

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, радіоїодрезистентні метастази, цитокератин 17, тиреоїдна пероксидаза, передопераційне прогнозування.

## ЦИТОКЕРАТИН 17 І ТИРЕОЇДНА ПЕРОКСИДАЗА В ЯКОСТІ ІМУНОЦИТОХІМІЧНИХ МАРКЕРІВ ДООПЕРАЦІЙНОГО ПРОГНОЗУВАННЯ РАДІОЇОДРЕЗИСТЕНТНОСТІ ТА ЕФЕКТИВНОСТІ РАДІОЇОДТЕРАПІЇ ПАПІЛЯРНОГО РАКУ ЩИТОПОДІБНОЇ ЗАЛОЗИ

**Мета:** дослідження експресії тиреоїдної пероксидази та цитокератину 17 (ЦК17) у клітинах папілярних карцином (ПК) щитоподібної залози (ЩЗ) і їх метастазів та оцінка можливості використання цих антигенів для прогнозування радіоїодрезистентності пухлин. **Об'єкт і методи:** імуноцитохімічні дослідження з використанням МкАТ до тиреоїдної пероксидази та ЦК17 проводили на матеріалі тонкогolkових аспіраційних пункційних біопсій 32 первинних ПК ЩЗ та 103 метастазів, виявлених у післяопераційний період (79 — радіоїодрезистентні, 24 — радіоїодчутливі) у пацієнтів обох статей віком 8–40 років. **Результати:** на основі проведеного дослідження було показано існування залежності між вмістом клітин, які експресують ЦК17, у пунктатах первинних ПК та ефективністю радіоїодтерапії. Для пацієнтів, у клітинах пунктатів ПК яких вміст тиреоцитів з ЦК17 становив менше 5%, проведення радіоїодтерапії було ефективним. У більшій частині хворих (70%) з наявністю цього антигену більше ніж в 5% тиреоцитів спостерігався розвиток радіоїодрезистентних метастазів. Таким чином, ЦК17 може бути використаний як цитологічний маркер раннього доопераційного прогнозування радіоїодрезистентності з вірогідністю 70%. Це дозволяє виділити групу ризику хворих на папілярний рак ЩЗ з високою вірогідністю появи радіоїодрезистентних метастазів та більш ретельно ставитися до спостереження за ними, навіть при отриманні радіоїоднегативних скенограм. Для прогнозування радіоїодрезистентності метастазів папілярного тиреоїдного раку, які виникли в післяопераційний період, запропоновано імуноцитохімічне визначення експресії тиреоїдної пероксидази. При відсутності або незначній експресії цього антигену прогнозується неефективність радіоїодтерапії, радіоїодрезистентність метастазу та необхідність його хірургічного видалення. Якщо вміст пухлинних клітин, які містять тиреоїдну пероксидазу, перевищує 77,5%, прогнозується можливість проведення успішної радіоїодтерапії. **Висновки:** виявлення за допомогою імуноцитохімічних методів маркерів ЦК17 та тиреоїдної пероксидази в клітинах пункційного матеріалу пухлини та її метастазів може бути використане для доопераційного моніторингу радіоїодрезистентних метастазів ПК ЩЗ; дозволить досить точно прогнозувати радіоїодрезистентність та

обирати правильну тактику лікування (радіоїодтерапії або хірургічне видалення метастазів).

Незважаючи на переважно ефективне лікування хворих на папілярну карциному (ПК) щитоподібної залози (ЩЗ) за допомогою радіоїоду, в низці випадків виявляють метастази навіть після проведення тиреоїдектомії та наступної радіоїодтерапії. Найбільшою проблемою є діагностика і лікування радіоїодрезистентних метастазів (РЙРМ), клітини

яких втрачають здатність до накопичення радіоїоду і радіоїодтерапія для них стає неефективною [1–3].

Стандартним способом діагностики РЙРМ високодиференційованого раку ЩЗ є визначення рівня тиреоглобуліну з ультразвуковим дослідженням та сцинтиграфією з радіофармпрепаратом Тс-МІВІ [4]. Запізнення у виявленні метастазів різко погіршує показники виживаності хворих на рак ЩЗ [5]. Тому актуальним є питан-

ня раннього доопераційного прогнозування розвитку РЙРМ ПК ЩЗ та прогнозування статусу щодо накопичення радіоїоду метастазами, виявленими у післяопераційний період. Останнім часом дослідники приділяють усе більше уваги розробці методів прогнозування поведінки тиреоїдної карциноми, вивчаючи морфологічні, імуноцитохімічні та навіть молекулярні особливості клітин ПК ЩЗ [6–9]. Але в доступній літературі не знайдено даних щодо цитологічних досліджень РЙРМ папілярного раку ЩЗ та методів їх доопераційного прогнозування, що спонукає до проведення наступних досліджень.

Метою даної роботи були дослідження експресії тиреоїдної пероксидази та цитокератину 17 (ЦК17) у клітинах ПК ЩЗ і їх метастазів та оцінка можливості використання цих антигенів для прогнозування радіоїодрезистентності пухлин.

### ОБ'ЄКТ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

У дослідженнях використовували матеріал тонкогілкових аспіраційних пункційних біопсій 32 первинних ПК та 103 метастазів, виявлених у післяопераційний період після проведення тиреоїдектомії та радіоїодтерапії (79 — радіоїодрезистентні, 24 — радіоїодчутливі) у пацієнтів обох статей віком 8–40 років, що проходили обстеження, хірургічне лікування та радіоїодтерапію в клініці ДУ «Інститут ендокринології та обміну речовин ім. В.П. Комісаренка НАМН України». Усі пацієнти були проінформовані та дали згоду на використання їх біологічного матеріалу для проведення досліджень. В імуноцитохімічних дослідженнях використовували матеріал пунктів, фіксованих метанолом та забарвлених за методом Романовського [10]. Проводили імуноцитохімічні реакції виявлення антигенів непрямим імунопероксидазним методом за допомогою МкАТ миші проти тиреоїдної пероксидази (ТРО-47, DakoCytomation, Данія) та ЦК17 — клон Е3 (DakoCytomation, Данія). У другому шарі використовували антитіла проти гамма-глобулінів миші, мічені пероксидазою хрому (DakoCytomation, Данія). Після проведення імуноцитохімічної реакції ядра клітин дофарбовували розчином гематоксиліну.

Статистичне опрацювання даних робили за непараметричним методом Колмогорова — Смирнова, Манна — Уїтні та методом кореляційного аналізу. Розрахунки виконано в пакеті Statistica 11.0.

### РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Наші попередні дослідження показали, що малігнізація фолікулярного епітелію ЩЗ супроводжується значним збільшенням експресії одного з білків цитоскелета епітеліальних клітин — ЦК17 (при дослідженні гістологічних зрізів доброякісних новоутворень — в середньому 0,39%, злаякісних — 30,85%) [11]. Особливістю позитивних за ЦК17 клітин є відсутність у них

антигенів, причетних до зв'язування тиреоцитами радіоїоду (більшість не містить тиреоглобуліну, не визначається ТП) [12, 13]. Тому можна очікувати, що ЦК17-позитивні (ЦК17<sup>+</sup>) клітини можуть бути одним із джерел РЙРМ. Важливо також встановити, чи буде ефективність радіоїодтерапії відрізнятися для ПК з різним вмістом клітин з ЦК17.

Пацієнти, прооперовані з приводу папілярного раку ЩЗ, які проходили обстеження та лікування за допомогою радіоїоду, були розподілені на дві групи залежно від ефективності радіоїодтерапії. До першої групи включено 14 пацієнтів, які отримали лише одну лікувальну дозу радіоїоду та протягом 5–10 років спостереження не мали рецидивів раку ЩЗ. До другої групи увійшли 18 пацієнтів, котрі отримали від 2 до 7 лікувальних курсів радіоїодтерапії та у яких було виявлено поодинокі або численні метастази ПК ЩЗ у лімфатичні вузли ший, легені, середостіння.

У результаті проведених досліджень виявилось, що в пунктатах первинної ПК пацієнтів першої групи у 71% випадків (10/14) не було знайдено клітин з ЦК17. У пунктатах 29% пацієнтів цієї групи (4/14) ЦК17<sup>+</sup> клітини становили лише 1–4,7% від загальної популяції тиреоцитів пунктату. У пунктатах пацієнтів другої групи відсоток ЦК17<sup>+</sup> клітин був значно вищим (5–100% тиреоцитів пунктату у 67% хворих).

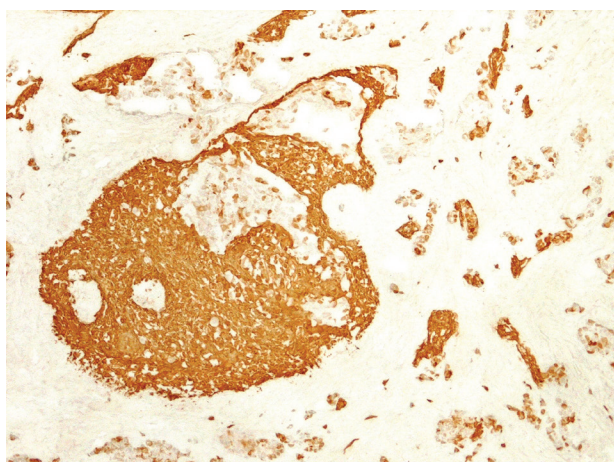
У пацієнтів другої групи, у пунктатах первинної ПК яких вміст ЦК17<sup>+</sup> клітин був найвищим і становив 55–100%, відмічали розвиток численних метастазів ПК ЩЗ, які не піддавалися лікуванню радіоїодом та були видалені хірургічним шляхом. Важливо відмітити, що всі вони мали дифузно-склерозуючий варіант ПК ЩЗ, майже всі епітеліальні клітини якої містили ЦК17 (рис. 1).

Математична обробка за методом Колмогорова — Смирнова та Манна — Уїтні показала, що різниця за відсотком ЦК17<sup>+</sup> клітин у пунктатах ПК ЩЗ між двома групами пацієнтів із різною ефективністю радіоїодтерапії є статистично підтвердженою ( $p < 0,05$ ) (рис. 2).

Таким чином, ЦК17 може бути використаний на ранньому доопераційному етапі як цитологічний маркер прогнозування радіоїодрезистентності з вірогідністю 70%, що перевищує подібний показник для натрій-йодного симпортера (sodium-iodine symporter — NIS) [9]. Прогнозування радіоїодрезистентності ПК має важливе клінічне значення для вибору подальшої тактики лікування. Метод дозволяє виділити групу ризику пацієнтів з високою вірогідністю появи РЙРМ та більш ретельно спостерігати за ними. Тобто навіть при отриманні радіоїоднегативних сканограм у таких пацієнтів варто враховувати можливість наявності «мовчазних» РЙРМ, які можуть бути візуалізовані за допомогою таких додаткових методів дослідження, як рентген, ультразвукове дослідження, FDG-ПЕТ-діагностика.

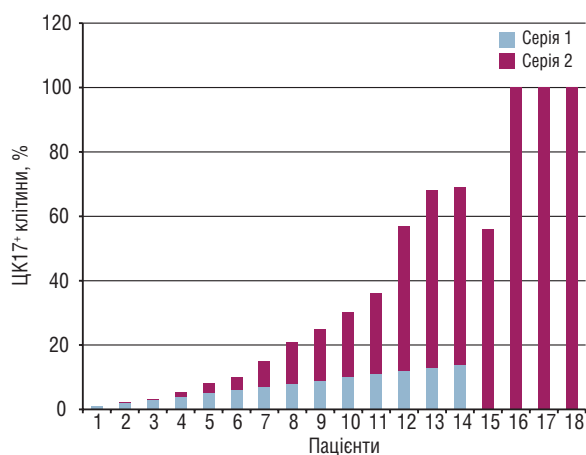


а



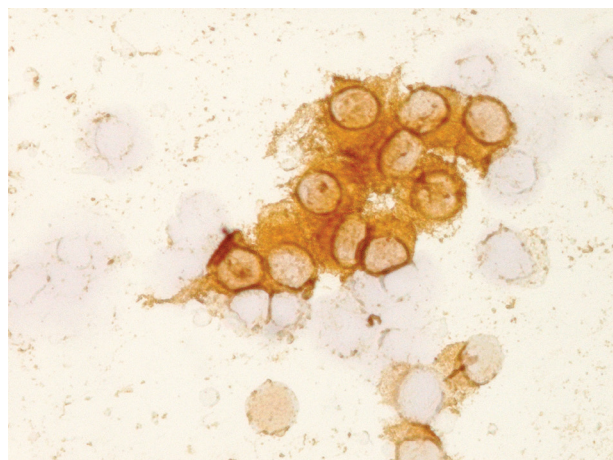
б

**Рис. 1.** Епітеліальні ЦК17<sup>+</sup> клітини в пунктаті (а) та на гістологічному зрізі (б) первинної ПК ЩЗ. Імуноцитохімічна реакція з антитілами до ЦК17. 36. × 40

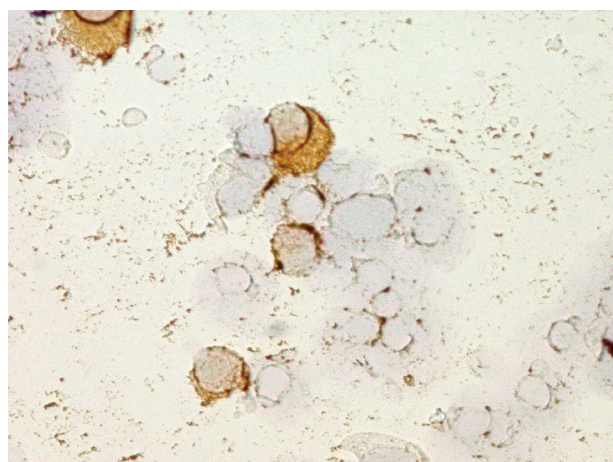


**Рис. 2.** Вміст ЦК17<sup>+</sup> клітин в пунктатах первинних ПК ЩЗ пацієнтів з високою (серія 1) та низькою (серія 2) ефективністю радіоїодтерапії

Враховуючи значний ризик агресії ПК із високою експресією ЦК17, ця інформація може сприяти рішення хірургів про розширення обсягу первинного оперативного втручання до тиреоїдектомії (навіть у випадках мікрокарцином) та проведення профілактичної дисекції лімфатичних колекторів серединного відсіку ший.



а



б

**Рис. 3.** Експресія тиреоїдної пероксидази в клітинах пунктатів РЙЧМ (а) та РЙРМ (б). Імуноцитохімічна реакція з антитілами до ТРО. 36. × 40

У післяопераційний період, навіть після проведення тиреоїдектомії та наступної радіоїодтерапії, у пацієнтів можуть з'являтися як РЙРМ, для яких радіоїодтерапія є неефективною, так і метастази, що накопичують радіоїод та можуть бути успішно вилікувані за його допомогою.

Імуноцитохімічне дослідження експресії тиреоїдної пероксидази (thyroid peroxidase — ТРО) в пунктатах метастазів, виявлених у післяопераційний період, дозволило встановити статистично достовірну різницю між радіоїодрезистентними та радіоїодчутливими метастазами (РЙЧМ) ПК ЩЗ за відсотком клітин, що реагують з антитілами до ТРО (рис. 3).

У відповідності з непараметричним критерієм Манна — Уїтні підтверджено альтернативну гіпотезу про наявні значущі відмінності (рівні значущості 0,05 та 0,001) між показниками двох груп ( $p = 0,000000$ ). У 77,5% пунктатів метастазів, які накопичували радіоїод, виявлено високий рівень експресії ТРО (імунопозитивні тиреоцити становили від 65 до 100%). У 3 пунктатах (12,5%) імунопозитивні клітини становили 30–46%. У групі РЙРМ, навпаки, в 83% випадків експресія ТРО була

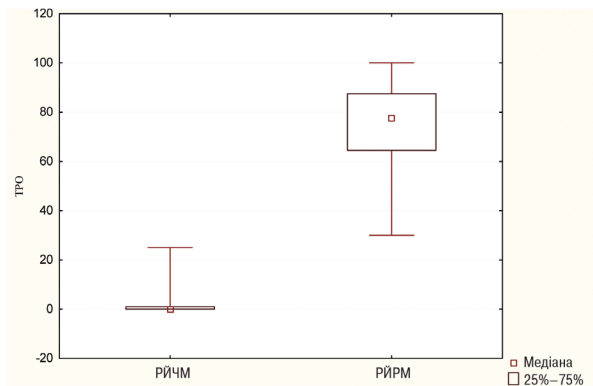


Рис. 4. Розподіл РІРМ та РІЧМ за показником ТРО<sup>+</sup> клітин (%)

відсутня, а в 17% випадків — імунопозитивні тиреоцити становили лише 6–22% загальної кількості клітин (рис. 4).

Якщо група РІРМ була однорідною за відсотком ТРО<sup>+</sup> клітин, то в групі РІЧМ відмічали гетерогенність за дослідженим показником (30–100% ТРО<sup>+</sup> клітин). У групі РІЧМ ефективність радіоїодтерапії у пацієнтів з різним відсотком ТРО<sup>+</sup> клітин була різною, незважаючи на те, що всі метастази накопичували радіоїод. Так, для 87,5% пацієнтів радіоїодтерапія була успішною, нові метастази не з'являлися (вміст ТРО<sup>+</sup> клітин у пунктах метастазів перевищував 50%). Водночас у 12,5% пацієнтів цієї групи клітини метастазів з часом втрачали здатність накопичувати радіоїод, тобто розвивалася вторинна радіоїодрезистентність, і такі метастази були видалені хірургічно (вміст ТРО<sup>+</sup> клітин у пунктах — від 30,0 до 46,0%). Це демонструє, що наявність 30,0–46,0% клітин з експресією ТРО хоча й зумовлює помірне накопичення радіоїоду, але може не бути достатньою умовою для успішної радіоїодтерапії. Пояснити різну ефективність радіоїодтерапії для групи, гетерогенної за відсотком ТРО<sup>+</sup> клітин у пунктах метастазів, можна, враховуючи існування явища фенотипічної гетерогенності популяції тиреоцитів метастазу. Вірогідно, невеликий відсоток ТРО<sup>+</sup> клітин знищується за допомогою радіоїоду, а ТРО<sup>-</sup> клітини стають субстратом для розвитку вторинної радіоїодрезистентності та прогресії метастазу.

Аналіз діаграми (див. рис. 4) демонструє, що медіана відсотка ТРО<sup>+</sup> клітин для групи РІРМ становить 0,0%, а для групи РІЧМ — 77,5%. Значення медіани можна використовувати в якості граничного відсотка ТРО<sup>+</sup> клітин, перевищення якого однозначно вказує на радіоїодчутливість досліджуваного метастазу. Водночас відсутність клітин з експресією ТРО однозначно свідчить про радіоїодрезистентність метастазу. Отже, у результаті проведених досліджень вперше був розроблений спосіб передопераційного прогнозування радіоїодрезистентності метастазів ПК ЩЗ на основі імуноцитохімічного визначення

експресії ТРО у клітинах пунктатів метастазів. При відсутності експресії ТРО прогнозується радіоїодрезистентність метастазу, неефективність радіоїодтерапії та необхідність його хірургічного видалення. Якщо частка пухлинних клітин, які містять ТРО, перевищує 77,5% (значення медіани), прогнозується можливість проведення успішної радіоїодтерапії. Такий простий, достатньо швидкий і зручний спосіб прогнозування радіоїодрезистентності папілярного тиреоїдного раку та ефективності радіоїодтерапії був запатентований та використовується в практичній діяльності нашого інституту [14].

Проведені дослідження продемонстрували, що у випадках, коли вміст ТРО<sup>+</sup> клітин у пунктах метастазів становить 30,0–46,0%, необхідно враховувати можливість розвитку вторинної радіоїодрезистентності метастазів, які попередньо накопичували радіоїод, та неефективність і недоцільність подальшого проведення 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 проведення радіоїодтерапії визначаються персистентні локально-регіонарні метастази. Таким чином, простий метод визначення ТРО у клітинах пунктатів виявлених у післяопераційний період метастазів дозволяє передбачити ефективність радіоїодтерапії та доцільність її подальшого проведення, а також необхідність виконання дисекції шиї у пацієнтів із РІРМ. На думку клініцистів, цитологічне дослідження лімфогенних метастазів із визначенням маркерів йодрезистентності є мінімально травматичним та дозволяє коригувати програму лікування [14].

## ВИСНОВКИ

1. Виявлення за допомогою імуноцитохімічних методів маркерів ЦК17 та ТРО у клітинах пункційного матеріалу пухлини та її метастазів може бути використане для доопераційного моніторингу РІРМ ПК ЩЗ; дозволить досить точно прогнозувати радіоїодрезистентність та обирати правильну тактику лікування (радіоїодтерапія або хірургічне видалення метастазів).

2. Розвиток радіоїодрезистентності можна прогнозувати, якщо відсоток ЦК17<sup>+</sup> клітин перевищує 5% у пунктах первинних ПК ЩЗ. Для пацієнтів, у клітинах пунктатів ПК яких вміст тиреоцитів з ЦК17 становив менше 5%, проведення радіоїодтерапії було ефективним.

3. Для прогнозування радіоїодрезистентності метастазів папілярного тиреоїдного раку, які виникли в післяопераційний період, запропоновано імуноцитохімічне визначення експресії ТРО. Можливість проведення успішної радіоїодтерапії

прогнозується при наявності в пунктатах 77,5% і більше ТРО<sup>+</sup> клітин.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Bryan R, Haugen BR, Alexander EK, *et al.* 2015 American thyroid association management guidelines for adult patients with thyroid nodules and differentiated thyroid cancer: the american thyroid association guidelines task force on thyroid nodules and differentiated thyroid cancer. *Thyroid* 2016; **26** (1): 1–133.
2. Pacini F, Yasuhiro I, Markus L. Radioactive iodine-refractory differentiated thyroid cancer: unmet needs and future directions. *Expert Rev Endocrin Metab* 2012; **7** (5): 541–4.
3. Pfister DG, Fagin JA. Refractory thyroid cancer: a paradigm shift in treatment is not far off. *J Clin Oncol* 2008; **26** (29): 4701–4.
4. Rubello D, Mazarrotto R, Casara D, *et al.* The role of technetium-99m-methoxyisobutylisonitrile scintigraphy in the planning therapy and follow-up of patient with differentiated thyroid carcinoma after surgery. *Eur J Nucl Med*; 2000; **7** (4): 431–40.
5. Epstein EB, Oleinik VA, Sovenko TC. Treatment of differentiated thyroid cancer. *Promeneva diahnozyka, promeneva terapiya* 2000; (1): 53–4 (in Russian).
7. Ricorde-Filho JC, Ryder M, Chitale DA, *et al.* Mutational profile of advanced primary and metastatic radioactive iodine-refractory thyroid cancers reveals distinct pathogenetic roles for BRAF, PIK3CA, and AKT1. *Cancer Res* 2009; **69** (1): 4885.
8. 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* 2011; **1** (18): 159–69.
9. Xing M, Westra WH, Tufano RP, *et al.* BRAF mutation predicts a poorer clinical prognosis for papillary thyroid cancer. *J Clin Endocrin Metab* 2005; **90** (12): 6373.
10. Min JJ, Chung JK, Lee YJ, *et al.* Relationship between expression of the sodium/iodide symporter and <sup>131</sup>I uptake in recurrent lesions of differentiated thyroid carcinoma. *Eur J Nucl Med* 2001; **28** (5): 639–45.
11. Bozhok YM, Tavokina LV, Epstein EV. The new things in diagnostic of thyroid cancer. Optimal combination of morphological and immunocytochemistry research methods of punctious materials. *Med Announcer (USA)* 1996; **138** (1): 40–3.
14. Zelinskaya AV, Bozhok YuM. The use of immunocytochemical detection of cytokeratin N17 determinants in the preoperative cytological diagnosis of thyroid malignant tumors. *Oncology* 2000; **2** (1–2): 56–60 (in Russian).
17. Dunn JT, Dunn AD. Update on intrathyroidal iodine metabolism. *Thyroid* 2001; **11** (5): 407–17.
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. Zelinska HV. Method for prediction of effectiveness of radioiodine therapy of post-operative metastases of papillary cancer of thyroid gland (Pat. № 86375). Publ. 25.12.2013 UA. Bul. № 24 (in Ukrainian).
21. Method recommendations Leadership of the American Thyroid Association 2015: Edited by AE Kovalenko, MI Bobrik. Kiev 2016. 62 p. (in Russian).

## CYTOKERATIN 17 AND THYROID PEROXIDASE AS IMMUNOCYTOCHEMICAL MARKERS FOR REOPERATIVE PREDICTION OF RADIOIODINE RESISTANCE AND THE EFFECTIVENESS OF RADIOIODINE THERAPY OF PAPILLARY THYROID CARCINOMA

A. V. Zelinskaya

SI «V.P. Komisarenko Institute of Endocrinology and Metabolism of Academy of Medical Science of Ukraine», Kyiv, Ukraine

**Summary. Objective:** immunocytochemical studies of the expression of thyroid peroxidase and cytokeratin 17 in thyroid papillary carcinomas and their metastases in order to determine the correlation between the expression of these antigens and the radioiodine resistance of papillary carcinoma. **Object and methods:** immunocytochemical studies with using monoclonal antibody against cytokeratin 17, thyroid peroxidase of the epithelium were performed on the material of Fine Needle Aspiration Biopsy of 32 papillary thyroid carcinomas and their metastases detected in the postoperative period (79 — radioiodine-resistant metastases, 24 — radioiodine-sensitive metastases) in patients of both sexes aged 8–40 years. **Results:** it was shown the correlation between the content of the cytokeratin 17-positive cells in the punctates of primary papillary carcinoma and the efficacy of radioiodine therapy for them. When the percentage of cells with cytokeratin 17 in punctates exceeded 5%, radio-resistant metastases were developed in 70% of cases. Thus, cytokeratin 17 can be used as a cytologic marker of preoperative prediction of radioactivity with a 70% concurrence, which will provide a similar indicator for natrium-iodine symporter protein and increase the level of early preoperative testing. This allows to identify the risk group of patients with papillary thyroid cancer with a high probability of occurrence of radioiodine-resistant metastases and more closely to observe them, even when receiving radiiodide negative scenograms. To predict the radioiodine resistance of papillary thyroid cancer metastases that arose in the postoperative period, immunocytochemical determination of the expression of thyroid peroxidase was proposed. In the absence or insignificant expression of this antigen, the ineffectiveness of radioiodine therapy, the radioiodine resistance of the metastasis and the need for its surgical removal are projected. If the content of tumor cells containing thyroid peroxidase exceeds 77.5%, the possibility of successful radioiodine therapy is predicted. **Conclusions:** detection by immunocytochemical methods of markers of cytokeratin 17 and thyroid peroxidase in tumor puncture cells and its metastases can be used for preoperative monitoring of radioiodine resistant metastases of papillary carcinoma thyroid gland; and will allow accurately predict radioiodine resistance and choose the right treatment tactics (radioiodine therapy or surgical removal of metastases).

**Key Words:** papillary thyroid carcinoma, fine-needle aspiration puncture biopsy, radioiodine resistant metastasis, cytokeratin 17, thyroid peroxidase, preoperative prognosis.

Адреса для листування: