

О.О.Бондаренко
І.С.Шпонька
В.І.Шпонька

Дніпропетровська державна медична академія

Ключові слова: папілярний рак щитовидної залози, фолікулярний рак щитовидної залози, імуногістохімічна діагностика.

Надійшла: 16.10.2008

Прийнята: 05.11.2008

УДК 616.441-006.6-078.33-091.8

ЕКСПРЕСІЯ Na^+ /I-СИМПОРТЕРУ В НОВОУТВОРЕННЯХ ЩИТОВИДНОЇ ЗАЛОЗИ: ІМУНОГІСТОХІМІЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ

Резюме. Одним з ключових моментів радіоїод терапії, а також радіоізотопної діагностики раків щитовидної залози є спроможність їх клітин накопичувати йодид. Ця спроможність забезпечується активністю специфічного транспортеру – натрій-йодного симпортеру. Наше дослідження продемонструвало порушення імуноекспресії натрій-йодного симпортеру у всіх пухлинах щитовидної залози: від надекспресії та відсутності мембранної експресії в диференційованих карциномах до слабкої або фактично відсутньої в низькодиференційованих раках та Гюртле-клітинних пухлинах. Таким чином, існує перспектива застосування натрій-йодного симпортеру, як прогностичного маркеру.

Морфологія. – 2009. – Т. III, № 1. – С.28-31.

© О.О.Бондаренко, І.С.Шпонька, В.І.Шпонька, 2009

Bondarenko O.O., Shponka I.S., Shponka V.I. Expression of sodium-iodide symporter in thyroid gland tumors: immunohistochemical study.

Summary. One of the key moments of radioiodine therapy, and also radioisotope diagnostics of cancers of a thyroid gland is ability of their cells to accumulate iodide. This ability is provided with activity of the specific transporter – sodium-iodide symporter. Our research has shown disorders of sodium-iodide symporter immunoexpression in all tumors of thyroid gland: from overexpression and absence of plasma membrane expression in differentiated carcinomas, up to weak or actually absent in low differentiated cancers and Hurtle-cells tumors. Thus, there is a prospect of application of the sodium-iodide symporter, as the prognostic marker of thyroid cancers.

Key words: papillary thyroid cancer, follicular thyroid cancer, immunohistochemistry.

Вступ

Транспорт і концентрування йодиду в щитовидній залозі (ЩЗ) являє собою перший крок в продукції тиреоїдних гормонів. Проходження йодиду крізь базолатеральну мембрану поляризованих фолікулярних клітин щитовидної залози забезпечується специфічним транспортером, натрій-йодним симпортером людини (hNIS). Разом з йодид-аніоном NIS пропускає до клітини два іони натрію; трансмембранний градієнт Na^+ служить рушійною силою для транспорту йодиду проти його електрохімічного градієнту. Градієнт Na^+ підтримується Na^+/K^+ -АТФ-азою (Кавок Н.С., 2006). Молекулярні інструменти, генеровані клонуванням гену NIS (Dai G. et al., 1996), були використані для аналізу різних аспектів експресії NIS в тканині щитовидної залози. На теперішній час існує достатньо літератури присвяченої експресії NIS людини у нормальних і патологічно змінених тканинах. В серії статей, які аналізували рівні транскрипції hNIS методом полімеразної ланцюгової реакції (Yu K.Y. et al., 1999) або наявність NIS в парафінових блоках тканини щитовидної залози імуногістохімічним методом (Jhiang S.M. et al., 1998), доповідається про загальне зниження, або, інколи, втрату експресії NIS в доброякісних і злоякісних пухлинах ЩЗ. Ці дані підкріплюються тим фактом, що як доброякісні – фолікулярні аденоми, так і злоякісні – фолікулярні і папілярні карциноми (ПР), – пухлини щитовидної залози, за дуже невеликим виключенням, демонструють зниження або втрату накопичення йодиду. В протилежність цьому, інші дослідження, базовані на комбінації нозерн-або вестерн-блотінгу (Castro M.R. et al., 1999), або тільки на імуногістохімічному методі (Saito T. et al., 1998), показали нормальну експресію, або навіть надекспресію hNIS в більшості тиреоїдних карцином і аденом. В двох більш пізніх спостереженнях, імунореактивність hNIS була переважно, якщо не виключно, визначена усередині тиреоїдних клітин. Цей факт привів авторів до постулату, що дефект накопичення йоду в фолікулярних клітинах щитовидної залози міг би бути результатом пошкодженого спрямування NIS до плазматичної мембрани цих клітин.

Мета дослідження – дослідити зміни експресії NIS людини, які виникають в пухлинах ЩЗ, шляхом аналізу його імунореактивності в пухлинах і відповідних незмінених тканинах щитовидної залози.

Матеріали та методи

Ретроспективно був досліджений матеріал 27 пацієнтів (19 жінок, 8 чоловіків) різного віку в діапазоні від 1936 до 1976 року народження, який був отриманий з відділення ендокринної хірургії Дніпропетровської обласної лікарні ім. І.І.Мечнікова за період з 1999 по 2008 рр. У 15 хворих після проведеного рутинного гістологічного дослідження був встановлений діагноз папілярного раку (в трьох випадках з метастазами в регіональні лімфовузли), 2 пацієнтам – низькодиференційований рак (НР), 2 – Гюртле-клітинна аденома (ГА), 3 пацієнтам – фолікулярний рак (ФР) і 5 – фолікулярна аденома (ФА).

Для проведення морфологічного дослідження операційний і біопсійний матеріал хворих фіксувався в 10% розчині нейтрального формаліну. Після фіксації і проводки матеріал, фарбований гематоксилином-еозином піддавався рутинному мікроскопічному дослідженню. Потім зрізи товщиною 4-5 мкм наносились на предметне скло, попередньо оброблене адгезивним розчином, слідом за чим депарафінізувалися відповідно до прийнятих стандартів. Для демаскування антигенів (HIER) використовувалося нагрівання на водяній бані в 10 мМ цитратному буфері з рН 6,0 (на протязі 30 хвилин після досягнення температури 98°C) або обробка в автоклаві (5 хвилин при температурі 121°C). Як первинні антитіла використовувалися моноклональні антиті-

ла до натрій-йодному симпортеру людини (hNIS, клон FP5A, LabVision™), в концентрації 4 мг/мл (1:50) впродовж 30 хвилин. Позитивним контролем в реакціях з hNIS-антитілами були фолікули оточуючої тканини ЩЗ в контрольній групі. Негативний контроль проводився без використання первинних антитіл.

Подальшу обробку проводили за допомогою системи візуалізації Ultra Vision LP (Lab Vision®). Як хромоген використовували діамінамінобензидін (DAB, Lab Vision®). В якості фонового барвника використовували гематоксилін Майєра. Результати імуногістохімічної реакції оцінювали в балах: 0 балів – експресія відсутня, 1 бал – слабка, 2 бали – помірна, 3 бали – сильна. Спостереження проводили на світловому мікроскопі Leica® DMLS.

Результати та їх обговорення

Ми проаналізували 20 тиреоїдних раків (з них 3 папілярні карциноми з метастазами) та 7 доброякісних новоутворень ЩЗ з тканинами, прилеглими до пухлин.

Всі зразки нормальної тканини були імунопозитивні на натрій-йодний симпортер. Кубічні та призматичні клітини звичайно демонстрували експресію NIS на плазматичній мембрані (рис. 1, 1b), тоді як сплюснені клітини, розташовані навколо розтягнутих колоїдом фолікулів, демонстрували менш інтенсивне та переважно внутрішньоклітинне забарвлення.

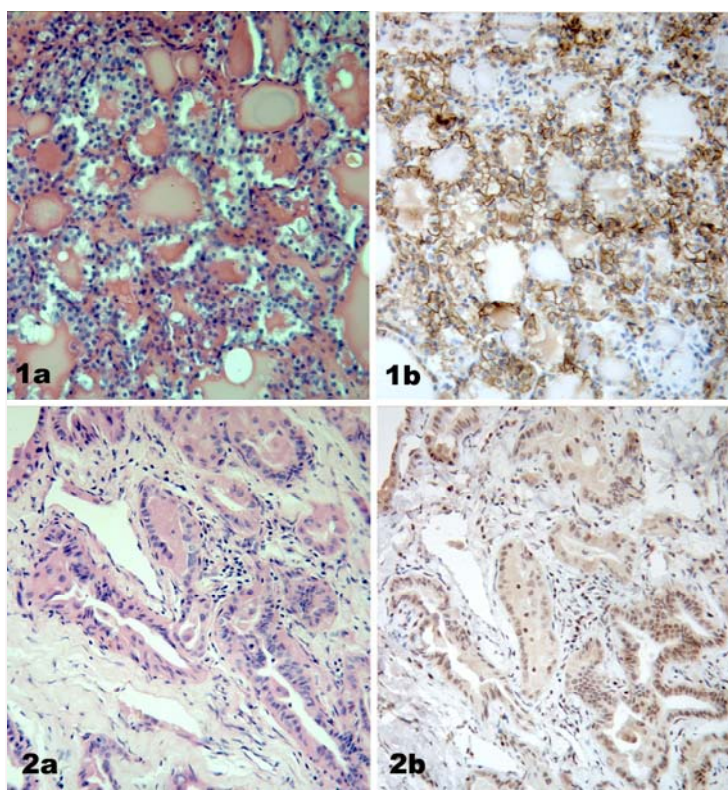


Рис. 1. Експресія NIS в папілярній карциномі і нормальній тканині щитовидної залози. 1 – фрагмент нормальної тканини щитовидної залози, $\times 400$; 2 – фрагмент папілярного раку щитовидної залози, $\times 400$; а – гематоксилін-еозин; б – імунопероксидазний метод, хромоген-діамінобензидін. Пояснення в тексті.

Близько третини клітин у фолікулі показували сильну реактивність базальної мембрани, що узгоджується з попередніми дослідженнями (Levy O. et al., 1998). Імунореактивність NIS була відсутня в деяких фрагментах тканин, що виглядали нормально, які оточували пухлинне ураження. Цей феномен може виникати за рахунок невеликого обідка здавленої вузлом тканини. NIS експресувався в 77,8% диференційованих раків ЩЗ, включаючи високо диференційовані папілярні та фолікулярні карциноми. Ці результати узгоджувались з даними, отриманими O. Dohán та ін. (2001). Більшість NIS-позитивних раків показували сильне внутрішньоклітинне забарвлення, при цьому імунореактивність плазматичної мембрани не визначалась (рис. 1, 2b). Навпаки, у 2 випадках папілярної карциноми фолікулярного варіанту будови, продемонстровано чітке мембранне забарвлення. Було проаналізовано три випадки метастазів папілярного раку в регіональні лімфатичні вузли. Помірна експресія NIS

була присутня в 2 з 3 випадків (66,6%) цих метастазів, порівняно з первинними папілярними пухлинами (73,3%).

Низькодиференційовані раки мали слабку експресію NIS (1 з 2 зразків зі слабо позитивною реакцією). Гюртле-клітинні новоутворення зазвичай не транспортують йодид, але імуногістохімічно вони показали слабку фокальну гранулярну внутрішньоклітинну імунореактивність (1 з 2 зразків був слабо позитивним). Всі випадки фолікулярних карцином демонстрували високу (2 випадки) або помірну (1 випадок) як мембранну, так і цитоплазматичну експресію симпортеру. Чотири з п'яти фолікулярних аденом продемонстрували характерну базолатеральну експресію NIS на плазматичній мембрані. В одному випадку аденоми експресія була переважно інтрацелюлярною, але деінде спостерігалась і фокальна мембранна експресія. Результати були згруповані за ступенем інтенсивності експресії NIS (табл. 1).

Таблиця 1

Показники експресії NIS в пухлинах щитовидної залози

Групи	Виразна експресія			Помірна експресія		Слабка експресія	
	Нормальна тканина	ПР	ФР	ФА	Метастази ПР	НР	ГА
Наявність мембранної експресії	+	±	±	±	--	--	--
Інтенсивність (бали)	3	3	3	2	2	1	1
Кількість випадків	27	15	3	5	3	2	2

Підсумок

Ми підтвердили, що експресія натрій-йодного симпортеру порушена у всіх пухлинах ЩЗ. Незважаючи на прояви надекспресії в папілярних та фолікулярних раках, мембранне імуномічення було вкрай незначне. Як в злоякісних, так і в доброякісних пухлинах переважало внутрішньоклітинне накопичення NIS. Експресія NIS була в цілому знижена у карциномах порівняно з нормальною тканиною ЩЗ, а також в метастатичних ураженнях, порівняно з первинними пухлинами.

Значно зниженою, практично відсутньою, була експресія в низькодиференційованих карциномах та Гюртле-клітинних аденомах.

Наше дослідження показало, що експресія NIS може варіювати в різних варіантах раків ЩЗ. Експресія цього маркера може залежати від ступеня диференціювання пухлини, а також від наявності чи відсутності метастазів.

Перспективи подальших досліджень

Прогноз перебігу диференційованих раків щитовидної залози залежить від їх спроможності акумулювати йодид, і може визначати їх чутливість до аблятивної ¹³¹I-терапії (радіойодабляції). Таким чином, в перспективі подальших розробок може бути вивчення застосування імуноекспресії натрій-йодного симпортеру в діагностичних цілях, як прогностичного і передбачувального маркера у хворих на тиреоїдні раки.

Літературні джерела

Кавок Н. С. Структура и функция регуляторов тиреоидного гормонального / Н.С. Кавок // Укр. біохім. журн. – 2006. – С. 5-19.

An immunohistochemical study of Na⁺/I⁻ 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.

Dai G. Cloning and characterization of the thyroid iodide transporter / G. Dai, O. Levy, N. Carrasco // Nature. – 1996. – Vol. 379. – P. 458-460.

Development of reverse transcription competitive polymerase chain reaction method to quantitate

the expression levels of human sodium iodide symporter / K. Y. Ryu, M. E. Senokozlieff, P. A. Smanik [et al.] // *Thyroid*. – 1999. – Vol. 9. – P. 405-409.

Increased expression of the sodium/iodide symporter in papillary thyroid carcinomas / T. Saito, T. Endo, A Kawaguchi. [et al.] // *J. clin. invest.* – 1998. – Vol. 101. – P. 1296-1300.

Monoclonal antibodies against the human sodium iodide symporter: utility for immunocytochemistry of thyroid cancer / M. R. Castro, E. R. Bergert, T. G. Beito [et al.] // *J. endocrinol.* – 1999. – Vol. 163. – P. 495-504.

N-linked glycosylation of the thyroid Na⁺/I⁻ symporter (NIS) – implications for its secondary structure model / O. Levy, A. DelaVieja, C. S. Ginter [et al.] // *J. biol. chem.* – 1998. – Vol. 273. – P. 22657-22663.

Rapid communication: predominant intracellular overexpression of the Na⁺/I⁻-symporter (NIS) in a large sampling of thyroid cancer cases / O. Dohan, Z. Baloch, Z. Banrevi, V. Livolsi [et al.]. // *J. clin. endocrinol. metab.* – 2001. – Vol. 86. – P. 2697-2700.

Бондаренко О.О., Шпонька И.С., Шпонька В.И. Экспрессия Na⁺/I⁻-симпортера в новообразованиях щитовидной железы: иммуногистохимическое исследование.

Резюме. Одним из ключевых моментов радиойодтерапии, а также радиоизотопной диагностики раков щитовидной железы является способность их клеток накапливать йодид. Эта способность обеспечивается активностью специфического транспортера – натрий-йодного симпортера. Наше исследование продемонстрировало нарушения иммуноэкспрессии натрий-йодного симпортера во всех опухолях щитовидной железы: от сверхэкспрессии и отсутствия мембранной экспрессии в дифференцированных карциномах, до слабой, или фактически отсутствующей, в низкодифференцированных раках и Гюртлечелочных опухолях. Таким образом, существует перспектива применения натрий-йодного симпортера, как прогностического маркера.

Ключевые слова: папиллярный рак щитовидной железы, фолликулярный рак щитовидной железы, иммуногистохимическая диагностика, натрий-йодный симпортер.