

Можливості імуноцитохімічного визначення експресії НВМЕ-1 у діагностичному пошуку диференційованої карциноми щитоподібної залози. Власне дослідження



О. П. Нечай, Н. І. Белемєць, В. О. Паламарчук,
Д. М. Квітка, Є. С. Козачук, О. А. Товкай

Український науково-практичний центр ендокринної хірургії,
трансплантації ендокринних органів і тканин
Міністерства охорони здоров'я України, Київ

Диференційована карцинома щитоподібної залози (ДКЩЗ), папілярний і фолікулярний варіанти, є поширеною злоякісною пухлиною голови та шиї [1]. Клінічно ДКЩЗ характеризується відносно високою злоякісністю та повільним ростом пухлини, однак інвазію й метастази вважають основними чинниками, що призводять до рецидиву пухлини та смерті пацієнтів. Тому рання діагностика і хірургічне втручання, яке є основним методом лікування, — запорука сприятливого прогнозу [2]. Морфологічне дослідження є золотим стандартом у верифікації ДКЩЗ, але цитологічні збіги між фолікулярною аденомою, папілярною карциномою та багатовузловим зобом, які демонструють ознаки папілярного брунькування, зумовлюють діагностичну дилему [3]. Неправильна діагностика й інтерпретація даних морфологічного дослідження може призвести до значних соціальних і психологічних проблем та збільшення витрат на охорону здоров'я. Застосування імуноцитохімічного (ІЦХ) та імуногістохімічного (ІГХ) дослідження підвищує частоту виявлення ДКЩЗ у сумнівних морфологічних випадках. Маркер

мезотеліальних клітин (Hector Battifora mesothelial-1 (НВМЕ-1)) — поширений молекулярний маркер пухлин, який використовують для діагностики та прогнозування ДКЩЗ [4]. За останнє десятиліття досліджено вияви НВМЕ-1 у доброякісних і злоякісних ураженнях щитоподібної залози (ЩЗ) на гістопатологічних зразках, тоді як його ІЦХ-застосування недостатньо вивчено.

Мета роботи — дослідити варіанти експресії НВМЕ-1 на цитологічному матеріалі, класифікованому за категоріями Bethesda як сумнівні (III, IV, V), оцінити значення тесту експресії НВМЕ-1 на відповідному гістологічному матеріалі вузлового зоба, фолікулярної пухлини з невизначеним потенціалом злоякісності для диференційної діагностики карциноми щитоподібної залози.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Відібрано 14 пацієнтів із вузовими утвореннями ЩЗ, які за результатом цитологічного дослідження мали сумнівну («Gray zone») категорію Bethesda: III — 5 випадків, IV — 5, V — 4.

Нечай Олександр Павлович, к. мед. н., ст. наук. співр., зав. відділу патології. ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-5978-4458>; Белемєць Наталія Іванівна, зав. відділення цитології; Паламарчук Володимир Олександрович, д. мед. н., старший дослідник. E-mail: paldoc@i.ua. ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-9554-4817>; Квітка Дмитро Миколайович, лікар-хірург. E-mail: dnkvitka@gmail.com. ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-7606-8365>; Козачук Єлизавета Сергіївна, к. мед. н., вчений секретар. ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-2453-2496>; Товкай Олександр Андрійович, д. мед. н., проф., директор Українського науково-практичного центру ендокринної хірургії, трансплантації ендокринних органів і тканин Міністерства охорони здоров'я України. E-mail: director.tovkai@gmail.com. ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-1329-279X>

Усіх пацієнтів прооперовано в Українському науково-практичному центрі ендокринної хірургії, трансплантації ендокринних органів і тканин МОЗ України у 2022 р. За патогістологічним висновком (ПГВ) діагностовано вузловий зоб (ВЗ) у 6 випадках, фолікулярну пухлину з невизначеним потенціалом злоякісності (ФПНПЗ) — у 4, ДКЩЗ — у 4 (папілярна форма — у 3, фолікулярна — у 1). У всіх випадках цитологічне та гістологічне дослідження доповнювали ІЦХ- та ІГХ-дослідженням з використанням мишачих моноклональних антитіл проти людського HBME-1 (1 : 500; кат. № BSB 3459; «Bio SB» «Bioscience for the World» Santa Barbara, США) та системи візуалізації фірми DACO (Німеччина). Процедура проводилася відповідно до інструкцій [5]. Результати ІЦХ- та ІГХ-досліджень оцінювали за інтенсивністю забарвлення (0 балів — відсутність кольору, 1 бал — слабо позитивний неглибокий жовтий колір, 2 бали — помірно виразний жовтий, 3 бали — яскраво виразний коричневий) та часткою наявних в цитоплазмі клітин (0 балів — 0 %, 1 бал — 1—25 %, 2 бали — 26—50 %, 3 бали — 51—75 %, 4 бали — 76—100 %). Сума двох оцінок представляла ІЦХ- та ІГХ-оцінку. Зразок із оцінкою > 6 балів вважали позитивним. Під мікроскопом (× 400) у кожній секції випадково вибирали 5 типових зон та в полі зору проводили підрахунок клітин, розраховували середнє значення.

РЕЗУЛЬТАТИ

Проведено цитологічне дослідження (n = 14) з визначенням ІЦХ експресії HBME-1. Результат був негативним у 9 хворих, позитивним — у 5. ІГХ-

дослідження показало, що експресія HBME-1 була відповідною та корелювала з ІЦХ-зразками (табл. 1).

За результатами гістологічного дослідження, у хворих без експресії HBME-1 (n = 9) за ПГВ діагностовано ВЗ у 6 випадках, ФПНПЗ — у 3, у хворих із експресією HBME-1 (n = 5) за ПГВ — ФПНПЗ — у 1, ДКЩЗ — у 4 (папілярний — у 3, фолікулярний — у 1). Таким чином, у хворих без експресії HBME-1 за результатом ІЦХ-дослідження після операції не діагностували ДКЩЗ за ПГВ на відміну від хворих із експресією HBME-1, у яких у 4 випадках встановлено ДКЩЗ.

Серед хворих із категорією III за Bethesda (n = 5) ВЗ за ПГВ діагностовано у 4 без експресії HBME-1, ФПНПЗ — у 1 з експресією HBME-1, серед пацієнтів із категорією IV (n = 5) ВЗ — у 2 без експресії HBME-1, ФПНПЗ — у 1, серед осіб з експресією HBME-1 ДКЩЗ — у 2 (папілярний — у 1, фолікулярний — у 1), серед хворих із категорією V (n = 4) усі пацієнти без експресії HBME-1 (n = 2) за ПГВ мали ФПНПЗ, усі пацієнти з експресією HBME-1 (n = 2) — ДКЩЗ (папілярна форма). Прослідковується закономірність: при збільшенні класу за Bethesda та очікуваному відповідному збільшенні випадків ДКЩЗ спостерігається кореляція з позитивною експресією HBME-1 за результатом ІЦХ-дослідження (див. табл. 1).

Для оцінки значущості отриманих результатів та їх статистичної достовірності застосовано статистичне програмне забезпечення для біомедичних досліджень «MedCalc» (табл. 2).

Як ілюстрації наводимо зразки експресії HBME-1 за даними ІЦХ- та ІГХ-дослідження відповідно до категорії Bethesda та ПГВ (рис. 1—4).

Таблиця 1

Порівняння результатів цитологічного дослідження та патогістологічного висновку до імуноцитохімічної та імуногістохімічної експресії HBME-1

Цитологічний висновок ІЦХ-експресія за Bethesda	HBME-1	Патогістологічний висновок			
		Вузловий зоб	ФПНПЗ	Папілярний рак ЩЗ	Фолікулярний рак ЩЗ
Клас III (n = 5)	– (n = 4)	4	–	–	–
	+ (n = 1)	–	1	–	–
Клас IV (n = 5)	– (n = 3)	2	1	–	–
	+ (n = 2)	–	–	1	1
Клас V (n = 4)	– (n = 2)	–	2	–	–
	+ (n = 2)	–	–	2	–

Примітка. «–» експресії HBME-1 немає; «+» експресія HBME-1.

Таблиця 2

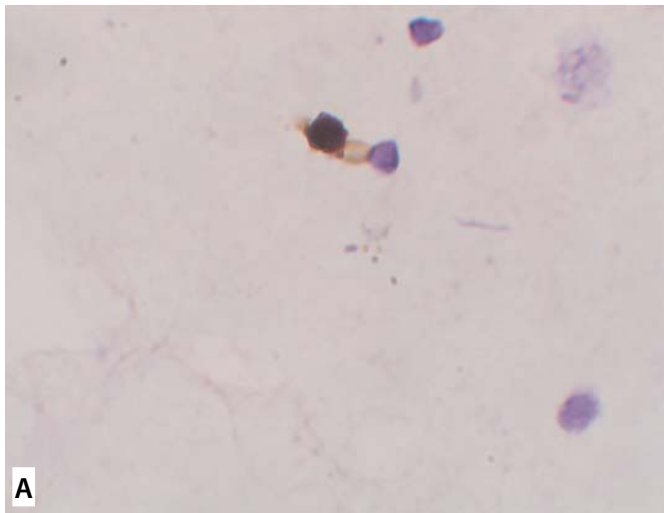
Основні операційні характеристики («MedCalc»), %

Показник	Значення (95 % ДІ)
Чутливість	100,0 (39,8—100,0)
Специфічність	90,0 (55,5—99,7)
Прогностична значущість позитивного результату	80,0 (38,4—96,3)
Прогностична значущість негативного результату	100,0
Діагностична ефективність	92,9 (66,1—99,8)

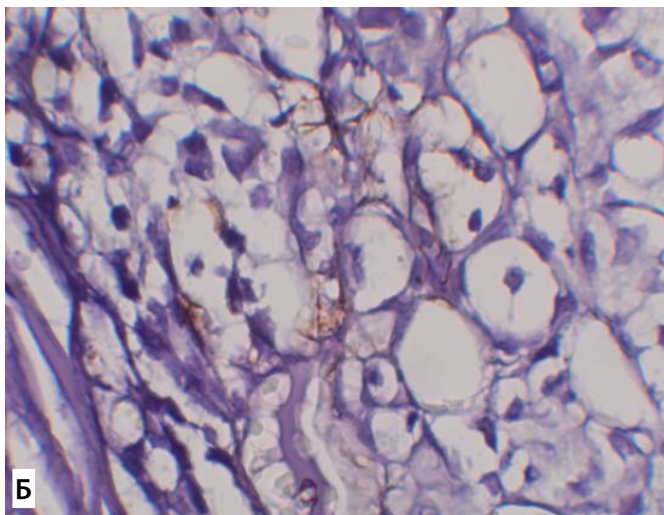
ДІ — довірчий інтервал.

ОБГОВОРЕННЯ

Морфологічне дослідження залишається золотим стандартом у верифікації ДКЩЗ, яка ґрунтується на ядерних ознаках (гіпохромія ядер, видовження клітини, мікроядра та псевдовключення, інвагінація цитоплазми в ядро). Морфологічні збіги між фолікулярною аденомою, папілярною карциномою та багатовузловим зобом, які демонструють ознаки папілярного брунькування, ускладнюють діагностику [3]. Поліпшити доопераційну діагностику допомагає ІЦХ-дослідження з різними маркерами. Одним із запропонованих маркерів, який демонструє високу

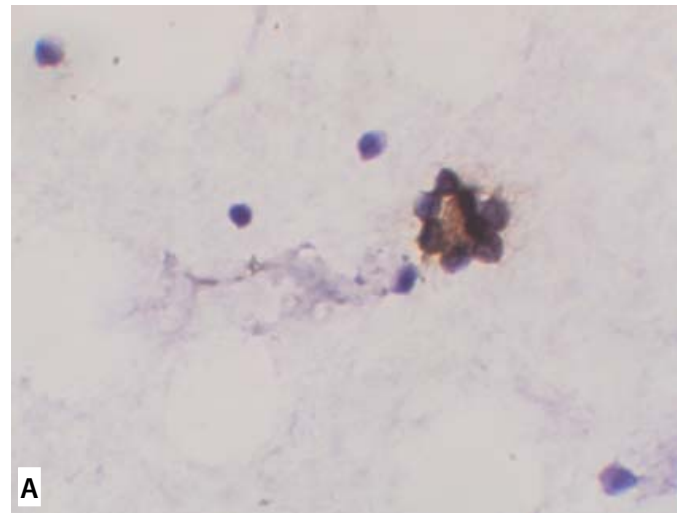


А

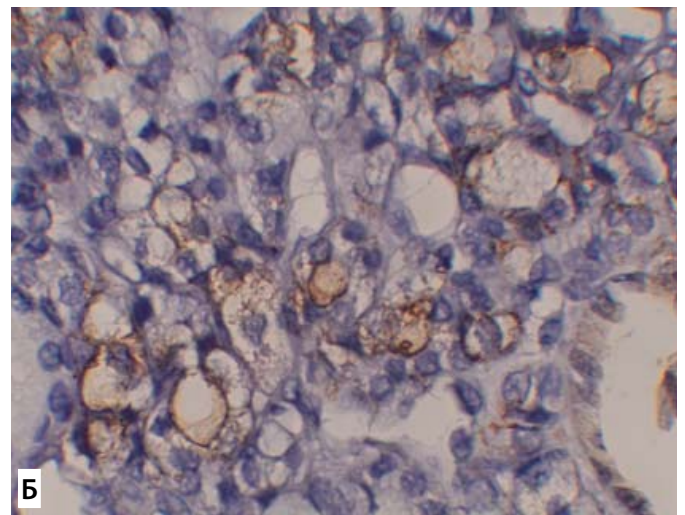


Б

Рис. 1. Цитологічний матеріал з категорією III за Bethesda (А) та гістологічний зразок ФНПЗ на тлі тиреоїдиту (Б). В ІЦХ-зразку реакція НВМЕ-1 позитивна, лише в поодиноких ізольованих фолікулярних клітинах становить 12 %, у ІГХ-зразку вона наявна у фолікулярних клітинах, яскраво виражена фокально у 15 % клітин. Варта уваги негативна реакція в лімфоїдних клітинах



А



Б

Рис. 2. Цитологічний матеріал з категорією IV за Bethesda (А) і гістологічний зразок фолікулярного раку ЩЗ (Б). В ІЦХ-зразку реакція НВМЕ-1 позитивна в значній кількості мікрофолікулярних структур — 74 %, у ІГХ-зразку — вона яскраво виражена в мікрофолікулах — 85 %

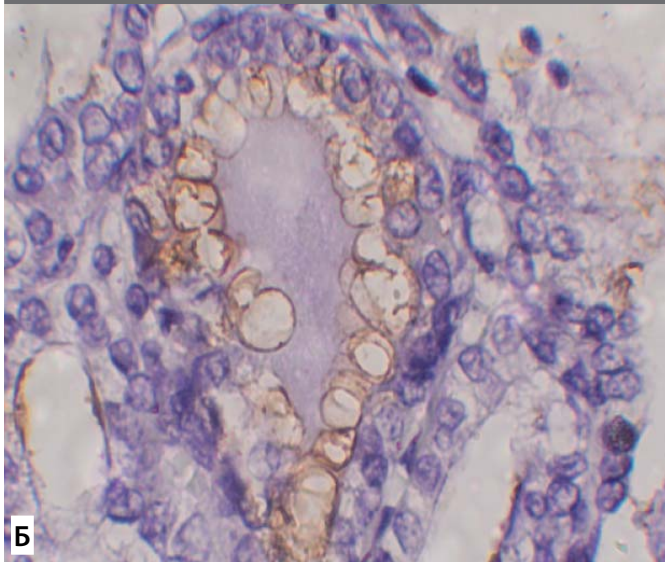
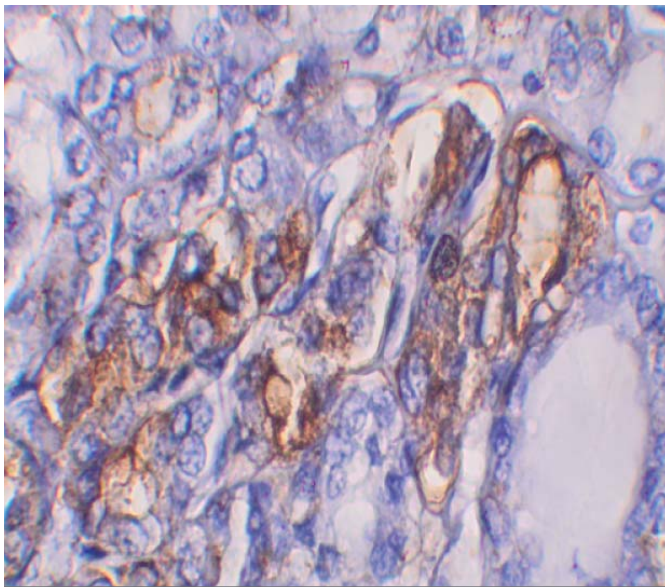
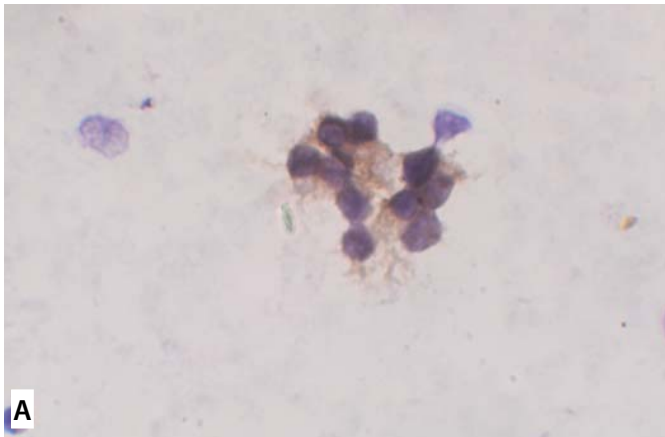


Рис. 3. Цитологічний матеріал з категорією V за Bethesda (А) і гістологічний зразок папілярного раку ЩЗ (Б). В ІЦХ-зразку реакція HBME-1 позитивна в невеликих папілярних структурах, а також у більшості мікроструктур — 78 %, у ІГХ-зразку — у 83 % мікрофолікулів та папіл

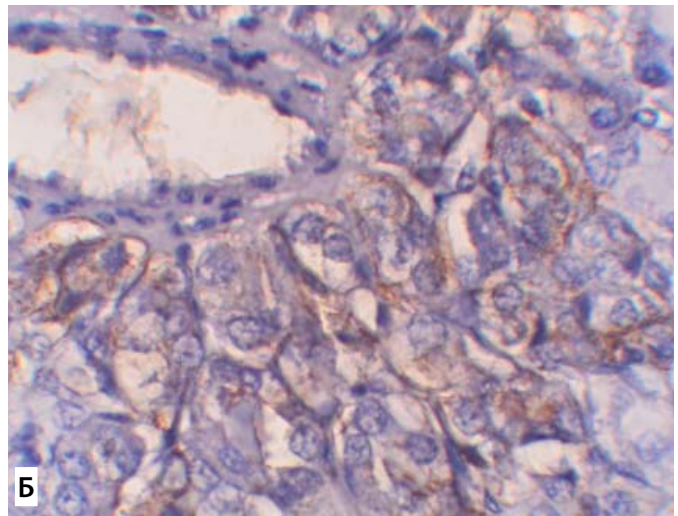
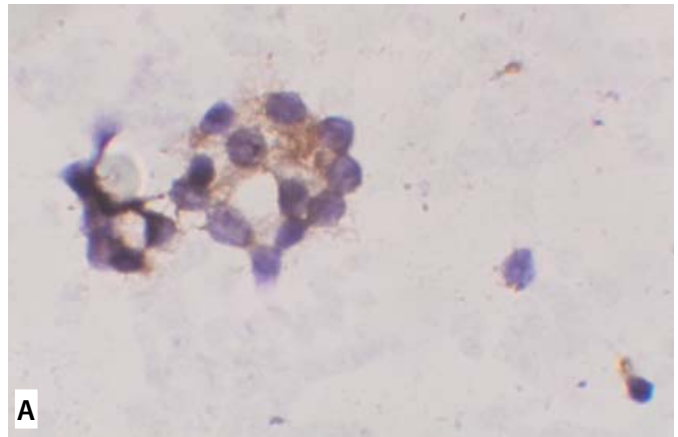


Рис. 4. Цитологічний матеріал з категорією Bethesda IV (А) та гістологічний зразок фолікулярний варіант раку ЩЗ (Б). В ІЦХ-зразку реакція HBME-1 позитивна в більшості мікроструктур — 75 %, у ІГХ-зразку — у 79 % мікрофолікулів, переважно біля судин

специфічність (63—94 %) є HBME-1 [4], мембранний антиген, який міститься в мікроворсинках мезотеліальних клітин. Його функція точно не встановлена. Застосування HBME-1 набуло популярності протягом останніх 10 років, оскільки було досліджено його вияв у доброякісних і злоякісних ураженнях ЩЗ. У нормальній тканині ЩЗ експресія HBME-1 відсутня, але цей маркер надмірно виразний у злоякісних пухлинах, особливо в папілярній карциномі ЩЗ. У кількох дослідженнях виявлено різні експресії HBME-1 у різних типах тканин ДКЩЗ. Показано, що HBME-1 надмірно експресується у 78,8 % злоякісних пухлин ЩЗ, 87,3 % папілярної карциноми ЩЗ та 65,2 % фолікулярної карциноми ЩЗ. Доведено, що HBME-1 виявляє злоякісні пухлини ЩЗ зі специфічністю 82,1 % [6].

Комбіноване застосування маркерів HBME-1, GAL-3 і TROP-1 у вигляді панелі є сучасним методом для визначення злоякісності новоутворень ЩЗ, оскільки комбінована імунопозитивність для Gal-3, TROP-1 і HBME-1 демонструє високу чутливість (95 %) і специфічність (97 %) для діагностики ДКЩЗ [7—9]. Це дослідження широко не застосовують в Україні. Важливо, що експресія зазначених маркерів не є прогностичною ознакою клінічної агресивності пухлини і не може бути використана для визначення обсягу оперативного втручання [9, 10].

У нашому дослідженні прогностична значущість позитивного результату становила 80 % (95 % ДІ 38,4—96,3 %), діагностична ефективність — 92,9 % (95 % ДІ 66,1—99,8 %). Високі значення показників свідчать про великий потенціал тесту, але через невелику кількість спостережень їхні довірчі інтервали дуже широкі. Для отримання точніших значень необхідно провести додаткові дослідження на більших групах хворих різних класів «Gray zone».

ВИСНОВКИ

Позитивна реакція HBME-1 у ІЦХ- та ІГХ-дослідженнях є ефективною щодо виявлення ДКЩЗ.

Білок HBME-1 може бути ІЦХ-маркером для диференціації доброякісних і злоякісних вузлових утворень ЩЗ.

Необхідно продовжити дослідження для отримання достовірніших статистичних даних щодо використання HBME-1 для виявлення різних уражень ЩЗ.

Застосування HBME-1 як ІЦХ-маркера допоможе зменшити кількість зайвих хірургічних видалень доброякісних утворень, що поліпшить якість життя пацієнтів і зменшить навантаження на медичні служби.

Конфлікту інтересів немає.

Участь авторів: концепція і дизайн дослідження — О. П. Нечай, О. А. Товкай; збір та опрацювання матеріалу — О. П. Нечай, Н. І. Белемєць, В. О. Паламарчук, Д. М. Квітка, Є. С. Козачук; написання тексту — О. П. Нечай; редагування — В. О. Паламарчук, О. А. Товкай

ЛІТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Asa SL, Giordano TJ, LiVolsi VA. Implications of the TCGA genomic characterization of papillary thyroid carcinoma for thyroid pathology: does follicular variant papillary thyroid carcinoma exist? *Thyroid*. 2015 Jan;25(1):1-2. doi: 10.1089/thy.2014.0540. PMID: 25409450.
2. Yuan Y, Sun C, Yin T, Shao C, Pan B, Lu D, Hou S, Lowe S, Bentley R, Chen S, Huang C, Cheng C, Li Y, King B, Zhou Q, Yan C, Zhang F. Comparison of endoscopic thyroidectomy by complete areola approach and conventional open surgery in the treatment of differentiated thyroid carcinoma: A retrospective study and meta-analysis. *Front Surg*. 2022 Dec 20;9:1000011. doi: 10.3389/fsurg.2022.1000011. PMID: 36605164; PMCID: PMC9807756.
3. Paschke R, Lincke T, Müller SP, Kreissl MC, Dralle H, Fassnacht M. The Treatment of Well-Differentiated Thyroid Carcinoma. *Dtsch Arztebl Int*. 2015 Jun 26;112(26):452-8. doi: 10.3238/arztebl.2015.0452. PMID: 26205749; PMCID: PMC4515787.
4. De Matos PS, Ferreira AP, de Oliveira Facuri F, Assumpção LV, Metze K, Ward LS. Usefulness of HBME-1, cytokeratin 19 and galectin-3 immunostaining in the diagnosis of thyroid malignancy. *Histopathology*. 2005 Oct;47(4):391-401. doi: 10.1111/j.1365-2559.2005.02221.x. PMID: 16178894.
5. Sadamori H, Yagi T, Iwagaki H, Matsuda H, Shinoura S, Umeda Y, Ohara N, Yanai H, Ogino T, Tanaka N. Immunohistochemical staining of liver grafts with a monoclonal antibody against HCV-Envelope 2 for recurrent hepatitis C after living donor liver transplantation. *J Gastroenterol Hepatol*. 2009 Apr;24(4):574-80. doi: 10.1111/j.1440-1746.2008.05638.x. PMID: 19368635.
6. Rossi ED, Straccia P, Palumbo M, Stigliano E, Revelli L, Lombardi CP, Santeusano G, Pontecorvi A, Fadda G. Diagnostic and prognostic role of HBME-1, galectin-3, and β -catenin in poorly differentiated and anaplastic thyroid carcinomas. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2013 May;21(3):237-41. doi: 10.1097/PAI.0b013e3182688d0f. PMID: 23235344.
7. Baloch ZW, Asa SL, Barletta JA, Ghossein RA, Juhlin CC, Jung CK, LiVolsi VA, Papotti MG, Sobrinho-Simões M, Tallini G, Mete O. Overview of the 2022 WHO Classification of Thyroid Neoplasms. *Endocr Pathol*. 2022 Mar;33(1):27-63. doi: 10.1007/s12022-022-09707-3. Epub 2022 Mar 14. PMID: 35288841.
8. Trimboli P, Guidobaldi L, Amendola S, Nasrollah N, Romanelli F, Attanasio D, Ramacciato G, Saggiorato E, Valabrega S, Crescenzi A. Galectin-3 and HBME-1 improve the accuracy of core biopsy in indeterminate thyroid nodules. *Endocrine*. 2016 Apr;52(1):39-45. doi: 10.1007/s12020-015-0678-7. Epub 2015 Jul 4. PMID: 26142180.
9. Arcolia V, Journe F, Renaud F, Leteurtre E, Gabius HJ, Rimmelink M, Saussez S. Combination of galectin-3, CK19 and HBME-1 immunostaining improves the diagnosis of thyroid cancer. *Oncol Lett*. 2017 Oct;14(4):4183-4189. doi: 10.3892/ol.2017.6719. Epub 2017 Aug 4. PMID: 28943926; PMCID: PMC5592881.
10. Crescenzi A, Baloch Z. Immunohistochemistry in the pathologic diagnosis and management of thyroid neoplasms. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2023 May 31;14:1198099. doi: 10.3389/fendo.2023.1198099. PMID: 37324272; PMCID: PMC10266214.

РЕЗЮМЕ

Мета роботи — дослідити варіанти експресії HBME-1 на цитологічному матеріалі, класифікованому за категоріями Bethesda як сумнівні (III, IV, V),

оцінити значення тесту експресії HBME-1 на відповідному гістологічному матеріалі вузлового зоба, фолікулярної пухлини з невизначеним потенціалом злоякісності для диференційної діагностики карциноми щитоподібної залози (ЩЗ).

Матеріали та методи. Проаналізовано дані 14 пацієнтів із вузовими ураженнями ЩЗ та цитологічними категоріями Bethesda III, IV і V («Gray zone»). Експресію HBME-1 визначали за результатами імуноцитохімічного (ІЦХ) та імуногістохімічного (ІГХ) фарбування з використанням мишачих моноклональних антитіл до HBME-1 людини (1 : 500; кат. № BSB 3459; «Bio SB» «Bioscience for the World», США). Ступінь експресії HBME-1 розраховували як суму балів за інтенсивністю фарбування та квадратом кількості наявних в цитоплазмі клітин в ІГХ-зразку. Зразок із оцінкою > 6 балів вважали позитивним.

Результати. Серед 14 досліджуваних пацієнтів HBME-1-позитивних було 5. Згідно з післяопераційним гістологічним висновком у групі таких хворих у 4 випадках діагностовано рак ЩЗ (у 3 — папілярний, у 1 — фолікулярний), в 1 — фолікулярну пухлину невизначеної злоякісності. Важливо, що ІЦХ та ІГХ HBME-1-реакції у зразках цих пацієнтів були однакової інтенсивності. У 9 доопераційно негативних хворих за HBME-1 згідно з підсумковим гістологічним висновком не виявлено злоякісних новоутворень. У 6 хворих діагностовано вузловий зоб, у 3 — фолікулярну пухлину невизначеної злоякісності. Гістологічні зразки всіх 9 пацієнтів також були негативними щодо HBME-1. Отримані результати продемонстрували збільшення частоти виявлення раку з підвищенням категорії Bethesda. Застосування статистичного програмного забезпечення для біомедичних досліджень «MedCalc» виявило, що позитивна прогностична цінність тесту експресії HBME-1 становила 80 % (95 % довірчий інтервал 38,4—96,3 %), діагностична ефективність — 92,9 % (95 % довірчий інтервал 66,1—99,8 %). Ці дані свідчать про великий потенціал тесту, однак через невелику кількість спостережень довірчі інтервали дуже широкі.

Висновки. HBME-1 може бути ІЦХ-маркером для диференціації доброякісних і злоякісних вузових утворень ЩЗ, а його застосування допоможе зменшити кількість зайвих хірургічних видалень доброякісних утворень, що поліпшить якість життя пацієнтів і зменшить навантаження на медичні служби.

Ключові слова: рак щитоподібної залози, HBME-1, «Gray zone».

ABSTRACT

Possibilities of immunocytochemical staining for HBME-1 expression in the «diagnostic search» of differentiated thyroid cancer.

Own investigation

O. P. Nechay, N. I. Belemets,
V. O. Palamarchuk, D. M. Kvitka,
Y. S. Kozachuk, O. A. Tovkai

Ukrainian Scientific and Practical Center
of Endocrine Surgery, Transplantation
of Endocrine Organs and Tissues of MoH of Ukraine

Objective — to investigate HBME-1 expression variants on cytological material classified as doubtful (III, IV, V), according to the Bethesda categories, to evaluate the value of the HBME-1 expression test on the corresponding histological material of nodular goiter, follicular tumor with an uncertain potential for malignancy for the differential diagnosis of thyroid carcinoma (ThC).

Materials and methods. The analysis was performed on the data of 14 patients with thyroid nodular lesions and cytological Bethesda categories III, IV, and V (“gray zone”). The HBME-1 expression was determined by the results of immunocytochemical (ICC) and immunohistochemical (IHC) staining with the use of mouse monoclonal antibodies against human HBME-1 (1 : 500; cat № BSB 3459; «Bio SB» «Bioscience for the World» Santa Barbara USA). The HBME-1 expression grade was calculated as the sum of the score for staining intensity and cytoplasmic positive cells square, present in the IHC sample. HBME-1 positive result was considered with an IHC score > 6 point.

Results. From 14 investigated patients, five were defined as HBME-1 positive. According to the postoperative histological conclusion for the group of HBME-1 positive patients, thyroid carcinoma was diagnosed in four subjects, including three cases of papillary ThC and one follicular ThC; in one patient follicular tumor of uncertain malignant potential (FT-UMP) was reported. Importantly, immunocytochemical and immunohistochemical HBME-1 reactions in the specimens of these patients were of the same intensity. Among 9 HBME-1 preoperative negative patients, none had malignancy according to the final histological study. Nodular goiter was diagnosed in six patients, and tumor of uncertain malignant potential (FT-UMP) was reported for three subjects. Histological specimens of all 9 patients were HBME-1 negative as well. The obtained results demonstrated an increase in cancer detection rates with

increasing Bethesda category. Application of statistical software for biomedical research MedCalc revealed that positive predictive value (PPV) of the HBME-1 expression test was 80 % (95 % confidence interval CI 38.4—96.3 %), and diagnostic efficiency was 92.9 % (CI 66.1—99.8 %). These results suggest the great potential of the test, however, due to the limited observations, the confidence intervals are too wide.

Conclusions. HBME-1 can be used as an immunocytochemical marker for the differentiation of benign and malignant thyroid nodules, its use will help to reduce the number of unnecessary surgical removals of benign tumors, which will improve the quality of life of patients and reduce the burden on medical services.

Keywords: thyroid cancer, HBME-1, «Gray zone».

Дата надходження до редакції 04.07.2023 р.

Дата рецензування 01.08.2023 р.

Дата підписання статті до друку 21.08.2023 р.