

Zastosowanie markerów molekularnych w diagnostyce zmian ogniskowych w tarczycy – współczesny stan wiedzy

Application of molecular markers in the diagnostics of thyroid focal lesions
– current state of knowledge

*prof. dr hab. n. med. Marek Ruchała, lek. Kosma Woliński,
lek. Maciej Fularz, dr n. med. Ewelina Szczepanek-Parulska*

*Katedra i Klinika Endokrynologii, Przemiany Materii i Chorób Wewnętrznych
Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu*

Kierownik Katedry i Kliniki: prof. dr hab. n. med. Marek Ruchała



STRESZCZENIE

Choroba guzkowa tarczycy jest powszechnie występującym schorzeniem, dotyka ona ok. 20% dorosłych w populacji polskiej. Ponieważ metody obecnie stosowane rutynowo w ocenie tych zmian często nie pozwalają na jednoznaczne rozpoznanie, wciąż poszukuje się nowych markerów złośliwości guzków tarczycy, w tym markerów molekularnych. Jak dotąd nie odnaleziono pojedynczego markera molekularnego, który cechowałby się zadowalającą czułością i swoistością w przedoperacyjnym odróżnianiu łagodnych zmian w tarczycy od zmian złośliwych. Żaden spośród rozpatrywanych potencjalnych markerów nie wszedł jeszcze do rutynowej diagnostyki czy wytycznych postępowania. Intensywnie prowadzone badania, mające na celu poszukiwanie nowych markerów molekularnych, optymalizację metod ich wykrywania oraz ocenę ich rzeczywistej przydatności klinicznej, przynoszą jednak coraz bardziej obiecujące rezultaty. Choć analiza żadnego z przebadanych jak dotąd markerów nie może obecnie stanowić samodzielnej metody diagnostycznej, to oznaczanie szeregu markerów będące elementem zestawu badań, obok ultrasonografii czy klasycznej cytologii, może przyczynić się do zwiększenia czułości i specyficzności wykrywania zmian złośliwych, a co za tym idzie – ułatwić podjęcie właściwej decyzji o sposobie leczenia choroby guzkowej tarczycy.

SŁOWA KLUCZOWE: choroba guzkowa tarczycy, rak tarczycy, biopsja aspiracyjna cienkoigłowa, markery molekularne

ABSTRACT

Thyroid nodular disease is a common disorder and affects about 20% of adult polish population. Due to the fact that methods currently applied in routine assessment of these changes often do not provide accurate diagnosis, the research are ongoing to identify novel markers of malignancy, including molecular ones. Thus far not a single marker was found, which characterises with satisfying sensitivity and specificity in the preoperative differentiation of benign and malignant thyroid lesions. None of the developed potential markers was included to the routine diagnostic procedures or guidelines, either. However, intensive research aiming to search for novel molecular markers, optimization of methods of detection and evaluation of their true clinical utility bring more and more promising results. Analysis of not a single studied marker cannot serve as independent diagnostic method. However, examination of a group of several markers, together with ultrasound examination and classic cytological examination, may contribute to the increase in sensitivity and specificity in detection of malignant lesions and thus, make further therapeutic decisions in a patient with thyroid nodular disease easier.

KEY WORDS: thyroid nodular disease, thyroid cancer, fine-needle aspiration biopsy, molecular markers

WPROWADZENIE

Choroba guzkowa tarczycy jest powszechnie występującym schorzeniem. Konsekwencją dynamicznego rozwoju i coraz większej dostępności nowoczesnych technik obrazowania jest szybka rosnąca wykrywalność zmian ogniskowych w obrębie gruczołu tarczowego. Według doniesień dotyczących populacji polskiej, w badaniach ultrasonograficznych (USG) zmiany ogniskowe w tarczycy wykrywa się u 12,5% mężczyzn oraz 28,4% kobiet [1]. W zależności od badanej grupy ryzyko złośliwości ogniska w tarczycy wynosi jednak zaledwie 5–15% [2–6]. Codziennym wyzwaniem dla endokrynologa jest zatem wyodrębnienie spośród kohorty pacjentów z chorobą guzkową tarczycy właśnie tych, którzy ze względu na duże ryzyko złośliwości wymagają leczenia chirurgicznego.

Jak dotąd złotym standardem w diagnostyce choroby guzkowej tarczycy jest biopsja aspiracyjna cienkoigłowa (BAC). Jednak w blisko 1/4 przypadków nie pozwala ona jednoznacznie odróżnić zmiany złośliwej od łagodnej; wówczas wynik umieszczany jest w jednej z kategorii niediagnostycznych [7]. Większość tych pacjentów ze względu na podwyższone ryzyko złośliwości jest kierowana na zabieg operacyjny w celu histopatologicznej weryfikacji charakteru zmiany. Nierzadko zdarza się, że pierwszy zabieg polega na lobektomii bądź subtotalnej tyreoidektomii, po czym dopiero w przypadku histopatologicznego rozpoznania raka tarczycy chorego kieruje się na ponowny zabieg w celu wykonania całkowitej tyreoidektomii. W związku z powyższym część chorych jest narażona na dwukrotny zabieg operacyjny, a tym samym istotne ryzyko powikłań okołoperacyjnych. Z drugiej strony, znaczna część pacjentów jest niepotrzebnie poddawana zabiegowi z powodu zmian, których łagodny charakter ujawnia dopiero badanie histopatologiczne. Szacuje się bowiem, że u chorych, u których wynik BAC jest nierozstrzygujący, zaledwie w 10–40% przypadków zmiany mają charakter złośliwy [8–10]. Niepotrzebne narażenia chorych oraz kosztów tych zabiegów można by uniknąć, gdyby przedoperacyjnie udało się potwierdzić obecność zmian łagodnych w pozostałych 60–90% przypadków. W związku z tym wciąż trwają poszukiwania metody, która przedoperacyjnie umożliwiłaby jednoznaczne odróżnienie zmian złośliwych od łagodnych, co pozwoliłoby na ustalenie właściwego postępowania, np. wybór optymalnego zakresu operacji.

Badania wykazały, że istnieją pewne markery molekularne, możliwe do wykrycia w aspiracie cytologicznym z BAC, których obecność wiąże się z podwyższonym ryzykiem złośliwości zmiany. Wykrycie markera lub grupy markerów molekularnych o satysfakcjonującej czułości i specyficzności pozwoliłoby na włączenie tego rodzaju badań do rutynowej diagnostyki choroby guzkowej tarczycy i ułatwiłoby klinicyście decyzję co do metody leczenia.

W niniejszej pracy dokonano przeglądu wybranych markerów molekularnych o potencjalnym znaczeniu diagnostycznym i rokowniczym w ocenie zmian ogniskowych w tarczycy.

BRAF (V-RAF MURINE SARCOMA VIRAL ONCOGENE HOMOLOG B1)

BRAF jest genem zlokalizowanym na długim ramieniu chromosomu 7 (7q34). Ma on długość ok. 197 kpz i zawiera 18 eksonów. Koduje on białko wielkości 72,5 kDa, należące do kinaz serynowo-treoninowych z rodziny RAF, odgrywające istotną rolę m.in. w szlaku kinazy MAP. Mutacje somatyczne genu *BRAF* dotyczące domeny kinazowej, z których najczęstsza jest *BRAFV600E*, zostały opisane w szeregu nowotworów złośliwych [11]. Mutacja ta podnosi aktywność kinazową, co prowadzi do aktywacji kaskady MAPK, oraz zmienia skład macierzy zewnątrzkomórkowej [12, 13]. Badania na transgenicznym myszku wskazują, że wprowadzenie genu *BRAF* z mutacją V600E skutkuje rozwojem raka tarczycy u większości osobników. W modelu zwierzęcym obecność ww. mutacji była związana z wyższym stężeniem TSH, przy prawidłowych stężeniach T_3 i T_4 [14]. Namba i wsp. opisali tę mutację w 49 ze 170 (28,8%) przypadków raka brodawkowatego tarczycy. Opisano także pozytywną i istotną statystycznie korelację obecności mutacji z występowaniem przerzutów odległych oraz zaawansowaniem klinicznym tego nowotworu. Obecność *BRAFV600E* dodatkowo pogarsza rokowanie i zwiększa śmiertelność w przebiegu choroby [12]. Mutację tę wykryto także u 2 z 6 przebadanych pacjentów z rakiem nieodróżnionym tarczycy. Nie znaleziono jej natomiast u żadnej z 31 przebadanych osób ze zmianami łagodnymi lub rakiem pęcherzykowym. W innym badaniu u 45 pacjentów (u 16 zdiagnozowano ostatecznie raka brodawkowatego tarczycy) mutacja *BRAFV600E* była obecna w materiale uzyskanym z biopsji guzka u 50% badanych, u których guzek okazał się rakiem brodawkowatym, i u żadnego ze zmianami łagodnymi [15]. Badania wskazują także, że ocena obecności mutacji V600E może być pomocna w podjęciu decyzji o postępowaniu w stadium T_1 guza, gdyż jest to niezależny marker bardziej agresywnego przebiegu choroby oraz obecności rozsiewu nowotworowego [16, 17]. Obecność mutacji *BRAFV600E* stwierdza się wprawdzie, według różnych badań, w 28,8–50% raków brodawkowatych [12, 15], jednak bardzo wysoka specyficzność pozwala myśleć o badaniu jej jako wartościowym elemencie postępowania diagnostycznego i istotnym czynnikiem prognostycznym.

RAS

Protoonkogeny *RAS* (*N-RAS*, *K-RAS*, *H-RAS*) kodują sprzężone z wewnętrzną powierzchnią błony komórkowej białka wiążące GTP, które uczestniczą w przekazywaniu mitogennych sygnałów

z receptorów błonowych dla czynników wzrostu do jądra szlakiem *RAS/RAF/MAPK*. Mutacje punktowe w kodonach 12, 13 (ekson 1) i 61 (ekson 2), kodujących odpowiednio region wiążący GTP i domenę GTP-azową, prowadzą do stałej aktywacji białka *RAS* i w konsekwencji do rozwoju nowotworu [18].

Mutacje genu *RAS* w guzach tarczycy występują umiarkowanie często. W dotychczasowych badaniach (obejmujących co najmniej 30 przypadków danego nowotworu) zostały stwierdzone w 10–25% raków brodawkowatych [19–24], 21–37% raków pęcherzykowych [23, 25, 26] oraz 20–33% gruczolaków pęcherzykowych [25–27]. Prace analizujące występowanie mutacji *RAS* w poszczególnych podtypach raka brodawkowego wskazują, że wszystkie mutacje dotyczą wariantu pęcherzykowego, co przemawia za ścisłym powiązaniem mutacji *RAS* z foliularnym zróżnicowaniem nowotworu [22, 24]. Ponad 50% mutacji *RAS* dotyczy kodonu 61 (ekson 2) genu *NRAS* [25–27]. Na podstawie analizy 22 badań Vasco i wsp. stwierdzili występowanie takiej mutacji w 5% raków brodawkowatych, 24% raków pęcherzykowych, 14% gruczolaków pęcherzykowych i jedynie 2% guzków koloidowych [26].

Obecność mutacji *RAS* zarówno w zmianach łagodnych, jak i złośliwych sugeruje, że jest to wczesne wydarzenie w rozwoju guza [27–30], które może predysponować do transformacji złośliwej [25, 26]. Ponadto kilka badań wykazało zależność między mutacją *RAS* a słabszym zróżnicowaniem nowotworu [21, 23, 31]. Wskazuje to na potencjalną możliwość progresji zróżnicowanych raków tarczycy z mutacją *RAS* do raka anaplastycznego [22, 31], niemniej jednak doniesienia te wymagają weryfikacji w dalszych badaniach. Garcia i wsp. stwierdzili ponaddwukrotnie zwiększoną śmiertelność w przebiegu raków tarczycy z mutacją *RAS* [23]. Co więcej, szereg prac wskazuje na korelację tej mutacji z częstszym występowaniem przerzutów drogą krwi, zwłaszcza do kości [21, 23, 32]. Powyższe dane pozostają w zgodzie z pęcherzykowym zróżnicowaniem nowotworów z mutacją *RAS*.

Wykrycie mutacji *RAS* wydaje się mieć wysoką wartość w diagnostyce zmian ogniskowych w tarczycy. Przede wszystkim pomaga w identyfikacji guzów, które najtrudniej zdiagnozować za pomocą BAC, tj. raka pęcherzykowego oraz wariantu pęcherzykowego raka brodawkowego [19]. W dwóch badaniach, w których analizowano przydatność wykrywania mutacji *RAS* w poprawie trafności BAC, wszystkie zmiany opisane jako nieokreślone pod względem złośliwości mające mutację *RAS* w badaniu histopatologicznym okazały się rakami [19, 33]. Stwierdzenie obecności mutacji w obrębie *RAS* nie umożliwia odróżnienia gruczolaka pęcherzykowego od raka pęcherzykowego, jest jednak wysoce swoistym badaniem odróżniającym nowotwór foliularny od guzka koloidowego [25, 26]. Chirurgiczne usunięcie gruczolaka

z mutacją *RAS* może być usprawiedliwione ryzykiem jego progresji do nowotworu złośliwego [19]. Ponadto obecność mutacji *RAS* w nowotworach tarczycy może się wiązać z gorszym rokowaniem [23].

PIK3CA I *PTEN*

Gen *PIK3CA* koduje podjednostkę katalityczną p110 α 3-kinazy fosfatydyloinozytolu (PI3K). Zarówno mutacje punktowe, jak i amplifikacja tego genu prowadzą do nadmiernej aktywacji szlaku sygnałowego PI3K/AKT, który odgrywa ważną rolę w regulacji wzrostu i proliferacji komórki, co może skutkować transformacją nowotworową. Podobny efekt wywołują inaktywujące mutacje genu supresorowego *PTEN*, kodującego białko o funkcji antagonistycznej w stosunku do *PI3K* [34]. Częstość występowania nieprawidłowości w obrębie genów *PIK3CA* i *PTEN* w nowotworach tarczycy została przedstawiona w tabeli 1 [34–36].

TABELA 1.
Częstość występowania nieprawidłowości w genach *PIK3CA* i *PTEN* w nowotworach tarczycy.

	Amplifikacja <i>PIK3CA</i>	Mutacja <i>PIK3CA</i>	Mutacja <i>PTEN</i>
Rak pęcherzykowy	24–29%	0–13%	6–7%
Rak brodawkowy	5–14%	0–3%	0–2%
Gruczolak pęcherzykowy	8–17%	0–6%	0%

Mutacje i amplifikacja *PIK3CA* oraz mutacje *PTEN* są najczęściej wykrywane w raku pęcherzykowym. Ich występowanie w zmianach łagodnych świadczy, że nieprawidłowości genetyczne powodujące nadmierną aktywność szlaku sygnałowego PI3K/AKT są wczesnym wydarzeniem w rozwoju nowotworów tarczycy i ich obecność może promować progresję gruczolaka do raka [34–36]. Hou i wsp. wykryli amplifikację *PIK3CA*, mutację *PIK3CA* i mutację *PTEN* odpowiednio w 42%, 12% i 16% z 50 raków anaplastycznych; ich zdaniem sugeruje to wpływ zaburzeń funkcjonowania szlaku PI3K/AKT na transformację raka zróżnicowanego w anaplastycznego [34]. Pewne podobieństwa powyższych właściwości z obserwowanymi w nowotworach z mutacją *RAS* wyjaśnia interakcja *RAS* z kaskadą PI3K/AKT [34].

Wykrycie nieprawidłowości w genach *PIK3CA* i *PTEN* może być przydatne w identyfikacji raka pęcherzykowego oraz selekcji zmian łagodnych zagrożonych progresją do złośliwych. Przydatność wykrywania mutacji punktowych *PIK3CA* i *PTEN* w diag-

nostyce jest ograniczona ze względu na ich rzadkie występowanie w guzach tarczycy, niemniej jednak amplifikacja *PIK3CA* jest stosunkowo częsta. Dalsze badania są konieczne do rozszerzenia zastosowania powyższych markerów.

RET I RET/PTC

Protoonkogen *RET* koduje receptory o aktywności kinazy tyrozynowej dla białek z rodziny glejopochodnego czynnika neurotroficznego (GDNF). Przyłączenie liganda powoduje dimeryzację receptorów *RET*, autofosforylację domeny wewnątrzkomórkowej i pobudzenie szlaków sygnałowych przyczyniających się do powstania nowotworu [37]. W obrębie gruczołu tarczowego wysoki poziom ekspresji genu *RET* wykazują jedynie komórki C [38]. Punktowe mutacje *RET* w linii germlinalnej odpowiadają za występowanie rodzinnego raka rdzeniastego tarczycy oraz zespoły mnogiej gruczolakowatości wewnątrzwydzielniczej (MEN) typu 2A i 2B [18]. Somatyczne mutacje *RET* są obecne w blisko 30–50% przypadków sporadycznego raka rdzeniastego [37]. Wykrycie mutacji *RET* w materiale z BAC mogłoby być użyteczne w diagnostyce tego typu nowotworu, jednak oznaczanie osoczonego stężenia kalcytoniny jest łatwiejszym i powszechnie uznanym testem o wyższej czułości. Niemniej u wszystkich pacjentów z rozpoznaniem rakiem rdzeniastym tarczycy należy wykonać badania w kierunku mutacji *RET* w linii zarodkowej. W przypadku wyniku pozytywnego krewni chorego powinni zostać poddani podobnym badaniom oraz tyreoidektomii w razie wykrycia mutacji [37].

W komórkach pęcherzykowych tarczycy gen *RET* może zostać aktywowany przez fuzję z genem wykazującym konstytutywną ekspresję. Opisano wiele rodzajów takiej rearanżacji, która została nazwana *RET/PTC* [38]. Częstość występowania *RET/PTC* w raku brodawkowatym tarczycy wynosi 16–52% [20, 24, 39, 40]. Nikiforov, na podstawie pięciu dużych badań przeprowadzonych w Stanach Zjednoczonych, oszacował ją na 35% [38]. Rearanżacja *RET/PTC* jest wysoce swoista dla raka brodawkowatego [20, 24, 39]. Niemniej jednak istnieją pojedyncze doniesienia o jej występowaniu w gruczolakach pęcherzykowych i chorobie Hashimoto [38, 40]. Większość raków brodawkowatych związanych z ekspozycją na promieniowanie jonizujące posiada rearanżację *RET/PTC* [18, 38]. Ponadto jest ona częstsza u dzieci i młodych dorosłych [38]. Rodzaj rearanżacji wpływa na rokowanie. *RET/PTC1*, która występuje najczęściej, wiąże się z łagodniejszym charakterem guza. *RET/PTC3*, najczęstsza u pacjentów ekspozowanych na promieniowanie jonizujące, odpowiada agresywniejszemu przebiegowi choroby [38].

Rearanżacja *RET/PTC* wydaje się cennym markerem w diagnostyce raka brodawkowatego, ponieważ charakteryzuje się wysoką

swoistością i stosunkowo częstym występowaniem. Cheung i wsp. z powodzeniem stosowali wykrywanie *RET/PTC* w celu poprawy trafności BAC. Zidentyfikowanie rearanżacji pozwoliło na szybkie rozpoznanie raka brodawkowatego w 9 z 15 przypadków opisanych jako nieokreślone pod względem złośliwości oraz w 2 z 6 biopsji niediagnostycznych, ze 100-procentową swoistością [39].

PAX8/PPAR γ

PAX8 jest genem zlokalizowanym na długim ramieniu chromosomu 2 (2q13), jego produkt jest czynnikiem transkrypcyjnym istotnym w procesie rozwoju tarczycy. *PPAR γ* to gen zlokalizowany na krótkim ramieniu chromosomu 3 (3p25), jego produkt należy do rodziny receptorów jądrowych [41]. Rearanżacja *PAX8/PPAR γ* jest zmianą typową dla nowotworów pęcherzykowych. W dotychczasowych pracach była wykrywana w 25–57% raków pęcherzykowych i ok. 4–13% gruczolaków pęcherzykowych [25, 42–44]. W jednym z badań nie odnaleziono *PAX8/PPAR γ* w żadnym z 40 zbadanych gruczolaków pęcherzykowych [44]. W większości opracowań częstość występowania tej rearanżacji była istotnie wyższa w rakach niż gruczolakach pęcherzykowych, choć jedna z publikacji przedstawia odwrotną zależność [45]. W większości przeprowadzonych doświadczeń ta rearanżacja była swoista dla zmian pęcherzykowych i nie występowała w innych guzkach tarczycy. Przedmiotem kontrowersji pozostaje wartość rearanżacji *PAX8/PPAR γ* jako markera prognostycznego. Wyniki dostępnych badań są rozbieżne, jednak większość wskazuje, że raki pęcherzykowe, które ją posiadają, mają mniej agresywny przebieg kliniczny [46].

mRNA Tg I TSHR

Oznaczenia osoczonego stężenia tyreoglobuliny (Tg) są stosowane w rutynowej diagnostyce, przede wszystkim w monitorowaniu pacjentów po całkowitej tyreoidektomii z powodu zróżnicowanego raka tarczycy, jako marker wznowy procesu nowotworowego [47]. Do wad tej metody należy m.in. to, że powstające przeciwciała skierowane przeciw epitopom Tg mogą zaniżyć wyniki pomiarów stężenia markera, a tym samym prowadzić do wyników fałszywie ujemnych, dlatego podjęto próby wykorzystania ilościowych oznaczeń mRNA Tg. Uważa się, że oznaczenie stężenia mRNA genów ulegających transkrypcji zasadniczo wyłączenie w komórkach pęcherzykowych tarczycy może pozwolić na wczesne wykrycie wznowy po operacji. Ponadto podejmuje się próby wykorzystania tych oznaczeń w przedoperacyjnej diagnostyce guzów tarczycy, gdyż sądzi się, że markery wykrywalne we krwi obwodowej mogą świadczyć o obecności procesu złośliwego [48]. Bardzo wysoka czułość techniki RT-PCR umożliwia wykrycie już bardzo niewielkiej ilości materiału. Istnieje również kilka

doniesień o wykorzystaniu w tym celu mRNA genu receptora dla TSH (*TSHR*) [49]. W dotychczasowych pracach, zależnie od grupy badanej i stężenia mRNA przyjmowanego za punkt odcięcia, uzyskiwano czułość rzędu 60–80% przy specyficzności sięgającej 70–80% [48, 49]. Choć wyniki te trudno uznać za satysfakcjonujące, istnieją doniesienia, że włączenie oznaczenia stężenia mRNA *TSHR* jako jednego z elementów algorytmu decyzyjnego, wraz z badaniem USG i wynikiem biopsji aspiracyjnej cienkoigłowej, pozwoliło na zwiększenie specyficzności diagnozy nowotworu złośliwego, lecz pozostawało bez wpływu na czułość. Badanie to okazało się także dość skutecznym markerem monitorowania nawrotu raka tarczycy u chorych po operacji, skuteczniejszym niż oznaczanie stężenia Tg w surowicy i w 91% dawało wynik zgodny ze scyntyografią całego ciała z użyciem jodu ¹³¹I [50].

VEGF-A synonim: VEGF (*vascular endothelial growth*), *factor A*

Gen kodujący VEGF znajduje się na chromosomie 6 (6p21.1) i zawiera 8 eksonów [51]. W wyniku procesu alternatywnego wycinania intronów (*splicing*) może powstać kilka różnych produktów tego genu, o wielkości odpowiednio 121, 145, 165, 183, 189 i 206 aminokwasów. Większość badań wskazuje, że VEGF165 jest najpowszechniej występującą i najbardziej aktywną biologicznie izoformą [52]. VEGF to czynnik promujący angiogenezę, dlatego budzi zainteresowanie jako punkt uchwytu dla leków, marker prognostyczny lub wznowy, a w mniejszym stopniu jako potencjalny marker diagnostyczny. W jednym z badań określano stężenie VEGF w surowicy 30 pacjentów z rakiem brodawkowatym tarczycy, 30 pacjentów z wolem oraz 23 osób zdrowych. Wykazano, że w grupie z rakiem było ono istotnie wyższe niż u chorych z wolem czy w grupie kontrolnej. Nie wykazano natomiast istotnej różnicy między pacjentami z wolem a osobami zdrowymi. Uwzględnivszy podział raka brodawkowatego na stadia wg klasyfikacji TNM, okazało się, że jedynie u pacjentów w III i IV stopniu zaawansowania stężenie VEGF było podwyższone w sposób istotny statystycznie wobec grupy z wolem. Podważa to wartość oznaczenia stężenia VEGF jako markera umożliwiającego wykrycie raka brodawkowatego we wczesnym stadium [53]. Z kolei w polskim badaniu, obejmującym 48 pacjentów z rakiem brodawkowatym tarczycy oraz 20 zdrowych dawców szpiku wykazano istotnie wyższe stężenie VEGF w grupie chorych z nowotworem, przy czym w badaniu tym wykazano również negatywną korelację między stężeniem VEGF a stopniem zaawansowania nowotworu wg skali pTNM [54]. Badania linii komórkowych pochodzących z kilku typów raków tarczycy (brodawkowaty, pęcherzykowy, z komórek Hürthla, rdzeniasty), pierwotnych kultur in vitro komórek tarczycy, skrawków parafinowych zawierających

tkanki pochodzące z analogicznych nowotworów, gruczolaków pęcherzykowych i tarczyc osób z chorobą Gravesa-Basedowa dowiodły, że linie komórek raków tarczycy odznaczają się wyższym stężeniem mRNA VEGF niż pierwotne kultury komórek tarczycy, a tkanki nowotworowe odznaczały się wyższą ilością białka VEGF niż fragmenty pozostałych tkanek. Zarówno w przypadku badania linii komórkowych, jak i skrawków parafinowych stężenie VEGF było niższe w materiale pochodzącym z raków rdzeniastych niż z raków zróżnicowanych tarczycy [55].

Wykazano także istnienie polimorfizmów sekwencji kodujących 5' i 3'-UTR (*untranslated region*; element mRNA niepodlegający procesowi translacji), jak 141A-C, 405C-G (5'-UTR) czy 936C-T (3'-UTR), które istotnie częściej występowały w materiale pobranym z raków brodawkowatych niż w kontrolnych tkankach tarczycy. Obecność polimorfizmów 405C-G oraz 936C-T była też częstsza w nowotworach o wyższym stopniu zaawansowania [56].

Szereg badań dowodzi, że stężenie VEGF koreluje ze stopniem zaawansowania raka brodawkowatego [53, 57]. Podwyższone stężenie także negatywny czynnik rokowniczy [57].

Galektyna 3

Galektyna 3 to białko złożone z 250 aminokwasów, należące do rodziny galektyn (lektyn wiążących β-glikozydy), kodowane przez gen na chromosomie 14 (14q22.3) złożony z 6 eksonów [58]. Pełni liczne i zróżnicowane funkcje w wielu procesach w komórcach, takich jak *splicing*, oddziaływania międzykomórkowe czy kontrola cyklu komórkowego i apoptozy [59, 60]. Galektyna 3 jest jednym z najczęściej badanych markerów diagnostycznych raka tarczycy. W jednym z badań przy użyciu techniki RT-PCR oceniano ekspresję galektyny 3 na poziomie mRNA w materiale pochodzącym z przedoperacyjnej biopsji aspiracyjnej cienkoigłowej i konfrontowano uzyskane dane z wynikami pooperacyjnego badania histopatologicznego. Doświadczenie przeprowadzono na grupie 428 pacjentów, przy czym materiał uzyskany w 87% biopsji (n = 371) nadawał się do analizy. Obecność mRNA galektyny 3 stwierdzono w 68% (8 z 13) raków z komórek Hürthla, 86% (56 z 65) raków brodawkowatych, 100% raków pęcherzykowych (3 z 3), 29% (16 z 56) przypadków choroby Hashimoto, 34% (61 z 181) przypadków wola guzkowego tarczycy oraz 43% (23 z 53) przypadków gruczolaków pęcherzykowych [61]. Z kolei w kilku badaniach immunocytochemicznych wykazano stuprocentową specyficzność oznaczeń galektyny 3 w diagnostyce złośliwych nowotworów pęcherzykowych [62, 63]. Dotychczasowe wyniki sugerują, że galektyna 3 może być cennym markerem diagnostycznym, aczkolwiek uzyskiwane wyniki w dużym stopniu zależą od zastosowanej metody oznaczeń i wymagają dalszych badań w celu optymalizacji i wyboru odpowiednich metod badawczych.

miRNA (*microRNA*)

Obok klasycznych markerów, tzn. genów kodujących białka i ich produktów, w kontekście markerów diagnostycznych i prognostycznych zaczęto rozpatrywać także cząsteczki miRNA. Badania przy użyciu technologii mikromacierzowej na dość małej grupie pacjentów (14 pacjentów z gruczolakiem pęcherzykowym, 12 z rakiem pęcherzykowym oraz 7 bez zmian w tarczycy) wykazały, że tylko jeden rodzaj miRNA, miR-122, wykazuje znamienne statystycznie różnice w stężeniach między rakiem a gruczolakiem pęcherzykowym (różnica średnich powyżej 2 odchyłeń standardowych), rakiem pęcherzykowym i normalną tkanką tarczycy oraz rakiem pęcherzykowym z obecnością rearanżacji *PAX8/PPARγ* i bez niej (różnica średnich powyżej 3 odchyłeń standardowych) [46].

PODSUMOWANIE

Podsumowując wyniki dotychczasowych badań, należy stwierdzić, że wykryto szereg markerów, których poziom ekspresji jest różny w tkance prawidłowej, zmianach łagodnych i poszczególnych

rakach tarczycy, a także mutacje, których obecność jest typowa dla danej grupy zmian w obrębie gruczołu tarczowego. Jak dotąd nie odnaleziono pojedynczego markera molekularnego, który cechowałby się zadowalającą czułością i swoistością w przedoperacyjnym różnicowaniu łagodnych i złośliwych zmian tarczycy. Żaden spośród rozpatrywanych potencjalnych markerów nie wszedł również jeszcze do rutynowej diagnostyki czy wytycznych postępowania w chorobie guzkowej tarczycy. Intensywnie prowadzone badania mające na celu znalezienie nowych markerów molekularnych, optymalizację metod ich wykrywania oraz ocenę rzeczywistej przydatności przynoszą jednak coraz bardziej obiecujące rezultaty. Choć analiza żadnego z przebadanych jak dotąd markerów nie może być obecnie samodzielną metodą diagnostyczną, to oznaczanie szeregu markerów jako element zestawu badań, obok badania USG czy klasycznej cytologii, może się przyczynić do zwiększenia czułości i specyficzności wykrywania zmian złośliwych, a co za tym idzie podjęcia właściwej decyzji o sposobie leczenia choroby guzkowej tarczycy.

Piśmiennictwo

1. Karaszewski B., Wilkowski M., Tomasiuk T. et al.: The prevalence of incidentaloma – asymptomatic thyroid nodules in the Tricity (Gdansk, Sopot, Gdynia) population. *Endokrynol. Pol.* 2006; 57(3): 196-201.
2. Mazzaferri E.L., de los Santos E.T., Rofagha-Keyhani S.: Solitary thyroid nodule: diagnosis and management. *Med. Clin. North Am.* 1988; 72: 1177-1211.
3. Cooper D.S., Doherty G.M., Haugen B.R. et al.: Management guidelines for patients with thyroid nodules and differentiated thyroid cancer. *Thyroid* 2006; 16: 109-142.
4. Frates M.C., Benson C.B., Doubilet P.M. et al.: Prevalence and distribution of carcinoma in patients with solitary and multiple thyroid nodules on sonography. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2006; 91: 3411-3417.
5. Kim D.L., Song K.H., Kim S.K.: High prevalence of carcinoma in ultrasonography-guided fine needle aspiration cytology of thyroid nodules. *Endocr. J.* 2008; 55: 135-142.
6. Papini E., Guglielmi R., Bianchini A. et al.: Risk of malignancy in nonpalpable thyroid nodules: predictive value of ultrasound and color-Doppler features. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2002; 87: 1941-1946.
7. Nikiforov Y.E., Ohori N.P., Hodak S.P. et al.: Impact of mutational testing on the diagnosis and management of patients with cytologically indeterminate thyroid nodules: a prospective analysis of 1056 FNA samples. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2011; 96: 3390-3397.
8. Baloch Z.W., LiVolsi V.A., Asa S.L. et al.: Diagnostic terminology and morphologic criteria for cytologic diagnosis of thyroid lesions: a synopsis of the National Cancer Institute Thyroid Fine-Needle Aspiration State of the Science Conference. *Diagn. Cytopathol.* 2008; 36: 425-437.
9. Baloch Z.W., Fleisher S., LiVolsi V.A. et al.: Diagnosis of „follicular neoplasm”: a gray zone in thyroid fine-needle aspiration cytology. *Diagn. Cytopathol.* 2002; 26: 41-44.
10. Mazzaferri E.L.: Management of a solitary thyroid nodule. *N. Engl. J. Med.* 1993; 328: 553-559.
11. Davies H., Bignell G.R., Cox C. et al.: Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 2002; 417: 949-954.
12. Namba H., Nakashima M., Hayashi T. et al.: Clinical implication of hot spot BRAF mutation, V599E, in papillary thyroid cancers. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2003; 88: 4393-4397.
13. Nucera C., Porrello A., Antonello Z.A. et al.: B-RafV600E and thrombospondin-1 promote thyroid cancer progression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2010; 107(23): 10649-54.
14. Knauf J.A., Ma X., Smith E.P. et al.: Targeted Expression of BRAFV600E in Thyroid Cells of Transgenic Mice Results in Papillary Thyroid Cancers that Undergo Dedifferentiation. *Cancer Res.* 2005; 65: 4238-4245.
15. Xing M., Tufano R.P., Tufano A.P. et al.: Detection of BRAF Mutation on Fine Needle Aspiration Biopsy Specimens: A New Diagnostic Tool for Papillary Thyroid Cancer. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2004; 89(6): 2867-72.
16. Nikiforov Y.E.: Molecular diagnostics of thyroid tumors. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 2011; 135(5): 569-77.
17. Giannini R., Ugolini C., Lupi C. et al.: The Heterogeneous Distribution of BRAF Mutation Supports the Independent Clonal Origin of Distinct Tumor Foci in Multifocal Papillary Thyroid Carcinoma. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2007; 92(9): 3511-6.
18. Kumar V., Cotran R., Robbins S.: Patologia. Wydawnictwo Medyczne Urban & Patner, Wrocław 2005.
19. Nikiforov Y.E., Steward D.L., Robinson-Smith T.M. et al.: Molecular testing for mutations in improving the fine-needle aspiration diagnosis of thyroid nodules. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2009; 94: 2092-8.

20. Kimura E.T., Nikiforova M.N., Zhu Z. et al.: High prevalence of BRAF mutations in thyroid cancer: genetic evidence for constitutive activation of the RET/PTC-RAS-BRAF signaling pathway in papillary thyroid carcinoma. *Cancer Res.* 2003; 63: 1454-7.
21. Basolo F., Pisaturo F., Pollina L.E. et al.: N-ras mutation in poorly differentiated thyroid carcinomas: correlation with bone metastases and inverse correlation to thyroglobulin expression. *Thyroid* 2000; 10: 19-23.
22. Zhu Z., Gandhi M., Nikiforova M.N. et al.: Molecular profile and clinical-pathologic features of the follicular variant of papillary thyroid carcinoma. An unusually high prevalence of ras mutations. *Am. J. Clin. Pathol.* 2003; 120: 71-7.
23. Garcia-Rostan G., Zhao H., Camp R.L. et al.: Ras mutations are associated with aggressive tumor phenotypes and poor prognosis in thyroid cancer. *J. Clin. Oncol.* 2003; 21: 3226-35.
24. Di Cristofaro J., Marcy M., Vasko V. et al.: Molecular genetic study comparing follicular variant versus classic papillary thyroid carcinomas: association of N-ras mutation in codon 61 with follicular variant. *Hum. Pathol.* 2006; 37: 824-30.
25. Nikiforova M.N., Lynch R.A., Biddinger P.W. et al.: RAS point mutations and PAX8-PPAR gamma rearrangement in thyroid tumors: evidence for distinct molecular pathways in thyroid follicular carcinoma. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2003; 88: 2318-26.
26. Vasko V., Ferrand M., Di Cristofaro J. et al.: Specific pattern of RAS oncogene mutations in follicular thyroid tumors. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2003; 88: 2745-52.
27. Esapa C.T., Johnson S.J., Kendall-Taylor P. et al.: Prevalence of Ras mutations in thyroid neoplasia. *Clin. Endocrinol. (Oxf.)* 1999; 50: 529-35.
28. Lemoine N.R., Mayall E.S., Wyllie F.S. et al.: High frequency of ras oncogene activation in all stages of human thyroid tumorigenesis. *Oncogene* 1989; 4: 159-64.
29. Namba H., Rubin S.A., Fagin J.A.: Point mutations of ras oncogenes are an early event in thyroid tumorigenesis. *Mol. Endocrinol.* 1990; 4: 1474-9.
30. Suarez H.G., du Villard J.A., Severino M. et al.: Presence of mutations in all three ras genes in human thyroid tumors. *Oncogene* 1990; 5: 565-70.
31. Motoi N., Sakamoto A., Yamochi T. et al.: Role of ras mutation in the progression of thyroid carcinoma of follicular epithelial origin. *Pathol. Res. Pract.* 2000; 196: 1-7.
32. Manenti G., Pilotti S., Re F.C. et al.: Selective activation of ras oncogenes in follicular and undifferentiated thyroid carcinomas. *Eur. J. Cancer* 1994; 30A: 987-93.
33. Sciacchitano S., Paliotta D.S., Nardi F. et al.: PCR amplification and analysis of ras oncogenes from thyroid cytologic smears. *Diagn. Mol. Pathol.* 1994; 3: 114-21.
34. Hou P., Liu D., Shan Y. et al.: Genetic alterations and their relationship in the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway in thyroid cancer. *Clin. Cancer Res.* 2007; 13: 1161-70.
35. Wang Y., Hou P., Yu H. et al.: High prevalence and mutual exclusivity of genetic alterations in the phosphatidylinositol-3-kinase/akt pathway in thyroid tumors. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2007; 92: 2387-90.
36. Wu G., Mambo E., Guo Z. et al.: Uncommon mutation, but common amplifications, of the PIK3CA gene in thyroid tumors. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2005; 90: 4688-93.
37. Krysiak R., Marek B., Okopień B.: Rak rdzeniasty tarczycy – aktualny stan wiedzy. *Endokrynologia Polska* 2008; 59: 446-55.
38. Nikiforov Y.E.: RET/PTC Rearrangement in Thyroid Tumors. *Endocr. Pathol.* 2002; 13: 3-16.
39. Cheung C.C., Carydis B., Ezzat S. et al.: Analysis of ret/PTC gene rearrangements refines the fine needle aspiration diagnosis of thyroid cancer. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2001; 86: 2187-90.
40. Salvatore G., Giannini R., Faviana P. et al.: Analysis of BRAF point mutation and RET/PTC rearrangement refines the fine-needle aspiration diagnosis of papillary thyroid carcinoma. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2004; 89: 5175-80.
41. Eberhardt N.L., Grebe S.K., McIver B. et al.: The Role of the PAX8/PPARγ Fusion Oncogene in the Pathogenesis of Follicular Thyroid Cancer. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2010; 321(1): 50-6.
42. Sahin M., Allard B.L., Yates M. et al.: PPARγ staining as a surrogate for PAX8/PPARγ fusion oncogene expression in follicular neoplasms: clinicopathological correlation and histopathological diagnostic value. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2005; 90(1): 463-8.
43. Marques A.R., Espadilha C., Frias M.J. et al.: Underexpression of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)γ in PAX8/PPARγ-negative thyroid tumours. *Br. J. Cancer* 2004; 91(4): 732-8.
44. Dwight T., Thoppe S.R., Foukakis T. et al.: Involvement of the PAX8/peroxisome proliferator-activated receptor gamma rearrangement in follicular thyroid tumors. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2003; 88(9): 4440-5.
44. French C.A., Alexander E.K., Cibas E.S. et al.: Genetic and biological subgroups of low-stage follicular thyroid cancer. *Am. J. Pathol.* 2003 Apr; 162(4): 1053-60.
45. Cheung L., Messina M., Gill A. et al.: Detection of the PAX8-PPAR gamma fusion oncogene in both follicular thyroid carcinomas and adenomas. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2003; 88(1): 354-7.
46. Reddi H.V., Madde P., Milosevic D. et al.: The Putative PAX8/PPARγ Fusion Oncoprotein Exhibits Partial Tumor Suppressor Activity through Up-Regulation of Micro-RNA-122 and Dominant-Negative PPARγ Activity. *Genes Cancer* 2011; 2(1): 46-55.
47. Baudin E., Do Cao C., Cailleux A.F. et al.: Positive predictive value of serum thyroglobulin levels, measured during the first year of follow-up after thyroid hormone withdrawal, in thyroid cancer patients. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2003; 88(3): 1107-11.
48. Savagner F., Rodien P., Reynier P. et al.: Analysis of Tg transcripts by real-time RT-PCR in the blood of thyroid cancer patients. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2002; 87(2): 635-9.
49. Wagner K., Arciaga R., Siperstein A. et al.: Thyrotropin receptor/thyroglobulin messenger ribonucleic acid in peripheral blood and fine-needle aspiration cytology: diagnostic synergy for detecting thyroid cancer. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2005; 90(4): 1921-4.
50. Milas M., Mazzaglia P., Chia S.Y. et al.: The utility of peripheral thyrotropin mRNA in the diagnosis of follicular neoplasms and surveillance of thyroid cancers. *Surgery* 2007; 141(2): 137-46.
51. Tischer E., Mitchell R., Hartman et al.: The human gene for vascular endothelial growth factor: multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing. *J. Biol. Chem.* 1991; 266: 11947-11954.
52. Tayama M., Furuhashi T., Inafuku Y. et al.: Vascular endothelial growth factor 165b expression in stromal cells and colorectal cancer. *World J. Gastroenterol.* 2011; 17(44): 4867-74.
53. Lin S.Y., Wang Y.Y., Sheu W.H.: Preoperative plasma concentrations of vascular endothelial growth factor and matrix metalloproteinase 9 are associated with stage progression in papillary thyroid cancer. *Clin. Endocrinol. (Oxf.)* 2003; 58(4): 513-8.
54. Konturek A., Barczyński M., Cichoń S. et al.: Significance of vascular endothelial growth factor and epidermal growth factor in development of papillary thyroid cancer. *Langenbecks Arch. Surg.* 2005; 390(3): 216-21.
55. Soh E.Y., Duh Q.Y., Sobhi S.A. et al.: Vascular endothelial growth factor expression is higher in differentiated thyroid cancer than in normal or benign thyroid. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1997; 82(11): 3741-7.

56. Salajegheh A., Smith R.A., Kasem K. et al.: Single nucleotide polymorphisms and mRNA expression of VEGF-A in papillary thyroid carcinoma: potential markers for aggressive phenotypes. *Eur. J. Surg. Oncol.* 2011; 37(1): 93-9.
57. Klein M., Vignaud J.M., Hennequin V. et al.: Increased expression of the vascular endothelial growth factor is a pejorative prognosis marker in papillary thyroid carcinoma. *J. Clin. Endocr. Metab.* 2001; 86: 656-658.
58. Guittaut M., Charpentier S., Normand T. et al.: Identification of an internal gene to the human galectin-3 gene with two different overlapping reading frames that do not encode galectin-3. *J. Biol. Chem.* 2001; 276: 2652-2657.
59. Pricci F., Leto G., Amadio L. et al.: Role of galectin-3 as a receptor for advanced glycosylation end products. *Kidney Int. Suppl.* 2000; 77: 31-9.
60. Nangia-Makker P., Nakahara S., Hogan V. et al.: Galectin-3 in apoptosis, a novel therapeutic target. *J. Bioenerg. Biomembr.* 2007; 39(1): 79-84.
61. Samija I., Mateša N., Lukač J. et al.: Galectin-3 and CD44v6 as markers for preoperative diagnosis of thyroid cancer by RT-PCR. *Diagn. Mol. Pathol.* 2011; 20(4): 233-41.
62. Raggio E., Camandona M., Solerio D. et al.: The diagnostic accuracy of the immunocytochemical markers in the pre-operative evaluation of follicular thyroid lesions. *J. Endocrinol. Invest.* 2010; 33(6): 378-81.
63. Ersoz S., Sert H., Yandi M. et al.: The significance of Galectin-3 expression in the immunocytochemical evaluation of thyroid fine needle aspiration cytology. *Pathol. Oncol. Res.* 2008; 14(4): 457-60.

Adres do korespondencji:

prof. dr hab. n. med. Marek Ruchała
Katedra i Klinika Endokrynologii,
Przemiany Materii i Chorób Wewnętrznych
Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu
ul. Przybyszewskiego 49, 60-355 Poznań
tel.: (61) 869-13-30
e-mail: mruchala@ump.edu.pl