



## Indications for surgery of thyroid cancer based on biopate molecular examination

Elżbieta Gubała<sup>1</sup>, Tomasz Olczyk<sup>1</sup>, Agnieszka Pawlaczek<sup>1</sup>, Daria Handkiewicz-Junak<sup>1</sup>, Józef Roskosz<sup>1</sup>, Jolanta Krajewska<sup>1</sup>, Marcin Zeman<sup>2</sup>, Ewa Chmielik<sup>3</sup>, Aleksandra Kukulska<sup>1</sup>, Agnieszka Czarniecka<sup>2</sup>, Jan Włoch<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Nuclear Medicine and Endocrine Oncology,

<sup>2</sup>Clinic of Oncological Surgery,

<sup>3</sup>Department of Tumor Pathology,

Comprehensive Cancer Center and M. Skłodowska-Curie Memorial Institute of Oncology, Gliwice Branch

### Abstract

**Introduction:** In differentiated thyroid cancer (DTC) the differentiation between reactive and metastatic lymph nodes is difficult at the early stages of metastasis. The aim of the study was to assess the results of fine needle aspiration (FNA) samples examination by the use of RT-PCR for Tg mRNA. The special attention was directed to the evaluation of specificity of TgRNA estimation.

**Material and methods:** The group consisted of 193 DTC patients with suspicion of lymph node recurrence and at least one positive RT-PCR result. Thyroglobulin RT-PCR was conducted in residual material left after preparation of cytological smears from FNA specimens. Primer spanning exons 3–5 were used with 39 cycles of PCR. RNA isolation control and cDNA amplification were carried out using GAPDH starters. 308 lymph node biopsies were included.

**Results:** 246 positive results for Tg RNA were observed in the analyzed group, 71.1% confirmed by FNA. Among other 71 results, in which cytological examination did not correspond unequivocally to molecular findings, in 34 metastases were confirmed both by cytological and clinical examination. There were 11 patients operated due to the positive serial molecular examination only. In 10 (91%) of them DTC

metastases were confirmed. So, the positive predictive value of the molecular result ranged between 75–89% and the negative one was 100%.

**Conclusions:** In DTC patients RT-PCR Tg mRNA is helpful in qualification of suspicious lymph nodes to surgery in DTC patients. At the negative cytological finding, the positive molecular result constitutes an indication for early surgery.

(*Pol J Endocrinol* 2006; 4 (57): 396–402)

**Key words:** differentiated thyroid cancer (DTC), reactive and metastatic lymph nodes, cytological finding, molecular result, RT-PCR Tg mRNA



Elżbieta Gubała, M.D., Ph.D.

Department of Nuclear Medicine and Endocrine Oncology  
Comprehensive Cancer Center and M. Skłodowska-Curie  
Memorial Institute of Oncology, Gliwice Branch  
Wybrzeże Armii Krajowej 15, 44-101 Gliwice  
phone: (032) 278 97 20, fax: 032 278 93 25  
e-mail: egubala@io.gliwice.pl



## Wskazania do leczenia operacyjnego raka tarczycy na podstawie badania molekularnego bioptatu

Elżbieta Gubała<sup>1</sup>, Tomasz Olczyk<sup>1</sup>, Agnieszka Pawlaczek<sup>1</sup>, Daria Handkiewicz-Junak<sup>1</sup>, Józef Roskosz<sup>1</sup>,  
Jolanta Krajewska<sup>1</sup>, Marcin Zeman<sup>2</sup>, Ewa Chmielik<sup>3</sup>, Aleksandra Kukulka<sup>1</sup>, Agnieszka Czarniecka<sup>2</sup>, Jan Włoch<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Zakład Medycyny Nuklearnej i Endokrynologii Onkologicznej

<sup>2</sup>Klinika Chirurgii Onkologicznej

<sup>3</sup>Zakład Patologii Nowotworów

Centrum Onkologii — Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie, Oddział w Gliwicach

### Streszczenie

**Wstęp:** Ryzyko wznowy w węzłach chłonnych w przebiegu zróżnicowanych raków tarczycy (DTC, *differentiated thyroid cancer*) jest znaczące. Mimo że większość nawrotów wykrywa się już w czasie pierwszych lat obserwacji, to jednak u części chorych do wznowy raka może dojść nawet po wielu latach od zakończenia leczenia skojarzonego. We wczesnej fazie tworzenia się przerzutu trudno odróżnić węzły chłonne odczynowe od przerzutowych, stąd pytanie, czy w rozpoznaniu przerzutów podejrzanych węzłów chłonnych może pomóc badanie molekularne uzyskanego bioptatu. Celem pracy była ocena wyników bioptatów badanych metodą molekularną, RT-PCR (*reverse transcription polymerase chain reaction*) dla mRNA tyreoglobuliny (Tg, *thyroglobulin*).

**Materiał i metody:** W badaniu wzięła udział grupa 193 chorych na zróżnicowane raki tarczycy z podejrzeniem przerzutów do miejscowych węzłów chłonnych, u których przynajmniej raz w toku obserwacji uzyskano wynik dodatni RT-PCR. Łącznie pobrano od nich 308 bioptatów.

Reakcję RT-PCR wykonywano z materiału pozostałego w igle po wykonaniu tradycyjnego rozmazu cytologicznego. Kontrolę izolacji RNA i amplifikacji cDNA przeprowadzano, stosując startery dla dehydrogenazy fosforanu-3-gliceroaldehydu (GADPH, *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*). Startery dla tyreoglobuliny obejmowały eksony 3–5; stosowano 39 cykli PCR.

**Wyniki:** W badanej wyselekcjonowanej grupie chorych uzyskano 246 wyników dodatnich badania RT-PCR, a rozpoznanie przerzutów do węzłów chłonnych potwierdzono za pomocą badania cytologicznego w 71,1% przypadków. Spośród pozostałych 71 wyników, w których wynik badania cytologicznego nie był jednoznacznie zgodny z badaniem molekularnym, w 34 przypadkach potwierdzenie istnienia przerzutu wynikało z łącznej interpretacji badania cytologicznego (w którym cytolog stwierdzał podejrzenie

przerzutu, ale nie dawał jednoznacznego rozpoznania lub wynik bioptatu był niediagnostyczny) i klinicznego (ze względu na wyniki innych badań). Operowano 11 chorych, u których na zabieg zdecydowano się wyłącznie ze względu na utrzymujący się w kolejnych bioptatach dodatni wynik badania molekularnego. U 10 z nich (91%) rozpoznanie przerzutu raka tarczycy potwierdzono za pomocą pooperacyjnego badania histopatologicznego węzłów chłonnych szyi. Zatem łączna ocena wiarygodności wyniku dodatniego mieściła się w zakresie 75–89%, przy wiarygodności wyniku ujemnego równej 100%.

**Wnioski:** Badanie molekularne (RT-PCR dla mRNA Tg) podejrzanych węzłów chłonnych jest badaniem wspomagającym kwalifikację chorych do leczenia operacyjnego w przebiegu zróżnicowanych raków tarczycy. W przypadku, kiedy badanie cytologiczne jest ujemne, wiarygodność dodatniego wyniku badania molekularnego nie jest pełna, dlatego przed podjęciem leczenia operacyjnego konieczne należy przeprowadzić indywidualną analizę wskazań, a dodatni wynik badania molekularnego kwalifikuje chorego do grupy wysokiego ryzyka wznowy w węzłach.

(*Endokrynol Pol* 2006; 4 (57): 396–402)

**Słowa kluczowe:** zróżnicowany rak tarczycy, węzły chłonne odczynowe i przerzutowe, bioptat, badanie molekularne RT-PCR dla mRNA Tg



Dr med. Elżbieta Gubała  
Zakład Medycyny Nuklearnej i Endokrynologii Onkologicznej  
Centrum Onkologii — Instytut im. M. Skłodowskiej-Curie  
Oddział w Gliwicach  
ul. Wybrzeże Armii Krajowej 15, 44–101 Gliwice  
tel.: 032 278 97 20, faks: 032 278 93 25  
e-mail: egubala@io.gliwice.pl

## Wstęp

W leczeniu raka tarczycy bardzo istotne znaczenie ma wczesne wykrycie wznowy, ponieważ tylko wtedy leczenie operacyjne i uzupełniające leczenie radiojodem może dać pełny, pozytywny efekt [1]. W przypadku raka brodawkowatego przerzuty do węzłów chłonnych często stwierdza się już w chwili rozpoznania nowotworu. Po zabiegu chirurgicznym nawroty choroby nowotworowej najczęściej są zlokalizowane w węzłach chłonnych szyi, stanowiąc 60–75% wznów miejscowych [2]. Ryzyko wznowy miejscowej w przebiegu zróżnicowanych raków tarczycy (DTC, *differentiated thyroid cancer*) jest znaczne i wynosi 5–30%. Większość nawrotów wykrywa się w ciągu pierwszych lat obserwacji, jednak u części chorych do nawrotu może dojść nawet po wielu latach od zakończenia leczenia. Wczesne wykrycie wznowy miejscowej znacznie zwiększa szansę wyleczenia [1, 3]. Do tej pory w zróżnicowanych rakach tarczycy nie znaleziono markera molekularnego pozwalającego na wykrycie przerzutów nowotworowych w początkowej fazie ich rozwoju. Wiadomo jednak, że ekspresja białek swoistych dla tarczycy jest zachowana w większości zróżnicowanych raków tarczycy, chociaż jest ona znacznie niższa niż w prawidłowych komórkach pęcherzykowych [4–7]. Mimo że tyreoglobulina (Tg, *thyroglobulin*) oznaczana immunometrycznie we krwi chorych dobrze spełnia swoją rolę markera nawrotów, to czasem zawodzi jako sygnał wczesnej wznowy węzłowej [8]. Istnieje zatem potrzeba szukania lepszych markerów służących do monitorowania pooperacyjnego chorych na DTC — takich, które pozwoliłyby na wczesne rozpoznanie przerzutów do węzłów chłonnych szyi.

W przypadku podejrzenia przerzutów nowotworowych do węzłów chłonnych badaniem rozstrzygającym jest wykonanie biopsji aspiracyjnej cienkoigłowej celowanej [9]. Uzyskanie materiału niediagnostycznego w biopsji lub wynik fałszywie ujemny w badaniu cytologicznym nie należy do rzadkości. Ponadto różnicowanie zmienionych odczynowo węzłów chłonnych z węzłami przerzutowymi wymaga często wielokrotnych biopsji, co jest zadaniem niełatwym, szczególnie u osób młodych, u których odczynowe powiększenie węzłów chłonnych jest częste. Wczesne wykrycie wznowy węzłowej DTC może być również trudne z powodu małej liczby komórek nowotworowych obecnych w aspiracie.

Postępowanie diagnostyczne u chorych na DTC może być wspierane przez analizę molekularną próbek uzyskanych z biopłatów [10–18]. Wykrywanie ekspresji genu przez badanie mRNA jest metodą bardziej czułą niż badanie obecności samego białka. Ponieważ komórki zróżnicowanych raków tarczycy zachowują zdolność produkcji tyreoglobuliny, wykrycie mRNA dla Tg

w badanych węzłach chłonnych szyi jest argumentem przemawiającym za obecnością komórek przerzutowych raka tarczycy. Zastosowanie techniki odwrotnej transkrypcji reakcji łańcuchowej polimerazy (RT-PCR, *reverse transcription polymerase chain reaction*) do wykrywania ekspresji genu dla tyreoglobuliny może więc uzupełniać badanie cytologiczne i zwiększyć jego czułość [10, 13, 16–18].

Wprowadzenie tej metody do monitorowania raka wiąże się jednak z zasadniczym pytaniem, czy jej wysoka czułość nie stanowi jednocześnie jej najważniejszego ograniczenia, prowadząc do obniżenia swoistości [19]. Wątpliwości te wynikają zarówno z rozważań teoretycznych, jak i z doświadczeń praktycznych, między innymi z badań nad wprowadzeniem RT-PCR do diagnostyki raka jelita grubego czy raka piersi [20–22]. Badając markery użyte w tych nowotworach, Bostick i wsp. [19] wykazali u zdrowych kobiet ekspresję dla cytokeratyny, antygeny karcinoembrionalnego (CEA, *carcinoembryonic antigen*) oraz MUC-1 i to zarówno we krwi obwodowej, jak i w węzłach chłonnych. Niska swoistość jest w wielu przypadkach czynnikiem ograniczającym wdrożenie tej metody do diagnostyki klinicznej.

Celem niniejszej pracy jest ocena przydatności badania molekularnego w kwalifikacji chorych na DTC do zabiegu operacyjnego.

## Materiał i metody

W badaniu wzięło udział 193 chorych z podejrzeniem rozsiewu zróżnicowanego raka tarczycy do szyjnych węzłów chłonnych (308 biopłatów), u których przynajmniej jeden raz stwierdzono w biopłacie dodatni wynik badania molekularnego. Wskazania do biopsji podejrzanego węzła chłonnego ustalono po przeprowadzeniu badania przedmiotowego lub badania ultrasonograficznego u chorych zgłaszających się po raz pierwszy po operacji zróżnicowanego raka tarczycy lub monitorowanych po zakończeniu leczenia skojarzonego, obejmującego leczenie operacyjne i uzupełniające leczenie jodem promieniotwórczym [9].

U wszystkich chorych rutynowo wykonywano biopsję aspiracyjną cienkoigłową podejrzanego węzła chłonnego pod kontrolą USG. Po wykonaniu klasycznego rozmazu cytologicznego igłą biopsyjną przepłukiwano dodatkowo 350  $\mu$ l buforu RLT z  $\beta$ -merkaptotetanolem (1 ml RLT/10  $\mu$ l  $\beta$ -merkaptotetanolu) i uzyskany w ten sposób materiał komórkowy zamrażano w  $-120^{\circ}\text{C}$  do badania RT-PCR. Rozmaz barwiono hematoksyliną-eozyną.

Dalsze postępowanie kliniczne zależało od wyniku badania cytologicznego. Jeżeli wynik badania cytologicznego był dodatni, przeprowadzano ocenę operacyjności przerzutów i kwalifikowano chorych do leczenia

**Tabela I**

*Wyniki badań cytologicznych i molekularnych u chorych na raka tarczycy z podejrzeniem wznowy węzłowej (łącznie u 193 chorych wykonano 308 bioptatów)*

**Table I**

*Results of cytological and molecular investigation in patients with suspicion of DTC lymph node metastases (308 fine-needle aspirations were performed in 193 patients)*

	<b>Dodatnie</b>	<b>Ujemne</b>	<b>Niejednoznaczne</b>	<b>Razem</b>
Badania molekularne	246 79,9%	62 20,1%	0	308
Badania cytologiczne	175 56,8%	88 (62 + 26*) 28,6%	45 14,6%	308

\*W dalszej obserwacji wycofano się z podejrzenia przerzutu

operacyjnego. Jeżeli wynik badania cytologicznego był ujemny, postępowanie uzależniano od ryzyka rozsewu, ocenianego na podstawie obserwacji klinicznej. U chorych, u których w badaniu USG lub w innych badaniach dodatkowych (stężenie tyreoglobuliny w surowicy) stwierdzano podejrzenie przerzutów, powtarzano biopsje cienkoigłowe. Chorych, u których kolejne biopsje nie potwierdzały zmian przerzutowych w węzłach chłonnych, a wynik badania RT-PCR był ponownie dodatni, poddano kilkuletniej obserwacji (od roku do 5 lat).

U pozostałych chorych kontrolowano jedynie obraz podejrzanego węzła w USG i kontynuowano oznaczenia Tg.

Kwas rybonukleinowy (RNA, *ribonucleic acid*) z materiału uzyskanego przez płukanie igły biopsyjnej izolowano za pomocą zestawu *Rneasy Mini Kit* (Qiagen). Syntezę jednoniciowego DNA (cDNA) prowadzono na matrycy RNA z użyciem zestawów cDNA *Cycle Kit* (Invitrogen). Do probówek zawierających 6  $\mu$ l badanego RNA dodawano 5,5  $\mu$ l H<sub>2</sub>O i po 1  $\mu$ l starterów oligo dT (sekwencje tych starterów ulegają komplementarnemu parowaniu z zasadami znajdującymi się w ogonie poliadenylowym cząsteczki informacyjnego RNA). Probówki umieszczano w termocyklerze UNO II (Biometra): 10 min w temperaturze 65°C, 2 min w temperaturze 20°C. Następnie dodano 4  $\mu$ l buforu 5  $\times$  RT, 1  $\mu$ l 100 mmol roztworu dezoksyrybonukleotydów (dNTPs), 1  $\mu$ l 80 mmol pirofosforanu sodu i 1  $\mu$ l inhibitora RNA-az oraz 0,5  $\mu$ l odwrotnej transkryptazy (AMV). Całość umieszczano w temperaturze 42°C na okres 60 min. Wyizolowany cDNA zamrażano w -120°C.

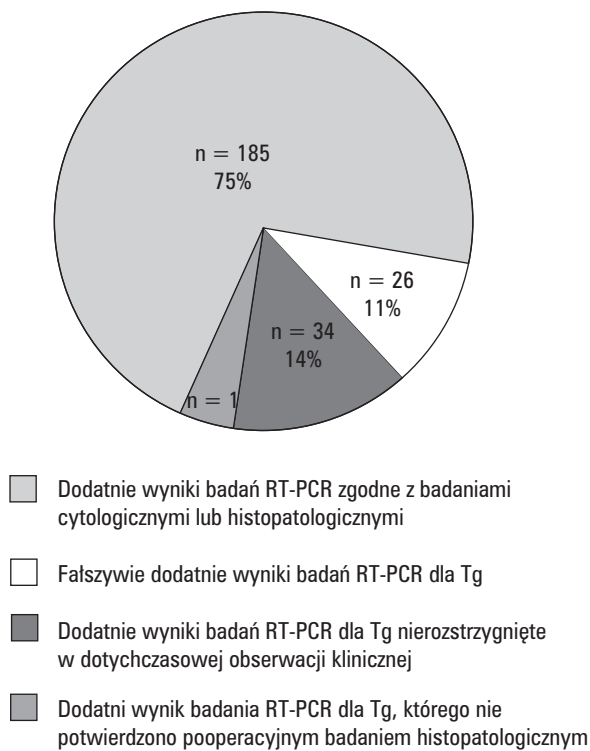
Reakcję PCR prowadzono w następujących warunkach: 5 min (94°C); 39 cykli: 30 s (94°C), 30 s (60°C), 30 s (72°C); 10 min (72°C) z użyciem starterów dla genu tyreoglobuliny (F:5'TGT GAG CTG CAG AGG GAA ACG GCC 3' R:5'ATA CAC CTC CAT CCC CTC TGC GTC CAC ACA 3') oraz dla GAPDH użytego jako kontroli

(F:5' CCA CCC ATG GCA AAT TCC ATG GCA 3' R:5'TCT AGA CGG CAG GTC AGG TCC ACC 3'). Następnie przeprowadzano elektroforezę na 2-procentowym żelu agarozowym barwionym bromkiem etydydy, przy użyciu pUC Mix (MBI Fermentas) jako markera długości fragmentów DNA. Długość produktów reakcji PCR z użyciem starterów dla genów tyreoglobuliny i GAPDH wynosiły odpowiednio: 348 i 603 pz.

## Wyniki

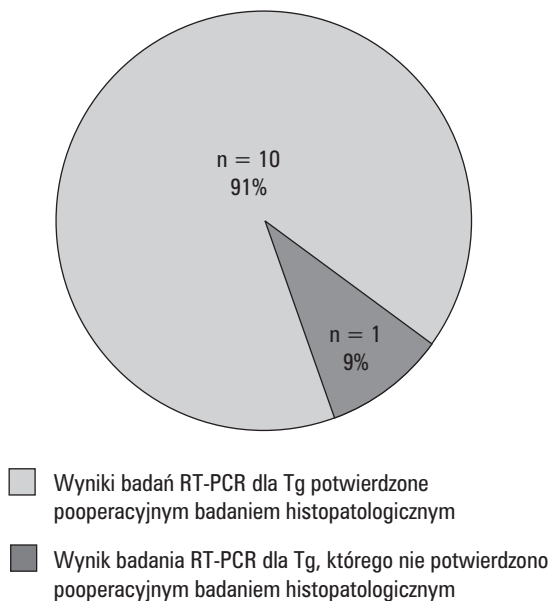
W wyselekcjonowanej grupie 193 chorych (308 bioptatów) uzyskano 246 wyników dodatnich badania molekularnego. Rozpoznanie przerzutów do węzłów chłonnych za pomocą badania cytologicznego potwierdzono w 175 przypadkach, co stanowiło 71% wszystkich dodatnich wyników badań molekularnych (tab. I). W pozostałych 29% badanie cytologiczne nie było zgodne z badaniem molekularnym bioptatu. W toku dalszej obserwacji w 26 przypadkach (11%) wykluczono wznowę węzłową, a wynik badania molekularnego uznano za fałszywie dodatni (ryc. 1). W dalszych 34 przypadkach potwierdzenie istnienia przerzutów wynikało z łącznej interpretacji wyników badania cytologicznego (w którym cytolog stwierdzał podejrzenie przerzutu, lecz nie dawał jednoznacznego rozpoznania lub wynik biopsji był niediagnostyczny) i innych badań. W 11 przypadkach, w których badanie cytologiczne nie było jednoznaczne, a które leczono operacyjnie, badanie molekularne zweryfikowano poprzez pooperacyjne badanie histopatologiczne. U 10 z tych chorych (91%) uzyskano jednoznaczne potwierdzenie obecności wznowy węzłowej w badaniu histopatologicznym po zabiegu (ryc. 2).

W badaniach kontrolnych (72 badanych węzłów), wykonanych u chorych z podejrzeniem przerzutu nowotworu innego niż DTC, w 20 przypadkach uzyskano cytologiczne rozpoznanie przerzutu, a w 52 wynik



**Rycina 1.** Analiza dodatnich wyników badania molekularnego biopsji węzłów chłonnych

**Figure 1.** Evaluation of positive results of molecular examination of suspected lymph nodes



**Rycina 2.** Wiarygodność wyniku molekularnego w grupie chorych zakwalifikowanych do leczenia operacyjnego mimo ujemnego wyniku badania cytologicznego

**Figure 2.** Positive predictive value of molecular examination, as evaluated by post-surgery histopathology. Surgery was decided on the basis of positive RT-PCR, at negative cytology

**Tabela II**

Grupa kontrolna — 72 chorych na nowotwory inne niż zróżnicowane raki tarczycy (DTC)

**Table II**

Control group — 72 patients with suspicion of lymph node metastases from other tumors than differentiated thyroid carcinoma

Wynik badania cytologicznego	RT-PCR Tg		Razem
	+	-	
Dodatni*	0	20	20
Ujemny	0	52	52
<b>Razem</b>	<b>0</b>	<b>72</b>	<b>72</b>

\*Rak inny niż DTC; DTC (*differentiated thyroid carcinoma*) — zróżnicowane raki tarczycy; RT-PCR (*reverse transcription polymerase chain reaction*) — odwrotna transkrypcja reakcji łańcuchowej polimerazy; Tg — tyreoglobulina

badania cytologicznego był ujemny. W żadnej z 72 badanych próbek nie otrzymano dodatniego wyniku RT-PCR dla mRNA tyreoglobuliny (tab. II).

Podsumowując powyższe wyniki, należy stwierdzić, że w wybranych w ten sposób grupach wiarygodność wyniku dodatniego mieści się w granicach 75–89%, w zależności od przyjętego kryterium, a wiarygodność wyniku ujemnego wynosi 100%.

## Dyskusja

Komórki raka tarczycy, tworzące przerzuty do węzłów chłonnych, zachowują wiele cech funkcjonalnych komórki pęcherzykowej, zatem można w nich badać ekspresję genów swoistych dla tarczycy [23, 24]. Metodę RT-PCR zastosowano w zróżnicowanym raku tarczycy do badania ekspresji wielu genów swoistych dla komórek pęcherzykowych, w tym genu tyreoglobuliny, receptora dla TSH, symportera jodowo-sodowego oraz peroksydazy tarczycowej czy pendryny [5, 16–18, 23–27]. Badania wykonane metodą ilościowej PCR w czasie rzeczywistym wskazują, że liczba kopii mRNA jest znacznie wyższa dla tyreoglobuliny niż dla innych genów i to zarówno w prawidłowej komórce pęcherzykowej, jak i w komórce raka brodawkowatego [23, 27, 28]. Mimo że ekspresja wszystkich genów tarczycowo-swoistych jest w raku tarczycy wyraźnie obniżona, to w wartościach względnych obniżenie jest najmniejsze właśnie dla tyreoglobuliny [23]. Dlatego w celu wykrycia komórek nowotworowych tworzących przerzuty DTC w innych narządach najczęściej stosuje się tyreoglobulinę.

Autorzy niniejszej pracy skupili się przede wszystkim na kwestii swoistości wyniku badania molekularnego,

dlatego ograniczyli się wyłącznie do osób, u których przynajmniej jeden raz stwierdzono wynik dodatni. Wiarygodność wyniku dodatniego wahała się w granicach 75–89%. Dolna granica tego zakresu to wyniki potwierdzone cytologicznie lub histopatologicznie. Górną granicę wyznacza stwierdzenie 11% wyników fałszywie dodatnich, ponieważ u tych chorych w dalszej obserwacji jednoznacznie wycofano się z podejrzenia przerzutu [26]. U 11 chorych, u których stwierdzono dodatni wynik badania molekularnego bez rozpoznania przerzutu w badaniu cytologicznym, zdecydowano się na leczenie operacyjne, które wykazało bardzo dobrą wiarygodność tych badań (91%). U pozostałych chorych operacji nie wykonywano ze względu na obecność rozsiewu choroby do innych narządów lub przeciwwskazań do leczenia chirurgicznego, bądź też niskie prawdopodobieństwo przerzutów o znaczącej masie, wynikające z oceny klinicznej. Wyniki autorów prezentowanej pracy zachęcają do kontynuowania badań molekularnych w opisanej sytuacji klinicznej. Jeżeli liczba komórek raka w węzle chłonny jest stosunkowo niewielka, łatwo można je przeoczyć w materiale z biopsji cienkoigłowej, obejmującym stosunkowo niewielką liczbę komórek. Stwierdzenie w uzyskanym materiale cytologicznym komórek raka tarczycy lub komórek o morfologii tyreocytów pozwala na postawienie rozpoznania nawrotu procesu nowotworowego. Jednak w przypadku mało zaawansowanych zmian interpretacja otrzymanego rozmazu komórkowego może być utrudniona (zbyt mała liczba komórek lub ich zmieniona morfologia, będąca wynikiem przeprowadzonego leczenia). Barwienie na obecność Tg w aspiracie może zwiększyć czułość i swoistość tej metody, jednak często jest to również niewystarczające ze względu na niewielką ilość pobranego materiału komórkowego [10].

Użycie techniki RT-PCR umożliwia wykrycie mRNA dla Tg, nawet jeżeli w aspiracie znajduje się zaledwie kilka komórek zdolnych do syntezy Tg. Wykrycie informacyjnego RNA dla Tg w biopsjach podejrzanych węzłów chłonnych osób chorych na DTC może być podstawą do rozpoznania wznowy miejscowej. Konieczne jest jednak wyznaczenie kryteriów interpretacyjnych dla tej metody diagnostycznej, umożliwiającej monitorowanie obecności pojedynczych komórek przerzutu. Niniejsza praca wyznacza taki zakres wiarygodności.

Próby zastosowania metody RT-PCR w badaniach cytologicznych były do tej pory w zróżnicowanym raku tarczycy podejmowane przez licznych badaczy [11, 29], jednak nikt nie opisał swojej metody ilościowo. Jeszcze częściej oznaczano immunoradiometrycznie Tg w płuczynach z wymazu [30, 31].

Jakkolwiek zastosowanie tak czułej metody, jaką jest RT-PCR, wydaje się logicznym etapem zwiększania czułości biopsji cienkoigłowej, zastosowanie praktyczne tej metody jest jeszcze w onkologii rzadkie ze względu na poważne wątpliwości dotyczące jej swoistości. Zwiększając liczbę cykli w reakcji PCR, można uzyskać badany transkrypt praktycznie z każdego materiału. Zatem każda pracownia musi udowodnić, że warunki reakcji są tak dobrane, by stanowiły optymalny kompromis między zwiększaniem czułości a obniżeniem swoistości. Dotyczy to nie tylko liczby cykli w reakcji PCR, ale także zakresu oczyszczania izolowanego RNA z domieszek DNA. Autorzy chronili się przed zanieczyszczeniami DNA, stosując wstępne trawienie DNA-azą. Zastosowanie starterów obejmujących kilka kolejnych eksonów także zmniejszało ryzyko namnażania zanieczyszczeń DNA. Ryzyko nieuprawnionej transkrypcji okazało się niskie, na co wskazuje analiza grupy odniesienia, którą stanowiły biopsje pobrane od chorych na inne nowotwory niż DTC. W metodzie autorów niniejszej pracy wiarygodność wyniku ujemnego badana w grupie chorych z innymi nowotworami wynosiła 100%.

## Wnioski

Badanie molekularne (RT-PCR dla mRNA Tg) podejrzanych węzłów chłonnych jest badaniem wspomagającym kwalifikację chorych do leczenia operacyjnego w przebiegu zróżnicowanych raków tarczycy. Należy jednak podkreślić, że w przypadku, kiedy wynik badania cytologicznego jest ujemny, wiarygodność wyniku dodatniego badania molekularnego nie jest pełna i mieści się w granicach 75–89%, w zależności od przyjętego kryterium, wyższa jest wiarygodność wyniku ujemnego, która wynosi 100%. Tak więc, przed podjęciem leczenia operacyjnego konieczna jest indywidualna ocena wskazań u każdego chorego, a jej zastosowanie pozwala na trafny wybór chorych, u których operacja jest uzasadniona. Należy przyjąć, że dodatni wynik badania molekularnego kwalifikuje chorych do grupy wysokiego ryzyka wznowy węzłowej.

## Piśmiennictwo

1. Tubiana M, Schlumberger M, Rougier P i wsp. Long-term results and prognostic factors in patients with differentiated thyroid carcinoma. *Cancer* 1985; 55: 794–804.
2. Grebe SKG, Hay ID. Thyroid cancer nodal metastases: biologic significance and therapeutic considerations. *Surg Oncol Clin N America* 1999; 5: 43–63.
3. Mazzaferri EL. An overview of the management of papillary and follicular thyroid carcinoma. *Thyroid* 1999; 9 (5): 421–427.
4. Ditkoff BA, Marvin MR, Yemul S i wsp. Detection of circulating thyroid cells in peripheral blood. *Surgery* 1996; 120: 959–965.

5. Tallini G, Ghossein RA, Emanuel J i wsp. Detection of thyroglobulin, thyroid peroxidase, and RET/PTC1 mRNA transcripts in the peripheral blood of patients with thyroid disease. *J Clin Oncol* 1998; 16: 1158–1166.
6. Ringel MD, Ladenson PW, Levine MA. Molecular diagnosis of residual and recurrent thyroid cancer by amplification of thyroglobulin messenger ribonucleic acid in peripheral blood. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83: 4435–4442.
7. Bojunga J, Roddiger S, Stanisch M i wsp. Molecular detection of thyroglobulin mRNA transcripts in peripheral blood of patients with thyroid disease by RT-PCR. *Br J Cancer* 2000; 82: 1650–1655.
8. Schlumberger M, Baudin E. Serum thyroglobulin determination in the follow-up of patients with differentiated thyroid carcinoma. *Eur J Endocrinol* 1998; 138: 249–252.
9. Diagnostyka i leczenie nowotworów złośliwych tarczycy. Rekomendacje Komitetu Naukowego II Konferencji „Rak Tarczycy” w Szczyrku. *Wiad Lek* 2001 LIV (supl. 1): 443–459.
10. Frasoldati A, Toschi E, Zini M i wsp. Role of thyroglobulin measurement in fine-needle aspiration biopsies of cervical lymph nodes in patients with differentiated thyroid cancer. *Thyroid* 1999; 9: 105–111.
11. Russo D, Arturii F, Pontecorvi A i wsp. Genetic analysis in fine needle aspiration of the thyroid: a new tool for clinic. *Thyroid* 1999; 10: 280–285.
12. Arturi F, Russo D, Giuffrida D i wsp. Early diagnosis by genetic analysis of differentiated thyroid cancer metastases in small lymph nodes. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82: 1638–1641.
13. Winzer R, Schmutzler C, Jakobs TC i wsp. Reverse transcriptase-polymerase chain reaction analysis of thyrocyte-relevant genes in fine-needle aspiration biopsies of the human thyroid. *Thyroid* 1998; 8 (11): 981–987.
14. Lawrence W Jr, Kaplan BJ. Diagnosis and management of patients with thyroid nodules. *J Surg Oncol* 2002; 80: 157–170.
15. Weber T, Klar E. Minimal residual disease in thyroid carcinoma. *Semin Surg Oncol* 2001; 20: 272–277.
16. Penna-Martinez M, Winten C, Fichtel T i wsp. Isolation of thyroid cells obtained by fine-needle aspiration biopsy. *Thyroid* 2005; 15 (9): 989–995.
17. Gubała E, Handkiewicz-Junak D, Zeman M i wsp. RT-PCR for thyroglobulin as a method of lymph nodes metastases detection in differentiated thyroid carcinoma. *Wiad Lek* 2001; 54: 346–355.
18. Gubała E, Handkiewicz-Junak D, Zeman M i wsp. Wspomaganie badań cytologicznych metodą RT-PCR w wykrywaniu przerzutów nowotworowych do węzłów chłonnych w przebiegu zróżnicowanych raków tarczycy. *Pol J Endocrinol* 2002; 2 (1): 52–53.
19. Bostick PJ, Chatterjee S, Chi DD i wsp. Limitations of specific reverse-transcriptase polymerase chain reaction markers in the detection of metastases in the lymph nodes and blood of breast cancer patients. *J Clin Oncol* 1998; 16: 2632–2640.
20. Liu Z, Ye X, Bi W i wsp. Detection of occult metastases in lymph nodes from patients with colorectal carcinoma by reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Chin Med J* 2002; 115: 529–531.
21. Shivers SC, Stall A, Goscin C i wsp. Molecular staging for melanoma and breast cancer. *Surg Onkol Clin N Am* 1999; 8 (3): 515–526.
22. Hochberg M, Lotem M, Gimon Z i wsp. Expression of tyrosinase, MIA and MART-1 in sentinel lymph nodes of patients with malignant melanoma. *Br J Dermatol* 2002; 146: 244–249.
23. Lazar V, Bidart JM, Caillou B i wsp. Expression of the Na<sup>+</sup>/I<sup>-</sup> symporter gene in human thyroid tumors: a comparison study with other thyroid-specific genes. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84 (9): 3228–3234.
24. Łącka K, Włoch J, Stawny A i wsp. Poziom mRNA Tg a stopień zróżnicowania nowotworów złośliwych tarczycy. *Endokrynologia Polska/Pol J Endocrinol* 1997; 48: 73.
25. Bidart JM, Mian C, Lazar V i wsp. Expression of pendrin and the Pendred syndrome (PDS) gene in the human thyroid tissues. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85: 2028–2033.
26. Park HJ, Kim JY, Park KY i wsp. Expressions of human sodium iodide symporter mRNA in primary and metastatic papillary thyroid carcinomas. *Thyroid* 2000; 10: 211–217.
27. Tanaka K, Otsuki T, Sonoo H i wsp. Semi-quantitative comparison of the differentiation markers and sodium iodide symporter messenger ribonucleic acids in papillary thyroid carcinomas using RT-PCR. *Eur J Endocrinol* 2000; 142: 340–346.
28. Ringel MD, Balducci-Silano PL, Anderson JS i wsp. Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction of circulating thyroglobulin messenger ribonucleic acid for monitoring patients with thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84: 4037–4042.
29. Takano T, Miyauchi A, Matsuzuka F i wsp. Preoperative diagnosis of medullary thyroid carcinoma by RT-PCR using RNA extracted from leftover cells within a needle used for fine needle aspiration biopsy. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84 (3): 951–955.
30. Schlumberger M, Pacini F, Wiersinga WM i wsp. Follow-up and management of differentiated thyroid carcinoma: a European perspective in clinical practice. *E J Endocrinology* 2004; 151: 539–548.
31. Mikosiński S, Pomorski L, Oszukowska L i wsp. Wartość oznaczenia stężenia tyreoglobuliny w aspiratach z węzłów chłonnych szyi u chorych ze zróżnicowanym rakiem tarczycy. III Konferencja Naukowa „Rak Tarczycy” — Szczyrk 23–25.03.2006. Materiały konferencyjne: 157.