О.О. Гузь

ОСОБЛИВОСТІ ЕКСПРЕСІЇ ЦИКЛІНУ D1 У ПУХЛИНАХ ЩИТОПОДІБНОЇ ЗАЛОЗИ ФОЛІКУЛЯРНОГО ПОХОДЖЕННЯ

Український науково-практичний центр ендокринної хірургії, трансплантації ендокринних органів і тканин МОЗ України, Київ

ВСТУП

Пухлини щитоподібної залози (ЩЗ) фолікулярного походження складають широкий спектр утворень із різними патогістологічними особливостями. Провідна роль у діагностиці таких пухлин належить патогістологічному дослідженню, під час якого виявляють ознаки злоякісності. Загальновизнаним абсолютним критерієм злоякісності є наявність інвазії в капсулу пухлини та/або ознаки інвазії судини [1]. Проте стандартне патогістологічне дослідження не завжди дає належний результат у виявленні ознак злоякісного росту за фолікулярних новоутворень ЩЗ [2]. Гетерогенність пухлин ЩЗ фолікулярного походження обумовлює певні диференційно-діагностичні труднощі як під час цитологічного аналізу аспірату, так і під час остаточного патологогістологічного дослідження. До таких пухлин відносять атипову фолікулярну аденому (АФА), фолікулярну пухлину з невизначеним потенціалом злоякісності (ФП НПЗ), гіалінізуючу трабекулярну аденому (ГТП), фолікулярний рак (ФР) і фолікулярний варіант папілярного раку (ФВ ПР). Наразі інтенсивно вивчається роль різних діагностичних/прогностичних маркерів у діагностиці пухлин ЩЗ [3]. Визначення проліферативної активності новоутворення є одним із найбільш поширених методів у вивченні важливих характеристик її фенотипу, поширення та схильності до метастазування [4, 5]. Встановлення молекулярно-генетичного профілю доброякісних і злоякісних пухлин ЩЗ є перспективним технологічним підходом в уточненні потенціалу злоякісних новоутворень, що сьогодні представляє певні діагностичні труднощі [6].

Циклін D1 – білок-продукт гена *CCND1 (PRAD-1, bcl-1)*, локалізований на 11-й хромосомі (локус 11q13). Цей білок масою 36 кДа складається з 259 амінокислот і відіграє ключову роль у контролюванні клітинного циклу. Він є частиною молекулярного комплексу, що регулює перехід клітини з фази G1 до фази S клітинного циклу. Циклін досягає піку свого накопичення наприкінці фази G1, і його синтез припиняється, коли клітини перебувають у фазі S клітинного циклу. Синтез цикліну D1 стимулюють чинники росту, що індукують неактивні клітини вступати до клітинного циклу [7, 8]. Диспропорційне накопичення цикліну D1 супроводжується надмірною проліферацією клітин, що мають вкорочену G1 фазу і втрачають здатність реагувати на фізіологічні чинники росту. Гіперекспресія може бути результатом ампліфікації гена, вірусних перебудов гена, транслокації фрагментів хромосоми або викликатися підвищеною чутливістю непластичних клітин до зовнішніх сигналів, наприклад, до стимуляції гормонами [9]. Порушення генетичного апарату внаслідок змін вмісту певних речовин, що регулюють клітинний цикл, а також патологічні чинники, що впливають на функціонування механізмів внутрішнього контролю, викликають порушення гомеостазу клітин. Ці процеси лежать в основі непластичної трансформації клітин. У найбільш вивчених пухлинах шлунково-кишкового тракту та прищитоподібних залоз ген, що кодує циклін D1, зазнає ампліфікації, що спричинює значне підвищення його синтезу [10]. Ампліфікацію ділянки 11q13 було встановлено для злоякісних пухлин молочної залози, легень, гортані, яєчників, сечового міхура [11].

Нормальні клітини фолікулярного епітелію ЩЗ не експресують циклін D1, тоді як у злоякісних пухлинах експресію зареєстровано у 64% випадків (у 67% ПР і 40% ФР) [10]. Диференційно-діагностичне значення цикліну D1 обмежується можливістю експресії в клітинах ФА (від 34% до 45,5%) [12] і вузлового зоба (2%) [13].

Мета дослідження – визначити експресію цикліну D1 у пухлинах ЩЗ фолікулярного походження.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Матеріалом для дослідження послужили гістологічні препарати пухлин ЩЗ 28 пацієнтів, прооперованих у хірургічному відділенні Українського науково-практичного центру ендокринної хірургії, трансплантації ендокринних органів і тканин МОЗ

України з приводу доброякісних і злоякісних новоутворень ЩЗ у період 2011-2012 рр. Середній вік хворих складав 42,8±3,9 року (від 28 до 75 років). Патогістологічне дослідження проведено трьома незалежними патологоанатомами згідно з класифікацією ВООЗ пухлин ЩЗ (2004 р.). За результатами остаточного патогістологічного дослідження пухлини ЩЗ розподілено на 3 групи: доброякісні (10 випадків, 35,7%), злоякісні (10 випадків, 35,7%) і ФП НПЗ (8 випадків, 28,6%). Групу доброякісних пухлин склали АФА (6 випадків, 60,0%) і ГТП (4 випадків, 40,0%), групу злоякісних – ФР (4 випадки, 40,0%) і ФВ ПР (6 випадків, 60,0%). Розмір пухлини варіював від 1 до 8 см і у середньому складав 4,14±0,42 см.

Імуногістохімічне дослідження проведено з використанням стандартного стрептавідин-біотин-пероксидазного методу із застосуванням моноклональних антитіл (МоАт) cyclin D1 (H-295): sc-753 (Santa Cruz Biotechnology) за рекомендованою методикою. Застосовували оптимальне розведення первинних АТ (1:50). Як вторинні антитіла використовували біотин-зв'язані кролячі anti-mouse IgM. Для візуалізації імунної реакції застосовували полімерну систему EnVision (Dako, Данія). За позитивний контроль правила тканина мигдалика.

Реакцію оцінювали напівкількісним методом. Слабкою (+) вважали реакцію, коли кількість позитивно забарвлених клітин складала від 1 до 10%, помірною (++) – від 10 до 50%, вираженою (+++) – якщо кількість позитивно забарвлених клітин перевищувала 50%.

Результати імуногістохімічної експресії цикліну D1 наведено у табл. 1 і 2.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

В усіх випадках злоякісних пухлин ЩЗ визначено специфічну позитивну реакцію брунатного кольору, локалізовану в ядрі або цитоплазмі клітин фолікулярного епітелію. Імуноекспресія цикліну D1 мала переважно дифузний характер. У поодиноких випадках позитивна реакція мала місце лише у периферичних або центральних відділах пухлини. У 6/10 (60,0%) випадках злоякісних пухлин, у 6/10 (60,0%) випадках доброякісних пухлин та у 4/8 (50,0%) ФП НПЗ спостерігали цитоплазматичну локалізацію позитивної реакції з антитілами до цикліну D1.

У жодному випадку експресії даного маркера клітинами фолікулярного епітелію оточуючої тканини ЩЗ не виявлено, хоча поодинокі клітини запальної інфільтрації експресували циклін D1.

Таблиця 1

Результати експресії цикліну D1 у пухлинах ЩЗ фолікулярного походження різного потенціалу злоякісності

Патолого-гістологічний діагноз	Центральний відділ пухлини	Периферичний відділ пухлини	Нормальна тканина ЩЗ	Локалізація реакції
Фолікулярний рак				
1	+	++	0	Я
2	+++	++	0	Ц
3	++	++	0	Я
4	+++	+++	0	Я
Фолікулярний варіант папілярного раку				
1	++	++	0	Я
2	+	+	0	Ц
3	+	++	0	Я
4	+	++	0	Ц
5	++	+	0	Ц
6	++	++	0	Ц
Фолікулярна пухлина з невизначеним потенціалом злоякісності				
1	+	+	0	Ц
2	++	++	0	Я
3	++	+++	0	Я
4	+++	++	0	Я
5	++	++	0	Я
6	+	+	0	Ц
7	0	+	0	Ц
8	+	0	0	Ц
Атипова аденома				
1	0	+	0	Ц
2	+	+	0	Я
3	++	++	0	Ц
4	0	+	0	Ц
5	+	+	0	Я
6	++	++		Ц
Гіалінізована трабекулярна аденома				
1	++	+	0	Я
2	+	0	0	Ц
3	+	+	0	Я
4	+	+	0	Ц

***Примітка**: Я – ядро, Ц – цитоплазма.*

Таблиця 2

Порівняльна характеристика експресії цикліну D1 залежно від гістологічного типу пухлини

Інтенсивність реакції	Злоякісні пухлини		Доброякісні пухлини		ФП НПЗ (n=8)
	ФР (n=4)	ФВ ПР (n=6)	АФА (n=6)	ГТП (n=4)	
+++	2	0	0	0	2
++	2	5	2	1	2
+	0	1	4	3	4
0	0	0	0	0	0

Отже, за отриманими результатами імуногістохімічного дослідження в усіх випадках злоякісних утворень ЩЗ мала місце експресія цикліну D1 різного ступеня. Інтенсивність експресії для різних гістологічних типів злоякісних новоутворень ЩЗ різнилась у центральних і периферичних відділах пухлини. У 2/4 випадків (50,0%) фолікулярного раку реакція з цикліном D1 була вираженою та у 2/4 випадків (50,0%) – помірною. У 5/6 (83,3%) випадках ФВ ПР виявлено помірну реакцію, а в 1/6 (16,7%) – слабку. Серед гістологічних варіантів раку найбільшу експресію даного маркера відзначено у випадках ФР, незначне зниження – у пухлинах ФВ ПР. Тобто, злоякісні пухлини ЩЗ характеризуються досить високою частотою та інтенсивністю експресії цикліну D1.

У групі доброякісних пухлин ЩЗ, незалежно від їх гістологічної будови, експресія цикліну D1 була незначною. У 3/10 (30,0%) випадків імуноекспресія даного маркера була помірною, у 7/10 (70,0%) – слабкою.

Група ФП НПЗ виявилася неоднорідною щодо експресії цикліну D1. Інтенсивнішою вона була у тучних і тучно-трабекулярних пухлинах порівняно з АФА нормо- або мікрофолікулярної будови, але відмінності виявилися статистично незначущими. У 2/8 (25,0%) випадків експресія цикліну D1 була вираженою, у 2/8 (25,0%) – помірною, у 4/8 (50,0%) – слабкою.

Відмінності між групами пухлин за інтенсивністю експресії не досягали рівня статистичної значущості, можливо, внаслідок малої кількості спостережень.

Тим не менше, отримані результати дозволяють зазначити, що застосування імуногістохімічного дослідження експресії цикліну D1 можливо у рутинній практиці патогістологічного дослідження пооперaційного матеріалу для встановлення потенціалу злоякісності фолікулярних новоутворень ЩЗ.

Отримані результати дозволяють розглядати експресію цикліну D1 як маркер для диференційної діагностики доброякісних і злоякісних новоутворень ЩЗ фолікулярного походження, а також як допоміжний засіб встановлення істинного характеру ФП НПЗ.

ВИСНОВКИ

1. Експресію цикліну D1 виявлено у пухлинах ЩЗ фолікулярного походження різного ступеня злоякісності, але інтенсивність її різнилась. У доброякісних пухлинах експресія цикліну D1 була слабкою (30%), а у злоякісних – перевищувала 90%. У ФП НПЗ експресію цикліну D1 визначено у половині випадків.
2. Сумнівні результати експресії цикліну D1 можуть відображати осередкову неопластичну трансформацію в межах доброякісної пухлини. Для підтвердження цього припущення доцільне подальше вивчення з використанням сучасних молекулярно-генетичних технологій.
3. Для остаточного висновку про можливу злоякісність ФП НПЗ необхідне накопичення додаткових знань із дослідженням більшої кількості випадків і пошук нових, надійніших маркерів, а також тривале спостереження групи пацієнтів із ФП НПЗ для розробки адекватної діагностичної та лікувальної тактики.
4. Отримані результати продемонстрували, що експресія цикліну D1 може мати прогностичне значення у вивченні біологічної поведінки злоякісних новоутворень ЩЗ.

ЛІТЕРАТУРА

1. *Baloch Z.W., LiVolsi V.A.* Follicular-patterned lesions of the thyroid: the bane of the pathologist / Am. J. Clin. Pathol. – 2002. – V. 117. – P. 143-150.
2. *Fonseca E., Sobrinho-Simoes M.* Diagnostic problems in differentiated carcinomas of the thyroid // Path. Res. Pract. – 1995. – Vol. 191. – P. 318-331.

3. *Dabbs D.J., Davis A.T., Bonsib S.M. et al.* Comparison of MIB-1 proliferation rates for eosinophilic renal tumors. Oncocytoma, chromophobe renal carcinoma, and eosinophilic variant of renal carcinoma // Appl. Immunohistochem. – 1998. – Vol. 6. – P. 187-190.
4. *Saiz A.D., Olvera M., Rezk S. et al.* Immunohistochemical expression of cyclin D1, E2F-1 and Ki67 in benign and malignant thyroid lesions // J. Pathol. – 2002. – Vol. 198. – P. 157-162.
5. *Muller-Hocker J.* Immunoreactivity of p53, and bcl-2 in oncocytic adenomas and carcinomas of the thyroid gland // Hum. Pathol. – 1999. – Vol. 30 – P. 926-933.
6. *Ohori N.P., Nikiforova M.N., Schoedel K.E.* Contribution of molecular testing to thyroid fine-needle aspiration cytology of "follicular lesion of undetermined significance / atypia of undetermined significance" // Cancer Cytopathol. – 2010. – Vol. 118, № 1. – P. 17-23.
7. *Goto A., Sakamoto A., Machinami R.* An immunohistochemical analysis of cyclin D1, p53 and p21 protein in tumors originating from the follicular epithelium of the thyroid gland // Pathol. Res. Pract. – 2001. – Vol. 197. – P. 217-222.
8. *Kim J.Y., Cho H., Rhee B.D. et al.* Expression of CD44 and cyclin D1 in fine needle aspiration cytology of papillary thyroid carcinoma // Acta Cytol. – 2002. – Vol. 46. – P. 679-683.
9. *Bieche I., Franc B., Vidaud D. et al.* Analyses of MYC, ERBB2 and CCND1 genes in benign and malignant thyroid follicular cell tumors by real-time polymerase chain reaction // Thyroid. – 2001. – Vol. 11 – P. 147=152.
10. *Basolo F., Caligo M.A., Pinchera A. et al.* Cyclin D1 overexpression in thyroid carcinomas: relation with clinico-pathological parameters, retinoblastoma gene product and Ki67 labeling index // Thyroid. – 2000. – Vol. 10. – P. 741-746.
11. *Lazzereschi D., Sambuco L., Carnovale Scalzo C. et al.* Cyclin D1 and cyclin E expression in malignant thyroid cells and in human thyroid carcinomas // Int. J. Cancer. – 1998. – Vol. 76. – P. 806-811.
12. *Nakashima M., Meirmanov S., Naruke Y. et al.* Cyclin D1 overexpression in thyroid tumours from a radiocontaminated area and its correlation with Pin1 and aberrant beta-catenin expression // J. Pathol. – 2004. – Vol. 202, № 4. – P. 446-455.
13. *Park Y.J. Kwak S.H., Kim D.C. et al.* Diagnostic value of galectin-3, HBME-1, cytokeratin 19, high molecular weight cytokeratin, cyclin D1 and p27 (kip1) in the differential diagnosis of thyroid nodules // J. Korean Med. Sci. – 2007. – Vol. 22, № 4. – P. 621-628.

РЕЗЮМЕ

Особливості експресії цикліну D1 у пухлинах щитоподібної залози фолікулярного походження

О.О. Гузь

Гетерогенність пухлин щитоподібної залози (ЩЗ) фолікулярного походження обумовлює певні диференційно-діагностичні труднощі як під час цитологічного аналізу аспірату, так і під час остаточного патогістологічного дослідження. Наразі інтенсивно вивчається роль різних діагностичних/прогностичних маркерів у діагностиці пухлин ЩЗ. Нормальні клітини фолікулярного епітелію ЩЗ не експресують циклін D1, тоді як у злоякісних його експресію зареєстровано у 60-70% випадків.

Мета роботи – визначити експресію цикліну D1 у пухлинах ЩЗ фолікулярного походження.

Матеріали та методи. Матеріалом для дослідження були гістологічні препарати пухлин ЩЗ 28 пацієнтів із доброякісними та злоякісними новоутвореннями ЩЗ у період 2011-2012 рр. Середній вік хворих складав 42,8±3,9 року (від 28 до 75 років). За результатами остаточного патогістологічного дослідження пухлини ЩЗ розподілено на 3 групи: доброякісні (10 випадків, 35,7%), злоякісні (10 випадків, 35,7%) і ФП НПЗ (8 випадків, 28,6%). Групу доброякісних пухлин склали АФА (6 випадків, 60,0%) і ГТП (4 випадків, 40,0%), групу злоякісних – ФР (4 випадки, 40,0%) і ФВ ПР (6 випадків, 60,0%). Імуногістохімічне дослідження проведено з використанням стандартного стрептавідин-біотин-пероксидазного методу із застосуванням моноклональних антитіл за рекомендованою методикою. Реакцію оцінювали напівкількісним методом.

Результати та обговорення. Імуноекспресію цикліну D1 виявлено в усіх пухлинах ЩЗ різного ступеня злоякісності, але інтенсивність її різнилась. У доброякісних пухлинах експресія цикліну D1 була слабкою (30%), а у злоякісних – перевищувала 90%, у ФП НПЗ визначалась у половині випадків.

Висновки. Отримані результати продемонстрували, що експресія цикліну D1 може мати прогностичне значення у вивченні біологічної поведінки злоякісних новоутворень ЩЗ.

Ключові слова: імуногістохімія, щитоподібна залоза, циклін D1.

РЕЗЮМЕ

Особенности экспрессии циклина D1 в опухолях щитовидной железы фолликулярного происхождения

О.А. Гузь

Гетерогенность опухолей щитовидной железы (ЩЖ) фолликулярного происхождения обусловливает определенные дифференциально-диагностические трудности как при цитологическом анализе аспирата, так и во время окончательного патогистологического исследования. Сейчас интенсивно изучается роль различных диагностических/прогностических маркеров в диагностике опухолей ЩЖ.

Нормальные клетки фолликулярного эпителия ЩЖ не экспрессируют циклин D1, тогда как в злокачественных опухолях его экспрессию регистрируют в 60-70% случаев.

Цель работы – определить экспрессию циклина D1 в опухолях ЩЖ фолликулярного происхождения.

Материалы и методы. Материалом для исследования послужили гистологические препараты опухолей щитовидной железы 28 пациентов с доброкачественными и злокачественными новообразованиями ЩЖ в период 2011-2012 гг. Средний возраст больных составлял 42,8±3,9 года (от 28 до 75 лет). По результатам окончательного патогистологического исследования опухоли ЩЖ распределили на 3 группы: доброкачественные (10 случаев, 35,7%), злокачественные (10 случаев, 35,7%) и ФП НПЗ (8 случаев, 28,6%). Группу доброкачественных опухолей составили АФА (6 случаев, 60,0%) и ГТП (4 случаев, 40,0%), группу злокачественных – ФР (4 случая, 40,0%) и ФВ ПР (6 случаев, 60,0%). Иммуногистохимическое исследование проведено с использованием стандартного стрептавидин-биотин-пероксидазного метода с применением моноклональных антител по рекомендованной методике. Реакцию оценивали полуколичественным методом.

Результаты и обсуждение. Иммуноэкспрессия циклина D1 обнаружена во всех опухолях ЩЖ разной степени злокачественности, но ее интенсивность различалась. В доброкачественных опухолях экспрессия циклина D1 была слабой (30%), а в злокачественных – превышала 90%. В ФП НПЗ экспрессия циклина D1 определялась в половине случаев.

Выводы. Полученные результаты показывают, что экспрессия циклина D1 может иметь прогностическое значение в изучении биологического поведения злокачественных новообразований ЩЖ.

Ключевые слова: иммуногистохимия, щитовидная железа, циклин D1.

SUMMARY

Pecularities of cyclin D1 expression in thyroid tumours of follicular origin

O. Guz

Heterogenity of thyroid tumors of follicular origin determines certain differential – diagnostic difficulties both in cytology aspirate, and during the final pathological study. Now the role of various diagnostic/prognostic markers in the diagnosis of thyroid tumors is extensively studied. Normal follicular cells do not express cyclin D1, whereas expression in malignant tumors has been reported in 60-70% of cases.

The aim of the study is to determine the expression of cyclin D1 in benign and malignant tumors of thyroid of follicular origin.

Materials and methods. Histological preparations of thyroid tumors from28 patients with benign and malignant tumors of the thyroid gland in the period 2011-2012 had been used. The average age of was 42,8±3,9 years (range from 28 to 75 years). According to the results of histopathological study thyroid tumors were divided into 3 groups: benign (10 cases, 35.7%), malignant (10 cases, 35.7%) UMP-T (8 cases, 28.6%). Group of benign tumors made up of AFA (6 cases, 60.0%) and GTT (4 cases, 40.0%), a group of malignant – FC(4 cases, 40.0%) and PC (6 cases, 60.0%). The immunohistochemical study was performed using a standard streptavidin-biotin-peroxidase method using a monoclonal antibody at the recommended procedure. The reaction was evaluated semiquantitatively.

Results and discussion. Immunohistochemical expression of cyclin D1 was detected in all thyroid tumors of different grade, but the intensity of expression was different. In benign tumors, the expression of cyclin D1 was weak (30%), in malignant – indicators of expression of this marker is higher than 90%. In UMP-tumours cyclin D1 expression was determined in 50% of cases.

Conclusions. Obtained results have shown that expression of cyclin D1 may be of prognostic value in the study of the biological behavior of malignant thyroid neoplasms.

Key words: immunohistochemistry, thyroid, cyclin D1.

Дата надходження до редакції 21.01.2015 р.