

А.В. Зелинская

Ю.М. Божок

Институт эндокринологии
и обмена веществ
им. В.П. Комиссаренко
АМН Украины, Киев,
Украина

Ключевые слова: щитовидная
железа, рак, цитологическая
диагностика, цитокератин N17.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ИММУНОЦИТОХИМИЧЕСКОГО ВЫЯВЛЕНИЯ ДЕТЕРМИНАНТ ЦИТОКЕРАТИНА N17 В ДООПЕРАЦИОННОЙ ЦИТОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКЕ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ НОВООБРАЗОВАНИЙ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Резюме. В работе показана принципиальная возможность выявления в пунктатах новообразований щитовидной железы детерминант цитокератина N17 и использования его для дифференциальной цитологической диагностики аденом и папиллярных карцином. Для этого фолликулярный эпителий пунктатов исследовали при помощи моноклональных антител E3 и подсчитывали процентное содержание клеток, реагирующих с ними. Для повышения точности подсчетов и исключения из них неэпителиальных клеток иммуноцитохимические реакции производили после морфологического исследования пунктатов. Различие между аденомами и карциномами в процентном содержании клеток, экспрессирующих цитокератин N17, оказалось статистически достоверным. Показано, что только в пунктатах папиллярных карцином содержание клеток, связывающих антитела E3, превышает 1%. Определение цитокератина N17 может быть использовано для дифференциальной диагностики опухолевых процессов, возникающих из фолликулярного эпителия.

ВВЕДЕНИЕ

Своевременная и точная диагностика тиреоидных новообразований в настоящее время приобрела особую актуальность в связи с резким увеличением заболеваемости раком щитовидной железы после аварии на Чернобыльской АЭС [1]. На сегодняшний день наиболее эффективным методом дооперационной диагностики карцином щитовидной железы является тонкоигольная аспирационная пункционная биопсия (ТАПБ) с последующим цитологическим исследованием полученного материала [2]. Однако цитолог, в отличие от гистолога, не имеет возможности наблюдать такие признаки злокачественности, как инвазивный рост, прорастание капсулы или кровеносных сосудов. В пункционном материале присутствуют лишь разрозненные клетки или фрагменты эпителия, поэтому цитолог довольствуется косвенными морфологическими признаками злокачественности, что снижает точность диагноза. В связи с этим некоторые авторы предложили использовать цитохимические и иммуноцитохимические маркеры малигнизации фолликулярного эпителия. Среди них чаще всего упоминаются йодпероксидаза, дипептидиламино-

пептидаза, выявление антигена CA50 [3–5]. Использование йодпероксидазы в качестве маркера малигнизации основывается на значительном снижении ее содержания в папиллярных карциномах щитовидной железы [3]. Ферментативная активность дипептидиламинопептидазы, напротив, резко возрастает в этих злокачественных новообразованиях [4]. Однако оба маркера имеют существенные недостатки. Во-первых, определение злокачественности основывается на подсчете процента клеток, содержащих или не содержащих соответствующий маркер. В то же время технология выявления этих маркеров исключает предварительную морфологическую идентификацию учитываемых клеток, хотя известно, что в пунктатах новообразований щитовидной железы неэпителиальные элементы (например, макрофаги) могут составлять до половины всех клеточных элементов. Во-вторых, оба маркера обнаруживаются и в ряде доброкачественных новообразований (при использовании йодпероксидазы 22% микрофолликулярных и 50% атипичных аденом не отличаются по ее содержанию от многих карцином [3], а высокая активность дипептидиламинопептидазы выявляется по крайней мере в 15%

аденом [6]). Те же недостатки присущи и методам выявления антигена СА-50.

В последние годы особое внимание уделяется изучению распределения в тканях щитовидной железы большой группы белков промежуточных филаментов эпителиальных клеток — цитокератинов. Их спектр существенно изменяется в процессе дифференцировки и дедифференцировки [7]. Имеются сообщения о высоком содержании цитокератина N19 в большинстве случаев (около 70%) при папиллярной карциноме, хотя такой же уровень экспрессии этого белка наблюдался в 9% случаев при узловом зобе. Фолликулярные аденомы и карциномы неотличимы по данному показателю [8].

В предыдущей работе мы изучали распределение цитокератина N17 на гистологических срезах различных доброкачественных и злокачественных новообразований щитовидной железы человека с помощью моноклональных антител (МКАТ) Е3, полученных С.М. Трояновским и соавторами [9]. Различия в процентном содержании эпителиальных клеток, связывающих МКАТ Е3, между аденомами и карциномами оказались статистически достоверными. В данной работе мы попытались выяснить возможность выявления детерминант цитокератина N17 на цитологических препаратах пунктатов щитовидной железы и применения метода в дооперационной дифференциальной цитологической диагностике папиллярной карциномы щитовидной железы.

ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе использовали материал, полученный при проведении ТАПБ новообразований щитовидной железы у 61 пациента обоего пола в возрасте от 8 до 72 лет. Послеоперационный гистологический диагноз карциномы щитовидной железы установлен у 41 пациента (папиллярная карцинома — у 38, низкодифференцированный рак — у 3). У остальных 20 пациентов обнаружены доброкачественные новообразования щитовидной железы (аденома — у 15, узловой зоб — у 5).

Иммуноцитохимическое выявление детерминант цитокератина N17 проводили на цитологических препаратах пунктионного материала, до этого фиксированных метанолом (5 мин) и окрашенных по методу Май—Грюнвальд—Гимзы (MGG). Такой прием позволял получить объективное представление о составе исследуемой клеточной популяции перед проведением иммуноцитохимических реакций. Поскольку окраска по MGG блокирует на препарате многие антигенные детерминанты, восстановление их реакционной способности проводили по описанной ранее методике [10]. Для этого препарат обрабатывали 0,01% раствором трипсина в течение 10 с, затем промывали в фосфатно-солевом буфере (рН 7,4) (PBS), после чего экстрагировали красители 5% раствором уксусной кислоты. Активность эндо-

генной пероксидазы подавляли инкубацией в 1% растворе H_2O_2 на PBS. Цитокератин N17 выявляли непрямой иммунопероксидазным методом с помощью антител Anti-Cytokeratin Peptide 17 клонна Е3 (Sigma, США). В качестве вторых антител использовали меченные пероксидазой антитела против α -глобулинов мыши (Dakopatts, Дания) с 10% сывороткой крови человека группы АВ(IV) для подавления неспецифического связывания. Ядра клеток докрасивали гематоксилином. На отдельных участках тех же препаратов одновременно ставили соответствующие положительные и отрицательные контроли, а также выявляли цитокератины антителами Anti-Pan Cytokeratin (Sigma, США) для исключения технологических ошибок при отрицательной реакции с МКАТ Е3. В полученных препаратах определяли процентное содержание клеток, связывающих МКАТ Е3, в фолликулярном эпителии опухоли, подсчитывая не менее 1000 эпителиальных клеток в мазке. Статистическую обработку данных производили по непараметрическому методу Колмогорова — Смирнова.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенные исследования показали, что на препаратах, обработанных описанным выше методом, детерминанты цитокератина N17 выявляли в значительной части эпителиальных клеток пунктатов большинства папиллярных карцином (рис. 1). При этом МКАТ Е3 гомогенно окрашивали цитоплазму либо выявляли в ней характерные для цитокератинов волокнистые структуры. В ядрах клеток реакция не наблюдалась.

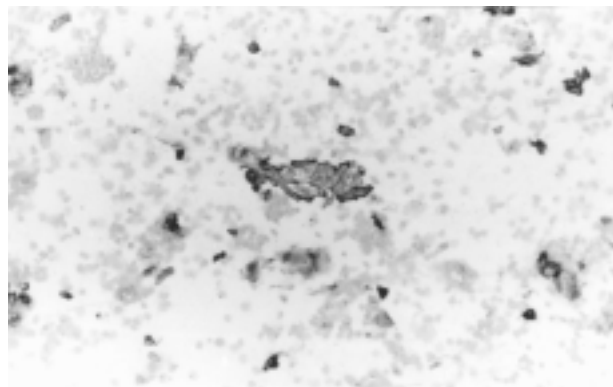


Рис. 1. Пунктат папиллярной карциномы щитовидной железы. Непрямая иммунопероксидазная реакция с МКАТ Е3. Ядра клеток докрасивены гематоксилином. Об. 10, ок. 5

Клетки, реагирующие с МКАТ Е3, располагались на препаратах пунктатов карциномы изолированно или были включены в состав эпителиальных пластов и комплексов, чаще всего группами (рис. 2). В пределах одного пласта или комплекса клетки, реагирующие и не реагирующие с МКАТ Е3, не отличались по морфологическим признакам. То же отмечалось нами ранее на гистологических срезах опухолей [10]. Однако

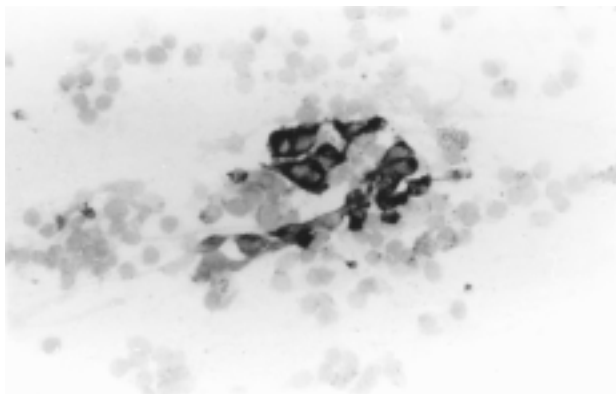


Рис. 2. Клетки, реагирующие с МКАТ Е3, в комплексах эпителиальных клеток папиллярной карциномы щитовидной железы. Непрямая иммунопероксидазная реакция. Ядра докрашены гематоксилином. Об. 20, ок. 5

в пунктатах карциномы с высоким уровнем экспрессии цитокератина N17 в общей популяции клеток фолликулярного эпителия можно было заметить наличие двух клеточных типов (рис. 3). Клетки 1-го типа формировали типичные эпителиальные пласты, были немного увеличены в размерах. Умеренно-базофильная цитоплазма таких клеток на цитологических препаратах часто не имела четких границ. В клетках 1-го типа цитокератин N17 выявлялся редко. Клетки 2-го типа были гораздо крупнее клеток нормального фолликулярного эпителия и резко отличались от него морфологически. В мазках пункционного материала эти клетки располагались изолированно или в виде неправильных комплексов, часто имели округлую форму и четкие клеточные границы. Цитоплазма таких клеток обладала выраженной базофилией, крупные овальные ядра располагались эксцентрично. Значительная часть клеток 2-го типа экспрессировала цитокератин N17.

В случаях диффузно-склерозирующего рака клетки, содержащие детерминанты цитокератина N17, имели вакуолизированную цитоплазму и составляли большую часть характерных для пунктатов этой карциномы клеточных комплексов, окружающих мелкие сферические кальцификаты, либо небольшие псаммомные тельца.

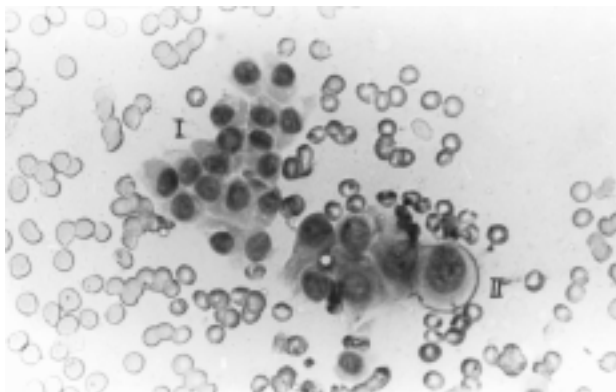


Рис. 3. Клетки 1-го (I) и 2-го типа (II) в пунктате карциномы с высоким уровнем экспрессии цитокератина N17. Окраска по MGG. Об. 40, ок. 5

В пунктатах карцином, в эпителии которых цитокератин N17 не был обнаружен, все эпителиальные клетки были сходны с клетками 1-го типа.

При подсчетах числа клеток, экспрессирующих цитокератин N17, выявились существенные различия между доброкачественными и злокачественными новообразованиями (рис. 4). В пунктатах аденоматозных узлов щитовидной железы клетки, связывающие МКАТ Е3, отсутствовали в 17 из 20 случаев. В 3 случаях их содержание не превышало 0,25% клеток фолликулярного эпителия. В то же время в пунктатах злокачественных новообразований клетки, содержащие детерминанты цитокератина N17, отсутствовали лишь в 4 случаях из 41 наблюдения. В 31 случае их содержание превышало 0,25%, а в 26 — составляло от 1,5 до 55% всех эпителиальных клеток. Значительный разброс значений этого показателя для разных папиллярных карцином, по крайней мере отчасти,

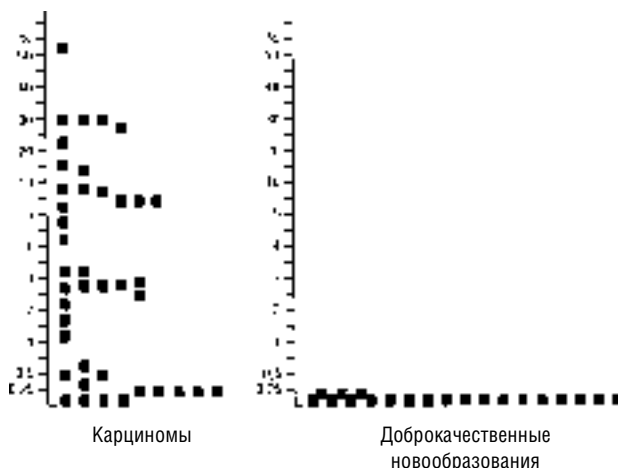


Рис. 4. Распределение новообразований по процентному содержанию клеток, связывающих МКАТ Е3, в популяции эпителиальных клеток пунктатов доброкачественных и злокачественных опухолей щитовидной железы

обусловлен неравномерным распределением клеток, реагирующих с МКАТ Е3, в пределах опухолевого узла. Такое неравномерное распределение было отмечено нами при исследовании гистологических срезов опухолей щитовидной железы [10]. В результате процент клеток, содержащих детерминанты цитокератина N17, в пунктатах разных участков опухоли может колебаться в широких пределах. Несмотря на это, наблюдалось статистически достоверное различие ($p < 0,001$) между пунктатами доброкачественных узлов и карцином щитовидной железы в процентном содержании клеток, реагирующих с антителами Е3.

Полученные результаты позволяют с определенной долей вероятности рассматривать экспрессию детерминант цитокератина N17 как маркер малигнизации фолликулярного эпителия, который может быть использован в дооперационной дифференциальной диагностике папиллярной карциномы и доброкачественных узлов щитовидной железы. Поскольку в пунктатах аденоматозных уз-

лов количество клеток, реагирующих с МКАТ Е3, составляло не более 0,25%, можно указать предел процентного содержания таких клеток, превышение которого будет свидетельствовать о злокачественности пунктируемого образования. Такой предельный процент желательнее определить с некоторым «запасом», например четырехкратным (1%), во избежание ошибок, связанных с отмечавшимся выше неравномерным распределением различных клеток в пределах опухолевого узла.

Использование экспрессии цитокератина N17 в качестве цитологического критерия злокачественности невозможно для узлов с выраженной кистозной дегенерацией, а также массивными инфильтратами при аутоиммунном тиреоидите. В обоих случаях при иммуногистологических исследованиях срезов таких образований нередко наблюдалось значительное число клеток, реагирующих с МКАТ Е3. Следует также напомнить, что рассматриваемый маркер малигнизации касается лишь новообразований из А-клеток (фолликулярного эпителия) щитовидной железы.

Несмотря на указанные ограничения реакция с МКАТ Е3 может быть полезна в случаях папиллярного рака, которые не поддаются цитологической диагностике по морфологическим признакам. Речь идет о карциномах, в клетках которых отсутствуют внутриядерные цитоплазматические включения — наиболее четкий морфологический маркер малигнизации фолликулярного эпителия. Наши исследования показали, что в пунктатах таких карцином процентное содержание клеток, экспрессирующих цитокератин N17, часто было очень высоким (от 7,5 до 55%), хотя прямой зависимости между содержанием таких клеток и количеством внутриядерных включений не обнаружено. Следует отметить, что выявление цитокератина N17 по описанной выше методике проводится на материале, предварительно исследованном морфологически, что позволяет исключить из подсчетов неэпителиальные клетки.

ЛИТЕРАТУРА

1. Олійник ВА, Епштейн ОВ, Рибаків СІ та ін. Особливості діагностики та лікування раку щитовидної залози після аварії на Чорнобильській АЕС. Метод рекомендації. Київ, 1994. 12 с.
2. Rodriguez JM, Parrilla P, Sola J, et al. Comparison between preoperative cytology and intraoperative frozen-section biopsy in the diagnosis of thyroid nodules. Br J Surgery 1994; 81: 1151–4.

3. Henry J-F, Denizot A. Thyroperoxidase immunodetection for the diagnosis of malignancy on fine-needle aspiration of thyroid nodules. World J Surg 1994; 18: 529–34.

4. Aratake Y, Kotani T, Tamura K, et al. Dipeptidyl aminopeptidase IV staining of cytologic preparations to distinguish benign from malignant thyroid diseases. Anat Pathol 1991; 96: 306–10.

5. Vierbuchen M, Schroder S, Uhlenbruck G. CA 50 and CA 19-9 antigen expression in normal, hyperplastic, and neoplastic thyroid tissue. Labor Invest 1989; 60: 726–32.

6. Iwabuchi H, Toriya K, Mimura T, et al. Staining for dipeptidyl aminopeptidase IV activity in nodular thyroid disease. Acta Cytol 1996; 40: 158–63.

7. De Micco C. Immunohistochemie des carcinomes thyroïdiens. Ann Pathol 1989; 9: 233–48.

8. Raphael SJ, McKeown-Eyssen G, Asa SL. High-molecular-weight cytokeratin and cytokeratin-19 in the diagnosis of thyroid tumors. Modern Pathol 1994; 7: 296–300.

9. Божок ЮМ, Зелинская АВ, Васько ВВ. Клетки, экспрессирующие детерминанты цитокератина 17, в злокачественных и доброкачественных новообразованиях щитовидной железы человека. Эксперим онкология 1994; 16: 154–8.

10. Bozok J, Tavokina L, Abramenko I, Belous N. Immunocytochemical method for the detection of cell's antigens after May-Grunvald-Giemsma (MGG) staining. Acta Cytol 1995; 39: 278.

IMMUNOCYTOCHEMICAL DETECTION OF CYTOKERATIN N17 IN PREOPERATIVE CYTOLOGICAL DIAGNOSTICS OF HUMAN THYROID CANCER

A.V. Zelinskaya, Y.M. Bozhok

Summary. *The possibility of detecting cytokeratin N17 determinants in punctates of the thyroid neoplasms with the aim of differential diagnostics between adenomas and papillary carcinomas has been shown. The follicular epithelium of the punctates has been investigated with the help of E3 monoclonal antibody. The percentage of E3-positive cells has been determined. Cytokeratin N17 was assayed immunocytochemically after the morphological study of the punctates allowing us to ignore nonepithelial cells. The difference in the percentage of E3-positive cells in benign and malignant neoplasms was statistically significant. The percentage of E3-positive cells exceeded 1% only in fine needle aspiration biopsy smears of papillary carcinomas. This criterion can be used in the cases of neoplasms from follicular epithelium without signs of the cyst and thyreoidite.*

Key Words: thyroid gland, cancer, cytological diagnostic, cytokeratin N17.