

РОЛЬ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МАРКЕРОВ В ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ ДИАГНОСТИКЕ ФОЛЛИКУЛЯРНЫХ ОПУХОЛЕЙ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Е.А. Трошина, Н.В. Мазурина, И.А. Абесадзе, П.В. Юшков, П.И. Гарбузов

Эндокринологический научный центр РАМН (директор — академик РАН и РАМН И.И. Дедов)

Тонкоигольная аспирационная биопсия (ТАБ) является единственным методом морфологической диагностики на дооперационном этапе исследования, хотя этот метод имеет ряд ограничений. В 10–30% случаев результаты цитологического исследования расцениваются как “неопределенные” или подозрительные на злокачественные. К ним относят фолликулярные опухоли щитовидной железы, так как на основании цитологического исследования не представляется возможным отличить фолликулярную аденому от фолликулярного рака. Достижения молекулярной медицины позволяют с помощью молекулярных маркеров проводить дополнительное исследование как цитологического, так и операционного материала. Наиболее полезными молекулярными маркерами в клинической практике оказались тиреоидная пероксидаза (ТПО), теломераза и галектин-3. Проведение ТАБ с последующим иммуноцитохимическим исследованием в ткани щитовидной железы позволит усовершенствовать дифференциальный диагноз между доброкачественными и злокачественными образованиями щитовидной железы.

Molecular Markers in Differential Diagnostics of Follicular Neoplasms of the Thyroid

E. Troshina, N. Masurina, N. Galkina, I. Abesadse, P. Yushkov, P. Garbusov

Endocrinological Research Center, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

Ultrasound-guided fine-needle aspiration biopsy (FNAB) is a basic method of morphological diagnostics at the preoperative examination, although it has some limitations. In 10–30 % of the cases, cytological examination results defined as indefinite or suspicious to malignant nodules, including follicular neoplasm, as according to the results of a cytological examination it does not appear to be possible to make the difference between follicular adenoma and follicular cancer. Molecular medicine progress let us put an additional examination in a cytological, or surgical aspirates with the molecular markers. The most effective molecular markers in the clinical practice are thyroid peroxidases (TPO), telomerase and galectin-3. The application FNAB with the following immunocytochemistry examination in the thyroid tissue let us improve a differential diagnostics between benign and malignant nodules of the thyroid.

Тонкоигольная аспирационная биопсия (ТАБ) является основным методом дифференциальной диагностики узловых образований щитовидной железы. Несмотря на то что проведение ТАБ дает возможность проводить морфологическую верификацию диагноза на дооперационном этапе, этот метод имеет ряд ограничений. По данным многочисленных исследований распространенность злокачественных новообразований, выявляемых при ТАБ, составляет около 5%. В то же время в 10–30% случаев результаты цитологического исследования расцениваются как “неопределенные” или подозрительные на злокачественные [2, 3, 9, 11, 16].

Диагностика фолликулярных опухолей щитовидной железы на дооперационном этапе вызывает особые сложности, так как аденома и аденокарцинома фолликулярного строения имеют сходные цитологические признаки. Только два критерия — инвазии в сосуды или в капсулу опухоли, которые могут быть определены исключительно при гистологическом исследовании операционного материала, позво-

ляют отличить фолликулярный рак. Кроме того, гиперпластический, активно пролиферирующий коллоидный зоб или фолликулярный вариант папиллярной аденокарциномы при цитологическом исследовании могут быть сходны с фолликулярными новообразованиями. В результате пациенты с цитологическими признаками фолликулярной неоплазии направляются на оперативное лечение, причем при гистологическом исследовании не более 8–17% таких узлов оказываются злокачественными [1, 3–5].

Достижения молекулярной диагностики делают возможным дополнительное исследование как цитологического, так и операционного материала, позволяющее в ряде случаев проводить дифференциальный диагноз между доброкачественными и злокачественными образованиями. Основные требования, которые предъявляются к молекулярным маркерам в клинической практике, могут быть сформулированы следующим образом [10]:

- возможность достоверно отличить злокачественное новообразование от доброкачественного,

особенно при “неопределенном” цитологическом диагнозе;

- достоверность маркера должна быть подтверждена несколькими независимыми исследованиями;
- маркер должен определяться в цитологическом и гистологическом материале иммуноцитохимическим и иммуногистохимическим методами, иммуноферментным методом или методом ПЦР;
- наиболее значимыми в клинической практике можно считать маркеры, имеющие прогностическое значение и поэтому принимаемые во внимание при выборе оптимальной тактики лечения.

В литературе описывается не менее 50 различных молекулярных маркеров, исследованных у пациентов с узловыми образованиями щитовидной железы. Однако лишь несколько из многочисленных маркеров (тиреоидная пероксидаза (ТПО), теломераза, галектин-3) оказались полезными в клинической практике и продемонстрировали достаточно высокую чувствительность и специфичность при исследовании пунктатов, подозрительных на злокачественные. Кроме того, эти маркеры могут определяться практически в любой морфологической лаборатории. В последние годы в литературе также появились публикации, посвященные возможности использования для дифференциальной диагностики фолликулярных опухолей таких маркеров, как HBME-1 и PAX8-PPAR γ .

Молекулярный маркер RET/PTC оказался специфичным для папиллярного рака щитовидной железы. К сожалению, детекция этого маркера папиллярной аденокарциномы требует проведения генетического исследования материала, в частности ПЦР.

Ряд маркеров, таких, как p53 и сервивин, экспрессируются преимущественно при недифференцированном раке щитовидной железы. Однако до 10% высокодифференцированных раков щитовидной железы демонстрируют экспрессию p53 и около 20% — экспрессию сервивина. Таким образом, клиническое значение этих маркеров при высокодифференцированном раке щитовидной железы в большей степени определяется возможностью выделить группу пациентов с неблагоприятным прогнозом, требующих более радикального подхода при определении тактики лечения.

Тиреоидная пероксидаза

Тиреоидная пероксидаза (ТПО) является одним из наиболее изученных молекулярных маркеров. Оказалось, что высокая экспрессия ТПО наблюдается в нормальной ткани или в доброкачественных опухолях, а низкая экспрессия или ее отсутствие — в злокачественных новообразованиях. Это определило значимость ТПО для дифференциальной диагностики доброкачественных и злокачественных образований

щитовидной железы. De Micco et al. (13) разработали специальные моноклональные антитела (MoAb 47) к тиреоидной пероксидазе. Слабое иммуногистохимическое окрашивание или его отсутствие со 100% чувствительностью позволяло диагностировать злокачественную опухоль, тогда как выраженное окрашивание с высокой долей вероятности позволяло говорить о доброкачественности исследуемого образования. При использовании других моноклональных и поликлональных антител были получены сходные результаты, хотя чувствительность и специфичность были наилучшими при использовании MoAb 47.

Henry et al. [17] провели ретроспективный анализ результатов ТАБ 279 пациентов с гистологически подтвержденным диагнозом. При цитологическом исследовании узел расценивался как доброкачественный, если более 80% клеток оказывались ТПО-положительными, и как подозрительный на злокачественность, если менее 80% клеток оказывались ТПО-положительными. Все злокачественные образования демонстрировали иммуноокрашивание менее 80% клеток, в то время как в 215 из 231 (93%) доброкачественных образований ТПО-положительными были более 80% клеток. Был также проведен анализ результатов цитологического исследования узлов с “неопределенными” изменениями. Среди оперированных пациентов оказалось 60 случаев фолликулярных опухолей щитовидной железы. Из них при гистологическом исследовании было выявлено 8 случаев рака (13%). Во всех 8 образованиях менее 80% клеток оказались окрашенными, тогда как в доброкачественных фолликулярных опухолях в 61% случаев доля окрашенных клеток превышала 80%. Сходные результаты при цитологически “неопределенных” изменениях были получены и другими авторами.

В дальнейшем подтвердилось, что MoAb 47 позволяет сделать диагностику фолликулярных опухолей щитовидной железы на цитологическом этапе исследования более точной. На основе данных моноклональных антител в настоящее время выпускаются коммерческие наборы для проведения как иммуногистохимического, так и иммуноцитохимического исследования, которые могут использоваться в любой патоморфологической лаборатории.

Теломераза

Теломеры представляют собой повторяющиеся последовательности ДНК, расположенные на концах хромосом и определяющие стабильность хромосом. Теломерические повторы укорачиваются с каждым делением клетки. При достижении теломерами критической длины происходят остановка клеточного цикла и апоптоз. Теломераза — фермент, содержащий РНК. Под действием теломеразы увеличивается

количество повторов в составе теломера. Теломераза экспрессируется в период эмбриогенеза, однако активность этого энзима не обнаруживается в большинстве соматических тканей у взрослых. Оказалось, что в большинстве злокачественных опухолей активность теломеразы высока, что предотвращает сокращение теломера и препятствует наступлению запрограммированной клеточной смерти.

Lo et al. [21] суммировали результаты 8 различных исследований, посвященных изучению активности теломеразы в опухолях щитовидной железы. Только в 6% образцов нормальной ткани щитовидной железы и в 14% образцов фолликулярной аденомы была выявлена активность теломеразы. В ткани папиллярного рака активность фермента определялась в 50% случаев, в образцах недифференцированного рака также в 50% и в ткани фолликулярного рака — в 75% случаев. Эти результаты определили роль теломеразы как прекрасного вспомогательного средства для дифференцированного диагноза при цитологическом исследовании. Saji et al. [25, 26] успешно провели анализ теломеразной активности в цитологическом материале при изменениях, подозрительных на злокачественные.

Возможность исследования теломеразной активности в клинической практике с использованием коммерческих наборов имеет ряд ограничений. Во-первых, методика исследования достаточно сложна и не всегда применима в обычной лаборатории. Во-вторых, активированные лимфоциты экспрессируют теломеразу и могут давать ложноположительные результаты. По данным восьми независимых исследований 44% образцов из ткани щитовидной железы с явлениями хронического лимфоцитарного тиреоидита оказались позитивными при исследовании активности теломеразы.

Определение уровня мРНК гена hTERT (обратная транскриптаза теломеразы человека) с использованием обратной ПЦР в цитологическом материале, полученного при ТАБ, не выявило достоверного различия между доброкачественными и злокачественными опухолями. Из 48 случаев, когда по данным ТАБ были выявлены неопределенные изменения, в 42% узлов, доброкачественных при гистологическом исследовании, и в 63% узлов, оказавшихся злокачественными, был отмечен высокий уровень мРНК hTERT ($p = NS$).

Таким образом, определение активности теломеразы в цитологических препаратах, полученных при ТАБ, может быть эффективным при дифференциальной диагностике доброкачественных и злокачественных новообразований щитовидной железы. Но этот метод в настоящее время недоступен для использования в клинической практике.

Галектин-3

Галектин-3 оказался наиболее перспективным маркером, позволяющим дифференцировать аденомы щитовидной железы от злокачественных опухолей. Галектины являются гликопротеинами из семейства β -галактоза-связывающих лектинов. Галектины экспрессируются многими эпителиальными и иммунными клетками. Они участвуют в сплайсинге мРНК, клеточной адгезии, клеточном росте, вовлечены в процессы злокачественной трансформации и метастазирования. Галектины локализуются в цитоплазме и ядре, на поверхности клеток и в межклеточном матриксе.

Иммуногистохимические исследования операционного материала, проведенные различными группами ученых в 1995–1998 гг., показали, что в ткани папиллярного рака галектин-3 экспрессируется в 100% случаев, а в фолликулярных раках — в 50–100% случаев. В то же время ни в одном из образцов нормальной ткани щитовидной железы и доброкачественных узлов этот маркер при иммуногистохимическом исследовании не определялся. Однако по данным двух более поздних исследований экспрессия галектина-3 наблюдается в 45–75% аденом щитовидной железы, а также в 17–75% случаев многоузлового зоба. Таким образом, чувствительность галектина-3 при дифференциальной диагностике фолликулярной аденомы и фолликулярного рака не превышала 68,6% [13–15, 18, 19, 23, 27].

Поскольку при изучении экспрессии галектина-3 в операционном материале были получены обнадеживающие данные, дальнейшие исследования были посвящены возможности определения экспрессии этого маркера в материале, полученном при ТАБ. Сопоставление результатов иммуногистохимического и иммуноцитохимического исследований в случаях оперированных пациентов позволило утверждать, что экспрессия галектина-3 может успешно определяться в цитологическом материале.

Прицельное изучение возможностей дифференциальной диагностики между злокачественными и доброкачественными образованиями щитовидной железы подтвердило клиническое значение этого маркера. Наиболее значимым среди подобных исследований можно считать работу Bartolazzi et al. [7]. В это многоцентровое исследование были включены 1099 пациентов, оперированных по поводу различных опухолей щитовидной железы. Кроме того, было проведено проспективное исследование материала, полученного при ТАБ в 226 случаях. Ретроспективное иммуногистохимическое исследование продемонстрировало экспрессию галектина-3 в 97% случаев при папиллярном раке, в 100% при инвазивном фолликулярном раке, в 92% случаев при минимально инвазивном фоллику-

лярном раке и только в 3% при аденомах щитовидной железы. В группе больных, включенных в проспективное исследование, в 73 (30%) случаях при цитологическом исследовании были выявлены “неопределенные” изменения. В дальнейшем выяснилось, что среди этих узлов оказались все 35 фолликулярных аденом и 11 фолликулярных раков, идентифицированных при гистологическом исследовании, а также 17% папиллярных раков. В этих 73 случаях все злокачественные опухоли оказались галектин-3-позитивными и только 5% фолликулярных аденом экспрессировали галектин-3.

Проведено множество иммуногистохимических исследований экспрессии галектина-3 в ткани щитовидной железы с различными патологиями. Японскими учеными Aratake Y. et al. [6] проводились исследования, целью которых являлось определение диагностических маркеров, позволяющих выявить морфологию образований щитовидной железы на дооперационном этапе исследования. Были проанализированы результаты 79 пациентов с доказанной патологией щитовидной железы. Методом иммуногистохимии галектин-3 определялся во всех 37 папиллярных карциномах, в 5 из 6 фолликулярных карциномах, во всех 3 анапластических карциномах, в одной из 3 медулярных карцином и в 2 из 14 фолликулярных аденом. ПЦР-анализ показал сверхсекрецию галектина-3 и во всех исследованных папиллярных и фолликулярных карциномах, хотя выделение мРНК было слабым или неопределяемым в доброкачественных опухолях щитовидной железы и нормальной ткани за исключением одного случая фолликулярной аденомы. Авторы предположили, что определение галектина-3 может иметь важное место в предоперационной диагностике образований щитовидной железы.

Бразильские ученые [22] провели иммуногистохимическое исследование экспрессии галектина-3 в ткани щитовидной железы 87 пациентов. Из них 24 образца с морфологическим заключением многоузловой (коллоидной) зоб, 31 — с фолликулярной аденомой, 20 — с фолликулярной карциномой, 12 — с папиллярной карциномой и 5 образцов с нормальной тканью щитовидной железы. Протеин галектин-3 определялся методами иммуногистохимии при световом, флюоресцирующем микрокопировании и с использованием моноклональных антител. Также определялся галектин-3 и методом молекулярного анализа. Результаты исследования показали, что большинство раков продуцируют галектин-3 (фолликулярный рак в 90% случаев, папиллярный — в 100%). Однако в отличие от ранее опубликованных данных показано, что доброкачественные опухоли также выделяли галектин-3 (аденома — 45%, многоузловой зоб — 17%). Хотя чувствительность при идентификации рака по содержанию галектина-3 иммунными методами составляет

93,8%, точность при определении доброкачественной или злокачественной опухоли была 77%. Специфичность была ниже (68,6%), когда продукция галектина-3 в фолликулярной аденоме сравнивалась с фолликулярной карциномой. Таким образом, ученые полагают, что проводимые исследования не позволяют использовать галектин-3 как высокоспецифичный маркер для дифференциальной диагностики фолликулярной аденомы от фолликулярного рака, хотя он, бесспорно, может быть использован как дополнительное средство исследования.

Венгерские врачи [20], оценившие роль галектина-3 при различных заболеваниях щитовидной железы, выявили, что наиболее выражено галектин-3 экспрессировался при папиллярных карциномах, в других злокачественных опухолях был представлен слабо, фокально или с переменной положительной реакцией. В фолликулярных новообразованиях фокальная позитивная реакция получена в 4 из 19 фолликулярных аденом, отрицательный результат — в 4 из 10 фолликулярных карцином. Исследователи полагают, что иммуногистохимическая реакция на галектин-3 важна при диагностике папиллярной карциномы, а при фолликулярных поражениях галектин-3 не является достоверным маркером его определения, хотя остается полезным при дифференцировании доброкачественной и злокачественной опухолей.

Beesley M.F. и McLaren K.M. [8], проводившие иммуногистохимическое исследование галектина-3 в солитарных узлах щитовидной железы, утверждают, что проведение иммуногистохимического исследования галектина-3 является полезным методом постановки гистопатологического диагноза одиночных образований щитовидной железы и что галектин-3 может служить маркером для диагностики фолликулярных карцином, причем даже для минимально инвазивных форм.

Представляют интерес данные итальянских исследователей [24], которые провели сравнительный анализ результатов иммуногистохимического исследования экспрессии галектина-3 в тканях 17 микроинвазивных фолликулярных карцином и 52 фолликулярных аденом, а также анализ иммуногистохимического исследования в предоперационных, фиксированных парафином цитологических препаратах, полученных в результате тонкоигольной аспирационной биопсии. Среди карцином с минимальной инвазией во всех тканях хирургического материала выявлялся галектин-3, в то время как в цитологических материалах галектин-3 экспрессировал в 16 из 17 случаев. Галектин-3 не выявлялся в 48 аденомах из 52 и в цитологических, и в гистологических препаратах. Эти результаты подтверждают, что галектин-3 является надежным маркером предоперационной диагностики малоинвазивных

фолликулярных карцином, повышая диагностическую ценность обычной аспирационной тонкоигольной биопсии. Метод также доказал эффективность проведения иммуногистохимического исследования галектина-3 при послеоперационной оценке опухолей, подозрительных в отношении малигнизации.

Заключение

Таким образом, дифференциальная диагностика фолликулярных опухолей щитовидной железы на дооперационном этапе остается одной из актуальных проблем современной эндокринологии и онкологии. Ключевым методом диагностики на цитологическом этапе является проведение иммуноцитохимического исследования маркеров злокачественного роста в ткани щитовидной железы.

Список литературы

1. Ветшев П.С., Баранова О.В., Габаидзе Д.И. Аденомы щитовидной железы // Проблемы эндокринологии. 2001. Т. 47. № 2. С. 25–32.
2. Ветшев П.С., Шкроб О.С., Чилингарики К.Е. и др. Возможности предоперационной морфологической верификации при узловых эутиреоидных образованиях щитовидной железы // Хирургия. 1988. № 2. С. 4–8.
3. Гринева Е.Н. Дифференциальная диагностика узловых зоб // В сб.: "Актуальные проблемы заболеваний щитовидной железы": Материалы 2-го Российского тиреоидологического конгресса. М., 2002. С. 99–103.
4. Пачес А.И., Пронн Р.М. Рак щитовидной железы. М., 1995. С. 47–78.
5. Хмельницкий О.К. Цитологическая и гистологическая диагностика заболеваний щитовидной железы. Санкт-Петербург, 2002. С. 137–144.
6. Aratake Y., Umeki K., Kiyoyama K. et al. Department of Clinical Investigation, Miyazaki Medical College Hospital, Miyazaki, Japan. Diagnostic utility of galectin-3 and CD26/DPPIV as preoperative diagnostic markers for thyroid nodules // Diagn Cytopathol. 2002. V. 26. N 6. P. 366–372.
7. Bartolazzi A., Gasbarri A., Pappotti M. et al. Application of an immunodiagnostic method for improving preoperative diagnosis of nodular thyroid disease // Lancet. 2001. V. 357. P. 1644–1650.
8. Beesley M.F., McLaren K.M. Department of Pathology, Edinburgh University Medical School, Edinburgh, UK. Cytokeratin 19 and galectin-3 immunohistochemistry in the differential diagnosis of solitary thyroid nodules // Histopathology. 2002. V. 41. N 3. P. 236–243.
9. Belfiore A., La Rosa G.L. Fine-needle aspiration biopsy of the thyroid // Endocrinol Metab Clin North Am. 2001. V. 30. P. 361–400.
10. Bryan R. Haugen, Whitney W. Woodmansee and Michael T. McDermott. Towards improving the utility of fine-needle aspiration biopsy for the diagnosis of thyroid tumours // Clinical Endocrinology. 2002. V. 56. P. 281–290.
11. Cuello C., Correa P., Eisenberg H. Geographic pathology of thyroid carcinoma // Cancer. 1969. V. 23. P. 230–238.
12. De Micco C., Vassko V., Henry J.F. The value of thyroid peroxidase immunohistochemistry for preoperative fine-needle aspiration diagnosis of the follicular variant of papillary thyroid cancer // Surgery. 1999. V. 126, P. 1200–1204.
13. Fernandez P.L., Merino M.J., Gomez M. et al. Galectin-3 and laminin expression in neoplastic and nonneoplastic thyroid tissue // Journal of Pathology. 1997. V. 181. P. 80–86.
14. Gasbarri A., Martegani M.P., Del Prete et al. Galectin-3 and CD44v6 isoforms in the preoperative evaluation of thyroid nodules // Journal of Clinical Oncology. 1999. V. 17. P. 3494–3502.
15. Gerasimov G., Bronstein M., Troshina K. et al. Nuclear p53 immunoreactivity in papillary thyroid cancers is associated with two established indicators of poor prognosis // Experimental Molecular Pathology. 1995. V. 62. P. 52–62.
16. Gharid H., Goellner J.R., Jonson D.A. Fine-needle aspiration cytology of the thyroid. A 12-years experience with 11,000 biopsies // Clin. Lab. Med. 1993. V. 13. P. 699–709.
17. Henry J.F., Denizot A., Porcelli A. et al. Thyroperoxidase immunodetection for the diagnosis of malignancy on fine-needle aspiration of thyroid nodules // World Journal of Surgery. 1994. V. 18. P. 529–534.
18. Inohara H., Akahani S., Kohts K., Raz A. Interactions between galectin-3 and Mac-2-binding protein mediate cell-cell adhesion // Cancer Research. 1996. V. 56. P. 4530–4534.
19. Inohara H., Hanjo Y., Yoshii T. et al. Expression of galectin-3 in fine-needle aspirates as a diagnostic marker differentiating benign from malignant thyroid neoplasms // Cancer. 1999. V. 85. P. 2475–2484.
20. Kovacs R.B., Foldes J., Winkler G. et al. Department of Pathology, St John's Hospital, Budapest, Hungary. The investigation of galectin-3 in diseases of the thyroid gland // Eur J Endocrinol. 2003. V. 149. N 5. P. 449–453.
21. Lo C.-Y., Lam K.-Y., Chan K.-T., Luk J.M. Telomerase activity in thyroid malignancy // Thyroid. 1999. V. 12. P. 1215–1220.
22. Martins L., Matsuo S.E., Ebina K.N. et al. Department of Histology and Embryology, Institute of Biomedical Sciences, Universidade de Sao Paulo, Sao Paulo 05508-900, SP, Brazil. Galectin-3 messenger ribonucleic acid and protein are expressed in benign thyroid tumors // J. Clin. Endocrinol. Metab. 2002. V. 87. N 10. P. 4806–4810.
23. Orlandi F., Saggiorato E., Pivano G. et al. Galectin-3 is a presurgical marker of human thyroid carcinoma // Cancer Research. 1998. V. 58. P. 3015–3020.
24. Saggiorato E., Cappia S., De Giuli P. et al. Department of Clinical and Biological Sciences, University of Turin, Turin, Italy. Galectin-3 as a presurgical immunocytochemical marker of minimally invasive follicular thyroid carcinoma // J. Clin. Endocrinol. Metab. 2001. V. 86. N 11. P. 5152–5158.
25. Saji M., Westra W.H., Chen H. et al. Telomerase activity in the differential diagnosis of papillary carcinoma of the thyroid // Surgery. 1997. V. 122. P. 1137–1140.
26. Saji M., Xydas S., Westra W.H. et al. Human telomerase reverse Transcriptase (hTERT) gene expression in thyroid neoplasms // Clinical Cancer Research. 1999. V. 5. P. 1483–1489.
27. Xu X.C., El Naggar A.K., Lotan R. Differential expression of galectin-1 and galectin-3 in thyroid tumors. Potential diagnostic implications // American Journal of Pathology. 1995. V. 147. P. 815–822.