

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ ГАЛЕКТИНА-3 В ТКАНИ ФОЛЛИКУЛЯРНЫХ ОПУХОЛЕЙ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Е.А. Коган¹, Н.А. Петунина², Т.В. Чернышова², Д.В. Лукьянченко³

¹ ФГУ “Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. академика В.И. Кулакова Минздравсоцразвития РФ” (директор – академик РАМН, доктор мед. наук, профессор Г.Т. Сухих)

² Кафедра эндокринологии ФППОВ ГОУ ВПО “Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздравсоцразвития РФ” (ректор – член-корреспондент РАМН, доктор мед. наук, профессор П.В. Глыбочко)

³ Больница Центросоюза РФ, Москва (главный врач – доктор мед. наук, профессор С.И. Емельянов)

Е.А. Коган – доктор мед. наук, профессор, руководитель патологоанатомического отделения №1 ФГУ “Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. академика В.И. Кулакова Минздравсоцразвития РФ”; Н.А. Петунина – доктор мед. наук, профессор, заведующая кафедрой эндокринологии ФППОВ ГОУ ВПО “Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздравсоцразвития РФ”; Т.В. Чернышова – младш. науч. сотр. кафедры эндокринологии ФППОВ ГОУ ВПО “Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздравсоцразвития РФ”; Д.В. Лукьянченко – городской ординатор отделения хирургии больницы Центросоюза РФ

Целью исследования являлось определение экспрессии галектина-3 в ткани фолликулярных опухолей щитовидной железы для проведения дифференциальной диагностики. В исследование были отобраны 36 образцов ткани фолликулярных опухолей щитовидной железы, среди которых было выделено 3 группы: 1-я группа (n = 15) – гистологическое заключение “фолликулярная аденома”; 2-я группа (n = 15) – гистологическое заключение “фолликулярный рак”; 3-я группа (n = 6) – сочетание фолликулярного рака и фолликулярной аденомы. Экспрессия галектина-3 выявлена в ткани фолликулярной аденомы в 8 случаях из 15 (53,3%), в ткани фолликулярного рака в 13 случаях из 15 (86,7%), сочетание фолликулярного рака и фолликулярной аденомы во всех 6 случаях (100%). Диагностическая чувствительность составляет 73,6%; диагностическая специфичность – 81,8%; диагностическая эффективность – 77,7%; диагностическая точность – 77%. Было выявлено, что галектин-3 экспрессируется в 53,3% случаев фолликулярных аденом. Средний уровень экспрессии в эпителиальных клетках аденом достоверно ниже по сравнению с фолликулярной карциномой. В опухолевых клетках фолликулярного рака галектин-3 иммуногистохимически обнаружен в 86,7%, в связи с чем галектин-3 не может применяться в качестве единственного маркера в дифференциальной диагностике фолликулярных опухолей щитовидной железы. В фолликулярной аденоме при сочетании ее с фолликулярным раком экспрессия галектина-3 присутствует во всех случаях, средний уровень которой достоверно ниже, чем в фолликулярном раке. Исследование показало, что галектин-3 не может применяться в качестве единственного маркера, однако определение его экспрессии может иметь большое значение в комплексной диагностике фолликулярных опухолей щитовидной железы, а также в комплексе с другими онкомаркерами. При экспрессии галектина-3 вероятность наличия злокачественного характера опухоли достоверно высокая.

Ключевые слова: галектин-3, фолликулярная аденома, фолликулярный рак, иммуногистохимический, опухоль щитовидной железы.

Determination of galectin-3 expression in the tissue of follicular thyroid tumors

E.A. Kogan¹, N.A. Petunina², T.V. Chernyshova², D.V. Lukyanchenko³

¹ Scientific Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology named after V.I. Kulakov, Moscow

² I.M. Sechenov First Moscow Medical State University, Moscow

³ Centrosoyuz hospital, Moscow

The aim of this study was to investigate the usefulness of immunohistochemical expression galectin-3 for differential diagnosis follicular carcinoma and follicular adenoma in a sample of thyroid lesions using a specific anti-galectin-3 monoclonal antibody. We evaluated 36 thyroid lesions including 15 follicular carcinomas, 15 follicular adenomas, and in 6 cases there was a combination of follicular carcinomas and follicular adenomas. Galectin-3 expression was detected in 8 of 15 (53.3%) follicular adenomas, 13 of 15 (86.7%) follicular carcinomas and in 6 of 6 (100%) combined cases. The sensitivity, specificity, efficiency and diagnostic accuracy of this test method were 73.6%, 81.8%, 77.7% and 77%, respectively. Galectin-3 expression determined in 53.3% of adenomas. The average

Для корреспонденции: Петунина Нина Александровна – 119991 Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2. Первый МГМУ им. Сеченова, кафедра эндокринологии ФППОВ

level of the expression in adenoma cells was significantly lower compared with carcinoma. Galectin-3 can't be used for differential immunohistochemical diagnosis of follicular thyroid tumors because the expression of the marker in cells of follicular carcinoma was only 86.7%. Expression of galectin-3 in the cells of adenomas with a combination of follicular adenoma and follicular cancer was revealed in all cases. In the adenoma tissue mean expression level was significantly lower than in carcinoma. So galectin-3 can't be used as the sole marker but definition of the expression galectin-3 may be important in the complex diagnosis follicular thyroid tumors and also in combination with other markers. The expression of galectin-3 chance of having a malignant nature of the tumor was significantly higher.

Key words: *galectin-3, follicular adenoma, follicular carcinoma, immuno-histochemical, thyroid tumors.*

Введение

Рак щитовидной железы (РЩЖ) составляет около 1% среди всех злокачественных опухолей. Около 90% всех видов РЩЖ являются высокодифференцированными. В структуре высокодифференцированного РЩЖ около 15% составляет фолликулярный и около 80% – папиллярный рак [2, 3, 6].

В настоящее время методом, в большинстве случаев позволяющим провести дифференциальную диагностику между злокачественными и доброкачественными опухолями ЩЖ, является тонкоигольная аспирационная биопсия (ТАБ) ЩЖ. Однако на основании данных цитологической картины провести дифференциальный диагноз между фолликулярным раком (ФР) и фолликулярной аденомой (ФА) не представляется возможным, так как основным достоверным критерием диагноза является инфильтрирующий рост опухоли. Это дало основание для появления термина “фолликулярная неоплазия”, или опухоль “неопределенного потенциала злокачественности”. Частота встречаемости такого варианта заключений от 10 до 15% всех проводимых ТАБ [3, 6]. Все это делает актуальным поиск новых методов дифференциальной диагностики фолликулярных образований ЩЖ. На сегодняшний день одним из наиболее перспективных в данном направлении является выполнение иммуногистохимического исследования, в ходе которого проводится определение экспрессии потенциальных маркеров злокачественности [2, 5]. К таким маркерам относят, в частности, галектин-3, НВМЕ-1, цитокератины различного спектра, циклин D1, фибронектин-1 и другие [2].

Галектин-3-белок из семейства β-галактозосвязывающих лектинов, который участвует в регуляции клеточного цикла, дифференцировке и апоптозе, межклеточной адгезии и передаче межклеточных сигналов, воспалительной реакции, опухолевой трансформации и метастазировании [1].

В работах многих авторов [7–10, 12] показано, что, опираясь на данные результатов экспрессии галектин-3, удастся верифицировать папиллярный и ФР с большой вероятностью, а также избежать необоснованных хирургических вмешательств. Выявлено, что нормальные тиреоциты не экспрессируют га-

лектин-3 [8]. Получены данные об эффективности определения экспрессии галектин-3 при минимальных формах карцином [9, 10]. L. Martins и соавт. [11] выявили, что, помимо раков, экспрессия галектин-3 выявляется и при ФА (45%), многоузловом зобе (17%). Положительная экспрессия галектин-3 при аденоме (в 22,5%) получена И.А. Абесадзе [2]. Наиболее значимыми среди российских исследований являются работы Е.А. Трошиной и соавт. [6].

Таким образом, галектин-3 является одним из наиболее перспективных маркеров в данном направлении. На сегодняшний день результаты предшествующих исследований противоречивы.

Цель исследования – определение экспрессии галектин-3 в ткани фолликулярных опухолей ЩЖ с целью проведения дифференциальной диагностики.

Материал и методы

Было проведено иммуногистохимическое исследование – определение экспрессии маркера галектин-3 в ткани фолликулярных опухолей ЩЖ. На первом этапе мы выполнили ретроспективный анализ данных гистологического исследования 147 пациентов, прооперированных по поводу узловых образований ЩЖ в период с 2001 по 2009 гг. в перечисленных ниже учреждениях здравоохранения: больнице Гражданской авиации (Москва), Республиканском онкологическом диспансере (Республика Мордовия), городской клинической больнице №4 (Саранск, Республика Мордовия). В исследование были отобраны 23 пациента с фолликулярной опухолью ЩЖ: женщин было 20 (средний возраст – $44,9 \pm 4,52$ года) и мужчин – 3 (средний возраст – $59,3 \pm 1,59$ года). Из них ФА была диагностирована у 10 женщин (средний возраст – $40 \pm 5,19$ года) и 2 мужчин (средний возраст – $60 \pm 2,19$ года). ФР был верифицирован у 11 человек (10 женщин (средний возраст – $49,7 \pm 3,36$ года) и 1 мужчина (возраст – 58 лет)). Критерием отбора для исследования являлся диагноз, подтвержденный морфологическим исследованием. Следует отметить, что в 6 случаях обнаружено сочетание ФР и ФА. Все пациенты на дооперационном этапе были обследованы по стандартной

методике дифференциально-диагностического поиска при узловом зобе, включающей в себя выявление жалоб, сбор анамнеза, физикальное обследование с пальпацией ЩЖ, ультразвуковое исследование (УЗИ) ЩЖ, определение уровня тиреоидных гормонов (тиреотропного гормона (ТТГ), свободного тироксина), тонкоигольную аспирационную биопсию (ТАБ). Средний объем ЩЖ составил: у женщин – $18,4 \pm 2,1$ см³, у мужчин – $25,3 \pm 3,2$ см³. Все пациенты, включенные в исследование, имели нормальную функцию ЩЖ (средний уровень ТТГ составил $1,8 \pm 0,9$ мМЕ/мл).

У всех обследованных пациентов отсутствовали клинические симптомы высокого риска злокачественного новообразования, такие как компрессия, увеличение регионарных лимфоузлов, осиплость голоса. Гистологический тип опухоли определялся по классификации ВОЗ [13]. В исследование были отобраны 36 образцов ткани фолликулярных опухолей ЩЖ, среди которых было выделено 3 группы): 1-я группа (n = 15) – гистологическое заключение “фолликулярная аденома”; 2-я группа (n = 15) – гистологическое заключение “фолликулярный рак”; 3-я группа (n = 6) – сочетание фолликулярного рака и фолликулярной аденомы.

Иммуногистохимические реакции проводились на депарафинированных срезах толщиной 4–5 мкм, расположенных на стеклах, покрытых APES-слоем (Janice A., 1983) по общепринятым методикам. В качестве первичных антител использовались моноклональные антитела к галектину-3 фирмы Lab Vision. Срезы инкубировали с вторичными антителами во влажных камерах в течение 1 ч, затем они ополаскивались в фосфатном буфере (рН 7,0–7,6). Для метки вторичных антител использовался авидин-стрептовидиновый комплекс. Далее ядра докрашивались гематоксилином. Для иммуногистохимических реакций определили положительный и отрицательный контроль. В качестве отрицательного контроля брали образцы исследуемых срезов, которые подвергались стандартной процедуре иммуногистохимии, но без добавления первичных антител; положительный контроль – ткань папиллярного рака ЩЖ с доказанной экспрессией галектина-3.

Оценка интенсивности реакции для галектина-3 проводилась по шестибалльной системе: 2 балла – до 20% окрашенных клеток; 4 балла – от 20 до 40% окрашенных клеток; 6 баллов – более 40% окрашенных клеток. Статистический анализ данных производили с помощью пакетов программ Excel, StatSoft Statistica v6.0 Multilingual и SPSS 11.0. На первом этапе с использованием критерия согласия Пирсона нами была проведена проверка на нормальность распределения. Так как полученные данные не подчиня-

лись нормальному распределению, при сравнительном анализе переменных применялись непараметрические методы – U-критерий Манна–Уитни. Критическое значение уровня статистической значимости принималось равным 5% ($p < 0,05$). Рассчитывалась диагностическая чувствительность (ДЧ), диагностическая специфичность (ДС), диагностическая эффективность (ДЭ); диагностическая точность (ДТ).

Результаты и их обсуждение

Морфологическая характеристика опухолей ЩЖ.

Фолликулярная аденома макроскопически имела вид инкапсулированного, чаще, солитарного, гомогенного узла мягкой консистенции, серовато-белого, иногда розового оттенка. Гистологически представлена опухолевой тканью, образованной клетками зрелого фолликулярного эпителия: высокодифференцированными фолликулами крупного, среднего калибра, микрофолликулами, а также солидными тяжами из прилегающих друг к другу мелких клеток с крупными ядрами округлой формы. При всех формах аденом отсутствовала инвазия в сосуды и капсулу опухоли.

Фолликулярная аденокарцинома макроскопически существенно не отличалась от ФА и была представлена четко отграниченными узлами опухоли различных размеров. Микроскопическая картина фолликулярных аденокарцином была разнообразна: раковые элементы напоминали фолликулы ЩЖ различных размеров и формы. Часть клеток, выстилающих эти элементы, могла быть с гиперхромными ядрами, наползающими одно на другое. Обнаруживались и трабекулярные структуры. Также отмечались солидные разрастания опухолевых клеток, расположенные в виде выступов внутри фолликулов. Выявлено врастание опухолевых клеток в капсулу и кровеносные сосуды, что являлось достоверным признаком карциномы.

В 3-й группе мы наблюдали смешанные формы – сочетание ФР и ФА; микроскопически – наличие в одном и том же препарате инкапсулированных узлов фолликулярного строения с признаками малигнизации по периферии (инвазии в зоне капсулы и субкапсулярных сосудов) и узлов без признаков инвазии в капсулу и сосуды, однако с признаками атипичии и клеточного полиморфизма.

Иммуногистохимическое исследование галектина-3 в ткани фолликулярной аденомы ЩЖ. При проведении исследования экспрессии галектина-3 в ткани ФА были получены следующие результаты. В 8 (53,3%) из 15 случаев реакция расценивалась как положительная. При этом в 3 случаях (20%) интенсивность окрашивания составила менее 10% клеток,

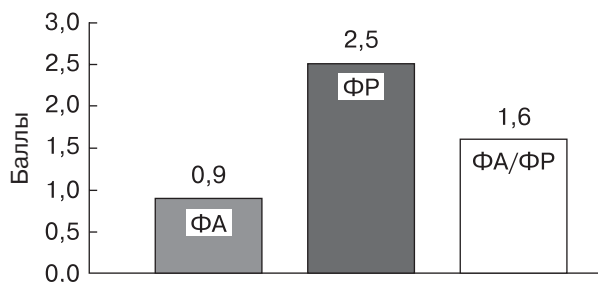


Рис. Экспрессия галектина-3 в ткани фолликулярных опухолей ЩЖ.

в 5 (33,3%) – менее 20%. В 7 (46,7%) из 15 случаев мы наблюдали отрицательную реакцию. Средней уровень экспрессии составил 0,9 балла (рис.).

При проведении исследования экспрессии галектина-3 в ткани ФР в 13 (86,7%) из 15 случаев мы выявили положительное окрашивание. Из них в 7 случаях (46,7%) отмечалось окрашивание до 40% клеток, в 4 (26,7%) – до 20% и в 2 (13,3%) – до 10% клеток. Отрицательный результат был получен в 2 (13,3%) из 15 случаев. Средней уровень экспрессии составил 2,5 балла (см. рис.).

Сочетание ФА и ФР (ФР на фоне ФА) обнаружено в 6 из 30 случаев: было получено положительное окрашивание клеток ФА слабой интенсивности (до 20%). Средней уровень экспрессии составил 1,6 балла (см. рис.); ДЧ – 73,6%; ДС – 81,8%; ДЭ – 77,7%; ДТ – 77%.

Обнаружена экспрессия галектина-3 в 53,3% случаев ФА, что совпадает с данными исследований [2, 11]. Кроме того, по результатам нашей работы достоверно установлено, что средний уровень экспрессии в эпителиальных клетках аденом был ниже по сравнению с экспрессией в ткани аденокарцином.

В ткани ФР галектин-3 обнаружен не во всех случаях, а только в 86,7% случаев. При этом уровень экспрессии маркера в галектин-3-позитивных карциномах был достоверно выше по сравнению с ФА.

Во всех случаях сочетания карциномы и аденомы в ткани ФР и ФА было получено положительное окрашивание не только опухолевых клеток карциномы, но и клеток аденомы, однако в последних уровень экспрессии (до 20%) был достоверно ниже, чем в клетках карциномы (до 40%). Таким образом, при сочетании ФА и ФР обнаруживаются морфологические и молекулярные признаки атипии и полиморфизма в клетках не только злокачественной, но и доброкачественной опухолей (увеличение размера клеток, базофилия цитоплазмы, просветление ядер и появление ядерных борозд), выраженные в меньшей степени и при отсутствии инвазивного роста. Данный факт может быть объяснен с помощью теорий Шапота об уподоблении окружающей ткани опухо-

левой (1975 г.), а также теории “опухолевого поля” Willis (1967) [4]. На основании полученных данных в 3-й группе представляется возможным сделать заключение о наличии более высокого злокачественного потенциала клеток ФА при сочетании с ФР.

Таким образом, наше исследование показало, что галектин-3 не может применяться в качестве единственного маркера в дифференциальной диагностике рака и ФР ЩЖ. Однако определение экспрессии галектина-3 может иметь большое значение в комплексной диагностике фолликулярных опухолей ЩЖ, включающей клиничко-лабораторные методы, УЗИ, цитологическую и морфологическую верификацию опухоли. Полученные результаты находят подтверждение в работах других исследователей, показавших эффективность оценки галектина-3 в комплексе с другими онкомаркерами [3]. При экспрессии галектина-3 вероятность наличия злокачественного характера опухоли достоверно высокая.

В случае выявления фолликулярной аденомы с признаками атипии клеток обнаружение экспрессии галектина-3 свидетельствует о более высоком злокачественном потенциале клеток аденомы и требует онкологической настороженности в отношении возможного сочетания ее с карциномой ЩЖ, что должно определять выбор объема оперативного вмешательства.

Выводы

1. Галектин-3 экспрессируется в 53,3% случаев фолликулярных аденом. Средний уровень экспрессии в эпителиальных клетках аденом достоверно ниже по сравнению с фолликулярной карциномой.

2. В опухолевых клетках фолликулярного рака галектин-3 иммуногистохимически обнаруживается в 86,7%, в связи с чем галектин-3 не может применяться в качестве единственного маркера в дифференциальной диагностике рака и фолликулярной аденомы ЩЖ.

3. В фолликулярной аденоме при сочетании ее с фолликулярным раком имеется экспрессия галектина-3 во всех случаях, средний уровень которой достоверно ниже, чем в фолликулярном раке.

Список литературы

1. Антонова С.С., Юшков П.В. Галектин-3 как представитель семейства лектинов: роль в норме и патологии // Молекулярная медицина. 2004. №1. С. 60–64.
2. Абесадзе И.А. Дифференциальная диагностика фолликулярных опухолей щитовидной железы: Дис. ... канд. мед. наук. М., 2008.
3. Двинских Н.Ю. Морфологическая и иммуногистохимическая оценка злокачественности опухолей щитовидной железы: Дис. ... канд. мед. наук. М., 2010.

4. Краевский Н.А., Смольяников А.В., Саркисова Д.С. Патолого-анатомическая диагностика опухолей человека: Руководство для врачей. М.: Медицина, 1993. С. 349–362.
5. Пальцев М.А., Коган Е.А., Тунцова О.И. Иммуногистохимия биомолекулярных маркеров раннего рака щитовидной железы // Арх. патол. 1997. №6. С. 18–23.
6. Трошина Е.А., Платонова Н.М., Юшков П.В., Солдатова Т.В. Заболевания щитовидной железы. Ультразвуковая и морфологическая диагностика / Под общ. ред. Мельниченко Г.А. М.: РКИ Северо-пресс, 2008. С. 55–58.
7. Bartolazzi A., Gasbarri A. et al. Thyroid Cancer Study Group. Application of an immunodiagnostic method for improving preoperative diagnosis of nodular thyroid lesions // Lancet. 2001. N357. P. 1644–1650.
8. Bartolazzi A., Orlandi F. et al. Galectin-3-expression analysis in the surgical selection of follicular thyroid nodules with indeterminate fine-needle aspiration cytology: a prospective multicentre study // Lancet On-col. 2008. V. 9. N6. P. 508–510.
9. Beesley M.F., McLaren K.M. Cytokeratin 19 and galectin-3 immunohistochemistry in the differential diagnosis of solitary thyroid nodules // Histopathol. 2002. V. 41. N3. P. 236–243.
10. Gasbarri A., Martegani M.P. et al. Galectin-3 and CD44v6 isoforms in the preoperative evaluation of thyroid nodules // J. Clin. Oncol. 1999. V. 17. N11. P. 3494–3502.
11. Martins L., Matsuo S.E. et al. Galectin-3 messenger ribonucleic acid and protein are expressed in benign thyroid tumors // J. Clin. Endocrinol. Metab. 2002. V. 87. N10. P. 4806–4810.
12. Saggiorato E., Aversa S. et al. Galectin-3: presurgical marker of thyroid follicular epithelial cell-derived carcinomas // J. Endocrinol. Invest. 2004. V. 27. N24. P. 311–317.
13. Delellis R.A., Lyoid R.V., Heitz P.U. World Health Organization Classification of Tumors. Pathology & Genetics. Lyon: IARC Press, 2004.