромограніном А також була вищою у пацієнтів, які не мали реци-

Таблиця 1

Дані показників пухлинних маркерів у групах без рецидиву та з рецидивом МРЦЗ (Ме [25%; 75%])

| Показник | Група | Ме [25%; 75%] | Min | Max |
|---------------------|--------------|------------------------|-----|-----|
| Кальцитонін, бали | без рецидиву | 6,00 [6,00; 7,00] | 2 | 7 |
| | рецидив | 5,00 [5,00; 5,00]* | 3 | 6 |
| Кальцитонін, % | без рецидиву | 100,00 [90,00; 100,00] | 45 | 100 |
| | рецидив | 95,00 [80,00; 100,00] | 30 | 100 |
| Хромогранін А, бали | без рецидиву | 3,00 [2,00; 5,00] | 1 | 6 |
| | рецидив | 2,00 [2,00; 4,00] | 1 | 5 |
| Хромогранін А, % | без рецидиву | 90,00 [60,00; 100,00] | 8 | 100 |
| | рецидив | 90,00 [70,00; 100,00] | 25 | 100 |
| Віментин, бали | без рецидиву | 5,00 [4,00; 7,00] | 1 | 7 |
| | рецидив | 7,00 [6,00; 7,00] | 4 | 7 |
| Віментин, % | без рецидиву | 25,00 [12,00; 80,00] | 0.5 | 100 |
| | рецидив | 2,00 [0,50; 20,00] | 0.5 | 80 |
| Кі-67, % | без рецидиву | 10,00 [7,00; 15,00] | 5 | 45 |
| | рецидив | 10,00 [9,00; 38,00] | 7 | 39 |

Примітка 1. Ме – медіана, 25% – перший кuartиль, 75% – третій кuartиль, Min – мінімальний показник у групі, Max – максимальний показник у групі.

Примітка 2. * – $p < 0,05$ при порівнянні значень показника між групами за результатами обчислення U-критерію Мана-Уїтні.

| Scale, pluses | Scale, points |
|---------------|---------------|
| + | 1 |
| +/++ | 2 |
| ++/+ | 3 |
| ++ | 4 |
| ++/+++ | 5 |
| +++/>++ | 6 |
| +++ | 7 |

Methods of descriptive and analytical statistics were used during the study. Given the discrete nature of data, small sample and non-compliance with the normal distribution (established using the Shapiro-Wilk test), the central trend was presented in the form of Me [25%; 75%], in addition, the tables indicate the minimum and maximum value. The Mann-Whitney U-test was used to verify the significance of the difference in value between groups of absolute values. The results were considered significant at a significance level of $p < 0.05$ [16, 17].

Results

Analysis of tumor markers in patients with MTC in groups with and without recurrence of the disease showed that the level of calcitonin expression in the group of patients with recurrence was lower and was 5.00 [5.00; 5.00] points (which is within ++/+++ range by stain intensity) ranging from a minimum of

3 points to a maximum of 6 points. Meanwhile, in the group without MTC recurrence, this figure was higher and amounted to 6.00 [6.00; 7.00] points (within +++/++) with fluctuations from 2 to 7 points. The difference between groups according to the results of the Mann-Whitney U-test was statistically significant ($p < 0.05$) (Table 1).

In contrast to the proven higher expression of calcitonin marker in samples of patients without recurrence of MTC, the proportion of positively stained cells of samples was not significantly higher in this group ($p > 0.05$): 100.00 [90.00; 100.00] % with fluctuations from 45% to 100% compared to the group with recurrence accounting for 95.00 [80.00; 100.00] % with fluctuations from 30% to 100%.

Similarly to calcitonin, the intensity of staining of samples with chromogranin A was also higher in patients who did not have a recurrence of MTC: 3.00 [2.00; 5.00] points (cell staining intensity ++/+) with fluctuations from 1 to 6 points, while in patients with MTC recurrence, the expression of chromogranin A was lower: +/++ (2.00 [2.00; 4.00] points with fluctuations from 1 to 5 points). However, the difference between these indicators was not significant ($p > 0.05$). The percentage

Table 1

Data of tumor markers in groups without recurrence and with recurrence of MTC (Me [25%; 75%])

| Indicator | Group | Me [25%; 75%] | Min | Max |
|------------------------|--------------------|------------------------|-----|-----|
| Calcitonin, points | without recurrence | 6.00 [6.00; 7.00] | 2 | 7 |
| | recurrence | 5.00 [5.00; 5.00]* | 3 | 6 |
| Calcitonin, % | without recurrence | 100.00 [90.00; 100.00] | 45 | 100 |
| | recurrence | 95.00 [80.00; 100.00] | 30 | 100 |
| Chromogranin A, points | without recurrence | 3.00 [2.00; 5.00] | 1 | 6 |
| | recurrence | 2.00 [2.00; 4.00] | 1 | 5 |
| Chromogranin A, % | without recurrence | 90.00 [60.00; 100.00] | 8 | 100 |
| | recurrence | 90.00 [70.00; 100.00] | 25 | 100 |
| Vimentin, points | without recurrence | 5.00 [4.00; 7.00] | 1 | 7 |
| | recurrence | 7.00 [6.00; 7.00] | 4 | 7 |
| Vimentin, % | without recurrence | 25.00 [12.00; 80.00] | 0.5 | 100 |
| | recurrence | 2.00 [0.50; 20.00] | 0.5 | 80 |
| Ki-67, % | without recurrence | 10.00 [7.00; 15.00] | 5 | 45 |
| | recurrence | 10.00 [9.00; 38.00] | 7 | 39 |

Note 1. Me – median, 25% – the first quartile, 75% – the third quartile, Min – minimum indicator in the group, Max – maximum indicator in the group.

Note 2. * – $p < 0.05$ when comparing values of the indicators between the groups according to the results of the Mann-Whitney U-test.

диву МРЩЗ: 3,00 [2,00; 5,00] бали (інтенсивність забарвлення клітин ++/+) з коливаннями від 1 до 6 балів, тоді як у пацієнтів з рецидивом МРЩЗ експресія рівня хромограніну А була нижчою: +/++ (2,00 [2,00; 4,00] бали з коливаннями від 1 до 5 балів). Проте різниця між даними показниками була не суттєвою ($p > 0,05$). Відсоток позитивно забарвлених клітин моноклонального антитіла Chromogranin A в пацієнтів цих груп порівняння був однаковий 90,0%.

Імуногістохімічні дослідження взірців з використанням моноклонального антитіла Vimentin показали більшу експресію забарвлення у пацієнтів із рецидивом: 7,00 [6,00; 7,00] балів з коливаннями від 4 до 7 балів, тоді як у пацієнтів без рецидиву МРЩЗ рівень експресії забарвлення був нижчим: 5,00 [4,00; 7,00] балів з коливаннями від 1 до 7 балів ($p > 0,05$). Проте частка площі із позитивним забарвленням була більшою у пацієнтів без рецидиву (25,00 [12,00; 80,00] %), а у пацієнтів з рецидивом у 12,5 раз меншою (2,00 [0,50; 20,00] %).

Проліферативна активність пухлинних клітин щитоподібної залози, визначена за допомогою онкомаркеру Ki-67 не мала відмінностей у пацієнтів обох досліджуваних груп: частка позитивно забарвлених клітин у пацієнтів без рецидиву була 10,00 [7,00; 15,00] % (коливання від 5% до 45% клітин з імунопозитивними ядрами), у пацієнтів з

рецидивом – 10,00 [9,00; 38,00] % (у межах від 7% до 39%).

Порівняння рівнів експресії кальцитоніну у групах пацієнтів «живі» та «померлі» показало незначно більші медіанні значення у групі пацієнтів, що були живими на кінець дослідження (6,00 [5,25; 7,00] балів з коливаннями від 2 до 7 балів), та відповідно нижчі – у пацієнтів, що померли (5,00 [4,50; 5,25] балів з коливаннями від 3 до 6 балів) ($p > 0,05$). Частка позитивно забарвлених клітин теж була несуттєво більшою на 20 % ($p > 0,05$) у пацієнтів групи живих, ніж у групі померлих: 100,00 [95,75; 100,00] % проти 80,00 [67,50; 85,00] % відповідно (табл. 2).

Інтенсивність забарвлення хромограніном А у пацієнтів групи «померлі» за медіанними значеннями була у 1,5 рази вищою ($p > 0,05$) порівняно з групою пацієнтів «живі»: 3,50 [2,50; 4,25] бали проти 2,00 [2,00; 5,00] бали відповідно. Тоді як частка позитивно забарвлених клітин хромограніном А була в 1,23 рази ($p > 0,05$) більшою у пацієнтів, що були живими на момент завершення періоду спостереження: 92,50 [62,50; 100,00] % клітин, при 75,00 [58,75; 85,00] % - у пацієнтів групи «померлі».

Рівень експресії забарвлення онкомаркером віментином також незначно був вищий у пацієнтів групи «померлі» порівняно з

Таблиця 2

Дані показників пухлинних маркерів у групах живих та померлих пацієнтів з МРЩЗ (Me [25%; 75%])

| Показник | Група | Me [25%; 75%] | Min | Max |
|---------------------|---------|------------------------|-----|-----|
| Кальцитонін, бали | живі | 6,00 [5,25; 7,00] | 2 | 7 |
| | померлі | 5,00 [4,50; 5,25] | 3 | 6 |
| Кальцитонін, % | живі | 100,00 [95,75; 100,00] | 45 | 100 |
| | померлі | 80,00 [67,50; 85,00] | 30 | 100 |
| Хромогранін А, бали | живі | 2,00 [2,00; 5,00] | 1 | 6 |
| | померлі | 3,50 [2,50; 4,25] | 1 | 5 |
| Хромогранін А, % | живі | 92,50 [62,50; 100,00] | 8 | 100 |
| | померлі | 75,00 [58,75; 85,00] | 25 | 100 |
| Віментин, бали | живі | 5,00 [4,00; 7,00] | 1 | 7 |
| | померлі | 6,00 [4,75; 7,00] | 4 | 7 |
| Віментин, % | живі | 22,50 [11,25; 77,50] | 0,5 | 100 |
| | померлі | 6,25 [0,50; 29,00] | 0,5 | 80 |
| Ki-67, % | живі | 10,00 [7,00; 14,25] | 5 | 45 |
| | померлі | 23,00 [8,50; 37,50] | 7 | 39 |

Примітка. Різниця між показниками у групах не доведено ($p > 0,05$).

of positively stained cells of the monoclonal antibody Chromogranin A in patients of these comparison groups was the same at 90.0%.

Immunohistochemical examinations of samples using the monoclonal antibody Vimentin revealed greater expression of staining in patients with recurrence: 7.00 [6.00; 7.00] points with fluctuations from 4 to 7 points, while in patients without MTC recurrence, the level of stain expression was lower: 5.00 [4.00; 7.00] points with fluctuations from 1 to 7 points ($p > 0.05$). However, the proportion of the area with positive staining was larger in patients without recurrence (25.00 [12.00; 80.00] %), and in patients with recurrence, it was 12.5 times smaller (2.00 [0.50; 20.00] %).

The proliferative activity of thyroid tumor cells, determined using the Ki-67 tumor marker, had no differences in patients of both study groups: the proportion of positively stained cells in patients without recurrence was 10.00 [7.00; 15.00] % (fluctuations from 5% to 45% of cells with immunopositive nuclei), while in patients with recurrence, it was 10.00 [9.00; 38.00] % (ranging from 7% to 39%).

The comparison of calcitonin expression levels in patients of groups "alive" and "dead" showed slightly higher median values in the group of patients who were alive at the end of the study (6.00 [5.25; 7.00] points with fluctuations

from 2 to 7 points) and correspondingly lower in patients who died (5.00 [4.50; 5.25] points with fluctuations from 3 to 6 points) ($p > 0.05$). The proportion of positively stained cells was also insignificantly higher by 20% ($p > 0.05$) in patients in the "alive" group than in the "dead" group: 100.00 [95.75; 100.00] % vs. 80.00 [67.50; 85.00] %, respectively (Table 2).

The intensity of chromogranin A staining in patients of the "dead" group with median values was 1.5 times higher ($p > 0.05$) than in the patient group "alive": 3.50 [2.50; 4.25] points against 2.00 [2.00; 5.00] points, respectively. While the share of cells positively stained with chromogranin A was 1.23 times ($p > 0.05$) higher in patients who were alive at the end of the observation period: 92.50 [62.50; 100.00] % of cells, while 75.00 [58.75; 85.00] % was revealed in patients of the "dead" group.

The level of expression of the tumor marker vimentin was also slightly higher in patients of the "dead" group in comparison with the "alive" group: +++/+++ (6.00 [4.75; 7.00] points with fluctuations from 4 to 7 points) against ++/+++ (5.00 [4.00; 7.00] points with fluctuations from 1 to 7). On the contrary, the proportion of positively stained cells was higher in patients of the "alive" group: 22.50 [11.25; 77.50] % vs. 6.25 [0.50; 29.00] % in the "dead" group before the end of the 10-year follow-up period.

Table 2

Data on tumor markers in "alive" and "dead" groups of patients with MTC (Me [25%; 75%])

| Indicator | Group | Me [25%; 75%] | Min | Max |
|------------------------|-------|------------------------|-----|-----|
| Calcitonin, points | alive | 6.00 [5.25; 7.00] | 2 | 7 |
| | dead | 5.00 [4.50; 5.25] | 3 | 6 |
| Calcitonin, % | alive | 100.00 [95.75; 100.00] | 45 | 100 |
| | dead | 80.00 [67.50; 85.00] | 30 | 100 |
| Chromogranin A, points | alive | 2.00 [2.00; 5.00] | 1 | 6 |
| | dead | 3.50 [2.50; 4.25] | 1 | 5 |
| Chromogranin A, % | alive | 92.50 [62.50; 100.00] | 8 | 100 |
| | dead | 75.00 [58.75; 85.00] | 25 | 100 |
| Vimentin, points | alive | 5.00 [4.00; 7.00] | 1 | 7 |
| | dead | 6.00 [4.75; 7.00] | 4 | 7 |
| Vimentin, % | alive | 22.50 [11.25; 77.50] | 0,5 | 100 |
| | dead | 6.25 [0.50; 29.00] | 0,5 | 80 |
| Ki-67, % | alive | 10.00 [7.00; 14.25] | 5 | 45 |
| | dead | 23.00 [8.50; 37.50] | 7 | 39 |

Note. The difference between indicators of the groups was not significant ($p > 0.05$).

Таблиця 3

Дані кореляційних взаємозв'язків (r) між онкомаркерами у пацієнтів з МРЩЗ

| Показники | Кальцитонін, бали | Кальцитонін, % | Хромогранін А, бали | Хромогранін А, % | Віментин, бали | Віментин, % | Ki-67, % |
|---------------------|-------------------|----------------|---------------------|------------------|----------------|-------------|----------|
| Кальцитонін, бали | - | 0,51* | 0,49* | 0,30 | 0,25 | 0,04 | -0,52* |
| Кальцитонін, % | 0,51* | - | 0,13 | 0,68* | 0,22 | 0,11 | -0,40 |
| Хромогранін А, бали | 0,49* | 0,13 | - | 0,17 | 0,64* | -0,22 | -0,18 |
| Хромогранін А, % | 0,30 | 0,68* | 0,17 | - | 0,45* | -0,23 | -0,31 |
| Віментин, бали | 0,25 | 0,22 | 0,64* | 0,45* | - | -0,29 | -0,02 |
| Віментин, % | 0,04 | 0,11 | -0,22 | -0,23 | -0,29 | - | -0,03 |
| Ki-67, % | -0,52* | -0,40 | -0,18 | -0,31 | -0,02 | -0,03 | - |

Примітка. * - кореляційний зв'язок достовірний ($p < 0,05$).

групою «живі»: +++/++ (6,00 [4,75; 7,00] балів з коливаннями від 4 до 7 балів) проти ++/+++ (5,00 [4,00; 7,00] балів з коливаннями від 1 до 7). А частка позитивно забарвлених клітин навпаки була вищою у пацієнтів, що були живими: 22,50 [11,25; 77,50] % проти 6,25 [0,50; 29,00] % у групі померлих до завершення 10-річного періоду спостереження.

Частка позитивно зафарбованих клітин онкомаркером Ki-67 була в 1,23 рази більшою у пацієнтів групи «померлі», ніж у пацієнтів групи «живі»: 23,00 [8,50; 37,50] % проти 10,00 [7,00; 14,25] % відповідно ($p > 0,05$).

Дослідження взаємозв'язку методом парної кореляції поміж імуногістохімічними та клінічними показниками у різних комбінаціях не довело наявних зв'язків між характеристиками пухлини за класифікацією TNM та імуногістохімічними онкомаркерами МРЩЗ ($p > 0,05$). При обрахунку комбінацій взаємозв'язку між різними специфічними онкомаркерами найчастіше доведений кореляційний зв'язок зустрічався з кальцитоніном (табл. 3).

Зокрема, встановлено прямий середньої сили кореляційний зв'язок між рівнем експресії кальцитоніну та площею його імунопозитивних клітин ($r = +0,51$, $p = 0,015$). Також інтенсивність забарвлення моноклонального антитіла Calcitonin була прямо взаємозв'язана з інтенсивністю забарвлення Chromogranin A ($r = +0,49$, $p = 0,021$), а частка імунопозитивних клітин кальцитоніну з часткою імунопозитивних клітин хромограніну А ($r = +0,68$, $p = 0,001$) (рис. 1).

Також було доведено зворотній середньої сили зв'язок рівня експресії кальцитоніну та частки імунопозитивних клітин онкомаркеру Ki-67 ($r = -0,515$, $p = 0,014$) (рис. 2).

Кореляційний зв'язок експресії кальцитоніну одночасно із двома іншими онкомаркерами зображено на рис. 3.

Окрім того, було встановлено прямий середньої сили кореляційний зв'язок експресії онкомаркеру віментину з експресією хромограніну А ($r = +0,64$, $p = 0,001$) та з часткою позитивних клітин хромограніну А ($r = +0,45$, $p = 0,038$) (рис. 4, 5).

Не було доведено жодного кореляційного зв'язку частки імунопозитивних клітин віментину з іншими онкомаркерами. Був наявним зворотній слабкий кореляційний зв'язок частки позитивних клітин віментину із обома показниками хромограніну А та експресією віментину, проте він був недостовірний ($p > 0,05$). Так само для онкомаркеру Ki-67 не було доведено жодного іншого взаємозв'язку, окрім з експресією кальцитоніну, про що повідомлялось вище.

Обговорення

Важливим є звернути увагу на те, що частота рецидивів у чоловіків є більшою в 5 разів: вони були у 3 чоловіків з 5 (60,0%) та у 2 жінок з 17 (11,8%). Статистично різниця не є доведеною ($p > 0,05$) через малу статистичну потужність (невелике число досліджуваних), проте ми вважаємо необхідним акцентувати увагу на частішій появі рецидивів серед чоловіків, ніж серед жінок. При цьому до сьогодні існують протилежні думки щодо впливу статі хворих на перебіг та про-

Table 3

Data on correlations (r) between tumor markers in patients with MTC

| Indicator | Calcitonin, points | Calcitonin, % | Chromogranin A, points | Chromogranin A, % | Vimentin, points | Vimentin, % | Ki-67, % |
|------------------------|--------------------|---------------|------------------------|-------------------|------------------|-------------|----------|
| Calcitonin, points | - | 0.51* | 0.49* | 0.30 | 0.25 | 0.04 | -0.52* |
| Calcitonin, % | 0.51* | - | 0.13 | 0.68* | 0.22 | 0.11 | -0.40 |
| Chromogranin A, points | 0.49* | 0.13 | - | 0.17 | 0.64* | -0.22 | -0.18 |
| Chromogranin A, % | 0.30 | 0.68* | 0.17 | - | 0.45* | -0.23 | -0.31 |
| Vimentin, points | 0.25 | 0.22 | 0.64* | 0.45* | - | -0.29 | -0.02 |
| Vimentin, % | 0.04 | 0.11 | -0.22 | -0.23 | -0.29 | - | -0.03 |
| Ki-67, % | -0.52* | -0.40 | -0.18 | -0.31 | -0.02 | -0.03 | - |

Note. * – significant correlation ($p < 0.05$).

The share of cells positively stained with the tumor marker Ki-67 was 1.23 times higher in patients of the “dead” group than in patients of the “alive” group: 23.00 [8.50; 37.50] % vs. 10.00 [7.00; 14.25] %, respectively ($p > 0.05$).

The study of the relationship by the method of pairwise correlation between immunohistochemical and clinical parameters in different combinations did not prove any existing relations between tumor characteristics according to the TNM classification and immunohistochemical tumor markers of MTC ($p > 0.05$). When calculating combinations of the relationship between different specific tumor markers, the most frequently proven correlation was found in calcitonin (Table 3).

In particular, a direct medium-strength correlation was found between the level of calcitonin expression and the surface of its immunopositive cells ($r = +0.51$, $p = 0.015$). Also, the color intensity of the monoclonal antibody Calcitonin was directly related to the color intensity of Chromogranin A ($r = +0.49$, $p = 0.021$), and the share of immunopositive calcitonin cells was related to the proportion of immunopositive cells of chromogranin A ($r = +0.68$, $p = 0.001$) (fig. 1).

The inverse relationship of medium strength between the level of calcitonin expression and the proportion of immunopositive cells of the tumor marker Ki-67 ($r = -0.515$, $p = 0.014$) was also proven (fig. 2).

The correlation of calcitonin expression simultaneously with two other tumor markers is shown in fig. 3.

In addition, a direct medium-strength correlation between the expression of the tumor marker vimentin and the expression of chromogranin A ($r = +0.64$, $p = 0.001$) and with the proportion of positive cells of chromogranin A ($r = +0.45$, $p = 0.038$) was established. (Figs. 4, 5).

No correlation between the proportion of immunopositive vimentin cells and other tumor markers has been proven. There was an inverse weak correlation between the proportion of positive vimentin cells and both chromogranin A and vimentin expression, but it was not significant ($p > 0.05$). Similarly, for the tumor marker Ki-67, no relationship was demonstrated other than the one involving the expression of calcitonin, as reported above.

Discussion

It is important to note that the recurrence rate in men is 5 times higher: recurrences were found in 3 out of 5 men (60.0%) and in 2 out of 17 women (11.8%). Statistically, the difference is not significant ($p > 0.05$) due to low statistical power (small number of subjects), but we consider it necessary to emphasize the more frequent recurrences among men than among women. Meanwhile, to this day, there are opposing views on the influence of the sex of patients on the course and prognosis of the disease. In particular, some authors believe that the 10-year survival rate in men is 2 times higher than in women [18, 19], and female sex was directly correlated with more advanced disease after the diagnosis ($p < 0.001$) [3, 10]; according to others, survival among women was higher for both 5- and 10-year follow-up period [20, 21].

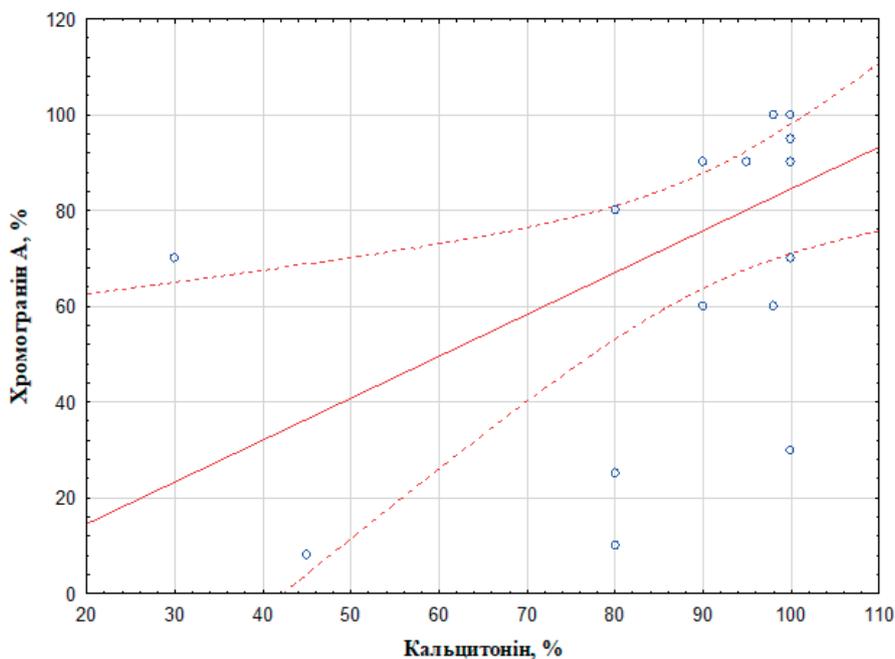


Рисунок 1. Кореляційний взаємозв'язок частки імунопозитивних клітин кальцитоніну та частки імунопозитивних клітин хромограніну А

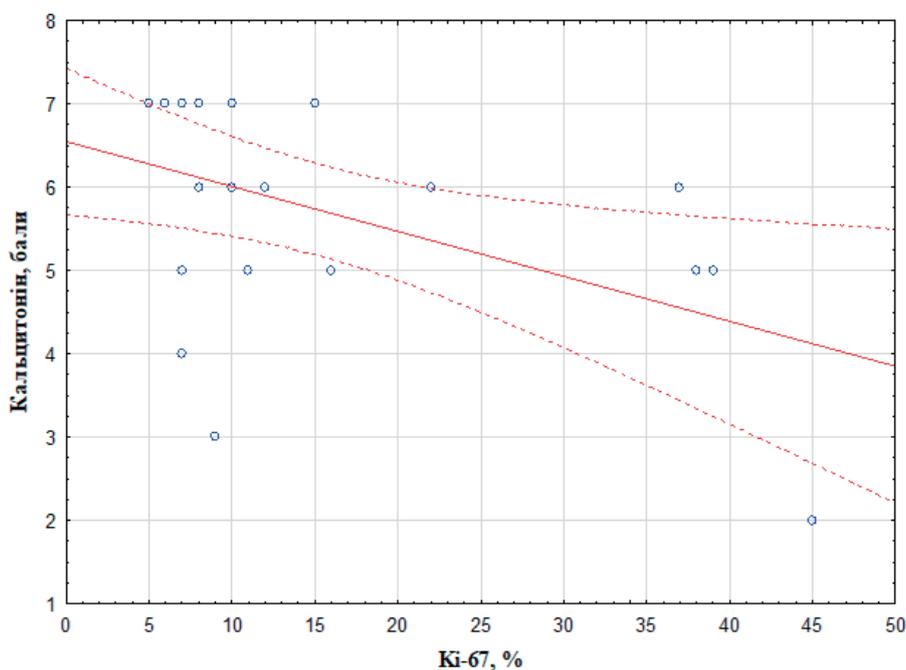


Рисунок 2. Кореляційний взаємозв'язок рівня експресії кальцитоніну та частки імунопозитивних клітин Ki-67

гноз хвороби. Зокрема, одні автори вважають, що рівень 10-ти річної виживаності в чоловіків у 2 рази вищий, ніж у жінок [18, 19], а жіноча стать безпосередньо корелювали з більш запущеним захворюванням

після встановлення діагнозу ($p < 0,001$) [3, 10]; на думку інших – виживаність серед жінок була більшою як впродовж 5, так і 10 років [20, 21].

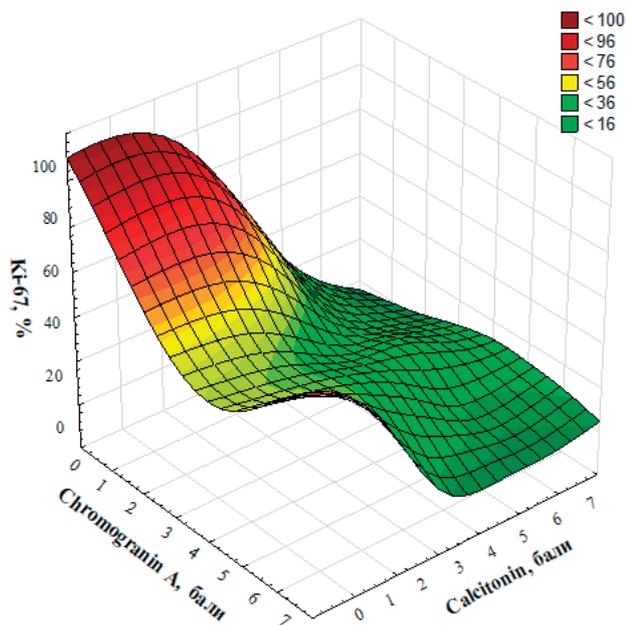


Рисунок 3. Взаємозв'язок експресії кальцитоніну з експресією хромограніну А та часткою позитивних клітин Ki-67

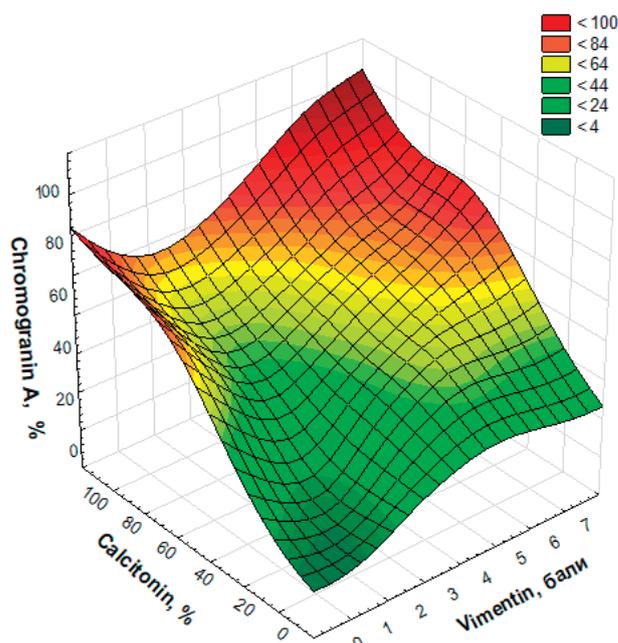


Рисунок 5. Взаємозв'язок експресії виментину з часткою імунопозитивних клітин кальцитоніну та часткою імунопозитивних клітин хромограніну А

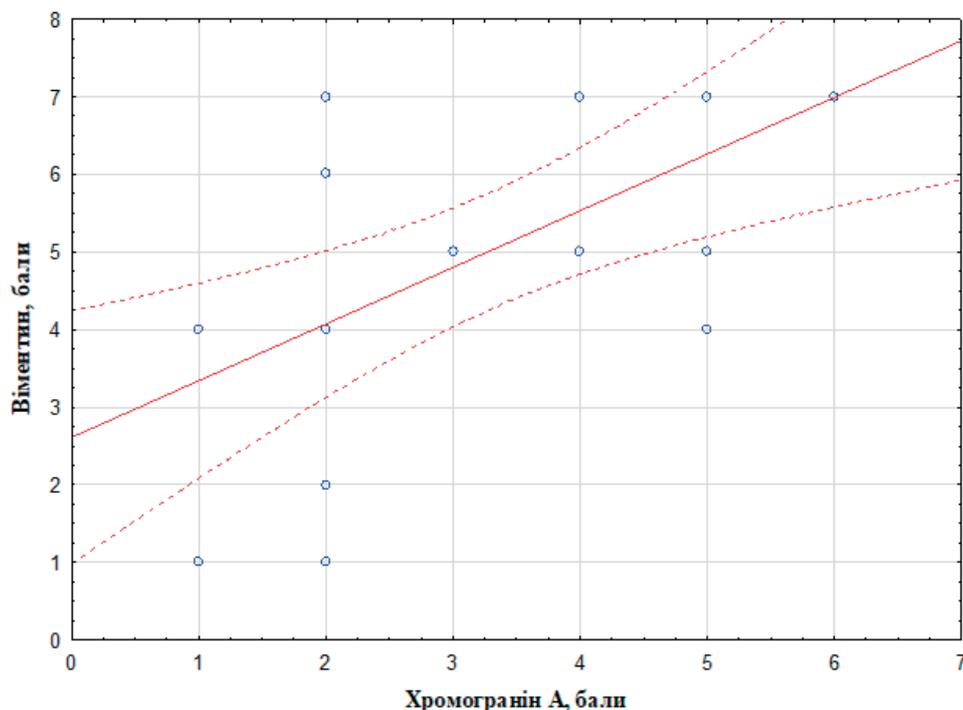


Рисунок 4. Кореляційний взаємозв'язок рівня експресії виментину та рівня експресії хромограніну А

В цілому наше дослідження показало, що інтенсивність забарвлення з використанням антитіл до кальцитоніну і хромограніну А була вищою у групі без рецидиву, а виментину – у групі з рецидивом МРЦЗ.

Проте статистично значимою різниця була лише щодо кальцитоніну.

Слід звернути увагу на те, що якщо кальцитонін мав і експресію, і площу ураження

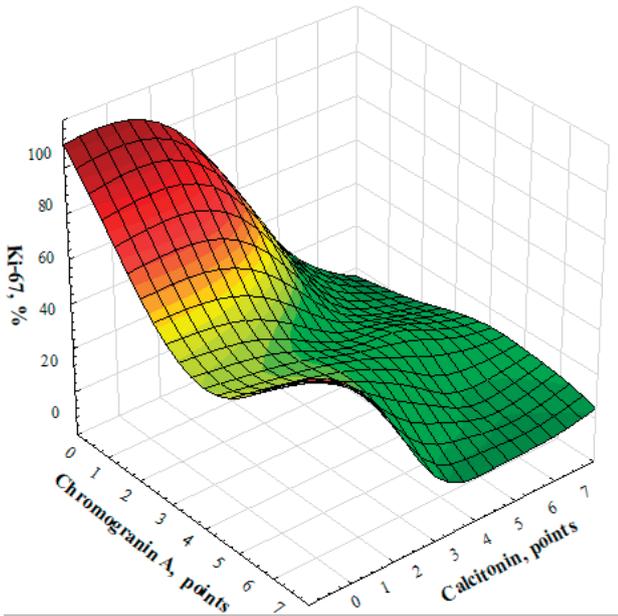


Figure 3. The relationship between Calcitonin expression and Chromogranin A expression and Ki-67 cell proportion

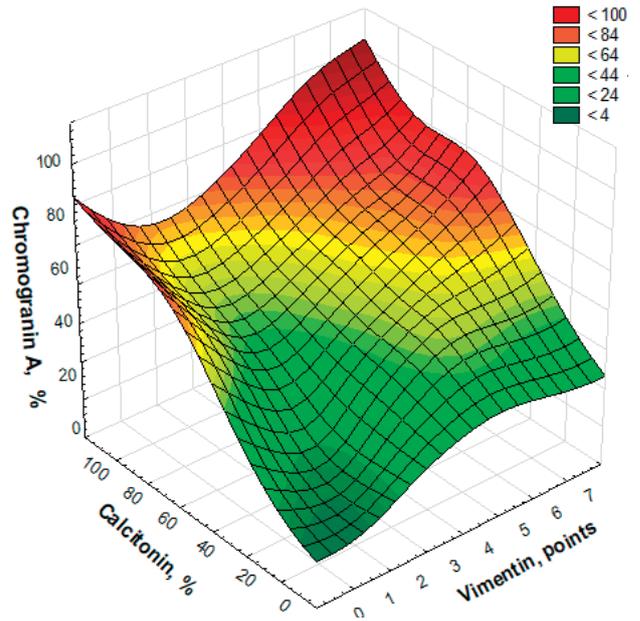


Figure 5. The relationship of Vimentin expression with the proportion of immunopositive Calcitonin cells and the proportion of immunopositive Chromogranin A cells

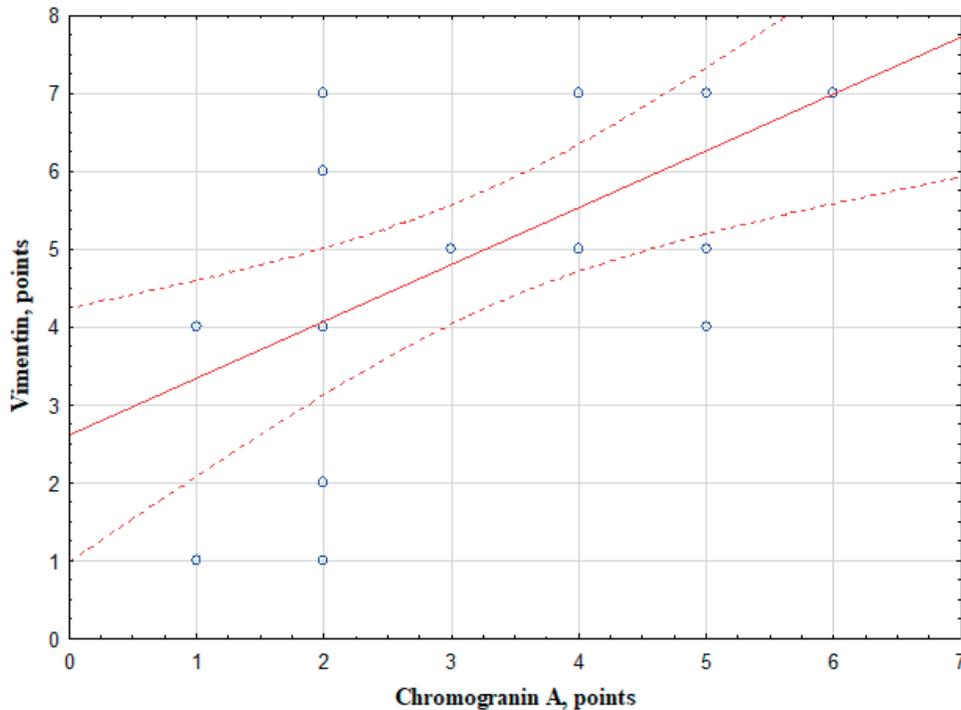


Figure 4. The correlation between Vimentin expression level and Chromogranin A expression level

group of “alive” patients, chromogranin A and vimentin had higher expression in the “dead” group, while the area of positively stained cells was larger in the “alive” group at the end of the study. However, the difference between these

follow-up of patients with MTC. To sum up obtained results:

1. The discrepancy between the data of histological and immunohistochemical examinations in MTC is 12.0%, which

більшу в групі живих пацієнтів, то хромогранін А та віментин мали вищу експресію в групі померлих, а площу позитивно зафарбованих клітин – у пацієнтів, що були живими на кінець дослідження. Проте різниця цих показників у групах була статистично не суттєвою ($p > 0,05$). Аналіз даних релевантних джерел показав незначну кількість публікацій, пов'язаних із імуногістохімічними онкомаркерами МРЦЗ. Низка авторів згадувала про те, що іноді у пацієнтів з МРЦЗ може бути відсутнім імуногістохімічно діагностований кальцитонін («атиповий МРЦЗ») [13, 22]. Єгипетські вчені виявили асоціацію між експресією віментину та прогресуванням пухлини [23]. Китайські дослідники довели, що зростання Ki-67 відіграє важливу роль в проліферації пухлин і їх міграції, та 5-річна виживаність була нижчою у пацієнтів з високим рівнем експресії Ki-67 [24].

Таким чином, встановлення доведених взаємозв'язків між специфічними онкомаркерами є важливими у процесі лікування та для динамічного спостереження за пацієнтами з МРЦЗ. Підсумовуючи отримані результати, можемо стверджувати, що:

1. Розбіжність між даними гістологічних та імуногістохімічних досліджень при МРЦЗ становить 12,0%, що вказує на гіпердіагностику даної нозології та аргументує важливість проведення імуногістохімічних досліджень для верифікації діагнозу.
2. У пацієнтів в яких виник рецидив МРЦЗ був достовірно ($p < 0,05$) менший рівень експресії кальцитоніну (5,00 [5,00; 5,00] балів) порівняно з пацієнтами у яких рецидив не виник, де даний показник становив 6,00 [6,00; 7,00] балів.
3. У пацієнтів з МРЦЗ збільшення рівня експресії кальцитоніну достовірно поєднувалось зі збільшенням рівня експресії хромограніну А ($r = +0,49$, $p = 0,02$); аналогічний зв'язок виявлено щодо часток імунопозитивних клітин даних онкомаркерів: $r = +0,68$, $p = 0,001$. Водночас встановлено, що збільшення рівня експресії кальцитоніну достовірно поєднувалось з зменшенням рівня експресії Ki-67 ($r = -0,52$, $p = 0,02$). Також було встановлено, що збільшення рівня експресії віментину поєднується зі збільшенням експресії ($r = +0,64$, $p = 0,001$) та частки імунопозитивних клітин хромограніну А ($r = +0,45$, $p = 0,038$).

References

1. Pitt SC, Moley JF. Medullary, anaplastic, and metastatic cancers of the thyroid. *Semin Oncol.* 2010; 37:567- 579.
2. Raffel A, Cupisti K, Krausch M, Wolf A, Schulte K, Roher H. Incidentally found medullary thyroid cancer: treatment rationale for small tumors. *World J Surg.* 2004; 28:397- 401.
3. Chang EHE, Lutfi W, Feinglass J, Reiher AE, Moo-Young T, Bhayani MK. National Trends in the Surgical Treatment of Non-advanced Medullary Thyroid Cancer (MTC): An Evaluation of Adherence with the 2009 American Thyroid Association Guidelines. *World J Surg.* 2016; 40(Suppl 12):2930-2940. doi: 10.1007/s00268-016-3643-6.
4. Roman S, Lin R, Sosa JA. Prognosis of medullary thyroid carcinoma. *Cancer.* 2006; 107:2134-2142.
5. Shah J, Patel S, Singh B, Wong R. *Head and Neck Surgery and Oncology*, 5th ed., Mosby, 2020: 859.
6. Rumyantsev PO, Ilyin AA, Rumyantseva UV. The choice of the amount of surgical intervention in medullary thyroid cancer. *Endocrine surgery.* 2011;2: 26-31.
7. Daniels GH. Screening for Medullary Thyroid Carcinoma with Serum Calcitonin Measurements in Patients with Thyroid Nodules in the United States and Canada. *Thyroid.* 2011; 21(Suppl 11):1199-1207. doi:10.1089/thy.2010.0297.
8. Costante G and Filetti S. Early Diagnosis of Medullary Thyroid Carcinoma: Is Systematic Calcitonin Screening Appropriate in Patients with Nodular Thyroid Disease? *Oncologist.* 2011; 16(Suppl 1):49-52. doi: 10.1634/theoncologist.2010-0344.
9. Machens A, Dralle H. Surgical cure rates of sporadic medullary thyroid cancer in the era of calcitonin screening. *Eur J Endocrinol.* 2016; 175(Suppl 3):219-28. doi: 10.1530/EJE-16-0325.
10. Kvacheniuk AM, Reizin DV, Kvacheniuk DA. The role of calcitonin in the diagnosis of medullary thyroid cancer. *Collection of scientific works of collaborator of PL Shupyk NMAPE.* 2013; 22 (Suppl 1):25-33.
11. Sukach HH. Radionuclide therapy and monitoring of patients with medullary thyroid cancer: author's ref. dis. for scientific degree of Candidate of Medical Sciences: spec. 14.01.23 "Radiation diagnostics and radiation therapy" K., 2014:23.

indicates the hyperdiagnosis of this nosology and argues the importance of immunohistochemical studies to verify the diagnosis.

2. Patients who had a recurrence of MTC had significantly ($p < 0.05$) lower levels of calcitonin expression (5.00 [5.00; 5.00] points) in comparison with patients who did not develop recurrence, where this figure was 6.00 [6.00; 7.00] points.
3. In patients with MTC, an increase in calcitonin expression was significantly associated with an increase in chromogranin A expression

($r = +0.49$, $p = 0.02$); a similar relationship was found for the shares of immunopositive cells of these tumor markers: $r = +0.68$, $p = 0.001$. Meanwhile, it was revealed that an increase in the level of calcitonin expression was significantly correlated with a decrease in the level of Ki-67 expression ($r = -0.52$, $p = 0.02$). It was also found that the increased level of vimentin expression is correlated with an increase in the expression ($r = +0.64$, $p = 0.001$) and the proportion of immunopositive cells of chromogranin A ($r = +0.45$, $p = 0.038$).

12. Kihara M, Miyauchi A, Kudo T, Hirokawa M, Miya A. Reference values of serum calcitonin with calcium stimulation tests by electrochemiluminescence immunoassay before/after total thyroidectomy in Japanese patients with thyroid diseases other than medullary thyroid carcinoma. *Endocr J.* 2016; 63(Suppl 7):627-32. doi: 10.1507/endocrj.EJ16-0107.
13. Samà MT, Giaccherino RR, Gallo M, Felicetti F, Maletta F, Bonelli N et al. Clinical challenges with calcitonin-negative medullary thyroid carcinoma. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology.* 2016; 142(Suppl 9):2023-2029.
14. Cho YY, Jang HW, Jang JY, Kim TH, Choe J-H, Kim J-H et al. Clinical outcomes of patients with hypercalcitoninemia after initial treatment for medullary thyroid cancer and postoperative serum calcitonin cutoffs for predicting structural recurrence. *Head Neck.* 2016; 38(Suppl 10):1501-1508. doi: 10.1002/hed.24469.
15. Jung KY, Kim SM, Yoo WS, Kim B-W, Lee YS, Kim KW et al. Postoperative biochemical remission of serum calcitonin is the best predictive factor for recurrence-free survival of medullary thyroid cancer: a large-scale retrospective analysis over 30 years. *Clin Endocrinol.* 2016; 84(Suppl 4):587-597.
16. Matsyura O, Menshykova A, Besh L, Gutor T, Kovalska O, Besh O et al. Translation, adaptation, and initial validation of the Food Allergy Quality of Life Questionnaire – Parent Form (0–12 years) in Ukrainian language. *Pediatrics Polska - Polish Journal of Paediatrics.* 2021; 96(Suppl 1):47-52. doi:10.5114/polp.2021.104828.
17. Yunkerov VI, Grigoryev SG. Mathematical and statistical processing of medical research data. Saint Petersburg: VMedA, 2002:266.
18. Boyko NI, Shavarov YuI, Duda OR, Kemin RV, Revura AP, Dovgan YuP et al. Apudomas: medullary thyroid cancer - clinic, diagnosis, treatment. *Lviv Medical Journal.* 2010; 16(Suppl 4):135-138.
19. Paterson IC, Greenlee R, Adams Jones D. Thyroid cancer in Wales 1985-1996: a cancer registry-based study. *Clin. Oncol. (R. Coll. Radiol).* 1999; 11:245-251. doi:10.1053/clon.1999.9057.
20. Demidchik YuE, Kolobukhov AE, Demidchik EP. Results of treatment of patients with medullary thyroid cancer. *Oncol. journal.* 2008; 2-3(Suppl 7):19-30.
21. Romanchishin AF, Lisovenko OV, Kolosyuk VA. Modern aspects of surgical endocrinology. SPb. 2003; 1:201-203.
22. Nakazawa T, Cameselle-Teijeiro J, Vinagre J, Soares P, Rousseau E, Eloy C et al. C-cell-derived calcitonin-free neuroendocrine carcinoma of the thyroid: the diagnostic importance of CGRP immunoreactivity. *Int J Surg Pathol.* 2014; 22:530-535.
23. Anan F. The role of immunohistochemical markers in diagnosis and prognosis of medullary thyroid carcinoma. *Egyptian Journal of Pathology* 2013; 33:13-17. doi:10.1097/01.XEJ.0000429915.96543.7.
- Sun Y, Zhang H, Wang J, Zhang P, Zhang D, Shao L et al. Ki-67 Is Highly Expressed in the Medullary thyroid Carcinoma and Indicates Poor Prognosis. 2014; 06:156-157. Available at: <https://www.airitilibrary.com/Publication/alDetailedMesh?DocID=8717147>.