

Г.В. Зелінська

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

**Ключові слова:** папілярна карцинома щитоподібної залози, тонкогolkова аспіраційна пункційна біопсія, пунктати, радіоїодрезистентні метастази, проліферуюча активність, Ki-67.

## ДОСЛІДЖЕННЯ ПРОЛІФЕРАТИВНОЇ АКТИВНОСТІ КЛІТИН РАДІОІОДРЕЗИСТЕНТНИХ МЕТАСТАЗІВ ПАПІЛЯРНОГО РАКУ ЩИТОПОДІБНОЇ ЗАЛОЗИ

*Розвиток радіоїодрезистентності — серйозна проблема в діагностиці та лікуванні диференційованого раку щитоподібної залози. Недостатньо висвітлено, чи пов'язано явище радіоїодрезистентності папілярного тиреоїдного раку з проліферативною активністю його клітин. Мета: проведення порівняльних досліджень експресії маркера проліферативної активності клітин (антигену Ki-67) у пунктатах радіоїодрезистентних (РЙРМ), радіоїодчутливих метастазів (РЙЧМ) та загальній групі метастазів папілярних тиреоїдних карцином. Об'єкт і методи: цитологічні та імуноцитохімічні дослідження з використанням мкАт до антигену Ki-67 (MIB-1) проводили на матеріалі тонкогolkових аспіраційних пункційних біопсій 29 метастазів папілярних тиреоїдних карцином, виявлених до операції, та на пунктатах 38 метастазів (27 — РЙРМ, 11 — РЙЧМ), ідентифікованих у післяопераційний період після проведення тиреоїдектомії та радіоїодтерапії, а також 4 медулярних карцином, 10 папілярних карцином (ПК) та 10 вузлових зобів. Результати: відпрацьовано методуку імуноцитохімічного визначення маркера проліферативної активності клітин у пунктатах, забарвлених за методом Романовського. Найвищий відсоток Ki-67-позитивних клітин відмічали в пунктатах медулярного раку (7–10%), дифузно-склерозуючого варіанта ПК (7–12%) та ПК на фоні аутоімунного тиреоїдиту (6–35%). За результатами застосування критерію Манна — Уїтні не визначено значущої відмінності між РЙРМ та загальною популяцією метастазів ПК, а також між групами РЙРМ та РЙЧМ папілярних тиреоїдних карцином. Висновки: відсутність статистично вірогідної різниці в експресії антигену Ki-67 між досліджуваними групами метастазів папілярних тиреоїдних карцином демонструє незалежність радіоїоднакопичувальної здатності від інтенсивності проліферативних процесів тиреоїтів метастазів ПК. Водночас відзначається тенденція до підвищення вмісту Ki-67-позитивних клітин у пунктатах повторних РЙРМ рецидивуючих ПК.*

Розвиток радіоїодрезистентності є серйозною проблемою в діагностиці та лікуванні диференційованого раку щитоподібної залози (ЩЗ) [1, 2]. На сьогодні актуальними є морфологічні, імуногістохімічні та молекулярно-біологічні дослідження найбільш агресивних типів папілярних тиреоїдних карцином та їх радіоїодрезистентних метастазів (РЙРМ) [3–6]. Раніше проведені нами цитологічні дослідження РЙРМ папілярних карцином (ПК) дозволили виявити деякі імуноцитохімічні та цитологічні особливості, на основі яких стає можливою розробка передопераційних методів прогнозування їх виникнення [7]. Подальша розробка подібних методів можлива лише за умови визначення клініко-біологічних особливостей радіоїодрезистентних тиреоїдних метастазів. Як свідчать дані літератури, пухлина тим активніше

відповідає на радіаційну терапію, чим вища проліферативна здатність її клітин.

Відповідно до основного радіобіологічного закону (Бергонье — Трибондо) тканини, які складаються з малодиференційованих клітин, що активно проліферують, належать до радіоїодчутливих, а тканини, які містять диференційовані клітини, що слабо або зовсім не проліферують, є радіоїодрезистентними [9]. Тому важливим є питання, чи пов'язана радіоїодрезистентність метастазів ПК ЩЗ зі зниженням проліферативної активності клітин в порівнянні із загальною популяцією ПК та групою радіоїодчутливих метастазів (РЙЧМ). Відомим маркером проліферативної активності клітин є антиген Ki-67 — ядерний негістоновий протеїн, який експресується в усіх фазах клітинного циклу, крім G0-фази [10].

За даними літератури, експресія маркерів проліферації клітин асоційована з біологічними ознаками та клінічною поведінкою пухлин. Так, висока експресія Ki-67 корелює із несприятливим прогнозом у пацієнтів з раком молочної або передміхурової залози [11, 12]. Показано, що експресія цього антигену асоційована з віком, розміром пухлини, екстратиреоїдною інвазією, метастазуванням та агресивним гістологічним типом ПК. Епідеміологічні та клінічні дослідження показали, що висока експресія Ki-67 корелює з високим ризиком виникнення рецидивів і віддалених метастазів та несприятливим прогнозом виживаності пацієнтів із папілярним раком ЩЗ. Так, пацієнти з високим індексом Ki-67 мають значно менший термін життя, ніж пацієнти з низьким індексом Ki-67 [13]. За даними інших авторів показана цінність антигену Ki-67 як незалежного прогностичного маркера агресії ПК та виживаності хворих. Вважається, якщо відсоток тиреоцитів, які містять цей антиген, перевищує 4%, прогнозується несприятлива поведінка пухлин, їх агресія та скорочення періоду життя хворих [14]. Усе це свідчить про існування зв'язку між визначеною за допомогою антитіл до антигену Ki-67 проліферативною активністю пухлин та їх агресією і схильністю до метастазування. Але в доступних джерелах літератури не було висвітлено, чи пов'язано явище радіоїодрезистентності папілярного тиреоїдного раку з проліферативною активністю його клітин, що спонукало нас до проведення відповідної дослідницької роботи.

Метою роботи було виконання порівняльних досліджень експресії маркера проліферативної активності клітин — антигену Ki-67 у пунктатах РЙРМ, РЙЧМ та загальній групі метастазів тиреоїдних ПК.

### ОБ'ЄКТ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

У роботі використано матеріал, отриманий в результаті проведення тонкогілкових аспіраційних пункційних біопсій 29 метастазів ПК ЩЗ, виявлених до операції, та 38 метастазів, ідентифікованих у післяопераційний період, тобто після проведення тиреоїдектомії та радіоїодтерапії (27 — РЙРМ, 11 — РЙЧМ), а також 4 медулярних карцином, 10 ПК та 10 вузлових зобів. Пацієнти обох статей віком 8–40 років проходили обстеження, хірургічне лікування та радіоїодтерапію в клініці ДУ «Інститут ендокринології та обміну речовин ім. В.П. Комісаренка НАМН України». Усі пацієнти дали інформовану згоду на використання їх біологічних матеріалів у дослідницьких цілях.

Імуноцитохімічні дослідження проводили в пунктатах, фіксованих метанолом та пофарбованих за методом Романовського, після проведення реакції відновлення активності антигенів за методикою, розробленою в нашій лабораторії раніше [8]. Проводили імуноцитохімічну реакцію виявлення антигенів непрямим імунопероксидазним методом за допомогою мкАт миші проти ан-

тигену Ki-67 — клон MIB-1 (DakoCytomation, Данія). Ядра клітин дофарбовували гематоксиліном. При визначенні відсотка імунопозитивних клітин підраховували не менше 1000 тиреоцитів. Статистичне опрацювання даних робили за непараметричним методом Манна — Уїтні та в пакеті Statistica 11.0.

### РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

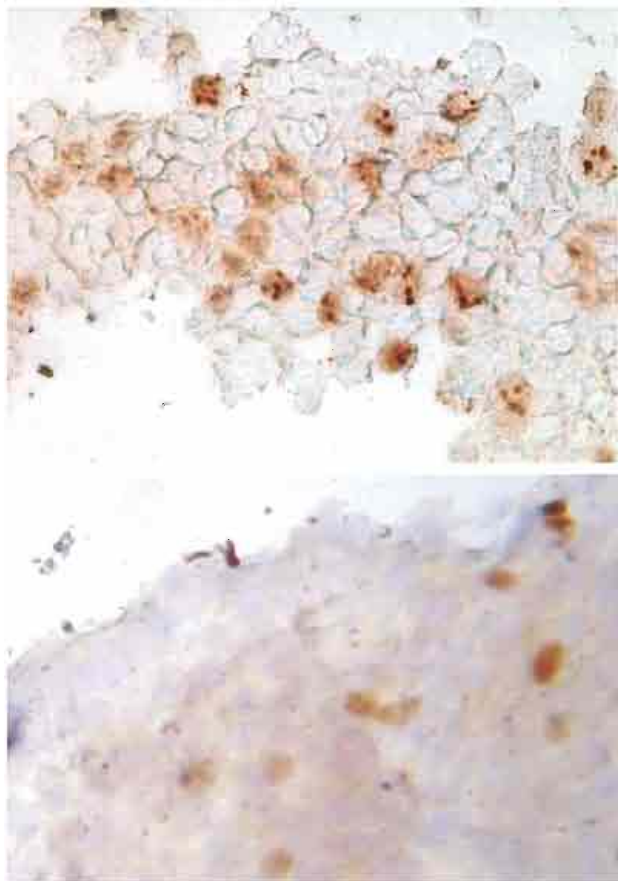
Відпрацьовано методику імуноцитохімічного визначення маркера проліферативної активності клітин — антигену Ki-67 в пунктатах. Результати імуноцитохімічного виявлення антигену за допомогою мкАт на цитологічних препаратах, зафіксованих метанолом, виявилися незадовільними. Водночас, коли була використана методика відновлення антигенних детермінант на препаратах пунктів, спочатку забарвлених за Романовським, отримано задовільну якість імуноцитохімічної реакції з антигенами до антигену Ki-67. При цьому антиген виявлявся у вигляді гранулярного та дифузного забарвлення ядер тиреоцитів. Показано відсутність або незначну кількість (0,5%) епітеліоцитів, які містять антиген Ki-67 у пунктатах вузлового зоба. У пунктатах більшості карцином вміст клітин з антигеном Ki-67 становив від 1 до 10%. Найвищий процентний вміст цих клітин відмічали в пунктатах медулярного раку (7–10%), дифузно-склерозуючого варіанта ПК (7–12%) та ПК ЩЗ на фоні аутоімунного тиреоїдиту (6–35%). Цікаво, із чотирьох досліджених медулярних карцином, в двох відсоток Ki-67-позитивних (Ki-67<sup>+</sup>) клітин був високим — відповідно 7 і 10%, а в інших двох випадках імунопозитивні клітини не були виявлені зовсім.

У пунктатах досліджених РЙРМ, як і в загальній групі метастазів ПК, вміст клітин, які експресують антиген Ki-67, становив від 0 до 17% (рис. 1). Лише в одному випадку метастазів ПК відсоток Ki-67<sup>+</sup> клітин досягав 35%.

У пунктатах РЙЧМ ПК ЩЗ вміст Ki-67<sup>+</sup> тиреоцитів становив 0–6%, тобто помітна деяка тенденція до підвищення проліферативної активності клітин РЙРМ в порівнянні з РЙЧМ, що відображено на діаграмі розмаху (рис. 2). Це спостереження збігається з даними літератури про кореляцію високої експресії антигену Ki-67 з високим ризиком виникнення рецидивів та віддалених метастазів [9, 10], але потребує продовження досліджень.

Для статистичного порівняльного аналізу відсотка епітеліоцитів, які містять антиген Ki-67, між групами РЙРМ та загальною групою метастазів ПК і між РЙРМ та РЙЧМ застосували непараметричний ранговий критерій Манна — Уїтні. За його результатами не відхилено основну гіпотезу, тобто не визначено значимої відмінності між досліджуваними групами показників. Показано, що при рівні значимості 0,05 значення довірчої імовірності  $p=0,577181$  отримано при порівнянні відсотка Ki-67<sup>+</sup> клітин між РЙРМ та загальною популяцією метастазів ПК;



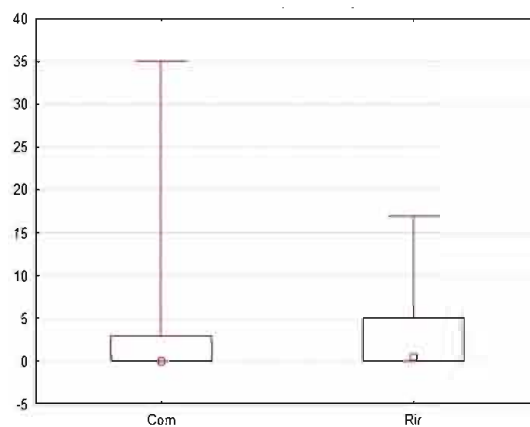


**Рис. 1.** Експресія антигену Ki-67 у клітинах пунктату РЙРМ ПК ЩЗ. Імуноцитохімічна реакція з мкАт до Ki-67, забарвлення ядер клітин гематоксилином. 36. × 400

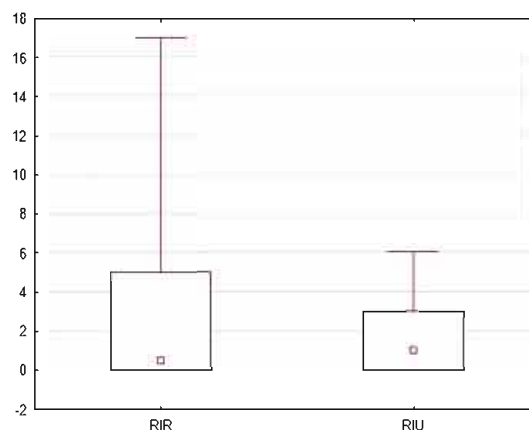
значення довірчої імовірності  $p=0,987160$  отримано при порівнянні відсотка проліферуючих клітин між РЙРМ та РЙЧМ (див. рис. 2; рис. 3).

Слід відмітити тенденцію до підвищення вмісту проліферуючих тиреоцитів у пунктатах метастазів рецидивуючих ПК з повторним метастазуванням. Якщо в пунктатах метастазів, які з'явилися вперше через деякий час після тиреоїдектомії та радіоїодотерапії, відсоток Ki-67<sup>+</sup> тиреоцитів не перевищував 2%, то в метастазах, які виникли повторно, він досягав 9–17%. Це свідчить про підвищення проліферативної активності клітин повторних метастазів ПК ЩЗ в порівнянні з первинними метастазами, та ці дані збігаються з даними літератури щодо асоціації проліферативної активності клітин із несприятливим прогнозом пухлин та схильністю до метастазування.

При детальному аналізі цитологічних картин РЙРМ з різним відсотком Ki-67<sup>+</sup> клітин у пунктатах виявляли високу експресію проліферуючих тиреоцитів як у випадках, коли цитологічна картина метастазу була представлена різними типами тиреоцитів з вираженою атипією клітин, так і у випадках, коли пунктат являв собою однорідну популяцію тиреоцитів без ознак атипії та поліморфізму. Тобто не було помічено чіткої кореляції між характером цитологічної картини метастазу та проліферативною активністю його клітин.



**Рис. 2.** Відсоток Ki-67<sup>+</sup> клітин (вісь ординат) в РЙРМ (Rir) та загальній популяції метастазів (COM)



**Рис. 3.** Відсоток Ki-67<sup>+</sup> клітин (вісь ординат) в РЙРМ (RIR) та РЙЧМ (RIU)

## ВИСНОВКИ

Показана відсутність статистично імовірної різниці в експресії антигену проліферуючих клітин Ki-67 між РЙРМ і загальною популяцією метастазів ПК ЩЗ та між групами РЙРМ і РЙЧМ папілярних тиреоїдних карцином, що демонструє незалежність розвитку радіоїодрезистентності від інтенсивності проліферативних процесів тиреоцитів метастазів ПК. Водночас відзначається тенденція до підвищення вмісту Ki-67<sup>+</sup> клітин у пунктатах повторних РЙРМ багаторазово метастазуючих ПК.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

- Haugen BR, Alexander EK, Bible KC, *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; 26 (1): 1–133.
- Pacini F, Ito Y, Luster M. Radioactive iodine-refractory differentiated thyroid cancer: unmet needs and future directions. *Expert Rev Endocrinol Metab* 2012; 7 (5): 541–4.
- Deandris D, Ghuzlan A, Leboulleux S, *et al.* Do histological, immunohistochemical, and metabolic (radioiodine and fluorodeoxyglucose uptakes) patterns of metastatic thyroid cancer correlate with patient outcome? *Endocr Relat Cancer* 2011; 1 (18): 159–69.
- Castro MR, Bergert ER, Goellner JR, *et al.* Immunohistochemical analysis of sodium iodide symporter expression in meta-

static differentiated thyroid cancer: correlation with radioiodine uptake. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; **86** (11): 5627–32.

5. Min JJ, Chung JK, Lee Y, *et al.* Relationship between expression of the sodium/iodide symporter and (131)I uptake in recurrent lesions of differentiated thyroid carcinoma. *Eur J Nucl Med* 2001; **28** (5): 639–45.

6. Xing M, Westra W, Tufano R, *et al.* BRAF mutation predicts a poorer clinical prognosis for papillary thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; **90** (12): 6373.

7. Zelinskaya A. The possibility of cytological diagnostics in preoperative prognosis of tumor behavior and the choice of adequate therapy. *Endocrinol* 2018; **23** (1): 47–53

8. Bozhok YuM, Tavokina LV, Epstein EV. The new things in diagnostic of thyroid cancer. Optimal combination of morphological and immunocytochemistry research methods of punctious materials. *Medicinal announcer (USA)* 1996; **138** (1): 40–3.

9. Yarmonenko SP. Radiobiology of Humans and Animals. M: Vysshaya shkola 1988. 424 p. (in Russian).

10. Schlüter C, Duchrow M, Wohlenberg C, *et al.* The cell proliferation-associated antigen of antibody Ki-67: a very large, ubiquitous nuclear protein with numerous repeated elements, representing a new kind of cell cycle-maintaining proteins. *J Cell Biol* 1993; **123** (3): 513–22.

11. Luporsi E, André F, Spyrtos F, *et al.* Ki-67: level of evidence and methodological considerations for its role in the clinical management of breast cancer: analytical and critical review. *Breast Cancer Res Treat* 2012; **132** (3): 895–915.

12. Berney D, Gopalan A, Kudahetti S, *et al.* Ki-67 and outcome in clinically localised prostate cancer: analysis of conservatively treated prostate cancer patients from the Trans-Atlantic Prostate Group study. *Br J Cancer* 2009; **100** (6): 888–93.

13. Miyauchi A, Kudo T, Hirokawa M, *et al.* Ki-67 labeling index is a predictor of postoperative persistent disease and cancer growth and a prognostic indicator in papillary thyroid carcinoma. *Eur Thyroid J* 2013; **2** (1): 57–64.

14. Ito Y, Miyauchi A, Kakudo K, *et al.* Prognostic significance of Ki-67 labeling index in papillary thyroid carcinoma. *World J Surg* 2010; **34** (12): 3015–21.

#### INVESTIGATION OF PROLIFERATIVE ACTIVITY OF CELLS OF RADIOIODINE RESISTANT THYROID PAPILLARY CANCER METASTASES

A. V. Zelinska

SI «V.P. Komisarenko Institute of Endocrinology and Metabolism, NAMS of Ukraine», Kyiv, Ukraine

**Summary. Objective:** comparative studies of the expression of marker of cells' proliferative activity (the antigen of Ki-67) in punctates of radioiodine-resistant (RIRM),

radioiodine-sensitive metastases (RISM) and the general group of papillary thyroid carcinoma metastases. **Object and methods:** cytomorphological and immunocytochemical studies using monoclonal antibody against antigen Ki-67 (MIB-1) were performed on the material of fine needle aspiration biopsy of papillary thyroid carcinomas metastases: 29 — were detected before surgery, 38 — were detected in the postoperative period (27 — RIRM, 11 — RISM); as well as on punctates of 4 medullary carcinomas, 10 papillary carcinomas (PC) and 10 nodular goiters. **Results:** the technique of immunocytochemical determination of cells proliferative activity marker in punctates, painted according to the Romanovsky method, was worked out. The highest percentage of Ki-67-positive cells was observed in punctates of medullary carcinoma (7–10%), the diffuse-sclerosing variant of PC (7–12%) and PC associated with autoimmune thyroiditis (6–35%). Based on the results of the Mann — Whitney criterion, significant difference between RIRM and the general population of PC metastases, and between RIRM and RISM of papillary thyroid carcinoma wasn't detected. There was a tendency to increase the content of Ki-67-positive cells in punctates of repeated RIRM of recurrent PC. **Conclusion:** the absence of statistically significant difference in expression of Ki-67 between the studied groups of papillary thyroid carcinoma metastases was demonstrated. This indicates the independence of radioiodine accumulation capacity from the intensity of the proliferative processes of thyrocytes of papillary metastases. There is a tendency to increase the content of Ki-67-positive cells in punctates of repeated RIRM of recurrent PC.

**Key Words:** papillary thyroid carcinoma, fine-needle-aspiration puncture biopsy, punctate, radioiodine-resistant metastases, proliferative activity, Ki-67.

Адреса для листування:

Зелінська Г.В.

04114, Київ, вул. Вишгородська, 69

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

E-mail: Ann.zelinskaya@ukr.net

Одержано: 15.03.2019