

A PAPILLÁRIS PAJZSMIRIGY DAGANAT GENETIKAI HÁTTÉRÉNEK VIZSGÁLATA

Tézisek

Dr. Ármós Richárd Levente

Rácz Károly Konzervatív Orvostudományi Tagozat
Semmelweis Egyetem



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

Hivatalos bírálók:

Dr. Bödör Csaba, DSc., egyetemi tanár

Dr. Kovács Gábor László, PhD., osztályvezető főorvos

Komplex vizsga szakmai bizottság:

Elnök: Dr. Hosszúfalusi Nóra, CSc., egyetemi tanár

Tagok: Dr. Várbíró Szabolcs, DSc., egyetemi tanár

Dr. Kovács Gábor László, PhD., osztályvezető főorvos

Budapest
2025

1. BEVEZETÉS

A pajzsmirigyrák a leggyakoribb endokrin daganattípus, világszerte évente több mint 800 000 új esettel. Az esetek körülbelül 90%-át a differenciált pajzsmirigyrák (DTC) teszi ki, melyek közül a leggyakoribb a papilláris (PTC) szövettani típus. A klasszikus szövettani kategorizálás mellett egyre nagyobb hangsúlyt kap a molekuláris jellemzők szerinti osztályozás, mivel ezek prognosztikai és terápiás jelentősége is növekszik.

A betegség kezelése az Amerikai Pajzsmirigy Társaság (ATA) irányelvei szerint, a kórkép rizikóbesorolása alapján történik, mely főként a szövettani tulajdonságokat veszi figyelembe. A PTC elsődleges kezelési módja a sebészi eltávolítás, amit szükség esetén radiojód (I^{131}) terápia követhet. Terápiarefrakter esetekben célzott molekuláris terápiák (pl.: *RET*, *NTRK* ellen) is szóba jöhetnek másodvonalbeli kezelési lehetőségként.

A molekuláris terápiák indikációjának és a pontosabb differenciáldiagnosztikának az alapját a molekuláris diagnosztikai profilalkotás jelenti, mely részét képezheti a „driver” génfúziók, illetve az egyre inkább előtérbe kerülő mikroRNS (miRNS) expressziós eltérések kimutatása. Emiatt a molekuláris diagnosztika rutinszerűbb alkalmazása a jövőben a klinikai döntéshozatal sarokkövét és a személyre szabott medicina fontos eszközét jelentheti. Ennek ellenére az ilyen jellegű, a PTC molekuláris etiológiáját feltáró, eredeti genetikai kutatások — különösen kellően nagy esetszámú kontrollcsoporttal és klinikopatológiai adatokkal kiegészítve — még mindig igen korlátozott számban állnak rendelkezésre.

2. CÉLKITŰZÉSEK

Kutatásunk célja a papilláris pajzsmirigyrák (PTC) molekuláris hátterének átfogó vizsgálata volt hazai kohorszokon a molekuláris profilalkotás diagnosztikai, prognosztikai és terápiás jelentőségének hangsúlyozása érdekében.

Munkánk során az alábbi két fő területre összpontosítottunk:

1. releváns génfúziók gyakorisági eloszlásának meghatározása és ezek esetleges összefüggéseinek feltárása a rutinszerűen vizsgált klinikopatológiai jellegekkel,
2. a PTC kialakulásában a miRNS-ek lehetséges kóroki szerepének alátámasztása és részletes feltérképezése, valamint a miRNS expressziós mintázatok összefüggéseinek meghatározása egyes klinikopatológiai jellegekkel és más, hasonló genetikai háttérrel rendelkező kórállapotokkal.

3. MÓDSZEREK

3.1. Vizsgálati populáció

A kutatás két különálló hazai PTC betegkohorszra épült. A génfúziós vizsgálatba történő bevonásra a kizárásokat követően 100 eset szövettani mintája bizonyult alkalmasnak. A diagnózis felállításakor az átlag életkor $45 \pm 15,64$ év volt (nőknél: $46 \pm 16,15$ év; férfiaknál: $44 \pm 14,52$ év). 32 betegnek a PTC-n kívül egyéb társbetegsége nem volt. A bevont betegek 69%-a klasszikus típusú PTC-vel volt diagnosztizálva.

A miRNS-vizsgálatunkba a kizárások után 118 eset került bevonásra, melyek tumoros és tumormentes pajzsmirigyszövet mintáit egyaránt vizsgáltuk. Ebben a kohorszban a bevont PTC-k 81%-a volt klasszikus típusú. A következő klinikopatológiai változókat mindkét kohorsz esetén elemeztük: életkor a diagnózis idején, nem, ATA rizikó pontszám, TNM stádium és tumorstádium (az Amerikai Rákbizottság 8. kiadása szerint).

3.2. Mintagyűjtés és szövettani feldolgozás

A minták a Semmelweis Egyetem Belgyógyászati és Onkológiai Klinikájához, valamint az Országos Onkológiai Intézethez tartozó esetek formalinban fixált, paraffinba ágyazott (FFPE) szövetblokkjaiból származtak. A szövettani típusokat és a daganatszövet arányát hematoxilin-eozin festéssel, patológus szakorvos segítségével ellenőriztük. A megfelelőnek ítélt mintákból makrodisszekcióval metszeteket készítettünk.

Kizárólag az előzetes szövettani vizsgálat alapján validált, legalább 80%-os tumor tartalmú PTC minták kerültek bevonásra. A miRNS kohorsz esetén kontrollmintákat is vizsgáltunk, melyeket a tumortól lehető legtávolabb eső, szövettanilag tumormentes pajzsmirigyszövetekből nyertünk. Az esetekhez tartozó klinikopatológiai adatokat (pl.: életkor, nem, társbetegségek) anonimizált módon, retrospektív lekérdezéssel gyűjtöttük ki a medikai rendszerekből. A következő klinikopatológiai adatokat mindkét kohorsz esetén elemeztük: életkor a diagnózis idején, nem, ATA rizikó pontszám, TNM stádium és tumorstádium. Ezen túlmenően, a génfúziós kohorszban sok további klinikopatológiai jelleget is megvizsgáltunk. Ilyenek voltak: a PTC szövettani szubtípusa, az agresszivitás, az R stádium, a tumorméret, az érinvázió, a perineurális terjedés, a kapszulainvázio, az extrathyreoidális terjedés, a fokalitás, a mikrokarcinóma jelleg, a tumorlokalizáció, az oldaliság, egyes preoperatív képalkotó jellemzők, az elvégzett sebészeti eljárás típusa, az indikált kezelések, a relapszuskészség, a szövödmények és az anamnesztikus adatok, beleértve a társbetegségeket is.

3.3. Molekuláris vizsgálatok

3.3.1. Génfúziók vizsgálata

A vizsgálatok során a következő 23 onkogén génfúzió jelenlétét szűrtük: *ABL1*, *AKT3*, *ALK*, *AXL*, *BRAF*, *EGFR*, *ERBB2*, *ERG*, *ETV1*, *ETV4*, *ETV5*, *FGFR1*, *FGFR2*, *FGFR3*, *MET*, *NTRK1*, *NTRK2*, *NTRK3*, *PDGFRA*, *PPARG*, *RAF1*, *RET*, *ROS1*. Az RNS-izolálás RecoverAll™ nukleinsav izolációs szetten történt. Az Oncomine Focus amplikon könyvtárát az Ion AmpliSeq Library Kit 2.0 segítségével állítottuk elő. A végső könyvtár

koncentrációja QuantStudio eszközön végzett qPCR segítségével került megállapításra. OneTouch eszközön emPCR módszerrel történő mintaelőkészítést követően szekvenálást végeztünk Ion S5 Sequencing Kit használatával. A fenti génfúziók azonosítása érdekében bioinformatikai analízis történt Ion Reporter 5.18 platform segítségével, mely során variánsannotációt és felhőalapú adatelemzést végeztünk. A molekuláris adatgyűjtést követően az eredményeket kiegészítettük a klinikopatológiai adatbázissal, majd statisztikai kiértékelést végeztünk, mely során konvencionális statisztikai eljárások mellett az új, többváltozós analízisekre kifejlesztett *d*-korreláció alapú főkomponens analízist (PCA) is alkalmaztuk.

3.3.2. miRNS-expressziós vizsgálat

A miRNS-ek izolálása az FFPE metszetekből Zymo Quick RNA FFPE készlettel történt. Az RNS koncentrációk meghatározása Qubit™ HS RNA Assay Kit segítségével valósult meg Qubit™ 3.0 fluorometer-en. A könyvtárkészítéshez NEXTFLEX® Small RNA-Seq Kit v4-et alkalmaztunk. A szekvenálás Illumina NextSeq 2000 platformon zajlott. A nyers adatok minőségellenőrzését (FastQC, PEAR, Trim Galore), az adatbázisokra illesztést (Bowtie1) és a kvantifikálást (SAMtools) standard bioinformatikai metodika szerint végeztük. Mivel a miRNS-ek expressziók nagyságrendnyi eltéréseket mutathatnak, az adatainkat logaritmikus skálákon értékeltük. A statisztikai kiértékeléshez R v4.2.1 szoftverkörnyezetet alkalmaztunk. A miRNS expressziós különbségeket DESeq2 csomag segítségével számoltuk. Átfogóbb kiértékelés érdekében a PTC-ben azonosított miRNS expressziós mintázatokat összehasonlítottuk más kórállapotok és biológiai folyamatok molekuláris profiljaival nagy nemzetközi genetikai adatbázisok (KEGG, GeneOntology) bevonásával.

3.4. Irodalomkutatás

Az irodalomkutatást 2024. október 31-ig végeztük az NCBI PubMed adatbázisának felhasználásával. A keresési kifejezéseink a következők voltak: *“papillary thyroid carcinoma”*, *“PTC”*, *“thyroid carcinoma”*, *“fusion mutation”*, *“gene fusion”*, *“miRNA”* és *“microRNA”*.

4. EREDMÉNYEK

4.1. Génfúziók előfordulása és klinikopatológiai összefüggései

A génfúziós kohorszba bevont minták 27%-ban 9 különböző génhez köthetően volt kimutatható fúziós mutáció jelenléte. A leggyakrabban érintett géneknek a *RET* (28,6%) és *NTRK3* (16,3%) mutatkoztak. Ezen onkogének már effektív terápia célpontként is sikeresen alkalmazhatók.

A *d*-korreláció alapján a génfúziók főként egymással, egyes hisztopatológiai változókkal (pl.: mikrokarcinóma karakter, kétoldaliság) és bizonyos társbetegségekkel (pl.: Hashimoto-betegség, hypothyreosis, COPD), valamint a sebészi beavatkozás típusával mutattak pozitív korrelációt.

Az *NTRK3/ETV6* génfúziók mélyebb statisztikai vizsgálatára (logisztikus regresszió) is sor került, mely alapján ezen génfúziók jelenléte szignifikáns összefüggést mutatott a Hashimoto-thyreoiditisszel, az endometriózissal, valamint a teljes pajzsmirigyeltávolítás igényével a féloldali lobektómiával szemben.

A fúziós génmutációval rendelkező páciensek (32-35 év) lényegesen fiatalabbak voltak, a génfúziót nem hordozó betegekhez (48 év) képest.

4.2. miRNS-expressziós profil és klinikopatológiai összefüggések

A miRNS vizsgálati kohorszban a 2656 vizsgált miRNS közül összesen 30 esetén volt szignifikánsan eltérő expresszió a tumorszövet és az egészséges kontroll pajzsmirigyszövet között. Ezek közül 27 miRNS (pl.:

miR-551b-3p, miR-146b-3p, miR-9983-3p, miR-221-3p, miR-222-3p és miR-375-3p) jelentősen túlexpresszált, míg 3 miRNS (miR-206, miR-873-3p és miR-204-3p) alulexpresszált volt a daganatban. A legkifejezettebb eltéréseket a miR-551b-3p, miR-146b-3p, miR-146b-5p, miR-221-3p, miR-375-3p, miR-873-3p és miR-204-3p esetében tapasztaltuk. 582 miRNS típus esetén nem volt kimutatható kifejeződés a pajzsmirigyszövet területén.

A miRNS profil alapján a tumoros és kontroll halmazok egyértelmű elkülönülésének vizualizálása érdekében több különböző adatmegjelenítési módszert alkalmaztunk (főkomponens analízis, vulkán diagram, hőtérkép).

Mind a tumoros, mind a kontroll csoportból származó miRNS-specifikus molekuláris adatainkat összevetettük egyes, a klinikai döntéshozatalban releváns változókkal. Eredményeink alapján több miRNS mutatott szignifikáns összefüggést a beteg TNM stádiumával, valamint az ATA rizikóbesorolásával.

Kiegészítésként, összevetettük a PTC miRNS profilját a KEGG és a GeneOntology adatbázisaiban szereplő, más kórképekben és biológiai folyamatokban leírt molekuláris mintázatokkal. Az eredmények alapján a PTC kialakulása a miRNS kifejeződés szempontjából közös töről eredeztethető bizonyos élettani folyamatokkal (pl.: prosztatatumor patogenezise, növekedési faktorra adott sejtválasz).

4.3. Kitekintés a klinikopatológiai változók egymáshoz való viszonyára

A genetikai eltérésektől függetlenül végzett elemzések igazolták, hogy a klinikai jellemzők többsége a vártnak megfelelően viselkedik: a kisebb méretű, alacsonyabb stádiumú PTC-k ritkábban újulnak ki, míg az előrehaladott, agresszívabb megbetegedések esetén gyakoribb volt a

relapszus. Feltűnő azonban, hogy a molekuláris terápiák alkalmazása jellemzően csak előrehaladott kórképben, súlyosabb klinikai állapotban történt meg, annak ellenére, hogy a *d*-korrelációs elemzés során a molekuláris terápiák célpontjaként szolgáló fúziós mutációk főként a kevésbé agresszív klinikopatológiai jellemzőkkel klasztereződtek. Ez rámutat a molekuláris diagnosztika – és következetesen terápia – korai alkalmazásának lehetséges előnyeire.

5. KÖVETKEZTETÉSEK

1. A PTC-ban előforduló génfüziók — különösen a *RET* és *NTRK3* partnergének — gyakoriak a magyar betegpopulációban, és összefüggés mutatható ki jelenlétük és bizonyos klinikopatológiai tényezők (pl.: Hashimoto-thyreoiditis, fiatalabb életkor, indikált sebészeti beavatkozás) között.
2. A génfüziós mutációk több esetben kevésbé agresszív klinikai jellemzőkkel társultak, ellenben a molekuláris terápiák indikálásának körülményeit. Ez felveti a korai molekuláris diagnosztika indokoltságát akár már a betegség kezdeti szakaszában is.
3. A miRNS-expressziós vizsgálat során számos miRNS (pl.: miR-146b, miR-221, miR-222, miR-204, miR-375) szignifikáns expressziós eltéréseit mutattuk ki PTC-ben, mely eltérések hatékonyan elkülönítik a daganatos és az egészséges szöveteket egymástól. Ez a képesség a citológiai kérdéses esetekben segítheti a differenciáldiagnosztikát.
4. A miRNS-ek expressziós eltérései összefüggést mutatnak egyes klinikai döntéshozatali változókkal, mint a TNM stádium és az ATA rizikó.
5. A KEGG és GeneOntology adatbázisokkal történő összehasonlítás alapján a PTC miRNS expressziós profilja hasonlóságot mutat más kórképekével és élettani folyamatokéval (pl.: egyéb neopláziák). Ez megerősíti a miRNS-ek potenciális szerepét a betegség kialakulásában.
6. A feltárt genetikai eltérések — különösen, ha klinikopatológiai adatokkal kombinálva értékeljük őket — fontos diagnosztikus és prognosztikus értékkel bírnak a PTC tekintetében. Eredményeink alátámasztják a rutinszerűbb molekuláris profilalkotás relevanciáját a mindennapi klinikai döntéshozatalban.

6. PUBLIKÁCIÓK

Értekezés témájához közvetlenül kapcsolódó saját közlemények:

1. **Armos, Richard** ; Bojtor, Bence ; Podani, Janos ; Illyes, Ildiko ; Balla, Bernadett ; Putz, Zsuzsanna ; Kiss, Andras ; Kohanka, Andrea ; Toth, Erika ; Takacs, Istvan ; Kosa, Janos P. ; Lakatos Peter
Descriptive Analysis of Common Fusion Mutations in Papillary Thyroid Carcinoma in Hungary
INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES
25 : 19 Paper: 10787 , 19 p. (2024)
IF: 4,9
2. **Armos, Richard** ; Bojtor, Bence ; Papp, Marton ; Illyes, Ildiko ; Lengyel, Balazs ; Kiss, Andras ; Szili, Balazs ; Tobias, Balint ; Balla, Bernadett ; Piko, Henriett ; Illes, Anett ; Putz, Zsuzsanna ; Kiss, Andras ; Toth, Erika ; Takacs, Istvan ; Kosa, Janos P. ; Lakatos, Peter
MicroRNA Profiling in Papillary Thyroid Cancer
INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES
25 : 17 Paper: 9362 , 21 p. (2024)
IF: 4,9

Értekezés témájától független saját közlemények:

1. Bojtor, Bence ; Vaszilko, Mihaly ; **Armos, Richard** ; Tobias, Balint ; Podani, Janos ; Szentpeteri, Szofia ; Balla, Bernadett ; Lengyel, Balazs ; Piko, Henriett ; Illes, Anett ; Kiss, Andras ; Putz, Zsuzsanna ; Takacs, Istvan ; Kosa, Janos P. ; Lakatos, Peter
Analysis of SIRT1 Gene SNPs and Clinical Characteristics in Medication-Related Osteonecrosis of the Jaw
INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES
25 : 7 Paper: 3646 , 11 p. (2024)
2. Stempler, Márk ; Bakos, Bence ; Solymosi, Tibor ; Kiss, András ; **Ármós, Richárd Levente** ; Szili, Balázs ; Mészáros, Szilvia ; Tőke, Judit ; Szűcs, Nikolette ; Reismann, Péter ; Péter, Pusztai ; Lakatos, Péter András ; Takács, István
Analysis of factors influencing the dose of levothyroxine treatment in adequately controlled hypothyroid patients of different etiologies
HELIYON 10 : 20 Paper: e39639 , 8 p. (2024)
3. Kiss, András ; Szili, Balázs* ; Bakos, Bence ; **Ármós, Richárd** ; Putz, Zsuzsanna ; Árvai, Kristóf ; Kocsis-Deák, Barbara ; Tobiás, Bálint ; Balla, Bernadett ; Pikó, Henriett ; Dank, Magdolna ; Kósa, János Pál ; Takács, István ; Lakatos, Péter
Comparison of surgical strategies in the treatment of low-risk differentiated thyroid cancer
BMC ENDOCRINE DISORDERS 23 : 1 Paper: 23 , 7 p. (2023)

4. Bakos, Bence ; Kiss, András* ; Árvai, Kristóf* ; Szili, Balázs ;
Kocsis-Deák, Barbara ; Tobiás, Bálint ; Putz, Zsuzsanna ; **Ármós,
Richárd** ; Balla, Bernadett ; Kósa, János ; Dank, Magdolna ;
Valkusz, Zsuzsanna ; Takács, István ; Tabák, Ádám ; Lakatos,
Péter
Co-occurrence of thyroid and breast cancer is associated with an
increased oncogenic SNP burden
BMC CANCER 21 : 1 Paper: 706 , 11 p. (2021)
5. **Ármós, Richárd Levente**
A TRK fehérjék fúziójának szerepe pajzsmirigydaganatok
kialakulásában és felhasználásuk terápiás célpontként
ORVOSTOVÁBBKÉPZŐ SZEMLE 28 : 1 pp. 27-31. , 5 p. (2021)
6. Stempler, M ; Bakos, B ; Kiss, A ; **Ármós, R** ; Solymosi, T ;
Takács, I
LEVOTHYROXINKEZELÉST BEFOLYÁSOLÓ TÉNYEZŐK
VIZSGÁLATA
MAGYAR BELORVOSI ARCHIVUM 76 : 5-6 pp. 331-331. , 1 p.
(2023)
7. Bojtor, Bence ; Balla, Bernadett ; Vaszilkó, Mihály ; **Ármós,
Richárd** ; Tóbiás, Bálint ; Szentpéteri, Szófia ; Lengyel, Balázs ;
Pikó, Henriett ; Illés, Anett ; Putz, Zsuzsanna ; Kiss, András ;
Takács, István ; Kósa, János ; Lakatos, Péter
A gyógyszer indukálta állcsontnekrozis genetikai háttere
ORVOSTOVÁBBKÉPZŐ SZEMLE 31 : 4 pp. 72-78. , 7 p. (2024)

ΣIF: 25.54