



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **60699** (13) **U**
(51) МПК
G01N 33/53 (2006.01)МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ**ОПИС**
ДО ПАТЕНТУ
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬвидається під
відповідальність
власника
патенту**(54) СПОСІБ ВИЯВЛЕННЯ СИМПОРТЕРА НАТРІЮ/ЙОДУ (NIS) В ПАПІЛЯРНИХ КАРЦИНОМАХ ЩИТОПОДІБНОЇ ЗАЛОЗИ**

1

2

(21) u201014757

(22) 09.12.2010

(24) 25.06.2011

(46) 25.06.2011, Бюл.№ 12, 2011 р.

(72) ВОСКОБОЙНИК ЛАРИСА ГРИГОРІВНА

(73) ДЕРЖАВНА УСТАНОВА "ІНСТИТУТ ЕНДОКРИНОЛОГІЇ ТА ОБМІНУ РЕЧОВИН ІМ. В. П. КОМІСАРЕНКА НАМН УКРАЇНИ

(57) Спосіб виявлення симпортера натрію/йоду (NIS) в папілярних карциномах щитоподібної залози, який включає проведення імуногістохімічної реакції в пухлинній тканині з моноклональними анти-NIS антитілами, який **відрізняється** тим, що реакцію проводять без контрастування ядер гематоксиліном і виконують порівняльний аналіз ознак агресивності папілярних карцином ЩЗ у NIS-позитивних та NIS-негативних пухлинах.

Корисна модель належить до галузі медицини, зокрема до ендокринології, онкології, патологічної анатомії, радіології і може застосовуватися для визначення експресії симпортера натрію/йоду (NIS) в папілярних карциномах (ПК) щитоподібної залози (ЩЗ).

ПК ЩЗ є найбільш поширеною формою тиреоїдної онкопатології (біля 80 % від усіх злоякісних пухлин ЩЗ). У цілому ПК ЩЗ характеризуються сприятливим прогнозом, оскільки метастази, які можуть розвинути у післяопераційному періоді, ефективно виявляються і лікуються радіоактивним йодом [Рак щитовидної залози: Современные подходы к диагностике и лечению /П.О.Румянцев, А.А.Ильин, У.В.Румянцева, В.А.Саенко. - М.: ГЭОТАР-Медиа, 2009, - 448с]. Використання радіоактивного йоду у клінічній практиці для руйнування гіперактивної тканини ЩЗ (дифузний токсичний зоб) та для виявлення і лікування метастазів високодиференційованого раку ЩЗ відомо з 30-х років минулого сторіччя, проте субстрат, що забезпечує поглинання йоду тиреоїдними клітинами, відкритий недавно. Це інтегрований до плазматичної мембрани тиреоцитів білок - симпортер натрію/йоду (NIS) [Dohan O., De la Vieja A., Paroder V. et al. The sodium/iodide symporter (NIS): characterization, regulation, and medical significance // Endocrine Rev. -2003. - 24, N1.-P. 48-77].

Відомо, що диференційовані карциноми ЩЗ та їх метастази характеризуються зниженою здатністю акумулювати йод. Вважають, що така ситуація пов'язана зі зниженим рівнем експресії NIS в їхніх клітинах. Оскільки головним методом лікування

метастазів папілярного раку є радіоїодотерапія, ефективність якої обумовлена активністю NIS-білка, дослідження щодо адекватного виявлення його експресії в злоякісних диференційованих пухлинах ЩЗ та відповідних метастазах є надзвичайно актуальними.

Відомий спосіб виявлення експресії NIS в тканинах пухлин ЩЗ - молекулярно-біологічний, що полягає у виділенні РНК з пухлинної тканини, проведенні реакції зворотної транскрипції для отримання кДНК та ампліфікації транскриптів шляхом проведення кількісної полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) з визначенням рівня експресії мРНК гена NIS [Lundh C, Lindencrona U., Postgard P. et al. Radiation-induced thyroid stunning: differential effects of (123)I, (131)I, (99m)Tc, and (211)At on iodide transport and NIS mRNA expression in cultured thyroid cells // J. Nucl. Med. -2009. - 50, N7. -P. 1661-1667]. Однак, за таких обставин, визначається лише рівень транскрипції гена NIS, що не завжди корелює з вмістом відповідного білка, оскільки можливі порушення на етапі його трансляції.

Найбільш адекватним, на нашу думку, є метод імуногістохімічної реакції з відповідними антитілами, який і був нами обраний за прототип [Peyrottes 1., Navarro V., Ondo-Mendez A. et al. Immunoanalysis indicates that the sodium iodide symporter is not overexpressed in intracellular compartments in thyroid and breast cancers // Eur J Endocrinol. - 2009. - Vol. 160, N 2. -P. 215-225]. Зазначений метод дозволяє виявляти не тільки факт експресії NIS-білка у тканинах пухлин, а й визначати його локалізацію - мембранну чи цитоплазматичну. Такі дані є без-

(19) **UA** (11) **60699** (13) **U**

умовно корисними, оскільки, за даними літератури, транслокація NIS від мембрани до цитоплазми асоційована зі зниженням його функціональної активності, зокрема порушеннями процесів акумулювання йоду клітинами.

Зазначений метод виконується наступним чином - на відібраних парафінових зрізах проводять імуногістохімічну реакцію з моноклональними анти-NIS антитілами непрямим імунопероксидазним методом. Після інкубування зрізів з антитілами (первинними та вторинними) їх контрастують гематоксиліном, що дозволяє ідентифікувати пухлинні клітини, але ж ускладнює виявлення трансмембранних білків, особливо за умов їх низького вмісту. Реакцію вважають позитивною, якщо більш ніж 10 % непластичних клітин є позитивними до NIS. При оцінці реакції зазначають локалізацію NIS-білка - мембранну чи цитоплазматичну.

Однак, наведений спосіб має ряд недоліків:

1) За даними літератури, в нормальних тироцитах завжди відбувається експресія NIS, між тим в прототипі відмічено, що у незмінній тканині ЩЗ лише окремі тироцити чи їх невеличкі скупчення є NIS-позитивними. Можливо, що окремі тироїдні клітини перебувають у стані гіперактивності, активно експресують NIS, що й виявляється методом прототипу. Водночас, в інших тироцитах відбувається незначний базальний рівень експресії NIS, і чутливість використаного методу є недостатньою для його виявлення;

2) Зниження експресії тироїдспецифічних білків, до яких відносять й NIS, може бути асоційована зі зниженням ступеня диференціювання пухлинних клітин, і, як наслідок, інвазійними властивостями карцином. Однак такого аналізу автори прототипу не виконують.

3) Вважають, що ефективність радіойодотерапії пов'язана зі вмістом NIS-білка, між тим, у прототипі такий взаємозв'язок не досліджено.

В основу корисної моделі поставлено задачу удосконалити спосіб виявлення NIS в папілярних карциномах щитоподібної залози шляхом підвищення чутливості імуногістохімічної реакції внаслідок удосконалення методики, що дозволить отримати інформативні дані щодо взаємозв'язку між експресією NIS-білка у папілярних карциномах ЩЗ, їх інвазійними властивостями та ефективністю наступної радіойодотерапії.

Поставлена задача вирішується тим, що в способі, який включає проведення імуногістохімічної реакції в пухлинній тканині з моноклональними анти-NIS антитілами, згідно з корисною моделлю, реакцію проводять без контрастування ядер гематоксиліном і виконують порівняльний аналіз ознак агресивності папілярних карцином ЩЗ у NIS-позитивних та NIS-негативних пухлинах.

Основною відмінністю вказаного способу виявлення експресії NIS від прототипу є те, що автори вперше пропонують не використовувати для контрастування гематоксилін, який, крім ядер, забарвлює й клітинні мембрани, що ускладнює виявлення трансмембранних білків за умов їх низького вмісту, та провести порівняльний аналіз між експресією NIS, інвазійними властивостями карцином та ефективністю їх лікування. Таким чином,

спосіб є інформативним, простим у виконанні і дозволяє суттєво підвищити чутливість імуногістохімічного методу та виявити найбільш агресивні пухлини.

Спосіб виконується наступним чином.

Матеріал, отриманий після хірургічного втручання, фіксують у 10 % розчині формаліну та обробляють згідно з загально прийнятим гістологічним методом для виготовлення парафінових блоків. З відібраних парафінових блоків на мікроскопі отримують тонкі зрізи і проводять на них імуногістохімічну реакцію з моноклональними анти-NIS антитілами за непрямим імунопероксидазним методом, але ж без процедури контрастування ядер гематоксиліном, що дозволяє уникнути небажаного забарвлення клітинних мембран та отримати об'єктивні дані щодо експресії NIS-білка, навіть за умов його низького вмісту.

На відміну від прототипу, при виконанні удосконаленого способу, що пропонується, після аналізу результатів імуногістохімічної реакції встановлюють взаємозв'язок між експресією NIS-білка, інвазійними властивостями карцином та ефективністю їх лікування.

Для адекватного порівняння способу, що пропонується, та прототипу проведені імуногістохімічні дослідження щодо експресії NIS-білка у 35 папілярних карциномах ЩЗ обома способами.

При проведенні імуногістохімічної реакції з анти-NIS антитілами на парафінових зрізах, виготовлених зі зразків умовно незміненої позапухлинної тканини ЩЗ, чітко видна різниця препаратів, пофарбованих різними методами. Порівняно з прототипом (рис. 1), використання способу, що пропонується, дозволяє встановити, що експресія NIS-білка спостерігається майже в усіх тироцитах (рис. 2). Таким чином, запропонований метод є більш чутливим.

Стовсовно пухлинної тканини, за методом прототипу, було встановлено, що в більшій частині ПК (27 із 35 або 77 %) експресія NIS-білка була відсутня. У решті 23 % випадків (8 пухлин із 35) спостерігалася позитивна імуногістохімічна реакція за умов цитоплазматичної локалізації NIS-білка. Таким чином, отримані результати свідчать про зниження вмісту активного NIS-білка в ПК ЩЗ.

Проведення удосконаленої імуногістохімічної методики дозволяє виявляти експресію NIS-білка у 23 пухлинах із 35 (66 % випадків). Таким чином, запропонований нами спосіб дозволяє підвищити чутливість імуногістохімічного методу щодо виявлення NIS-білка за умов його низького вмісту у клітинах ПК ЩЗ на 43 %.

Наступний аналіз встановив, що в NIS-позитивних ПК, порівняно з NIS-негативними пухлинами, вірогідно рідше спостерігалися ознаки екстра- та інтратироїдного розповсюдження, регіональні метастази до лімфатичних вузлів ший, віддалені метастази в легені. У хворих з NIS-позитивними ПК (помірна реакція) в післяопераційному періоді майже не було метастазів і радіоактивний йод використовували лише з метою абляції залишків ЩЗ. Лише в 7 випадках із 23 відмічено наявність метастазів до лімфатичних вузлів ший, для руйнування яких було достатньо лише 1 курсу

радіойодотерапії. Водночас при NIS-негативних ПК ЩЗ хворим проводили від 1 до 8 лікувальних курсів (3,5 у середньому). Крім того, у 4-х таких хворих було зазначено розвиток рецидивів захворювання у післяопераційному періоді. Наведені дані переконливо свідчать, що імуногістохімічний метод виявлення NIS в ПК ЩЗ має важливе прогностичне значення і може бути корисним при розробці програм післяопераційного моніторингу хворих на папілярний рак щитоподібної залози.

Приклад 1.

Хворий Барсук О.М., 1969 року народження, прооперований з приводу папілярної карциноми щитоподібної залози. Діагноз підтверджений патоморфологічними дослідженнями №251/99. Проведена імуногістохімічна реакція з анти-NIS антитілами двома способами - тим, що обраний за прототип (звичайний), та модифікованим. За методом прототипу спостерігали негативну імуногістохімічну реакцію (рис. 3). За вдосконаленим способом виявлено чітку мембранну реакцію (рис. 4). Зазначена карцинома характеризувалася відсутністю ознак екстратиреоїдного розповсюдження, багатофокусного росту, метастазів в лімфатичні вузли. У післяопераційному періоді хворий протягом 11 років після операції перебуває у стані стійкої ремісії і ніяких метастазів виявлено не було.

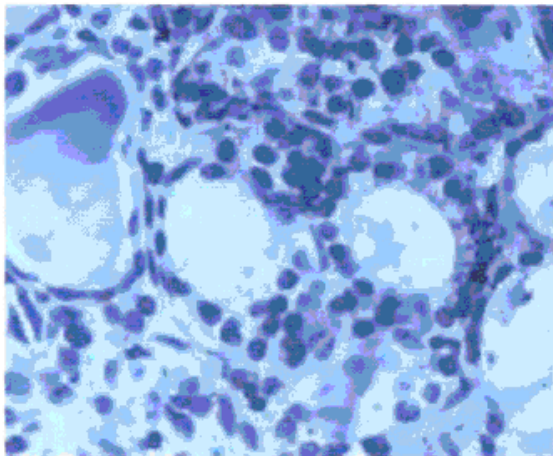
Приклад 2.

Хвора Власова Т.Ю., 1985 року народження, прооперована з приводу папілярної карциноми щитоподібної залози. Діагноз підтверджений пато-

морфологічними дослідженнями №321/99. Також виконані дослідження двома способами - звичайним та модифікованим. За звичайним методом спостерігали негативну імуногістохімічну реакцію. За модифікованим способом виявлено чітку цитоплазматичну реакцію. При патоморфологічному дослідженні не виявлено ознак екстра- та інтра-тиреоїдного розповсюдження пухлини. В післяопераційному періоді виявлено метастази папілярного раку в лімфатичні вузли ший, для лікування яких проведено лише один курс радіойодотерапії.

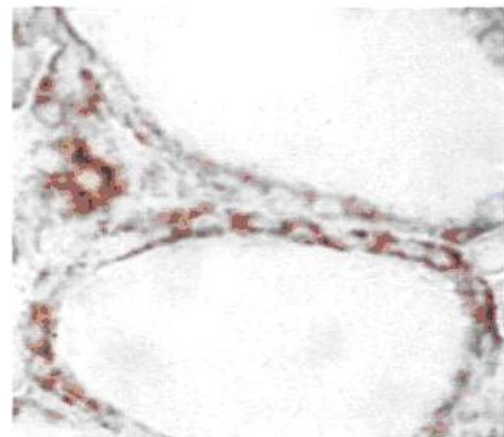
Хвора Семенюк Г.І., 1974 року народження, прооперована з приводу папілярної карциноми щитоподібної залози. Діагноз підтверджений патоморфологічними дослідженнями №43/01. Як за звичайним, так і модифікованим методами, спостерігали негативну імуногістохімічну реакцію. Пухлина характеризувалася інвазійним ростом та наявністю метастазів в лімфатичні вузли ший. У післяопераційному періоді було виявлено наявність віддалених метастазів в легені для руйнування яких проведено 6 курсів радіойодотерапії.

Таким чином, даний спосіб виявлення експресії NIS в папілярних карциномах щитоподібної залози, який пропонують автори, є інформативним, простим у виконанні, чутливим, що дозволяє виявляти наявність NIS-білка, навіть за умов його низького вмісту в пухлинних клітинах, сприяє виявленню найбільш агресивних карцином щитоподібної залози і пропонується для впровадження в наукову та клінічну практику.



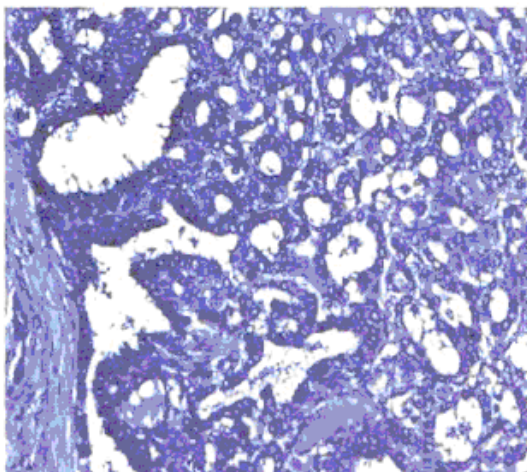
Позапухлинна тканина
(за методом прототипу)

Рис. 1



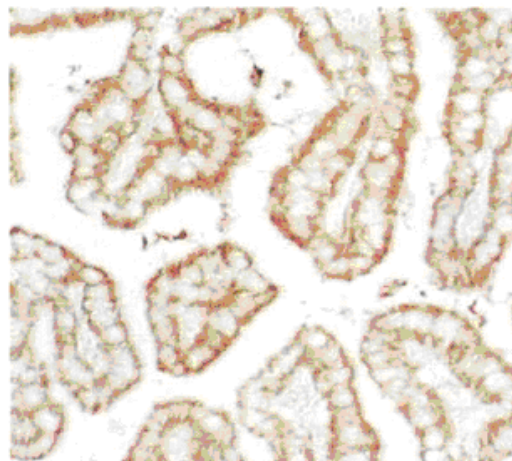
Позапухлинна тканина
(за вдосконаленим методом)

Рис. 2



Папілярна карцинома
(за методом прототипу)

Рис. 3



Папілярна карцинома
(за вдосконаленим методом)

Рис. 4