

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

<<ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ – ΜΟΡΙΑΚΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ, ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ>>

"ΜΟΡΙΑΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑΤΩΝ ΤΟΥ ΘΥΡΕΟΕΙΔΟΥΣ ΣΤΟΝ ΕΛΛΗΝΙΚΟ ΠΛΗΘΥΣΜΟ"



ΑΡΓΥΡΟΠΟΥΛΟΥ ΜΑΡΙΛΕΝΑ

2016

"Μοριακή ανάλυση καρκινωμάτων του θυρεοειδούς στον ελληνικό πληθυσμό"

"Molecular analysis of thyroid carcinomas in the Greek population"

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

1. Λιαδάκη Καλλιόπη – Επίκουρος Καθηγήτρια Βιοχημικής Φαρμακολογίας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας (επιβλέπουσα)
2. Μαμούρης Ζήσης, Καθηγητής Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
3. Σαραφίδου Θεολογία, Επίκουρος Καθηγήτρια Μοριακής Γενετικής Ζωικών Οργανισμών, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

• Περίληψη.....	5
• Abstract.....	6
A. Εισαγωγή7	
• 1. Θυρεοειδής αδέννας.....	7
• 2. Ορμόνες θυρεοειδούς αδέννα.....	9
• 3. Διαταραχή λειτουργίας του θυρεοειδούς αδέννα.....	10
• 4. Καρκίνος του θυρεοειδή.....	11
• 5. Ταξινόμηση καρκινωμάτων θυρεοειδούς.....	11
• 6. Θηλώδες καρκίνωμα.....	14
• 6.1. Ποικιλίες θηλώδους καρκινώματος.....	15
• 6.2. Θηλώδες μικροκαρκίνωμα.....	16
• 7. Θυλακιώδες καρκίνωμα.....	17
• 7.1. Hurthle cell νεόπλασμα.....	18
• 8. Μυελοειδές καρκίνωμα.....	19
• 9. Αναπλαστικό – αδιαφοροποίητο καρκίνωμα.....	21
• 10. Χαμηλής διαφοροποίησης καρκίνωμα.....	22
• 11. Επιδημιολογία.....	22
• 12. Γονίδιο BRAF.....	24
• 13. Γονίδιο RAS.....	26
• 14. Μοριακή διάγνωση καρκίνου θυρεοειδούς.....	27
• 15. Σκοπός εργασίας.....	32
B: Υλικά και μέθοδοι	
• 1. Δείγματα.....	33
• 2. Απομόνωση DNA από βιοψίες ασθενών.....	35
• 3.A. Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης.....	36
• 3.B. Real – Time PCR.....	38
• 3.Γ. Πειραματική διαδικασία.....	39
Γ: Αποτελέσματα.....	42
Δ: Συζήτηση.....	46
Ε. Βιβλιογραφία.....	48

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο καρκίνος του θυρεοειδούς είναι η πιο κοινή ενδοκρινική κακοήθεια και η συχνότητά του αυξάνεται σταθερά τις τελευταίες δεκαετίες. Σύμφωνα με ιστοπαθολογικά χαρακτηριστικά, κατατάσσεται σε πέντε βασικούς τύπους (θηλώδης, θυλακιώδης, μυελοειδής, αναπλαστικός και χαμηλής διαφοροποίησης), ενώ έχουν παρατηρηθεί και παραλλαγές αυτών, όπως ο θυλακιώδης υπότυπος του θηλώδους καρκίνου. Προηγούμενες έρευνες έχουν δείξει ότι μεταλλάξεις που οδηγούν στην ενεργοποίηση του μονοπατιού σήματος των MAP κινασών (RAS/RAF/MEK/ERK/MAPK) συναντώνται στους διαφορετικούς τύπους καρκινωμάτων του θυρεοειδούς. Αυτές περιλαμβάνουν τη μετάλλαξη του γονιδίου BRAF στο κωδικόνιο 600, τις μεταλλάξεις των γονιδίων RAS (HRAS, KRAS και NRAS) στα κωδικόνια 12, 13 και 61, καθώς και τις μετατοπίσεις RET/PTC και PAX8/PPAR γ . Στο πλαίσιο μιας ευρύτερης έρευνας για τη μοριακή παθογένεση του καρκίνου του θυρεοειδούς αδένα στον ελληνικό πληθυσμό στόχος της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη των γονιδίων KRAS και BRAF σε ένα αντιπροσωπευτικό δείγμα καρκινωμάτων του θυρεοειδούς. Συγκεκριμένα, η μελέτη αυτή πραγματοποιήθηκε σε 31 ασθενείς που διαγνώστηκαν με καρκίνο του θυρεοειδούς μεταξύ του 2006 και 2015. Τα περιστατικά αφορούσαν σε 23 θηλώδη, 5 θυλακιώδη, 2 μυελοειδή και 1 χαμηλής διαφοροποίησης καρκινώματα θυρεοειδούς. Πραγματοποιήθηκε απομόνωση του DNA από τα δείγματα που ήταν εγκλεισμένα σε block παραφίνης, και χρησιμοποιήθηκε η διαδικασία της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης ποσοτικού χρόνου (Real – Time PCR) για την ανίχνευση της μετάλλαξης του γονιδίου BRAF (V600E) και έντεκα μεταλλάξεων για το γονίδιο KRAS: 12 (CGT), 12 (TGT), 12 (AGT), 12 (GTT), 12 (GCT), 12 (GAT), KRAS 13 (GAC), και KRAS 61 (CGA), 61 (CAC), 61 (CAT), 61 (CTA). Η μελέτη δεν ταυτοποίησε κανένα θετικό δείγμα για τις μεταλλάξεις του KRAS ενώ κατέδειξε μόνο ένα θετικό δείγμα με μετάλλαξη BRAF (V600E) σε δείγμα ασθενούς με θηλώδες καρκίνωμα με θυλακιώδη διαμόρφωση, σε ποσοστό που αντιστοιχεί στο 4,3% επί του συνόλου των θηλωδών καρκινωμάτων που μελετήθηκαν. Καθώς ο αριθμός των δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία είναι αντιπροσωπευτικός αλλά μικρός, τα χαμηλά ποσοστά των μεταλλάξεων που ταυτοποιήθηκαν σε σχέση με την παγκόσμια βιβλιογραφία είναι αναγκαίο να επιβεβαιωθούν σε μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων γιατί υποδηλώνουν ότι πιθανώς να υπάρχουν διαφορές στη μοριακή διάγνωση του καρκίνου του θυρεοειδούς στον Ελληνικό πληθυσμό, οι οποίες πρέπει να λαμβάνονται υπόψη όσον αφορά στην μελέτη της παθογένειας, στην εξέλιξη και τη θεραπευτική αντιμετώπισή τους.

SUMMARY

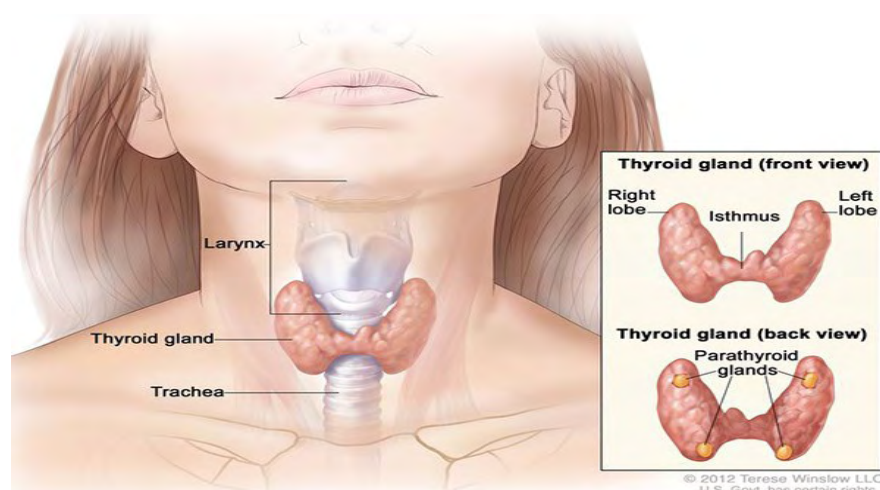
Thyroid cancer is the most common type of endocrine malignancy and its frequency is increasing steadily in recent decades. According to histopathological characteristics, thyroid tumors are classified into five basic types (papillary, follicular, medullary, anaplastic and poorly differentiated), while additional variants exist between these major types, like the follicular variant of papillary cancer. Previous studies have shown that mutations leading to the activation of the MAP kinase signal pathway (RAS/RAF/MEK/ERK/MAPK) have been detected in different types of thyroid tumors. These include point mutations of the BRAF gene (codon 600), point mutations of the RAS (HRAS, KRAS and NRAS) genes (codons 12, 13 and 61), and the genetic rearrangements of RET / PTC and PAX8 / PPAR. In an effort to identify the molecular pathogenesis of thyroid cancer in the Greek population, the aim of the present work was to study the KRAS and BRAF genetic alterations in a representative sample of thyroid carcinomas. The study was performed on 31 patients diagnosed with thyroid cancer between the years of 2006 and 2015. The incidents involved 23 papillary, 5 follicular, 2 medullary and 1 poorly differentiated thyroid carcinoma. Following the isolation of genomic DNA from paraffin-embedded tissue biopsies, real-time polymerase chain reaction (PCR) was used in order to detect the mutation V600E of the BRAF gene and eleven mutations of the KRAS gene: 12 (CGT), 12 (TGT), 12 (AGT), 12 (GTT), 12 (GCT), 12 (GAT), KRAS 13 (GAC), and KRAS 61 (CGA), 61 (CAC), 61 (CAT), 61 (CTA). The study did not identify any samples carrying mutations in the KRAS gene, but identified one patient with papillary carcinoma of follicular subtype harboring the BRAF V600E mutation (yielding a 4,3% prevalence). Although the sample number used in this study is relatively small, therefore our results need to be confirmed in a larger population, the significantly low percentage of *BRAF* mutations point to the conclusion that the molecular alterations leading to thyroid cancer in the Greek population may differ compared to those previously reported, and this consideration should be taken into account regarding the pathogenesis, progression and treatment of thyroid cancer.

A: ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. ΘΥΡΕΟΕΙΔΗΣ ΑΔΕΝΑΣ

Ο θυρεοειδής αδένας ανήκει στο ενδοκρινικό σύστημα. Το ενδοκρινικό σύστημα αποτελείται από τις ωθήκες, τους όρχεις, τα επινεφρίδια, το πάγκρεας, τους παραθυρεοειδείς αδένες, την υπόφυση και τον υποθάλαμο. Οι αδένες αυτοί εκκρίνουν ουσίες, τις ορμόνες, οι οποίες ελέγχουν και συντονίζουν άλλες λειτουργίες του οργανισμού.

Ο θυρεοειδής αδένας βρίσκεται στο πρόσθιο πλάγιο τμήμα του τραχήλου, κάτω από το υοειδές οστόν, μπροστά από τον κρικοειδή χόνδρο του λάρυγγα. Έχει ερυθρόφαιη χροιά, μαλακή σύσταση, με βάρος 15-40 γραμμάρια στους ενήλικες και αποτελείται από δυο λοβούς οι οποίοι ενώνονται μεταξύ τους με τον ισθμό (προκύπτει σχήμα πεταλούδας). Μερικές φορές από τον ισθμό εκπορεύεται προς τα πάνω ένας τρίτος μικρός λοβός, ο πυραμοειδής.



Εικόνα 1. Η θέση του θυρεοειδούς αδένος στο σώμα (από την ιστοσελίδα http://www.thyroiduk.org.uk/tuk/about_the_thyroid/thyroid_overview.html).

Ο θυρεοειδής αδένας περιβάλλεται από λεπτό, ινώδη χιτώνα συνδετικού ιστού και καλύπτεται από ψευδοκάψα προερχόμενη από έλυτρο της προτραχειακής περιτονίας. Ιδιαίτερη ανατομική αξία έχει η πίσω επιφάνεια του θυρεοειδούς, στην οποία βρίσκονται οι παραθυρεοειδείς αδένες και από την οποία εισέρχονται στον αδένος τα κυριότερα αγγεία και νεύρα του.

Η πλούσια αγγείωση του θυρεοειδούς οφείλεται στις δυο άνω θυρεοειδικές αρτηρίες που προέρχονται από την έξω καρωτίδα, στις δύο κάτω θυρεοειδικές αρτηρίες που προέρχονται από τη σπονδυλική στήλη και στη μέση θυρεοειδική

αρτηρία που εκφύεται από την αορτή και καταλήγει στον ισθμό του θυρεοειδούς. Η πλούσια αιμάτωση του θυρεοειδούς του εξασφαλίζει πλούσια παροχή αίματος, περίπου 4-6 ml/min/γραμμάριο ιστού (Καμμάς Α., 2006).

Οι φλέβες που επάγουν το αίμα από τον αδένα είναι οι άνω και οι μέσες θυρεοειδικές που εκβάλλουν στην έσω σφαγίτιδα και οι κάτω θυρεοειδικές που εκβάλλουν στις ανώνυμες φλέβες.

Η νεύρωση του αδένα πραγματοποιείται από ίνες του συμπαθητικού και παρασυμπαθητικού συστήματος.

Ιστολογικά ο θυρεοειδής αποτελείται από κλειστά θυλάκια (follicles) με θυλακιώδη επιθηλιακά κύτταρα, το μέγεθος των οποίων ποικίλλει σημαντικά, με μέση διάμετρο 200 μm. Το τοίχωμα των θυλακίων σχηματίζεται από κυβοειδή κύτταρα. Το περιεχόμενο των θυλακίων, προϊόν έκκρισης των κυττάρων του, είναι μια κολλοειδής ουσία, το κολλοειδές, το οποίο περιέχει τις θυρεοειδικές ορμόνες υπό τη μορφή της θυρεοσφαιρίνης. Ανάλογα με τη δραστηριότητα του αδένα τα θυλάκια μπορεί να είναι είτε μικρά είτε πλατιά και κοντά.

Ανάμεσα στα θυλάκια βρίσκεται και ένα άλλο είδος κυττάρων που ονομάζονται κύτταρα C (C-cells) ή παραθυλακιώδη κύτταρα και τα οποία παράγουν την ορμόνη καλσιτονίνη. Τα κύτταρα C έχουν μεγάλο μέγεθος, βρίσκονται στη βασική στιβάδα και δεν επικοινωνούν με την κοιλότητα του κυστιδίου. Στις μεγαλύτερες ηλικίες τα κύτταρα αυτά αυξάνονται και ίσως σχηματίζουν μικρά οζίδια.



Εικόνα 2: Φυσιολογικός θυρεοειδής αδένας, με θυλακιώδη επιθηλιακά κύτταρα.

2. ΟΡΜΟΝΕΣ ΘΥΡΕΟΕΙΔΟΥΣ ΑΔΕΝΑ

Οι θυρεοειδικές ορμόνες παράγονται από τα θυλακιώδη κύτταρα και είναι δύο, η θυροξίνη (T4) και η τριιωδοθυρονίνη (T3). Πρόκειται για ιωδιωμένα παράγωγα του αμινοξέως τυροσίνη. Η T4 έχει τέσσερα άτομα ιωδίου ενώ η T3 έχει τρία άτομα στο μόριο της. Οι δράσεις τους ποιοτικά είναι οι ίδιες, όμως διαφέρουν από πλευρά ταχύτητας και έντασης δράσης. Η T3 είναι περίπου 4 φορές γρηγορότερη και 2-4 φορές ισχυρότερη της T4.

Κεντρική θέση στη σύνθεση των θυρεοειδικών ορμονών έχει το ιώδιο, το οποίο προσλαμβάνεται από τις τροφές (δημητριακά, ψωμί, αλάτι, θαλασσινά κλπ.) και μεταφέρεται με το αίμα, συνδεδεμένο με πρωτεΐνες, στο θυρεοειδή αδένα. Εκεί το ιώδιο προσλαμβάνεται με ενεργητικό μηχανισμό (κατανάλωση ATP) σαν ιόν ιωδίου και συσσωρεύεται στα κύτταρα των θυλακίων σε ποσότητα περίπου 25 φορές μεγαλύτερη από το πλάσμα. Την πρόσληψη ιόντων ιωδίου προάγει η θυρεοειδοτρόπος ορμόνη (TSH), η οποία παράγεται στην υπόφυση (ενδοκρινής αδένας στη βάση του εγκεφάλου).

Η βιοσύνθεση και η έκκριση των T3 και T4 ελέγχεται από ένα σύνθετο ρυθμιστικό κύκλωμα στο οποίο μετέχουν υποφυσιοτρόπα κέντρα του υποθαλάμου, ο πρόσθιος λοβός της υπόφυσης και οι ίδιες οι ορμόνες T3 και T4. Η TSH προάγει τη πρόσληψη ιωδίου από τον θυρεοειδή αδένα όσο και την βιοσύνθεση και την έκκριση των ορμονών T3 και T4 στο αίμα. Η έκκριση της ίδιας της TSH επηρεάζεται από τις τελικές ορμόνες T3-T4 και από τις ορμόνες του υποθαλάμου. Υψηλές τιμές T3-T4 στο αίμα δρουν ανασταλτικά στην παραγωγή TSH. Το ψύχος και οι διάφορες συναισθηματικές καταστάσεις επηρεάζουν τη λειτουργία του θυρεοειδούς μέσω του υποθαλάμου.

Οι ορμόνες T3 και T4 ασκούν δυο κυρίως δράσεις στον οργανισμό:

- Αυξάνουν τον γενικό μεταβολισμό πολλών ιστών του οργανισμού
- Προάγουν, κατά την εμβρυική ζωή και παιδική ηλικία την ανάπτυξη, διαφοροποίηση και την ωρίμανση του εγκεφάλου και των οστών.

Η μεγάλη σημασία των θυρεοειδικών ορμονών για την ανάπτυξη φαίνεται στις περιπτώσεις υπολειτουργίας του αδένα λόγω μεγάλης έλλειψης ιωδίου κατά την εμβρυική ζωή. Προκαλούνται διάφορες νευρολογικές διαταραχές, διανοητική καθυστέρηση και σαφής καθυστέρηση της σωματικής ανάπτυξης.

Η βασικότερη δράση των T3 και T4 στον μεταβολισμό είναι η αύξηση της κατανάλωσης O₂ και της παραγωγής θερμότητας σε όλα τα αερόβια όργανα του σώματος. Ακόμη οι θυρεοειδικές ορμόνες επηρεάζουν την δραστηριότητα διαφόρων άλλων ορμονών, κυρίως αυτών που μετέχουν στη ρύθμιση του μεταβολισμού όπως κατεχολαμίνες, ινσουλίνη, γλυκαγόνη και γλυκο-κορτικοειδή (Κανέλλος Ε., 1996).

3. ΔΙΑΤΑΡΑΧΕΣ ΤΗΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ ΤΟΥ ΘΥΡΕΟΕΙΔΟΥΣ ΑΔΕΝΑ

Υπολογίζεται ότι το 12% των αμερικανών πολιτών θα αναπτύξουν κάποια πάθηση στο θυρεοειδή αδένα σε κάποια φάση της ζωής τους. Επίσης έχει δειχθεί ότι το 60% αυτών που πάσχουν από κάποια ασθένεια του θυρεοειδούς δεν το γνωρίζουν. Ωστόσο οι μη διαγνωσμένες παθήσεις του αδένα μπορεί να οδηγήσουν σε σοβαρότερες παθήσεις, όπως είναι τα καρδιαγγειακά νοήματα, οστεοπόρωση ή και στειρότητα. Σοβαρές παρενέργειες μη διαγνωσμένων παθήσεων του θυρεοειδούς – κυρίως υποθυρεοειδισμός- εμφανίζονται σε έγκυες γυναίκες οι οποίες κινδυνεύουν από πρόωρο τοκετό, αποβολή ή και ακόμα από προβλήματα ανάπτυξης του παιδιού. Οι χρόνιες παθήσεις του θυρεοειδούς μπορούν να ρυθμιστούν με τη σωστή φαρμακευτική αγωγή και έτσι να είναι ελεγχόμενες χρόνιες νόσοι, χωρίς να προκαλούν προβλήματα στη καθημερινότητα των ασθενών. Οι διάφορες παθολογικές καταστάσεις του θυρεοειδούς είναι πιθανό να συνοδεύονται από συμπτώματα ενδοκρινικής υπερλειτουργίας ή υπολειτουργίας.

1. Κάθε διόγκωση του αδένα, ανεξάρτητα από τη λειτουργικότητα του, ονομάζεται βρογχοκήλη. Εάν η λειτουργία του είναι φυσιολογική πρόκειται για απλή βρογχοκήλη. Η πιο συνηθισμένη μορφή βρογχοκήλης είναι η ενδημική που οφείλεται σε έλλειψη ιωδίου ή σε αδυναμία χρησιμοποίησής του.
2. Υπερθυρεοειδισμός : πρόκειται για παθολογική κατάσταση που χαρακτηρίζεται από υπερλειτουργία του αδένα με αυξημένη παραγωγή των ορμονών T3 και T4. Διακρίνεται σε:
 - i) Πρωτοπαθή υπερθυρεοειδισμό, όταν ο ίδιος ο θυρεοειδής αδένας ευθύνεται για την υπερπαραγωγή των ορμονών του, ανεξάρτητα από την TSH. Η αυξημένη παραγωγή των T3 και T4 μπορεί να οφείλεται σε όγκο του θυρεοειδούς (αδένωμα) ή σε όλο το διογκωμένο αδένα (νόσος Graves-Basedow). Η νόσος Graves είναι μια αυτοάνοση πάθηση που εμφανίζεται περίπου στο 1% του πληθυσμού.
 - ii) Δευτεροπαθής υπερθυρεοειδισμός, όταν η υπερλειτουργία του αδένα οφείλεται σε υπερπαραγωγή της TSH από την υπόφυση.
3. Υποθυρεοειδισμός: πρόκειται για καταστάσεις που χαρακτηρίζονται από μειωμένη παραγωγή ή έλλειψη των T3 και T4 και συνεπώς υπολειτουργία του αδένα. Η υπολειτουργία συχνά συνυπάρχει με βρογχοκήλη. Ο υποθυρεοειδισμός μπορεί να οφείλεται σε καταστροφή του αδένα από ακτινοβολία, χειρουργική αφαίρεση ή καταστροφή του από άλλα νοσήματα.

Ειδικές περιπτώσεις υπερθυρεοειδισμού ή υποθυρεοειδισμού μπορούν να εμφανιστούν τόσο σε καλοήθη όσο και σε κακοήθη νοσήματα. Στα κακοήθη νοσήματα ανήκουν οι νεοπλασίες. Στα καλοήθη νοσήματα του αδένα ανήκουν οι διάφοροι τύποι βρογχοκήλης, η θυρεοειδίτιδα Hashimoto, η αυτοάνοση θυρεοειδίτιδα, η νόσος Graves και άλλα πιο σπάνια σύνδρομα (Κανέλλος Ε., 1996).

4. ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΘΥΡΕΟΕΙΔΟΥΣ

Ο καρκίνος του θυρεοειδούς είναι η πιο συχνή κακοήθεια που αφορά το ενδοκρινικό σύστημα και αντιστοιχεί περίπου στο 90% των περιπτώσεων κακοήθειας των ενδοκρινών αδένων. Ωστόσο, ο καρκίνος αυτός αντιστοιχεί σε ποσοστό κάτω του 1% των θανάτων που οφείλονται στο καρκίνο στο γενικό πληθυσμό. Επίσης μόνο το 10% των ασθενών που θα νοσήσουν από καρκίνο του θυρεοειδούς θα καταλήξουν από την ασθένεια αυτή. Σύμφωνα με νεώτερη έρευνα η 10ετής επιβίωση των ασθενών διαμορφώνεται ως εξής: 98% για θηλώδες καρκίνωμα, 92% για θυλακιώδες καρκίνωμα, 80% για μυελοειδές καρκίνωμα και 13 % για αδιαφοροποίητο καρκίνωμα.

Ο καρκίνος έχει συχνή εμφάνιση και σε παιδιά με το θηλώδες καρκίνωμα να είναι ο πιο συχνός τύπος. Ένας από τους βασικότερους παράγοντες ανάπτυξης καρκίνου σε παιδιά είναι η έκθεση τους στο πυρηνικό ατύχημα του Chernobyl το 1986. Στα παιδιά ο καρκίνος αυτός είναι πιο επιθετικός σε σχέση με τους ενήλικες και δίνει πιο συχνά απομακρυσμένες μεταστάσεις. Ωστόσο ακόμα και σε αυτή τη περίπτωση η θνησιμότητα είναι της τάξεως μόλις του 2,6 % (Fletcher C.D.M.,2013).

Τα κριτήρια TNM για την κλινικοπαθολογοανατομική σταδιοποίηση του όγκου, που εγκρίθηκαν από τη Διεθνή Ένωση κατά του καρκίνου (UICC) και την Αμερικάνικη Επιτροπή για τον καρκίνο (AJCC), βασίζονται στη διάμετρο του μεγαλύτερου όγκου (T) και στην ύπαρξη ή μη εξωθυρεοειδικής προσβολής, στη διήθηση ή μη των λεμφαδένων (N) και σε τυχόν απομακρυσμένες μεταστάσεις (M) που θα έχει δώσει. (Sobin L.H. et al, 2009,).

5. ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑΤΩΝ ΘΥΡΕΟΕΙΔΟΥΣ

Τα καρκινώματα του θυρεοειδούς ταξινομούνται με βάση τα κριτήρια TNM, του 2009, στα εξής

- Πρωτοπαθής όγκος (T)

Οι πολυεστιακοί όγκοι σταδιοποιούνται βάση της μεγαλύτερης διαμέτρου του μεγαλύτερου όγκου.

TX = Ο πρωτοπαθής όγκος δεν μπορεί να αξιολογηθεί.

T0 = Δεν υπάρχουν ενδείξεις του πρωτοπαθή όγκου.

T1 = Όγκος ≤ 2 εκ, περιορισμένος εντός του θυρεοειδή.

T1a = Όγκος ≤ 1 εκ.

T1b = Όγκος > 1 εκ. αλλά ≤ 2 εκ.

T2 = Όγκος > 2 εκ. αλλά ≤ 4 εκ, περιορισμένος εντός του θυρεοειδή.

T3 = Όγκος > 4 εκ. εντός του θυρεοειδή ή όγκος οποιουδήποτε μεγέθους με ελάχιστη εξωθυρεοειδική επέκταση.

T4a = Όγκος οποιουδήποτε μεγέθους με επέκταση εκτός της θυρεοειδικής κάψας και να εισβάλει υποδόρια στους ιστούς, λάρυγγα, τράχηλο, οισοφάγο ή στο λαρυγγικό νεύρο.

T4b = Όγκος που εισβάλει ή στα αγγεία ή στη καρωτιδική αρτηρία.

Όλοι τα αδιαφοροποίητα (αναπλαστικά) καρκινώματα θεωρούνται ως στάδιο T4:

T4a = Όγκος οποιουδήποτε μεγέθους εντός του θυρεοειδή.

T4b = Όγκος οποιουδήποτε μεγέθους εκτός της θυρεοειδικής κάψας.

▪ Επιχώριοι λεμφαδένες (N)

NX = Επιχώριοι λεμφαδένες δεν μπορούν να αξιολογηθούν.

N0 = Δεν υπάρχει μετάσταση στους λεμφαδένες.

N1= Ύπαρξη μεταστάσεων στους λεμφαδένες

N1a= Μετάσταση στο επίπεδο VI (προτραχηλικούς, παρατραχηλικούς και προλαρυγγικούς λεμφαδένες).

N1b= Μετάσταση σε μονήρη, διμερείς ή ετερόπλευρους τραχηλικούς ανώτερους / μεσοθωράκιους λεμφαδένες.

▪ Απομακρυσμένες μεταστάσεις (M)

MX = Απομακρυσμένες μεταστάσεις δεν μπορούν να αξιολογηθούν.

M0 = Δεν ανευρίσκονται απομακρυσμένες μεταστάσεις.

M1= Ανευρίσκονται απομακρυσμένες μεταστάσεις.

Σταδιοποίηση των καρκινωμάτων του θυρεοειδούς

• ΘΗΛΩΔΕΣ Ή ΘΥΛΑΚΙΩΔΕΣ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑ

ΣΤΑΔΙΟ	<45 ΕΤΩΝ	≥45 ΕΤΩΝ
I	Κάθε T, κάθε N, M0	T1,N0,M0
II	Κάθε T, κάθε N, M1	T2,N0,M0
III	-----	T3,N0,M0 T1/T2/T3,N1a,M0
IV A	-----	T4a, κάθε N, M0 T1/T2/T3, N1b, M0
IV B	-----	T4b, κάθε N, M0
IV C	-----	Κάθε T, κάθε N, M1

- ΜΥΕΛΟΕΙΔΕΣ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑ

ΣΤΑΔΙΟ	
I	T1, N0, M0
II	T2, N0, M0
III	T3, N0, M0 T1/T2/T3, N1a, M0
IV A	T4a, κάθε N, M0 T1/T2/T3, N1b, M0
IV B	T4b, κάθε N, M0
IV C	Κάθε T, κάθε N, M1

- ΑΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΤΟ – ΑΝΑΠΛΑΣΤΙΚΟ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑ

Όλες οι περιπτώσεις του τύπου αυτού θεωρούνται στάδιο IV

ΣΤΑΔΙΟ	
IV A	T4a, κάθε N, M0
IV B	T4b, κάθε N, M0
IV C	Κάθε T, κάθε N, M1

Η πλειοψηφία των περιπτώσεων του καρκίνου αφορούν σε καλά διαφοροποιημένα καρκινώματα που προέρχονται από τα θυλακιώδη κύτταρα. Έτσι ο καρκίνος του θυρεοειδούς ταξινομείται στις εξής κατηγορίες :

1. Διαφοροποιημένα καρκινώματα
 - i) Θηλώδες καρκίνωμα
 - i) Θηλώδες καρκίνωμα με θυλακιώδη διαμόρφωση
 - ii) Καρκίνωμα εκ των κυττάρων Hürthle (Hürthle cell carcinoma)
 - ii) Θυλακιώδες καρκίνωμα
2. Αναπλαστικά – Αδιαφοροποίητα καρκινώματα
3. Μυελοειδή καρκινώματα (προέρχονται από τα παραθυλακιώδη κύτταρα)
4. Χαμηλής διαφοροποίησης καρκινώματα

Η ταξινόμηση αυτή γίνεται με βάση την ιστολογική τους εικόνα, κλινικά και μορφολογικά χαρακτηριστικά και επιβεβαιώνεται με ανοσοϊστοχημικές χρώσεις και μοριακές τεχνικές.

Πίνακας 1: Συχνότητα εμφάνισης των κυριότερων κακοηθειών του θυρεοειδούς.

ΤΥΠΟΣ ΚΑΡΚΙΝΟΥ	ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ ΕΜΦΑΝΙΣΗΣ
Θηλώδης	80-85%
Θυλακιώδης	5-10%
Μυελοειδές	2-4%
Αδιαφοροποίητος – Αναπλαστικός	2-5%
Χαμηλής διαφοροποίησης	2-7%

6. ΘΗΛΩΔΕΣ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑ

Το θηλώδες καρκίνωμα (Papillary thyroid cancer, PTC) είναι ο πιο κοινός ιστολογικός τύπος του καρκίνου, και ο πιο κοινός τύπος από τα καλά διαφοροποιημένα καρκινώματα, που αντιστοιχεί στο 80% των κακοηθειών και προέρχεται από τα θυλακιώδη κύτταρα. Εμφανίζεται συχνότερα στις γυναίκες απ'ότι στους άντρες και συνήθως πριν την ηλικία των 45 ετών. Τα τελευταία χρόνια η μέση ηλικία εμφάνισης έχει αυξηθεί ενώ το μέσο μέγεθος του όγκου έχει μειωθεί. Η εμφάνιση του σχετίζεται με προηγούμενη έκθεση σε ακτινοβολία είτε αυτή είναι για θεραπευτικούς σκοπούς είτε τυχαία (π.χ. ατύχημα του Τσέρνομπιλ). Επίσης, η ύπαρξη θυρεοειδίτιδας Hashimoto αλλά και κάποιων ακόμα συνδρόμων αυξάνει τον κίνδυνο εμφάνισης του θηλώδους καρκινώματος.

Το θηλώδες καρκίνωμα αρχικά εμφανίζεται σαν μια διόγκωση (ακανόνιστη στερεά ή κυστική μάζα) στη πρόσθια τραχηλική χώρα, η οποία όμως είναι ανώδυνη κατά τη ψηλάφηση. Τις περισσότερες φορές η διόγκωση αυτή οφείλεται σε έναν μονήρη όζο και ο ασθενής είναι ασυμπτωματικός (Ανθούλη – Αναγνωστοπούλου Φ., 2009).

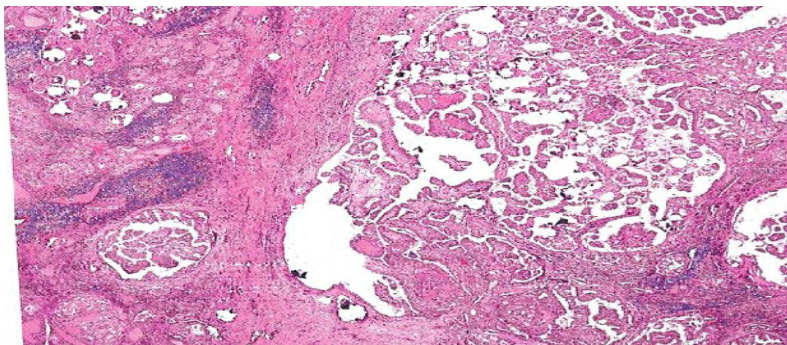
Αν και το θηλώδες καρκίνωμα είναι ένα καλά διαφοροποιημένο καρκίνωμα, ωστόσο οι όγκοι αυτοί μπορούν εύκολα να εξαπλωθούν στα υπόλοιπα όργανα. Το θηλώδες καρκίνωμα δίνει συχνά λεμφογενείς μεταστάσεις, κυρίως στους επιχώριους τραχηλικούς λεμφαδένες ενώ σπάνια δίνει μεταστάσεις δια μέσου των αιμοφόρων αγγείων.

Το θηλώδες καρκίνωμα γενικά έχει άριστη πρόγνωση και πλήρη ίαση καθώς οι όγκοι αναπτύσσονται πολύ αργά και συνήθως είναι αποτέλεσμα μακροχρόνιας αύξησης του αρχικού όζου ώστε να γίνει ψηλαφητός και να ξεκινήσει η διαδικασία ολοκληρωμένης διάγνωσης. Έτσι λοιπόν το 90% των ασθενών έχουν δεκαετή επιβίωση. Από αυτούς περίπου το 15% έχουν υποτροπή της νόσου αλλά μετά τη δεκαετία και από αυτούς μόνο το 5% πεθαίνει από τη συγκεκριμένη νόσο. Το ποσοστό της δεκαετούς επιβίωσης αγγίζει το 100% για ασθενείς νεαρής ηλικίας με ελάχιστες ή καθόλου μεταστάσεις. Άλλωστε ο καρκίνος αυτός πολύ σπάνια δίνει απομακρυσμένες μεταστάσεις όπως σε πνεύμονες ή οστά, και εκτιμάται ότι μόνο ένα 9-14% των ασθενών θα τις εμφανίσουν. Οι μεταστάσεις φαίνεται πως είναι μια συνάρτηση με το πρωταρχικό μέγεθος του όγκου, έτσι όγκοι μεγαλύτεροι των 5 εκ. εντάσσονται στην ομάδα υψηλού κινδύνου ακόμα και για απομακρυσμένες μεταστάσεις.

Η πρόγνωση για το θηλώδες καρκίνωμα σχετίζεται με την ηλικία, το φύλο και τη σταδιοποίηση του όγκου. Η πρόγνωση είναι καλύτερη στις γυναίκες και ιδίως κάτω των 40 ετών. Επίσης ένα θετικό χαρακτηριστικό για την έκβαση της νόσου είναι το

γεγονός ότι ο όγκος δεν διασπά τη θυρεοειδική κάψα, αν και το γεγονός αυτό ελάχιστα θα επηρεάσει το προσδόκιμο επιβίωσης.

Η θεραπεία του θηλώδους καρκινώματος είναι η ολική θυρεοειδεκτομή ιδίως σε περιπτώσεις πολυεστιακού καρκίνου. Επίσης σαν θεραπεία προτείνεται και η ολική λοβεκτομή αλλά και η ημιθυρεοειδεκτομή. Η χορήγηση ραδιενεργού ιωδίου αλλά και θυροξίνης είναι επιβεβλημένη σε ασθενείς υψηλού κινδύνου (Fletcher



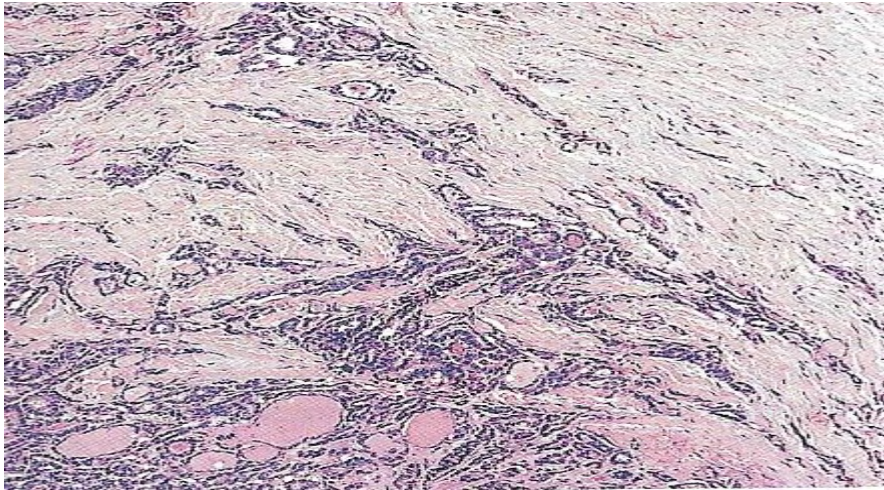
C.D.M.,2013).

Εικόνα 3 : Θηλώδες καρκίνος του θυρεοειδούς.

6.1. ΠΟΙΚΙΛΙΕΣ ΘΗΛΩΔΟΥΣ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑΤΟΣ ΘΥΡΕΟΕΙΔΟΥΣ

Στο θηλώδες καρκίνωμα του θυρεοειδούς έχουν αναγνωριστεί διάφορες ποικιλίες οι οποίες όμως δεν αποκλείουν η μια την ύπαρξη της άλλης και αυτό γιατί τα μορφολογικά χαρακτηριστικά του όγκου μπορεί να ταιριάζουν σε περισσότερους του ενός τύπου. Είναι ποικιλίες που έχουν ελάχιστη σημασία για τη πρόγνωση της νόσου.

Η πιο κοινή ποικιλία είναι αυτή του θηλώδους καρκινώματος με θυλακιώδη διαμόρφωση. Αποτελεί περίπου το 10% των περιπτώσεων του θηλώδους καρκινώματος. Ο όγκος αποτελείται από θυλακιώδη κύτταρα που έχουν ποικιλία σχημάτων και μεγέθους. Τα κύτταρα αυτά είναι τα τυπικά στα θυλακιώδη καρκινώματα έτσι η τελική διάγνωση βασίζεται στα τυπικά πυρηνικά χαρακτηριστικά που έχει το θηλώδες καρκίνωμα και εμφανίζονται και σε αυτή τη ποικιλία όγκων. Ο τύπος αυτός του θηλώδους καρκινώματος στην ουσία περιέχει δύο άλλους υπότυπους, τον διηθητικό τύπο (infiltrative) και τον εγκλεισμένο σε κάψα (encapsulated). Ο πρώτος διηθεί το θυρεοειδικό παρέγχυμα και έχει κλινικά, μορφολογικά και βιολογικά χαρακτηριστικά ίδια με τον βασικό τύπο του θηλώδους καρκινώματος. Ο δεύτερος τύπος όγκου περιβάλλεται από μια κάψα την οποία είτε διηθεί είτε όχι όπως και τα αγγεία. Τα κλινικά, παθολογικά και μοριακά χαρακτηριστικά του είναι πιο κοινά με αυτά του κοινού θυλακιώδους αδενώματος ή καρκινώματος.



Εικόνα 4: Θηλώδες καρκίνωμα με θυλακιώδη διαμόρφωση

Οι περισσότερες από τις υπόλοιπες ποικιλίες θηλώδους καρκινώματος είναι αρκετά σπάνιες και δύσκολες στη διάγνωσή τους. Ωστόσο είναι πολύ πιο επιθετικές με αποτέλεσμα και η θεραπεία των ασθενών να είναι πιο επιθετική απ'ότι στον απλό τύπο (Chen K. T. et al., 1977).

6.2. ΘΗΛΩΔΗ ΜΙΚΡΟΚΑΡΚΙΝΩΜΑΤΑ ΤΟΥ ΘΥΡΕΟΕΙΔΟΥΣ

Τα θηλώδη μικροκαρκινώματα (occult papillary carcinoma or papillary microcarcinoma) του θυρεοειδούς είναι όγκοι διαμέτρου 1 εκ. ή και λιγότερο. Το 2004 ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (Π.Ο.Υ./WHO) έκανε αυστηρότερη την κατάταξη του ώστε με τον όρο θηλώδη μικροκαρκινώματα (papillary microcarcinoma) να περιλαμβάνονται μόνο οι τυχαία ανευρεθέντες όγκοι με διάμετρο μικρότερη του 1 εκ. και όχι οι κλινικά αποδεδειγμένοι μικροί θηλώδεις όγκοι.

Συνήθως δεν γίνονται αντιληπτά στη κλινική εξέταση και έτσι βρίσκονται μόνο μετά από θυρεοειδεκτομή ή λοβεκτομή, που γίνεται για κάποιον άλλο λόγο, σε νεκροψίες ή σε υπερηχογράφημα, είναι λοιπόν ένα τυχαίο εύρημα. Αν και είναι καρκίνος, δεν προλαβαίνει να μετατραπεί σε έναν κλινικό καρκίνο και έτσι η "συμπεριφορά" του είναι καλή και σπάνια έχει επιθετικό χαρακτήρα ή δίνει μακρινές μεταστάσεις. Οι ασθενείς με θηλώδη μικροκαρκίνωμα δεν έχουν διαφορετικό προσδόκιμο ζωής από ένα υγιή άτομο του γενικού πληθυσμού. Η εμφάνισή του είναι κοινή και στα δύο φύλα. Τα θηλώδη μικροκαρκινώματα είναι πολύ συχνά στο γενικό πληθυσμό και ίσως σε αυτά να οφείλεται η αύξηση νέων περιπτώσεων καρκίνου, όπου τα νέα περιστατικά έχουν τριπλασιαστεί τα τελευταία 30 χρόνια. Το 50% της αύξησης αυτής οφείλεται στις διαγνώσεις μικροκαρκινωμάτων. Η μεγάλη αύξηση της τυχαίας ανεύρεσης μικροκαρκινωμάτων πιθανότατα οφείλεται τόσο στην εξέλιξη της τεχνολογίας όσο και στην εξέλιξη των

παθολογοανατομικών εξετάσεων. Επίσης έχει παρατηρηθεί αύξηση των υπερήχων αλλά και των βιοψιών δια της λεπτής βελόνης (FNA). Η ευρεία χρήση των υπερήχων έχει οδηγήσει στην αναγνώριση μη ψηλαφητών όζων μεγέθους 1-3 mm, που παλιότερα θα έμεναν αδιάγνωστοι. Έτσι λοιπόν αν ο όζος, μετά την παρακέντηση και την κυτταρολογική εξέταση, είναι καρκίνος, όσο μικρός και να είναι, γίνεται θυρεοειδεκτομή. (Fletcher C.D.M. Diagnostic histopathology of tumors, fourth edition (2013), Volume 2, pages 1177-1179, Elsevier Saunders).

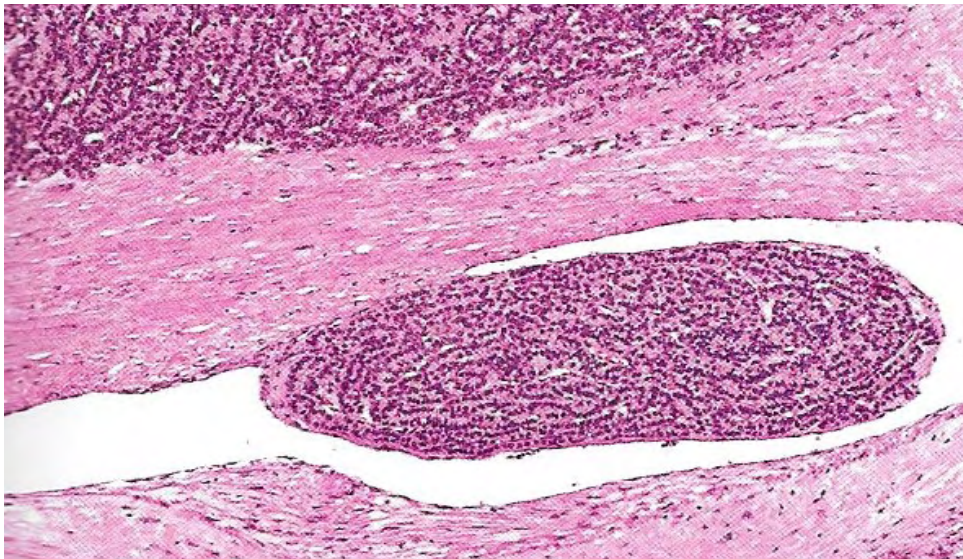
7. ΘΥΛΑΚΙΩΔΕΣ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑ

Το θυλακίωδες καρκίνωμα του θυρεοειδούς (follicular thyroid carcinoma, FTC) είναι ένα καλά διαφοροποιημένο καρκίνωμα, αποτελεί το δεύτερο πιο συχνό τύπο μετά το θηλώδες καρκίνωμα, και αντιπροσωπεύει το 10-15% όλων των κακοηθειών. Τα θηλώδη και τα θυλακίωδη καρκινώματα μαζί, αντιστοιχούν στο 95% των περιπτώσεων καρκίνου. Παρόλο που οι δυο αυτοί τύποι καρκίνου αφορούν καλά διαφοροποιημένα καρκινώματα, ωστόσο διαφέρουν στη συμπεριφορά και στη πρόγνωση, η οποία σχετίζεται με την ηλικία του ασθενούς. Το θυλακίωδες καρκίνωμα εμφανίζεται πολύ συχνά στις ηλικίες 45-50 ετών και σχεδόν ποτέ στα παιδιά.

Το θυλακίωδες καρκίνωμα προέρχεται από τα θυλακίωδη κύτταρα και η ιστολογική του εικόνα είναι πολύ κοντά στην εικόνα ενός φυσιολογικού θυρεοειδούς. Επίσης τα κυτταρολογικά του χαρακτηριστικά μοιάζουν με αυτά ενός θυλακίωδους αδενώματος. Έτσι λοιπόν η διάκριση μεταξύ ενός θυλακίωδους καρκινώματος και ενός θυλακίωδους αδενώματος είναι πολύ δύσκολη και γίνεται μόνο αν υπάρξει διήθηση της κάψας του θυρεοειδή ή είσοδος κυτταρικών στοιχείων μέσα σε αγγειακούς χώρους ή όταν εμφανιστεί κάποια μετάσταση. Το θυλακίωδες αδένωμα φέρεται ως μια προ-κακοήθης βλάβη στον αδένα, αν και αυτό ακόμα είναι υπό μελέτη. Η διάγνωση λοιπόν είναι πιθανό να αργήσει και ο όγκος να είναι πιο προχωρημένος ή και να έχει ήδη δώσει μεταστάσεις (11% των ασθενών εμφανίζουν απομακρυσμένες μεταστάσεις όπως πόνους στα οστά, κατάγματα) προτού βρεθεί το πρωτοπαθές θυρεοειδικό νεόπλασμα. Πιθανώς εκεί να οφείλεται το γεγονός ότι το θυλακίωδες καρκίνωμα έχει αυξημένη νοσηρότητα αλλά και θνησιμότητα.

Το θυλακίωδες καρκίνωμα είναι πιο επιθετικό και ανταποκρίνεται λιγότερο στις κλασικές μεθόδους αντιμετώπισης. Το καρκίνωμα αυτό μπορεί να εξαπλωθεί αιματογενώς με διήθηση των αγγείων και όχι λεμφογενώς όπως το θηλώδες καρκίνωμα. Οι απομακρυσμένες μεταστάσεις που δίνει το θυλακίωδες καρκίνωμα είναι πιο συχνές απ'ότι στο θηλώδες καρκίνωμα και αντιστοιχούν περίπου στο 20% των περιπτώσεων, κυρίως σε γυναίκες. Οι μεταστάσεις αυτές μπορεί να είναι στους πνεύμονες, στα οστά, στο ήπαρ και στον εγκέφαλο.

Ανάλογα με την ικανότητα διήθησης το θυλακιώδες καρκίνωμα μπορεί να χωριστεί σε δυο τύπους, το ελάχιστα διηθητικό θυλακιώδες καρκίνωμα και το ευρέως διηθητικό θυλακιώδες καρκίνωμα. Στο πρώτο παρατηρείται δυνατότητα διήθησης η οποία όμως περιορίζεται στη κάψα στα αγγεία, ενώ στο δεύτερο παρουσιάζεται ευρεία διήθηση των αγγείων και συχνά επεκτείνεται στα παρακείμενα μαλακά μόρια. Στο ελάχιστα διηθητικό θυλακιώδες καρκίνωμα οι μεταστάσεις που παρατηρούνται είναι λιγότερες από 5%, ενώ στο ευρέως διηθητικό θυλακιώδες καρκίνωμα οι μεταστάσεις είναι πολύ συχνές. Σε έναν τυπικό επανέλεγχο για την πορεία της νόσου οι περισσότεροι ασθενείς από αυτούς που έχουν ευρέως διηθητικό θυλακιώδες καρκίνωμα, θα έχουν μεταστάσεις στους λεμφαδένες καθώς και απομακρυσμένες μεταστάσεις κυρίως σε πνεύμονες και οστά. Η επέκταση του όγκου στους μαλακούς ιστούς του λαιμού είναι μια από τις ανεπιθύμητες επιρροές της επιβίωσης του ασθενή. Το ευρέως διηθητικό θυλακιώδες καρκίνωμα είναι πολύ επιθετικό και η θεραπευτική του αντιμετώπιση αφορά σε ολική θυρεοειδεκτομή, χορήγηση ραδιενεργού ιωδίου και χορήγηση θυροξίνης (Evans H.L. et al., 1998)



Εικόνα 5: Θυλακιώδες καρκίνωμα του θυρεοειδούς με διήθηση αγγείου

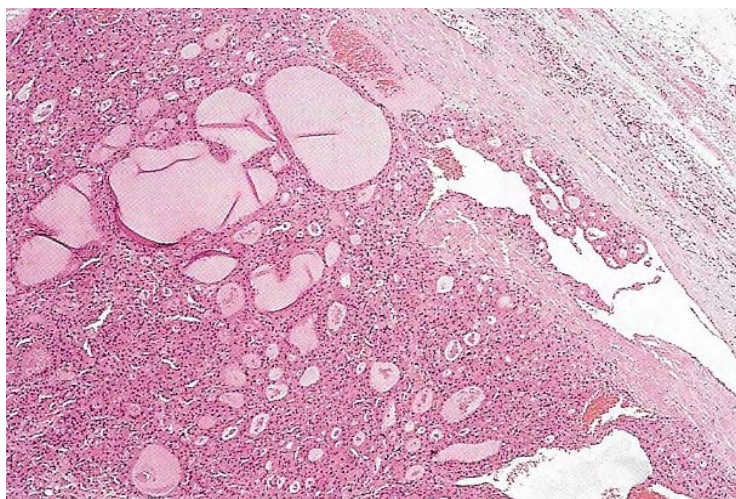
7.1. HÜRTHLE CELL ΝΕΟΠΛΑΣΜΑ

Το Hürthle cell νεόπλασμα θεωρείται ένας υπότυπος του θυλακιώδους καρκινώματος καθώς η μορφολογία του είναι παρόμοια με τα θυλακιώδη νεοπλάσματα. Το Hürthle cell καρκίνωμα εμφανίζεται σε μεγαλύτερες ηλικίες (51 ετών) και ο όζος είναι περίπου 4,3 εκ.

Η θνησιμότητα στα Hürthle cell καρκινώματα είναι περίπου από 30% έως 70%. Οι μεταστάσεις συνήθως είναι στο λαιμό και στους μαλακούς ιστούς και όχι στους

περιφερικούς λεμφαδένες. Η μεγάλη ηλικία, το μέγεθος του όγκου (>4 εκ.) και η εκτεταμένη αγγειακή διήθηση είναι ο συνδυασμός με τη χειρότερη πρόγνωση.

Τα Hürthle cell καρκινώματα σε σχέση με τα θυλακιώδη καρκινώματα έχουν λιγότερη ανταπόκριση στο ραδιενεργό ιώδιο, έχουν συχνότερες έξω θυρεοειδικές επεκτάσεις, τοπική επανεμφάνιση αλλά και μεταστάσεις στους λεμφαδένες. Συγκριτικά λοιπόν, το Hürthle cell καρκίνωμα είναι πιο επιθετικό από το θυλακιώδες καρκίνωμα (Carcangiu M.L. et al, 1991).



Εικόνα 6: Hürthle cell νεόπλασμα

8. ΜΥΕΛΟΕΙΔΗΣ ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΘΥΡΕΟΕΙΔΟΥΣ

Το μυελοειδές καρκίνωμα (Medullary thyroid carcinoma, MTC) αντιπροσωπεύει το 2-4% του συνόλου των καρκινωμάτων του θυρεοειδούς και προέρχεται από τα παραθυλακιώδη C κύτταρα. Το χαρακτηριστικό του γνώρισμα είναι η παραγωγή καλσιτονίνης. Επίσης σε σπάνιες περιπτώσεις υπάρχει αυξημένη παραγωγή καρκινοεμβρυϊκού αντιγόνου (CEA) στον ορό του αίματος (Kebebew E. et al., 2000).

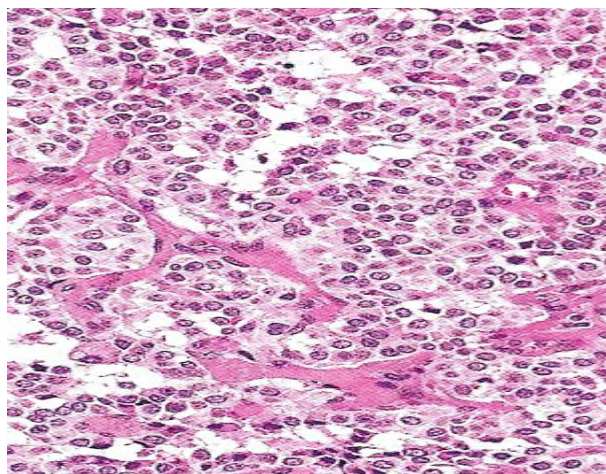
Η μέση ηλικία εμφάνισης είναι τα 40-50 έτη με ελάχιστα αυξημένη συχνότητα επί των γυναικών. Το 70% - 80% των περιπτώσεων αφορούν σε σποραδικό μυελοειδές καρκίνωμα με μονήρη όζο και το υπόλοιπο 20% - 30% αφορά σε κληρονομικού τύπου (αυτοσωμικό επικρατές γονίδιο με υψηλή διεισδυτικότητα και ποικίλη έκφραση) μυελοειδές καρκίνωμα (Raue F. Et al., 1993).

Στον κληρονομικό τύπο μυελοειδούς καρκινώματος υπάρχει νωρίτερη έναρξη της νόσου, ύπαρξη διμερών όγκων καθώς και υπερπλασία των κυττάρων C. Ο τύπος αυτός έχει τρεις υποκατηγορίες, το οικογενές μυελοειδές καρκίνωμα (familial MTC), την πολλαπλή ενδοκρινή νεοπλασία τύπου 2 A (multiple endocrine neoplasia type 2 A, MEN-2A) και τη πολλαπλή ενδοκρινή νεοπλασία τύπου 2 B (multiple endocrine

neoplasia type 2 B, MEN-2B). Οι διαφορετικοί τύποι οφείλονται στη μετάλλαξη της βλαστικής σειράς του γονιδίου RET. Παρά την ονομασία κληρονομικός τύπος αυτό δεν είναι πάντα σωστό καθώς μπορεί το οικογενειακό ιστορικό να είναι καθαρό και ο όγκος να οφείλεται σε νέα μετάλλαξη. Έτσι, σύμφωνα με νέες κατευθυντήριες οδηγίες του 2009, όλοι οι ασθενείς με μυελοειδές καρκίνωμα ή υπερπλασία των κυττάρων C πρέπει να υποβάλλονται σε έλεγχο της βλαστικής σειράς RET.

Οι όγκοι του μυελοειδούς καρκινώματος συνήθως δίνουν μεταστάσεις στους λεμφαδένες του λαιμού. Κατά τη διάρκεια της νόσου ίσως δώσουν μεταστάσεις και σε άλλα όργανα όπως οι πνεύμονες, ήπαρ, οστά και επινεφρίδια. Ωστόσο αυτός ο τύπος καρκίνου δεν θεωρείται από τους θανατηφόρους γιατί έχει αργή εξέλιξη καθώς άτομα με όγκο θυρεοειδή που έχει περιοριστεί εκεί, έχουν επιβίωση περίπου 95%. Ακόμα όμως και με απομακρυσμένες μεταστάσεις η δεκαετής επιβίωση είναι της τάξεως του 51% - 78%. Καλύτερη πρόγνωση φαίνεται να έχουν οι γυναίκες, άτομα νεότερα των 45 ετών, η μη ύπαρξη απομακρυσμένων μεταστάσεων καθώς και διηθημένων λεμφαδένων, όγκοι < 1 εκ καθώς και ο τύπος MEN- 2 A.

Το μυελοειδές καρκίνωμα δεν ανταποκρίνεται στη ραδιοθεραπεία και έχει ελάχιστη ανταπόκριση στη χημειοθεραπεία. Έτσι λοιπόν η καλύτερη αντιμετώπιση είναι αυτή της ολικής θυρεοειδεκτομής. Ωστόσο τα τελευταία χρόνια γίνονται προσπάθειες ανάπτυξης στοχευμένων φαρμάκων όπως είναι οι αναστολείς των RET κινασών (vandetanib). (Kebebew E. et al., 2000).



Εικόνα 7: Μυελοειδές καρκίνωμα του θυρεοειδούς.

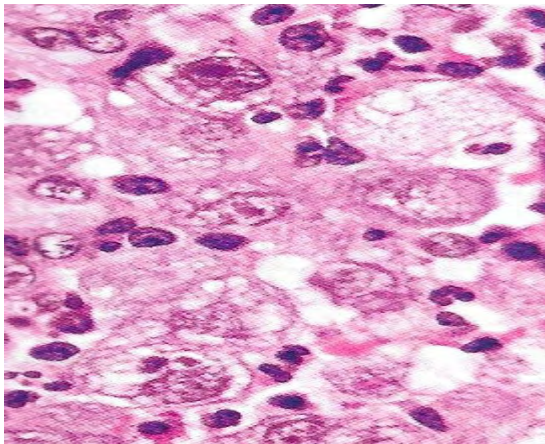
9. ΑΝΑΠΛΑΣΤΙΚΟ – ΑΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΤΟ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑ ΘΥΡΕΟΕΙΔΟΥΣ

Το αναπλαστικό καρκίνωμα αντιπροσωπεύει το 2% έως 5 % των περιστατικών του καρκίνου. Είναι ένας επιθετικός τύπου καρκίνου που οι μισές περιπτώσεις έχουν όγκους τόσο διηθητικούς που δεν γίνεται ούτε να χειρουργηθούν. Οι λεμφαδενικές

αλλά και οι απομακρυσμένες (οστά και πνεύμονες) μεταστάσεις είναι αρκετά συχνές. Οι περισσότεροι ασθενείς πεθαίνουν μέσα σε 1 χρόνο με μέση επιβίωση τους 4 μήνες. Η πενταετής επιβίωση αγγίζει το 3,6 % έως 10%. Οι παράγοντες κακής πρόγνωσης είναι η ηλικία (≥ 70 ετών), ο μεγάλος όγκος (> 5 εκ.), οι εξωθυροειδικές επεκτάσεις, οι απομακρυσμένες μεταστάσεις αλλά και η παρουσία οξέων συμπτωμάτων. Οι ελάχιστοι ασθενείς που επιβιώνουν είναι ηλικίας μικρότερης των 60 ετών και με όγκους μικρότερους των 4 εκ. (Cangariu M.L. et al., 1985), (Han J.M. et al., 2012).

Η εμφάνιση του είναι πιο συχνή στις γυναίκες καθώς και σε άτομα μεγαλύτερης ηλικίας (70 ετών περίπου). Το αναπλαστικό καρκίνωμα είναι συχνότερο επί εδάφους βρογχοκήλης καθώς και σε ανεπάρκεια ιωδίου. Η εμφάνιση του αναπλαστικού καρκινώματος είναι συνήθως σε ασθενείς με χρόνια βρογχοκήλη στους οποίους γίνεται έλεγχος του θυροειδή, σε ασθενείς με ταχεία αναπτυσσόμενη θυροειδική μάζα χωρίς ιστορικό βρογχοκήλης, σε ασθενείς με επανεμφάνιση ενός καλά διαφοροποιημένου καρκίνου του θυροειδή ή είναι περιφερικοί ή απομακρυσμένοι μεταστατικοί όγκοι.

Η καλύτερη θεραπεία είναι η ραδιοθεραπεία και /ή η χημειοθεραπεία σε συνδυασμό με ολική θυροειδεκτομή. Ωστόσο η χημειοθεραπεία δεν είναι αρκετά αποτελεσματική για προχωρημένους ή μεταστατικούς όγκους (Haigh P.I. et al, 2001).



Εικόνα 8: Αδιαφοροποίητο – Αναπλαστικό καρκίνωμα του θυροειδούς.

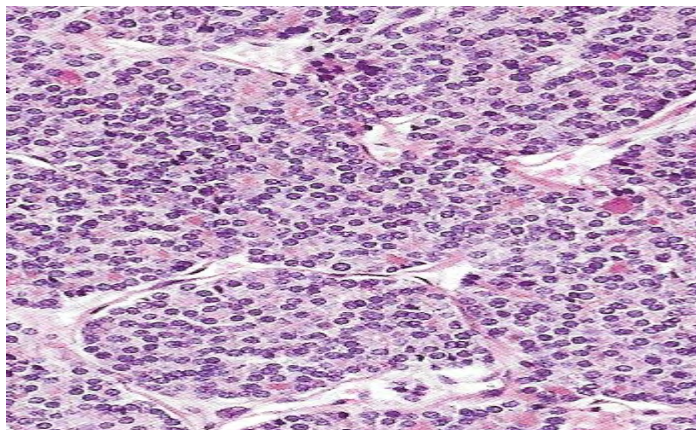
10. ΧΑΜΗΛΗΣ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗΣ ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΘΥΡΕΟΕΙΔΟΥΣ

Τα χαμηλής διαφοροποίησης καρκινώματα βρίσκονται ανάμεσα στα καλά διαφοροποιημένα καρκινώματα και στα αδιαφοροποίητα καρκινώματα, αφού τόσο

η ιστολογική τους εικόνα όσο και τα βιολογικά τους χαρακτηριστικά είναι στη μέση των δύο αυτών. Είναι καρκινώματα με ελάχιστα διαφοροποιημένα θυλακιώδη κύτταρα. Για χρόνια υπήρχε σύγχυση στο πως θα γίνει η ταυτοποίηση και η ονομασία του καρκίνου αυτού. Ωστόσο το 2007 προτάθηκαν κάποια χαρακτηριστικά που θα βοηθούσαν στη ταυτοποίηση. Η ταυτοποίηση ως χαμηλής διαφοροποίησης καρκίνωμα αφορά σε περιπτώσεις όπου υπάρχει εκτεταμένη νέκρωση του όγκου, 3 ή περισσότερες μιτώσεις ανά υψηλό πεδίο ανάλυσης και λοβωτός πυρήνας (Asioli S. et al, 2010).

Η ανάπτυξη αυτού του τύπου καρκίνου γίνεται είτε de novo είτε μετά από αποδιαφοροποίηση των καλά διαφοροποιημένων όγκων είτε ακόμα και μετά από συνεχείς επανεμφάνσεις. Οι όγκοι αυτοί μπορούν να μετατραπούν σε αδιαφοροποίητο καρκίνωμα από την αρχή ή αν γίνει επανεμφάνιση.

Ο χαμηλής διαφοροποίησης καρκίνος εμφανίζεται κυρίως σε μεγαλύτερες ηλικίες με μέσο όρο τα 60 έτη. Είναι διπλάσια η συχνότητα εμφάνισης του στις γυναίκες σε σχέση με τους άντρες. Οι ασθενείς συνήθως έχουν μια μάζα στο θυρεοειδή για αρκετό καιρό. Ελάχιστοι ασθενείς μπορεί να έχουν εμφανίσει μετάσταση στα οστά (Tallini G, 2011).



Εικόνα 9: Χαμηλής διαφοροποίησης καρκίνωμα του θυρεοειδούς.

11. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ

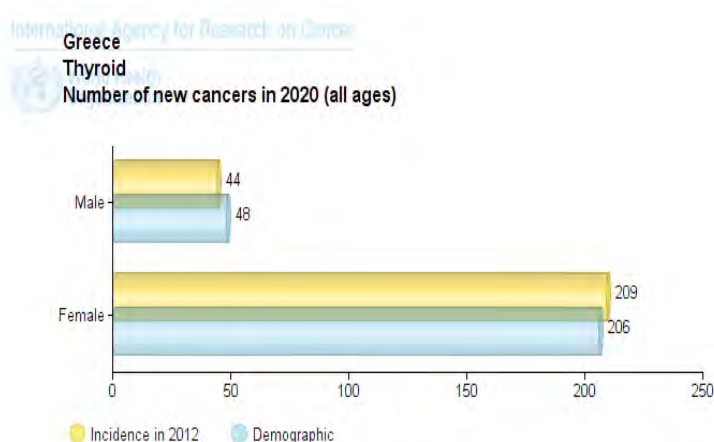
Ο καρκίνος του θυρεοειδούς είναι ο ένατος πιο συχνός τύπος καρκίνου στην αμερικανική ήπειρο. Η πενταετής επιβίωση των ασθενών αφορά το 97,8% των περιπτώσεων, ποσοστό που είναι το μεγαλύτερο σε σχέση με όλους τους υπόλοιπους τύπους καρκίνου. Το ποσοστό της πενταετής επιβίωσης ανεβαίνει στο 99,9% των ασθενών που η διάγνωση για καρκίνο του θυρεοειδή έγινε στο στάδιο 1.

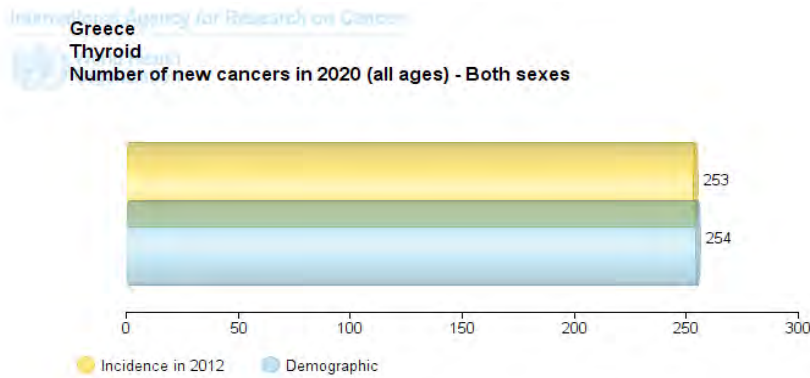
Η ανάπτυξη καρκίνου είναι 3-5 φορές πιο συχνή στις γυναίκες σε σχέση με τους άντρες. Υπολογίζεται ότι η ετήσια εμφάνιση βάση φύλου είναι από 1.0 έως 2.9

περιπτώσεις ανά 100.000 άνδρες και 3.4 έως 9.1 περιπτώσεις ανά 100.000 γυναίκες. Η εμφάνιση γίνεται κυρίως σε ηλικίες 45-54 ετών με μέσο όρο ηλικίας τα 50 έτη και για τα δυο φύλα. Υπάρχει επίσης διαφορά στην εμφάνιση της νόσου και λόγω φυλετικής καταγωγής, όπου εκεί παρατηρούνται τα υψηλότερα ποσοστά εμφάνισης σε άτομα της λευκής φυλής και του λεγόμενου αναπτυγμένου κόσμου (27,3 περιπτώσεις ανά 100.000 άτομα) ενώ τα χαμηλότερα σε άτομα της μαύρης φυλής και του αναπτυσσόμενου κόσμου (14,6 περιπτώσεις ανά 100.000 άτομα) (<http://www.thyroid.org/>).

Η μέση ηλικία θνησιμότητας λόγω καρκίνου είναι τα 73 έτη, ενώ το εύρος κυμαίνεται από τα 75-84 έτη. Επιπλέον η θνησιμότητα λόγω της νόσου είναι διαφορετική ανάλογα και με τη φυλή του ασθενούς. Έτσι λοιπόν ενώ οι περισσότερες νέες περιπτώσεις αφορούν άτομα της λευκής φυλής, οι περισσότεροι θάνατοι (1,5 θάνατοι ανά 100.000 άτομα) αφορούν άτομα της ασιατικής φυλής και οι λιγότεροι (0,5 θάνατοι ανά 100.000 άτομα) αφορούν ιθαγενείς της Αμερικής.

Μελετώντας τις στατιστικές σε σχέση με τις νέες περιπτώσεις που εμφανίζονται κάθε χρόνο, με τους θανάτους που οφείλονται στο καρκίνο αλλά και με τα ποσοστά της πενταετούς επιβίωσης μπορούμε να αντλήσουμε πληροφορίες για την εξέλιξη της επιστήμης τόσο σε διαγνωστικά κριτήρια όσο και σε θεραπείες έναντι του καρκίνου. Έτσι λοιπόν ενώ βλέπουμε χρόνο με το χρόνο αύξηση στις νέες περιπτώσεις καρκίνου (5,5% ανά χρόνο την τελευταία δεκαετία), οι θάνατοι παραμένουν σταθεροί και η πενταετής επιβίωση αυξάνεται (92,3% το 1975 και 97,8% το 2013). Η αύξηση των νέων περιπτώσεων (κυρίως σε περιστατικά θηλώδους καρκίνου) οφείλεται σε μεγάλο βαθμό στην ανίχνευση πολύ μικρών όγκων μέσω σύγχρονων τεχνικών ανάλυσης που παλαιότερα αυτό δεν ήταν δυνατό αλλά και σε διάφορους περιβαλλοντικούς παράγοντες καθώς τα νέα αυξημένα κρούσματα αφορούν σε όλους τους τύπους του καρκίνου του θυρεοειδή (<http://emedicine.medscape.com>).





Εικόνα 10: Εκτιμώμενα νέα περιστατικά καρκίνου θυρεοειδούς αδένος στην Ελλάδα κατά το έτος 2020. (<http://globocan.iarc.fr>)

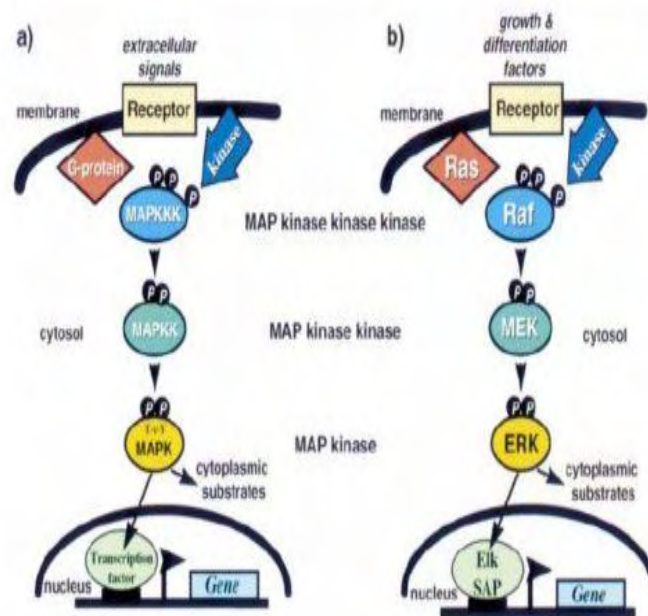
12. ΓΟΝΙΔΙΟ BRAF

Το γονίδιο BRAF (v – raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1 ή BRAF1 ή RAFB1) εδράζεται στο χρωμόσωμα 7 και συγκεκριμένα στη θέση 7q34. Είναι ένα πρωτοογκογονίδιο που ανήκει στην οικογένεια των κινασών σερίνης /θρεονίνης.

Η πρωτεΐνη BRAF εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα και παίζει σημαντικό ρόλο στη μετάδοση μηνυμάτων από τη κυτταρική μεμβράνη προς το πυρήνα του κυττάρου μέσω του σηματοδοτικού μονοπατιού RAS/RAF/MEK/ERK/MAPK. Το σηματοδοτικό αυτό μονοπάτι έχει καθοριστική λειτουργία στην ογκογένεση καθώς ρυθμίζει τον πολλαπλασιασμό, την επιβίωση και τη διαφοροποίηση των κυττάρων αλλά και την αγγειογένεση.

Το έναυσμα για την έναρξη της μετάδοσης του σήματος γίνεται με τη δέσμευση ενός αυξητικού παράγοντα στον υποδοχέα με δράση κινάσης τυροσίνης (RTK, receptor tyrosine kinase). Στο επόμενο στάδιο ενεργοποιείται η μικρή πρωτεΐνη RAS, η οποία λειτουργεί ως μοριακός διακόπτης της μεταγωγής σήματος και εναλλάσσεται μεταξύ δύο μορφών: η ανενεργός RAS είναι συνδεδεμένη με GDP ενώ η ενεργός μορφή με GTP. Οι μεταλλαγές που μετατρέπουν το RAS σε ογκογονίδιο αναστέλλουν την ικανότητα της RAS να υδρολύει το GTP με αποτέλεσμα η πρωτεΐνη να μένει συνεχώς ενεργή. Η RAS GTP φωσφορυλιώνει, και έτσι ενεργοποιεί, την κυτταροπλασματική κινάση σερίνης / θρεονίνης RAF (BRAF) το πρώτο μέλος της οικογένειας των κινασών το οποίο μεταφέρει το βιολογικό σήμα απ'τη κυτταρική μεμβράνη στον πυρήνα του κυττάρου. Η ενεργοποιημένη RAF φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί μέλη της πρωτεϊνικής οικογένειας των κινασών MAPKK/MEK, με χαρακτηριστικούς αντιπροσώπους τις πρωτεΐνες MEK1 και MEK2. Οι

ενεργοποιημένες κινάσες MEK φωσφορυλιώνουν και ενεργοποιούν πλήθος κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών που ρυθμίζουν την κυτταρική διαίρεση. Οι κινάσες MEK ενεργοποιούν τις κινάσες ERK μέσω διπλής φωσφορυλίωσης σε γειτονικά αμινοξικά κατάλοιπα τυροσίνης και θρεονίνης. Τέλος οι ενεργοποιημένες κινάσες ERK φωσφορυλιώνουν πλήθος στόχων όπως μεταγραφικούς παράγοντες. Οι φωσφορυλιωμένοι μεταγραφικοί παράγοντες συνδέονται επιλεκτικά σε ρυθμιστικές περιοχές του DNA (υποκινητές γονιδίων) επηρεάζοντας έτσι τη γονιδιακή έκφραση και κατ' επέκταση το πολλαπλασιασμό, την επιβίωση και τη διαφοροποίηση του κυττάρου. Στο 30% των παθολογικών καταστάσεων στον άνθρωπο, έχει φανεί ότι υπάρχει πρόβλημα στο σηματοδοτικό μονοπάτι RAS/RAF/MEK/ERK.



Εικόνα 11: Σηματοδοτικό μονοπάτι RAS/RAF/MEK/ERK/MAPK

Για το γονίδιο BRAF έχουν αναφερθεί τόσο σωματικές μεταλλάξεις (Somatic Mutations) όσο και πολυμορφισμοί ενός νουκλεοτιδίου (SNP, Single Nucleotide Polymorphism). Η σημαντικότερη όμως μετάλλαξη που έχει περιγραφεί και συμμετέχει στην ογκογένεση διαφόρων τύπων καρκίνου είναι η V600E. Η μετάλλαξη αυτή αντιστοιχεί στη T1799A (κωδικόνιο GTG > GAG) και προκαλεί την αντικατάσταση της Βαλίνης (V) από το Γλουταμινικό οξύ (E). Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα να δημιουργεί μεταλλακτική ενεργότητα στα κύτταρα και έτσι το BRAF να μένει ενεργό ανεξάρτητα από το γονίδιο RAS. Η πρωτεΐνη λοιπόν έχει αυξημένη ενεργότητα και το μήνυμα που πηγαινει στο πυρήνα των κυττάρων μέσω του σηματοδοτικού μονοπατιού RAF/MEK/ERK/MAPK είναι συνεχές με αποτέλεσμα να έχει ογκογενετικές επιπτώσεις. Η μετάλλαξη αυτή είναι αποκλειστική και σπάνια (~1%) συνυπάρχει και με άλλη μετάλλαξη όπως η KRAS, με την οποία εμφανίζεται

στους ίδιους τύπους καρκίνου. Αν όμως υπάρχει μετάλλαξη στο BRAF τότε αυτή δεν θα είναι στο V600E. Η μετάλλαξη του BRAF V600E σχετίζεται με τον καρκίνο των ωοθηκών, του θυρεοειδούς, του παχέος εντέρου και του μελανώματος, ενώ δεν εμφανίζεται σε νευροβλάστωμα, λευχαιμία, λέμφωμα, καρκίνο παγκρέατος, προστάτη, στομάχου, ουροδόχου κύστεως, νεφρών, μήτρας, τραχήλου μήτρας και όρχεων (Davies H. et al 2002).

Στο μελάνωμα υπολογίζονται τα υψηλότερα ποσοστά εμφάνισης του μεταλλαγμένου BRAF από όλους τους τύπους καρκίνου στον άνθρωπο (Davies H. et al. 2002) και αυτό αντιστοιχεί στο 40%-50% των ασθενών και από αυτούς το 90% έχει τη V600E (Long GV et al. 2011).

Στο καρκίνο του θυρεοειδούς αδένος τα ποσοστά εμφάνισης της μετάλλαξης BRAF ποικίλουν από 23% – 40% των ασθενών. Όπως και στη προηγούμενη περίπτωση κυριαρχεί η V600E και κυρίως σε θηλώδες και αναπλαστικό καρκίνωμα (Mitsiades et al. 2007).

Στον καρκίνο του παχέος εντέρου η εμφάνιση της μετάλλαξης του BRAF αντιστοιχεί στο 5-10% όλων των τύπων. Τέλος, η μετάλλαξη BRAF V600E έχει ταυτοποιηθεί στο 11% του συνόλου των καρκινωμάτων των ωοθηκών (Kurman and Shih 2011).

13. ΓΟΝΙΔΙΟ RAS

Οι RAS πρωτεΐνες ανήκουν στην οικογένεια των G πρωτεϊνών (GTPάσες) οι οποίες έχουν δύο μορφές, την ενεργή στην οποία είναι συνδεδεμένες με ένα νουκλεοτίδιο GTP και την ανενεργή στην οποία είναι συνδεδεμένες με ένα νουκλεοτίδιο GDP. Βρίσκονται στην κυτταρική μεμβράνη και σε ενδομεμβράνες και στα κύτταρα των θηλαστικών υπάρχουν σε τρία πρωτο – ογκογονίδια RAS που κωδικοποιούν τέσσερις πρωτεΐνες συγγενείς αλλά όχι ίδιες: KRAS4A, KRAS4B, (Kirsten rat sarcoma virus), NRAS (απομονώθηκε για πρώτη φορά από νευροβλάστωμα στον άνθρωπο) και το HRAS (Harvey rat sarcoma virus). Το KRAS εδράζεται στη θέση 12p12.1, το NRAS στη θέση 1p13.2 και το HRAS 11p15.5. (www.mycancergenome.org)

Οι RAS πρωτεΐνες λειτουργούν σαν μοριακοί διακόπτες σε διάφορα σηματοδοτικά μονοπάτια και έτσι ρυθμίζουν ποικίλες κυτταρικές λειτουργίες όπως τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίηση, τη γήρανση, την απόπτωση, την επιβίωση και την κυτταρική κινητικότητα. Η ικανότητα των RAS να ρυθμίζουν τις κυτταρικές λειτουργίες οφείλεται στο εναρκτήριο σήμα (π.χ. αυξητικός παράγοντας) και τους μηχανισμούς ενεργοποίησης και απενεργοποίησης.

Οι RAS πρωτεΐνες είναι σημαντικές στην ογκογένεση των κακοηθειών καθώς έχει φανεί ότι οι μεταλλάξεις τους είναι υπαίτιες για το 30% των όγκων του ανθρώπου

και πιο συγκεκριμένα οι μεταλλάξεις στο KRAS αφορούν το 50% των όγκων του παχέος εντέρου (Astrid Lièvre et al. 2006). Τα πιο συχνά ελεγχόμενα κωδικόνια των γονιδίων KRAS, NRAS και HRAS είναι τα 12, 13 και 61.

Στον καρκίνο του θυρεοειδούς το ποσοστό των μεταλλάξεων του γονιδίου KRAS είναι 49% σε τυπικά θυλακιώδη καρκινώματα (Nikiforova et al. 2003). Ωστόσο οι μεταλλάξεις αυτές είναι μοναδικές και δεν συνυπάρχουν με μεταλλάξεις άλλων γονιδίων όπως το BRAF, RET/PTC και PAX8/PPARγ (Bhaijee et al, 2011).

Μεταλλάξεις για το KRAS έχουν αναφερθεί σε μη μικροκυτταρικό καρκίνο των πνευμόνων (Boch et. al. 2013) και σε παγκρεατικό αδενοκαρκίνωμα (Lennerz 2015). Επιπλέον οι μεταλλάξεις του KRAS ταυτοποιούνται σε ποσοστό 5% σε καρκίνο του μαστού (Sánchez-Muñoz et al. 2010), στο 11% των ασθενών με όγκο ουροδόχου κύστεως (Kompier et al.,2010), και στο 12% των όγκων της ρινός και των παραρίνιων (Lopez et al, 2012).

14. ΜΟΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΣΕ ΚΑΡΚΙΝΟ ΘΥΡΕΟΕΙΔΟΥΣ

Για την ταυτοποίηση του καρκίνου του θυρεοειδούς ακολουθείται η εξής διαδικασία: αρχικά γίνεται μια εξέταση αίματος για να ελεγχθούν τα επίπεδα των ορμονών του θυρεοειδούς που σχετίζονται με τη φυσιολογική λειτουργία του αδένου. Ο βιοχημικός έλεγχος περιλαμβάνει τη μέτρηση των επιπέδων των ορμονών T3, T4 και TSH. Η μέτρηση των αντιθυρεοειδικών αντισωμάτων είναι χρήσιμη για τη διαφορική διάγνωση ή συνύπαρξη αυτοάνοσης θυρεοειδικής νόσου. Επίσης η μέτρηση της καλσιτονίνης επιτρέπει την προεγχειρητική διάγνωση του μυελοειδούς καρκίνου του θυρεοειδούς.

Έπειτα γίνεται η κλινική εξέταση του ασθενούς για την ύπαρξη και ψηλάφηση όζων. Το υπερηχογράφημα στη συνέχεια θα καθορίσει το μέγεθος και τα χαρακτηριστικά των όζων με την ευαισθησία της μεθόδου για την απεικόνιση συμπαγών όζων μεγέθους 3 mm και κυστικών όζων 2 mm. Επίσης ελέγχει τη λεμφαδενική διήθηση και την επέκταση της νόσου αλλά και ταυτοποιεί όζους που δεν είναι ψηλαφητοί στην κλινική εξέταση. Επιπλέον μπορεί να γίνει και σπινθηρογράφημα ώστε να καθοριστεί η λειτουργική δραστηριότητα του όζου και Doppler για την πιθανή φύση του όζου.

Ωστόσο η μέθοδος που θα δείξει με μεγαλύτερη ακρίβεια αν ένας όζος είναι καλοήθης ή κακοήθης, είναι η παρακέντηση δια λεπτής βελόνης (fine – needle aspiration, FNA). Η ευαισθησία στη διάγνωση αγγίζει το 95% και θεωρείται η αποτελεσματικότερη. Επίσης η εφαρμογή της μειώνει τις χειρουργικές επεμβάσεις από 35% - 75% και αυξάνει το ποσοστό, 2- 3 φορές, των προ - διαγνωσμένων όγκων του θυρεοειδούς που θα κάνουν θυρεοειδεκτομή. Η μέθοδος αυτή είναι απλή,

εύκολη, ανεκτή και με σπάνιες επιπλοκές. Με οδηγό το υπερηχογράφημα τοποθετείται μια λεπτή βελόνη μέσα στον όζο και παίρνει κύτταρα ή υγρό, τα οποία στέλνονται σε κυτταρολογικό εργαστήριο ώστε να καθοριστεί η φύση τους.

Τα τελευταία χρόνια οι νέες οδηγίες για τη διάγνωση του καρκίνου του θυρεοειδούς μέσω FNA, περιλαμβάνουν και ένα πάνελ μοριακών αναλύσεων με στόχο τη καλύτερη και ακριβέστερη διάγνωση των όγκων προεγχειρητικά. Οι αναλύσεις αυτές περιλαμβάνουν τον έλεγχο για σημειακή μετάλλαξη για το γονίδιο BRAF (V600E), KRAS, NRAS, HRAS αλλά και για τις μετατοπίσεις RET/PTC και PAX8/PPARγ. Οι μεταλλάξεις αυτές αποτελούν το 70% όλων των γενετικών μεταλλάξεων στα διαφοροποιημένα καρκινώματα του θυρεοειδούς αδένου. Σχεδόν πάντα οι μεταλλάξεις αυτές είναι αποκλειστικές και η ύπαρξη της μιας αποκλείει την ύπαρξη άλλης. Η μελέτη των μεταλλάξεων αυτών σε δείγματα που έχουν ελεγχθεί μετά από λήψη τους με FNA, δείχνει ότι η δυνατότητα ακριβής πρόβλεψης της νόσου έχει υψηλή ειδικότητα (86%-94%) και η θετική προγνωστική αξία (ποσοστό ασθενών που είχαν θετικά αποτελέσματα και πράγματι είχαν καρκίνο θυρεοειδούς ή πόσα αποτελέσματα ήταν αληθώς θετικά) είναι επίσης πολύ υψηλή (87% - 100%) (Ferris et al, 2015).

Αυτή τη στιγμή κυρίως στο εξωτερικό υπάρχει ένα τεστ το οποίο αναφέρεται ως 7-gene MT panel και το οποίο ελέγχει τις σημειακές μεταλλάξεις για το γονίδιο BRAF (V600E), KRAS, NRAS, HRAS αλλά και για τις μετατοπίσεις RET/PTC και PAX8/PPARγ. Το τεστ αυτό δημιουργήθηκε στο Πανεπιστήμιο του Pittsburgh και θεωρείται ως έλεγχος ρουτίνας για τη διάγνωση των διαφοροποιημένων καρκινωμάτων του θυρεοειδούς μιας και η θετική προγνωστική του αξία αγγίζει το 88%.

Το τεστ της επόμενης γενιάς, δημιουργήθηκε επίσης στο ανωτέρω Πανεπιστήμιο, περιλαμβάνει έλεγχο 60 γονιδίων γεγονός που αντιστοιχεί στο 91% των μεταλλάξεων του καρκίνου του θυρεοειδούς και έχει θετική προγνωστική αξία της τάξεως του 83% (Witt et al, 2013).

Συγκεκριμένα τα ποσοστά εμφάνισης των παραπάνω μεταλλάξεων διαφέρουν ανάλογα με τον τύπο του καρκίνου του θυρεοειδούς. Αναλυτικά η συχνότητα εμφάνισης αυτών φαίνεται στην εικόνα 12 .

Tumor Type	Prevalence, %
Papillary carcinoma	
<i>BRAF</i>	40–45
<i>RET/PTC</i>	10–20
<i>RAS</i>	10–20
<i>TRK</i>	<5
Follicular carcinoma	
<i>RAS</i>	40–50
<i>PAX8-PPARγ</i>	30–35
<i>PIK3CA</i>	<10
<i>PTEN</i>	<10
Poorly differentiated carcinoma	
<i>RAS</i>	25–30
β -Catenin (<i>CTNNB1</i>)	10–20
<i>TP53</i>	20–30
<i>BRAF</i>	10–15
Anaplastic carcinoma	
<i>TP53</i>	70–80
β -Catenin (<i>CTNNB1</i>)	60–70
<i>RAS</i>	40–50
<i>BRAF</i>	20–30
Medullary carcinoma	
Familial forms <i>RET</i>	>95
Sporadic <i>RET</i>	40–50

Εικόνα 12: Συχνότητα εμφάνισης της εκάστοτε μετάλλαξης σε σχέση με το τύπο του καρκίνου του θυρεοειδούς.

BRAF: Η σημειακή μετάλλαξη BRAF (V600E) εμφανίζεται στα θηλώδη καρκινώματα σε ποσοστό 40% – 45% των περιστατικών. Έχει φανεί ότι τα θηλώδη καρκινώματα με την τυπική ιστολογική εικόνα αλλά και τα θηλώδη του υπότυπου των ψηλών κυττάρων (tall cell variant) είναι αυτά που έχουν πιο συχνά τη μετάλλαξη. Η εμφάνιση της σε θηλώδη καρκινώματα με θυλακιώδη υπότυπο είναι πιο σπάνια ενώ σχεδόν ποτέ δεν εμφανίζεται σε θυλακιώδη καρκινώματα. Επίσης η μετάλλαξη αυτή έχει εντοπιστεί σε αναπλαστικά αλλά και σε χαμηλής διαφοροποίησης καρκίνο του θυρεοειδούς. Ωστόσο στους τύπους αυτούς έχει εντοπιστεί σε περιοχές όπου ο όγκος περιλαμβάνει καλά διαφοροποιημένα θηλώδη καρκινώματα.

Το BRAF μπορεί να χρησιμοποιηθεί και σαν προγνωστικός δείκτης του θηλώδους καρκινώματος του θυρεοειδούς. Έχει φανεί ότι συνδέεται με επιθετικά χαρακτηριστικά του όγκου, όπως είναι οι απομακρυσμένες ή οι λεμφαδενικές μεταστάσεις, εξωθυρεοειδική επέκταση αλλά και προχωρημένο στάδιο (όταν έγινε η διάγνωση). Επίσης η ύπαρξη του BRAF συνδέεται με αυξημένες πιθανότητες επανεμφάνισης της νόσου και ιδιαίτερα αν η διάγνωση της μετάλλαξης έγινε σε υλικό από FNA.

RAS: Τα RAS γονίδια, και τα τρία ισόμορφα KRAS, NRAS, HRAS έχουν αναφερθεί συχνά στις μεταλλάξεις του θυρεοειδούς και θεωρούνται οι δεύτερες πιο κοινές μεταλλάξεις μετά το BRAF. Συγκεκριμένα ελέγχονται τα εξής κωδικόνια: για το KRAS τα κωδικόνια 12,13 και το 61 πιο σπάνια, για το NRAS και το HRAS το κωδικόνιο 61.

Το ποσοστό εμφάνισης των RAS μεταλλάξεων διαφοροποιείται σε κάθε τύπο, κυρίως όμως αφορά όγκους που προέρχονται από θυλακιώδη κύτταρα. Πιο συγκεκριμένα τα θηλώδη καρκινώματα έχουν μεταλλάξεις στα γονίδια RAS σε ποσοστά περίπου 10% - 20% και κυρίως εντοπίζεται στους υπότυπους με θυλακιώδη διαμόρφωση. Επίσης στα συμβατικά θυλακιώδη καρκινώματα τα ποσοστά ανεβαίνουν στο 40% – 50%. Κάποιες μελέτες έχουν συνδέσει την ύπαρξη μετάλλαξης RAS με όχι καλή πρόγνωση της νόσου αλλά και με την εμφάνιση μεταστάσεων, κυρίως στα οστά.

Ωστόσο οι μεταλλάξεις RAS δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως προγνωστικός δείκτης για όλους τους τύπους θυρεοειδούς καρκινώματος αλλά μπορούν να θεωρηθούν σημαντική βοήθεια στη διάγνωση και τυποποίηση του θηλώδους καρκινώματος με θυλακιώδη διαμόρφωση, σε δείγματα από FNA καθώς είναι πολύ δύσκολη η διάγνωση του συγκεκριμένου τύπου.

PAX8/PPARγ: Το γονίδιο PAX8 κωδικοποιεί έναν ειδικό μεταγραφικό παράγοντα ο οποίος είναι σημαντικός για τη γένεση των θυλακιωδών κυττάρων, τη ρύθμιση έκφρασης των θυρεοειδικών γονιδίων, τη διαφοροποίηση και την ανάπτυξη του θυρεοειδούς αδένου. Εδράζεται στο χρωμόσωμα 2, στο μακρύ βραχίονα (q) μεταξύ της θέσης 12 και 14.

Το γονίδιο PPARγ εδράζεται στο χρωμόσωμα 3 και τη θέση 3p25 και κωδικοποιεί τον υπεροξεισωματικό πολλαπλασιαστικό ενεργό υποδοχέα γ, PPARγ (peroxisome-proliferator-activated receptor). Στο γονίδιο PPARγ, η σωματική γενετική αναδιάταξη περιλαμβάνει μια 3p25 και 2q13 μετάθεση. Η μετάθεση αυτή αφορά τα χρωμοσώματα 2 και 3 και δείχνει την πιθανή ύπαρξη ογκοκατασταλτικού γονιδίου στη θέση 3p25 για τα θυλακιώδη καρκινώματα του θυρεοειδούς. Σωματικές μεταλλάξεις στο γονίδιο του PPARγ έχουν σαν αποτέλεσμα την απώλεια της ικανότητας σύνδεσης με τον προσδέτη του υποδοχέα. Από τα συγκεκριμένα αποτελέσματα φαίνεται ότι ο υποδοχέας PPARγ λειτουργεί σαν ογκοκατασταλτικό γονίδιο και οι μεταλλάξεις απώλειας λειτουργίας (loss-of-function) οδηγούν σε καρκινογένεση.

Εμφανίζεται σε ποσοστό 30% - 40% των τυπικών θυλακιωδών καρκινωμάτων του θυρεοειδούς. Οι όγκοι που φέρουν τον ανασυνδυασμό PAX8/RRARγ χαρακτηρίζονται από υπερέκφραση της πρωτεΐνης PPARγ, εμφανίζονται σε μικρότερη ηλικία, έχουν μικρότερο μέγεθος αλλά και εμφανίζουν φλεβική διήθηση.

Η ανίχνευση του PAX8/RRARγ δεν χρησιμοποιείται ως διαγνωστικός δείκτης κακοήθειας, ωστόσο μπορεί να είναι μια ένδειξη ώστε ο πραγματοποιηθεί διεξοδικός έλεγχος του όγκου για φλεβική διήθηση ή διήθηση της κάψας.

RET/PTC: Ο ανασυνδυασμός RET/PTC είναι μια γενετική τροποποίηση που παρατηρείται κυρίως στα θηλώδη καρκινώματα. Το πρωτοογκογονίδιο RET εδράζεται στο χρωμόσωμα 10q11.2. Προκύπτει από τη συγκόλληση του 3' τμήματος του γονιδίου που κωδικοποιεί την τυροσινική κινάση του υποδοχέα RET και του 5' τμήματος διαφόρων άλλων τυχαίων γονιδίων. Έχουν ταυτοποιηθεί συνολικά έντεκα (11) ανασυνδυασμοί RET/PTC με τους πιο κοινούς στον καρκίνο του θυρεοειδή να είναι το RET/PTC1 και το RET/PTC3. Όλοι διατηρούν ακέραιο το τμήμα της τυροσινικής κινάσης του υποδοχέα RET και έτσι η ανασυνδυασμένη RET/PTC πρωτεΐνη διατηρεί την ικανότητα να ενεργοποιεί τον καταρράκτη Ras/Raf/MAPK και να προκαλεί ογκογένεση. Διαπιστώθηκε ότι ο ανασυνδυασμός RET/PTC εμφανίζεται στο 10% - 20% του σποραδικού θηλώδους καρκινώματος. Τα καρκινώματα του θυρεοειδούς αδένος με αυτό τον ανασυνδυασμό συναντώνται σε νεότερες ηλικίες εμφάνισης, σε άτομα με αυξημένες πιθανότητες για λεμφαδενικές ή απομακρυσμένες μεταστάσεις αλλά και σε όγκους με τα τυπικά χαρακτηριστικά του θηλώδους καρκινώματος.

Η συχνότητά του ανασυνδυασμού αυτού ποικίλει σημαντικά στις διάφορες μελέτες, κυρίως λόγω των διαφορετικών μεθόδων προσδιορισμού, καθώς και κάποιας διαφοροποίησης ως προς τη γεωγραφική κατανομή. Παρουσιάζει μεγαλύτερη συχνότητα σε ασθενείς που είχαν ακτινοβοληθεί παλαιότερα (50-80%) και σε παιδιά και νέους με θηλώδες καρκίνωμα (40% - 70%). Το RET/PTC1 είναι ο συνηθέστερος ανασυνδυασμός και αντιπροσωπεύει το 60% - 70% των περιστατικών, το RET/PTC3 αντιπροσωπεύει το 20-30%, ενώ το RET/PTC2 και οι άλλοι ανασυνδυασμοί ανιχνεύονται σε ποσοστό <5% των περιστατικών.

Το RET/PTC δεν έχει καθιερωθεί ως προγνωστικός δείκτης ή ιδιαίτερα χρήσιμη εξέταση εξαιτίας του γεγονότος πως αφορά κυρίως θηλώδη καρκινώματα και αυτά σπάνια έχουν κάποια δυσκολία στη διάγνωση τους, κυρίως σε χειρουργικά παρασκευάσματα. Ωστόσο ο ανασυνδυασμός αυτός θα μπορούσε να είναι ιδιαίτερα χρήσιμος σε δείγματα FNA τα οποία έχουν ελάχιστο υλικό ή έχουν θεωρηθεί ως μη διαγνωσμένα από το κυτταρολόγο και η ταυτοποίησή τους μπορεί να οδηγήσει σε μια προεγχειρητική διάγνωση. (Nikiforou, 2011).

15. ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη της συσχέτισης των μεταλλάξεων στα γονίδια BRAF (κωδικόνιο 600) και KRAS (κωδικόνια 12,13 και 61) με τους διαφορετικούς τύπους καρκίνου του θυρεοειδούς στον ελληνικό πληθυσμό.

B. ΥΛΙΚΑ – ΜΕΘΟΔΟΙ

1. ΔΕΙΓΜΑΤΑ

Η μελέτη αυτή πραγματοποιήθηκε σε 31 ασθενείς με καρκίνο του θυρεοειδή. Όλα τα δείγματα προήλθαν από το Παθολογοανατομικό Εργαστήριο του Νοσηλευτικού Ιδρύματος του Μετοχικού Ταμείου Στρατού (Ν.Ι.ΜΤ.Σ.) στην Αθήνα.

Όλα τα δείγματα προέρχονται από χειρουργικά περιστατικά θυρεοειδεκτομής (είτε ολικής είτε σχεδόν ολικής) που πραγματοποιήθηκαν το διάστημα 2006-2015. Τα δείγματα ήταν αντιπροσωπευτικά αυτών του γενικού πληθυσμού καθώς υπήρχαν όλοι οι τύποι καρκίνου.

Η μελέτη έγινε σε ιστολογικές τομές εγκλεισμένες σε block παραφίνης όπου η διάγνωση και η ταυτοποίηση των όγκων είχε προηγηθεί στο ίδιο εργαστήριο από ειδικευμένους Παθολογοανατόμους, με τη βοήθεια ειδικών ιστοχημικών και ανοσοϊστοχημικών χρώσεων και σύμφωνα με τις κατευθυντήριες οδηγίες του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (Π.Ο.Υ.), τη Διεθνή Ένωση κατά του Καρκίνου (UICC / 7^η έκδοση) και την Αμερικάνικη Επιτροπή για τον Καρκίνο (AJCC).

Πίνακας 2 : Δείγματα που μελετήθηκαν στη έρευνα

A/A	ΤΥΠΟΣ	ΦΥΛΟ	ΗΛΙΚΙΑ
1	Θηλώδες καρκίνωμα με θυλακιώδη διαμόρφωση	ΘΗΛΥ	43
2	Θηλώδες καρκίνωμα με θυλακιώδη διαμόρφωση	ΘΗΛΥ	61
3	Θηλώδες καρκίνωμα	ΘΗΛΥ	48
4	Μικροθυλακιώδες καρκίνωμα	ΘΗΛΥ	43
5	Θηλώδες καρκίνωμα θυλακιδούς τύπου	ΑΡΡΕΝ	50
6	Μυελοειδές καρκίνωμα	ΘΗΛΥ	55
7	Μικροδιηθητικό θυλακιώδες (Hurtle cell) καρκίνωμα	ΑΡΡΕΝ	43
8	Θηλώδες μικροκαρκίνωμα	ΘΗΛΥ	48
9	Θηλώδες καρκίνωμα με θυλακιώδη διαμόρφωση	ΘΗΛΥ	43
10	Θυλακιώδες καρκίνωμα	ΘΗΛΥ	47
11	Πανεστιακό θηλώδες καρκίνωμα με θυλακιώδη διαμόρφωση	ΘΗΛΥ	45
12	Θηλώδες καρκίνωμα με θυλακιώδη διαμόρφωση	ΘΗΛΥ	52
13	Θυλακιώδες (occult) αδenoκαρκίνωμα	ΘΗΛΥ	83
14	Θηλώδες καρκίνωμα με θυλακιώδη διαμόρφωση	ΘΗΛΥ	28
15	Θηλώδες μικροκαρκίνωμα (occult)	ΘΗΛΥ	48
16	Πανεστιακό θηλώδες αδenoκαρκίνωμα με θυλακιώδη διαμόρφωση	ΑΡΡΕΝ	67
17	Θηλώδες καρκίνωμα με θυλακιώδη διαμόρφωση	ΘΗΛΥ	33
18	Θηλώδες καρκίνωμα με θυλακιώδη διαμόρφωση	ΘΗΛΥ	30
19	Πολυεστιακό Θηλώδες καρκίνωμα με θυλακιώδη διαμόρφωση	ΘΗΛΥ	56
20	Θηλώδες αδenoκαρκίνωμα ενίοτε με ασαφώς θυλακιώδη διαμόρφωση	ΘΗΛΥ	47
21	Θηλώδες καρκίνωμα με θυλακιώδη διαμόρφωση	ΘΗΛΥ	40

22	Θηλώδες καρκίνωμα με θυλακιώδες πρότυπο ανάπτυξης	ΘΗΛΥ	66
23	Πολλαπλή εντόπιση Θηλώδες καρκίνωμα με θυλακιώδη διαμόρφωση	ΑΡΡΕΝ	26
24	Θηλώδες καρκίνωμα με θυλακιώδη διαμόρφωση	ΑΡΡΕΝ	56
25	Μυελοειδές καρκίνωμα με πολύμορφο(αναπλαστικό)πρότυπο ανάπτυξης	ΘΗΛΥ	57
26	Θηλώδες καρκίνωμα με θυλακιώδη διαμόρφωση	ΘΗΛΥ	56
27	Θηλώδες καρκίνωμα εν μέρει θυλακιώδους τύπου	ΘΗΛΥ	61
28	Θηλώδες καρκίνωμα με θυλακιώδη διαμόρφωση	ΘΗΛΥ	58
29	Καρκίνωμα χαμηλής διαφοροποίησης	ΘΗΛΥ	74
30	Θηλώδες καρκίνωμα με θυλακιώδη διαμόρφωση	ΘΗΛΥ	69
31	Πολυεστιακό θυλακιώδες αδενοκαρκίνωμα	ΘΗΛΥ	76

Οι ασθενείς ήταν και των δύο φύλων (26 γυναίκες – 5 άνδρες) και οι ηλικίες τους κυμαίνονταν από 26 – 83 ετών με μέσο όρο ηλικία εμφάνισης τα 52,58 έτη για τις γυναίκες και τα 48,4 έτη για τους άνδρες .

Συνολικά, τα δείγματα που μελετήθηκαν αφορούν 3 περιστατικά με θηλώδες καρκίνωμα θυρεοειδούς, 20 περιστατικά με θηλώδες καρκίνωμα με θυλακιώδη πρότυπο ανάπτυξης, 5 περιστατικά με θυλακιώδες καρκίνωμα, 2 περιστατικά με μυελοειδές καρκίνωμα και 1 περιστατικό με καρκίνωμα χαμηλής διαφοροποίησης. Η συχνότητα εμφάνισης των διαφορετικών τύπων καρκινωμάτων στη μελέτη αυτή είναι αντιπροσωπευτική της συχνότητας εμφάνισής τους στο γενικό πληθυσμό, όπως φαίνεται στον Πίνακα .

Πίνακας 3: Συχνότητα εμφάνισης κακοηθιών θυρεοειδούς αδένων στο γενικό πληθυσμό αλλά και στην έρευνα.

ΤΥΠΟΣ ΚΑΡΚΙΝΟΥ	ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ ΕΜΦΑΝΙΣΗΣ ΣΤΟ ΓΕΝΙΚΟ ΠΛΗΘΟΣΜΟ	ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ ΕΜΦΑΝΙΣΗΣ ΣΤΗΝ ΕΡΕΥΝΑ
Θηλώδες καρκίνωμα	80-85%	74,19%
Θυλακιώδες καρκίνωμα	5-10%	16,13%
Μυελοειδές καρκίνωμα	2-4%	6,45%
Αδιαφοροποίητο – Αναπλαστικό καρκίνωμα	2-5%	0%
Χαμηλής διαφοροποίησης καρκίνωμα	2-7%	3,23%

Πίνακας 4: Ανάλυση περιστατικών που μελετήθηκαν στην έρευνα βάση τύπου, φύλου και ηλικίας.

ΤΥΠΟΣ - ΥΠΟΤΥΠΟΣ ΚΑΡΚΙΝΟΥ	ΦΥΛΟ	Μ.Ο. ΗΛΙΚΙΑΣ ΕΜΦΑΝΙΣΗΣ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ
Θηλώδες καρκίνωμα	A: -- Θ: 3	---- 48	3
Θηλώδες καρκίνωμα με θυλακιώδη διαμόρφωση	A: 4 Θ: 16	49,75 49,25	20
Θυλακιώδες καρκίνωμα	A: 1 Θ: 4	43 62,25	5
Μυελοειδές καρκίνωμα	A: --- Θ: 2	--- 56	2
Χαμηλής διαφοροποίησης καρκίνωμα	A: --- Θ: 74	--- 74	1

2. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA ΑΠΟ ΒΙΟΨΙΕΣ ΑΣΘΕΝΩΝ

Η απομόνωση του DNA έγινε από δείγματα βιοψίας καρκίνου που μετά από φixάρισμα σε φορμόλη έχουν εγκλειστεί σε block παραφίνης με τη χρήση του kit Clart® human papillomavirus 2, genotyping of human papillomavirus via genomic identification for in vitro diagnosis της εταιρείας GENOMICA σύμφωνα με τις οδηγίες του παρασκευαστή.

Από κάθε block κόπηκαν 4-5 τομές σε ροδέλες, πάχους 30 μm και φυλάχθηκαν σε αποστειρωμένο eppendorf του 1,5 ml (microcentrifuge tube), για αποφυγή επιμολύνσεων, φύλαξη αλλά και μακροχρόνια χρήση. Στη συνέχεια προστέθηκε 1ml ξυλόλης σε κάθε σωληνάριο, με στόχο να γίνει η αποπαραφίνωση του δείγματος, πραγματοποιήθηκε επώαση με τη ξυλόλη για περίπου 10 δευτερόλεπτα και με μια πιπέτα αφαιρέθηκε προσεκτικά όλο το υγρό. Ακολούθησε προσθήκη καθαρής αιθανόλης, ανακίνηση σε Vortex (Vortex – Genie 2, Scientific Industries) για 10 δευτερόλεπτα, φυγοκέντρηση (Thermo Scientific, MicroCL 17 Centrifuge) για 1 λεπτό σε 12.000 rpm (στροφές ανά λεπτό) και προσεκτική αφαίρεση της περίσσειας αιθανόλης. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε σύντομο ξέπλυμα του ιζήματος με απεσταγμένο νερό, με σκοπό την απομάκρυνση των υπολειμμάτων της αιθανόλης, που πιθανώς να δράσουν αδρανοποιώντας το ένζυμο πρωτεϊνάση K που θα προστεθεί στο επόμενο στάδιο.

Στη συνέχεια προστέθηκαν 180 μl Διαλύματος T1 (Solution T1) από το kit της GENOMICA και 25 μl από διάλυμα πρωτεϊνάσης K (η λυοφιλιωμένη πρωτεϊνάση K που περιέχεται στο kit διαλύθηκε σε αποστειρωμένο απιονισμένο νερό ώστε η συγκέντρωση του διαλύματος να είναι 20 mg/ml) . Τα δείγματα σε Vortex και επώαστηκαν στους 56 °C σε Thermoblock (Thermomixer Comfort) με συνεχή

ανακίνηση, για όλη τη διάρκεια της νύχτας. Η πρωτεΐνάση K προκαλεί πλήρης λύση του κάθε δείγματος υπό συνθήκες μετουσίωσης και επειδή τα δείγματα προέρχονται από ιστούς εγκλεισμένους σε block παραφίνης, η διαδικασία αυτή διαρκεί όλη νύχτα, ιδανικά 24 ώρες.

Την επόμενη μέρα προστέθηκαν 200 μl buffer B3 (έγινε μεταφορά του Buffer B1 των 12 ml στο Buffer B2 των 3 ml και ανάμιξη των δύο buffer ώστε να δημιουργηθεί το buffer B3), έγινε ανακίνηση σε vortex και στη συνέχεια για 10 λεπτά τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε υδατόλουτρο 70° C. Το buffer B3 σταματάει το προηγούμενο στάδιο, τη δράση της πρωτεΐνάσης K. Ακολούθως προστέθηκαν 210 μl αιθανόλης 96% και τα δείγματα ανακινήθηκαν κατευθείαν σε vortex. Έπειτα, αφού είχε ετοιμαστεί μια στήλη καθαρισμού (purifying column) για κάθε δείγμα πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση για 1 λεπτό στις 12.000 rpm ώστε το γενωμικό DNA να δεσμευτεί στη στήλη. Μετά από προσθήκη 500 μl Διαλύματος BW (Solution BW, wash buffer) έγινε φυγοκέντρηση για 1 λεπτό στις 12.000 rpm και απορρίφθηκε το διάλυμα που μεταφέρθηκε στο σωληνάριο. Στη συνέχεια προστέθηκαν 600 μl Solution B5 (πριν τη χρήση του, είχε γίνει προσθήκη σε ολόκληρο το διάλυμα 28 ml από αιθανόλη 100%) και τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν για 1 λεπτό στις 12.000 rpm. Το διάλυμα B5 "καθαρίζει" το δείγμα από το διάλυμα πλύσης BW (Solution BW, wash buffer). Ακολούθησαν δυο ακόμα φυγοκεντρήσεις του ενός λεπτού σε 12.000 rpm. Αυτή η διπλή φυγοκέντρηση ήταν απαραίτητη ώστε να απομακρυνθεί όλη η ποσότητα του Solution B5 γιατί αλλιώς μπορεί να αναστείλει κάποια από τις επόμενες ενζυματικές αντιδράσεις.

Τέλος, η στήλη μεταφέρθηκε σε νέο καθαρό microcentrifuge tube, έγινε προσθήκη 100 μl διαλύματος BE (αφού πρώτα είχε προθερμανθεί στους 70° C) για 1 λεπτό και ξανά φυγοκέντρηση για 1 λεπτό στις 12.000 rpm. Το DNA που απομονώθηκε στο σωληνάριο αποθηκεύθηκε και συντηρήθηκε στους -20° C για μελλοντική χρήση.

3. ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ

3.A. Αρχή της μεθόδου

Η τεχνική της Αλυσιδωτής Αντίδρασης της Πολυμεράσης (Polymerase Chain reaction, PCR) πρωτοεφαρμόστηκε από την ομάδα των ερευνητών Mullis, Fallona και Saiki της εταιρείας Cetus και αποτελεί αναμφίβολα επανάσταση στην βιοτεχνολογία με ευρύτατο φάσμα εφαρμογών.

Με την PCR επιτυγχάνεται η σύνθεση και ο πολλαπλασιασμός ενός τμήματος DNA, ανεξαρτήτου προελεύσεως, "in vitro". Σε χρονικό διάστημα ολίγων ωρών, η συγκεκριμένη περιοχή του DNA που επεκτείνεται (DNA στόχος), πολλαπλασιάζεται σε ένα μεγάλο αριθμό αντιγράφων. Ο αριθμός των αντιγράφων εξαρτάται από τον

αριθμό των κύκλων της αντίδρασης. Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στην κινητική επανασύνδεσης των αποδιαταγμένων συμπληρωματικών αλυσίδων του δίκλωνου νουκλεϊκού οξέος, που ανέπτυξαν οι Britten και Kohne στα τέλη της δεκαετίας του '60.

Το DNA στόχος, πολλαπλασιάζεται μετά από πολλαπλές αντιγραφές, σε σημείο που να είναι ανιχνεύσιμο. Το DNA στόχος αποτελεί το πρότυπο DNA στην αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης και ως αφετηρίες χρησιμοποιούνται 2 συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια (18-22 βάσεων) που έχουν δομή συμπληρωματική προς τις πλευρικές αλληλουχίες του DNA στόχου, το καθένα αντίστοιχα προς τον ένα κλώνο του στόχου και με αντίθετη κατεύθυνση.

Το *πρώτο στάδιο* της αντίδρασης PCR είναι η μετουσίωση του DNA στόχου κατά την οποία το δίκλωνο DNA μετατρέπεται σε μονόκλωνο. Στη συνέχεια συνδέονται «υβριδίζονται» τα δύο συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια τα οποία καλούνται εκκινητές ή και “primers” στις δύο πλευρές του DNA στόχου, στους αντίστοιχους κλώνους DNA (*2ο στάδιο*). Με τη δράση του ενζύμου Taq DNA πολυμεράσης προστίθενται συμπληρωματικές βάσεις δεοξυριβονουκλεοτιδίων στο 3' άκρο κάθε εκκινητού (primer) και η αλυσίδα επεκτείνεται (*3ο στάδιο*). Έτσι σχηματίζονται δύο καινούργιοι κλώνοι DNA συμπληρωματικοί προς αυτές των δύο κλώνων του προτύπου DNA με αποτέλεσμα το διπλασιασμό του DNA στόχου.

Η σειρά των τριών σταδίων, μετουσίωση (denaturation), υβριδισμού των εκκινητών (primers annealing) και επέκτασης των εκκινητών με τη σύνθεση καινούργιου κλώνου (extension), αποτελούν 1 κύκλο της αντίδρασης PCR.

Όλη η αντίδραση PCR ολοκληρώνεται στο ίδιο μείγμα αντιδραστηρίων, για το οποίο απαιτούνται: DNA στόχος, εκκινητές “primers”, τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια, ένζυμο Taq DNA πολυμεράση, ιόντα Mg^{++} απαραίτητα για την ενζυμική δράση και κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα pH ≈ 8.2 για τη δράση του ενζύμου.

Το ένζυμο Taq DNA είναι μια θερμοσταθερή DNA πολυμεράση η οποία απομονώθηκε από το βακτήριο *Thermus aquaticus* (Taq) και έχει την ιδιότητα να είναι ενεργό ακόμη και στους $+95^{\circ} C$, θερμοκρασία η οποία απαιτείται για τη μετουσίωση του DNA στόχου, επί τουλάχιστον 30 λεπτά.

Στο τέλος του πρώτου κύκλου της αντίδρασης οι κλώνοι του DNA στόχου είναι πλέον 4 και αποτελούν τα πρότυπα για τη σύνθεση νέων κλώνων DNA στο 2ο κύκλο. Στο τέλος του 2ου κύκλου οι κλώνοι θα είναι 8 και αυξάνοντας τον αριθμό των κύκλων, αυξάνει εκθετικά και ο αριθμός των ανατύπων του στόχου DNA, διότι οι κλώνοι που σχηματίζονται χρησιμοποιούνται ως πρότυπο στον επόμενο κύκλο. Με

αυτόν τον τρόπο επιτυγχάνεται μεγέθυνση του DNA στόχου, 2^n όπου n ο αριθμός των κύκλων.

Κάθε κύκλος PCR περιλαμβάνει τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες για τα 3 στάδια, μετουσίωσης, υβριδισμού και επέκτασης. Η μετουσίωση του DNA επιτυγχάνεται συνήθως σε θερμοκρασία 94-95° C για 30 δευτερόλεπτα περίπου, ο υβριδισμός ανάλογα με τη σύνθεση των βάσεων A/T, G/C των εκκινητών σε θερμοκρασία 50-65° C επί 20 δευτερόλεπτα έως 1 λεπτό και τέλος η επέκταση των εκκινητών στους 72-74°C επί 30 δευτερόλεπτα έως 1 λεπτό ανάλογα του μεγέθους του προϊόντος της PCR και της ποιότητας της Taq DNA πολυμεράσης.

Οι εναλλαγές της θερμοκρασίας ανάμεσα σε κάθε κύκλο επιτυγχάνονται με αυτοματοποιημένες συσκευές, τους θερμοκυκλοποιητές, οι οποίοι έχουν την ικανότητα να ανεβοκατεβάζουν τη θερμοκρασία μεταξύ των τριών προαναφερομένων θερμοκρασιών.

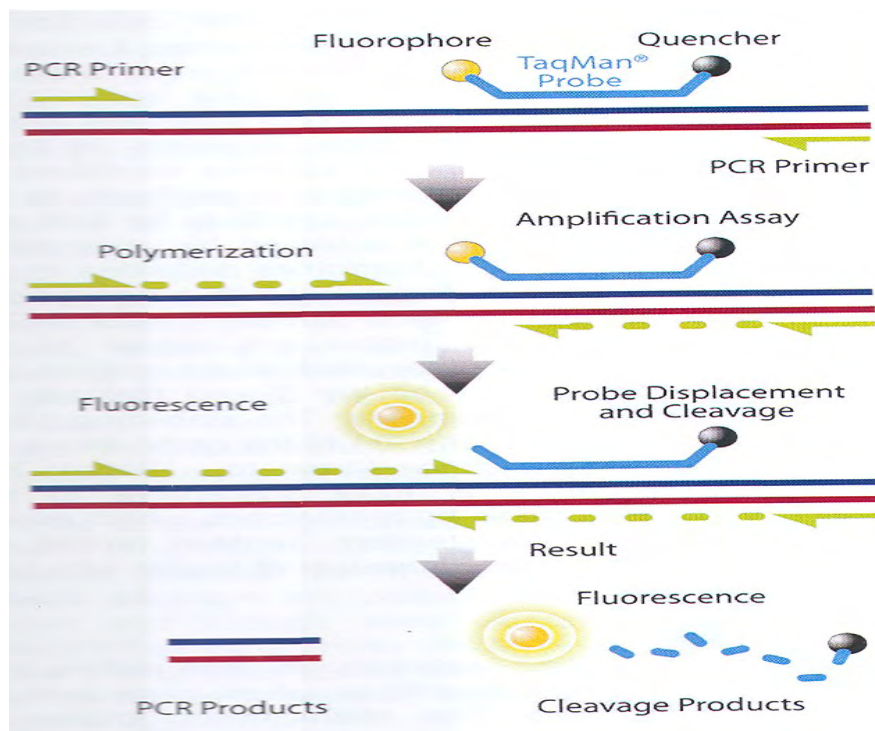
Το DNA στόχος είναι δυνατόν να προέρχεται από ποικιλία δειγμάτων και μάλιστα σε μη καθαρή μορφή. Συνήθως 100 ng ολικού DNA είναι αρκετά για να επιτευχθεί ο γονιδιακός πολλαπλασιασμός του DNA στόχου. Προϋπόθεση για τον πολλαπλασιασμό του DNA στόχου είναι η ακεραιότητά του. Κατά συνέπεια ακόμα και θραύσματα (τμήματα) γενετικού υλικού π.χ. ιού, βιολογικά αδρανή, είναι δυνατόν να ανιχνευθούν με την PCR.

Η αλληλουχία βάσεων του DNA στόχου είναι δυνατόν να είναι άγνωστη, θα πρέπει όμως η αλληλουχία βάσεων των πλευρικών περιοχών του DNA στόχου να είναι γνωστή ώστε να κατασκευασθούν τα συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια (primers).

3.B. PCR πραγματικού χρόνου (real time PCR)

Σημαντική εξέλιξη στην PCR αποτελεί σήμερα η δυνατότητα παρακολούθησης της αντίδρασης σε πραγματικό χρόνο (real time PCR). Σε αυτή τη μέθοδο ένα ειδικό ολιγονουκλεοτίδιο-ανιχνευτής ιχνηθετείται στο 5' άκρο του με ένα φθορίζον μόριο-ανταποκριτή (reporter molecule) και στο 3' άκρο του με ένα μόριο-αποσβέστη (quencher molecule).

Όταν κατά την PCR οι εκκινητές συνδέονται με την αλληλουχία-στόχο, τότε το ολιγονουκλεοτίδιο-ανιχνευτής καταστρέφεται από την DNA πολυμεράση, λόγω της ταυτόχρονης δράσης της ως 5-εξωνουκλεάση. Μέσω της δράσης αυτής απομακρύνεται το φθορίζον μόριο ανταποκριτής από το μόριο αποσβέστη με αποτέλεσμα την παρουσία σήματος φθορισμού, το οποίο και αυξάνεται ανάλογα με την αρχική ποσότητα του DNA στόχου στο δείγμα (Εικόνα 13).



Εικόνα 13: Διαδικασία Real – Time PCR

3.Γ. Πειραματική διαδικασία

Για την ανίχνευση των μεταλλάξεων των γονιδίων K-RAS και BRAF χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της Real – Time PCR και συγκεκριμένα το 'The KRAS/BRAF Mutation Analysis Kit for in vitro diagnostic use' της εταιρείας EntroGen Inc. Αναλυτικά για κάθε ασθενή ελέγχθηκαν μία μετάλλαξη για το BRAF (V600E) και 11 μεταλλάξεις για το γονίδιο K-RAS ειδικότερα οι: KRAS 12 (CGT), 12 (TGT), 12 (AGT), 12 (GTT), 12 (GCT), 12 (GAT), KRAS 13 (GAC), και KRAS 61 (CGA), 61 (CAC), 61 (CAT), 61 (CTA).

Πίνακας 5: Γονίδια και μεταλλάξεις που μελετήθηκαν

Γονίδιο	Μετάλλαξη	Αλλαγή αμινοξέος
KRAS	12GGT>AGT	G12S
KRAS	12GGT>GAT	G12D
KRAS	12GGT>GTT	G12V
KRAS	12GGT>TGT	G12C
KRAS	12GGT>GCT	G12A
KRAS	12GGT>CGT	G12R
KRAS	13GGC>GAC	G13D
KRAS	61CAA>CAT	Q61H
KRAS	61CAA>CTA	Q61L
KRAS	61CAA>CGA	Q61R
KRAS	61CAA>CAC	Q61H
BRAF	600GTG>GAG	V600E

Αρχικά φυγοκεντρήθηκαν για 10 δευτερόλεπτα στις 10.000 rpm τα αντιδραστήρια primer mix, 2X PCR reaction mix και positive control mix που περιέχονται στο kit και στη συνέχεια αναμείχθηκαν σύμφωνα με τις ποσότητες που δίνονται στον πίνακα 5:

Πίνακας 6: Αντιδραστήρια και ποσότητες ανά well

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	ΌΓΚΟΣ (μl/well)
2X PCR reaction mix	15
Primer mix	6
Δείγμα DNA (θετικός μάρτυρας, αρνητικός μάρτυρας, δείγμα ασθενούς)	1
Molecular grade water	8
Τελικός όγκος	30

Πίνακας 7: Συνολικές ποσότητες ανά ασθενή

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	μl/δείγμα
Master mix	183 μl
Θετικό μάρτυρας ή αρνητικός μάρτυρας ή δείγμα DNA	12,2 μl
H ₂ O	97,6 μl

Όπου για αρνητικό μάρτυρα χρησιμοποιήθηκε απεσταγμένο νερό, για το δείγμα DNA χρησιμοποιήθηκε το δείγμα DNA του κάθε ασθενούς και για θετικό μάρτυρα χρησιμοποιήθηκε δείγμα DNA που φέρει τη μετάλλαξη και παρέχεται στο Kit.

Οι ποσότητες που αναγράφονται στον πίνακα 6 είναι για το σύνολο των μεταλλάξεων (12) ανά ασθενή. Οι ποσότητες είναι λίγο αυξημένες ώστε να υπολογίζεται το λάθος από τις πιπέτες.

Αφού έγινε η ανάμιξη όλων των αντιδραστηρίων ακολούθησε ανακίνηση σε vortex και έπειτα φυγοκέντρηση για 10 δευτερόλεπτα στις 10.000 rpm. Στη συνέχεια προστέθηκαν 24 μl από το master mix σε κάθε πηγαδάκι ανά οριζόντια σειρά (η κάθε οριζόντια σειρά αντιπροσωπεύει έναν ασθενή, άρα μια πλάκα με 96 πηγαδάκια αντιστοιχεί σε 6 ασθενείς, ένα θετικό και έναν αρνητικό μάρτυρα ενώ η κάθε κάθετη σειρά αντιστοιχεί στην κάθε μετάλλαξη). Μετά προστέθηκαν 6 μl από κάθε εκκινητή (που αντιπροσωπεύει την πιθανή μετάλλαξη), ακολούθησε πιπετάρισμα αρκετές φορές ώστε να γίνει καλή ανάμιξη των αντιδραστηρίων και στη συνέχεια η πλάκα καλύφθηκε με το φιλμ. Τέλος η πλάκα τοποθετήθηκε στο θερμικό κυκλοποιητή (7500 Fast Real – Time PCR System, AB Applied Biosystems) και τα δείγματα υποβλήθηκαν στο παρακάτω πρόγραμμα.

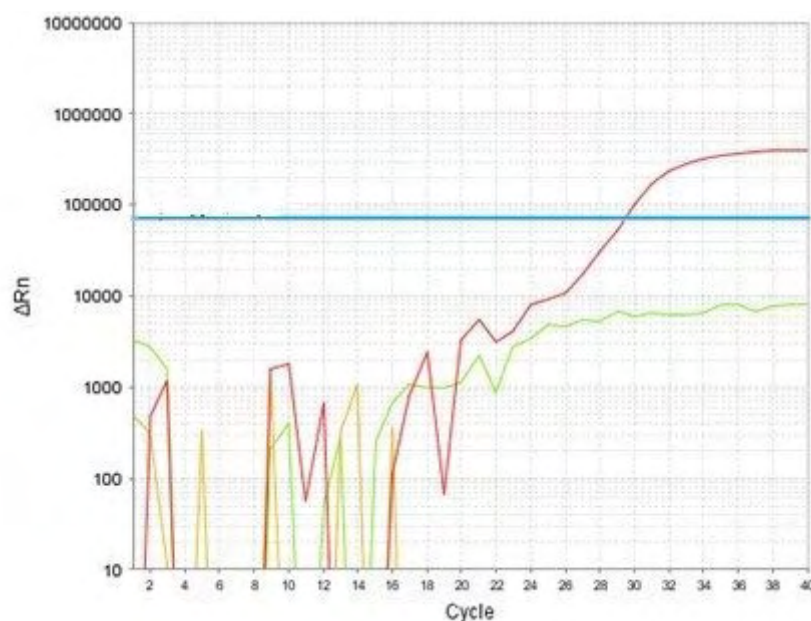
ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ	ΧΡΟΝΟΣ	ΚΥΚΛΟΙ
95 °C	10 λεπτά	X1
95 °C	30 δευτερόλεπτα	X40
64 °C	60 δευτερόλεπτα	

Μετά το πέρας του προγράμματος τα δείγματα αναλύθηκαν με το λογισμικό της εταιρείας που παρέχεται στον συνολικό εξοπλισμό (ABI Prism®7500 Instrument (SDS Software version 2.0.3).

Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Η ανάλυση των δειγμάτων για τις 11 μεταλλάξεις του γονιδίου KRAS (κωδικόνια 12, 13 και 61) με τη μέθοδο της Real – Time PCR έδειξε ότι όλα τα δείγματα ήταν αρνητικά.

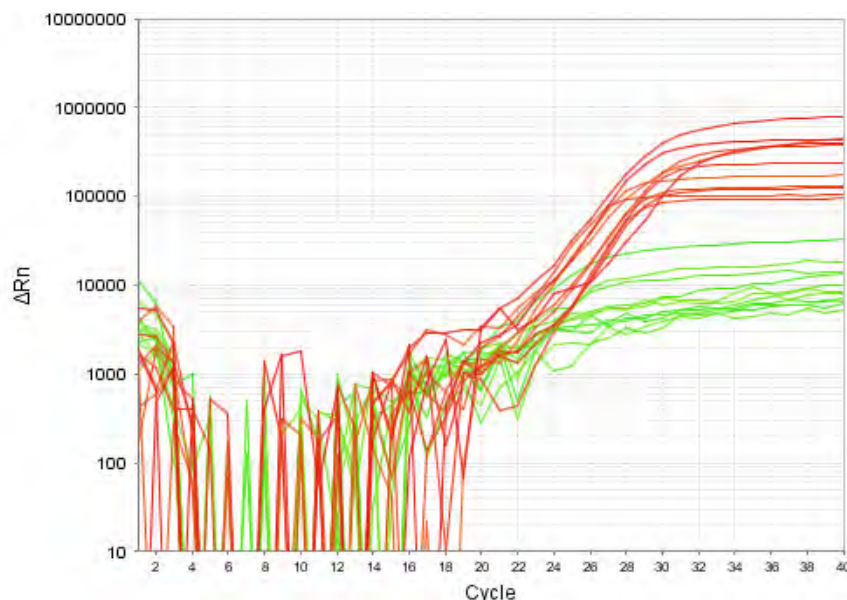
Ενδεικτικά στην εικόνα 14 απεικονίζεται γραφικά το αποτέλεσμα της RT-PCR για την ανίχνευση της μετάλλαξης του γονιδίου KRAS στο κωδικόνιο 12 (GGT>AGT) για το δείγμα #1. Η εικόνα είναι το γράφημα ενίσχυσης (amplification plot) και παριστάνει την μεταβολή του ΔRn σε συνάρτηση με τον αριθμό των κύκλων της PCR. Με το πορτοκαλί χρώμα απεικονίζεται το δείγμα αρνητικού ελέγχου (που δεν περιλαμβάνει DNA), με το κόκκινο το δείγμα θετικού ελέγχου (positive control), που είναι δείγμα που παρέχεται από την εταιρεία και φέρει τη συγκεκριμένη μετάλλαξη και με την πράσινη γραμμή το δείγμα #1. Όπως φαίνεται το δείγμα #1 είναι αρνητικό για τη συγκεκριμένη μετάλλαξη.



Εικόνα 14 : Γράφημα ενίσχυσης (amplification plot) για το δείγμα #1 (πράσινο), δείγμα αρνητικού ελέγχου (πορτοκαλί) και δείγμα θετικού ελέγχου (κόκκινο) για την ανίχνευση της μετάλλαξης KRAS (κωδικόνιο 12: AGT). Το δείγμα #1 είναι αρνητικό για τη συγκεκριμένη μετάλλαξη.

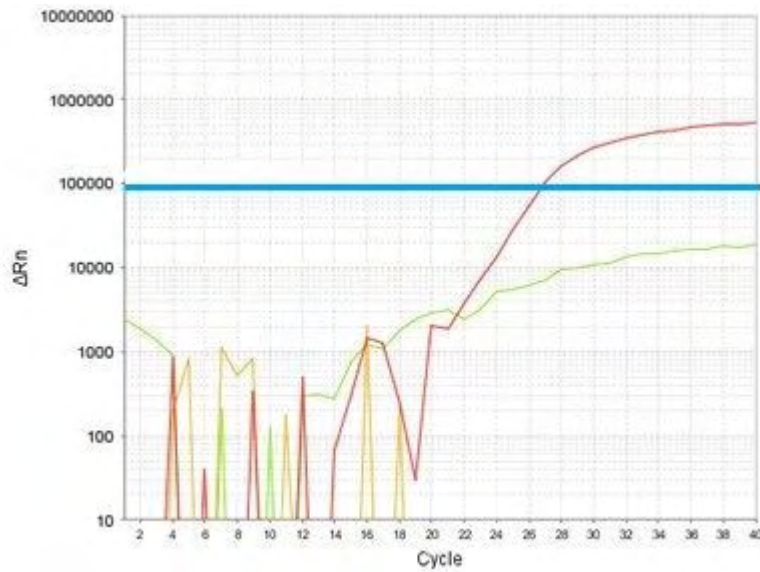
Στην εικόνα 15 απεικονίζεται το γράφημα ενίσχυσης (amplification plot) για το δείγμα #1, για το οποίο ελέγχθησαν 11 μεταλλάξεις του γονιδίου KRAS (πράσινο), συγκριτικά με δείγματα θετικού ελέγχου που φέρουν τις συγκεκριμένες μεταλλάξεις (κόκκινο). Το δείγμα αυτό είναι αρνητικό για τις μεταλλάξεις AGT, GAT, GTT, TGT,

GCT, CGT του κωδικονίου 12, τη μετάλλαξη GAC του κωδικονίου 13 και τις μεταλλάξεις CAT, CTA, CGA, CAC των κωδικονίου 61.



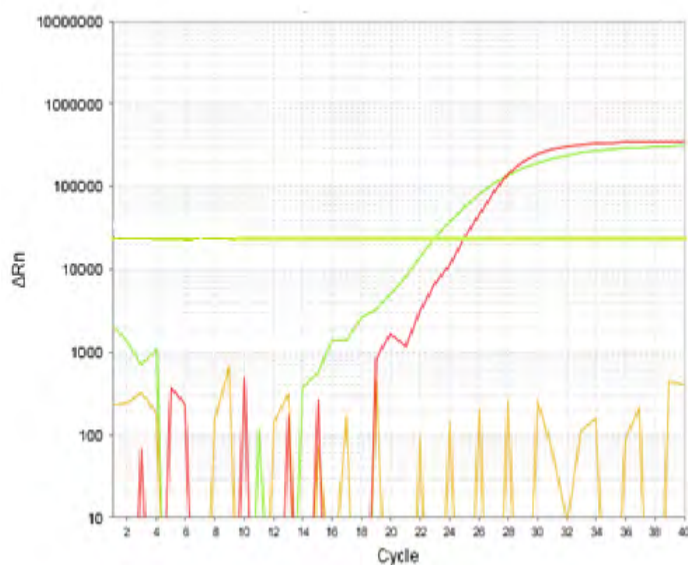
Εικόνα 15: Γράφημα ενίσχυσης (amplification plot) για το δείγμα #1, που περιλαμβάνει με πράσινο τις 11 μεταλλάξεις στα κωδικόνια 12, 13 και 61, του γονιδίου KRAS, και με το κόκκινο, όλα τα δείγματα θετικού ελέγχου που φέρουν τις μεταλλάξεις. Το δείγμα #1 είναι αρνητικό για όλες τις μεταλλάξεις.

Η ανάλυση των δειγμάτων για τη μετάλλαξη του BRAF (κωδικόνιο 600: GAG) με τη μέθοδο της Real – Time PCR ταυτοποίησε μόνο ένα θετικό δείγμα. Ενδεικτικά στην εικόνα 16 απεικονίζεται το γράφημα ενίσχυσης για το δείγμα #30, το οποίο δεν φέρει τη μετάλλαξη GAG στο κωδικόνιο 600 του BRAF. Με κόκκινο αντιπροσωπεύεται το δείγμα θετικού ελέγχου (positive control) που παρέχεται από την εταιρεία και φέρει τη συγκεκριμένη μετάλλαξη, με πορτοκαλί το δείγμα αρνητικού ελέγχου (που δεν περιλαμβάνει DNA) και με πράσινο το δείγμα #30.



Εικόνα 16: Γράφημα ενίσχυσης (amplification plot) για το δείγμα #30 (πράσινο), δείγμα αρνητικού ελέγχου (πορτοκαλί) και δείγμα θετικού ελέγχου (κόκκινο) για την ανίχνευση της μετάλλαξης BRAF (κωδικόνιο 600: GAG). Το δείγμα #30 είναι αρνητικό για τη συγκεκριμένη μετάλλαξη.

Η εικόνα 17 αφορά στο δείγμα #17 το οποίο ήταν και το μόνο θετικό στη μετάλλαξη του BRAF (κωδικόνιο 600 GAG). Με το κόκκινο αντιπροσωπεύεται το δείγμα θετικού ελέγχου (positive control) που φέρει τη μετάλλαξη, με πορτοκαλί το δείγμα αρνητικού ελέγχου (negative control) και με πράσινο το δείγμα #17. Το δείγμα αφορά σε ένα θηλώδες καρκίνο του θυρεοειδούς, και συγκεκριμένα στον υπότυπο του που έχει θυλακιώδη διαμόρφωση και προήλθε από μια γυναίκα ηλικίας 33 ετών.



Εικόνα 17: Γράφημα ενίσχυσης (amplification plot) για το δείγμα #17 (πράσινο), δείγμα αρνητικού ελέγχου (πορτοκαλί) και δείγμα θετικού ελέγχου (κόκκινο) για την ανίχνευση της μετάλλαξης BRAF (κωδικόνιο 600: GAG). Το δείγμα #17 είναι θετικό για τη συγκεκριμένη μετάλλαξη.

Συνολικά, στην παρούσα εργασία η μετάλλαξη BRAF (V600E) ανιχνεύθηκε σε ποσοστό 4,3% επί του συνόλου των θηλωδών καρκινωμάτων που μελετήθηκαν, ενώ δεν ανιχνεύθηκε καμιά μετάλλαξη στα κωδικόνια 12, 13 και 61 του γονιδίου KRAS σε όλα τα δείγματα.

Δ. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο καρκίνος του θυρεοειδούς είναι η πιο κοινή ενδοκρινική κακοήθεια και η συχνότητά του αυξάνεται σταθερά τις τελευταίες δεκαετίες. Σύμφωνα με ιστοπαθολογικά χαρακτηριστικά, οι διαφορετικοί τύποι ταξινομούνται σε θηλώδη, θυλακιώδη, αναπλαστικά, μυελοειδή και καρκινώματα χαμηλής διαφοροποίησης. Επιπλέον, έχουν ταυτοποιηθεί ποικίλες παραλλαγές μεταξύ των παραπάνω τύπων, όπως το θηλώδες καρκίνωμα του θυλακιώδους υποτύπου. Η κατανόηση της μοριακής παθογένεσης και η ταυτοποίηση μοριακών δεικτών, που θα χρησιμοποιηθούν για τη διάγνωση και την πρόγνωση του θυρεοειδούς καρκίνου, είναι μεγάλης κλινικής σημασίας. Προηγούμενες μελέτες έχουν αναδείξει ότι γενετικές μεταλλάξεις που έχουν ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του μονοπατιού σηματοδότησης των MAP κινασών (MAPK), συμβάλλουν στην παθογένεση του θυρεοειδούς καρκίνου. Αυτές περιλαμβάνουν σημειακές μεταλλάξεις στο γονίδιο BRAF και στα γονίδια RAS, καθώς και τις γενετικές αναδιατάξεις μεταξύ των RET / PTC και PAX8 / PPARγ (Nikiforova et al., 2003; Nikiforov et al., 2013).

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η συσχέτιση σημειακών μεταλλάξεων των γονιδίων BRAF και KRAS με τους διαφορετικούς τύπους καρκινωμάτων του θυρεοειδούς στον Ελληνικό πληθυσμό. Χρησιμοποιήθηκαν 31 δείγματα ασθενών (ανδρών και γυναικών), τα οποία προήλθαν από το Στρατιωτικό Νοσοκομείο ΝΙΜΙΤΣ της Αθήνας. Τα δείγματα περιελάμβαναν διαφορετικούς τύπους καρκινωμάτων του θυρεοειδούς με μία συχνότητα αντιπροσωπευτική της συχνότητας εμφάνισής τους στο γενικό πληθυσμό. Η πειραματική διαδικασία περιλάμβανε την απομόνωση γενωμικού DNA από βιοψίες ιστών, και την ανίχνευση των μεταλλάξεων με Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (RT-PCR).

Από τα 31 δείγματα ταυτοποιήθηκε ένα θετικό δείγμα που φέρει μετάλλαξη στο κωδικόνιο 600 του γονιδίου BRAF. Η μετάλλαξη αφορά την αλλαγή του κωδικονίου GTG σε GAG, που συνεπάγεται την αλλαγή του αμινοξέος βαλίνη (Val, V) σε γλουταμικό (Glu, E). Αυτή η μετάλλαξη οδηγεί σε μία συνεχή δραστηριοποίηση της κινάσης BRAF και σε μία χρόνια διέγερση του μονοπατιού των MAP κινασών, δίνοντας γένεση στην ανάπτυξη θυρεοειδικών όγκων (Xing, 2005). Η μετάλλαξη του γονιδίου BRAF βρέθηκε σε δείγμα που προήλθε από μια γυναίκα ασθενή, 33 ετών, με θηλώδες καρκίνο του θυρεοειδούς και συγκεκριμένα με τον θυλακιώδη υπότυπο. Το αποτέλεσμα αυτό συμφωνεί με την διεθνή βιβλιογραφία, όσον αφορά στην παρουσία μεταλλάξεων του γονιδίου BRAF σε θηλώδη καρκινώματα και σε υποτύπους τους. Η μετάλλαξη BRAFV600E τυπικά εντοπίζεται στον κλασικό θηλώδη καρκίνο (με ένα υψηλό ποσοστό της τάξεως του 40-50%), αλλά σπανιότερα στο θηλώδες καρκίνωμα με θυλακιώδες πρότυπο ανάπτυξης (ποσοστό 14%). Στην εργασία μας το ποσοστό εμφάνισης της μετάλλαξης BRAF αντιστοιχεί στο 4,34% του συνόλου των θηλωδών καρκινωμάτων, και είναι εξαιρετικά μικρό συγκριτικά με τη

διεθνή βιβλιογραφία. Το δείγμα με την μετάλλαξη αναλύθηκε για μεταλλάξεις των γονιδίων KRAS και NRAS (στα κωδικόνια 12, 13 και 61) και βρέθηκε αρνητικό. Το αποτέλεσμα αυτό επιβεβαιώνει την ήδη υπάρχουσα βιβλιογραφία που αναφέρει ότι σχεδόν ποτέ δεν συνυπάρχουν περισσότερες από μια μεταλλάξεις στο ίδιο δείγμα καρκίνου θυρεοειδούς (Nikiforov et al., 2011; Xing, 2013).

Όσον αφορά στην ανάλυση του γονιδίου KRAS δεν ταυτοποιήθηκε καμία μετάλλαξη στα κωδικόνια 12, 13 και 61 σε όλα τα δείγματα που μελετήθηκαν. Η εργασία αυτή περιλαμβάνει θυλακιώδη καρκινώματα και θηλώδη καρκινώματα με θυλακιώδη υπότυπο για τα οποία έχει αναφερθεί ποσοστό μεταλλάξεων στα γονίδια RAS (HRAS, KRAS, NRAS) της τάξεως του 40-50% και 10-20% αντίστοιχα (Nikiforova et al., 2003). Αν και στους περισσότερους καρκίνους φαίνεται ότι υπερσχύουν οι μεταλλάξεις στα κωδικόνια 12 και 13 του γονιδίου KRAS, στον καρκίνο του θυρεοειδούς οι πιο συχνές μεταλλάξεις αφορούν τα κωδικόνια 61 των γονιδίων HRAS και NRAS (Nikiforov, 2011). Παρ' όλο που ο αριθμός των δειγμάτων, που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή τη μελέτη, ήταν αντιπροσωπευτικός της συχνότητας εμφάνισης των διαφόρων τύπων καρκίνου του θυρεοειδούς στον ελληνικό πληθυσμό, τα αποτελέσματα αυτά θα πρέπει να αξιολογηθούν με προσοχή λόγω του μικρού αριθμού των δειγμάτων που εξετάστηκαν.

Στο σημείο αυτό είναι σημαντικό να αναφερθεί η προηγούμενη μελέτη που έγινε σε μία ομάδα ελληνικού πληθυσμού, η οποία εστιάστηκε στη μετάλλαξη του γονιδίου BRAF (κωδικόνιο 600) και του γονιδίου KRAS (κωδικόνιο 12) σε θηλώδη και μυελοειδή καρκινώματα (55 και 44 δείγματα αντίστοιχα) (Goutas et al., 2008). Η μελέτη αυτή έδειξε ότι το ποσοστό των μεταλλάξεων στο κωδικόνιο 12 του γονιδίου KRAS ήταν 54,5% για τα θηλώδη καρκινώματα, και 40,9% για τα μυελοειδή καρκινώματα. Ομοίως το ποσοστό της μετάλλαξης BRAFV600E ήταν 27,3 % για τα θηλώδη καρκινώματα και 68,2% για τα μυελοειδή καρκινώματα. Τα αποτελέσματα αναδεικνύουν μια εξαιρετική υψηλή συχνότητα των παραπάνω μεταλλάξεων σε σχέση με τη διεθνή βιβλιογραφία. Τέλος, μια ακόμα έρευνα που πραγματοποιήθηκε σε δείγματα καρκίνου του θυρεοειδούς που προήλθαν από τον ελληνικό πληθυσμό, ανέδειξε ότι η μετάλλαξη BRAFV600E απαντάται σε ποσοστό 36,2% επί του συνόλου των θηλωδών καρκινωμάτων (Mitsiades et al., 2007).

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης είναι σημαντικό να αξιολογηθούν σε επόμενη στάδιο και σε μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων καθώς όπως αναδεικνύεται από τη παρούσα έρευνα, η μοριακή παθογένεση του καρκίνου του θυρεοειδούς στον ελληνικό πληθυσμό πιθανώς να διαφέρει σε μεγάλο βαθμό από τα παγκόσμια δεδομένα και ενδεχομένως αυτό να επηρεάσει και την πρόγνωση, διάγνωση και τη θεραπευτική προσέγγιση του καρκίνου του θυρεοειδούς στη χώρα μας.

E. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Καμμάς Α., Μαθήματα Ανατομικής, Ζαχαρόπουλος, 2006
- Κανέλλος Ε., Φυσιολογία ΙΙ, Β' έκδοση, Λύχνος
- Ανθούλη – Αναγνωστοπούλου Φ., Ιστοπαθολογία με Στοιχεία Ογκολογίας, Εκδόσεις Πασχαλίδης)
- Rosai and Ackerman's, Surgical Pathology, ninth edition (2004), Elsevier Mosby
- Fletcher C.D.M. , Diagnostic histopathology of tumors, fourth edition (2013), Volume 2, pages 1177-1179, Elsevier Saunders
- Sobin Leslie, Mary Gospodarowicz, Christian Wittekind, 2009, TNM classification of malignant tumors, 7th edition, Wiley – Blackwell
- David P. Clark, Nanette J. Pazdernik, Biotechnology, Academic Cell, Update Edition, Elsevier, 2012
- Lela Buckingham, Maribeth L. Flaws, Molecular Diagnostics: Fundamentals, Methods, & Clinical Applications, E.A. Davis Company, 2007
- Chen KTK, Rosai J.,(1977). Follicular variant of thyroid papillary carcinoma: A clinicopathologic study of six cases. Am J Surg Pathol 1:123-130.
- Evans H. L., Vassilopoulou – Sellin R., (1998). Follicular and Hurthle cell carcinomas of the thyroid: a comparative study. Am J Surg Pathol 22:1512-1520.
- Carcangiu M.L., Bianchi S., Savino D., Voynick I.M., Rosai J., (1991). Follicular Hurthle cell tumors of the thyroid gland. Cancer 68:1944-53.
- Kebebew E. Ituarte PH, Siperstein AE., Duh QY, Clark OH, (2000). Medullary thyroid carcinoma: clinical characteristics, treatment, prognostic factors and a comparison of staging systems. Cancer 88(5): 1134 - 48
- Raue F. J. Kotzerke, D. Reinwein, S. Schröder, H. D. Röher, H. Deckart, R. Höfer, M. Ritter, F. Seif and more (1993). Prognostic factors in medullary thyroid carcinoma: evaluation of 741 patients from the German Medullary Thyroid Carcinoma Register. Clinical investigation 71 7-12.
- Cangariu M.L., Steep T., Zampi G., Rosai J., (1985). Anaplastic thyroid carcinoma: A study of 70 cases. Am J Surg Pathol 83 (2):135-58.
- Han J.M., Kim W.B., Ryu J.S., Gyungyub G., Suck J. H., Jung-Han K., Young L. Oh, Hye W. J., Sun W. K., Jae H. C., Young K. S., (2012). Time trend in tumour size and characteristics of anaplastic thyroid cancer. Clin Endocrinol (Oxf) 77(3): 459-64.

Haigh P.I., Ituarte P.H.G., Wu H.S., Treseler P.A., Posner M.D., Quivey J.M., Duh Q.Y., Clark O.H., (2001). Completely resected anaplastic thyroid carcinoma combined with adjuvant chemotherapy and irradiation is associated with prolonged survival. *Cancer* 91(12): 2335-42.

Asioli S., Erickson L.A., Righi A., Jin L., Volante M., Jenkins S., Papotti M., Bussolati G., Loyd R.V.,(2010). Poorly differentiated carcinoma of the thyroid: validation of the Turin proposal and analysis of IMP3 expression. *Mod Pathol* 23 (9):1269-78.

Tallini G. (2011). Poorly differentiated thyroid carcinoma. Are we there yet? *Endocr Pathol* 22:190-194.

Davies H., Bignell GR, Cox C., Stephens P., Edkins S., Clegg S., Teague J., Woffendin H., Garnett MJ, Bottomley W., Davis N., Dicks E., Ewing R., Gray K, Hall S., Kosmidou V. (2002). Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 417 (6892):949-54.

Long GV., Menzies AM, Nagrial AM, Haydu LE., Hamilton AL., Mann GJ, Hughes TM., Thompson JF, Scolyer RA, Kefford RF., (2011). Prognostic and clinicopathologic associations of oncogenic BRAF in metastatic melanoma. *J Clin Oncol* 29 (10):1239-46.

Mitsiades C. S , Nergi J., McMullan C., McMillin D.W., Sozopoulos E., Fanourakis G., Voutsinas G., Tseleni – Balafouta S., Poulaki V., Batt D., Mitsiades N.,(2007). Targeting BRAF V600E in thyroid carcinoma: therapeutic implications. *Mol Cancer Ther* 6; 1070

Sieben LG N, Macropoulos P., Roemen G.M.J.M., Kolkman – Uljee S.M., Jan Fleuren G., (2004). In ovarian neoplasma, BRAF but not KRAS mutations are restricted to low – grade serous tumours. *The Journal of Pathology* 202(3):336-40

Kurman RJ, Shih L., (2011). Molecular pathogenesis and extraovarian origin of epithelial ovarian cancer. *Hum Pathol* 42 (7): 918-31.

Lievre A., Bachet JB, Le Corre, Boige V, Landi B., Emile JF, Cote JF, Tomasic G ,Penna C , Ducreux M , Rougier P , Penault –Liocra F , Laurent – Puig P. (2006). KRAS mutation status is predictive of response to cetuximab therapy in colorectal cancer. *Cancer Res* 15;66 (8) 3992-5.

Nikiforova MN, Lynch RA, Biddinger PW, Alexander EK, Dorn GW, Tallini G , Kroll TG, Nikiforov YE (2003). RAS point mutations and PAX8-PPAR gamma rearrangement in thyroid tumors: evidence for distinct molecular pathways in thyroid follicular carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab*, 88 (5): 2318-2326.

Bhajjee F., Nikiforov YE (2011). Molecular analysis of thyroid tumors. *Endocr Pathol* 22(3):126-3.

Boch C., Kollmeier J., Roth A., Stephan – Falkenau S., Misch D., Gruning W., Bauer T.T., Mairinger T., (2013). The frequency of EGFR and KRAS mutations in non-small

cell lung cancer (NSCLC): routine screening data for central Europe from a cohort study. *BMJ Open* 3:e002560.

Lennerz J.K., Stenzinger A., (2015). Allelic ratio of KRAS mutations in pancreatic cancer. *Oncologist* 20(4): e8-9.

Sánchez-Muñoz A, Gallaego E., De Luque V., Perez – Rivals L.G., Vicioso L., Ribelles N., Loano J., Alba E., (2010). Lack of evidence for KRAS oncogenic mutations in triple – negative breast cancer. *13;10:136*.

Kompier L.C. , Lurkin I., Madelon N. M. van der Aa, Bas W. G. van Rhijn, Theo H. van der Kwast, Zwarthoff E.C.,(2010). FGFR3, HRAS, KRAS, NRAS and PIK3CA Mutations in Bladder Cancer and Their Potential as Biomarkers for Surveillance and Therapy. *PLoS One* 5(11):e13821.

Lopez F., Garcia C., Jhudit Perez E., César Á. M., Scola B., Suarez C., Llorente J.L., Hermsen M.A.(2012). KRAS and BRAF mutations in sinonasal cancer. *Oral Oncology* 48(8): 692-697.

Ferris R.L., Baloch Z., Bernet V., Chen A., Fahey T.J. III, Ganly I., Hodak S.P., Kebebew E., Patel K.N., Shaha A., Steward D.L., Tufano R.P., Wiseman S.M., Carty S.E.,(2015). American Thyroid Association Statement on Surgical Application of Molecular Profiling for Thyroid Nodules: Current Impact on Perioperative Decision Making. *Thyroid* 25(7):760-8.

Witt R.L., Ferris RL., Pribitkin E.A., Sherman S.I., Steward D.L., Nikiforov Y.E. (2013). Diagnosis and management of differentiated thyroid cancer using molecular biology. *Laryngoscope* 123(4): 1059-64.

Nikiforov YE (2011). Molecular diagnostics of thyroid tumors. *Arch Pathol Lab Med* 135 (5): 569-77.

Placzkowski K.A., Reddi H.V., Grebe S.K.G., Eberhardt N.L., McIver B.,(2008). The Role of the PAX8/PPAR γ Fusion Oncogene in Thyroid Cancer. *Mol Cell Endocrinol* 321 (1) : 50-56.

Ascierto P.A., Kirkwood J.M., Grob J.J., Simeone E., Grimaldi A.M., Maio M., Palmieri G., Testori A., Marincola F.M., Mozzillo N. (2012). The role of BRAF V600 mutation in melanoma. *J Transl Med* 9;10:85.

Puxeddu E., Moretti S., Elisei R., Romei C., Pascucci R., Martinelli M., Marino C., Avenia N., Rossi E.D., Fadda G., Cavaliere A., Ribacchi R., Falorni A., Pontecorvi A., Pacini F., Pinchera A., Santeusano F., (2004). BRAFV599E Mutation Is the Leading Genetic Event in Adult Sporadic Papillary Thyroid Carcinomas. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 89 (5):2414-2420.

Goutas N, Vlachodimitropoulos D, Bouka M, Lazaris AC, Nasioulas G, Gazouli M. (2008). BRAF and K-RAS Mutation in a Greek Papillary and Medullary Thyroid Carcinoma Cohort. *Anticancer Research*, 28: 305-308.

Shaha AR. (2007). TNM classification of thyroid carcinoma. *World J Surg* 31 (5): 879-87.

Xing M. (2005). BRAF mutation in thyroid cancer. *Endocr Relat Cancer*, 12(2): 245-262.

Cohen Y., Xing M., Mambo E., Guo Z., Wu G., Trink B., Bellr U., Westra W.H., Ladenson P.W., Sidransky D. (2003). BRAF mutation in papillary thyroid carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 95 (8): 625-7.

Zhu Z., Gandhi M., Nikiforova M.N., Fischer A.H., Nikiforov Y.E. (2003). 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* 120(1):71-7.

Nikiforov YE, Nikiforova MN (2011). Molecular genetics and diagnosis of thyroid cancer. *Nat Rev Endocrinol*, 7: 569-580.

Moses W., Weng J., Kebebew E. (2011). Prevalence, Clinicopathologic Features, and Somatic Genetic Mutation Profile in Familial Versus Sporadic Nonmedullary Thyroid Cancer. *Thyroid* 21 (4): 367-371.

Xing M. 2013. Molecular pathogenesis and mechanisms of thyroid cancer. *Nat Rev Cancer* 13(3): 184-199.

Nikiforov YE, Yip L, Nikiforova MN (2013). New strategies in diagnosing cancer in thyroid nodules: impact of molecular markers. *Clin Cancer Res*, 19(9): 2283-2288.

ΙΣΤΟΣΕΛΙΔΕΣ

www.cancergenome.nih.gov/

www.cancer.sanger.ac.uk/cosmic

<http://uicc.org>

<http://www.thyroid.org/>

<http://globocan.iarc.fr/>

www.mycancergenome.org

www.emedicine.medscape.com