

**О.О.Бондаренко  
І.С.Шпонька  
П.А.Гриценко**

Дніпропетровська державна  
медична академія

**Ключові слова:** диференційовані раки щитовидної залози, імуногістохімія, натрій-йодний симпортер, тиреоглобулін, галектин-3, Ki-67, p53.

*Надійшла: 04.02.2009*

*Прийнята: 11.03.2009*

УДК 616.441-006.6-078.33-091.8

## **ВИКОРИСТАННЯ ОНКОМАРКЕРІВ В МОРФОЛОГІЧНІЙ ДІАГНОСТИЦІ ЕПІТЕЛІАЛЬНИХ ПУХЛИН ЩИТОВИДНОЇ ЗАЛОЗИ**

**Резюме.** Робота присвячена вивченню експресії молекулярних маркерів в диференційованих раках щитовидної залози для прогнозування подальшого клінічного перебігу захворювання. В дослідженні проведено аналіз натрій-йодного симпортеру, тиреоглобуліну, галектину-3, онкопротеїну p53, проліферативної активності (на основі експресії Ki-67) в пухлинах в залежності від наявності метастазів та рівня інвазії. Визначено прогностичне значення кожного маркера біологічних властивостей. Встановлені імунофенотипи тиреоїдних раків з високим ризиком метастазування. Запропонований маркер для диференційної діагностики між фолікулярними аденомами і карциномами. Отримані дані дозволяють на підставі імуногістохімічного профілю диференційованих раків щитовидної залози прогнозувати їх подальший перебіг, що дає можливість виділити групи пацієнтів, які потребують більш ретельного клінічного обстеження й спостереження, індивідуалізації терапії, а також групу хворих, до яких можуть бути застосовані менш інвазивні методи лікування.

**Морфологія.** – 2009. – Т. III, № 2. – С. 12-16.

© О.О.Бондаренко, І.С.Шпонька, П.А.Гриценко, 2009

**Bondarenko O.O., Shponka I.S., Gritsenko P.O. Using of oncomarkers in morphological diagnostics of epithelial tumors of thyroid gland.**

**Summary.** This study is dedicated to research molecular marker's expression in the differentiated thyroid tumors for prognosis of subsequent clinical course. In this study thyroid tumors were analyzed for NIS, thyroglobulin, galectin-3, p53 expression as well as for proliferation activity (based on Ki-67 expression) depending on the presence of metastases and invasion level. It was identified the prognostic value of each marker of biological properties. The immunophenotypes of thyroid cancers with high risk of tumor dissemination were established. The differential diagnostic marker of follicular tumors was proposed as well. These immunomorphology tumor profile based findings allow to predict the clinical course of thyroid cancer that make possible to separate the groups of patients, which need more careful clinical observing and examination, individualization of treatment as well as group of patients, which may get less invasive treatment methods.

**Key words:** differential thyroid cancer, immunohistochemistry, NIS, thyroglobulin, galectin-3, Ki-67, p53.

### **Вступ**

Частка раку щитовидної залози (РЩЗ) становить від 1 до 4 % всіх злоякісних пухлин, а, як відомо, смертність від онкологічних захворювань посідає друге місце у світі. Експерти ВООЗ розробляють нові підходи до діагностики РЩЗ, у яких рекомендується застосовувати сполучення морфологічного методу з молекулярно-біологічними з визначенням біомолекулярних маркерів пухлини. Вивчення біомолекулярних маркерів в РЩЗ має важливе значення для визначення її злоякісного потенціалу й вибору терапії. Пошук імуногістохімічних маркерів для достовірної диференційної діагностики між фолікулярними раками (ФР) та аденомами (ФА) проводиться серед різних видів молекул клітинної адгезії, особливо серед сімейства лектинів – глікопротеїдів, які виконують різні функції: від регулювання запалення до впливу на апоптоз (Gasbarri A. et

al., 1999; Casey M.V. et al., 2003; Cvejic D. et al., 2005; Бондаренко О.О., 2008). Той факт, що на даний час ця сукупність досліджень не призвела до розробки єдиного діагностичного алгоритму, свідчить про недостатність і суперечливість інформації з цього питання.

Гістологічна картина пухлини не завжди відповідає її біологічним властивостям. Перш за все, це стосується найбільш поширених РЩЗ – папілярних карцином (ПРЩЗ). Від цього залежить прогноз перебігу захворювання та виживаність хворих у ряді випадків, яка не корелює з гістологічним типом, стадією захворювання (Katon R. et al., 1995; Kobayashi K. et al., 1999; Шпонька І.С. та співавт., 2007). Більшість раків щитовидної залози та їх метастазів демонструють порушення акумулювання радіоактивного йоду у порівнянні з нормальною тканиною щитовидної залози (Jhiang S.M. et al., 1998; Dohan O. et al.,

2001; Бондаренко О.О. та співавт., 2009). Редуквана активність йодидного транспорту в злоякісних пухлинних клітинах може бути доволі суттєва для ефективної радіойодаблячії. Таким чином, у проблемі морфологічної діагностики РЩЗ залишаються невирішеними питання:

- про експресію галектину-3 в фолікулярних пухлинах ЩЗ і його кореляцію з клініко-морфологічними параметрами;
- про роль маркерів проліферації (Ki-67), апоптозу (p53) і диференціювання (тиреоглобулін) в прогнозуванні перебігу папілярних карцином ЩЗ;
- прогнозування чутливості до радіойодаблячії хворих с різними гістологічними варіантами й стадіями захворювання на РЩЗ.

#### **Мета**

Удосконалити прогностичні критерії перебігу диференційованих тиреоїдних раків на підставі вивчення показників експресії біомолекулярних маркерів.

#### **Матеріали та методи**

У нашому дослідженні проведено ретроспективний аналіз клініко-анатомічного матеріалу 71 хворого, який було отримано під час операцій (тотальна або субтотальна тиреоїдектомія, лімфаденектомія) з приводу вузлових утворень щитовидної залози з відділення ендокринної хірургії Дніпропетровської обласної клінічної лікарні ім. І.І.Мечникова, за період з 1999 по 2008 р.

За гістологічною будовою новоутворення були представлені диференційованими пухлинами які походять із фолікулярних клітин щитовидної залози: папілярними карциномами – 32 випадки, фолікулярними раками – 17 випадків, фолікулярними аденомами – 19 випадків, а також аденомами з клітин Гюртле (ГА) – 3 випадки. Весь клініко-анатомічний матеріал був розподілений на 7 груп, відповідно до гістологічної будови пухлин, крім того, папілярні та фолікулярні карциноми були розділені на 3 підгрупи, враховуючи характер інвазії та наявність метастазування: карциноми з мінімальною інвазією без метастазів – 11 випадків серед фолікулярних карцином, з широкою інвазією без метастазів – 25 випадків серед папілярних та 6 випадків серед фолікулярних карцином, а також раки з наявністю метастазів в регіонарні лімфатичні вузли – 7 спостережень серед папілярних раків. Для проведення морфологічного дослідження використовували парафінові блоки операційного матеріалу у випадках раку щитовидної залози та його метастазів у лімфатичні вузли. В якості первинних використовувалися моноклональні антитіла до онкопротеїну p53 (клон DO-7), Ki-67 (клон MIB-1), тиреоглобуліну (клон НТГ-46, DakoCytomation), галектину-3 (клон 9C4, LabVision), натрій-йодному симпортеру (NIS, клон

FP5A, LabVision) з подальшим застосуванням системи візуалізації EnVision (DakoCytomation). Ідентифікація реакції проводилась за допомогою хромогену DAB. Оцінка експресії кожного маркера проводилась індивідуально у відповідності з рекомендаціями інших дослідників.

#### **Результати та їх обговорення**

У нашому дослідженні був проведений аналіз проліферативної активності диференційованих РЩЗ за допомогою моноклонального антитіла Ki-67 та визначення індексу проліферації (ІП). При порівнянні ІП в більшості випадків відзначена неоднорідність показника в різних зонах пухлини. Так, спостерігалася тенденція до збільшення частки проліферуючих клітин в зонах інвазивного росту в порівнянні з поверхневими відділами пухлини, в окремих випадках ІП в різних зонах пухлини відрізнявся на 10-15%. При порівнянні проліферативної активності первинної пухлини і її метастазів у лімфатичні вузли відзначені відповідні відмінності. Більш високі значення ІП визначені в клітинах метастазів, їх показники відповідали у більшості випадків показникам первинної пухлини у ділянках з вираженим інвазивним ростом. ІП у РЩЗ коливався від 1,3 до 26,72% і, в середньому, складав  $14,83 \pm 1,51\%$ . При аналізі ІП в пухлинах з різною гістологічною картиною було визначено істотні розходження: ПРЩЗ продемонстрували середній показник ІП  $25,45 \pm 2,34\%$ , ФР –  $4,21 \pm 0,32\%$ . В групі фолікулярних РЩЗ з наявністю широкої інвазії проліферативна активність була вищою ніж у мікроінвазійних ФР (середні показники склали  $7,11 \pm 0,84\%$  і  $1,3 \pm 0,04\%$  відповідно) (рис. 1). Серед ПРЩЗ з наявністю метастазів чи без них значних розходжень між групами не відзначено. Так само як і між ФА (в т.ч. ГА) – ІП  $0,77 \pm 0,01\%$  ( $1,21 \pm 0,04\%$ ), ФР з мінімальною інвазією ( $1,3 \pm 0,03\%$ ) у порівнянні з нормальною тканиною ( $0,81\%$ ) значної різниці не виявлено.

У клітинах диференційованих РЩЗ експресія p53 виявлялася як специфічне інтрануклеарне забарвлення різної інтенсивності, в основному високої і помірної. У нашому дослідженні більшість випадків РЩЗ (78,1%) мали p53-позитивний статус. Частота надекспресії p53 у пухлинах з наявними метастазами була на 8,12% вище, ніж серед всіх РЩЗ й на 2,72% ніж серед папілярних пухлин без метастазів (рис. 1). При порівнянні рівня експресії p53 у первинній пухлині й у метастазах значних відмінностей не виявлено. Але, в той же час, була виявлена значна розбіжність в надекспресії p53 між ПРЩЗ та ФР. Середній показник для ФР склав  $3,95 \pm 0,15\%$ , а для ПРЩЗ –  $17,46 \pm 1,87\%$ . Тим не менш, серед груп ФР з широкою та мінімальною інвазією достовірної різниці не знайдено, як не було її знайдено при порівнянні ФР і ФА (рис. 1).

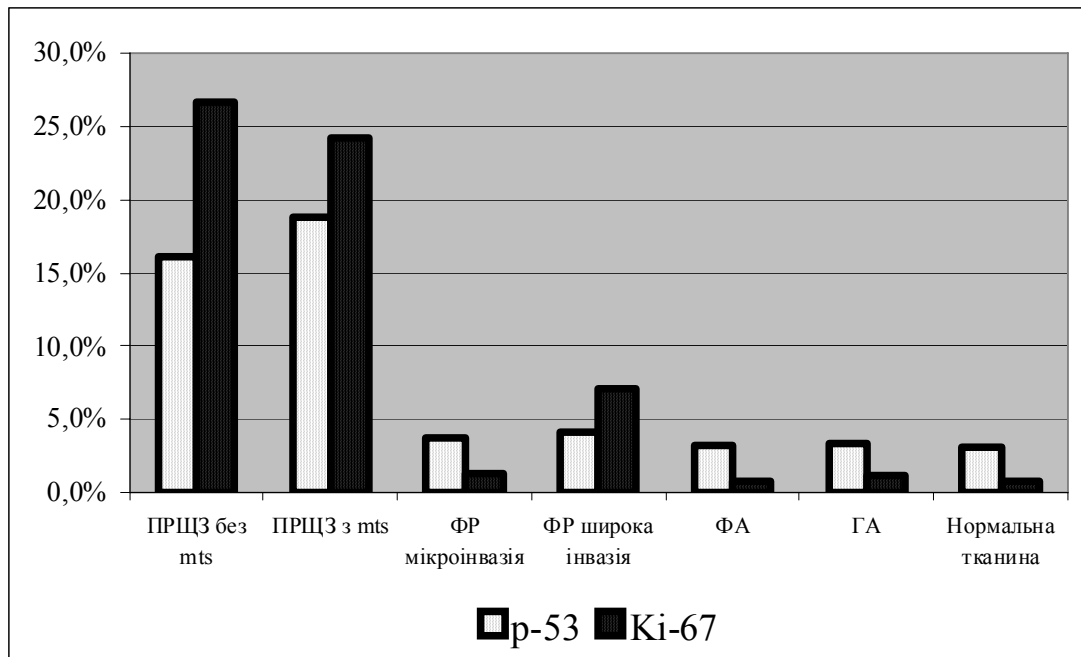


Рис. 1. Розподіл експресії маркерів проліферації та апоптозу серед різних варіантів пухлин щитовидної залози.

При дослідженні експресії тиреоглобуліну (ТГ) позитивний статус спостерігався в усіх випадках диференційованих РЩЗ, в усіх клітинах, але з різним ступенем інтенсивності. При цьому в більшості спостережень відзначалося слабе або помірної інтенсивності фарбування з дифузним розподілом клітин з реакцією у пухлинній паренхімі. При порівнянні рівня експресії ТГ у різних зонах пухлини значимих відмінностей не знайдено, кількість і інтенсивність реакції в усій

пухлині були однаковими. Експресія ТГ у РЩЗ з наявністю метастазів і без таких мала значні розходження. Так, серед метастатичних пухлин інтенсивність експресії ТГ була в 1,57 рази нижчою, ніж серед новоутворень без метастазів (рис. 2). При цьому серед решти пухлин значної розбіжності майже не спостерігалось, з лише незначною тенденцією до збільшення експресії ТГ в ФА порівняно з ФР, які, в свою чергу мали більш інтенсивну експресію у порівнянні з ПРЩЗ.

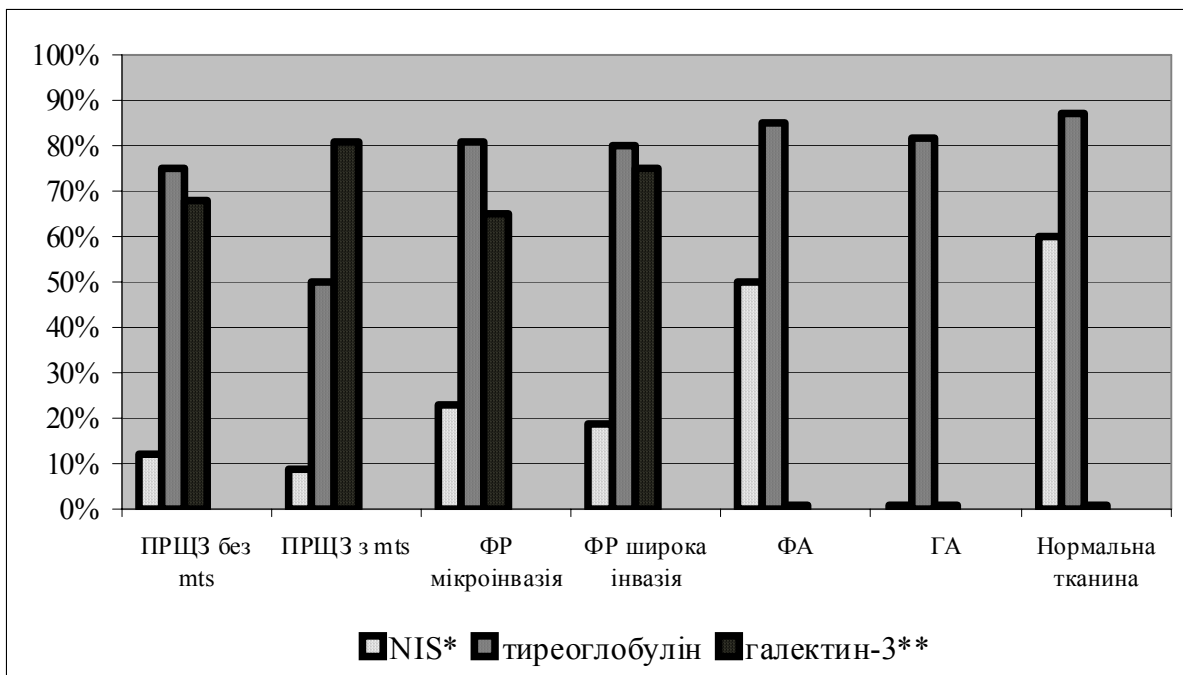


Рис. 2. Розподіл експресії маркерів біологічних властивостей серед різних гістологічних варіантів раків щитовидної залози.

Експресія галектину-3 виявлена у всіх випадках диференційованих РЩЗ та в тканині метастазів раку у лімфатичні вузли. У всіх випадках відзначалося виражене забарвлення практично всіх клітин раку. В той же час, були відсутні будь-які ознаки експресії в паренхімі ФА та ГА, так само як і в нормальній тканині. В цих випадках експресія галектину-3 відзначалася в стромі. Таким чином, спостерігалась своєрідна інверсія експресії галектину-3 при переході від доброякісних до злоякісних пухлин. Крім того була вивчена експресія галектину-3 в РЩЗ в залежності від гістологічної структури та біологічної поведінки. Було визначено достовірне збільшення експресії галектину-3 в ПРЩЗ з метастазами, порівняно з такими без метастазів, а також зростання експресії цього маркера в ФР з наявністю широкої інвазії, порівняно з такими в яких була мінімальна інвазія ( $p < 0,01$ ).

Позитивний статус для натрій-йодидного симпортеру (NIS) спостерігався в 77,8% клітин диференційованих РЩЗ, включаючи ПРЩЗ та ФР. Більшість NIS-позитивних ПРЩЗ показували сильне внутрішньоклітинне забарвлення при цьому імунореактивність плазматичної мембрани не визначалась. У випадках метастазів ПРЩЗ в регіональні лімфатичні вузли була присутня помірна експресія NIS в 67,8±7,2% цих метастазів, порівняно з первинними папілярними пухлинами (73,3±8,7%). Всі випадки ФР демонстрували виразну або помірну цитоплазматичну експресію NIS, в 21% випадків спостерігалось мембранне забарвлення. Спостерігалось зниження експресії NIS в ФР з широкою інвазією (18,9±2,3%). Близько 50% ФА продемонстрували характерну базолатеральну експресію NIS на плазматичній мембрані. В ГА мембранне забарвлення на NIS майже не спостерігалось.

#### Висновки

1. Експресія протеїну Ki-67 в папілярних раках щитовидної залози мала середній показник 25,45±2,34%, в фолікулярних карциномах – 4,21±0,32%, в аденомах – 0,99±0,02%. Виявлений прямий кореляційний зв'язок рівня експресії Ki-67 з ступенем інвазії в фолікулярних карциномах ( $r=+0,49$ ) і наявністю метастазів в папілярних раках ( $r=+0,57$ ).

2. Експресія онкопротеїну p53 спостерігалась в 78,1% випадків диференційованих раків щитовидної залози. Експресія цього маркера значно збільшена в папілярних раках порівняно з фолі-

кулярними карциномами. Не було виявлено достовірної залежності рівня експресії p53 ні з наявністю метастазів в папілярних раках, ні зі ступенем інвазії в фолікулярних.

3. Реакція з тиреоглобуліном в диференційованих карциномах щитовидної залози визначена в 100% випадків. Інтенсивність експресії цього маркера варіювала від виразної в фолікулярних та папілярних карциномах без метастазів до помірної експресії. Експресія білку ТГ мала прогностичне значення щодо подальшого перебігу процесу. Виявлений зворотній кореляційний зв'язок рівня експресії ТГ з наявністю метастазів ( $r=-0,35$ ).

4. У всіх випадках карцином щитовидної залози (і фолікулярних, і папілярних) та в їх метастазах у лімфатичні вузли виявлена внутрішньоклітинна експресія галектину-3 в паренхімі пухлини. В доброякісних новоутвореннях та нормальній залозі спостерігалось забарвлення стромального компоненту. Таким чином галектин-3 є достовірним діагностичним маркером для диференціювання між фолікулярними карциномами та аденомами. Встановлено прямий кореляційний зв'язок між рівнем експресії і наявністю метастазів в регіонарні лімфатичні вузли ( $r=+0,34$ ), а також зі зростанням рівня інвазії в фолікулярних карциномах ( $r=+0,27$ ).

5. Експресія натрій-йодного симпортеру в папілярних карциномах щитовидної залози відрізнялась інтрацелюлярним характером та втратою мембранної локалізації, встановлено зворотній кореляційний зв'язок рівня експресії з наявністю метастазів в регіонарні лімфатичні вузли ( $r=-0,25$ ), а також з зростанням рівня інвазії в фолікулярних карциномах ( $r=-0,21$ ).

6. Отримані дані дозволяють на підставі імуногістохімічного профілю раку щитовидної залози уточнювати ступінь інвазійних властивостей, прогнозувати його подальший перебіг, наявність метастазів та проводити диференційну діагностику. Це дає можливість виділити групи пацієнтів, які потребують більш ретельного клінічного обстеження й спостереження, більш тривалої й масивної терапії, а також тих хворих, до котрих можуть бути застосовані органозберігаючі методи лікування.

**Перспективи подальших розробок** пов'язані з вивченням додаткових факторів які відображають біологічні властивості раків щитовидної залози.

#### Літературні джерела

Бондаренко О. О. Експресія Na<sup>+</sup>/I<sup>-</sup>-симпортеру в новоутвореннях щитовидної залози: імуногістохімічне дослідження / О. О. Бондаренко, І. С. Шпонька, В. І. Шпонька // Морфологія. – 2009. – Т. 3, № 1. – С. 28-31.

Бондаренко О. О. Особливості експресії галектину-3 у фолікулярних пухлинах щитовидної залози / О. О. Бондаренко // Світ медицини та біології. – 2008. – Т. 2, № 1. - С. 14-17.

Шпонька І. С. Прогностичне значення експресії

пресії тиреоглобуліну та онкомаркерів (P 53 та Ki-67) в різних варіантах папілярного раку щитовидної залози / І. С. Шпонька, О. О. Бондаренко, М. М. Федченко // Медичні перспективи. - 2007. - Т. 12, № 4. - С. 11-16.

An immunohistochemical study of Na<sup>+</sup>/I<sup>-</sup>-symporter in human thyroid tissues and salivary gland tissues / S. M. Jhiang, J. Y. Cho, K. Y. Ryu [et al.] // Endocrinology. - 1998. - Vol. 139. - P. 4416-4419.

Casey M. B. Distinction between papillary thyroid hyperplasia and papillary thyroid carcinoma by immunohistochemical staining for cytokeratin 19, galectin-3, and HBME-1 / M. B. Casey, C. M. Lohse, R. V. Lloyd // Endocr. Patol. - 2003. - Vol. 14, № 1. - P. 55-60.

Cvejic D. Galectin-3 and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) expression in papillary thyroid carcinoma / D. Cvejic, S. Savin, I. Petrovic // Experimental oncology. - 2005. - Vol. 27, № 3. - P. 210-214.

Galectin-3 and CD44v6 Isoforms in the Preoperative Evaluation of Thyroid Nodules / A.

Gasbarri, M. P. Martegani, F. Del Prete [et al.] // Journal of clinical oncology. - 1999. - Vol. 17, № 11. - P. 3494-3502.

Growth activity in hyperplastic and neoplastic human thyroid determined by an immunohistochemical staining procedure using monoclonal antibody MIB-1 / R. Katon, K. Suzuki, A. Hemmi [et al.] // Human pathology. - 1995. - Vol. 26, № 2. - P. 139-146.

MIB-1 Labeling index in various types of thyroid neoplasms. - MIB-1 labeling index in papillary carcinomas of the thyroid represents pathological differentiated types of the tumors / K. Kobayashi, Sh. Fukata, T. Yokozawa [et al.] // Journal of endocrinological investigation. - 1999. - Vol. 22, № 6. - P. 70.

Rapid communication: predominant intracellular overexpression of the Na<sup>+</sup>/I<sup>-</sup>-symporter (NIS) in a large sampling of thyroid cancer cases / Dohan O., Baloch Z., Banreji Z. [et al.] // Journal of clinical endocrinology and metabolism. - 2001. - Vol. 86. - P. 2697-2700.

#### **Бондаренко О.О., Шпонька И.С., Гриценко П.О. Использование онкомаркеров в морфологической диагностике эпителиальных опухолей щитовидной железы.**

**Резюме.** Работа посвящена изучению экспрессии молекулярных маркеров в дифференцированных раках щитовидной железы для прогнозирования дальнейшего клинического течения заболевания. В исследовании проведен анализ натрий-йодного симпортера, тиреоглобулина, галектина-3, онкопротейна p53, пролиферативной активности (на основании экспрессии Ki-67) в опухолях в зависимости от наличия метастазов и уровня инвазии. Определено прогностическое значение каждого маркера биологических свойств. Установлены иммунофенотипы тиреоидных раков с высоким риском метастазирования. Предложен маркер для дифференциальной диагностики между фолликулярными аденомами и карциномами. Полученные данные позволяют на основании иммуноморфологического профиля дифференцированных раков щитовидной железы прогнозировать их дальнейшее течение, что даёт возможность выделить группы пациентов, которые требуют более тщательного клинического обследования и наблюдения, индивидуализации терапии, а также тех больных, к которым могут быть применены менее инвазивные методы лечения.

**Ключевые слова:** дифференцированные раки щитовидной железы, иммуногистохимия, натрий-йодный симпортер, тиреоглобулин, галектин-3, Ki-67, p53.