

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
СУМСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
МЕДИЧНИЙ ІНСТИТУТ

Гапченко Андрій Валерійович

УДК-617.53-006-018-091.8(043.3)

**ДИФЕРЕНЦІЙНО-ДІАГНОСТИЧНЕ ЗНАЧЕННЯ
КАЛЬЦИФІКАТІВ У ЩИТОПОДІБНІЙ ЗАЛОЗІ**

14.03.02 – патологічна анатомія

Робота на здобуття кваліфікаційного ступеня магістра

Науковий керівник:

Романюк Анатолій Миколайович,
доктор медичних наук, професор,
завідувач кафедри патологічної анатомії

СУМИ – 2015

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

АІТ – аутоімунний тиреоїдит

ВЗ – вузловий зоб

ЗЗ– змішаний зоб

ДТЗ – дифузний токсичний зоб

ПРЩЗ – папілярний рак щитоподібної залози

ПТ – псамомні тільця

ОПН – остеопонтин

ФА – фолікулярна аденома

ФРЩЗ – фолікулярний рак щитоподібної залози

УЗД – ультразвукове дослідження

ЩЗ - щитоподібна залоза

ЗМІСТ

ВСТУП.....	4
РОЗДІЛ 1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	8
1.1. Анатомо-фізіологічні особливості щитоподібної залози.....	8
1.2. Захворювання щитоподібної залози, які супроводжуються процесами біомінералізації.....	9
1.3. Загальна характеристика патологічної біомінералізації тканин організму.....	16
РОЗДІЛ 2 МАТЕРІАЛ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	18
РОЗДІЛ 3 РЕЗУЛЬТАТИ ВЛАСНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	21
3.1. Морфологічне дослідження захворювань щитоподібної залози, які супроводжуються біомінералізацією	22
3.2. Результати імуногістохімічного дослідження ЩЗ	35
РОЗДІЛ 4 АНАЛІЗ РЕЗУЛЬТАТІВ ВЛАСНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	47
ВИСНОВКИ.....	56
ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ.....	58
ДОДАТОК А.....	59
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	60

ВСТУП

Актуальність проблеми. Захворювання щитоподібної залози (ЩЗ) характеризуються надзвичайним поширенням серед населення і залежать від стану навколишнього середовища – забруднення поллютантами, радіонуклідами, йододефіциту, тощо [7, 9]. Наприклад, зобом і пов'язаними з ним захворюваннями страждають не менше 200 млн. людей, що обумовлює великі медичні та медико-соціальні проблеми. За сумарною частотою у популяції захворювання ЩЗ виходять на перше місце серед ендокринної патології та зумовлюють клінічні прояви багатьох синдромів та важких розладів, в т.ч. серцево-судинних порушень [13, 24].

У ЩЗ кальцифікати зустрічаються як при доброякісній, так і за умов злоякісної патології, яка діагностується при ультразвуковому дослідженні органа. Отримана діагностична інформація про кальцифіковані об'єкти у ЩЗ часто пропускається клініцистами або їй надається мінімальне клінічне значення [37]. Проте існує багато повідомлень про високий ризик поєднання процесів біомінералізації (кальцифікації) з злоякісними пухлинами [15, 20, 39]. Ризик виявлення злоякісної пухлини ЩЗ значно зростає у солітарних вузлах [37]. У жителів США пальповані вузли ЩЗ виявляються у 4-7% населення [44]. Поширеність вузлів, які випадково виявляються при автопсії або УЗД, у людей, які ніколи не страждали на захворювання ЩЗ, досягає 20-65% [42]. Вузли ЩЗ частіше виявляються у жінок, співвідношення жінок та чоловіків, за різними оцінками, коливається від 1,2:1 до 4,3:1 і з віком збільшується [1, 6].

Оскільки вірогідність злоякісної пухлини існує, деякі клініцисти, особливо хірурги, рекомендують видаляти всі вузли без виключення. Інші, наприклад ендокринологи, вважають за краще запобігати непотрібним операціям. Тому питання про ведення і лікування таких хворих є дискусійним.

Широке застосування УЗД (ультразвукового дослідження) при обстеженні ЩЗ дозволило значно поліпшити візуалізацію осередкових змін, але не було виявлено значущих відмінностей у вірогідності виявлення злоякісного процесу у вузлах великого і малого розміру, поодиноких і множинних, та будь-якої залежності від тиреоїдної функціональної активності [55].

У ЩЗ кальцифікати зустрічаються як при доброякісній, так і за умов злоякісної її патології. Отримана діагностична інформація про кальцифіковані об'єкти у ЩЗ часто пропускається клініцистами або їй надається мінімальне клінічне значення [58]. Проте існує багато повідомлень про високий ризик поєднання процесів біомінералізації (кальцифікації) з злоякісними пухлинами. Ризик виявлення злоякісної пухлини ЩЗ значно зростає у солітарних вузлах [67].

Таким чином, існує цілий комплекс невирішених проблем, пов'язаних зі складністю диференційної діагностики патології ЩЗ, яка супроводжується процесами біомінералізації (кальцифікацією).

Мета роботи дослідити диференційно-діагностичне значення процесів біомінералізації у щитоподібній залозі при її патології.

Для досягнення поставленої мети були визначені наступні **задачі дослідження**:

1. Провести макро- та мікроскопічне дослідження змін при захворюваннях щитовидної залози, які супроводжуються процесами біомінералізації.
2. Дослідити фізико-хімічний склад біомінералів щитоподібної залози.
3. Створити алгоритм диференційної діагностики біомінеральних утворень щитоподібної залози.

Об'єкт дослідження

Біопсійний, аутопсійний та післяопераційний матеріал при вузловому

зобі та пухлинах щитоподібної залози на базі Сумської обласної клінічної лікарні (СОКЛ), Сумського обласного клінічного онкодиспансера (СОКОД), та обласному патологоанатомічному бюро.

Предмет дослідження

Процеси біомінералізації в тканині щитоподібної залози.

Наукова новизна отриманих даних

На підставі комплексних гістологічних, фізико-хімічних досліджень отримані нові дані про особливості процесу біомінералізації при вузлових захворюваннях щитоподібної залози. Проведене дослідження дозволило отримати поглиблені дані про морфологічні імуногістохімічні особливості біомінералізованих утворень ЩЗ, створити алгоритм діагностики.

Практичне значення отриманих результатів

Проведене дослідження та детальний аналіз біомінералізації можуть розцінюватись як діагностична і прогностична ознака для проліферативних захворювань ЩЗ. Отримані дані можуть бути використані в роботі лікарів загальної практики, ендокринологів, патоморфологів. Створено алгоритм патогістологічного дослідження мінералізованих утворень щитоподібної залози. Отриманні дані можуть бути використані в роботі лікарів загальної практики, ендокринологів, радіологів, хірургів, патоморфологів.

Методи дослідження: макроскопічне дослідження, загальноприйняті рутинні гістологічні методи, гістохімічні методи, імуногістологічне дослідження, ультразвукове дослідження щитоподібної залози, методи медичної статистики.

Особистий внесок здобувача:

Робота виконана на кафедрі патологічної анатомії медичного інституту СумДУ.

Основний об'єм дослідження виконано автором, у тому числі:

1. Проаналізована та систематизована сучасна наукова література з даної тематики.
2. Досліджено клініко-морфологічні особливості мінералізованих утворень щитоподібної залози.
3. Проведено іміногістохімічне дослідження препаратів кальцифікованих фрагментів щитоподібної залози.
4. Сформовано висновки та практичні рекомендації.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Анатомо-фізіологічні особливості щитоподібної залози

Вперше згадки про захворювання ЩЗ зустрічаються в літературі китайських цілителів в II тисячолітті до н.е. Зовнішній вигляд залози вперше описаний на початку XV століття К.Галеном. Анатомія ЩЗ описана А.Везалієм в 1543 році, а назва tyros (щит) запропонована в 1656 році Т.Vartou – зберіглася дотепер. У XIX столітті була запропонована і доведена теорія про гормональну функцію ЩЗ і про те, що її секрет, потрапляючи в кров, діє на весь організм [11].

ЩЗ – це найбільший орган внутрішньої секреції в організмі людини. Її закладка відбувається у людини на 2-4 тижні утробного розвитку. Залоза розташована на передній поверхні шиї на рівні щитовидного хряща, частково прилягає до глотки і стравоходу, складається з правої і лівої доль, а також перешийка (іноді зустрічається пірамідна частка, яка відходить або від перешийка, або від однієї з доль) [1,14]. Зовні ЩЗ оточена четвертою фасцією шиї та м'язами шиї, з двох боків від неї проходить судинний – нервовий пучок, що включає загальну сонну артерію, яремну вену, блукаючий нерв.

ЩЗ має часточкову структуру, що складається з фолікулів в яких міститься колоїд. Між фолікулами розташовані кровоносні судини, що контактують з ними. Вони переносять синтезовані гормони у кровоносне русло.

Споживання йоду для нормального функціонування ЩЗ складає 110-140 мкг на добу. Щитовидна залоза проводить йодовмісні гормони, що беруть участь практично у всіх видах основного обміну – трийодтиронін (Т3) і тироксин (Т4), а кальцитонін (регулює обмін кальцієм і фосфором), що не містить йоду [1, 2, 14].

Виробництво і виділення гормонів щитовидної залози регулюється гіпоталамо – гіпофізарною системою (частини головного мозку відповідальні за діяльність залоз внутрішньої секреції) шляхом вироблення тиреотропін-релізінг

гормону (ТРГ), який стимулює вироблення гіпофізом тиреотропного гормону (ТТГ). Кількість ТРГ, що виділяються, і ТТГ залежить від рівня тиреоїдних гормонів в крові і між ними існує зворотний зв'язок [2]. Якщо цей нейро–ендокринний зв'язок порушується, виникає місце для розвитку більшості патологічних станів у щитовидній залозі. Найбільш небезпечним серед них є рак щитовидної залози [1,41].

Гормони залози — тироксин, трийодтиронін — справляють величезний вплив на ріст, фізичний, статевий та розумовий розвиток дитини. Функція щитоподібної залози може бути нормальною (стан еутиреозу), підвищеною (гіпертиреоз) або зниженою (гіпотиреоз). Гіперфункція характерна для таких захворювань, як дифузний токсичний зоб, вузловий токсичний зоб, токсична аденома щитоподібної залози. Гіпофункція спостерігається при вузловому або змішаному зобі, аплазії щитоподібної залози, ектопії або дифузному її збільшенні [14].

1.2. Захворювання щитоподібної залози, які супроводжуються процесами біомінералізації

Розрізняють різний ступінь ризику асоціації біомінеральних утворень ЩЗ з розвитком злоякісних пухлин у залежності від розмірів кальцифікатів. За даними тиреоїдної ультрасонографії процеси біомінералізації розділяють на макро- мікрокальцифікацію [18, 21, 33]. В окремих роботах, окрім двох зазначених видів кальцифікації, що виявляються при УЗД, виділяють ще ободову або кільцеву кальцифікацію [68]. Межа між мікро- та макрокальцифікацією на УЗ-дослідженні дорівнює 2 мм: об'єкт розміром ≤ 2 мм вважається мікрокальцифікатом, >2 мм – макрокальцифікатом [37]. У багатьох дослідженнях отримані результати про достовірну кореляцію мікрокальцифікатів з високим ризиком малігнізації, проте зв'язок макрокальцифікатів з раком ЩЗ залишається нез'ясованим. Біомінералізовані

вузли ЩЗ з макрокальцифікацією у роботі Lee J. та співавт. (2013) поділені на 4 групи: гладенька повна кальцифікація (за типом яйцевої шкаралупки), гладенька часткова кальцифікація, нерівномірна кальцифікація та вузлова кальцифікація [39]. Часто кальцифікація вузлів зустрічається при багатовузловому зобі з кістозним переродженням, особливо якщо захворювання має тривалий перебіг. Діагностичну цінність тиреоїдних вузлів з макрокальцифікацією рекомендується визначати за допомогою цитологічного дослідження [33].

У дослідженні Wu et al. (2012), серед 383 пацієнтів з вузловою патологією ЩЗ на передопераційній комп'ютерній томографії у 135 хворих (35,2%) виявили ознаки кальцифікації залози. Після оперативних втручань шляхом гістологічної верифікації було встановлено, що частота виявлення злоякісних пухлин серед кальцифікованих вузлів була достовірно вищою, ніж некальцифікованих (48% проти 20%). Рак ЩЗ асоціювався з різними типами кальцифікації вузла з різною частотою: 22% вузлів з периферичною біомінералізацією, 21% випадків – з грубою мінералізацією, 58% вузлів з простою точковою кальцифікацією, 79% випадків – з множинною точковою кальцифікацією. У пацієнтів з солітарним кальцифікованим вузлом в 83% виявляли РЩЗ [20].

У роботі Gungor B et al. (2012) досліджувалися зв'язки між кальцифікацією та злоякісними пухлинами ЩЗ шляхом порівняння результатів доопераційного УЗ-дослідження та гістопатологічного дослідження після тиреоїдектомії серед 169 пацієнтів. Ознаки патологічної біомінералізації були виявлені 32,54% (55 випадків). Відсоток злоякісної патології серед пацієнтів з кальцифікацією становив 30,91% (29 пацієнтів). Таким чином, показник пацієнтів із злоякісними пухлинами і кальцифікацією становив 58,62% (17/29), а показник пацієнтів із злоякісними пухлинами, але без ознак кальцифікації відповідно становив 10,52% (12/114), що статистично достовірно ($p < 0,001$)

показувало зв'язок між кальцифікацією та ризиком виникнення злоякісних пухлин ЩЗ [29].

Вивчався також зв'язок між ультрасонографічними ознаками кальцифікації вузлів ЩЗ і результатами гістологічних досліджень [38, 58]. Всього було досліджено 1431 вузол ЩЗ від 1078 пацієнтів, яким спочатку було виконано УЗ-дослідження, після чого була виконана тиреоїдектомія. За результатами УЗД у 38,6% вузлів (552 вузли) було виявлено ознаки біомінералізації, які були поділені на наступні типи: мікрокальцифікати, кільцеподібна периферична кальцифікація, півмісяцеподібна кальцифікація, груба внутрішньовузлова кальцифікація та точкова кальцифікація. За результатами гістологічного дослідження в 91,1% вузлів виявлено злоякісні пухлини і в 8,9% (126 вузлів) виявлена доброякісна патологія. Серед злоякісних пухлин частота кальцифікації сягала 40,2% (524 випадки), найпоширенішим типом кальцифікації були мікрокальцинати (42,9%), найменш поширеним типом – кільцева периферична кальцифікація (5,9%). У ході дослідження виявилось, що з усіх типів кальцифікації статистично достовірний зв'язок із злоякісними пухлинами мали мікрокальцифікація та груба внутрішньовузлова кальцифікація [58]. Сильний достовірний зв'язок мікрокальцифікатів та злоякісних пухлин ЩЗ (особливо мікропапілярної карциноми) підтверджується також у роботі Shi C et al (2012), специфічність мікрокальцифікатів досягає 96,5% [62]. Частота мікрокальцифікатів значно зростає у групі пацієнтів старше 45 років. У цьому дослідженні також було виявлено 12 випадків кальцифікації лімфатичних вузлів шиї. У всіх зразках гістологічно було встановлено метастази ПРЩЗ [62]. Подібні результати також зустрічаються в інших роботах [40, 62].

Злоякісні епітеліальні пухлини ЩЗ складають 1% від усіх злоякісних новоутворень, але є найбільш розповсюдженими пухлинами органів ендокринної системи [1, 4]. Відомо, що папілярний рак ЩЗ є однією з найпоширеніших форм диференційованого раку ЩЗ [14, 41]. У структурі

злоякісних пухлин ЩЗ папілярний рак (ПРЩЗ) складає 70% і його частка у структурі захворюваності останніми десятиріччями зростає у всьому світі [41]. Незважаючи на доволі сприятливий прогноз ПРЩЗ, близько 10% пацієнтів помирають від цього захворювання, а у 5-20% випадків виникають рецидиви [1, 4]. Загальне виживання для більшості хворих зі злоякісними пухлинами ЩЗ залежить багато в чому від швидкості і точності встановлення правильного діагнозу та гістологічного типу пухлини.

Наразі актуальною є проблема диференційної діагностики злоякісних пухлин ЩЗ з проявами патологічної кальцифікації [1, 12, 14]. У зв'язку з цим, вивчення морфологічних особливостей патологічної біомінералізації при захворюваннях ЩЗ представлятиме практичний інтерес для клініцистів.

Вік пацієнта, стать, розмір та гістологічна належність пухлини, наявність метастатичного ураження поза ЩЗ, стан лімфатичних вузлів є значними маркерами для прогнозу у пацієнтів з ПРЩЗ [41]. Однак значення патологічної біомінералізації (кальцифікації) як гістологічної ознаки ПРЩЗ нехтується патологами та клініцистами. УЗД ЩЗ широко використовується для виявлення кальцифікатів під час передопераційної підготовки пацієнтів з вузлами ЩЗ [21]. Ознаки патологічної біомінералізації присутні як у доброякісних, так і в злоякісних захворюваннях ЩЗ. В окремих дослідженнях вказується на асоціацію раку ЩЗ і кальцифікації [21, 27, 59].

Серед усіх захворювань ЩЗ найбільш часто кальцифікація виявляється при ПРЩЗ. Однак, клінічне значення кальцифікації, включаючи співвідношення клінічних проявів, вплив на виживання пацієнта та молекулярні механізми, які відповідають за кальцифікацію тканини пухлини, залишається невстановленим. Грунтуючись на клінічних особливостях патологічної біомінералізації, у роботі Bai Y., et al, (2009), кальцифікати ЩЗ були поділені на псамомні тільця, стромальну кальцифікацію та формування кісткової тканини (осифікацію) [18].

Псамомні тільця (ПТ) характеризуються як сферичні кальцифіковані осередки, побудовані з концентричних пластинок [12, 22, 30]. Присутність ПТ більшість авторів вважає діагностичним критерієм ПРЩЗ, але повідомляється також про випадки їх виявлення при інших типах РЩЗ [21]. У роботі J. Hunt and E.L. Barns (2003) вивчалися 29 випадків не асоційованих з пухлинами ПТ, виявлених у ЩЗ та перитиреоїдальних лімфовузлах. За детального клінічного та гістологічного дослідження тканини обох часток ЩЗ було встановлено наявність карцином в 27 випадках з 29: в 25 хворих виявлено різні типи ПРЩЗ та у 2 пацієнтів карциному з клітин Гюртле. Важливо наголосити, що в 15 випадках ПТ виявлялися у протилежній частці ЩЗ, що утруднювало виявлення основної пухлини [31].

ПТ зазвичай знаходяться всередині стромі ракових сосочків ПРЩЗ. У випадках, коли ПТ виявляються у ЩЗ поза пухлиною, їх можна знайти в міжфолікулярній та міжчасточковій стромі, так як там знаходяться кровоносні та лімфатичні судини [30, 31]. Окрім ЩЗ, ПТ спостерігаються в менінгіомах, папілярних серозних цистаденокарциномах яєчника, і рідше – в інших пухлинних і не пухлинних захворюваннях [23].

Про походження ПТ існують різні погляди. Наприклад, Johannessen J.V et al. (1980) ПТ вважають результатом дистрофічного звапнення пухлинних тромбів у просвіті лімфатичних та кровоносних судин. Ультраструктурні дослідження ПРЩЗ показують потовщення базальної мембрани судин пухлинних сосочків з тромбозом, кальцифікацією і некрозом пухлинних клітин, що призводить до формування ПТ [30]. За поглядами інших авторів ПТ формуються як внутрішньоклітинні кальцифікати в життєздатних клітинах, які розташовані вогнищево [65]. Дослідження серозних цистаденокарцином яєчника та менінгіом показало, що продукція колагену пухлинними клітинами і наступна кальцифікація є відповіддю на формування ПТ [22]. Про можливе існування попередників ПТ повідомлялося для менінгіом та ПРЩЗ, вони описувалися у вигляді позаклітинних великих і малих гіалінових глобул,

коротких гіалінових циліндрів, які оточені диференційованими пухлинними клітинами або у вигляді невеликої кількості внутрішньоцитоплазматичних тілець (включень), виділених з інтактних пухлинних клітин [22]. Також було виявлено численні позаклітинні еозинофільні відкладення, які відповідали некальцифікованим псамомним тільцям, при низькодиференційованій аденокарциномі підшлункової залози [61]. Клітинна дегенерація і некроз, які призводять до зникнення пухлинних клітин, виявляються тільки навколо ПТ, але не навколо попередників. Базуючись на зазначених фактах, автори представляють ПТ як активний біологічний процес, який призводить до загибелі пухлинних клітин і попереджує їх ріст та поширення [22].

Найбільш поширена загальноприйнята думка, що ПТ у ПРЩЗ пов'язані з пухлинними клітинами всередині лімфатичних судин або пухлинної строми [41]. Також існує оригінальна гіпотеза походження ПТ в пухлинах ЩЗ та яєчниках, в якій доводиться участь у процесах біомінералізації грам-негативних нанобактерій (*Chlamidia*), які здатні преципітувати (осаджувати) солі кальцію [57]. У поодиноких дослідженнях повідомляється про асоціацію ПТ з доброякісними гранулематозними реакціями на сторонні тіла (силікат алюмінію) [16].

Цікавим є дослідження Olivera-Merlin P.S., et al (2012) з приводу хімічного складу псамомних тілець папілярних пухлин ЩЗ та яєчника, яке було виконане за допомогою плазмо-емісійної спектрофотометрії виділених з парафінових блоків кальцифікатів. Було встановлено, що ПТ містять у підвищених концентраціях такі неорганічні елементи, як мідь, кадмій, кальцій, залізо, магній та цинк, при чому, статистично достовірної різниці між показниками тканини ЩЗ та яєчників не виявлено [45].

Осифікація або формування кістки фіксувалася у випадках, коли ідентифікувався кістковий матрикс та остеоцити [18]. Всі кальцифікати, які не підходили під визначення ПТ та осифікації, вважалися стромальною кальцифікацією, включаючи також псамомоподібні кальцифікати – округлі без

пошарової структури та пошаровані, але з нерівними краями. Про механізми реагування на формування ПТ, стромальної кальцифікації та осифікації відомо мало.

Стромальна кальцифікація виникає внаслідок відкладення депозитів фосфату кальцію у фіброзну строму. У дослідженні Bai Y., (2009) 27 з 28 випадків осифікації супроводжувалися стромальною кальцифікацією [18]. Це легко пояснюється тим, що формування кістки відбувається з попередньо існуючого вогнища мінералізації, що призводить до кісткової метаплазії. Вважається, що для початку процесів ектопічного формування кістки та стромальної кальцифікації на молекулярному рівні необхідне залучення сигнального шляху кісткоутворювальних білків (bone morphogenetic protein - BMP). Сімейство кісткоутворювальних білків (BMP) складається, щонайменше, з 30 молекул, які вперше виділені з демінералізованого кісткового матриксу. Білки BMP 1-7 здатні індукувати ектопічну осифікацію [36].

Про молекулярні основи утворення псамомних тілець, стромальної кальцифікації та осифікації у ЩЗ відомо відносно небагато. Наприклад, лінія пухлинних клітин карциноми ЩЗ 8505С може продукувати BMP-1 та BMP-2 [34]. BMP-1 або проколаген-С-пепсидаза є ферментом-металопротеїназою, інші кісткоутворювальні білки, такі як BMP 2-7 є білками, подібними до β -трансформуючого фактора росту (TGF- β) [28, 36]. BMP-1 може конвертувати попередники білків, таких як ламінін-5, проколаген, фактори росту і диференціації 8 та 11 і TGF- β 1, в їхні активні форми, що відіграють різнобічні ролі в адгезії клітини та регуляції мінералізації екстрацелюлярного матриксу твердих тканин [28]. BMP-1 також може активувати два інших білки сімейства BMP: BMP-2 та BMP-4, руйнуючи їх антагоніст, хордін [28, 32]. Серед інших кісткоутворювальних білків за умов патології ЩЗ був досліджений BMP-9 [15], який є один з найбільш остеогенних субтипів кісткоутворювальних білків. У процесі дослідження було встановлено, що в умовах осифікації при ПРЩЗ значно посилювалася експресія BMP-9, чого не спостерігалось при відсутності

ознак мінералізації тканини [15]. Також повідомляється про зв'язок утворення ПТ з експресією BMP-11 та остеопонтину. Відомо, що зазначені білки продукуються макрофагами [32, 33].

Остеопонтин (OPN) - кислий фосфопротеїн, що експресується у мінералізованих тканинах і інгібує утворення гідроксиапатиту, активує функцію остеокластів [60]. OPN пригнічує кальцифікацію, зв'язуючись з поверхнею кристалів [33, 43]. Він являється прозапальним цитокіном, що підсилює ремоделювання судин і ангиогенез. Таким чином, проангіогенна дія розщепленого OPN полегшує мінералізацію матриксу, а повного фосфорильованого OPN - інгібує його. Також було показано, що OPN входить до складу ниркових каменів і, вірогідно, впливає на їх формування [26, 49].

Окрім білків сімейства BMP, TGF- β , остеопонтину, наявні повідомлення про участь у процесах біомінералізації диференційованих злоякісних пухлин ЩЗ таких молекул, як Runx2, CD44v6, остеокальцину [27].

Таким чином, ознаки патологічної біомінералізації (кальцифікації) можуть бути важливим диференційно-діагностичним критерієм пухлин ЩЗ як при УЗД, так і при патогістологічному дослідженні. Це особливо стосується пацієнтів з солітарним кальцифікованим вузлом, кальцифікацією лімфатичних вузлів шиї, мікрокальцинатами у пацієнтів старшого віку (більше 45 років) та грубою кальцифікацією вузлів. Особливу увагу патологам необхідно звернути на псамомні тільця, прямо не пов'язані з пухлинною патологією, так як це може бути ознакою прихованого ПРЩЗ (мікрокарцинома) або метастазу РЩЗ з протилежної частки залози.

1.3. Загальна характеристика патологічної біомінералізації тканин організму

При патологічній біомінералізації відбувається аномальне випадіння солей кальцію одночасно з малою кількістю заліза, магнію та інших

мінеральних солей [25]. Розрізняють три форми патологічної біомінералізації: дистрофічну, метастатичну та метаболічну.

При дистрофічній біомінералізації солі кальцію відкладаються в ділянках некрозу. Відкладення солей кальцію частіше виявляють у померлих тканинах, або тканинах у стані глибокої дистрофії. Основна причина дистрофічної біомінералізації – фізико-хімічна зміна тканин, що забезпечує абсорбцію солей кальцію з крові та тканинної рідини [5, 23].

Під час дистрофічної біомінералізації утворюються кристалічні мінерали, котрі складаються з фосфата кальцію у вигляді апатиту, схожого на гідроксиapatит кісток. Даний процес складається з двох фаз: ініціації та поширення – і розвивається як в клітинах, так і в позаклітинному просторі. Поза клітиною фаза ініціації відбувається у міхурцях з мембраною близько 20нм у діаметрі. Кальцит концентрується в цих міхурцях завдяки його спорідненості з кислими фосфоліпідами, а фосфати акумулюються як результат дії фосфатаз зв'язаних з мембраною. Ініціація внутрішньоклітинного звапнення відбувається в мітохондріях померлих або помираючих клітин, котрі накопичують кальцій [5].

У фазі поширення відбувається утворення кристалів, котре залежить від концентрації кальцію та фосфору у позаклітинному просторі, а також від наявності мінеральних інгібіторів, колагену та інших білків. Крім того, остеопонтин, кислий, зв'язаний з кальцієм фосфопротеїн з високою спорідненістю до гідроксиapatиту бере участь в мінералізації кісток та в дистрофічній біомінералізації, а колаген прискорює утворення кристалів [35].

Метастатична біомінералізація відбувається у нормальних тканинах при гіперкальциемії, причиною якої є: гіперпаратиреоїдизм, гіпофункція С-клітин ЩЗ, інтоксикація вітаміном D, системний саркоїдоз, хвороба Адіссона, ідіопатична гіперкальциемія [5, 50].

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Дослідження проводилось на біопсійному матеріалі отриманому під час оперативних втручань з приводу захворювань ЩЗ різного ступеню атипії (злоякісних, доброякісних пухлин та зобів), які проводились на базі Сумського обласного клінічного онкологічного диспансеру (СОКОД) та Сумської обласної лікарні. Всього було досліджено 100 зразків паренхіми ЩЗ з різною проліферативною патологією. Всі пацієнти перед операцією проходили УЗД ЩЗ.

Гістологічний та гістохімічний методи. Для гістологічного дослідження брали праву частку ЩЗ, фіксували її в 10% розчині нейтрального формаліну або розчині Боуіна впродовж 24 годин. Результати фіксували у протоколах забору матеріалу. Проводку і виготовлення парафінових блоків здійснювали за загальноприйнятою методикою. На ротаційному мікротомі Shendon Finnesse 325 виконувалися парафінові серійні зрізи товщиною 4-5 мкм, забарвлювали гематоксилін-еозином, алізариновим червоним та методом фон Косса.

Після послідовних дій (фіксація тканини залози в 10% розчині формаліну, заливка в парафін, депарафінізації та зневоднення) частина препаратів використовувалась для фарбування гематоксиліном-еозином та проведення гістологічного дослідження під світловим мікроскопом, а частина на проведення імуногістохімічного дослідження.

Схема послідовних дій, під час проведення імуногістохімічного дослідження препарату:

1. Фіксація тканини залози в 10% розчині нейтрального формаліну протягом 12 годин, заливка в парафін, депарафінізації та зневоднення;
2. Демаскування антитіл (кип'ятіння в цитратному буфері);
3. Пригнічення ендогенної пероксидази за допомогою H_2O_2 ;
4. Інкубація перший антитіл при $t\ 30^0$;
5. Промивання в 3 стаканах ТВС-буфері (Трис-НСІ буфер рН 7,4);

6. Інкубація зв'язуючих антитіл;
7. Промивання в 3 склянках в ТВС-буфері;
8. Інкубація з стрептовідином (кон'югований з ферментом);
9. Промивання в 3 склянках ТВС-буфері;
10. Виявлення ферменту діамінобензидином;
11. Промивання водою, дофарбовування ядер гематоксиліном, заключення в середовище.

З метою встановлення експресії імуногістохімічних маркерів ми використовували спектр антитіл, який включав маркери p53 (клон DO-7 (DAKO), маркеру проліферації Ki-67 (клон M1B-1 (DAKO), Osteopontine (DAKO, клон 8P3 (LabVision)). Інкубацію зрізів з первинними антитілами проводили у вологих камерах при температурі 23-25°C впродовж 30 хвилин. Титр антитіл підбирався індивідуально для кожного маркера. Наступний етап імуногістохімічного дослідження проводили з використанням системи візуалізації UltraVision LP (LabVision), ідентифікація реакцій проводилась за допомогою хромогену DAB (діамінобензидин). Для диференціювання структур тканин зрізи додатково забарвлювали гематоксиліном Майєра.

Показники експресії імуногістохімічних маркерів' визначали за інтенсивністю фарбування в коричневий колір специфічних структур в клітинах та за локалізацією експресії маркеру клітинною мембраною та ядром. Експресію для кожного маркеру оцінювали індивідуально не менше ніж в 10 полях зору мікроскопу з наступною градацією, а саме: негативна та позитивна експресія. Вивчення забарвлених мікропрепаратів проводилось за допомогою світлового мікроскопу, а фотозйомка – за допомогою цифрової системи вибору зображень SEO SCAN IEX285AK-F IEE - 1394.

Стандарт оцінки експресії p53 проводили згідно рекомендацій американської науково-дослідницької лабораторії. При фарбуванні менше 5% ядер, незалежно від інтенсивності, пухлина вважається p53-негативною. P53-позитивним статус буде при: 1) фарбуванні більше 50% ядер незалежно від

інтенсивності, 2) інтенсивному (3+) фарбуванні більше 5% ядер, 3) помірному фарбуванні від 10% до 50% ядер.

Проліферативна активність в тканині ЩЗ у відповідності до рекомендацій Fitzgibbons et al. (2000) оцінювалася по градаціях ($\geq 1\%$, $\geq 10\%$, $\geq 20\%$ пухлинних клітин), у зв'язку з чим експресія Ki-67 більш ніж в 20% пухлинних клітин розглядалася як позитивна (Ki-67+) та як вкрай несприятлива, а менше 20% - негативна (Ki-67-).

Рівень експресії остеопонтину (OPN) визначався напівкількісним методом за забарвленням цитоплазми клітин: негативна (0), слабка (+), помірна (++) та сильнопозитивна (+++) реакція.

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ВЛАСНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

У дослідженні було відібрано 100 випадків найбільш поширеної патології ЩЗ. У 50 біопсіях ЩЗ виявлено явища патологічної біомінералізації, 50 зразків тканини ЩЗ виступали у якості контрольної групи.

Для коректного порівняння результатів імуногістохімічного дослідження було досліджено по 10 випадків патології ЩЗ з відкладеннями солей кальцію (серія I) та без виявлених ознак біомінералізації (серія II): вивчалися змішаний зоб, фолікулярні аденоми, папілярний та фолікулярний рак ЩЗ та тиреоїдити (дифузний токсичний зоб та аутоімунний тиреоїдит). Розподіл матеріалу відображений в таблиці 3.1.

Табл. 3.1. Розподіл хворих по групах.

Групи	Серія I	Серія II
1.Змішаний зоб	10	10
2.Тиреоїдит	10	10
3.Фолікулярна аденома	10	10
4.Фолікулярний рак	10	10
5.Папілярний рак	10	10
Всього	50	50

Діагностика захворювань ЩЗ починається з огляду та об'єктивних методів дослідження – таким чином можна виявити, наприклад, утворення вузлів у органі, але встановити наявність патологічної біомінералізації надзвичайно складно. Значно полегшує виявлення кальцифікатів у тканині ЩЗ проведення УЗД, яке дозволяє з високою точністю визначити розміри, форму та локалізацію депозитів сполук кальцію. При УЗД ЩЗ патологічна біомінералізація виявлялася у вигляді різних паттернів: точкових

мікрокальцифікатів, грубих або овальних щільних об'єктів, дуго-і кільцеподібних утворень.

Також при ультрасонографічному дослідженні визначаються розміри, форма, внутрішня ехогенність (гіпо-, ізо- або гіперехогенність в порівнянні з фоном тканини ЩЗ) та гало (наявність або відсутність) виявлених об'єктів. На жаль, трактування УЗД-паттернів не надає повної верифікації патологічного процесу, тому патогістологічне дослідження залишається «золотим стандартом» діагностики захворювань ЩЗ, особливо це стосується онкопатології.

3.1. Морфологічне дослідження захворювань щитоподібної залози, які супроводжуються біомінералізацією

Група 1. Змішаний (макро-мікрофолікулярний) зоб.

При проведенні УЗД ЩЗ у пацієнтів зі змішаним зобом найбільш часто виявлялася картина грубих і щільних відкладень кальцифікованої тканини (50%) та округлих та дугоподібних об'єктів з гладенькими краями (40%). Також було виявлено один випадок точкового відкладення патологічних біомінералітів. (рис.1)



Рис. 1

Рис.1. Ультрасонограма правої частки ЩЗ (доплерографія). Ділянки відкладень мінералізованої тканини(гіперехогенні включення) у капсулі вузла змішаного зобу.

Під час макроскопічного дослідження зразків ЩЗ першої групи встановлено, що у чотирьох (40%) випадках одна з часток залози була вузлоподібна, значно збільшена по відношенню до іншої долі (до 8-10 см у поперечнику), повнокровна, щільної консистенції. У одному з цих випадків на розрізі було виявлено кісткоподібний об'єкт розмірами 2,0x2,5x7,5см, твердий, білуватого кольору, який різався зі значними труднощами (рис .2). У інших шести випадках (60%) ЩЗ була дифузно збільшена, у товщі контурували вузлоподібні утвори округлої форми від 0,5 до 1,6 см в діаметрі. На дотик вони мали різну щільність, котра не залежала від розміру вузла. Під час розрізу ЩЗ в місцях ущільнення у всіх випадках тканина різалася з хрустом, поверхня розрізу була рожево-сірого кольору, зерниста на вигляд, із крововиливами, ділянками білої щільною речовини, яка кришилася.



Рис.2. Щитоподібна залоза на розрізі з кісткоподібним об'єктом, який містив ділянки щільної білої речовини. Макрофото змішаного зобу.

Мікроскопічно ЗЗ характеризувався наявністю як збільшених, перерозтягнутих колоїдом фолікулів, так і дрібних фолікулів з мінімальною кількістю колоїду, утворенням вузлів різного розміру, значною кількістю сполучної тканини у капсулах вузлів. Патологічна біомінералізація найбільш часто виникала у сполучнотканинних капсулах вузлів (80%) (рис. 3А, 3В), іноді поширювалася на паренхіму ЗЗ, захоплюючи міжфолікулярний простір, колоїд, фолікулярний епітелій (рис. 3Б).

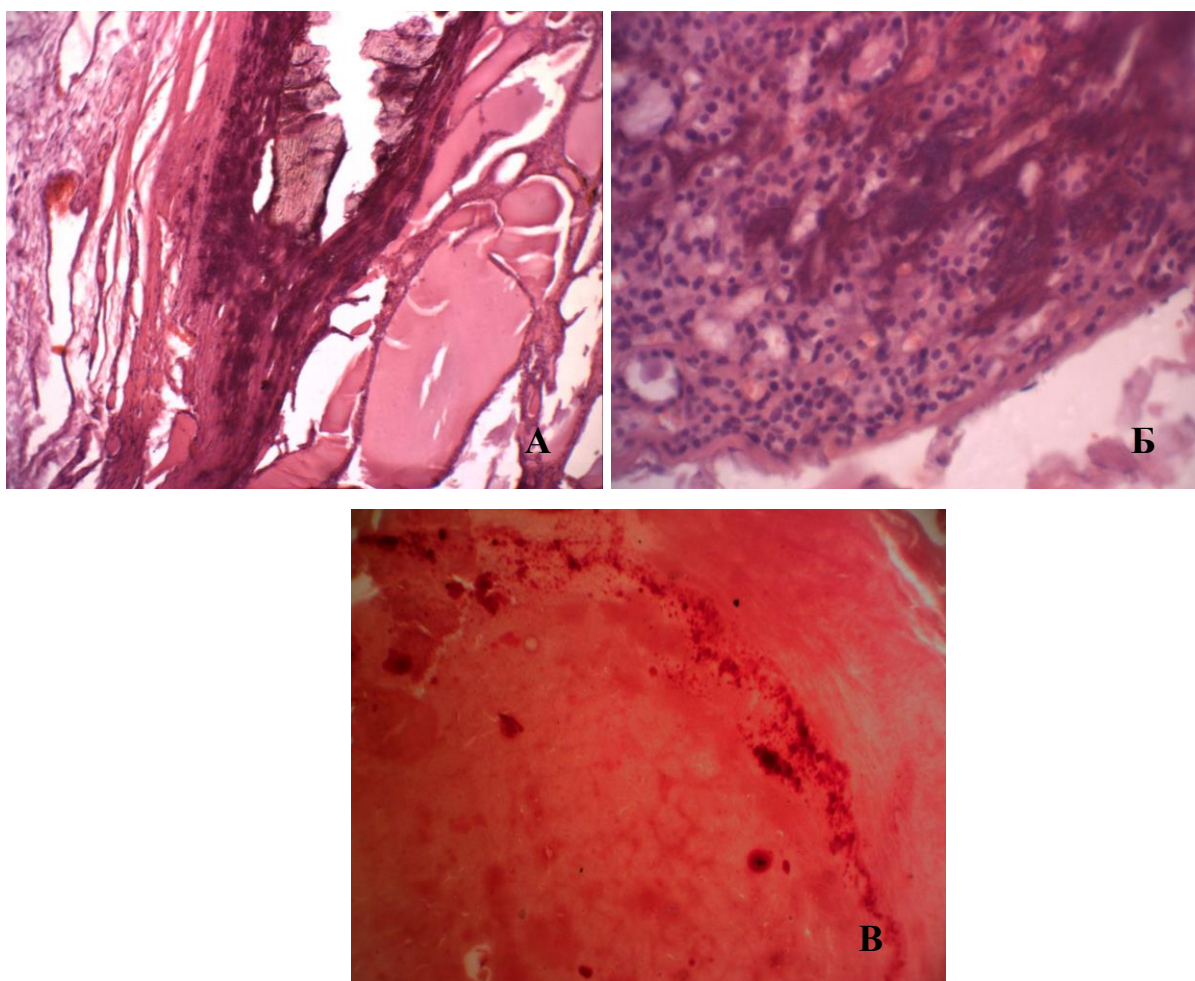


Рис. 3. Гістологічне дослідження змішаного зобу ЩЗ. А – грубі відкладення кальцифікатів у капсулі вузла. Заб. гематоксилін-еозином, зб.х100; Б – відкладення біомінералізованої тканини у паренхімі ЩЗ. Заб. гематоксилін-еозином, зб.х400; В – відкладення кальцифікатів уздовж капсули вузла у вигляді арки, дуги. Заб. алізариновим червоним, зб. 100.

Таким чином, утворення кальцифікатів уздовж капсули вузлів при ЗЗ пояснює ультрасонографічну картину паттернів кілець та дуг, які часто

виявляються при цій нозології. Як правило, явища патологічної біомінералізації виникають вузлового змішаного зобу: нерівномірний ріст тиреоїдної паренхіми призводить до тиску вузла на навколишню тканину і утворення з неї капсули. При тривалому існуванні вузлів у капсулі вірогідно виникають дистрофічні зміни тканин, викликані тривалим тиском, проявом яких є дистрофічна кальцифікація.

Група 2. Тиреоїдит (аутоімунний тиреоїдит та дифузний токсичний зоб)

Оскільки обидві нозології (аутоімунний тиреоїдит та дифузний токсичний зоб) супроводжуються інтенсивною лімфоїдною інфільтрацією, яка є проявом імунного запалення, мають схожий патогенез, було вирішено віднести їх до одної групи. При УЗД ЩЗ виявлялися паттерни грубих аморфних відкладень (40%), точкової мікрокальцифікації (30%), солітарних округлих об'єктів (20%) та в одному випадку (10%) при ультрасонографії не виявлено ознак кальцифікації (пізніше були виявлені при гістологічному дослідженні). (рис.4)

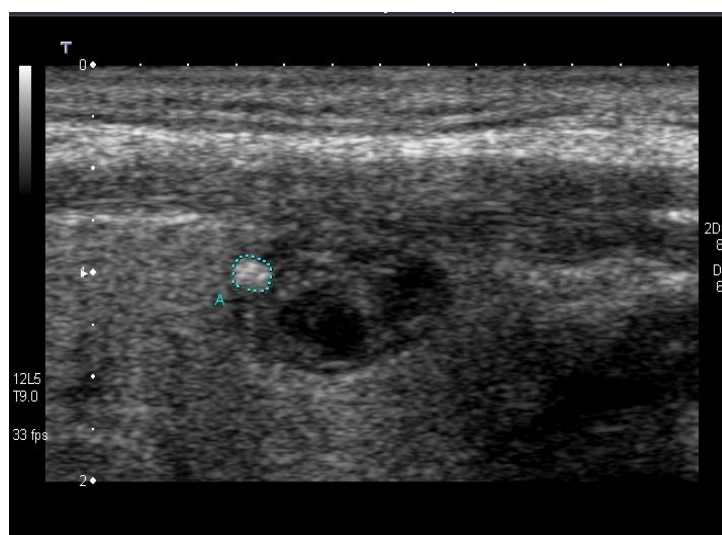


Рис. 4. Ультрасонограма ЩЗ при АІТ. Округле вогнище відкладення мінералізованої тканини(гіперехогенні включення).

Під час макроскопічного дослідження зразків ЩЗ другої групи біомінеральні утворення (кальцифікати) також найчастіше виявлялися у тканині ЩЗ, значно рідше в капсулі вузлів. У ЩЗ при тривало існуючому АІТ відбувається значний розвиток сполучної тканини, в товщі якої містяться щільні включення білуватого кольору. У групі 2 біомінеральні утворення були у вигляді твердих утворень білого кольору, без чітких меж, розмірами від дуже дрібних (0,1-0,5 см) до середніх (0,6-3,0 см). (рис.5)



Рис. 5. Макрофото щитоподібної залози з аутоімунним тиреоїдитом. На розрізі ділянки фіброзу білого кольору.

При мікроскопічному дослідженні у тканині ЩЗ виявлялися ознаки активації морфо-функціонального стану фолікулярного апарату у вигляді розрідження колоїду, різкого зростання кількості вакуоль резорбції, утворення подушечок Сандерсона, набуття фолікулів фестончастого і зіркоподібного вигляду. Біомінеральні утворення мали вигляд відкладень неправильної форми у міжчасточкових септах та міжфолікулярному просторі, колоїді та, рідше, у капсулах вузлів. Процеси утворення вузлів при АІТ та ДТЗ розвиваються з

меншою частотою, ніж при інших захворюваннях ЩЗ (ЗЗ, пухлини). Проте у випадках «базедовіфікації» окремих вузлів при ЗЗ, можливий розвиток клінічної і гістологічної картини ДТЗ з формуваннях дистрофічної кальцифікації уздовж волокон сполучної тканини капсули. (рис.6)

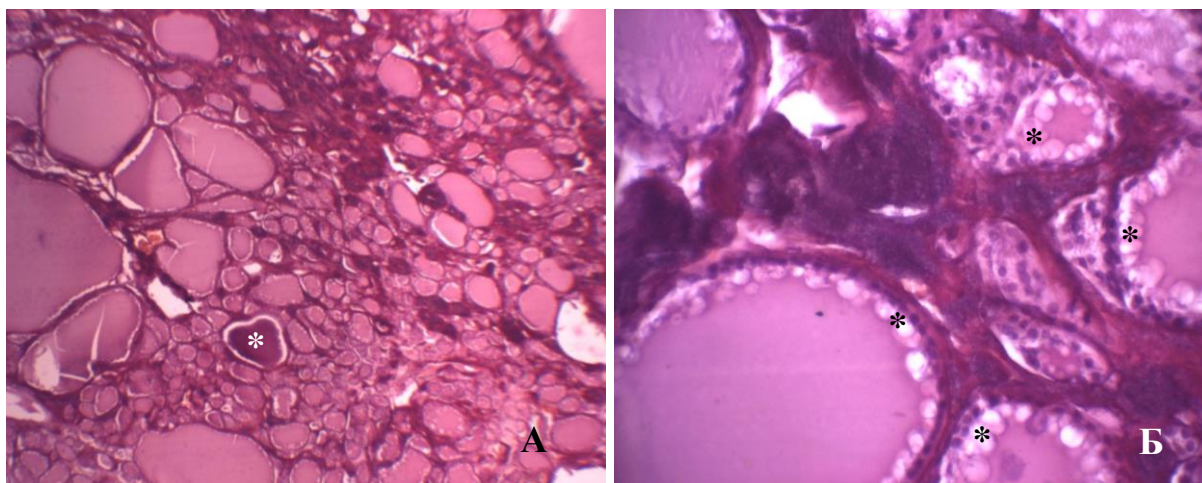


Рис. 6. Гістологічне дослідження АІТ ЩЗ. А – явища біомінералізації колоїду (відмічено зірочкою) та міжфолікулярної стромі. Заб. гематоксилін-еозином, зб.х40; Б – відкладення кальцифікатів у міжфолікулярному просторі на фоні активації резорбції колоїду у фолікулах (відмічено зірочками). Заб. гематоксилін-еозином, зб.х400.

Група 3. Фолікулярні аденоми

На ультрасонограмах ЩЗ у пацієнтів з фолікулярними аденомами найбільш часто виявлялася картина грубих і щільних відкладень кальцифікованої тканини (40%) та округлих об'єктів з гладенькими краями (40%). (рис. 7) Також було виявлено по одному випадку точкового відкладення кальцифікатів (10%) та солітарного округлого кальцифікату (10%).

Під час макроскопічного дослідження зразків групи ФА ЩЗ біомінеральні утворення (кальцифікати) виявлялися у капсулі вузлів з переходом на паренхіму пухлинного вузла ЩЗ (80%). В інших 2 випадках біомінераліти знаходилися в товщі вузла у вигляді поодиноких округлих включень з рівними краями (рис. 8). Мінералізовані тканини виявлялися у

вигляді твердих утворень білого кольору, без чітких меж, розмірами від дуже дрібних (0,1-0,5 см) до середніх (0,6-3,0 см).

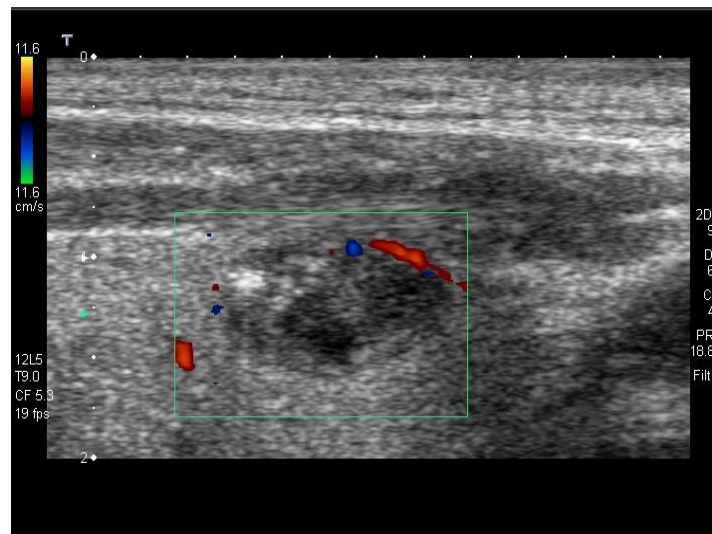


Рис. 7. Ультрасонограма фолікулярної аденоми ЩЗ (доплерографія). Відкладення мінералізованої(гіперехогенні включення) тканини у вигляді неповного кільця.



Рис. 8. Макрофото фолікулярної аденоми щитоподібної залози. На розрізі помітні вузли сіруватого кольору з вкрапленнями білуватої тканини (препарат фіксований формаліном).

ФА при світлооптичному мікроскопіюванні виявлялися як у вигляді солітарних, так і множинних вузлів, часто на фоні вузлового зобу. Як правило, виникнення ФА на фоні вузлового ЗЗ є наслідком аденоматозної трансформації. Тканина ФА чітко відокремлена капсулою від навколишньої тканини і представлена дрібними фолікулами та проліферуючим тиреоїдним епітелієм, який не містив ознак клітинного атипізму. Питання диференційної діагностики ФА та ФРЩЗ надзвичайно складне навіть для досвідчених спеціалістів, тому потрібно з підвищеною увагою досліджувати можливість інвазивних процесів у капсулі вузла. Мінералізована тканина частіше розташована уздовж капсули з поширенням досередини тканини вузла. В окремих випадках конкреції виявляються всередині пухлинного вузла без мінералізації капсули. Процесам кальцифікації підлягає переважно сполучнотканинні волокна капсули та міжфолікулярна строма. (рис. 9)

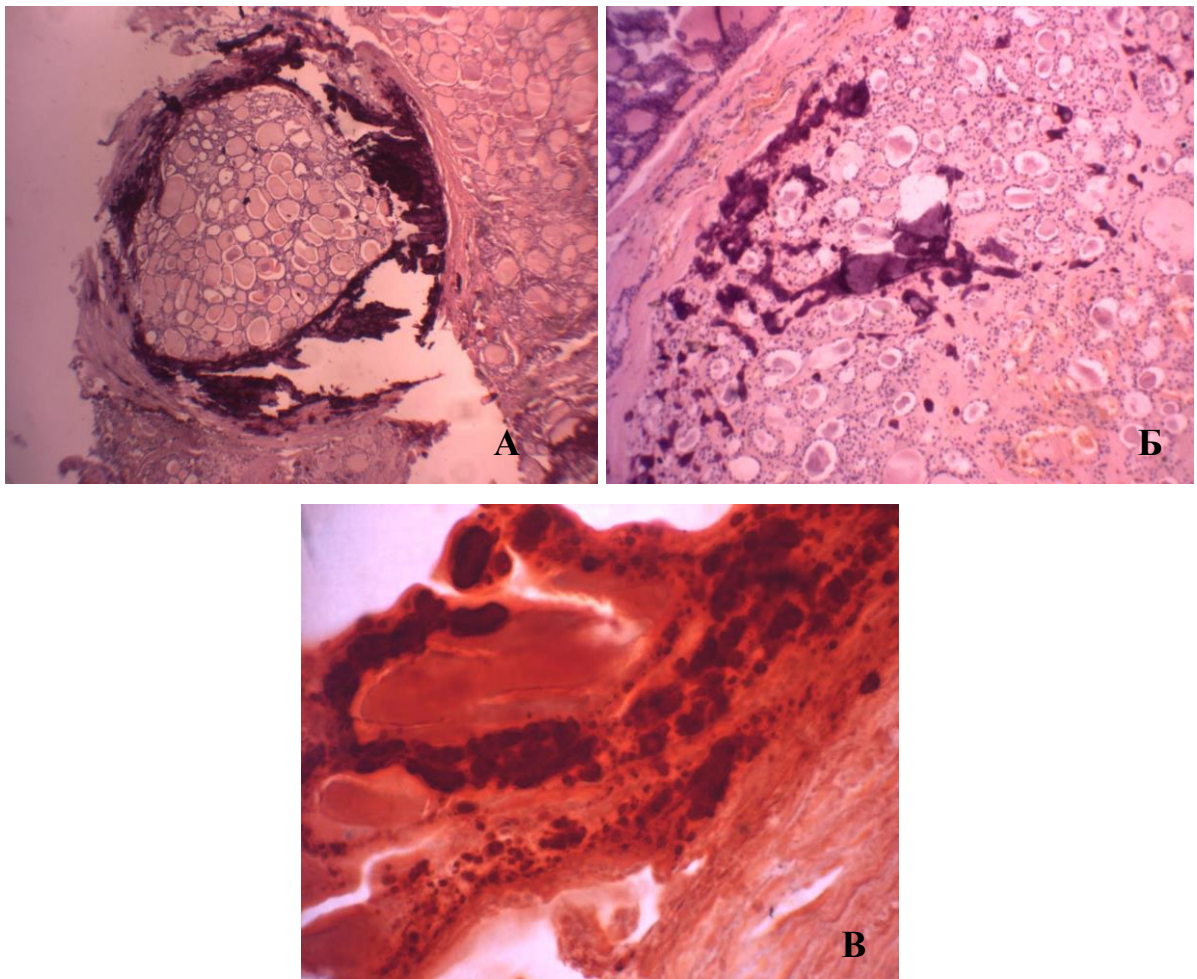


Рис. 9. Гістологічне дослідження фолікулярних аденом ЩЗ. А – кільцеподібна біомінералізація капсули вузла. Заб. гематоксилін-еозином, зб.х40; Б –

відкладення біомінералізованої тканини в капсулі з переходом на паренхіму ФА. Заб. гематоксилін-еозином, зб.х100; В – відкладення кальцифікатів у між фолікулярній стромі ФА. Заб. алізариновим червоним, зб. 400.

Група 4. Фолікулярний рак ЩЗ

На ультрасонограмах ЩЗ у пацієнтів з ФРЩЗ переважно виявлялися вузлові утворення з грубими відкладеннями мінералізованої тканини з нерівними контурами в капсулі та паренхімі вузлів (70%) та поодиноких об'єктів з нерівними краями (20%). (рис. 10) В одному випадку при УЗД не було виявлено ознак мінералізації (гістологічна верифікація) (10%).

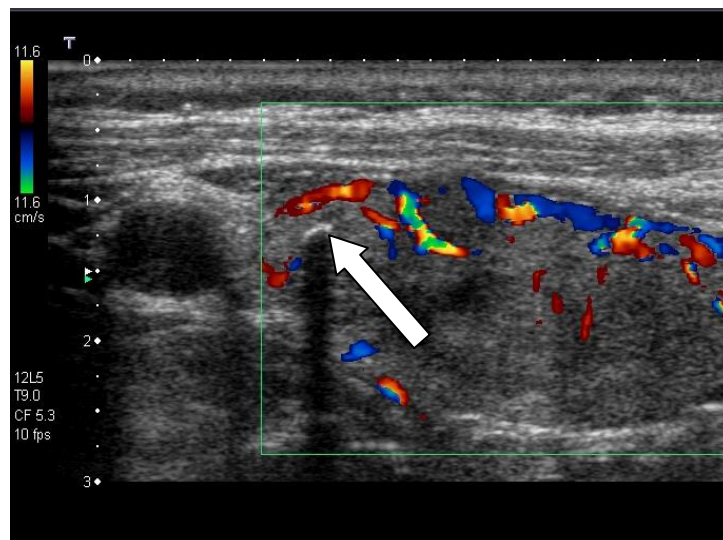


Рис. 10. Ультрасонограма ФРЩЗ (доплерографія). Відкладення мінералізованої тканини у вигляді об'єкту неправильної форми з рівним, чітким контуром, і з гіпогенною доріжкою.

Макроскопічного дослідження препаратів ФРЩЗ показує наявність пухлин у вигляді вузлів, часто оточених товстою капсулою, в якій виявляються щільні включення за типом конкрементів. Тканина пухлини має жовтувато-рожево-сірий колір, м'яку консистенцію. Кальцифікати, окрім капсули вузлів (50%), виявлялися у паренхімі пухлини (50%). Мінералізовані включення

виявлялися у вигляді твердих утворень білого кольору неправильної форми, переважно мали невеликі розміри (0,1-1,0 см). (рис. 11)



Рис. 11. Макрофото фолікулярного раку щитоподібної залози. На розрізі помітна потовщена щільна капсула білого кольору.

Мікроскопічне дослідження ФРЦЗ показує, що пухлини складаються з дрібних фолікулів, які утворені клітинами з різним ступенем атипізму і частково заповненими колоїдом. Їх важко відрізнити від ФА та атипових аденом, вирішальне значення має проростання пухлини в капсулу. Деякі пухлини мають трабекулярну будову або складатися з солідних шарів полігональних або веретеноподібних клітин. Клітини в таких випадках можуть бути різними за розміром і формою, проте анаплазія для них нехарактерна. Процеси кальцифікації набувають розвитку в капсулах пухлин, відмічаються поширення патологічної біомінералізації на паренхіму пухлини з захопленням між фолікулярної стромы і колоїду з формуванням значним осередків неправильної форми (рис.12А). Необхідно відмітити явища кальцифікації судин

середнього калібру (рис. 12 Б, 12В). Відкладення біомінералів відбувається у внутрішньому та середньому шарах стінок судин.

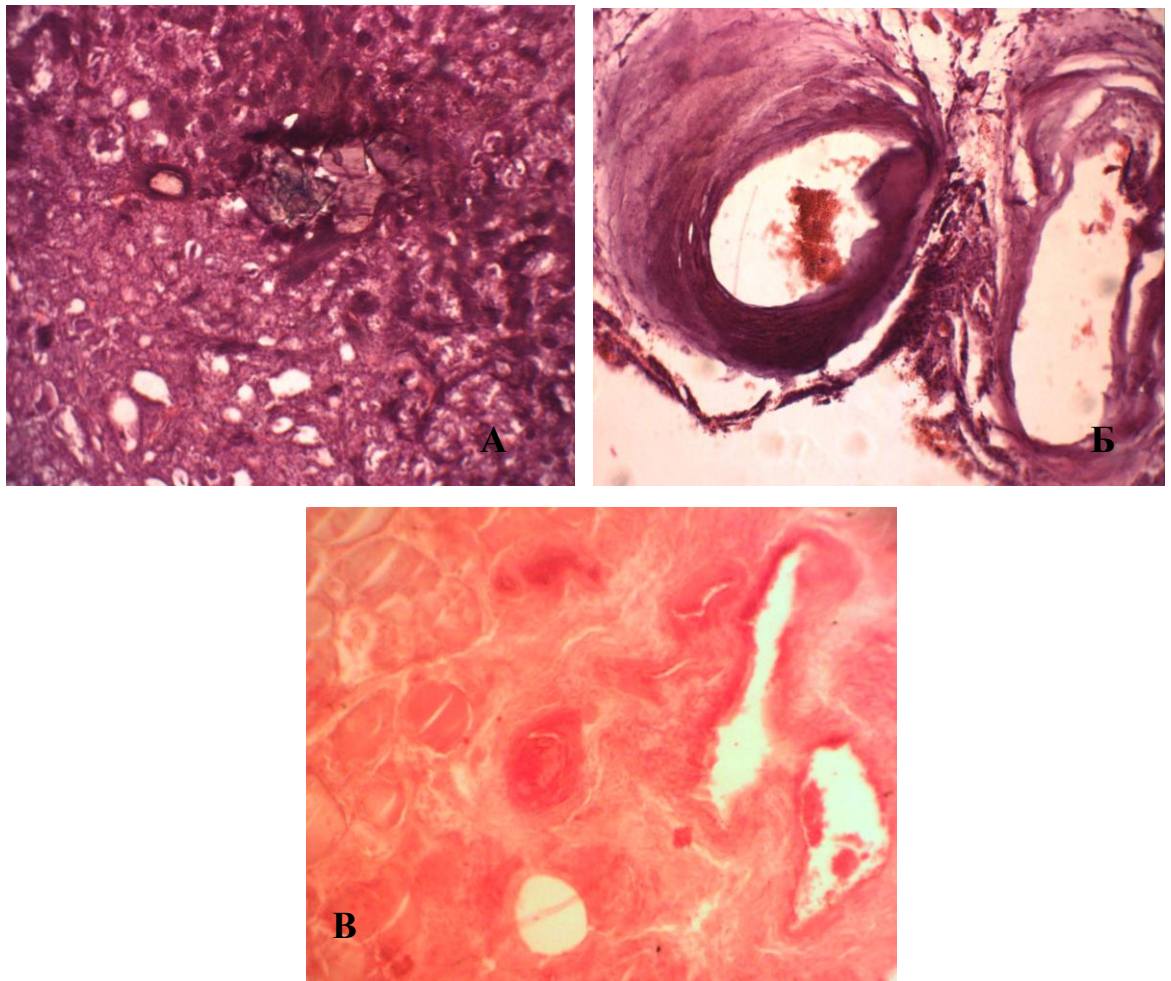


Рис. 12. Гістологічне дослідження ФРЦЗ. А – формування грубих кальцифікатів неправильної форми у тканині пухлини. Заб. гематоксилін-еозином, зб.х100; Б – біомінералізація стінок судин. Заб. гематоксилін-еозином, зб.х200; В – відкладення кальцифікатів у стінках судин капсули. Заб. алізариновим червоним, зб. 100.

Група 5. Папілярний рак ЩЗ

На УЗД ЩЗ пацієнтів з ПРЦЗ найбільш часто виявляються гіпоехогенні утворення різного діаметру (від 0,5 до 2,5 см), неоднорідні за ехоструктурою, з нечіткими контурами, відсутністю анехогенного обідця, аваскулярним типом судинного рисунка. Найбільш часто виявляються точкові мікрокальцифікати округлої або неправильної форми (80%). (рис. 13) Також виявлений один випадок з грубими відкладеннями кальцифікованої тканини (10%) та в одному

випадку при УЗД не було виявлено ознак мінералізації (виявлено при гістологічному дослідженні) (10%).



Рис.13. Ультрасонограма вузла ЩЗ. Точкові депозити мінералізованої тканини (гіперехогенні включення - мікрокальцифікати).

При макроскопічному дослідженні виявляється пухлина у вигляді вузла, іноді ворсинчастого, в основному мультифокальним ростом. Вузли не мають капсули, щільної консистенції, з ділянками кістозних змін. Розміри вузлів можуть бути різними – від 0,1 до 7,0 см. На зрізі колір пухлини варіював від біло-сірого до рожево-жовтого кольору. Кальцифікація в ПРЩЗ виявляється дрібними вогнищами сіро-білої твердої тканини, яка на розрізі кришиться. (рис.14)

Гістологічно ПРЩЗ складається з ніжних сосочків, які галузяться, з багатою судинами фіброзною основою, вистеленою одним або кількома шарами епітеліальних клітин з різним ступенем диференціювання. Частіше зустрічаються високодиференційовані пухлини з мономорфним кубічним епітелієм, можливий різний ступінь втрати диференціювання з розвитком поліморфізму. Для ПРЩЗ найбільш характерне утворення псамомних тілець (ПТ) – округлих мінеральних об'єктів, які складаються з концентричних нашарувань. ПТ є патогномонічним

симптомом для багатьох папілярних пухлин (яєчник, підшлункова залоза, матка). Окрім ПТ, при гістологічному дослідженні ПРЦЗ виявлялися грубі відкладення сполук кальцію в оточуючих тканинах та в стінках судин (рис.15А, 15Б). Для ПРЦЗ також характерна мінералізація метастазів з утворенням ПТ у лімфатичних вузлах та інших тканинах (рис. 15 В).



Мал.14. Макрофото ПРЦЗ. Тканина на розрізі рожевого кольору повнокровна з ділянками білої щільної речовини.

Мінеральний і кристало-хімічний склад ПТ описаний в літературі і свідчить про переважання у їх структурі гідроксиапатиту та, в меншій мірі, інших сполук кальцію [8, 12, 17]. В нашому дослідженні вміст сполук кальцію підтверджується гістохімічною реакцією фон Коса та забарвленням алізариновим червоним за МакГі в модифікації Даля (рис. 15Д).

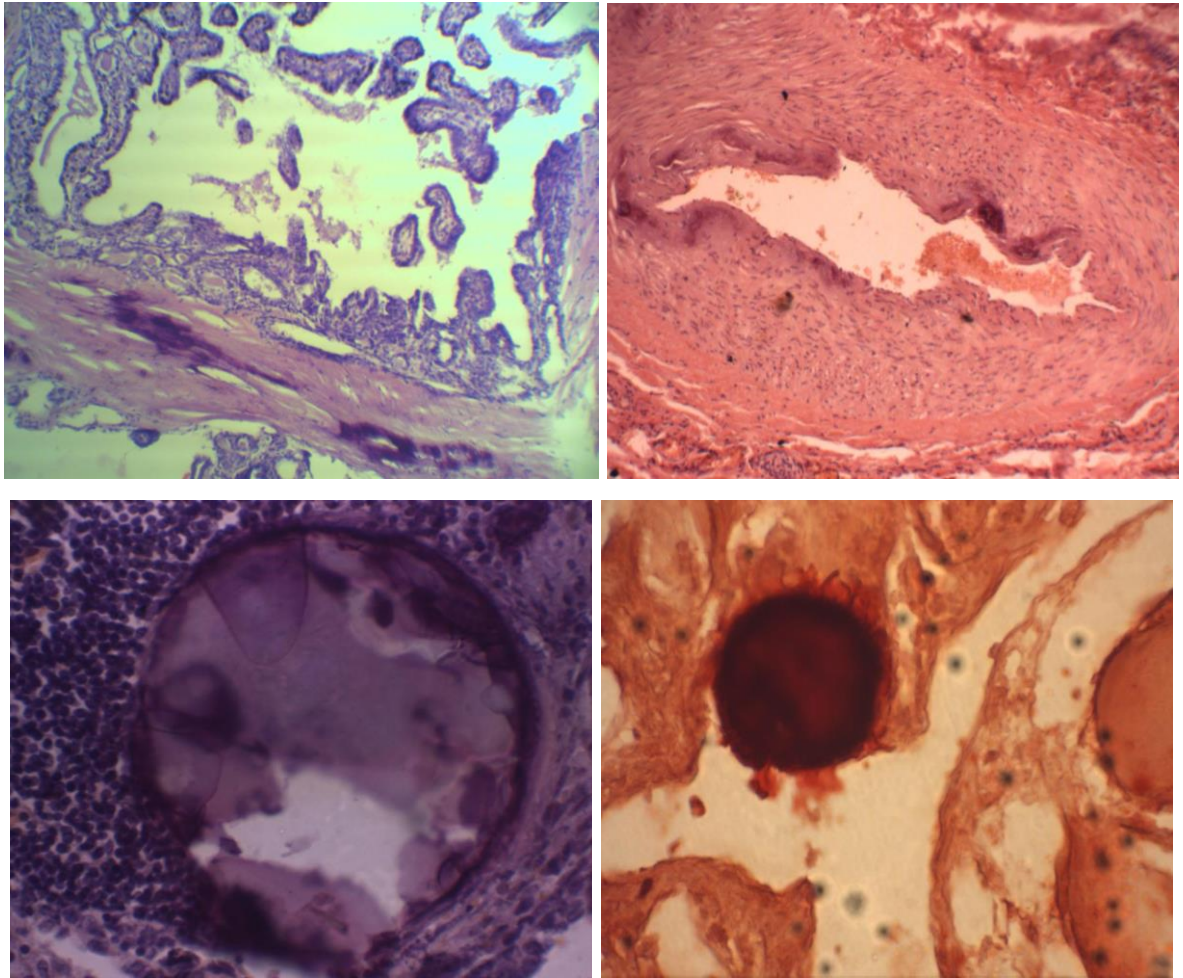


Рис. 15. Гістологічне дослідження ПРЦЗ. А – формування грубих кальцифікатів неправильної форми у тканині навколо пухлини. Заб. гематоксилін-еозином, зб.х100; Б – біомінералізація внутрішньої стінки судини. Заб. гематоксилін-еозином, зб.х400; В – відкладення кальцифікатів у стінках судин капсули. Заб. алізариновим червоним, зб. 100.

3.2. Результати імуногістохімічного дослідження ЩЗ

Зважаючи на суперечливі повідомлення зв'язок білка остеопонтину з процесами біомінералізації [3, 17, 50, 54], ми проводили порівняння результатів ІГХ дослідження кальцифікованої тканини ЩЗ при різних її захворюваннях з такими ж нозологіями, але без ознак мінералізації.

Процеси програмованої клітинної смерті залучені у патогенетичні механізми майже всіх хвороб. За допомогою імуногістохімічного визначення

експресії білка p53 у нашому дослідженні буде простежений можливий зв'язок апоптозу та патологічної біомінералізації в мінералізованій тканині ЩЗ.

Зв'язок інтенсивності проліферативної активності фолікулярного епітелію та розвитку патологічної кальцифікації буде відображатися дослідженням ядерного білка Ki-67 в мінералізованих тканинах ЩЗ та в контрольних групах.

Для дослідження були відібрані пацієнти жіночої статі, так як це відповідає гендерним особливостям досліджуваної патології: за різними даними співвідношення чоловіків і жінок коливається від 1:5,6 до 1:8,8 [1, 14].

Група 1. ІГХ дослідження тканини змішаного (макро-мікрофолікулярного) зобу.

Результати ІГХ-дослідження групи 1А ЗЗ з кальцифікатами відображені в таблиці 4.1.

№ зразка	вік	OPN	P53	Ki-67
1	61	+	0	0
2	32	++	0	0
3	44	++	0	+
4	51	+++	0	+
5	80	+	±	+
6	57	+	0	+
7	35	++	0	+
8	25	++	0	0
9	75	+++	0	+
10	59	+	0	0

Група 1А (змішаний зоб з кальцифікацією) повністю склали жінки, середній вік яких складав $51,9 \pm 5,7$ років. При аналізі ІГХ результатів експресії ОПН, виявлено, що у 40% інтенсивність реакції трактувалася як слабка та 40% випадків - помірна, ще в 20% випадків встановлено сильну експресію ОПН. При ІГХ дослідженні p53 його експресії не виявлено, за винятком суперечливої реакції в одному випадку. Загалом можна констатувати низьку проліферативну активність у тканинах 33 з ознаками мінералізації: в 60% випадків виявлявся низький рівень Ki-67, а в 40% випадків – реакцію можна вважати негативною.

Результати ІГХ-дослідження групи 1Б 33 без ознак мінералізації (контроль) відображені в таблиці 4.2.

№ зразка	вік	OPN	p53	Ki-67
1	45	±	0	+
2	59	±	0	0
3	53	+	0	0
4	54	+	0	+
5	65	+	0	0
6	59	±	0	+
7	52	0	0	+
8	39	±	0	0
9	61	±	0	+
10	25	0	0	0

У групі 1Б (33 без ознак кальцифікації), яка також повністю складалась з жінок, середній вік склав $51,2 \pm 3,8$ років. При ІГХ дослідженні ОПН помітно менша виразність експресії цього білка у тканині ЩЗ: в 20% реакція була відсутня, в 50% випадках спостерігалася суперечлива реакція та в 30% випадків – виявлена слабка експресія ОПН. Експресії аномального білка p53 не було виявлено в жодному з досліджуваних зразків. По відношенню до експресії Ki-67 контрольна група розділилася на дві підгрупи: у 50% зразків реакція була відсутньою, в інших 50% випадків експресія проліферативного маркера була слабкою.

Група 2. ІГХ дослідження тканини тиреоїдитів (аутоімунний тиреоїдит та дифузний токсичний зоб).

Результати ІГХ-дослідження групи 2А (тиреоїдити з кальцифікатами) відображені в таблиці 4.3.

№ зразка	вік	OPN	p53	Ki-67
1	67	++	0	++
2	73	++	0	+
3	64	+	0	0
4	64	±	0	0
5	59	+	0	+
6	52	++	0	+
7	65	+	0	+
8	53	++	0	++
9	59	+	0	+

10	54	+	0	++
----	----	---	---	----

Середній вік пацієток у групі 2А склав $61,0 \pm 2,1$ рік. При ІГХ дослідженні ОПН у тканині тиреоїдинів з кальцифікацією виявлено, що в 50% випадків спостерігалася його слабка експресія, у 40% зразків – помірна. В одному зразку спостерігалася суперечлива реакція. Підвищення експресії білка p53 не відбувалося в жодному випадку. Спостерігаючи за проліферативною активністю тканини ЩЗ з проявами тиреоїдитів встановлено, що в половині випадків виявлялася слабка експресія Ki-67, в 30% випадків – помірна експресія, в 20% забарвлення було відсутнім.

Результати ІГХ-дослідження групи 2Б (тиреоїдити без ознак біомінералізації) відображені в таблиці 4.4.

№ зразка	вік	OPN	p53	Ki-67
1	72	+	0	++
2	73	+	0	+++
3	48	++	0	0
4	57	+	0	0
5	69	+	0	+
6	30	+	0	+
7	65	+	0	+
8	60	+	0	+
9	63	±	0	+
10	65	+	0	+

Середній вік жінок контрольної групи складав $60,2 \pm 4,1$ року. Рівень ОПН у групі 2Б був наступний: в 10% виявлялася помірна експресія, в 80% зразків – слабка експресія, в одному випадку (10%) – виявлялася суперечлива реакція. Підвищення рівнів експресії p53 у групі тиреоїдитів не виявлялося. При дослідженні інтенсивності проліферації було встановлено, що в 10% виявлено сильну експресію Ki-67, ще в 10% зразків – помірну експресію, в 60% випадків – слабку реакцію та в 20% реакція була відсутня.

Група 3. ІГХ дослідження тканини ФА.

Результати ІГХ-дослідження групи 3А (фолікулярні аденоми з ознаками біомінералізації) відображені в таблиці 4.5.

№ зразка	вік	OPN	p53	Ki-67
1	73	+	+	++
2	53	++	0	+
3	42	+	0	0
4	57	±	+	+++
5	60	+++	0	++
6	50	++	0	0
7	64	+	+	+
8	42	+++	0	+
9	73	++	0	+
10	50	+	0	+

Група 3А (ФА з кальцифікацією) складалась з жінок, середній вік яких складав $56,4 \pm 3,5$ років. ІГХ дослідження ОПН показує, що в одному випадку (10%) спостерігалась суперечлива реакція, в 40% інтенсивність реакції трактувалася як слабка, у 30% випадків - помірна, у 20% випадках встановлено сильну експресію ОПН. При ІГХ дослідженні p53 виявлена його підвищена експресія в 30% випадків, в інших зразках реакція була негативною. Проліферативна активність у тканинах ФА з ознаками мінералізації була розподілена наступним чином: в 50% випадків виявлявся низький рівень експресії Ki-67, в 20% випадків – помірний рівень, в 10% зразків – сильний. В 20% зразків реакцію можна вважати негативною.

Результати ІГХ-дослідження групи 3Б (ФА без ознак біомінералізації) відображені в таблиці 4.6.

№ зразка	вік	OPN	p53	Ki-67
1	39	+	+	++
2	45	±	0	+
3	59	+	0	0
4	60	+	+	+
5	30	0	0	+
6	33	+	0	++
7	57	++	+	+
8	25	++	0	+
9	69	0	0	+
10	52	0	0	+

Група 3Б (ФА без ознак мінералізації) складалась з пацієток, середній вік яких складав $46,9 \pm 4,7$ років. При ІГХ дослідженні ОПН встановлено, що в 30% зразків була відсутня експресія досліджуваного білка, в одному випадку (10%) спостерігалась суперечлива реакція, в 40% інтенсивність реакції трактувалася як слабка, а у 20% випадків - помірна. ІГХ дослідження білка p53 виявлена його підвищена експресія в 30% випадків, в інших зразках реакція була негативною. Проліферативна активність у групі контролю розподілялась наступним чином: в 70% випадків виявлявся низький рівень експресії Ki-67, в 20% випадків – помірний рівень, в 10% зразків реакцію можна вважати негативною.

Група 4. ІГХ дослідження тканини ФРЦЗ

Результати ІГХ-дослідження групи 4А (ФРЦЗ з ознаками біомінералізації) відображені в таблиці 4.7.

№ зразка	вік	OPN	p53	Ki-67
1	48	++	+	++
2	63	++	++	+++
3	52	0	0	++
4	48	0	++	++
5	72	+	0	+
6	27	+	0	+++
7	52	0	+	+++
8	51	++	0	++

9	64	++	0	+++
10	61	+	++	++

Група 4А (ФРЦЗ з кальцифікацією) складалась з жінок, середній вік яких складав $53,9 \pm 3,9$ років. ІГХ дослідження ОПН показує, що в 40% випадків виявлено помірну експресію ОПН, у 30% зразків виявлялася слабка реакція та ще в 30% експресії не спостерігалось. При визначенні p53 виявлена його підвищена експресія в 50% випадків, в інших 50% зразків реакція була негативною. Проліферативна активність у тканинах ФРЦЗ з ознаками мінералізації була розподілена наступним чином: в 40% випадків виявлявся високий рівень експресії Ki-67, в 50% випадків – помірний рівень, в 10% зразків – слабкий.

Результати ІГХ-дослідження групи 4Б (контроль) відображені в таблиці 4.8.

№ зразка	вік	OPN	p53	Ki-67
1	73	++	0	+++
2	47	++	0	++
3	58	+	++	+++
4	33	+	0	+
5	23	0	0	+
6	39	+	+	++
7	56	0	+	+++
8	69	+	0	+++

9	51	+	+	++
10	47	+	+	++

Середній вік пацієток групи 4Б (контроль) склав 49,6±4,9 років. При дослідженні рівня експресії ОПН виявлено, що в 40% випадків спостерігалася помірна експресія ОПН, у 30% випадках експресія білка трактувалася як слабка та в 30% зразків експресія білка була відсутня. При дослідженні p53 виявлена його підвищена експресія в 50% випадків, в інших 50% зразків реакція була негативною. Проліферативна активність у тканинах контрольної групи була розподілена наступним чином: в 40% випадків виявлявся високий рівень експресії Ki-67, 40% випадків – помірний рівень та в 20% - слабкий рівень проліферативної активності.

Група 5. ІГХ дослідження тканини ПРЦЗ.

Результати ІГХ-дослідження групи 5А (ПРЦЗ з ознаками біомінералізації) відображені в таблиці 4.9.

№ зразка	вік	OPN	p53	Ki-67
1	75	++	+	+++
2	55	++	++	++
3	49	+	0	+
4	53	+++	+	+++
5	37	++	0	++
6	60	+++	++	+++
7	38	+++	+	++

8	72	++	0	++
9	60	++	0	+++
10	40	+++	++	+++

Група 5А (ПРЦЗ з кальцифікацією) складалась з жінок, середній вік яких склав 53,9±4,2 років. ІГХ дослідження ОПН показує, що в 40% інтенсивність реакції була сильною, у 50% випадків виявлено помірну експресію ОПН, у 10% випадках експресія білка трактувалася як слабка. При ІГХ дослідженні p53 виявлена його підвищена експресія в 60% випадків, в інших 40% зразків реакція була негативною. Проліферативна активність у тканинах ПРЦЗ з ознаками мінералізації була розподілена наступним чином: в 50% випадків виявлявся високий рівень експресії Ki-67, в 40% випадків – помірний рівень, в 10% зразків – слабкий.

Результати ІГХ-дослідження групи 5Б (ПРЦЗ без ознак біомінералізації - контроль) відображені в таблиці 4.10.

№ зразка	вік	OPN	p53	Ki-67
1	45	0	+	++
2	56	0	0	++
3	69	++	+	+++
4	37	+	0	+++
5	65	+	++	++
6	73	+	+	++
7	52	++	0	+++

8	39	+	++	++
9	61	++	0	+++
10	29	+	++	+++

Середній вік пацієток групи 5Б (контроль) складав $52,6 \pm 4,7$ років. При дослідженні рівня експресії ОПН виявлено, що в 30% випадків спостерігалася помірна експресія ОПН, у 50% випадках експресія білка трактувалася як слабка та в 20% зразків експресія білка була відсутня. При ІГХ дослідженні p53 виявлена його підвищена експресія в 60% випадків, в інших 40% зразків реакція була негативною. Проліферативна активність у тканинах контрольної групи була розподілена наступним чином: в 50% випадків виявлявся високий рівень експресії Ki-67 та в 50% випадків – помірний рівень.

РОЗДІЛ 4

АНАЛІЗ ТА ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Присутність кальцифікатів при майже всіх захворюваннях ЩЗ значно утруднює диференційну діагностику тиреоїдної патології. Це призводить до того, що отримана діагностична інформація про мінералізовані об'єкти у ЩЗ часто не враховується у клінічній практиці [37]. До того ж існують суперечливі точки зору у трактуванні значення патологічної біомінералізації при патології ЩЗ [58, 59].

Мінеральний і кристало-хімічний склад ПТ описаний в літературі і свідчить про переважання у їх структурі гідроксиапатиту та, в меншій мірі, інших сполук кальцію [8, 17]. У нашому дослідженні вміст сполук кальцію підтверджується гістохімічною реакцією фон Коса та забарвленням алізариновим червоним за МакГі в модифікації Даля.

Кальцифікація в тканині ЩЗ виявляється, за даними різних авторів, на 14-55% ультрасонограм. Важливого значення ектопічній кальцифікації у ЩЗ надає її можливий зв'язок з злоякісними пухлинами, при чому частота такої асоціації коливається у широкому діапазоні [58-59, 63, 68].

Всі діагностичні паттерни патологічної мінералізації, які виявляються при УЗД ЩЗ мають своє морфологічне підґрунтя. Специфічні об'єкти, які фіксуються при УЗД дослідженні, класифікуються за формою, контурами та розмірами: точкові мікрокальцифікати, груба кальцифікація з неправильними контурами, кальцифікати з гладкими (овальними) контурами, дуго- (арко-) і кільцеподібних утворення. Дуго- та кільцеподібні утворення за контурами можна розділити на утворення з рифленими краями, утворення з гладенькими та об'єкти з контурами неправильної форми [68].

Генезис дуго- і кільцеподібних об'єктів ЩЗ тісно пов'язаний з вузлоутворенням. Утворенням вузлів є проявом більшості зобів, доброякісних і злоякісних пухлин ЩЗ. Сьогодні велике значення надається дослідженню механізмів підтримання морфологічного гомеостазу ЩЗ і уявлень про її

структурно-функціональну одиницю [11]. Структурно-функціональна одиниця – це еквівалентна органу комплексна мікросистема, яка включає в себе різноманітні тканинні компоненти, серед яких інтегральною ланкою є окрема асоціація мікросудин, специфічним чином зорієнтованих у просторі [10, 48]. У ЩЗ такою одиницею є не одиничний фолікул, як це вважалося раніше, а поліфолікулярна структура з трьохвимірною мікросудинною системою і підлягаючою сполучною тканиною, яка містить С-клітини, тканинні базофіли і фібробласти. Доказом топографічної відокремленості є існування спеціальної оболонки з фібробластів (Ф-оболонки), яка оточує групу з 4-6 фолікулів і ділить залозу на самостійні структурно-функціональні одиниці – мікрочасточки [10]. Проліферація тироцитів стимулюється тиреотропним гормоном (ТТГ) гіпофізу при пермісивній дії інсуліну або інсуліноподібного фактору росту (ІРФ-1) [56]. Окрім того, кожна мікродолька має свою окрему іннервацію. Таким чином, у випадку посиленої нейроендокринної та нервової стимуляції може відбуватися нерівномірний або автономний ріст окремих мікрочасточок, що є підґрунтям для відокремлення і формування вузлів у ЩЗ. Наприклад цей механізм найбільш вірогідний при вузловому зобі та базедовіфікації окремих вузлів, АІТ. Проліферативна автономія окремих мікрочасточок може стояти біля джерел доброякісного і злоякісного росту в ЩЗ. Ріст вузла призводить до створення тиску на навколишні тканини, їх гіпоксію, атрофію і дистрофізацію. Стиснуті тканини ЩЗ в умовах гіпоксії проростають сполучною тканиною, з часом формуючи капсулу вузла. Зі збільшенням тривалості процесу нодулогенезу поглиблюються склеротичні і дистрофічні зміни в капсулі вузла, часто повністю оточуючи його. При частковій кальцифікації капсули на ультрасонографічній візуалізації формуються «дуги», «арки», при повній мінералізації – спостерігається паттерн «кільця».

Оскільки процеси утворення вузлів при АІТ та ДТЗ розвиваються з меншою частотою, ніж при інших захворюваннях ЩЗ (ЗЗ, пухлини), виявлення

дуго- кільцеподібних об'єктів при УЗД можна використовувати для диференційної діагностики вузлової патології ЩЗ.

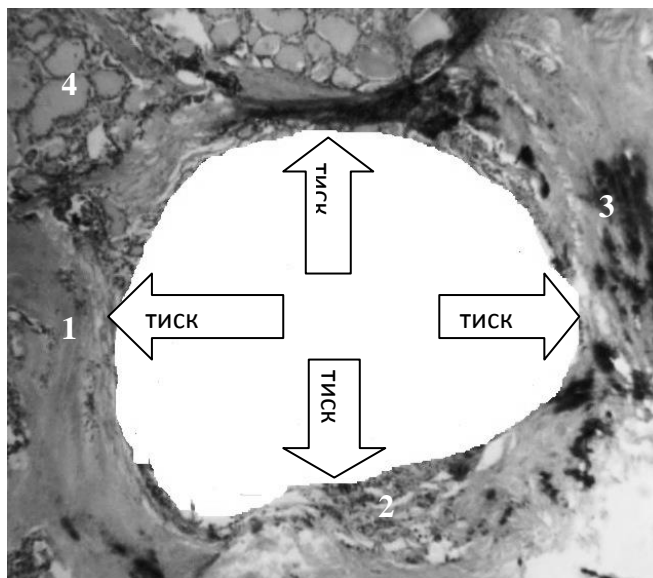


Рис. 4.1. Схема формування капсули вузла з дистрофічними змінами. 1 – сполучнотканинна капсула, 2 – залишки фолікулярного епітелію, 3 – дистрофічна мінералізація, 4 - оточуюча тиреоїдна паренхіма.

Вузли, які утворюються, особливо у випадку злоякісного пухлинного росту, часто мають неправильні контури. Це може бути обумовленим нерівномірним ростом самого вузла із-за наявності кількох центрів проліферації. Таким чином створюється нерівномірний тиск на навколишні тканини, який призводить до нерівномірного фіброзу і мінералізації капсули. У самих тканинах вузла (частіше при пухлинах) при нерівномірному рості і тиску відбуваються атрофічні і некробіотичні зміни клітин, що веде до розвитку дистрофічної кальцифікації вже у самому вузлі. Мінералізована тканина розташовується уздовж капсули з поширенням досередини тканини вузла. (рис.4.1) Таким чином формується УЗД-паттерни кальцифікатів з гладкими (овальними) контурами та грубої кальцифікації з неправильними контурами. В окремих випадках конкреції виявляються всередині пухлинного вузла без мінералізації капсули. Процесам кальцифікації підлягає переважно

сполучнотканинні волокна капсули та міжфолікулярна строма. Як правило, утворення біомінералітів з округлими (гладенькими) контурами характерне для доброякісних пухлин (ФА) і зубів ЩЗ, так як повільний експансивний ріст вузла поступово створює у тканині тиск і відтісняє тканину, не порушуючи базальних мембран і міжчасточкових септ. Малігнізація доброякісних процесів або розвиток злоякісних пухлин супроводжується інфільтративним ростом, який може спричинити поширення патологічної мінералізації вздовж проліферуючих тяжів пухлинних клітин і обумовити нерівні контури утворення кальцифікатів у тканині пухлини. (рис. 4.2)

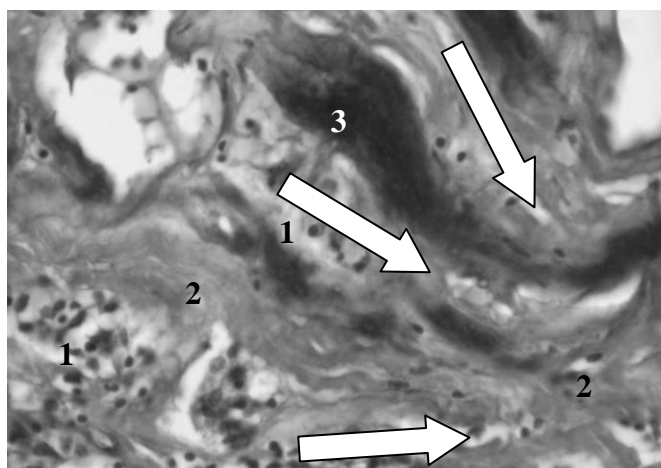


Рис. 4.2. Схема формування депозитів сполук кальцію у тканині ФРЦЗ. 1 – тяжі проліферуючих атипових пухлинних клітин, 2 – сполучна тканина, 3 – відкладення сполук кальцію. Стрілками вказано напрями росту пухлинних тяжів.

Окрім капсули та міжфолікулярної строми процеси кальцифікації можуть поширюватися на колоїд і фолікулярний епітелій з формуванням невеликих осередків різної форми. (рис. 4.3)



Рис. 4.3. Схема формування кальцифікатів у тканині колоїді (різнонаправлені стрілки) та фолікулярному епітелії (зірочки). Зб.х600.

УЗД – картина точкової мікрокальцифікації може формуватися при всіх вищезазначених механізмах патологічної біомінералізації. Але необхідно звернути увагу на значний сегмент морфологічних об'єктів, які створюють паттерн мікрокальцифікації. Це псамомні тільця (ПТ), найбільш характерні для пухлин папілярної будови [30, 66]. Виявлення ПТ у тканині ЩЗ є дуже важливою діагностичною ознакою ПРЩЗ. Особливістю будови ПТ є округла форма та шарувата структура (рис. 4.4).

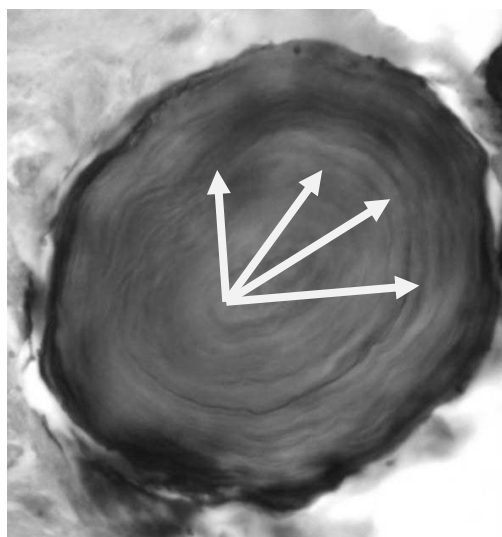


Рис. 4.4. Формування псамомного тільця (стрілки направлені на різні шари). Зб.х600.

Існує кілька гіпотез, які пояснюють механізм утворення та значення ПТ, але превалюючою є думка про те, що ця форма патологічної біомінералізації у ЩЗ є результатом дистрофічної кальцифікації пухлинних тромбів у просвіті лімфатичних та кровоносних судин. Для ПРЩЗ також характерна мінералізація метастазів з утворенням ПТ у лімфатичних вузлах та інших тканинах.

У ході гістологічного дослідження зразків ЩЗ виявлялися прояви патологічної мінералізації у стінках судин. Діагностичне значення цього феномена до кінця неясне, але переважно кальцифіковані судини виявляються при злоякісних пухлинах ЩЗ. Також спостерігалися поодинокі випадки мінералізації судин при ЗЗ. Процесами патологічної біомінералізації переважно розвиваються у стінках судин середнього калібру. Відкладення біомінералів відбувається у внутрішньому та середньому шарах стінок судин.(рис. 4.5) Пояснити біомінералізаційні процеси з механістичної точки зору надзвичайно важко. Скоріш за все ураження судин є активним процесом і розвивається за типом, описаним для ендотелію судин простати при її злоякісній патології [19].

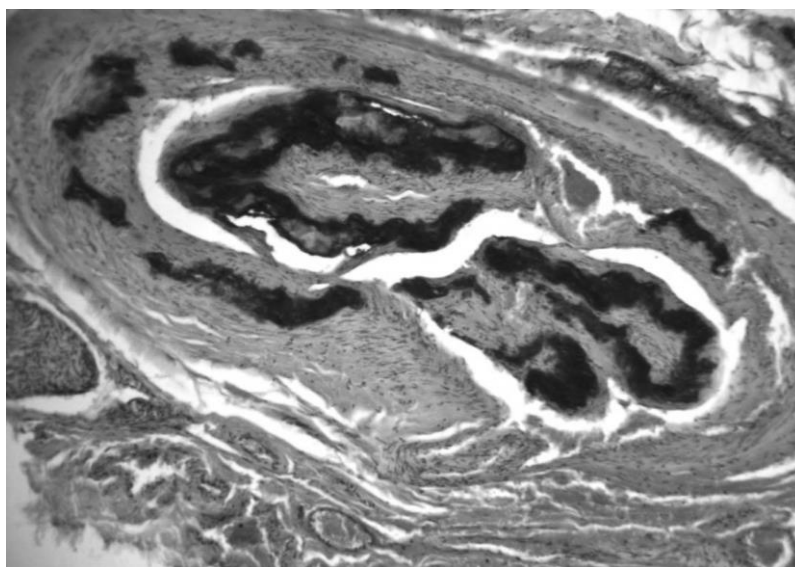


Рис. 4.5. Кальцифікація внутрішньої і середньої оболонки судини при ПРЩЗ. Мінералізовані тканини мають чорний колір. Зб.х100.

Таким чином, ґрунтуючись на аналізі результатів дослідження вибірки залучених у нашу роботу зразків, можна зробити деякі висновки відносно зв'язку та відповідності ультрасонографічної картини мінералізації тканини ЩЗ та її реальними морфологічними змінами. Для доброякісних патологічних процесів ЩЗ, які супроводжуються вузлуотворенням характерна наявність дуго- та кільцеподібної кальцифікації капсули (по 40% у кожній групі) з поширенням патологічної мінералізації на тканину вузла (50% ЗЗ та 40% ФА) і формуванням грубої мінералізації, переважно з неправильної форми.

Окремою групою можна виділити захворювання ЩЗ з дифузного характеру – ДТЗ та АІТ. Для вказаних захворювань переважною є картина грубої кальцифікації або солітарних утворень з поліциклічними або гладенькими краями (у сумі – до 60%). Значною часткою проявів біомінералізації при тиреоїдитах є мікрокальцифікати.

Злоякісні пухлини ЩЗ також мають свої відмінності в переважній формі кальцифікації. Для ФРЩЗ переважним є утворення грубих кальцифікатів з нерівними поліциклічними краями (70%). В той же час, для ПРЩЗ характерним є утворення мікрокальцифікатів (80%), які при гістологічному дослідженні ідентифікуються як ПТ.

Імуногістохімічний аналіз результатів дослідження патології ЩЗ у більшості груп показує зв'язок білка остеопонтину (ОПН) з процесами біомінералізації. Так, при порівнянні результатів ІГХ дослідження у групі 1 кальцифікованої тканини ЩЗ ЗЗ експресія ОПН достовірно вища, ніж у тканині ЗЗ без мінералізації ($p \leq 0,05$). Також експресія ОПН достовірно вище у мінералізованих тканинах зразків груп 3 (ФА) та 4 (ПРЩЗ). Але в зразках груп 2 (тиреоїдити) та 4 (ФРЩЗ) експресія ОПН у досліджуваних і контрольних групах достовірно не відрізняється ($p \geq 0,05$).

При ІГХ дослідженні білка p53 у групах тиреоїдної патології з ознаками патологічної біомінералізації та без них достовірної різниці експресії маркеру апоптозу між досліджуваними групами і контролем не було виявлено ($p \geq 0,05$).

ІГХ-дослідження білка Ki-67 у групах мінералізованих тканин тиреоїдної патології та тканин ЩЗ без проявів кальцифікації показує подібний рівень проліферативної активності клітин: достовірної різниці не було виявлено в жодній з груп ($p \geq 0,05$).

Таким чином, у нашому дослідженні можливого зв'язку апоптозу та патологічної біомінералізації в тканині ЩЗ не було виявлено. Також не було встановлено впливу інтенсивності проліферативної активності фолікулярного епітелію на розвиток кальцифікації тиреоїдних тканин.

У ході вивчення експресії ОПН були отримані цікаві результати, для пояснення яких необхідні подальші дослідження. При розвитку мінералізації в тканинах ЗЗ, ФА та ПРЩЗ виявлений зв'язок з експресією ОПН. Це можна пояснити тим, що ОПН - кислий фосфопротеїн, що пригнічує утворення гідроксиапатиту, шляхом зв'язування з поверхнею кристалів [51, 53] та активує функцію остеокластів [52, 64]. Отже, експресія ОПН є відповіддю організму на патологічну біомінералізацію. Це означає, що ОПН є вторинним маркером біомінералізації, так як у випадку відсутності реакції на патологічну кальцифікацію його експресія буде відсутня. Окрім процесів біомінералізації, ОПН бере участь в пухлинному рості, запаленні, аутоімунних процесах. Чисельність функцій та залученість ОПН в основні патологічні процеси ускладнює трактування результату, отримані у групах 2 (тиреоїдити) та 4 (ФРЩЗ). У випадку тиреоїдитів (АІТ та ДТЗ) виразне імунне запалення може призвести до посиленої експресії ОПН у немінералізованих тканинах ЩЗ, таким чином зменшуючи різницю показників експресії зазначеного білка між групами 2А та 2Б ($1,35 \pm 0,18$ та $1,05 \pm 0,12$). Відсутність достовірної різниці у групах 4А та 4Б (ФРЩЗ) окрім залученості ОПН у процеси пухлинного росту додатково можна пояснити дедиференціацією пухлинної тканини і втратою можливостей виробляти ОПН у відповідь на мінералізацію тканини.

З огляду на отримані результати, процесам патологічної мінералізації у ЩЗ необхідно надавати більше діагностичного значення, таких хворих

потрібно ретельно обстежувати, використовуючи додаткові інструментальні методи дослідження та тонкоголкову аспіраційну біопсію з подальшим цитологічним дослідженням. Отримані у ході дослідження результати ми пропонуємо використовувати у вигляді алгоритму діагностики (додаток А).

ВИСНОВКИ

1. Ґрунтуючись на зв'язку та відповідності ультрасонографічної картини мінералізації тканини ЩЗ та її реальними морфологічними змінами було встановлено, що для доброякісних проліферативних процесів ЩЗ, які супроводжуються вузлоутворенням характерна наявність дуго- та кільцеподібної кальцифікації капсули (по 40% у кожній групі) з поширенням патологічної мінералізації на тканину вузла (50% ЗЗ та 40% ФА) і формуванням грубої мінералізації, переважно неправильної форми. Для захворювань ЩЗ дифузного характеру (ДТЗ та АІТ) переважною є картина грубої кальцифікації або солітарних утворень з поліциклічними або гладенькими краями (у сумі – до 60%).
2. Злоякісні пухлини ЩЗ також мають свої відмінності у біомінералізації з переважанням кальцифікації. Для ФРЩЗ характерним є утворення грубих кальцифікатів з нерівними поліциклічними краями (70%). В той же час, для ПРЩЗ частіше спостерігається утворення мікрокальцифікатів (80%), які при гістологічному дослідженні ідентифікуються як ПТ.
3. Імуногістохімічний аналіз результатів дослідження патології ЩЗ у більшості груп показує зв'язок білка остеопонтину (ОПН) з процесами біомінералізації: у кальцифікованій тканині ЩЗ ЗЗ експресія ОПН достовірно вища, ніж у тканині ЗЗ без мінералізації ($p \leq 0,05$). Також експресія ОПН достовірно вище у мінералізованих тканинах зразків груп 3 (ФА) та 4 (ПРЩЗ).
4. При ІГХ дослідженні білка p53 у групах тиреоїдної патології з ознаками патологічної біомінералізації та без них достовірної різниці експресії маркеру апоптозу між досліджуваними групами і контролем не було виявлено ($p \geq 0,05$).
5. ІГХ-дослідження білка Ki-67 у групах мінералізованих тканин тиреоїдної патології та тканин ЩЗ без проявів кальцифікації показує відсутність у

різниці проліферативної активності клітин: достовірної різниці не було виявлено в жодній з груп ($p \geq 0,05$).

ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

1. За умов виявлення ознак патологічної мінералізації у ЩЗ таких хворих необхідно ретельно обстежувати, використовуючи додаткові інструментальні методи дослідження та тонкоголкову аспіраційну біопсію з подальшим цитологічним дослідженням.
2. Результати дослідження ми пропонуємо використовувати у вигляді алгоритму діагностики.
3. Отримані дані можуть бути використані в роботі лікарів загальної практики, ендокринологів, патоморфологів, хірургів та онкологів.

Список публікацій та виступів

За темою роботи опубліковано 1 стаття та 3 тезів:

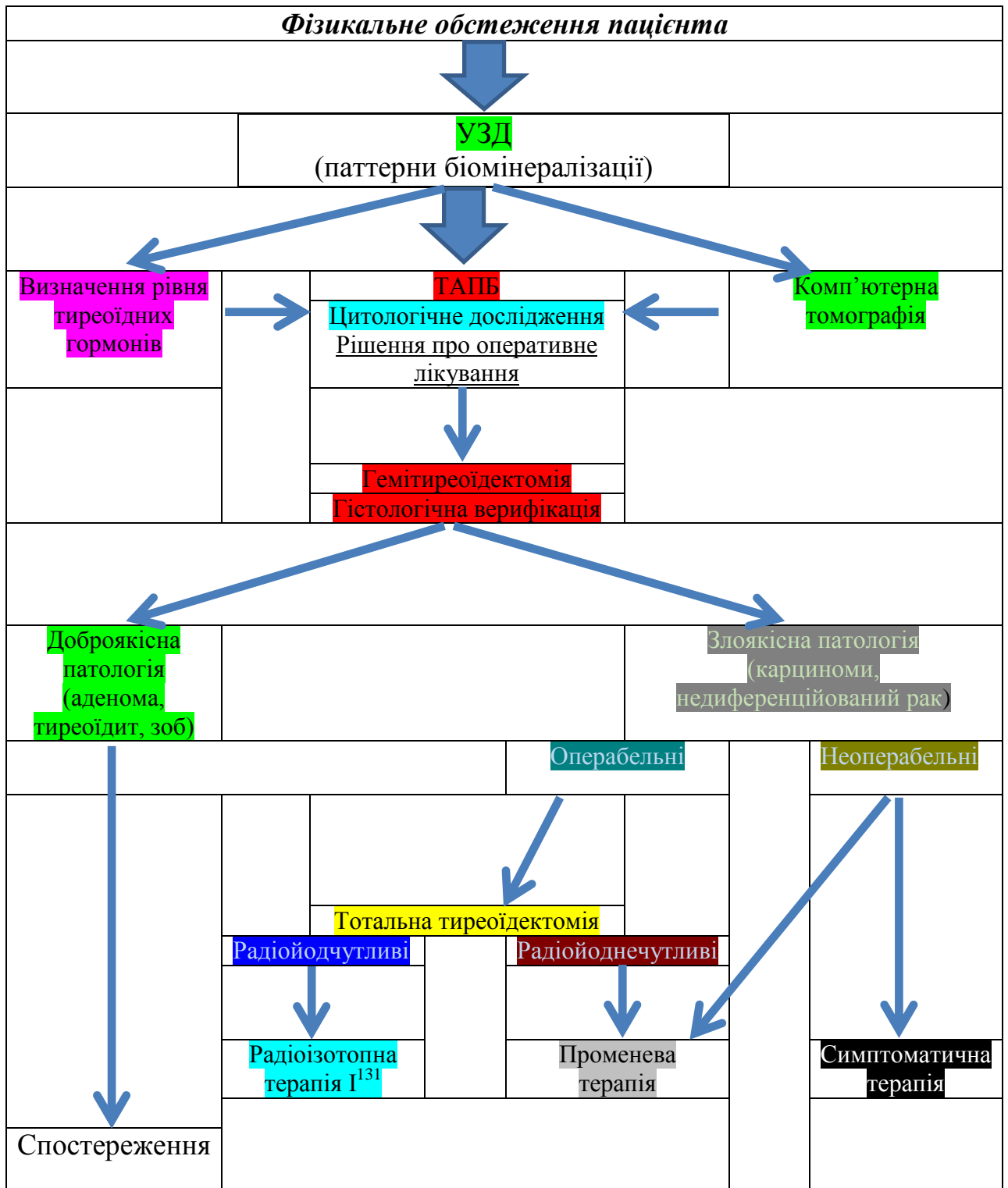
Кальцифікація щитоподібної залози: поширення, патологія, механізми виникнення та діагностичне значення (огляд літератури) / [Романюк А. М., Москаленко Р.А., Резнік А.В., Гапченко А. В.] // Журнал клінічних та експериментальних медичних досліджень. — 2014. — Т.2, №4. — С. 417-426.

Романюк, А.М. Визначення експресії маркера остеопонтину як фактору біомінералізації при фолікулярній карциномі щитоподібної залози / А.М. Романюк, Р.А. Москаленко, Г.Ю. Будко, А.В. Резнік, А.В. Гапченко // Актуальні питання теоретичної та практичної медицини : збірник тез доповідей III Міжнародної науково-практичної конференції студентів та молодих вчених, м. Суми, 23-24 квітня 2015 р. / Н.В. Деміхова. - Суми : СумДУ, 2015. - С. 227.

Резнік А.В. Диференційно-діагностичне значення кальцифікатів у щитоподібній залозі при доброякісних патологіях / А.В.Резнік, А.В.Гапченко // Актуальні питання теоретичної та практичної медицини : збірник тез доповідей III Міжнародної науково-практичної конференції студентів та молодих вчених, м. Суми, 23-24 квітня 2015 р. / Н.В. Деміхова. - Суми : СумДУ, 2015. - С. 224.

Романюк А.М. Дослідження експресії рецепторів білків p53 та Ki67 у тканині щитоподібної залози з біомінералізацією / А.М. Романюк, Р.А. Москаленко, Л.І. Карпенко, А.В. Резнік, А.В. Гапченко, А.С. Мальцева // Актуальні питання теоретичної та практичної медицини : збірник тез доповідей III Міжнародної науково-практичної конференції студентів та молодих вчених, м. Суми, 23-24 квітня 2015 р. / Н.В. Деміхова. - Суми : СумДУ, 2015. - С. 226.

ДОДАТОК А



Список використаної літератури

1. Богданова Т.И. Патология щитовидной железы у детей/ Т.И.Богданова, В.Г.Козырницкий, Н.Д.Тронько.// Атлас.-К.: Чернобыльинформ, 2000. - 160с.
2. Биохимия человека/ Марри Р., Греннер Д., Мейес П., Родуэлл В. В 2-х т. Т.2. Пер. с англ.: - М.: Мир, 1993. – 415 с.
3. Визначення експресії маркера остеопонтину як фактору біомінералізації при фолікулярній карциномі щитоподібної залози / [А.М.Романюк, А.В. Резнік, Р.А.Москаленко] / Українські медичні вісті. – 2014. Т. 11, №1-4 (80-83). – С. 434.
4. Горбенко В.Н. Рак щитовидной железы в Украине (1989-2004) / В.Н.Горбенко, Л.О.Гулак, З.П.Федоренко [та ін] // Международный эндокринологический журнал. – 2007. – Т.8.-№2 – С.34-38.
5. Голованова О. А. Патогенное минералообразование в организме человека / О. А. Голованова // Известия Томского политехнического университета. – 2003 – т.315 - №3 - С. 51-56.
6. Лукаш, А.В. Злоякісні пухлини щитоподібної залози в Сумській області (2000-2009 рр.) / А.В. Лукаш, Д.Ф. Половинка, Р.А. Москаленко // Актуальні питання теоретичної медицини. Актуальні питання клінічної медицини. Клінічні та патогенетичні аспекти мікроелементозів. Actual problems of fundamental and clinical medicine : матеріали науково-практичних конференцій студентів, молодих вчених, лікарів та викладачів, Суми, 20-22 квітня 2011 року / Відп. за вип. Л.Н. Приступа. — Суми : СумДУ, 2011. — Ч.1. — С. 42.
7. Мелеховець О.К. Клініко-географічне районування Сумської області за ступенем йододефіциту / О.К.Мелеховець, Н.В.Климанська, Р.А.Москаленко // Вісник СумДУ, серія Медицина. –2005. – №3. – С. 96-101.
8. Москаленко Р.А. Морфологические аспекты биоминерализации при патологии щитовидной железы / Р.А. Москаленко, А.Н. Романюк, С.Н.Данильченко, А.В. Резник // Современные подходы в клинико-

- морфологической диагностике и лечении заболеваний человека: сб. научн. тр. пятых научных чтений Всероссийской конференции с международным участием, посвященной памяти член-корр. РАМН, з.д.н. РФ, профессора Олега Константиновича Хмельницкого (4-5 октября 2013, г. Санкт-Петербург). - СПб.: Медпресса, 2013. - С.244-245.
9. Романюк А.М. Особливості обміну мікроелементів у щитоподібній залозі при проліферативних захворюваннях в умовах впливу солей важких металів / А.М. Романюк, Р.А. Москаленко // Вісник СумДУ, серія Медицина. – 2007. – №1. – С.9-13.
 10. Романюк А.Н. Особенности фолликулогенеза в щитовидной железе крыс в условиях влияния солей тяжелых металлов / А.Н.Романюк, Р.А.Москаленко, А.В.Логвин // Российский медико-биологический вестник . – 2010. - №4. – С.8-15.
 11. Романюк А.М. Еволюція поглядів на будову і функцію щитоподібної залози / А. М. Романюк, Р. А. Москаленко // Вісник СумДУ, серія Медицина. – 2008. – Т. 2, № 2. – С. 23–28.
 12. Патологічна біомінералізація при патології щитоподібної залози / А.М.Романюк, Р.А. Москаленко, А.В.Резнік [та ін] // Український морфологічний альманах. - 2013. - Т.16., №3 (додаток)- С.212.
 13. Тимченко А.М. Сучасні особливості регіональної розповсюженості тиреопатології серед населення / А.М.Тимченко // Проблеми ендокринної патології. – 2003. -№3. – С.36-45.
 14. Хмельницкий О.К. Гистологическая диагностика неопухолевых заболеваний щитовидной железы: [Пособие для врачей] / О.К. Хмельницкий – С-П., 1999. –вып. 26. - 100с.
 15. ALK-1 and BMP-9 overexpression as a cause of ossifying papillary thyroid carcinoma / 63.Sung J-Y., Na K.Y., Lee S.K [et al] // Virchovs Arch. 2012; 461 (Suppl. 1): S 104.

16. Aluminum silicate –containing psammoma bodies in a cervicovaginal smear (Pap): cytological, ultrastructural, and radiographic microprobe studies / Li S., Boudousquie A.C., Baloch Z.W. [et al] // *Diagn. Cytopathol.* 1999. 21: 122-4.
17. Association between osteopontin expression and thyroid disease biomineralization / [Reznik A. V., Moskalenko R. A, Reznik M. A.] // *Folia medica Cassoviensia.* – 2014. – Tomus 69, No.1, Suppl. 1. – P.112.
18. Bai Y., Kakudo K., Li Y. et al. Subclassification of non-solid-type papillary thyroid carcinoma identification of high-risk group in common type. *Cancer Sci.* 2008; 99:1908-1915.
19. Calcification of multi-potent, prostate tumor endothelium / A.C. Dudley, Z.A. Khan, S-C. Shih, S-Y. Kang, B.M.M. Zwaans [et al] // *Cancer Cell.* – 2008. – Vol.14, No. 3. – P. 201-11.
20. Calcifications in thyroid nodule identified o preoperative computed tomography: patterns and clinical significance / Wu C.W., Dionigi G., Lee K.W. [et al] // *Surgery.* 2012. Vol. 151, 151(3): 464-70. Doi 10.2016/j.surg.2011.07.032.
21. Consorti F., Anello A., Benvenuti C et al. Clinical value of calcifications in thyroid carcinoma and multinodular goiter. *Anticancer Res.* 2003; 23:3089-3092.
22. Das D.K. Psammoma body: a product of dystrophic calcification or of a biologically active process that aims at limiting the growth and spread of tumor? *Diagn Cytopathol.* 2009. 37 (7)534-41. doi: 10.1002/dc.21081.
23. Denhardt D., Giachelli C., Rittling R. Role of osteopontin in cellular signaling and toxicant injury./*Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 2001, V.41, P.723 - 749.
24. *Diseases of the thyroid/* Edited by Lewis E. Braverman. Humana Press, New Jersey. 2000; 432 pp.
25. Giachelli C.M. Ectopic calcification: gathering hard facts about soft tissue mineralization / C.M. Giachelli // *Am J Pathol.* – 1999. – Vol. 154, No. 3. – P.671-5.
26. Giachelli C.M., Steitz S. Osteopontin: a versatile regulator of inflammation and biomineralization. *Matrix. Biol.*2000;19: 615-622.

27. Gong T., Wang J. [The analysis of the calcification in differentiating malignant thyroid neoplasm and the molecular mechanisms for the formation of the calcification]. *Lin Chung Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi*. 2012;26(16):763-6. [Article in Chinese].
28. Ge G., Greenspan D.S. BMP1 controls TGFbeta1 activation via cleavage of latent TGFbeta-binding protein. *J Cell Biol*. 2006; 175:111-120.
29. Gungor B. Do the calcifications in the thyroid gland predict malignancy? / Gungor B., Polat A.C., Polat C. // *Bratisl Lek Listy*. 2012; 113 (9):552-5.
30. Johannessen J.V., Sobrinho-Simoes M. The origin and significance of thyroid psammoma bodies. *Lab. Invest*. 1980;43:287-96.
31. Hunt J.L. Non-tumor-associated psammoma bodies in the thyroid / J.L. Hunt, L.Barnes // *Am J Pathology*. – 2003. – Vol. 128. – P. 90-94.
32. Herring G.M. The organic matrix of bone.// *The Biochemistry and Physiology of bone.*, 1999., G.H. Bourne, Ed. V. 1., P. 127 - 189., Academic Press., New York.
33. Franzen A., Heinegard D. Isolation and characterisation of two sialoproteins present only in bone calcified matrix.// *Biochem. J.*, 1996., V. 232., P. 715 - 724.
34. Hatakeyama S. Expression of bone morphogenetic proteins of human neoplastic epithelial cells / Hatakeyama S., Gao Y.N., Ohara-Nemoto Y. // *Biochem Mol Biol Intern*. 1997; 42:497-505.
35. Hijiya N. , Setoguchi M., Higuchi Y., Akizuki S., Yamamoto S. Cloning and characterization of the human osteopontin gene and its promoter.// *Biochem. J.*, 1999., V. 303., P. 255 - 262.
36. Hopkins D.R., Keles S., Greenspan D.S. The bone morphogenetic protein 1 / Tolloid-like metalloproteinases. *Matrix Biol*. 2007; 26:508-523.
37. Khoo M.L., Asa S.L., Witterick I.J., Freeman J.L. Thyroid calcification and its association with thyroid carcinoma. *Head Neck*. 2002; 24:651-655.
38. Kouvaraki M. A., et al. Role of preoperative ultrasonography in the surgical management of patients with thyroid cancer. *Surgery*, 2003, 134.6: 946-954.

39. Lee J., Lee S.Y., Cha S.H., Cho B.S., Kang M.H., Lee O.J. Fine needle aspiration of thyroid nodules with macrocalcification. *Thyroid*. 2013.
40. Liu H.F., Tang W.S., Yang Z.Y. [Thyroid nodules with calcification and thyroid carcinoma]. *Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao*. 2003; 25(5):626-9 [Article in Chinese].
41. LiVolsi V.A., Mazzaferri E.L., Schneider A.B., Albores-Savedra J., Hay I. Papillary carcinoma. In: Delellis R.A., Lloyd R.V., Heitz P.U., Eng C. editors. *World Health Organization Classification of tumors, pathology and genetics of tumors of endocrine organs*. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. 2004. p. 57-66.
42. Lyons R., Waters P.S., Sugrue C., Kerin M.J. An unusual presentation of calcified thyroid gland. *BMJ Case Rep*. 2012. Pii: bcr 2012007844. Doi:10.1136/bcr-2012-007844.
43. Matrix gla protein inhibits ectopic calcification by a direct interaction with hydroxyapatite crystals / J. O'Young, Y. Liao, Y. Xiao [et al] // *J Am Chem Soc*. – 2011. – Vol. 133. – P. 18406-12.
44. Mazzaferri E.L. Management of a solitary thyroid nodule. *N Engl J Med*. 1993; 328:553–559.
45. Merlin Olivera P.S., del C. Leyva Bohorquez P., Martinez-Cruz R., Canseco S.P., Hernandez P et al. A study on inorganic elements in psammomas from ovarian & thyroid cancer. *Indian J Med Res*. 2012; 135:217-220.
46. Mezosi E. Abberant apoptosis in thyroid epithelial cells from goiter nodules / E.Mezosi, H.Yamazaki, J.D.Bretz // *J. Clin. Endocrinology & Metabolism*. – 2002. – Vol. 87. - №9. – P. 4264-4272.
47. Morphogenetic aspects of biomineralization on the background of benign prostatic hyperplasia / Moskalenko R., Romanyuk A., Danilchenko S., Stanislavov O., Piddubniy A. [et al] // *Georgian medical news*. - 2013. - № 1 (214). - C. 54-61.

48. Moskalenko R. Intrafollicular pressure of colloid thyroid gland determinate the type of folliculogenesis / R.Moskalenko, A.Romanyuk, A.Logvin // Georgian medical news. – 2012. - №4 (205). – C. 67-73.
49. Nemir M., DeVouge W., Mukherjee B. Normal rat kidney cells secrete both phosphorylated and nonphosphorylated forms of osteopontin showing different physiological properties.//J. Biol. Chem., 2007., V. 164., P.18202 - 18208.
50. Nishio S, Hatanaka M, Takeda H, Aoki K, Iseda T, Iwata H, Yokoyama M. Calcium phosphate crystal-associated proteins: alpha2-HS-glycoprotein, prothrombin F1, and osteopontin.// Mol. Urol., 2000, V.4., P. 383 - 390.
51. Nomura S., Wills A., Edwards D., Hearth J., Hogan B. Developmental expression of 2ar (osteopontin) and SPARC (osteonectin) RNA as revealed by in situ hybridization.// J. Cell Biol., 2006., V. 106., P. 441 - 450.
52. Oldbarg A., Franzen A., Heinegard D. Cloning and sequence analysis of rat bone sialoprotein (osteopontin) cDNA reveals an Arg-Gly-Asp cell-binding sequence.// PNAS USA, 2004., V. 83. P. 8819 - 8823.
53. O'Regan A, Berman J. Osteopontin: a key cytokine in cell-mediated and granulomatous inflammation.// Int. J. Exp. Pathol., 2000, V. 81., P. 373 - 390.
54. Osteopontin facilitates angiogenesis, accumulation of osteoclasts, and resorption in ectopic bone / Asou Y, Rittling SR, Yoshitake H, [et al] // Endocrinology 2001., V. 142., P. 1325 - 32.
55. Park S.H., Suh E.H., Chi J.G. A histopathologic study on 1095 surgically resected thyroid specimens. Jpn J Clin Oncol. 1988;18:297-302.
56. Patarca R., Freeman G., Singh R., Wei F., Durfee T., Blattner F., regner D., Kozak C., Mock B., Morse H., Jerells T., Cantor H. Structural and functional studies of the early T-lymphocyte activation 1 (Eta-1) gene.// J. Exp. Med., 2001., V. 170., P. 145 - 161.
57. Presence of nanobacteria in psammoma bodies of ovarian cancer. Evidence for pathogenetic role in intratumoral biomineralization / Hudelist G., Singer C.F., Kubista E. [et al] // Histopathology. 2004. 45: 633-7.

58. Relationship between patterns of calcification in thyroid nodules and histopathologic findings / Kim B.K., Choi Y.S., Kwon H.J. [et al] // *Endocr J.* 2013. 28;60 (2):155-60.
59. Retrospective analysis of thyroid nodules by clinical and pathological characteristics, and ultrasonographically detected calcification correlated to thyroid carcinoma in South China / Chen G., Zhu X.Q., Zou X. [et al] // *Eur Surg Res.* 2009; 42 (3):137-42. doi:10.1159/000196506.
60. Scatena M., Liaw L., Giachelli C.M. Osteopontin: A multifunctional molecule regulating chronic inflammation and vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007; 27:2302–2309.
61. Schneider N.I., Bauernhofer T., Schollnast H., Ott A., Langner C. Pancreatic adenocarcinoma with multiple eosinophilic extracellular deposits consistent with noncalcified psammoma bodies. *Virchows Arch.* 2011; 459:623-625.
62. Shi C., Li S., Shi T., Liu B., Ding C., Qin H. Correlation between thyroid nodule calcification morphology on ultrasound and thyroid carcinoma. *J Int Med Res.* 2012; 40 (1):350-7.
63. Seiberling K.A., Dutra J.C., Grant T, et al. Role of intrathyroidal calcifications detected on ultrasound as a marker of malignancy. *Laryngoscope.* 2004; 114:1753-1757.
64. Sendger D., Perruzzi C., Gracey C., Papadopoulos A., Tenen D. Secreted phosphoproteins associated with neoplastic transformation. Close homology with plasma proteins cleaved during blood coagulation.// *Cancer Res.* 1988., V.48., P. 5770 - 5774.
65. Survival impact of psammoma bodies, stromal calcifications, and bone formation in papillary thyroid carcinoma / Bai Y., Zhou G., Nakamura M. [et al] // *Modern pathology.* 2009. 22, 887-894.
66. Triggiani V., Guastamacchia E., Licchelli B, et al. Microcalcifications and psammoma bodies in thyroid tumors. *Thyroid.* 2008; 18:1017-1018.

67. Yoo E.Y., Shin J.H., Ko E.Y., Han B.K. Contribution of the BRAF mutation analysis in calcified thyroid nodules. *Am J Roentgenol.* 2012; 198(4):891-5. doi: 10.2214/AJR.11.6866.
68. Yoon Y.D. Peripheral calcification in thyroid nodules. Ultrasonographic features and prediction of malignancy / Y.D. Yoon, J.W. Lee, S.K. Chang [et al] // *J. Ultrasound Med.* – 2007. Vol. 26., P.1349-1355.