

Új, NGS alapú módszer kidolgozása a pajzsmirigy hideg göbök malignizálódásának előrejelzésére

Doktori értekezés

Kocsis-Deák Barbara

Semmelweis Egyetem
Klinikai orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Lakatos Péter, DSc., egyetemi tanár

Hivatalos bírálók: Dr. Pikó Henriett, PhD., tudományos munkatárs
Dr. Péterfia Bálint Ferenc, PhD., tudományos főmunkatárs

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Buzás Edit, DSc., egyetemi tanár
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Patócs Attila, PhD., egyetemi docens
Dr. Kovács Gábor László, PhD., főorvos

Budapest
2019

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke.....	3
1. Bevezetés	6
1.1. A pajzsmirigy jelentősége.....	6
1.2. A pajzsmirigy betegségei.....	8
1.3. A pajzsmirigy tumoros elváltozásai	9
1.3.1. Differenciált pajzsmirigy daganatok	9
1.3.2. Differenciálatlan, vagyis anaplasztikus pajzsmirigy daganatok	12
1.3.3. Medullaris pajzsmirigy daganatok	12
1.4. A pajzsmirigy göbök hagyományos vizsgálati módszerei.....	13
1.4.1. Anamnézis felvétel és fizikális vizsgálat	13
1.4.2. Ultrahangvizsgálat.....	14
1.4.3. Pajzsmirigy-szcintigráfia	15
1.4.4. Vékonytű-aspirációs vizsgálat.....	16
1.5. A pajzsmirigy göbök genetikai vizsgálatai	17
1.5.1. A pajzsmirigy daganatok kialakulását befolyásoló genetikai faktorok	18
1.5.2. Géndiagnosztikai panelek	27
2. Célkitűzések.....	30
3. Módszerek.....	31
3.1. A pajzsmirigy diagnosztikájában alkalmazható széleskörű génpanel kialakítása	31
3.2. Pajzsmirigy minták gyűjtése.....	33
3.2.1. Pajzsmirigy szövetminták gyűjtése	33
3.2.2. Pajzsmirigy FNAB minták gyűjtése.....	34
3.3. Genomiális DNS izolálása	34
3.3.1. Pajzsmirigy szöveti minták.....	34
3.3.2. FNAB minták	35
3.4. Újgenerációs szekvenálás	35
3.5. Genetikai adatok elemzése.....	42
3.5.1. Szoftveres adatelemzés	42
3.5.2. Statisztikai adatelemzés	43

4.	Eredmények	45
4.1.	A vizsgált páciensek adatai	45
4.1.1.	Pajzsmirigy szöveti minták.....	45
4.1.2.	FNAB minták	46
4.2.	A szekvenálási adatok minőségi értékei	47
4.3.	A pajzsmirigy szövetminták mutációs profilja	49
4.3.1.	Tumoros szövetekben talált mutációk.....	49
4.3.2.	Szövettanilag egészséges, tumormentes szövetekben talált mutációk .	50
4.4.	A genetikai adatok statisztikai elemzése.....	51
4.4.1.	Statisztikai elemzés variánsok alapján	51
4.4.2.	Statisztikai elemzés gének alapján	55
4.5.	Vékonytű biopsziás minták mutációs profilja	58
5.	Megbeszélés.....	63
6.	Következtetések.....	73
7.	Összefoglalás	75
8.	Summary.....	76
9.	Irodalomjegyzék	77
10.	Saját publikációk jegyzéke	88
11.	Köszönetnyilvánítás	91

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

AMD	average mutation density, átlagos mutáció sűrűség
ATC	anaplastic thyroid cancer, anaplasztikus pajzsmirigy daganat
BRAF	v-RAF murine sarcoma viral oncogene homolog B, serine/threonin-protein kinase B-RAF
CCDC6	coiled-coil domain containing 6
COSMIC	Catalogue of Somatic Mutations in Cancer
CV1	single canonical variate, egyedi kanonikus változat
CVA	canonical variate analysis, diszkriminancia analízis
DNS	dezoxiribonukleinsav
DTC	differentiated thyroid cancer, differenciált pajzsmirigy daganat
EGF	epidermális növekedési faktor
eIF1a	eukarióta transzlációs iniciációs faktor 1A
emPCR	emulziós polimeráz láncreakció
EU-TIRADS	European Thyroid Imaging Reporting and Data System
FAP	familial adenomatous polyposis, familiáris adenomatózus polipózis
FGF	fibroblaszt növekedési faktor
FNAB	fine needle aspiration biopsy, vékonytű-aspirációs vizsgálat
FTA	follicular thyroid adenoma, follicularis pajzsmirigy adenoma
FTC	follicular thyroid cancer, follicularis pajzsmirigy daganat
GDP	guanosine-diphosphate, guanozin-difoszfát
GEF	guanine nucleotide exchange factor
GTP	guanosine-triphosphate, guanozin-trifoszfát
HRAS	Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog
ISP	Ion Sphere Particles, Ion Szekvenáló Részecskék, szekvenáló gyöngyök
KRAS	Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
MAPK	mitogen-activated protein kinase, mitogénaktivált proteinkináz
miRNS	microRNS
MNV	multiple nucleotide variant

MTC	medullary thyroid cancer, medullaris pajzsmirigy daganat
mTOR	mammalian target of rapamycin
n	number of pieces, darabszám
N/A	nincs adat
NCOA4	nuclear receptor coactivator 4
NGS	next generation sequencing, újgenerációs szekvenálás
NIFTP	Noninvasive follicular thyroid neoplasm with papillary-like nuclear features
NPV	net present value, negatív prediktív érték
NRAS	Neuroblastoma rat sarcoma viral oncogene homolog
PAX8	paired box 8
PBS	phosphate buffered saline, foszfáttal pufferelt sóoldat
PCR	polymerase chain reaction, polimeráz lánreakció
PI3K/AKT	phosphatidylinositole-4,5-biphosphate 3-kinase/protein kinase B, foszfatidilinozitol-4,5-biszfoszfát 3-kináz/protein kináz B
PIP3	foszforilált PI3K (phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate)
PRKAR1A	cAMP-dependent protein kinase type I-alpha regulatory subunit
PPAR γ	peroxisome proliferator activated receptor γ
PPV	positive predictive value, pozitív prediktív érték
PTC	papillary thyroid cancer, papillaris pajzsmirigy daganat
qPCR	quantitative polymerase chain reaction, valós idejű polimeráz lánreakció
RAS	Rat sarcoma
RET/PTC	rearranged during transfection / papillary thyroid cancer
RTK	receptor tirozin kináz
sec	secundum, másodperc
SNV	single-nucleotide variant
T3	triiodothyronine, trijód-tironin
T4	tetraiodothyronine / thyroxine, tetrajód-tironin / tiroxin
Tc	technetium, technécium
TIRADS	Thyroid Imaging–Reporting and Data System

UH	ultrahang
WNT	„wingless” = szárny nélküli

1. BEVEZETÉS

A pajzsmirigy egy kicsi, elhanyagolható, jelentős törődést nem igénylő szervünk, legalábbis sokan ily módon vélekednek róla, helytelenül. A pajzsmirigy az alapanyagcserét szabályozza, működése minden életfolyamatunkra hatással van, ezáltal az emberi szervezetben nélkülözhetetlen szerepet tölt be. Ha működésében bármilyen zavar áll be, egész szervezetünk normál ritmusa borul fel.

Hazánkban a pajzsmirigy betegségei a lakosság nagy hányadát érintik, ezért népbetegségnek tekintjük. A legismertebb pajzsmirigy rendellenességek (alul-és túlműködés, gyulladások) gyakori előfordulása mellett ma a pajzsmirigydaganatok incidenciája is folyamatosan növekszik világszerte. Hazánkban a pajzsmirigy-rák a leggyakrabban előforduló endokrin tumor, melyek többnyire ún. hideg göbökben alakulhatnak ki, ezek prevalenciája pajzsmirigyben 4-7% [1]; azonban e göböknek csak egy része (5-10%) válik később tumorossá.

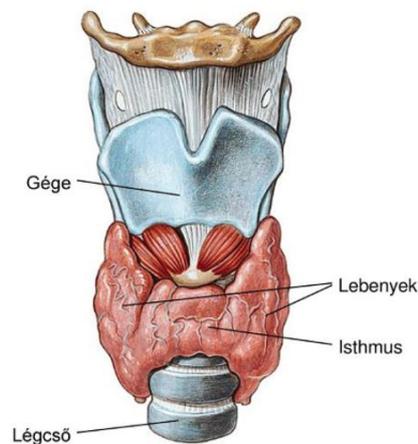
A klinikai gyakorlatban jelenleg alkalmazott eljárások sokszor csak megkésve jelzik a daganatos elváltozásokat. Napjainkban szükségessé vált egy olyan célzottabb, korai felismerést lehetővé tevő vizsgálmódszer bevezetése, mely alkalmas a klinikai diagnosztika pontosítására és a malignizálódási hajlam megítélésének segítésére is. A genetika és az informatika tudományának robbanásszerű fejlődését kihasználva nyílt meg az út a molekuláris géndiagnosztikai módszerek legújabb generációja előtt, mely teret nyújt az újgenerációs szekvenálási (NGS) technikák használatára és innovatív daganat diagnosztikai eljárások kialakítására.

1.1. A pajzsmirigy jelentősége

A pajzsmirigy (glandula thyreoidea) egy pillangó alakú, belső elválasztású mirigy, mely a nyak elülső, alsó részén, a légcső, illetve a gége előtt pajzsszerűen helyezkedik el. A felnőtt pajzsmirigy átlagos tömege kb. 15-25 gramm, és egészséges állapotban nem is változik (kivéve: terhességben, ahol növekszik a tömege) [2]. Két oldalsó, szimmetrikus lebenyből és az ezeket összekötő középső részből, az isthmusból áll (1. ábra). A mirigyet egy kötőszövetes tok veszi körül, melynek behúzódnásai kisebb,

lebenyszerű képződményekre tagolják. A funkciót tekintve a szerkezeti alapegységei a folliculusok (vagy más néven acinusok), melyek szabálytalan gömbalakú, 200-800 μm átmérőjű, egyrétegű köbhámmal (follicularis sejtek) bélelt vesiculák, bennük sűrű kolloid található.

A pajzsmirigy fő funkciója a pajzsmirigyhormonok előállítása, azok raktározása és a keringésbe való kijuttatása. A follicularis sejtek, vagy más néven thyreociták által termelt hormonok a tetrajód-tironin, azaz tiroxin (T4) és a trijód-tironin (T3). E hormonok az egész szervezetre kifejtik hatásukat: esszenciálisak a központi idegrendszer postnatalis fejlődésében, működésében, szükségesek a zavartalan postnatalis növekedésben, meghatározzák a bőr feszességét, beállítják a szervezet alap-energiaforgalmát, és közvetlen hatással vannak a szívre is. A folliculusok között a parafollicularis sejtek (C-sejtek) helyezkednek el, melyek a kalcitonin termelésért felelősek, így a pajzsmirigy a kalcium-anyagcsere szabályozásában is jelentős szerepet játszik. A pajzsmirigyhormonok legfőbb feladata, hogy képesek szabályozni a sejtek génexpresszióját és így befolyásolják a különböző anyagcsere-folyamatokat. A T4 és T3 hormonok két aromás gyűrűből (fenil- és tirozin-gyűrű) állnak, melyekhez jódatomok kapcsolódnak [2]. A jód nélkülözhetetlen a pajzsmirigyhormonok megfelelő működéséhez. A nem megfelelő jódbevitel súlyos egészségügyi problémákat okozhat. A pajzsmirigy csökkent működésének legközismertebb oka is a jódhány.



1. ábra: A pajzsmirigy elhelyezkedése és részei.

(Ábra forrása: [3])

1.2. A pajzsmirigy betegségei

A pajzsmirigy legismertebb rendellenességei közé tartozik a pajzsmirigy alul-és túlműködése (hypo-és hyperthyreosis), illetve a különböző gyulladásai (thyreoiditisek). E pajzsmirigybetegségek fordulnak elő a legnagyobb számban a populációban.

A pajzsmirigybetegségek legtöbbször a pajzsmirigy tartós, többnyire látható és tapintható megnagyobbodásával járnak együtt, melyet strúmának vagy golyvának hívunk. Megkülönböztetünk diffúz és göbös golyvát, melyek gyakori oka a jódszűrés [4]. A nem elégséges jódszűrés hatására a pajzsmirigy sejtszervi osztozása, számukat megnövelve próbálják a szervezet számára megfelelő mennyiségű hormonokat (T4, T3) előállítani. Abban az esetben, amikor a pajzsmirigy egésze megnagyobbodik, diffúz strúmaról; míg a pajzsmirigy egyes, kisebb részeiben jönnek létre gyorsabban növekvő sejthalmazok, akkor göbös strúmaról beszélünk. Általában a diffúz típusú golyvák jóindulatúak (benignusak), de esztétikai problémákat okoznak, illetve komprimálhatják és/vagy diszlokálhatják a nyelvsöveget és a légsöveget. A göbös strúma 2-10%-ánál daganatos elváltozás alakulhat ki. Különböző méretű pajzsmirigy-göbök a lakosság több mint felében észlelhetők ultrahangos vizsgálati módszerek segítségével [5]. Jódszűréses területeken elterjedtebbek és főként nőknél (30-50%), illetve az idősebb korosztályoknál figyelhetők meg [6]. A göbök normál méretű, tehát nem megnagyobbodott pajzsmirigyben is fellelhetők, számuk és nagyságuk változó, általában néhány milliméteresek, de több centiméteresek is lehetnek, illetve, több, különböző méretű göb is kialakulhat egy pajzsmirigyben. A göböket csoportosíthatjuk funkciójuk alapján szcintigráfia segítségével, mely eredményeként megkülönböztetjük: normál (meleg göb), fokozott (forró göb) és csökkent (hideg göb) jódszűrés eltéréseit. Hazánkban a hideg göbök előfordulása a leggyakoribb (85%), melyek 5-10%-a az idő előrehaladtával tumorossá válhat [7].

1.3. A pajzsmirigy tumoros elváltozásai

A pajzsmirigy rosszindulatú daganatainak legnagyobb része (90%) a folliculus epithélisejtekből származó jól differenciált carcinomák (DTC) közé tartozik, amelynek 70-80%-a papillaris (PTC), míg 10-15%-a follicularis (FTC) pajzsmirigy tumor. A differenciálatlan rosszindulatú daganatok, vagyis az anaplasztikus pajzsmirigy-tumorok (ATC) előfordulása ritkább, az összes pajzsmirigy-daganat 1-3%-át teszik ki. Ezekon kívül megkülönböztetünk egy negyedik típust, a medullaris pajzsmirigy carcinomát (MTC), melynek előfordulását 2-5%-ra tehetjük. Utóbbi a pajzsmirigy parafollicularis C-sejtjeiből származó ritka neuroendokrin daganat.

1.3.1. Differenciált pajzsmirigy daganatok

A differenciált pajzsmirigy daganatos betegek száma világszerte lényegesen megnövekedett az utóbbi évtizedekben, Magyarországon évente kb. 500-800 új DTC-s páciens regisztrálnak [8, Nemzeti Rákregiszter]. E növekedés okát vitatják ugyan, de a legnagyobb valószínűséggel az egyre érzékenyebb diagnosztikus módszerek elterjedése segíti elő a hatékonyabb felismerést, melynek során egyre kisebb göböket is észlelnek a pajzsmirigyben [9].

A papillaris carcinoma a leggyakoribb a pajzsmirigy rosszindulatú daganatai közül, melynek előfordulását a jódeháztartás is befolyásolja: a jódeháztartású területeken kissé több a PTC a follicularis carcinomák esetekhez képest, míg jódeháztartású területeken ez éppen fordítva figyelhető meg. Bár mindkét daganattípust a differenciált pajzsmirigy carcinomák közé sorolják, mégis fontos őket elkülönítve tárgyalni, mert a kétféle daganat számos tekintetben (előfordulási gyakoriság, szöveti szerkezet, áttétképzés módja, prognózis, stb.) eltér egymástól.

Papillaris carcinoma

A PTC nőknél gyakrabban fordul elő (nő/férfi arány: 2:1), az incidencia a koraival nő és a gesztációs korban lévő nőknél a leggyakoribb az előfordulása, ami hormonális, reprodukív tényezőkkel állhat összefüggésben. Karakterisztikáját tekintve igen

széleskörű: a kis (néhány mm) indolens tumoroktól egészen a nagy (több cm), gyorsan növekvő, lokálisan invazív, metasztatizáló változatig bármelyik előfordulhat.

A PTC elnevezése szövettani jellemzőin alapszik, a klasszikus forma papillaris struktúrákat mutat, elágazódásokkal, amelyhez follicularis elemek társulhatnak. A papillák felszínén többrétegű hám található, a sejtmag óraüveg vagy kávébab formájú. A tumor variánsai prognosztikailag különböznek a klasszikus formától. A leggyakrabban előforduló altípusai: [10]

- Follicularis variáns: Képes betörni a környező szövetekbe, és ott áttétet képezni, leggyakrabban fiatalokon jelentkezik. E variáns jódfelhalmozásódást mutat, míg a tisztán papillaris carcinoma a jódot nem halmozza. Ez a tulajdonság az áttétek képalkotó diagnosztikáját megnehezíti.
Az utóbbi néhány évben e típuson belül elkülönítettek egy újabb variánst, a NIFTP-t (noninvasive follicular thyroid neoplasm with papillary-like nuclear features, vagyis nem-invazív follicularis pajzsmirigy neoplazma papillaris jellegű nukleáris jellemzőkkel), mely szövettanilag follicularis felépítést mutat PTC sejtmagi jellemzőkkel, azonban az invázió nem jellemző rá. Összességében azonban nem sorolható egyértelműen a jóindulatú tumorok közé.
- Microcarcinoma: Az elváltozás kiterjedése maximum 1 cm, így nagy részük nem kerül felismerésre, csak boncolás során, tehát a legtöbb microcarcinomából nem fejlődik ki klinikailag is észlelhető pajzsmirigyrák. Kis részük azonban agresszív, akár távoli áttét kialakítására is képes.
- Encapsulált variáns: E típus kötőszövetes tokkal van körbe véve és jó prognózissal rendelkezik, azonban focalis invazivitást mutat.
- Hürthle-sejtes variáns: Szövettani felépítésében nagyban hasonlít a klasszikus formához, a sejtmag felépítésében térnek csak el, míg a papillákat oxyphil sejtek határolják. A jódot szintén nem halmozza fel, így szcintigráfia, illetve jódiotóp kezelés korlátozottan alkalmazható a pácienseknél. A Hürthle-sejtes variáns ritka, azonban agresszív fajta, gyakran kiújulhat és nagy mortalitási mutatókkal rendelkezik.

- Oncocyter variáns: A klasszikus formához hasonló prognózissal rendelkeznek, azonban nagyobb folliculus hámsejtek találhatóak benne, és nagy hyperchromaticus sejtmag jellemző.
- Magas sejtes (tall cell) variáns: E daganattípus olyan hámsejtekből épül fel, melyek magassága kétszerese a szélességének. Főként idősebb korban fordul elő, agresszívek, képesek áttétet adni a tüdőbe, a mellhártyába és az agyba is.

Ezekon kívül ritkábban előfordulhatnak a diffúz sclerotizáló, solid és macrofollicularis típusok is.

Papillaris carcinoma esetében általában egy tömött, kemény göb jelenik meg a nyakon, mely encapsulált vagy tok nélküli daganatot tartalmaz. E szürkésfehér daganatos göb lehet szolid, cisztikus vagy kevert felépítésű. A PTC-k limfogén úton terjednek, és rövid idő elteltével áttét képződik a nyaki nyirokcsomókban, távoli áttétként megjelenhet a tüdőben, a májban, ritkábban az agyban is. A klasszikus forma jó prognózisú, a 30 éves túlélés meghaladja a 90%-ot, míg a betegség-specifikus halálozás kicsi (1% alatti). A külső, ionizáló sugárzás, illetve korábbi pajzsmirigy elváltozások növelik a tumor megjelenésének kockázatát, a betegek anamnézisének tekintve közel 30%-uknak volt már korábban valamilyen pajzsmirigy betegsége (például: göbös struma, Hashimoto-thyreoditis, Basedow-Graves betegség). A családi halmozódás elérheti a 10%-ot.

Follicularis carcinoma

Az esetek többségében tömött (néha fájdalmas) csomóként jelentkezik, inkább középkorú (50 éves kor körül) vagy idősebb betegeken. Nőknél ez a típus is gyakoribb, a nő/férfi arány: 3:1.

Viselkedését tekintve az FTC invazívabb és jóval agresszívebb, mint a papillaris carcinoma. Terjedésére a hematogén út a jellemző. Nyirokcsomókba ritkán ad áttétet, azonban a daganat felismerésekor 10-20% a távoli áttétek meglétének esélye, mert legtöbbször áttöri a pajzsmirigy tokját, betör az erekbe, és már igen korai szakaszban áttétet képez a csontokban vagy a tüdőben.

Az FTC nem mutat olyan sejtmagra jellemző eltéréseket, mint a papillaris carcinoma, így diagnosztizálása a látott citológiai kép alapján nem egyszerű (a minimálisan invazív, nem encapsulált forma elkülönítése a follicularis adenomától citológiaiilag

nem lehetséges), ezért pontos diagnózist csak műtét után, a hisztológiai képből lehet megmondani.

Négy különböző altípusát különíthetjük el: minimálisan invazív follicularis carcinoma, invazív forma, „clear cell” carcinoma és Hürthle-sejtes carcinoma.

A prognózis szorosan összefügg a daganat invazivitásával. A kis invazivitással rendelkező esetekben a prognózis kiváló, az öt éves túlélés eléri a 98%-ot, azonban a mérsékelten invazív formánál, ahol érbetörés és akár már tokáttörés is megfigyelhető, ez a túlélési esély már csak 80%, míg az invazív formánál 38%-ra csökken.

1.3.2. Differenciálatlan, vagyis anaplasztikus pajzsmirigy daganatok

Az ATC-s betegek átlagéletkora a diagnózis idején 65 év, mely magasabb, mint a DTC-ben szenvedő pácienseké. Az anaplasztikus daganatok 70%-a nőkben fordul elő, és a betegek 20%-ánál már előfordult korábban differenciált pajzsmirigy daganat, illetve 20-30%-ának az ATC megjelenésekor is van. A szinkron tumorok többsége papillaris carcinoma. A rendszeresen követett betegek esetében leírták, hogy a DTC átalakulhat anaplasztikussá [11].

Az esetek 90%-ában már a diagnózis pillanatában helyi-, és távoli metasztázisok is megfigyelhetőek. Legtöbbször nyirokcsomó- és trachea áttétek, illetve tüdő-, csont-, míg a betegek 5%-ánál agyi metasztázis fordul elő.

A differenciált pajzsmirigy-tumorokkal szemben az ATC rendkívül agresszív daganatforma, a betegség-specifikus halálozás 100%. A betegség rendkívül gyors lefolyású, miközben a kezelési lehetőségek igen csak korlátozottak, így a korai felismerés ebben a betegségben mindennél fontosabb.

1.3.3. Medullaris pajzsmirigy daganatok

Az MTC a pajzsmirigyben elhelyezkedő parafollikularis C-sejtekből származik, azonban ezen sejtek fejlődéstanilag nem innen származnak, neuroectodermális eredetűek. A C-sejtek az embrionális fejlődés során vándorolnak a pajzsmirigy felső pólusához.

E neuroendokrin daganatos esetek többsége sporadikus, míg kb. 25%-a familiáris öröklődésű, illetve a multiplex endokrin neoplasia 2-es (MEN2) típusának

részjelenségeként figyelhető meg. A sporadikus forma a páciensek 40-60. éveiben jelenik meg, általában egy soliter göb formájában. A betegek felében már az első vizsgálatkor áttétek figyelhetők meg, ezek mintegy 70%-ában nyaki nyirokcsomókban találhatók, míg ritkábban májban, tüdőben vagy csontokban is felfedezhetők.

1.4. A pajzsmirigy göbök hagyományos vizsgálati módszerei

Az egyre szélesebb körben megjelenő rákos megbetegedések minél korábbi felismerése, és megfelelő kezelése a legfontosabb. Napjainkban a végleges diagnózis felállításához a klinikai gyakorlatban évtizedek alatt kialakított hagyományos pajzsmirigy vizsgálati módszereket alkalmazzák. A pajzsmirigy megbetegedések laboratóriumi diagnosztikájára az Egészségügyi Minisztérium szakmai protokollja a mérvadó [12]. A páciensek kivizsgálása során több módszert is igénybe vesznek a kezelő orvosok (fizikális vizsgálat, ultrahangvizsgálat, szcintigráfia, vékonytű-aspirációs vizsgálat), amíg kialakul a végleges diagnózis.

1.4.1. Anamnézis felvétel és fizikális vizsgálat

A beteg kivizsgálása elején fontos a kórtörténet alapos, körültekintő felvétele. Ennek mindenképp tartalmaznia kell a korábban nyaki régiót vagy egyéb testrészt ért besugárzásra, a rokonságban előforduló daganatos betegségekre, illetve az esetleges korábbi endokrin eredetű kórképekre vonatkozó kérdéseket.

Az anamnézis felvételét követi a fizikális vizsgálat, amelynek során a vizsgálatot végző orvos – kihasználva a pajzsmirigy felületes elhelyezkedését – ujjainak segítségével kitapintja az esetleges göböket, megbecsüli a mirigy méretét, viszonyát a környezetéhez, stb. Ily módon észlelhető a megszokottnál tömöttebb pajzsmirigy állomány, tapintásra jelentkező fájdalom vagy a környezetéhez fixált, tömött, gyorsan növekvő terime jelenléte is, amelyek malignitás gyanúját vethetik fel.

1.4.2. Ultrahangvizsgálat

A képalkotó eljárások közül a leggyakrabban az ultrahangvizsgálatot (UH) alkalmazzák, mert nagy felbontóképessége révén alkalmas a pajzsmirigy morfológiai elváltozásainak kimutatására, az esetleges göbök felfedezésére és azok számának, illetve szerkezetének vizsgálatára. Az ultrahang módszer egyik hátránya, hogy az észlelt eltérések egyike sem jelzi teljes biztonsággal a malignus elváltozást, azonban egyes jelek megléte növeli a daganatos elfajulás gyanúját [13]. Ezekből a gyanús göbökből vékonytű aspirációs biopsziával mintát kell venni és citológiai vizsgálatnak alávetni. Az ultrahangvizsgálat másik, talán legnagyobb hátránya a szubjektivitás, hiszen a pajzsmirigygöbök ultrahangos kiértékelése nagymértékben függ a vizsgálatot végző személytől. Emiatt fontos, hogy az értékelés egységes standardizált rendszer alapján történjen. Ma már több nemzetközi irányelv is kialakult [14], ezek alapját az elsőként leírt Thyroid Imaging–Reporting and Data System, vagyis a TIRADS elnevezésű besorolási rendszer adja [15]. Az irányelvek közös koncepciója, hogy a pajzsmirigygöböket malignitási kockázatuk alapján csoportosítják, és különböző kategóriákba sorolják őket. A TIRADS összesen 6 kategóriát különít el (1. táblázat).

1. táblázat: A TIRADS rendszer által elkülönített hat kategória, amely alapján egyszerűen és egységesen elkülöníthetők az ultrahanggal vizsgált pajzsmirigygöbök; és az egyes csoportokba tartozó göbök malignitási esélye [15].

TIRADS kategóriák		Malignitás esélye (%)
1	normális pajzsmirigy	-
2	benignus elváltozás	0
3	valószínűleg benignus göb	<5
4	malignitásra gyanús göb	5-80
5	valószínűen malignus göb	>80
6	malignus göb (biopsziával igazoltan)	100

A 2009-es TIRADS megjelenése óta több munkacsoport is átvette vagy módosította, leegyszerűsítette az eredeti besorolást, ezért napjainkban már számos változata van használatban, és a mindennapi klinikai döntéshozatalban rutinszerűen alkalmazzák. Ilyen például a francia TI-RADS, melyet a Francia Radiológus Társaság hozott létre [16], és az EU-TIRADS is, amelyet az Európai Pajzsmirigy Társaság alakított ki [17]. Ezen irányelvek valójában egyszerűek, és lehetővé teszik az egységes ultrahang leletezést. Jelenleg Magyarországon nincs egységesen elfogadott és alkalmazott rendszer, tanácsos lenne az EU-TIRADS irányelveit követve a napi rutin használatban is alkalmazni azt, amelynek kapcsán az ultrahang vizsgálatok kevésbé szubjektív, azaz a vizsgáló személy kilététől függetlenül is használható eredményt adnának [18].

1.4.3. Pajzsmirigy-szcintigráfia

A pajzsmirigy göbök funkcióját a pajzsmirigy-szcintigráfia segítségével vizsgálhatjuk. Ilyen in vivo izotópvizsgálat során kis mennyiségű radioaktív izotópot, általában ^{99m}Tc -t (technécium) juttatnak a páciensbe – intravénás injekció formájában vagy szájon át –, mely a jódhoz hasonlóan a pajzsmirigyben feldúsul. Egészséges pajzsmirigyben a lebenyek csaknem ugyanúgy, egyenletesen dúsítják az izotópot. Az alapján, hogy a göb milyen mértékben veszi fel a bejuttatott izotópot – a körülötte lévő normál szövethez viszonyítva – megkülönböztetünk forró, meleg és hideg göböket. Forró göbről abban az esetben beszélünk, ha a vizsgált göb fokozott mértékben veszi fel a bejuttatott izotópot. Amennyiben azonos mértékben történik izotópfelvétel, mint a környező pajzsmirigyszövetben, akkor meleg göbről van szó. Azonban, ha egy göb nem veszi fel az izotópot, vagy csak kisebb mértékben, mint a környező mirigysejtek, akkor hideg göbről beszélünk. A forró és meleg göbök legtöbbször jóindulatúaknak mutatkoznak, és további, malignitási irányba való kivizsgálást ritkán igényelnek. A meleg göb megléte pajzsmirigy túlműködésre jellemző tüneteket eredményez, például heves szívdobogás, idegesség, illetve normál étkezés melletti fogyás. A hideg göbök esetén további vizsgálatok szükségesek, mivel 5-10%-uk rosszindulatú elváltozást takarhat [19-20].

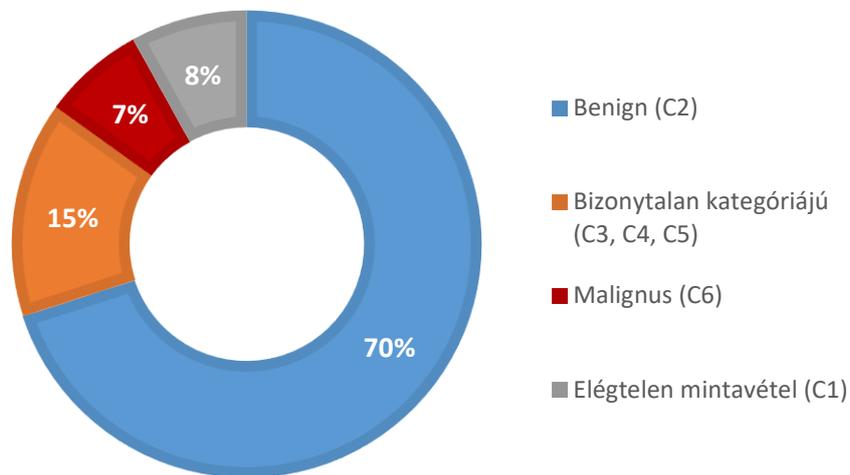
1.4.4. Vékonytű-aspirációs vizsgálat

A pajzsmirigyöbök diagnosztikájának leghatásosabb eszköze évek óta a vékonytű-aspirációs vizsgálat (fine needle aspiration biopsy, FNAB), a segítségével általában megerősíthető vagy kizárható a malignitás, így a felesleges sebészi beavatkozások száma is csökkenthető. A biopszia során, ultrahang segítségével, egy vékony tűt (23-27G, kb. 0.6 mm vastag) vezetnek a pajzsmirigybe és sejteket szívnak ki az adott elváltozástól. Ez a mintavételi eljárás ma a legegyszerűbb és leggyorsabb technika, mely a páciens számára mindössze egy kis kellemetlenséggel, minimális fájdalommal jár. Az FNAB mintavételt megfelelően képzett orvos végzi. Hazai irodalmi adatok alapján a mintavétel abban az esetben a leghatékonyabb, amikor a radiológusok, illetve a citológusok nem önállóan, hanem együtt végzik a biopsziát, így csökkenthető leginkább az értékelhetetlen minták száma [21]. A kinyert sejtek különböző tulajdonságainak (sejtmorfológia, elrendeződés stb.) citológiai vizsgálata alapján a legtöbb esetben meghatározható a pontos diagnózis. A kiértékelést itt is egy kategóriákba való besoroláson alapuló rendszer segíti, akár csak az ultrahang esetében. A mintákat ebben az esetben is 6 kategóriába sorolhatjuk (2. táblázat).

2. táblázat: A „Bethesda rendszer” hat besorolási kategóriája (C1-C6). Az egyes kategóriákhoz különböző malignitási kockázatok tartoznak [22].

Bethesda kategóriák	Malignitás esélye (%)	További teendők
C1 értékelhetetlen minta	1-4	ismételt mintavétel
C2 benignus elváltozás	0-3	utánkövetés
C3 atípusos, nem meghatározható minta	~5-15	ismételt mintavétel
C4 follicularis neoplasia vagy annak gyanúja	15-30	lobectomia
C5 malignitásra gyanús minta	60-75	közel teljes thyroidectomia vagy lobectomia
C6 egyértelműen malignus daganat	97-99	közel teljes thyroidectomia

A besorolási rendszer alapja a Bethesda System for Reporting Thyroid Cytopathology [23], mely már világszerte, így Magyarországon is elterjedt, és a legtöbb intézményben ezt alkalmazzák [24]. A citológiai kiértékelés során megvizsgált göbök kb. 8%-ánál értékelhetetlen a biopsziás minta, ezen eseteknél későbbi, ismételt mintavétel történik. A kiértékelt minták legnagyobb részében (kb. 70%) végül jóindulatú elváltozások igazolódnak [25], míg az esetek kb. 7%-ában egyértelműen malignus elváltozásokat állapítanak meg (2. ábra). A megvizsgált minták mintegy negyede bizonytalan kategóriába (Bethesda 3, 4 és 5) sorolható, ahol a malignitási kockázat kb. 14–48% [26-28], ezen betegek esetében későbbi, ismételt mintavétel ajánlott, azonban a kezelőorvos gyakran műtéti beavatkozás mellett dönt.



2. ábra: A vizsgált pajzsmirigy göbök citológiai eredményeinek átlagos, százalékos eloszlása a különböző „bethesda” kategóriákban (C1-C6).

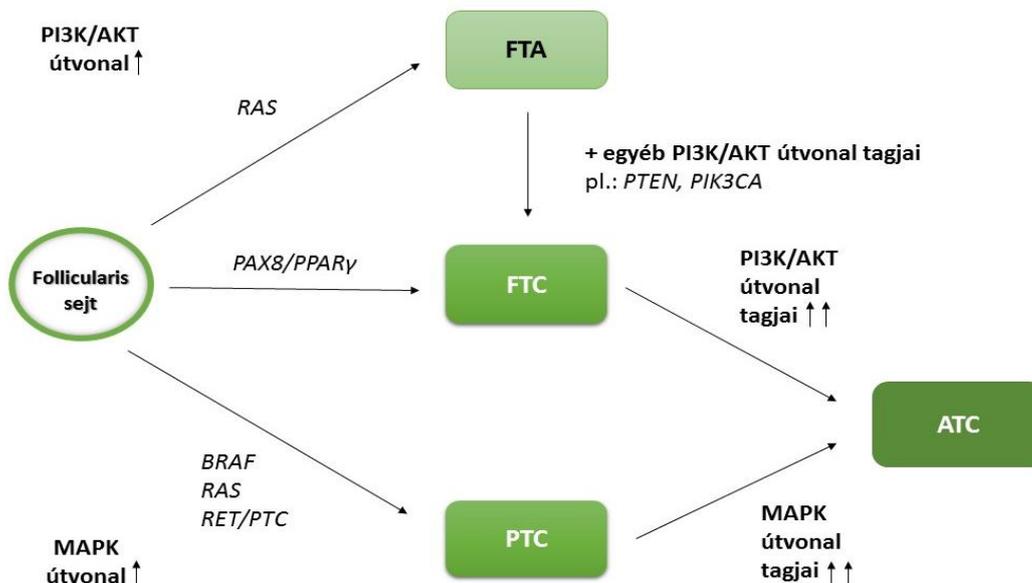
1.5. A pajzsmirigy göbök genetikai vizsgálatai

Napjainkban a hagyományos vizsgálati módszerek alkalmasak egyes, rosszindulatú elváltozások, gyanús képletek elkülönítésére, azonban az esetek jelentős hányadában – mint fentebb láttuk – a kapott diagnózis bizonytalan. Ilyen esetekben a hagyományos ajánlások szerint későbbi, ismételt mintavétel szükséges vagy pajzsmirigy lobectomia elvégzését javasolják. A sebészi beavatkozás során nyert minták kisebbik részében

igazolódik a pajzsmirigy rosszindulatú daganata, míg az esetek nagyobbik részében benignus elváltozásról van szó, a bizonytalan kategóriákba eső göbök malignitási esélye 5-30% közé tehető [29]. Ilyen esetekben nyújthatnak segítséget az elmúlt évtizedek genetikai kutatómunkái, melyek a pajzsmirigydaganatok kialakulásában szerepet játszó genetikai faktorok meghatározására koncentráltak.

1.5.1. A pajzsmirigy daganatok kialakulását befolyásoló genetikai faktorok

A pajzsmirigysejtek tumorigenezisének folyamata során a magasan differenciált, jóindulatú thyreociták fokozatosan alakulnak át malignussá, és ezen átalakulás oka a genomiális DNS-ben felhalmozódó specifikus csíravonalas és/vagy szomatikus mutációk megjelenése. A különböző pajzsmirigy daganatokban észlelt szövettani jellemzők kialakulásában szerepet játszó genetikai faktorok között számos szomatikus onkogén mutációt és génátrendeződést írtak már le. A megfigyelt génhibák két útvonal, a mitogénaktivált proteinkináz (MAPK) és a foszfatidilinozitol-4,5-biszfoszfát 3-kináz/protein kináz B (PI3K/AKT) konstitutív aktivációját eredményezik (3. ábra).



3. ábra: A pajzsmirigysejtek tumorigenezisében résztvevő két legfontosabb útvonal a MAPK és a PI3K/AKT útvonal, amelyeken a bekövetkező genetikai változások a különböző daganattípusok kialakulásához vezetnek [30].

A MAPK útvonal tagjaiban (például: *BRAF*, *RET/PTC*) bekövetkezett genetikai változások elsődlegesen papillaris pajzsmirigy rák kialakulásához vezetnek. A follicularis pajzsmirigysejtekben végbemenő genetikai változások/sérülések hatására – mint például a *RAS*, a *PTEN* és a *PIK3CA* génben (PI3K/AKT útvonal tagjai) – elsősorban a follicularis pajzsmirigy adenoma (FTA) és a follicularis pajzsmirigy carcinoma alakulhat ki. Az FTA állapotról az FTC-re való átalakulást a PI3K/AKT útvonal további, fokozott aktiválása válthatja ki. A PTC és FTC állapotból további, nagymértékű genetikai mutációk felhalmozódásával kialakulhat az anaplasztikus carcinoma.

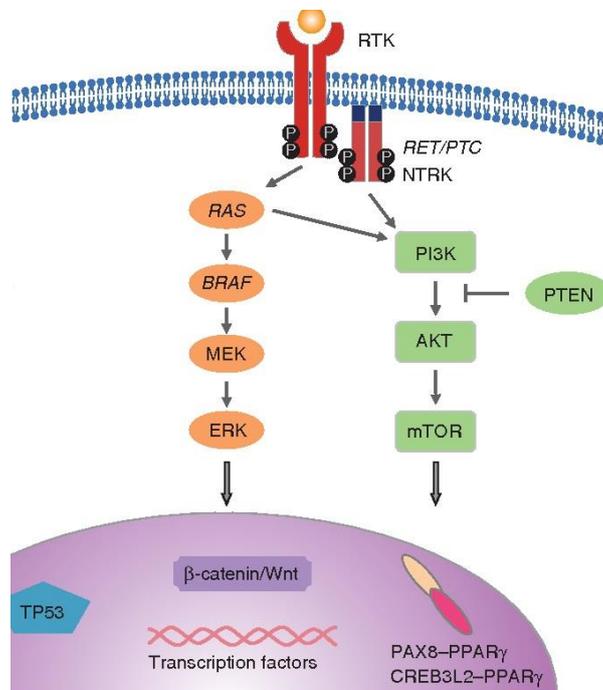
A legfontosabb jelátviteli útvonalak

1. MAPK útvonal (mitogén-aktivált proteinkináz).

A MAP-kináz enzimszaládba tartozó komponensek szerin/treonin specifikus protein kinázok, melyeknek fontos szabályozó szerep jut a szervezetben, hatással vannak a géneexpresszióra, ezzel szabályozva a sejtek osztódását, differenciálódását és túlélését. A MAP-kinázok által szabályozott kaszkád egy extracelluláris jel hatására aktiválódik (4. ábra), ezek különböző növekedési faktorok lehetnek (például: epidermális növekedési faktor (EGF), fibroblaszt növekedési faktor (FGF)). A jel hatására a receptor tirozin kináz (RTK) az útvonal első tagját, a Ras fehérjét aktiválja, mely a GTP-kötő fehérjék családjához tartozik. Az inaktív állapotban lévő Ras az aktiválódása során a hozzá kötődő GDP-t GTP-re cseréli. Így ez az aktív állapotba jutása beindít egy ún. foszforilációs kaszkádot, mely során a kinázok foszforilálják és ezáltal aktiválják is egymást. A MAPK útvonal végül elindítja jelátvitelt beindító növekedési faktor által szabályozott folyamatokat a célgének kifejeződésével. Attól függően, hogy a sejt milyen extracelluláris jelet kap, meghatározza, hogy mely gének aktiválódnak, és így mely funkciók induljanak be az adott sejtben. A kaszkád rendszer bármelyik tagjában bekövetkező mutációk tumor kialakulásához vezethetnek.

2. PI3K/AKT útvonal (foszfatidilinozitol-4,5-biszfoszfát 3-kináz/protein kináz B).

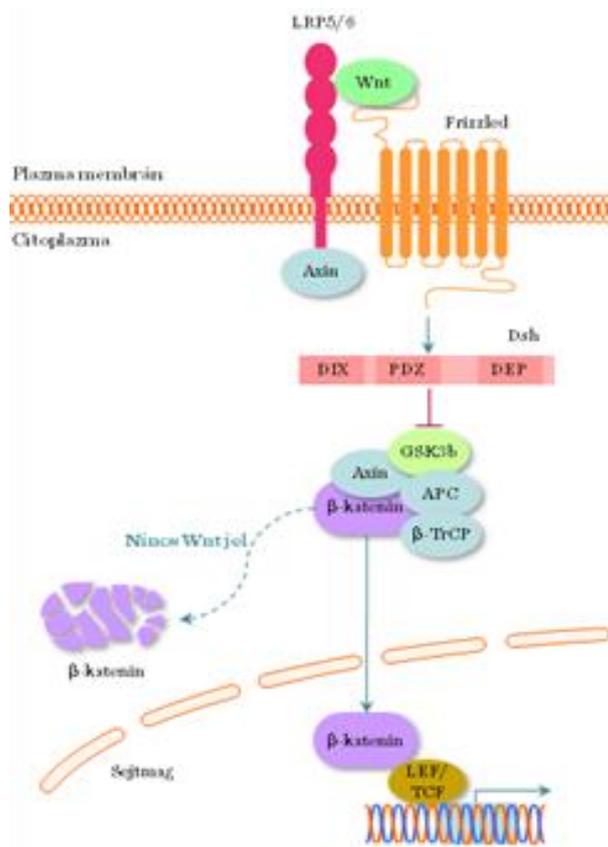
A PI3K/AKT útvonal tagjai szintén sokféle sejtes funkció/celluláris folyamat szabályozásában játszanak fontos szerepet, beleértve a glükózfelvételt, az intracelluláris transzport folyamatokat, a sejtek növekedését és proliferációját, illetve a túlélésüket. Az útvonalat szintén a tirozin kináz receptorhoz történő ligandkötés, majd az aktiválódott Ras fehérje indítja be, ami a MAPK útvonal foszforilációs kaskád mechanizmusát is elindítja (4. ábra). A Ras hatására a PI3-kinázok aktiválódnak, ezeknek számos osztályát különítjük el, melyek közül az I. osztályba tartozók a legfontosabbak a tumorgenezis során. Általában egy p85-ös szabályzó régióból és egy p110 katalitikus alegységből állnak. Az utóbbi alegység két típusa, az α - (PIK3CA) és a β -típus (PIK3CB) expresszálódik a legtöbb szövetben és ezek mutációi a leggyakoribbak a pajzsmirigy-tumorokban [31], ugyanis ezen alegységeken található egy Ras-t felismerő kötőhely, mely szükséges a PI3K foszforilálásához. A foszforilált PI3K (PIP3) képes a protein kináz B (AKT), az pedig az mTOR (mammalian target of rapamycin) aktiválására. Ezen foszforilációk és aktivációk során a szignál végül bejut a sejtmagba, hogy ott elindítsa a különböző növekedési faktorok által szabályozott célgének átíródását.



4. ábra: A MAPK (bal oldalon) és a PI3K/AKT útvonal (jobb oldalon) sematikus ábrája, a legfontosabb tagokkal. (Kép forrása: [32])

3. WNT útvonal (az elnevezés a „wingless” = szárny nélküli, *Drosophila melanogaster*-ben leírt gén és az egérben megtalálható homológja, az *Int-1* (*Wnt-1*) alapján alakult ki) [33].

A jelátviteli útvonal egész életen át kulcsszerepet játszik a különböző élettani folyamatokban. Részt vesz az embrionális fejlődésben, a különböző típusú tumorok kialakulásában és az öregedési folyamatokban is. A legtöbb szervünkben szabályozza a fejlődést és a sejtek megfelelő működését, például a sejt proliferációjára és differenciációjára, a sejt polaritására és a sejtmigrációra is hatással van, így nem csoda, hogy a WNT útvonal folyamatainak megfelelő szabályozása igen jelentős. A receptoraik a Frizzled (Fz) család tagjai, melyeket különböző, a Wnt családba tartozó molekulák aktiválják, egyéb koreceptorok (LRP5/6 (low-density lipoprotein related protein 5 és 6)) segítségével. A létrejövő receptor komplexből három fő útvonal indul ki, melyek közül az utóbbi években a kanonikus, β -katenin függő útvonal (5. ábra) kapta a legnagyobb figyelmet a tumoros állapotokban betöltött kritikus szerepe folytán.



5. ábra: A kanonikus, β -katenin függő WNT útvonal. (Kép forrása: [34])

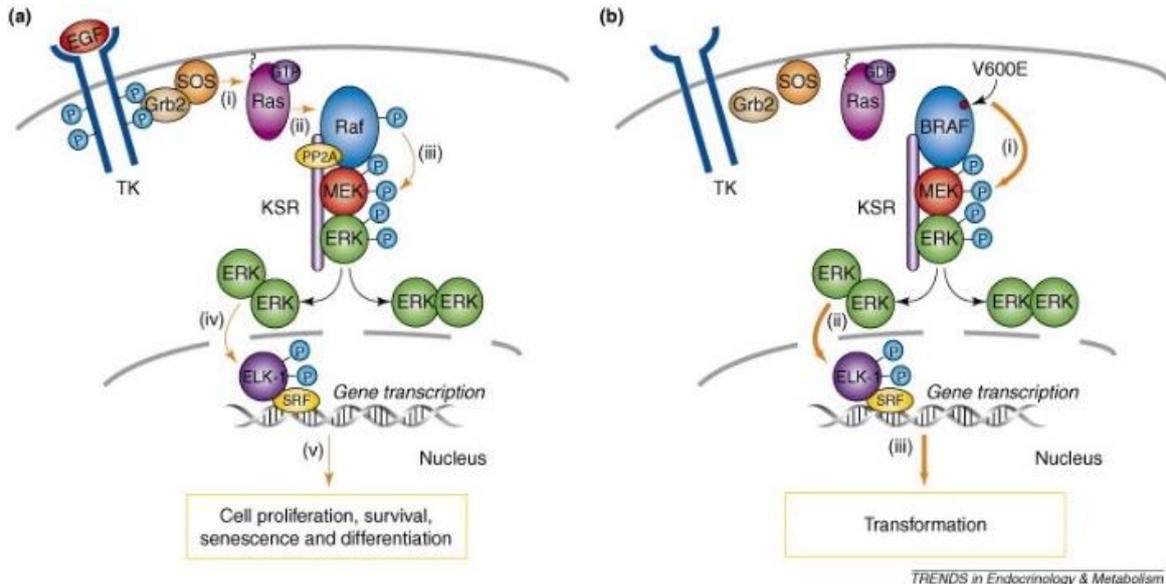
A kanonikus útvonalat különböző Wnt faktorok (például: Wnt1, Wnt3, Wnt3A, Wnt7A vagy Wnt10B) kötődése képes aktiválni az Fz receptoron. Hatására a Dishevelled (Dsh) három doménje foszforilálódik, amely egy citoszolikus jelátvivő molekula és a glikogén szintáz kináz-3 β (GSK-3 β) gátlását eredményezi, mely egy több komponensből felépülő „pusztító komplex” egyik tagja (további tagok például: Axin, APC). Ezen komplex gátlásának következtében a β -katenin stabilizálódni képes és a fehérje felhalmozódik a citoplazmában, majd bejut a sejtmagba, ahol a TCF/LEF transzkripciós faktorokhoz kötődik, ami végül a célgénjeinek aktivációját okozza (például: cyclin-D1, c-myc, c-jun, Fra-1, VEGFR). Amennyiben a Wnt faktorok nincsenek jelen, a citoplazmatikus β -katenin lebomlik és a célgénjei nem íródnak át. Számos publikáció hangsúlyozza a Wnt/ β -katenin útvonal szerepét a pajzsmirigyrákokban is [35-36], főként papillaris carcinomákban [37-38].

A leggyakoribb szomatikus onkogének

BRAF gén (v-RAF murine sarcoma viral oncogene homolog B, serine/threonin-protein kinase B-RAF).

A *BRAF* gén a 7. kromoszóma hosszú karjának 24. pozíciójában (7q24) elhelyezkedő, szerin-treonin kináz fehérjét kódoló protoonkogén [39]. A MAPK jelátviteli útvonal szabályozásának fontos tagja, mely minden humán sejtben expresszálódik, így a pajzsmirigy sejtjeiben is. Az általa kódolt fehérje képes hatni a sejtosztódásra, a differenciálódásra és az apoptózisra [40]. A *BRAF* gén egyik szomatikus pontmutációját (V600E, akkor még V599E néven) 2003-ban hozták először összefüggésbe a pajzsmirigy daganatokkal [41], ahol az 600. kodonnál a valin glutamátra cserélődik ki, és ennek hatására fokozódik a kináz-aktivitás, ez folyamatosan stimulálja a MAPK útvonalat, ami tumor kifejlődéséhez vezethet (6. ábra). A *BRAF* génben bekövetkezett változás már a papillaris pajzsmirigy carcinoma tumorigenezisének korai fázisában jelentkezik, így azóta a *BRAF* V600E egy specifikus tumormarkerré vált. A PTC-s pácienseknél azt is megfigyelték, hogy a *BRAF* státusza és egyéb klinikai jellemzői (áttétképzés, kiújulás, agresszivitás) között szoros összefüggés van [42]. Így például a V600E pontmutációt hordozó páciensek

esetében a papillaris pajzsmirigyák jóval agresszívebb, és már korai stádiumban áttétképzésre hajlamos, nagyobb az esély a kiújulásra és könnyebben alakulhat át anaplasticus carcinomává [43-45]. Tehát elmondható, hogy a *BRAF* V600E mutáció megléte már önmagában is rossz prognózissal társul [46-47].

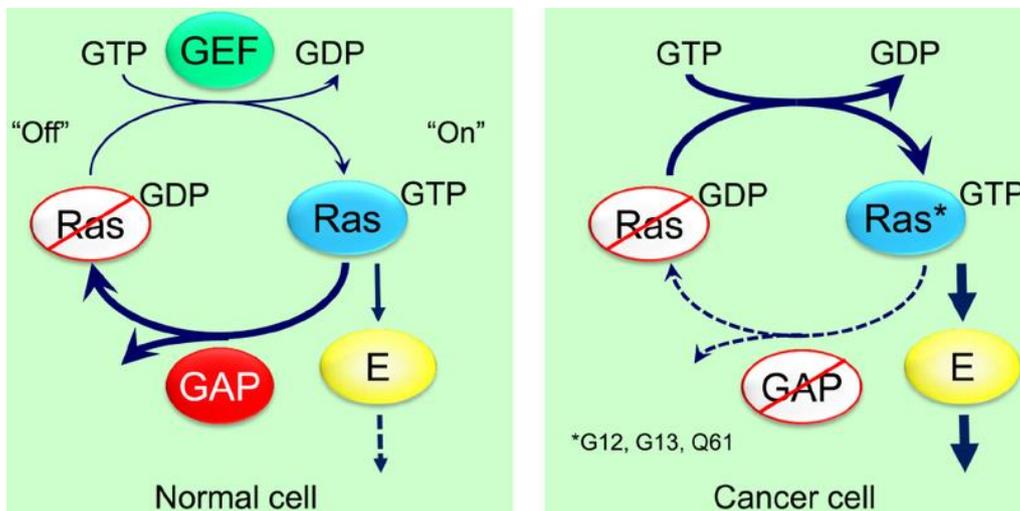


6. ábra: a) A MAPK útvonal normális működése, ha az adott útvonalon nem található a *BRAF* génben mutáció. b) A MAPK útvonal konstitutívan aktív extracelluláris jel nélkül is a *BRAF* génben található V600E pontmutáció hatására, melynek következményeként tumor fejlődhet ki. (Képek forrása: [48])

RAS gének (Rat sarcoma).

A humán rákkutatásban a *RAS* gének három formája a legjelentősebb: *HRAS* (Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog), *NRAS* (Neuroblastoma rat sarcoma viral oncogene homolog) és *KRAS* (Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog), amelyek mind a MAPK, mind a PI3K/AKT növekedési faktor jelátviteli útvonalat képesek befolyásolni. A *RAS* gének a protoonkogének családjába tartoznak. Az általuk kódolt fehérjék nagyon hasonlítanak egymásra, melyek inaktív állapotukban guanozin-difoszfátot (GDP) kötnek. A fehérjéken – aktiválás hatására – a guanine nucleotide exchange factor (GEF) lecseréli a GDP-t guanozin-trifoszfátra (GTP), míg újbóli inaktív állapotba jutásuk a fehérjék saját GTP-áz aktivitásán alapul (7. ábra). Amennyiben a gének valamelyikében pontmutáció történik, olyan hibás Ras fehérje

alakul ki, amely nagyobb affinitással kötődik a GTP-hez vagy a GTP-áz funkció inaktívulódik. A patológiás fehérje állandóan aktív állapotba kerül, és ennek következtében beindulnak a jelátviteli pályák [49-50]. A *RAS* géneket először 1988-ban hozták összefüggésbe a pajzsmirigy daganatokkal [51], azóta kiderült, hogy a *RAS* pontmutációk a differenciált pajzsmirigydaganatok közül elsősorban a FTC-ben és a PTC follicularis variánsában alakulnak ki, illetve gyakran kimutathatók anaplasticus carcinomákban is [52]. Ezeken kívül gyakran megtalálhatók még a FTA-ban is. A *RAS* géncsalád pontmutációja szintén a pajzsmirigy tumorgenezisének korai fázisában alakul ki, illetve ezen mutációk meglete előre jelezheti a pajzsmirigydaganat agresszívebb tulajdonságát [53].



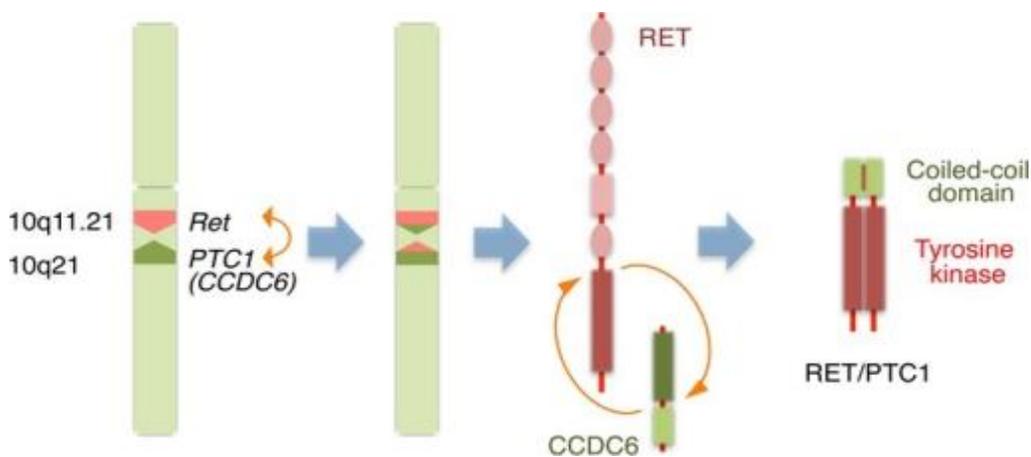
7. ábra: Normál sejtekben a tirozin kináz receptorhoz történő ligandkötés hatására a guanine nucleotide exchange factor (GEF) aktiválja a Ras fehérjét, melyek ilyenkor GTP-t kötnek meg, és ily módon képesek beindítani a foszforilációs kaszkádot. Jel hiányában a Ras fehérjék inaktív állapotba kerülnek saját GTP-áz aktivitásuk segítségével. Míg tumoros sejtekben, ligand kötődése nélkül is aktívak a Ras fehérjék, és inaktív állapotba nem képesek visszatérni, így folyamatosan aktív marad az általuk irányított útvonalak. (Képek forrása: [54])

A leggyakoribb génátrendeződések

RET/PTC (rearranged during transfection / papillary thyroid cancer).

A *RET* egy tirozin-kináz aktivitású transzmembrán receptort kódoló protoonkogén, mely a 10. kromoszómán helyezkedik el (10q11.2). A normál follicularis pajzsmirigysejtekben a *RET* nem expresszálódik, azonban PTC-kben génátrendeződés következtében *RET/PTC* alakul ki, melynek hatására egy patológiás tirozin-kináz receptor keletkezik, így az aktivációhoz nincs szükség ligandra. A *RET/PTC* génátrendeződést először a papillaris pajzsmirigy carcinomák esetében írták le 1992-ben [55], azóta több típusát fedezték fel. A génátrendeződéseknek három leggyakoribb típusát az alapján különböztetjük meg, hogy mely szakaszok rendeződnek át:

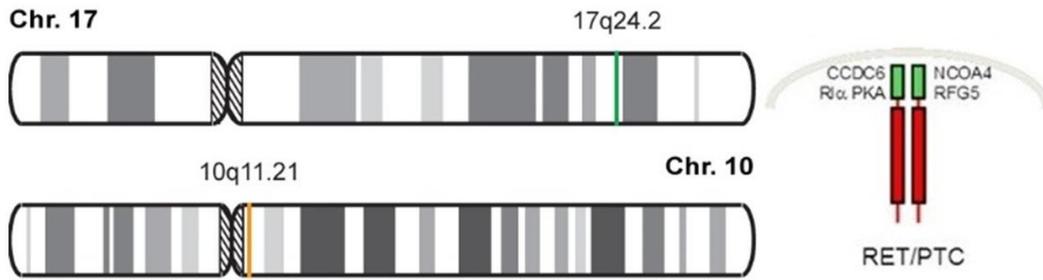
1. *RET/PTC1*: a *RET* és a *CCDC6* (coiled-coil domain containing 6, régebbi neve: D10S170) gének fúziója révén a 10. kromoszóma hosszú karján található intrakromoszómális szakasz inverziója következik be [55] (8. ábra).



8. ábra: A *RET/PTC1* kialakulása a *RET* és a *CCDC6* gének fúziója során.

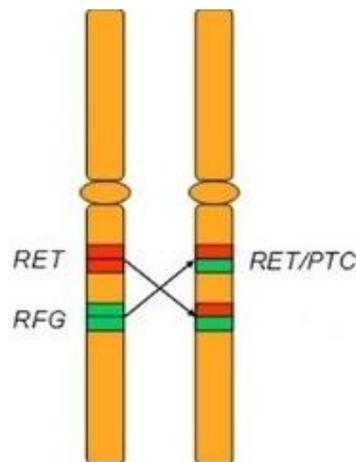
(Kép forrása: [56])

2. *RET/PTC2*: a *RET* gén tirozin-kináz doménje és a 17. kromoszómán lévő *PRKARIA* (cAMP-dependent protein kinase type I-alpha regulatory subunit) gén szabályozó alegysége között létrejövő transzlokáció hozza létre [57] (9. ábra).



9. ábra: A RET/PTC2 kialakulása. A 17. kromoszóma hosszú karján található PRKAR1A és a 10. kromoszóma hosszú karján lévő RET gének transzlokációja révén jön létre ez a RET/PTC génátrendeződés. (Képek forrása: [58-59])

3. *RET/PTC3*: szintén a 10. kromoszóma hosszú karján található intrakromozómális szakasz inverziója miatt alakul ki, a *RET* és az *NCOA4* (nuclear receptor coactivator 4/RFG) gének közötti fúzió révén [60] (10. ábra).



10. ábra: A *RET/PTC3* kialakulása a *RET* és az *NCOA4* vagy másik nevén *RFG* gének fúziója során. (Kép forrása: [58])

A *RET* génátrendeződések kialakulása és típusa függ a nemtől, az életkortól és korábbi sugárexpozíciótól is [49,61], például a *RET/PTC3* sokkal gyakrabban alakul ki fiatal életkorban végzett sugárterhelés következtében, illetve e változat klinikai lefolyása sokkal agresszívebb a többi típushoz képest [62]. A *RET/PTC* kialakulása szintén a tumorgenezis korai szakaszára tehető, így ennek vizsgálata is fontos a pajzsmirigy

tumordiagnosztikájában, melyben szintén nagy segítséget ad az a fontos felfedezés, hogy a *RET/PTC* pozitív daganatok nem alakulnak át anaplasticussá [63].

PAX8/PPAR γ (paired box 8 / peroxisome proliferator activated receptor γ).

A *PAX8* gén (2q14.1) egy transzkripciós faktort kódol, mely nélkülözhetetlen a normál szöveti differenciálódáshoz. A pajzsmirigy specifikus gének (például: thyroglobulin, thyroid peroxidáz) expressziójában is jelentős szerepet kap.

A *PPAR γ* gén (3p25.2) egy sejtmagi receptort kódoló tumorszupresszor, mely a zsírszövet mester regulátora, szükséges a zsírszövet fejlődéséhez, a lipid metabolizmushoz és a szervezetünk inzulinérzékenységének kialakításához.

A *PAX8/PPAR γ* génátrendeződést főként follicularis carcinomákban mutatták ki (30-60%) [64-65], de néhány esetben megtalálható a follicularis adenomákban is [66]. A génátrendeződéshez a 2q13 és 3p25 kromoszóma régiók transzlokációja vezet, az ennek hatására expresszálandó fehérje csökkenti az apoptózis mértékét.

1.5.2. Géndiagnosztikai panelek

Az eddig összegyűjtött molekuláris genetikai háttértudás egyre szélesebb körű és modernebb vizsgálati eljárások előtt nyitotta meg az utat a pajzsmirigydaganat diagnosztika területén, melyeknek legnagyobb előnyei a citológiai bizonytalan diagnózisok biztossá tétele, a felesleges műtéti beavatkozások elkerülése és a ténylegesen nagy kockázatú betegek kiemelése.

E genetikai tudás hatékony felhasználásához szükség volt a molekuláris genetika és azon belül is a DNS szekvencia meghatározás elképesztő fejlődésére, melyet az újgenerációs szekvenálási vizsgálatoknak (NGS) köszönhetünk. Ezen legmodernebb laboridiagnosztikai eljárások bevezetése a napi, rutin vizsgálatokba megadta a kellő laboratóriumi háttérrel a tumordiagnosztikának is.

Az NGS platformok nagy áteresztőképességgel rendelkeznek, a szekvenálási reakció sokszorososan párhuzamosítva zajlik, tehát egyszerre több millió DNS szál leolvasása történik. Egyazon reakció során akár több száz gén teljes szekvenciáját (összes exon, intronikus szakaszok, nem-transzlálódó, illetve promóter régiók) is képesek vagyunk meghatározni, ellentétben a korábbi szekvenálási módszerekkel, ahol csak egyes hot

spottok/ismert mutációs pontok státuszát azonosíthattuk célzottan. Az NGS nagy felbontású genetikai vizsgáló módszer, melynek segítségével a szomatikus mutációk jóval kisebb tumorarány mellett (akár 10% alatti allélfrekvenciával) is meghatározhatók, ez a klasszikus Sanger-szekvenálásnál még jóval magasabb volt (átlagosan 30%). Az újgenerációs szekvenálás végére rengeteg genetikai információt kapunk, lényegesen rövidebb idő alatt, és e nagy mennyiségű adatot – az informatika fejlődésének jóvoltából – bioinformatikai szoftverek, illetve online adatbázisok segítségével elemezhetjük. E módszernek is vannak azonban korlátai, például az elemzést végző szoftver mindössze 1-től néhány tíz nukleotidig képes nagy pontossággal meghatározni az eltéréseket, és a rövid ismétlődéseket nem képes biztonsággal megállapítani.

A pajzsmirigy tumorgenezisről megszerzett háttértudás és a szükséges NGS módszerek kifejlődése együtt lehetővé tette a kutatók számára pajzsmirigy specifikus génpanelek kidolgozását, melyek kiegészíthetik a citológiai vizsgálatok eredményeit. Ezen molekuláris genetikai vizsgálatok segítségével felfedezett génmutációk elsődlegesen a citológiai bizonytalan kategóriába sorolt göbök vizsgálatakor használhatók fel, de akár benignus eredményt mutató elváltozások esetében is előre jelezhetik a malignus átalakulás lehetőségét.

Napjainkra már több pajzsmirigy-tumorra specifikus géndiagnosztikai újgenerációs szekvenálásra alapuló tesztet fejlesztettek ki [67-70]. E tesztek számos, a pajzsmirigy tumorgenezissel kapcsolatban bizonyítottan fontos szerepet játszó génnek (driver génnek) egyidejű vizsgálatát teszik lehetővé, illetve elérhetőek nagyobb, kiterjesztett génpanelek is, melyeket további, esetlegesen kisebb jelentőségű génekkel is kiegészítettek. A különböző génpanelek szenzitivitása és specificitása meglehetősen magas (>80%), míg pozitív (PPV) és negatív prediktív értékük (NPV) változó (PPV: 37-89%, NPV:75-100%) [30]. Ezek a paneleket azonban elsősorban az Egyesült Államokban alkalmazzák, mivel áruk kifejezetten magas (2500-4500 USD per minta).

A kiterjesztett, több gént egyszerre vizsgáló panelek felhasználása pajzsmirigy-göbök esetében igen előnyös. Az egyes daganattípusok kialakulásához egyszerre akár több gén mutációja is szükséges, és amennyiben ezen gének teljes csoportját képesek vagyunk egyszerre vizsgálni, a megszerzett genetikai információ nagy segítséget

nyújthat az adott göb végleges diagnózisának felállításában, illetve annak időbeni változásairól, a további teendőkkel, esetleges műtéti beavatkozásokkal vagy a terápiával kapcsolatban.

2. CÉLKITŰZÉSEK

Munkacsoportunk 2010-ben egy 8 onkogén vizsgálatán alapuló panelt fejlesztett ki. A teszt egy citológiát kiegészítő eljárás, mely az adott pajzsmirigy elváltozás (hideg göb) pontosabb diagnózisához és az esetleges malignitás előrejelzéséhez járul hozzá. E kezdeti génpanelünk bevezetése után egy sokkal kiterjedtebb, pontosabb és költséghatékonyabb módszer kifejlesztését tűztük ki célul.

1. Jelen munkánk során elsődleges célunk egy újgenerációs szekvenáláson alapuló genetikai diagnosztikai eljárás kialakítása volt, amely nagy pozitív prediktív értékkel és szenzitivitással képes megjósolni a még citológiailag benignus hideg göbök malignizálódásának kockázatát, illetve a bizonytalan citológiai kategóriába sorolt páciensek esetében segíthet a végleges diagnózis felállításában.

Eljárásunk kialakításának lépései a következők:

1. Nemzetközi adatok alapján, a lehető legtöbb releváns gént magába foglaló genetikai panel kialakítása.
 2. NGS-en alapuló szekvenálási folyamat kifejlesztése laboratóriumunkban.
 3. A kialakított molekuláris diagnosztikai panel optimalizálása és validálása a pajzsmirigy biobankunkban tárolt 67 darab ismert szövettani háttérű műtéti mintán.
 4. A szekvenálási eredmények gyors és effektív kiértékeléséhez szükséges bioinformatikai technológia, folyamat és szoftver fejlesztése.
 5. Új statisztikai módszer bevezetése a kapott eredmények elemzéséhez.
 6. A kialakított genetikai panel sikeres alkalmazása pajzsmirigy vékonytű-biopsziás mintákon.
-
2. Célunk, hogy az általunk kifejlesztett módszer nemzetközi viszonylatban is a legszélesebb körű és leginkább költséghatékony géndiagnosztikus panel legyen a pajzsmirigy daganatok korai, hideg göbből történő előrejelzésére és a bizonytalan citológiai eredmények kiegészítésére, esetleges terápiás konzekvenciákkal együtt.

3. MÓDSZEREK

3.1. A pajzsmirigy diagnosztikájában alkalmazható széleskörű génpanel kialakítása

Vizsgálatunk célja egy újgenerációs szekvenáláson alapuló géndiagnosztikai panel kidolgozása volt, mely pajzsmirigy szöveti mintából egy időben képes számos, a pajzsmirigydaganat kialakulásában szerepet játszó gén vizsgálatára.

Az általunk kifejlesztett NGS metodika a Thermo Fisher Scientific által forgalmazott Ion Torrent PGM™ rendszeren alapul. Egy egyedi AmpliSeq hot spot panelt terveztünk, amely összesen 23 gént tartalmaz (3. táblázat). Ezen géneken belül összesen 568 ismert onkogén mutációra terveztük a primereket. A vizsgálatba bevont géneket, illetve mutációkat korábban, a nemzetközi szakirodalomban már leírták pajzsmirigy daganatokkal kapcsolatban [71-75]. Közöttük természetesen megtalálhatjuk a már jól ismert, ún. driver géneket (*BRAF*, *RAS*), melyek a pajzsmirigy tumorgenezisében már jelentős helyet foglalnak el, illetve egyéb, kisebb jelentőséggel bíró gének is bekerültek génpanelünkben, így elősegítve, hogy ritkábban előforduló mutációkat is azonosíthassunk.

Az Ion Torrent PGM™ rendszerrel kb. 1-40 nukleotid hosszúságú eltéréseket tudunk detektálni, míg a génátrendeződéseket nem láthatjuk, hiszen a töréspontok ismerete nélkül (nem mindig ugyanott következik be a törés) az adott régiót nem tudjuk amplifikálni könyvtárkészítéskor. A szekvenáláshoz egy általunk tervezett multiplex primer poolt alkalmaztunk, a tervezési folyamat összesen 101 amplikont eredményezett. Annak érdekében, hogy a számunkra fontos génterületek minél nagyobb lefedettséget kapjanak, a primereket úgy terveztük meg, hogy azok a közeli intronok egyes részeit is tartalmazzák. E multiplex primer pool segítségével könnyedén tudtuk sokszorosítani a szekvenáláshoz szükséges DNS szakaszokat.

3. táblázat: Génpanelünk által vizsgált 23 gén, teljes nevükkel, illetve azon pajzsmirigy típusok feltűntetésével, melyekben már azonosították e gének mutációit (gyakoriság szerinti sorrendben – a leggyakoribb típus az első, jelölések jelentése: P-papillaris carcinoma, F-follicularis carcinoma, A-anaplasztikus carcinoma, M-medullaris carcinoma, NA-nincs adat, nincs meghatározva a pontos típus, zárójellel jelölt-ritkán előfordul az adott típusban) [76].

Gén	Gének egyéb nevei	Milyen típusú pajzsmirigyekben írták le?
AKT1	AKT Serine/Threonine Kinase 1; V-Akt Murine Thymoma Viral Oncogene Homolog 1	A, P
APC	Adenomatous Polyposis Coli	P, A, F
AXIN1	Axis Inhibition Protein 1; Protein Phosphatase 1, Regulatory Subunit 49	A, P
BRAF	V-Raf Murine Sarcoma Viral Oncogene Homolog B; Serine/Threonine-Protein Kinase B-Raf	P, A, M
C16orf3	Chromosome 16 Open Reading Frame 3; GAS8 Antisense Gene Protein 1	P, F
CTNNB1	Catenin Beta 1	A, P, F
DICER1	Dicer1, Dcr-1 Homolog; Dicer 1, Ribonuclease III	P, F, A
EIF1AX	Eukaryotic Translation Initiation Factor 1A X- Linked	F, A, P
GNAS	Guanine Nucleotide Binding Protein (G Protein), Alpha Stimulating	F, P, A
HRAS	V-Ha-Ras Harvey Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog	M, F, P, A
IDH1	Isocitrate Dehydrogenase (NADP(+)) 1	P, F, (A, M)
KRAS	V-Ki-Ras2 Kirsten Rat Sarcoma 2 Viral Oncogene Homolog	P, F, A, M

<i>LPAR4</i>	Lysophosphatidic Acid Receptor 4	NA
<i>MET</i>	MET Proto-Oncogene, Receptor Tyrosine Kinase; Hepatocyte Growth Factor Receptor	F, P, A
<i>NRAS</i>	V-Ras Neuroblastoma RAS Viral Oncogene Homolog	P, F, A
<i>PIK3CA</i>	Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase Catalytic Subunit Alpha	A, P, F
<i>PTEN</i>	Phosphatase And Tensin Homolog	A, F, P
<i>RET</i>	Rearranged During Transfection	P, F, M (A)
<i>SMAD4</i>	SMAD Family Member 4	P, F, (A)
<i>TERT</i>	Telomerase Reverse Transcriptase; Telomerase-Associated Protein 2	A, P, F
<i>TP53</i>	Tumor Protein P53; Transformation-Related Protein 53	A, F, P, (M)
<i>TSHR</i>	Thyroid Stimulating Hormone Receptor	P, F, (A)
<i>VHL</i>	Von Hippel-Lindau Tumor Suppressor	M, P, (A)

3.2. Pajzsmirigy minták gyűjtése

Munkánk során kétféle pajzsmirigy mintával dolgoztunk.

1. Módszerünk optimalizálásához és validálásához hisztológiailag igazoltan papillaris carcinomában szenvedő páciensek pajzsmirigyszövetéből, műtéti beavatkozás során vett szövetet analizáltunk.
2. A kialakított eljárásunkat ezután malignitásra gyanús göbökből, ultrahang-vezérelten vett FNAB mintákon is teszteltük.

3.2.1. Pajzsmirigy szövetminták gyűjtése

Validálási vizsgálatunkhoz 40 papillaris pajzsmirigy daganatban szenvedő páciensből (31 nő és 9 férfi) gyűjtöttünk be intraoperatív, friss szövetmintákat. Minden beteg

daganatos szövetrészből és normál, a tumor által nem érintett és szövettanilag egészséges/ép pajzsmirigyszövetéből is megtörtént a mintavétel, a Semmelweis Egyetem Sebészeti Osztályán, 2010-2016 között. A műtét során begyűjtött pajzsmirigy szövetmintákat a beavatkozást követően azonnal lefagyasztottuk és – 80°C-on tároltuk feldolgozásig. A vizsgálatot a Nemzeti Kutatási Etikai Bizottság hagyta jóvá, és minden beteg írásban beleegyezett a vizsgálat elvégzésébe. (ETT-TUKEB 1160-0/2010-1018EKU).

Összesen 67 darab pajzsmirigyminta vizsgálata történt meg, ebből 39 darab származik papillaris pajzsmirigydaganatból, míg 28 darab szövettanilag egészséges (normál) pajzsmirigyszövetből. 27 páciens esetében voltak megfelelőek, mind a PTC-s mind a normál pajzsmirigy részből származó szöveti minták, így ezen párok mindegyike, azaz 27 PTC-s és 27 normál minta került be a vizsgálatba, ezek mellett 12 páciensből csak a carcinomás, míg egy páciensből csak a normál szövetből származó minta került bevonásra.

3.2.2. Pajzsmirigy FNAB minták gyűjtése

Összesen 51, ultrahanggal gyanúsaként ítélt pajzsmirigy göbből származó FNAB mintát analizáltunk. A levett mintákat egy speciális tartósító oldatban, 4°C-on tároltuk az izolálásig. A mintavételek 2018-ban zajlottak, a Semmelweis Egyetem Sebészeti Klinikáján, illetve az Istenhegyi Magánklinikán. A vizsgálatot a Nemzeti Kutatási Etikai Bizottság hagyta jóvá, és minden beteg írásban beleegyezett a vizsgálat elvégzésébe (ETT-TUKEB 1160-0/2010-1018EKU).

3.3. Genomiális DNS izolálása

3.3.1. Pajzsmirigy szöveti minták

A feldolgozás megkezdésekor a fagyasztott műtéti mintákat, felolvasztás után, foszfáttal pufferelt sóoldatban (PBS) felaprítottuk Fisher Scientific PowerGen 125 szövethomogenizátor (Fisher Scientific GmbH, Németország) által.

3.3.2. FNAB minták

Az FNAB mintákat szobahőre melegedés után 10 percig 2000 rpm-en centrifugáltuk, majd a felülúszót leszívtuk, és csak a pelletet őriztük meg.

Mind a PBS-ben lévő szöveti mintákból és az FNAB mintákból származó sejtekből genomiális DNS-t izoláltunk a Roche High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche Indianapolis, IN, USA) segítségével. Minden mintánál a gyártó által előírt protokollt használtuk. Az izolált DNS minőségét NanoDrop spektrofotométerrel (NanoDrop Technologies, Montchanin, DE, USA) 260/280 nm-en mértük meg és csak a megfelelő minőségű DNS-t fogadtuk el (ahol a 260/280 arány legalább 1,8 volt). A DNS koncentrációját a Qubit dsDNA HS assay Kit (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA) segítségével határoztuk meg, és a túl alacsony (<10 ng/ul) koncentrációjú mintákat kizártuk a további vizsgálatból, ugyanis a szekvenáláshoz szükséges minimális DNS koncentráció minimum 10 ng/ul.

3.4. Újgenerációs szekvenálás

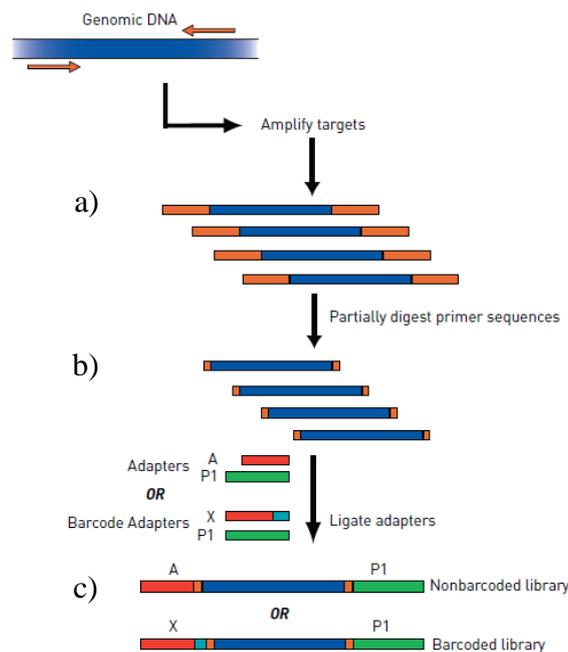
A szekvenálás laboratóriumi munkafolyamata három fő lépésből áll: könyvtárkészítés, emulziós PCR és szekvenálás.

1. Könyvtárkészítés

Az eljárás során a korábban izolált DNS-t felhasználva, annak specifikus régióit felsokszorozva DNS könyvtárat készítettünk. A DNS könyvtár elnevezése alatt az egy mintához tartozó, felsokszorozott DNS fragmentek összességét értjük.

A könyvtárak elkészítése az Ion AmpliSeq™ Library Kit 2.0 (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA) alkalmazásával történt (11. ábra). Az 5X Ion AmpliSeq™ HiFi Mixből, az egyedi multiplex primer poolból és 10 ng genomiális DNS-ből mixet készítettünk, ezután PCR-rel felamplifikáltuk, melyet a következő protokoll alapján végeztük: 2 perc 99°C-on, 21 cikluson át: 15 sec 99°C-on és 4 perc 60°C-on, végül 10°C-on tartva (11. ábra a) rész). A PCR reakció után a primereket részben visszaemésztettük FuPa reagens segítségével. Az emésztéshez szükséges környezet:

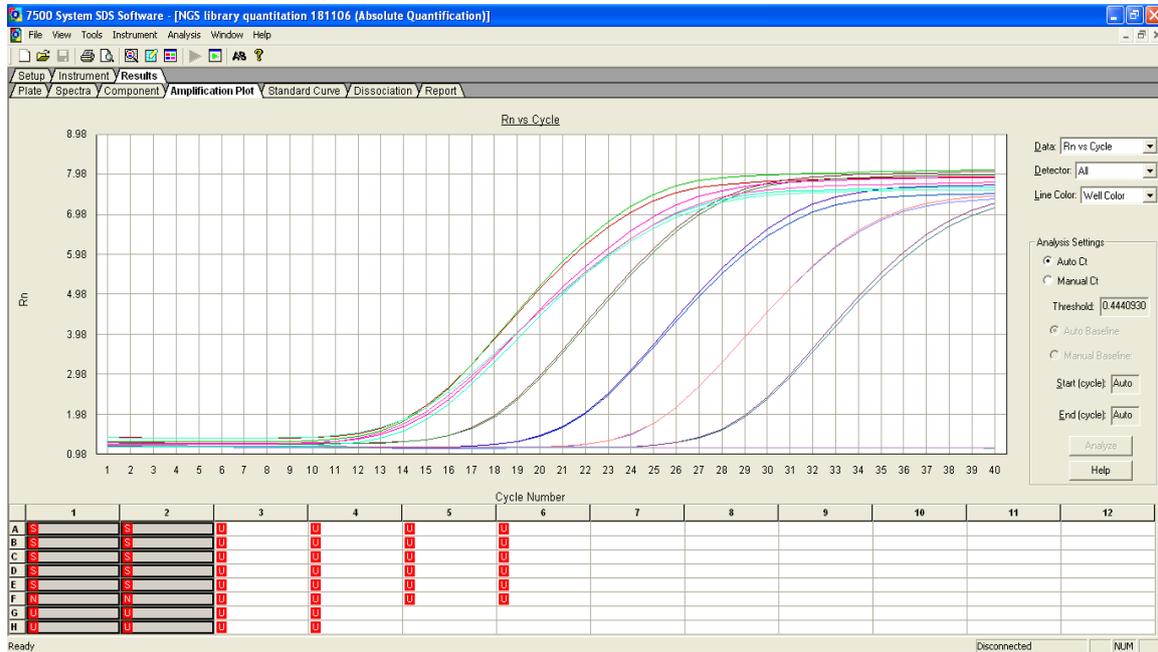
10 perc 50°C-on, 10 perc 55°C-on, 20 perc 60°C-on, végül 10°C-on tartva (11. ábra b) rész). Ezután a szekvenáló adaptereket és egyedi bárkódokat ligáltunk az amplikonok végére. A folyamathoz szükséges környezet: 30 perc 22°C-on, 10 perc 72°C-on, végül 10°C-on tartva (11. ábra c) rész). Ezután a kész könyvtárakat Agencourt® AMPure® XP Reagent (Beckmann Coulter, CA, USA) segítségével kitisztítottuk.



11. ábra: A szekvenálási protokoll első részének, a könyvtárkészítésnek a folyamata: a) a szükséges DNS szakasz felamplifikálása, b) primerek részleges visszaemésztése, c) adapterek és bárkódok ligálása. (Ábra forrása: [77])

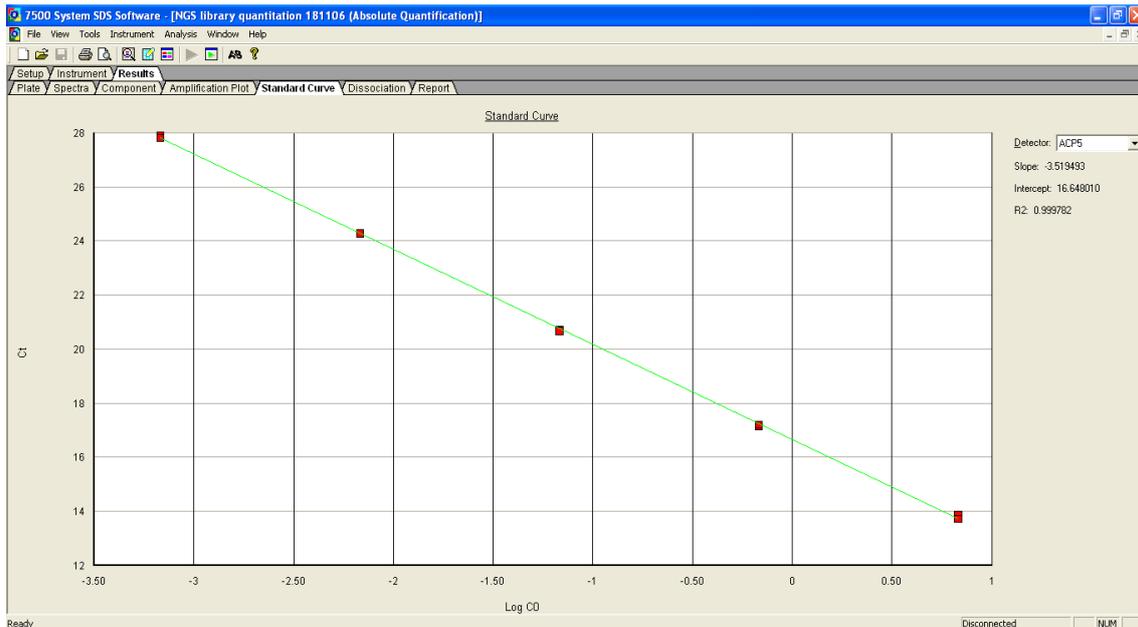
A folyamat sikerességét csak a DNS könyvtárak qPCR módszerrel történő koncentráció meghatározásával tudjuk megítélni, melyhez a reakciót az Ion Library TaqMan Quantitation Kit (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA) felhasználásával mértük össze, a gyári protokoll alapján. A reakció egy ABI 7500 Real-Time PCR készüléken történt. A vizsgált mintákat ismert koncentrációjú kontrollok mellett vetettük alá a PCR reakciónak, mely során a keletkezett termék mennyiségét valós időben monitoroztuk. Az ismert kontrollokhoz hasonlítva megállapítottuk az ismeretlen minták DNS tartalmát (12. ábra). A mérés során a következő protokollt

használtuk: 2 perc 50°C-on, 20 sec 95°C-on, majd 40 cikluson át: 1 sec 95°C-on és 20 sec 60°C-on.



12. ábra: qPCR segítségével határoztuk meg a könyvtáraink DNS koncentrációját. Öt ismert kontrollhoz (S) és egy negatív kontrollhoz (N) hasonlítva határoztuk meg az ismeretlen minták (U) DNS tartalmát.

A futást akkor tekintjük megfelelőnek, ha a párhuzamos standard értékekre illesztett egyenes (standard curve) R^2 értéke a lehető legközelebb esik az 1-hez, a qPCR reakció által mért értékeket 0,95-ös R^2 értéktől fogadjuk el megbízhatónak (13. ábra).



13. ábra: Az ismert kontrollok értékeire illesztett egyenes. Jelen ábrán az R^2 érték kerekítve 0,99 volt, mely alapján a mért könyvtárak koncentrációja megbízhatónak adódott.

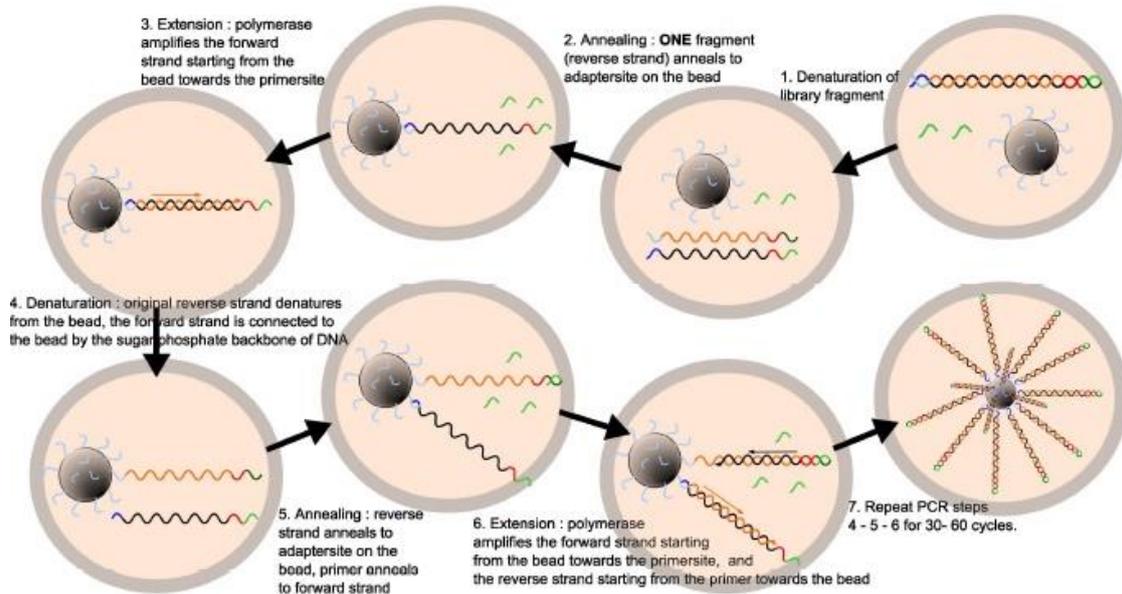
Azokat a mintákat, melyek koncentrációja a qPCR mérés során 100 pM feletti értéket mutatott, szekvenálásra alkalmas mintának ítéltük meg.

2. emulziós PCR

A folyamat során az elkészített DNS könyvtármolekulákat, meghatározott koncentrációban és arányban, az Ion Szekvenáló Részecskék (ISP, Ion Sphere Particles, szekvenáló gyöngyök) felszínére kötöttük és felsokszoroztuk, egy emulziós PCR (emPCR) reakció során (14. ábra). A reakcióba bekerülő könyvtárakat nem egyenként, hanem kis csoportokban (5 minta/csoport) kezeltük ettől a lépéstől kezdve, egészen a szekvenálás végéig.

A templát előkészítését Ion PGM™ Hi-Q View OT2 Kittel (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA) végeztük egy félautomata Ion OneTouch 2 készüléken. A többlépésből álló folyamat első lépéseként az együtt vizsgált minták könyvtárait 100 pM koncentrációra hígítottuk, majd egy könyvtár mixet készítettünk belőlük. Az így kialakult, most már egy csőben lévő minta került bele az Ion OneTouch 2 készülékbe. Az emPCR során a reakció egy olaj-víz emulzióban zajlik, melynek segítségével párhuzamosítható az amplifikáció, a DNS fragmentumok felsokszorosítása

mikrométer nagyságrendű, az adapterekkel komplementer oligonukleotidokkal borított szekvenáló gyöngyök felületén zajlik.

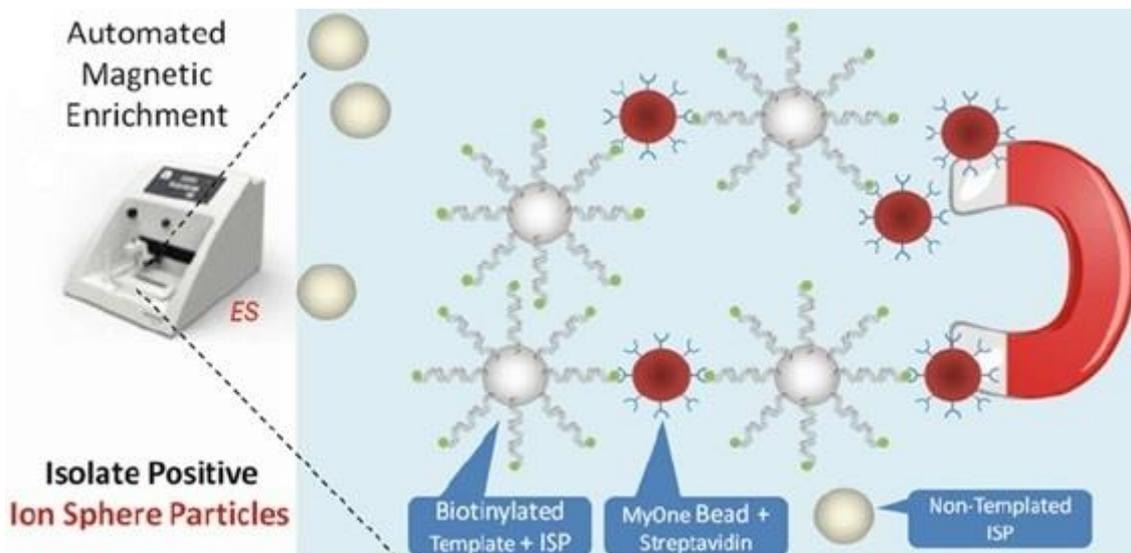


14. ábra: Az emPCR folyamata egy mikroreaktorban. 1. Denaturáció: A könyvtár fragmens denaturációja. 2. Annealing: A fragmes reverz szála a gyöngy felszínén található oligonukleotidhoz kötődik. 3. Extension: A DNS-polimeráz létrehozza a hiányzó, forward szálát. 4. Denaturáció: Megtörténik a denaturáció, majd a leváló szál (reverz) is hozzákapcsolódik a gyöngyhez. 5. Annealing: A primerek a forward szálak végéhez kapcsolódnak. 6. Extension: A DNS-polimeráz létrehozza a hiányzó szálakat, a reverz szálon a gyöngytől a primerhelyig, míg a forward szálon a primertől a gyöngy felé építi be a nukleotidokat. 7. A PCR lépései ciklusosan ismétlődnek (4-5-6. lépés, 30-60 ciklus). (Kép forrása: [78])

Az elkészült szekvenáló gyöngyöknek összesen 10-30%-a használható fel a szekvenálás során, melynek okai a következők:

- nincs templát a reaktorban
- többféle templát van a reaktorban (poliklonális gyöngyök)
- nincs primer a reaktorban
- nincs PCR mix a reaktorban
- nincs gyöngy a reaktorban
- üres a reaktor

Azon gyöngyöket, amelyek bármilyen okból is, de nem hordoztak a felszínükön szekvenálható DNS szakaszt, egy dúsítási eljárás segítségével eltávolítottuk az elkészült templát oldatból. Az eltávolítás az Ion OneTouch ES (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA) készülék segítségével történt, melynek alapját a biotin és a streptavidin nagy affinitású kölcsönhatása adta. Az ISP gyöngyök felületére kötött DNS szakaszok végei biotiniláltak, ezekhez a dúsítási eljárás során olyan mágneses gyöngyöket kevertünk, melyeknek felszínére streptavidint rögzítettek. A streptavidin mindegyik alegysége egy biotin megkötésére képes. Ezután képesek vagyunk a mágneses gyöngyök segítségével e molekulák elkülönítésére (15. ábra). Egyedül a poliklonálisan amplifikálódott gyöngyöket nem tudjuk eltávolítani. Az így elkészített ISP-k alkalmasak az Ion Torrent PGM™ készüléken való szekvenáláshoz.



15. ábra: A dúsítási eljárás Ion OneTouch ES készülék segítségével, kihasználva a biotin-streptavidin kölcsönhatást. (Kép forrása: [79])

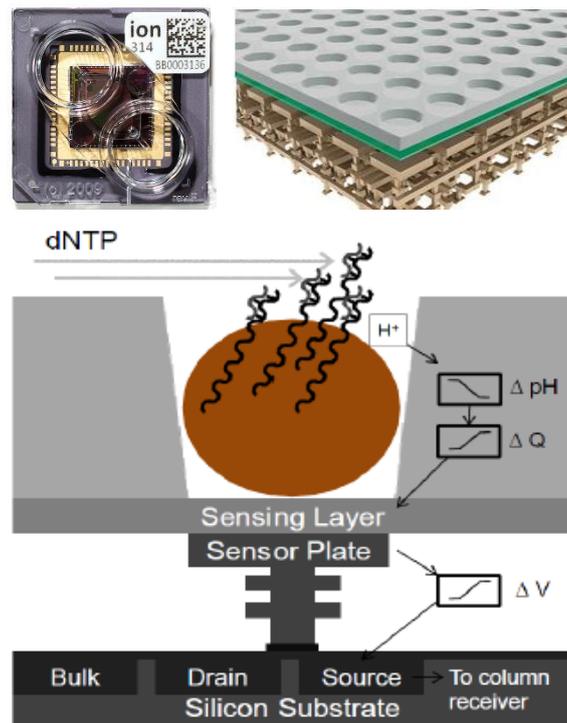
3. Szekvenálás

A teljes eljárás utolsó, laboratóriumban történő fázisa maga a szekvenálási folyamat. Az elkészített ISP gyöngyöket szekvenáló chipbe töltöttük és meghatároztuk a gyöngyök felszínén lévő DNS fragmensek nukleotid szekvenciáját az előzetesen inicializált Ion Torrent PGM™ szekvenátor segítségével.

A szekvenálás előkészítéseként szekvenáló primert és polimerázt adtunk a templátot tartalmazó gyöngyökhöz, majd az így teljesen előkészített ISP gyöngyöket egy Ion

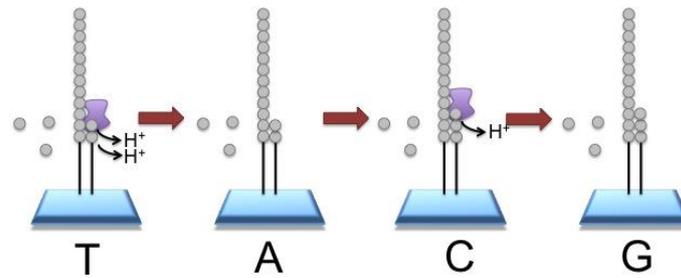
314™ Chip v2 BC szekvenáló chipbe töltöttük, és elindítottuk a szekvenálást az Ion PGM™ Hi-Q™ View Sequencing Kit (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA) segítségével.

Az Ion 314™ Chip v2 BC szekvenáló chipek felületét 1,2 millió parányi well borítja, melyek mindegyikébe egyetlen ISP gyöngy kerülhet. Minden egyes well rendelkezik egy ion szenzorral, amely érzékelné képes egy adott gyöngyön lévő DNS szál szekvenálása során bekövetkező H^+ felszabadulást (16. ábra).



16. ábra: Egy Ion 314™ Chip v2 BC szekvenáló chip, és annak felszíne közelről, illetve egy wellhez tartozó ion szenzor működésének vázlata. (Képek forrása: [80])

Minden nukleotid beépülésekor egy H^+ felszabadul. A nukleotidok egyesével adódnak a reakcióhoz, így abban az esetben, ha a következő beépítendő nukleotid nem azonos az éppen bemért nukleotiddal, akkor nem tapasztalunk H^+ felszabadulást; ha azonos (és be is épül) akkor viszont igen (17. ábra). Minden nukleotid bemérés és detektálás után mosással a gép eltávolítja a megmaradt nukleotidokat, majd jöhet a következő ciklus.



17. ábra: A szekvenálás folyamata. H^+ felszabadulás következik be, ha az éppen soron következő, szekvenátor által bejuttatott nukleotid azonos a beépítendő nukleotiddal.

3.5. Genetikai adatok elemzése

A szekvenálás végére hatalmas mennyiségű, több gigabájtnyi adatot kapunk, melynek értelmezéséhez, kiértékeléséhez szoftveres segítségre van szükségünk. Vizsgálatunk során a validálási mintákból származó adatokat szoftveres elemzés után statisztikailag is analizáltuk. Az FNAB mintákból származó eredményeket csupán szoftveres elemzésnek vetettük alá.

3.5.1. Szoftveres adatelemzés

A szoftveres adatelemzés során bioinformatikai eszközökkel értékeltük ki az újgenerációs szekvenátor által előállított nagy mennyiségű genetikai adatot.

Az Ion Torrent PGM™ futásából származó adatokat egy platform-specifikus Torrent Suite v5.0.4 szoftver segítségével elemeztük. A szekvenálási leolvasásokat a referencia genomhoz (hg19) illesztettük, TMAP (<https://github.com/iontorrent/TMAP>) algoritmus segítségével, majd a variáns hívót úgy állítottuk be, hogy a szomatikus variánsokat megtalálja az adott régiókban. Ion Reporter 5.0-t használtunk a variánsok jelölésére. Az eredményes elemzéshez, és a variánsok megbízható azonosításához megfelelő, vagyis minimum 5×-ös lefedettségre van szükségünk. Azon genetikai variánsokat, amelyek populációs gyakorisága 1%-nál nagyobb volt, a további elemzésből kizártuk.

3.5.2. Statisztikai adatelemzés

A genetikai kutatások eredményeként rengeteg hasznos információ kerül a birtokunkba, amelyek közül gyakran, a fejlett bioinformatikai eszközök segítségével sem tudjuk megtalálni a számunkra leghasznosabb információkat, illetve a mélyebb összefüggések meglátása is nehézkes vagy hibás. Ezen kívül a számunkra nyilvánvaló összefüggéseket bonyolult lehet mások számára egyértelműen bemutatni. E problémákra nyújt megoldást a matematikai, statisztikai szemlélet.

Jelen kutatásunk során fontos feladatunk volt az adatfeltárás, a lényeges információk kiemelése, illetve a biológiai mintázat leírása és az abból történő konklúzió levonása. Ezeket különféle matematikai metodikák segítségével tudtuk elérni. Az elemzés folyamán az ún. többváltozós módszerek mintázat-, vagy adatstruktúra-feltáró funkciója bizonyult hasznosnak. E módszerek biológiai jelentősége már régóta ismert, például egy 1990-ben megjelent cikkben a többváltozós módszerek több mint 500 alkalmazását említik [81]. A metodikák közül az egyik leggyakrabban alkalmazott a diszkriminancia analízis (canonical variate analysis, CVA) [82].

A CVA elemzés a csoportok elkülönítését maximalizáló módszer, mely az egyes csoportok közötti varianciát maximalizálja, míg a csoportokon belüli varianciát a minimumra próbálja csökkenteni. Fő célja, hogy a leginkább elkülönülő változókat megtalálja, és az új eseteket besorolja a megfelelő csoportba. A CVA alapját a különböző változók által létrehozott mátrixok adják, melyek $n \times n$ -es méretűek.

A kapott NGS adatokat a diszkriminancia analízis segítségével osztályoztuk, míg a tumorkockázat becsléséhez az F-értékeket használtuk. A statisztikai számításokhoz a SYN-TAX 2000 csomagot alkalmaztuk [83]. Elemzésünk célja azon mutációk és gének csoportosítása és leválogatása volt, amelyek a legmegbízhatóbban felhasználhatóak a pajzsmirigy tumoros vagy benignus állapotának elkülönítésére.

A vizsgált adatokat két szinten értelmeztük: variánsok és gének szintjén. Az első, vagyis a variánsok szintjén egy 177 sorból (az azonosított mutációk száma) és 67 oszlopból (pajzsmirigyminták száma) álló mátrixot állítottunk össze és ezt vetettük alá CVA elemzésnek. A mátrixban az egyes mutációk meglétét 1-es számmal jelöltük azon minták esetében, ahol azokat megtaláltuk, míg abban az esetben, amikor adott mintában mutációt nem találtunk, 0-val jeleztük. E mátrix nagyon ritkás volt, ugyanis

a legtöbb variánst csak 1 vagy 2 mintában azonosítottuk, ezek indikátor értéke igen alacsony, ezért a ritkán előforduló mutációkat kivettük a további analízisből, és csak azon elváltozásokat hagytuk meg, amelyek legalább háromszor előfordultak.

A második szinten, a gének szintjén vizsgált mátrix 20 sorból (gének száma (a vizsgált 23 génből 20-ban találtunk mutációt)) és 67 oszlopból (pajzsmirigyminták száma) állt. Ezen a szinten minden mutációt számításba vettünk, amely egy adott génhez és mintához köthető volt.

Mindkét adatmátrixot diszkriminancia analízisnek vetettünk alá. A CVA elég robusztus módszer ahhoz, hogy durva becsléseket adjon a besorolás valószínűségéről, míg a kanonikus funkciók használata az ismeretlenek besorolására nem alkalmas. Mivel csupán két csoportunk volt, így az elemzés egyetlen kanonikus változatot (CV1) eredményezett mindkét adatkészlet esetében. A kanonikus variánsok és az eredeti változók közti összefüggés révén elkülöníthető volt a két vizsgált csoport (tumoros vagy egészséges/tumormentes), illetve a tumor kialakulásának valószínűsége. E tumorkockázat becsléséhez az F-értékeket használtuk fel (minden egyes változó csoportok közötti és csoporton kívüli varianciájának aránya), melyek értéke minél nagyobb, annál nagyobb a kockázat.

4. EREDMÉNYEK

4.1. A vizsgált páciensek adatai

4.1.1. Pajzsmirigy szöveti minták

Validálási vizsgálatunkba összesen 40 páciensből származó pajzsmirigy szövetszövetminta került bevonásra, melyek harmincegy női és kilenc férfi betegől származtak. A páciensek átlagéletkorának eloszlása a következő volt: női pácienseink esetében az átlag 49,5 év (27-80 év között), míg férfi pácienseinké 55,1 évre (37-80 év között) tehető.

4. táblázat: Harminckilenc PTC-s és 28 normál, szövettanilag tumormentes pajzsmirigy szövetet gyűjtöttünk 40 páciensről. A minták több mint fele (n=24) a klasszikus típusba tartozik, míg a maradék 15 minta több hisztológiai variáns között oszlik meg.

PTC minták (n=39)	Férfi/nő (n)	Lebények érintettsége egy/mindkettő (n)	Átlagos tumor átmérő (mm)	Nyirokcsomó metasztázis (n)
<i>Klasszikus PTC</i> (n=24)	7/17	18/6	14,8	9/24
<i>Follicularis variáns</i> (n=4)	1/3	4/0	18,8	1/4
<i>Encapsulált variáns</i> (n=3)	0/3	1/2	14,3	0/3
<i>Oncocyter variáns</i> (n=4)	0/4	4/0	16,3	3/4
<i>Multifokális variáns</i> (n=1)	0/1	0/1	N/A	0/1
<i>Microcarcinoma</i> (n=3)	0/3	3/0	3,3	0/3

A vizsgált papillaris pajzsmirigy daganatoknak hét altípusát figyelhettük meg. Huszonnégy mintánk klasszikus PTC típusba tartozott, míg a többi 15 valamelyik PTC variáns közé sorolódott: follicularis variáns (n = 4), encapsulált (n = 3), oncocyter (n = 4), multifokális (n = 1) és mikrocarcinoma (n = 3). A legnagyobb daganatméretet a follicularis variánsok esetében tapasztaltunk (átlagos átmérő = 18,8 mm). A

multifokális variáns eseten kívül még a klasszikus és az encapsulált PTC típusokban jelent meg a tumoros elváltozás a pajzsmirigy mindkét lebenyében. A mintáink alapvető jellemzőit az 4. táblázatban mutatjuk be.

4.1.2. FNAB minták

Vékonytű-aspirációs biopszia segítségével összesen 77 páciens ultrahanggal gyanús pajzsmirigy göbéből történt mintavétel, majd DNS izolálás. A DNS-ek koncentrációja igen kritikus az NGS módszer sikeressége szempontjából, ezért a túl alacsony DNS koncentrációval rendelkező mintákat (<10 ng/ul) kizártuk a további fázisokból. Így végül 51 göböt vizsgáltuk meg, melyek negyvenegy női (átlag életkor: 53 év) és tíz férfi (átlag életkor: 45 év) páciensről származtak.

A biopszia során minden esetben két mintavétel is történt egyidőben, melyek egyikéből az általunk végzett genetikai vizsgálat, míg a másikkól a citológiai kiértékelés történt, mely utóbbi összesített eredményeit az 5. táblázat tartalmazza. Ezek alapján nyolc eset volt malignus, míg negatív, vagyis benignus/jóindulatú göböt 28 esetben véleményezett a citológiai vizsgálat. További 14 páciens eredménye a malignitásra gyanús kategóriákba sorolódott. Egyetlen esetről nincs citológiai információnk, a kenet sejtmentessége miatt, azonban a genetikai vizsgálathoz szerencsére elegendő DNS mennyiséget tartalmazott az adott minta, így rendelkezünk genetikai eredménnyel ebben az esetben is.

5. táblázat: Az 51 megfelelő DNS koncentrációval rendelkező biopszia minta citológiai eredményei, illetve a páciensek nem eloszlása.

	Mintasám	Nő/Férfi (n)
Pozitív citológiai lelet	8	6/2
Negatív citológiai lelet	28	25/3
Gyanús citológiai lelet	14	9/5
NA (Sejtmentes kenet)	1	1/0
Összesen	51	51

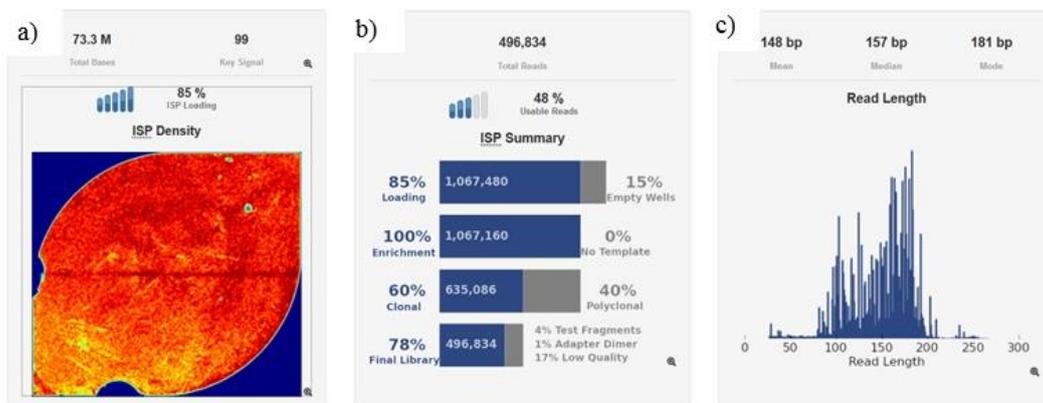
4.2. A szekvenálási adatok minőségi értékei

A szekvenálás végeztével kapott eredmények megbízhatóságát, az egyes futásokról, adott chipen történt leolvasásokról minden esetben ellenőriznünk kell.

Először szekvenálási futásunk legalapvetőbb jellemzőit kell áttekintenünk:

1. chip töltöttsége: min. 60%
2. ISP-k, melyek tartalmaznak templátot: min. 99%
3. monoklonális:poliklonális gyöngyök eloszlása: a poliklonális gyöngyök maximum az összes gyöngy 1/3-át adhatják ki
4. végső readszám: min. 450.000
5. megfelelő hosszúságú readek: a 25 bp-nál rövidebb readeket a program eltávolítja, míg a readek középértékének (mean) 135-155 bp kell lennie.

Egy reprezentatív futás ezen eredményeit láthatjuk az 18. ábrán, melyek mindegyike tökéletesen megfelelt az elvárásoknak, így a példánál maradva az ebből származó adatokat megbízhatónak tekintettük.



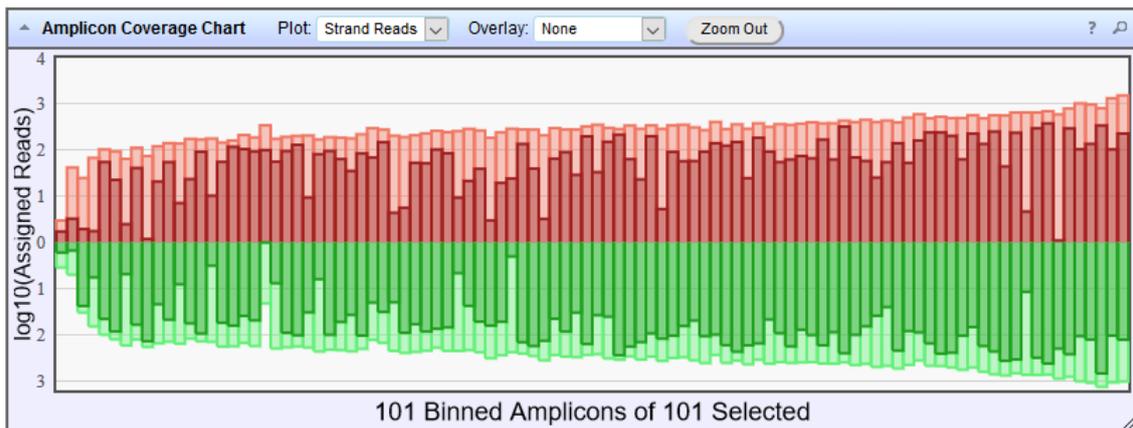
18. ábra: Egy szekvenálási futás legalapvetőbb jellemzői. A chip töltöttsége jól látszik a megjelenített a) ábrán, összességében 85%-os volt, vagyis a chip felületén található wellék 85%-ába került szekvenáló gyöngy. b) A szekvenáló gyöngyök mindegyike tartalmazott templátot, tehát üres gyöngy egy sem volt. A monoklonális gyöngyök (clonal) előfordulása 60%-ra tehető. A poliklonális (polyclonal) és az alacsony minőségű szekvenális readek kiszelektálódtak, így azok nem kerültek elemzésre. Így alakult ki a végső readszám, ami 496.834 leolvasást tartalmazott.

Ezen readek átlagos hosszeloszlása látható a c) ábrán.

Ezek után további paraméterek áttekintésére is szükség van. Az átlagos lefedettséget és az 1×-es target lefedettséget kell ellenőrizni minden minta esetében. Egy minta átlagos elfedtségének 100×-os felett, míg az 1×-es target lefedettség értékének 95% fölött kell alakulnia, hogy az adott mintából megbízható eredmény készülhessen.

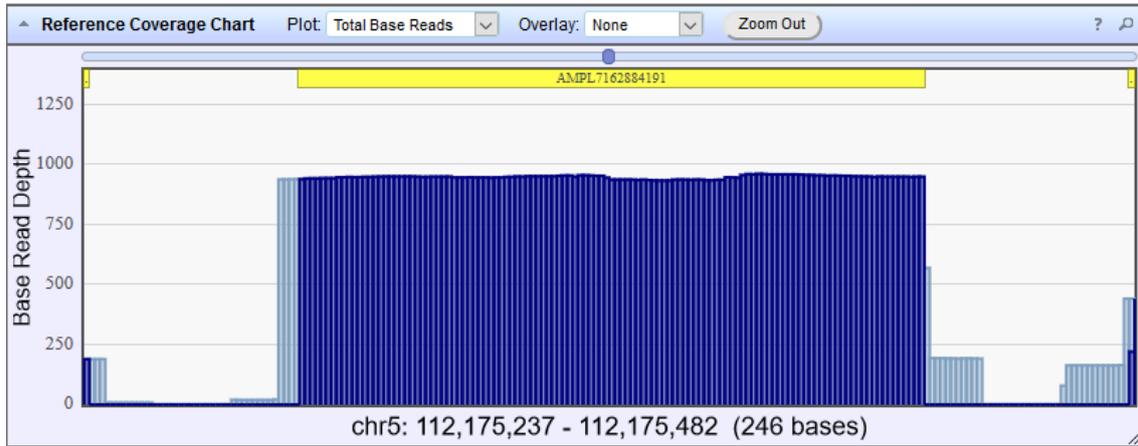
Az általunk vizsgált minták minden esetben megfelelő paraméterekkel rendelkeztek, így ezután a variant caller (variáns kivonatoló program) segítségével megkereshettük és kigyűjthettük az illesztett szekvenciákban található, referenciától való eltéréseket.

A mintánkénti átlagos readok száma 143.211 volt. Az átlagos lefedettségünk $642\times$ ($121\times\text{-}2.290\times$) (19-20. ábra), míg az átlagos 1×-es target lefedettség 98,2%-os volt, 99% feletti átlagos pontossággal. A lefedettségek uniformitása 54,4 és 93,2% között alakultak.



19. ábra: Az ábrán egy minta AmpliSeq amplicon könyvtárának, amplicononkénti lefedettségi értékei láthatóak (az ehhez a mintához rendelt read-ek száma), tízes alapú logaritmus skálán ábrázolva, ahol az átlagos lefedettség 485x volt.

Leolvasható a forward (piros) és reverz (zöld) szálon keletkezett szekvencia leolvasások aránya, mind a 101 ampliconon. A háttérben látható, világosabb színű oszlopok az összes leolvasás számát mutatják, amíg az erősebben színezett oszlopok azok mennyiségét, amelyek végig érik a teljes amplicont. Megfigyelhető, hogy egyes ampliconok esetében a két szekvenálási irány ideális 50-50%-os aránya kissé az egyik irányba eltolódott. Információt ezzel nem veszítünk, azonban egy variáns fals pozitívitásának nagyobb lehet az esélye.



20. ábra: Az ábrán egy ampikonon belül látható a lefedettség eloszlása, bázisonként. A világos kék sávok az off-target bázisokat és azok lefedettségét jelölik. Az ampikonok szükségszerűen túlnyúlnak a vizsgálni kívánt régiókon, így a primer kötőhelyek nem maszkolhatnak el genomi eltéréseket.

4.3. A pajzsmirigy szövetminták mutációs profilja

A 67 pajzsmirigy szövetmintán 23 pajzsmirigy carcinoma kialakulásában szerepet játszó gént vizsgáltunk meg 568 ismert mutációs hotspot területen. Ezen mintákban összesen 177 nem-szinonim, vagyis aminosavcserevel járó variánst azonosítottunk, ezek közül 145 SNV (142 missense és 3 nonsense), 31 INDEL eltérés (27 inszerció, 3 deléció és 1 frameshift deléció), és 1 missense MNV különíthető el. E genetikai eltérések közül ötvenet már leírtak a COSMIC adatbázisban. Jelen vizsgálatunkkal további 127 új variánst azonosítottunk a célzott szekvenciák körül. Ugyanis a vizsgálati módszer jellegéből adódóan a rendszer nemcsak a hotspot régiókat látja, hanem a környező szakaszok egy részét is, így találhattunk olyan variánsokat, melyek nem a kezdeti 568 mutáció közé tartoztak.

4.3.1. Tumoros szövetekben talált mutációk

A PTC-s szövetmintákban összesen 102 szomatikus mutációt azonosítottunk 20 génben. A legpolimorfabb génnek az *AXINI* mutatkozott, melynek 16 különböző variánsát azonosítottuk. Ez után következik a *PIK3CA*, az *APC* és a *TSHR* gén 15, 14,

illetve 13 SNV-vel. Talált mutációink közül a leggyakrabban előforduló a már jól ismert *BRAF* c.1799T>A (V600E) volt, ami 14 papillaris pajzsmirigy daganatszövetben fordult elő. Emellett gyakran megjelenő változatok voltak még a *TSHR* c.1373T>C, amely öt esetben, illetve az *APC* c.636_637insAA frameshift mutáció, amely négy tumorszöveti mintában jelent meg.

Átlagosan egy PTC-s mintában 5,74 darab mutációt figyeltünk meg. Tizenkilenc nukleotid változás volt a legmagasabb eltérésszám, amit felfedeztünk egy tumoros mintában, és két olyan PTC-s mintánk volt, amelyben nem azonosítottunk egyetlen szomatikus mutációt sem a vizsgált génekben.

A *BRAF* V600E mutáció tekintetében több megfigyelést is tettünk. Először is azon PTC-s minták, amikben a *BRAF* V600E mutáció megtalálható volt egyéb mutációk kevésbé fordultak elő (AMD (átlagos mutáció sűrűség) = 3,8), mint e mutáció nélküli tumoros szövetszövetmintákban (AMD = 6,1). Másodszor a *BRAF* gén mutációi közül a V600E-n kívül másfajta SNV csak a klasszikus PTC-s mintákban fordult elő, az összes többi altípusban csak V600E variánst találtunk. Csak a klasszikus típusban fedeztünk fel egy valószínűleg patogén variánst, a 1795A>G (T599A) SNV-t. A vizsgált mintáinkban szintén csak a klasszikus PTC-ben jelent meg a *VHL* tumorszupresszor gén négy különböző mutációja.

Két gén eltéréseit – a *GNAS*-t, amely a benignus göbök indikátora és a *KRAS*-t, amely csak jóindulatú pajzsmirigy neopláziát okoz – nem detektáltuk egyik PTC-s mintánkban sem. Ezekon kívül a már jól jellemzett *TERT* promóter elváltozásaira sem találtunk példát vizsgált tumormintáink között.

4.3.2. Szövettanilag egészséges, tumormentes szövetekben talált mutációk

A tumormintákhoz képest a normál, szövettanilag egészségesnek/épnek meghatározott szövetszövetmintáinkban közel fele annyi mutációt fedeztünk fel. Összesen 52 szomatikus mutációt detektáltunk 15 génben. A legpolimorfabb génnek itt is az *AXINI* mutatkozott, azonban mutációs mintázata eltért a PTC-s mintákban találtakétól. A leggyakrabban előforduló mutáció az *EIF1AX* c.71G>A volt, amelyet két mintában találtunk meg. Nyolc vizsgált gén esetében nem találtunk egyetlen

szomatikus eltérést sem, ezek a következők: *AKT1*, *BRAF*, *GNAS*, *HRAS*, *KRAS*, *NRAS*, *TERT* és *VHL*.

4.4. A genetikai adatok statisztikai elemzése

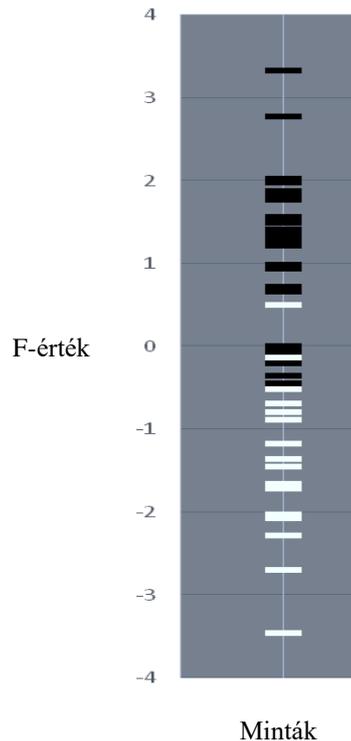
Az NGS adatok szoftveres elemzése alapján felfedezett genetikai eltéréseket ezután diszkriminancia elemzésnek vetettük alá. Ennek segítségével további, pontosabb összefüggéseket szeretnénk volna felfedezni, melyek alapján létrehozhatunk egy olyan score rendszert, aminek a segítségével el tudjuk különíteni a tumoros pajzsmirigy mintákat a jóindulatú elváltozásoktól.

Korábban, a „Módszerek” részben, említettek alapján az adatokat kétféle szinten elemeztük. Az egyik adatmátrix tartalmazta azon mutációkat, melyek legalább háromszor előfordultak a vizsgált mintákban, míg a másik mátrix a gének szintjén összesítette a mintákban található elváltozásokat.

4.4.1. Statisztikai elemzés variánsok alapján

Az elsődleges vizsgálatok alapján a mutációk közül 16 bizonyult a leginformatívabbnak (e variánsok fordultak elő legalább három mintában), így a végleges CVA elemzés e mutációk szintjén történt.

Az elemzés végére a minták mindegyike kapott egy számértéket (F-érték), amely alapján azok tumorkockázata megbecsülhető. A pozitív F-értékkel rendelkező minták nagy korrelációt mutatnak a tumor meglétével, míg a negatív értékek a tumormentes állapotot jelzik. A két pácienscsoport viszonylag jól elkülönül egymástól egy tengely mentén (21. ábra), ezért biztonsággal állíthatjuk, hogy a CVA analízis során kapott értékek jól korrelálnak a tumor jelenlétével.



21. ábra: A PTC-s (fekete sáv) és a normál, tumormentes pajzsmirigy minták (fehér sáv) eloszlásának grafikus ábrázolása, a 16 variánsból számolt F-érték alapján.

A variánsok közül a *BRAF* c.1799T>A (V600E) pontmutáció rendelkezik a legnagyobb tumorjelző képességgel. Ez a mutáció összesen 14 tumoros szövetmintában volt jelen, és egyetlen normál, tumormentes mintában sem fordult elő. További öt olyan variánst különítettünk el, amely szintén nagy szerepet kap a két csoport elkülönítése során. A hat legfontosabb variánst F-értékük alapján különíthettük el a többitől (6. táblázat), így ha egy variánshoz tartozó F-érték nagyobb, mint 1, az adott variáns jó indikátor a tumorkockázat becslésekor, hiszen főként a tumoros mintákban figyelhetők meg. Abban az esetben, ha $F < 1$ -nél, a variáns nem hasznos előjelzője a tumoros állapotnak, mert előfordulása véletlenszerű a különböző szövetmintákban. Ezek alapján a genetikai elemzés, abban az esetben is hasznos lehet, ha csak e hat pontmutációt elemezzük (amennyiben a variánsok F-értékének korrelációja CV1-el nagyobb 0,22-nél). E hat elkülönítésben fontos variáns: *BRAF* c.1799T>A, *TSHR* c.1373T>C, *APC* c.636_637insA, *LPAR4* c.137A>G, *TSHR* c.1963A>G és *SMAD4* c.964T>A.

6. táblázat: A 16 variáns, melynek indikátor értéke a legnagyobb a diszkriminancia analízis során, hisz e variánsok fordultak elő legalább három mintában. A variánsok F-értékük alapján csökkenő sorrendben lettek feltüntetve, míg az utolsó oszlopban a kanonikus variánssal való korreláció értéke látható. Az F-érték minél nagyobb, annál nagyobb a malignitási kockázat. A más színnel kiemelt, felső 6 variáns a legjobb indikátor a tumorkockázat becslésekor.

Gén	Protein	Variáns	F-érték	Korreláció CV1-el
<i>BRAF</i>	p.Val600Glu	c.1799T>A	16,978	0,637
<i>TSHR</i>	p.Phe458Ser	c.1373T>C	3,995	0,337
<i>APC</i>	p.Arg213fs	c.636_637insA	3,104	0,299
<i>LPAR4</i>	p.Tyr46Cys	c.137A>G	2,859	-0,287
<i>TSHR</i>	p.Thr655Ala	c.1963A>G	2,447	0,267
<i>SMAD4</i>	p.Tyr322Asn	c.964T>A	1,707	-0,224
<i>C16orf3</i>	p.Val64fs	c.190_191insA	0,795	-0,154
<i>LPAR4</i>	p.Leu86Ser	c.257T>C	0,743	-0,149
<i>TP53</i>	p.Thr150Ser	c.448A>T	0,722	-0,147
<i>APC</i>	p.Ala289Asp	c.866C>A	0,482	0,12
<i>AXINI</i>	p.Lys719Glu	c.2155A>G	0,482	0,12
<i>TP53</i>	p.Val216fs	c.647delT	0,482	0,12
<i>APC</i>	p.Thr288Pro	c.862A>C	0,189	0,075
<i>EIF1AX</i>	p.Glu18fs	c.51_52insA	0,115	-0,059
<i>AXINI</i>	p.Gln769Arg	c.2306A>G	0,007	0,014
<i>LPAR4</i>	p.Val83Ala	c.248T>C	0,001	-0,006

Amennyiben csak a hat legnagyobb F-értékkel rendelkező variáns alapján végeztük az elemzést, a tumormentes minták F-értéke -0,513 volt vagy annál kisebb. Ezen gondolatmenetet követve ismeretlen pajzsmirigyminta esetében, amennyiben $\leq -0,513$ eredményt kapunk F-értékként, az adott páciens a tumormentes csoportba sorolhatjuk, míg ettől pozitív irányba eltérő esetben a tumoros csoportba kerül a beteg. A 7. táblázatban a páciensek jelenlegi állapotát/szövettani minősítését (tumoros, egészséges/tumormentes) és az összes, 16 variáns elemzése alapján történt

kockázatbecslést figyelhetjük meg. Ezek alapján jól látszik, hogy a szövettani eredményekkel jól korrelál a genetikai vizsgálat alapján végzett statisztikai besorolás. Az F-értékek alapján a legtöbb egészséges, tumormentes beteget ténylegesen az egészséges csoportba, míg a valóban PTC-s páciensek mintáinak többségét a tumoros csoportba soroltuk.

7. táblázat: A 67 pajzsmirigy szövetmintánk csoportosítása, a jelenlegi állapot (szövettan) és a 16 variáns szerinti elemzés (CVA) alapján. A 28 szövettanilag egészséges mintánk közül huszonnégyet valóban az egészséges csoportba soroltunk a statisztikai elemzés segítségével. Míg a 39 PTC-s páciens mintájából harmincegy került a tumoros csoportba, CVA szerint.

	CVA szerint egészséges minták	CVA szerint tumoros minták	Összes minta (szövettan)
Szövettanilag egészséges minták	24	4	28
Szövettanilag tumoros minták	8	31	39
Összes minta (CVA)	32	35	67

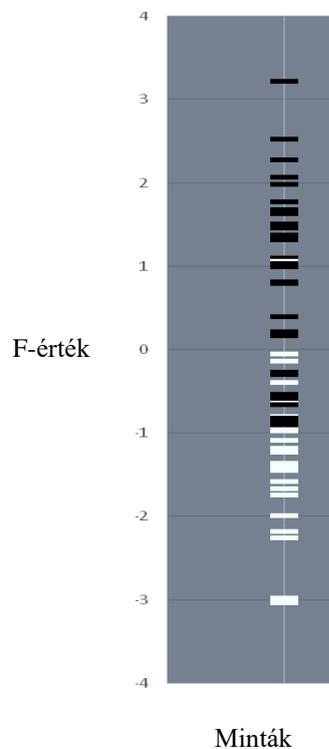
A 7. táblázatban feltüntetett szám adatok alapján kiszámolhatjuk e módszer alábbi fontos értékeit:

- szenzitivitás: $31/39 = 0,79$ **79%**
- specificitás: $24/28 = 0,86$ **86%**
- PPV: $31/35 = 0,89$ **89%**
- NPV: $24/32 = 0,75$ **75%**

4.4.2. Statisztikai elemzés gének alapján

Hasonló CVA elemzést végeztünk a vizsgált gének közül azon 20 génen, amelyben legalább egy mutáció is előfordult.

Az elemzés végére ebben az esetben is minden mintához hozzárendeltünk egy F-értéket, amely a segítségünkre volt a tumorkockázat becslésében. A gének szintjén vizsgálva a 0,24 F-értéknél lehetett meghúzni a határt a két csoport elkülönítése érdekében, melyek egy tengely mentén viszonylag jól elkülönülnek egymástól (22. ábra). A 0,24-nél nagyobb F-értékkal rendelkező minták a tumor jelenlétével korrelálnak, míg a $<0,24$ F-érték a tumormentes állapotot tükrözi.



22. ábra: A PTC-s (fekete sáv) és a normál, tumormentes pajzsmirigy minták (fehér sáv) eloszlásának grafikus ábrázolása, a megvizsgált 20 gén F-értékei alapján.

Az első, variánsokon alapuló elemzéshez hasonlóan itt is a *BRAF* génben fellelhető mutációk meglehetősen korreláltak legjobban a tumor jelenlétével. Ez után még további hat génben található eltérések azok, amelyek fontosak lehetnek a kockázatbecslésben, ezek a következők: *TSHR*, *TP53*, *PIK3CA*, *VHL*, *AKT1* és *APC*. Az első gén, melynek mutációi a jóindulatú pajzsmirigyben találhatóak, az *EIF1AX*, ezt követi további négy

gén, a *RET*, az *NRAS*, a *DICER1* és a *PTEN*, melyek F-értéke még 1 felettinek adódott. Az ennél is alacsonyabb F-értékkal rendelkező gének tumorindikátorként nem jól alkalmazhatók, mert nem korrelálnak egyértelműen a tumorállapottal. Ezen géneket, a hozzájuk tartozó F-értékeket és az értékek korrelációját CV1-el a 8. táblázat tartalmazza.

8. táblázat: Az elemzésbe bekerült 20 gén, amelyben legalább egy mutációt felfedeztünk. A gének F-értékük alapján csökkenő sorrendben lettek feltüntetve, míg az utolsó oszlopban a kanonikus variánssal való korreláció értéke látható. Az F-érték minél nagyobb, annál nagyobb a malignitási kockázat.

Gén	F-érték	Korreláció CV1-el
<i>BRAF</i>	17,368	0,643
<i>TSHR</i>	3,786	0,329
<i>TP53</i>	3,435	0,314
<i>PIK3CA</i>	3,226	0,305
<i>VHL</i>	3,104	0,299
<i>AKT1</i>	2,264	0,257
<i>APC</i>	2,011	0,243
<i>EIF1AX</i>	1,741	-0,226
<i>RET</i>	1,702	0,224
<i>NRAS</i>	1,468	0,208
<i>DICER1</i>	1,238	0,191
<i>PTEN</i>	1,155	-0,185
<i>C16orf3</i>	0,792	-0,154
<i>HRAS</i>	0,715	0,146
<i>MET</i>	0,676	0,142
<i>AXIN1</i>	0,47	0,119
<i>SMAD4</i>	0,334	-0,1
<i>LPAR4</i>	0,196	-0,077
<i>IDH1</i>	0,178	-0,073
<i>CTNNB1</i>	0,13	-0,063

A vizsgált területeken mutációt nem hordozó páciensek F-értéke -0,822 volt, vagy annál kisebb. Így minden olyan páciensből származó mintát, melynek F-értéke $\leq -0,822$ -al a tumormentes csoportba, míg ettől pozitív irányba eltérő eseteket a tumoros csoportba sorolhatunk.

A 9. táblázatban a páciensek jelenlegi állapotát/szövetteni minősítését (tumoros, egészséges/tumormentes) és a 20 gén elemzése alapján történt besorolást figyelhetjük meg. Mint ahogyan a variáns szintű elemzés során, így itt is a legtöbb esetben a szövetteni eredmények és az általunk végzett analízisből levont következtetések jól korrelálnak egymással. A legtöbb valóban tumormentes páciens mintáját sikerült az egészséges csoportba, míg a PTC-s minták többségét a tumoros csoportba sorolni.

9. táblázat: A 67 pajzsmirigy szövetmintánk csoportosítása, a jelenlegi állapot (szövetten) és a 20 gén szerinti elemzés (CVA) alapján. A 28 szövettenileg egészséges minták közül tizenkilencet valóban az egészséges csoportba soroltunk a statisztikai elemzés segítségével. A 39 PTC-s páciens mintájából harmincnégy került a tumoros csoportba CVA elemzéssel.

	CVA szerint egészséges minták	CVA szerint tumoros minták	Összes minta (szövetten)
Szövettenileg egészséges minták	19	9	28
Szövettenileg tumoros minták	5	34	39
Összes minta (CVA)	24	43	67

Ebben az esetben a 9. táblázatban feltüntetett szám adatok alapján a következő értéket számolhattuk ki:

- szenzitivitás: $34/39 = 0,87$ **87%**
- specificitás: $19/28 = 0,68$ **68%**
- PPV: $34/43 = 0,79$ **79%**

- NPV: $19/24 = 0,79$ **79%**

4.5. Vékonytű biopsziás minták mutációs profilja

Az általunk vizsgált 51 pajzsmirigy vékonytű biopszia mintából származó szekvenálási értékek minden esetben megfelelőnek bizonyultak. Az átlagos leolvasási szám mintánként 243.955 read, az átlagos lefedettség $4312\times$, míg az átlagos, $10\times$ -es célszekvencia lefedettség 87% volt. Ezen adatok alapján – a variant caller után – kapott eltéréseket megbízhatónak ítéltük.

Az analizált 51 mintából, harmincötben találtunk minimum egy klinikailag releváns genetikai eltérést a megvizsgált 23 gén egyikében, miközben tizenhat minta esetében egyet sem fedeztünk fel (10. táblázat).

10. táblázat: Az 51 biopszia minta besorolása a citológiai eredményeik alapján, és azok felosztás aszerint, hogy a genetikai vizsgálat során találtunk-e bennük mutációt vagy sem.

	Mintaszám	Nincs mutáció	Van mutáció
Pozitív citológiai lelet	8	2	6
Negatív citológiai lelet	28	8	20
Gyanús citológiai lelet	14	6	8
NA (Sejtmentes kenet)	1	0	1
Összesen	51	16	35

Az ötvenegy vékonytű biopsziás mintában 36 aminosavcserevel járó mutációt azonosítottunk, tizenöt génben (11. táblázat): huszonnégy SNV-t (24 missense), hét INDEL-t (1 inszerció, 6 delécio), két splice site variánst, egy intronikus régióba eső mutációt és két MNV-t fedeztünk fel. A talált eltérések közül huszonhetet azonosítottunk új mutációként, melyekről nincs szakirodalmi adat pajzsmirigy daganatokkal összefüggésben. Kilenc azonosított mutációt korábban már leírták, megtalálhatók a szakirodalomban, illetve online adatbázisokban is, melyek többségét pajzsmirigy tumorokban, míg néhányat egyéb, nem pajzsmirigy daganatos betegekben (pl.: vastagbél daganat, hasnyálmirigy daganat, stb.) azonosítottak.

11. táblázat: A vékonytű biopszia mintákban azonosított 36 mutáció, azok típusos besorolása és a hozzájuk tartozó COSMIC azonosítójuk (amennyiben az adott variáns megtalálható a szakirodalomban). A táblázat legutolsó oszlopában feltüntettük, hogy az adott mutációt milyen citológiai besorolást kapott mintában/mintákban azonosítottuk.

(P=pozitív, malignus; N=negatív, jóindulatú; Gy=gyanús; bizonytalan kategóriájú minta; NA=nincs adat, sejtmentes kenet)

Gén	Mutáció	Mutáció típusa	COSMIC	Milyen citológiai mintában találtuk?
APC	c.1758A>C	Missense	-	P
APC	c.2788A>C	Missense	-	GY
APC	c.4343C<G	Missense	-	2 N
APC	c.4679A>T	Missense	-	N
AXIN1	c.120_122delCAGinsAGC	MNV	-	P
AXIN1	c.1326delC	Deléció	-	GY
AXIN1	c.1887_1891delCCAGA	Deléció	-	N
AXIN1	c.2155A>G	Missense	-	N
AXIN1	c.2392A>G	Missense	-	GY
AXIN1	c.476A>G	Missense	-	GY
BRAF	c.1799T>A	Missense	COSM476	4 P, GY
EIF1AX	c.17G>T	Missense	-	N
EIF1AX	c.338-1G>C	Splice site	COSM3372212	N
EIF1AX	c.51_52insA	Inszerció	-	2 N
EIF1AX	c.75delA	Deléció	-	N
HRAS	c.181C>A	Missense	COSM496	N
IDH1	c.142A>G	Missense	-	N
LPAR4	c.137A>G	Missense	-	2 P, 6 N, 2 GY, 1 NA
LPAR4	c.824T>C	Missense	-	N
MET	c.4079C>T	Missense	-	N
NRAS	c.181C>A	Missense	COSM580	GY
PIK3CA	c.1034A<G	Missense	-	N
PTEN	c.398T>A	Missense	-	N

PTEN	c.409G>C	Missense	-	N
PTEN	c.411_413delATA	Deléció	-	N
PTEN	c.634+2T>G	Splice site	COSM1968251	N
SMAD4	c.1561A>G	Missense	-	GY
SMAD4	c.1569C>G	Missense	COSM14115	P
SMAD4	c.919G>A	Missense	-	N
TERT	c.-245T>C	Intronic	-	N, GY
TSHR	c.1115_1121delACCCCCAins CCCCCG	MNV	-	N
TSHR	c.1887G>T	Missense	COSM26422	N
TSHR	c.1895C>T	Missense	COSM26418	N
TSHR	c.745delC	Deléció	-	N
TSHR	c.749_753delAGGAA	Deléció	-	P
VHL	c.148G>A	Missense	COSM17999	GY

A nyolc pozitív, tehát malignus citológiai eredményt kapott mintánk közül hat esetben találtunk genetikai eltérést (*BRAF* c.1799T>A, *LPAR4* c.137A>G, *APC* c.1758A>C, *AXIN1* c.120_122delCAGinsAGC, *SMAD4* c.1569C>G és *TSHR* c.749_753delAGGAA).

A citológiaiilag negatív, benignus elváltozást hordozó 28 páciens közül húsz esetben sikerült felfedeztünk genetikai eltérést, mely a későbbi rosszindulatú daganat kialakulását vetítheti előre. Egy-egy ilyen mintában a COSMIC azonosítóval rendelkező mutációk közül az *EIF1AX* c.338-1G>C, a *HRAS* c.181C>A, a *PTEN* c.634+2T>G, a *TSHR* c.1887G>T és c.1895C>T variánsokat azonosítottuk, melyeket a pajzsmirigy malignus elváltozásával kapcsolatban már leírtak. A legismertebb variáns ezek közül a *HRAS* c.181C>A, mely főként differenciált pajzsmirigy tumoros mintákban fordul elő a leggyakrabban [84]. A leggyakrabban azonosított mutáció az *LPAR4* c.137A>G volt, melyet a szakirodalom a PTC-s állapottal hoz kapcsolatba [72]. Ezen mutációk előfordulása a citológiaiilag benignus mintákban előre jelezhetik a későbbi malignus állapot kialakulását. A további nyolc citológiaiilag negatív esetben nem találtunk elváltozást a vizsgált 23 génben.

A 14 malignitásra gyanús/bizonytalan kategóriába sorolt páciensek mintái közül hat esetenél nem fedeztünk fel eltéréseket, míg nyolc mintánál detektáltunk mutációt, melyek

közül a jól ismert *BRAF* c.1799T>A és *NRAS* c.181C>A variánsait azonosítottuk egy-egy páciens mintájában. A többi mintában az *APC*, *AXINI*, *LPAR4*, *SMAD4*, *TERT* és *VHL* génekben fedeztünk fel genetikai eltéréseket.

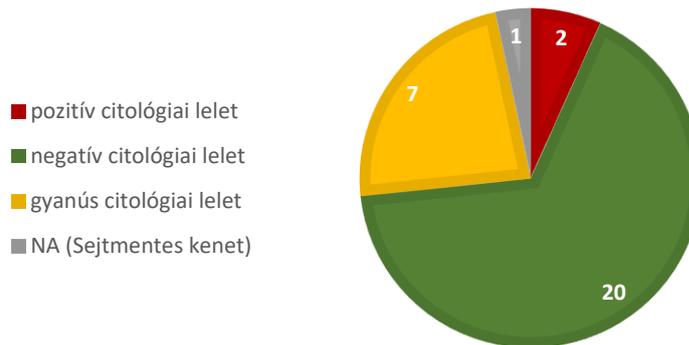
Abban az egy mintából, ahol a citológiai kiértékelés során – a kenet sejtmentessége miatt – nem kaptunk eredményt, az NGS vizsgálatra párhuzamosan levett mintából sikerült rosszindulatú eltérést (*LPAR4* c.137A>G) detektálnunk.

Hat különböző variánsával az *AXINI* gén mutatkozott a legpolimorfabbnak, ezek közül a c.120_122delCAGinsAGC variánst malignus, a c.1326delC, c.2392A>G és c.476A>G variánsait bizonytalan, tehát malignitásra gyanús, míg a c.1887_1891delCCAGA és c.2155A>G variánsait negatív citológiai kategóriájú göbökben fedeztük fel. Az *AXINI* e felsorolt variánsait eddig még nem írták le a szakirodalomban. Az következő leggyakrabban előforduló gének: öt variánsával a *TSHR* (citológiailag ezek a minták: 1 pozitív, 4 negatív), majd 4-4 variánsukkal az *APC* (1 pozitív, 1 gyanús, 2 negatív), az *EIFIAX* (4 negatív) és a *PTEN* (4 negatív) gének. A *TSHR* génben felfedezett mutációk közül kettőt írták már le (c.1887G>T és a c.1895C>T), melyek patogénként szerepelnek a szakirodalomban [85-87], azonban az FNAB mintáink között egy-egy negatív citológiájúban fordultak elő.

Vizsgált mintáinkban az *LPAR4* c.137A>G, egy aminosav cserével járó missense variáns volt a leggyakrabban előforduló mutáció, összesen tizenegy mintánkban fedeztük fel, melyek közül hat esetben a citológia negatív, két esetben pozitív eredményt adott, további két göbnél bizonytalan kategóriába sorolta az adott mintákat, míg egy esetben értékelhetetlen volt a minta (sejtmentes kenet). E gén szerepe még nem tisztázott az irodalomban, szomatikus variánsait különböző daganatokban, mint például vastagbélrákban és fej-és nyak laphámsejtes daganatokban már azonosították [88-89], míg van olyan közlemény, melyben a papillaris carcinoma egyik alapvető onkogénjeként írták le [72].

A jól ismert *BRAF* c.1799T>A (V600E) mutációt öt biopszia mintában azonosítottuk. A citológiai eredményekkel összevetve a minták többségét – négy mintát – helyesen a malignus kategóriába soroltak, míg egy páciens bizonytalan kategóriájú, malignitásra gyanús eredményt kapott csupán és későbbi, ismételt mintavételre jegyezték elő.

Harminc olyan FNAB mintánk volt, amelyben felfedeztünk genetikai eltéréseket, amelyek nem a *BRAF* génben voltak (23. ábra). Ezen mutációk nagyrészt citológiaiilag negatív, tehát jóindulatú göbökben találtuk meg. Két pozitív/malignus citológiai eredménnyel rendelkező minta esetében találtunk *BRAF* géntől eltérő génben lévő variánst, illetve hét olyan esetben, ahol csak a malignitás gyanúja állt fenn.



23. ábra: A *BRAF* génen kívüli még 14 másik génben találtunk mutációt a vizsgált 23 génből, melyek összesen 30 mintában találhatóak meg. Ezek közül 20 negatív, kettő malignus és hét gyanús/bizonytalan kategóriájú citológiával rendelkezik.

A validálási és biopszia mintáinkból kapott eredményeinket figyelembe véve fontos kiemelni, hogy természetesen a genetikai eredményt csak önmagában nem használhatjuk a tumorstátusz besorolására, minden páciens esetében szükséges emellé a citológiai eredmény is. A kettőt együtt értelmezve kell kialakítani a végső diagnózist. Bár ez felveti azt a kérdést is, hogy egy szövettanilag ép pajzsmirigy minta esetében mi a megoldás, ha a genetikai vizsgálat során kiderül, hogy a páciens már hordozza a tumorról összefüggésbe hozható mutációk egyikét. Ugyanis nagy valószínűséggel ezen eseteknél a vizsgált göb előbb vagy utóbb malignizálódni fog. Ilyen esetekben a genetikai eredmény plusz információt ad, így – akár egy megfelelő sebészeti beavatkozással – megelőzhető a rosszindulatú daganat kialakulása, azonban ennek tényleges bizonyítása még a jövő feladata.

5. MEGBESZÉLÉS

A molekuláris genetica területén az utóbbi időben páratlan fejlődésnek lehettünk szemtanúi, ennek hatására mára megváltoztak, kiegészültek a régi, rutin klinikai diagnosztikus módszerek. A klinikai döntéshozatalban a gyakorló orvosok számára is elérhetővé váltak a genetikai meghatározások.

Az elmúlt évtizedekben a legfőbb népbetegségekről, mint például kardiovaszkuláris, daganatos, metabolikus, autoimmun, idegrendszeri és mozgásszervi kórképekről kiderült, hogy ezek sok komponensű, multifaktoriális, azaz komplex betegségek. Ezen felfedezés tükrében a genetikai vizsgálatok egyre nagyobb szerepet játszanak a klinikumban, a diagnózisok felállításában, a célzott terápiák, kezelések kiválasztásában, illetve a betegségek kialakulásához kapcsolatos kockázatbecslésekben. A genetikai tesztek eredményei komoly következményekkel járhatnak az adott beteg számára, sőt hozzátartozói részére is jelentős információval bírnak.

Annak érdekében, hogy ma ilyen genetikai vizsgálatokat végezhessünk, a molekuláris biológia területén hatalmas mértékű technológiai változásokra volt szükség. A közelmúltban felgyorsult a nagy áteresztőképességű, ún. high-throughput metodikák fejlesztése (nukleotid szekvencia-meghatározás, microarray technológia, teljes genom vizsgálatok), melyek segítséget nyújtottak ezen a területen. Külön kiemelendők az újgenerációs szekvenálási eljárások, amelyek az első, hagyományos szekvenálási módszerek (pl.: Sanger-féle módszer) után kerültek kifejlesztésre. Korábban a szekvenáló metodikák közül – a Federick Sanger nevéhez fűzhető [90] – Sanger-féle szekvenálás volt az általánosan használt módszer, mely során izotópok segítségével, direkt szekvenálással határozták meg a DNS egy-egy szakaszának bázissorrendjét. Ezt a későbbiekben felváltotta a fluoreszcensen jelölt DNS-fragmentumok elválasztásán alapuló metodika, amelynek automatizált változata is megjelent. Az első humán genom bázissorrendjét is ezzel a módszerrel sikerült meghatározni. A Sanger-szekvenálás nagy biztonságú és pontosságú módszer, mely könnyen kiértékelhető szekvenciaeredményt ad, hátránya, hogy drága és rendkívül időigényes.

E problémák kiküszöbölésére dolgozták ki az újgenerációs szekvenálási módszereket. Közös tulajdonságuk, hogy a szekvenálási reakció sokszorosan párhuzamosítva zajlik,

vagyis egyszerre több millió DNS szál leolvasása történik meg, és így számottevően több információt kapunk sokkal rövidebb idő alatt, ráadásul az első generációs szekvenálási módszerekhez képest lényegesen kedvezőbb áron. Az újgenerációs szekvenálások az egyes lépéseknél különféle eljárásokat alkalmaznak, azonban összességében elmondható, hogy az új technológia minden szinten meghaladja a Sanger-szekvenálás teljesítményét és komplexitását. Hiszen azon kívül, hogy több molekuláris technikát kombinál, a keletkező nagy mennyiségű adat kezeléséhez bioinformatikai szoftvereket, illetve online adatbázisokat használ fel.

Ma már az orvostudomány területén többféle megközelítésben is alkalmazni tudjuk az NGS-en alapuló technikákat. Az újgenerációs szekvenálás a pontmutációk okozta betegségek felderítésében válik nagy hasznunkra. Pontmutációk, rövidebb deléciók és inszerciók esetében az adott DNS-szakasz szekvenálásával tudunk pontos információhoz jutni. Az NGS technikával igen hosszú DNS-szakaszokat is nagyon gyorsan le tudunk olvasni. Egy adott betegséghez asszociált gének teljes szekvenciavizsgálatával megtalálunk olyan genetikai eltéréseket, amelyek az adott betegségben relevánsak, vagy diagnosztikus értékűek, ezen kívül feltárjuk ritka betegségek genetikai hátterét is. A releváns gének feltérképezésével bizonyos betegségek kialakulására vonatkozó kockázatbecslést is képesek vagyunk adni a vizsgált személynek. Ezen felül e módszer segítségével lehetőségünk van alátámasztani örökletes betegségek diagnózisát, illetve képesek vagyunk tanulmányozni a daganatos betegségek kialakulásához vezető genetikai elváltozásokat is.

A pajzsmirigy daganatok egyre sűrűbben jelennek meg világszerte, melynek oka nem tisztázott. Az egyik leggyakrabban emlegetett és vizsgált okok közé tartozik a jódeháztartás. Egy felnőtt szervezet teljes jódeháztartalma 8–9.000 µg, ugyanis a pajzsmirigy e mennyiség tárolására képes, amelyet kb. 2 hónap alatt használ fel a szervezet. Az optimális jódeháztétel felnőttek esetében a napi 150 µg, míg várandósok esetében napi 220 µg. Hazánkban az átlagos jódeháztétel kb. 100 µg naponta. Jódeháztétel kb. 80 µg-nál alacsonyabb rendszeres napi bevitelnél alakul ki. A jódeháztételt a vizelettel történő napi jodidürítéssel lehet a legpontosabban követni. A jódeháztételt akkor tartjuk kielégítőnek, ha a vizelettel való ürítés meghaladja az 100 µg/l-t, az 50-

99 µg/l ürítése enyhe, a 20-49 µg/l ürítése közepes, míg 20 µg/l alatti ürítés súlyos jódhiányt jelez [91]. A Föld különböző területein a víz és a talaj, illetve a táplálékok jódtartalma igen eltérő, például Magyarország ivóvízkészletének kb. 80%-ában a jódkoncentrációja alig éri el a 25 µg/l-t, ezért hazánk jódhiányosnak mondható. E hiány jelentős következményekkel jár, csökken a pajzsmirigy normál működése, kognitív zavarokat okozhat, illetve a pajzsmirigyben golyvák fejlődhetnek ki, amely végül daganat kialakulásához is vezethet.

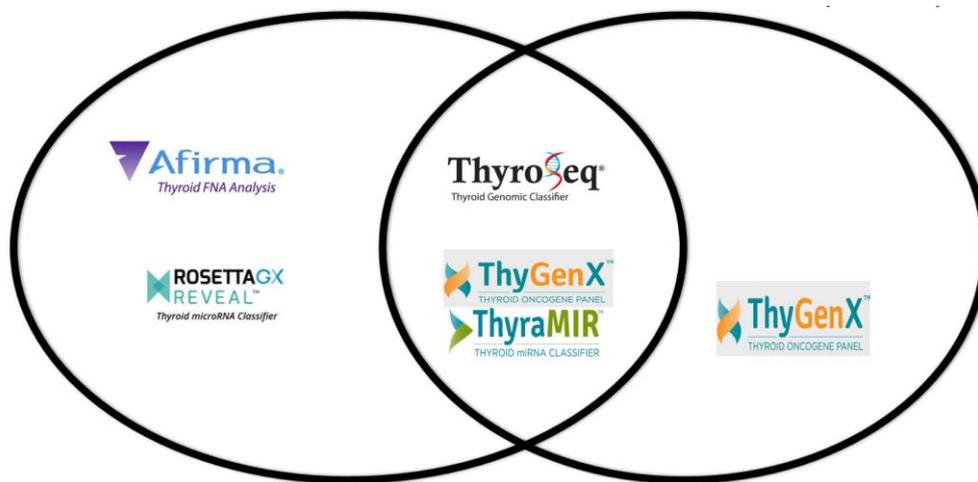
A környezeti adottságokon kívül a pajzsmirigy göbök vizsgálati módszereinek fejlődése is magyarázatot adhat a daganatos betegségek számának emelkedésére. A mai korszerű technikák segítségével már a legapróbb göbök is felfedezhetők, melyeket pár évtizede még nem láthattak volna meg a kezelő orvosok. Az ultrahang vizsgálat sokkal kifinomultabbá és pontosabbá vált, számos malignitásra utaló jelet fedezhetünk fel a segítségével. A gyanúsak ítélt göbökből ma már egyszerűen vehetünk mintát vékonytű-biopsziával, és azt értékelhetjük citológiai módszerekkel. Azonban a citológiai vizsgálat sem képes minden alkalommal pontos diagnózist adni, illetve egy adott pillanatban benignusnak titulált göb idővel rosszindulatúvá válhat, melynek kockázati becslésére a hagyományos vizsgálati módszerek nem képesek választ adni. Ilyen esetekben nyújthatnak segítséget a genetikai vizsgálatok, melyek kiegészíthetik és pontosíthatják a végleges diagnózist.

Az utóbbi években több munkacsoport is olyan genetikai diagnosztikai teszt kifejlesztését tűzte ki célul, aminek a segítségével, már az egyértelmű hisztológiai patológiás folyamatok kialakulása előtt, előre jelezhető a betegség. A pajzsmirigy daganatok kialakulásában szerepet játszó mutációk és génátrendeződések megismerése és az újgenerációs, illetve génexpressziós technikák fejlődése lehetővé tette ezen új, pajzsmirigy szövetre specifikus tesztek kidolgozását. Több külföldi szolgáltató által forgalmazott géndiagnosztikai teszt érhető már el, melyek a pajzsmirigy-tumor kialakulásában bizonyítottan fontos szerepet játszó gének vizsgálatán alapulnak. A génpanelek két típusát különíthetjük el az alkalmazott módszer alapján: 1. a rule-in tesztek a vizsgálat során képesek megerősíteni a malignitás gyanúját, 2. a rule-out tesztek a vizsgálat során képesek kizárni a malignitás meglétét.

Az USA-ban jelenleg négy génpanel érhető el a pajzsmirigyöbök tesztelésére (24. ábra).

A Veracyte cég Afirma tesztje egy microarray alapú, 167 gén mRNS expressziójának elemzését végzi [92]. Módszere alapján rule-out teszt, azaz képes kizárni a malignitást, a jóindulatú mintákat nagy hatékonysággal megtalálja a citológiai bizonytalan minták között (szenzitivitás: 92%, NPV: 94-95%). A benignusnak besorolt minták malignitási esélye: 5-6%, javaslat: a páciens követése, műtét nélkül. Ha a vizsgálat gyanús eredményt ad, akkor a páciens továbbra is a bizonytalan kategóriába sorolandó, ennek oka a teszt túl alacsony, 37-38%-os, PPV értéke [68]. Összegzésként elmondható, hogy ez a platform alkalmas a citológiai eredmény kiegészítésére, mert kiszűri azon pácienseket, melyeknek biztosabb megoldást nyújt a műtéti beavatkozás.

A Rosetta Genomics, Inc. által forgalmazott Rosetta GX Reveal módszer is a rule-out tesztek közé sorolandó, mely microRNS-ek (24 darab miRNS) vizsgálatán alapul pajzsmirigy citológiai kenetkből, real-time qPCR segítségével. A módszer szenzitivitása 85%, specificitása 72%, PPV-je 59%, míg NPV értéke 91% körül adódik [93].



24. ábra: Az USA-ban forgalomban lévő génpanelek besorolása az alkalmazott módszer alapján. Az ábra bal oldalán lévő tesztek (Afirma, Rosetta GX) rule-out, a jobb oldali részen található ThyGenX rule-in, míg a középső cikkelyben található tesztek, a ThyroSeq és a ThyGenX kiegészítve a ThyraMIR-rel mindkét típusú módszert alkalmazzák vizsgálataik során. Ábra forrása: [94].

Az Asuragen cég miRinform panelje egy rule-in, azaz malignitás gyanúját megerősítő vizsgálat. A teszt 4 gén pontmutációit (*BRAF*, *HRAS*, *NRAS* és *KRAS*) és 3 génátrendeződést (*RET/PTC1*, *RET/PTC3* és *PAX8/PPAR γ*) vizsgál. Magas PPV értékkel rendelkezik, így alkalmas a malignitás megerősítésére [67]. Ma már ez a teszt ThyGenX néven elérhető az Interpace Diagnostics jóvoltából, mely több módosításon ment keresztül: multiplex-PCR segítségével vizsgálnak nyolc gént, több mint 100 ponton. Magas PPV értékkel rendelkezik, azonban NPV értéke alacsony. Később ezt a panelt is kiegészítették 10 miRNS expresszió elemzésével, így alakult ki a ThyraMIR. A két panel egymást kiegészíti, olyan esetekben, amikor a ThyGenX negatív eredményt ad, egy második vizsgálatot is végeznek ThyraMIR-en. Amennyiben együttesen alkalmazzák őket a teszt PPV értéke 74%, amíg az NPV 94% [68]. A mindkét platform által negatívnak, vagyis benignusnak besorolt minták malignitási esélye: 6%.

A University of Pittsburgh által kifejlesztett módszer a ThyroSeq, mely újgenerációs szekvenáláson alapul, és felméri a malignitás kockázatát a pajzsmirigygöbökben. Napjainkra már három különböző változata jelent meg. Az alap panel 12 onkogénben 284 hotspotban megtalálható mutációkat és génfüziókat vizsgál [69]. A ThyroSeq v2 már 13 gént és 42-féle génfüziót elemz [70]. E teszt PPV értéke 68-87%, míg NPV-je 95-98%. A további fejlesztéseknek hála 2018-tól már elérhető a legújabb verziója, a ThyroSeq v3 [95], mely 112 gént elemz (pontmutációkat, inszerciókat, deléciókat, génfüziókat és kópiaszámváltozásokat), DNS- és RNS alapú NGS segítségével. Az elemzés során genetikai osztályozással különítik el egymástól a tumoros és jóindulatú mintákat. A ThyroSeq v3 minden Bethesda kategóriában magas szenzitivitási (91-97%), NPV (89-100%) és PPV (50-80%) értéket ért el, az eredményeket a pajzsmirigyák összes fő típusán validálták.

Az ismertett amerikai génpanelek a páciensek számára is elérhetőek, áruk 2500-4500 USA dollár között mozognak és 1-2 hetes leletátfutási idővel képesek eredményt adni. A mi módszerünk költsége 430 USA dollárnak fele meg, amely töredéke a fentiekének.

Hazánkban egy – munkacsoportunk által kialakított – 8 genetikai elváltozást vizsgáló módszer volt elérhető 2010-től [46], mely 4 szomatikus génmutációt (*BRAF*, *HRAS*, *NRAS* és *KRAS*) és 4 génátrendeződést (*RET/PTC1*, *RET/PTC3*,

PAX8ex7/PPARgamma és *PAX8ex9/PPARgamma*) elemez. Jelen munkánk alapját e 8-génes vizsgálati módszer adta és célunk ennek a továbbfejlesztése volt. Egy olyan génpanel kialakítását tűztük ki célul, mely a legkorszerűbb diagnosztikai technikát ötvözi a mai legszélesebb körű pajzsmirigy tumorgenezissel kapcsolatos genetikai tudásunkkal.

Kutatásunk során kifejlesztettünk és validáltunk egy 23 onkogén elemzésén alapuló, célzott szekvenálási módszert, mely pontosabb diagnózist tesz lehetővé papillaris pajzsmirigy daganatok esetében. Ezen vizsgálatunk során már 568 mutációt elemeztünk ki (és a környező szakaszokból származó információkat), így összességében rengeteg variáns vizsgálatát végeztük el egyidőben. A hotspot panelünk a rule-in és a rule-out megközelítést is alkalmazza. Először használtunk egy többváltozós statisztikai módszert, a diszkriminancia analízist, hogy meghatározhassuk az elkülönítéshez használható F-értékeket, melyek segítségével létrehozható egy score-rendszer, amely képes a szövetmintákban megbecsülni a tumor előfordulásának kockázatát. Ezzel az eljárással sikeresen választottuk szét a tumoros és jóindulatú esetek nagy részét.

BRAF gén mutációinak előfordulása:

Eredményeinkben leggyakrabban a *BRAF* gén c.1799T> A (V600E) mutációja fordult elő, összesen 14 papillaris pajzsmirigyszövetmintában volt jelen. A legújabb irodalmi eredmények alapján a *BRAF* V600E variáns a PTC-k mintegy 45%-ában fordul elő [96-97]. A *BRAF* a RAF kináz-család egyik fontos tagja, mely elősegíti a jelátviteli RAS/RAF/MAPK jelátviteli kaskádon. A *BRAF* gén mutációja révén expresszálandó patológiás fehérje a jelátviteli út konstitutív aktivációját okozza, mely rossz klinikai prognózishoz, tumorhoz is vezethet. A *BRAF* V600E mutáció a PTC összes szövettani altípusában megtalálható volt, míg a klasszikus PTC-s mintáinkban egy további, valószínűleg patogén *BRAF* variánst is találtunk: c.1795A>G (T599A). Zheng és munkatársai írták le, hogy ebben az 599. pozícióban mutáció esetén a treonin egy alaninra cserélődik, mely változás a kináz-aktivitás teljes sikertelenségét okozza [98]. E megállapításuk összhangban van Wylie és munkatársai munkájában leírtakkal is, miszerint a *BRAF* T599A szubsztitúció nem csak, hogy nem indukálja a MAPK

jelátviteli utat, de károsítja is azt [99]. Ezek és saját eredményeink alapján kijelenthetjük, hogy a *BRAF* génben a V600E hotspot környezetében bekövetkező változások jelentős klinikai következményekkel járhatnak.

RAS géncsalád mutációinak előfordulása:

Mára már általánosan elfogadottá vált, hogy a *RAS* géncsaládban és a *BRAF* génben bekövetkező bizonyos mutációk kölcsönösen kizárják egymást egy páciensen belül [100]. Az általunk vizsgált 14 PTC-s esetben, amelyekben *BRAF* V600E pozitív eredményt kaptunk, valóban nem találtunk *RAS* mutációkat. Érdekes azonban, hogy abban az egy esetben, amelyben a *BRAF* T599A pontmutáció található, megfigyeltünk egy *NRAS* c.235C>T (L79F) mutációt is. További két PTC-s esetben találtunk a *RAS* géncsaláddhoz tartozó mutációkat: *NRAS* c.181C>A és *HRAS* c.73C>G, melyek a papillaris carcinoma follicularis variánsaiban voltak jelen; míg harmadik formájában, a *KRAS* génben mutációt (mely benignus pajzsmirigy neoplasiát okoz) egyetlen PTC-s mintánkban sem találtunk. Napjainkra már – több vizsgálat alapján – elfogadott tény, hogy a *RAS* gének mutációi a follicularis daganatokban gyakrabban fordulnak elő, mint papillaris carcinomákban. A PTC-s esetekben a follicularis variánsra, illetve az encapsulált altípusra jellemző e mutációk megjelenése [97]. Nikiforov és munkatársai például 462 FNAB minta analízisét végezték el, amely során összesen csak 8 esetben találtak *RAS* mutációkat (5 *NRAS* és 3 *HRAS*), ezek közül 5 eset tartozott a PTC follicularis variánsai közé, 2 FTC-snek, míg 1 eset follicularis adenomának mutatkozott a szövettani vizsgálat során [101].

AXINI gén mutációinak előfordulása:

Kutatásunk során az *AXINI* gén bizonyult a legváltozatosabb onkogénnek a vizsgált gének közül, mert 16 különböző variánsát is azonosítottuk a mintáinkban. Az *AXINI* egy tumorszupresszor fehérjét kódol, mely a WNT jelátviteli útvonal jelentős komponense. Mutáció hatására β -katenin felhalmozódás következik be, amely transzlálódik a sejtmagba és célgénjeinek expresszióját megváltoztatja [33]. Tumoros és szövettanilag egészséges mintáinkban összesen 30 genetikai eltérést észleltünk az *AXINI* génben, azonban a mutációs mintázatuk eléggé különbözőnek mutatkozott. A PTC-s mintáinkban azonosítottunk 3 INDEL, 2 nonsense és 11 missense variánst, míg

az egészséges szövetmintákban csak missense eltérések fordultak elő. Az említett 30 eltérés közül négy (c.2306A>G, c.2155A>G, c.2098G>C és c.1877_1878delCG) előfordult mind a tumoros, mind a benignus mintákban is. A CVA módszer alapján az *AXINI* gén korrelációja a tumoros állapottal nem volt egyértelmű, azonban a variáns szintjén alkalmazott elemzés során két eset (c.2306A>G és c.2155A>G, melyek előfordultak mindkét csoportban) bekerült azon 16 lókuszt közé, melyek indikátor értéke fontos volt az elemzés folyamán, bár igaz, hogy csak alacsony F-értéket kaptak, így a tumoros állapottal való korrelációjuk nem a legmegbízhatóbb. Jelenleg csak korlátozott információ áll rendelkezésünkre az *AXINI*-ben bekövetkező mutációk következményeiről, azonban a legtöbb kutatási eredmény szerint inkább a rosszul differenciált, anaplasztikus pajzsmirigydaganatokban mutatkoznak [102], a DTC-k kialakításában, illetve azok viselkedésében betöltött lehetséges szerepük még nem tisztázott.

APC gén mutációinak előfordulása:

A WNT útvonal egy másik kulcsfontosságú szabályozó eleme, az *APC* szintén jelentősen polimorf gének mutatkozott a kiértékelés során, összesen 14 mutációját azonosítottuk PTC mintáinkban. A funkcióvesztéssel járó *APC* mutációk hatására expresszálandó patológiás fehérje a WNT/ β -catenin jelátviteli útvonal aktiválódását okozza, amely megindítja a tumorigenezis folyamatát [33].

Kezdetben az *APC* génben bekövetkező változásokat a familiáris adenomatózus polipózis (familial adenomatous polyposis, FAP) szindrómával hozták összefüggésbe, e betegség kialakulásának kiváltójaként azonosították [103]. A sporadikus *APC* mutációkat a FAP során kialakuló ritka papillaris pajzsmirigy carcinoma altípussal, a cribriform-morularral társították, azonban később nem FAP szindrómás betegekben is felfedezték [104].

Emellett az anaplasztikus pajzsmirigy daganatokban is megfigyeltek *APC* mutációkat [105]. Találunk már olyan PTC exom vizsgálatokat is, melyek eredményeként az *APC* egy potenciális driver gén a pajzsmirigy rák diagnosztikájában [106]. Ezen következtetés hasonlít a saját NGS eredményeinkhez, mely szerint az *APC* megbízható elkülönítő géneként szerepel, és a benne bekövetkező mutációk a rosszindulatú transzformációval hozhatók kapcsolatban.

PIK3CA gén mutációinak előfordulása:

A *PIK3CA* gén azon mutációi, amelyek a PI3K p110 α katalitikus alegységét kódolják, gyakran előfordulnak pajzsmirigydaganatokban. A CVA elemzésünk során a *PIK3CA* mutációi fontos indikátorai a tumoros állapot fennállásának, mely eredmény a szakirodalmi adatokkal is megegyezik [31]. Másrészt a PI3K/AKT útvonal tagjainak, mint a *PIK3CA*, az *AKT1* és a *TP53* mutációi ritkán fordulnak elő jóindulatú pajzsmirigy göbökben [107]. Pan és munkatársai tanulmányukban kijelentik, hogy a PI3K/AKT útvonal génjeinek mutációi (*PIK3CA*, *PIK3R2*, *AKT2*, *PTEN* és *TP53*) kölcsönösen kizárják egymást, így azok nem fordulnak elő egy páciensen belül, ezt az általuk vizsgált kínai PTC-s páciensek 12,1%-ában figyelték meg [72]. Ennek ellentmondanak saját eredményeink. Esetünkben találtunk olyan PI3K/AKT útvonal tagokat kódoló géneket, amelyek mutációi együttesen fordulnak elő 8 PTC-s esetünkben, tehát tumoros mintáink kb. 20%-ában. Azonban 20 tumormintánk csupán egy mutációt tartalmazott ezen útvonalon fellelhető gének valamelyikében.

A PI3K/AKT útvonal a MAPK kaszkáddal szoros kapcsolatban áll, így érthető, hogy számos olyan PTC-s eset fellelhető, ahol a *PIK3CA* mutációk együtt vannak jelen *RAS* vagy *BRAF* gének variánsaival [31]. Eredményeink alátámasztják ezt a megfigyelést, hiszen kilenc tumoros mintánál találtunk egyidejűleg *BRAF* és *PIK3CA* mutációkat is.

EIF1AX gén mutációinak előfordulása:

Vizsgálatunkban az *EIF1AX* volt az első olyan gén, melynek mutációi jellemzően a hisztológiailag egészséges pajzsmirigy szövetekben fordultak elő. Az *EIF1AX* gén az eukarióta transzlációs iniciációs faktor 1A-t (eIF1a) kódolja, amely fontos résztvevője a transzláció iniciációs fázisának. Egy 2016-os tanulmány szerint az *EIF1AX* mutációk jellemzően a papillaris pajzsmirigy daganatok follicularis variánsaiban és a follicularis adenomákban, illetve a benignus göbökben fordulnak elő leginkább [74]. E tanulmány szerint az *EIF1AX* mutációk előfordulási gyakorisága 2,3% volt PTC-kben, míg jóindulatú göbökben 8,7%. Saját vizsgálatunkban öt különböző *EIF1AX* variánst azonosítottunk, ezek közül csak egy volt jelen három tumoros mintánkban, a többi mutáció csak jóindulatú, tumormentes szövetmintákban fordult elő.

TERT gén mutációinak előfordulása:

Számos korábbi vizsgálat foglalkozott a *TERT* gén promóter régiójának mutációival (C228T és C250T), és azok fontos szerepével a pajzsmirigy-tumорок esetében [108-109]. Az eddigi kutatások alapján ezen promóter régiókban található mutációk igen ritkán fordulnak elő papillaris pajzsmirigy carcinomákban, azonban a tumoros állapottal szoros kapcsolatot mutatnak [110]. Vizsgálatunk során *TERT* promóter mutációkat azonban nem fedeztünk fel egy mintánkban sem. A fentiek alapján a *TERT* promóter mutációinak diagnosztikai és prognosztikai hasznossága a papillaris elváltozásokban eléggé ellentmondásos, így e terület további vizsgálatokat igényel, hogy biztos következtetéseket vonhassunk le.

Összegzésként elmondhatjuk, hogy NGS-elemzésünk alátámasztja azon közelmúltbeli megállapításokat, miszerint a papillaris pajzsmirigy daganatok genetikailag sokkal változatosabbak, mint azt korábban feltételezték [106]. Számos eredményünk összhangban van a jelenlegi, nemzetközi irodalmi adatokkal, azonban egy új nézőpontból is bemutattuk a papillaris pajzsmirigy carcinomák mutációs profilját és genetikai markereit, egyúttal több új variánst is azonosítottunk. Munkacsoportunk volt az első, amely diszkriminancia analízist alkalmazott, hogy a pajzsmirigyszövetek tumorkockázatát megbecsülhessük. A CVA elemzés segítségével a legtöbb mintánkat sikerült a mutációk gyakorisága és a kiválogatott gének különböző variánsai alapján a megfelelő csoportba sorolnunk. Az általunk kifejlesztett, új, NGS-en alapuló módszer megfelelő választás lehet elsősorban azon FNAB minták esetében, melyek bizonytalan kategóriába kerültek a citológiai vizsgálat során. Ezzel nagy segítséget nyújthat a klinikai döntéshozatalban. Ezen kívül e módszer nagy áteresztőképességű technika és nem utolsósorban költséghatékony, melyek alapján sikeresen integrálható a mindennapi klinikai rutinba.

6. KÖVETKEZTETÉSEK

Kutatásunk során sikerült egy új, pajzsmirigy specifikus géneket vizsgáló, újgenerációs szekvenáláson alapuló diagnosztikai eljárást kifejleszteni, mely az első, legszélesebb körű génpanel Európában. A szekvenálás során kapott eredményeket a szoftveres elemzés után új statisztikai megközelítéssel is analizáltuk, melynek köszönhetően módszerünk képes nagy pozitív prediktív értékkel és szenzitivitással megjósolni egy pajzsmirigyöb malignizálódásának kockázatát.

A genetikai alaputatásoknak köszönhetően évről évre egyre több genetikai faktort ismerünk meg, amelyek kisebb-nagyobb jelentőséggel ugyan, de kiveszik részüket a pajzsmirigydaganatok kialakulásában. A korábban megismert, pajzsmirigy tumorgenezisben fontos, *BRAF* driver gén jelentőségét a mi eredményeink is alátámasztották. Azonban a vizsgálatba bevont egyéb gének is – melyekhez korábban talán kisebb jelentőséget társítottak – hasznosnak bizonyultak. A panelünkbe beválogatott génekben számos, eddig nem ismert mutációt azonosítottunk, amelyek hozzájárultak módszerünk diszkriminatív erejének növeléséhez. A klinikai gyakorlatban napi, rutinszerűen alkalmazott vizsgálati módszerek, mint az ultrahang által vezérelt vékonytű-aspirációs biopszia és citológia, az esetek többségében megfelelő diagnózist adhat. Azonban a bizonytalan kategóriákba eső minták további vizsgálatokat, későbbi mintavételt, végső soron műtéti beavatkozást igényelnek, a ma használatos standard alapján [111]. Amennyiben e vizsgálati módszereket kiegészítenénk a napjainkban rohamos fejlődést mutató molekuláris genetikai diagnosztikai technikákkal, a citológiai eredményekhez plusz információkat biztosíthatnánk, a bizonytalan kategóriájú esetek számát csökkenthetnénk, sőt a citológiailag benignus elváltozások pontos genetikai hátterének megismerésével esetleg megbecsülhetnénk azok malignitási kockázatát.

Diagnosztikai génpanelünket pajzsmirigy biobankunkban tárolt, ismert szövettani hátterű műtéti mintákon optimalizáltuk. E szövettani mintákon végzett vizsgálat során sikerült kialakítanunk egy helyesen alkalmazható NGS-alapokon nyugvó metodikát, melynek tovább fejlesztésével tágíthatjuk a vizsgált minták típusát. Az FNA biopszia mintákon is alkalmazott génpanelünk kellően széleskörűnek bizonyult. Az eredmények alapján jól látszik, hogy a módszer megfelelő kiegészítést nyújt a

bizonytalan kategóriájú citológiai eredményt kapott eseteknél, míg a citológiailag benignusnak mutatkozott mintáknál plusz információkat nyújthat a betegek számára.

7. ÖSSZEFOGLALÁS

Hazánkban az endokrin tumorok közül a pajzsmirigy daganatos elváltozásai fordulnak elő a leggyakrabban, melyek közül a differenciált papillaris típusok száma a legmeghatározóbb (80-85%). E daganatok elsősorban hideg göbökben alakulnak ki, melyek 5-10%-a idővel rosszindulatúvá válik. A klinikai gyakorlatban alkalmazott hagyományos eljárások sokszor csak megkésve vagy bizonytalanul jelzik e tumoros elváltozás meglétét. Ily módon napjainkra szükségessé vált egy új diagnosztikai módszer bevezetése, amely képes a tumoros állapot korai felismerésére, esetleges kialakulásának előrejelzésére. Napjainkban nagymértékben fejlődnek a molekuláris genetika területén alkalmazott módszerek, mint például az újgenerációs szekvenálási technikák, melyek képesek akár több száz mutáció egyidejű vizsgálatára.

Erre alapozva, célul tűztük ki, hogy az utóbbi évtizedekben felfedezett számos gént és a hozzájuk kapcsolódó rengeteg mutációt, melyek a pajzsmirigy tumorigenezisében játszanak meghatározó szerepet, együtt vizsgáljuk meg NGS segítségével pajzsmirigy göbökből származó szövettani, majd vékonytű biopsziás mintákon.

Szekvenálási eredményeinket a szoftveres elemzés során egy humán referencia genomhoz illesztettünk, majd az ennek során kapott genetikai eltéréseket egy újfajta, egyedülálló módon alkalmazott statisztikai megközelítés révén analizáltunk. A leggyakoribb mutációk és a legmutáltabb gének alapján, illetve a diszkriminancia analízis segítségével sikerült egy score-rendszert kialakítanunk, ami nagy pontossággal diagnosztizálni képes a papillaris pajzsmirigy carcinomát. Egy adott mintán így képesek vagyunk a tumorkockázat becslésére.

Eredményeink alapján elmondhatjuk, hogy a pajzsmirigy göbök vizsgálatakor a célzott panelek igen előnyösen használhatók, hiszen a tumorok kialakulásában több gén mutációja is szerepet játszhat. Módszerünkkel a pajzsmirigy mintákból egyedülálló módon azonosíthatunk genetikai eltéréseket, melyek a citológiai eredményekkel együtt megbízhatóbb klinikai diagnózist biztosítanak pácienseink számára.

8. SUMMARY

In Hungary, thyroid cancers are the most common malignant endocrine tumors; the biggest percent of which are various differentiated papillary types (80–85% of all malignant thyroid tumors). These usually develop from cold nodules, and 5–10% of them becomes malignant over time. Diagnostic procedures used in clinical care find these lesions to be ambiguous or too late. Therefore, developing a new diagnostic method that is capable of diagnosing a tumor in its early stage, or predict its malignization is important. Nowadays molecular genetic methods (such as new generation sequencing techniques (NGS), capable of the simultaneous examination of a hundred or more mutations) are rapidly evolving.

Our goal was to study the genes discovered in the last decades; their mutations (having a crucial role in the tumorigenesis of thyroid cancers) with the help of NGS, acquired from cold nodule tissue and fine needle aspiration biopsy samples, respectively.

We adjusted our sequencing results from software analysis to a human reference genome, then analysed the acquired genetic differences with a new, unique statistical method. Based on the most common mutations, the genes that had the most mutation, and discriminant analysis, we developed a score system that is able to diagnose papillary thyroid carcinomas with high accuracy. Therefore, we are able to estimate the risk of developing malignancies on a certain sample.

Our results show that targeted panels can be useful in the examination of cold nodules, since it is possible that not only one gene is responsible for tumor genesis. Our method can help us identify genetic abnormalities from thyroid samples uniquely. Together with the results of cytology tests, we could provide a more accurate clinical diagnosis to our patients.

9. IRODALOMJEGYZÉK

- [1]. Halaszlaki C, Tobias B, Balla B, Kosa JP, Horanyi J, Bolony E, Nagy Z, Speer G, Jaray B, Szekely E, Istok R, Szekely T, Putz Z, Dank M, Lakatos P, Takacs I. (2016) Predictive Value of Somatic Mutations for the Development of Malignancy in Thyroid Nodules by Cytopathology. *Endocr Pract*, 22(9): 1081-1087.
- [2]. Fonyó A. A pajzsmirigy működése. In: Cornides Á (szerk.), *Az orvosi élettan tankönyve*. Medicina, Budapest, 2011: 663-676.
- [3]. L. Kiss A. Pajzsmirigy, mellékpajzsmirigy, mellékvese, tobozmirigy, pancreas, <https://slideplayer.hu/slide/13520074/>; Accessed: 12.12.2018.
- [4]. Knobel M. (2016) Etiopathology, clinical features, and treatment of diffuse and multinodular nontoxic goiters. *J Endocrinol Invest*, 39(4): 357-373.
- [5]. Brander A, Viikinkoski P, Nickels J, Kivisaari L. (1991) Thyroid gland: US screening in a random adult population. *Radiology*, 181(3): 683-687.
- [6]. Ezzat S, Sarti DA, Cain DR, Braunstein GD. (1994) Thyroid incidentalomas. Prevalence by palpation and ultrasonography. *Arch Intern Med*, 154(16): 1838-1840.
- [7]. Lakatos P, Takács I. *Pajzsmirigybetegségek a gyakorlat oldaláról*. Semmelweis kiadó, Budapest, 2007: 288.
- [8]. Konrády A. (2008) Aktualitások a differenciált pajzsmirigyrák felismerésében és kezelésében. *Magyar orvos*, 9: 40-42.
- [9]. Szujó S, Bajnok L, Bodis B, Nemes O, Rucz K, Mezosi E. (2018) [Recovery rate in differentiated thyroid cancer. Experiences of one of the Hungarian clinical centers]. *Orv Hetil*, 159(22): 878-884.
- [10]. Lloyd RV, Buehler D, Khanafshar E. (2011) Papillary thyroid carcinoma variants. *Head Neck Pathol*, 5(1): 51-56.
- [11]. Khairy G. (2009) Anaplastic transformation of differentiated thyroid carcinoma. *Int J Health Sci (Qassim)*, 3(1): 93-96.
- [12]. Az Orvosi Laboratóriumi Vizsgálatok Szakmai Kollégiuma. Az Egészségügyi Minisztérium szakmai protokollja - A pajzsmirigy megbetegedések laboratóriumi diagnosztikája http://ftsz.pte.hu/docs/protokollok/ORV.LABPajzsmirigy_P.pdf

- [13]. Bonavita JA, Mayo J, Babb J, Bennett G, Oweity T, Macari M, Yee J. (2009) Pattern recognition of benign nodules at ultrasound of the thyroid: which nodules can be left alone? *AJR Am J Roentgenol*, 193(1): 207-213.
- [14]. Haugen BR. (2017) 2015 American Thyroid Association Management Guidelines for Adult Patients with Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer: What is new and what has changed? *Cancer*, 123(3): 372-381.
- [15]. Horvath E, Majlis S, Rossi R, Franco C, Niedmann JP, Castro A, Dominguez M. (2009) An ultrasonogram reporting system for thyroid nodules stratifying cancer risk for clinical management. *J Clin Endocrinol Metab*, 94(5): 1748-1751.
- [16]. Russ G. (2016) Risk stratification of thyroid nodules on ultrasonography with the French TI-RADS: description and reflections. *Ultrasonography*, 35(1): 25-38.
- [17]. Russ G, Bonnema SJ, Erdogan MF, Durante C, Ngu R, Leenhardt L. (2017) European Thyroid Association Guidelines for Ultrasound Malignancy Risk Stratification of Thyroid Nodules in Adults: The EU-TIRADS. *Eur Thyroid J*, 6(5): 225-237.
- [18]. Győri G, Kocsis-Deák B, Lakatos P. (2018) A göbös pajzsmirigy ultrahangvizsgálata - a korszerű ultrahanglelet. *Magyar Radiológia*, 9(2): 3/1-11.
- [19]. Frates MC, Benson CB, Doubilet PM, Kunreuther E, Contreras M, Cibas ES, Orcutt J, Moore FD, Jr., Larsen PR, Marqusee E, Alexander EK. (2006) Prevalence and distribution of carcinoma in patients with solitary and multiple thyroid nodules on sonography. *J Clin Endocrinol Metab*, 91(9): 3411-3417.
- [20]. Tobias B, Balla B, Kosa PJ, Horanyi J, Takacs I, Bolony E, Halaszlaki C, Nagy Z, Speer G, Jaray B, Szekely E, Istok R, Lakatos P. (2011) [Comparative study of somatic oncogene mutations in normal thyroid tissues and thyroid neoplasms]. *Orv Hetil*, 152(17): 672-677.
- [21]. Járay B, Székely E, Istók R, Winternitz T, Tarján Z, Tóth A, Győri G, Péntek Z, Egyed Z, Nádor K. (2007) A citopatológus és a radiológus együttműködése a citodiagnosztikában. *LAM*, 17(3): 233-237.
- [22]. Cibas ES, Ali SZ. (2009) The Bethesda System for Reporting Thyroid Cytopathology. *Thyroid*, 19(11): 1159-1165.
- [23]. Cibas ES, Ali SZ, Conference NCITFSotS. (2009) The Bethesda System For Reporting Thyroid Cytopathology. *Am J Clin Pathol*, 132(5): 658-665.

- [24]. Auger M, Nayar R, Khalbuss WE, Barkan GA, Benedict CC, Tambouret R, Schwartz MR, Howell LP, Souers RJ, Hartley DA, Thomas N, Moriarty AT. (2013) Implementation of the Bethesda System for Reporting Thyroid Cytopathology: observations from the 2011 thyroid supplemental questionnaire of the College of American Pathologists. *Arch Pathol Lab Med*, 137(11): 1555-1559.
- [25]. de Vos tot Nederveen Cappel RJ, Bouvy ND, Bonjer HJ, van Muiswinkel JM, Chadha S. (2001) Fine needle aspiration cytology of thyroid nodules: how accurate is it and what are the causes of discrepant cases? *Cytopathology*, 12(6): 399-405.
- [26]. D'Cruz AK, Vaish R, Vaidya A, Nixon IJ, Williams MD, Vander Poorten V, Lopez F, Angelos P, Shaha AR, Khafif A, Skalova A, Rinaldo A, Hunt JL, Ferlito A. (2018) Molecular markers in well-differentiated thyroid cancer. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 275(6): 1375-1384.
- [27]. Yassa L, Cibas ES, Benson CB, Frates MC, Doubilet PM, Gawande AA, Moore FD, Jr., Kim BW, Nose V, Marqusee E, Larsen PR, Alexander EK. (2007) Long-term assessment of a multidisciplinary approach to thyroid nodule diagnostic evaluation. *Cancer*, 111(6): 508-516.
- [28]. Yang J, Schnadig V, Logrono R, Wasserman PG. (2007) Fine-needle aspiration of thyroid nodules: a study of 4703 patients with histologic and clinical correlations. *Cancer*, 111(5): 306-315.
- [29]. Liu X, Medici M, Kwong N, Angell TE, Marqusee E, Kim MI, Larsen PR, Cho NL, Nehs MA, Ruan DT, Gawande A, Moore F, Jr., Barletta J, Krane JF, Cibas ES, Yang T, Alexander EK. (2016) Bethesda Categorization of Thyroid Nodule Cytology and Prediction of Thyroid Cancer Type and Prognosis. *Thyroid*, 26(2): 256-261.
- [30]. Kocsis-Deák B, Balla B, Tóbiás B, Árvai K, Putz Z, Kósa J, Lakatos P. (2018) Molecular genetic examinations in the diagnosis of thyroid tumors. [Molekuláris genetikai vizsgálatok a pajzsmirigy daganatainak diagnosztikájában.]. *Orvostovábbképző szemle*, 9: 49-53.
- [31]. Xing M. (2010) Genetic alterations in the phosphatidylinositol-3 kinase/Akt pathway in thyroid cancer. *Thyroid*, 20(7): 697-706.
- [32]. Hsiao SJ, Nikiforov YE. (2014) Molecular approaches to thyroid cancer diagnosis. *Endocr Relat Cancer*, 21(5): T301-313.

- [33]. Sastre-Perona A, Santisteban P. (2012) Role of the wnt pathway in thyroid cancer. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 3: 31.
- [34]. Berki T, Boldizsár F, Szabó M, Talabér G, Varecza Z. Jelátvitel (Orvosi biotechnológia). Pécsi Tudományegyetem, Pécs, 2011: 79.
- [35]. Kurihara T, Ikeda S, Ishizaki Y, Fujimori M, Tokumoto N, Hirata Y, Ozaki S, Okajima M, Sugino K, Asahara T. (2004) Immunohistochemical and sequencing analyses of the Wnt signaling components in Japanese anaplastic thyroid cancers. *Thyroid*, 14(12): 1020-1029.
- [36]. Skah S, Uchuya-Castillo J, Sirakov M, Plateroti M. (2017) The thyroid hormone nuclear receptors and the Wnt/beta-catenin pathway: An intriguing liaison. *Dev Biol*, 422(2): 71-82.
- [37]. Ivanova K, Ananiev J, Aleksandrova E, Ignatova MM, Gulubova M. (2017) Expression of E-Cadherin/Beta-Catenin in Epithelial Carcinomas of the Thyroid Gland. *Open Access Maced J Med Sci*, 5(2): 155-159.
- [38]. Dong T, Zhang Z, Zhou W, Zhou X, Geng C, Chang LK, Tian X, Liu S. (2017) WNT10A/betacatenin pathway in tumorigenesis of papillary thyroid carcinoma. *Oncol Rep*, 38(2): 1287-1294.
- [39]. Kondo T, Nakazawa T, Murata S, Kurebayashi J, Ezzat S, Asa SL, Katoh R. (2007) Enhanced B-Raf protein expression is independent of V600E mutant status in thyroid carcinomas. *Hum Pathol*, 38(12): 1810-1818.
- [40]. Nucera C, Lawler J, Parangi S. (2011) BRAF(V600E) and microenvironment in thyroid cancer: a functional link to drive cancer progression. *Cancer Res*, 71(7): 2417-2422.
- [41]. Kimura ET, Nikiforova MN, Zhu Z, Knauf JA, Nikiforov YE, Fagin JA. (2003) High prevalence of BRAF mutations in thyroid cancer: genetic evidence for constitutive activation of the RET/PTC-RAS-BRAF signaling pathway in papillary thyroid carcinoma. *Cancer Res*, 63(7): 1454-1457.
- [42]. Shi CL, Sun Y, Ding C, Lv YC, Qin HD. (2015) Correlation between the BRAF V600E mutation status and the clinicopathologic features of papillary thyroid carcinoma. *Genet Mol Res*, 14(3): 7377-7385.
- [43]. Nikiforova MN, Kimura ET, Gandhi M, Biddinger PW, Knauf JA, Basolo F, Zhu Z, Giannini R, Salvatore G, Fusco A, Santoro M, Fagin JA, Nikiforov YE. (2003) BRAF

mutations in thyroid tumors are restricted to papillary carcinomas and anaplastic or poorly differentiated carcinomas arising from papillary carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab*, 88(11): 5399-5404.

[44]. Xing M, Clark D, Guan H, Ji M, Dackiw A, Carson KA, Kim M, Tufaro A, Ladenson P, Zeiger M, Tufano R. (2009) BRAF mutation testing of thyroid fine-needle aspiration biopsy specimens for preoperative risk stratification in papillary thyroid cancer. *J Clin Oncol*, 27(18): 2977-2982.

[45]. Gandolfi G, Sancisi V, Torricelli F, Ragazzi M, Frasoldati A, Piana S, Ciarrocchi A. (2013) Allele percentage of the BRAF V600E mutation in papillary thyroid carcinomas and corresponding lymph node metastases: no evidence for a role in tumor progression. *J Clin Endocrinol Metab*, 98(5): E934-942.

[46]. Tobias B, Halaszlaki C, Balla B, Kosa JP, Arvai K, Horvath P, Takacs I, Nagy Z, Horvath E, Horanyi J, Jaray B, Szekely E, Szekely T, Gyori G, Putz Z, Dank M, Valkusz Z, Vasas B, Ivanyi B, Lakatos P. (2016) Genetic Alterations in Hungarian Patients with Papillary Thyroid Cancer. *Pathol Oncol Res*, 22(1): 27-33.

[47]. Xing M, Haugen BR, Schlumberger M. (2013) Progress in molecular-based management of differentiated thyroid cancer. *Lancet*, 381(9871): 1058-1069.

[48]. Puxeddu E, Durante C, Avenia N, Filetti S, Russo D. (2008) Clinical implications of BRAF mutation in thyroid carcinoma. *Trends Endocrinol Metab*, 19(4): 138-145.

[49]. Nikiforov YE, Nikiforova MN. (2011) Molecular genetics and diagnosis of thyroid cancer. *Nat Rev Endocrinol*, 7(10): 569-580.

[50]. Angell TE. (2017) RAS-positive thyroid nodules. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*, 24(5): 372-376.

[51]. Suarez HG, Du Villard JA, Caillou B, Schlumberger M, Tubiana M, Parmentier C, Monier R. (1988) Detection of activated ras oncogenes in human thyroid carcinomas. *Oncogene*, 2(4): 403-406.

[52]. Szántó Z, Kun IZ. (2008) A pajzsmirigy cancerogenesisében szereplő onkogének, antionkogének és egyéb tumormarkerek diagnosztikai és prognosztikai jelentősége. *Orvostudományi Értesítő*, 81(1): 9-12.

[53]. Garcia-Rostan G, Zhao H, Camp RL, Pollan M, Herrero A, Pardo J, Wu R, Carcangiu ML, Costa J, Tallini G. (2003) ras mutations are associated with aggressive tumor phenotypes and poor prognosis in thyroid cancer. *J Clin Oncol*, 21(17): 3226-3235.

- [54]. Baines AT, Xu D, Der CJ. (2011) Inhibition of Ras for cancer treatment: the search continues. *Future Med Chem*, 3(14): 1787-1808.
- [55]. Pierotti MA, Santoro M, Jenkins RB, Sozzi G, Bongarzone I, Grieco M, Monzini N, Miozzo M, Herrmann MA, Fusco A, et al. (1992) Characterization of an inversion on the long arm of chromosome 10 juxtaposing D10S170 and RET and creating the oncogenic sequence RET/PTC. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89(5): 1616-1620.
- [56]. Suzuki K, Mitsutake N, Saenko V, Yamashita S. (2015) Radiation signatures in childhood thyroid cancers after the Chernobyl accident: possible roles of radiation in carcinogenesis. *Cancer Sci*, 106(2): 127-133.
- [57]. Sozzi G, Bongarzone I, Miozzo M, Borrello MG, Blutti MG, Pilotti S, Della Porta G, Pierotti MA. (1994) A t(10;17) translocation creates the RET/PTC2 chimeric transforming sequence in papillary thyroid carcinoma. *Genes Chromosomes Cancer*, 9(4): 244-250.
- [58]. Menicali E, Moretti S, Voce P, Romagnoli S, Avenia N, Puxeddu E. (2012) Intracellular signal transduction and modification of the tumor microenvironment induced by RET/PTCs in papillary thyroid carcinoma. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 3: 67.
- [59]. CytoTest. Papillary Thyroid Carcinoma (PTC) Diagnostic Kit <https://www.cytotest.com/tercshow.asp?ID=773>
- [60]. Santoro M, Dathan NA, Berlingieri MT, Bongarzone I, Paulin C, Grieco M, Pierotti MA, Vecchio G, Fusco A. (1994) Molecular characterization of RET/PTC3; a novel rearranged version of the RET proto-oncogene in a human thyroid papillary carcinoma. *Oncogene*, 9(2): 509-516.
- [61]. Fagin JA. (2004) Challenging dogma in thyroid cancer molecular genetics--role of RET/PTC and BRAF in tumor initiation. *J Clin Endocrinol Metab*, 89(9): 4264-4266.
- [62]. Nakashima M, Takamura N, Namba H, Saenko V, Meirmanov S, Matsumoto N, Hayashi T, Maeda S, Sekine I. (2007) RET oncogene amplification in thyroid cancer: correlations with radiation-associated and high-grade malignancy. *Hum Pathol*, 38(4): 621-628.
- [63]. Santoro M, Papotti M, Chiappetta G, Garcia-Rostan G, Volante M, Johnson C, Camp RL, Pentimalli F, Monaco C, Herrero A, Carcangiu ML, Fusco A, Tallini G. (2002)

RET activation and clinicopathologic features in poorly differentiated thyroid tumors. *J Clin Endocrinol Metab*, 87(1): 370-379.

[64]. Raman P, Koenig RJ. (2014) Pax-8-PPAR-gamma fusion protein in thyroid carcinoma. *Nat Rev Endocrinol*, 10(10): 616-623.

[65]. Dwight T, Thoppe SR, Foukakis T, Lui WO, Wallin G, Hoog A, Frisk T, Larsson C, Zedenius J. (2003) Involvement of the PAX8/peroxisome proliferator-activated receptor gamma rearrangement in follicular thyroid tumors. *J Clin Endocrinol Metab*, 88(9): 4440-4445.

[66]. Marques AR, Espadinha C, Catarino AL, Moniz S, Pereira T, Sobrinho LG, Leite V. (2002) Expression of PAX8-PPAR gamma 1 rearrangements in both follicular thyroid carcinomas and adenomas. *J Clin Endocrinol Metab*, 87(8): 3947-3952.

[67]. Labourier E, Shifrin A, Busseniers AE, Lupu MA, Manganelli ML, Andrus B, Wylie D, Beaudenon-Huibregtse S. (2015) Molecular Testing for miRNA, mRNA, and DNA on Fine-Needle Aspiration Improves the Preoperative Diagnosis of Thyroid Nodules With Indeterminate Cytology. *J Clin Endocrinol Metab*, 100(7): 2743-2750.

[68]. Nishino M. (2016) Molecular cytopathology for thyroid nodules: A review of methodology and test performance. *Cancer Cytopathol*, 124(1): 14-27.

[69]. Nikiforova MN, Wald AI, Roy S, Durso MB, Nikiforov YE. (2013) Targeted next-generation sequencing panel (ThyroSeq) for detection of mutations in thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab*, 98(11): E1852-1860.

[70]. Nikiforov YE, Carty SE, Chiose SI, Coyne C, Duvvuri U, Ferris RL, Gooding WE, Hodak SP, LeBeau SO, Ohori NP, Seethala RR, Tublin ME, Yip L, Nikiforova MN. (2014) Highly accurate diagnosis of cancer in thyroid nodules with follicular neoplasm/suspicious for a follicular neoplasm cytology by ThyroSeq v2 next-generation sequencing assay. *Cancer*, 120(23): 3627-3634.

[71]. Penna GC, Vaisman F, Vaisman M, Sobrinho-Simoes M, Soares P. (2016) Molecular Markers Involved in Tumorigenesis of Thyroid Carcinoma: Focus on Aggressive Histotypes. *Cytogenet Genome Res*, 150(3-4): 194-207.

[72]. Pan W, Zhou L, Ge M, Zhang B, Yang X, Xiong X, Fu G, Zhang J, Nie X, Li H, Tang X, Wei J, Shao M, Zheng J, Yuan Q, Tan W, Wu C, Yang M, Lin D. (2016) Whole exome sequencing identifies lncRNA GAS8-AS1 and LPAR4 as novel papillary thyroid carcinoma driver alternations. *Hum Mol Genet*, 25(9): 1875-1884.

- [73]. de Kock L, Sabbaghian N, Soglio DB, Guillerman RP, Park BK, Chami R, Deal CL, Priest JR, Foulkes WD. (2014) Exploring the association Between DICER1 mutations and differentiated thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab*, 99(6): E1072-1077.
- [74]. Karunamurthy A, Panebianco F, S JH, Vorhauer J, Nikiforova MN, Chiosea S, Nikiforov YE. (2016) Prevalence and phenotypic correlations of EIF1AX mutations in thyroid nodules. *Endocr Relat Cancer*, 23(4): 295-301.
- [75]. D'Inzeo S, Nicolussi A, Donini CF, Zani M, Mancini P, Nardi F, Coppa A. (2012) A novel human Smad4 mutation is involved in papillary thyroid carcinoma progression. *Endocr Relat Cancer*, 19(1): 39-55.
- [76]. COSMIC. Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer, <https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>; Accessed: 07.11.2018.
- [77]. ThermoFisherScientificInc. (2018) Ion AmpliSeq™ DNA and RNA Library Preparation. 15.
- [78]. Vierstraete A. Next Generation Sequencing, <http://users.ugent.be/~avierstr/nextgen/nextgen.html>; Accessed: 29.10.2018.
- [79]. Kohn AB, Moroz TP, Barnes JP, Netherton M, Moroz LL. (2013) Single-cell semiconductor sequencing. *Methods Mol Biol*, 1048: 247-284.
- [80]. Chang F, Liu GL, Liu CJ, Li MM. Chapter 18 - Somatic Diseases (Cancer): Amplification-Based Next-Generation Sequencing. In: Kulkarni S, Pfeifer J (szerk.), *Clinical Genomics*. Academic Press, Washington, 2015: 297-319.
- [81]. James FC, McCulloch CE. (1990) Multivariate Analysis in Ecology and Systematics: Panacea or Pandora's Box? *Annu Rev Ecol Syst*, 21: 129-166.
- [82]. Podani J. Bevezetés a többváltozós biológiai adatfeltárás rejtelmeibe, avagy Mit kezdünk azzal a rengeteg adattal? *Scientia*, Budapest, 1997: 400. <http://ramet.elte.hu/~podani/subindex.html>.
- [83]. Podani J. (2001) SYN-TAX 2000. Computer Programs for Data Analysis in Ecology and Systematics. *Scientia Publishing*.
- [84]. Pozdeyev N, Gay LM, Sokol ES, Hartmaier R, Deaver KE, Davis S, French JD, Borre PV, LaBarbera DV, Tan AC, Schweppe RE, Fishbein L, Ross JS, Haugen BR, Bowles DW. (2018) Genetic Analysis of 779 Advanced Differentiated and Anaplastic Thyroid Cancers. *Clin Cancer Res*, 24(13): 3059-3068.

- [85]. Gozu H, Avsar M, Bircan R, Sahin S, Deyneli O, Cirakoglu B, Akalin S. (2005) Mutations in the thyrotropin receptor signal transduction pathway in the hyperfunctioning thyroid nodules from multinodular goiters: a study in the Turkish population. *Endocr J*, 52(5): 577-585.
- [86]. Palos-Paz F, Perez-Guerra O, Cameselle-Teijeiro J, Rueda-Chimeno C, Barreiro-Morandeira F, Lado-Abeal J, Galician Group for the Study of Toxic Multinodular G, Araujo Vilar D, Argueso R, Barca O, Botana M, Cabezas-Agricola JM, Catalina P, Dominguez Gerpe L, Fernandez T, Mato A, Nuno A, Penin M, Victoria B. (2008) Prevalence of mutations in TSHR, GNAS, PRKAR1A and RAS genes in a large series of toxic thyroid adenomas from Galicia, an iodine-deficient area in NW Spain. *Eur J Endocrinol*, 159(5): 623-631.
- [87]. Tonacchera M, Chiovato L, Pinchera A, Agretti P, Fiore E, Cetani F, Rocchi R, Viacava P, Miccoli P, Vitti P. (1998) Hyperfunctioning thyroid nodules in toxic multinodular goiter share activating thyrotropin receptor mutations with solitary toxic adenoma. *J Clin Endocrinol Metab*, 83(2): 492-498.
- [88]. Harper K, Arsenault D, Boulay-Jean S, Lauzier A, Lucien F, Dubois CM. (2010) Autotaxin promotes cancer invasion via the lysophosphatidic acid receptor 4: participation of the cyclic AMP/EPAC/Rac1 signaling pathway in invadopodia formation. *Cancer Res*, 70(11): 4634-4643.
- [89]. Matayoshi S, Chiba S, Lin Y, Arakaki K, Matsumoto H, Nakanishi T, Suzuki M, Kato S. (2013) Lysophosphatidic acid receptor 4 signaling potentially modulates malignant behavior in human head and neck squamous cell carcinoma cells. *Int J Oncol*, 42(5): 1560-1568.
- [90]. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 74(12): 5463-5467.
- [91]. Lakatos P, Takács I. *Pajzsmirigybetegségek az orvosi gyakorlatban*. SpringerMed, Budapest, 2017: 19.
- [92]. Alexander EK, Schorr M, Klopper J, Kim C, Sipos J, Nabhan F, Parker C, Steward DL, Mandel SJ, Haugen BR. (2014) Multicenter clinical experience with the Afirma gene expression classifier. *J Clin Endocrinol Metab*, 99(1): 119-125.
- [93]. Lithwick-Yanai G, Dromi N, Shtabsky A, Morgenstern S, Strenov Y, Feinmesser M, Kravtsov V, Leon ME, Hajdich M, Ali SZ, VandenBussche CJ, Zhang X, Leider-

- Trejo L, Zubkov A, Vorobyov S, Kushnir M, Goren Y, Tabak S, Kadosh E, Benjamin H, Schnitzer-Perlman T, Marmor H, Motin M, Lebanony D, Kredo-Russo S, Mitchell H, Noller M, Smith A, Dattner O, Ashkenazi K, Sanden M, Berlin KA, Bar D, Meiri E. (2017) Multicentre validation of a microRNA-based assay for diagnosing indeterminate thyroid nodules utilising fine needle aspirate smears. *J Clin Pathol*, 70(6): 500-507.
- [94]. Ferraz C. (2018) Can current molecular tests help in the diagnosis of indeterminate thyroid nodule FNAB? *Arch Endocrinol Metab*, 62(6): 576-584.
- [95]. Nikiforova MN, Mercurio S, Wald AI, Barbi de Moura M, Callenberg K, Santana-Santos L, Gooding WE, Yip L, Ferris RL, Nikiforov YE. (2018) Analytical performance of the ThyroSeq v3 genomic classifier for cancer diagnosis in thyroid nodules. *Cancer*, 124(8): 1682-1690.
- [96]. Torregrossa L, Viola D, Sensi E, Giordano M, Piaggi P, Romei C, Materazzi G, Miccoli P, Elisei R, Basolo F. (2016) Papillary Thyroid Carcinoma With Rare Exon 15 BRAF Mutation Has Indolent Behavior: A Single-Institution Experience. *J Clin Endocrinol Metab*, 101(11): 4413-4420.
- [97]. Elisei R. (2014) Molecular profiles of papillary thyroid tumors have been changing in the last decades: how could we explain it? *J Clin Endocrinol Metab*, 99(2): 412-414.
- [98]. Zheng G, Tseng LH, Chen G, Haley L, Illei P, Gocke CD, Eshleman JR, Lin MT. (2015) Clinical detection and categorization of uncommon and concomitant mutations involving BRAF. *BMC Cancer*, 15: 779.
- [99]. Wylie D, Beaudenon-Huibregtse S, Haynes BC, Giordano TJ, Labourier E. (2016) Molecular classification of thyroid lesions by combined testing for miRNA gene expression and somatic gene alterations. *J Pathol Clin Res*, 2(2): 93-103.
- [100]. Zou M, Baitei EY, Alzahrani AS, BinHumaid FS, Alkhafaji D, Al-Rijjal RA, Meyer BF, Shi Y. (2014) Concomitant RAS, RET/PTC, or BRAF mutations in advanced stage of papillary thyroid carcinoma. *Thyroid*, 24(8): 1256-1266.
- [101]. Nikiforov YE, Steward DL, Robinson-Smith TM, Haugen BR, Klopper JP, Zhu Z, Fagin JA, Falciglia M, Weber K, Nikiforova MN. (2009) Molecular testing for mutations in improving the fine-needle aspiration diagnosis of thyroid nodules. *J Clin Endocrinol Metab*, 94(6): 2092-2098.

- [102]. Smallridge RC, Marlow LA, Copland JA. (2009) Anaplastic thyroid cancer: molecular pathogenesis and emerging therapies. *Endocr Relat Cancer*, 16(1): 17-44.
- [103]. Latchford A, Volikos E, Johnson V, Rogers P, Suraweera N, Tomlinson I, Phillips R, Silver A. (2007) APC mutations in FAP-associated desmoid tumours are non-random but not 'just right'. *Hum Mol Genet*, 16(1): 78-82.
- [104]. Dalal KM, Moraitis D, Iwamoto C, Shaha AR, Patel SG, Ghossein RA. (2006) Clinical curiosity: cribriform-morular variant of papillary thyroid carcinoma. *Head Neck*, 28(5): 471-476.
- [105]. Gerber TS, Schad A, Hartmann N, Springer E, Zechner U, Musholt TJ. (2018) Targeted next-generation sequencing of cancer genes in poorly differentiated thyroid cancer. *Endocr Connect*, 7(1): 47-55.
- [106]. Cancer Genome Atlas Research N. (2014) Integrated genomic characterization of papillary thyroid carcinoma. *Cell*, 159(3): 676-690.
- [107]. Kargi AY, Bustamante MP, Gulec S. (2017) Genomic Profiling of Thyroid Nodules: Current Role for ThyroSeq Next-Generation Sequencing on Clinical Decision-Making. *Mol Imaging Radionucl Ther*, 26(Suppl 1): 24-35.
- [108]. Liu C, Liu Z, Chen T, Zeng W, Guo Y, Huang T. (2016) TERT promoter Mutation and Its Association with Clinicopathological Features and Prognosis of Papillary Thyroid Cancer: A Meta-analysis. *Sci Rep*, 6: 36990.
- [109]. Alzahrani AS, Alsaadi R, Murugan AK, Sadiq BB. (2016) TERT Promoter Mutations in Thyroid Cancer. *Horm Cancer*, 7(3): 165-177.
- [110]. Vinagre J, Almeida A, Populo H, Batista R, Lyra J, Pinto V, Coelho R, Celestino R, Prazeres H, Lima L, Melo M, da Rocha AG, Preto A, Castro P, Castro L, Pardal F, Lopes JM, Santos LL, Reis RM, Cameselle-Teijeiro J, Sobrinho-Simoes M, Lima J, Maximo V, Soares P. (2013) Frequency of TERT promoter mutations in human cancers. *Nat Commun*, 4: 2185.
- [111]. Zafon C, Diez JJ, Galofre JC, Cooper DS. (2017) Nodular Thyroid Disease and Thyroid Cancer in the Era of Precision Medicine. *Eur Thyroid J*, 6(2): 65-74.

10. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

A disszertációhoz kapcsolódó publikációk:

Kocsis-Deák Barbara, dr. Balla Bernadett, dr. Tóbiás Bálint, Árvai Kristóf, dr. Putz Zsuzsanna, dr. Kósa János, dr. Lakatos Péter: *Molekuláris genetikai vizsgálatok a pajzsmirigy daganatainak diagnosztikájában*. Orvostovábbképző szemle, XXV. évf. 9. szám, 2018/09

IF: --

Balla Bernadett, Kocsis-Deák Barbara, Kósa János, Árvai Kristóf, Tóbiás Bálint, Takács István, Lakatos Péter: *Az újgenerációs molekuláris diagnosztikai módszerek lehetőségei az endokrinológiában*. Magyar Tudomány, 2019/05

IF: --

Kocsis-Deák Barbara, dr. Balla Bernadett, Árvai Kristóf, dr. Tóbiás Bálint, dr. Győri Gabriella, dr. Járay Balázs, dr. Székely Eszter, Podani János, dr. Kósa János, dr. Lakatos Péter: *A pajzsmirigyöbök genetikai vizsgálata újgenerációs szekvenáláson alapuló platformon kifejlesztett génpanel segítségével*. Orvosi Hetilap, 2019/36

IF: 0.564

Barbara Kocsis-Deák, Kristóf Árvai, Bernadett Balla, Bálint Tóbiás, Andrea Kohánka, Balázs Járay, János Horányi, János Podani, István Takács, Zsuzsanna Putz, János Kósa, Péter Lakatos: *Targeted mutational profiling and a powerful risk score as additional tools for the diagnosis of papillary thyroid cancer*. Pathology & Oncology Research, 2019 Nov 22. Doi: 10.1007/s12253-019-00772-4.

IF: 2.433

A disszertációhoz kapcsolódó konferencia előadások és poszterek:

MEAT 2018. évi Kongresszusa, Hajdúszoboszló, 2018. május 31-június 02.

Előadás címe: 779 pajzsmirigy „hideg” göbös beteg vékonytű biopsziás mintáinak genetikai vizsgálata és 7 éves követése

DKK17, Doktoranduszok a klinikai kutatásokban, Pécs, 2017. október 28.

Poszter címe: Új, NGS alapú molekuláris diagnosztikai módszer a pajzsmirigy papilláris daganatának kimutatására

19th European Congress of Endocrinology 2017, Lisszabon, Portugália, 2017. május 20-23.

Poszter címe: Mutation analysis of papillary thyroid cancers using a newly developed targeted multi-gene panel in Hungarian population

PhD tudományos napok 2017, Semmelweis Egyetem, Budapest, 2017. április 11-12.

Poszter címe: A new custom-made multiplex PCR-based hot spot test for the parallel detection of genetic alterations in papillary thyroid cancer tissue

A disszertációtól független publikációk és absztraktok:

Edina Nemes, Katalin Farkas, Barbara Kocsis-Deák, Andrea Drubi, Adrienn Sulák, Kornélia Tripolszki, Piroska Dósa, Ferenc Lakatos, Nikoletta Nagy, Márta Széll: *Phenotypic diversity of patients with LEOPARD syndrome carrying the worldwide recurrent p.Tyr279Cys PTPN11 mutation*. Archives of Dermatological Research, 2015/12

IF: 2.146

Katalin Farkas, Barbara Kocsis-Deák, Laura Cubells Sánchez, Ana Mercedes Victoria Martínez, János Varga, Alfredo Montoro Botella: *The CYLD p.R758X worldwide recurrent nonsense mutation detected in patients with multiple familial trichoepithelioma type 1, Brooke-Spiegler syndrome and familial cylindromatosis represents a mutational hotspot in the gene*. International Journal of Dermatology, 2016/02

IF: 2.666

Katalin Karászi, Szilvia Szabó, Kata Juhász, Péter Király, Barbara Kocsis-Deák, Beáta Hargitai, Tibor Krenács, Petronella Hupuczi, Offer Erez, Zoltán Papp, Ilona Kovalszky, Nándor Gábor Than: *Increased placental expression of Placental Protein 5 (PP5)/Tissue*

Factor Pathway Inhibitor-2 (TFPI-2) in women with preeclampsia and HELLP syndrome: Relevance to impaired trophoblast invasion? Placenta, 2019/01

IF: 2.773

Bernadett Balla, Sárvári M, János Kósa, Barbara Kocsis-Deák, Bálint Tobiás, Kristóf Árvai, István Takács, János Podani, Liposits Z, Péter Lakatos: *Long-term selective estrogen receptor-beta agonist treatment modulates gene expression in bone and bone marrow of ovariectomized rats.* J Steroid Biochem Mol Biol, 2019/04

IF: 3.785

Kósa János, Balla Bernadett, Kocsis-Deák Barbara, Árvai Kristóf, Tobiás Bálint, Takács István, Lakatos Péter: *Tumordiagnosztika vérből – A folyadékbiopszia.* Magyar Tudomány, 2019/05

IF: --

Vajdasági Magyar Felsőoktatási Kollégium: 13. VMTDK-rezümékötet. ISBN: 978-86-85245-27-5, Újvidék, 2014. p. 45-46

2015. Évi Tudományos Diákköri Konferencia: Absztrakt füzet. ISBN: 978-963-306-358-3, Szeged, 2015. február 10-14. p.44

XX. Korányi Frigyes Tudományos Fórum: Absztraktfüzet. Budapest. 2015. p. 78.

19th European Congress of Endocrinology: Endocrine Abstracts. ISSN: 1479-6848 (online) May 2017. Volume 49. EP1435

11. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Jelen dolgozatom megszületésében sokan, többféleképpen támogattak, az alábbiakban szeretném köszönetemet kifejezni e személyeknek. Segítségük és támogatásuk nélkül az értekezésem nem készülhetett volna el.

Legelőször szeretném hálás köszönetemet kifejezni témavezetőmnek, *dr. Lakatos Péter* professzor úrnak, aki megfelelő helyet és egy kivételesen érdekes témát biztosított számomra a PhD tanulmányaim során. Köszönöm, hogy kutatómunkám során mindig megbízható szakmai útmutatást nyújtott, míg cikkeim és dolgozatom elkészülését jó tanácsokkal és kritikai megjegyzésekkel segítette elő.

Szívből köszönöm *dr. Kósa János*nak, a PentaCore laboratórium vezetőjének, hogy biztosította számomra a kutatómunkámhoz szükséges feltételeket, valamint hogy munkám során mindvégig szakmai, elvi és anyagi téren is támogatott és mindenben a segítségemre volt.

Őszinte köszönetemet fejezem ki *Árvai Kristófnak*, a PentaCore laboratórium NGS részleg vezetőjének, aki első napomtól kezdve segítette kutatásomat és a laboratóriumi munkába való beszokásomat. Kristóf volt az, akitől az elmúlt évek alatt megtanulhattam mindent, amit csak az újgenerációs szekvenálásról tudni kell és lehet, mindig fordulhattam hozzá bármilyen problémámmal, ha elakadtam a munkámban. Örülök, hogy azóta már kollégaként visszaadhatok valamit ebből a támogatásból.

Köszönetemet fejezem ki a kutatócsoportunk és laboratóriumunk többi munkatársának is. Külön köszönet jár *dr. Balla Bernadett*nek, aki nélkül cikkeim sosem készültek volna el és *dr. Tobiás Bálint*nek, akihez bármikor fordulhattam segítségért, ha valamit nem értettem a pajzsmirigy daganatokkal kapcsolatban. Ezenkívül köszönöm *Kövesdi Andreának*, *dr. Klujber Valériának*, *Kohánka Andreának*, *Készné Fodor Lilinek*, *Molnár Gábornak*, *Szőke Saroltának*, *Fáskerti Dóranak*, *Bozzay Noéminek*, *Panker Teodóranak*, *Keresztényi Györgyinek* és *Máté Editnek*, akik mindvégig támogattak, bíztattak és hasznos tanácsaikkal utat mutattak nekem a kutatásaim és a dolgozat elkészítése során is.

Szeretnék köszönetet mondani az I. sz. Sebészeti Klinikáról *dr. Horányi János*nak, a Radológiai és Onkoterápiás Klinikáról *dr. Győri Gabriellá*nak, hogy részt vállaltak a kutatómunkámban. Köszönetet szeretnék mondani az Egyetem II. sz. Patológiai Intézet munkatársainak is, köztük *dr. Járay Balázs*nak és *dr. Székely Eszter*nek, akik segítségével nem jöhetett volna létre ez a munka. Őszinte köszönetemet fejezem ki *Podani János* professzor úrnak, aki megismertetett a diszkriminancia analízis rejtelseivel, nélküle a dolgozat statisztikai kiértékelése sokkal semmitmondóbb lenne.

Végül, de nem utolsósorban hálás köszönettel tartozom szüleimnek és testvéremnek, akik lehetőségeikhez mérten támogattak e munka megalkotásában, és férjemnek, aki mindvégig mellettem állt az olykor rögsnek látszó úton, bátorított és biztatott a végső cél eléréséig.