

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY**

(19) **PL**

(11) **237807**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **393389**

(22) Data zgłoszenia: **22.12.2010**

(51) Int.Cl.

G01N 33/577 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

(54) **Sposób różnicowania zmian nowotworowych tarczycy oraz zastosowanie metalotioneiny (MT) do różnicowania zmian nowotworowych tarczycy**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:
02.07.2012 BUP 14/12

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:
31.05.2021 WUP 11/21

(73) Uprawniony z patentu:

**SIEĆ BADAWCZA ŁUKASIEWICZ – PORT
POLSKI OŚRODEK ROZWOJU TECHNOLOGII,
Wrocław, PL**

(72) Twórca(y) wynalazku:

**PIOTR DZIĘGIEL, Wrocław, PL
MARZENA PODHORSKA-OKOŁÓW,
Wrocław, PL
ANNA KRÓLICKA, Wrocław, PL
CHRISTOPHER KOBIERZYCKI, Wrocław, PL
BARTOSZ PUŁA, Wrocław, PL
ALEKSANDRA PIOTROWSKA, Wrocław, PL**

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Piotr Godlewski

PL 237807 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest sposób różnicowania zmian nowotworowych tarczycy obejmujących gruczolaka pęcherzykowego i raka pęcherzykowego oraz zastosowanie metalotioneiny do różnicowania zmian nowotworowych tarczycy ww. typów. Przedmiotowy wynalazek należy do dziedziny diagnozowania i różnicowania nowotworów tarczycy z wykorzystaniem metod immunohistochemicznych.

Raki tarczycy są najczęstszymi nowotworami układu endokrynnego. Z komórek pęcherzyków tarczycy rozwijają się raki wysokorozóżnicowane (brodawkowaty i pęcherzykowy), występujące najczęściej u osób młodych, oraz niskorozóżnicowane raki anaplastyczne, występujące zwykle u ludzi po 60. roku życia. Rak brodawkowaty stanowi 70–80% nowotworów tarczycy i jest uważany za najłagodniejszą postać spośród raków tego narządu. Z kolei rak pęcherzykowy stanowi 5–15% raków gruczołu tarczowego. Z powodu trudności w odróżnieniu go od gruczolaka pęcherzykowego, który jest zmianą łagodną, stosuje się względem obu opisanych zmian termin guza pęcherzykowego. Ich różnicowanie możliwe jest wyłącznie w preparacie pooperacyjnym, natomiast zmiany te są nie do odróżnienia w celowanej biopsji cienkoigłowej.

Do grupy najczęściej oznaczanych markerów proliferacyjnych należy Ki-67. Wykazano wysoką ekspresję Ki-67 w rakach m.in. gruczołu sutkowego, płuc, prostaty, guzach tkanek miękkich oraz mózgu, jednak jego biologiczna funkcja nadal pozostaje nie do końca poznana. W wielu dotychczas opublikowanych pracach porównywano ekspresję metalotioneiny (MT) i antygenu Ki-67 w różnych typach nowotworów. Badano dotychczas nowotwory jelita grubego, kory nadnerczy, jamy ustnej, prostaty, gruczołu piersiowego, jajnika, mięsaki tkanek miękkich oraz niedrobnokomórkowe raki płuc. W większości badań zaobserwowano wyraźną korelację między ekspresją MT a antygenem Ki-67. Niemniej jednak dotychczasowe prace nad ekspresją MT i jej izoform w łagodnych i złośliwych zmianach gruczołu tarczowego prezentują często niejednoznaczne wyniki.

Ze stanu techniki znana jest publikacja Fenario i wsp. (Fenario C, Lavagni P, Gariboldi M, Miranda C, Losa M, Cleris L, Formelli F, Pilotti S, Pierotti MA and Greco A: Metallothionein IG acts as an oncosuppressor in papillary thyroid carcinoma. *Lab Invest* 88: 474–481, 2008, w której autorzy wykazali spadek ekspresji funkcjonalnych izoform MT w raku brodawkowatym (MT1E, MT1C, MT1F oraz MT2A) oraz w oparciu o model komórkowy wskazali na możliwą rolę MT-1G jako supresora rozwoju procesu nowotworowego. Publikacja odnosiła się jedynie do problemu różnicowania zmian złośliwych typu rak brodawkowaty i rak pęcherzykowy, natomiast nie poruszała problemu diagnostycznego gruczolaka pęcherzykowego i raka pęcherzykowego. Praca Huang Y. ujawnia, iż do spadku ekspresji MT-1G w raku brodawkowatym gruczołu tarczowego dochodzi na skutek hipermetylacji promotora tego genu (Huang Y, de la Chapelle A and Pellegata NS: Hypermethylation, but not LOH, is associated with the low expression of MT1G and CRABP1 in papillary thyroid carcinoma. *Int J Cancer* 104: 735–744, 2003). W pracy Huang Y. przedstawiono wyniki badań na tkankach zdrowych tarczycy oraz raku brodawkowatym i jego wariacie pęcherzykowym (FVPTC), nie dostarczono jednakże obserwacji na temat gruczolaka pęcherzykowego oraz możliwości diagnozowania tego typu względem raka pęcherzykowego. Badania Liu i wsp. dowodzą, iż każda z 8 funkcjonalnych izoform MT może ulec ekspresji pod wpływem stymulującego działanie kadmu oraz aktywacji kinaz ERK1/2 w komórkach raka brodawkowatego tarczycy. Komórki, w których ekspresji uległy te izoformy cechowały się krótszą fazą G1 oraz szybszym przejściem w fazę S oraz M cyklu komórkowego (Liu ZM, Hasselt CA, Song FZ, Vlantis AC, Cherian MG, Koropatnick I and Chen GG: Expression of functional metallothionein isoforms in papillary thyroid cancer. *Mol Cell Endocrinol* 302: 92–98, 2009). Badania przeprowadzone przez Liu i wsp. w zakresie ekspresji metalotioneiny w nowotworze tarczycy zostały przeprowadzone jedynie na jednej linii komórkowej raka brodawkowatego (KAT5) wyizolowanej z materiału pochodzącego od jednego pacjenta. Praca nie dostarcza wyników z badań na materiale klinicznym od różnych pacjentów, co mogłoby zapewnić różnorodność przypadków i zobrazować stan faktyczny. Autorzy publikacji nie poruszają także problemu diagnostycznego gruczolaka pęcherzykowego w odniesieniu do raka pęcherzykowego i skupiają się na analizie mechanizmów regulujących poziom ekspresji MT w linii raka brodawkowatego.

Do indukcji izoform MT dochodzi również w komórkach raka anaplastycznego tarczycy pod wpływem jonów wapnia, gdzie ich zwiększona ekspresja skutkowała również skróceniem bazy G1 cyklu (Liu ZM, Chen GG, Shum CK, Vlantis AC, Cherian MG, Koropatnick J and van Hasselt CA: Induction of functional MT1 and MT2 isoforms by calcium in anaplastic thyroid carcinoma cells.

FEBS Lett. 581: 2465–2472, 2007). Badania przeprowadzone w tym zakresie również nie poruszają kwestii możliwości różnicowania raka pęcherzykowego względem gruczolaka pęcherzykowego z wykorzystaniem pomiaru poziomu ekspresji MT.

Istnieje więc potrzeba dostarczenia efektywnego markera dla zmian nowotworowych tarczycy typu gruczolak pęcherzykowy i rak pęcherzykowy ułatwiającego postawienie trafnej diagnozy i podjęcie odpowiednich działań terapeutycznych. Pomimo wieloletnich badań nad funkcją białka metalotioneiny w różnych typach nowotworów złośliwych nie potwierdzono jednoznacznie jej wysokiej wartości prognostycznej i rokowniczej dla rzeczonych typów nowotworów tarczycy.

Przedmiotem wynalazku jest sposób różnicowania gruczolaka pęcherzykowego i raka pęcherzykowego tarczycy prowadzony w warunkach *in vitro*, charakteryzujący się tym, że w próbce tkanki nowotworowej pochodzącej od pacjenta bada się ekspresję białka metalotioneiny (MT) metodą immunohistochemiczną z użyciem przeciwciał monoklonalnych anty-MT-I/-II, ocenia się stopień nasilenia ekspresji metalotioneiny w mikroskopie świetlnym półilościową metodą IRS wg Remmele, przy czym gdy stopień nasilenia ekspresji metalotioneiny jest równy lub większy 8 na półilościowej skali IRS stwierdza się wówczas obecność raka pęcherzykowego.

Korzystnie, bada się ekspresję izoform metalotioneiny MT-I i MT-II.

Korzystnie, ekspresję metalotioneiny bada się w materiale od pacjenta po zabiegu usunięcia gruczołu tarczowego wraz z guzem.

W innej korzystnej realizacji wynalazku obecność raka pęcherzykowego lub gruczolaka pęcherzykowego stwierdza się przy jednoczesnym adekwatnym obrazie histopatologicznym dla ww. zmian.

Innym przedmiotem wynalazku jest zastosowanie metalotioneiny do różnicowania nowotworów tarczycy typu rak pęcherzykowy i gruczolak pęcherzykowy.

Korzystnie, izoformy metalotioneiny oznaczają MT-I i MT II.

Metalotioneiny (MT) są rodziną białek o małej masie cząsteczkowej, a ich obecność wykazano głównie w organizmach zwierzęcych. Są one wysoko konserwatywne i występują w postaci 4 głównych izoform o różnym umiejscowieniu zarówno w tkankach zdrowych i nowotworowych. Łańcuch polipeptydowy MT jest zbudowany z 61 do 68 aminokwasów (zależnie od izoformy), z których 30% reszt aminokwasowych stanowią reszty cysteiny. Cząsteczka MT składa się z dwóch domen połączonych dimerem lizynowym. Fizjologiczną rolą MT jest wiązanie i transport jonów cynku i miedzi oraz detoksykacja organizmu (poprzez wiązanie) z metali ciężkich, np. kadmu, rtęci i ołowiu. W komórkach intensywnie dzielących się (m.in. komórkach nowotworowych) zaobserwowano wzrost ekspresji MT dostarczających jonów cynku (Zn) dla enzymów biorących udział w procesie replikacji DNA, a także wzrost ekspresji MT chroniących komórki przed apoptozą. MT mogą wpływać również na działanie niektórych chemioterapeutyków (dezaktywują wolne rodniki tworzone w wyniku metabolizmu niektórych cytostatyków np. antracyklin, a z innymi mogą się wiązać jak np. cisplatyna). Różnica w ekspresji MT między gruczolakiem pęcherzykowym i rakiem pęcherzykowym wskazuje na możliwość wykorzystania MT jako pomocniczego markera w różnicowaniu ww. zmian. MT jest też o wiele lepszym markerem diagnostycznym różnicującym zmiany typu gruczolak pęcherzykowy oraz rak pęcherzykowy w porównaniu do Ki-67, gdyż między tymi guzami występuje istotna statystycznie różnica w ekspresji MT. Brak natomiast takich istotnych różnic w ekspresji antygenu Ki-67. Zastosowanie przedmiotowej metody diagnostycznej stanowi pomocniczą metodę dla trudnej diagnostyki histopatologicznej tych dwóch zmian rozrostowych tarczycy.

Przedmiot wynalazku w przykładzie realizacji uwidoczniono na figurach, gdzie Fig. 1 przedstawia ekspresję jądrowo-cytoplazmatyczną MT w gruczolaku pęcherzykowym (1A) i raku pęcherzykowym (1B) oraz ekspresję jądrową antygenu Ki-67 w gruczolaku pęcherzykowym (1C) i raku pęcherzykowym (1D). Fig. 2 przedstawia nasilenie ekspresji MT w różnych typach zmian tarczycy. Znaczącą statystycznie różnicę wykazano pomiędzy rakiem pęcherzykowym a rakiem brodawkowatym ($p < 0,001$) oraz gruczolakiem pęcherzykowym ($p < 0,05$). Istotna statystycznie wyższa ekspresja wykazana została również pomiędzy rakiem pęcherzykowym oraz rakiem rdzeniastym (Fig. 2; $p < 0,0001$). Istotnie statystycznie mniejszą ekspresję w stosunku do wola guzowatego zaobserwowano dla raka brodawkowatego ($p < 0,0001$) oraz raka rdzeniastego ($p < 0,005$). Fig. 3 przedstawia nasilenie ekspresji antygenu Ki-67 w różnych typach zmian tarczycy. Znaczącą statystycznie różnicę zaobserwowano między rakiem rdzeniastym a gruczolakiem pęcherzykowym ($p < 0,05$) oraz rakiem rdzeniastym a wolem guzowatym ($p < 0,05$).

Wynalazek ilustruje niżej podany przykład.

Do badań wykorzystano 186 bloczków parafinowych różnych zmian tarczycy otrzymanych z Zakładu Patomorfologii Akademii Medycznej we Wrocławiu. Badane bloczki zawierały 92 przypadki raków, w tym: 48 raków brodawkowatych, 35 raków pęcherzykowych, 9 raków rdzeniastych, 31 gruczolaków oraz 63 przypadki wola guzowatego tarczycy.

A. Immunohistochemia

Wycinki z guzów zostały utrwalone w roztworze 10% zbuforowanej formaliny, odwodnione a następnie zatopione w bloczkach parafinowych. Wszystkie reakcje immunohistochemiczne (IHC) zostały przeprowadzone na skrawkach parafinowych o grubości 4 μm , odparafinowanych w ksylenie i nawodnionych. W przypadku reakcji IHC anty-Ki-67 skrawki były inkubowane w buforze cytrynianowym (pH 6, 10 mM) w temperaturze 95–98°C przez 20 minut celem odsłonięcia epitopów. Aktywność endogennej peroksydazy została zablokowana przez 5-minutową inkubację z 3% roztworem H_2O_2 . Ekspresja MT-I/-II (Klon E9) i Ki-67 (Klon MIB-1) została wykazana przy użyciu mysich przeciwciał monoklonalnych firmy DakoCytomation (Glostrup, Dania). Badane antygeny zostały uwidocznione przy użyciu biotynylowanych przeciwciał oraz streptawidyny koniugowanej z peroksydazą chrzanową (DakoCytomation LSAB+ System-HRP). Jako substratu użyto diaminobenzydyny (DAB, DakoCytomation). Wszystkie reakcje zostały przeprowadzone z zastosowaniem kontroli negatywnej. Wszystkie preparaty zostały poddane barwieniu kontrastującemu hematoksyliną.

B. Ocena nasilenia reakcji IHC

Do oceny nasilenia ekspresji MT wykorzystano półilościową metodę IRS wg Remmele, w której brano pod uwagę intensywność reakcji barwnej oraz odsetek pozytywnych komórek nowotworowych w preparacie. Skala ta ma zakres 0–12 punktów: 0 – brak reakcji, 1–2 – słaba reakcja, 3–4 – umiarkowanie silna reakcja, 6–12 – silna reakcja. Nasilenie ekspresji antygenu Ki-67 w komórkach nowotworowych było oceniane wg skali określającej odsetek pozytywnych komórek nowotworowych w stosunku do wszystkich komórek nowotworowych. Skala ta przyjmuje następujące wartości: 0 pkt – brak reakcji, 1 pkt – 1–10%, 2 pkt – 11–25%, 3 pkt – 26–50%, 4 pkt – >50%.

C. Analiza statystyczna

Uzyskane wyniki zostały poddane analizie statystycznej z użyciem programu Prism 5.0 (GraphPad, CA, USA). Zastosowane zostały testy korelacji Spearmana, test Kiuskall-Wallis'a oraz test U Mann-Whitney'a. Różnice istotne statystycznie uznano dla $p < 0,05$.

Spośród badanych 186 zmian gruczołu tarczowego, w 180 (96,79%) stwierdzono jądrowo-cytoplazmatyczną ekspresję MT (Fig. 1A, 1B). Wysoka ekspresja MT (6–12 pkt) została wykazana w: 73% przypadków zmian typu wola guzowatego, 70,9% przypadków gruczolaka pęcherzykowego (Fig. 1A), 45,8% przypadków raka brodawkowatego oraz 85,7% raka pęcherzykowego (Fig. 1B). Wysoką ekspresję MT stwierdzono w 33% przypadków raka rdzeniastego.

Największa ekspresja MT została odnotowana w rakach pęcherzykowych ($9,14 \pm 3,32$), niższa, lecz wciąż znacząca w wolu guzowatym ($7,25 \pm 3,41$), gruczolaku pęcherzykowym ($6,54 \pm 3,40$) natomiast najniższa w raku brodawkowatym ($4,47 \pm 3,14$) oraz raku rdzeniastym ($3,22 \pm 2,54$). Zaobserwowano istotną statystycznie różnicę ekspresji MT między poszczególnymi zmianami tarczycy (Fig. 2).

Zauważono istotną statystycznie różnicę pomiędzy nasileniem ekspresji MT w rakach pęcherzykowych (Fig. 1B) oraz gruczolakach pęcherzykowych (Fig. 1A), które są trudne w różnicowaniu histopatologicznym (Fig. 2; $p < 0,05$). Istotnie statystycznie wyższa ekspresja wykazana została pomiędzy rakiem brodawkowatym a rakiem pęcherzykowym (Fig. 2; $p < 0,0001$) oraz rakiem rdzeniastym (Fig. 2; $p < 0,0001$). Istotnie statystycznie mniejszą ekspresję w stosunku do wola guzowatego zaobserwowano dla raka brodawkowatego (Fig. 2; $p < 0,0001$) oraz raka rdzeniastego (Fig. 2; $p < 0,005$).

Pośród 131 zbadanych zmian, w 118 wykryto jądrową ekspresję antygenu Ki-67. Najwyższą ekspresję (Figura 3) odnotowano w raku pęcherzykowym ($1,13 \pm 0,92$), niewiele niższe w gruczolaku pęcherzykowym ($1,08 \pm 0,4$), raku brodawkowatym ($1,05 \pm 0,52$) i wolu guzowatym ($1,05 \pm 0,22$) oraz najniższą w raku rdzeniastym ($0,56 \pm 0,53$).

Nie zaobserwowano różnicy istotnej statystycznie w stopniu nasilenia ekspresji antygenu Ki-67 między gruczolakiem pęcherzykowym (Fig. 1C) i rakiem pęcherzykowym (Fig. 1D). Istotną statystycznie różnicę ekspresji dla tego antygenu wykryto pomiędzy rakiem rdzeniastym i wolem guzowatym ($p < 0,05$), oraz między rakiem rdzeniastym a gruczolakiem pęcherzykowym ($p < 0,05$) (Fig. 3).

Zależność ekspresji metalotioneiny i antygenu Ki-67 w zmianach typu adenoma folliculare oraz carcinoma folliculare zbadana testem Speaimana wykazała brak korelacji ww. antygenów ($r = 0,12$; $p > 0,05$).

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób różnicowania gruczolaka pęcherzykowego od raka pęcherzykowego tarczycy, prowadzony w warunkach *in vitro*, **znamienny tym**, że:
 - a) w próbce tkanki nowotworowej pochodzącej od pacjenta mierzy się ekspresję izoform MT-I i MT-II białka metalotioneiny (MT) za pomocą metod immunohistochemicznych z użyciem przeciwciał monoklonalnych anti-MT,
 - b) stopień ekspresji MT-I i MT-II mierzy się w mikroskopie świetlnym stosując metodę IRS Remmele,przy czym gdy stopień nasilenia ekspresji metalotioneiny jest równy lub większy 8 na skali IRS stwierdza się obecność raka pęcherzykowego.
2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że ekspresję MT-I i MT-II bada się w materiale od pacjenta.
3. Sposób według zastrz. 1 albo 2, **znamienny tym**, że obecność raka pęcherzykowego lub gruczolaka pęcherzykowego stwierdza się przy jednoczesnym adekwatnym obrazie histopatologicznym dla ww. zmian.
4. Zastosowanie izoform MT-I i MT-II metalotioneiny do różnicowania *in vitro* raka pęcherzykowego od gruczolaka pęcherzykowego tarczycy jak określono w zastrz. od 1 do 3.

Rysunki

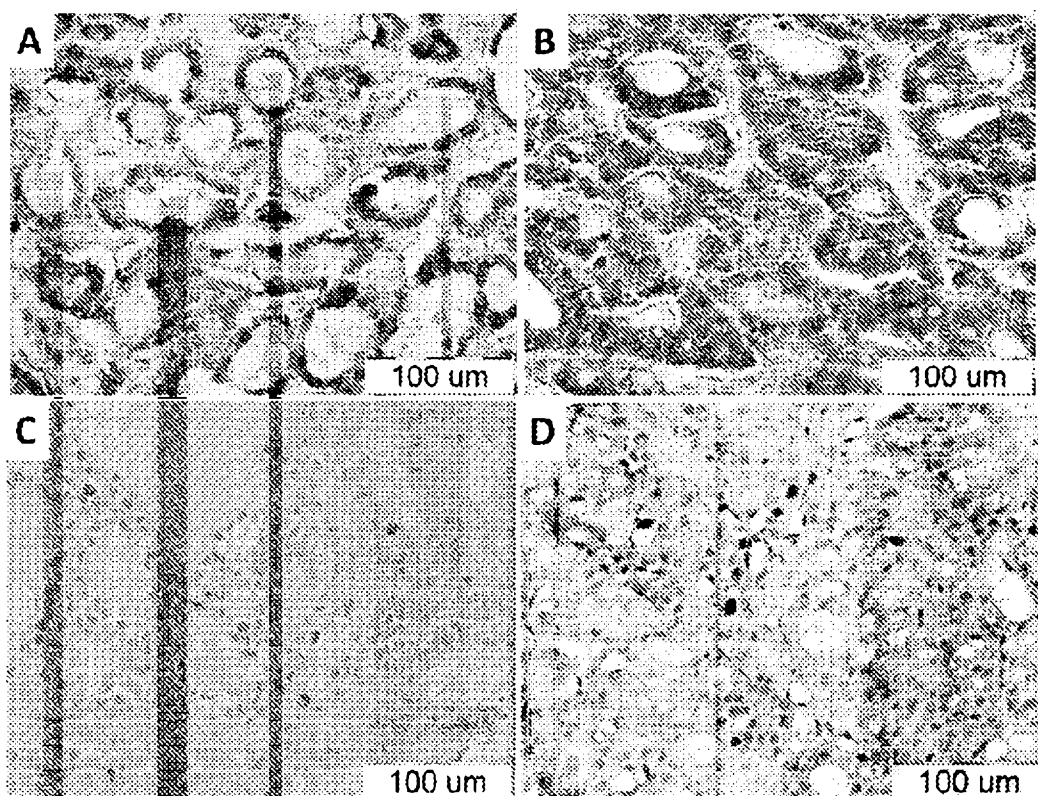


Fig. 1

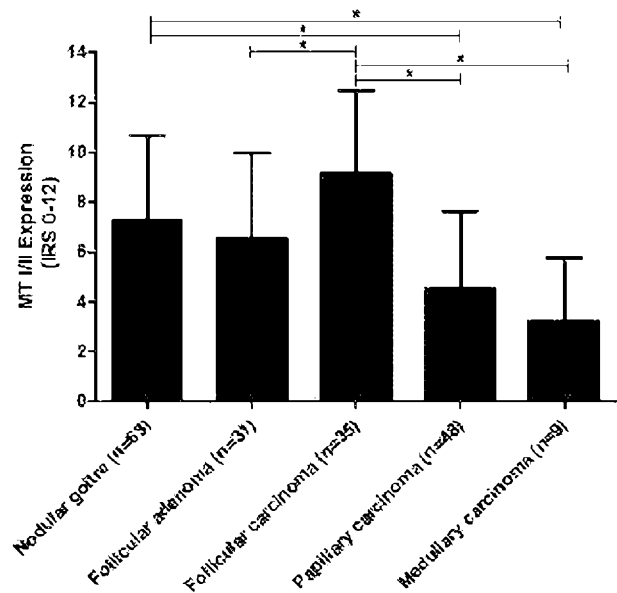


Fig. 2

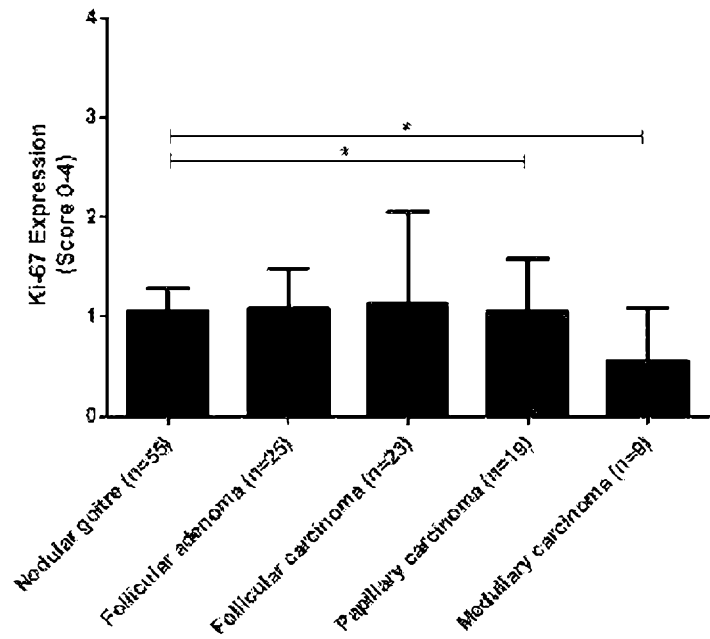


Fig. 3