

Zakład Fizjologii Układu Krążenia
Katedra Fizjologii Doświadczalnej i Klinicznej UM

Analiza krążących kwasów nukleinowych w raku brodawkowym tarczycy

mgr Ewelina Perdas

promotor dr hab. n.med. prof.UM Maria Pawelska-Zubrzycka
promotor pomocniczy dr n.med. Robert Stawski

Uniwersytet Medyczny w Łodzi

Łódź, 2020

Streszczenie

Wstęp

Rak brodawkowaty tarczycy (ang. *papillary thyroid carcinoma*; PTC) jest najczęściej występującym nowotworem tarczycy. Choroba rozwija się między 30 a 50 rokiem życia. W przypadku wystąpienia nowotworu przed 45 rokiem życia rokowania są dobre, a ryzyko nawrotu choroby niewielkie. Diagnostyka zmian tarczycy oparta jest na biopsji aspiracyjnej cienkoigłowej, którą wykonuje się pod kontrolą ultrasonografii. W przypadku 25% guzków tarczycy nie można jednoznacznie postawić diagnozy na podstawie wyniku biopsji. Natomiast obecnie metodą rekomendowaną w leczeniu PTC jest całkowite usunięcie gruczołu tarczycy. W latach 1970-2015 odsetek raków brodawkowatych tarczycy wzrósł z 58% do 86%. Jednocześnie liczba tyreoidektomii wzrosła 2,5-krotnie. Natomiast około 70% do 80% tyreoidektomii okazuje się zmianami łagodnymi, które nie wymagają usunięcia tarczycy. Mimo to biopsja cienkoigłowa nadal pozostaje główną metodą oceny zmian tarczycy.

Analiza krążących we krwi kwasów nukleinowych w tym pozakomórkowego DNA (ang. *cell free DNA*; cf-DNA) i mikro RNA (miRNA) może stanowić nową, mało inwazyjną metodę diagnostyki PTC.

Materiał

Poziom cf-DNA i miRNA w osoczu oceniono u pacjentów przyjętych do Kliniki Chirurgii Ogólnej i Onkologicznej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi. Porównywano poziom cf-nDNA i cf-mtDNA w osoczu między grupą z PTC, a zdrową grupą kontrolną wykorzystując technikę PCR w czasie rzeczywistym. Natomiast poziom pięciu miRNA (*let-7a*, *let-7c*, *let-7d*, *let-7f* i *let-7i*) w osoczu porównano, między grupą z PTC, a zdrowymi osobami za pomocą ddPCR.

Wyniki

- Poziom cf-nDNA w grupie z PTC wyniósł 3 089 GE/ml natomiast w grupie kontrolnej 1 872 GE/ml.
- Poziom cf-mtDNA w grupie z PTC wyniósł 44 992 GE/ml natomiast w grupie kontrolnej 92 220 GE/ml.
- Poziom ekspresji dla *let-7a*, *let-7c*, *let-7d*, *let-7f* w grupie z PTC wyniósł odpowiednio 224 kopii/ μ l, 100 kopii/ μ l, 58 kopii/ μ l i 65 kopii/ μ l w porównaniu z grupą kontrolną w

której poziom dla let-7a wyniósł 55 kopii/ μ l, dla let-7c wyniósł, 38 kopii/ μ l, dla let-7d wyniósł 16 kopii/ μ l i dla let-7f wyniósł 18 kopii/ μ l.

- Analiza ROC wykazała wysoką czułość powyżej 70% dla let-7a i let-7d.
- Analiza ROC wykazała wysoką specyficzną cf-nDNA na poziomie 96%, i 80% dla cf-mtDNA.

Podsumowanie

Prowadzone przeze mnie badania przedstawiają po raz pierwszy dowody wskazujące na niższy poziom cf-mtDNA w osoczu w grupie pacjentów z PTC. Ponadto, zaobserwowany wzrost cf-nDNA w grupie chorych z PTC jest zgodny z poprzednimi doniesieniami innych autorów. Analiza miRNA wykazała nadekspresję w osoczu let-7a, let-7c, let-7d i let-7f w grupie z PTC. W związku z tym obie formy krążących kwasów nukleinowych mogą służyć jako biomarker diagnostyczny w PTC. Stosunkowo wysoka specyficznosc cf-DNA i czułość let-7a i let-7d pozwala na zmniejszenie liczby wykonania niepotrzebnych operacji. Dotychczasowe obserwacje wymagają jednak wykonania dalszych badań na większej liczbie pacjentów w celu potwierdzenia wyników i umożliwienia włączenia analizy krążących kwasów nukleinowych do rutynowego stosowania w testach diagnostycznych, a przez to zwiększenia skuteczności wykrywania raka brodawkowatego tarczycy.

Summary

Introduction

Papillary thyroid carcinoma (PTC) is the most common thyroid cancer. The disease develops between 30 and 50 years of age. If the tumor occurs before the age of 45, the prognosis is good and the risk of cancer recurrence is low. Diagnosis of thyroid lesions is based on a fine needle biopsy (FNB) which is performed under ultrasound control. FNB cannot establish a definitive diagnosis in 25% of thyroid nodules. However, currently the recommended method for treating PTC is radical resection of the thyroid gland. Between 1970 and 2015, the proportion of papillary thyroid cancers increased from 58.0% to 86%. At the same time, the number of total thyroidectomies, which are currently the recommended method of treatment, increased 2.5 times. Approximately 70% to 80% of thyroid lobectomies performed just for diagnostic purposes are benign. Furthermore, FNB still remains the main method of evaluation of thyroid nodules.

Analysis of circulating nucleic acids, including extracellular DNA (cf-DNA) and micro RNA (miRNA) may be a new, minimally invasive method of PTC diagnosis.

Materials

The level of cf-DNA and miRNAs in plasma was evaluated in patients admitted to the Department of General and Oncological Surgery of the Medical University of Lodz. The levels of cf-nDNA and cf-mtDNA in plasma between the PTC cases and healthy subjects have been compared by real-time PCR. The levels of five miRNAs (let-7a, let-7c, let-7d, let-7f, and let-7i) in plasma have been compared between the PTC cases and healthy subjects by ddPCR.

Results

- Level of cf-nDNA in the PTC group was 3 089 GE/ml while in the control group it was 1872 GE/ml.
- Level of cf-mtDNA in the PTC group was 44 992 GE/ml while in the control group it was 92 220 GE/ml.
- Let-7a, let-7c, let-7d, let-7f expression levels in the PTC group were 224 copies/ μ l, 100 copies/ μ l, 58 copies/ μ l and 65 copies/ μ l, respectively, in comparison with the control

group in which the level for let-7a was 55 copies μ l, for let-7c was 38 copies/ μ l, for let-7d was 16 copies/ μ l and for let-7f was 18 copies/ μ l.

- The ROC analysis showed that the specificity for cf-nDNA was 96% and for cf-mtDNA 80%.
- The ROC analysis showed that the sensitivity for let-7a and let-7d was above 70%

Conclusions

In summary, the study provided the first evidence for lower cf-mtDNA plasma levels in PTC patients. Furthermore, the finding that there was an increase cf-nDNA in patients is consistent with previous reports. The miRNA analysis showed overexpression in plasma let-7a, let-7c, let-7d and let-7f in the PTC group. Therefore, both forms of circulating nucleic acids can serve as a biomarker in the diagnosis of PTC. The relatively high specificity for cf-DNA and sensitivity for let-7a and let-7d allow to reduce the number of unnecessary operations. The previous observation, however, requires further studies on a larger group of patients that will enable the analysis of circulating nucleic acids for routine use in diagnostic assays, and the same improved efficiency of papillary thyroid carcinoma detection.