

Роль цитологічних особливостей тиреоцитів радіоїодрезистентних метастазів папілярного раку щитоподібної залози в їх передопераційному прогнозуванні

Г.В. Зелінська

ДУ «Інститут ендокринології та обміну речовин ім. В.П. Комісаренка НАМН України»

Резюме. Мета роботи — імуноцитохімічне та цитоморфологічне дослідження популяції тиреоцитів пунктів радіоїодрезистентних метастазів (РІРМ) порівняно з радіоїодчутливими метастазами (РІЧМ) і первинними папілярними карциномами щитоподібної залози та виявлення фенотипових особливостей тиреоцитів, на підставі яких можлива розробка методів доопераційного прогнозування радіоїодрезистентних метастазів папілярного раку щитоподібної залози. **Матеріали та методи.** Цитоморфологічні та імуноцитохімічні дослідження з використанням моноклональних антитіл проти тиреоїдної пероксидази, тиреоглобуліну, цитокератинів 7, 8, антигену Ki-67 проводили на матеріалі тонкогілкових аспіраційних пункційних біопсій 45 папілярних карцином та їх метастазів, виявлених у післяопераційному періоді (30 — радіоїодрезистентних, 15 — радіоїодчутливих). **Результати.** Показано, що радіоїодрезистентні метастази папілярного раку щитоподібної залози демонструють фенотипову гетерогенність популяції тиреоцитів на відміну від радіоїодчутливих метастазів та появу клітинних типів та структур, які відсутні в первинних папілярних карциномах та радіоїодчутливих метастазах. Ознаки фенотипової гетерогенності популяції тиреоцитів разом із низькою експресією тиреоїдної пероксидази можуть бути цитологічними чинниками доопераційного прогнозування радіоїодрезистентності метастазів папілярної карциноми щитоподібної залози, які виникли в післяопераційному періоді, та використовуватися на практиці.

Ключові слова: щитоподібна залоза, папілярна карцинома, матеріал тонкогілкової аспіраційної пункційної біопсії, радіоїодрезистентні метастази, субпопуляції епітеліоцитів, тиреоїдна пероксидаза.

* Адреса для листування (Correspondence): ДУ «Інститут ендокринології та обміну речовин ім. В.П. Комісаренка НАМН України», вул. Вишгородська, 69, м. Київ, 04114, Україна. E-mail: zdovado@ukr.net

На відміну від карцином інших локалізацій, папілярна карцинома щитоподібної залози (ПКЩЗ) у більшості випадків має сприятливий прогноз — показники 20-річного виживання хворих перевищують 90%. Це можливо завдяки застосуванню радіойодтерапії — специфічного високоефективного таргетного лікування диференційованого раку щитоподібної залози (ЩЗ) і його метастазів, яке ґрунтується на унікальній здатності клітин ЩЗ акумулювати радіойод і використовувати його в синтезі тиреоїдних гормонів. Але, на жаль, у 4-20% пацієнтів присутня первинно або розвивається з часом так звана «метастатична радіойодрефрактерна хвороба», тобто з'являються метастази, клітини яких не здатні до накопичення радіойоду, і радіойодтерапія для них є неефективною [1-3]. За даними різних авторів, втрачання тиреоїдними раками здатності до накопичення радіойоду корелює з терміном виживання хворих, середня медіана якого становить лише 2,5-3,5 року [4]. Відомо, що невчасне виявлення метастазів різко погіршує показники виживання хворих на рак ЩЗ, тому актуальним є питання раннього передбачення статусу метастазів щодо здатності до накопичення радіойоду [5]. Таке прогнозування можливе за умов знаходження фенотипових особливостей тиреоцитів у пунктатах радіойодрезистентних метастазів. Існують літературні дані щодо деяких гістологічних ознак, які корелюють із радіойодрезистентністю, агресивною поведінкою папілярних раків (певні гістологічні варіанти, наявність оксифільноклітинних і некротичних змін) [6-8]. Водночас не знайдено літературних даних щодо досліджень пункційного матеріалу радіойодрезистентних метастазів.

Метою даної роботи було імуноцитохімічне та цитологічне дослідження популяції тиреоцитів у пунктатах радіойодрезистентних метастазів (РЙРМ) порівняно з радіойодчутливими метастазами (РЙЧМ) і первинними ПКЩЗ та виявлення фенотипових особливостей тиреоцитів, на підставі яких можливо розробляти методи передопераційного прогнозування розвитку радіойодрезистентних метастазів папілярного раку щитоподібної залози.

Матеріали та методи

У роботі використано матеріал, отриманий шляхом тонкоіголкових аспіраційних пункційних біопсій (ТАПБ) у пацієнтів чоловічої та жіночої статі віком від 8 до 40 років, які проходили обстеження, хірургічне лікування та радіойодтерапію в клініці ДУ «Інститут ендокринології та обміну речовин ім. В.П. Комісаренка НАМН України». Дослідження проводили на пункційному матеріалі 45 первинних ПКЩЗ та їх метастазів (30 — радіойодрезистентних і 15 — радіойодчутливих).

Цитологічні дослідження проводили на пунктатах, фіксованих метанолом і забарвлених за методом Романовського. Імуноцитохімічні дослідження проводили непрямим імунопероксидазним методом за допомогою моноклональних антитіл миші проти таких антигенів: тиреоїдної пероксидази, тиреоглобуліну, Ki-67 (Clone MIB-1, DakoCytomation, Данія), цитокератинів 7 і 8 (DakoCytomation, Данія). Як вторинні використовували антитіла проти γ -глобулінів миші, мічені пероксидазою хрому (DakoCytomation, Данія). Після проведення імуноцитохімічної реакції ядра клітин забарвлювали розчином гематоксиліну. Статистичне опрацювання даних здійснювали за непараметричним методом Колмогорова — Смирнова, методами Манна — Уїтні та кореляційного аналізу. Розрахунки виконано в пакеті Statistica 7.0.

Результати та їх обговорення

Відомо, що морфологічні ознаки пухлин певною мірою відображають їх біологічну поведінку. Дослідниками знайдено чимало гістологічних та імуноцитохімічних проявів агресивної поведінки та радіойодрезистентності карцином ЩЗ [6-8]. Тому слід очікувати, що тиреоцити радіойодрезистентних метастазів будуть відрізнятися за своїми імуноцитохімічними та цитологічними ознаками (тобто фенотипово) від тиреоцитів метастазів, які не втратили здатності до накопичення радіойоду. На підставі виявлених фенотипових особливостей тиреоцитів РЙРМ можна передбачати їх появу, крім того, це — крок до розуміння механізмів виникнення явища радіойодрезистентності. У літературі не знайдено даних щодо

цитологічних проявів радіюдрезистентності або досліджень, пов'язаних із вивченням цитологічних і деяких імуноцитохімічних змін клітин у процесі онкогенезу папілярних карцином від первинної пухлини до радіюдрезистентного метастазу.

Проведене порівняльне дослідження цитологічних та імуноцитохімічних характеристик тиреоцитів пунктів метастазів ПКЩЗ виявило фенотипову гетерогенність епітелію РЙРМ порівняно з РЙЧМ. Фенотипова гетерогенність популяції тиреоцитів метастазів проявляється наявністю різних субпопуляцій тиреоцитів, які відрізняються за морфологічними та імуноцитохімічними характеристиками від загальної популяції фолікулярного епітелію. Першим проявом фенотипової гетерогенності епітелію є наявність двох типів епітеліальних пластів — регулярної та нерегулярної архітектури. Якщо пласти регулярної архітектури характеризуються відносно регулярним розташуванням помірно плеоморфних тиреоцитів у межах пласта та нагадують стільниковидну структуру нормального фолікулярного епітелію (рис. 1, А), то пласти нерегулярної архітектури відрізняються нерегулярною структурою та сформовані гетерогенними за розмірами та формою тиреоцитами (рис. 1, Б).

У попередніх дослідженнях було виявлено дві особливі субпопуляції епітеліоцитів у межах нерегулярних епітеліальних пластів, що є яскравим проявом фенотипової гетерогенності популяції тиреоцитів [9]. Клітини першого фенотипу мають округлу форму та чіткі межі, відрізняються вираженим світлозаломленням добре збереженої поверхні клітин. На препаратах, забарвлених за Романовським, їх цитоплазма була помірно базофільною в центральній частині та безбарвною на периферії. Тому ці клітини виглядали світлішими за оточуючі їх тиреоцити та були названі «світлими клітинами», або клітинами субпопуляції S (рис. 2).

Клітини другого фенотипу відрізнялись від інших тиреоцитів наявністю в їх цитоплазмі базофільної макули, що міститься в центральній частині цитоплазми та зникає після перетравлення препаратів рибонуклеазою, — це свідчить, що вона містить РНК. Ці клітини отримали назву «МС-клітини» (рис. 3). На відміну від клітин субпопуляції S, вони не

мали чітких контурів, оскільки їх поверхня не відрізнялася від інших тиреоцитів вираженим світлозаломленням.

Епітеліальну природу клітин обох фенотипів підтверджено імуноцитохімічною позитивною реакцією з антитілами проти цитокератинів 7 і 8 (рис. 4) і відсутністю реакції з антитіла-

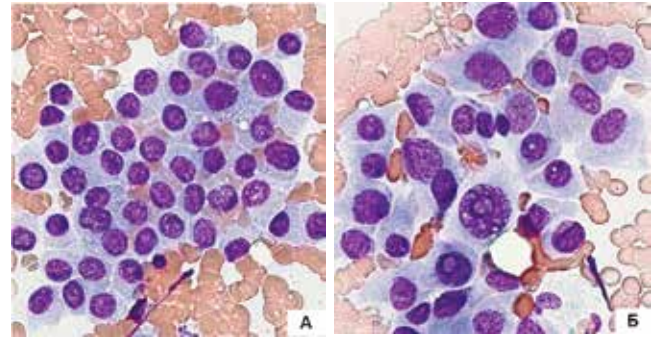


Рис. 1. Епітеліальні пласти регулярної (А) та нерегулярної (Б) архітектури в пунктах метастазів ПКЩЗ, забарвлення за Романовським, $\times 40$.

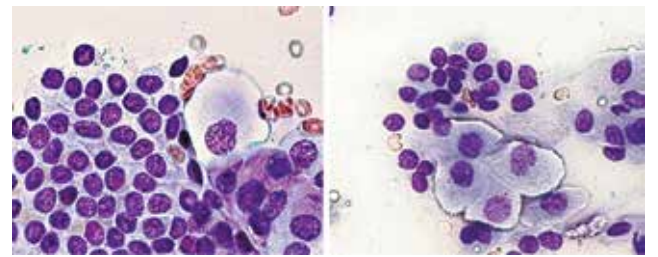


Рис. 2. Клітини субпопуляції S серед інших тиреоцитів у пункті РЙРМ ПКЩЗ, забарвлення за Романовським, $\times 40$.

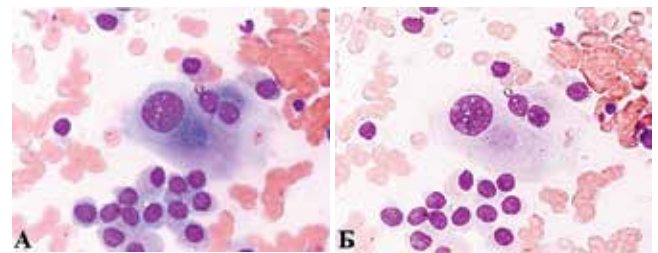


Рис. 3. EMC-клітини в пункті РЙРМ ПКЩЗ: А — базофільна макула в цитоплазмі МК-клітини, Б — базофільна макула після перетравлення рибонуклеазою, забарвлення за Романовським, $\times 40$.

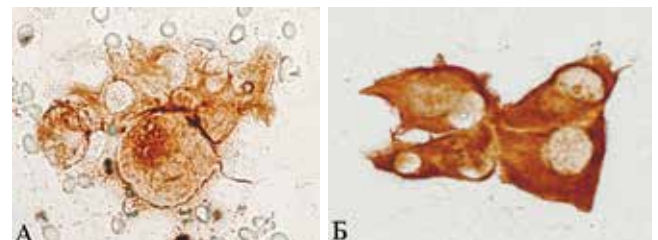


Рис. 4. Імуноцитохімічна реакція з антитілами до цитокератину 8 клітин субпопуляції S (А) і МК-клітин (Б), $\times 40$.

Оригінальні дослідження

ми проти антигенів CD68 і CD45, притаманних клітинам гістіоцитарно-макрофагального ряду. Цікаво, що якщо цитоплазма МС-клітин реагує з антитілами проти тиреоглобуліну, то S-клітини тиреоглобуліну не містять.

Проведені порівняльні дослідження демонструють наявність епітеліальних пластів нерегулярної архітектури та S- і МС-клітин лише в пунктатах РЙРМ, тоді як у РЙЧМ присутні лише епітеліальні пласти регулярної архітектури та відсутні S- і МС-клітини. Причому клітини субпопуляції S відсутні також у відповідних первинних папілярних карциномах — ППК (табл.).

Окрім того, оксифільноклітинні зміни та особливі комплекси вакуолізованих клітин із псамомними тільцями виявляються в пунктатах РЙРМ і відсутні в РЙЧМ (рис. 5).

Окрім того, виявлено, що якщо «тлом» пунктату РЙЧМ в усіх випадках є лімфоїдні елементи різного ступеня зрілості, то у 80% РЙРМ

Таблиця. Частота різних цитологічних ознак у пунктатах РЙРМ і РЙЧМ ПКЩЗ і в пунктатах ППК, n (%)

Тип клітин	РЙРМ (n=30)		РЙЧМ (n=15)	
	ППК	РЙРМ	ППК	РЙЧМ
Регулярні пласти	25 (83,3)	28 (93,3)	15 (100)	15 (100)
Нерегулярні пласти	11 (36,6%)*	13 (43,3)*	0	0
Субпопуляція S	0	8 (26,6)*#	0	0
МС-клітини	11 (36,6)*	16 (53,3)*	0	0
Комплекси вакуоліз. клітин	0	3 (10,0)	0	0
Кістозна дегенерація	8 (26,6)*	24 (80,0)**##	0	0
Оксифільні зміни	5 (16,6)	8 (26,6)*	0	0

Примітка: * — $p < 0,05$; ** — $p < 0,001$ порівняно з РЙЧМ; # — $p < 0,05$; ## — $p < 0,001$ порівняно з відповідною ППК за критерієм χ^2 .

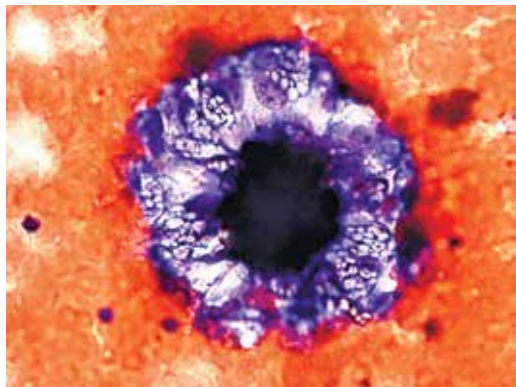


Рис. 5. Комплекс вакуолізованих клітин і псамомного тільця в пунктаті РЙРМ, забарвлення за Романовським, $\times 40$.

клітини метастазу розташовано в кістозній рідині, тобто є кістозна дегенерація (наявність кістозної рідини з гемосидерофагами). У загальній популяції метастазів ПКЩЗ ознака кістозної дегенерації спостерігається лише у 23% випадків. У ППК ознаку кістозної дегенерації виявлено у 26,6% випадків, що вірогідно відрізняється від їх кількості в РЙЧМ (див. табл.).

Сучасні теорії онкогенезу (як стохастична, так і гіпотеза стовбурових клітин) вказують, що завдяки генетичним та епігенетичним змінам (абераційній диференціації) моноклональна за походженням популяція клітин злоякісної пухлини з часом розпадається на низку субклонів та стає фенотипово гетерогенною [10-12]. Саме серед згаданих субклонів з'являються такі, що здатні до інвазійного росту та утворення метастазів. Наявність у пунктатах РЙРМ більшої кількості субклонів і структур тиреоцитів порівняно з РЙЧМ, можливо, є проявом більшої генетичної гетерогенності цих пухлин, яка є ліпшим «полігоном» для появи субклонів тиреоцитів з агресивною поведінкою, що можуть зумовлювати розвиток РЙРМ.

Оскільки фенотипова гетерогенність популяції тиреоцитів (наявність різних субпопуляцій клітин) наявна в пунктатах РЙРМ і відсутня в пунктатах РЙЧМ ПКЩЗ, то її наявність можна розглядати як цитологічний чинник прогнозування радіоїодрезистентності поопераційних метастазів ПКЩЗ.

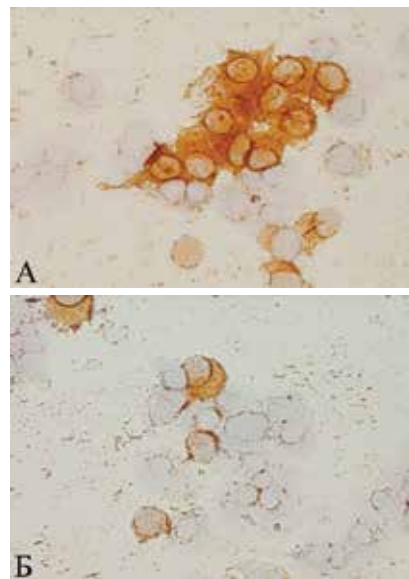


Рис. 6. Імуноцитохімічна реакція з антитілами до тиреоїдної пероксидази в пунктатах метастазів: А — РЙЧМ, Б — РЙРМ, $\times 40$.

Радіюодрезистентні метастази ПКЩЗ є унікальним явищем, підґрунтям якого є втрата диференційованими клітинами їх головної функції — накопичення радіоїоду, що здійснюється через втрату цими клітинами антигенів і ферментів, відповідальних за захоплення та накопичення радіоїоду. Одним із таких чинників є тиреоїдна пероксидаза — фермент клітин фолікулярного епітелію ЩЗ, який є ключовим у біосинтезі тиреоїдних гормонів [13-16].

Проведене порівняльне імуноцитохімічне дослідження експресії тиреоїдної пероксидази в РЙРМ і РЙЧМ показало, що в групі РЙРМ у 80,0% випадків експресія тиреоїдної пероксидази відсутня, а в решті випадків лише 5-12% пухлинних клітин є імунопозитивними. Водночас в усіх метастазах групи РЙЧМ від 75 до 90% пухлинних клітин експресують тиреоїдну пероксидазу (**рис. 6**). Отже, імуноцитохімічне визначення експресії тиреоїдної пероксидази може бути використано як прогностичний маркер радіюодрезистентності метастазів, виявлених у поопераційний період. Якщо в пункті метастазу не виявляється експресії тиреоїдної пероксидази, прогнозується радіюодрезистентність метастазу, неефективність подальшої радіюодтерапії та необхідність хірургічної ліквідації метастазу. Якщо відсоток клітин, які містять тиреоїдну пероксидазу, перевищує 75%, прогнозується успішна радіюодтерапія.

Асоційованість РЙРМ із фенотиповою гетерогенністю популяції тиреоцитів і низькою експресією тиреоїдної пероксидази порівняно з такими в РЙЧМ, можливо, є проявами втрати диференціювання тиреоцитами РЙРМ на відміну від клітин РЙЧМ.

Висновки

1. Радіюодрезистентні метастази папілярного раку щитоподібної залози демонструють фенотипову гетерогенність тиреоцитів, на відміну від радіюодчутливих метастазів, і появу клітинних типів і структур, які відсутні в первинних папілярних карциномах і радіюодчутливих метастазах.
2. Ознака фенотипової гетерогенності тиреоцитів разом із низькою експресією тиреоїдної пероксидази можуть бути цитоло-

гічними чинниками передопераційного прогнозування радіюодрезистентності метастазів папілярної карциноми щитоподібної залози, які виникли в поопераційний період, і використовуватися на практиці.

Список використаної літератури

1. Тронько МД, Кравченко ВІ, Кваченюк АМ, Камінський ОВ. Чорнобильська катастрофа та тиреоїдна патологія. *Здоров'я України*. 2016;34(2):19-20. Tron'ko MD, Kravchenko VI, Kvachenyuk AM, Kaminsky OV. Chornobyl disaster and thyroid pathology. *Zdorov'ya Ukrainy*. 2016;34(2):19-20.
2. Haugen BR, Alexander EK, Bible KC, Doherty GM, Mandel SJ, Nikiforov YE, et al. 2015 American Thyroid Association Management Guidelines for Adult Patients with Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer: The American Thyroid Association Guidelines Task Force on Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer. *Thyroid*. 2016 Jan;26(1):1-133.
3. Busaidy NL, Cabanillas ME. Differentiated thyroid cancer: Management of patients with radioiodine nonresponsive disease. *J Thyroid Res*. 2012; 2012: 618985. Published online 2012 Feb 28. doi: 10.1155/2012/618985.
4. Pacini F, Ito Y, Luster M, Pitoia F, Robinson B, Wirth L. Radioactive iodine-refractory differentiated thyroid cancer: unmet needs and future directions. *Expert Rev Endocrinol Metab*. 2012;7(5):541-54.
5. Эпштейн ЕВ, Олейник ВА, Сovenko ТК. Лечение дифференцированного рака щитовидной железы. Променева диагностика, променева терапия. 2000;1:53-4. (Epstein YeV, Oleynik VA, Sovenko TK. Treatment of differentiated thyroid cancer. Promeneva diagnostika, promeneva terapiya. 2000;1:53-4).
6. Deandreis D, Ghuzlan A, Lebouleux S. Do histological, immunohistochemical, and metabolic (radioiodine and fluorodeoxyglucose uptakes) patterns of metastatic thyroid cancer correlate with patient outcome? *Endocr Relat Cancer*. 2011 Feb;18(1):159-69.
7. Rivera M, Ghossein R, Schoder H, Gomes D., Larson SM, Tuttle RM. Histopathologic characterization of radioactive iodine-refractory fluorodeoxyglucose-positron emission tomography-positive thyroid carcinoma. *Cancer*. 2008;113(1):48-56.
8. Ricorde-Filho JC, Ryder M, Chitale DA. Mutational profile of advanced primary and metastatic radioactive iodine-refractory thyroid cancers reveals distinct pathogenetic roles for BRAF, PIK3CA, and AKT1. *Cancer Res*. 2009 Jun;69(1):4885.
9. Божок ЮМ, Зелінська ГВ, Ніконенко ОГ. Дослідження фенотипічної гетерогенності популяції тиреоцитів папілярних карцином в матеріалі тонкогілкових пункційних біопсій. *Журнал Національної академії медичних наук України*. 2016; 22(2):145-152. (Bozhok YuM, Zelinska HV, Nikonenko OH. Investigation of phenotypic heterogeneity of the papillary carcinoma thyroid population in the material of the thin-puncture biopsies. *Zhurnal Natsionalnoi akademiyi medychnykh nauk Ukrainy*. 2016; 22(2):145-152).
10. Kim H., Piao Z., Park C, Chung WY, Park CS. Clinical significance of clonality in thyroid nodules. *Br J Surg*. 1998;85(8):1125-8.
11. Pennec S, Konopka T, Gacquer D. Intratumor heterogeneity and clonal evolution in an aggressive papillary thyroid cancer and matched metastases. *Endocr Relat Cancer*. 2015 Apr;22(2):205-16.
12. Ling V, Chambers AF, Harris JF, Hill RP. Dynamic heterogeneity and metastasis. *J Cell Physiol*. 1984;3(Suppl):99-103.
13. Dunn JT, Dunn AD. Update on intrathyroidal iodine metabolism. *Thyroid*. 2001;11(5):407-17.
14. Furuya F, Shimura H, Suzuki H, Taki K, Ohta K, Haraguchi K, et al. Histone deacetylase inhibitors restore radioiodide uptake and retention in poorly differentiated and anaplastic thyroid cancer cells by expression of the sodium/iodide symporter thyroperoxidase and thyroglobulin. *Cancer*. 2004;145(6):2865-75.
15. Liu YY, Stokkel MP, Pereira AM, Corssmit EP, Morreau HA, Romijn JA, et al. Bexarotene increases uptake of radioiodide in metastases of differentiated thyroid carcinoma. *Eur J Endocrinol*. 2006 Apr;154(4):525-31.

Оригінальні дослідження

16. Huang M, Batra RK, Kogai T, Lin YQ, Hershman JM, Lichtenstein A, et al. Ectopic expression of the thyroperoxidase gene augments radioiodide uptake and retention mediated by the sodium iodide symporter in non-small cell lung cancer. *Cancer Gene Ther.* 2001;8(8):612-8.

(Надійшла до редакції 01.08.2017 р.)

Цитологические особенности популяции тиреоцитов радиойодрезистентных метастазов папиллярного рака щитовидной железы в их дооперационном прогнозировании

А.В. Зелинская

ГУ «Институт эндокринологии и обмена веществ им. В.П. Комиссаренко НАМН Украины»

Резюме. Цель работы — иммуноцитохимическое и цитоморфологическое исследование популяции тиреоцитов пунктатов радиойодрезистентных метастазов (РЙРМ) в сравнении с радиойодчувствительными метастазами (РЙЧМ) и первичными папиллярными карциномами щитовидной железы и выявление фенотипических особенностей тиреоцитов, на основе которых возможна разработка методов дооперационного прогнозирования радиойодрезистентных метастазов папиллярного рака щитовидной железы. **Материалы и методы.** Цитоморфологические и иммуноцитохимические исследования популяции тиреоцитов с использованием моноклональных антител против тиреоидной пероксидазы, тиреоглобулина, цитокератинов 7, 8, антигена Ki-67 проводили на материале тонкоигольных аспирационных пункционных биопсий 45 папиллярных карцином и их метастазов, выявленных в послеоперационном периоде (30 — радиойодрезистентных, 15 — радиойодчувствительных). **Результаты.** Показано, что радиойодрезистентные метастазы папиллярного рака щитовидной железы демонстрируют фенотипическую гетерогенность популяции тиреоцитов в отличие от радиойодчувствительных метастазов и появление клеточных типов и структур, которые отсутствуют в первичных папиллярных карциномах и радиойодчувствительных метастазах. Признаки фенотипической гетерогенности популяции тиреоцитов вместе с низкой экспрессией тиреоидной пероксидазы могут быть цитологическими факторами дооперационного прогнозирования

радиойодрезистентности метастазов папиллярной карциномы щитовидной железы, которые возникли в послеоперационном периоде, и применяться на практике.

Ключевые слова: щитовидная железа, папиллярная карцинома, материал тонкоигольной аспирационной пункционной биопсии, радиойодрезистентные метастазы, субпопуляции эпителиоцитов, тиреоидная пероксидаза.

The cytological features of thyrocyte population of radioiodine-resistant metastases of papillary thyroid cancer in their pre-operational prediction

A.V. Zelinskaya

SI «V.P. Komisarenko Institute of Endocrinology and Metabolism of Academy of Medical Sciences of Ukraine»

Abstract. Aim is cytomorphological and imunocytochemical studies of thyrocyte populations in punctuates of radioiodine resistant metastases compared to radioiodine sensitive those and primary papillary thyroid cancer, and identification of thyrocyte phenotypic features to create the methods for preoperational prognosis of radioiodine-resistant papillary thyroid metastases. **Material and methods.** Cytomorphological and imunocytochemical studies using monoclonal antibodies against thyroid peroxidase, thyroglobulin, cytokeratinum 7, 8, and antigen Ki-67 were performed on the material of the thin-puncture biopsies of 45 papillary carcinomas and their metastases detected in the postoperative period (30 — radioiodine resistant, 15 — radioiodine sensitive). **Results.** It was shown that radioiodine resistant metastases of papillary thyroid carcinoma demonstrated phenotypic heterogeneity of thyrocyte population unlike radioiodine sensitive metastases and appearance of cellular types and structures that are absent in primary papillary thyroid cancer and radioiodine sensitive metastases. The cytological sign of phenotypic heterogeneity of thyrocyte population with low expression of thyroid peroxidase can be cytological preoperative factors predicting radioiodine resistant metastases of papillary thyroid cancer arising in the postoperative period and can be used in practice. **Keywords:** thyroid gland, papillary thyroid carcinoma, fine-needle aspiration punction biopsy, radioiodine resistant metastasis, subpopulations of epithelial cells, thyroid peroxidase.