

ДООПЕРАЦІЙНЕ ПРОГНОЗУВАННЯ РАДІОЙОДРЕЗИСТЕНТНОСТІ ПАПІЛЯРНОГО РАКУ ЩИТОПОДІБНОЇ ЗАЛОЗИ

Зелінська Г.В.

*Інститут ендокринології та обміну речовин ім. В.П. Комісаренка НАМН України, відділення функціональної діагностики, м. Київ, Україна,
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-4320-6901>,
e-mail: Ann.zelinskaya@ukr.net*

Резюме. Мета. На основі виявлення цитоморфологічних та імуноцитохімічних особливостей клітин радіоїодрезистентних метастазів папілярних тиреоїдних карцином розробити методи їх доопераційного прогнозування та ефективності радіоїодтерапії.

Методи. Цитоморфологічні та імуноцитохімічні дослідження з використанням моноклоніальних антитіл проти тиреоїдної пероксидази, тиреоглобуліну, цитокератинів 7,8, макрофагальних антигенів, антигену Ki-67, молекул адгезії епітелію проведені на пункційному матеріалі 60 первинних папілярних карцином та їх метастазів, виявлених до операції та на матеріалі 95 метастазів, які виявили в післяопераційному періоді (70 – радіоїодрезистентних метастазів, 25 – метастазів, які накопичували радіоїод).

Результати. У результаті проведених досліджень виявлена фенотипічна гетерогенність тиреоїдних радіоїодрезистентних метастазів, на відміну від радіоїодчутливих метастазів, яка проявляється наявністю особливих клітинних субпопуляцій і структур, які відсутні в радіоїодчутливих метастазах та первинних папілярних карциномах. Показана статистично імовірна різниця в експресії тиреоїдної пероксидази між радіоїодрезистентними та радіоїодчутливими метастазами папілярних тиреоїдних карцином, на основі чого створений метод доопераційного прогнозування радіоїодрезистентності післяопераційних метастазів. Виявлена тенденція до підвищення вмісту проліферуючих тиреоцитів у пунктатах метастазів рецидивуючих папілярних карцином з повторним метастазуванням.

Висновки. У результаті вперше проведених цитологічних та імуноцитохімічних досліджень радіоїодрезистентних метастазів тиреоїдних папілярних карцином виявлено, що ознака фенотипічної гетерогенності, кістозної дегенерації та низької експресії тиреоїдної пероксидази можуть бути використані в доопераційному прогнозуванні метастазів, виявлених у післяопераційному періоді, на основі чого створені методи доопераційного прогнозування радіоїодрезистентності.

Ключові слова: папілярна карцинома щитоподібної залози, тонкогільчаста аспіраційна пункційна біопсія, радіоїодрезистентні метастази, тиреоїдна пероксидаза, прогноз.

Вступ. Як відомо, у переважній більшості випадків папілярний рак щитоподібної залози (ЩЗ) ефективно лікується завдяки застосуванню терапії радіоїодом. Летальні випадки фіксують досить рідко (в 4–6 % випадків), 5-річне виживання хворих на рак ЩЗ складає біля 98 %, а 20-30-річне виживання перевищує 90 %. Дуже високими є й показники безрецидивного 10-20-30-річного виживання – більше 70 %, 60 % і 50% відповідно [1, 2, 3]. Такі позитивні результати обумовлені впровадженням у клінічну практику всебічно обґрунтованого стандартного протоколу лікування пацієнтів з диференційованим раком ЩЗ, який включає: радикальне видалення всієї ЩЗ (тотальна тиреоїдектомія, часто доповнена дисекцією лімфатичних колекторів), з наступною радіоїодною абляцією остаточної тиреоїдної тканини та супресивною терапією L-тироксинам [4, 5].

Ключовим моментом успішного лікування диференційованого раку ЩЗ та його метастазів є використання радіоїодтерапії – специфічного високоєфективного таргетного методу терапії цього захворювання. Радіоїодтерапія базується на унікальній здатності клітин ЩЗ уловлювати радіоїод та використовувати в синтезі тиреоїдних гормонів, що є основою знищення клітин тиреоїдних папілярних карцином (ПК) та їх метастазів. Проте триумфальне застосування радіоїодтерапії в лікуванні тиреоїдного раку ускладнюється появою метастазів, клітини яких не мають або з часом втрачають здатність до акумуляції радіоїоду. За результатами Shumberger et al, 20-25 % метастатичних тиреоїдних карцином втрачають здатність до накопичення радіоїоду та стають радіоїодрезистентними (або радіоїодрефрактерними). За даними дослідників, радіоїодрефрактерний тиреоїдний рак зустрічається в 2/3 випадках віддалених метастазів [6]. За даними різних авторів, втрата тиреоїдним раком здатності до накопичення радіоїоду корелює з тривалістю виживання хворих, середня медіана виживання у яких складає лише 2,5–3,5 роки [7]. Деякі дослідження демонструють, що серед пацієнтів з метастатичним диференційованим раком ЩЗ, 10-річне виживання є характерним для 56 % пацієнтів, які мали радіоїодчутливі пухлини, але тільки для 10 % пацієнтів, які мали радіоїодрефрактерні пухлини [8]. Радіоїодрезистентність ставить пацієнтів на рак ЩЗ в загальний ряд з хворими на рак інших локалізацій, для яких не існує такого специфічного лікування, як радіоїодтерапія, а інші методи лікування, такі як хіміотерапія та променева терапія, – не є ефективними. Розвиток радіоїодрезистентності метастазів ПК ЩЗ робить неможливим їхню діагностику та лікування за допомогою радіоїоду. Такі метастази не можуть бути виявлені при діагностичному скануванні з радіоїодом, і пацієнти, які вважаються здоровими, можуть бути носіями радіоїодрезистентних метастазів (РЙРМ), які можуть розповсюджуватися в організмі людини та навіть бути причиною її смерті. Тому розуміння явища радіоїодрефрактерності ПК ЩЗ є безумовно актуальним питанням.

Обґрунтування дослідження. Як відомо, запізнення у виявленні метастазів різко погіршує показники виживання хворих на рак ЩЗ [9]. Тому дуже актуальними є питання ранньої діагностики, лікування та прогнозування появи РЙРМ. Стандартним способом діагностики РЙРМ високодиференційованого раку ЩЗ є визначення рівня тиреоглобуліну, з ультразвуковим дослідженням та скінтиграфією з радіофармпрепаратом Tc-MIBI [10]. Якомога найбільш раннє прогнозування та діагностику РЙРМ можна здійснювати на доопераційному рівні за умови виявлення цитологічних особливостей їх клітин. Це можливо лише на основі комплексного вивчення клініко-біологічних особливостей РЙРМ ПК ЩЗ.

У світовій практиці є актуальним персоналізований терапевтичний підхід до кожного пацієнта на основі прогнозування поведінки пухлини, її агресії, частоти рецидивування та радіоїодрезистентності ПК. Актуальним є прогнозування поведінки пухлин на основі стадіювання тиреоїдних карцином за групами ризику, які створюються

на основі таких ознак, як: вік пацієнтів, розмір карцином, наявність капсули, розповсюдження за її межі; наявність таких гістологічних ознак, як: некроз, високий мітотичний індекс, які асоційовані зі зниженням ступеню диференціювання карцином та їх неблагоприємною поведінкою [11]. Останнім часом дослідники приділяють все більше уваги розробці методів прогнозування поведінки тиреоїдних карцином на основі як морфологічних, так й імуноцитохімічних та молекулярно-генетичних факторів. У той же час, велику зацікавленість вчених та клініцистів викликає можливість передбачення поведінки пухлин саме на доопераційному етапі. Закордонними дослідниками запропоновано використання такого молекулярного фактору, як мутація гену BRAF в матеріалі тонкогілкових аспіраційних пункційних біопсій (ТАПБ) ПК для прогнозування їх агресивної клінічної поведінки та появи рецидивів [12]. Однак суперечливі дані щодо кореляції його експресії з частотою рецидивування, радіоїодрезистентністю та агресивною поведінкою карцином та коштовність обладнання навряд чи дозволить використовувати цей фактор в поточній практиці українських клінік. Прикладом використання імуноцитохімічного фактора прогнозування радіоїодрезистентності є виявлення NIS-протеїну в післяопераційному матеріалі ПК. При його відсутності, з 46 % вірогідністю прогнозують появу РЙРМ [13]. Однак цей метод здійснюється на післяопераційному гістологічному матеріалі, коли неможливо вплинути на план операції та передбачити радіоїодчутливість післяопераційних метастазів без їх видалення. Таким чином, не знайдені дані щодо порівняльних досліджень достатніх за чисельністю груп РЙРМ з групами радіоїодчутливих метастазів (РЙЧМ) та загальною популяцією ПК ЩЗ. В той же час, саме дослідження, проведені на пункційному матеріалі РЙРМ, можуть виявити особливості клітин таких метастазів та дозволити розробити нові ефективні методи доопераційного прогнозування радіоїодрезистентності. Такі методи можуть дати клініцистам інформацію щодо раннього доопераційного прогнозування поведінки пухлин і можливого розвитку радіоїодрезистентності та допомогти визначити найбільш правильну тактику лікування. Таким чином, відсутність наукових даних щодо особливостей клітин РЙРМ ПК ЩЗ спонукає до проведення комплексних досліджень з метою виявлення їх цитоморфологічного та імуноцитохімічного профілів, на основі чого можуть бути розроблені методи доопераційного прогнозування таких метастазів.

Мета дослідження. На основі виявлення цитоморфологічних та імуноцитохімічних особливостей клітин РЙРМ ПК ЩЗ розробити методи доопераційного прогнозування радіоїодрезистентності та ефективності радіоїодтерапії.

Матеріали. У роботі використано матеріал, отриманий у результаті проведення ТАПБ новоутворень ЩЗ під контролем сонографії у пацієнтів чоловічої та жіночої статі віком від 8 до 40 років, що проходили обстеження, хірургічне лікування та радіоїодтерапію в клініці ДУ «Інститут ендокринології та обміну речовин НАМН України ім. В.П. Комісаренка».

Цитоморфологічні та імуноцитохімічні дослідження проводили на пункційному матеріалі 60 первинних папілярних карцином та їх метастазів, виявлених до операції, та на матеріалі 95 метастазів, які виявили при сонографічному та сцинтиграфічному дослідженні пацієнтів в післяопераційному періоді, тобто після проведення тиреоїдектомії та радіоїодтерапії (70 – радіоїодрезистентних метастазів, 25 – метастазів, які накопичували радіоїод).

Методи. Цитоморфологічні методи. Цитоморфологічні дослідження проводили на пунктатах, отриманих шляхом проведення тонкогілкових аспіраційних пункційних біопсій. Пунктати висушували на повітрі та фіксували метанолом протягом 5 хвилин. Після цього, пунктати знову висушували та фарбували протягом 30 хвилин за методом Романовського, після чого промивали у дистильованій воді,

висушували та досліджували під мікроскопом. Розчин для фарбування готували із концентрату Романовського виробництва Шосткінського заводу хімікатів у складі: Фосфатний буфер 0,07 М з рН 6,4-20 мл. Барвник Романовського 1-1,5 мл.

Імуноцитохімічні методи. Імуноцитохімічні дослідження проводили на пунктатах, фіксованих метанолом та пофарбованих за методом Романовського, після проведення реакції відновлення активності антигенів за методикою, розробленою в нашій лабораторії раніше [14]. Пунктати досліджували під мікроскопом та визначали ділянки з великим вмістом непошкоджених епітеліальних клітин, які відокремлювали за допомогою обведення гідрофобним олівцем. Ділянки обробляли 0,001 % розчином трипсини на фосфатному буфері (PBS, рН=7,4) протягом 60 секунд, після чого промивали фосфатним буфером та дистильованою водою та обробляли 1 % оцтовою кислотою протягом 10 хвилин, після чого промивали дистильованою водою. Для інгібування власної, ендогенної пероксидази пунктату, яку містять макрофаги, лейкоцити, препарати обробляли 1 % розчином перекису водню у PBS (рН=7,4) протягом 30 хвилин, після чого ділянки промивали фосфатним буфером. Наступним етапом проводили імуноцитохімічну реакцію виявлення антигенів непрямим імунопероксидазним методом за допомогою моноклональних антитіл миші проти наступних антигенів: тиреоглобуліну – клон RBU/01 (Sigma, USA) та клон DAK-Tg 6 (DakoCytomation, Данія), Pan Cytokeratin (цитокератини 1,4,5,6,8,10,13,18,19) (Sigma, USA), цитокератину 8 – клон H1 (DakoCytomation, Данія, клон M20, Sigma, USA), ядерного антигена проліферуючих клітин Ki-67 (Clone MIB-1, DakoCytomation, Данія), цитокератину 7 (DakoCytomation, Данія), (1:50, clone OV-TL 12/30, Dako, Denmark), молекул адгезії епітеліальних клітин (epCAM) (1:100, clone Ber-Ep4, Dako, Denmark), макрофагальних антигенів (CD68) (clone EBM11, Dako, Denmark, 1:50).

Робоче розведення антитіл у співвідношенні від 1:50 до 1:100 робили на розчині фосфатно-сольового буферу (PBS). Інкубацію з антитілами проводили на протязі 40 хвилин при 30° С. У якості антитіл другого шару використовували моноклональні антитіла проти g-глобулінів миші, мічені пероксидазою хрому (DakoCytomation, Данія). Робоче розведення мічених антитіл робили на PBS з 1 % сироватки людини (для зменшення фонового забарвлення). Інкубацію проводили протягом 40 хвилин при 30° С. Візуалізацію локалізації виявлених антигенів проводили за допомогою розчину хромогену тиреоїдної пероксидази – 3,3'-діамінобензидину (diaminobenzidine tetrahydrochloride (Sigma, USA)), 1 мг якого розчиняли у 3 мл PBS, до якого додавали 10 мкл 6 % розчину перекису водню. Після обробки розчином протягом 7-10 хвилин ділянки промивали дистильованою водою та оцінювали під мікроскопом. Після проведення імуноцитохімічної реакції, ядра клітин дофарбовували розчином гематоксиліну. Підраховували не менше 1000 тиреоцитів пунктату. В якості позитивного контролю імуноцитохімічної реакції використовували інші ділянки препаратів, на яких проводили дослід, не наносячи перші антитіла, або використовували антитіла проти антигену, який не міститься в досліджуваних клітинах.

Статистичні методи. Статистичне опрацювання даних робили за непараметричним методом Колмогорова-Смирнова, Манна-Уїтні та методом кореляційного аналізу. Розрахунки виконані в пакеті Statistica 7.0.

Результати дослідження. Цитологічні особливості тиреоцитів радіоїодрезистентних метастазів

папілярного раку щитоподібної залози. З метою визначення гістологічних особливостей РЙРМ ПК ЩЗ, нами був проведений порівняльний аналіз патогістологічних заключень первинних пухлин та РЙРМ 20-ти пацієнтів та проаналізована наявність таких гістологічних ознак, як фолікулярні структури, некротичні зміни та оксифільноклітинні зміни. Всі пацієнти мали патогістологічний діагноз – ПК (у 3-х випадках був поставлений діагноз – дифузно-склерозуючий варіант ПК ЩЗ, 16 з первинних пухлин (80 %) мали інвазій-

ний ріст в капсулу і за її межі та метастази в регіональні лімфовузли, в 4-х випадках (20 %) патогістологи спостерігали тільки інвазійний ріст пухлини в капсулу, але не за її межі). Результати аналізу таких гістологічних характеристик, як наявність фолікулярних структур, некротичних змін та оксифільноклітинних змін в РЙРМ в порівнянні з первинними пухлинами та загальною популяцією ПК представлені у табл. 1.

Таблиця 1

Частота зустрічаємості гістологічних ознак у первинних папілярних карциномах (ПК), радіоїодрезистентних метастазах (РЙРМ) та загальній популяції папілярних карцином (ПК)

Гістологічна ознака	Первинна пухлина пацієнтів з РЙРМ	РЙРМ	Загальна популяція ПК	Первинна пухлина пацієнтів з РЙЧМ
Фолікулярні структури	55 %	0 %	60 %	100 %
Некротичні зміни	15 %	5 %	<1 %	0 %
Оксифільно-клітинні зміни	25 %	30 %	16 %	0 %

Проведене нами порівняльне дослідження цитологічних характеристик тиреоцитів пунктів метастазів ПК ЩЗ виявило існування фенотипічної гетерогенності епітелію РЙРМ ПК ЩЗ у порівнянні з радіоїодчутливими метастазами (РЙЧМ). Фенотипічна гетерогенність популяції тиреоцитів метастазів проявляється наявністю їх різних субпопуляцій, які відрізняються за цитологічними та імуноцитохімічними характеристиками від загальної популяції фолікулярного епітелію. Першим проявом фенотипічної гетерогенності епітелію є наявність двох типів епітеліальних пластів - регулярної (Рис. 1, А) та нерегулярної архітектури (рис. 1, Б).

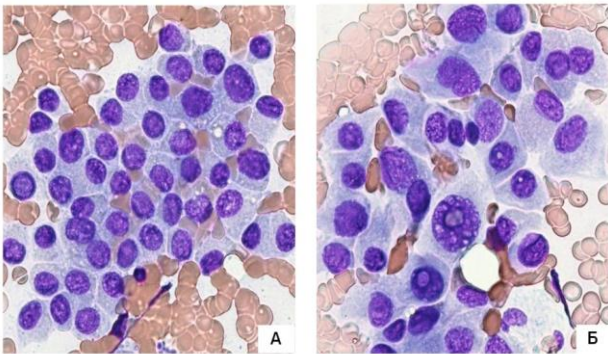


Рис. 1. Епітеліальні пласти регулярної (А) та нерегулярної (Б) архітектури в пунктатах метастазів ПК ЩЗ. Пофарбування за Романовським. Об. х 40.

Наші дослідження виявили наявність двох особливих субпопуляцій епітеліоцитів, які знайдені в межах нерегулярних епітеліальних пластів, які є виразним проявом фенотипічної гетерогенності популяції тиреоцитів. Клітини першого фенотипу виглядають світлими у порівнянні з тиреоцитами, що їх оточують, та були названі «світлі клітини», або клітини субпопуляції S, і мають округлу форму та чіткі межі. Клітини другого типу відрізнялись від інших тиреоцитів наявністю в їх цитоплазмі базофільної макули – округлої структури, що міститься в центральній частині цитоплазми і зникає після перетравлення препаратів рибонуклеазою, що свідчить про те, що вона містить РНК. Ці клітини отримали назву МС-клітини (рис. 2).

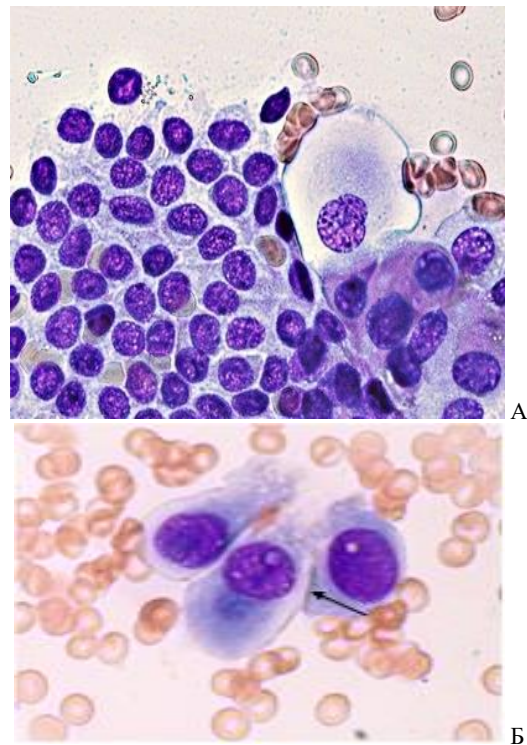


Рис. 2. Клітини субпопуляції S (А) та МС-клітини (Б) серед інших тиреоцитів в пунктатах РЙРМ ПК ЩЗ. Пофарбування за Романовським. Об. х 40.

Епітеліальна природа клітин обох фенотипів клітин була підтверджена імуноцитохімічно позитивною реакцією з антитілами проти цитокератинів № 7, №8 та панцитокератину та відсутністю реакції з антитілами проти антигенів CD 68 та CD 45, притаманних клітинам гістіоцитарно-макрофагального ряду. Цікаво, що, якщо цитоплазма МС-клітин реагує з антитілами проти тиреоглобуліну, то S-клітини не містять тиреоглобуліну (рис. 3).

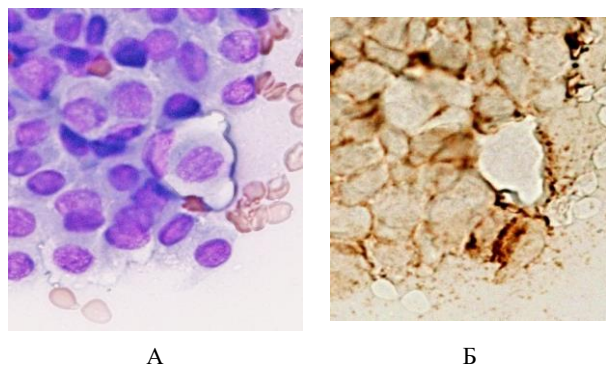


Рис. 3. А – клітина субпопуляції S серед інших тиреоцитів в пунктаті РЙРМ ПК ЩЗ. Пофарбування за Романовським. Б – негативна імуноцитохімічна реакція клітини субпопуляції S з антитілами до тиреоглобуліну на фоні позитивної реакції інших тиреоцитів. Об. х 40.

Проведені порівняльні дослідження демонструють наявність епітеліальних пластів нерегулярної архітектури та S- і MC-клітин лише в пунктатах РЙРМ, у той же час в РЙЧМ присутні лише епітеліальні пласти регулярної архітектури та відсутні S- та MC-клітини. При цьому, клітини субпопуляції S відсутні також в відповідних первинних ПК. Цитограми первинних пухлин і їх РЙЧМ метастазів представлені клітинами однорідної морфології, без ознак фенотипічної гетерогеності у порівнянні з пацієнтами з РЙРМ, клітини яких демонструють виразну фенотипічну гетерогеність, яка проявляється наявністю нерегулярних тиреоїдних пластів та особливих клітинних субпопуляцій.

Були проведені дослідження наявності кореляції між присутністю клітин субпопуляції S у первинній ПК ЩЗ та частотою виникнення метастазів після проведення у цих пацієнтів стандартної терапії (тиреоедектомія, супресивна гормональна терапія, радіойодтерапія). Була досліджена група з 44 пацієнтів, у яких після тиреоїдектомії на першому скануванні з лікувальною дозою радіоїоду, не було виявлено метастазів. У 67 % пацієнтів (10/15), у пунктатах первинних пухлин яких були виявлені клітини субпопуляції S, з часом з'явилися метастази, що накопичували радіоїод.

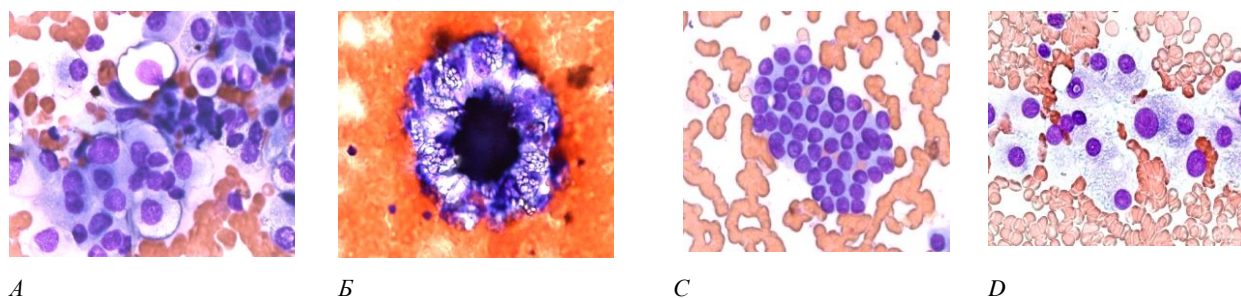


Рис. 4. Наявність різних субпопуляцій клітин та клітинних структур в пунктатах РЙРМ (А, Б) у порівнянні з одноманітною популяцією тиреоцитів в РЙЧМ ПК ЩЗ (С, D).

У той же час, у пацієнтів, в пунктатах первинних пухлин

яких ці клітини були відсутні, такі метастази з'явилися лише в 27 % випадків (8/29).

Були проведені дослідження щодо існування кореляції між наявністю клітин субпопуляції S у пунктатах первинних ПК та кількістю регіональних метастазів ПК ЩЗ (по системі TNM, N>1 або N<1). Виявилось, що у пацієнтів з N>1 (тобто, якщо кількість регіонарних метастазів перевищує 1), клітини субпопуляції S зустрічались в пунктатах первинних ПК в 42 % випадків, у той же час у пацієнтів з N<1, ці клітини зустрічались лише в 22 % випадків.

Заслугує на увагу така незвичайна цитоморфологічна структура, як особливі комплекси, які складаються з центрально розташованого псамомного тільця, оточеного шаром макрофагів та вакуолізованих клітин епітеліальних клітин, які містять цитокератин 17 [15]. Така структура зустрічалася в 29 % РЙРМ, що 2,6 рази частіше, ніж в загальній популяції ПК, де вона зустрічалася в 11 % випадків. Такі комплекси не зустрічалися в жодному випадку РЙЧМ. Ці комплекси та оксифільноклітинні зміни спостерігаються в пунктатах РЙРМ метастазів та відсутні в РЙЧМ ПК ЩЗ (рис. 4).

Було відмічено, що якщо «фоном» пунктатів РЙЧМ в усіх випадках є лімфоїдні елементи різного ступеню зрілості (зрілі лімфоцити, лімфобласти, пролімфоцити, плазматичні клітини, еозинофіли, базофіли, тобто цитологічна картина реактивної гіперплазії лімфатичного вузла), то в 80 % РЙРМ, пухлинні клітини метастазу розташовані в кістозній рідині, тобто спостерігається ознака кістозної дегенерації (наявність кістозної рідини з гемосидерофагами). На відміну від РЙРМ, у загальній популяції метастазів ПК ЩЗ, ознака кістозної дегенерації спостерігається лише в 23 % випадків (табл. 2). Було проведено порівняння за частотою зустрічаємості ознаки кістозної дегенерації групи РЙРМ, що з'явилися після проведення тиреоїдектомії та курсу радіойодтерапії із загальною групою метастазів ПК ЩЗ, виявлених до проведення тиреоїдектомії та радіойодтерапії.

За допомогою кореляційного аналізу було встановлено, що зв'язок між радіойодрезистентністю та наявністю кістозної дегенерації обернений та значимий (Фі-коефіцієнт кореляції дорівнює -0,5, тетрагоричний коефіцієнт кореляції дорівнює -0,7).

Таблиця 2

Ілюстрація частоти ознаки кістозної дегенерації, що зустрічається в загальній популяції метастазів ПК ЩЗ, в групах РЙРМ та РЙЧМ

№	Наявність цитологічної ознаки	Наявність гістологічної ознаки	% метастазів з цитологічною ознакою	% метастазів з гістологічною ознакою
Загальна популяція метастазів ПК	42	10	23	23
РЙРМ	35	28	80	72
РЙЧМ	15	0	0	-

Імуноцитохімічні особливості тиреоцитів пунктів радіодрезистентних метастазів папілярного раку щитоподібної залози. Проведені нами порівняльні імуноцитохімічні дослідження експресії тиреоїдної пероксидази (ТПО) у групі РЙРМ та РЙЧМ показали, що в групі РЙРМ у 80 % випадків експресія тиреоїдної пероксидази відсутня, а в решті випадків лише 5-12 % пухлинних клітин є імунопозитивними. В той же час, в усіх метастазах групи РЙЧМ, від 75 до 90 % пухлинних клітин експресують тиреоїдну пероксидазу. Різниця між радіодрезистентними та радіодрезистентними метастазами за процентним вмістом клітин, що реагують з антитілами до тиреоїдної пероксидази, виявилась статистично достовірною. У відповідності з непараметричним критерієм Манна-Уїтні підтверджено альтернативну гіпотезу про наявність значимі відмінності (на рівні 0,001) між показниками двох груп ($p=0,000011$) (рис. 7).

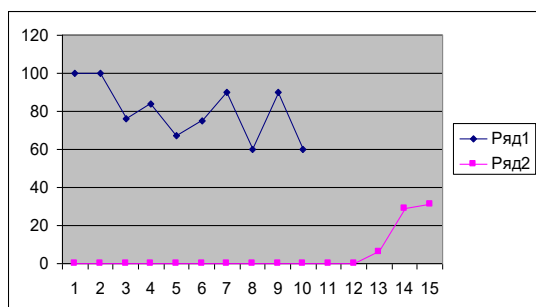


Рис. 7. Розподіл груп РЙРМ (ряд 1) та РЙЧМ ПК ЩЗ (ряд 2) за відсотком тиреоцитів, які містять тиреоїдну пероксидазу.

Дослідження проліферативної активності клітин радіодрезистентних метастазів папілярного раку щитоподібної залози. Показана відсутність або незначна кількість (0,5 %) клітин, які містять антиген проліферуючих клітин Ki-67 у пунктатах вузлового зобу. У пунктатах карцином вміст клітин з антигеном Ki-67 складав від 1 до 10 %. Найбільший процентний вміст цих клітин спостерігався в пунктатах медулярного раку, дифузно-склерозуючого варіанту ПК та ПК ЩЗ на фоні аутоімунного тиреїдиту (7-10 %). У пунктатах досліджених РЙРМ, як і в загальній групі ПК, вміст клітин, експресуючих антиген Ki-67, складав 1-7 %. У той же час, в пунктатах РЙЧМ вміст таких клітин складав 0-1 %. (рис. 8).

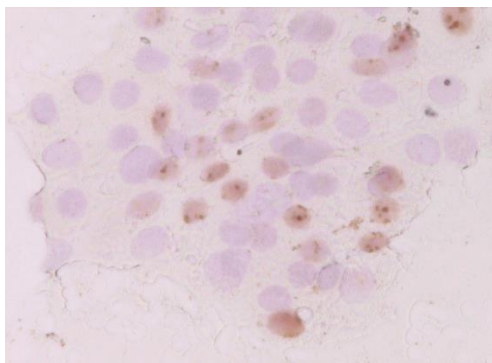


Рис. 8. Імуноцитохімічне виявлення антигену Ki-67 в клітинах пунктату РЙРМ ПК ЩЗ. Об.40, ок.3,3. Ядра клітин пофарбовані гематоксилином.

Слід відмітити тенденцію до підвищення вмісту проліферуючих тиреоцитів у пунктатах метастазів рецидивуючих ПК з повторним метастазуванням. Якщо в пунктатах метастазів, які з'явилися через деякий час після тиреоїдектомії та радіодрезистентності, Ki-67-позитивні тиреоцити були відсутні в більшості випадків, то в метастазах, які з'явилися повторно, він у ряді випадків досягав 17 %. Це

свідчить про підвищення проліферативної активності клітин повторних метастазів ПК у порівнянні з первинними метастазами.

Обговорення результатів. Слід очікувати, що тиреоцити РЙРМ будуть відрізнятися за своїми імуноцитохімічними та цитоморфологічними ознаками (тобто фенотипічно) від тиреоцитів метастазів, які не втратили здатності до накопичення радіоїоду. На основі виявлених фенотипічних особливостей клітин популяції тиреоцитів РЙРМ можна передбачати їх появу, крім того, це крок до розуміння механізмів виникнення явища радіодрезистентності. У літературі не знайдено даних щодо цитоморфологічних проявів радіодрезистентності, або досліджень, пов'язаних з вивченням цитоморфологічних та деяких імуноцитохімічних змін клітин у процесі онкогенезу ПК від первинної пухлини до РЙРМ.

З метою знаходження фенотипічних особливостей тиреоцитів РЙРМ ПК ЩЗ, вперше було проведено комплексне дослідження їх цитологічних та імуноцитохімічних характеристик в порівнянні з РЙЧМ та первинними ПК ЩЗ. Було виявлено існування фенотипічної гетерогенності епітелію РЙРМ ПК ЩЗ в порівнянні з РЙЧМ ПК ЩЗ. Проявами фенотипічної гетерогенності була наявність епітеліальних пластів нерегулярної архітектури, наявність особливих клітинних субпопуляцій (S- та МС-клітини), та особливих комплексів вакуолізованих тиреоцитів та псамомних тілець, наявність кістозної дегенерації, які зустрічались в пунктатах РЙРМ та були відсутні в РЙЧМ.

В результаті проведених досліджень була виявлена кореляція між наявністю кістозної дегенерації в пункційному матеріалі метастазів, виявлених в післяопераційному періоді та їх радіодрезистентністю. Можна дати таке пояснення цьому феномену. Ферменти та антигени, які беруть участь в акумуляції клітинами йоду (ТПО, NaI-симпортер) присутні в мембранах тиреоцитів [16, 17], а не в кістозній рідині. Крім того, та частка маси лімфовузла, яка безпосередньо приймає участь у зв'язуванні ізотопу в кістозно дегенеруючих вузлах буде меншою в порівнянні з метастазами однорідної будови.

Той факт, що ознаки кістозної дегенерації легко визначаються на матеріалі ТАПБ, дозволяє запропонувати таке визначення якості прогностичного фактора радіодрезистентності метастазів ПК ЩЗ. Спосіб використання виявлення цитологічної ознаки кістозної дегенерації в пунктатах післяопераційних метастазів ПК ЩЗ якості фактору прогнозу радіодрезистентності та ефективності радіодрезистентності, є запатентованим та може бути запропонованим для практичного використання. Як видно з таблиці (таб. 1), частота визначення кістозної дегенерації на цитологічних препаратах дещо вища, ніж її реєстрація на патогістологічних заключеннях. Це можна пояснити тим, що при пункційній біопсії новоутворень, цитологічні ознаки (кістозна рідина з гемосидерофагами) можуть бути отримані з відносно невеликих кіст на початку процесу.

Наявність у пунктатах РЙРМ більшої кількості субклонів та структур тиреоцитів у порівнянні з групою РЙЧМ, можливо, є проявом більшої генетичної гетерогенності цих пухлин, яка є кращим «полігоном» для появи субклонів тиреоцитів з агресивною поведінкою, які можуть обумовлювати розвиток радіодрезистентності. Ці міркування, а також відсутність у клітинах субпопуляції S тиреоглобуліну, який є аркером диференційованих тиреоцитів, спонукало нас до припущення щодо участі цих клітин у процесі метастазування, а, можливо, й формуванні РЙРМ. Відповідні дослідження продемонстрували наявність кореляції між присутністю клітин субпопуляції S у первинних ПК ЩЗ та частотою виникнення метастазів після проведення у цих пацієнтів стандартної терапії. З проведених досліджень випливає наявність зв'язку між кількістю та частотою метастазування ПК ЩЗ та наявністю клітин субпопуляції S в первинних ПК. Це, безумовно, натякає на безпосередню, хоч і не єдину участь цієї особливої субпопуляції

клітин у процесі метастазування. Оскільки фенотипічна гетерогенність популяції тиреоцитів (наявність різних субпопуляцій та структур клітин) зустрічається в пунктатах РЙРМ та відсутня в пунктатах РЙЧМ ПК ЩЗ, то її наявність можна розглядати як цитоморфологічний фактор прогнозування радіоїодрезистентності післяопераційних метастазів ПК ЩЗ.

РЙРМ ПКЩЗ є унікальним явищем, в основі якого є втрата диференційованими клітинами їх головної функції – накопичення радіоїоду, що здійснюється через втрату цими клітинами антигенів та ферментів, відповідальних за захват та накопичення радіоїоду. Одним з таких факторів є ТПО – фермент, притаманний клітинам фолікулярного епітелію ЩЗ, який є ключовим у біосинтезі тиреоїдних гормонів [18-20]. Проведені дослідження продемонстрували статистично імовірну різницю в експресії ТПО в пунктатах між групами РЙРМ та РЙЧМ ПК ЩЗ. Імуноцитохімічне визначення експресії ТПО може бути використано в якості прогностичного маркера радіоїодрезистентності метастазів, виявлених в післяопераційному періоді.

У післяопераційному періоді, навіть після проведення у пацієнтів з ПК ЩЗ тиреоїдектомії та наступної радіоїодтерапії, можуть з'являтися як РЙРМ, для яких радіоїодтерапія є неефективною, так і метастази, які накопичують радіоїод та можуть бути успішно вилікованими за його допомогою. Проведені нами дослідження дозволили запропонувати нові методи доопераційного прогнозування метастазів, виявлених у післяопераційному періоді за допомогою визначення в матеріалі ТАПБ ТПО та деяких цитологічних ознак (наявність фенотипічної гетерогенності, кістозної дегенерації, особливих клітинних субпопуляцій та комплексів). Відсутність ТПО в пунктатах таких метастазів свідчить про нездатність їх клітин до зв'язування радіоїоду, неефективність подальшої радіоїодтерапії цього метастазу і доцільність його хірургічного видалення. Якщо більше 75 % клітин пунктату містять ТПО, передбачають здатність метастазу до накопичення радіоїоду та доцільність подальшої радіоїодтерапії. Прогнозування радіоїодчутливості метастазів ПК ЩЗ може бути одним з факторів, який визначає персоналізовану тактику лікування у випадках неповної структурної відповіді на початкову терапію, коли після першого курсу радіоїодтерапії визначаються персистентні локально-регіонарні метастази [21]. Таким чином, простий метод визначення ТПО в пунктатах метастазів, виявлених у післяопераційному періоді дозволить передбачити ефективність радіоїодтерапії та обговорювати виконання дисекції шиї у пацієнтів з РЙРМ та доцільність подальшої радіоїодтерапії у пацієнтів з РЙЧМ. Таким чином, цитологічне дослідження лімфогенних метастазів з визначення маркерів йодрезистентності є мінімальнотравматичним дослідженням, що дозволяє коректувати програму лікування [22].

Висновки:

1. Вперше були проведені комплексні цитологічні та імуноцитохімічні дослідження РЙРМ у порівнянні з РЙЧМ та первинними ПК ЩЗ та були виявлені фенотипічні особливості РЙРМ, на основі яких розроблені методи їх доопераційного прогнозування.
2. Радіоїодрезистентні метастази ПК ЩЗ демонструють фенотипічну гетерогенність популяції тиреоцитів на відміну від радіоїодчутливих метастазів та появу клітинних типів та структур, які відсутні в первинних ПК радіоїодчутливих метастазах.
3. У результаті проведених досліджень показана кореляція між наявністю кістозної дегенерації в пункційному матеріалі післяопераційних метастазів та їх радіоїодрезистентністю, на основі чого розроблений спосіб доопераційного прогнозування ефективності радіоїодтерапії.
4. Ознака фенотипічної гетерогенності популяції тиреоцитів разом з низькою експресією тиреоїдної пероксидази можуть бути цитологічними факторами доопераційного прогнозування радіоїодрезистентності метастазів ПК

ЩЗ, які виникли в післяопераційному періоді та ефективності радіоїодтерапії.

5. Простий метод визначення ТПО в пунктатах метастазів, виявлених у післяопераційному періоді дозволить передбачити ефективність радіоїодтерапії та обговорювати виконання дисекції шиї у пацієнтів з РЙРМ та доцільність подальшої радіоїодтерапії у пацієнтів з РЙЧМ.

References:

1. Dzepina D., Zurak K., Petric V., Cupic H. Pathological characteristics and clinical perspectives of papillary thyroid cancer: study of 714 patients. *Eur. Arch. Otorhinolarygol.* 2014. Vol.271 (1). P.141 - 148.
2. Lei S., Ding Z., Ge J., Zhao D. Association between prognostic factors and clinical outcome of well-differentiated thyroid carcinoma: a retrospective 10-year follow-up study. *Oncol. Lett.* 2015. Vol.10 (3). P.1749 – 1754.
3. Markovina S., Grigsby P.W., Schwarz J.K. et al. Treatment approach, surveillance, and outcome of well-differentiated thyroid cancer in childhood and adolescence. *Thyroid.* 2014. Vol.24 (7). P.1121 - 1126.
4. Dadu R., Devine C., Hernandez M. et al. Role of salvage targeted therapy in differentiated thyroid cancer patients who failed first-line sorafenib. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2014. Vol. 99. P.2086 - 2094.
5. Haugen B.R., Alexander E.K., Bible K.C. et al. American thyroid Association management guidelines for adults patients with thyroid nodules and differentiated thyroid cancer. *Thyroid.* 2015. (in press).
6. Bryan R. Haugen, Erik K. Alexander, Keith C. Bible et al. 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. Vol. 26(1).
7. Pfister D.G., Fagin J.A. Refractory thyroid cancer: a paradigm shift in treatment is not far off. *J. Clin. Oncol.* 2008; 26(29): 4701 - 4704. Pacini F., Yasuhiro Ito., Markus Luster. Radioactive iodine-refractory differentiated thyroid cancer: unmet needs and future directions. *Expert Rev. Endocrinol. Metab.* 2012; 7(5): 541 - 544.
8. Epshteyn Ye.V., Oleynik V.A., T.K. Sovenko T.K. Lecheniya differentsirovannogo raka shchitovidnoy zhelezy. *Promeneya diagnostika, promeneya terapiya.* 2000; 1: 53 - 54.
9. Rubello D., Mazzarotto R., Casara D. et al. The role of technecium-99m-methoxyisobutylisonitrile scintigraphy in the planning therapy and follow-up of patient with differentiated thyroid carcinoma after surgery. *Eur.J.Nucl.Med.* 2000; 27(4): 431 -440.
10. Deandreis D., Ghuzlan A, Lebouleux S. et al. Do histological, immunohistochemical, and metabolic (radioiodine and fluorodeoxyglucose uptakes) patterns of metastatic thyroid cancer correlate with patient outcome? *Endocr Relat Cancer* February. 2011; 1(18): 159 - 169.
11. Xing M., Westra W.H., Tufano R.P. et al. BRAF mutation predicts a poorer clinical prognosis for papillary thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005; 90(12): 6373.
12. Min J.J., Chung J.K., Lee Y.J. et al. Relationship between expression of the sodium/iodide symporter and 131I uptake in recurrent lesions of differentiated thyroid carcinoma. *Eur.J.Nucl.Med.* 2001; 28(5): 639 – 645.
13. Bozhok YU.M., Tavokina L.V., Epshteyn O.V. Nove v diahnostytsi raka shchytovydnoyi zalozy. Optymal'ne poyednannya morfolohichnykh ta imunotsytokhimichnykh metodiv doslidzhennya punktsiynoho materialu. *Likars'ky visnyk (SSHA).* 1996; 138(1): 40 - 43.
14. Zelins'ka H.V., Kulinichenko H.M., Hulevaty S.V., Bozhok YU.M., Markov V.V., Ustyomenko H.YA. Tsytolohichni dosyahennya u prohnouzuvanni radioyodrezystentnosti papilyarnoho raku shchytovodibnoyi zalozy v dopomohu radioloham. *Ukrayins'ky Radiolohichnyy Zhurnal.* 2013. T. 10(3). P.313 - 315.

15. Yamashita H., Noguchi S., Muracami N. et al. Ultrastructural localisation of endogenous peroxidase activity in benign diseases. *Acta Pathol. Jap.* 1987; 37(5): 755 -762.
16. Nilsson M. Iodide handling by the thyroid epithelial cell. *Experim. Clin. Endocrin. Diabetes.* 2001; 109(1): 13 - 17.
17. Dunn J.T., Dunn A.D. Update on intrathyroidal iodine metabolism. *Thyroid.* 2001; 11(5): 407 - 417.
18. Furuya F., Shimura H., Hideyo S. 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.
19. Liu Ying Y., Marcel P., Stokkel L. et al. Bexarotene increases uptake of radioiodide in metastases of differentiated thyroid carcinoma. *European J. Endocrinology.* 2006; 154: 525 - 531.
20. Kovalenko A.Ye., Bobrik M.I. Redaktery. Metod. rekomendatsii. Rukovodstvo Amerikanskoj Tireoidnoy Asotsiatsii. M.I.- K.; 2016. P. 62.
21. Kovalenko A.Ye., Protsyk V.S., Tarashchenko YU.N., Solodyannikova O.I., Sagan D.L. Papillyarniy rak shchitovidnoy zhelezyz opyt 30 let poslechernobyl'skogo perioda. *Ukrayins'kyy Radiolohichnyy Zhurnal.* 2016; dodatok 1. P. 25

УДК 616.441-006.6:616-076.5:[546.15:615.849.2]

ДООПЕРАЦИОННОЕ ПРОГНОЗИРОВАНИЕ РАДИОЙОДРЕЗИСТЕНТНОСТИ ПАПИЛЛЯРНОГО РАКА ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Зелинская А.В.

Институт эндокринологии и обмена веществ им. В.П. Комисаренко НАМН Украины, отделение функциональной диагностики, г. Киев, Украина, ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-4320-6901>, e-mail: ann.zelinskaya@ukr.net

Резюме. Цель. На основе выявления цитоморфологических и иммуноцитохимических особенностей клеток радиойодрезистентных метастазов папиллярных тиреоидных карцином разработать методы их дооперационного прогнозирования и эффективности радиойодтерапии.

Методы. Цитоморфологические и иммуноцитохимические исследования с использованием моноклональных антител против тиреоидной пероксидазы, тиреоглобулина, цитокератинов 7,8, макрофагальных антигенов, антигена Ki-67, молекул адгезии эпителия проведены на пункционном материале 60 первичных папиллярных карцином и их метастазов, выявленных до операции и на материале 95 метастазов, выявленных в послеоперационном периоде (70–радиойодрезистентных метастазов, 25–метастазов, накапливающих радиойод).

Результаты. Обнаружена фенотипическая гетерогенность тиреоидных радиойодрезистентных метастазов, в отличии от радиойодчувствительных метастазов, которая проявляется наличием особых клеточных субпопуляций и структур. Показана статистически достоверная разница в экспрессии тиреоидной пероксидазы между радиойодрезистентными и радиойодчувствительными метастазами папиллярных тиреоидных карцином, на основе чего созданы методы дооперационного прогнозирования радиойодрезистентности послеоперационных метастазов.

Выводы. В результате впервые проведенных цитологических и иммуноцитохимических исследований радиойодрезистентных метастазов тиреоидных папиллярных карцином выявлено, что признак фенотипической гетерогенности, кистозной дегенерации и низкой экспрессии тиреоидной пероксидазы могут быть использованы в дооперационном прогнозировании радиойодрезистентности послеоперационных метастазов, на основе чего созданы

методы дооперационного прогнозирования радиойодрезистентности и эффективности радиойодтерапии.

Ключевые слова: папиллярная карцинома щитовидной железы, тонкоигольная аспирационная пункционная биопсия, радиойодрезистентные метастазы, тиреоидная пероксидаза, прогноз.

UDC 616.441-006.6:616-076.5:[546.15:615.849.2]

PREOPERATIVE PROGNOSIS OF RADIOIODINE-RESISTANCE OF PAPILLARY THYROID CANCER

A.V. Zelinska

V.P.Komisarenko Institute of Endocrinology and Metabolism of Academy of Medical Science of Ukraine, Kiev Ukraine, ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-4320-6901>, e-mail: Ann.zelinska@ukr.net

Abstract. Aim. On the basis of detection of cytomorphological and immunocytochemical characteristics of thyrocytes of radioiodine - resistant metastases of papillary thyroid carcinoma to develop methods of their preoperative prediction and effectiveness of radioiodine therapy.

Material and methods. Cytomorphological and immunocytochemical studies using monoclonal antibody against thyroid peroxidase, thyroglobulin, cytokeratins 7,8, antigen Ki-67, adhesion molecules of the epithelium were performed on the material of Fine Needle Aspiration Biopsy of 60 papillary thyroid carcinomas and their metastases detected in the postoperative period (70 – radioiodine - resistant metastases, 25 - radioiodine – sensitive metastases).

Results. As a result of the conducted researches, the phenotypic heterogeneity of thyrocytes of radioiodine resistant metastases was revealed, in contrast to radioiodine-sensitive metastases, which is manifested by the presence of specific cell subpopulations and structures that are absent in radioiodine-sensitive metastases and primary papillary carcinomas. The correlation between the presence of cystic degeneration in punctates of postoperative thyroid metastases and radioiodine resistance was revealed. Based on this, a method for preoperative prediction of radioiodine resistance of postoperative metastases has been developed. The statistically significant difference in the expression of thyroid peroxidase between radioiodine resistant and radioiodine-sensitive papillary thyroid carcinoma metastases is shown, on the basis of which the methods of preoperative prediction of radioiodine resistance of postoperative metastases is established. The tendency to increase the content of proliferating thyroiditis in punctates of recurrent papillary carcinoma metastases with repeated metastases is revealed.

Conclusions:

1. For the first time the complex cytological and immunocytochemical researches of radioiodine-resistant metastases of papillary thyroid carcinoma were performed in comparison with radioiodine – sensitive metastases and primary papillary thyroid carcinoma and phenotypic features of radioiodine-resistant metastases were discovered, on the basis of which methods of their preoperative prediction were developed.

2. As a result of the conducted studies, the correlation between the presence of cystic degeneration in the puncture material of postoperative metastases, and their radioiodine resistance. On the basis of which the method of preoperative prediction of the effectiveness of radioiodine therapy has been developed.

3. The sign of the phenotypic heterogeneity of the thyroid population, together with the low expression of the thyroid peroxidase, can be cytological factors of preoperative prediction of radioiodine resistance of papillary thyroid metastases, which

arose in the postoperative period and the effectiveness of radioiodine therapy.

4. A simple method for determining of thyroid peroxidase in punctuates of thyroid metastases detected in the postoperative period will allow for the prediction of the effectiveness of radioiodine therapy and discuss the implementation of neck dissection in patients with radioiodine resistance of papillary thyroid metastases and the feasibility of further radio-

iodine therapy in patients with radioiodine – sensitive metastase. This approach allows predict response of metastases on radioiodine therapy to choose proper therapeutic approach.

Keywords: papillary thyroid carcinoma, fine-needle aspiration punction biopsy, radioiodine resistant metastasis, thyroid peroxidase, prognosis.

Стаття надійшла в редакцію 02.07.2018 р.