

УДК 616.441-006.55-074

В.В. Хазієв, І.В. Сорокіна*

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

**Харківський національний медичний університет*

ЕКСПРЕСІЯ ОНКОМАРКЕРІВ Ki-67 І P53 У ФОЛІКУЛЯРНИХ НЕОПЛАЗІЯХ ЩИТОВИДНОЇ ЗАЛОЗИ

Виявлено високу частоту експресії Ki-67 в препаратах фолікулярних аденом (100 %), фолікулярного (100 %) та папілярного (78,95 %) раку щитовидної залози. Найбільш висока сила експресії характерна для фолікулярного раку. Слабка експресія p53 з максимальною частотою реєструвалася в препаратах фолікулярних аденом (66,7 %) і значно рідше в препаратах фолікулярного (18,7 %) та папілярного (21,05%) раку щитовидної залози. Отримані дані не можуть підтвердити гіпотезу про цінність онкомаркерів Ki-67 і p53 для диференційної діагностики тиреоїдних фолікулярних неоплазій і вказують на необхідність глибокого вивчення патогенетичних факторів існування несхожих форм пухлинної патології щитовидної залози.

Ключові слова: щитовидна залоза, фолікулярна аденома, фолікулярний рак, папілярний рак.

Сукупна точність клінічних, інструментальних і лабораторних методів діагностики щодо встановлення морфологічного походження вузлових новоутворень щитовидної залози навіть за самими сміливими висновками не перевищує 80 % [1]. Такий результат не може задовольнити ні хірургів (невиправдана гіпердіагностика раку щитовидної залози, ні ендокринологів (неадекватний і несвоєчасний відбір пацієнтів для хірургічного лікування). Клінічно встановити злоякісність вузла на ранньому етапі практично неможливо, а діагноз, як правило, встановлюється на пізніх стадіях при наявності регіонарних і віддалених метастазів [2–4]. В якості критеріїв диференційної діагностики вузлового зоба і раку щитовидної залози пропонуються чисельні імуногістохімічні, імуноцитохімічні та молекулярні маркери, жоден з яких, на жаль, не має стовідсоткової специфічності [5, 6].

Перспективним маркером вважається Ki-76. Антитіла Ki-67 розпізнають ДНК-зв'язаний ядерний протеїн, що присутній в ядрах клітин в G1-, S-, G2- та M-фазах і відсутній в G₀-фазі. Проліферативна активність багатьох новоутворень оцінюється за допомогою Ki-67. Виявлено зв'язок між значеннями індексу проліферації, ступенем гістологічної диференціації пухлини і клінічним прогнозом при раку ендометрія, яєчників, легенів, молочної залози, сечового міхура, лімфомах та пухлинах нервової системи [7–10].

Багатообіцяючим для діагностичного застосування є також онкомаркер p53. Білок p53 – продукт гена-супресора пухлини TP53, експресується в усіх клітинах організму. Результатом його активації є зупинка клітинного циклу і реплікації ДНК, при сильному стресовому сигналі – запуск апоптозу. Білок p53 активується при ушкодженнях генетичного апарату, а також при стимулах, які можуть призвести до подібних пошкоджень або є сигналом при несприятливому стані клітини (стресовому стані). Функція білка p53 полягає у видаленні з пулу тих клітин, які є потенційно онкогенними, звідси образна назва білка p53 – англ. *guardian of the genome* – хранитель геному. За даними літератури, втрата функції білка p53 встановлювалася приблизно у 50 % випадків злоякісних пухлин людини, у тому числі і щитовидної залози [11, 12].

Мета даного дослідження – визначення експресії маркерів Ki-67 і p53 в якості потен-

зак між значеннями індексу проліферації, ступенем гістологічної диференціації пухлини і клінічним прогнозом при раку ендометрія, яєчників, легенів, молочної залози, сечового міхура, лімфомах та пухлинах нервової системи [7–10].

© В.В. Хазієв, І.В. Сорокіна, 2013

ціальних критеріїв диференційної діагностики фолікулярних неоплазій щитовидної залози.

Матеріал і методи. Імуногістохімічним методом досліджено 24 препарати фолікулярних аденом щитовидної залози (ФАЩЗ), 16 препаратів фолікулярного раку щитовидної залози (ФРЩЗ) та 19 препаратів папілярного раку щитовидної залози (ПРЩЗ). Використано моноклональні антитіла до p53-онкопротеїну (клон DO-7, DakoCytomation), Ki-67 (клон MIB-1, DakoCytomation). Зрізи товщиною 4–5 мкм наносили на предметні скельця, заздалегідь оброблені адгезивною рідиною (poly-L-lysine) з подальшою депарафінізацією відповідно до прийнятих стандартів. Для кожного маркера виконувалися контрольні дослідження з метою виключення помилково позитивного або помилково негативного результату. Подальшу обробку проводили з використанням систем візуалізації LSAB2 і LabVision (UltraOne) впродовж 10 хв з кожним реагентом з проміжним промиванням у ТРИС-буферному розчині. Після цього проводили реакцію з хромогеном (DAB, DakoCytomation), мікроскопічно оцінюючи якість взаємодії протягом 20 с – 3 хв. Для диференціювання структур тканин зрізи додатково фарбували гематоксиліном Майєра протягом 3 хв. Дегідратація і заливка в бальзам здійснювалися згідно з відомими принципами. Результат оцінювали як позитивний при випаданні солей хромогенів саме в пухлинних клітинах, причому у вигляді специфічної реакції (мембранної або реакції цитоплазми).

Клітини, що були позитивними відносно експресії маркерів, вивчали як мінімум на 4–6 випадково вибраних гістологічних зрізах в полях зору мікроскопа з використанням об'єктивів $\times 10$ і 40 . Після підрахунку 300 гістологічно ідентифікованих об'єктів (ядер або клітин) обчислювали показники експресії за результатами усіх вивчених ділянок. Враховували позитивну реакцію в нормальних клітинах фолікулярного тиреоїдного епітелію, а також в пухлинних клітинах. При оцінці імуногістохімічного забарвлення з антитілами до Ki-67 і p53 позитивна реакція в клітинних ядрах виявлялася коричневим забарвленням різного ступеня інтенсивності.

Оцінка імуногістохімічної реакції ґрунтувалася на інтенсивності забарвлення і розподілі імунопозитивних клітин: «–» – немає експресії; «+» – слабка; «++» – помірна і «+++» – інтен-

сивна експресія. Експресію p53 і Ki-67 обчислювали незалежно від інтенсивності забарвлення як відсоток клітин з інтрануклеарною реакцією від загального числа клітин в середньому за результатами усіх вивчених ділянок.

Результати та їх обговорення. У досліджуваному матеріалі ФАЩЗ експресія Ki-67 коливалася від 1–2 до 3–4 забарвлених ядер в полі зору (24 випадки; 100,0 %), рис. 1.

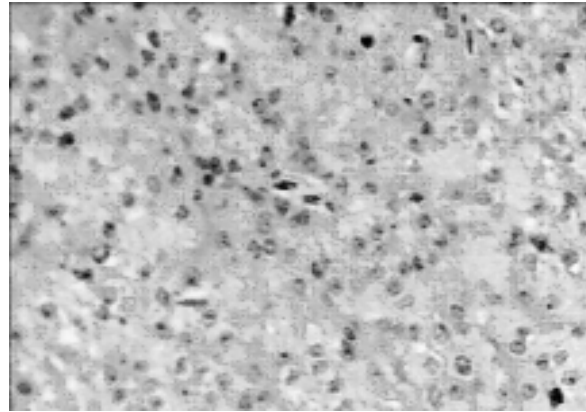


Рис 1. Мікроструктура нормофолікулярної аденоми. Фокальна нуклеарна реакція на Ki-67, додаткове фарбування гематоксиліном Майєра, $\times 400$

Нуклеарна експресія Ki-67 у ФРЩЗ була більш вираженою у порівнянні з такою у ФАЩЗ, що відображає значно більшу проліферативну активність фолікулярних карцином. У нашому дослідженні експресія даного маркера коливалася в діапазоні 8–20 забарвлених ядер у полі зору (16 випадків; 100,0 %), рис. 2.

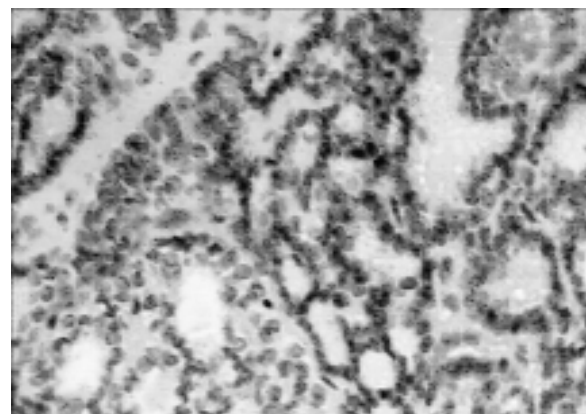


Рис. 2. Експресія Ki-67 у фолікулярному раці щитовидної залози. Додаткове забарвлення гематоксиліном Майєра в полі зору до 20 забарвлених ядер, $\times 400$

Експресія Ki-67 в ПРЦЗ була слабо вираженою. Забарвлення мало фокальний нуклеарний характер, причому в полі зору визначалося не більше 1–2 ядер з помірною реакцією на цей маркер (рис. 3). Необхідно відмітити, що позитивну експресію було виявлено в 15 випадках із 19 (78,95 %). Решта препаратів не показала активності проліферативних процесів і була властивою ПРЦЗ.



Рис. 3. Незначна експресія Ki-67 у папілярному раці щитовидної залози. Додаткове забарвлення гематоксиліном Майєра, $\times 400$

При визначенні онкопротеїну p53 у ФАЦЗ виявлено, що він був присутнім у 66,7 % усіх вивчених випадків аденом. Експресія маркера була слабо вираженою і специфічною для мікрофолікулярних аденом щитовидної залози (рис. 4). Тільки у трьох випадках (18,7 %)

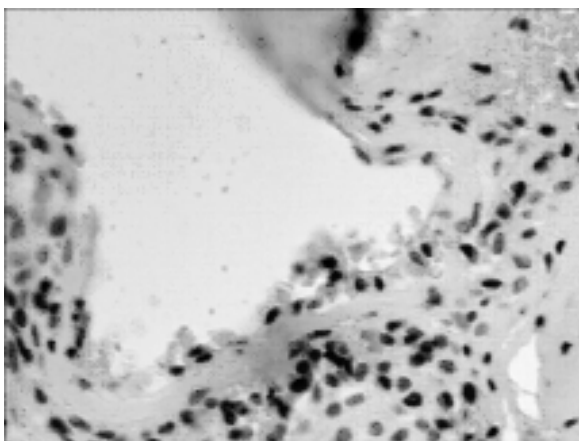


Рис. 4. Мікроструктура фолікулярної аденоми щитовидної залози. Незначна ядерна реакція на p53. Додаткове забарвлення гематоксиліном Майєра, $\times 400$

ФАЦЗ нуклеарна експресія онкопротеїну p53 була слабопозитивною (рис. 5). Аналогічні дані

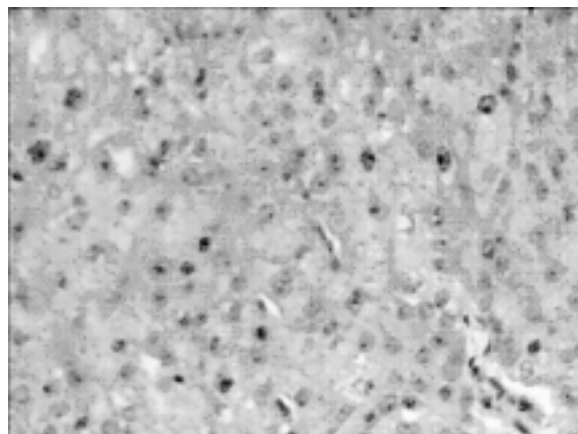


Рис. 5. Слабопозитивна експресія p53 у фолікулярному раці щитовидної залози. Додаткове забарвлення гематоксиліном Майєра, $\times 400$

нами виявлені і при дослідженні p53 в препаратах ПРЦЗ – позитивна експресія визначалася в 4 із 19 випадків (21,05 %). Забарвлення на цей маркер мало фокальний характер, причому в одному полі зору визначалося не більше 6–7 ядер (рис. 6).

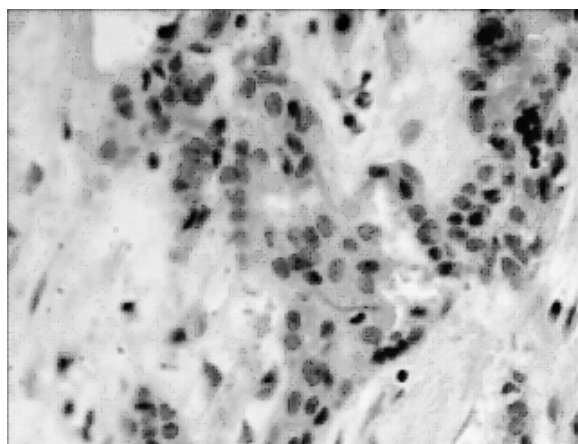


Рис. 6. Незначна нуклеарна експресія p53 в папілярній карциномі щитовидної залози. Додаткове забарвлення гематоксиліном Майєра, $\times 400$

Отримані дані свідчать про різний характер експресії досліджуваних маркерів у препаратах новоутворень фолікулярного епітелію щитовидної залози. Щодо експресії Ki-67, то максимальну проліферативну активність демонстрували зразки ФРЦЗ і ФАЦЗ, тоді як у зразках ПРЦЗ вона була менш вираженою. Існують дані, що в злоякісних пухлинах щитовидної

залози близько 40 % клітин експресують рецептори до Ki-67, а близько 10 % – доброякісні. На думку авторів, якщо прийняти рівень 20 % за межу між доброякісними та злоякісними новоутвореннями щитовидної залози, то за допомогою Ki-67 можна визначити малігнізацію на пункційному матеріалі з чутливістю до 82 % і точністю до 84 % [7–10]. Отримані нами дані не підтверджують таку гіпотезу у зв'язку із високою частотою експресії досліджуваного маркера для всіх видів патології, як доброякісної, так і злоякісної.

Відповідно до сучасних поглядів, білок p53 задіяний у трансформації високодиференційованого тиреоїдного раку в анапластичний. За деякими даними, мутації в гені p53 характерні для 25 % випадків диференційованих раків щитовидної залози, що узгоджується з нашими даними, і 86 % випадків анапластичних карцином, тому пропонується використовувати цей онкомаркер як прогностичний чинник [13, 14]. Але відповідно до отриманих нами даних p53 значно частіше експресувався у ФАЦЗ, ніж у злоякісних новоутвореннях щитовидної залози, що вказує, по-перше, на неможливість його використання як чинника диференційної діагностики, по-друге, на генетичну неоднорідність фолікулярного та папілярного раку щитовидної залози.

Отже, виявлений неоднозначний характер експресії онкомаркерів p53 та Ki-67 вказує на існування різних типів пухлин фолікулярного

епітелію щитовидної залози з розбіжними патогенетичними механізмами розвитку, перебігу та прогнозу.

Висновки

1. Дослідження експресії Ki-67 виявило її високу частоту в препаратах фолікулярних аденом щитовидної залози (100 %), фолікулярного (100 %) і папілярного (78,95 %) раку щитовидної залози. Найбільш висока сила експресії характерна для фолікулярного раку щитовидної залози.

2. Слабка експресія p53 з максимальною частотою реєструвалася в препаратах фолікулярних аденом щитовидної залози (66,7 %) і значно рідше – у випадках фолікулярного (18,7 %) і папілярного (21,05 %) раку щитовидної залози.

3. Отримані дані не можуть підтвердити гіпотезу про цінність онкомаркерів Ki-67 і p53 для диференційної діагностики фолікулярних неоплазій щитовидної залози і вказують на необхідність глибокого вивчення патогенетичних факторів існування несхожих форм пухлинної патології щитовидної залози.

Перспективою подальших досліджень є поглиблене вивчення патогенетичних факторів існування несхожих форм пухлинної патології щитовидної залози та впровадження отриманих результатів в практику з метою покращення морфологічної діагностики пухлин щитоподібної залози.

Список літератури

1. Рожкова Е.Б. Экспрессия p53 и EGFR в папиллярном раке щитовидной железы / Е.Б. Рожкова // *Фундаментальные науки и прогресс клинической медицины* : Матер. III конф. молодых ученых России с междунар. участием. – М., 2004. – С. 232–233.
2. Роль первичного морфологического диагноза папиллярного рака щитовидной железы / Л.Е. Демидчик, Е.П. Демидчик, М.В. Фридман [и др.] // *Вопросы онкологии*. – 2009. – Т. 55, № 3. – С. 351–357.
3. Diagnosis of the follicular variant of papillary thyroid carcinoma. Significance of immunohistochemistry / S. Guyétant, S. Michalak, I. Valo [et al.] // *Ann. Pathol.* – 2003. – V. 23, № 1. – P. 11–20.
4. False-negative fine-needle aspiration cytology results delay treatment and adversely affect outcome in patients with thyroid carcinoma / M. W. Yeh, O. Demircan, P. Ituarte [et al.] // *Thyroid*. – 2004. – № 14. – P. 207–215.
5. Онкомаркеры в дифференциальной диагностике и прогнозе при папиллярном раке щитовидной железы / Е. Б. Рожкова, Е. А. Коган, М. Sobrinho-Simoes [и др.] // II Всероссийский съезд патологоанатомов, 11–14 апреля 2006 г. : материалы съезда. – М., 2006. – С. 355–357.
6. Parameswaran R. Molecular pathogenesis of follicular cell derived thyroid cancers / R. Parameswaran, S. Brooks, G. P. Sadler // *Int. J. Surg.* – 2010. – № 8 (3). – P. 186–193.

7. Choudhury M. Diagnostic utility of Ki-67 and p53 immunostaining on solitary thyroid nodule – a cytohistological and radionuclide scintigraphic study / M. Choudhury, S. Singh, S. Agarwal // *Indian J. Pathol. Microbiol.* – 2011. – № 54 (3). – P. 472–475.
8. Class distinction between follicular adenomas and follicular carcinomas of the thyroid gland on the basis of their signature expression / B. S. Stolf, M. M. S. Santos, D. F. Simao [et al.] // *Cancer.* – 2006. – № 106. – P. 1891–1900.
9. Immunohistochemical expression of cyclin D1, E2F-1 and Ki-67 in benign and malignant thyroid lesions / A. D. Saiz, M. Olvera, S. Rezk [et al.] // *J. Pathol.* – 2002. – № 198. – P. 157–162.
10. Ki-67 positive fractions in benign and malignant thyroid tumours: application of flow cytometry / A. Horii, J. Yoshida, M. Sakai [et al.] // *Acta Otolaryngol.* – 1999. – Vol. 119, № 5. – P. 617–620.
11. A new oncogene in human thyroid papillary carcinomas and their lymph nodal metastases / A. Fusco, M. Grieco, M. Santoro [et al.] // *Nature.* – 1987. – Vol. 328, № 5. – P. 170–172.
12. Ret oncogene activation in papillary thyroid carcinoma: prevalence and implication on the histological parameters / A. K. Lam, K. T. Montone, K. Nolan [et al.] // *Hum. Pathol.* – 1998. – Vol. 29, № 6. – P. 565–568.
13. Farid N. R. Molecular pathogenesis of cancer: the significance of oncogenes, tumor suppressor genes, and genomic instability / N. R. Farid // *Endocrinol. and Diabets.* – 1996. – Vol. 104, № 14. – P. 1–12.
14. Significance of P53 in human thyroid tumors / D. Simon, P. E. Goretzki, V. Gorelev [et al.] // *World J. Surg.* – 1994. – Vol. 18, № 3. – P. 535–541.

V.V. Khaziev, I.V. Sorokina

ЭКСПРЕССИЯ ОНКОМАРКЕРОВ Ki-67 И P53 В ФОЛЛИКУЛЯРНЫХ НЕОПЛАЗИЯХ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Выявлена высокая частота экспрессии Ki-67 в препаратах фолликулярных аденом (100 %), фолликулярного (100 %) и папиллярного (78,95 %) рака. Наиболее высокая сила экспрессии характерна для фолликулярного рака. Слабая экспрессия p53 с максимальной частотой регистрировалась в препаратах фолликулярных аденом (66,7 %) и значительно реже – в препаратах фолликулярного (18,7 %) и папиллярного (21,05 %) рака щитовидной железы. Полученные данные не могут подтвердить гипотезу о ценности онкомаркеров Ki-67 и p53 для дифференциальной диагностики тиреоидных фолликулярных неоплазий и указывают на необходимость глубокого изучения патогенетических факторов существования непохожих форм опухолевой патологии щитовидной железы.

Ключевые слова: щитовидная железа, фолликулярная аденома, фолликулярный рак, папиллярный рак.

V.V. Khaziev, I.V. Sorokina

EXPRESSION OF ONCOMARKERS Ki-67 AND P53 IN THYROID FOLLICULAR NEOPLASIAS

It was revealed a high prevalence of Ki-67 expression in thyroid follicular adenomas (100 %), follicular (100 %) and papillary (78.95 %) cancer. The highest power of expression was specific for follicular cancer. Partly expression of p53 with a maximum frequency was recorded in preparations of follicular adenomas (66.7 %) and much less for follicular (18.7 %) and papillary thyroid (21.05 %) cancer. The data can not confirm the hypothesis about the value of tumor markers Ki-67 and p53 for the differential diagnosis of thyroid follicular neoplasia and point to the need for in-depth study of pathogenic factors of diverse forms of thyroid tumor existence.

Key words: thyroid, follicular adenoma, follicular carcinoma, papillary carcinoma.

Поступила 24.04.13