

УДК 616.441-006.6:616-076.5:[546.15:615.849.2]

ГАННА ВОЛОДИМИРІВНА ЗЕЛІНСЬКА, АНДРІЙ МИКОЛАЙОВИЧ КВАЧЕНЮК,
ГАЛИНА МИКОЛАЇВНА КУЛІНІЧЕНКО, ГАННА ЯКІВНА УСТИМЕНКО,
ЮРІЙ МИХАЙЛОВИЧ БОЖОК

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

РАДІОЙОДОРЕЗИСТЕНТНІ МЕТАСТАЗИ ПАПІЛЯРНОГО РАКУ ЩИТОПОДІБНОЇ ЗАЛОЗИ ЯК ПРОЯВ ВНУТРІШНЬОПУХЛИННОЇ ФЕНОТИПІЧНОЇ ГЕТЕРОГЕННОСТІ

Явище внутрішньопухлинної фенотипічної гетерогенності може стати джерелом мультифокального росту та причиною неефективного лікування злоякісних пухлин.

Мета роботи. Дослідження явища фенотипічної гетерогенності (відмінність цитологічних та імуноцитохімічних характеристик тиреоцитів) у пунктатах папілярних карцином та їх метастазів (радіоїодорезистентних та радіоїодочутливих).

Матеріали та методи. Цитоморфологічні та імуноцитохімічні дослідження з використанням моноклональних антитіл до тиреоїдної пероксидази, тиреоглобуліну, антигену проліферуючих клітин, цитокератину 17 проводили на матеріалі тонкогілкової аспіраційної пункційної біопсії 45 первинних папілярних карцином та їх метастазів, виявлених до операції та на матеріалі 65 метастазів, виявлених в післяопераційному періоді (45 — радіоїодорезистентних метастазів, 20 — радіоїодочутливих).

Результати. Ми виявили ознаки фенотипічної гетерогенності (відмінність цитологічних та імуноцитохімічних характеристик тиреоцитів) між пухлинними осередками одного і того самого хворого в 14 % папілярних карцином з метастазами та в 70 % пацієнтів з багаторазово метастазуючими папілярними карциномами з тенденцією до зниження диференціювання тиреоцитів та втрати радіоїодочутливості від первинної папілярної карциноми до метастазів.

Висновки. Проведена робота демонструє можливість визначення цитологічних та імуноцитохімічних ознак фенотипічної внутрішньопухлинної гетерогенності в пунктатах, що є основою раннього доопераційного прогнозування агресивної поведінки тиреоїдних папілярних карцином та розвитку особливих терапевтичних підходів до таких пухлин.

Ключові слова: щитоподібна залоза, папілярна карцинома, матеріал тонкогілкової аспіраційної пункційної біопсії, радіоїодорефрактерні метастази, фенотипічна гетерогенність, внутрішньопухлинна гетерогенність, субклони.

Явище внутрішньопухлинної гетерогенності між різними пухлинними осередками одного і того самого хворого часто стає причиною неефективного лікування злоякісних пухлин [1, 2]. Радіоїодорезистентні метастази папілярних карцином (ПК) щитоподібної залози (ЩЗ) є найбільшою проблемою в лікуванні папілярного раку ЩЗ [3]. Саме радіоїодорезистентність ставить хворих на рак ЩЗ (РЩЗ) в загальний ряд із хворими на рак інших локалізацій, для яких не існує такого специфічного лікування, а інші методи лікування, такі як хімотерапія та променева терапія, не є ефективними. Проведені нами дослідження демонструють наявність цитологічних особливостей та фенотипічну гетерогенність популяції тиреоцитів радіоїодорезистентних метастазів папілярних карцином у порівнянні

з радіоїодочутливими. Проведення комплексних клініко-біологічних досліджень радіоїодорезистентних метастазів папілярного РЩЗ дозволяє розглядати їх як прояв внутрішньопухлинної фенотипічної гетерогенності, що дає можливість розробляти нові підходи до прогнозування та лікування таких метастазів.

МЕТОДИКА ДОСЛІДЖЕННЯ

У роботі використано матеріал, отриманий в результаті проведення тонкогілкових аспіраційних пункційних біопсій (ТАПБ) у пацієнтів чоловічої та жіночої статі віком від 8 до 40 років, що проходили обстеження, хірургічне лікування та радіоїодотерапію (РІТ) в Інституті ендокринології та обміну речовин. Цитоморфологічні та імуноцитохімічні дослідження проводили на матеріалі ТАПБ 45 первинних ПК та їх метастазів (М), виявлених до операції та на матеріалі 65 М, які виявили при сонографічному

© Г. В. Зелінська, А. М. Кваченюк, Г. М. Кулініченко,
Г. Я. Устименко, Ю. М. Божок, 2018

та сцинтиграфічному дослідженні пацієнтів у післяопераційному періоді, тобто після проведення тиреоїдектомії та РЙТ (45 — радіоїодорезистентних метастазів (РЙРМ), 20 — метастазів, які накопичували радіоїод). Імуноцитохімічні дослідження проводили непрямим імунопероксидазним методом за допомогою моноклональних антитіл (МКАТ) миші проти цитокератину 17 (ЦК17) — клон Е3, МКАТ ТРО-47 проти тиреоїдної пероксидази (ТПО), тиреоглобуліну (Тг), проти антигену проліферуючих клітин (Ki-67), антитіл проти g-глобулінів миші, мічених пероксидазою хрому (DakoCytomation, Данія).

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Проведення цитологічних досліджень показало, що у 14 % пацієнтів з ПК ЩЗ із наявністю регіонарних М, пункти первинної ПК та її М різко відрізнялися один від одного за цитологічними та імуноцитохімічними характеристиками, демонструючи фенотипічну гетерогенність (ФГ). Траплялися випадки, коли первинна ПК мала ознаки добре диференційованої ПК, пунктат був представлений регулярними тиреоїдними пластами клітин без виразних ознак атипії та поліморфізму та були відсутні особливі субпопуляції клітин (рис. АІ, А кол. вкл.). Водночас цитологічна картина пунктату М цього ж пацієнта не мала нічого спільного з цитограмою первинної ПК і була представлена нерегулярними тиреоїдними пластами, або розрізненими тиреоцитами з ознаками поліморфізму та атипії, зустрічалися особливі клітинні популяції [4] (рис. АІ, В кол. вкл.). Схожа ФГ спостерігалась також між двома або більше М одного і того ж пацієнта. Явище ФГ між пухлинними осередками одного і того самого пацієнта є типовим для багаторазово метастазуючих ПК. Так, у 70 % таких випадків пунктат М, який виникав через кілька років після проведення тиреоїдектомії та РЙТ, мав цитологічну та імуноцитохімічну картину добре диференційованої ПК, яка складалася з регулярних пластів тиреоцитів з високим рівнем експресії Тг та ТПО. Водночас М, який виникав через деякий час після ліквідації першого (радіоїодотерапія чи хірургічне видалення), за цитологічною картиною навіть не нагадував попередній. Іноді можна було навіть запідозрити низькодиференційовану карциному та лише слабка імуноцитохімічна реакція з визначенням Тг була доказом її тиреоїдного походження (рис. АІІ кол. вкл.). У одного з пацієнтів через 4 роки після видалення першого М, пунктат якого складався з однорідної популяції тиреоцитів, виявлено регіонарні шийні М, пунктат одного з яких був представлений переважно клітинами особливої популяції, а інший містив комплекси вакуолізованих клітин та псамомних тілець (рис. АІІІ кол. вкл.). Термін «гетерогенність пухлини» давно зустрічається в літературі та має на увазі існування низки відмінностей між клітинами в пухлині, клітинами первинної пухлини та М, клітинами різних М. Розрізняють внутрішньопухлинну, міжпухлинну ФГ та функціональну гетерогенність [5, 6]. Дані про існування ФГ між пухлинними осередками одного і того самого хворого або існування багатофокусного росту пухлин знаходять підтримку та пояснення в літературі.

Так, була описана генетична гетерогенність між різними осередками ПК ЩЗ при багатофокусному рості ПК за мутацією гена BRAF, частота зустрічальності якої складала від 4,8 до 39 % [7,8]. Зменшення кількості мутацій BRAF в М у порівнянні з первинною ПК пояснюють клональною еволюцією. Існують дані літератури як щодо єдиного походження первинних пухлин і М (рак простати), так і приклади, які підтверджують їх різне клональне походження, коли метастазування відбувається на ранньому етапі пухлинної прогресії (молочна залоза) [5]. Хоча багато пухлинних клітин здатні до раннього метастазування, лише ті, що придбали достатню кількість онкогенних мутацій, здатні ініціювати вторинні метастатичні пухлини.

Таким чином, ми спостерігали явище ФГ між пухлинними осередками одного і того самого пацієнта, яке можна пояснити поліклональною структурою популяції тиреоцитів ПК, різні субклони якої існують одразу або можуть з'явитися з часом. Явище внутрішньопухлинної гетерогенності, або ФГ між М, які виникли з різницею в декілька років, можна пояснити існуванням субклонів, які, на відміну від основної маси тиреоцитів, знищених радіоїодом, втратили з часом антигени та ферменти, причетні до накопичення радіоїоду та здатність до його акумуляції та «перечекали» РЙТ у кровотоці. З часом їх мутаційний агресивний потенціал був реалізований при формуванні нових М, наділених більш агресивними якостями, та клітини, з яких вони склалися, за фенотипічними характеристиками навіть не нагадували попередні. Для клітин таких М є характерними зниження експресії Тг та ТПО і високий проліферативний потенціал (Ki-67-позитивні клітини складали 7–12 % в РЙРМ порівняно із загальною популяцією ПК, де їх вміст складав до 5 % тиреоцитів).

За даними літератури, внутрішньопухлинна гетерогенність лежить в основі пухлинної прогресії та корелює з її мультицентричністю. Мультифокальність пухлин є незалежним фактором ризику метастазування, тобто ПК із наявністю М мають більш високий ризик рецидування. Дані клінічних досліджень демонструють, що пацієнти, в яких є більше двох пухлинних фокусів, мають вищу вірогідність рецидивів та смерті від раку, ніж уніфокальні ПК, і гірший прогноз у відношенні до абляції радіоїодом та потребують ретельного спостереження [9, 10]. Враховуючи зазначену кореляцію внутрішньопухлинної гетерогенності тиреоїдних карцином з їх мультицентричністю та несприятливим прогнозом, цитологічно визначену ФГ між пухлинними осередками ПК (первинна ПК та М або між метастатичними осередками), можна розглядати як додатковий фактор прогнозу несприятливої поведінки ПК.

Існування ФГ та генетичної гетерогенності між пухлинними осередками одного і того самого пацієнта ставить під сумнів можливість прогнозування поведінки пухлини за будь-якими факторами взагалі. Ці розмірковування знаходять підтвердження в експериментах, проведених на мишах, які демонструють, що неможливо спрогнозувати поведінку пухлин, які виникають у результаті трансплантації суміші пухлинних клонів за поведінкою пухлин, отриманих

з окремих клонів [16]. Існують дві основні концепції походження гетерогенності пухлинних клітин: їх різні субтипи виникають з різних стовбурових клітин (концепція стовбурової клітини) або внаслідок генетичних або епігенетичних змін однієї стовбурової клітини (концепція клональної еволюції). Пухлина, як динамічне створіння багатьох інтерактивних субпопуляцій (пухлинних клітин та мікрооточення), з часом зазнає гетерогенних змін її властивостей внаслідок її прогресії, дисемінації та колонізації. Враховуючи це, висловлюємо думку, що неможливо прогнозувати поведінку пухлини на основі характеристик її окремих клонів [8–11]. Поряд із цим проведена нами робота свідчить про можливість прогнозування радіоїодорезистентності за наявності цитологічних прогностичних факторів (висока експресія ЦК17 у первинній ПК та ФГ і відсутність ТПО в післяопераційних М) з великою часткою вірогідності [12]. Слід пам'ятати, що коли відсутність таких факторів у первинній пухлині не завжди є гарантією їх відсутності та сприятливого прогнозу в подальшому, то їх наявність у первинній ПК однозначно свідчить на користь агресивної поведінки ПК, розвиток РЙРМ та потребує індивідуального підходу до таких пацієнтів (ретельний нагляд, додаткові до сцинтиграфії методи виявлення М).

За даними літератури та нашими спостереженнями, співіснування різних пухлинних субклонів може мати клінічні наслідки для прогресу захворювання, діагностики та терапії пухлин. Існування клональної гетерогенності має враховуватися при розробці методів таргетної терапії, оскільки генетична гетерогенність пухлин означає високу вірогідність існування та прогресії пухлинних клонів, резистентних до загальноприйнятої терапії, що ми, вірогідно, спостерігаємо при розвитку РЙРМ ПК. Експериментальні пухлини, які склалися з безлічі клонів клітин, проявляли відмінну від моноклональних пухлин чутливість до цитотоксичних препаратів, оскільки клональні

взаємодії можуть як стимулювати, так і пригнічувати терапевтичний ефект [2, 13]. Дослідження показали, що індекс клональної гетерогенності є досить точним предиктором злоякісної прогресії у разі раку стравоходу та може використовуватися при визначенні тактики терапії. Автори вважають, що визначення ступеня молекулярної та клітинної гетерогенності навіть невеликої первинної пухлини має велике прогностичне значення [14].

Таким чином, внутрішньопухлинна ФГ клітин може бути «полігоном» для появи пухлинних субклонів з більш агресивним потенціалом у порівнянні із загальною популяцією клітин, які розвивають резистентність до загальних терапевтичних засобів та можуть бути джерелом розвитку РЙРМ ПК. Проведена робота демонструє можливість визначення цитологічних та імуноцитохімічних ознак фенотипічної внутрішньопухлинної гетерогенності, що є основою раннього доопераційного прогнозування агресивної поведінки ПК ЩЗ та розвитку особливих терапевтичних підходів до таких пухлин.

ВИСНОВКИ

1. При цитологічному дослідженні ПК із наявністю М в 14 % випадків була виявлена виразна ФГ між первинною ПК та її М.

2. В 70 % ПК з багаторазовим метастазуванням спостерігалася ФГ між ПК та М, виявленими через деякий час, та ФГ між різними метастатичними осередками з тенденцією до зниження диференціювання тиреоцитів та втрати радіоїодочутливості від первинної ПК до М.

3. Проведена робота демонструє можливість визначення цитологічних та імуноцитохімічних ознак фенотипічної внутрішньопухлинної гетерогенності, що є основою раннього доопераційного прогнозування агресивної поведінки ПК ЩЗ та розвитку особливих терапевтичних підходів до таких пухлин.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. *Intratumor heterogeneity and clonal evolution in an aggressive papillary thyroid cancer and matched metastases* / S. Le Penec, T. Konopka, D. Gacquer, D. Fimereli et al. // *Endocr Relat Cancer*. — 2015. — N 22. — P. 205–16.
2. *Salvador J. Diaz-Cano*. Tumor Heterogeneity: Mechanisms and Bases for a Reliable Application of Molecular Marker Design / J. Diaz-Cano Salvador // *Int. J. Mol. Sci.* — 2012. — N 13. — P. 1951–2011.
3. *Busaidy N*. Differentiated Thyroid Cancer: Management of Patients with Radioiodine Nonresponsive Disease / N. Busaidy, Lamki, M. E. Cabanillas // *J. Thyroid Research*. — 2012, N 2. Article ID 618985, 12 pages <http://dx.doi.org/10.1155/2012/618985>
4. *Субклональна структура популяції тиреоцитів радіоїодорефрактерних та радіоїодочутливих метастазів папілярного раку щитоподібної залози* // Г. В. Зелінська, Г. М. Кулініченко, Г. Я. Устименко, та ін. // *Укр. радіол. журн.* — 2016. — Т. XXIV, Вип. 3. — С. 15–19.
5. *Чехун В. Ф.* Гетерогенность опухоли — динамическое состояние / В. Ф. Чехун, С. Д. Щербин, З. Д. Савцова // *Онкология*. — 2012. — Т. 14, № 1. — С. 4–12.
6. *Marusyka A*. Tumor heterogeneity: causes and consequences / A. Marusyka, K. Polak // *Biochim Biophys. Acta.* — 2010. — Vol. 1805, N 1. — P. 105–17.
7. *Walts A. E*. BRAF genetic heterogeneity in papillary thyroid carcinoma and its metastasis // A. E. Walts, A. Pao, W. Sacks, S. Bose // *Human Pathology*. — 2014. — N 45. — P. 935–941.
8. *BRAF^{V600E} Mutation: Has It a Role in Cervical Lymph Node Metastasis of Papillary Thyroid Cancer* / Neslihan Kurtulmus, Burak Ertas, Yesim Saglican, et al. // *Eur. Thyroid. J.* — 2016, Sep. — N 5. — P. 195–200.
9. *Papillary microcarcinoma of the thyroid-Prognostic significance of lymph node metastasis and multifocality* / S. M. Chow, S. C. Law, J. K. Chan, S. K. Au, S. Yau et al. // *Cancer*. — 2003. — Vol. 98. — P. 31–40.
10. *Molecular definition of breast tumor heterogeneity* // M. Shipitsin, L. L. Campbell, P. S. Argani et al. // *Cancer Cell*. — 2007. — N 11. — P. 259–73.

11. *Visvader J. E.* Cells of origin in cancer / J. E. Visvader // *Nature*. — 2011. — N 469. — P. 314–22.
12. *Цитологічні* досягнення у прогнозуванні радіоїодорезистентності папілярного раку щитоподібної залози в допомогу радіологам / Г. В. Зелінська, В. В. Марков, Г. М. Кулініченко та ін. // *Укр. радіол. журн.* — 2013. — Т. XXI, вип. 3. — С. 313–315.
13. *Leith J. T.* Growth properties of artificial heterogeneous human colon tumors / J. T. Leith, S. Michelson, L. E. Faulkner, S. F. Bliven // *Cancer Res.* — 1987. — № 47. — P. 1045–1051.
14. *Genetic clonal diversity predicts progression to esophageal adenocarcinoma* / C. C. Maley, P. C. Galipeau, J. C. Finley et al. // *Nat. Genet.* — 2006. — № 38. — P. 468–473.

Стаття надійшла до редакції 30.05.2018.

A. B. ZELINSKAYA, A. N. KVACHENYUK, G. N. KULINICHENKO, A. YA. USTIMENKO, YU. M. BOZHOK

ГУ «Інститут ендокринології та обміну речовин ім. В. П. Комисаренка НАМН України», Київ

РАДИОЙОДРЕЗИСТЕНТНЫЕ МЕТАСТАЗЫ ПАПИЛЛЯРНОГО РАКА ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ КАК ПРОЯВЛЕНИЕ ВНУТРИОПУХОЛЕВОЙ ФЕНОТИПИЧЕСКОЙ ГЕТЕРОГЕННОСТИ

Явление внутриопухолевой фенотипической гетерогенности может стать источником мультифокального роста и причиной неэффективного лечения злокачественных опухолей.

Цель работы. Исследование явления фенотипической гетерогенности (отличие цитологических и иммуноцитохимических характеристик тироцитов) в пунктатах папиллярных карцином и их метастазов (радиоїодрезистентных и радиоїодчувствительных).

Материалы и методы. Цитоморфологические и иммуноцитохимические исследования с применением моноклональных антител к тироидной пероксидазе, тироглобулину, антигену пролиферирующих клеток, цитокератину 17 проводили на материале тонкоигольной аспирационной пункционной биопсии 45 первичных папиллярных карцином и их метастазов, выявленных до операции и на материале 65 метастазов, выявленных в послеоперационном периоде (45 — радиоїодрезистентных, 20 — радиоїодчувствительных).

Результаты. Мы выявили признаки фенотипической гетерогенности (отличие цитологических и иммуноцитохимических характеристик тироцитов) между опухолевыми очагами одного и того же пациента в 14 % папиллярных карцином с метастазами и у 70 % пациентов с повторно метастазирующими папиллярными карциномами с тенденцией к снижению дифференцировки тироцитов и утраты радиоїодчувствительности от первичной папиллярной карциномы до метастазов.

Выводы. Проведенная работа демонстрирует возможность выявления цитологических и иммуноцитохимических признаков фенотипической внутриопухолевой гетерогенности в пунктатах, что является основой раннего дооперационного прогнозирования агрессивного поведения папиллярных карцином щитовидной железы и разработки особых терапевтических подходов к таким опухолям.

Ключевые слова: щитовидная железа, папиллярная карцинома, материал тонкоигольной аспирационной пункционной биопсии, рецидивы, радиоїодрефрактерные метастазы, фенотипическая гетерогенность, внутриопухолевая гетерогенность, субклоны.

A. V. ZELINSKAYA, A. N. KVACHENYUK, G. N. KULINICHENKO, A. YA. USTIMENKO, YU. M. BOZHOK

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

RADIOIODINE-REFRACTORY METASTASES OF PAPILLARY THYROID CARCINOMA AS A MANIFESTATION OF INTRA-TUMOR PHENOTYPIC HETEROGENEITY

The phenomenon of intra-tumor phenotypic heterogeneity can be the source of multifocal growth and the cause of ineffective treatment of malignant tumors. We revealed signs of phenotypic heterogeneity (difference in cytological and immunocytochemical characteristics of thyrocytes) between the tumor sites of the same patient in 14% of papillary carcinoma with metastases and 70% of patients with recurrent papillary carcinomas with repeated metastases. The study demonstrates the possibility of identification of cytological and immunocytochemical signs of phenotypic intra-tumor heterogeneity, which is the basis of early preoperative prediction of aggressive behavior of thyroid papillary carcinoma and development of special therapeutic approaches to such tumors.

Keywords: papillary thyroid carcinoma, fine needle aspiration biopsy, cytological diagnosis, recurrence of papillary cancer, radioiodine-refractory metastases, intra-tumor phenotypic heterogeneity, subclones.

Контактна інформація:

Зелінська Ганна Володимирівна

кандидат біологічних наук, старший науковий співробітник відділення функціональної діагностики ДУ «Інститут ендокринології та обміну речовин ім. В. П. Комисаренка НАМН України»

вул. Вишгородська, 69, м. Київ, 04114, Україна

тел.: +38 (044) 431-02-96, (050) 617-19-28

E-mail: ann.zelinskaya@ukr.net