

УДК 613.8:614.71:615.227:616.44

DOI: 10.22141/2224-0721.13.8.2017.119267

Сазонов М.Є., Корчагін Є.П., Гойденко Н.І.

ДУ «Інститут проблем ендокринної патології імені В.Я. Данилевського НАМН України», м. Харків, Україна

Визначення експресії імуногістохімічних маркерів апоптозу та проліферації у тканинах фолікулярних неоплазій щитоподібної залози

For cite: Mezhdunarodnyi Endokrinologicheskii Zhurnal. 2017;13(8):541-545. doi: 10.22141/2224-0721.13.8.2017.119267

Резюме. Мета. Визначення експресії імуногістохімічних маркерів апоптозу p53 та bcl-2 і маркера проліферації Ki-67 у фолікулярних неоплазіях щитоподібної залози (ЩЗ). **Матеріали та методи.** Як критерії диференціальної діагностики фолікулярних неоплазій ЩЗ пропонуються численні імуногістохімічні маркери, серед яких найбільш корисними є маркери проліферації Ki-67 та апоптозу p53, bcl-2. Проведено імуногістохімічне дослідження операційного матеріалу 50 пацієнтів, оперованих у клініці ДУ «Інститут проблем ендокринної патології імені В.Я. Данилевського НАМН України» з приводу доброякісних (25 аденом) та злоякісних (25 карцином) фолікулярних новоутворень. **Результати.** Отримані дані показують, що фолікулярні аденоми солідної і фетально-ембріональної будови мають високий рівень спорідненості з фолікулярним раком ЩЗ за показниками проліферативної активності та порушень механізмів апоптозу, що, ймовірно, передбачає найбільший потенціал до малігнізації і подальшого метастазування. **Висновки.** Високий рівень експресії p53 та стабільно високий рівень експресії bcl-2 в клітинах фолікулярного раку ЩЗ і фолікулярної аденоми солідної та фетально-ембріональної будови вказує на глибокі порушення апоптотичних процесів при розвитку фолікулярних неоплазій ЩЗ.

Ключові слова: щитоподібна залоза; фолікулярна неоплазія; імуногістохімічні маркери; Ki 67; p53; bcl-2

Вступ

Як критерії диференціальної діагностики фолікулярних аденом (ФА) та фолікулярного раку щитоподібної залози (ФРЩЗ) пропонуються численні імуногістохімічні, імуноцитохімічні та молекулярні маркери, жоден з яких, на жаль, не має стовідсоткової специфічності [1, 2]. Відрізнити доброякісну пухлину від злоякісної, використовуючи рутинні морфологічні методи, наприклад, дослідження гістологічних препаратів хірургічно видаленої пухлинної тканини, іноді нескладно, іноді — нелегко. В останньому випадку йдеться про так звані групи пухлин неуточненого потенціалу злоякісності (ПНПЗ) [3].

Відомо, що фолікулярно-клітинні пухлини ЩЗ представлені широким спектром новоутворень різної гістологічної будови й потенціалу злоякісності: від доброякісних ФА до диференційованого папі-

лярного й ФРЩЗ, більш агресивного низькодиференційованого раку і вкрай злоякісної недиференційованої карциноми. ПНПЗ займають проміжне положення між ФА і високкодиференційованими папілярним і ФРЩЗ [3]. Це пояснюється тим, що проблема встановлення злоякісності пов'язана не стільки з морфологічними та клінічними особливостями самих пухлин, скільки з недостатнім знанням біологічної сутності новоутворень [1, 2]. Однак пошук імуногістохімічних і молекулярно-генетичних відмінностей проводиться між групами очевидно доброякісних і очевидно злоякісних тиреоїдних новоутворень. Вивченню ж діагностичної значущості імуногістохімічних маркерів у встановленні злоякісності вузлового зоба присвячені поодинокі роботи [4]. У літературі згадується не менше 50 різних молекулярних маркерів, однак лише деякі з них виявилися корисними в клінічній практиці.

Це насамперед маркери проліферації Ki-67 і апоптозу p53 та bcl-2 [5].

Ki-67 є найбільш специфічним маркером проліферації і димерною молекулою, що має тісний зв'язок із 10-ю хромосою та складається з двох поліпептидних ланцюгів із молекулярною масою 345 і 395 кДа. Визначення експресії Ki-67 дозволяє виділити пухлинні клітини, що знаходяться в усіх фазах (G1, S, G2 і M) клітинного циклу, крім G0 [6, 7].

Транскрипційний фактор p53, який складається з 392 амінокислот і включає 6 доменів, регулює клітинний цикл і виконує функцію супресора утворення злоякісних пухлин та експресується в усіх клітинах організму. Білок p53 активується при ушкодженнях генетичного апарату, а також при стимулах, які можуть призвести до подібних ушкоджень, або є сигналом при несприятливому стресовому стані клітини. Функція його полягає у видаленні з пулу клітин, які є потенційно онкогенними (звідси образна назва p53 — guardian of the genome — хранитель геному) [8, 9]. Але це стосується p53 «дикого типу», який, як вважають, стимулює апоптоз, у той час як мутантний p53 інгібує запрограмовану клітинну загибель. Втрата функції білка p53 може бути встановлена в 50 % випадків злоякісних пухлин людини. Передбачається, що рак формується шляхом активації протоонкогенів і втрати або інактивації гена супресора пухлини (антионкогена). Відповідно до цієї теорії вважається, що фолікулярна карцинома трансформується з фолікулярної аденоми, папілярний рак — із клітин-попередників тиреоцитів, а анапластичний рак може розвиватися як з папілярної, так і з фолікулярної карциноми внаслідок втрати диференціювання [5, 10]. Дефекти p53 дозволяють клітинам знайти толерантність до цитотоксичної дії ефektorів імунної системи протягом усього злоякісного переродження і формування клону злоякісних клітин [11, 12].

Родину bcl-2 становлять 17 клітинних білків, які мають широкий спектр активності щодо апоптотичних процесів. Субродина близьких до bcl-2 за морфологією білків (bcl-2, bcl-XL, bcl-w та ін.) пригнічує апоптоз, у той час як білки субродин bax і bH3 активують апоптотичні процеси. Функціональна різниця між близькими за структурою молекулами цієї родини білків полягає у впливі на вивільнення цитохрому C із мітохондрій. Білки bcl-2 та bcl-XL здатні безпосередньо зв'язувати цитохром C і витіснити його з апоптосом, запобігаючи таким чином активації каспаз [8, 13].

Отже, визначення взаємозв'язку між експресією Ki-67, p53, bcl-2 та морфологічними характеристиками фолікулярних неоплазій (ФН) вважається актуальним для встановлення спорідненості між доброякісними та злоякісними тиреоїдними пухлинами, пошуку маркерів їх диференціальної діагностики.

Мета дослідження — визначення експресії імуногістохімічних маркерів апоптозу p53 та bcl-2 і маркера проліферації Ki-67 у фолікулярних неоплазіях ЩЗ.

Матеріали та методи

Досліджено операційний матеріал 50 хворих, оперованих у клініці ДУ «Інститут проблем ендокринної патології імені В.Я. Данилевського НАМН України» протягом 2014–2016 рр. При остаточному патоморфологічному дослідженні виявлено 25 випадків ФРЩЖ, 5 нормофолікулярних аденом, 10 аденом солідної будови та 10 фетально-ембріональних аденом. Для визначення злоякісного потенціалу пухлин ІГХ-методом визначали експресію p53; як маркер антиапоптозу досліджувалася експресія bcl-2; проліферативну активність пухлин оцінювали за експресією маркера Ki-67. Використовувалися мишачі й кролячі моноклональні та поліклональні антитіла фірми DAKO (Данія), фірми Thermo Scientific (Великобританія), фірми Diagnostic BioSystems (США) і Abcam (США). Матеріал фіксували 10% нейтральним формаліном протягом 24 годин. Заливали в парафін, готували зрізи завтовшки 4 мкм, які наносили на високоадгезивні скла і висушували при температурі 37 °С протягом 18 годин. Демаскуюча термічна обробка була виконана за методом кип'ятіння зрізів у цитратному буфері (рН — 6,0). Для візуалізації первинних антитіл використовувалася система детекції UltraVision Quanto Detection Systems HRP Polymer (Thermo Scientific). Як хромоген використовувався DAB (діамінобензидин). Підрахунок результатів здійснювали за допомогою окулярної сітки Автанділова в довільно вибраних полях зору при збільшенні 400 [14]. Оцінку імуногістохімічної мітки виробляли за двома параметрами: ступінь поширення та інтенсивність забарвлення. Ступінь поширення мітки враховували за процентним умістом забарвленої цитоплазми клітин від загального числа клітин у полі зору. Комплексні морфологічні та морфометричні дослідження проводилися на мікроскопі Primo Star (Carl Zeiss) з використанням програм AxioCam (ERc 5s) і Microsoft Excel.

Результати

Отримані дані свідчили про різний характер експресії досліджуваних маркерів у препаратах новоутворень фолікулярної будови. При визначенні Ki-67 встановлено, що прості ФА (нормофолікулярні) статистично не експресували даний маркер (рис. 1). Максимальний рівень експресії виявлено в тканинах ФРЩЗ (72,0 %). ФА солідного та фетально-ембріонального характеру займали проміжне місце (10 та 40 % відповідно). Слід відзначити, що експресія Ki-67 в нормальній та доброякісно зміненій тиреоїдній паренхімі не визначалася. Крім того, у випадках, коли вузлові новоутворення оточували мікрокарциноми, проліферативна активність доброякісних тиреоцитів збігалася з рівнем проліферації клітин у злоякісній пухлині ЩЗ, яка нещодавно виникла. Такі дані можуть розцінюватися, як підтвердження вірогідної малігнізації доброякісних утворень ЩЗ.

Звертає на себе увагу і той факт, що фетально-ембріональні аденоми ЩЗ виявляли високий рівень проліферації. Такі властивості цих аденом можуть

опосередковано вказувати на високий потенціал ФА до малігнізації.

За нашими даними, маркер p53 мав високу частоту експресії в тканинах солідних, фетально-ембріональних ФА та ФРЩЗ, що демонструє значні порушення процесу апоптозу при вказаних патологіях (рис. 2). Крім того, у поєднанні з високим рівнем проліферації за показниками експресії Ki-67 вказані аденоми мали найвищий ризик до подальшої малігнізації.

За результатами досліджень bcl-2 визначено його високий рівень експресії для всіх типів ФН, що свідчить про втрату апоптотичних властивостей клітин як доброякісних тиреоїдних аденом, так і ФРЩЗ (рис. 3).

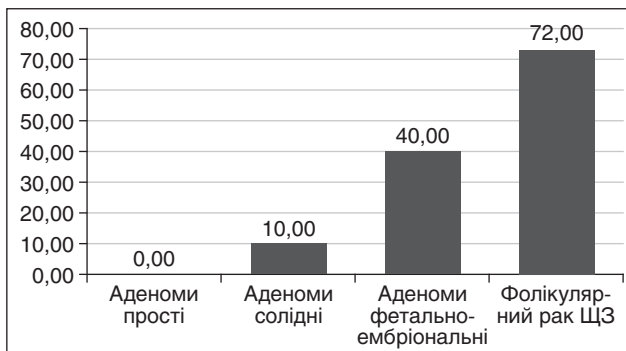


Рисунок 1. Частота експресії Ki-67 в тканинах фолікулярних пухлин щитоподібної залози (у %)

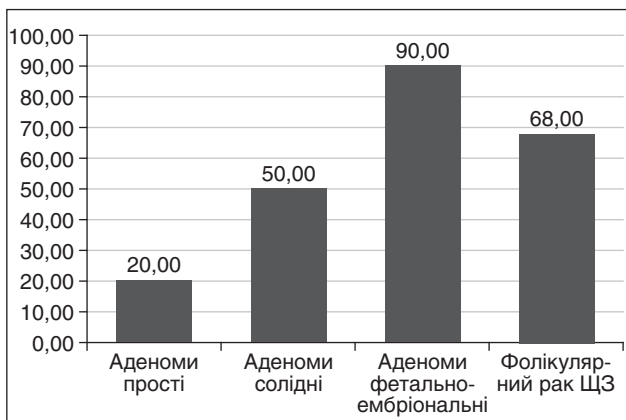


Рисунок 2. Частота експресії p53 в тканинах фолікулярних пухлин щитоподібної залози (у %)

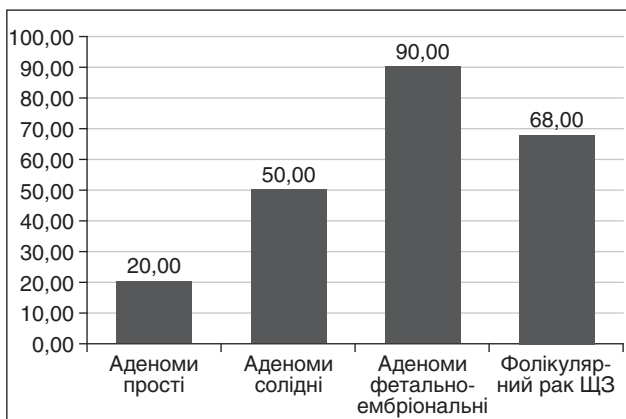


Рисунок 3. Частота експресії bcl-2 в тканинах фолікулярних пухлин щитоподібної залози (у %)

Обговорення

Проліферативна активність (ПА) новоутворення є однією з найбільш важливих характеристик його фенотипу, що визначає швидкість росту новоутворення, здатність його до метастазування, ефективність лікувальних заходів. Індекс ПА як кількісний критерій досить активно застосовується в мамології при оцінці агресії злоякісного процесу. ПА пухлинних клітин при раку ЩЗ досить активно вивчається в країнах Західної Європи, США, Росії та Японії [15]. Багато досліджень демонструють високий рівень експресії при злоякісній патології ЩЖ, зокрема при папілярному раку ЩЗ, а також як прогностично несприятливий фактор при диференціальній діагностиці ФА і ФРЩЗ [16, 17]. Виражена експресія Ki-67 при ФРЩЗ, за результатами наших досліджень, узгоджується із загальноприйнятою гіпотезою. Звертає на себе увагу близькість за показниками маркера проліферації Ki-67, ФРЩЗ і ФА фетально-ембріональної будови, що вірогідно свідчить про найвищий потенціал останніх до малігнізації й подальшого метастазування. Низький рівень експресії Ki-67 вказує на відносну ефективність регуляції клітинного циклу, що є характерним для незміненої тиреоїдної тканини, що, за нашими даними, демонструють нормофолікулярні аденоми.

Згідно з даними численних досліджень, підвищена експресія p53 була виявлена в багатьох ракових клітинних лініях. У нормальних тканинах рівень p53 залишається низьким, але у відповідь на ушкодження ДНК відбувається активація p53 із великим накопиченням його рівня. Але існують дані, що не підтверджують відмінності в експресії p53 у пацієнтів з фолікулярною аденомою і фолікулярною карциномою, чи навпаки, показують зниження експресії у диференційованих формах РЩЗ [8, 18]. Також недостатньо досліджені мутації цього гена у хворих із доброякісними й аутоімунними захворюваннями ЩЗ [19]. Відповідно до отриманих нами даних, вірогідно встановити прогностичну цінність даного маркера в диференціальній діагностиці фолікулярних новоутворень поки не вдається, що вказує на необхідність глибокого вивчення патогенетичних факторів існування схожих форм пухлинної патології ЩЗ.

bcl-2 є найбільш вивченим геном, гіперекспресія якого характерна для багатьох злоякісних процесів. Численні дослідження показують, що експресія bcl-2 може блокувати апоптоз індукованих поряд сигналів, у тому числі радіацією, хіміотерапевтичних препаратів, стероїдними гормонами та ін. [20]. Білок bcl-2 також здатний захищати клітину від апоптозу регульованого p53, що передбачає супресію фенотипічного сигналу і трапляється при пухлинній трансформації. Наявність вираженої експресії білка bcl-2, за деякими даними, є маркером підвищеної агресивності та маркером втрати диференціювання у хворих на тиреоїдний рак; за іншими даними, — забезпечує

кращий прогноз виживання. Крім того, існують дослідження, що показують резистентність пухлин до дії протипухлинних препаратів і променевої терапії на тлі підвищеної експресії bcl-2, що обумовлено апоптотичним механізмом загибелі пухлинних клітин [21]. Також у літературі зустрічаються дані як про відсутність експресії bcl-2 у більше ніж 70 % аденом і карцином, так і про наявність її практично в усіх варіантах тканини ЩЗ (нормальна незмінена тканина, ФА, ФРЩЗ), що збігається з отриманими результатами наших досліджень [22].

Висновки

1. Дослідження маркера проліферації Ki-67 виявило високу частоту експресії в препаратах ФРЩЗ і відсутність у нормофолікулярних аденомах. Високий рівень експресії Ki-67 у тканинах ФРЩЗ і ФА фетально-ембріональної будови свідчить про ймовірно найвищий потенціал останніх до малігнізації та подальшого метастазування.

2. Високий рівень експресії p53 та стабільно високий рівень експресії bcl-2 в клітинах ФРЩЗ та ФА солідної та фетально-ембріональної будови вказує на глибокі порушення апоптотичних процесів при розвитку фолікулярних неоплазій ЩЗ.

Конфлікт інтересів. Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів при підготовці даної статті.

References

1. Yassa L, Cibas ES, Benson CB, et al. Longterm assessment of a multidisciplinary approach to thyroid nodule diagnostic evaluation. *Cancer*. 2007 Dec 25;111(6):508-16. doi: 10.1002/ncr.23116.
2. Xing M, Haugen BR, Schlumberger M. Progress in molecular-based management of differentiated thyroid cancer. *Lancet*. 2013 Mar 23;381(9871):1058-69. doi: 10.1016/S0140-6736(13)60109-9.
3. Chernukhina DIu, Prilutskii AS. Role of galectin-3, HBME-1 and cytokeratine in immune histochemical diagnostics of papillary thyroid cancer. *Mezhdunarodnyi Endokrinologicheskii Zhurnal*. 2012;5(45):21-23. (in Russian).
4. Abrosimov AIu, Dvinskikh NY. The diagnostic value of immuno-expression of galectin-3, HBME-1 and cytokeratin-19 in tumors of the thyroid gland of various malignant potentials. *Rossiiskii Onkologicheskii Zhurnal*. 2010;1:26-31. (in Russian).
5. Parameswaran R, Brooks S, Sadler GP. Molecular pathogenesis of follicular cell derived thyroid cancers. *Int J Surg*. 2010;8(3):186-93. doi: 10.1016/j.ijso.2010.01.005.
6. Pujani M, Arora D, Rujani M, Singh SK, Tejwani N. Role of Ki-67 as a proliferative marker in lesions of thyroid. *Indian J Cancer*. 2010 Jul-Sep;47(3):304-7. doi: 10.4103/0019-509X.64727.
7. Lacoste-Collin L, d'Aure E, Bérard D, Rouquette I, Delisle MB, Courtade-Saïdi M. Improvement of the cytological diagnostic accuracy of follicular thyroid lesions by the use of the Ki-67 proliferative index in addition to cytokeratin-19 and HBME-1 immunomarkers: a study of 61 cases of liquid-based FNA cytology with histological controls. *Cytopathology*. 2014 Jun;25(3):160-9. doi: 10.1111/cyt.12128.
8. Tsygan VN, Kazakov SP, Zobotina TN, Kushlinskiy NE. Apoptosis and proliferation markers from patients with thyroid oncology and autoimmune diseases. *Vestnik rossiiskoi voenno-meditsinskoi akademii*. 2010;4(32):197-204. (in Russian).
9. Khaziev VV, Sorokina IV. Expression of onco-markers Ki-67 and p53 in thyroid follicular neoplasias. *Ekspyrymental'na i klinichna medycyna*. 2013;2(59):77-81. (in Ukrainian).
10. Berezkina IS, Saprina TV, Zima AP, et al. The problem of molecular diagnostic test value in the differential diagnosis of a thyroid gland nodule. *Russian Journal of Biotherapy*. 2014;3(13):83-94. (in Russian).
11. Lehmann BD, Poetenpol JA. Targeting mutant p53 in human tumors. *J Clin Oncol*. 2012 Oct 10;30(29):3648-50. doi: 10.1200/JCO.2012.44.0412.
12. Muzhichuk OV, Afanasyeva NI, Muzhichuk VV. Value of the prognostic markers of the tumour progression of P53, P21WAF1/CIP1, P63 and KI-67 in thyroid tumors. *The Journal of V. N. Karazin Kharkiv National University, series Medicine*. 2009;879(18):4-9. (in Ukrainian).
13. Bouillet P, Strasser A. Bax and Bak: back-bone of T cell death. *Nat Immunol*. 2002 Oct;3(10):893-4. doi: 10.1038/ni1002-893.
14. Avtandilov GG. *Osnovy kolichestvennoi patologicheskoi anatomii [Fundamentals of quantitative pathological anatomy]*. Moscow: Meditsina; 2002. 240 p. (in Russian).
15. Aiad HA, Bashandy MA, Abdou AG, Zahran AA. Significance of AgNORs and ki-67 proliferative markers in differential diagnosis of thyroid lesions. *Pathol Oncol Res*. 2013 Apr;19(2):167-75. doi: 10.1007/s12253-012-9565-1.
16. Ito Y, Miyauchi A, Kakudo K, Hirokawa M, Kobayashi K, Miya A. Prognostic significance of ki-67 labeling index in papillary thyroid carcinoma. *World J Surg*. 2010 Dec;34(12):3015-21. doi: 10.1007/s00268-010-0746-3.
17. Katon R, Suzuki K, Hemmi A, et al. Growth Activity in Hyperplastic and Neoplastic Human Thyroid Determined by an Immunohistochemical Staining Procedure Using Monoclonal Antibody MIB-1. *Hum Pathol*. 1995 Feb;26(2):139-46. PMID: 7860043.
18. Koiomecki K, Maciaszczyk P, Stepień H, et al. Evaluation of p53 and soluble Fas ligand (sFasL) serum level concentration as indicators of apoptosis in serum of patients with benign and malignant primary follicular thyroid tumors. *Endokrynol Pol*. 2006 Jul-Aug;57(4):320-5. PMID: 17006831.
19. Hasbek Z, Turgut B, Erselcan T. P53 antibody: is it an indicator of dedifferentiated thyroid cancer? *Ann Nucl Med*. 2014 Jan;28(1):42-6. doi: 10.1007/s12149-013-0783-8.
20. Leitsas K P, Fzangou-Lazaizidis M, Skyrilas A. Transcription factor-mediated proliferation and apoptosis in benign and malignant thyroid lesions. *Pathol Int*. 2005 Nov;55(11):694-702. doi: 10.1111/j.1440-1827.2005.01899.x.
21. Thorlacius S, Børresen AL, Eyfjörd JE. Somatic p53 mutations in human breast carcinomas in an Icelandic population: a prognostic factor. *Cancer Res*. 1993 Apr 1;53(7):1637-41. PMID: 8453635.

Отримано 15.11.2017 ■

Сазонов М.Е., Корчагин Е.П., Гойденко Н.И.

ГУ «Институт проблем эндокринной патологии имени В.Я. Данилевского НАМН Украины», г. Харьков, Украина

Исследование экспрессии иммуногистохимических маркеров апоптоза и пролиферации в тканях фолликулярных неоплазий щитовидной железы

Резюме. *Цель.* Определение экспрессии иммуногистохимических маркеров апоптоза p53 и bcl-2 и маркера пролиферации Ki-67 в фолликулярных неоплазиях щитовидной железы (ЩЖ). *Материалы и методы.* В качестве критериев дифференциальной диагностики фолликулярных неоплазий ЩЖ предлагаются многочисленные иммуногистохимические маркеры, среди которых наиболее полезными являются маркеры пролиферации Ki-67 и апоптоза p53 та bcl-2. Проведено иммуногистохимическое исследование операционного материала 50 пациентов, оперированных в клинике ГУ «Институт проблем эндокринной патологии имени В.Я. Данилевского НАМН Украины» по поводу доброкачественных (25 аденом) и злокачественных (25 карцином) фолликулярных новообразований. *Результаты.* Полученные данные показывают, что фолликулярные

аденомы солидного и фетально-эмбрионального строения имеют высокий уровень сродства с фолликулярными карциномами ЩЖ по показателям пролиферативной активности и нарушениям механизмов апоптоза, что, вероятно, предполагает наибольший потенциал к малигнизации и дальнейшему метастазированию. *Выводы.* Высокий уровень экспрессии p53 и стабильно высокий уровень экспрессии bcl-2 в клетках фолликулярного рака ЩЖ и фолликулярной аденомы солидного и фетально-эмбрионального строения указывает на глубокие нарушения апоптотических процессов при развитии фолликулярных неоплазий ЩЖ.

Ключевые слова: щитовидная железа; фолликулярная неоплазия; иммуногистохимические маркеры; Ki 67; p53; bcl-2

M. Ye. Sazonov, Ye. P. Korchagin, N. I. Goidenko

State Institution "V. Danilevsky Institute of Endocrine Pathology Problems of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine", Kharkiv, Ukraine

Immune histochemical study of apoptosis marker expression and proliferation in tissues at follicular neoplasia of the thyroid gland

Abstract. *Background.* The purpose was to determine the expression of immune histochemical markers of apoptosis, p53 and bcl-2, and proliferation marker Ki-67 in follicular thyroid neoplasia. *Materials and methods.* Numerous immune histochemical markers are proposed as criteria for the differential diagnosis of follicular thyroid neoplasia, the most useful of which are Ki-67 proliferation marker and p53 and bcl-2 apoptosis markers. We have conducted immune histochemical study of the surgical material of 50 patients operated in the clinic of State Institution "V. Danilevsky Institute of Endocrine Pathology Problems of the NAMS of Ukraine" for benign (25 adenoid tumors) and malignant (25 carcinoma)

follicular neoplasms. *Results.* The obtained data shows that follicular adenomas with solid and fetal-embryonic structure have a high level of correlation with follicular thyroid carcinomas in terms of proliferative activity and dysfunction of apoptosis mechanisms, which, probably, presumes the greatest potential for malignancy and further metastasis. *Conclusions.* High level of p53 expression and stably high level of bcl-2 expression in the cells of follicle thyroid cancer specifies deep violations of apoptotic processes in development of follicular thyroid neoplasia.

Keywords: thyroid gland; follicular neoplasia; immunohistochemical markers; Ki-67; p53; bcl-2