

## **Ekspresija molekularnih markera u citološkom uzorku štitaste žlezde u identifikaciji prirode nodozne strume**

### **Uvod**

Iako su tiroidni nodusi česti, tiroidni karcinom ima godišnju incidencu 3,5-4,8% na 100000 stanovnika, a incidenca maligniteta u tiroidnim nodusima se kreće od 5-15%, tako da procenjena smrtnost iznosi manje od 1% i ima sporiji tok.(1) Tiroidni nodusi predstavljaju čest klinički problem, koji postaje još aktuelniji sa porastom prevalencije diferentovanog tiroidnog karcinoma.

U velikoj studiji Martensona i saradnika iz Minesote, rađenoj na autopsijskom materijalu, polovina je imala solitarne ili multiple noduse, pri čemu je najveći broj nodusa bio malih dimenzija ( $< 1\text{cm}$ ) benigne prirode.(2) Kod osoba sa iradijacijom glave i vrata u ranim godinama zapažene su u 70 % slučajeva benigne promene, a u 30 % maligne promene, s tim da su od maligniteta najčešći papilarni karcinomi. Kod dece koja su bila izložena zračenju u Černobilu pronađen je visok rizik za pojavu tiroidnih karcinoma.(3)

Pored funkcijske dijagnostike štitaste žlezde koja podrazumeva određivanje tiroidnih hormona u krvi, i autoimune dijagnostike kojom se određuju antitiroidna antitela od izuzetnog značaja je morfološko ispitivanje koje kreće od ehosonografske dijagnostike štitaste žlezde.

Razlikovanje benignog od malignog nodusa je veoma teško, pa je i donošenje odluke o hirurškom lečenju nekada kontraverzno. Pri proceni tiroidnog nodusa veoma su važne informacije dobijene anamnezom i fizikalnim pregledom, jer one vrše identifikaciju pacijenta sa većim rizikom za razvoj karcinoma.

Ispitivanje tiroidnog nodusa punkcijom štitaste žlezde tankom iglom ( FNA-fine needle aspiration ) i citopatološki pregled dobijenog aspirata primenjuje se unazad 60 godina. Punkcija tiroidnog nodusa od izuzetnog je značaja u preoperativnoj dijagnostici i predstavlja prvi korak u evaluaciji tiroidnog nodusa.

Uvođenjem citopunkcije štitaste žlezde u kliničku praksu, znatno je smanjen broj operacija štitaste žlezde. Neodređen nalaz citološkog istraživanja potiče od neadekvatne citološke analize. U toku citološke analize mogu se videti mnoge promene u samoj ćeliji ili jedru, a ne razlikuju se od ćelija u papilarnom karcinomu.

Dosadašnja iskustva većeg broja molekularnih markera pouzdaniji su pokazatelj maligno transformisanog tireocita. Između ostalih galektin -3, tiroidna peroksidaza, dipeptil dipeptidaza i HBM-1 (Hector Batiffore mezotelial 1). Nedavna studija na 450 pacijenata potvrdila je petostruku učestanost malignih nodusa koji su bili pozitivni na galektin 3.(4) I BRAF mutacije su prisutne u 45-50% papilarnih karcinoma pri čemu je zajednička analiza galektina i BRAF mutacija na uzorcima punkcije koji su označeni kao citološki neodređeni pokazala značajnu učestanost preoperativnog otkrića malignih tiroidnih nodusa. Marker koji su od koristi u određivanju metastatskog potencijala tumora štitaste žlezde su CIKLIN D1, pozitivan kod karcinoma sa većim metastatskim potencijalom, P27 i P 21 gde je negativna reakcija kod karcinoma sa većim metastatskim potencijalom. Od bitnog značaja su i PAX-PPAR1 i mutacije RET/PTC. (5,6,7) Samom preoperativnom identifikacijom molekularnih markera nakon aspiracione biopsije isključuje se, ili potvrđuje postojanje tiroidnog karcinoma obzirom da je poslednje dve decenije utrostručen porast papilarnog karcinoma. Od izuzetnog su značaja i kod novootkrivenih nodusa kao i u neodređenim nalazima aspirata ili seruma ispitivanih pacijenta. Orlandi i saradnici u ponovljenim punkcijama nalaze saglasnost sa prvobitnom citopunkcijskom dijagnozom u 91 do 100%.(8) Hamburger saopštava da ponovljena punkcija potvrđuje prvu citološku dijagnozu u 91% slučajeva i zaključuje da validnost ponovnog nalaza opravdava upućivanje na hiruršku intervenciju.(9)

## **RADNA HIPOTEZA**

Ekspresija molekularnih markera poboljšava kvalitet citološke dijagnostike dobro diferentovanog karcinoma štitaste žlezde što se manifestuje manjim brojem lažno pozitivnih i lažno negativnih nalaza.

## **CILJEVI ISTRAŽIVANJA**

Obzirom na to da primarni cilj proizilazi iz radne hipoteze definisani su sledeći ciljevi:

1. Učestalost lažno pozitivnih i lažno negativnih nalaza u citološkoj dijagnostici aspiracione biopsije štitaste žlezde, primenom različitih markera
2. Poređenje dijagnostičkog kvaliteta novih markera i standardnih dijagnostičkih postupaka.
3. Određivanje optimalnog markera ili kombinacije markera za preoperativnu dijagnostiku dobro diferentovanog karcinoma štitaste žlezde.

## **MATERIJAL I METOD**

Ispitivanje će se sprovesti na Medicinskom fakultetu u Beogradu, Klinici za endokrinologiju, dijabetes i bolesti metabolizma sa pacijentima kod kojih je poremećena građa štitaste žlezde. Studijom će biti obuhvaćeno 300 pacijenata. Studija predviđa prospektivno praćenje i ispitivanje bolesnika u periodu od januara meseca 2012 godine do januara meseca 2014 godine na osnovu koga će se moći doneti validni teorijski i klinički zaključci.

Za obradu svakog bolesnika biće urađena detaljna anamneza, klinički pregled, laboratorijske analize sa tiroidnim statusom, ultrazvučni nalaz štitaste žlezde, aspiraciona punkcija pod kontrolom ultrazvuka i imunocitohemijska ispitivanja aspirata u cilju kasnije korelacije sa patohistološkim nalazom operisanih štitastih žlezda.

U toku studije bili bi ispitani bolesnici sa nodozno izmenjenom štitastom žlezdom, bolesnici koji su upućeni na operativno lečenje tiroidnih nodusa bez obzira na citološki nalaz, a nakon operativnog lečenja korelacija patohistološkog nalaza sa prethodno urađenom imunocitohemijskom analizom i citohemijskom analizom na patohistološkom nalazu. U ispitivanju bi bili uključeni i pacijenti kod kojih

je dijagnostikovao tiroidni karcinom, kao i pacijenti kod kojih postoji poremećaj u tiroidnoj funkciji.

Svim ispitanicima biće određeni tiroidni status ,trijodtironin (T3), tiroksin(T4), tireostimulirajući hormon (TSH), antitela na tiroidnu peroksidazu (anti TPO ab), antitela na tireoglobulin (anti Tg ab), tireoglobulin(Tg) i kalcitonin , urađen ultrazvuk štitaste žlezde, a nakon toga aspiraciona punkcija tankom iglom ( FNA-fine needle aspiration), citološka analiza aspirata i imunocitohemija.

Molekularni markeri koji će biti određivani su galektin 3, citokeratin i HBME-1(Hector Battifore mezotelial 1). Imunocitohemijska analiza nakon demaskiranja epitopa sprovodiće se korišćenjem primarnih monoklonskih antihumanih antitela Galektin 3, Hector Battifore mesothelial 1 i citokeratin.

Rezultati dobijeni ovim istraživanjem bili bi obrađeni odabranim statističkim metodama i testovima pregledno prikazani u obliku dijagrama i tabela iz kojih će se jasno izvući potrebni zaključci.

U analiziranju biće korišćeni sledeći testovi:

- a) Hi kvadrat test
- b) Test slaganja ( kappa)
- c) Studentov T test
- d) jednostruka i višestruka korelacija
- e) multipla regresiona analiza kojom je ispitivana međusobna povezanost i direktan uticaj više ispitivanih parametara.

## **PROCENA KANDIDATA O POTENCIJALNOM NAUČNOM DOPRINOSU**

Rezultati dobijeni ovim istraživanjem imaće značaj u definisanju prirode tiroidnih nodusa na osnovu analize citopatološkog nalaza i, sledstveno tome, mogućnost daljeg praćenja ili pravovremenog operativnog lečenja tiroidnih nodusa, u smislu rane detekcije tiroidnog karcinoma , a s druge strane smanjiti broj operacija, smanjiti broj operativnih komplikacija, smanjiti troškove lečenja, čime će rad pored teorijskog imati praktičnu i kliničku vrednost.

## REFERENCE

- 1.Trbojević B.:Tiroidna žlezda.Patofiziološke osnove i klinički pristup.Beograd,Zavod za udžbenike i nastavna sredstva 1998: 377-87.
- 2.Moterson J.D.,Woolner L.B.,Bennet W.A.:Gross and microscopic findings in clinically normal thyrod glands. J.Clin.Endocrinol.Metab.1955;15:1270.
- 3.Nikiforov Y.,Gnepp D.R.,Fagin J.A.:Thyroid lesions in children and adolescents after the Chernobil disaster :implications for the stady of radiation tumorogenesis.J.Clin .Endokrinol.Metab.1996;81:9.
- 4.Bartolazzi A,Orlandi F,Saggiorato E,Volante M,Arecco F,Rossetto R,Palestini N,Ghigo E,Papotti M,Bussolati G,Matregnai MP,Pantellini F,Carpi A,Giovagnoli MR ,Monti S,Toscano V,Sciacchitano S,Pennellini GM,Mian C,Pelizzo MR,Rugge M,Troncane G,Palombini L,Chiappetta G,Botti G,Vecchione A,Bellico R;Italian Thyroid Cancer Study group(ITCSG)Galektin -3-expression analysis in the surgical selection of follicular thyroid nodules with indeterminate fine –needle aspiration cytology : a prospective multicentre study.Lancet Oncol 2008,4;7(1) : 89.
- 5.Aherne ST,Smyth PC,Flavin RJ,Russell SM,Denning KM,Li J ,Guenther SM,O,leary JJ,Shels OM,geographical mapping of a multifocal thyroid tumour using genetic alteration analysis mRNA profiling.Mol. cancer.2008,4;7 (1):89.
- 6.Lee X,Gao M,Ji Y,Yu,Feng Y,Li Y,Zhang Y,Cheng W,Zhao W,Analysis of Diferental BRAF (V 600E)Mutational status in High Aggressive Papillary Thyroid Microcarcinoma .Ann Surg Oncol .2008,26 DOI .1245/s 10434-008-0233-3 E pub ahead of point.
- 7.Kebebew E,Weng J,Bauer J,Ranvier G,Clark OH,Duh QY,Shibru D,Bastian B,Griffin A.The prevalence and prognostic value od BRAF mutation in thyroid cancer. Ann-Surg .2007;246 (3):466-7
- 8.Orlandi A,Puscar A,Capirata E,Fideleff H 2005 repeated fine-needle aspiration of the thyroid in benign nodular thyroid disease:critical evaluation of long-term follow-up.Thyroid 15:274-278.
- 9.Hamburger JI 1987 Consistencu of sequential needle biopsy findings for thyroid nodules.Management implications.Arch Intern Med 147;97-99.