

Ю. М. Божок, Г. В. Зелінська, О. Г. Ніконенко\*

Державна установа “Інститут ендокринології та обміну речовин ім. В. П. Комісаренка  
НАМН України”, 04114 Київ

\*Інститут фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України, 01024 Київ

## ДОСЛІДЖЕННЯ ФЕНОТИПІЧНОЇ ГЕТЕРОГЕННОСТІ ПОПУЛЯЦІЇ ТИРЕОЦИТІВ ПАПІЛЯРНИХ КАРЦИНОМ У МАТЕРІАЛІ ТОНКОГОЛКОВИХ АСПІРАЦІЙНИХ ПУНКЦІЙНИХ БІОПСІЙ

(Представлено акад. НАМН України М. Д. Троньком)

На матеріалі тонкоголкових аспіраційних пункційних біопсій доброякісних та злоякісних новоутворень щитоподібної залози було проведено цитоморфологічне, цитометричне, цитохімічне та імуноцитохімічне дослідження, що виявило істотну різницю в структурі популяції тиреоцитів між папілярними карциномами та іншими пухлинними чи непухлинними утвореннями. Тільки в пунктатах папілярних карцином виявлено два типи організації епітеліальних пластів — регулярний та нерегулярний, що відрізнялися геометрією розташування клітин у межах пласта, а також формою та розмірами тиреоцитів та їх ядер. В складі нерегулярного типу в 28-49 % досліджених папілярних карцином визначені два особливі фенотипи клітин. Перший з них — клітини зі світлозамомлюючою поверхнею (RS-клітини — *Refracting Surface*) відрізнявся вираженим світлозаломленням добре збереженої поверхні клітин, статистично більшими за інших тиреоцитів розмірами цитоплазми та ядер. Незважаючи на епітеліальну природу, що підтверджена визначенням цитокератинів № 7 та № 8 та відсутністю макрофагальних антигенів, цим клітинам була притаманна відсутність експресії молекул адгезії епітеліоцитів (*epCAM* — *EPithelial Cell Adhesion Molecule*) та тиреоглобуліну. Другий фенотип — базофільні макулярні клітини (BM-клітини — *Basophilic Maculae*) відрізнявся великим розміром поліморфних клітин, наявністю базофільної макули, що містила РНК та особливим розподілом *epCAM* на поверхні контактуючих клітин. Обидва типи клітин не відносились до С-клітин щитоподібної залози, оскільки не реагували з антитілами проти кальцитоніну. Висунуто припущення про те, що описані типи та особливі фенотипи клітин певною мірою відображають субклональну структуру популяції тиреоцитів папілярних карцином. Визначення RS- та BM-клітин в пункційному матеріалі можна використовувати в доопераційній цитологічній діагностиці як маркер папілярних карцином.

**Ключові слова:** діагностична цитологія, тонкоголкова аспіраційна пункційна біопсія, папілярна карцинома, популяція тиреоцитів, щитоподібна залоза.

Карцинома щитоподібної залози складає 0,5-1,5 % усіх карцином людини. Але внаслідок ядерної аварії на Чорнобильській АЕС (1986 р.) відбулось істотне збільшення частоти виникнення тиреоїдних карцином. Через 4 роки після Чорнобильської катастрофи, частота захворювань на рак щитоподібної залози у дітей збільшилася в 4,8 рази, а в

наступні роки перевищила доаварійні показники у 10 разів.

Тонкоголкова аспіраційна пункційна біопсія (ТАБП) з наступним цитологічним дослідженням на сьогоднішній день є головним методом доопераційної діагностики злоякісних пухлин щитоподібної залози [2, 4]. Тож її вдосконалення є актуальним

### Лабораторія функціональної діагностики

Ю. М. Божок — провідн.н.с., д.б.н. (yubozhok@gmail.com)

Г. В. Зелінська — с.н.с., к.б.н.

О. Г. Ніконенко — провідн.наук.співр. відділу цитології Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця

© Ю. М. Божок, Г. В. Зелінська, О. Г. Ніконенко, 2016.

питанням для нашої медицини. На жаль, цитологічна діагностика, на відміну від патогістологічних досліджень, не може використовувати для ідентифікації злоякісних пухлин такі безсумнівні ознаки злоякісної “поведінки” клітин карцином, як інвазії в судини або проростання капсули, оскільки пункційний матеріал містить лише зруйновані фрагменти тканини. Маркери пухлин, що використовуються в цитологічній діагностиці, як правило, не мають прямого відношення до процесів інвазії та метастазування, а скоріше відображають лише гетерогенність популяції пухлинних клітин, що виникає внаслідок їх генетичної нестабільності.

Згідно із сучасними теоріями онкогенезу злоякісні пухлини, зокрема карциноми щитоподібної залози, є популяціями моноклональних за походженням клітин [5, 7, 10]. Відповідно до стохастичної моделі, початок цій популяції кладе мутація в одній з клітин паренхіми органу. Згідно з іншою, найбільш поширеною гіпотезою, пухлини утворюються завдяки дизрегуляції самооновлення стовбурових клітин [3, 9, 13, 14]. Обидві теорії вказують, що завдяки генетичним змінам та аберантній диференціації моноклональна за походженням популяція клітин злоякісної пухлини з часом розпадається на ряд субклонів [6, 8]. Саме серед згаданих субклонів з’являються такі, що здатні до інвазивного росту та утворення метастазів.

Точність цитологічної діагностики істотно зросла, коли б вона спиралась на визначенні тих ознак, що мають пряме відношення до фундаментальних процесів онкогенезу та прогресії карцином. Тому, визначення субклональної структури злоякісних пухлин щитоподібної залози цитологічними методами може стати базою для розробки концептуально нових методів доопераційної диференційної діагностики злоякісних новоутворень на матеріалі ТАБП.

Нам невідомі дослідження, в яких би в зазначеному вище аспекті аналізувався матеріал пункційних біопсій щитоподібної залози. Стосовно цього органу лише у роботі *H. Studer* та співавт. [12] на гістологічних зрізах тканин вузлового зоба було продемонстровано гетерогенність популяції фолікулярного епітелію за ознакою проліферативної активності. *N. Mitsutake* та співавт. [9] у досліджах *in vitro* на культурах ліній анапластичних карцином щитоподібної залози показали, що лише невелика субпопуляція цих клітин має певні властивості стовбурових.

Виходячи з викладених міркувань, ми поставили собі за мету визначити, чи можливо продемонструвати певні ознаки наявності субклонів у популяції епітеліальних клітин папілярних карцином щитоподібної залози шляхом виявлення фенотипічної гетерогенності тиреоцитів на матеріалі ТАБП таких пухлин.

**Матеріали та методи.** У дослідженні були використані цитологічні препарати матеріалу пункційних біопсій 560 вузлових зобів, 125 фолікулярних аденом, 30 аутоімунних тиреоїдитів, 160 папілярних карцином, 21 фолікулярну та 18 медулярних карцином, а також 15 пухлин з клітин Ашкіназі — Гюртля.

Зразки пункційного матеріалу були отримані від пацієнтів обох статей віком від 17 до 82 років, які мали патогістологічний діагноз та згодом були прооперовані. Післяопераційне патогістологічне дослідження проведено в лабораторії морфології ендокринної системи нашого Інституту (зав. — проф. Т. І. Богданова).

Для цитоморфологічних досліджень було використано матеріал діагностичних тонкоголкових аспіраційних біопсій, проведених під контролем сонографії голкою 21G. Цитоморфологічні дослідження проводили на мазках пункційного матеріалу, зафіксованих у метанолі та фарбованих розчином Романовського — Гімза на фосфатному буфері рН 6,4.

Визначення локалізації РНК в клітинах проводили за допомогою перетравлення РНКазою (*Sigma*, США, 1 мг/10 мл, 1 год при 37 °С) після екстракції барвників з препаратів 5 % оцтовою кислотою. Після закінчення перетравлення препарати знов фарбували сумішшю Романовського — Гімза. Нейтральні полісахариди виявляли ШИК-реакцією також після екстракції барвників 5 % оцтовою кислотою.

Імуноцитохімічні реакції проводили на препаратах, попередньо пофарбованих сумішшю Романовського і досліджених морфологічно. Перед реакцією відновлювали активність антигенних детермінант за допомогою метода, розробленого в нашій лабораторії [1]. Для точного співставлення морфологічних та цитохімічних характеристик одних і тих самих клітин, їх фотографували цифровою камерою до та після проведення цитохімічних або імуноцитохімічних реакцій.

Для визначення наявності в клітинах певних антигенів застосовували непрямий імунопероксидазний метод з використанням моноклональних антитіл миші проти загальнолейкоцитарного антигену (*CD45*) (1:50, *clone PD7/26* та *2B11*, *Dako*, Данія), макрофагального антигену (*CD68*) (1:50, *clone EBM11*, *Dako*), тиреоглобуліну (1:100, *clone DAK-Tg6*, *Dako*), молекул адгезії епітеліальних клітин (*EPithelial Cell Adhesion Molecule — epCAM*) (1:100, *clone Ber-Ep4*, *Dako*), цитокератину 7 (1:50, *clone OV-TL12/30*, *Dako*), цитокератину 8 (1:100; *clone M20*, *Sigma*) та цитокератину 20 (1:50, *clone KS20.8*, *DBS*, США). Також використовували поліклональні антитіла кролика проти кальцитоніну (1:100, *DBS*).

Мічені пероксидазою поліклональні антитіла кроля проти миші та кози проти кролика (1:100,

Dako) використовували в якості другого шару антитіл. 3,30-diaminobenzidine tetrahydrochloride (Sigma) використовували як хромоген. Ендогенну пероксидазу блокували 30-хвилинною інкубацією у 1 %  $H_2O_2$  на фосфатному буфері (рН 7,4) при кімнатній температурі.

Цифрові зображення клітин отримували за допомогою камери DP12, що була під'єднана до мікроскопа Olympus CX41 (Olympus Corp., Японія). Для отримання зображень використовували об'єктив UplanFI 3 40/0.75. Периметр та площу клітин та їх ядер вимірювали на цифрових зображеннях за допомогою програми UTHSCSA ImageTool (версія 3, University of Texas, США).

Через проблеми з визначенням контурів клітин ми використали алгоритм, що будував діаграми Вороного і дозволяв отримувати апроксимацію профілю клітин. Центроїди ядер були використані для генерації точок мозаїки Вороного, а координати центроїдів визначали за допомогою програми ImageTool. Програмне забезпечення для побудови і вимірювань площі та периметрів полігонів Вороного було написано О. Г. Ніконенко у середовищі Delphi (версія 7, Borland Internat., США). У кожній групі аналізували біля 500 клітин. Клітини розташовані на краю епітеліальних пластів до аналізу не включали.

Чутливість, специфічність та позитивну передбачаючу цінність запропонованих маркерів папілярних карцином визначали за загально прийнятими формулами [15]. Статистичний аналіз проводили за допомогою програми Statistica (версія 5, StatSoft, США). Статистичну вірогідність розбіжностей між виборками визначали за допомогою непараметричного тесту Колмогорова — Смірнова.

**Результати та їх обговорення.** При дослідженні цитологічних препаратів пункційних біопсій папілярних карцином щитоподібної залози ми звернули увагу на те, що існують два різних патерни архітектури епітеліальних пластів фолікулярного епітелію. Перший патерн (регулярний патерн) характеризується відносно регулярним розташуванням помірно плеоморфних тиреоцитів у межах пласта і нагадує стільнікоподібну структуру нормального фолікулярного епітелію (рис. 1А). Другий патерн (нерегулярний патерн) відрізняється нерегулярною структурою епітеліальних пластів, сформованих гетерогенними за розмірами та формою тиреоцитами (рис. 1Б). Перший патерн спостерігався практично в усіх обстежених карциномах. Другий патерн був знайдений нами у 50 % випадків. Ці патерни відрізнялися не тільки архітектурою, а й морфологічними характеристиками клітин, що їх складають.

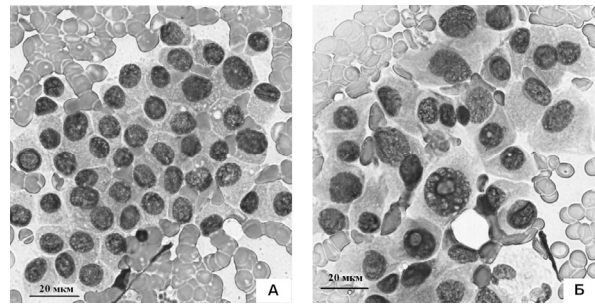


Рис. 1. Регулярний (А) та нерегулярний (Б) патерни фолікулярного епітелію в пункційному матеріалі папілярної карциноми. Фарбування за Романовським — Гімза.

Ми використали метод комп'ютерної морфометрії для аналізу відмінностей між морфологічними характеристиками клітин двох згаданих вище патернів в п'яти окремих випадках. Середня площа ядер клітин нерегулярного патерна в усіх випадках була на 28,5-67,0 % більша ніж ядер клітин регулярного патерна ( $P < 0,001$ ).

Коефіцієнт варіації (CV) цього параметра нерегулярного патерна майже у два рази (26,9-36,0 %) перевищував такий для регулярного патерна (17,3-25,3 %). Мода площі ядер клітин регулярного патерна становила 80-100  $\mu\text{m}^2$ , а нерегулярного патерна — 100-130  $\mu\text{m}^2$ . В усіх випадках гістограма цього показника для клітин нерегулярного патерна була зсунута праворуч та мала багато вторинних максимумів (рис. 2А).

Клітини, що формували регулярний та нерегулярний патерни також відрізнялися формою ядер. Середнє значення фактора форми (Shape Factor — SF) було більше для клітин нерегулярного патерна порівняно з регулярним, що вказує на більш округлу форму ядер клітин регулярного (рис. 2Б). Клітини нерегулярного патерна мали більш поліморфні ядра, на що вказує середнє значення SF, яке було у них істотно більшим в порівнянні з клітинами регулярного патерна. Коефіцієнт варіації цього показника коливався в інтервалі від 4,0 % до 6,4 % для регулярного патерна та від 5,9 % до 8,5 % — для нерегулярного.

У зв'язку з тим, що межі клітин тиреоцитів папілярних карцином були недостатньо чіткими, ми використали метод мозаїки Вороного для апроксимізації тіл фолікулярних клітин (рис. 2В). Середня площа полігонів Вороного була значно більшою для клітин нерегулярного патерна порівняно з регулярним. Ця різниця варіювала від 42,0 до 194,2 % для індивідуальних карцином та в усіх випадках була статистично достовірною ( $P < 0,001$ ). CV змінювався в діапазоні 23,5-36,4 % для регулярного патерна та 34,8-41,0 % — для нерегулярного.

Ці патерни також відрізнялися формою полігонів Вороного. Середнє значення SF для нерегу-

лярного патерна було на 4,4-8,4 % ( $p < 0,001-0,05$ ) більше порівняно з регулярним (рис. 2Г). CV для цього показника варіював у діапазоні 10,5-11,5 % для регулярного патерна та в межах 12,0-18,4 % для нерегулярного.

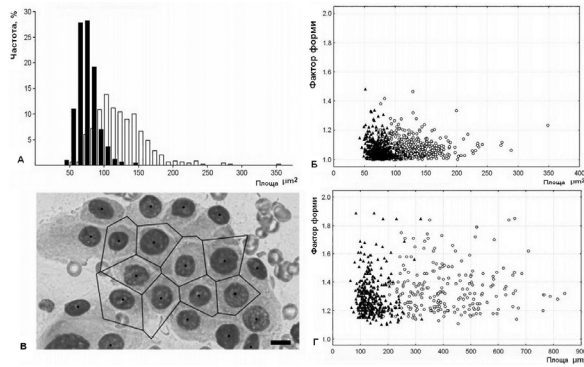


Рис. 2. Данні морфометрії, що свідчать про різницю між регулярним та нерегулярним патернами фолікулярного епітелію в пункційному матеріалі папілярних карцином. А — розподіл за площею ядер клітин регулярного (чорні стовпчики) та нерегулярного (білі стовпчики) патернів. Б — розподіл за фактором форми та площею ядер фолікулярних клітин, що складають регулярний (чорні трикутники) і нерегулярний (світлі кола) патерни. В — проекція мозаїки Вороного на тіла клітин нерегулярного патерна. Масштабна лінія = 10 мкм. Г — розподіл за фактором форми та площею тіл фолікулярних клітин, що складають регулярний (чорні трикутники) і нерегулярний (світлі кола) патерни.

При детальному дослідженні нерегулярного патерна епітелію папілярних карцином ми виявили в його межах дві особливі категорії клітин, що відрізнялись за своїм фенотипом. Клітини першого фенотипу мали округлу форму та ясні межі, що відрізнялись виразним світлозаломленням добре збереженої поверхні клітин (рис. 3А). Для зручності ми назвали їх “клітинами зі світлозаломлюючою поверхнею” (RS-клітинами — *Refracting Surface*).

На препаратах, фарбованих барвником Гимза, їх цитоплазма була помірно базофільною в центральній частині та безбарвною на периферії. В результаті, ці клітини виглядали світлішими порівняно з оточуючими їх тиреоцитами. На препаратах пункційних біопсій ці клітини розташовувалися поодинокі, могли бути інтегровані в епітеліальні пласти нерегулярного патерна або утворювали ізольовані кластери (рис. 3Б). Розмір цих клітин більш, ніж у два рази перевищував розмір звичайних фолікулярних клітин —  $(665,7 \pm 24,5)$  мкм<sup>2</sup> проти  $(272,5 \pm 6,7)$  мкм<sup>2</sup>,  $P < 0,01$ . Ядра RS-клітин були плеоморфні за формою, містили пиловидний

хроматин та іноді псевдовключення цитоплазми у ядро. Їх середня площа —  $(174,4 \pm 4,6)$  мкм<sup>2</sup> — була вірогідно більшою ніж ядер інших тиреоцитів папілярних карцином  $(106,2 \pm 1,5)$  мкм<sup>2</sup>,  $P < 0,01$ . Іноді в цитоплазмі клітин спостерігались мікроядра. RS-клітини не містили метакроматично пофарбованих секреторних вакуолей, які часто спостерігались в секреторно активних фолікулярних клітинах. Базофільні макули, що є характерною ознакою другої категорії клітин (див. нижче), іноді зустрічались в цитоплазмі RS-клітин. Також на поверхні їхньої цитоплазми можна було спостерігати лобоподії, що робило RS-клітини схожими на макрофаги. Проте RS-клітини не реагували з антитілами проти антигенів CD68 та CD45, що притаманно клітинам гістіоцитарно-макрофагального ряду. Натомість, вони давали чітку реакцію з антитілами проти цитокератинів № 7 та № 8 (рис. 4А, Б), що характерно для простих одношарових епітеліїв, у тому числі для фолікулярного епітелію щитоподібної залози. Так само, як і інші тиреоцити, RS-клітини не реагували з антитілами проти цитокератину № 20. Однак RS-клітини не давали реакції з антитілами клону *Ber Ep4* проти молекул адгезії епітеліальних клітин (*epCAM*) (рис. 4В, Г).

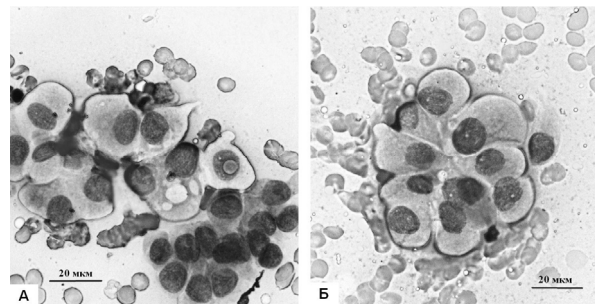


Рис. 3. RS-клітини в пунктаті папілярної карциноми щитоподібної залози. А — група RS-клітин поруч із звичайними тиреоцитами папілярної карциноми (правий нижній кут). Б — кластер з RS-клітини. Фарбування за Романовським — Гімза.

Це досить дивно, оскільки цей антиген завжди присутній в А-, В- і С-клітинах щитоподібної залози як у нормі, так і при малігнізації. RS-клітини також не давали чіткої реакції з антитілами проти тиреоглобуліну. Оскільки вони також не містили кальцитоніну, їх походження з парафолікулярних клітин мало ймовірно. Незвичайний вигляд цитоплазми цих клітин можна було б пояснити акумуляцією полісахаридів. Однак проведене нами визначення останніх за допомогою ПАС-реакції, показало, що RS-клітини за вмістом полісахаридів не відрізняються від інших клітин фолікулярного епітелію папілярних карцином. Отже, RS-клітини,

хоч і мають певні загальні риси з іншими тиреоцитами, але істотно відрізняються від них властивостями клітинної поверхні, світлою цитоплазмою, а також негативною реакцією з антитілами проти тиреоглобуліну та епітеліальних глікопротеїнів.

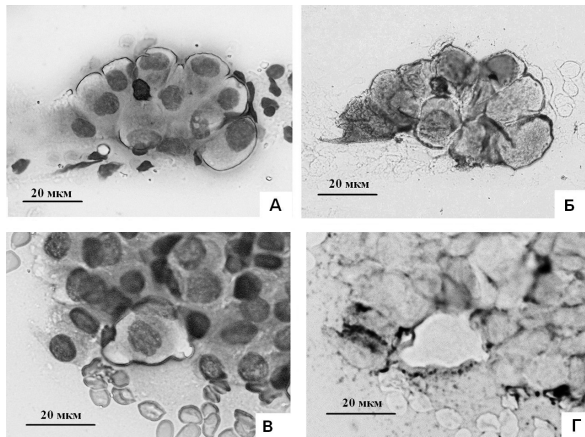


Рис. 4. А, В — *RS*-клітини, пофарбовані за Романовським — Гімза. Б — реакція *RS*-клітин з антитілами проти цитокератину № 8. Г — відсутність реакції *RS*-клітин з антитілами проти *epCAM*.

*RS*-клітини знайдені нами у пункційному матеріалі у 28,4 % папілярних карцином. В загальній популяції тиреоцитів вони становили, як правило, не більше 1 % клітин, хоч нам зустрічалися карциноми, в яких *RS*-клітини складали біля 38 % усіх епітеліальних клітин.

Друга категорія незвичайних клітин, знайдених нами в межах нерегулярного патерну, відрізнялась від інших тиреоцитів наявністю в їх цитоплазмі базофільної макули (*BM*-клітини — *Basophilic Maculae*) (рис. 5А, В). У препаратах пункційного матеріалу вони могли розташовуватися поодинокі або утворювали комплекси. Для цих клітин були властиві значні варіації форми та розміру. Середній розмір цих клітин становив  $(723,0 \pm 23,4)$  мкм<sup>2</sup> та був удвічі більшим за розмір інших епітеліальних клітин папілярних карцином ( $P < 0,01$ ). Середня площа ядер *BM*-клітин становила  $(147,2 \pm 3,2)$  мкм<sup>2</sup> і була вірогідно більшою за розмір ядер інших тиреоцитів ( $P < 0,01$ ).

Базофільні макули, що містилися у центральній частині цитоплазми *BM*-клітин, мали розміри від 4,5 до 18 мкм у перетині. Вони складалися з тонко гранульованого базофільного матеріалу, фарбування якого зумовлено вмістом РНК. На це вказує зникнення базофілії при фарбуванні барвником Гімза після перетравлення препаратів рибонуклеазою (рис. 5Г).

Межі *BM*-клітин не відрізнялися світлозалолюванням від інших тиреоцитів. Часом цитоплазма цих клітин утворювала структури, подібні до лобоподій. Загалом ці клітини за своєю морфоло-

гією нагадували макрофаги, але, на відміну від останніх не давали реакції з антитілами проти антигенів *CD68* та *CD45*. Цитоплазма цих клітин після фарбування по Гімза була помірно базофільною, структура ядер була аналогічною структурі в інших тиреоцитах і часом містила псевдовключення цитоплазми. *BM*-клітини, як і звичайний тиреоїдний епітелій зв'язували антитіла проти цитокератинів № 7 і № 8 та не реагували з антитілами проти цитокератину № 20. При цьому в зоні макули інтенсивність реакції була більшою. У той же час, *BM*-клітини відрізнялися від інших клітин фолікулярного епітелію характером локалізації реакції з антитілами клону *Ber Ep4* проти молекул адгезії епітеліальних клітин (*epCAM*) (рис. 5Б). Якщо в інших тиреоцитах антитіла проти згаданих антигенів давали чітку реакцію на поверхні і у цитоплазмі клітин, то в *BM*-клітинах реакція цитоплазми була дуже слабкою або повністю відсутня. Натомість, часом можна було спостерігати локальну реакцію ламінарних структур, що були розташовані в проміжку між поверхніми контактуючих клітин. На відміну від *C*-клітин щитоподібної залози, ці клітини не реагували з антитілами проти кальцитонину. Проте, цитоплазма *BM*-клітин давала реакцію з антитілами проти тиреоглобуліну, що вказує на їх походження від *A*-клітин щитоподібної залози.

*BM*-клітини не можна віднести до дегенеруючих форм, оскільки ми спостерігали в них міотичні фігури. Отже, цей тип клітин, що належить до нерегулярного патерну, в якості ключових характеристик має наявність базофільної макули, позитивну реакцію з антитілами проти тиреоглобуліну та специфічну локалізацію епітеліальних глікопротеїнів на поверхні клітин. У папілярних карциномах вони зустрічались частіше, ніж *RS*-клітини — у 48,9 % пухлин. В загальній популяції тиреоцитів таких пухлин, вони складали менше 1 %, але в деяких випадках, їх вміст сягав 30 %.

*RS*- та *BM*-клітини ми ніколи не зустрічали в пунктатах доброякісних новоутворень (аденом, вузлових зобів та вогнищ аутоімунного тиреоїдита). Також ми не бачили цих клітин в пунктатах пухлин з клітин Ашкіназі — Гюртля та медулярних карциномах.

Існуючі морфологічні та імуноцитохімічні методи, які застосовуються в сучасній цитологічній діагностиці, спрямовані на виявлення окремих властивостей клітин карцином, притаманних більшості епітеліоцитів злоякісної пухлини. Крім того, ці ознаки, як правило, не пов'язані з механізмами міграції клітин і не мають безпосереднього відношення до їх інвазивних властивостей. Зважаючи на те, що для реалізації інвазивного росту необхідна експресія великої кількості генів, що забезпечують

різні ланки цього процесу, до того ж рознесена у часі, сучасна цитологічна діагностика невзможі визначити інвазивні клітини на основі імуноцитохімічного визначення окремих антигенів.

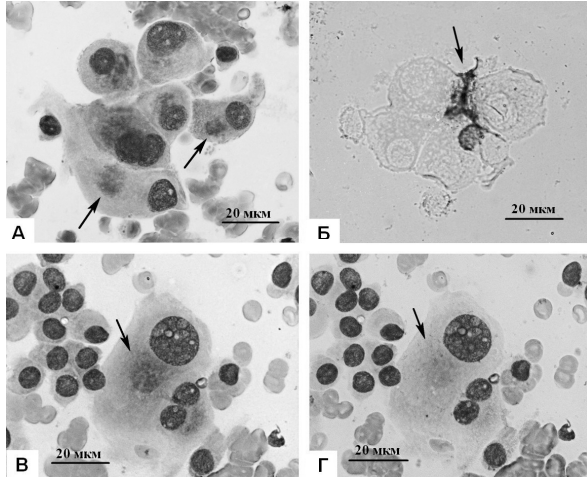


Рис. 5. *ВМ*-клітини в пунктатах папілярної карциноми щитоподібної залози. А, В — базофільні макули (стрілки) в цитоплазмі *ВМ*-клітин. Г — втрата базофілії макули (стрілка) після перетравлення РНК-азою. Б — локальна реакція з антитілами проти *pSAM* (стрілка) у зоні міжклітинних контактів *ВМ*-клітин. А, В, Г — фарбування за Романовським — Гімза.

Альтернативним підходом до вирішення цієї проблеми може стати визначення проявів субклональної гетерогенності в популяції епітеліоцитів папілярних карцином. Адже, властивості, необхідні для метастазування та інвазивного росту, вірогідно, притамані лише певним субклонам клітин карцином, що виникають в результаті нестабільності їхнього геному [15]. Першим кроком в дослідженні субклональної структури пухлин може бути визначення фенотипічної гетерогенності популяції тиреоцитів в препаратах пункційного матеріалу аспіраційних біопсій папілярних карцином.

В такій спосіб, нам вдалось виявити принаймні два патерни організації епітеліальних пластів, які

істотно відрізняються за морфометричними показниками. Більше того, в межах нерегулярного патерну, можна виділити дві субпопуляції епітеліоцитів, що мають властивості, відмінні від відомих типів клітин щитоподібної залози (*RS*- і *ВМ*-клітини).

На досліджених нами препаратах пункційного матеріалу, *RS*-клітини нерідко формували ізольовані кластери з 10-15 епітеліальних клітин. У кістозно дегенеруючих вузлах папілярної карциноми можна спостерігати подібні кластери, що утворюються макрофагами. Але, нами показана епітеліальна природа *RS*-клітин. Зважаючи на те, що епітеліальними клітинами не притаманна властивість вільно переміщатися, найбільш вірогідним механізмом утворення таких кластерів є розмноження однотипних клітин. Тому ми маємо підстави припустити, що *RS*-клітини являють собою особливий субклон в популяції тиреоцитів папілярних карцином. Те саме відноситься до *ВМ*-клітин, які нерідко утворюють комплекси однорідних клітин. Остаточні докази субклонального походження *RS*- і *ВМ*-клітин можуть бути отримані в результаті подальших досліджень.

З нашого погляду, визначення *RS*- і *ВМ*-клітин в популяції тиреоцитів, вже сьогодні можна використовувати в доопераційній діагностиці папілярного раку. Виходячи з визначеної нами частоти зустрічальності папілярних карцином з *RS*- і *ВМ*-клітинами, чутливість визначення злоякісних пухлин за їх допомогою відносно невелика (28,4% та 48,9%, відповідно). Проте через повну відсутність їх у всіх обстежених нами препаратах доброякісних новоутворень щитоподібної залози (аденом, вузлових зобів, кіст та вогнищ аутоімунного тиреоїдита), специфічність та позитивна передбачаюча цінність визначення папілярних карцином за наявністю *RS*- і *ВМ*-клітин в пункційному матеріалі становить 100%. Оскільки ці клітини легко визначаються морфологічними методами, їх можна використовувати, як точний маркер малігнізації в тих випадках, коли бракує інших цитологічних ознак папілярних карцином.

### Список використаної літератури

1. Божок Ю. М., Тавокина Л. В., Епштейн О. В. Нове в діагностиці рака щитовидної залози. Оптимальне поєднання морфологічних та імуноцитохімічних методів дослідження пункційного матеріалу // Лікарській вісник, США. — 1996. — 138. — № 1. — С. 40-43.
2. Bozhok Y., Greenebaum E., Bogdanova T. I. et al. NA cohort study of thyroid cancer and other thyroid diseases after the Chernobyl accident: cytohistopathologic correlation and accuracy of fine-needle aspiration biopsy in nodules detected during the first screening in Ukraine // Cancer. — 2009. — 117, № 2. — P. 73-81.
3. Burkert J., Wright N. A., Alison M. R. Stem cells and cancer: an intimate relationship // J. Pathol. — 2006. — 209, № 3. — P. 287-297.
4. Galera-Davidson H., Gonzalez-Campora R. Thyroid // Comprehensive Cytopathology. — Philadelphia: Saunders Elsevier, 2008. — P. 633-670.
5. Harrer P., Broecker M., Zint A. et al. Thyroid nodules in recurrent multinodular goiters are predominantly polyclonal // J. Endocrinol. Invest. — 1998. — 21, № 6. — P. 380-385.

6. Hill R. P., Chambers A. F., Ling V., Harris J. F. Dynamic heterogeneity: rapid generation of metastatic variants in mouse B16 melanoma cells // *Science*. — 1984. — **224**. — P. 998-1001.
7. Kim H., Piao Z., Park C. et al. Clinical significance of clonality in thyroid nodules // *Br. J. Surg.* — 1998. — **85**, № 8. — P. 1125-1128.
8. Ling V., Chambers A. F., Harris J. F., Hill R. P. Dynamic heterogeneity and metastasis // *J. Cell. Physiol.* — 1984. — **3**, Suppl. — P. 99-103.
9. Mitsutake N., Iwao A., Nagai K. et al. Characterization of side population in thyroid cancer cell lines: cancer stem-like cells are enriched partly but not exclusively // *Endocrinology*. — 2007. — **148**, № 4. — P. 1797-1803.
10. Moniz S., Catarino A. L., Marques A. R. et al. Clonal origin of non-medullary thyroid tumours assessed by non-random X-chromosome inactivation // *Eur. J. Endocrinol.* — 2002. — **146**. — P. 27-33.
11. Reya T., Morrison S. J., Clarke M. F., Weissman I. L. Stem cells, cancer, and cancer stem cells // *Nature*. — 2001. — **414**, № 6859. — P. 105-111.
12. Studer H., Gerber H., Zbaeren J., Peter H. J. Histomorphological and immunohistochemical evidence that human nodular goiters grow by episodic replication of multiple clusters of thyroid follicular cells // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* — 1992. — **75**, № 4. — P. 1151-1158.
13. Wicha M. S., Liu S., Dontu G. Cancer stem cells: an old idea — a paradigm shift // *Cancer Res.* — 2006. — **66**, № 4. — P. 1883-1896.
14. Zhang P., Zuo H., Ozaki T. et al. Cancer stem cell hypothesis in thyroid cancer // *Pathol. Int.* — 2006. — **56**, № 9. — P. 485-489.
15. Zhou X.-H., Obuchowski N. A., McClinch D. K. Statistical methods in diagnostic medicine. — Hoboken, NJ: Wiley, 2011. — 545 p.

Одержано 10.02.2016

## ИССЛЕДОВАНИЕ ФЕНОТИПИЧЕСКОЙ ГЕТЕРОГЕННОСТИ ПОПУЛЯЦИИ ТИРЕОЦИТОВ ПАПИЛЯРНЫХ КАРЦИНОМ В МАТЕРИАЛЕ ТОНКОИГОЛЬНЫХ АСПИРАЦИОННЫХ ПУНКЦИОННЫХ БИОПСИЙ

Ю. М. Божок, А. В. Зелинская, А. Г. Никоненко\*

Государственное учреждение “Институт эндокринологии и обмена веществ им. В. П. Комисаренко НАМН Украины”, 04114 Киев

\*Институт физиологии им. А. А. Богомольца НАН Украины, 01024 Киев

В материале тонкоигольных аспирационных биопсий доброкачественных и злокачественных новообразований щитовидной железы было проведено цитоморфологическое, цитометрическое, цитохимическое и иммуноцитохимическое исследование, которое выявило существенные различия в структуре популяции тиреоцитов между папиллярными карциномами и другими новообразованиями. Только в пунктатах папиллярных карцином выявлено два паттерна организации эпителиальных пластов — регулярный и нерегулярный, которые отличались геометрией расположения клеток в пределах пласта, а также формой и размерами тиреоцитов и их ядер. В составе нерегулярного паттерна в 28-49 % исследованных папиллярных карцином определены два особых клеточных фенотипа. Первый из них (RS-клетки) отличался выраженным светопреломлением хорошо сохраненной поверхности клеток, статистически большими, чем в иных тиреоцитах, размерами цитоплазмы и ядер. Несмотря на эпителиальную природу, подтвержденную наличием цитокератинов № 7 и № 8 и отсутствием макрофагальных антигенов, этим клеткам было присуще отсутствие экспрессии молекул адгезии эпителиоцитов (*epCAM*) и тиреоглобулина. Другой фенотип (MC-клетки) отличался большим размером полиморфных клеток, наличием базофильной макулы, которая содержала РНК и особым распределением *epCAM* на поверхности контактирующих клеток. Оба типа клеток не относились к C-клеткам щитовидной железы, поскольку не реагировали с антителами против кальцитонина. Выдвинуто предположение о том, что описанные паттерны и особенные фенотипы клеток в определенной мере отражают субклональную структуру популяции тиреоцитов папиллярных карцином. Определение RS- и MC-клеток в пункционном материале можно использовать для дооперационной цитологической диагностики как маркер папиллярных карцином.

**PHENOTYPIC HETEROGENEITY OF THE POPULATION OF PAPILLARY  
THYROID CARCINOMA THYROCYTES STUDIED IN SMEARS  
OF FINE-NEEDLE ASPIRATION BIOPSIES**

Yu. M. Bozhok, A. V. Zelinskaia, A. G. Nikonenko\*

State Institution "V. P. Komisarenko Institute of Endocrinology and Metabolism NAMS Ukraine", 04114 Kyiv

\*A. A. Bogomoletz Institute of Physiology NAS Ukraine, 01601 Kyiv

Smears of fine-needle aspiration biopsies sampled from benign and malignant neoplasms of the thyroid gland were studied using cytomorphology, cytometry, cytochemistry and immunocytochemistry. The results obtained revealed significant differences in the structure of thyrocyte populations between papillary carcinomas and other neoplasms. Papillary carcinoma cells were arranged in either of two cell patterns, regular or irregular, that differed in general cell sheet geometry, size and shape of follicular cells and their nuclei. In 28-49% of analysed papillary carcinoma cases the fragments of irregular cell pattern harboured cells of two distinct phenotypes. The surface of cells of the first phenotype strongly refracted light (RS-cells — Refracting Surface). These cells were larger in size and contained larger nuclei as compared with other thyrocytes. The epithelial origin of RS-cells was evidenced by cytokeratin 7 and 8 positivity as well as by the absence of macrophagal antigens. However, RS-cells, in contrast to ordinary follicular cells, were negative for epithelial cell adhesion molecule (epCAM) and thyroglobulin. Cells of the second phenotype (BM-cells — Basophilic Maculae) were distinct by their large size and pleomorphy, basophylic RNA-containing macula located in the cytoplasm, and specific pattern of epCAM expression on the cell surface. RS- and BM-cells have no relation to parafollicular cells because they display negative staining for calcitonin. The described cells and cell patterns were assumed to reflect, to some extent, the subclonal structure of follicular cell populations in papillary carcinomas. The identification of RS- and BM-cells in smears of fine needle aspiration biopsies can be used in pre-surgery cytology diagnostics as a marker of papillary thyroid carcinoma.